

# 行政院環境保護署

## 「100 年度土壤及地下水污染研究與技術提昇計畫」

### 利用現地分離之砷氧化菌做為含砷 地下水生物復育 之可行性探討 期末報告

主 辦 單 位： 行政院環境保護署

計畫執行單位：台灣大學／生物環境系統工程學系

計畫主持人：廖秀娟 教授

計畫執行期間：100 年11 月26 日起至

101 年11 月25 日

中 華 民 國 101年10 月 印製

## 中文摘要

砷 (Arsenic, As) 的毒性影響了全世界數百萬的民眾。台灣即使在1960年代已發現地下水砷污染的問題，然而很少文獻針對微生物與地下水砷釋放之間的關係作深入研究。在此研究當中，我們分離出現地之台灣烏腳病疫區砷污染地下水中之砷氧化菌，命名為As7325。並利用核酸序列比對工具(BLAST)，比對其16S rRNA發現As7325是與*Pseudomonas*同屬之菌種。而As7325最適宜之生長溫度和pH分別為30°C及7。As7325為一種兼性厭氧菌。除此之外，經由聚合酶鏈鎖反應技術，發現As7325具有可將砷氧化之砷氧化酶基因*aoxB*，由此可推論出As7325為具砷氧化或解毒機制之細菌。另外，As7325在好氧條件之下，可於一天以內氧化烏腳病疫區砷污染地下水含30μM (~2200 μg/L)之三價砷成五價砷。我們更進一步利用As7325作為一種生物吸附劑<sup>1</sup>，去除地下水中的五價砷，結果顯示，在兩天內 5g/L冷凍乾燥的As7325能分別以濃度為500及1000 ppb的五價砷各達37%及60%的效能；而在第六天時，其吸附效率則分別能達到87%及100%。因此，由本研究結果得知，As7325具有對於現地砷污染地下水之生物復育的重要潛能。本期末報告內容報告全程計畫執行期間之成果，計畫執行成果符合計畫預期，執行進度亦符合預定進度。

**關鍵詞：**砷、生物吸附劑、生物復育

## 英文摘要

Arsenic poisoning affects millions of people worldwide. Although groundwater arsenic problems in Taiwan have been recognized since 1960s, few reports have been published about the relationship between microbes and arsenic release into groundwater. In this study, we isolated an indigenous arsenite-oxidizing bacterium As7325 from arsenic contaminated shallow alluvial aquifer in the Blackfoot Disease endemic area. The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) search of the 16S rRNA showed that strain As7325 belongs to the genus of *Pseudomonas*. The optimal temperature for growth was 30°C and the pH was about 7. Bacterial strain As7325 is a facultative anaerobe. In addition, the cytoplasmic arsenite oxidase *aoxB* was amplified by PCR, suggesting that strain As7325 contains arsenic oxidation/detoxification mechanisms. Furthermore, strain As7325 was able to oxidize 30  $\mu\text{M}$  ( $\sim 2200 \mu\text{g/L}$ ) arsenite within 1 day using environmental groundwater under aerobic conditions. We also used As7325 as a biosorbent to remove arsenic in groundwater. The results showed that 5 g/L lyophilized cell pellet of strain As7325 can adsorb 500 and 1000 ppb arsenate with 37% and 60%, respectively within 2 days. The adsorption efficiency for 500 and 1000 ppb arsenate reached 87% and 100%, respectively at 6-day. Therefore, strain As7325 shows its great potential for bioremediation of groundwater arsenic *in situ*. In this final progress report, we showed that current results and progress fulfill the anticipated results and progress as proposed in the proposal.

**Keywords:** Arsenic; biosorbent ; bioremediation

# 第一章、計畫緣起與目的

**【摘要】** 本章節說明探討台灣地區含砷地下水問題的重要性，並闡述砷的毒性、參與砷還原、氧化、解毒的微生物的功能及機制。亦針對計畫目地欲利用生物復育法整治台灣地區含砷地下水作說明。

# 第一章 計畫緣起與目的

## 1-1 研究問題的重要性

砷 (Arsenic, As) 為已知之毒性物質，國際癌症研究組織 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 已將之列為第一級致癌物 (IARC, 1987 ; Chan and Huff, 1997 ; Basu *et al.*, 2001 ; Huang *et al.*, 2001)，美國環境保護署亦將之列為 A 級的致癌物。砷經由自然或人為活動可能被釋放於環境中，對人類健康造成潛在的風險。長期飲用含砷量高的水，可能會造成許多病變。飲用水造成的低劑量砷暴露在美國及世界各地普遍存在。例如，在新罕布什爾州，有 40% 的人口飲用私人井水，大約占該州人口總數 8% 的人的飲用水（飲用私人井水人口的 1/5）可能受到砷的污染，其濃度介於美國環保局建議的十億分之十的標準和現行的十億分之五十的標準之間。在工業區及有毒廢物棄置場，包括 70% 以上的綜合性廢物棄置場，砷往往是檢測得到的毒物中的一種。存在於這些廢物棄置場的砷可能會溶解滲透到地下水中，進而污染附近的井水 (Ronald, et al., 2001)。

包括台灣，目前國際上有超過三十個國家的水有遭砷污染的情況 (Mazumder, 2008)。我國飲用水中砷濃度標準限值為 0.01 mg/L。地下水部份，若屬水源區，為 0.05 mg/L，非水源區則為 0.5 mg/L (環保署法規)。環境中的砷能直接或間接的影響生態系統甚至是人類的健康，因此砷污染的相關整治計畫為極需被關注的議題。

雖然砷對大多數的生物體具有毒性，但已有證據顯示微生物能夠調控砷在環境中的轉化、循環與分佈 (Katsoyiannis and Zouboulis, 2004)。具有氧化砷能力的微生物可能具有生物復育的潛能。一般地下水環境中，與三價砷相較之下，由於五價砷其溶解度及移動性較低、吸附性較高，並且對人體危害較小，因此若能將三價砷轉換成五價砷，再將五價砷吸附清除，將可減低地下水中砷污染對人體健康的影響，此為本研究的主要目標。使用生物方法復育砷污染有許多優點，因菌株自現地分離，不會產生現地無法存活之問題，也降低生態系統被干擾的疑慮，因此對污染地區的環境生態影響較小，為一個經濟有效的復育方法。

## 1-2 砷

長期飲用含砷污染的水源，會造成慢性砷中毒，引發烏腳病，或是皮膚、肺、腎臟、膀胱等的病變甚至導致癌症。砷的來源主要有三：1. 自然界，主要來自母岩或土壤母質的風化；2. 工業，主要來自排放的廢水，在玻璃、紙、或是半導體的製程中都會產生出相關化合物 (Basu *et al.*, 2001)。工業上的砷污染，往往是造成人體砷中毒的禍首；3. 農業，砷除了可作為除草劑、殺蟲劑和殺菌劑以外，還可做為乾燥劑及木材防腐劑。含砷農藥的大量及長期使用，會使大部分的砷進入土壤並殘留，而影響植物生長，甚至發生毒害作用 (Finkelman, 1999)，砷也藉由地質化學的過程釋出，累積在地下水體與地下水中。

砷為原子序 33 原子量 74.9216 之非金屬元素，週期表第 VA 族，以不同的形式存在於環境中，主要可分成無機砷與有機砷的形式。砷的毒性與其氧化態、化學組成、及生物獲取率 (bioavailability) 有很大的關係 (Lerman *et al.*, 1983)，通常無機的三價砷 (arsenite, As(III)) 及五價砷 (arsenate, As(V)) 被認為是導致人類疾病最主要的兩種形式。一般說來，無機五價砷毒性較低，無機三價砷對人體的危害則較大。無機砷進入人體後，大多在肝臟中轉換為單甲基砷酸、再轉變成雙甲基砷酸，然後由尿液排出 (陳建仁, 2004)，約兩小時就會遍佈全身。當發生急性砷中毒時，會出現上吐下瀉的腸胃道症狀；長期飲用含砷污染的水源，會造成慢性砷中毒，引發烏腳病，或是皮膚、肺、腎臟、膀胱...等的病變甚至導致癌症。除了導致腫瘤的形成外，砷亦會產生所謂的基因毒性，有研究顯示老鼠長期暴露在含有砷的環境時會導致染色體的變形，而在細菌及酵母菌中，則有發現點突變的情形，但目前並不了解是砷直接與DNA產生鍵結或是破壞了細胞本身修復機制所產生之效應 (Gebel, 2001)。

數十年前台灣西南沿海的北門、布袋、學甲和義竹等地流行的烏腳病，雖然學界仍有部份不同的看法，但大多認為就是因當地民眾長期飲用含有砷的地下水而導致慢性中毒。烏腳病潰瘍不易痊癒，其臨床病理包括「血栓血管炎栓塞」和「動脈硬化栓塞」，造成肢體呈現烏青壞死而必須走上截肢的命運 (陳建仁, 2004)。因此環保署制定了法規，對於飲用水中的砷濃度有了限

制。在 2001 年 12 月 1 日，環保署參考世界衛生組織對於水中砷濃度的建議值，將飲用水中含砷標準調整為 0.01 mg/L，在水源區的地下水標準為 0.05 mg/L，非水源區則為 0.5 mg/L (環保署環保法規)。目前在台灣、智利、孟加拉及印度仍有許多人因飲用含砷的水而造成病變，且人數還在增加 (Abernathy *et al.*, 1999)。由此可見，砷污染已成為世界矚目的焦點，對人體的影響實在不容小覷。

在砷的地質循環中，微生物扮演了相當重要的角色 (Oremland and Stolz, 2003, 2005)。當抽取地下水造成水位變化時，會造成水的入滲以及促使橫向運輸，產生氧化的環境，使高氧化態的離子 (如五價砷) 轉換成較低的氧化態，如此一來砷自固相轉變成水溶液相。人類建造水井的這項舉動，因提供如氧氣的氧化劑，加速了這項過程 (附錄一)。

## 1-3 還原、氧化、解毒砷的微生物

### 1.3.1 還原砷的微生物

微生物將五價砷轉變成三價砷，有一主要目的為供作解毒之機制。最為人所知的機制為 *ars operon system*。位於抵抗砷的 *operon* 中的 *ars* 基因表現，被認為是一解毒的方式。*ars operon* 存在於微生物體內的染色體 (Diorio *et al.*, 1995) 或質體 (Owolabi and Rosen, 1990) 中。當五價砷進入微生物體內後，藉由五價砷還原酶 *ArsC* 將其轉換為三價砷，再利用運輸蛋白 *Ars A/B* 排出體外，此為 *ars operon* 作用的基本原理。例如 *Escherichia coli* 與 *Staphylococcus sp.* 砷的解毒機制與生化的分子層面現已被分析完整 (Mukhopadhyay *et al.*, 2002; Rosen, 1999)。此外，在具砷污染的土壤及礦脈中所分離出的好氧菌體內，也具有五價砷還原成三價砷的機制。

