

行政院環境保護署

104 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

地下水污染環境法醫： 發展高通量微生物偵測技術

期末報告(修訂稿)

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 博士
專案執行期間：103 年 12 月 01 日起至
104 年 11 月 30 日止

中華民國 104 年 10 月 印製

行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究及模場試驗專案」

期中報告初審意見對照表

計畫年度	104 年度	計畫類型	☒ 研究計畫 ☐ 現地試驗
計畫類別	☒ 調查 ☐ 整治復育 ☐ 評估 ☐ 底泥	主持人：吳哲宏 NO：08	
計畫名稱	地下水污染環境法醫：發展高通量微生物偵測技術		
委員審查意見		計畫單位回覆	
委員一	1. 已達預定之工作進度與目標。 2. 期中報告撰寫完整清楚，後續工作也有具體之規劃。	1. 謝謝委員給予肯定。 2. 謝謝委員給予肯定。	
委員二	1. 本研究導入高通量次世代定序與階層寡核苷酸引子延伸等分子生物分析技術，分析多氯乙烯地下水污染場址菌群結構與還原脫氯菌豐富度，以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，結合多氯乙烯在厭氧還原脫氯過程微生物動態的關聯性，發展微生物追蹤法醫技術，研究結果可提供多氯乙烯生物整治所需的微生物學資訊。 2. 主要成果符合計畫書之內容，目前進度並無落後情形。 3. 高通量次世代定序與階層寡核苷酸引子延伸等技術需在文獻回顧中做較完整說明。 4. 可說明本研究其實用性和應用價值，建議後續工作可補充如何進行實場應用。	1. 謝謝委員給予肯定。 2. 謝謝委員給予肯定。 3. 謝謝委員建議。階層寡核苷酸引子延伸技術原理已於 3.5 節(第 12 頁)中呈現，其應用之相關文獻回顧亦整理於 3.7 節第五段到六段，另補充階層寡核苷酸引子延伸技術應用於藍綠菌、甲烷菌、及戴奧辛分解菌之研究成果(第七段(第 20 頁))。 高通量次世代定序分析技術應用於地下水污染之相關文獻已補充於第三章文獻探討的 3.6 節(第 13-17 頁)中。 4. 謝謝委員建議。HOPE 技術將可提供工程顧問公司、檢測單位和污染整治業者快速了解現場污染狀態，擬定最佳整治策略與方法。於 6.1.3 節第二段(第 36 頁)補充。	
委員四	1. 確實已依計畫書項目執行。	1. 謝謝委員給予肯定。	

	2. 已建立 HOPE 分析平台，能有效偵測脫氯菌種族群及次要族群菌種。另以此技術已在台南多氯乙烯污染場址測試成效不錯。亦測試其偵測極限（1-3% 菌種即可測試）。 3. 後續研究主軸亦已提出。	2. 謝謝委員給予肯定。未來，我們將於期末報告中呈現不同污染場址的分析結果，並搭配傳統物化參數進行整體性的關聯性分析。 3. 謝謝委員給予肯定。
委員五	1. 執行現況、流程及方法的說明具體詳盡。 2. 計畫後續執行工作項目及內容已於第 7 章簡要說明。 3. 計畫執行進度與預定進度相符，已有初步的成果。 4. 建議討論本計畫與與國科會（科技部）前期計畫的成果與意義。 5. 前期計畫所獲的研究成果如何於本計畫中應用？建議說明。 6. 6.1.2 節的成果建議更具體討論。 7. 目前的實驗室成果與現場的水樣（6.1.3 節）的應用建議討論（應用條件為何？如何使 6.1.4 節更具有實務意義？）。	1. 謝謝委員給予肯定。 2. 謝謝委員給予肯定。 3. 謝謝委員給予肯定。 4. 本研究計畫主要針對地下水脫氯微生物族群發展高通量偵測技術，是首次提出計畫構想並向土基會申請，並未向其他單位申請。待本計畫期末完成實際樣本分析，相關數據將與本團隊之前研究結果(水質微生物、甲烷菌等)進行比較，並於期末報告中說明。 5. 本團隊已應用 HOPE 與 NGS 技術，結合多變量分析相關之統計學工具，分析水質微生物、甲烷菌等環工程序中重要指標菌群。此研究方法亦將於本計畫中研究脫氯菌與環境參數之關聯性，相關結果將待所有數據收集後進行分析，並於期末報告中討論說明。 6. 謝謝委員建議。已於 6.1.2 節(第 33 頁)第三段補充。 7. 謝謝委員建議。已於 6.1.3 節第二段(第 36 頁)中補充 HOPE 偵測結果討論，連結水質數據與脫氯族群的關聯性。 HOPE 偵測技術開發完成後，將能以設定好的分析條件應用於多氯乙烯污染場址的調查，並以 Set 1 和 Set 2 兩種不同策略互相搭配以提高偵測極限。
本署意見	請檢附缺失項目自評表。	已於期中報告修定稿第 49 頁中加入。

行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究及模場試驗專案」

期末報告初審意見對照表

計畫年度	104 年度	計畫類型	☒ 研究計畫 ☐ 現地試驗
計畫類別	☒ 調查 ☐ 整治復育 ☐ 評估 ☐ 底泥	主持人：吳哲宏 NO：08	
計畫名稱	地下水污染環境法醫：發展高通量微生物偵測技術		
委員審查意見		計畫單位回覆	
委員一	1. 已完成預定的工作項目。 2. 期末報告撰寫完整清楚。	1. 謝謝委員給予肯定。 2. 謝謝委員給予肯定。	
委員二	1. 本研究導入高通量次世代定序與階層寡核苷酸引子延伸等分子生物分析技術，分析多氯乙烯地下水污染場址菌群結構與還原脫氯菌豐富度，以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，結合多氯乙烯在厭氧還原脫氯過程微生物動態的關聯性，發展微生物追蹤法醫技術，相關研究結果並提供多氯乙烯生物整治所需的微生物學資訊。	1. 謝謝委員給予肯定。	
	2. 此分子生物分析技術應具實場應用性。	2. 謝謝委員給予肯定。	
	3. 本計畫整體研究成果符合預期，主要成果符合計畫書之內容。	3. 謝謝委員給予肯定。	
委員四	1. 期末報告格式均依規定撰寫，符合規定。	1. 謝謝委員給予肯定。	
	2. 研究項目及進度符合計畫內容，已達到計畫目標。	2. 謝謝委員給予肯定。	
	3. 初步成果已達預期。運用 HTS 高通量定序技術與 HOPE 分析技術已能快速偵測氯乙烯污染物 4 個脫氯菌群。	3. 謝謝委員給予肯定。	
	4. 未來可依初步成果應用於污染實場之操作試驗之可行性。	4. 謝謝委員給予肯定。	
委員五	1. 6.3.5 節：“...要找到...指標均群...仍有困難”，但此問題正是本計畫的目標(原計畫的研究目的之一)，建議再仔細評	1. 謝謝委員的指教。 2. 本計畫研究成果發現 <i>Geobacter</i> 可能與多氯乙烯的污染程度有關。 3. 可能是由於收集的樣本數量仍不足、或地	

	估各場址的物化與生物特性(例如: 取樣時該場址是未改善? 改善中? 改善的作為? 方式? 操作條件? 添加物?...)	層微生物多樣性複雜, 在分類階層門(phylum)下的解析結果, 不同場址不同污染程度的指標菌並不一致, 顯示地層菌群結構可能具有場址特異性。 4. 除了增加樣本的數量, 未來可朝向分析土水菌群的 RNA, 更能代表菌群活性與污染情況間之關聯性 (p.58)。
2.	場址的物化特性對研究成果解讀的影響為何? 建議討論。	於 6.3.5 中第二段進行補充說明。多氯乙烯的 TT 場址和 MJ 場址可推測 <i>Geobacter</i> 和污染程度有關聯, 但未來仍需持續累積場址的分析資料庫進行驗證。
3.	各場址的物化特性與菌群間的關係的合理性為何? 該場址的物化特性若與菌群間的關係原本即不合理, 則再探討其相關性就可能獲得不合理的組合, 勉強評估極可能得到錯誤的結論。	謝謝委員寶貴的意見, 本計畫已盡可能收集並確認場址的各種資訊。
4.	選 TT 場址為植種源: TT 場址事前已觀測到脫氯反應? 若不, 則添加的意義為何? 若是, 則未能觀測到的原因為何?	1. TT 場址長年受單一含氯化合物三氯乙烯的污染, 但從表 6.4 中多氯乙烯的組成卻觀察到有二氯乙烯和氯乙烯的生成, 代表脫氯反應正在發生。根據次世代分析結果, 可偵測到 <i>Dehalobacter</i> 、 <i>Desulfitobacterium</i> 、 <i>Geobacter</i> 、 <i>Dehalogenimonas</i> 和 <i>Anaeromyxobacter</i> 等目前已知的脫氯菌群, 因此選定該場址作為植種源。 2. 可能因為地下環境複雜與不均勻, 在採集土壤時未取到富含脫氯菌的區域, 或土柱保存較久, 導致需要很長時間才能優勢化脫氯菌。
5.	似乎對各測試場址的物化與其他水文水質條件均未能掌握? 是否是本計畫得到“...要找到...指標均群...仍有困難”的主要原因? 建議評估	地下水、地層環境複雜度、採樣代表性、以及次世代定序的定序深度等問題均可能是原因。另外, 計畫規模亦是利用高通量定序技術的限制。
6.	計畫執行進度與預定進度相符。	謝謝委員給予肯定。
7.	進度並無落後。	謝謝委員給予肯定。
8.	執行現況、研究流程及方法說明具體。	謝謝委員給予肯定。
9.	如果實務上要應用本成果, 建議提供一可供參考的評估與操作流程, 及必要的操控檢測參數。	本計畫已發展出脫氯菌的 HOPE 分析方法, 此法相當簡單、快速, 且分析成本不高, 實務上應用可參考本計畫建立的分析流程與實驗條件。然而次世代高通量定序法則由於分析成本高, 實務上若僅用於偵測脫氯菌, 效

		益不高。
本署意見	1. 請檢附修正、期中審查意見。	1. 將依要求附上資料。
	2. P.23 頁請修正圖標題。	2. 依要求修正完畢。

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 ☐ 評估 ☐ 底泥					
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					
計畫主持人		吳哲宏		職等／職稱		副教授	
專案名稱	中文	地下水污染環境法醫：發展高通量微生物偵測技術					
	英文	Environmental Forensics for Groundwater Pollution Using High-throughput Microbiology Detection as Toolbox					
	關鍵字	環境法醫、多氯乙烯、高通量微生物偵測技術、生物復育					
執行期程		自 民 國 1 0 3 年 1 2 月 1 日 起 至 民 國 1 0 4 年 1 1 月 3 0 日 止					
計畫主持人		姓名：吳哲宏 Email： 專線：06-2757575#65839 enewujh@mail.ncku.edu.tw 手機：					
專任助理		姓名：邱銘峻 Email： 專線： p58991046@mail.ncku.edu.tw 手機：0953803362					
經費分析表		專 案 預 估 經 費		金 額		編列說明	
		1.	人事費用	467,740		(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	615,845		(與計畫主體相關)	
		4.	其它研究相關費用	11,280		(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	113,635		(1~5 項相加之 10%為限)	
		專案計畫申請總金額		1,250,000			

日期：_____

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
104 年度專案成果績效自評表

一、專案基本資料

填表日期：104 年 11 月 23 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 ☐ 評估 ☐ 底泥		
申請機構系所	成功大學環境工程學系	計畫主持人	吳哲宏
專案名稱	地下水污染環境法醫：發展高通量微生物偵測技術		
專案執行期程	☐ 申請階段 ☐ 期中 ☒ 期末		

二、成果績效自評

「計畫總預估數」應與計畫審查核定值相符，請執行單位依實際達成之量化成果填寫於「結案達成數」欄位中。

(一) 學術面

項目 \ 目標達成程度			申請 預估數	期中 達成 數	期末 達成數	結案 達成率	備註 (說明未達成原因或學術 產出發表日期、發表處、 發表名稱、影響指數等)
A 學 術 產 出 及 活 動	1.國內投稿 (篇數)	(1)論文					
		(2)研討會論文	1	0	1	100%	
	2.國外投稿 (篇數)	(1)期刊論文	1	0	1	100%	
		(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					
		(2)博士					
	8.研究團隊 (個數)	(1)跨領域團隊					
		(2)跨國團隊					
		(3)跨機構團隊					
		(4)形成研究中心					
		(5)形成實驗室					
9.其他指標 (請自行命名)		(請自填)					

(二) 產業面

項目 \ 目標達成程度				申請 預估數	期中 達成數	期末 達成數	結案 達成率	備註 (說明未達成原因或專 利、技術轉移相關詳細資 料)
A 智 慧 財 產 權	1.專利 (件數)	已 核 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)						
6.其他指標 (請自行命名)		(請自填)						

(三) 政策面

項目 \ 目標達成程度			申請預 估數	期中 達成數	期末 達成數	結案 達成率	備註 (說明未達成原因或 其他詳細資料)
A 服 務 便 民	1.技術服務	次數					
		收入(仟元)					
	2.諮詢服務	次數					
		收入(仟元)					
B 支 援 合 作	3.協助政府 制定 (件數)	(1)政策					
		(2)法規					
		(3)規範					
		(4)標準					
4.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）

本計畫成功發展一套快速、低成本偵測地下水中厭氧還原脫氯菌 16S rRNA 基因豐富度的多通量方法。此方法是根據階層寡核苷酸引子延伸(Hierarchical Oligonucleotide Primer Extension, HOPE)技術，結合新設計或修改的七組專一性引子，同時偵測四屬常見厭氧脫氯菌，*Dehalococcoides*、*Dehalobacter*、*Desulfitobacterium* 和 *Geobacter*，並能分析 *Dehalococcoides* Pinellas、Victoria 和 Cornell 次族群。未來可應用於地下水多氯乙烯污染整治過程厭氧脫氯菌群的監測。另外，本計畫成功建立以次世代定序技術偵測土水微生物的族群結構與豐富度，是以 Illumina Miseq 進行定序，數據有不錯的重複性，但由於地下水環境條件複雜，若要找到關鍵的指標菌群，建議以本計畫建立的分析方法持續進行不同場址樣本的微生物族群分析，以累積台灣土水微生物資料庫。

研究成果中文摘要

國內土水污染的環境法醫學主要以地層水文、化學性證據分析為主，尚缺乏生物性證據分析技術與相關知識。為填補此空白，本研究將導入高通量次世代定序 (Next-generation high-throughput sequencing, HTS) 與階層寡核苷酸引子延伸 (Hierarchical Oligonucleotide Primer Extension, HOPE) 等尖端分子生物分析技術，分析多氯乙烯地下水污染場址菌群結構與還原脫氯菌豐富度，以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，結合多氯乙烯在厭氧還原脫氯過程微生物動態的關聯性，發展微生物追蹤法醫技術，相關研究結果並提供多氯乙烯生物整治所需的微生物學資訊。本計畫新設計偵測四屬脫氯菌的專一性引子，最佳化測試結果顯示 HOPE 分析技術能以低成本高通量的方式快速偵測於污染場址中相對豐富度高於 0.4% 的 *Dehalococcoides*、*Dehalobacter*、*Desulfitobacterium* 和 *Geobacter* 脫氯族群，或改以另一策略分析相對量更低的 *Dehalococcoides* 次族群，如與其他分生技術如分子選殖、定量 PCR 搭配運用，可快速提供場址整治過程脫氯菌群相關資訊。另一方面，本計畫導入土水微生物的高通量定序技術與大數據分析，除了全面性監測脫氯菌群之外，並探討土水微生物族群結構與含氯有機物的關聯性，提供地下水含氯有機物污染微生物分析診斷的基礎。本計劃建立的整合性地下水微生物分析平台、資料庫及相關知識，將有助於提升國內多氯乙烯生物整治技術之水平，增加土水產業之國際競爭力。

研究成果英文摘要

Currently, environmental forensics for groundwater pollutions is mainly relied on the analysis of hydrology and chemistry evidence. The microbiological evidence analysis is also compulsory but still in its infancy. This study applies the cutting-edge molecular biotechnology such as next-generation high-throughput sequencing and hierarchical oligonucleotide primer extension to analyze the microbial community structure and abundance of the anaerobic dechlorinators in the polychlorinated ethylene contaminating sites with an attempt to build up the relevant microbial fingerprint and indicator microorganism database. We have developed specific oligonucleotide primers and combined with hierarchical oligonucleotide primer extension (HOPE) to detect the common dechlorinators, including *Dehalococcoides*、*Dehalobacter*、*Desulfitobacterium* and *Geobacter*. With the optimal conditions obtained, the method can detect the targets at the abundance as low as 0.4% with respect to total bacterial population. Also, it can detect the three subgroup of *Dehalococcoides*. On the other hand, high-throughput sequencing (HTS) technology and big data analysis were used to study the microbial community structure in aquifers contaminated with chlorinated compounds. Together with HOPE and HTS, the results obtained with the field samples suggest the efficacy of the methods used in this study to quantitative analysis of the dechlorinating populations, and providing relevant microbial diagnostic information for the improved management for polychlorinated contaminant bioremediation.

目錄

(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 分子生物技術於環境法醫上的應用	7
3.3 污染場址整治前後微生物族群變化	7
3.4 常見脫氯菌與其偵測方法	9
3.5 聚合酶鏈鎖反應	12
3.6 階層寡核苷酸引子延伸技術	13
3.7 高通量次世代定序	14
3.8 本團隊相關研究成果	19
(四)、研究方法與過程	23
(五)、材料與方法	26
5.1 水樣 DNA 萃取	26
5.2 聚合酶鏈鎖反應	26
5.3 瓊脂糖電泳	26
5.4 分子選殖	27
5.5 DNA 定序分析	27
5.6 階層寡核苷酸引子延伸技術	27
5.6.1 單鹼基引子延伸實驗	27
5.6.2 毛細管電泳	28
5.6.3 HOPE 結果計算	28
5.7 高通量定序技術	28
5.8 地下水採樣與水質分析	29
(六)、初步結果與討論	31
6.1 還原脫氯菌豐富度多通量分析: HOPE 分析平台技術之建立	31
6.1.1 HOPE 引子設計	31
6.1.2 HOPE 引子專一性測試	34
6.1.3 HOPE 應用於分析環境樣本之驗證	37
6.1.4 HOPE 偵測極限測試	38

6.1.5 批次試驗	41
6.2 土水微生物高通量定序分析	43
6.2.1 高通量定序的再現性.....	43
6.2.2 土水樣本微生物分布差異性分析	44
6.3 污染場址實際樣本分析.....	46
6.3.1 TT 場址分析	46
6.3.2 MJ 場址分析	49
6.3.3 FPG 場址分析	53
6.3.4 反應槽樣本分析	55
6.3.5 綜合討論	58
6.4 批次試驗中微生物族群的動態變化.....	59
(七)、計畫總結.....	61
參考文獻	62

圖目錄

圖 1.1、美國常見於大眾供水井之揮發性有機物	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.....	7
圖 3.2、以 T-RFLP 進行多氯乙烯污染場址微生物多樣性分析	9
圖 3.3、目前已知的脫氯族群親源樹圖	11
圖 3.4、HOPE 分析原理和多種微生物指標中微生物群落的相對豐度示意圖 ..	14
圖 3.5、以 DNA 和 RNA 進行次世代定序，比較兩者的關係	17
圖 3.6、四氯乙烯於污染場址內的代謝圖	17
圖 3.7、以次世代定序分析不同基質於不同時間下微生物族群的動態變化.....	18
圖 3.8、微生物族群分析結果以統計方法-主座標分析進行分析	18
圖 3.9、以 NGS 法進行六個不同土壤樣本的微生物族群分析	19
圖 3.10、環境分子生物技術分析微生物菌群結構概略圖	20
圖 3.11、利用焦磷酸定序技術觀察受污染土壤中微生物動態分佈與叢集熱圖	22
圖 3.12、利用 HOPE 技術分析動物腸道菌與糞便污染來源追蹤的成果	22
圖 4.1、本計畫擬建置地下水微生物高通量分析策略與流程示意圖	24
圖 6.1、以 16S rRNA 為基礎和 Neighbor-joining 法所繪製的 <i>Desulfitobacterium</i> 、 <i>Dehalobacter</i> 、 <i>Geobacter</i> 和 <i>Dehalococcoides</i> 親源樹圖	32
圖 6.2、HOPE 法分析脫氯微生物族群的最佳化與專一性測試結果	35
圖 6.3、脫氯微生物族群對於多氯乙烯脫氯能力示意圖	38
圖 6.4、HOPE 分析法針對脫氯微生物族群的偵測極限測試	40
圖 6.5、以乳化油作為單一碳源進行操作的厭氧脫氯批次試驗	42
圖 6.6、TT 場址中樣本二重複的微生物相對豐富度	44
圖 6.7、TT 場址中土水相與水相的微生物族群分布	45
圖 6.8、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	47
圖 6.9、以統計軟體中的 Clustered heatmap analysis 進行 TT 場址中水樣微生物族 群豐富度的分析結果	48
圖 6.10、以屬階層進行 TT 場址的樣本主成分分析	49
圖 6.11、MJ 場址中不同污染濃度與不同深度採樣井的微生物族群分布	51
圖 6.12、以統計軟體中的 Cluster analysis 進行 MJ 場址中水樣微生物族群豐富度 的分析結果	52
圖 6.13、以屬階層進行 MJ 場址的樣本主成分分析	53

圖 6. 14、FPG 場址中分別代表低和高濃度二氯乙烷污染樣本的微生物族群分布	54
圖 6. 15、以乳化油馴養的反應槽植種 Seeding 與 Formate reactor 和 Acetate reactor 的微生物族群分佈	56
圖 6. 16、以統計軟體中的 Cluster analysis 進行植種源與反應槽中水樣微生物族群豐富度的分析結果	57
圖 6. 17、以屬階層進行植種與反應槽的樣本的主成分分析	58
圖 6. 18、以門階層進行所有樣本的主成分分析	59
圖 6. 19、以不同基質作為碳源進行三氯乙烯的脫氯試驗	60

表目錄

表 3.1、 <i>Dehalococcoides</i> 下的三類次族群.....	12
表 3.2、各世代定序技術之特點與比較.....	16
表 4.1、工作進度甘特圖.....	25
表 5.1、地下水分析項目.....	30
表 6.1、本計畫用於分子生物相關實驗所設計與使用的寡核苷酸引子.....	33
表 6.2、HOPE 法的專一性測試.....	36
表 6.3、台南某多氯乙烯污染場址 A 經由分子選殖後於 NCBI 比對結果.....	38
表 6.4、TT 場址樣本的多氯乙烯組成.....	47
表 6.5、MJ 場址樣本的多氯乙烯組成.....	50

(一)、前言

自工業革命以來環境污染問題日益嚴重，過去著重空氣、廢棄物和水質污染問題，但自 1978 年爆發 Love Canal 事件後美國甚至全球皆開始了解土壤地下水污染和後續整治問題。美國 U. S. Geological Survey (USGS) 針對全美家庭和大眾使用之地下水井累積超過 20 年揮發性有機物的調查分析數據，這些揮發性有機物包含三鹵甲烷、冷凍劑、有機合成物質、石油碳氫化合物和薰蒸劑等 42 種物質。USGS 以污染物標準 0.2 g /L 為偵測基準發現 14% 的家庭地下水井和 26% 的大眾用地下水井含有一種或多種揮發性有機物存在[1]。調查美國國家場址發現有 15 種揮發性有機物出現相當頻繁(圖 1.1)，尤其多氯乙烯在這 15 種常見化合物中佔了 33%，代表多氯乙烯是最常見的土壤地下水污染物[2]。根據土基會對於全台土壤地下水的調查，台灣目前受含氯化合物污染場址已有七十多處，並有逐漸增加的趨勢[3]。這些污染場址多半為塑膠工廠、化學電鍍工廠和加油站居多。這些含氯有機化合物皆具毒性，對生物體的生化代謝與細胞作用機制造成嚴重的影響，尤其對人類會造成致癌性、致突變性和降低免疫能力等問題，對整體環境生態系也會造成重大威脅與危害，因此，多氯乙烯被列為優先處理的污染物。

多氯乙烯為重質非水相液體(Dense Non-aqueous Phase Liquid, DNAPL)，以四氯乙烯(Tetrachloroethylene)為例，其密度為 1.622 g/cm³ 大於水，終將沉積於地底之厭氧環境，因此在整治上有相當高的困難度。根據 2014 年環保署舉辦之咖啡論壇會議結論，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。多氯乙烯污染的整治技術可分為物理化學技術與生物復育技術。物理化學技術整治反應快，時程短；生物復育技術則具有成本經濟上的競爭力。世界各國以及台灣工程界對於以生物整治地下水氯乙烯，通常傾向使用厭氧生物技術。

根據環境微生物學理論，在厭氧環境下，土壤地下水中特殊的還原脫氯菌則是以氫氣、小分子有機物為電子供給者，氯化有機物為最終電子接受者，進行還原脫氯呼吸反應。厭氧脫氯菌在土壤和地下水中進行鹵素呼吸需仰賴其他微生物族群，因此將多氯乙烯進行還原脫氯的作用可視為微生物間的共營現象(Syntrophy)。共營建立在動態能量守恆(Dynamic Energy Budget)的關係上，以乳酸的厭氧消化為例[4]:

- (1) $\text{Lactate}^- + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Acetate}^- + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ + 2\text{H}_2$ ($\Delta G^{0'} = 3.96 \text{ kJ/mol}$)
- (2) $\text{HCO}_3^- + 4\text{H}_2 + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3\text{H}_2\text{O}$ ($\Delta G^{0'} = -135.6 \text{ kJ/mol}$)
- (3) $\text{Acetate}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{CH}_4$ ($\Delta G^{0'} = -31.0.6 \text{ kJ/mol}$)
- (4) $\text{PCE} + \text{H}_2 \rightarrow \text{TCE} + \text{H}^+ + \text{Cl}^-$ ($\Delta G^{0'} = -163.6 \text{ kJ/mol}$)

