




行政院環境保護署

110 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

以穩定同位素探針與次世代定序技術 解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性 期末報告(定稿)

主辦單位： 行政院環境保護署
專案執行單位：國立臺灣大學／生物環境系統工程學系
專案主持人：蕭友晉 助理教授
專案執行期間：110 年 03 月 19 日起至
111 年 02 月 28 日止

中華民國 111 年 03 月 印製



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性



附件一 期末報告審查意見回覆表



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

行政院環境保護署 土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案

☐申請計畫書 ☐期中報告 審查意見回覆對照表
☐修正計畫書 ☒期末報告

計畫年度	110 年度	計畫類型	<input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型
計畫類別	<input type="checkbox"/> 調查 <input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 其他		主持人：蕭友晉 助理教授
計畫名稱	以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性		
委員審查意見		計畫單位回覆	
委員一 1. 本計畫期末報告摘要宜重新撰寫，其中內容似為申請者及期中報告階段，並未針對執行成果予以說明。 2. 本計畫未針對土壤或底泥之樣品，進行相關污染成份及性質分析，請補充說明原因，另依據粒徑大小如何能模擬二氯苯污染場址之整治情境？ 3. 請補充說明二氯苯之降解效率為何？抑或說明殘留之二氯苯濃度，以及降解反應之可能中間產物為何？ 4. 5.5 節所探討之微生物族群與環境因子之關聯性，然內容所述之氯離子，培養時間，氮/磷營養鹽，重金屬離子，供氧條件等，並未具體說明條件範圍，未來如何能作為技術應用之參考。		感謝委員寶貴意見。 1. 已依照委員建議重新修改期末報告摘要。 2. 由於本計畫設定之模擬情境為中壢某一污染整治場址，由於該場域已經過超過三年的化學氧化法整治，並接近整治完成。本研究針對現場之底泥樣品進行二氯苯檢測，幾乎已呈現未檢出。因此本研究模擬之二氯苯濃度乃採用該場址初始被環保署列為公告污染場址時，現場場域之二氯苯濃度作為實驗參考依據。另由於污染物透過土壤微生物分解，其主要分解效率關鍵為微生物之生物可及性，此又與土壤孔隙大小與污染物擴散速率有關，是故本研究以現場所採集到之底泥粒徑大小，與環保署當時公告該場域為污染場址之相關土壤粒徑資料作為參考。 3. 二氯苯降解效率部分已依照委員建議補充於期末報告書中。由於本研究團隊使用之檢測設備為 GC-FID，並無質譜儀功能，因此在產物的檢測僅有使用二氯苯標準樣品進行檢測峰的出峰時間進行比對。因為無確定可能之中間產物與並無其中間產物之標準樣品，因此無法針對檢測之原始資料進行檢測峰的律	



附件一 期末報告審查意見回覆表

	<p>定。</p> <p>4. 本研究受限於經費，因此第一階段僅針對未來若進行穩定同位素探針實驗，可能需要添加之同位素碳源種類進行探討，並無探討本技術未來可應用的方法。</p> <p>更具體來說，本階段研究結果，僅只於釐清若未來欲使用 DNA-SIP 技術作為二氯苯污染物的生物降解分析，需要使用何種 ^{13}C 進行活性微生物標記。</p> <p>然而在進行 DNA-SIP 之後所得到之活性微生物，仍須將其進行基因體定序、微生物代謝途徑釐清，亦或是進行菌種純化篩選後，解析其生態區位特性。之後才能針對這類高效率的活性降解微生物物種，提出實場整治的具體作法。</p> <p>目前本研究階段，因為主軸為探討 SIP 實驗需要的同位素碳源，因此營養鹽添加量的部分皆採用過量添加的方式，使這類營養鹽不會成為培養實驗之限制條件進行。</p>
<p>委員二</p> <p>1. 本研究計畫主要為引進 DNA-SIP 技術於土壤污染整治領域以了解降解污染物之相關功能微生物類群。期末報告撰述內容尚可，成果待加強。</p> <p>2. 實驗流程圖應修正與本年度之研究內容相符。</p> <p>3. 應補充北部污染土壤與各大土壤之基本理化特性並說明厭氧降解之土壤培養條件(溫度、濕度、pH...)。</p> <p>4. 以一年時間探討標的微生物之碳、氮源需求，內容有待充實。</p>	<p>感謝委員寶貴意見。</p> <p>1. 本研究由於經費因素，因此第一階段僅針對未來若進行穩定同位素探針實驗，可能需要添加之同位素碳源種類進行探討，並無探討本技術未來可應用的方法。</p> <p>2. 已依據委員建議，修改研究之實驗流程圖。</p> <p>3. 已依據委員建議，增加相關基本理化特性與研究的培養條件。</p> <p>4. 感謝委員建議，未來研究可利用本階段成果，使用同位素進行物種標記，並釐清環境中高效率的二氯苯降解微生物，屆時將能有更充實的成果。</p>
<p>委員三</p> <p>1. 本研究受限經費與資源，僅能執行前期試驗，並無法提供足夠之重複分析，實屬可惜。</p>	<p>感謝委員寶貴意見。</p> <p>1. 感謝委員寶貴意見。由於同位素二氯苯價格非常高昂，未來本團隊將繼續爭取</p>



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

- | | |
|---|--|
| <ol style="list-style-type: none"> 2. 摘要未說明研究成果，請補充。 3. 請補充說明實驗之 QAQC，若有重複試驗，請在結果顯示並進行相關科學統計。 4. 圖十一，顯示 D 組別微生物呼吸作用甲烷與二氧化碳產生量變異不大，請說明可能之原因。 5. 圖十二，D 組在 63 天才具有顯著濃度下降，是否為實驗誤差所造成，請說明。 6. 是否有量測樣品 ^{12}C 二氯苯濃度時間序列變化？ | <ol style="list-style-type: none"> 經費，期望有朝一日能將 DNA-SIP 技術利用於土壤污染整治領域。 2. 已依照委員建議重新修改期末報告摘要。 3. 由於本研究培養實驗僅有真重複一重複。其它土壤物化因子檢測如期末報告初稿所述，採用 one-way ANOVA 進行。已將統計檢定顯著之 p value 補充於報告書中。 4. 感謝委員寶貴意見。推測可能原因在於添加氮磷營養鹽之後，土壤脫氮相關之微生物活性增加，抑制產甲烷菌的活性，使甲烷排放量下降。而因為 D 組外來碳源僅有二氯苯，因此對於其它無法降解該污染物之微生物並無促進作用，是故二氧化碳的增加量亦較其它有添加碳源的組別為低。相關說明已補充於期末報告中。 5. 由於原始數據濃度變化較小，因此為求能較明顯看出組別間差異，故以熱影像圖的方式呈現。若以圖十二的圖例而言，D 組的二氯苯在培養 63 天後的削減率僅有 5% 左右。另一個可能是因為後期兩次採樣時間分別為培養後第 42 與第 63 天，間格時間較久，因此微生物可能反應速率為非線性，在後期才有比較明顯生長。另外亦可能如同委員認為，來自於實驗誤差，雖然在進行實驗過程有盡量將土樣混合均勻，不過此差異仍然有可能來自於土樣均勻度導致。相關敘述已經補充於結案報告中。 6. 由於原始數據濃度變化較小，因此為求能較明顯看出組別間差異，故以熱影像 |
|---|--|



附件一 期末報告審查意見回覆表

	圖的方式呈現。已經依委員意見，增加氣苯的濃度變化資料於報告書中。
<p>委員四</p> <p>1. 執行進度符合計畫需求。</p> <p>2. 110 年度專案成果績效自評表「二、成果績效自評」，投稿篇數期末達成數為 0，請於備註說明未達成原因；「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」，除國內外投稿及培育碩士人才外，建議加強說明本案新穎技術之應用價值。</p> <p>3. 摘要第 2 段倒數第 2 行「是故本計畫“期中報告”現階段主要實驗室模擬情境優先以探討厭氧分解可行性為主」，本次為期末報告，內容已增加好氧培養實驗，建議調整相關說明。</p> <p>4. P. 23 最後一段第一行文字「微生物整治的標準”最頁”流程」，誤繕請修正。</p> <p>5. P. 39 圖十六及 P. 40 圖十七標題「…(c)培養 14 天後；(d) 培養 42 天後；培養 63 天後」，”(e)” 缺漏字，請補充修正。</p>	<p>感謝委員寶貴意見。</p> <p>1. 感謝委員寶貴意見。</p> <p>2. 本研究由於為微生物培養實驗，因此計畫書初期規劃時，投稿的相關進度乃輝化於環保署所要求期程，於計畫完成後半年內進行投稿。目前相關文稿已經撰寫中，尚符合計畫書預期進度。</p> <p>3. 已依照委員建議重新修改期末報告摘要。</p> <p>4. 感謝委員寶貴意見，已修改誤繕。</p> <p>5. 感謝委員寶貴意見，已補充缺漏字。</p>



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

附註：穩定同位素 ^{13}C 二氯苯，每 0.01g 價格 35000 元、 ^{13}C 二氧化碳與 ^{13}C 甲烷每 1L 價格分別為 12000 與 15000 元。(如附件報價單)

以設定的污染場域二氯苯污染濃度 4000–5000 ppm 為估算，其所需三重複實驗成本，僅同位素 ^{13}C 二氯苯，價格超過 26 萬元。(僅單一藥品之成本，不含其他對照組實驗、DNA 萃取、離心分層、純化、各分層即時螢光定量與各分層定序)。

1,4二氯苯- C^{13}

友和價格:10 mg =35,000 NTD

污染濃度(ppm)	1,4二氯苯- C^{13} (mg)	土壤重(g)	預估費用	三重複
5,000	25	5	87,500	262,500
3,000	15	5	52,500	157,500
2,500	12.5	5	43,750	134,250
1,000	5	5	17,500	52,500

假設5,000 ppm 污染濃度，取25 mg (1,4二氯苯- C^{13})與5g 土壤混合，可達設定濃度。



附件二 期中報告審查意見回覆表



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☐申請計畫書 ☒期中報告☐修正計畫書 ☐期末報告 審查意見回復對照表