### 1.3.2 砷酸鹽異化還原菌

另一類和五價砷還原相關的微生物為砷酸鹽異化還原菌 (DARPs)。研究發現自水中的底泥、熱泉、金礦脈、河口等厭氧環境中，發現具有能把五價砷還

原的 DARPs (Oremland and stolz, 2003)。不同於五價砷還原酶 ArsC 的解毒機制，DARPs 把五價砷還原成三價砷的機制由 *arr* operon 負責，並可藉電子轉移的過程獲取能量。

### 1.3.3 氧化砷的微生物

在 1918 年的研究中發現，自環境中分離出可以把無機三價砷氧化為五價砷的異營 (Ehrlich, 2002; Green, 1918) 及自營性 (Rhine *et al.*, 2006; Santini *et al.*, 2000; Iliyaletdinov and Abdrashitova, 1981) 微生物。三價砷氧化為五價砷的過程，主要由 *aox* 基因所調控，三價砷氧化酶由兩個次單位所組成，其中又以 *aoxB* 為較大之次單元。異營性微生物氧化砷的過程被認為是微生物的一種解毒機制，但此微生物並沒有從此過程中獲取能量 (Silver and Phung, 2005)。而自營性氧化砷的微生物則把三價砷當作是電子提供者，在好氧去氫 (Rhine *et al.*, 2005) 的條件下，與二氧化碳結合以用於細胞增長。

## 1-4 砷的生物吸附

應用於砷污染之移除復育的方法很多，包括混凝 (Matis *et al.*, 1999)、膠凝、離子交換、氧化鐵或氧化鋁吸附 (Mouchet, 1992; Katsoyiannis and Zouboulis, 2004) 等，近年來以生物體做為吸附劑之研究漸受注目。目前關於重金屬的生物吸附研究，包含微生物類的 *Bacillus* (Nakajima and Tsuruta, 2004; Tunali *et al.*, 2006)、*Pseudomonas* (Chang *et al.*, 1997; Uslu and Tanyol, 2006)、*Streptomyces* (Mameri *et al.*, 1999; Selatnia *et al.*, 2004)，和真菌類的 *Aspergillus* (Kapoor and Viraraghavan, 1997; Jianlong *et al.*, 2001; Binupriya *et al.*, 2006)、*Rhizopus* (Bai and Abraham, 2002; Park *et al.*, 2005)、*Penicillium* (Niu *et al.*, 1993; Tan and Cheng, 2003) 等。然而尚未有利用現地菌株自身進行砷的生物吸附的相關研究。

## 1-5 研究動機

砷 (Arsenic, As)，為已知之毒性物質，國際癌症研究組織 (International Agency for Research on Cancer, IARC) 與歐盟皆將之列為第一級致癌物，美國環



境保護署 亦將之列為A級的致癌物。砷可能藉由工業、農業、火山爆發、採礦等行為被釋出 至環境中。長期飲用含砷污染的水源，會造成慢性砷中毒，引發烏腳病，皮膚、 肝臟、呼吸道、腸胃道、心血管等疾病，甚至導致糖尿病及癌症 (Mazumder, 2008)。包括台灣，目前國際上有超過三十個國家的水有遭砷污染的情況 (Mazumder, 2008)。台灣的宜蘭、雲林、嘉義、台南地區，地下水體過去都曾發現具高含量的 砷，雖然現今大多並不會以地下水作為主要的飲用水來源，但仍有部份民眾未裝 設自來水管，以地下水作為主要的飲用水來源，另外以地下水作為灌溉及養殖 用水的來源仍是相當普遍的現象。目前已知微生物在砷的地質循環中扮演重要角色 (Oremland and Stolz, 2003)。最近針對台灣烏腳病流行疫區的研究結果顯示，現 地的微生物為造成土壤中的砷釋放到地下水體的主要因子 (Liao *et al.*, 2011a)。若能 利用現地分離出的微生物，進行特性分析與探討，並以其做為生物吸附劑直接進 行砷的吸附，將能在最小的環境影響程度下解決地下水砷污染問題。以現地菌株 自身進行砷的生物吸附，達到移除環境中砷污染之優點有很多，因菌株自現地分 離，不會產生現地無法存活之問題，也降低生態系統被干擾的疑慮，相信將能有效進行環境中砷的生物復育。

## 1-6 研究目的

本研究利用現地分離出的三價砷氧化菌株，進行其特性探討。旨在除了能將 三價砷氧化為五價砷外，並欲利用此分離菌株之生物質量與具較佳吸附能力之五 價砷結合，如此一來，水溶液中的無機五價砷、或與菌株生物質量吸附的無機五價砷，可藉由與底泥中的氧化鐵或氧化錳等礦物產生吸附與共沉澱現象，期達到 移除地下水中砷污染之目的。

在一般 pH 值的環境中，與三價砷相較之下，由於五價砷其對土壤、底泥或是 吸附劑之吸附性較高，並且對人體危害較小，因此若能使三價砷轉換成五價砷，再將五價砷吸附清除，將可減低地下水中砷污染對人體健康的影響，達到生物復育之目的。

本實驗室已自含砷污染之地下水層中發現具高度氧化三價砷能力之菌株，可 將砷的毒性降低。本研究計畫欲進一步以現地水樣與環境特性模擬菌種對砷

之轉化情形、確認菌株生物吸附之能力，並模擬該氧化菌在不同砷濃度之生物吸附效率，以求出最佳之作用條件。期以生物復育的方式達到含砷地下水之污染整治。

**此計畫執行期程：**100 年 11 月 26 日起至 101 年 11 月 25 日

**此期末報告進度內容包括：**

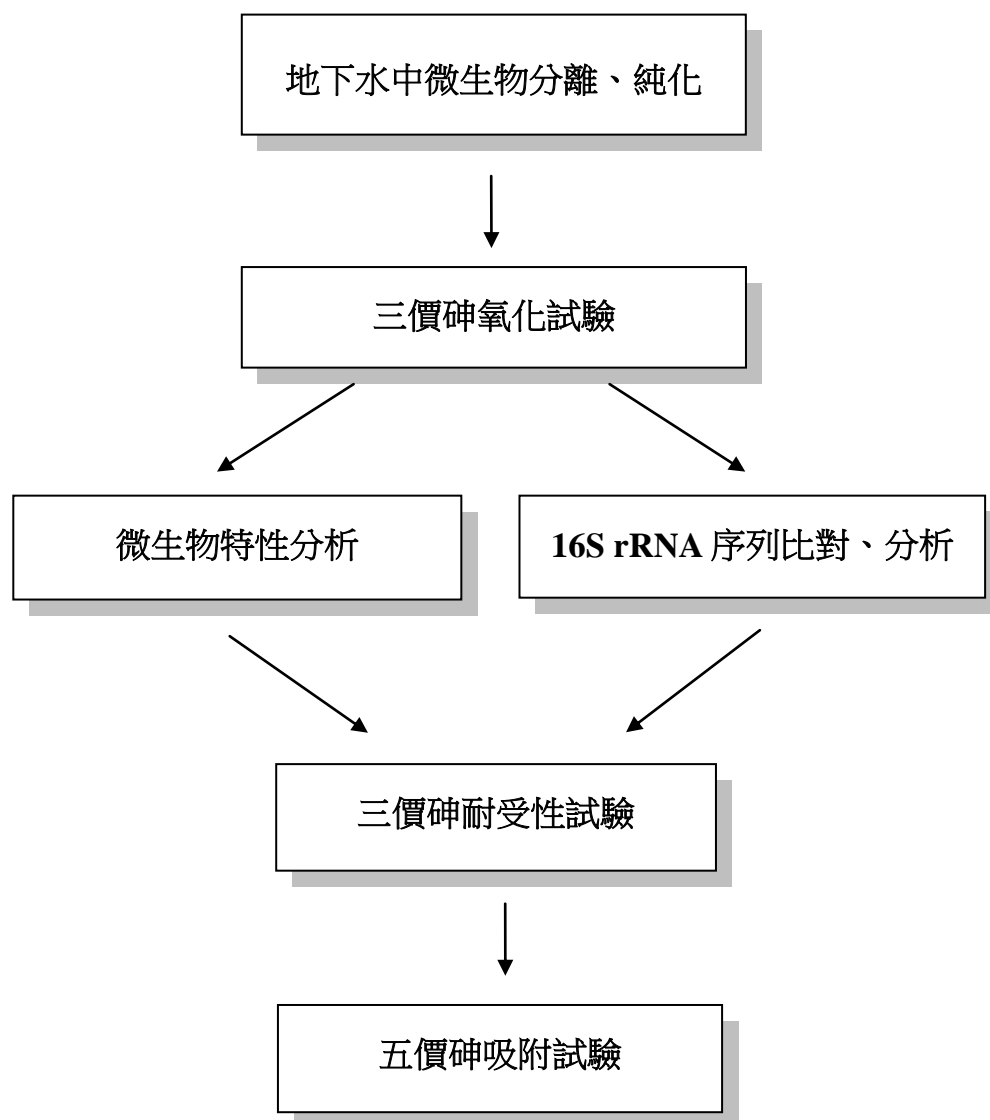
1. 含砷水樣中，具三價砷氧化特性之菌株篩選、分離與純化。
2. 菌株基本特性分析：pH 值容許範圍、溫度容許範圍、生長曲線、碳源利用情形、對砷之最低抑制濃度。
3. 以現地水樣與環境特性模擬菌種對砷之轉化情形。
4. 菌株生物吸附之能力評估。
5. 模擬不同菌量與不同砷濃度之生物吸附效率，求出最佳之作用條件。

## 第二章、研究方法與過程

**【摘要】** 本章節說明研究使用的主要藥品和實驗器材，並描述實驗步驟，包括：地下水金屬含量分析；微生物之分離、鑑定、與特性分析；微生物砷氧化實驗；微生物吸附五價砷之能力試驗等。

## 第二章 研究方法與過程

### 2.1 計畫執行流程圖



## 2-2 主要實驗藥品

### 2.2.1 培養基

- a. Agar
- b. Beef extract
- c. Glucose,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaCl}$  etc
- d. Peptone, Tryptone, Yeast extract

### 2.2.2 核酸電泳

- a. Agarose
- b. Ethidium bromide
- c. Electrophoresis buffers:  
Tris base, Boric acid, EDTA,  $\text{NaOH}$ , 1Kb marker

### 2.2.3 核酸萃取

- a. Alkaline lysis solution I :  
Tris base,  $\text{HCl}$ , Glucose
- b. Alkaline lysis solution II :  
 $\text{NaOH}$ , SDS
- c. Alkaline lysis solution III :  
Sodium acetate, Glacial acetic acid
- d. Ethanol
- e. TE (Tris-EDTA):  
Tris-Cl, Tris base,  $\text{HCl}$
- f. Pancreatic Rnase