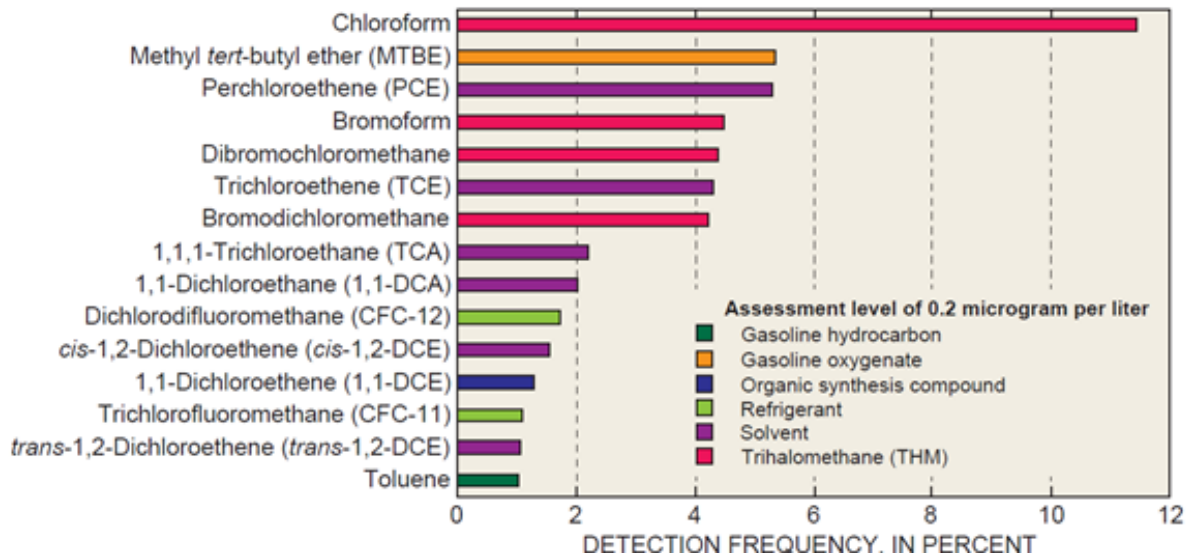


圖 1.1、美國常見於大眾供水井之揮發性有機物。

如反應式(1)，乳酸在標準狀態下酸化並產生氫氣為需能反應，反應自由能為正值，因此首要步驟是需要把反應後產物(乙酸和氫氣)的濃度降低，才有利於分解反應向右進行，而利用氫氣與乙酸的菌群如甲烷菌、還原脫氯菌的代謝作用，可扮演將氫氣與乙酸快速轉換，使乳酸分解之整體反應自由能變為負值之重要角色(反應式(2)-(4))。因此，在地下水環境，建立有機物厭氧分解發酵菌與還原脫氯菌之共營菌群結構，是厭氧還原脫氯技術整治多氯乙烯污染場址成功的關鍵因素。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、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。此外，藥劑基質與藥劑分解的代謝產物可刺激其他共營菌，如 *Sedimentibacter*、*Clostridium*、*Acetobacterium* 等厭氧發酵菌生長，並產生代謝化合物，如維生素 B12、必需胺基酸等，亦可促進脫氯菌加速進行脫氯反應發生[5]。微生物代謝氯化有機物的理論相當完整，歐美日等先進國家並已發展出成熟的整治工程技術。因此，地下水含氯有機物污染生物復育成功的關鍵

端賴於如何操控厭氧還原脫氯菌種類、數量、活性、以及電子提供者。對於多氯乙烯污染生物整治與技術發展，掌握脫氯族群結構與動態、藥劑發酵菌群結構與指標菌群等微生物學資訊是非常重要的。

就台灣多氯乙烯污染的現地生物整治技術發展現況，多半僅調查污染場址水文環境和水質特性，進行生物復育工程時僅(過度)重視目標污染物消長的表觀現象，卻常常忽略地層微生物是成功完成現地整治的關鍵核心，而且對於還原脫氯菌的分析能力與相關軟體知識不足，整體技術水平無法提升，很容易被大陸及東南亞國家後來居上。另一方面，就“地下水健康”(Health of Groundwater)而言，法規規定地下水四氯乙烯、三氯乙烯、順-二氯乙烯、反-二氯乙烯以及氯乙烯的濃度必須分別低於 5 µg/L, 5 µg/L, 70 µg/L、100 µg/L 及 2 µg/L。評估地下水環境健康的程度，除了水質參數，是否可發展地下水生物性參數，以彌補水質物化參數之不足？當地層被多氯乙烯污染，是否會造成地層/地下水微生物族群的改變？在整治期間，地層中注入大量 TOC 濃度相當於都市汙水的藥劑，刺激地下水體中微生物大量生長，但此做法是否衍生病原菌的風險？整治後地下水環境是否恢復至整治前的環境生態，這些問題都尚無相關生物指標可供判斷依循。因此，發展地層地下水微生物分析監測平台，並建立與多氯乙烯污染相關生物指標之知識庫有其需求性與重要性。

以大腸菌群(Coliform group、Fecal coliform、*Escherichia coli*)作為指標微生物檢測飲用水相關水質之糞便污染，可以說是利用微生物偵測(Microbial detection)作為環境法醫技術之濫觴，發展至今已經 100 多年[6]。傳統上，大腸桿菌群的分析是以選擇性培養基培養出大腸桿菌群後，計數其菌落數或最大可能數，監測水中大腸桿菌群的密度可以判斷水質是否受到動物糞便的污染，評估飲用水質是否安全。2002 年，Samadpour 提出微生物來源追蹤 (Microbial Source Tracking, MST) 或糞便污染來源追蹤 (Fecal Source Tracking, FST) 概念，其方法原理是萃取水樣中微生物 DNA，然後以聚合酵素鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)為主的分生技術，定量偵測 *Escherichia coli* 或宿主糞便專一性的指標菌群如、*Bacteroides-Prevotella* 等，追蹤水質糞便污染的來源動物(如人、豬、反芻動物、禽類等)，再針對糞便來源加以控管[7]。美國環保署曾於 2005 年出版的微生物來源追蹤指引(Microbial Source Tracking Guide Document)中詳細地評估各種分生方法的優劣[8]，可作為其他環境相關領域發展微生物追蹤技術之參考。

關於地層/地下水污染追蹤，國內已發展出氫、氯、碳等穩定同位素分析的環境法醫技術。林正浩等人利用天然氫氣穩定不易產生反應及易於分配至有機相等特性，追蹤和定位污染物位置及範圍[9]；黃德坤等人則是針對油污染源的來源鑑

定及洩漏時間，發展法醫技術，他們利用氣相層析質譜圖結合 pristane/ phytane 比值和 PAHs 異構物分析而獲得可靠結果[10]。反觀環境微生物法醫技術在國內外研究領域的發展都尚處於相當早期的階段。地層/地下水微生物大多屬於厭氧性，分析技術上是很難以培養的方法研究。雖然過去環境分生技術，如分子選殖 (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 Length Polymorphism, TRFLP) 等已應用於地層/地下水的微生物分析，但是分析方法通量與解析能力的限制，其結果通常不足以提供全面性、可靠性的微生物學資訊，致使對於本土地層/地下水微生物多樣性的知識累積有限。近年來，次世代環境分生技術 (Next-generation Environmental Biotechnology) 的突飛猛進，國內需要建立這些高端分析技術，應用於土水環境微生物分析，並厚植本土土水生物整治跨領域優質人才，提升我國土水污染整治工程與學術研究水準，居於國際領先地位。

(二)、研究目的

含氯化合物種類繁多且複雜，本研究選擇地下水常見的多氯乙烯污染為主要研究對象，建立尖端的高通量次世代環境分生分析平台，並應用於多氯乙烯污染場址地層土壤和地下水中污染相關菌群結構分析，建構國內多氯乙烯分解菌群多樣性資料庫，深入了解多氯乙烯污染在整治(分解)前期、中期和後期生態系統中微生物群種類與數量的變化，研擬健康與污染地層/地下水的指標菌群，除了提供生物整治所需的指標生物資訊外，最終希望發展出微生物追蹤技術，搭配環境法醫領域其他技術以精確地追蹤多氯乙烯污染源。本計畫相關研發成果、知識、經驗將可深化本土多氯乙烯污染整治調查技術，提供管理多氯乙烯場址之依據，以及精進多氯乙烯生物整治復育技術之參考。

本計畫將分階段完成以下目標。

1. 建立高通量次世代環境分生技術平台分析土水微生物相關操作參數。
2. 建立本土多氯乙烯污染地下水菌群結構與還原脫氯菌群資料庫。
3. 在實驗室多氯乙烯生物分解系統，探討添加藥劑促進還原脫氯過程微生物族群種類與數量的變化，建立脫氯菌群與有機物分解菌共生關係之微生物生態學新穎知識。

(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，逐漸了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[11]。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了解微生物共營系統，有助於場址整治。

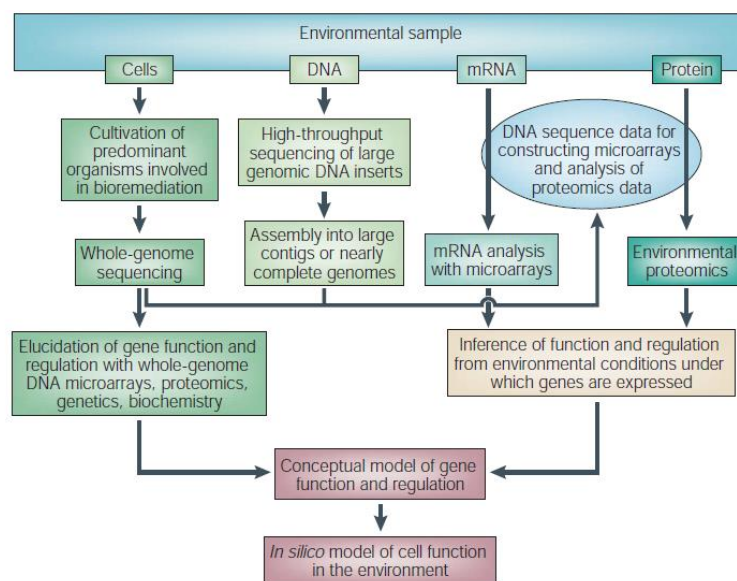


圖 3.1、基因分析技術提供微生物在污染環境中功能表現的模式[11]

3.2 分子生物技術於環境法醫上的應用

環境法醫的發展主要是用來判斷污染物的製造者、發生的原因、時間和污染程度等，其中最基本也是最直接的方法即是利用污染物的物理和化學特性進行鑑定[12, 13]。但如果污染程度複雜且無適合的物質提供採樣時，污染場址內的微生物和微生物所產生表現的相關基因和蛋白可能就是不錯的候選對象。微生物存在於環境中各個角落，不同的環境條件和污染物種類將孕育出不同的微生物族群，以此差異將能夠作為鑑別污染物的間接指標。污染事件發生時，是適合應用分子生物技術的時機。隨著時間的推演，微生物族群將因氣溫、營養物質及微生物間本身的交互作用，造成物種間的變化，可因此間接得知污染時間。舉例來說，當一間工廠發生三氯乙烯外洩時，土壤並不會在短時間內出現能將三氯乙烯進行脫氯的微生物，當有脫氯菌出現時即代表污染已發生很長的一段時間，且能從脫氯菌種類推估可能的污染物種類。現階段，分子生物技術在環境法醫上的應用尚未成熟階段，其數據仍需和化學分析數據互相配合，始能獲致較具體的結果。

環境法醫的概念 Da Silva 等人曾經於 2004 年提出，此作者以 Benzene-toluene-ethylbenzene-xylene (BTEX) 進行相關研究，但卻發現甲苯的快速降解時，*bssA* 基因數量會快速提升，因此建議將 *bssA* 基因作為環境法醫分析應用於甲苯降解的重要生物標記 [14]。2001 年更有應用法醫技術針對致病性大腸桿菌 *E coli* 0157:H7 配合水質數據進行的相關研究 [15]。

3.3 污染場址整治前後微生物族群變化

當地層發生污染或在污染整治過程，都會顯著地改變地層環境，如土壤有機物濃度、pH、溫度、氧氣、氧化還原電位等，使菌群活性與結構發生巨大的變化。瞭解這些微生物群變化的知識，將可有助於提升污染場址整治的效率。但是在複雜且多樣的微生物族群中要快速分析微生物的生態是一個難以實現卻相當重要的目標[16]。分子生物技術快速發展，已有多種工具能進行土壤地下水微生物族群分析。這些分析技術的使用早期是以 PCR-DGGE、PCR-TRFLP、Cloning and Sequencing 為主，最近則逐漸被次世代高通量定序分析所取代。

2005 年 Vinas 等人以 PCR-DGGE 進行受雜芬油(Creosote)污染土壤生物復育的菌相分析，從中了解到微生物間的交互作用關係[17]。Paul 等人於 2006 年嘗試以 *Arthrobacter protophormiae* RKJ100 進行農藥污染土壤的生物復育，復育期間以分子生物技術監測添加外來菌株對於現地土壤菌群結構是否造成影響，以分子選殖和限制性片段長度多態性分析，實驗結果觀察到農藥污染土壤菌群由 Proteobacteria 和 Actinomycetes 組成，整體微生物族群結構並無顯著變化，代表單純添加外來菌種很難對於現地微生物造成改變[16]。Joynt 等人則是選擇長期受鉛、鉻和石油碳氫化合物的污染土壤進行長期的微生物調查，研究主要是探討長期受金屬和有機污染對微生物族群結構和生物量的影響。結果發現，有 α -、 β -、 γ -和 δ -的 Proteobacteria 以及 high G+C、Low G+C Gram-positive bacteria、Green nonsulfur 和 OP8 出現，物種豐富度隨時間降低，但仍然有生存在現地條件不同種類的微生物族群出現[18]。

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 3.2)；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[19]。早期進行污染場址調查或整治時多半利用 DGGE、T-RFLP 和基因選殖方式進行分析，近年來分子生物技術快速進步，使得分析成本下降，因此 Kotik 等人於 2013 年以先進焦磷酸定序(Pyrosequencing)技術進行四氯乙烯污染地下水微生物族群分析，此種分析方式偵測極限低(<0.25%)的優點，能夠觀察到族群數量稀少的微生物族群。研究選擇該場址中三個特性不同的水井進行採樣，水中氧化還原電位介於 -51 mV~ +250 mV，涵蓋好氧到厭氧區間、鐵濃度則是介於 1.2 mg/L~10.3 mg/L。焦磷酸定序涵蓋 DNA 和 RNA 層面。實驗結果推測多氯乙烯的去除有二氯乙烯礦化菌 *Polaromonas* spp.、脫氯菌 *Geobacter* spp.和 *Burkholderia* spp.，以及 *Methylobacter* spp.參與共代謝脫氯程序[20]。

綜合以上文獻得知，污染場址整治前的微生物族群調查相當重要，而且將左右整治的工法。台灣目前對於多氯乙烯污染場址的微生物普查仍然不足，是未來可以努力的目標。

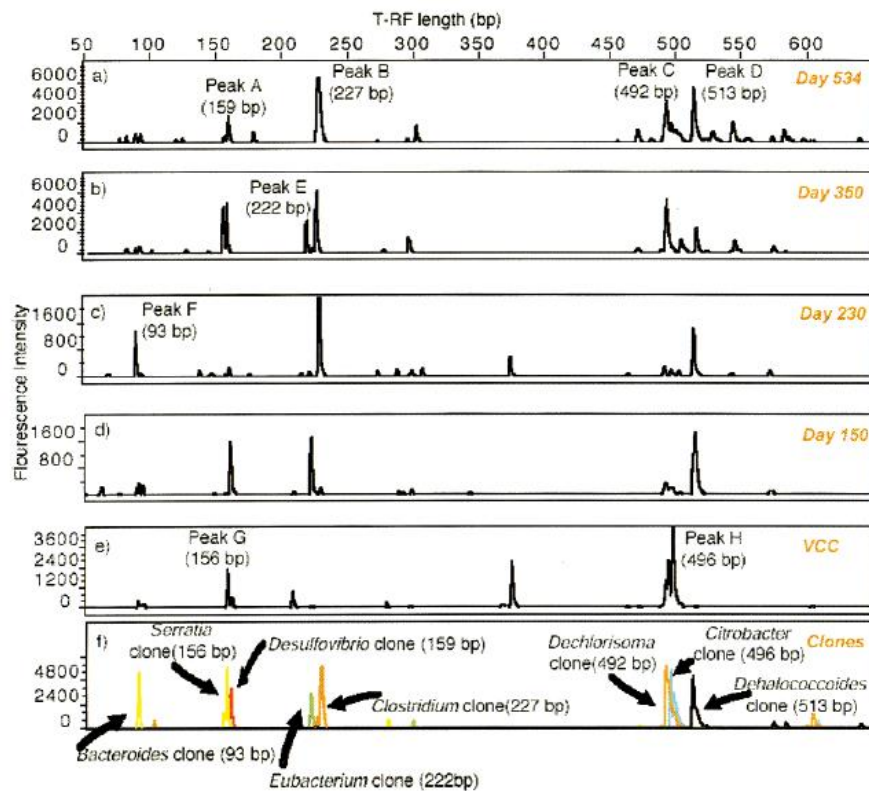


圖 3.2、以 T-RFLP 進行多氯乙烯污染場址(Alameda Naval Air Station)微生物多樣性分析[19]。

3.4 常見脫氯菌與其偵測方法

現今已知具有還原脫氯能力的厭氧脫氯菌至少有 40 株，多樣性非常複雜。這些可分離的脫氯菌分布在 Chloroflexi、Firmicutes、Proteobacteria 三大門(Phylum)中，其中在 Proteobacteria 門下的脫氯菌通常是分類在 Delta 與 Epsilon 綱。

多氯乙烯還原脫氯研究以 *Dehalococcoides* 菌群為先驅也較為完整。*Dehalococcoides* 為一絕對厭氧菌，至今已有七株從受含氯化合物污染場址、河川底泥和汙泥消化槽中被分離出來。目前已知的 *Dehalococcoides* 分類是以調查數個來自北美和歐洲的多氯乙烯污染場址以專一性引子取得 DNA 序列後，依 16S

rRNA 可變區間(variable regions)2 和 6 的位置差異將此族群細分成三大次要族群，分別稱為 Pinellas、Victoria 和 Cornell 次群(subgroup)，而名稱由來，以 Cornell 為例，著名的 *Dehalococcoides* strain 195 是首次於 Cornell 分離的脫氯菌，因此以 Cornell 為名。[21]。如下表 3.1 所示，目前已知脫氯菌群中僅 *Dehalococcoides* 具有能將二氯乙烯脫氯至乙烯的能力。此類微生物能進行有機鹵素呼吸代謝，並能利用短鏈脂肪酸和氫氣作為電子的提供者，而含氯化合物作為電子的接受者將氯脫除。厭氧脫氯菌 *Dehalococcoides* 被發現數年後，大部分的生理生化特性已被完整了解。2005 年由美國和歐洲所組成團隊將 *Dehalococcoides ethenogenes* 基因體解開，並藉由 DNA 轉錄成 RNA，RNA 轉譯成蛋白質後推得 *Dehalococcoides ethenogenes* 的脫氯機制[22]。

另一還原脫氯菌 *Dehalobacter* 也在自然界的脫氯反應中占有重要地位。*Dehalobacter* 常見於受含氯化合物所污染的場址中，但它卻和 *Dehalococcoides* 屬於不同的族群，*Dehalococcoides* 屬於 Chloroflexi；而 *Dehalobacter* 屬於 Firmicutes。*Dehalobacter* 最早於 1993 年從處理四氯乙烯的厭氧填充床中所分離出來，在環境中主要存在於氯乙烷和氯仿污染場址中，此種微生物能利用氯乙烯作為電子接受者，氫氣作為電子提供者進行厭氧鹵素呼吸[23]。目前為止有四株此屬微生物被分離出來，於 2015 年 5 月份由美國 JGI IMG/M 的資料庫中能發現其基因體已經被解開。另一方面 *Dehalobacter* 喜歡和其他微生物一起共生，像是 *Sedimentibacter*、*Clostridium* 和 *Acetobacterium* 等[5]。

Desulfitobacterium 同樣也具脫氯能力，其特性和 *Dehalococcoides*、*Dehalobacter* 差異較大。*Desulfitobacterium* 為硫酸還原菌。硫酸還原菌在厭氧呼吸過程中將硫酸根還原成亞硫酸根、硫代硫酸根至元素硫後轉變成硫化氫。此菌株能利用多種電子提供者例如氫、乳酸鹽、醋酸鹽和丙酮酸鹽等等。目前已有多株具脫氯能力的 *Desulfitobacterium* 被分離出來，常見的為 *Desulfitobacterium dehalogenans*、*Desulfitobacterium chlororespirans*、*Desulfitobacterium hafniense* 和 strain PCE 等[24]。

另外於 2006 年由 Löffler 所領軍的團隊發現 *Geobacter lovleyi* Strain SZ 同樣具有脫氯能力。此株微生物分離自無污染的河川底泥，但卻能利用乙酸作為碳源並將四氯乙烯脫氯至順-二氯乙烯的厭氧還原脫氯反應。Strain SZ 也能利用氫氣和丙酮酸作為電子提供者，四氯乙烯、三氯乙烯、硝酸鹽、延胡索酸、三價鐵、蘋果酸、四價錳、六價鈾、元素硫等物質作為電子接受者，是相當特殊的脫氯菌群之一。

除了常見的 *Dehalococcoides*、*Dehalobacter* 和 *Desulfitobacterium* 外，地下水

環境條件與污染物的程度複雜，可能衍生不同的脫氯菌群。脫氯菌的種類與數量將是決定場址整治是否成功的重要因素。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。過去研究已知 *Dehalococcoides* 擁有三個 subgroup，且這三個 subgroup 對於脫氯場址整治具有一定程度的影響，因此 Nikolausz 等人於 2008 年以單一核酸引子延伸技術 (Single-Nucleotide Primer Extension) 設計專一性引子，可以針對 *Dehalococcoides* 下的 Cornell、Pinellas 和 Victoria subgroup 個別偵測[25]。

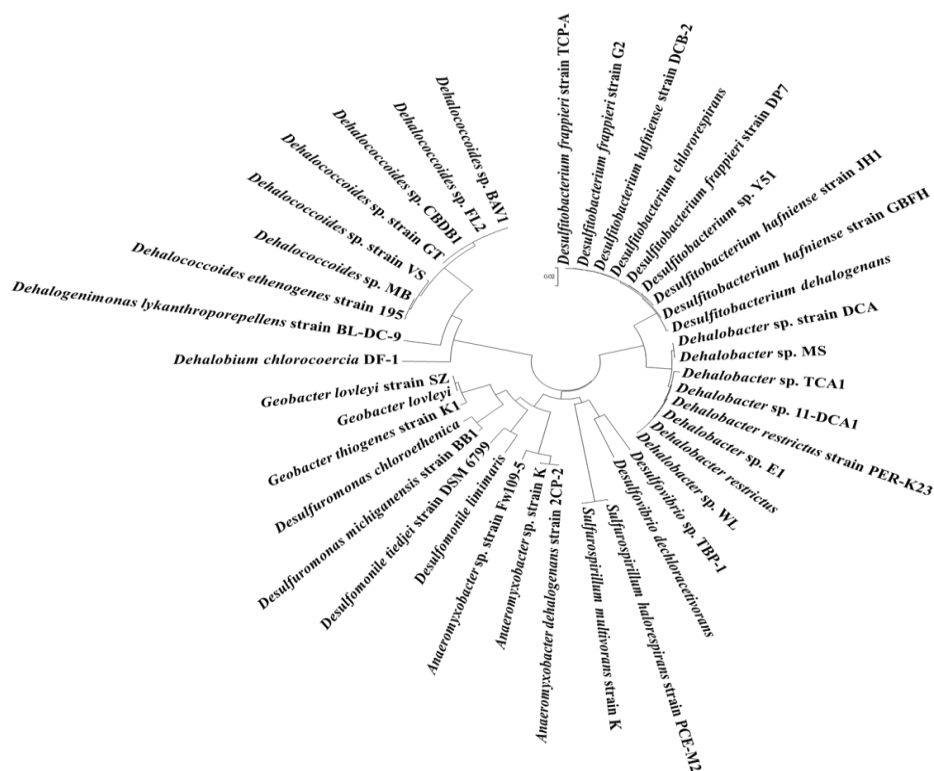


圖 3.3、目前已知的脫氯族群親源樹圖。

表 3. 1、*Dehalococcoides* 下的三類次族群

次要族群	常見代表菌株	能利用的 多氯乙烯 種類	還原後產物	文獻
Pinellas	<i>Dehalococcoides</i> sp. BAV1	VC	Ethene	[22]
	<i>Dehalococcoides</i> sp. CBDB1	PCE, TCE	Trans-DCE	[23]
	<i>Dehalococcoides</i> sp. FL2	TCE	Cis-DCE, Trans-DCE	[24]
	<i>Dehalococcoides</i> sp. GT	TCE	Ethene	[25]
Victoria	<i>Dehalococcoides</i> sp. VS	VC	Ethene	[26]
Cornell	<i>Dehalococcoides</i> sp. 195	PCE, TCE	Ethene	[27]
	<i>Dehalococcoides</i> sp. MB	PCE, TCE	Trans-DCE	[28]

3.5 聚合酶鏈鎖反應

聚合酶鏈鎖反應(Polymerase chain reaction)，簡稱 PCR，用於擴增特定的 DNA 片段，之後分析擴增後的 DNA 片段可增加靈敏度，較容易偵測到原本在環境中佔少量的微生物族群。

PCR 的發展是從 DNA 聚合酶的發現開始，DNA 聚合酶最早於 1955 年發現 (DNA polymerase I)，但由於這個酵素是一種易被熱所破壞之酵素，因此不符合一連串的高溫鏈鎖反應。而現今所使用的酵素簡稱 Taq polymerase，則是由 1976 年從熱泉中的細菌 *Thermus aquaticus* 分離出來。而現今發展出來的 PCR 則於 1983 年由 Dr. Kary B. Mullis 發展出來，此後 PCR 這項技術在 1993 年 10 月獲得了諾貝爾化學獎。

基本上進行 PCR 須具備四種要素:1. DNA 模板(DNA Template); 2. 兩端界定複製範圍的引子(Primers); 3. DNA 聚合酶(Taq Polymearse); 4. 合成的原料(dNTP)與緩衝液(Buffer)。與三個 PCR 反應主要步驟:

1. 變性(Denaturation):利用高溫 95°C 使雙鏈 DNA 分離。高溫將連接兩條 DNA 鏈的氫鍵打斷，僅以單鏈形式存在。

2. 引子黏合(Annealing): 在 DNA 雙鏈分離後，降低溫度使得引子可以結合於單鏈 DNA 上。
3. 引子延長(Extension): DNA 聚合酶由降溫時結合上的引子開始沿著 DNA 鏈合成互補鏈。

這流程通常會進行 30 個循環，使目標 DNA 被放大到原本的 230 倍。但因瓊脂糖膠(Agarose gel)敏感度較低、無法定量，僅能以片段大小的差別辨識產物是否正確。

3.6 階層寡核苷酸引子延伸技術

分子生物學工具已經成為研究環境樣本中微生物多樣性的”標準方法”。以小單位核糖體 RNA(SSU rRNA)為基礎發展出的分生技術可以快速進行不同環境生物樣本中微生物身分鑑定、型態觀察、族群大小定量。不同於微生物鑑定，目前準確地定量微生物族群大小還是具有相當的困難度。常用的定量分生技術包括螢光原位雜交法、膜雜交法、酵素斷片法以及定量即時連鎖聚合酶反應法等。以雜交反應為核心的偵測方法主要是利用螢光標記的寡核苷酸探針與目標核酸分子上的一段標誌區間的互補序列形成專一性的核酸交互作用。定量連鎖聚合酶反應(qPCR)則是利用 DNA 聚合酶在複製股延長的反應時，使衍生螢光強度的增加，以螢光偵測的儀器即時監測反應螢光強度的改變，參照建立的 DNA 濃度與螢光門檻循環值(Ct)的校正曲線即可估算環境中微生物的數量。雖然這些方法能有效率定量環境中的微生物，但各技術仍受限於不能分析多個目標族群。技術上，能同時定量分析多個目標族群的分析方法仍相當有限。不容置疑的，在環境微生物的研究上這是一個相當嚴苛的瓶頸。