計畫年度	110 年度	計畫類型	<input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型
計畫類別	<input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 調查 <input type="checkbox"/> 其它	主持人：蕭友晉 NO：B6	
計畫名稱	以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性		
委員審查意見		計畫單位回覆	
委員一 5. 本計畫期中報告有關結果討論部分僅4頁，無從判斷本計畫是否符合原預期進度？ 6. 有關進度落後之原因為何？建議不宜以經費是否進入貴校與否，作為落後無法達成預期進度之理由(p.47)。 7. 請補充說明已採樣之土壤樣品相關污染物質或成分分析結果？(目前僅完成粒徑分析)。 8. 本計畫對於二氯苯係添加 5000ppm 於試驗土壤中，其添加與驗證二氯苯之降解機制為何？ 9. 本計畫未來成果如何應用於實場之現地處理？微生物族群之優勢生長，受到環境因子之影響甚鉅，未來篩選出微生物族群結構，如何應用，亦請於期末報告中說明。		1. 感謝委員寶貴意見，期末報告已確實完成計畫目標，並完整呈現其研究結果數據，由於微生物培養實驗在期中報告階段主要為培養階段，因此分子生物分析等相關數據較少，因此結果討論部分較簡略，深感抱歉。 2. 非常感謝委員寶貴建議，相關討論以於期末報告刪除，未來執行計畫亦會注意相關理由解釋。 3. 由於試驗場址已經過長年的化學整治，因此本研究參考的二氯苯濃度乃採用環保署原始污染場址公告的初始濃度作為實驗設計的參考，而無採用本實驗所採集之樣品。僅使用現地採集的粒徑大小來模擬未來可能針對二氯苯污染場址整治的情境。 4. 本研究透過包含培養瓶中的微生物呼吸狀況(二氧化碳與甲烷濃度變化量)、土壤中氯離子濃度的變化量以及土壤中二氯苯濃度的變化量作為驗證二氯苯降解的機制是否在培養時間中發生的依據。相關資料已呈現於期末報告初稿中，懇請委員指教。 5. 本研究最終結果發現氮磷的營養鹽在厭氧培養過程中會影響二氯苯的降解，然而無機碳源的部分並無影響。因本研究計畫主要目的在於探討未來若要透過穩定同位素探針技術進行二氯苯降解之活性微生物 DNA 標記時所應該添	



附件二 期中報告審查意見回覆表

	<p>加之同位素碳源為何。經由本年度計畫結果可知，未來若要透過 DNA-SIP 探討活性微生物，最直接手段為加入同位素二氯苯以及氮磷營養鹽，其成功標記的機會最大。而探討環境因子如何在實場進行現地處理，仍需要在確認過實際可能的活性微生物後，再針對其微生物的生長特性進行研析。對於本年度所探討的環境因子與微生物的相關討論已於期末報告中進行討論，並透過多種統計分析確保討論與觀察相符。</p>
<p>委員二</p> <p>5. 本研究計畫嘗試導入 DNA 穩定同位素探針來尋找土水環境中特定微生物的活性，利用於含氯有機污染物的生物整治技術上。期中報告的撰述內容，對於研究方法與過程以及後續工作(期末)內容撰寫詳實。期中報告成果僅有模擬實驗土壤和定量標準的製備，明顯與查核點不符，應說明執行進度落後原因。DNA-SIP 技術的開發與運用已有十餘年，國內外相關研究報告甚多，應多加蒐集。</p>	<p>1. 感謝委員建議。本研究由於是微生物降解的培養實驗，因此在期中報告階段由於相關微生物物種尚未進行定序，是故數據呈現上較為簡略，本計畫團隊深感歉意。相關實驗確實於期末完成，並於期末報告中完整呈現，還請委員不吝指教。另外對於 DNA-SIP 的技術開發部分，在難分解有機物的研究中，相對之下探討較少，本研究團隊針對可搜尋到的文獻已添加於文獻回顧或是結果討論中，進行綜合比較。對於利用 DNA-SIP 進行其他環境議題探討，由於與本研究關聯性較弱，會避免模糊本研究焦點，因此較無著墨。</p>
<p>委員三</p> <p>7. 本計畫是採穩定同位素探針與次世代定序技術應用於難分解含氯有機物、多環芳香族碳氫化合物的生物整治上。</p> <p>8. 計畫執行進度與預期進度不符，落後之進度盡快補上。宜調整工作項目順序，而非等待。</p> <p>9. 台大會計系統動支日 6 月 23 日，相信其他計畫也是類似狀況。這個理由應該不是重點。</p> <p>10. 誤繕。P27，圖六、第一階段實驗流程圖。應該是“二”才對。</p>	<p>2. 感謝委員建議。本研究由於是微生物降解的培養實驗，因此在期中報告階段由於相關微生物物種尚未進行定序，是故數據呈現上較為簡略，本計畫團隊深感歉意。相關實驗確實於期末完成，並於期末報告中完整呈現，還請委員不吝指教。</p> <p>3. 感謝委員指教，相關討論已於期末報告移除。</p> <p>4. 感謝委員指教。由於後續研究在其他委員建議下增加好氧培養實驗，因此實驗流程有進行全面性的調整，已取得更完整且嚴謹的成果。相關流程圖已全面更新。</p>



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氮有機物之微生物族群結構與活性

<p>委員四</p> <p>6. 計畫運用 DNA-SIP 技術於土壤污染整治上，目前仍屬預試驗階段，計畫執行的進展，仍須掌握。</p>	<p>1. 感謝委員建議。本研究由於是微生物降解的培養實驗，因此在期中報告階段由於相關微生物物種尚未進行定序，是故數據呈現上較為簡略，本計畫團隊深感歉意。相關實驗確實於期末完成，並於期末報告中完整呈現，還請委員不吝指教。</p>
<p>委員五</p> <p>1. 請依 110 年度專案成果績效自評表格式，補充說明產業面、政策面之預期成果。</p> <p>2. P.24 最後一段第一行文字「微生物整治的標準」最頁「流程」，誤繕請修正。</p> <p>3. P.26 圖五及 P.27 圖六標題皆為第一階段實驗流程圖，與 P.25 文字說明不符，請調整修正。</p> <p>4. P.51 連續培養實驗樣品配至第五行「初期、中期、末期」，表三實驗日程分為「初始期、中期、後期」，P.57 第五段培養過程「初期、中期、後期」，各階段描述建議統一修正。</p>	<p>1. 感謝委員指教。關於產業面與政策面預期之成果，本計畫於計畫構想書提出時，針對這兩部分並無具體的預期成果，相關表格已填寫 0 來避免誤會。</p> <p>2. 感謝委員指教。誤繕已進行修正。</p> <p>3. 感謝委員指教。由於後續研究在其他委員建議下增加好氧培養實驗，因此實驗流程有進行全面性的調整，已取得更完整且嚴謹的成果。相關流程圖已全面更新。</p> <p>4. 本研究於期末報告已確認確實的初期、中期、與末期的採樣頻率，因此相關的採樣過程已統一修改成培養後多少日代替，以免「初期、中期、與末期」這類的文字描述不夠確實。對於期中報告階段描述不夠嚴謹，本研究團隊深感歉意。</p>



附件三 修正計畫書審查意見回覆表



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

行政院環境保護署
土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案

☐申請計畫書 ☐期中報告
☒修正計畫書 ☐期末報告 審查意見回覆對照表

計畫年度	110 年度	計畫類型	<input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型
計畫類別	<input type="checkbox"/> 調查 <input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 其他		主持人：蕭友晉 助理教授
計畫名稱	以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性		
委員審查意見		計畫單位回覆	
委員一 就方法技術，以前土基會無類似研究，值得發展。		感謝委員指導與肯定。 由於受限於有限的計畫經費，不足以購置相關同位素的藥劑（如附註），與超高速離心所使用之垂直離心管耗材，更無以負擔離心分層之後 <u>每個樣品 15 層</u> 的純化與定序經費。因此本計畫實驗項目進行調整修正，並預計在第一年先進行 DNA-SIP 的前期培養實驗。 待了解其代謝主要之微生物所需碳源後，預計於第二年再行提出穩定同位素探針的主實驗計畫，如此應可在有限的經費下完成穩定同位素探針實驗。	
委員二 具發展性。		感謝委員指導與肯定。 由於受限於有限的計畫經費，不足以購置相關同位素的藥劑（如附註），與超高速離心所使用之垂直離心管耗材，更無以負擔離心分層之後 <u>每個樣品 15 層</u> 的純化與定序經費。因此本計畫實驗項目進行調整修正，並預計在第一年先進行 DNA-SIP 的前置培養實驗。 待了解其代謝主要之微生物所需碳源後，預計於第二年再行提出穩定同位素探針的主實驗計畫，如此應可在有限的經費下完成穩定同位素探針實驗。	



附件三 修正計畫書審查意見回覆表

<p>委員三</p> <p>一、 主持人與計畫執行團隊</p> <p>1. 主持人(協同主持人)與執行團隊的研究及技術研究發展績效良好。</p> <p>2. 主持人與執行團隊的研究能力及技術發展能力佳，足以勝任本計畫。</p> <p>二、 本專案對土水污染及整治的潛在價值與意義</p> <p>11. 本專案計畫對國內土壤及地下水污染調查或整治工作的發展具有貢獻。</p> <p>12. 本計畫書撰寫具體，對研究方法的說明完整，研究方法與試驗流程具可行性。</p> <p>13. 本計畫成果的實場應用性建議多加說明。</p> <p>14. 建議說明本計畫成果實務應用的適用情境(原計畫書中說明：“...本計畫預計將以...地區的含氯有機污染土壤為研究的來源(該場址污染濃度調查，如下：1,2-二氯苯: 4,070 (mg/Kg); 1,3-二氯苯: 326 (mg/Kg); 總石油碳氫化合物: 1,560 (mg/Kg); 1,4-二氯苯: 2.11 (mg/L); 1,2-二氯苯: 16.1 (mg/L)...”，所以，本研究的重點是氯化芳香族，但計畫書中所述的氯化芳香族均為低含氯芳香族，較適合好氧分解。因此，本研究重點是厭氧或好氧？建議能先加以評估)與應用的限制條件。(例如：濃度的影響、高含氯或低含氯的區分...等等)</p> <p>15. 建議說明本計畫成果實務應用的適用情境。</p>	<p>1.1、1.2、2.1、2.2 感謝委員指導與肯定。</p> <p>2.3、2.5 本計畫原定之實場應用性乃希望透過穩定同位素標記出污染場址中，具有強二氯苯降解活性的相關微生物，即可進一步透過菌種篩選，或是菌群的生物代謝培養實驗(Biolog 的 EcoPlates)，迅速解析出其相關微生物在污染場址的生態區位(喜好的 pH 值、NP 營養鹽、其他微量元素等環境特性)，並可於第二年進行實場的生態整治試驗。藉由生態調控的方式來有效促進活性嗜二氯苯微生物的族群生長，以期達到微生物整治的目標，加速微生物分解污染場址之二氯苯。</p> <p>2.4 感謝委員指教。之所以選定厭氧作為主要的研究方式，乃因為二氯苯污染物在污染後，易順地下水流入土壤深層。</p> <p>以本計畫設定的污染場址而言，在撰寫計畫書的時候，與負責該場域整治之顧問公司及敝校在該場址進行三維水力掃描專業的老師討論後，了解污染物目前所在的位置已在土壤超過 10m 的深層地下水層中。因考量深層土壤的孔隙環境應以厭氧為主，故研究計畫書主以厭氧分解作為實驗設計。</p> <p>然而 DNA-SIP 類型的實驗在進行主實驗之前，皆會進行數次 ^{12}C 的培養實驗，目的在於取得正式培養實驗所需之降解參數，因此實際在預試驗的過程皆會使用好氧及厭氧兩種情境進行培養實驗。</p> <p>另，一般而言，DNA-SIP 的實驗所需的 ^{13}C 濃度約需在 3000ppm 以上，較能成功標記活性功能性微生物。考量設定的污染場址二氯苯濃度為 4000-5000ppm，因此實驗擬</p>
--	---