### 2.2.4 聚合酶連鎖反應

PCR buffer, dNTP, *Tag* enzyme

### 2.2.5 膠體純化

- a. Gel extraction kit: QIAquick Gel Extraction Kit

- b. Purification kit: QIAquick PCR Purification Kit

## 2-3 主要實驗器材

### 2.3.1 培養箱

恆溫迴旋震盪培養箱

### 2.3.2 核酸電泳

- a. 電泳槽
- b. 電源供應器

### 2.3.3 核酸萃取

- a. 離心機
- b. 真空抽氣吸引機
- c. 冰箱

### 2.3.4 聚合酶連鎖反應

- a. PCR machine
- b. 離心機

### 2.3.5 其它

- a. pH 測定儀
- b. -20°C 冷凍櫃
- c. -80°C 冷凍櫃
- d. 滅菌釜
- e. 製冰機
- f. 微量吸管
- g. 電動吸管
- h. UV 照相設備

- i. 數位相機
- k. 水浴槽
- l. 震盪器
- m. 微波爐
- n. 螢光光度計
- o. 分光光度計

## 2-4 地下水金屬含量分析

委託其他單位協助採集雲林、嘉義、台南的地下水樣與土壤，將土壤儲存於 4°C 環境下，以保持原有金屬和菌種的完整性。取實驗室取得之現地地下水樣利用感應耦合電漿原子發射光譜儀，可得知水樣中不同金屬之含量，以此作為未來分析之依據。

## 2-5 微生物之分離、鑑定、與特性分析

### 2.5.1 菌株分離與篩選

以仿照現地地下水之離子濃度所配成的人工合成地下水 (表一) (Liao *et al.*, 2011a)，額外添加酵母萃取物等碳源，再加入三價砷配成含砷之培養基，以進行三價砷氧化菌之分離與篩選。篩選後之三價砷氧化菌菌株，取 0.7 mL 與 0.3 mL 甘油混合均勻後，冷凍於 -80°C 中保存，待後續研究之進一步探討。

### 2.5.2 革蘭氏染色

取培養約 12 小時之三價砷氧化菌菌株，利用竹籤沾些許菌落於載玻片上，滴一滴無菌水將之塗抹均勻，待自然風乾後，於酒精燈上來回加熱 3-4 次，使菌體固定於載玻片上，形成薄膜。滴上結晶紫，染色作用 1 分鐘後以水沖洗多餘染液，覆上革蘭氏碘液作為媒染劑，作用 1 分鐘後以水沖洗多餘碘液。以 95% 乙醇作為脫色劑，緩緩滴上洗去媒染劑，至留下酒精變為無色或淡藍色。以水沖洗多餘脫色劑，滴上複染劑番紅，作用 30 秒後以水沖洗多餘染液。

玻片風乾後，置於顯微鏡下觀察。

### 2.5.3 菌種鑑定

針對本實驗室分離之可氧化三價砷之菌種，以引子 VLIAO-16S-F (5'-GGAGCAAACAGGATTAGATACC-3')/VLIAO-16S-R (5'-TGCCAACTCTATGGTGTGTGACG-3') (本實驗室設計) 進行 16S rRNA 之聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)，反應試劑濃度及作用條件如表二。取反應後產物送至生技公司進行 DNA 定序，得到之序列至 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 資料庫進行菌種 DNA 序列比對，收集相似菌株序列，繪製菌種演化樹，可確認實驗室所分離之三價砷氧化菌株之分類地位。

### 2.5.4 特性分析

(i). 生長曲線：以添加有酵母萃取物之人造地下水為培養基，加入實驗室分離之三價砷氧化菌，在不同時間點利用分光光度計測量 OD<sub>600</sub> 值 (optical density, OD<sub>600</sub>)，藉以推求該三價砷氧化菌株之生長曲線。

(ii). pH 值與溫度之容許範圍：以添加有酵母萃取物之人造地下水為培養基，加入實驗室分離之三價砷氧化菌，在不同的 pH 值 (pH = 4 - 10)、溫度 (12 - 45°C) 條件下測定其 OD<sub>600</sub> 值，藉以推求該三價砷氧化菌株在不同 pH 值與溫度下之生長情形。

(iii). 碳源之利用情形：以添加不同碳源，包括醋酸鹽 (acetate)、乳酸 (lactate)、丁二酸鹽 (succinate) 和重碳酸鹽 (NaHCO<sub>3</sub>) 之人造地下水為培養基，加入實驗室分離之三價砷氧化菌，在不同時間點測定其 OD<sub>600</sub> 值，以此推求該三價砷氧化菌株是否能利用該碳源。

(iv). 最低抑制濃度：以添加有酵母萃取物之人造地下水為培養基，加入實驗室分離之三價砷氧化菌，分別添加不同濃度的三價砷與五價砷，經 24 小時後測定其 OD<sub>600</sub> 值，可得知該三價砷氧化菌株對砷之最低抑制濃度。



## 2-6 微生物氧化實驗

本實驗分別以人造地下水與現地地下水為培養基，額外添加汙染地區經調查後之最大三價砷濃度，加入實驗室分離之三價砷氧化菌，在不同時間點利用免疫 酵素分析儀 Thermo scientific (MULTISKAN EX, Waltham, MA, US) 之光度計測定方法（本實驗室設計）測定培養基中三價砷與五價砷濃度。觀察實驗室分離之三價 砷氧化菌株之氧化效率。本試驗使用之免疫酵素分析儀之光度計測定方法，乃根據Johnson and Pilson (1972)和Dhar et al. (2004)修訂，其靈敏度為1  $\mu\text{M}$  (75 ppb)，檢量線 $R^2$ 值亦呈現0.99以上，顯示其靈敏度高且測定之精確度亦高。三價/五價砷之檢測亦利用LC-ICP-MS檢測。

## 2-7 微生物吸附五價砷之能力試驗

### 2.7.1 三價/五價砷之檢測

本實驗分別以人造地下水與現地地下水為培養基，額外添加汙染地區經調查後之最大三價砷濃度，加入實驗室分離之三價砷氧化菌，在不同時間點利用免疫 酵素分析儀 Thermo scientific (MULTISKAN EX, Waltham, MA, US) 之光度計測定方法（本實驗室設計）測定培養基中三價砷與五價砷濃度。觀察實驗室分離之三價 砷氧化菌株之氧化效率。本試驗使用之免疫酵素分析儀之光度計測定方法，乃根據 Johnson and Pilson (1972) 和 Dhar et al. (2004) 修訂，其靈敏度為 1  $\mu\text{M}$  (75 ppb)，檢量線  $R^2$  值亦呈現 0.99 以上，顯示其靈敏度高且測定之精確度亦高。

### 2.7.2 吸附用菌體製備

取培養 24 小時之菌液，放入 50 mL 離心管中 (離心管先行秤重)，以 12,000 rpm 轉速離心 15 分鐘後，去除上清液，收集菌數濃度約  $10^8$  cells/mL 之對數生長期末期或靜止期前期之菌體，將菌體預冷於  $-80^\circ\text{C}$  冰箱或乾冰中，使其於減壓前冷凍成固體，再將真空度降低至 30  $\mu\text{m}$  汞柱抽乾 18-24 小時，待冷凍乾燥後取出樣品瓶秤重，貯存於  $4^\circ\text{C}$  冰箱備用。

### 2.7.3 五價砷吸附試驗

取一定體積之冷凍乾燥菌體，置於 10 mL 三角瓶中，加入不同濃度之五價砷溶液，150 rpm 室溫下震盪反應 12 天，每三天取樣一次，以 2,000 rpm 離心 10 分鐘得到上清液，以 ICP 方式測上清液中所含之五價砷濃度。

## 第三章、主要發現與結論

**【摘要】** 本章節說明研究計畫的成果，包括選定含砷污染之地下水樣分析；鑑定分離現地具三價砷氧化能力之菌種；菌株之特性分析；三價砷氧化酶基因之發現；以現地水樣與環境特性模擬菌種對砷之氧化情形；菌株生物吸附之能力評估；菌株於不同五價砷濃度之生物吸附效率；不同菌量之生物吸附效率等。最後，針對研究計畫的結果及計畫建議事項作說明。

## 第三章 主要發現與結論

### 3-1 選定含砷污染之地下水樣

採集雲林、嘉義地區之淺井含水層 (約 20 公尺) 地下水樣與土壤進行總砷含量測定，以感應耦合電漿原子發射光譜儀檢測，結果得知遭受砷污染地區之地下水含砷濃度介於 200-780 ppb，遠超過環保署公告 10 ppb 之可容許範圍。當地居民健康議題值得政府單位多加留意。地下水水質資料如表三。

### 3-2 鑑定分離現地具三價砷氧化能力之菌種

將採集水樣和土壤進行微生物培養，以分區畫線方式得到單一菌落 (圖一)，並以革蘭氏染色法觀察分離菌株之型態，挑選純化之單一菌株進行三價砷氧化實驗，實驗結果發現雲林地下水樣中所分離之單一菌株屬於革藍氏陰性短桿菌 (圖二) 且具極佳三價砷氧化能力 (圖三)，處於好氧情況下，三天便能完全氧化三價砷為五價砷。利用 PCR 反應得到 16S rDNA 片段，將 PCR 產物定序後並利用資料庫中軟體 BLAST 與目前已知菌種進行 DNA 序列比對，比對結果確認該分離菌株為 *Pseudomonas* 屬 (圖四)，將其菌株命名為 *Pseudomonas* sp. As7325，後續實驗便是進一步針對此分離菌株進行其特性分析。

### 3-3 菌株之特性分析

#### (1) 生長曲線

基本特性分析實驗中，先就分離菌株 *Pseudomonas* sp. As7325 之生長曲線進行研究 (圖五)，在培養基中加入 0.1% 酵母萃取物後於 25 °C 下培養，分離菌株 *Pseudomonas* sp. As7325 於 4 小時後達到對數期 (log phase)，20 小時後達到靜止期 (stationary phase)，菌量密度約  $OD_{600}=0.4$ 。

#### (2) 溫度與 pH 值容許範圍

在溫度與 pH 值容許範圍方面，實驗結果得知分離菌株 *Pseudomonas* sp. As7325 在 18 - 37°C 環境中皆可生長 (圖六)，環境溫度高於 45°C 則無法生長，其中 30°C 為最適生長溫度，屬於中溫環境細菌。以最適生長溫度 30°C 條件下，調整培養基 pH 值為 4、7 或 10 進行菌株培養，結果發現此分離菌株 *Pseudomonas* sp. As7325 無法於 pH = 4 的環境下生長 (圖七)，其中 pH = 7 的條件下生長情況最佳。