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。

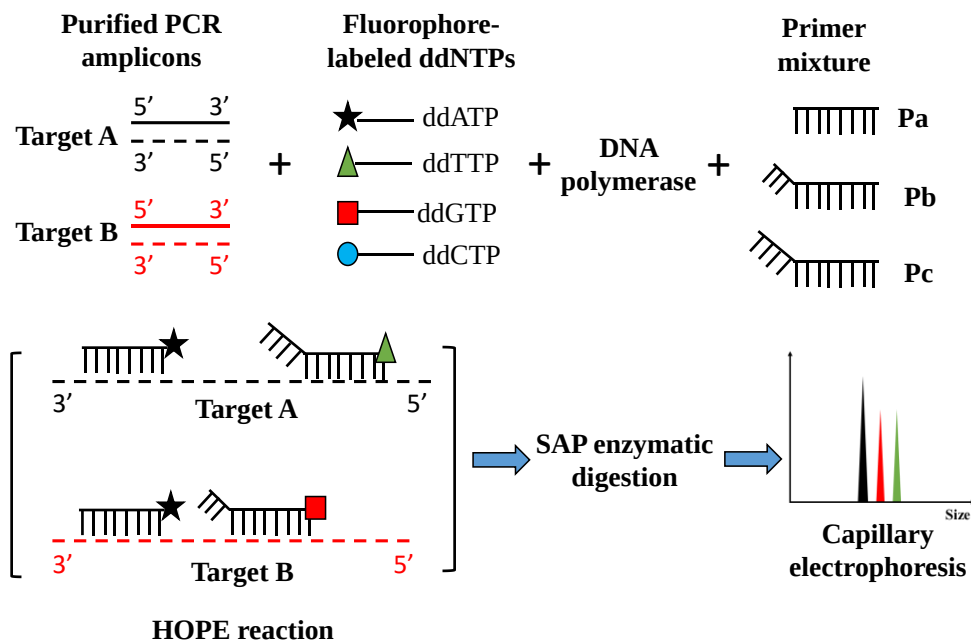


圖 3.4、HOPE 分析原理和多種微生物指標中微生物群落的相對豐度示意圖。

3.7 高通量次世代定序

1953 年 Watson 和 Crick 將 DNA 分子結構解開後，開啟 DNA 定序技術歷史性的一刻，往後各式 DNA 定序皆以此原理作為根基不斷進步。DNA 定序技術發展至今已超過三十年，截至 2015 年已研發出三個世代的定序方式，其中以第一代和第二代定序方式發展較為成熟。第一代定序概念源自於 Sanger 所提出的雙脫氧鏈終止法(Dideoxy chain-termination method)，其核心概念是利用 ddNTP 進行反應，ddNTP 缺乏 3' 的 OH 基，不具有與另一個 dNTP 連接形成磷酸二酯鍵的能力，因此可用來終止 DNA 鏈的延伸。此外，這些 ddNTP 上連接放射性同位素或螢光標記，將可利用膠體電泳或自動定序儀進行分析。目前第一代定序技術仍廣泛應用於分生相關研究，此方法單次序列讀取長度接近一千個鹼基，而解讀每個鹼基的準確度達 99.999%[26]。

第二代 DNA 定序技術(通稱為 Next Generation Sequencing, NGS, 次世代定序)為了加速分析，由定序化學方法的改良與自動化工程技術的突破，大幅縮短反應時間與成本。第二代 DNA 定序策略為先解讀各小片段的基因序列，再運用生物資訊軟體進行片段接合與分析，達成整個基因組定序的目標。其分析方法利用基因工程技術，將待定序的基因序列切成小片段，並接上轉接序列(adaptor)，可選擇加入微磁珠(micro-bead)並配合乳液聚合酶鏈鎖反應(emulsion PCR)或直接採用橋式聚合酶鏈鎖反應(bridge PCR)，以快速增幅待測基因片段，再結合微製程、光

學偵測與自動控制技術，以不同於 Sanger 定序原理的方法，迅速解讀大量的 DNA 序列[26]。目前次世代定序常見以下分析技術，分別為 Roche/454、Illumina 和 Applied Biosystems 等公司所開發，下表 3.2 為第一代與第二代定序技術的特點與比較表。

目前次世代定序技術已發展成熟且普遍應用於調查環境微生物的多樣性。2013 年 Kotik 等人於國際期刊中發表應用次世代定序技術 Pyrosequencing 進行四氯乙烯的污染場址調查。文中描述該場址主要是以四氯乙烯和三氯乙烯為主要污染物，但卻發現有 1,2-二氯乙烯和氯乙烯的生成。為了瞭解現地微生物的組成與哪些微生物於該場址具有活性，於是萃取現地土壤中的 DNA 和 RNA 進行 Pyrosequencing 的定序，分析結果如圖 3.5，建立微生物族群與污染物分解的網絡關係，如圖 3.6，且應用統計方法-主成分分析(Principal component analysis)，得知微生物族群與水質的關聯性[27]。另一方面，次世代定序技術也應用於批次系統的研究，2015 年 Miura 等人使用不同營養物質，探討微生物族群的動態變化，如圖 3.7，結合主座標分析(Principal coordinates analysis)，如圖 3.8，了解不同物質對於微生物族群的影響[28]。另外，於 2014 年也有團隊使用 MiSeq 定序儀(Illumina)作為土壤環境法醫鑑識的一個項目，由土壤微生物族群的分析，如圖 3.9，了解土壤來自何處與差異性[29]。

表 3.2、各世代定序技術之特點與比較[30, 31]

	第一代		第二代	
開發公司	ABI	Roche/454	Illumina/Solexa	ABI
技術平台	3730xl	Genome Sequence 20 System	Genome Analyzer	SOLiD
商品化時間	2002	2005	2006	2007
定序方式	Sanger	Pyrosequencing	Four-color SBS with reversible terminators	Oligonucleotide ligation with two-base, four-color encoding
增幅方法	PCR	Emulsion PCR	Bridge PCR	Emulsion PCR
單一反應 讀取長度	1000 bp	約 230 bp	36 bp	35 bp
單次反應產 生資料量 (Gbp)	1 Mb/天	0.1	1.5	3~4
單次反應 所需時間	2 小時	7.5 小時	3 天	7 天
錯誤率	~0.001	~1%	>1%	~0.1%

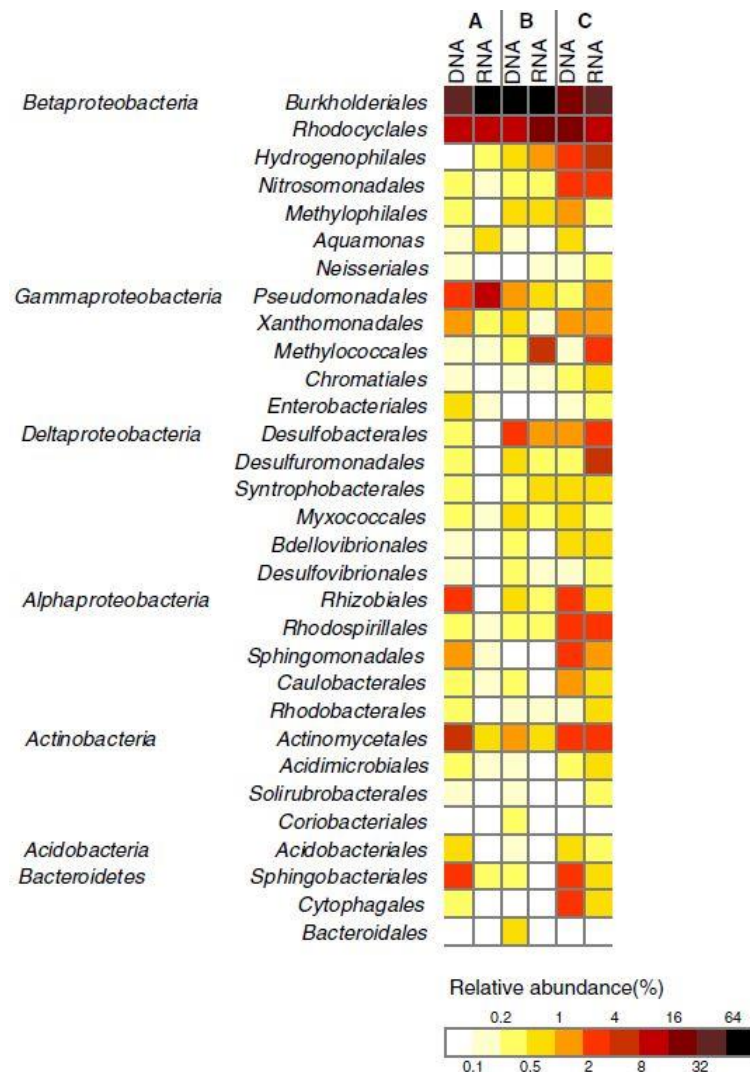


圖 3. 5、以 DNA 和 RNA 進行次世代定序，比較兩者的關係[27]。

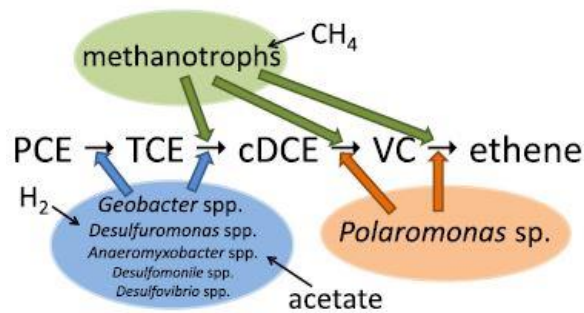


圖 3. 6、四氯乙烯於污染場址內的代謝圖[27]。

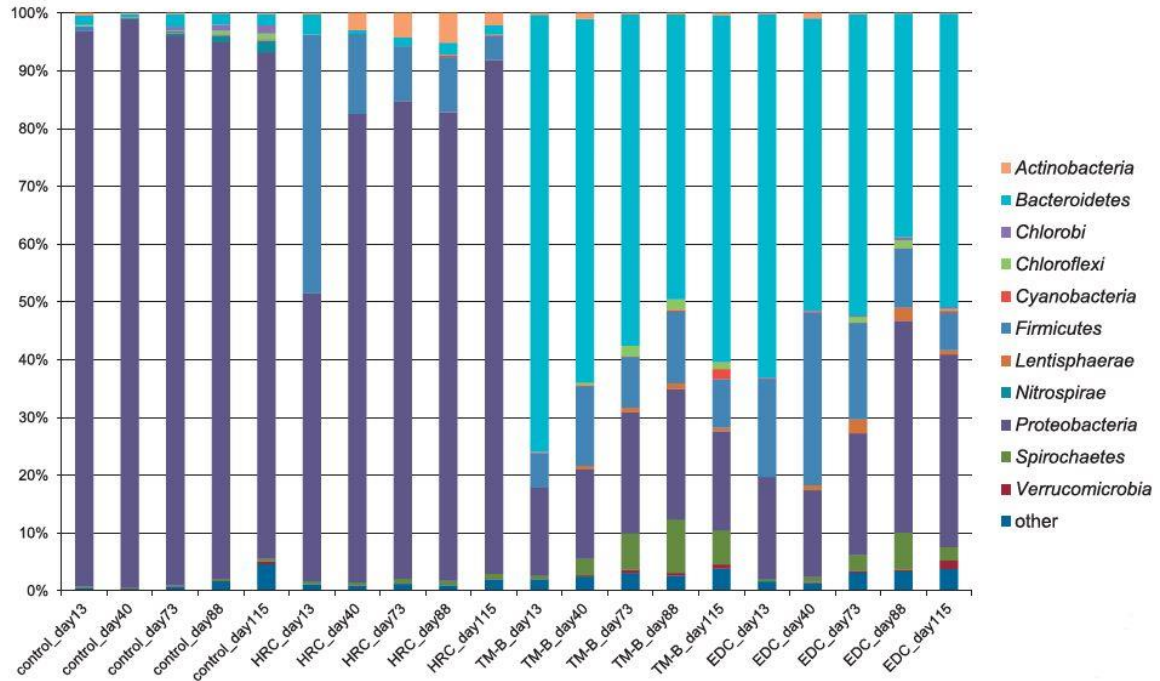


圖 3. 7、以次世代定序分析不同基質於不同時間下微生物族群的動態變化[28]。

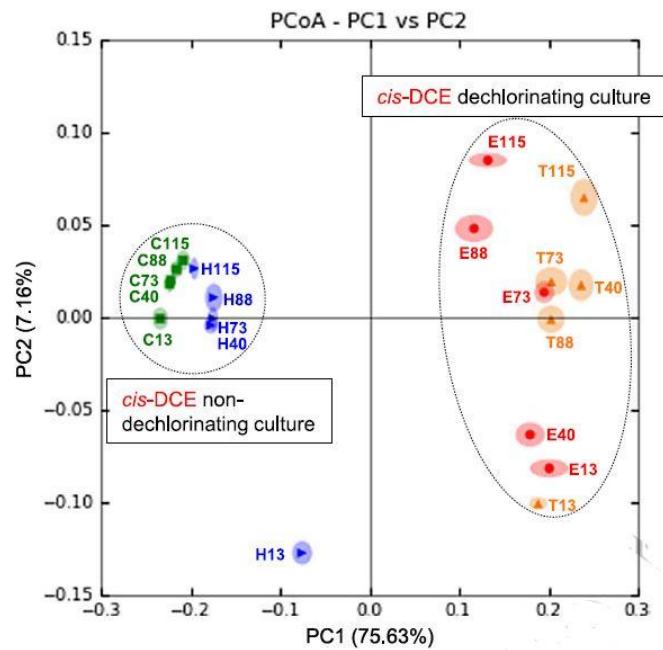


圖 3. 8、微生物族群分析結果以統計方法-主座標分析(Principal coordinates analysis) 進行分析[28]。

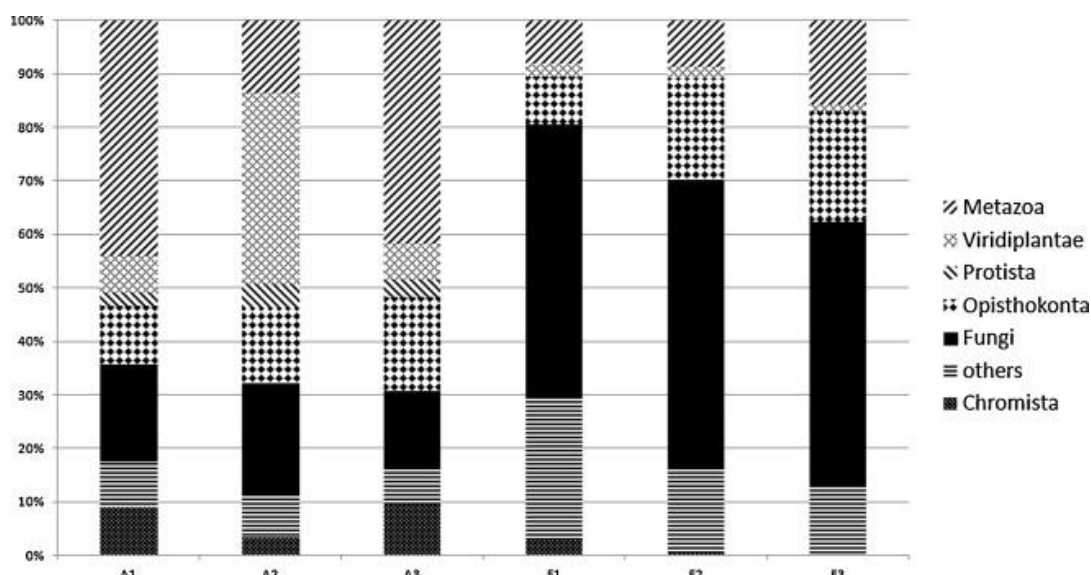


圖 3.9、以 NGS 法進行六個不同土壤樣本的微生物族群分析[29]。

3.8 本團隊相關研究成果

過去以培養方法分析監測土水微生物是非常困難的。根據研究，大部分的環境微生物很難在實驗室人工配置培養基生長，大約只有<5%的環境微生物在實驗室被分離出來，而這些容易被培養的菌群在環境中通常不是主要的菌種。為充分瞭解污染場址是否存有分解污染物的微生物群，及有效管理現地生物復育過程，近年來利用分子生物技術發展出一套研究環境微生物的方法。這個方法主要是分析微生物體內的分子標記(molecular marker)，利用分子標記觀察環境微生物菌群結構與變遷不僅縮短實驗時程、減少因培養機選擇性導致的誤差，更能深入探討微生物菌群結構，準確地診斷微生物因環境因素而造成的變動。最常分析的分子標記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[如圖 3.10]。

雖然以分子生物技術分析不同環境下微生物菌群結構、分佈、數量及動態，已有不錯的結果，但是土水微生物多樣性複雜，估計每克土壤或每毫升污染地下水含有至少 10^{6-9} 的細菌。傳統的分分子生物技術的分析通量有限，通常只能觀察到

主要優勢的菌群（豐富度至少 1-5%以上的菌群），而無法了解菌群結構的全貌，而且通常分析一組樣本需要數個星期，甚至數個月，相當費工耗時。

最近，本團隊建立兩套複雜環境樣本高通量的菌相分析方法：高通量定序(High-throughput sequencing, HTS)法與階層寡核苷酸引子延伸法(Hierarchical Oligonucleotide Primer Extension, HOPE)。高通量定序(HTS) 是新世代 DNA 序列分析技術，又稱為次世代定序(Next-generation sequencing, NGS)。不同於辛格定序(Sanger sequencing)低反應通量(reaction throughput)，單次 HTS 定序分析可獲得幾百萬到千萬條 DNA 分子的序列資訊。因此，在現有的 16S rRNA 基因為分子標記的基礎上，可針對中等長度的 DNA 序列(約 400-600bp)樣品進行高通量、高精準度和再現性佳的定序分析。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。

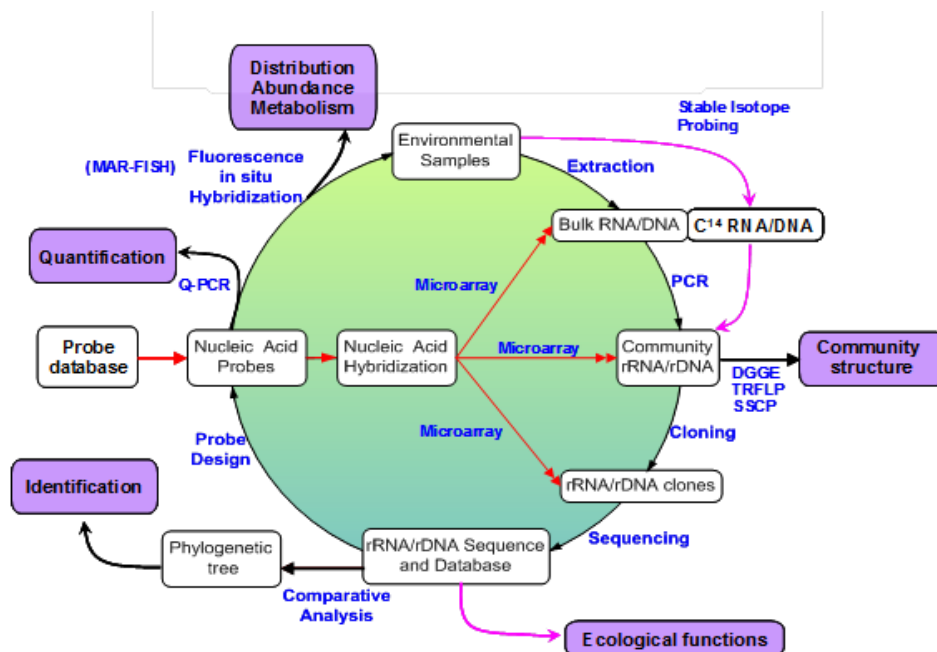


圖 3. 10、環境分子生物技術分析微生物菌群結構概略圖(本團隊整理)。

本團隊最近已利用焦磷酸(Pyrosequencing)高通量定序技術，成功地獲得約十萬條 DNA 序列並觀察受多氯戴奧辛污染土壤隨著時間變化，土壤中微生物菌群與數量的變動趨勢，結合叢集熱圖(clustered heat map)與主成分(principal component analysis)等統計分析工具，成功地比較健康土壤與多氯戴奧辛污染土壤之多樣性，並鑑定出可能分解多氯戴奧辛的指標菌群[圖 3.11]，可做為追蹤土壤戴奧辛污染的生物指標，相關知識提供發展戴奧辛污染土壤生物反應槽技術的

操作策略[32]。本團隊實驗室已例行地利用此項技術分析各種環境（如：土壤、廢水反應槽）的微生物菌群結構、分佈及動態。

HTS 定序技術主要針對未知微生物族群樣本進行開放式微生物鑑定分析，倘若要達到特殊菌群定量分析的目的，可仰賴高度變異的 16S rRNA 定序區段，設計專一性寡核苷酸探針，結合即時定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 技術定量關鍵菌群 16S rRNA 基因的濃度。若需要同時定性及定量分析多種不同菌種時，可依據 DNA 序列資料設計大量的寡核苷酸引子結合本研究開發的高通量分生定量技術-階層寡核苷酸引子延伸 (Hierarchical Oligonucleotide Primer Extension, HOPE) 技術，達到高產率的微生物鑑定及菌群結構分析的目的。HOPE 技術是吳哲宏博士於 2007 年研發出的高通量微生物豐度的定量分生技術。第一篇論文已發表於高影響係數的 *Nucleic Acids Research* (SCI impact factor 7.52)[33]，引起環境微生物領域科研人員相當的重視。利用在這項技術時需要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。單一 HOPE 分析反應可以定量至少七個目標菌群，突破目前定量分析技術僅可分析 3-4 的標的菌群的數量限制。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。

HOPE 已成功地應用在飲用水水質安全與廢水處理系統相關的微生物分析研究。HOPE 方法首先應用於糞便污染指標菌群之測定，根據人、豬、牛糞便中菌群的 16S rRNA 基因親緣特性，我們設計並最佳化 19 組專一性的寡核苷酸引子，以同時偵測 14 種不同分類階層的擬桿菌(*Bacteroides*)。結果顯示在人類的糞便中屬於擬桿菌目的菌群占糞便總菌群的 28%-44%，此豐度大約是牛與豬糞便樣本的 5 倍或都市廢水樣本的 2 倍。人類糞便樣本中都可偵測到 *B. vulgatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. caccae*, *B. uniformis*, *B. fragilis*, *B. eggerthii*, 與 *B. massiliensis* 的存在，即使這些個別菌群的豐度低至 0.1%。這個結果不僅說明擬桿菌是人類腸道中極為優勢的菌群，且展示 HOPE 分析的確具有高度的敏感性、專一性，並可快速偵測環境中擬桿菌種類及其族群大小[34]。進一步地，本團隊展示 HOPE 分析平台應用於人、豬、牛的糞便污染來源追蹤[35][圖 3.12]，並推廣在新店溪流域與金門山山外溪糞便污染來源追蹤。

除了腸道菌與糞便污染來源追蹤，HOPE 方法已成功地應用其他環境微生物，如藍綠菌[36]、甲烷菌[37]、土壤戴奧辛分解菌的定量分析[38]，分述如下。2010 年 HOPE 技術應用於調查台灣的水庫中藍綠菌 *Cylindrospermopsis raciborskii* 的分布，發現此藍綠菌在台灣的水庫中分布的相對豐富度介於 0.5%到 76.4%間，且 HOPE 分析 ITS 標記，可成功地鑒別全球不同區域的 *Cylindrospermopsis raciborskii* 族群；2013 年 HOPE 結合新設計的甲烷菌專一性引子，應用於調查 PTA 廢水、

Cumulative abundance (%)

1.5 month 3.0 month Week 0 Week 1 Week 2 Week 3 Week 4

Unclassified Bacteria
Others
Proteobacteria
Firmicutes
Acidobacteria
Actinobacteria

Phylogenetic composition

W2 W1 AS-Q AS-Q W3 W4 M6 W5

Planctomycetes
Spirochaetales
Deinococcales
Chlamydiales
Chlamydiae
Firmicutes
Clostridiales
Myxococcales
Xanthomonadales
Legionellales
Gammaproteobacteria_incertae_sedis
Pseudomonadales
Sphingomonadales
Caulobacteriales
Rhizobiales
Rhodospirillales
Actinomycetales
Actinobacteria

Bacteroides-Prevotella 16S Phylotype

Phylogenetic tree showing relationships between various Bacteroides and Prevotella species. The tree is rooted at the bottom and branches upwards. Species names are listed next to their corresponding branches. Bootstrap values are indicated at the nodes. A scale bar of 0.02 is shown at the bottom left.