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

	<p>採用此一濃度進行。然而受限於目前市面上並無販售 1,2-二氯苯，因此原計畫書採用 ^{13}C-1,4-二氯苯進行實驗規劃。</p> <p>然而由於最後核定之經費扣除校管理費之後，不足以購置相關同位素的藥劑（如附註），與超高速離心所使用之垂直離心管耗材，更無以負擔離心分層之後每個樣品 15 層的純化與定序經費。因此本計畫實驗項目進行調整修正，並預計在第一年先進行如同前述之 DNA-SIP 的前期培養實驗。待了解其代謝主要之微生物所需碳源後，預計於第二年再行提出穩定同位素探針的主實驗計畫。</p>
<p>委員四</p> <p>7. DNA-穩定同位素探針技術為一種環境微生物學者用來判斷環境特定活性微生物之新穎技，其應用性值得探討。</p> <p>8. 求短時間內快速鑑別出優勢且高污染降解潛能的功能微生物，同時解析其微生物的生態區位。藉由 DNASIP 所獲得的功能性微生物族群活性與生態區位等特性，將能實際應用在污染實場之驗證。</p>	<p>感謝委員指導與肯定。</p> <p>由於受限於有限的計畫經費，不足以購置相關同位素的藥劑（如附註），與超高速離心所使用之垂直離心管耗材，更無以負擔離心分層之後每個樣品 15 層的純化與定序經費。因此本計畫實驗項目進行調整修正，並預計在第一年先進行 DNA-SIP 的前期培養實驗。待了解其代謝主要之微生物所需碳源後，預計於第二年再行提出穩定同位素探針的主實驗計畫，如此應可在有限的經費下完成穩定同位素探針實驗。</p>
<p>委員五</p> <p>本研究計畫較似基礎研究，是否可於 1 年後提出具應用型之模場型計畫，有待觀察。</p>	<p>感謝委員指導與肯定。</p> <p>原先所設定的研究計畫書，若能順利透過穩定同位素標記出污染場址中，具有強二氯苯降解活性的相關微生物，即可進一步透過菌種篩選，或是菌群的生物代謝培養實驗(Biolog 的 EcoPlates)，迅速解析出其相關微生物在污染場址的生態區位(喜好的 pH 值、NP 營養鹽、其他微量元素等環境特性)，並可於第二年進行實際場域的生態整治試驗。藉由生態調控的方式來有效促進活性嗜二氯苯微生物的族群生長，以</p>



附件三 修正計畫書審查意見回覆表

	<p>期達到微生物整治的目標，加速微生物分解二氯苯的污染物。</p> <p>然而，由於受限於有限的計畫經費，不足以購置相關同位素的藥劑（如附註），與超高速離心所使用之垂直離心管耗材，更無以負擔離心分層之後每個樣品 15 層的純化與定序經費。因此本計畫實驗項目進行調整修正，並預計在第一年先進行 DNA-SIP 的前期培養實驗。</p> <p>並預計於第二年進行 DNA-SIP 之主實驗，若實驗順利將可於第三年進行全場域的生態調控試驗。</p>
<p>委員六</p> <p>此計畫有獨特性，有參考價值。</p>	<p>感謝委員指導與肯定。</p> <p>由於受限於有限的計畫經費，不足以購置相關同位素的藥劑（如附註），與超高速離心所使用之垂直離心管耗材，更無以負擔離心分層之後每個樣品 15 層的純化與定序經費。因此本計畫實驗項目進行調整修正，並預計在第一年先進行 DNA-SIP 的前期培養實驗。</p> <p>待了解其代謝主要之微生物所需碳源後，預計於第二年再行提出穩定同位素探針的主實驗計畫，如此應可在有限的經費下完成穩定同位素探針實驗。</p>
<p>委員七</p> <p>本專案對未來土壤及地下水污染整治有貢獻。</p>	<p>感謝委員指導與肯定。</p> <p>由於受限於有限的計畫經費，不足以購置相關同位素的藥劑（如附註），與超高速離心所使用之垂直離心管耗材，更無以負擔離心分層之後每個樣品 15 層的純化與定序經費。因此本計畫實驗項目進行調整修正，並預計在第一年先進行 DNA-SIP 的前期培養實驗。</p> <p>待了解其代謝主要之微生物所需碳源後，預計於第二年再行提出穩定同位素探針的主實驗計畫，如此應可在有限的經費下完成穩定同位素探針實驗。</p>



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氮有機物之微生物族群結構與活性

<p>委員八</p> <p>研究設計規劃清楚，值得期待成果。</p>	<p>感謝委員指導與肯定。</p> <p>由於受限於有限的計畫經費，不足以購置相關同位素的藥劑（如附註），與超高速離心所使用之垂直離心管耗材，更無以負擔離心分層之後<u>每個樣品 15 層</u>的純化與定序經費。因此本計畫實驗項目進行調整修正，並預計在第一年先進行 DNA-SIP 的前期培養實驗。</p> <p>待了解其代謝主要之微生物所需碳源後，預計於第二年再行提出穩定同位素探針的主實驗計畫，如此應可在有限的經費下完成穩定同位素探針實驗。</p>
<p>委員九</p> <p>1. 頁碼有誤，請再確認，建請雙面印刷。</p> <p>2. 績效自評表裝訂順序有誤。</p> <p>3. (六)行政管理費編列超過(一)~(五)總和的 10%，請修正。</p> <p>4. (一)人事費用</p> <p>(1) 考量計畫執行期程人事費建議以編列 11 個月為上限。</p> <p>(2) 考量補助計畫以培育人才為目的，建議專任人員任職以 5 個人月為限，優先聘任兼任人員。本案已編列 1 位兼任助理，建議酌減專任人員人月及增聘兼任人員。</p> <p>(3) 缺少(四)臨時工資料及總計表</p>	<p>1、2 感謝委員指教與建議，已再次確認相關頁碼與裝訂順序。</p> <p>3、4.1、4.2 已依據委員建議調整相關經費編列。</p> <p>4.3 由於經費有限，且實驗專業技術難度較高，因此本計畫暫不擬聘用臨時工協助計畫執行。</p>



附註：穩定同位素 ^{13}C 二氯苯，每 0.01g 價格 35000 元、 ^{13}C 二氧化碳與 ^{13}C 甲烷每 1L 價格分別為 12000 與 15000 元。(如附件報價單)

以設定的污染場域二氯苯污染濃度 4000–5000 ppm 為估算，其所需三重複實驗成本，僅同位素 ^{13}C 二氯苯，價格超過 26 萬元。(僅單一藥品之成本，不含其他對照組實驗、DNA 萃取、離心分層、純化、各分層即時螢光定量與各分層定序)。

1,4二氯苯- C^{13}

友和價格:10 mg =35,000 NTD

污染濃度(ppm)	1,4二氯苯- C^{13} (mg)	土壤重(g)	預估費用	三重複
5,000	25	5	87,500	262,500
3,000	15	5	52,500	157,500
2,500	12.5	5	43,750	134,250
1,000	5	5	17,500	52,500

假設5,000 ppm 污染濃度，取25 mg (1,4二氯苯- C^{13})與5g 土壤混合，可達設定濃度。



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性



附件四 構想書審查意見回覆表



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

110 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

☒構想書
 ☐申請計畫書

☐期中報告
 ☐期末報告

審查意見回復對照表

計畫年度	110 年度	計畫類型	<input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型
計畫類別	<input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 調查 <input type="checkbox"/> 其它	主持人：蕭友晉助理教授 NO：B10	
計畫名稱	以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性		
委員審查意見		計畫單位回覆	
委員一： 1.新方法與技術的引入值得期許。		謝謝委員給予肯定。	
委員二： 1.具技術先導性		謝謝委員給予肯定。	
委員三： 1.本研究是以 C1-Aromatics 或 C1-Aliphatics 為主？或是二者均是，建議說明。 2.脫鹵球菌（主要是 DHC）國內已有許多實務經驗，建議參考（厭氧）（本研究以低含氯芳香族，以好氧為主）		1. 謝謝委員建議。本研究主要以單環二氯苯環的(dichlorobenzene)污染作為主軸，故以化學結構而論，應為接近 Cl-mono-Aromatics（含氯單環芳香族結構）；另 Cl-Aliphatics 則為複雜的多環結構，暫不在此研究的範疇，惟本年度研究達到初步成果，預期應能延伸至下一階段進行。 2. 謝謝委員建議。本研究預期以模擬厭氧與好氧狀態分別進行二氯苯之土壤降解試驗，期將委員建議之脫鹵球菌(DHC, <i>dehalococcoides</i>)列為檢測指標之一；另經文獻證實亦有 <i>dehalobacter</i> 及靠近 <i>Chloroflexi</i> 親緣的微生物族群能進行脫鹵呼吸作用。	
委員四： 1.本研究型計畫，規劃有邏輯，說明很清楚，期對未來 1 年後提出模場型，其成果期對土基會污染整治調查工作有幫助。		謝謝委員給予肯定。	



附件四 構想書審查意見回覆表

委員五： 1.屬於基礎資料分析。	謝謝委員給予肯定。
委員六： 1.應用 DNA-SIP 技術結合生物處理技術，有助於進一步解析場址厭氧生物脫氯過程中汙染物分解與脫氯生物族群之關聯性。	謝謝委員給予肯定。
委員七： 1.DNA-SIP 可有效鑑定特定微生物類群，對未來精準生物整治發展有所助益。	謝謝委員給予肯定。