### (3) 碳源之利用情形

在碳源利用實驗部份，以模擬地下水成分之緩衝溶液 (artificial groundwater, AGW, final concentration of 10 mM sodium bicarbonate, 10 mM acetate, 10 mM lactate, and 10 mM succinate) 加入不同碳源進行測試。如表四所示，分離菌株 *Pseudomonas* sp. As7325 在有無三價砷的條件下皆可利用醋酸鹽 (acetate)、乳酸 (lactate) 和丁二酸鹽 (succinate) 作為能量來源進行生長，而無法利用重碳酸鹽 ( $\text{NaHCO}_3$ ) 為能量來源。顯示分離菌株 *Pseudomonas* sp. As7325 具氧化三價砷能力並非以三價砷作為其能量來源。

在水處理系統或實際地下水應用中，此砷氧化菌可利用常見之醋酸鹽為碳源，亦為生長效果最佳且最簡單的碳源之一。另外，亦可採集之後欲整治之實際地下水或水處理系統中的水樣，進一步分析其碳源成分，以利更有效的整治。

### (4) 對砷之最低抑制濃度

為了測試分離菌株 *Pseudomonas* sp. As7325 的抗砷能力，以最小抑制濃度試驗 (Minimum inhibitory concentration, MIC) 進行測試，分別處理三價砷 0、0.1、0.2、0.5、1、5 和 10 mM 以及五價砷 0、5、10、20、50 和 100 mM，暴露 24 小時後，觀察分離菌株生長情形。實驗觀察發現，分離菌株 *Pseudomonas* sp. As7325 三價砷和五價砷之最高容許濃度分別為 1 mM 和 100 mM。

## 3-4 三價砷氧化酶基因之發現

為了探討 *Pseudomonas* sp. As7325 的三價砷是藉由何種基因調控，利用三價砷氧化酶基因序列保守的特性，使用之前本研究室設計的引子(Liao et al., 2011b) 進行聚合酶鏈鎖反應技術。結果顯示 As7325 具有可將砷氧化之砷氧化酶基因 *aoxB* (圖八)，由此可推論出 As7325 為具砷氧化或解毒機制之細菌。

### 3-5 以現地水樣與環境特性模擬菌種對砷之轉化情形

為了觀察分離菌株 *Pseudomonas* sp. As7325 在實驗室與現地環境中對於三價砷氧化能力是否相同，利用現地地下水樣（內含約 2200 µg/L 三價砷）進行三價砷氧化測試。溫度條件參考之前環境調查年報，地下水年均溫約 25 °C，因此選擇 25 °C 做為實驗溫度。在好氧情況、25 °C 和現地水樣條件下，分離菌株 *Pseudomonas* sp. As7325 於 12 小時可氧化一半之三價砷 (~ 1000 µg/L) (圖九)，到 24 小時便達到完全的氧化效率。將反應後之As(III)與As(V)濃度相加，其總濃度符合一開始加入之As(III)濃度，顯示系統中As之質量平衡。

### 3-6 菌株生物吸附之能力評估

將冷凍乾燥所得之三價砷氧化菌 *Pseudomonas* sp. As7325 加入含有 6.67 µM (~ 500 µg/L) 或 13.33 µM (~ 1000 µg/L) 五價砷溶液中，分別在第 2、4、6 天測其溶液中所剩五價砷濃度。實驗結果發現，相較於未加入三價砷氧化菌 *Pseudomonas* sp. As7325 的控制組別，6 天實驗期間其溶液中五價砷濃度絲毫沒有改變 (圖十)，但是加入三價砷氧化菌 *Pseudomonas* sp. As7325 之組別，自第 2 天便可觀察到五價砷濃度降低，在 6 天內即百分之百吸附 6.67 µM (~ 500 µg/L) 或 13.33 µM (~ 1000 µg/L) 的五價砷 (圖十)。由此實驗結果可知，本實驗室所分離之三價砷氧化菌 *Pseudomonas* sp. As7325 除可有效氧化三價砷為五價砷外，還具有五價砷之吸附能力。

### 3-7 菌株於不同五價砷濃度之生物吸附效率

為比較*Pseudomonas* sp. As7325 之五價砷吸附能力，取 5 g/L 冷凍乾燥菌體加入不同濃度 (6.67  $\mu$ M (~ 500  $\mu$ g/L) 或 13.33  $\mu$ M (~ 1000  $\mu$ g/L)) 之五價砷溶液中，分別在第 2、4、6 天測其溶液中所剩五價砷濃度 (圖十)。實驗結果發現，自第 2 天起便有五價砷吸附於菌體，6.67  $\mu$ M (~ 500  $\mu$ g/L) 與 13.33  $\mu$ M (~ 1000  $\mu$ g/L) 五價砷吸附率分別為 34.8% 和 16.2%；第 4 天時溶液中 6.67  $\mu$ M (~ 500  $\mu$ g/L) 與 13.33  $\mu$ M (~ 1000  $\mu$ g/L) 五價砷吸附率分別為 49.0% 和 23.4%；在第 6 天便百分之百吸附 6.67  $\mu$ M (~ 500  $\mu$ g/L) 或 13.33  $\mu$ M (~ 1000  $\mu$ g/L) 的五價砷 (圖十)。

### 3-8 不同菌量之生物吸附效率

初步吸附實驗中得知，5 g/L 冷凍乾燥菌體對於 6.67  $\mu$ M (~ 500  $\mu$ g/L) 與 13.33  $\mu$ M (~ 1000  $\mu$ g/L) 五價砷在 6 天內皆具有良好之吸附效應，因此接下來便是探討 As7325 菌體多寡對於五價砷吸附之影響 (圖十一)。取不同菌量 (0, 1, 5, 10 g/L) 之冷凍乾燥菌體加入 6.67  $\mu$ M (~ 500  $\mu$ g/L) 五價砷溶液中，每 3 天測一次溶液中所剩五價砷濃度。實驗結果得知，第 3 天時不同菌量 (0, 1, 5, 10 g/L) 之冷凍乾燥菌體吸附五價砷之效率分別為 0%、9%、18% 和 72%；第 6 天時不同菌量 (0, 1, 5, 10 g/L) 之冷凍乾燥菌體吸附五價砷之效率分別為 0%、4.5%、40.5% 和 81%；第 9 天時不同菌量 (0, 1, 5, 10 g/L) 之冷凍乾燥菌體吸附五價砷之效率分別為 9%、4.5%、40.5% 和 90%；第 12 天時不同菌量 (0, 1, 5, 10 g/L) 之冷凍乾燥菌體吸附五價砷之效率分別為 4.5%、13.5%、85.5% 和 99% (圖十一)。實驗結果顯示，10 g/L 之冷凍乾燥菌體自第 3 天起便具有良好之五價砷吸附效力，短時間便可有效吸附溶液中之五價砷，因此三價砷氧化菌 *Pseudomonas* sp. As7325 培養容易，可於發酵槽中大量培養，且冷凍乾燥菌體製備容易，對於現地五價砷之移除具有極大之應用潛力。

### 3-9 結 論

由本研究所分離的砷氧化菌得知，此氧化菌能抗 1 mM (75 ppm) As(III) 的毒

性，並能在1天內將30  $\mu\text{M}$  (2250 ppb) 的As(III)氧化，該濃度遠高於台灣地下水監測的砷濃度，因此應用本研究的砷氧化菌做為現地復育，具有可行性。

根據以上所述，經由本計畫之執行，其預期效益欲藉由利用現地分離之砷氧化菌株自身的三價砷氧化能力與五價砷吸附的功用，有效移除環境中地下水的砷，以低污染及低成本之方式達到砷污染地區之生物復育。

期中實驗成果不僅分離、純化具三價砷氧化能力菌株 *Pseudomonas* sp. As7325，針對其基本特性(生長曲線、pH/溫度容忍範圍、砷最小抑制濃度試驗)進行分析，更利用現地水樣模擬現地環境，探討分離菌株於現地氧化三價砷之能力。

期末實驗成果接續其中所分離之菌株，進行五價砷之吸附試驗，結果得知此三價砷氧化菌 *Pseudomonas* sp. As7325 在 6 天內便可百分之百吸附 6.67  $\mu\text{M}$  (~ 500  $\mu\text{g/L}$ ) 或 13.33  $\mu\text{M}$  (~ 1000  $\mu\text{g/L}$ ) 的五價砷，且 10g/L 之冷凍乾燥菌體在實驗初期(第 3 天)即可有效移除溶液中五價砷，極具現地應用之發展潛力。**本計畫執行進度完成度 100%。**

目前直接自地下水系統中分離出來的砷氧化菌極少，三價砷氧化菌能夠將毒性較高的三價砷氧化成毒性較低的五價砷，此為生物復育重要的概念。利用現地分離出來的菌株進行復育也可降低生態干擾。此株三價砷氧化菌無論在有氧或無氧的環境下皆能生長，顯示其在還原態的地下水環境中亦能生存。未來若於現地應用，應可在地下水體中打入氧氣，使水環境呈現短暫的氧化態，因菌株的氧化效率高，能快速的將三價砷氧化成五價砷，再進一步進行生物吸附之功能。

### 3-10 計畫建議事項：

透過本計畫執行成果得知，自地下水所分離之三價砷氧化菌株 *Pseudomonas* sp. As7325，其自身兼具三價砷氧化能力與五價砷吸附的功用，能有效移除環境中地下水的砷，以低污染及低成本之方式達到砷污染地區之生物復育。



因此在中程目標建議結合水利工程團隊，在地下水污染區域裝置簡單鑿井設施 (附錄二)，透過其裝置打入氧氣到地下水層，短暫改變地下水層氧化還原態，促進微生物快速的將三價砷氧化成五價砷，之後於還原態與五價砷吸附，降低地下水之砷污染程度。除此之外，仍需搭配地下水中砷濃度之管理加上砷移除工程 (生物吸附等) 達到降低台灣地下水中砷污染之問題。

## 第四章、參考文獻

## 第四章、參考文獻

- Abernathy, C.O., Liu, Y.P., Longfellow, D., Aposhian, H.V., Beck, B., Fowler, B., Goyer, R., Menzer, R., Rossman, T., Thompson, C., Waalkes, M. (1999). Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues. *Environmental Health Perspective*, 107(7), 593-597.
- Bai, R. S., Abraham, T. E. (2002). Studies on enhancement of Cr(VI) biosorption by chemically modified biomass of *Rhizopus nigricans*. *Water Research*, 36(5), 1224-1236.
- Basu, A., Mahata, J., Gupta, S., Giri, A. K. (2001). Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 488(2), 171-194.
- Binupriya, A. R., Sathishkumar, M., Swaminathan, K., Jeong, E. S., Yun, S. E., Pattabi, S. (2006). Biosorption of metal ions from aqueous solution and electroplating industry wastewater by *Aspergillus japonicus*: Phytotoxicity studies. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 77(2), 219-227.
- Chan, P. C., Huff, J. (1997). Arsenic carcinogenesis in animals and in humans: Mechanistic, experimental, and epidemiological evidence. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 15(2), 83-122.
- Chang, J. S., Law, R., Chang, C. C. (1997). Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. *Water Research*, 31(7), 1651-1658.
- Dhar, R.K., Zheng, Y., Rubenstone, J., van Geen, A. (2004). A rapid colorimetric method for measuring arsenic concentrations in groundwater. *Analytica Chimica Acta*, 526, 203-209.
- Diorio, C., Cai, J., Marmor, J., Shinder, R., DuBow, M. S. (1995). An *Escherichia coli* chromosomal ars operon homolog is functional in arsenic detoxification and is conserved in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 177(8), 2050-2056.
- Ehrlich, H. L. (2002). Bacterial oxidation of As(III) compounds, New York. Marcel Dekker, Inc.
- Finkelman, R. B. (1999). Trace elements in coal: environmental and health significance.