Relative abundance (%)

Bar chart showing the relative abundance of Bacteroides and Prevotella species in different environments. The y-axis represents the relative abundance percentage (0 to 80). The x-axis lists the environments: Others, Dog, Human, Cow, Pig, and Bovine. The legend indicates the following species groups:

- Others
- B. fragilis subspecies (with *sdT11*)
- B. fragilis subspecies (with *sdT11*)
- P. distans cluster
- B. fragilis cluster
- B. coprocola
- B. fragilis
- B. vulgatus
- B. helgolandicus
- B. eggerthii
- B. uniformis
- B. intestinalis
- B. acidifaciens
- B. caecalis
- B. fragilis
- Others

Stress: 0.15

Stress plot showing the distribution of Bacteroides and Prevotella species across different environments (Cow, Pig, Human, Dog). The plot shows a clear separation between the environments, with a stress value of 0.15. The legend indicates the following species groups:

- Cow
- Pig
- Human
- Dog

(四)、研究方法與過程

本計畫將導入尖端的 HTS 定序法與 HOPE 法，針對多氯乙烯地下水污染場址生態系統，建立整合性的微生物分析平台。圖 4.1 是本計畫擬建置地下水微生物高通量分析策略與流程示意圖。如圖 4.1 所示，污染場址樣本適當前處理後，回收微生物群總 DNA。接著，以 PCR 結合原核生物(細菌域與古菌域)專一性的引子，複製 16S rRNA 基因片段並純化後，以 Illumina 公司最新推出的 MiSeq Workflow 次世代定序技術進行高通量定序分析，每個樣本估計約可獲得約 30 萬條以上的 DNA 序列資訊，預估採樣深度(sampling depth)足夠偵測到樣本中豐富度低於 0.001%，甚是更低的菌種。如此大量的數據，再利用生物資訊軟體分析後，可鑑定 DNA 序列至屬(genus)或種(species)的階層。HTS 定序法是開放式的偵測策略(open format detection)，因此無法預期會偵測到那些菌群，根據 HTS 定序法獲得的結果可深入瞭解污染場址細菌域與古菌域的微生物社群結構。

HOPE 法的偵測策略則是封閉型的(closed format detection)，即必須先擬定欲分析的目標菌群。本計畫將先建立脫氯菌群的 16S rRNA 基因序列庫，然後在域(domain)、屬(genus)、群(group)等階層，針對目前文獻報導經具有還原脫氯能力且常見於污染場址的菌群，如 *Dehalococcoides* (脫鹵球菌)、*Dehalobacter*、*Desulfitobacterium* 屬等為目標，設計專一性階層引子，其中對於脫鹵球菌屬下再設計三組專一性的引子，分別偵測 Pinellas、Victoria、Cornell (strain 195) 群的脫鹵球菌[表 3.1]。然後，以參考菌 DNA 進行反應條件最佳化實驗後，在最佳化分析條件下，分析污染場址的樣本中 *Dehalococcoides*、*Dehalobacter*、*Desulfitobacterium* 屬的豐富度。根據 HOPE 法獲得的結果可深入瞭解污染場址指標菌群的豐富度，然後進一步與地下水水文地質資料、其他生物性調查結果等進行交叉比較討論。由於國內多氯乙烯污染場址可能存在其他豐富度高的脫氯菌，將參考 HTS 定序法獲得的微生物社群結構結果，回饋做為 HOPE 分析的目標菌群。此計畫研擬結合 HTS 與 HOPE 的分析流程，將可建立客製化的指標菌群資料庫。

建構完成的 HTS 定序技術與 HOPE 法將能成為環境微生物法醫的重要的鑑識工具。當土壤地下水遭受多氯乙烯污染或進行生物復育法整治時，地下水環境會發生巨大改變，進而影響到微生物族群的分布。污染物與微生物種類隨著時間演進與空間分布發生演替變化，因此，結合化學性的數據、水文地質等參數與指標微生物分析的結果，將可能推估污染發生的時程以及種類。

雖然 HTS 分析法能夠得到環境中微生物社群結構全面性的資訊，但分析成本相當較高(每個樣本約 15000 元) 且非常耗時(大約需要 2-3 個月)。若只需要監測指標菌群或關鍵脫氮菌群，HTS 分析法可能獲得大量無法解釋或應用的數據，顯得浪費；HOPE 分析法在分析成本上(每個樣本約 2000-3000 元)、分析時效性(大約 1-3 天)、以及定量準確度上會優於 HTS 分析法。因此，HTS 與 HOPE 在技術層面上互補的，可相輔相成。本計畫將比較兩種方法的分析結果，再依據分析目的與方法優缺點，建議最作為地下水菌群結構與脫氮菌調查的工具與使用時機。

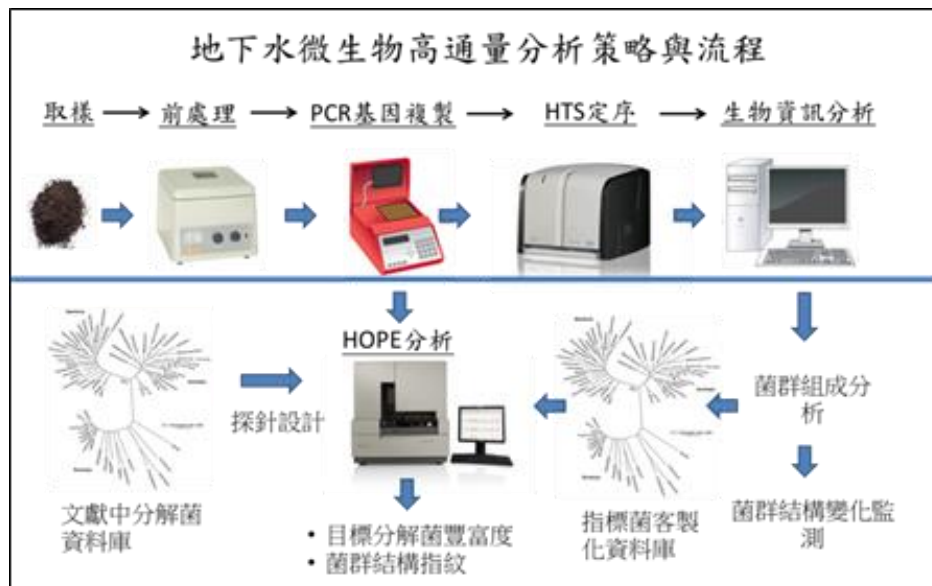
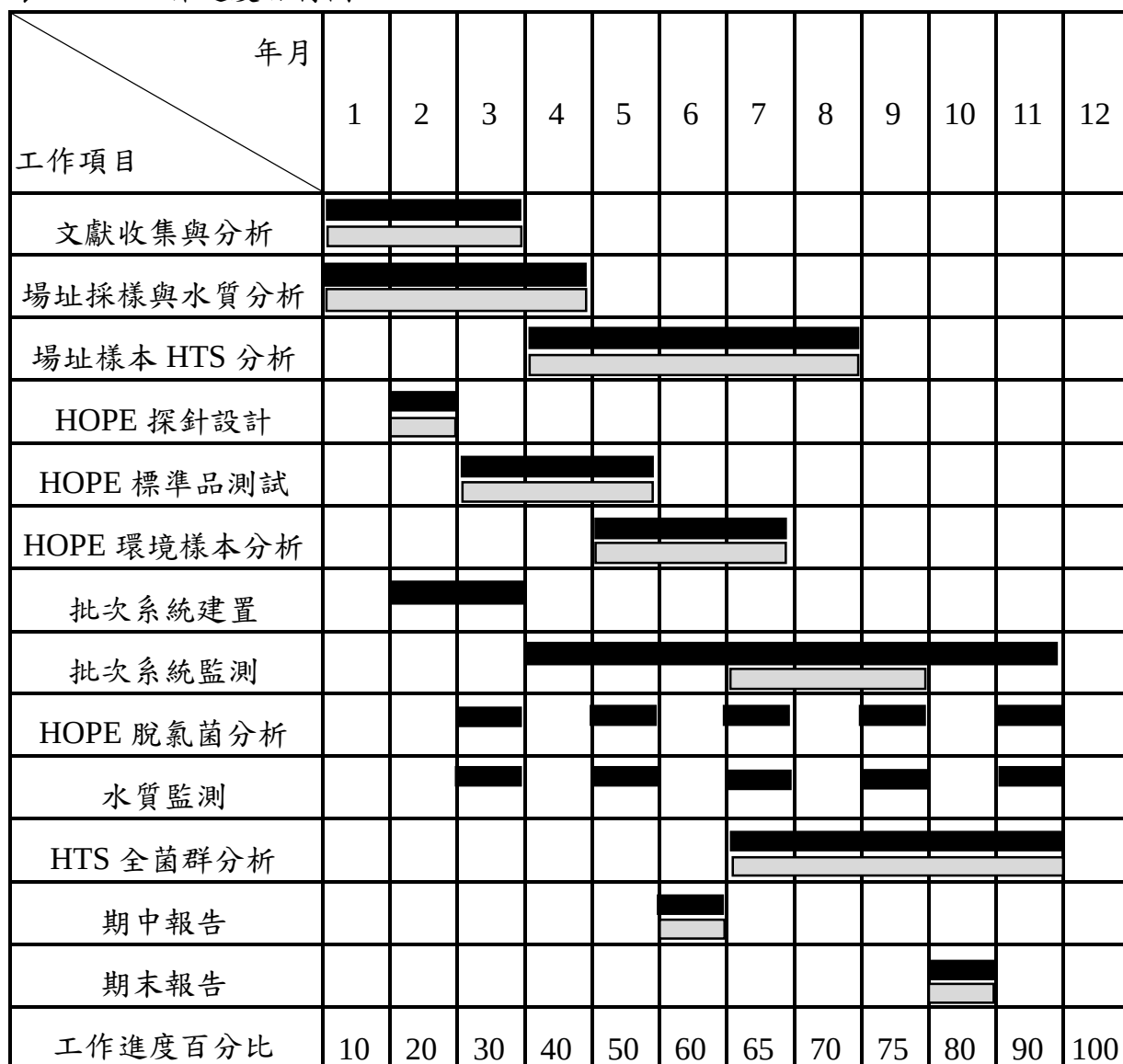


圖 4.1、本計畫擬建置地下水微生物高通量分析策略與流程示意圖

表 4.1、工作進度甘特圖



黑色長條為預期研究進度；灰色長條圖為實際進度

(五)、材料與方法

5.1 水樣 DNA 萃取

本研究使用商業化套組 Power water DNA Isolation kit(MOBIO, USA)萃取 DNA。以 0.22 μ m 濾紙進行水樣過濾後，將過濾好的濾紙放入抽取 DNA 用的試管中，在開始前，將 kit 的 PW1 以及 PW3 放至 55°C 烘箱 10 分鐘，溶解溶液中的溶質。以 PW1(強力的 lysing buffer，可去除非 DNA 的有機物與無機物)加入抽取 DNA 用的試管中，將濾膜上的物質洗下，震盪 2000rpm 5 分鐘，以 4000rpm 離心 1 分鐘，抽出溶液部份，以 13000g 離心 1 分鐘(將蛋白質碎片和細胞碎片與 DNA 分開) 後將上清液移至新 tube，加入 PW2(去除非 DNA 的有機物及無機物，增加 DNA 純度並減少抑制物質)，培養於 4°C，5 分鐘，後以 13000g 離心 1 分鐘，將上清液移至新 tube，加入 PW3 (高鹽試劑，使 DNA 與純化的膜結合)，將溶液加入至 filter tube 內，13000g 離心 1 分鐘，重複至濾完為止，將 filter 加以 PW4、PW5(沖洗 PW4)分別將 DNA 洗淨，以 PW6 回溶，冷凍於-20°C 冰箱待用。

5.2 聚合酶鏈鎖反應(Polymerase Chain Reaction, PCR)

在進行分子生物技術前須將樣本中的目標菌群基因放大以增加偵測極限，需進行聚合酶鏈鎖反應。將萃取之 DNA 以不同的引子以及 DNA 模板進行樣本及引子的測試或 DNA 的增幅。每管試劑配置如下，內含，1x Ex Taq buffer (TAKARA)，200 mM dNTP premix (TAKARA)，200 nM forward 和 reverse 的引子，0.5 U Ex Taq (TAKARA)，以及 5~10 ng 的 DNA，並以 PCR water 補至 20 μ L。本實驗所使用之 PCR 條件依照各引子及樣品條件有所不同，每一實驗所使用的詳細條件附註於結果與討論的圖表中，PCR 大致條件為 95 °C Denature 3~5 分鐘，再進行 95 °C Denature 30 秒~1.5 分鐘、52~64 °C Annealing 45 秒~1.5 分鐘、72 °C Extension 1 分鐘~1.5 分鐘，總共進行 25~35 個熱循環，最後以 72 °C Extension 5 分鐘~10 分鐘以完成放大。

5.3 瓊脂膠電泳

進行瓊脂膠體電泳是為了確定萃取之 DNA 或 PCR 放大後的基因序列長短，而根據用途不同可配製不同濃度之瓊脂膠體，本研究最常使用之濃度為 1.5%，作法如下：將 1.5 g agarose (Biotech, co., Ltd) 加入 100 ml 1X TAE buffer (40 mM Tris-base, 0.2 mM EDTA-2Na, 0.114% Glycyl acetic acid) 中，並於微波爐中加熱至溶解，接著倒入鑄模中冷卻，即得瓊脂膠體。進行電泳時，將 DNA 或 PCR 產

物與輔載染劑混合，注入瓊脂膠體內，然後控制電壓在 100 伏特~135 伏特之間進行電泳 20~40 分鐘。電泳完成後以溴化乙錠(ethidium bromide, EtBr) (amresco, 10 mg/L)染色 8 分鐘，之後以紫外光照膠系統(U:genius, SYNGENE, USA)進行分析。

5.4 分子選殖(Cloning)

本研究是挑選 TOPO TA cloning[®] kit (Invitrogen Inc., CA, US)進行分子選殖。首先大量複製樣本 DNA 中的特定基因片段，隨後嵌入質體(pCRII-TOPO[®])中，再轉殖到勝任細胞內，並加入 SOC medium 於 37℃ 下輕微震盪培養培養 1 小時後，塗抹於含有 Kanamycin、IPTG 與 X-gal 的 LB 洋菜膠上，放置於 37℃ 下培養 12-16 小時後可觀察到藍色與白色菌落，再放置 4℃ 下 2 小時使顏色更明顯。接著以無菌牙籤挑選白色菌落，混入滅菌水中，再利用特定引子進行 PCR 測試，經過瓊脂膠體電泳及照膠分析後，若有產生亮帶且片段長度正確，即送樣 DNA 序列分析。

5.5 DNA 定序分析

本研究委託明欣生物科技有限公司進行基因序列之分析，分析之結果經由 Bioedit 軟體進行處理後，傳送序列至 NCBI(National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)網站，應用 BLAST 軟體將定序出的基因片段與 GenBank 資料庫中已發表的序列進行比對分析。

5.6 階層寡核苷酸引子延伸技術(Hierarchical Oligonucleotide Primer Extension, HOPE)

5.6.1 單鹼基引子延伸實驗

每一管 HOPE 反應含有 2 µl SNaPshot premix、5.5~44 fmole 的 DNA 模板、20 pmole 的 multiplex 引子混合液及水。SNaPshot premix 中含有 AmpliTaq DNA polymerase, salty buffer 及含有螢光之 ddNTP (ddATP、ddTTP、ddCTP 及 ddGTP)，接著經過 30 個熱循環 (95 °C 10 秒, 60 °C 20 秒, 72 °C 30 秒)，反應後之溶液加入 1 U shrimp alkaline phosphatase (Roch Applied Science, Germany) 於 37 °C 下培養 90 分鐘以去除未反應的螢光 ddNTP，降低後續分析的背景螢光的干擾；再提高至 75 °C 維持 10 分鐘使酵素活性消失以終止反應。

5.6.2 毛細管電泳

經過單一螢光鹼基引子延伸反應後，取 1 μL 反應物並分別加入 0.1 μL Gene Scan 120 Liz size Standard (Applied Biosystem)、9 μL Hi-Di formamide (Applied Biosystem)，混合後取 10 μL 的反應液進行毛細管電泳片段分析。毛細管電泳條件為電壓 2.1 kV、時間 40 秒；最後利用 GeneMapper 軟體進行資料分析及收集。

5.6.3 HOPE 結果計算

經過毛細管電泳層析後的螢光圖譜以 GeneMapper® Software Version 4.0 (Applied Biosystems, USA) 程式的判讀後，轉換為層析的面積、高度、以及位置。其中將 multiplex 的引子進行標準菌的單一測試，可以得到引子間的校正係數 (calibration factor, CF)，此係數為校正引子間延伸效率不同造成的差異，其計算方式如下：

$$CF = \frac{\text{使用標準菌時 A primer 產生的螢光強度(以面積表示)}}{\text{使用標準菌時 B primer 產生的螢光強度(以面積表示)}}$$

獲得 CF 值後，即可針對環境樣本進行實驗並計算 A 菌於 B 菌的豐富度，計算方式如下式：

$$\text{A 菌於 B 菌的豐富度} = \frac{\text{測量環境樣本時 A primer 產生的螢光強度(以面積表示)}}{\text{測量環境樣本時 B primer 產生的螢光強度(以面積表示)} \times CF}$$

5.7 高通量定序技術

將萃取的 DNA 進行 16S rRNA 基因片段擴增，使用的引子對可針對 V3/V4 高變異區間進行複製，引子對分別為 Pro341F 及 Pro805R，作為菌群結構分析、環境菌群身分鑑定及親緣資料庫分析。PCR 反應溶液包含 DNA 模版 1~2 μL (約 10 ng)、各 200 nM 的引子、0.2 mM 的 dNTP、一倍的 FastStart Buffer (Roche, Indiana, USA) 以及 1.25 U 的 FastStart HiFi Polymerase (Roche, Indiana, USA)，PCR 總體積為 24 μL 。PCR 溶液於 9700 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) 進行熱循環反應，於 94°C 變性 3 分鐘，再進行 94°C 變性 15 秒、50°C 引子黏合 45 秒、72°C 延伸反應 1 分鐘，總共進行 40 個熱循環，最後以 72°C 延伸反應 8 分鐘完成 PCR 產物放大程序。接著，經過 PCR 放大的產物會利用 1.5% agarose 進行瓊脂膠體電泳確認聚合酶鏈鎖反應的產物長度，並使用 Agencourt AMPure XP Reagent (Beckman Coulter Inc., Beverly, Massachusetts, USA) 進行 PCR 產物

純化。隨後，將所有 PCR 產物集中於一管離心管中並利用 Illumina Miseq 高通量定序分析系統進行定序。

得到所有樣本的 16S rRNA 基因序列後，為了將定序的隨機誤差降到最小及去除品質不好的序列，首先將核酸序列小於 150 nt 基因片段去除，同時，去除涵蓋在序列的引子、barcodes 及 adaptor，修剪這些序列後，可使平均基因片段長度提升至 320~350 nt，可大大地提升基因片段的品質。樣本中的基因片段可利用 RDP Pipeline Process (<http://pyro.cme.msu.edu>) 中 "classifier" 分析工具且相似性參數為 95% 進行分類。緊接著，利用這些資料可進一步整合成 Rarefaction curve 並利用 97% 相似度定義各樣本的操作分類單元 (Operational Taxonomic Units, OTU) 推估微生物多樣性，並用以分析在不同階層微生物菌群的分佈情形。

5.8 地下水採樣與水質分析

多氯乙烯污染場址的地下水採樣依據環檢所標準方法 NIEA W103 51B 進行。採樣時在工程公司的協助下使用貝勒管(Bailers)採集地下水。採樣前先進行洗井動作，已至少三倍井柱水體積之水量快速洗井並且於洗井完後兩小時內完成採樣動作。採集完的樣本裝瓶且依環檢所公告標準方法 NIEA W102.50A 進行水樣保存並送至中環科技事業股份有限公司進行分析。分析項目及方法如下表 5.1。

表 5.1、地下水分析項目

檢驗項目	分析方法
氯甲烷	NIEA. W785.55B
氯乙烯	
1,1-二氯乙烯	
二氯甲烷	
反-1,2-二氯乙烯	
1,1-二氯乙烷	
順-1,2-二氯乙烯	
氯仿	
1,1,1-三氯乙烷	
1,2-二氯乙烷	
苯	
四氯化碳	
三氯乙烯	
甲苯	
1,1,2-三氯乙烷	
四氯乙烯	
氯苯	
乙苯	
間,對-二甲苯	
鄰-二甲苯	
1,4-二氯苯	
1,2-二氯苯	
奈	
二甲苯	
甲基第三丁基醚	

(六)、初步結果與討論

6.1 還原脫氯菌豐富度多通量分析: HOPE 分析平台技術之建立

6.1.1 HOPE 引子設計

目前已知的脫氯族群在 Bacteria 界中分屬於三個門(Phylum), 分別為 Firmicutes、Chloroflexi、和 Proteobacteria。Firmicutes 下的脫氯族群有 *Desulfitobacterium*、*Dehalobacter* 和 *Desulfovibrio*; Chloroflexi 下有 *Dehalococcoides*、*Dehalobium* 和 *Dehalogenimonas*; Proteobacteria 則有 *Geobacter*、*Desulfuromonas*、*Desulfomonile*、*Anaeromyxobacter* 和 *Sulfurospirillum*。這些脫氯菌僅能利用甲酸、乙酸和氫氣等簡單物質進行生長代謝, 並普遍存在於含氯污染的地下水以及土壤當中。本計畫將針對污染場址中常見的脫氯菌群開發偵測技術並設計 HOPE 專用引子, 所設計的引子特性如下表 6.1 所示。

PCR 是分子生物技術分析前的必備程序, 但為了增加 HOPE 技術對於脫氯族群偵測的敏感度, 須以兩種 DNA 放大策略來進行。第一, Set 1 以總細菌群的 16S rRNA 基因為主來進行放大, 選用引子對 27F-1492R 進行 PCR 複製反應以增加整體微生物的 16S rRNA 基因複製物的量; 第二, Set 2 以 *Dehalococcoides* 的專一性引子 27F-1350R, PCR 複製增加對於特定脫氯菌群的偵測極限。如圖 6.1 所示, 本計畫設計 HOPE 的引子分別針對域(Domain)階層 Bacteria; 屬(Genus)階層 *Dehalobacter*、*Desulfitobacterium*、*Dehalococcoides* 和 *Geobacter*; *Dehalococcoides* 次要族群(Subgroup)Cornell、Victoria 和 Pinellas, 共 8 組引子。引子的專一性設計主要藉由引子與非目標 DNA 板模的錯位數目及位置調控, 且為了能將經由 HOPE 反應後已標籤的引子能夠在毛細管電泳中分離, 在引子的 5'端會加上一段長短不同的 dTTP 序列, 但所加上去的序列將會影響引子延伸效率, 因此在調整引子長度與延伸效率下必須取得平衡。

應用分子生物技術偵測不同的菌群時, 都希望以高通量同時偵測多個目標菌群, 以減少時間、成本和人力消耗。HOPE 技術的優點在於可利用電腦進行 *in silico* 的分析, 在 5'端加上不同長度的且無意義序列, 可輕易在同一個反應中加入多條引子進行高通量分析。本計畫擬定 DNA 放大策略與 HOPE 引子需搭配使用, 如圖 6.1 所示。Set 1 使用 27F-1492R 進行放大, HOPE 反應則有一條對於 Bacteria 專一的引子 338F, 此引子可以延伸出鹼基 C(黑色), 以及四條對於脫氯菌群 *Dehalococcoides*、*Dehalobacter*、*Desulfitobacterium* 和 *Geobacter* 專一的引子 587F、Dh1b211R、Dsftb432R 和 Geo196R, 以上引子可以延伸出鹼基 C、T(紅色)、T 和 A(綠色)。Set 2 使用 27F-1350R 進行放大, 主要是用來提升 *Dehalococcoides* 的敏感度, 使用一條對於 *Dehalococcoides* 專一的引子 587F, 此引子可以延伸出鹼基

C，以及兩條對於 *Dehalococcoides* 次要族群 Cornell、Victoria 和 Pinellas 專一的引子 C190F 和 VP179F，以上引子可以延伸出鹼基 C、A 和 T。VP179 設計上較為特殊，能夠同時偵測 *Dehalococcoides* Victoria 和 *Dehalococcoides* Pinellas 族群，並分別延伸出 A 或 T 不同顏色的波峰。

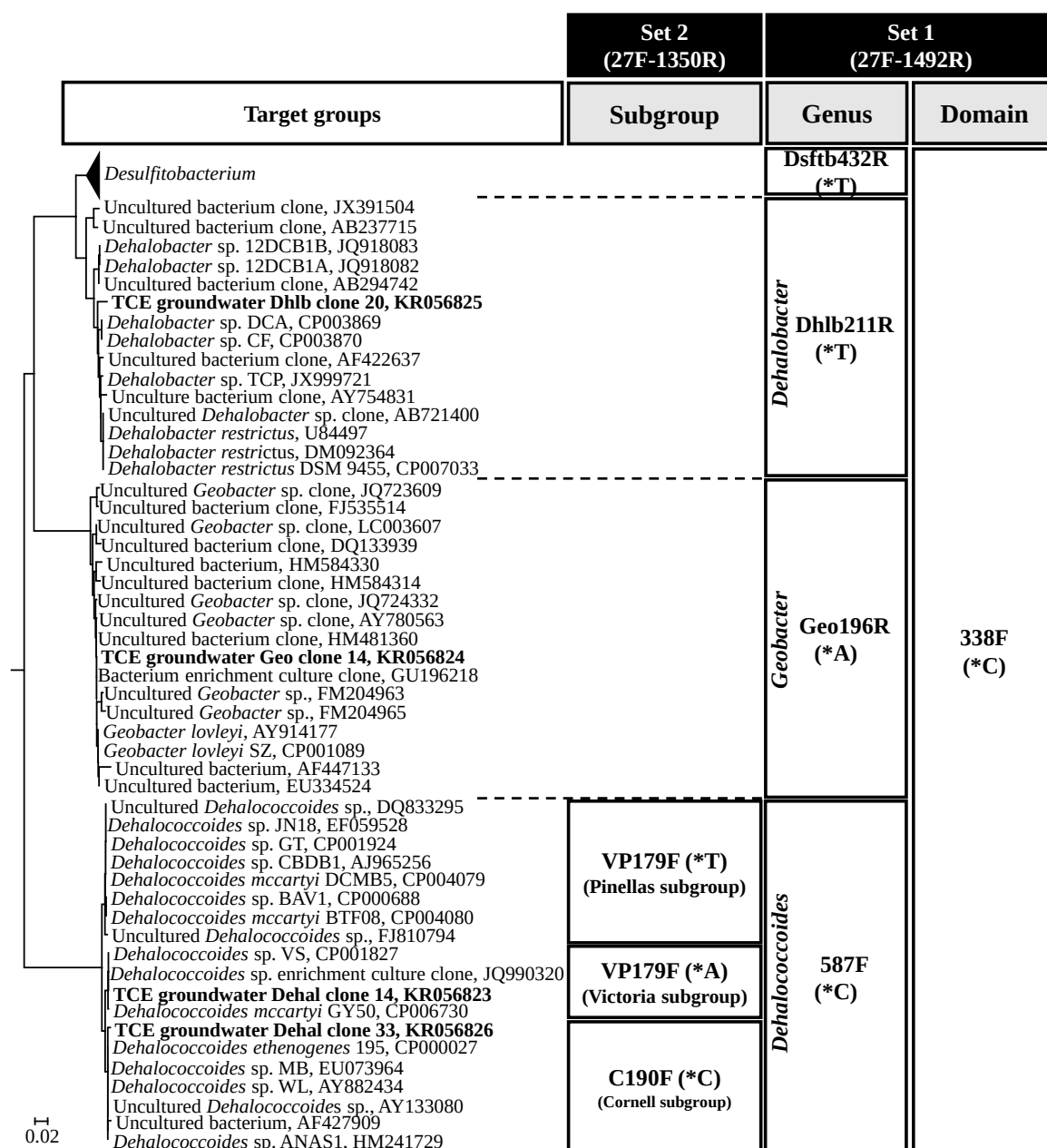


圖 6. 1、以 16S rRNA 為基礎和 Neighbor-joining 法所繪製的 *Desulfotobacterium*、*Dehalobacter*、*Geobacter* 和 *Dehalococcoides* 親源樹圖。圖中粗體字為本計畫以分子選殖所篩選到的標準菌株，以及右邊為 HOPE 分析法所設計的引子和階層關係。

表 6.1、本計畫用於分子生物相關實驗所設計與使用的寡核苷酸引子

Primer name	Specificity	Target	Length (nt)		Allele	GC (%)	Tm (°C)	Used in	Reference
			Primer	Tail					
587F	Genus	<i>Dehalococcoides</i>	25	0	C	32.0	52.6	HOPE	This study
C190F	Genus	<i>Dehalococcoides</i> Cornell	18	0	C	50.0	51.3		This study
VP179F	Genus	<i>Dehalococcoides</i> Victoria	35	18	A	55.9	54.6		Modified from [25]
VP179F	Genus	<i>Dehalococcoides</i> Pinellas	35	18	T	55.9	54.6		Modified from [25]
Dh1b211R	Genus	<i>Dehalobacter</i>	18	0	T	50.0	53.3		This study
Dsftb432R	Genus	<i>Desulfitobacterium</i>	18	0	T	55.6	53.2		This study
Geo196R	Group	<i>Geobacter</i>	22	6	A	32.1	54.3		Modified from [39]
338F	Domain	Bacteria	45	28	C	64.7	56.2		Modified from [40]
27F	Domain	Bacteria	20	-	-	47.5	52.2-54.3	Bacterial	[41]
1492R	Domain	Bacteria	22	-	-	43.2	53.5-55.6	16S rRNA	[41]
1350R	Genus	<i>Dehalococcoides</i>	18	-	-	55.6	53.7	gene	[42]