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性



專案基本資料表

專案性質		<input checked="" type="checkbox"/> 實驗性質 <input type="checkbox"/> 非實驗性質		專案類別(單選)		<input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型	
研究主題		<input type="checkbox"/> 調查 <input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 其他					
申請機構系所		國立臺灣大學生物環境系統工程學系					
機構地址		106 臺北市羅斯福路四段一號					
專案主持人		蕭友晉		職等／職稱		助理教授	
協同主持人				職等／職稱			
專案名稱	中文	以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性					
	英文	Using DNA Stable-Isotope Probing and Next Generation Sequencing to determine the Active Chloro-organics Degrading Microbial Structure in the Chlorinated Contaminated Soils					
	關鍵字	穩定同位素探針技術、次世代定序技術、生物降解含氯有機物					
執行期程		自民國 110 年 3 月 19 日起至民國 111 年 2 月 28 日止					
專案主持人		姓名：蕭友晉		Email：yshiau@ntu.edu.tw		專線：02-3366-3466 手機：0905103104	
專兼任人員		姓名：黃蕙瑄		Email：yhhuang2019@ntu.edu.tw		專線：02-3366-3471 手機：0926156845	
經費分析總表 (僅模場試驗專案需填寫兩年度金額)	專案預估經費			第一年金額	第二年金額	編列說明	
	1.	人事費用		411,575		(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		470,425		(與計畫主體相關)	
	4.	其它研究相關費用		0		(含差旅與租賃費用)	
	5.	雜支費用		0		(1~6 項相加之 5%為限)	
	6.	行政管理費		98,000		(1~5 項相加之 10%為限)	
	7.	自籌款		0		(自行籌備款項)	
	申請補助金額(1~6 項)			980,000		總金額：980,000	
計畫總金額(1~7 項)			980,000		總金額：980,000		

專案主持人(簽名及蓋章)：_____

日期：111.03.10





110 年度專案成果績效自評表

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

110 年度專案成果績效自評表

一、專案基本資料

填表日期：111 年 03 月 10 日

專案性質	<input checked="" type="checkbox"/> 實驗性質 <input type="checkbox"/> 非實驗性質	專案類別	<input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型
研究主題	<input checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 調查 <input type="checkbox"/> 其他		
申請機構系所	國立台灣大學生物環境系統工程學系	專案主持人	蕭友晉
專案名稱	以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性		
專案執行期程	<input type="checkbox"/> 申請階段 <input type="checkbox"/> 期中 <input checked="" type="checkbox"/> 期末		

二、成果績效自評

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

(一) 學術面

目標達成程度			申請 預估數	期中 達成數	期末 達成數	結案後半年 達成率	備註 (說明未達成 原因或學術產 出發表名稱)
項目							
A 學術 產 出 及 活 動	1.國內投稿 (篇數)	(1)論文	0	0	0	0	
		(2)研討會論文	1	0	0	1	
	2.國外投稿 (篇數)	(1)期刊論文	1	0	0	1	
		(2)研討會論文	0	0	0	0	
	3.報告 (篇數)	(1)技術報告	0	0	0	0	
		(2)研究報告	0	0	0	0	
	4.專著 (本數)		0	0	0	0	
	5.辦理學術 會議(場數)	(1)研討/說明會	0	0	0	0	
		(2)成果發表會	0	0	0	0	
		(3)論壇	0	0	0	0	
B 人 才 培 育	6.研發改良 技術(項數)	(1)已開發技術	0	0	0	0	
		(2)技術平台	0	0	0	0	
	7.研發人員 (人數)	(1)碩士	1	0	1	1	
		(2)博士	0	0	0	0	
	8.研究團隊 (個數)	(1)跨領域團隊	0	0	0	0	
		(2)跨機構團隊	0	0	0	0	
		(3)形成研究中心	0	0	0	0	



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

目標達成程度		申請 預估數	期中 達成數	期末 達成數	結案後半年 達成率	備註 (說明未達成 原因或學術產 出發表名稱)
項目						
	(4)形成實驗室	0	0	0	0	
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	結案後半年 達成率	備註 (說明未達成原因 或專利、技術轉移 相關詳細資料)
A 智慧財產權	1.專利 (件數)	已 核 准	發明	0	0	0	0	
			新型/設計	0	0	0	0	
			合計	0	0	0	0	
		申 請 中	發明	0	0	0	0	
			新型/設計	0	0	0	0	
			合計	0	0	0	0	
B 研發技術轉移	2.先期技術 成果移轉	件數		0	0	0	0	
		授權金(仟元)		0	0	0	0	
		衍生利益金(仟元)		0	0	0	0	
	3.技術移轉 (專利)	件數		0	0	0	0	
		授權金(仟元)		0	0	0	0	
		衍生利益金(仟元)		0	0	0	0	
	4.技術移轉 (應用技術)	件數		0	0	0	0	
		授權金(仟元)		0	0	0	0	
		衍生利益金(仟元)		0	0	0	0	
	5.可移轉 產業技術	(1)技術(件數)		0	0	0	0	
(2)品種/系(件數)		0	0	0	0			
C 產學研合作	6.促成合作 研究	件數		0	0	0	0	
		金額(仟元)		0	0	0	0	
	7.促成投資	件數		0	0	0	0	
		投資金額(仟元)		0	0	0	0	
	8.促成取得 業界科專	件數		0	0	0	0	
		業界投資金額(仟元)		0	0	0	0	
9.其他指標 (請自行命名)		(請自填)						



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

(三) 政策面

項目		目標達成程度	申請預估數	期中達成數	期末達成數	結案後半年達成率	備註 (說明未達成原因 或 其他詳細資料)
A 服務 便民	1.技術服務	次數	0	0	0	0	
		收入(仟元)	0	0	0	0	
	2.諮詢服務	次數	0	0	0	0	
		收入(仟元)	0	0	0	0	
B 支 援 合 作	3.協助政府制定 (件數)	(1)政策	0	0	0	0	
		(2)法規	0	0	0	0	
		(3)規範	0	0	0	0	
		(4)標準	0	0	0	0	
D 社 會 效 益	4.獲得認證(件數)		0	0	0	0	
	5.獲得獎項(件數)		0	0	0	0	
	6.提升能源效率(%)		0	0	0	0	
	7.節能減碳效率(%)		0	0	0	0	
8.其他指標 (請自行命名)		(請自填)					

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

本計畫的研究成果預計將能投稿至少一篇 SCI 國際期刊與一篇國內研討會，另計畫執行訓練至少一位碩士班學生，未來能具體學習 DNA-SIP 相關實驗技術與應用在土壤污染整相關可能。



摘要

含氯的有機物通常都具有致癌性，對於人體、土壤與地下水等生態，皆有潛在的接觸及污染風險。截至 109 年 8 月資料顯示，國內土壤及地下水受含氯有機污染物公告之列管場址為 16 處，共有 12 處整治場址、4 處控制場址，顯示目前在土壤及地下水含氯有機污染場址之管控與整治是十分重要的。現今土壤污染整治主要多以化學整治法為主，然而近年來國內政府已開始重視，國際間所提出的精準生物整治 (precision bioremediation)，應用於土壤及地下水污染。DNA-穩定同位素探針(DNA Stable Isotope Probing; DNA-SIP)技術為一種環境微生物學者用來判斷環境特定活性微生物之新穎技術。其透過微生物代謝同位素有機物過程將同位素標記於生物體 DNA 中，以在複雜的環境中迅速分離具有特定功能性的活性微生物族群。DNA-SIP 的技術應用於難分解有機物(含氯有機物、多環芳香族碳氫化合物)的生物整治上，在近兩年出現了許多的研究案例。以 DNA-SIP 技術結合現地(in situ)的生物整治技術，將能快速提供活性功能性微生物的族群結構資訊與污染物代謝的直接證據。

有鑒於此，本計畫期望能將環境微生物領域中所使用的 DNA-SIP 技術引入土壤污染整治，藉由透過 DNA-SIP 搭配次世代定序的技術整合，期望能更快速的探究土壤中難分解有機物污染物降解之相關功能微生物類群。在本階段的計畫，以桃園地區某含氯有機污染土壤為模擬的對象，評估結合 DNA-SIP 於其場址主要之污染物—1,2-二氯苯的精準生物整治可行性。受限於經費所致，本階段研究乃針對 DNA-SIP 時驗所需添加之同位素碳源進行前期培養實驗。並以透過實驗室模擬厭氧情境，評估降解二氯苯之可能微生物所需要之碳源種類以及是否需要其他營養鹽。研究使用六種不同的營養鹽集碳源的配置，包含僅添加二氯苯、添加二氯苯與二氧化碳、添加二氯苯與甲烷、前述三種組合分別加上氮磷營養鹽、以及對照組一組。另外好氧培養實驗則以添加二氯苯及氮磷營養鹽一組進行實驗。

研究結果顯示，在厭氧環境條件下，環境中可能存在許多具有降解二氯苯活性但目前尚未被培養成功之厭氧微生物占了約 80%的相對豐富度。而在已知具降解活性之厭氧微生物則主要以脫氮菌族群，如：*Pseudomonas*、*Nocardioides* 以及 *Anaeromyxobacter* 等為主，此外另有部分產甲烷菌可能具有降解二氯苯之潛力。對於脫氮菌族群可能利用二氯苯作為其生長所需碳源，因此未來若要透過 DNA-SIP 技術標記降解二氯苯之活性微生物，則須優先考慮同位素 ^{13}C 之二氯苯進行標記，另外亦可考慮使用同位素二氧化碳，然而其成功率可能較低。



Abstract

Chloro-organics are usually carcinogenic and have high toxic risks to human body, soil, groundwater, and ecology system. As of August 2020, the Taiwanese government has subjected 16 places as chloro-organics contaminated sites, among which 12 sites are announced as remediation sites and four sites as control sites. Thus, the management and remediation of contaminated sites are critical. The concept of precision bioremediation of soil and groundwater pollution have been widely proposed around the globe. DNA-Stable Isotope Probing (DNA-SIP) technology has been used to identify the active functional microbial communities of desired in various studies. This technique has also been introduced to identify and evaluate the microbes that can decompose recalcitrant organics such as chlorinated organics and polycyclic aromatic hydrocarbons. With using DNA-SIP and next-generation sequencing (NGS), scientists will get comprehensive and detailed information on the activities and compositions of microorganisms having abilities in degrading the chloro-organics.