- Biological Trace Element Research, 67(3), 197-204.
- Gebel, T. W. (2001). Genotoxicity of arsenical compounds. International Journal of Environmental Health Research, 203, 249-262.
- Green, H. H. (1918). Description of a bacterium which oxidizes arsenite to arsenate, and of one which reduces arsenate to arsenite, isolated from a cattle-dipping tank. South African Journal of Science, 14, 465-467.
- Huang, C., Li, J., Ding, M., Wang, L., Shi, X., Castranova, V., Vallyathan, V., Ju, G., Costa, M. (2001). Arsenic-induced NF $\kappa$ B transactivation through Erks- and JNKs-dependent pathways in mouse epidermal JB6 cells. Molecular and Cellular Biochemistry, 222(1), 29-34.
- Ilialetdinov, A. N., Abdrashitova, S. A. (1981). Autotrophic arsenic oxidation by a *Pseudomonas arsenitoxidans* culture. Mikrobiologiya, 50(2), 197-204.
- Jianlong, W., Xinmin, Z., Decai, D., Ding, Z. (2001). Bioadsorption of lead(II) from aqueous solution by fungal biomass of *Aspergillus niger*. Journal of Biotechnology, 87(3), 273-277.
- Johnson, D.L., Pilson, M. E. Q. (1972). Spectrophotometric determination of arsenite, arsenate, and phosphate in natural waters. Analytica Chimica Acta, 58, 289-299.
- Kapoor, A., Viraraghavan, T. (1997). Heavy metal biosorption sites in *Aspergillus niger*. Bioresource Technology, 61(3), 221-227.
- Katsoyiannis, I. A., Zouboulis, A. I. (2004). Application of biological processes for the removal of arsenic from groundwaters. Water Research, 38(1), 17-26.
- Lerman, S. A., Clarkson, T. W., Gerson, R. J. (1983). Arsenic uptake and metabolism by liver cells is dependent on arsenic oxidation state. Chemico-Biological Interactions, 45(3), 401-406.
- Liao, V. H. C., Chu, Y. J., Su, Y. C., Lin, P. C., Hwang, Y. H., Liu, C. W., Liao, C. M., Chang, F. J., Yu, C. W. (2011a). Assessing the mechanisms controlling the mobilization of arsenic in the arsenic contaminated shallow alluvial aquifer in the blackfoot disease endemic area. Journal of Hazardous Materials, 197, 397-403.
- Liao VH, Chu YJ, Su YC, Hsiao SY, Wei CC, Liu CW, Liao CM, Shen WC, Chang FJ. (2011b) Arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria associated with arsenic-rich groundwater in Taiwan. J Contam Hydrol. 123(1-2), 20-29.
- Mameri, N., Boudries, N., Addour, L., Belhocine, D., Lounici, H., Grib, H., Pauss, A.

- (1999). Batch zinc biosorption by a bacterial nonliving *Streptomyces rimosus* biomass. *Water Research*, 33(6), 1347-1354.
- Matis, K. A., Zouboulis, A. I., Zamboulis, D., Valtadorou, A. V. (1999). Sorption of As(V) by goethite particles and study of their flocculation. *Water, Air, & Soil Pollution*, 111(1), 297-316.
- Mazumder, D. N. G. (2008). Chronic arsenic toxicity & human health. *Indian Journal of Medical Research*, 128, 436-447.
- Mouchet, P. (1992). From conventional to biological removal of iron and manganese in France. *Journal of the American Water works Association*, 84(4), 158-167.
- Mukhopadhyay R, Rosen B. P, Phung L. T, Silver, S. (2002). Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiology Review* 26(3), 311-325.
- Nakajima, A., Tsuruta, T. (2004). Competitive biosorption of thorium and uranium by *Micrococcus luteus*. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 260(1), 13-18.
- Niu, H., Xu, X. S., Wang, J. H., Volesky, B. (1993). Removal of lead from aqueous solutions by *Penicillium* biomass. *Biotechnology and Bioengineering*, 42(6), 785-787.
- Oremland, R. S., Stolz, J. F. (2003). *The Ecology of Arsenic*. Science (Washington), 300(5621), 939-944.
- Oremland, R. S., Stolz, J. F. (2005). Arsenic, microbes and contaminated aquifers. *Trends in Microbiology*, 13(2), 45-49.
- Owolabi J. B., Rosen B. P. (1990). Differential mRNA stability controls relative gene expression within the plasmid-encoded arsenical resistance operon. *Journal of Bacteriology*, 172(5), 2367-2371.
- Park D., Yun Y. S., Park J. M. (2005). Use of dead fungal biomass for the detoxification of hexavalent chromium: screening and kinetics. *Process Biochemistry*, 40(7), 2559-2565.
- Rhine E. D., Garcia-Dominguez E., Phelps C. D., Young L. Y. (2005). Environmental microbes can speculate and cycle arsenic. *Environmental Science and Technology*, 39(24), 9569-9573.
- Rhine E. D., Phelps C. D., Young L. Y. (2006). Anaerobic arsenite oxidation by

- novel denitrifying isolates. *Environmental Microbiology*, 8(5), 899-908.
- Ronald, C. K., Alisa, M. D., Jean, P. L., Joshua, W. H. (2001). Arsenic alters the function of the glucocorticoid receptor as a transcription factor. *Environmental Health Perspective*, 109, 245-251.
- Rosen B. P. (1999). Families of arsenic transporters. *Trends Microbiology*, 7(5), 207-212.,
- Santini, J. M., Sly, L. I., Schnagl, R. D., Macy, J. M. (2000). A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Applied and Environment Microbiology*, 66(1), 92-97.
- Selatnia, A., Boukazoula, A., Kechid, N., Bakhti, M. Z., Chergui, A., Kerchich, Y. (2004). Biosorption of lead (II) from aqueous solution by a bacterial dead *Streptomyces rimosus* biomass. *Biochemical Engineering Journal*, 19(2), 127-135.
- Silver, S., Phung, L. T. (2005). Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Applied and Environment Microbiology*, 71(2), 599-608.
- Tan, T., Cheng, P. (2003). Biosorption of metal ions with *Penicillium chrysogenum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 104(2), 119-128.
- Tunali, S., Çabuk, A., Akar, T. (2006). Removal of lead and copper ions from aqueous solutions by bacterial strain isolated from soil. *Chemical Engineering Journal*, 115(3), 203-211.
- Uslu, G., Tanyol, M. (2006). Equilibrium and thermodynamic parameters of single and binary mixture biosorption of lead (II) and copper (II) ions onto *Pseudomonas putida*: Effect of temperature. *Journal of Hazardous Materials*, 135(1-3), 87-93.
- 陳建仁，科學人雜誌 2004 年 9 月號。