6.1.2 HOPE 引子專一性測試

在進行 HOPE 分析時，會先以 PCR 進行 16S rRNA 基因的放大，並置備成 HOPE 反應之 DNA 模板，之後加入不同脫氯菌群的引子混和物進行 HOPE 反應。HOPE 引子設計為了提升引子專一性，當引子與非目標 DNA 模板的互補區僅有一個錯位(mismatch)時，會刻意將錯位位置移到距離引子 3'端的鹼基，此項目的主要是利用 DNA 聚合酶的特性，使含錯誤配對之複合體不會進行延伸反應。

本計畫 HOPE 引子設計依據以上原則，分別針對不同脫氯菌的 DNA 模板進行測試，分別為 Dehlb clone20、Geo clone14、Dehal clone14 和 Dehal clone33，但由於仍缺乏部分的脫氯菌 DNA 標準品，因此我們設計了與引子相對應的 Oligonucleotide target 作為標準品，以探討 HOPE 引子的專一性。結果如圖 6.2 和表 6.3 所示，在 Bacteria 高階層與不同脫氯菌低階層的混和液測試結果中，都可以正確地偵測到目標物且延伸出與設計時相同的鹼基。圖 6.2a 是使用 Set 1 方法，HOPE 反應則有一條對於 Bacteria 專一的引子 338F，此引子可以延伸出黑色鹼基 C，位置約在 39.1，以及四條對於脫氯菌群 *Dehalobacter*、*Desulfitobacterium*、*Dehalococcoides* 和 *Geobacter* 專一的引子 Dhlb211R、Dsftb432R、587F 和 Geo196R，以上引子可以延伸出紅色、紅色、黑色和綠色的鹼基 C、T、T 和 A，位置約為 22.8、27.3、32.0 和 35.1；圖 6.2b 使用 Set 2 方法，使用一條對於 *Dehalococcoides* 專一的引子 587F，此引子可以延伸出黑色的鹼基 C，位置微 32.0，以及兩條對於 *Dehalococcoides* 次要族群 Cornell、Victoria 和 Pinellas 專一的引子 C190F 和 VP179F，以上引子可以延伸出黑色、綠色和紅色鹼基 C、A 和 T，位置為 28.7 和 42.0。VP179 設計上較為特殊，當環境中同時存在 Victoria 和 Pinellas 下及會出現綠色與紅色的波峰。

本計畫所設計的脫氯菌群引子其長度為 18~25 nt；T_m 值介於 51.3~56.2 °C，但為提升引子專一性，改以 60 °C 作為 HOPE 反應黏合溫度，由結果圖 6.2 中清楚看出所有引子延伸後所代表的波峰位置與顏色，並無其他非設計的波峰出現，證明本計畫設計的 HOPE 引子具高度專一性與鑑別力，足以應用於 HOPE 技術來偵測污染場址中脫氯菌群的豐富度。

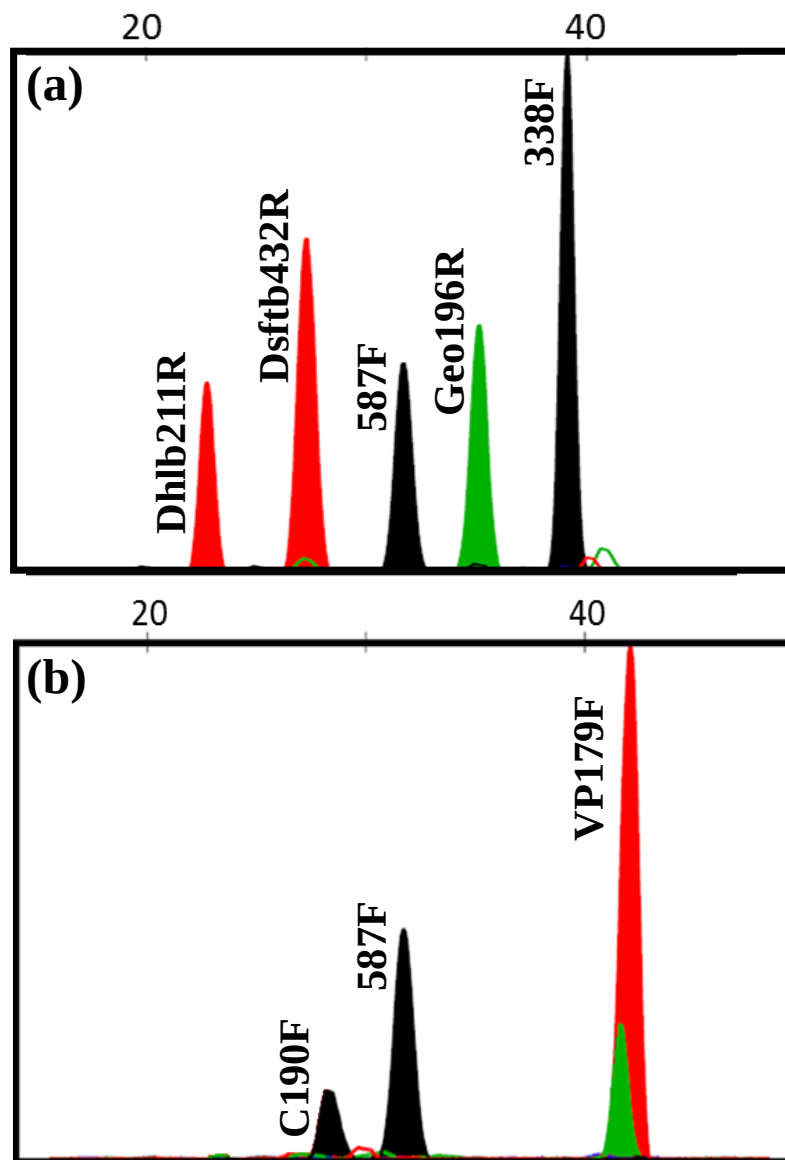


圖 6. 2、HOPE 法分析脫氯微生物族群的最佳化與專一性測試結果。(a)以 Set 1 條件分析結果；(b)以 Set 2 條件分析結果。

表 6. 2、HOPE 法的專一性測試

Perfect Match Target						
Primers	Dehal clone 33 <i>Dehalococcoides</i> sp. Strain 195-like	Dehal clone 14 <i>Dehalococcoides</i> sp. Strain VS-like	Synthetic Oligonucleotide <i>Dehalococcoides</i> sp. Strain Pinellas-like	Dhlb clone 20 <i>Dehalobacter</i> -like	Geo clone 14 <i>Geobacter</i> -like	Synthetic Oligonucleotide <i>Desulfitobacterium</i> -like
587F	C	C	-	-	-	-
C190F	C	-	-	-	-	-
VP179F	-	A	T	-	-	-
Dhlb211R	-	-	-	T	-	-
Dsftb432R	-	-	-	-	-	T
Geo196R	-	-	-	-	A	-
338F	C	C	-	C	C	-

6.1.3 HOPE 應用於分析環境樣本之驗證

當 HOPE 分析方法確認後，即挑選台南某多氯乙烯污染場址 A 與本實驗一還原脫氯反應槽樣本進行測試與驗證。在台南某場址發現三氯乙烯、順-二氯乙烯、反-二氯乙烯、1,1-二氯乙烯和氯乙烯，其濃度分別為 21.8 ppm、54.8 ppm、0.198 ppm、1.10 ppm 和 1.78 ppm。上述多氯乙烯的分佈據推斷該多氯乙烯污染場址 A 含有還原脫氯的微生物存在其中，因此以 HOPE 法進行偵測。偵測結果發現，有 *Dehalobacter*、*Dehalococcoides* Victoria 和 *Geobacter* 等脫氯菌群存在。另一方面，以 HOPE 方法偵測還原脫氯反應槽的水樣，則偵測到 *Dehalococcoides* Cornell 群存在。為了驗證上述 HOPE 分析實驗的結果，我們利用分子選殖技術分析，以特定脫氯菌之專一性引子進行實驗，所得結果如圖 6.1 和表 6.2。分子選殖數據經由 NCBI 比對後得到與 HOPE 分析一樣的結果，在台南某多氯乙烯污染場址 A 分別有 *Dehalobacter* sp. 1,1-DCA1、*Dehalococcoides* sp. Strain VS 和 *Geobacter lovleyi* strain SZ，其相似度分別為 100%、99% 和 100%；還原脫氯反應槽則有 *Dehalococcoides ethenogenes* 195，其相似度為 99%。以上結果經過分子選殖的驗證下，證明本計畫設計的 HOPE 引子具有高度專一性與有效性。

特定脫氯族群的出現可初步推測污染物污染時間、種類與整治是否成功，如下圖 6.3 所示。本計畫利用 HOPE 技術調查台南某多氯乙烯污染場址 A 發現 *Dehalobacter*、*Geobacter* 和 *Dehalococcoides* 存在其中。*Dehalobacter* 和 *Geobacter* 在多氯乙烯的還原脫氯中扮演將四氯乙烯脫氯成二氯乙烯的重要角色；*Dehalococcoides* 則會因不同的 subgroup 會有不同的脫氯反應的關聯性，HOPE 分析實驗偵測到 *Dehalococcoides* Victoria subgroup，Victoria group 主要是扮演將二氯乙烯完整脫氯至乙烯的重要微生物族群。以上偵測到的三種脫氯族群可代表幾項指標意義，分別為(1)該場址污染應已發生一段時間，因此馴養出較為完整的脫氯系統；(2)此場址除了主要污染物三氯乙烯的存在外，將會有低氯數的氯乙烯出現；(3)污染場址具備完整脫氯微生物系統，適合利用厭氧還原脫氯進行整治。

表 6.3、台南某多氯乙烯污染場址 A 經由分子選殖後於 NCBI 比對結果

Clone name	Length (bp)	Closet match in GenBank	Coverage/Identity (%/ %)	Sample type
Dhlb clone 20	863	<i>Dehalobacter</i> sp. 1,1-DCA1	100/100	Contaminated site
Geo clone 14	1443	<i>Geobacter lovleyi</i> strain SZ	100/100	
Dehal clone 14	1315	<i>Dehalococcoides</i> sp. Strain VS	100/99	
Dehal clone 33	1316	<i>Dehalococcoides ethenogenes</i> 195	100/99	Reactor

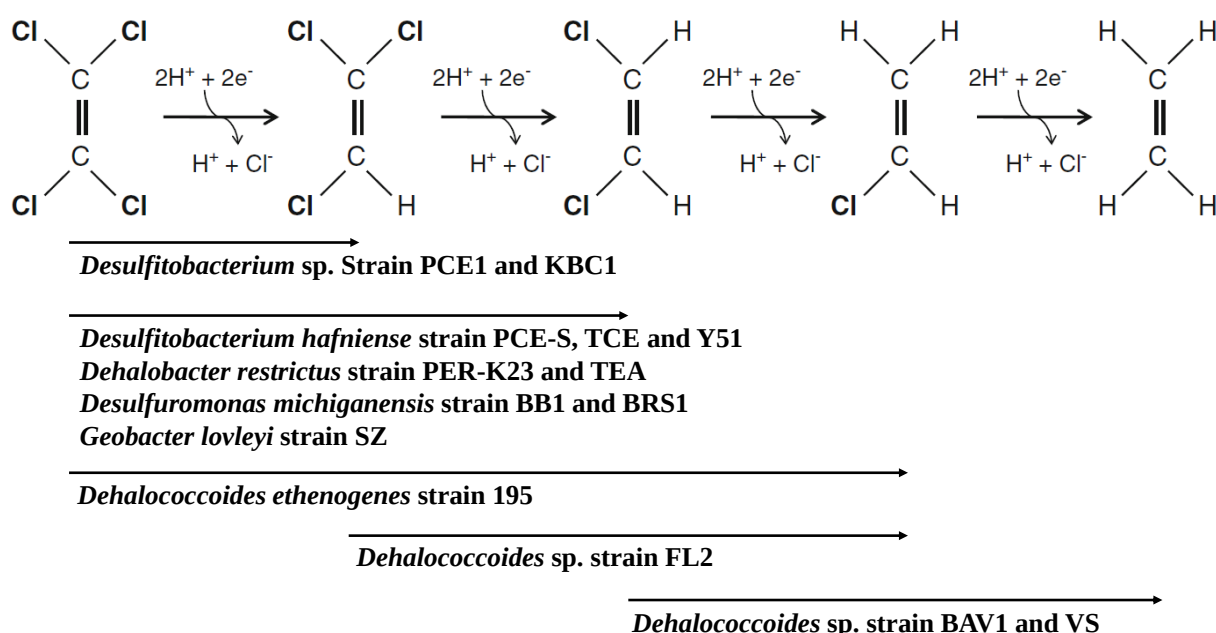


圖 6.3、脫氯微生物族群對於多氯乙烯脫氯能力示意圖。

6.1.4 HOPE 偵測極限測試

脫氯菌在污染場址當中數量稀少，但卻扮演污染物去除的重要角色，因此如何偵測到少數的微生物族群是相當重要的，本計畫針對於環境中極少的菌群開發偵測方法，於是進行偵測極限的測試。本試驗準備 Dehal clone14、Dhlb clone20 和 Geo clone14 經過 PCR 放大的 DNA 產物，調配相對豐富度範圍在 0.20% 到 3.13%，而總 DNA 濃度則為 20 ng。準備好以上已知濃度的產物後，選擇設計好針對脫氯菌的 HOPE 引子 587F、Dhlb211R 和 Geo196R 三組以及能夠偵測總細菌量的 338F，

如此將能進行微生物的相對定量計算。結果如圖 6.3 所示，圖 6.3a 的三組 DNA 標準品在序列稀釋下得到不錯的線性關係， R^2 皆高於 0.98 以上，由美國 Joint Genome Institute 資料庫查出，*Dehalococcoides*、*Geobacter* 和 *Dehalobacter* 三株菌株的 16S rRNA 套數分別為 1、2 和 3 套，將可能造成引子黏合效率以外另一個影響訊號強度的原因。當 Dehal clone14 的相對豐富度低於 0.39% 時，以 HOPE 分析方法較難偵測到，因此建議脫氯菌相對豐富度最好高於 0.39%。此外，為了驗證兩種 PCR 策略對於後續 HOPE 方法的偵測極限，本計畫選擇台南某多氯乙烯污染場址 A 進行調查，結果如圖 6.3b 和圖 6.3c。針對污染場址 A，我們以先前的策略 Set 1 和 Set 2 進行實驗，Set 1 分析法偵測到場址 A 中含有 *Dehalobacter* 和 *Geobacter*，其相對豐富度分別為 $0.68\% \pm 0.10\%$ 和 $2.49 \pm 0.81\%$ ，但並無偵測到 *Dehalococcoides* 族群；改以 Set 2 分析法則偵測到 *Dehalococcoides* 中的 Victoria 和 Cornell 族群，其佔 *Dehalococcoides* 的相對豐富度分別為 $72.23\% \pm 1.10\%$ 和 $12.13\% \pm 5.20\%$ 。由以上數據顯示使用 HOPE 方法偵測脫氯族群結果是正向的，HOPE 方法可以偵測到族群相對豐富度高於 0.4% 的脫氯菌，當 *Dehalococcoides* 族群相對豐富度低於 0.4% 時，我們可以選擇較為靈敏的方式偵測到 *Dehalococcoides* 的次要族群。

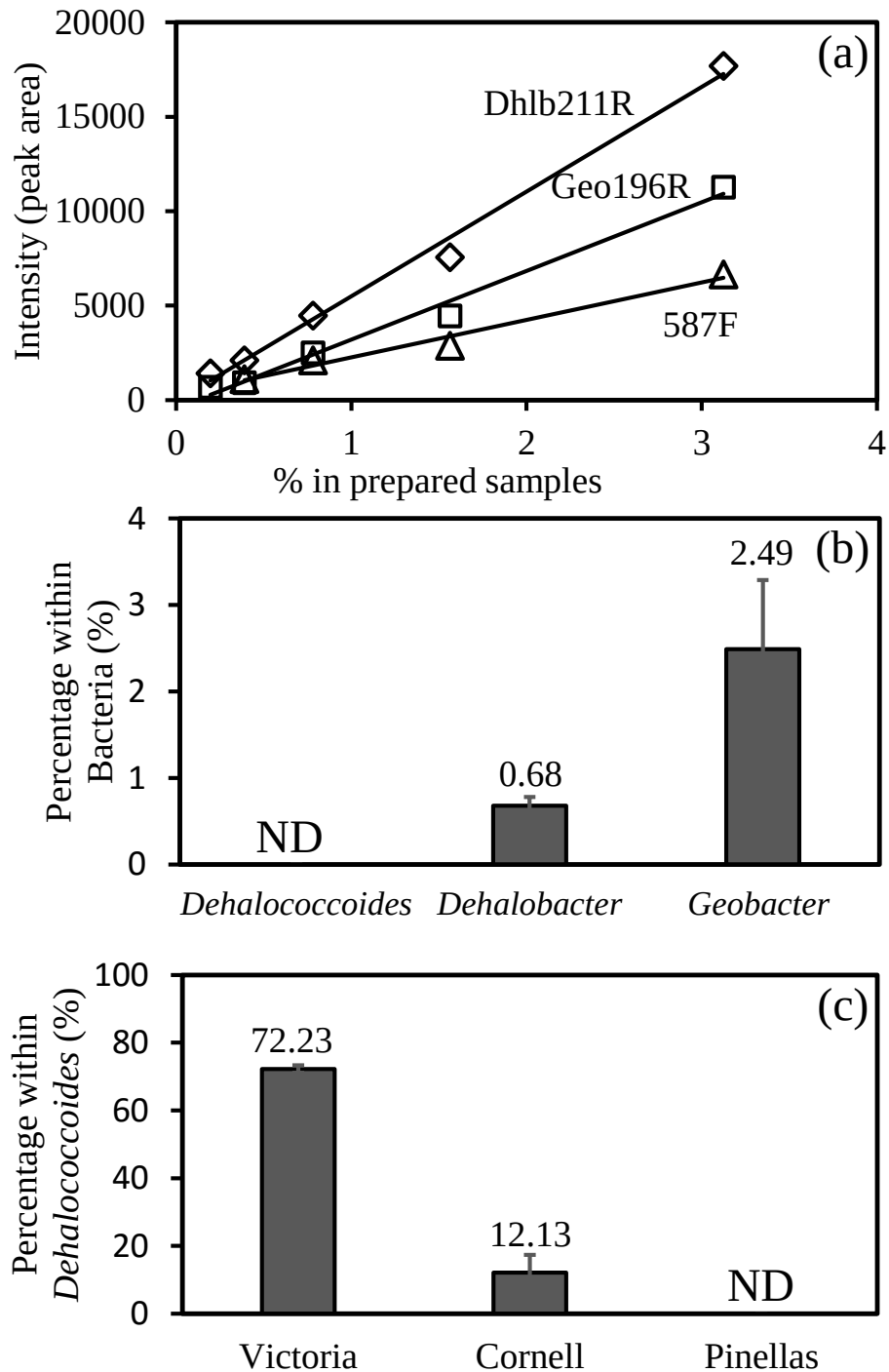


圖 6.4、HOPE 分析法針對脫氯微生物族群的偵測極限測試。(a)以 PCR 進行放大後的標準菌株 *Dehalococcoides*、*Dehalobacter* 和 *Geobacter* 與引子 338F、587F、Dhlb211R、Geo196R 進行 HOPE 反應後之螢光強度與相對豐富度關係圖；(b)以 HOPE 法 Set 1 條件進行污染場址 A 的分析結果；(c)以 HOPE 法 Set 2 條件進行污染場址 A 的分析結果。

6.1.5 批次試驗

接下來以建立的 HOPE 技術應用在批次實驗，探討脫氯菌群與多氯乙烯的動態變化。選擇地下水整治常用的乳化油作為碳源，植種來源為多氯乙烯污染場址 A 的地下土壤，由於該場址土壤 pH 值為 6.5，因此將在此 pH 值下於室溫進行實驗。實驗結果如圖 6.5 所示，圖 6.5a 中 pH 於反應前後無明顯變化，皆在 6.5 左右；圖 6.5b 和圖 6.5c 關係密切，分別為瓶頂空間的氣體組成和揮發酸的生成量，乳化油在厭氧消化的過程中會先被水解成脂肪酸，再經 β -oxidation 產生氫氣和乙酸，因此可以看到在第 2 天即有少量氫氣生成；10 天內有乙酸的累積。根據過去文獻得知，厭氧還原脫氯菌是以氫氣或短鏈揮發酸作為電子提供者；含氯化合物作為電子接受者進行鹵素呼吸，因此氫氣和短鏈揮發酸為脫氯反應前的必要物質。當具備電子提供者、電子接受者和碳源後，脫氯反應即可能發生，由圖 6.5d 可以觀察到三氯乙烯迅速被轉換成二氯乙烯。本研究以 HOPE 技術進行脫氯微生物的偵測與分析，結果如圖 6.5e 所示。圖中可以發現，當脫氯反應正在進行時，具四氯乙烯脫氯至二氯乙烯能力的 *Dehalobacter* 相對豐富度大幅增加，由原本低於偵測極限到增加到總菌量群的 $1.00 \pm 0.25\%$ ，隨著電子接受者被耗盡，*Dehalobacter* 的豐富度亦隨著時間逐漸遞減。可見 *Dehalobacter* 豐富度的增減與三氯乙烯第一步驟的脫氯反應有很強的關聯性，因此適合作為該場址的脫氯反應發生的指標菌群。此批次實驗結果顯示三氯乙烯只脫一個氯原子成為二氯乙稀，就不再繼續脫氯，而 HOPE 分析 *Dehalococcoides* 菌群與其他目標脫氯菌群的豐富度皆低於偵測極限的實驗結果相當吻合。

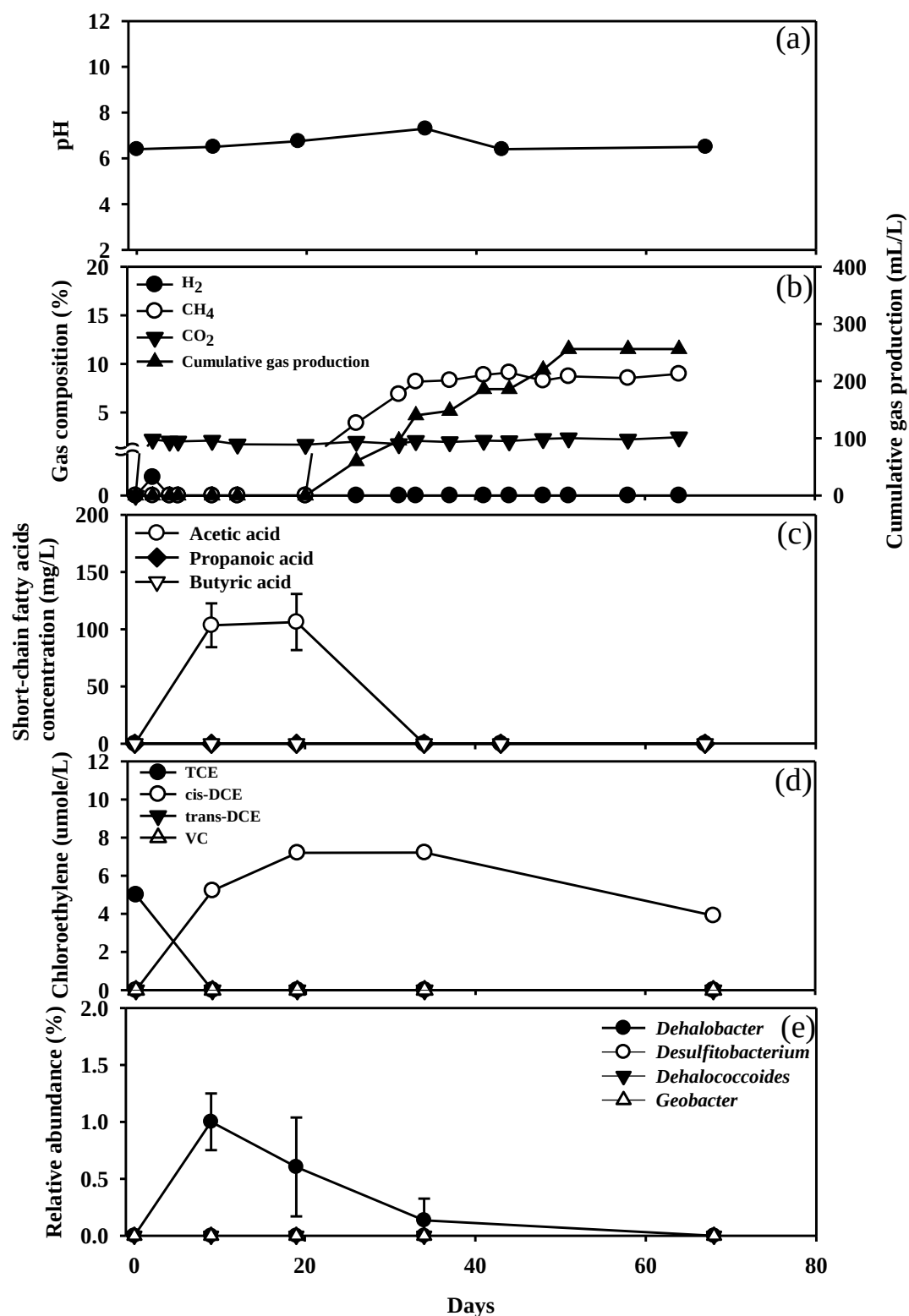


圖 6.5、以乳化油作為單一碳源進行操作的厭氧脫氯批次試驗。(a)反應槽中 pH 值變化；(b)瓶頂空間的氣體組成與生成量；(c)短鏈揮發酸的濃度變化；(d)多氯乙烯的組成分析；(e)脫氯微生物的組成。

6.2 土水微生物高通量定序分析

本計畫參考 Takahashi 等人於 2014 年發表於 PLOS ONE 所修改的引子進行次世代定序實驗[43]。所用引子為 Pro341F 和 Pro805R，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。此對引子以 RDP 作為資料庫在 in-silico 分析中得到細菌和古菌的涵蓋率分別為 98.0%和 94.6%。因此，本實驗以 Illumina Miseq 配合引子 Pro341F 和 Pro805R 進行土水為微生物的高通量定序分析，獲得的龐大數據的後續分析則選用 Ribosomal Database Project 的分類系統作序列親緣比對的參考[44]，為進一步分析結果，我們利用統計分析軟體 STATISTICA V8.0 中的主成分分析(Principal Components Analysis, PCA)和集群分析(Cluster Analysis)進行大數據的處理以找出關鍵微生物菌群。