Thus, the ultimately goal of this study is to determine whether DNA-SIP and NGS technologies can be utilized for future biological remediation projects. This project will simulate the conditions of a chloro-organics contaminated site in Taoyuan in laboratory. The site is mainly contaminated by 1,2-dichlorobenzene (1,2-DCB) with concentration of 4,070 mg/Kg. Because of the limited funding, in this current research project, we identified the carbon sources for the microorganisms that are responsible to the 1,2-DCB decomposition through a series of laboratory incubation experiments. The results showed that more than 80% of the microbial communities may be able to decompose the 1,2-DCB while yet been classified. For the rest 20% of the microbial communities, *Pseudomonas*, *Nocardioides* and *Anaeromyxobacter* appeared to have high potential in decomposing the 1,2-DCB. Moreover, the carbon source that were utilized by these microbes was likely to be 1,2-DCB. In addition, some methanogens may also be able to reduce the 1,2-DCB as well while they may likely use CO₂ as their C source. Thus, ¹³C amended 1,2-DCB and/or ¹³CO₂ should be considered for future DNA-SIP experiments to label the active 1,2-DCB utilizing microbes in the field.



章次

圖次.....	11
表次.....	14
(一)前言	15
(二)研究目的	16
(三)文獻探討	17
(四)研究方法與過程	25
4.1 研究執行流程	25
4.2 二氯苯污染場址	28
4.3 二氯苯降解實驗土壤配置	29
4.4 二氯苯厭氧降解實驗	30
4.5 二氯苯好氧降解實驗	32
4.6 土壤微生物族群結構與總量分析	33
4.7 土壤微生物與環境數據分析	34
(五)結果與討論	35
5.1 厭氧環境下土壤二氯苯降解、微生物活性與總量變化	35
5.2 厭氧培養實驗之總體與功能性微生物	40
5.3 好氧環境下土壤二氯苯降解之微生物活性、總量與族群結構變化	48
5.5 微生物族群與環境因子關聯	59
(六) 結論與建議	65
6.1 結論	65



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

6.2 建議	66
(七)參考文獻.....	67



圖次

圖一、精準生物整治流程	19
圖二、氯苯常見的降解途徑	20
圖三、微生物在好氧代謝氯苯的過程中常進行的氯苯酚鄰位裂解機制	21
圖四、實驗室培養下的 γ -HCH 降解速率與甲烷產生速率	21
圖五、連續培養實驗流程圖	26
圖六、於污染場址現地採集回實驗室之注藥井底泥	28
圖七、厭氧操作台	29
圖八、厭氧培養實驗之碳源與氮源配置	30
圖九、厭氧樣品瓶配置	31
圖十、培養實驗後(Day 63)，土壤陰離子與初始環境之濃度變化率。紅色(大於 1) 表示濃度較培養前增加，藍色(小於 1)表示濃度較培養前減少。	35
圖十一、厭氧培養實驗中，碳源與氮磷營養鹽添加處理下，其微生物二氧化碳(a) 與甲烷(b)隨時間變化之排放量 (單位：ppm)	36
圖十二、厭氧培養實驗二氯苯濃度減少率 (圖例：削減率)	37
圖十三、厭氧培養實驗，不同碳源與氮磷營養鹽添加處理下，土壤總體微生物 16S rRNA 數量隨時間變化 (Y 軸為對數刻度)	38
圖十四、厭氧培養實驗，不同碳源與氮磷營養鹽添加處理下，土壤功能基因 <i>bphA</i> 拷貝數變化 (Y 軸為對數刻度)	39
圖十五、厭氧培養實驗中，不同碳源與氮磷營養鹽添加下，其土壤 alpha 多樣性 指數之變化	40
圖十六、厭氧培養實驗之土壤微生物 NMDS 分析。(a)全培養週期；(b)培養 7 天 後；(c)培養 14 天後；(d)培養 42 天後；培養 63 天後。	41
圖十七、厭氧培養實驗之土壤微生物 PCoA 分析。(a)全培養週期；(b)培養 7 天 後；(c)培養 14 天後；(d)培養 42 天後；培養 63 天後。	42



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

圖十八、厭氧培養實驗中，不同處理的菌門相對豐富度與培養時間變化	43
圖十九、厭氧培養實驗中，不同處理的優勢菌屬絕對豐富度與培養時間變化 ..	45
圖二十、二氯苯降解之厭氧培養實驗，前 50 個 OTU 代表序列與碳氮磷元素添加 與否之培養結果的系統發育樹與豐富度	46
圖二十一、厭氧培養實驗中，不同處理的脫氮微生物菌屬絕對豐富度與培養時間 變化.....	47
圖二十二、厭氧培養實驗中，不同處理的產甲烷微生物菌屬絕對豐富度與培養時 間變化.....	47
圖二十三、好氧培養實驗，土壤陰離子濃度隨時間之變化率。紅色(大於 1)表示濃 度較培養前增加，藍色(小於 1)表示濃度較培養前減少。	48
圖二十四、好氧培養實驗土壤二氯苯濃度變化 (圖例：削減率).....	48
圖二十五、好氧培養實驗土壤總體微生物 16S rRNA 數量隨時間變化 (Y 軸為對 數刻度)	49
圖二十六、好氧培養實驗下，土壤功能基因 <i>bphA</i> 拷貝數變化 (Y 軸為對數刻度)	50
圖二十七、好氧培養實驗中，土壤 alpha 多樣性指數隨時間之變化.....	51
圖二十八、好氧培養實驗之土壤微生物 NMDS 分析	52
圖二十九、好氧培養實驗之土壤微生物 PCoA 分析	52
圖三十、好氧培養實驗中，不同菌門相對豐富度與培養時間變化	53
圖三十一、好氧培養實驗中，不同菌綱相對豐富度與培養時間變化	54
圖三十二、好氧培養實驗中，優勢菌屬絕對豐富度與培養時間變化	55
圖三十三、好氧培養實驗下，脫氮微生物菌屬絕對豐富度隨時間的變化	56
圖三十四、好氧培養實驗下，產甲烷微生物菌屬絕對豐富度隨時間的變化	56
圖三十五、二氯苯降解之好氧培養實驗，前 50 個 OTU 代表序列與時間變化的系 統發育樹與豐富度	58
圖三十六、培養實驗之數個已知代表 OTU 豐富度與環境因子之關聯性	59



圖三十七、環境因子與微生物族群的視覺化分析結果 62

圖三十八、厭氧培養實驗主要 OTU 代表序列的 Co-occurrence Network 分析結

果。綠色線表示正相關而紅色線表示負相關。線條越深表示相關性越強。藍

色圓圈部分越大且越深，表示其在培養的菌群中扮演的關鍵性越大。 63

圖三十九、好氧培養實驗主要 OTU 代表序列的 Co-occurrence Network 分析結

果。綠色線表示正相關而紅色線表示負相關。線條越深表示相關性越強。藍

色圓圈部分越大且越深，表示其在培養的菌群中扮演的關鍵性越大。 64



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

表次

表一、工作進度甘特圖	27
------------------	----



(一)前言

含氯有機物常被作為清洗劑，尤其 1,2-二氯苯能夠作為眾多化合物之中間產物或溶劑之用，亦可作為機械零件之油漬清洗，甚至可作為殺蟲劑及染料工業之溶劑，使用的範圍十分廣泛。另外，氯苯也常被用來當農藥使用，是農藥污染場址中的主要污染物。然而，此類含氯的有機物通常都具有致癌性，對於人體、土壤與地下水等生態，皆有潛在的接觸及污染風險，因此國內的土污法針對部分氯化有機物公告為土壤及地下水管制項目共計超過 20 項。截至 109 年 8 月資料顯示，國內土壤及地下水受含氯有機污染物公告之列管場址為 16 處，共有 12 處整治場址、4 處控制場址，顯示目前在土壤及地下水含氯有機污染場址之管控與整治是十分重要的。

近年來，精準生物整治的技術在國際上開始大量發展，然而相關的技術對於判別微生物具體降解含氯有機物的活性仍舊存在部分不確定性。DNA-穩定同位素探針(DNA Stable Isotope Probing; DNA-SIP)技術為一種環境微生物學者用來判斷環境特定活性微生物之新穎技術。其透過微生物代謝同位素有機物過程將同位素標記於生物體 DNA 中，以在複雜的環境中迅速分離具有特定功能性的活性微生物族群。

若能將此技術，應用於難分解有機物(含氯有機物、多環芳香族碳氫化合物)的生物整治上，應能有效在短時間內快速鑑別出優勢且高污染降解潛能的功能微生物，同時解析其微生物的生態區位(Ecological niche)，作為精準生態整治的重要科學依據。



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

(二)研究目的

本研究計畫期望能評估將 DNA-SIP 技術轉移到土壤污染的生物分解技術開發的可能性。

由於本技術使用，需要透過特定同位素 ^{13}C 或 ^{15}N 進行微生物的 DNA 標記。因此相關研究皆須進行預實驗，於確認環境中目標微生物的碳源或氮源需求後，透過同位素藥劑進行微生物示蹤。故本年度計畫將確認相關污染物降解之微生物碳源利用狀況，以利後續 DNA-SIP 的同位素實驗進行。



(三)文獻探討

傳統的土壤及地下水污染整治技術而言，整治列車的方式為近年來最常用的策略，然而在生物技術的快速發展下，減少物理能量消耗(降低能源損耗)與化學反應試劑的大量添加(減少二次污染)，並提高生物復育的技術層面與比例，為較符合經濟成本及提升環境永續的效益。氯化有機物其物化特性為重質非水溶相液體(DNAPL)，一旦洩漏後將會滲透至地下不透水層，且吸附於移動路徑之土壤中，含水層中之土壤吸附相與非水溶液相液體將會慢慢溶解於地下水中，形成污染團(plume)而隨地下水流向擴散，造成污染範圍擴大，使得污染整治的期程延長至好幾年。因此，大規模的污染情況，單靠物理及化學的整治方式頗為不足，若能利用自然環境中的原生菌族群，將含氯污染物作為微生物利用的碳源，以提升污染物降解的效率，找出含氯化合物的氧化還原機制以及脫氯代謝途徑中，酵素及功能微生物特定基因的參與，將能精準且有效地加速生物復育的整治期程。