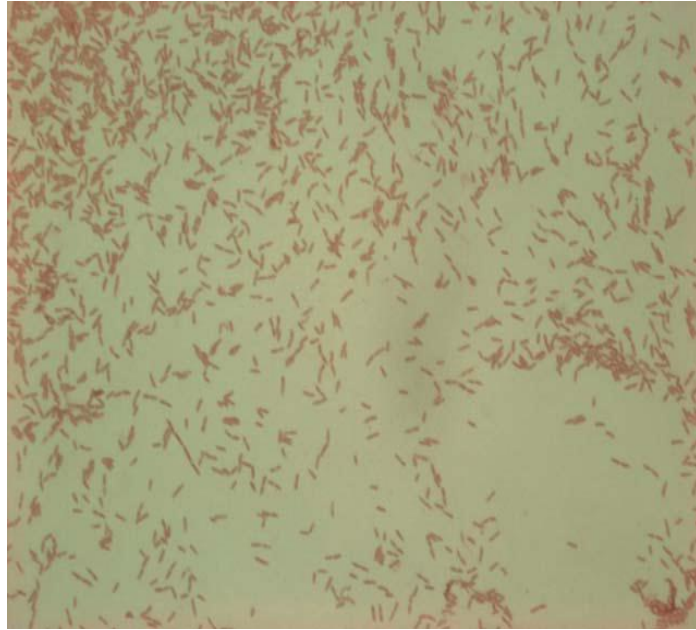
## 第五章、實驗結果圖表

## 第五章 實驗結果圖表

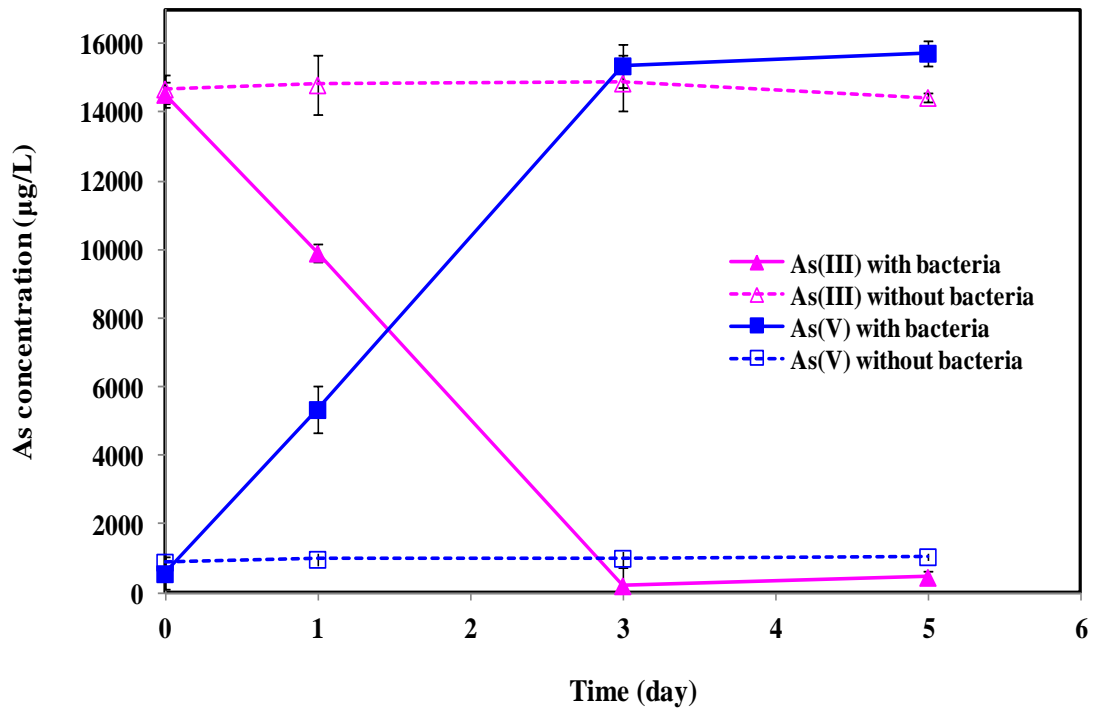


圖一、分離菌株 As7325 單一菌落

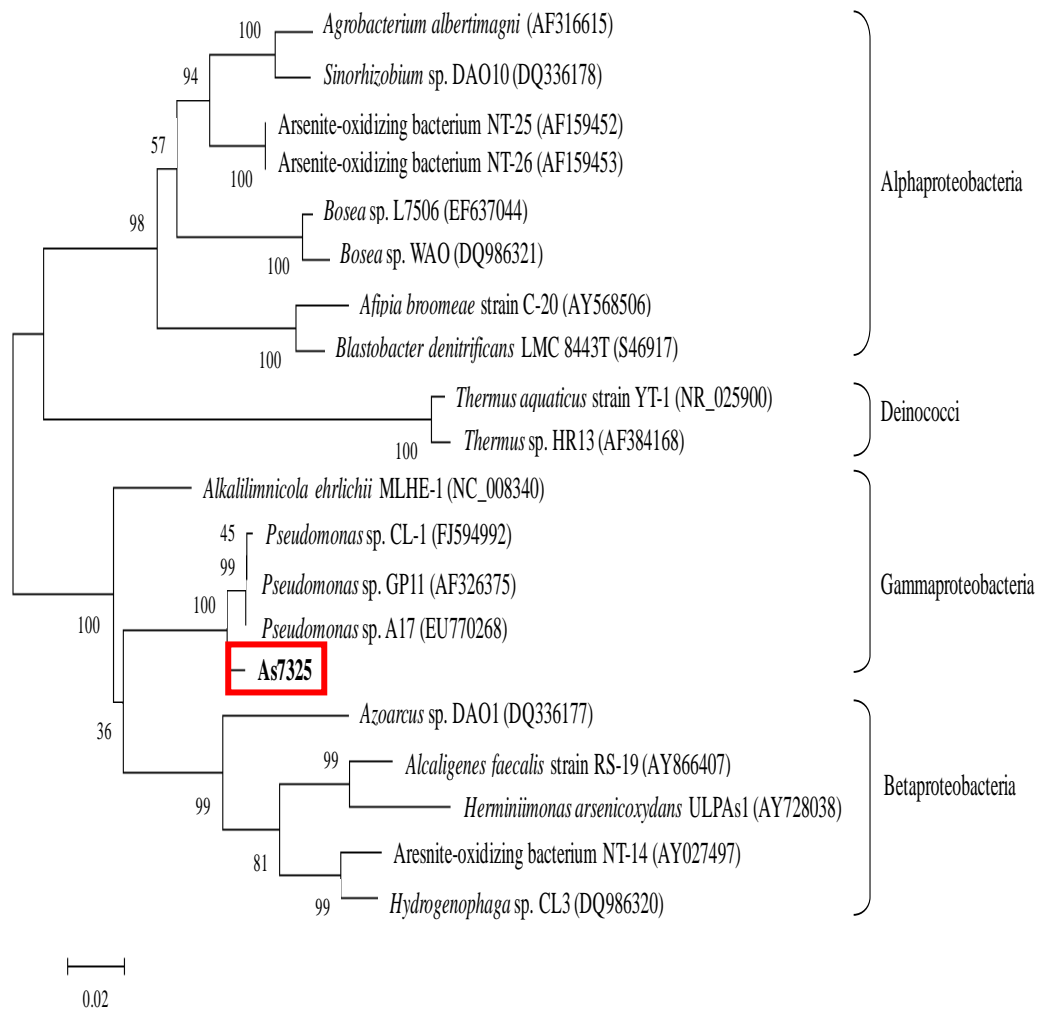




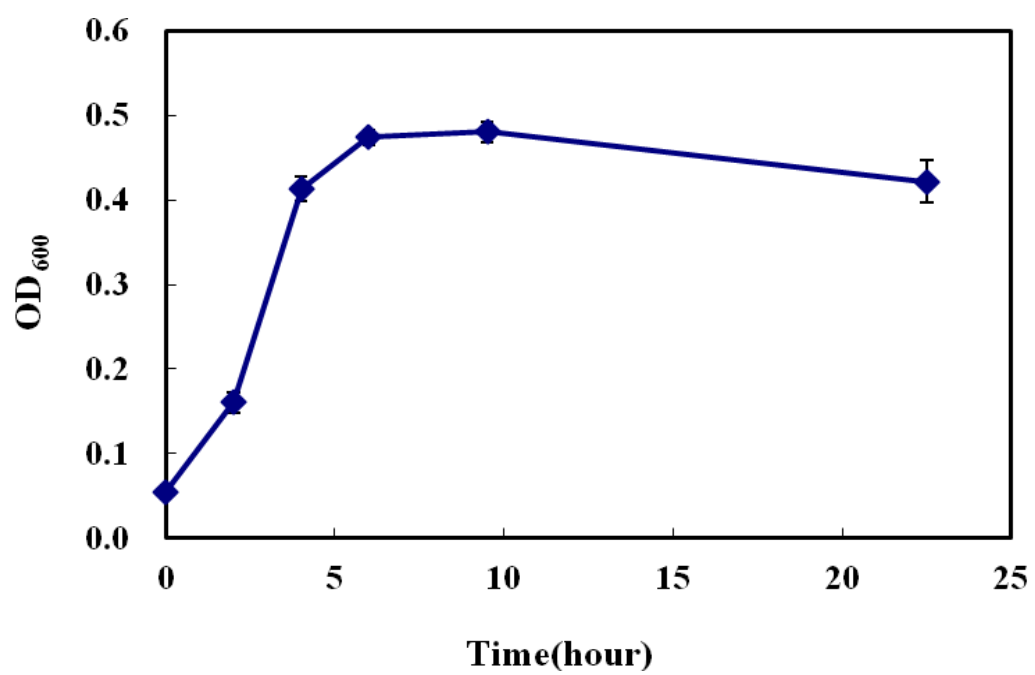
圖二、分離菌株 **As7325** 革蘭氏染色



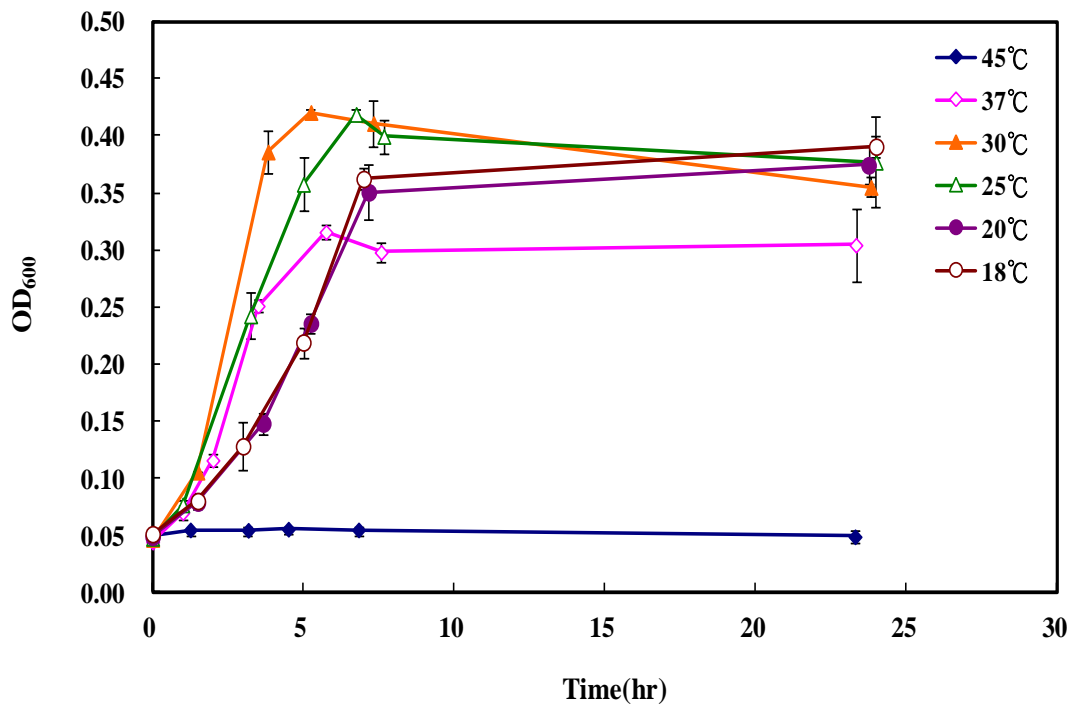
圖三、分離菌株 As7325 三價砷氧化能力試驗



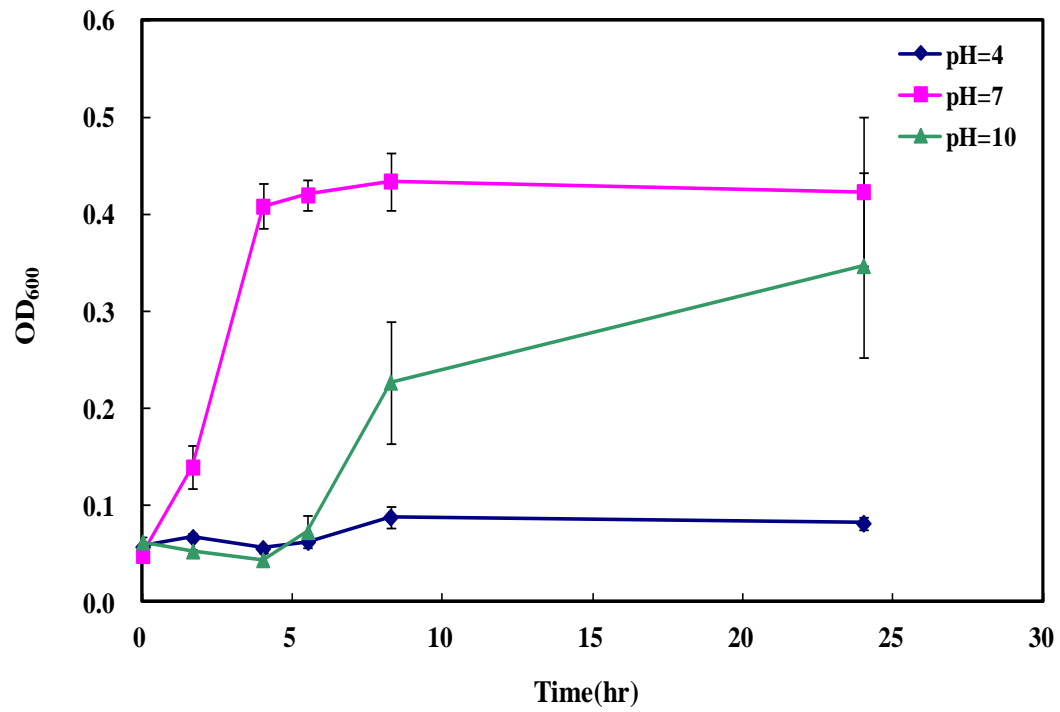
圖四、分離菌株 **As7325** 之演化分類



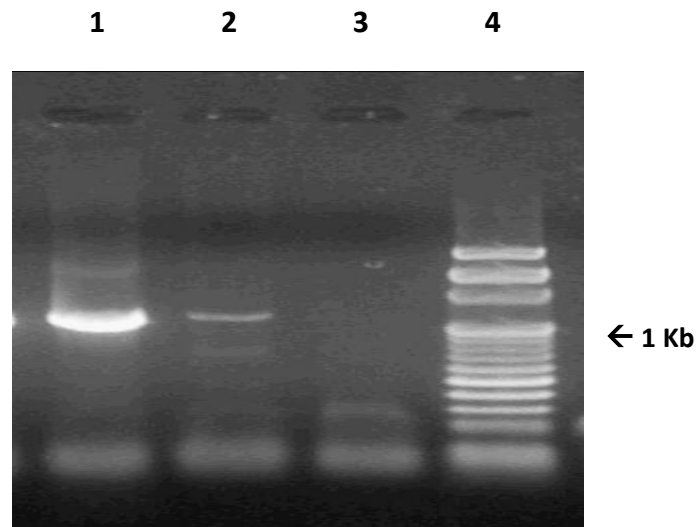
圖五、分離菌株 As7325 生長曲線試驗



圖六、分離菌株 As7325 生長溫度容忍試驗



圖七、分離菌株 As7325 生長 pH 值容忍試驗



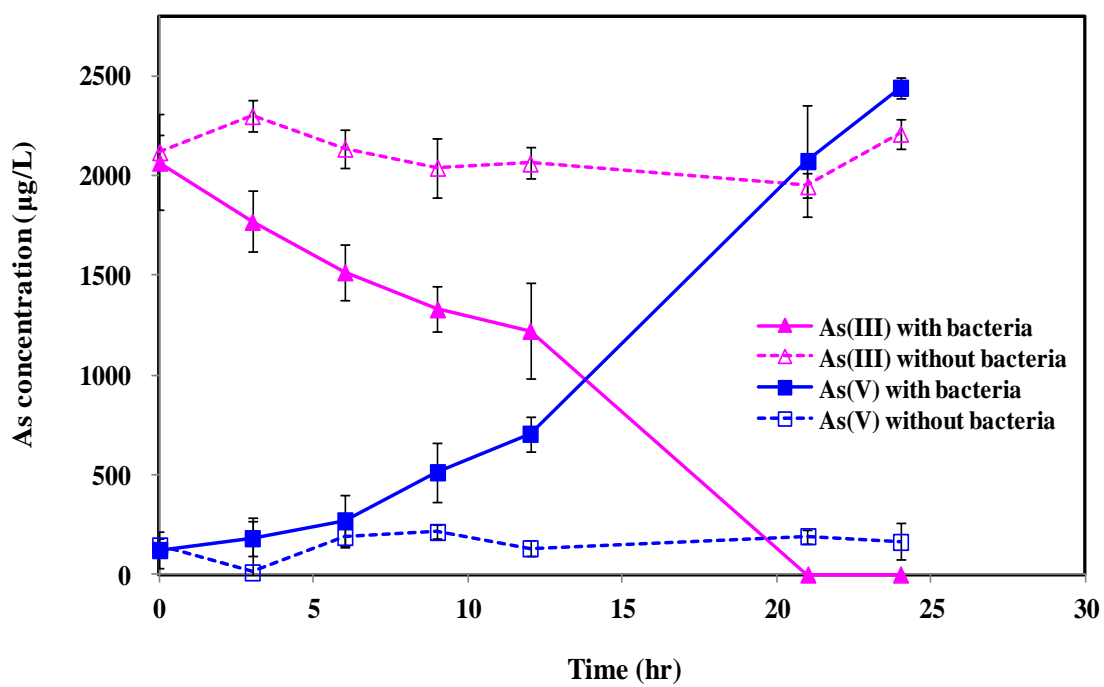
圖八、三價砷氧化基因 $aoxB$ 之基因放大片段

第1行: 本研究之砷氧化菌As7325。

第2行: L7506，正控制。

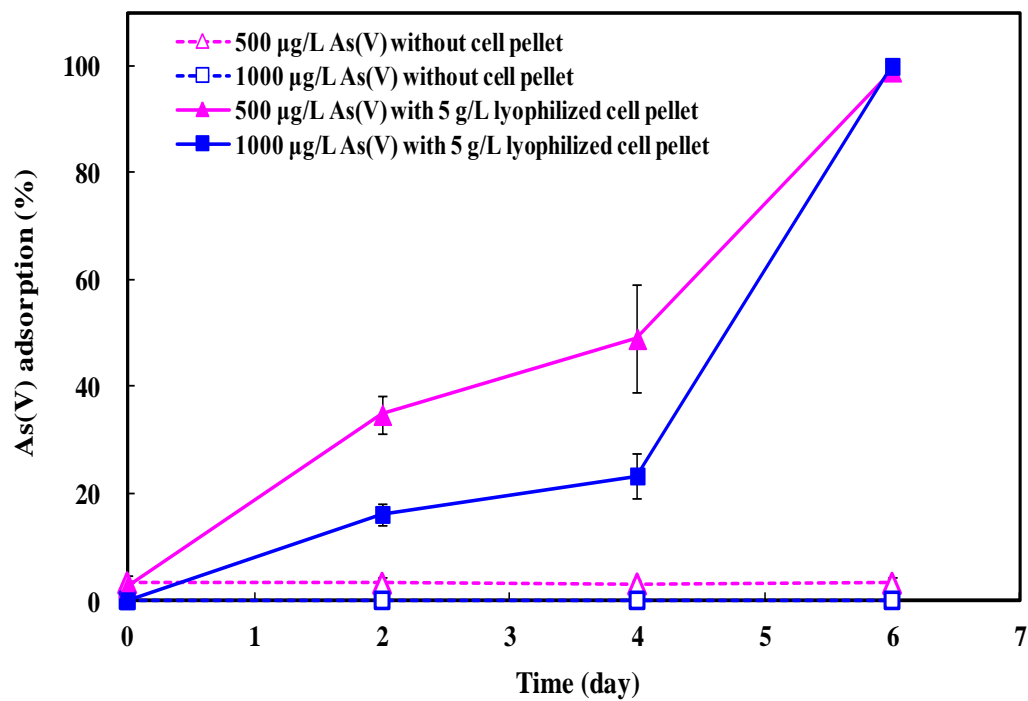
第3行: 負控制。

第4行: 100bp大小之DNA marker

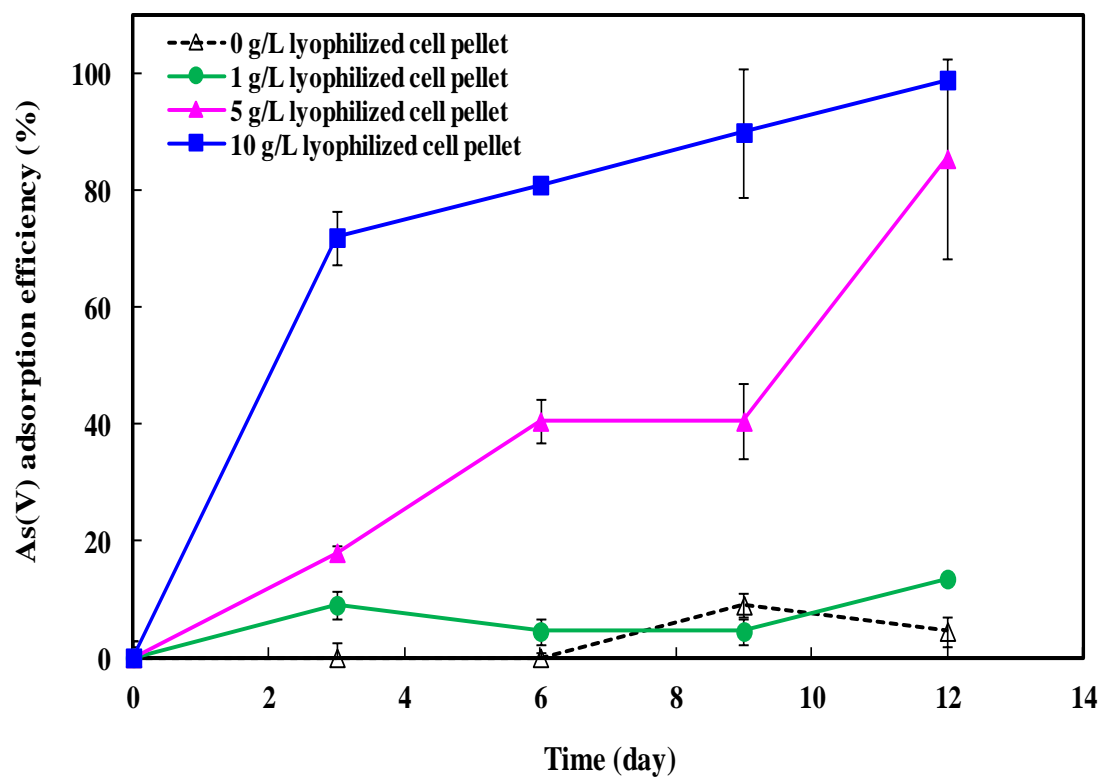


圖九、分離菌株 As7325 模擬現地之三價砷氧化能力試驗





圖十、分離菌株 As7325 吸附不同濃度五價砷之試驗



圖十一、不同生物質量分離菌株 As7325 對五價砷之吸附效率

表一、人造地下水組成

Media	Component (g/L)	
Artificial groundwater (AGW)	MgCl <sub>2</sub>	0.4
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.0014
	NaHCO <sub>3</sub>	0.0428
	MgSO <sub>4</sub>	0.018
	NaNO <sub>3</sub>	0.0008
	CaCO <sub>3</sub>	0.55
	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.01
	ZnCl <sub>2</sub>	0.13
	NiCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.024
	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.1
	K <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.012
	CaCl <sub>2</sub> · xH <sub>2</sub> O	0.1
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.025
	FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.11
	MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0.5
	EDTA	1.5
	<u>vitamin mix</u>	
	D-Biotin	0.02
	Choline Chloride	0.3
	Folic Acid	0.1
	myo-Inositol	3.5
	Niacinamide	0.1
	<i>p</i> -Amino Benzoic Acid	0.1
	D-Pantothenic Acid · 1/2Ca	0.025
	Pyridoxine · HCl	0.1
	Riboflavin	0.02
	Thiamine · HCl	0.1
	Vitamine B-12	0.0005