計畫共選擇三個污染場址不同污染程度的地下水樣本和三個反應槽樣本進行高通量定序，其場址代號分別為 TT 場址(三氯乙烯污染)、MJ 場址(三氯乙烯污染)和 FPG 場址(二氯乙烷污染)；反應槽皆進流三氯乙烯為最終電子接受者，但不同單一碳源為電子提供者，樣本代號分別為 Seeding(乳化油為碳源)、Formate(甲酸為碳源)和 Acetate(乙酸為碳源)。定序的原始深度為每個樣本介於 287,468-805,412 reads；以 FASTX-Toolkit 進行篩選後 reads 介於 25,181-321,760。

6.2.1 高通量定序的再現性

為探究高通量定序技術分析地下水微生物樣本的再現性，計劃選用受三氯乙烯污染的 TT 場址其中一口井 TT-3 進行重複性測試。樣本定序後以 FASTX-Toolkit 進行篩選，每個樣本深度介於 32,081-57,430 reads。分析結果如圖 6.6 所示，該井是以 Proteobacteria 和 Thermotogae 為主要微生物族群。TT-3 A 超過 1%的微生物以門(Phylum)分類分別為 Proteobacteria(65.3%)、Thermotogae(13.7%)、Firmicutes(4.6%)、Chloroflexi(3.6%)、Candidatus Saccharibacteria(3.2%)、Armatimonadetes(2.9%)、Acidobacteria(2.6%)和 Ignavibacteriae(1.2%)；TT-3 B 超過 1%的微生物以門(Phylum)分類分別為 Proteobacteria(63.6%)、Thermotogae(16.9%)、Firmicutes(4.3%)、Chloroflexi(3.2%)、Candidatus Saccharibacteria(2.9%)、Armatimonadetes(2.6%)、Acidobacteria(2.2%)和 Ignavibacteriae(1.4%)。由以上門下的分類分佈與序列豐富度比例，可觀察出樣本

在兩重複的分析下有非常高的數據再現性。

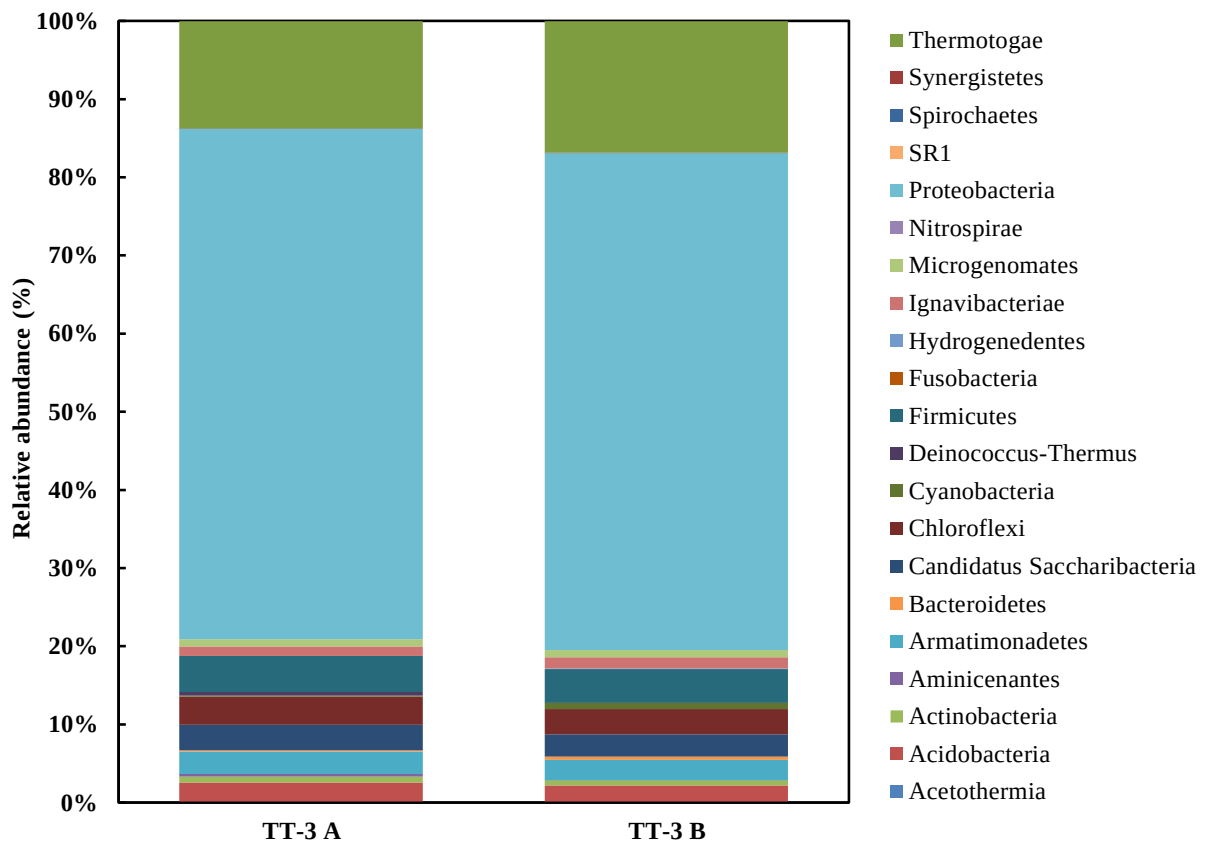


圖 6. 6、TT 場址中樣本二重複的微生物相對豐富度。

6.2.2 土水樣本微生物分布差異性分析

地下環境中同時存在土壤與孔隙水，為探討微生物於水相和土相的分布，本計畫將採集的地下水樣本利用慢速離心方式(2,000 ×g)將較重的土壤顆粒分離後，其他部分再以 0.22μm 的濾膜進行過濾，將樣本分成大顆粒樣本與小顆粒樣本後分別進行 HTS 分析。將同樣來源水樣以材料與方法的步驟進行 DNA 的萃取。以上兩種前處方法得到的樣本將能代表土相與水相(即 free-living)的微生物族群分

布。樣本來源為 TT 場址的地下水。樣本定序後以 FASTX-Toolkit 進行篩選，每個樣本的深度介於 25,181-57,430 reads。

圖 6.7 為門(Phylum)下的分析結果，圖中可以觀察出土相和水相擁有很大的差異。首先先從土相樣本來看，超過 1%的微生物以門(Phylum)分類分別為 Proteobacteria(63.6%)、Thermotogae(16.9%)、Firmicutes(4.3%)、Chloroflexi(3.2%)、Candidatus Saccharibacteria(2.9%)、Armatimonadetes(2.6%)、Acidobacteria(2.2%)和 Ignavibacteriae(1.4%);水相樣本超過 1%的微生物分別為 Proteobacteria(50.6%)、Actinobacteria(16.3%)、Acidobacteria(13.8%)、Firmicutes(7.6%)、Chloroflexi(6.0%)、Candidatus Saccharibacteria(1.4%)和 Deinococcus-Thermus(1.4%)。從以上結果觀察出 Proteobacteria 無論在土相或水相依然是相當龐大的菌群，而 Thermotogae 於土相擁有 16.9%的豐富度，但於水相僅剩 0.02%，代表此微生物族群主要是附著生長於土壤顆粒中，如將大顆粒土壤去除，所佔的族群豐富度將大幅度減少。另外，於本次實驗結果發現一特殊現象，即樣本中 Acidobacteria 和 Actinobacteria 在水相的豐富度遠大於土相，分別為 13.8%和 2.2%與 16.3%和 0.7%，可解讀為以上兩個門的微生物主要存在於水相中，當樣本包含土壤後將造成整體微生物 DNA 比例的改變，使得其相對豐富度反而減少。這分析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 HTS 分析結果造成很顯著的影響

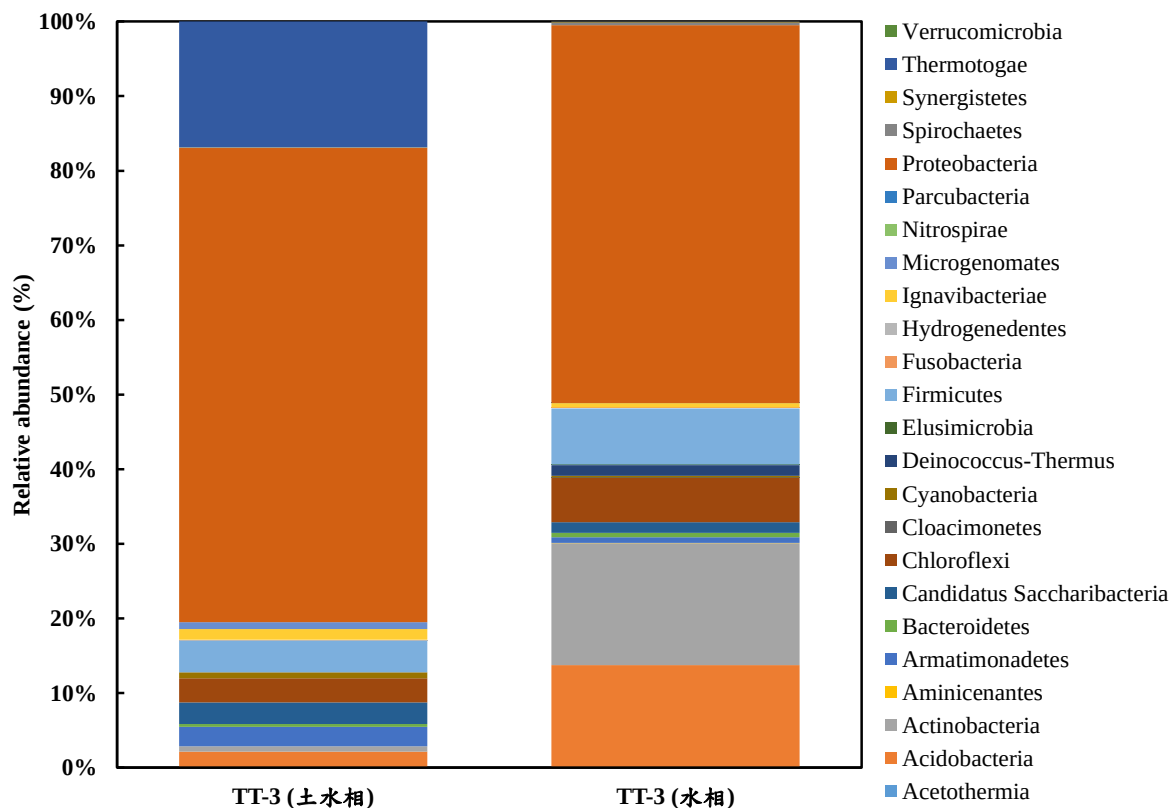


圖 6.7、TT 場址中土水相與水相的微生物族群分布。

6.3 污染場址實際樣本分析

6.3.1 TT 場址分析

TT 場址主要受到三氯乙烯的長年污染，本計畫在實驗設計中選定三口井，分別代表低(無)污染 TT-1、中度污染 TT-2 與高濃度污染 TT-3 進行微生物族群的探討。三口井的多氯乙烯組成如表 6.4 所示。TT-1、TT-2 和 TT-3 中，三氯乙烯濃度分別為 23.0 mg/L、0.595 mg/L 和 0.005 mg/L，同時也有順-二氯乙烯的存在，濃度分別為 0.003 mg/L、0.017 mg/L 和 17.2 mg/L。反-二氯乙烯的部分僅有 TT-3 有被偵測到，而氯乙烯則存在於 TT-1 和 TT-3 的水樣當中。樣本定序後以 FASTX-Toolkit 進行篩選，每個樣本的深度介於 31,122-77,811 reads。

由圖 6.8 可以觀察到 TT 場址的微生物族群相對豐富度，TT-1 中超過 1% 的微生物以門(Phylum)分類分別為 Proteobacteria(63.2%)、Firmicutes(28.5%)、Actinobacteria(4.8%) 和 Bacteroidetes(1.4%)；TT-2 為 Proteobacteria(74.1%)、Acidobacteria(12.9%)、Firmicutes(4.4%)、Chloroflexi(2.6%)、Nitrospirae(2.2%) 和 Actinobacteria(1.1%)；TT-3 為 Proteobacteria(63.6%)、Thermotogae(16.9%)、Firmicutes(4.3%)、Chloroflexi(3.2%)、Candidatus Saccharibacteria(2.9%)、Armatimonadetes(2.6%)、Acidobacteria(2.2%) 和 Ignavibacteriae(1.4%)。Firmicutes 和 Actinobacteria 於未污染地下水中的比例為 28.5% 和 4.8%，但只要含有水中含有多氯乙烯，則族群豐富度將大量減少到低於 5% 和 1% 以下。某些微生物族群則因為有多氯乙烯的存在而有豐富度增加的趨勢，分別為 Armatimonadetes、Candidatus Saccharibacteria、Chloroflexi 和 Ignavibacteriae 由低濃度豐富度為 0.0%、0.1%、0.1% 和 0.0% 至高濃度豐富度為 2.6%、2.9%、3.2% 和 1.4%。

此場址是以門(phylum)下的 Proteobacteria 為主，而在 Proteobacteria 下又分有 5 個綱(class)分別是 Alpha-、Beta-、Delta-、Epsilon- 和 Gamma-Proteobacteria，TT-1 分別佔 0.3%、48.5%、0.2%、0.3% 和 49.6%；TT-2 分別佔 11.1%、71.4%、1.1%、0.0%、9.9%；TT-3 分別佔 4.0%、3.8%、1.2%、0.0% 和 89.7%，其餘皆為 Unclassified 的 Proteobacteria。

此外，為了瞭解三口污染程度不同的井之間的關聯性，以 Clustered heatmap analysis 進行分析。由圖 6.9 中上方的樹枝狀可以得知只要場址出現污染，無論污染程度，其微生物的組成將會比較相似，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。

為了更瞭解微生物的組成，接著以較低階層的屬(Genus)來進行主成分分析，從中探討污染程度對於微生物族群的影響。由圖 6.10 可以觀察到第一主成分佔 60.17% 的總變異；第二主成分則有 39.83%，以上兩者總和代表該樣本受到未知的兩個因素所影響，其他因子佔的比例非常小。其中可以發現影響 TT-1 的微生

物分別為 *Neisseria*、*Streptococcus* 和 *Haemophilus*；TT-2 為 *Hydrogenophaga* 和 GP16；TT-3 則為 *Halomonas*。這些菌群可以作為該場址不同污染程度的指標菌群。

表 6.4、TT 場址樣本的多氯乙烯組成

樣本編號	TCE	cis-DCE	trans-DCE	VC
TT-1	0.005	0.003	ND	0.036
TT-2	0.595	0.017	ND	ND
TT-3	23	17.2	0.146	0.433

單位: mg/L

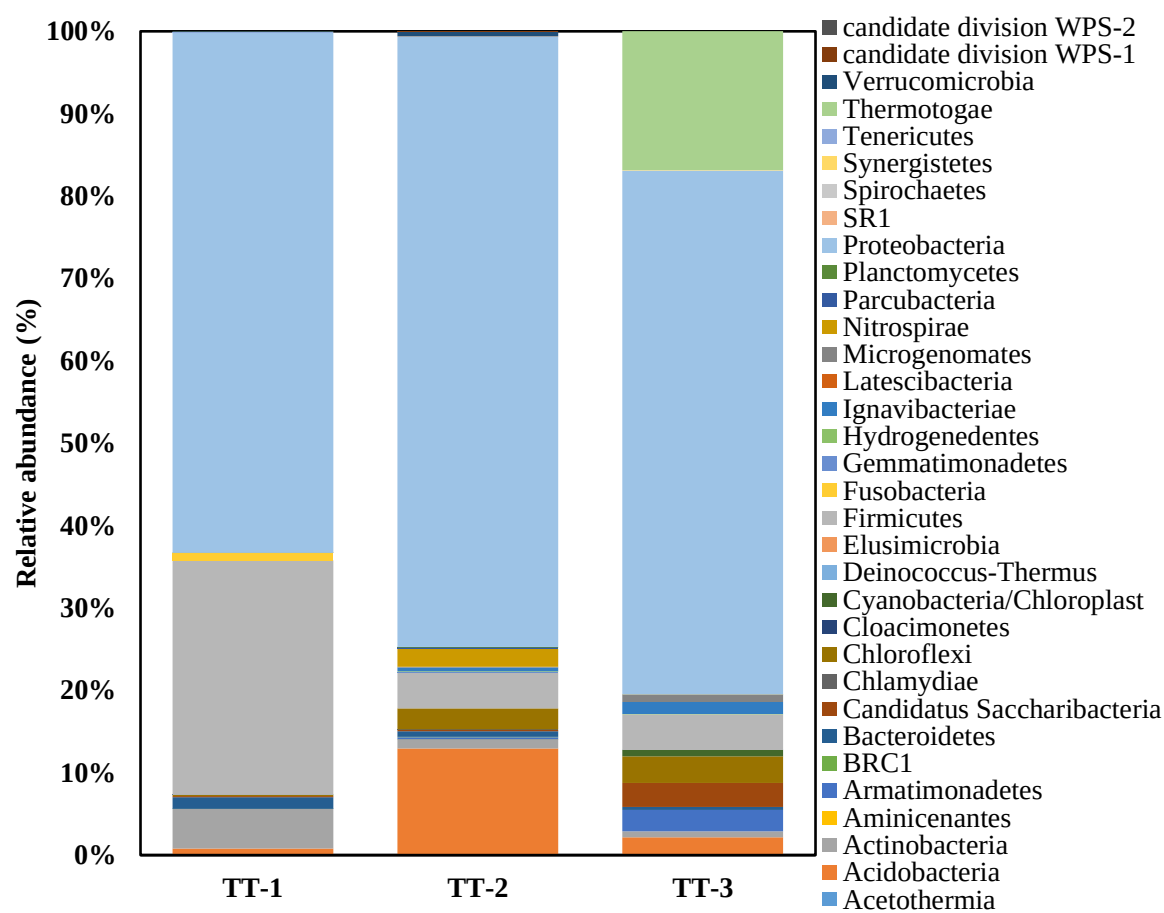


圖 6.8、TT 場址中分別代表低(無)、中和高濃度多氯乙烯污染樣本的微生物族群分布。

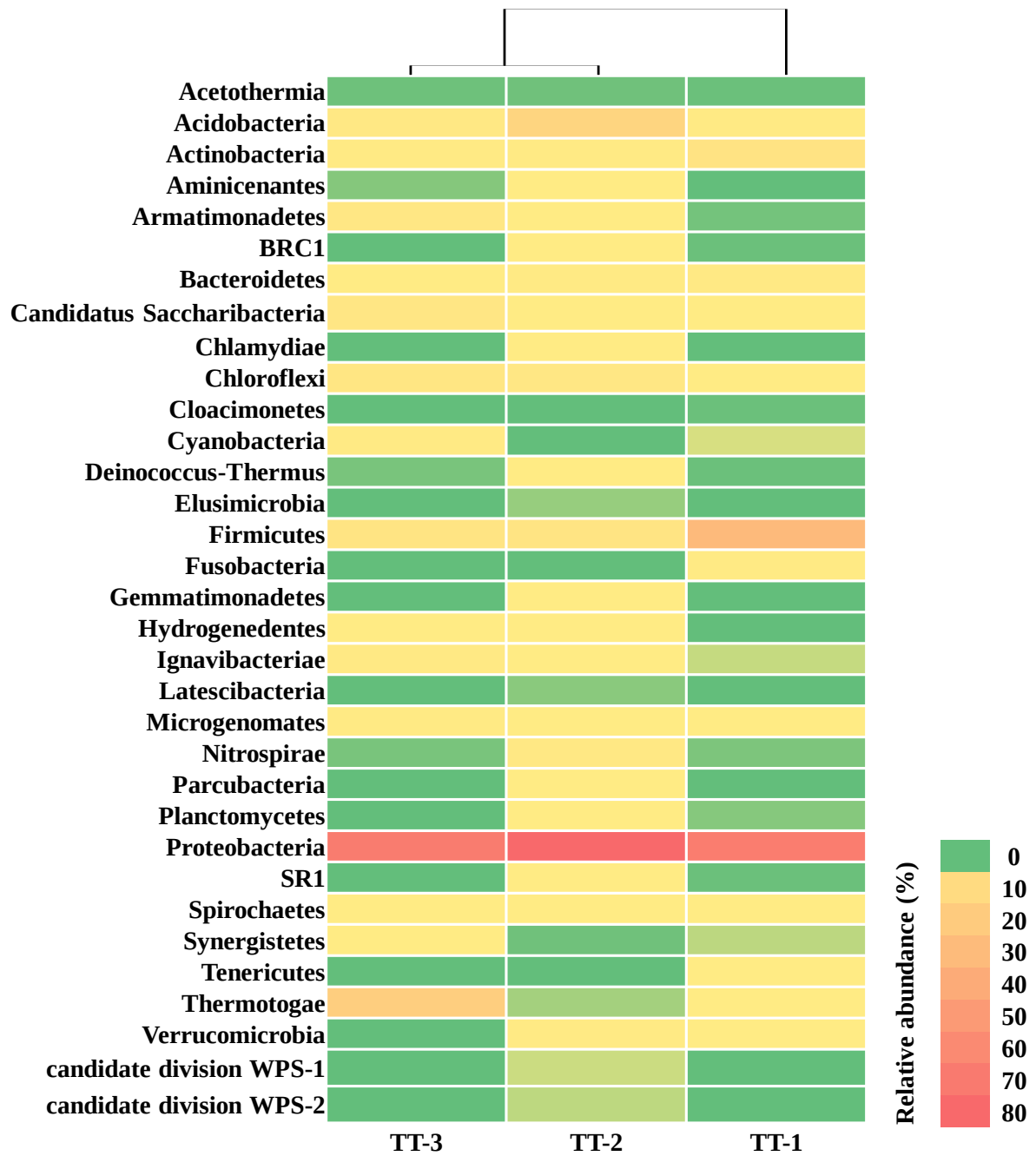


圖 6. 9、以統計軟體中的 Clustered heatmap analysis 進行 TT 場址中水樣微生物族群豐富度的分析結果。

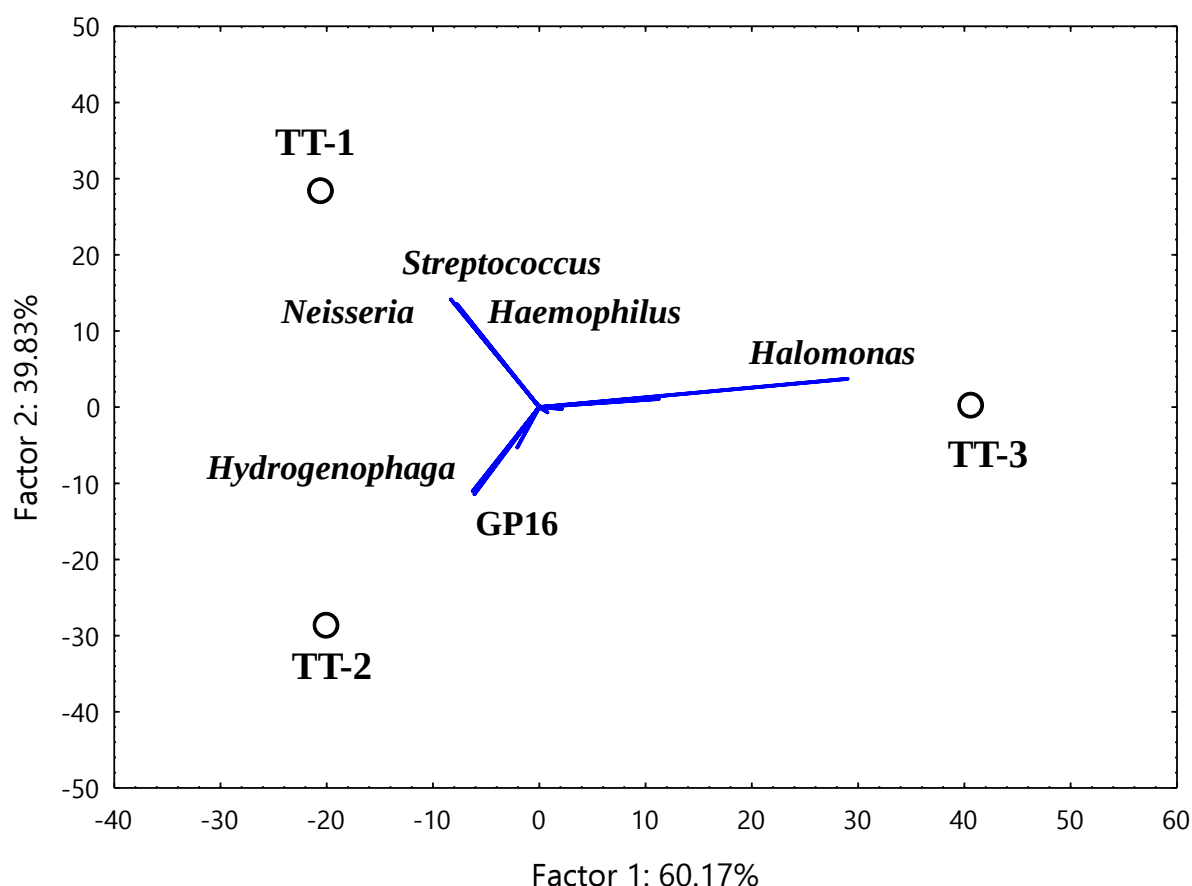


圖 6. 10、以屬(Genus)階層進行 TT 場址的樣本主成分分析。

6.3.2 MJ 場址分析

MJ 場址主要受到三氯乙烯的污染，但與 TT 場址相比，污染期程較短，由表 6.5 中多氯乙烯的分布即可初步推斷。此場址實驗設計除了探討低(無)、中和高度污染對於微生物族群的影響外，另外加入同口採樣井但不同井深的因子，藉此機會了解井深與族群的相關性。計畫中共採五口井，其中三口還有不同的深度的樣本，分別為低(無)污染的 MJ-C-4m、中低污染的 MJ-1(包含 3.5m 和 8m 兩種井深)、中度污染的 MJ-M-4m 和 MJ-3(包含 3.5m 和 8m 兩種井深)以及高度污染的 MJ-2(包含 3.5m 和 8m 兩種井深)。樣本定序後以 FASTX-Toolkit 進行篩選，每個樣本的深度介於 193,426-321,760 reads。

由圖 6.11 可以觀察到 MJ 場址的微生物族群相對豐富度，MJ-C-4m 中超過 1% 的微生物以門(Phylum)分類分別為 Proteobacteria(53.3%)、Acidobacteria(21.1%)、Nitrospirae(6.7%)、Chloroflexi(5.3%)、Firmicutes(4.5%)、Actinobacteria(4.3%)和 Verrucomicrobia(1.2%)；MJ-1-3.5m 為 Proteobacteria(71.1%)、Acidobacteria(10.2%)、Actinobacteria(6.4%)、Bacteroidetes(3.4%)、Firmicutes(2.7%)、Chloroflexi(1.8%)和 Nitrospirae(1.0%)；MJ-1-8m 為 Proteobacteria(63.7%)、Firmicutes(9.0%)、