當今對於難分解有機物的生物整治方法，主要可透過生物刺激(Biostimulation)或生物優植(Bioaugmentation)的手段來進行。生物刺激的方式乃是於污染場址所在地，直接透過加藥井添加能加速分解特定污染物的微生物生長所需之營養鹽(碳、氮、磷等)，進而期望能刺激該微生物生長，並催化微生物分解相關污染物的活性。常見的菌群為 *Pandoraea* sp., *Burkholderia* sp., *Ralstonia* sp., *Cupriavidus* sp., *Bacillus* sp.等(呂蕙芳, 2016)(國立中興大學環境工程系盧至人教授研究團隊)，以及其相關的脫氯酵素與功能性基因。這樣的技術經過實際應用而成功的案例，如國立中山大學環境工程研究所高志明教授研究團隊(段鑫霖, 2016)，曾利用添加營養鹽的生物刺激方式，在實際的含氯污染場址中，加強原生菌 *Dehalococcoides* sp.的厭氧還原脫氯的效果，達到有效的生物復育。此外在國際間，美國的喬治亞理工學院地球與大氣科學系 Martial Tallefert 教授以微生物在 Fenton 系統中降解含氯及非含氯地下有機污染物為相當具潛力的生物整治策略(Sekar et al., 2016)。此過程利用微生物的呼吸作用產生過氧化物及還原固體氧化鐵基質中的 Fe (Wang et al. 2013)為 Fe(II)，因此不需持續添加過氧化物及 Fe(II)以驅使羥基自由基的生成。利用兼性厭氧菌 *Shewanella oneidensis* 搭配檸檬酸鐵(III)、乳酸鹽、以及污染物，並交替打入空氣及氮氣使之轉換好氧及厭氧環境下，*Shewanella oneidensis* 可完全降解 TCE、PCE 以及 1,4-二氯六環。

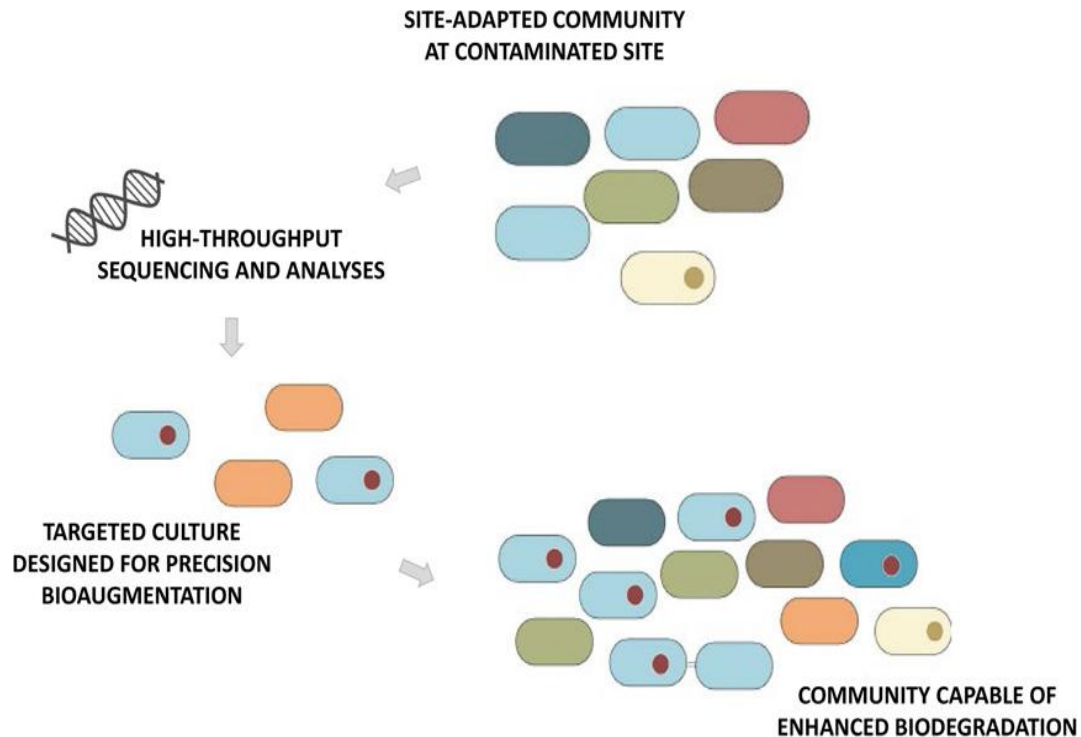
然而這樣的生物刺激技術容易因為不同污染土壤長期的風化作用、地理原生構造及質地等場址變異性的因素，使得同樣的生物刺激手段下，常有不同的整治成效。尤其受到生物刺激而活化的微生物菌相是否確實能降解目標污染物的功能，據悉目前尚無標準驗證機制。另一種常見的生物復育方式為生物優植法



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

(Bioaugmentation)。其主要仍使用傳統的隨機篩選功能菌。從污染環境中採樣回實驗室，經過長時間的飢餓培養，選出具潛在降解污染物能力的微生物，然而，此方法所篩選出的功能菌，其降解污染物的功能性與代謝過程中參與反應的基因，無法明確的被指出。另外，當選植出來之「候選」微生物投放回污染場址後，是否仍舊能具有高度降解污染物之活性，仍需長時間的監測。其主因乃受制於傳統生物復育研究，主要著重於單一的生物組體學方式(例如：基因組體學、蛋白組體學、代謝組體學等)(Malla et al., 2018)。自然界微生物生態系，各種物種間存在著彼此競爭、協同或是互利共生等作用，在這樣的自然環境下，生物間可能存在各種營養鹽與能量間的交換轉移，互相輔助等機制。此等交互作用，並無法在實驗室透過純菌篩選與培養的環境下進行全盤考量。因此也造成這類選植的微生物物種投放回污染場址，其實際降解污染速度的不確定性。

為了解決上述的問題，由田納西大學的 Frank Löffler 教授所提出的精準生物整治 (precision bioremediation) (Löffler et al., 2013)在近年來獲得國內的政府單位相當大的重視 (圖一)。該技術主要透過結合微宇宙培養實驗 (microcosm) 與次世代定序的方式，對整體微生物菌相與污染物濃度消長變化進行分析，並從中推測可能具有高降解污染物潛力的微生物物種。這樣的分析方式，已能部分改善傳統生物優植的缺點，提高篩選出分解污染物之微生物的機會。搭配即時螢光定量 (real-time PCR)與特定功能基因，了解環境中微生物族群是否存在脫氯菌群、是否存在脫氯的潛力，並期望透過環境的控制來有效控制脫氯的作用(吳雅婷, 2017)。此等技術於國外已有相關研究，並從中歸納出如 *Geobacter* 屬、*Mycobacterium* 屬與 *Sphingomonads* 屬等微生物族群對於特定含氯污染物具有降解能力 (Redfern et al., 2019)。



圖一、精準生物整治流程

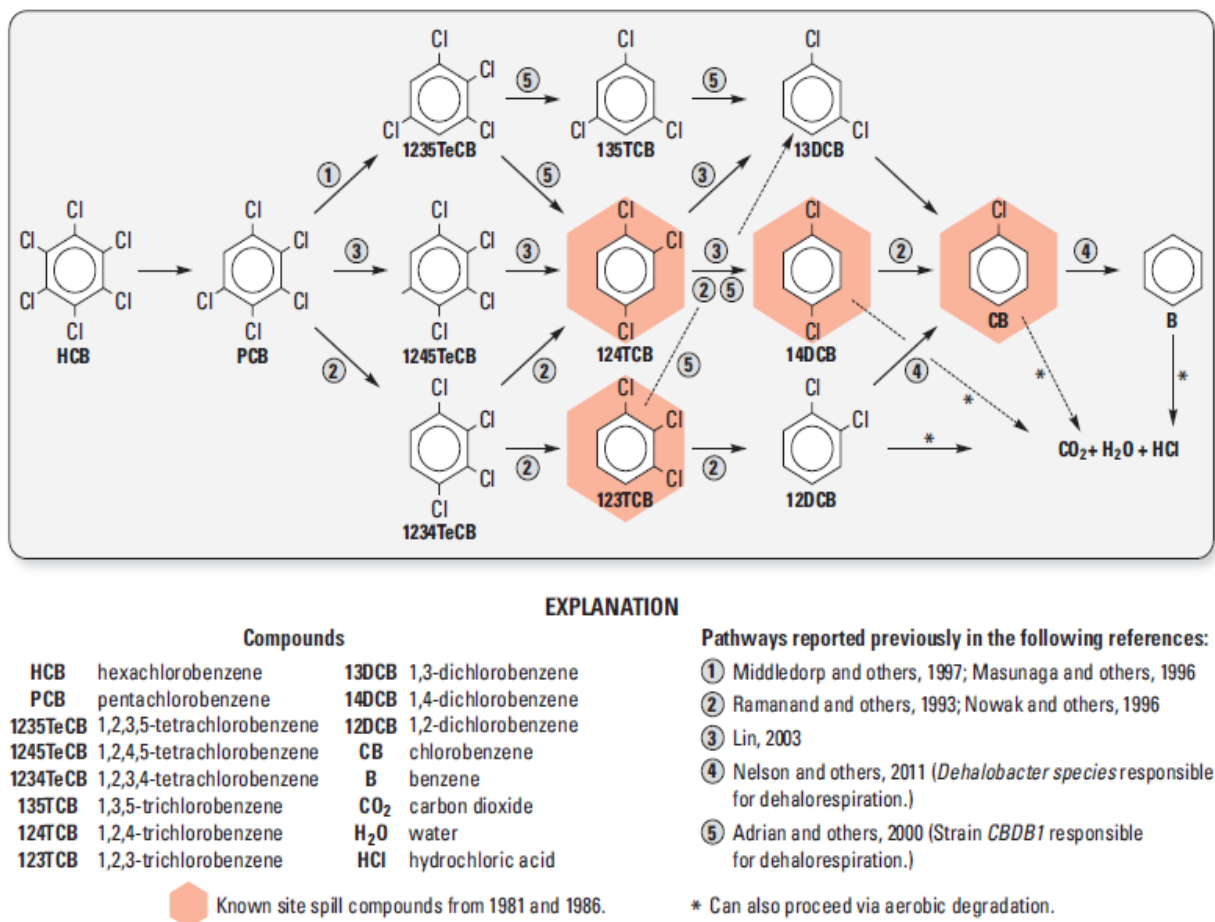
(Redfern et al., 2019)

然而這類結合次世代定序與微宇宙培養實驗的環境微生物研究，存在一個根本上的問題，即為兩種技術所分析出來的優勢物種，並沒有直接證據表明其具備實際降解有機污染物的能力。若需要證明該微生物的相關能力，仍需透過純菌的篩選、培養並分析其代謝途徑才能夠得以證實。這類生理代謝的分析，雖然在科學研究上具備相當高的價值，但就污染整治與應用層面而言，實為耗時耗力的工作。倘若無經過分析純菌的代謝途徑驗證及直接將該微生物進行生物刺激或是生物優植的方式進行實場復育，仍有失敗的風險。