表二、PCR 反應試劑濃度與條件

項目	總體積 50 $\mu$ L	最終濃度
10 $\times$ PCR Buffer (5X)	5 $\mu$ L	1X
10 mM dNTPs (dATP、dTTP、dCTP、dGTP)	1 $\mu$ L	1 mM
10 $\mu$ M primer1	2.5 $\mu$ L	0.5 $\mu$ M
10 $\mu$ M primer2	2.5 $\mu$ L	0.5 $\mu$ M
Template DNA (pI258)	5 $\mu$ L	--
Taq enzyme (5U/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L	2.5 units
ddH <sub>2</sub> O	33.5 $\mu$ L	--

溫度	時間	附註
94°C	5 min	第一回合
94°C (Denature temp.)	1 min	每一回合
55°C (Annealing temp.)	1 min	每一回合
72°C (Elongation temp.)	1.5 min	每一回合
72°C	15 min	最後回合

表三、地下水水質資料

水溫 (°C)	pH 值	溶氧量 (mg/L)	導電度 (μmho/cm)	總溶解固體量 (mg/L)	氯鹽 (mg/L)	硫酸鹽 (mg/L)
26.7	7.7	1.4	2583.3	1173.0	430.3	186.3
氨氮 (mg/L)	硝酸鹽氮 (mg/L)	亞硝酸鹽 氮(mg/L)	TOC (mg/L)	鎘 (μg/L)	砷 (μg/L)	鐵 (mg/L)
6.7	0.9	0.1	6.7	ND	213.8	0.7
鉀 (mg/L)	鎂 (mg/L)	鈣 (mg/L)	鈉 (mg/L)	化學需氧量 (mg/L)	硬度 (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	鹼度 (mg/L as CaCO <sub>3</sub> )
38.0	89.0	87.7	311.0	8.4	585.3	582.7

表四、分離菌株 As7325 碳源利用試驗

Carbon source <sup>a</sup>	Growth <sup>b</sup>
NaHCO <sub>3</sub>	-
NaHCO <sub>3</sub> + As(III)	-
acetate	+++
acetate + As(III)	+
lactate	+
lactate + As(III)	+
succinate	++
succinate + As(III)	+

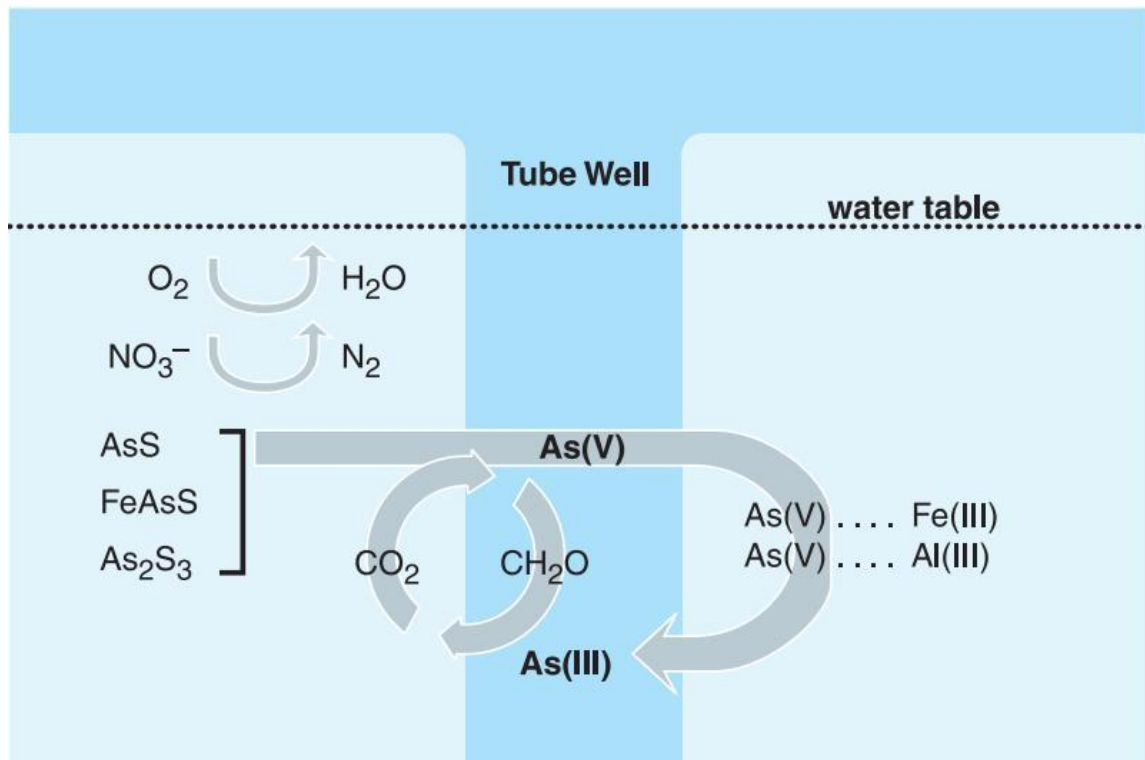
<sup>a</sup> Carbon source concentration: 10mM. Incubated under aerobic condition.

<sup>b</sup> OD<sub>600</sub> < 0.05, no growth was observed (-); OD<sub>600</sub> = 0.05-0.149 (+),  
OD<sub>600</sub> = 0.15-0.299 (++), OD<sub>600</sub> > 0.3 (+++)

## 附 錄

## 附錄一：砷於環境中受微生物影響之轉換

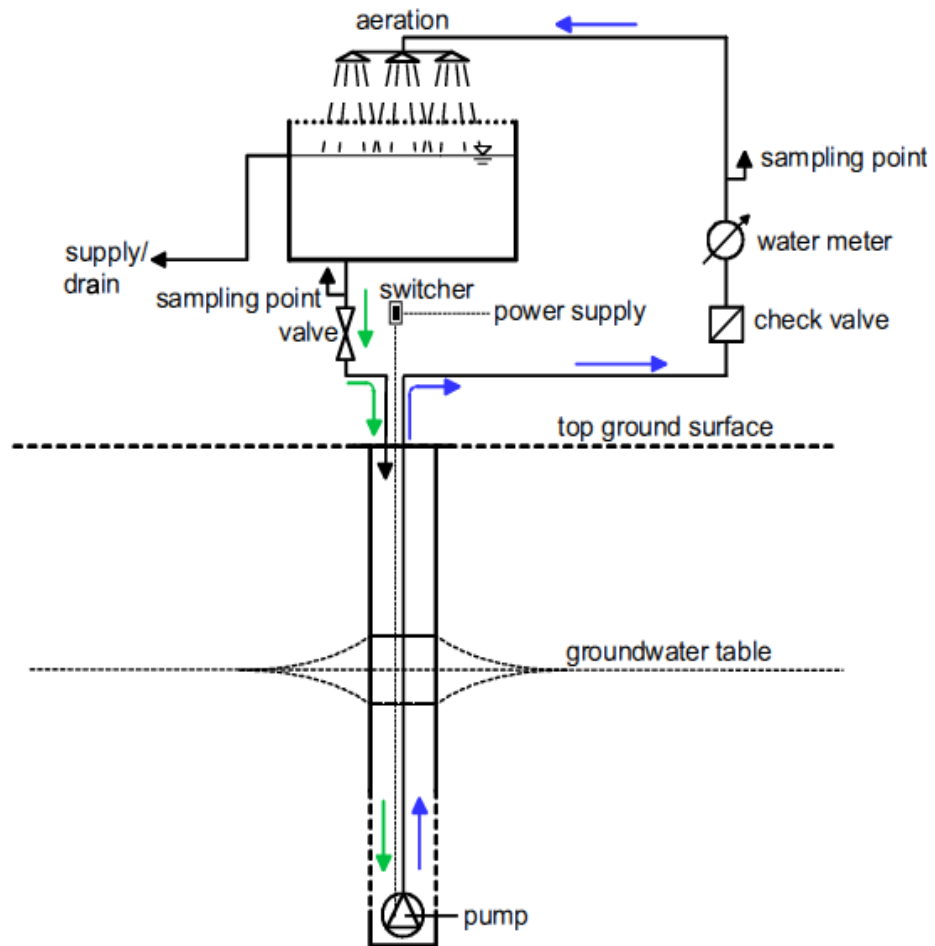
(資料來源:Oremland and Stolz, 2003)





## 附錄二：地下水層輸氧裝置示意圖

(資料來源：Sen Gupta et al., 2009)



附錄三：研究進度及預期完成之工作項目(甘特圖)

年月 工作項目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
資料蒐集	※	※	※	※	※	※	※	※	※	※	※	
地下水砷濃度測定		※	※									
砷氧化菌之分離與鑑定			※	※	※							
菌種對砷之轉化情形				※	※	※						
菌株生物吸附之能力評估						※	※	※	※	※		
菌量與砷濃度之生物吸附 效率最適條件探討								※	※	※	※	※
資料統整、分析				※	※	※				※	※	※
報告撰寫					※	※					※	※
工作進度估計百分比 (累積數)	5%	10%	25%	35%	45%	50%	55%	65%	70%	80%	90%	100%
預定查核點	期 中 :		1. 選定含砷污染之地下水樣 2. 鑑定分離現地具三價砷氧化能力之菌種。 3. 菌株之特性分析：									
	期 末 :		(1) pH 值容許範圍 (2) 溫度容許範圍 (3) 生長曲線 (4) 碳源之利用情形 (5) 對砷之最低抑制濃度 4. 以現地水樣與環境特性模擬菌種對砷之轉化情形。 5. 菌株生物吸附之能力評估。 6. 模擬不同菌量與不同砷濃度之生物吸附效率，求出最佳之作用條件。									

附件表一：地下水水質資料

水溫 (°C)	pH 值	溶氧量 (mg/L)	導電度 (μmho/cm)	總溶解固體量 (mg/L)	氯鹽 (mg/L)	硫酸鹽 (mg/L)
26.7	7.7	1.4	2583.3	1173.0	430.3	186.3
氨氮 (mg/L)	硝酸鹽 氮(mg/L)	亞硝酸鹽 氮(mg/L)	TOC (mg/L)	鎘 (μg/L)	砷 (μg/L)	鐵 (mg/L)
6.7	0.9	0.1	6.7	ND	213.8	0.7
鉀 (mg/L)	鎂 (mg/L)	鈣 (mg/L)	鈉 (mg/L)	化學需氧量 (mg/L)	硬度 (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	鹼度 (mg/L as CaCO <sub>3</sub> )
38.0	89.0	87.7	311.0	8.4	585.3	582.7