Nitrospirae(6.4%)、Verrucomicrobia(4.1%)、Acidobacteria(4.0%)、Bacteroidetes(2.5%)、Actinobacteria(2.5%)、Planctomycetes(2.5%)、Ignavibacteriae(2.1%)和Chloroflexi(1.5%)；MJ-M-4m 為 Proteobacteria(59.9%)、Actinobacteria(9.4%)、Chloroflexi(6.9%)、Firmicutes(6.7%)、Acidobacteria(6.9%)、Bacteroidetes(3.3%)、Nitrospirae(1.7%)、Aminicenantes(1.3%)和 Armatimonadetes(1.3%)；MJ-3-3.5m 為 Proteobacteria(67.6%)、Acidobacteria(10.5%)、Bacteroidetes(6.1%)、Firmicutes(3.1%)、Chloroflexi(3.0%)、Verrucomicrobia(2.7%)、Actinobacteria(2.6%)和 Nitrospirae(1.0%)；MJ-3-8m 為 Proteobacteria(73.4%)、Ignavibacteriae(5.5%)、Verrucomicrobia(3.6%)、Firmicutes(3.4%)、Acidobacteria(3.3%)、Chloroflexi(3.2%)、Actinobacteria(2.5%)和 Bacteroidetes(2.5%)；MJ-2-3.5m 為 Proteobacteria(67.1%)、Acidobacteria(10.2%)、Firmicutes(6.3%)、Chloroflexi(4.8%)、Actinobacteria(4.2%)、Bacteroidetes(3.4%)和 Nitrospirae(1.1%)；MJ-2-8m 為 Proteobacteria(68.4%)、Firmicutes(16.7%)、Bacteroidetes(3.1%)、Chloroflexi(3.1%)、Acidobacteria(2.3%)、Verrucomicrobia(2.3%)、Nitrospirae(1.5%)和 Ignavibacteriae(1.4%)。以上微生物族群存在於所有樣本中的分別為 Proteobacteria、Firmicutes、Chloroflexi 和 Acidobacteria。

此場址樣本數多，難以直接從單一樣本看出相關性，因此同樣以統計軟體進行屬(Genus)階層的分析。結果如圖 6.12 和圖 6.13 所示，Clustered heapmap analysis 的分析中觀察出 MJ-3-3.5m 與 MJ-2-3.5m 關係緊密，但如果從三氯乙烯濃度的分布來看 MJ-3-3.5m 為 0.563 mg/L；MJ-2-3.5m 為 23.4 mg/L 差異甚大，而以上兩樣本又與 MJ-1-3.5m 關係較近。綜合所有樹狀圖的結果來看，推測微生物族群的分布可能與污染物的濃度沒有直接的關聯性。如改以主成分分析的結果來看，兩個因子相加約為 69%，代表還有其他因子造成微生物族群與採樣井間的影響。如先不考慮上述影響因子，從圖中可看出不同井深影響著微生物的族群。

表 6.5、MJ 場址樣本的多氯乙烯組成

樣本編號	TCE	cis-DCE	trans-DCE	VC
MJ-C-4m	0.003	0.001	ND	ND
MJ-M-4m	1.700	1.060	ND	ND
MJ-1-3.5m	0.070	ND	ND	ND
MJ-1-8m	0.040	0.001	ND	ND
MJ-2-3.5m	23.4	1.92	0.038	ND
MJ-2-8m	50.1	6.05	0.092	ND
MJ-3-3.5m	0.563	0.336	ND	ND
MJ-3-8m	0.633	0.890	ND	ND

單位: mg/L

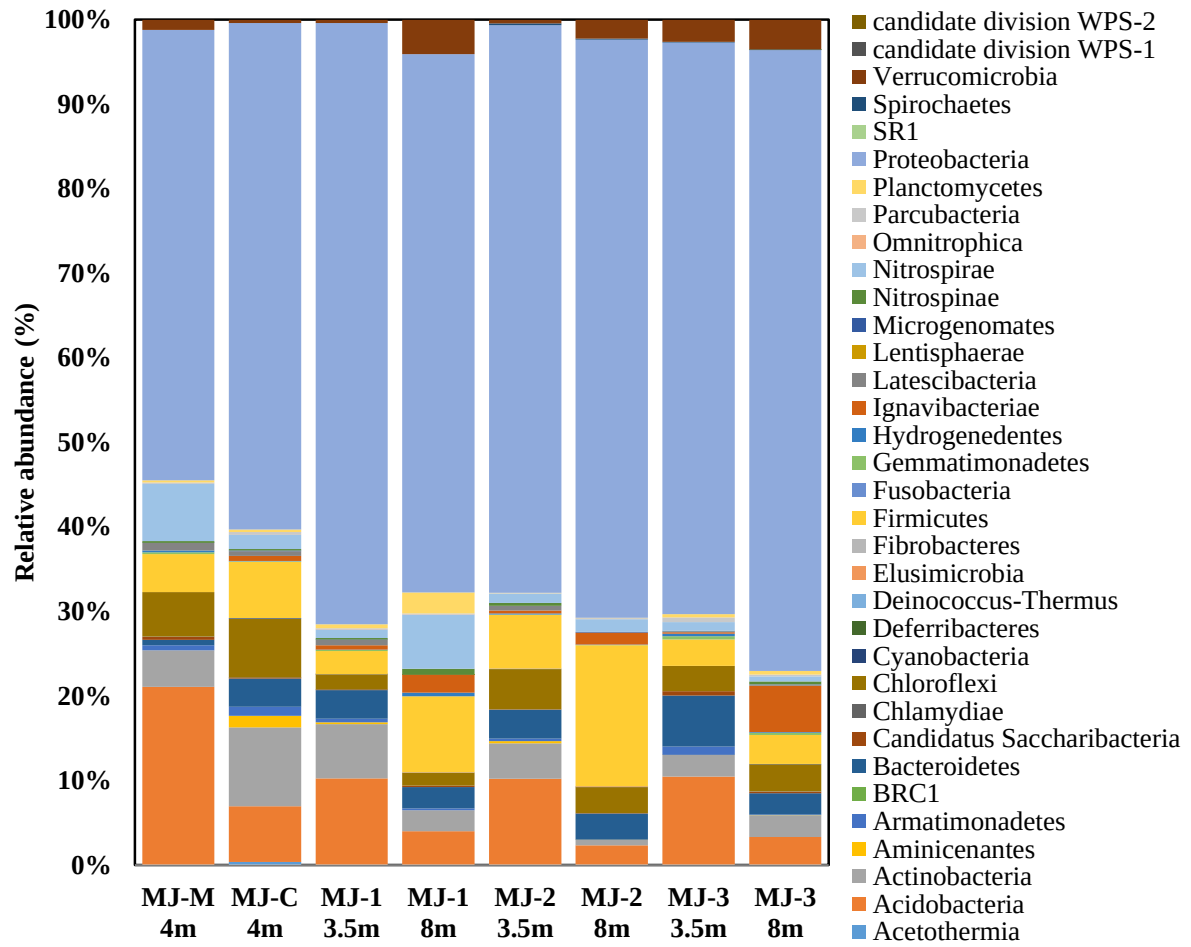


圖 6. 11、MJ 場址中不同污染濃度與不同深度採樣井的微生物族群分布

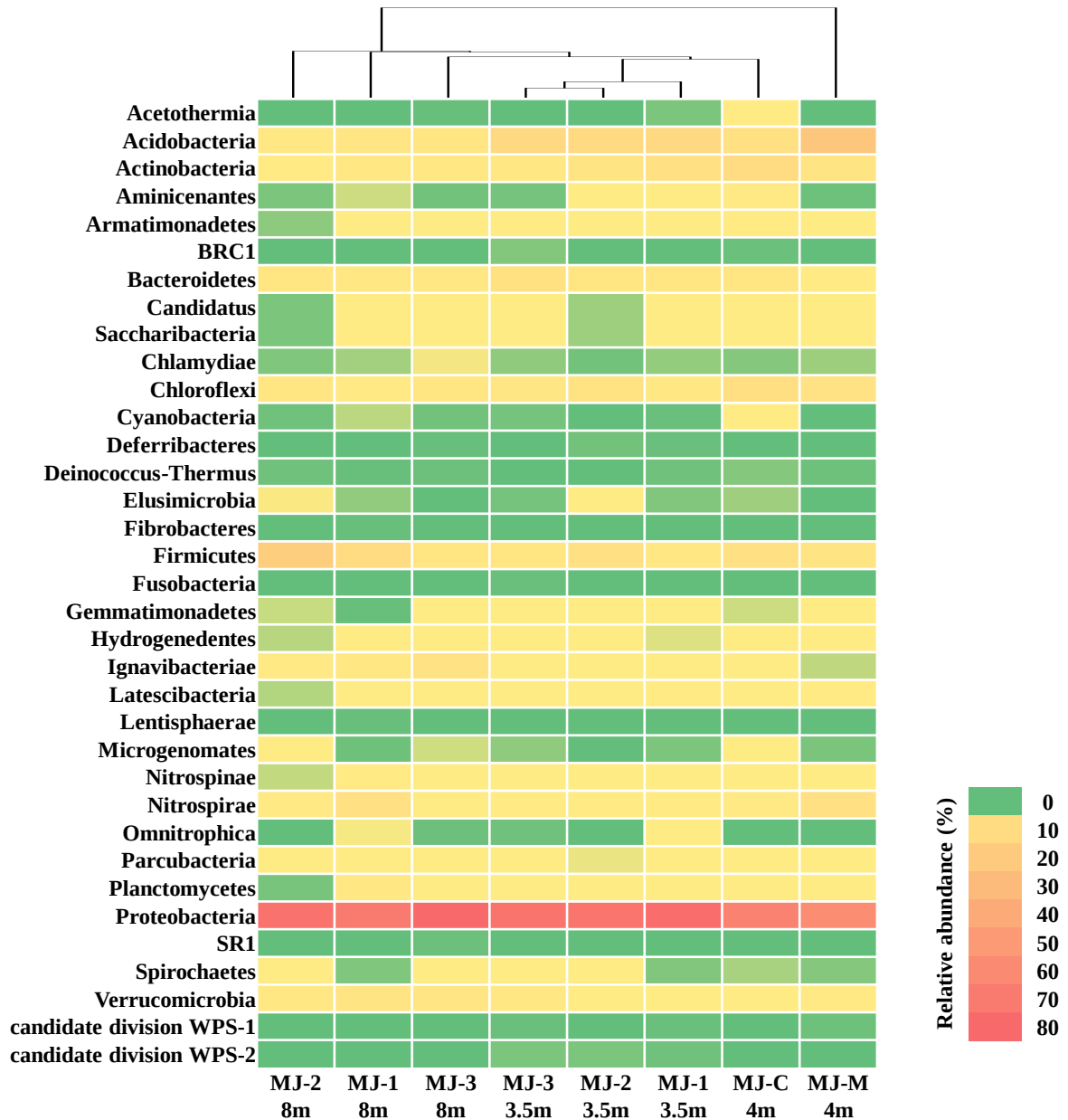


圖 6. 12、以統計軟體中的 Cluster analysis 進行 MJ 場址中水樣微生物族群豐富度的分析結果。

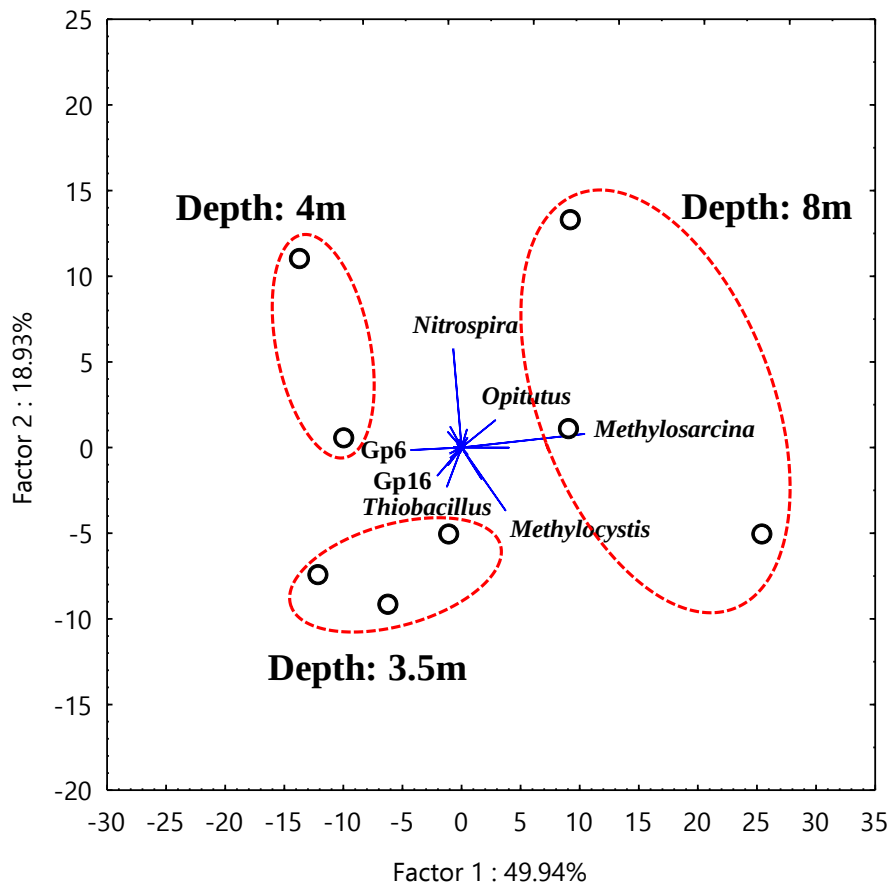


圖 6. 13、以屬(Genus)階層進行 MJ 場址的樣本主成分分析。

6.3.3 FPG 場址分析

FPG 場址與上述的 TT 場址和 MJ 場址差異較大，該場址主要是受到二氯乙烷的污染。本場址實驗設計針對低濃度污染 FPG-1 和高濃度污染 FPG-2 進行微生物族群的觀察。二氯乙烷於 FPG-1 和 FPG-2 的濃度分別為 10 mg/L 和 100 mg/L。樣本定序後以 FASTX-Toolkit 進行篩選，每個樣本的深度介於 221,550-227,649 reads。

由圖 6.14 可以觀察到 FPG 場址的微生物族群相對豐富度，FPG-1 中超過 1% 的微生物以門 (Phylum) 分類分別為 Candidatus Saccharibacteria(49.8%)、Proteobacteria(29.3%)、Firmicutes(6.2%)、Chloroflexi(5.4%)、Deferribacteres(2.7%)、Bacteroidetes(1.6%)、Actinobacteria(1.2%) 和 SR1(1.1%)；FPG-2 為 Proteobacteria(97.5%)、Firmicutes(1.3%)。以上結果可以明顯發現當二氯乙烷濃度相當高時，微生物族群的豐富度將大幅減少，僅剩下 Proteobacteria 在其中成為優勢族群。由於 Proteobacteria 在 FPG-2 樣本中超過 90%，因此將和 FPG-1 進行 Proteobacteria 下 5 個綱(class)的比較。5 個綱(class)分別是 Alpha-、Beta-、Delta-、Epsilon-和 Gamma-Proteobacteria，FPG-1 分別佔 4.5%、48.2%、41.7%、0.2%和

1.4%；FPG-2 分別佔 0.8%、1.5%、0.0%、0.0%、97.6%，其餘皆為 Unclassified 的 Proteobacteria。

樣本從屬(Genus)的階層來看，發現此場址微生物族群單純，FPG-1 超過 1% 的有 *Saccharibacteria*(64.3%)、*Dehalogenimonas*(4.3%)、*Calditerrivibrio*(3.5%)、*Desulfitobacterium*(5.0%)、*Methylophilas*(1.4%)、*Methylotenera*(3.7%)、*Geobacter*(11.0%) 和 SR1(1.4%)；FPG-2 則僅有 *Streptococcus*(1.3%)、*Pelomonas*(1.1%)、*Shewanella*(31.1%)、*Halomonas*(63.9%)。

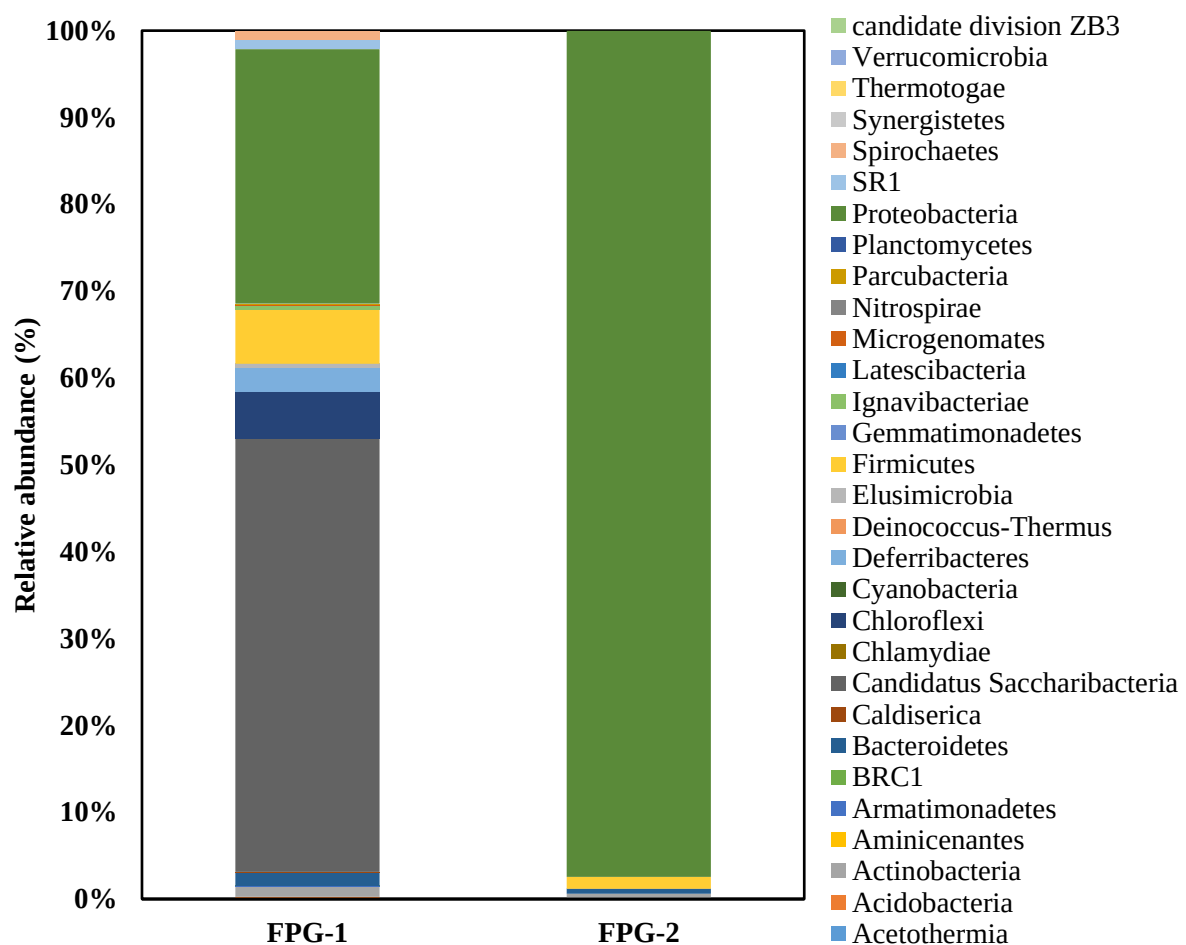


圖 6. 14、FPG 場址中分別代表低和高濃度二氯乙烷污染樣本的微生物族群分布。

6.3.4 反應槽樣本分析

反應槽的樣本分成三個，分別為 Seeding、Formate reactor 和 Acetate reactor。Seeding 樣本源自於 TT 場址的地下土壤，經由添加 500 mg-C/L 乳化油和 1 mg/L 三氯乙烯長達一百多天的馴養後作為 Formate reactor 和 Acetate reactor 的植種來源。而 Formate reactor 和 Acetate reactor 則分別以 10 mM 的甲酸鈉和乙酸鈉作為碳源，5 mg/L 的三氯乙烯作為電子接受者運轉約一年的時間。此實驗設計是以探討複合基質乳化油經過長時間馴養後的微生物族群以及簡單基質甲酸和乙酸對微生物族群的動態表現。樣本定序後以 FASTX-Toolkit 進行篩選，每個樣本的深度介於 187,511-314,523 reads。

由圖 6.15 可以觀察到經乳化油和三氯乙烯馴養的 Seeding 和反應槽的微生物族群相對豐富度，Seeding 中超過 1% 的微生物以門(Phylum)分類分別為 Proteobacteria(91.0%)和 Firmicutes(6.4%)；Formate reactor 為 Proteobacteria(64.9%)、Firmicutes(11.4%)、Candidatus Saccharibacteria(1.4%)和 Chloroflexi(1.1%)；Acetate reactor 為 Proteobacteria(80.1%)、Firmicutes(8.0%)、Spirochaetes(2.0%)、Ignavibacteriae(1.9%)、Bacteroidetes(1.9%)和 Actinobacteria(1.8%)。Proteobacteria 下 5 個綱(class)分別是 Alpha-、Beta-、Delta-、Epsilon-和 Gamma-Proteobacteria，Seeding 分別佔 6.6%、2.0%、0.0%、0.0%和 90.6%；Formate reactor 佔 51.0%、36.0%、3.3%、0.00%和 4.2%；Acetate reactor 佔 4.1%、10.6%、1.3%、0.0%和 79.3%。由以上 Proteobacteria 的分布可以觀察到 Seeding 與 Acetate reactor 相似，主要原因推估為 Seeding 以乳化油培養時，是以乙酸為主要代謝產物，因此造成相似的菌相。

如圖 6.16 和圖 6.17，以 Clustered heatmap analysis 分析後，在整體門(Phylum)的觀察下，同樣與 Proteobacteria 分佈有著相同的結果，即 Seeding 與 Acetate reactor 相近。而 Formate reactor 則在樹枝圖的外圍。如以屬(Genus)階層進行主成分分析，可以發現影響 Seeding 的為 *Shewanella*；影響 Formate reactor 的為 *Sporomusa*；影響 Acetate reactor 的為 *Acinetobacter*。