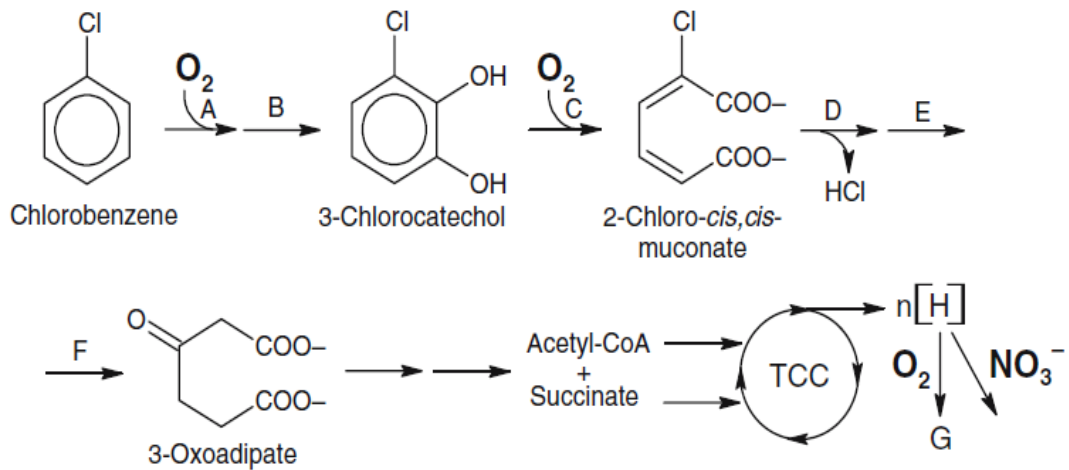
以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

微生物降解含氯有機物的機制，能夠利用混合培養的方式，在厭氧的還原脫氯過程中，將含有六個氯的氯苯結構，降解至完全脫氯的苯環結構(圖二)(Lorah, 2014)。脫氯的作用將會優先經由共代謝(cometabolic)以及脫氯的呼吸作用(dehalorespiration mechanisms)進行主要的降解。另外，在好氧的狀態下，氯苯的代謝初期是利用雙氧化酶(dioxygenase)導入氧氣分子至芳香族的結構當中以利後續的脫環作用(圖三)(Nestler et al., 2007)。



圖二、氯苯常見的降解途徑

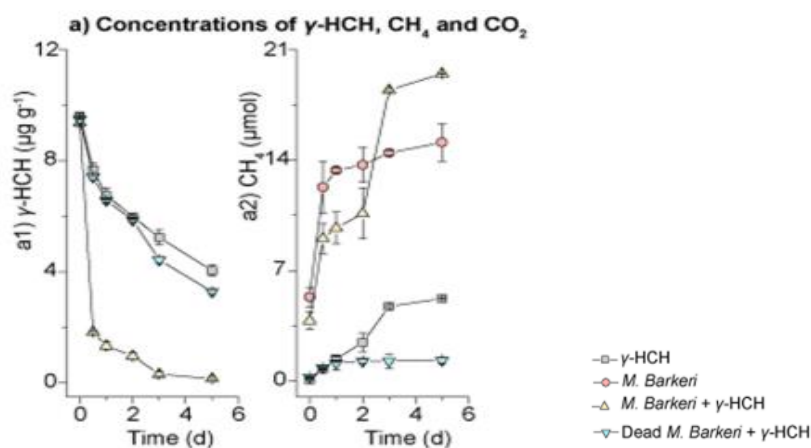
(Field & Sierra-Alvarez, 2008)



圖三、微生物在好氧代謝氯苯的過程中常進行的氯苯酚鄰位裂解機制

(Reineke, 2001; Reineke & Knackmuss, 1984)

此外，近年來亦有研究表示，氯環烷類的有機物，在厭氧的環境條件下，許多時候可透過產甲烷菌與硫酸還原菌及脫氯菌等，進行協同作用而降解含氯有機物 (Xu et al., 2015; Wen et al., 2017)。另外，Yuan 人等(2021)亦發現 *Methanosarcina* 屬具有脫氯的機制。該研究在厭氧純菌的培養條件下觀察到，在七天的培養時間裡， γ -HCH 的降解速率伴隨著甲烷的排放速率增加(圖四)。

圖四、實驗室培養下的 γ -HCH 降解速率與甲烷產生速率

(Yuan et al. 2021)



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

DNA-穩定同位素探針(DNA Stable Isotope Probing; DNA-SIP)技術為一種環境微生物學者在近年來所使用的新穎技術。其核心的原理在於此技術能夠在複雜的環境中迅速的解析出具有特定功能性的微生物族群 (Radajewski et al., 2000; Tringe & Rubin, 2005)。此技術主要透過在環境中添加具有穩定同位素標定的特定基質(同位素碳、氮等)作為微生物的主要營養源。當具有代謝該基質能力的微生物分解了具有穩定同位素的基質時,透過生物轉化的過程,其微生物的 DNA 會帶有同位素。如此一來,只要透過特殊的萃取與分析方式,找出含有穩定同位素的 DNA 片段,即可搭配次世代定序,快速得到實際上具有代謝活性的功能性微生物物種 (Neufeld et al., 2007)。

因此, DNA-SIP 不僅能用來鑑定揭露所有可能具有代謝特定基質能力且尚未被培養出的微生物族群,更能夠精準評估微生物在接近最原始的生長環境下的代謝基質效率(Dumont & Murrell, 2005; Dumont et al., 2006)。在近期的研究中, DNA-SIP 已被用於各種不同的環境領域(土壤、地下水、海洋、及廢水處理廠等)(Cho et al., 2016; Shiau et al., 2020; Shiau et al., 2018a; Shiau et al., 2018b; Zhang et al., 2016)。

DNA-SIP 的技術應用於難分解有機物(含氯有機物、多環芳香族碳氫化合物)的生物整治上,在近兩年出現了許多的研究應用。Jia 等人於 2020 年發表的研究提到(Jia et al., 2020),利用 DNA-SIP 技術結合 Illumina MiSeq 定序系統等,監測三氯沙(triclosan)廢水的硝化反應系統中,添加界面活性劑藉以提高生物降解的程序。研究發現微生物 *Amaricoccus* 能有效抵抗三氯沙,並同時產生生物界面活性的效果,分泌生物酵素來降解三氯沙,最終證明 *Amaricoccus* 能夠作為三氯沙的主要降解者。另外, Li 等人於 2018 年的研究(Li et al., 2018),亦以 DNA-SIP 技術驗證受多環芳香族碳氫化合物(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)污染的廢水系統中,添加原生性的生物降解菌 *Acinetobacter tandoii* LJ-5 能夠產生顯著的菲(phenanthrene, PHE)化合物的礦化作用。該研究指出,應用 DNA-SIP 技術結合現地(in situ)的生物整治技術,將能提供更穩定且深入的微生物族群結構資訊與污染物代謝及特定功能基因的直接證據。

中國廣東省生態環境技術研究所孫蔚旻團隊於 2020 年發表的研究(Zhang et al., 2020),利用穩定同位素追蹤-宏基因組分箱聯用技術呈現砷污染土壤中的厭氧砷氧化微生物及其代謝途徑。藉由宏基因體的分析將能更深入的解析嗜硝酸鹽的三價砷氧化還原菌(nitrate-dependent As(III)-oxidizing bacteria, NDAB)及其主要進行三價砷氧化作用與硝酸鹽還原作用等功能之基因,並確認其在砷氧化作用中(nitrate-dependent As(III) oxidation, NDAO)所扮演的角色。該研究除了擴展有關



NDAB 微生物族群的多樣性知識，同時證明了應用 DNA-SIP 技術能夠精準鑑定出緩慢生長 (slow-growing) 的 NDAB 微生物族群，說明此技術的新穎性與突破性。

過去 DNA-SIP 的相關研究，幾乎無對於氯苯等含氯有機物的相關研究，主要原因可能在於能實際進行 DNA-SIP 實驗的國際團隊並不多。因此本研究期望藉由此技術，釐清受到二氯苯污染的場址，其現地具有活性之微生物種類。

然而，由於本技術的使用，需要事先釐清目標微生物主要使用的碳源種類後，才能以正確的穩定同位素進行微生物 DNA 標記，並進而解析相關的功能性微生物族群活性與生態區位等特性。因此本研究預計將進行各種碳源組合的預實驗，找出設定的假想污染場址，其二氯苯降解的反應活性微生物。其後再利用對應的穩定同位素進行 DNA 標記與示蹤，以了解其微生物的組成，並期望未來能更進一步探討該活性微生物的生長特性，於實場中進行精準的生物調控，以加速污染場址的微生物整治效率。

藉由此研究，並可同時建立以穩定同位素探針技術進行微生物整治的標準最後流程，並提供做為未來實際應用在各種污染實場，依據不同的污染場址與不同的污染性質，因地制宜的解析該場域的高潛力的活性功能微生物族群，並加速生物整治的流程與成功率。亦可同時全面解析可能的未知功能性微生物種類與活性條件，找出污染環境中新型的功能性微生物。



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性



(四)研究方法與過程

4.1 研究執行流程

為了配合未來的精準生物整治技術，本研究目標在於探討微生物生態領域常使用之 DNA-SIP 技術，是否能快速且有效標記污染場址中，對污染物具有實際降解活性的微生物族群的有效方法。因此本研究主要以瑞昶科技公司在北部進行的某污染場址整治作為模擬的場域。