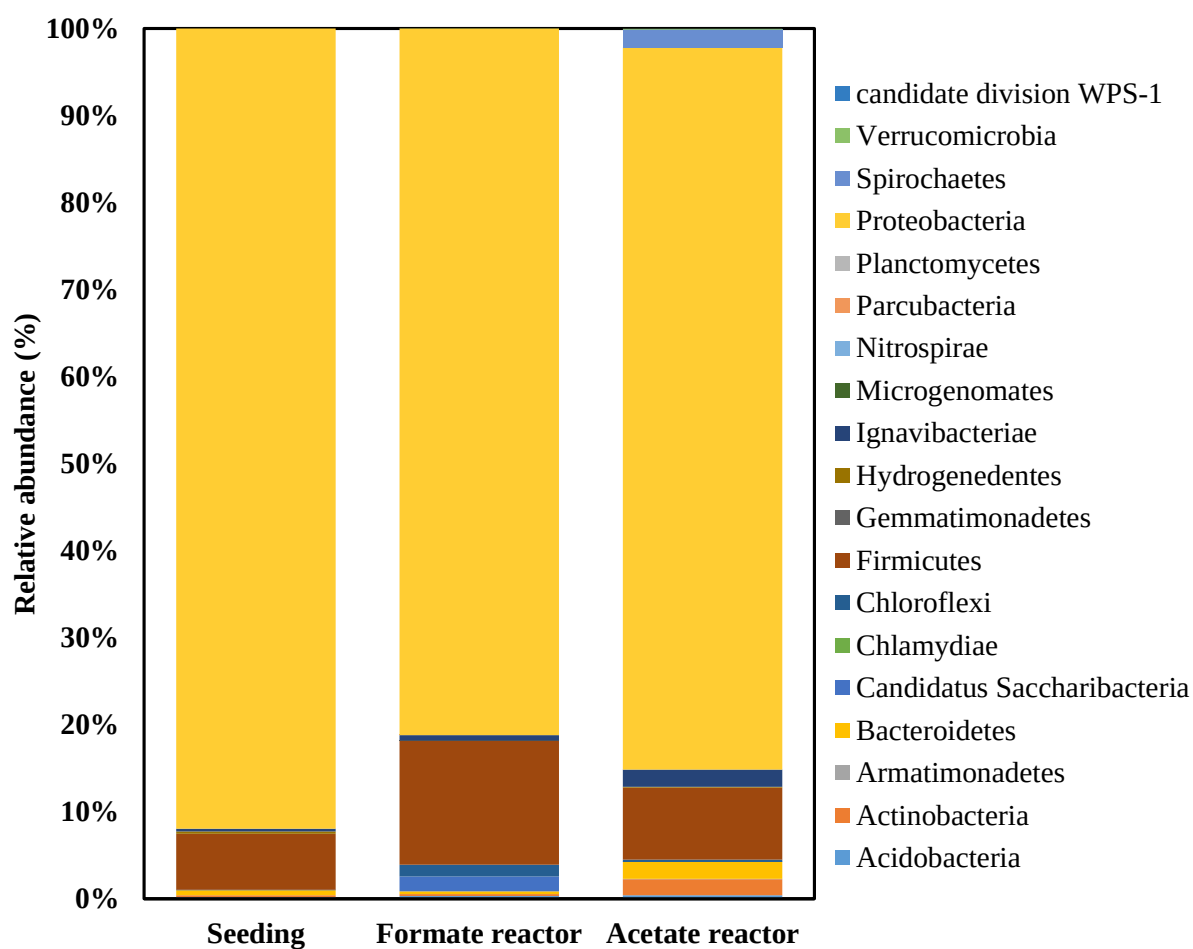


圖 6. 15、以乳化油馴養的反應槽植種 Seeding 與 Formate reactor 和 Acetate reactor 的微生物族群分佈。

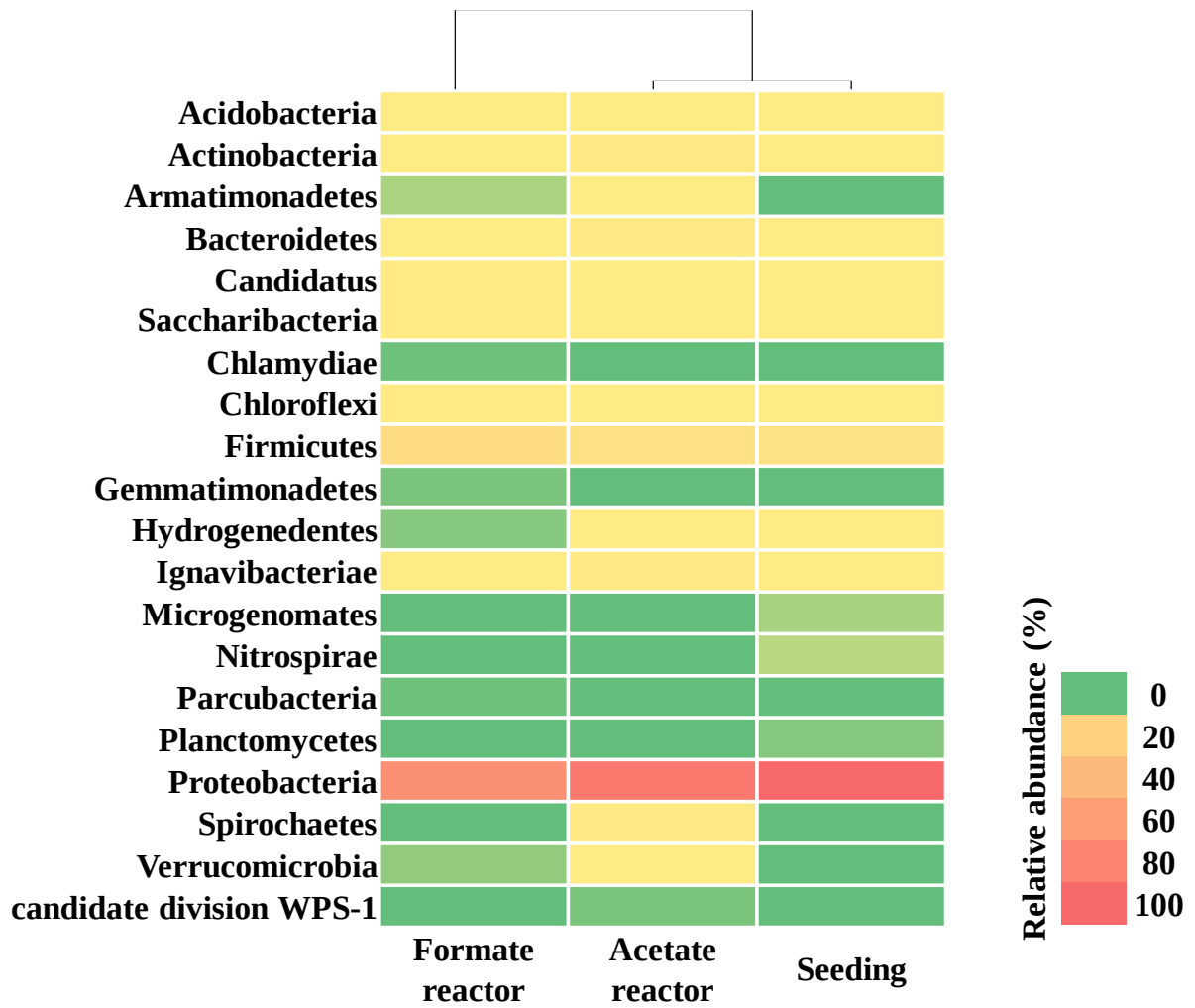


圖 6. 16、以統計軟體中的 Cluster analysis 進行植種源與反應槽中水樣微生物族群豐富度的分析結果。

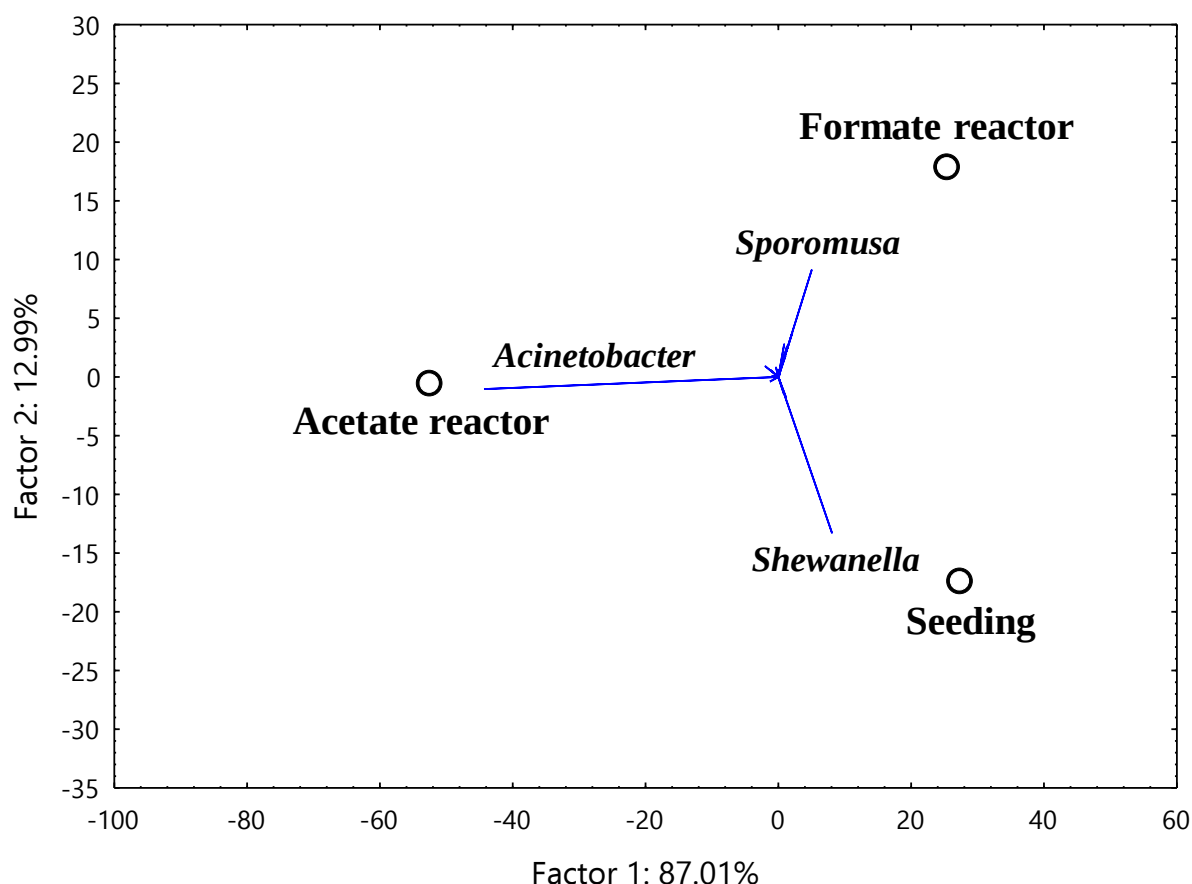


圖 6.17、以屬(Genus)階層進行植種與反應槽的樣本的主成分分析。

6.3.5 綜合討論

綜合以上數據，發現土壤地下水中微生物族群相當複雜，以本計畫目前分析的樣本數與數據累積量，要找到所有場址都通用的指標菌群，仍有困難，目前仍未觀察出通則，而此結果也暗指地層菌群結構可能具有場址特異性。舉例來說，龐大的 Firmicutes 族群在 TT 場址低(無)污染的井中，其相對豐富度高達 28.5%，一有污染則比例降至 5% 以下。MJ 場址則剛好相反，以三氯乙烯濃度為 50.1 mg/L 的 MJ-2-8m 和三氯乙烯濃度為 0.04 mg/L 的 MJ-1-8m 進行比較，MJ-2-8m 的 Firmicutes 比例為 16.71%，而 MJ-1-8m 則只有 8.99%，而 FPG 場址的 Firmicutes 則又與 TT 場址相符。因此，除了增加樣本的數量，未來可朝向分析土水菌群的 RNA，更能代表菌群活性與汙染情況間之關聯性。

為了解所有樣本間的差異，本團隊綜合以上以高通量分析技術的結果，以門(Phylum)階層進行主成分分析，結果如下圖 6.18 所示。圖中可以發現所有樣本的分佈上並無線索可循，除了反應槽的樣本較為集中外，其他皆往中心靠攏，顯示在門的層次解析土水菌群結構仍顯不足。但如以屬階層探討兩個多氯乙烯污染場址中脫氯菌群和物化特性(含氯化合物組成)的關係，則可以看出些許端倪。TT 場

址中 TT-1 和 TT-3 分別代表低(無)污染與高污染多氯乙烯區域，其中與目前已知脫氯菌 *Geobacter lovleyi* 同屬的 *Geobacter* 可能扮演重要角色，在 TT-1 和 TT-3 中 *Geobacter* 的相對豐富度分別為 0.03% 和 0%；MJ 場址的 MJ-2-3.5m、MJ-2-8m 和 MJ-C-4m 則分別代表同區域但井深不同的兩口高濃度樣本與低(無)污染三氯乙烯區域，*Geobacter* 的相對豐富度分別為 0.058%、0.193% 和 0%。以上多氯乙烯的 TT 場址和 MJ 場址可初步推測 *Geobacter* 和污染程度有關聯，但仍需持續建立場址的分析資料庫，以進行驗證。

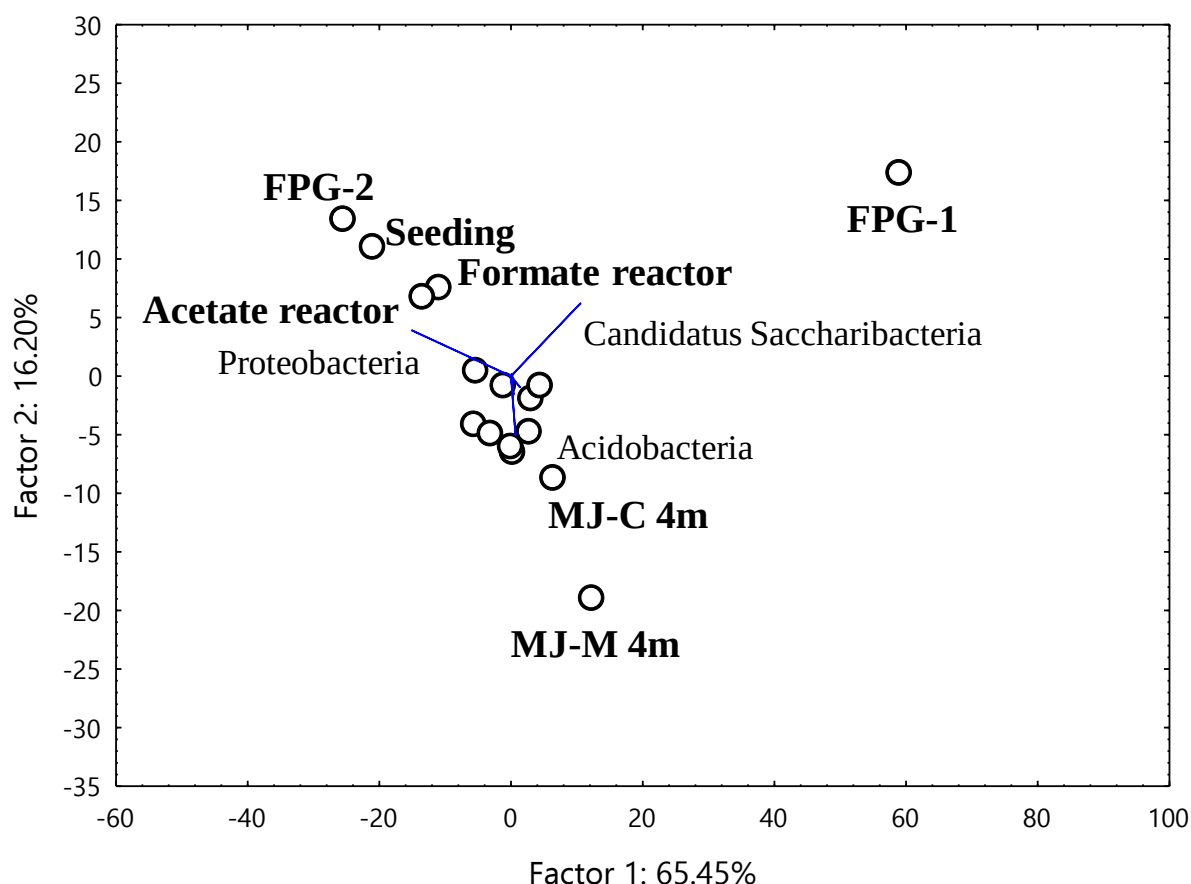


圖 6.18、以門(Phylum)階層進行所有樣本的主成分分析。

6.4 批次試驗中微生物族群的動態變化

多氯乙烯污染的現地生物整治技術多半注入糖蜜、食用油、乳酸鹽為基底的藥劑至地下水體中，大量注入藥劑使地下水 TOC 濃度與都市污水相當，甚至更高，刺激地下水體中厭氧菌與其他微生物大量生長，衍生水質二次污染。本計畫將設置批次系統，模擬添加藥劑促進多氯乙烯現地生物整治情境，在藥劑分解及多氯乙烯轉換成乙烯的過程，監測菌群結構與厭氧脫氯菌隨時間的變化。

本實驗選定 TT 場址的地下土壤作為植種源，添加約 2 mg/L 的三氯乙烯作為電子接受者進行反應。實驗經過超過兩個月的時間，發現三氯乙烯皆無發現脫氯和降解現象，如圖 6.19，推測本實驗失敗原因為未取得含有脫氯菌群的土壤或脫氯菌群數量稀少，仍在遲滯階段。

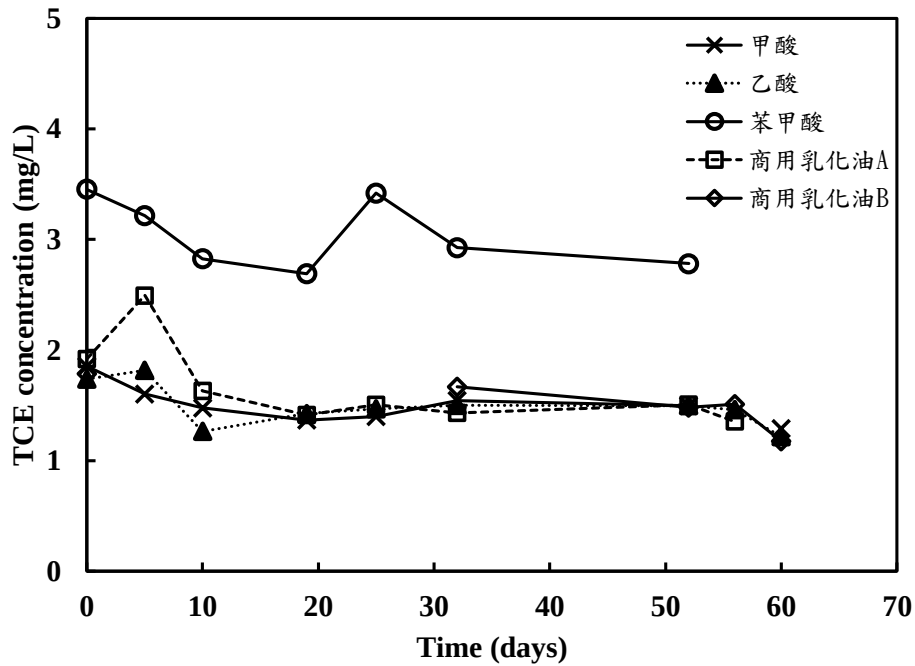


圖 6.19、以不同基質作為碳源進行三氯乙烯的脫氯試驗。

(七)、計畫總結

1. 本計畫成功發展一套快速偵測地下水中厭氧還原脫氯菌 16S rRNA 基因豐富度的多通量方法。此方法是根據階層寡核苷酸引子延伸(Hierarchical Oligonucleotide Primer Extension, HOPE)技術，結合新設計或修改的七組專一性引子，同時偵測四屬常見厭氧脫氯菌，*Dehalococcoides*、*Dehalobacter*、*Desulfitobacterium* 和 *Geobacter*。HOPE 反應最佳化後能偵測樣本中相對豐富度高於 0.27-0.39%的脫氯族群，並能分析 *Dehalococcoides* Pinellas、Victoria 和 Cornell 次族群。此方法適合應用於含氯化合物厭氧生物復育場址的脫氯菌群監測分析。
2. 以植種場址土壤與乳化油劑進行批次試驗，結果顯示經過九天的培養，乳化油分解產生氫氣與乙酸，使添加的三氯乙烯完全轉換成順-二氯乙烯。HOPE 分析結果發現 *Dehalobacter* 豐富度大幅增至 1%，顯示 *Dehalobacter* 是進行三氯乙烯還原脫氯反應的主角，可做為此場址的三氯乙烯脫氯反應生物性指標。
3. 結果展示本計畫建立的 HOPE 技術分析厭氧脫氯菌群具專一性，且快速、多通量、低成本，可應用於地下水多氯乙烯污染整治過程厭氧脫氯菌群的監測。
4. 本計畫成功建立以次世代定序技術偵測土水微生物的族群結構與豐富度，是以 Illumina Miseq 配合引子 Pro341F 和 Pro805R 進行定序，數據有不錯的重複性，唯土壤顆粒的濃度會影響微生物多樣性分析的結果。
5. 配合統計分析軟體 STATISTICA V8.0 中的主成分分析(Principal Components Analysis, PCA)和熱圖集群分析(Clustered Heatmap Analysis)進行大數據的處理找出含氯污染土水樣環境之關鍵微生物菌群。
6. 地下水微生物族群以 Proteobacteria 為優勢，根據目前的數據發現，低於 50 mg/L 的三氯乙烯並不足以影響整體的微生物族群結構，而是以井與地面的深度才會造成族群間較大的變異。
7. 由於地下水環境條件複雜，若要找到關鍵的指標菌群，建議以本計畫建立的分析方法持續進行不同場址樣本的微生物族群分析，以累積台灣土水微生物資料庫。

參考文獻

- [1] Alternatives for Managing the Nation's Complex Contaminated Groundwater Sites, The National Academies Press, 2013.
- [2] M.J. Moran, P.A. Hamilton, J.S. Zogorski, Volatile Organic Compounds in The NATION'S Ground Water And Drinking-water Supply Wells, Proceedings of the Water Environment Federation, 2007 (2007) 2650-2658.
- [3] 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網 http://sgw.epa.gov.tw/public/00_SGW.asp.
- [4] J.H. Wu, W.T. Liu, I.C. Tseng, S.S. Cheng, Characterization of microbial consortia in a terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system, Microbiology, 147 (2001) 373-382.
- [5] F. Maphosa, M.W. van Passel, W.M. de Vos, H. Smidt, Metagenome analysis reveals yet unexplored reductive dechlorinating potential of Dehalobacter sp. E1 growing in co-culture with Sedimentibacter sp, Environmental microbiology reports, 4 (2012) 604-616.
- [6] J.W.R. M. Hutchinson, Microbiological Aspects of Drinking Water Supplies, Academic Press, London.
- [7] J.M. Simpson, J.W. Santo Domingo, D.J. Reasoner, Microbial source tracking: state of the science, Environmental science & technology, 36 (2002) 5279-5288.
- [8] 張新杰, 微生物來源分析法追蹤地表水糞便污染: 指標微生物環境耐受性初探, 國立成功大學環境工程學系碩士論文, (2012).
- [9] 林正浩、林佩雲、蔡婉楹、鍾裕仁, 應用自然界的氦於地質作用與環境有機污染調查, 中興工程, 121 (2013) 43-50.
- [10] 黃德坤、陳大麟、林舜隆、羅文杰, 環境法醫技術應用在油污染源之鑑定, 工業污染防治, 91 (2004) 23-41.
- [11] D.R. Lovley, Cleaning up with genomics: applying molecular biology to

bioremediation, *Nature reviews. Microbiology*, 1 (2003) 35-44.

[12] R.D. Morrison, Critical review of environmental forensic techniques: Part I, *Environ Forensics*, 1 (2000) 157-173.

[13] R.D. Morrison, Critical review of environmental forensic techniques: Part II, *Environ Forensics*, 1 (2000) 175-195.

[14] M.L. Da Silva, P.J. Alvarez, Enhanced anaerobic biodegradation of benzene-toluene-ethylbenzene-xylene-ethanol mixtures in bioaugmented aquifer columns, *Applied and environmental microbiology*, 70 (2004) 4720-4726.

[15] M.N. Danon-Schaffer, Walkerton's contaminated water supply system: A forensic approach to identifying the source, *Environ Forensics*, 2 (2001) 197-200.

[16] D. Paul, G. Pandey, C. Meier, J. Roelof van der Meer, R.K. Jain, Bacterial community structure of a pesticide-contaminated site and assessment of changes induced in community structure during bioremediation, *FEMS microbiology ecology*, 57 (2006) 116-127.

[17] M. Vinas, J. Sabate, M.J. Espuny, A.M. Solanas, Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil, *Applied and environmental microbiology*, 71 (2005) 7008-7018.

[18] J. Joynt, M. Bischoff, R. Turco, A. Konopka, C.H. Nakatsu, Microbial community analysis of soils contaminated with lead, chromium and petroleum hydrocarbons, *Microb Ecol*, 51 (2006) 209-219.

[19] R.E. Richardson, V.K. Bhupathiraju, D.L. Song, T.A. Goulet, L. Alvarez-Cohen, Phylogenetic characterization of microbial communities that reductively dechlorinate TCE based upon a combination of molecular techniques, *Environmental science & technology*, 36 (2002) 2652-2662.

[20] M. Kotik, A. Davidova, J. Voriskova, P. Baldrian, Bacterial communities in tetrachloroethene-polluted groundwaters: a case study, *The Science of the total environment*, 454-455 (2013) 517-527.

- [21] E.R. Hendrickson, J.A. Payne, R.M. Young, M.G. Starr, M.P. Perry, S. Fahnestock, D.E. Ellis, R.C. Ebersole, Molecular analysis of *Dehalococcoides* 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout North America and Europe, *Applied and environmental microbiology*, 68 (2002) 485-495.
- [22] R. Seshadri, L. Adrian, D.E. Fouts, J.A. Eisen, A.M. Phillippy, B.A. Methe, N.L. Ward, W.C. Nelson, R.T. Deboy, H.M. Khouri, J.F. Kolonay, R.J. Dodson, S.C. Daugherty, L.M. Brinkac, S.A. Sullivan, R. Madupu, K.E. Nelson, K.H. Kang, M. Impraim, K. Tran, J.M. Robinson, H.A. Forberger, C.M. Fraser, S.H. Zinder, J.F. Heidelberg, Genome sequence of the PCE-dechlorinating bacterium *Dehalococcoides ethenogenes*, *Science*, 307 (2005) 105-108.
- [23] C. Holliger, G. Schraa, A.J. Stams, A.J. Zehnder, A highly purified enrichment culture couples the reductive dechlorination of tetrachloroethene to growth, *Applied and environmental microbiology*, 59 (1993) 2991-2997.
- [24] R. Villemur, M. Lanthier, R. Beaudet, F. Lepine, The *Desulfitobacterium* genus, *FEMS microbiology reviews*, 30 (2006) 706-733.
- [25] M. Nikolausz, A. Chatzinotas, M. Palatinszky, G. Imfeld, P. Martinez, M. Kastner, Single-nucleotide primer extension assay for detection and sequence typing of "*Dehalococcoides*" spp, *Applied and environmental microbiology*, 74 (2008) 300-304.
- [26] J. Shendure, H. Ji, Next-generation DNA sequencing, *Nature biotechnology*, 26 (2008) 1135-1145.
- [27] M. Kotik, A. Davidova, J. Voriskova, P. Baldrian, Bacterial communities in tetrachloroethene-polluted groundwaters: A case study, *Sci Total Environ*, 454 (2013) 517-527.
- [28] T. Miura, A. Yamazoe, M. Ito, S. Ohji, A. Hosoyama, Y. Takahata, N. Fujita, The Impact of Injections of Different Nutrients on the Bacterial Community and Its Dechlorination Activity in Chloroethene-Contaminated Groundwater, *Microbes and environments / JSME*, 30 (2015) 164-171.
- [29] S. Giampaoli, A. Berti, R.M. Di Maggio, E. Pilli, A. Valentini, F. Valeriani, G. Gianfranceschi, F. Barni, L. Ripani, V. Romano Spica, The environmental biological signature: NGS profiling for forensic comparison of soils, *Forensic science*

international, 240 (2014) 41-47.

[30] R.A. Holt, S.J. Jones, The new paradigm of flow cell sequencing, *Genome research*, 18 (2008) 839-846.

[31] T. Tucker, M. Marra, J.M. Friedman, Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine, *American journal of human genetics*, 85 (2009) 142-154.

[32] W.Y. Chen, J.H. Wu, Y.Y. Lin, H.J. Huang, J.E. Chang, Bioremediation potential of soil contaminated with highly substituted polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans: microcosm study and microbial community analysis, *Journal of hazardous materials*, 261 (2013) 351-361.

[33] J.H. Wu, W.T. Liu, Quantitative multiplexing analysis of PCR-amplified ribosomal RNA genes by hierarchical oligonucleotide primer extension reaction, *Nucleic acids research*, 35 (2007) e82.

[34] P.Y. Hong, J.H. Wu, W.T. Liu, Relative abundance of *Bacteroides* spp. in stools and wastewaters as determined by hierarchical oligonucleotide primer extension, *Applied and environmental microbiology*, 74 (2008) 2882-2893.

[35] P.Y. Hong, J.H. Wu, W.T. Liu, A high-throughput and quantitative hierarchical oligonucleotide primer extension (HOPE)-based approach to identify sources of faecal contamination in water bodies, *Environmental microbiology*, 11 (2009) 1672-1681.

[36] J.H. Wu, M.H. Hsu, C.H. Hung, I.C. Tseng, T.F. Lin, Development of a hierarchical oligonucleotide primer extension assay for the qualitative and quantitative analysis of *Cylindrospermopsis raciborskii* subspecies in freshwater, *Microbes and environments / JSME*, 25 (2010) 103-110.

[37] J.H. Wu, H.P. Chuang, M.H. Hsu, W.Y. Chen, Use of a hierarchical oligonucleotide primer extension approach for multiplexed relative abundance analysis of methanogens in anaerobic digestion systems, *Applied and environmental microbiology*, 79 (2013) 7598-7609.

[38] W.Y. Chen, J.H. Wu, J.E. Chang, Pyrosequencing Analysis Reveals High Population Dynamics of the Soil Microcosm Degrading Octachlorodibenzofuran, *Microbes and Environments*, 29 (2014) 393-400.

- [39] B.K. Amos, Y. Sung, K.E. Fletcher, T.J. Gentry, W.M. Wu, C.S. Criddle, J. Zhou, F.E. Löffler, Detection and quantification of *Geobacter lovleyi* strain SZ: implications for bioremediation at tetrachloroethene- and uranium-impacted sites, *Applied and environmental microbiology*, 73 (2007) 6898-6904.
- [40] R.I. Amann, B.J. Binder, R.J. Olson, S.W. Chisholm, R. Devereux, D.A. Stahl, Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations, *Applied and environmental microbiology*, 56 (1990) 1919-1925.
- [41] M.A. Dojka, P. Hugenholtz, S.K. Haack, N.R. Pace, Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation, *Applied and environmental microbiology*, 64 (1998) 3869-3877.
- [42] M. Bunge, L. Adrian, A. Kraus, M. Opel, W.G. Lorenz, J.R. Andreessen, H. Gorisch, U. Lechner, Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium, *Nature*, 421 (2003) 357-360.
- [43] S. Takahashi, J. Tomita, K. Nishioka, T. Hisada, M. Nishijima, Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing, *PloS one*, 9 (2014) e105592.
- [44] J.R. Cole, B. Chai, R.J. Farris, Q. Wang, S.A. Kulam, D.M. McGarrell, G.M. Garrity, J.M. Tiedje, The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis, *Nucleic acids research*, 33 (2005) D294-296.