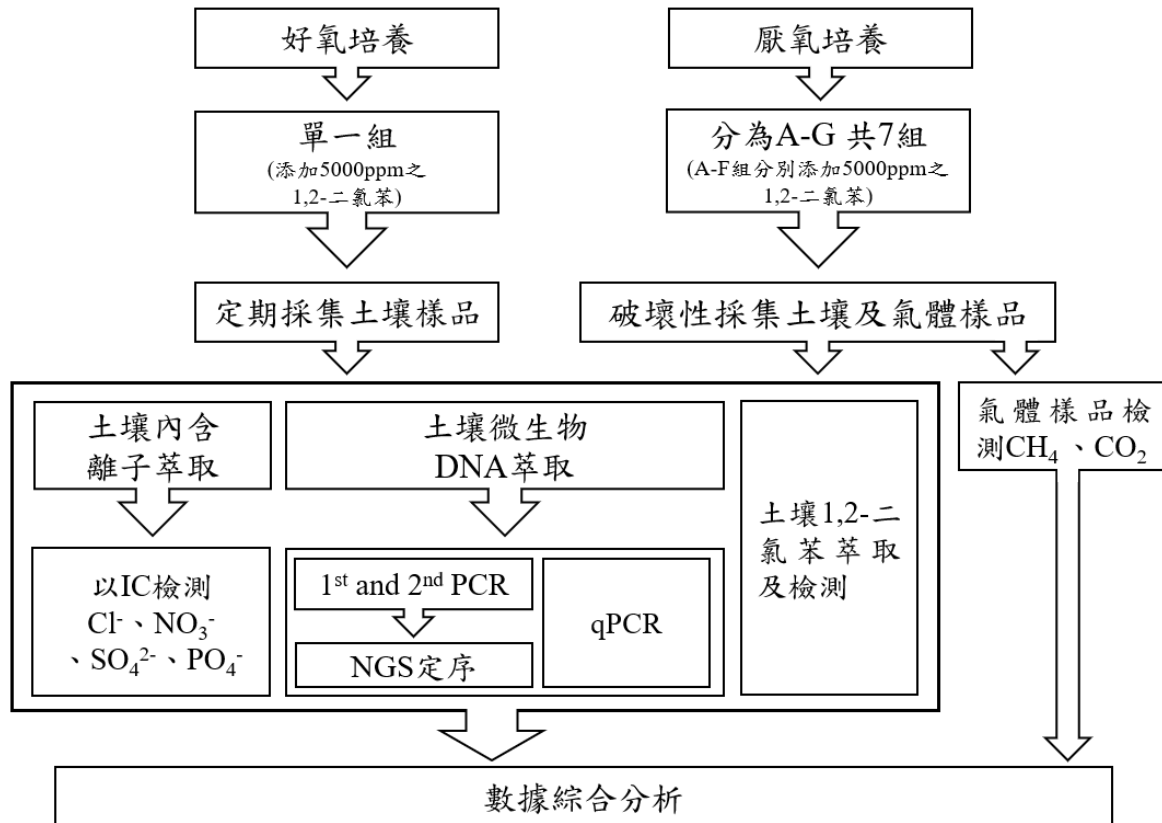
研究執行流程主要分成好氧與厭氧兩個類型的培養實驗如圖五所示。連續培養實驗首先參考現地底泥土壤組成，配置無二氯苯污染之標準土，之後分為厭氧培養及好氧培養兩種類型，標準土中均加入定量注藥井內底泥作為微生物種源。厭氧培養都置於厭氧操作台進行，分為 A~G 共 7 組，其中 A~F 共 6 組每組添加相同濃度之 1,2 二氯苯及不同比例之 CO_2 、 CH_4 及氮磷營養鹽，G 組除標準土及注藥井底泥外無添加其他項目，以做為參考組。好氧組為單一組，添加 1,2 二氯苯後以 25 °C 做培養。

培養後，厭氧組定期以 GC-FID 檢測 CO_2 及 CH_4 濃度變化，也定期用破壞性取出培養瓶內的土壤樣品作分析。好氧組因單一組總土量較多，以定期採樣的方式取出定量土壤作分析。採集的土樣分別萃取土壤微生物 DNA、土壤內含離子及土壤中 1,2 二氯苯。萃取完之 DNA 進行後續 NGS 及 qPCR 分析，以瞭解土壤中微生物的種類及其豐度變化。土壤內離子使用 IC 檢測 Cl^- 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 及 PO_4^- ，土壤中 1,2 二氯苯以甲醇萃取完後用 GC-FID 分析濃度變化。

最後本研究將各項目測得之數據進行綜合分析，以判明注藥井底泥中最有能力降解污染物之微生物族群，及適合這群微生物生長的碳源及氮源濃度。



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性



圖五、連續培養實驗流程圖



表一、工作進度甘特圖

年月 工作項目	110 年											111 年		備 註
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2		
進行土壤採樣與污 染物分析					※									
實驗室培養試驗										※				
微生物族群分析										※				
期中/期末報告														
工作進度累積百分 比	5 %	10 %	15 %	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %	70 %	80 %	90 %	100 %		
預定查核點	期中	1. 土壤採樣與模擬現地污染試驗 2. 不同營養鹽添加測試最佳 1,2-二氯苯降解趨勢(預試驗)												
	期末	1. 以最適營養鹽驗證 1,2-二氯苯降解之微生物族群(連續培養試驗) 2. 潛在功能性微生物族群結構解析 3. 污染物降解趨勢與功能微生物關聯性探討												



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

4.2 二氯苯污染場址

本研究預期透過實驗室培養實驗，了解參與二氯苯降解之微生物族群以及其對於可能利用的碳氮元素需求，以作為後續穩定同位素探針實驗所需參數。因此實驗室培養實驗所參考的二氯苯濃度以台灣北部地區某污染廠址作為參考。

該研究場址主要生產各式工業助劑，如有機染料與顏料化學製造程序、界面活性劑化學製造程序的工業溶劑等，產品與服務主要為底片相紙沖印液、染料、顏料、塗料中間體及助劑製造。場址於民國 104 年 2 月公告為土壤及地下水污染控制場址，主要的地下水污染物包括 1,2-二氯苯(1,2-DCB)及 1,4-二氯苯等 2 項，濃度約在 5,000 ppm 左右。其污染場址之土壤粒徑組成以砂土為主，約占總重量的 60%，粉土與黏土約占總重量之 8.5%，另有約 31.5%的礫石，因此後續模擬之土樣以此粒徑比例進行配置。

研究採集該廠址注藥井中底泥 (圖六)，並震盪淋洗現地底泥之微生物作為後續培養實驗的種源，並添加在本研究使用之未受二氯苯污染之實驗土中，進行連續培養實驗。因為該污染場址已經多年化學氧化法整治，因此現場之底泥樣品二氯苯目前已呈現未檢出，故本研究的培養情境乃採用該場址污染初期之二氯苯濃度為主。



圖六、於污染場址現地採集回實驗室之注藥井底泥



4.3 二氯苯降解實驗土壤配置

本研究使用無污染的土壤搭配標準石英砂，配置類似現地之深層土壤的粒徑比例，進行後續降解實驗。

無二氯苯污染的土樣取得，使用國立台灣大學生物環境系統工程學系於台大實驗農場的使用空間之土壤。採集的土壤取出部分進行風乾後過篩，並依據現地採集之底泥作為參考比例，於厭氧操作台中，配製共 1 公斤重的實驗土，並裝在 500 ml 之廣口血清瓶後，進行厭氧環境的馴化（圖七）。



圖七、厭氧操作台

另如前所述，配製好培養土後，加入約 50ml 由現地底泥淋洗出之菌液，作為微生物的種源。具體的菌液萃取方式參考過去文獻所述（周楊等人，2015）。

之後將血清培養瓶，以 25 度的環境溫度進行連續 15 天的厭氧馴化，以使土壤環境達到絕對厭氧條件。



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

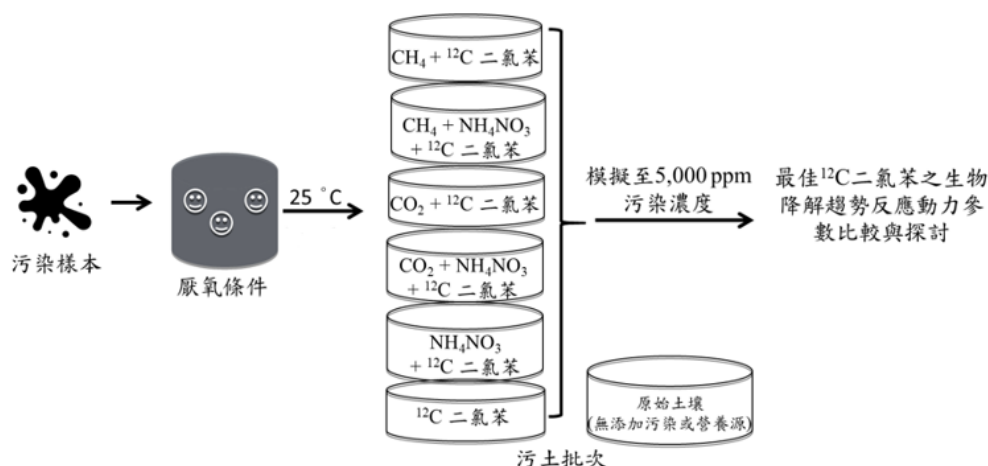
4.4 二氯苯厭氧降解實驗

過去文獻對於氯苯類的微生物降解研究主要提到包含 Methanogen 以及 Pseudomonas 為主要可能參與降解的微生物。Methanogen 主要的碳源有兩種可能種類，包含利用乙酸進行 Acetogenesis 之異營性產甲烷菌，以及透過 Dehydrogenation 反應，以無機二氧化碳作為碳源之產甲烷菌。另外 Pseudomonas 則為環境中常見的脫氯微生物。

因此，本研究採用七種不同的碳氮配置(六組實驗組加一組空白對照)，進行實驗室的厭氧培養實驗(圖八)。以了解在現地污染廠址可能的氯苯降解菌群主要結構組成。

具體配製方法如下，由實驗室厭氧馴化後的土樣，於厭氧操作台內，以一個樣品 10 g 土的量，將土壤分裝至 30 ml 的血清培養瓶中，共計 49 個樣品(圖九)。並同時以血清塞及鋁蓋封口後，將所有血清瓶內之氣體以氮氣進行氣體置換三次。

之後在每個樣品以七個為一組進行隨機分組。並選擇其中六組(42 個樣品)添加二氯苯至其土壤濃度為 5000 mg/kg (5000 ppm)。之後第一組樣品(組別 A)不進行其他任何處理；第二組樣品(組別 B)以氣密針頭加入約 0.3ml 之純二氧化碳，使其瓶內氣體二氧化碳濃度達到約 10,000 ppm；第三組樣品(組別 C)以氣密針頭加入約 0.3ml 之純甲烷，使其瓶內氣體甲烷濃度達到約 10,000 ppm；第四組(組別 D)、第五組(組別 E)以及第六組(組別 F)，準備的方法如同前述組別 A、B、C，差別在於 D、E、F 三組在進行氣體置換與 CO₂ 或 CH₄ 添加完畢之後，另外加入 10 mM 之 NH₄NO₃ 與 10 mM 的 K₂HPO₄，並配置調整土壤含水量，使其達到 60%。



圖八、厭氧培養實驗之碳源與氮源配置



圖九、厭氧樣品瓶配置

配置之後的樣品，於 25 度 C 之恆溫培養箱進行培養，並於初始(第 0 天)、7、14、28、42、56、63 天，分析其瓶內的 CO_2 濃度變化。之後每一組樣品隨機選取一瓶樣品進行後續化學性質的破壞實驗。

破壞實驗的部分，研究取用培養後第 0、7、14、42、63 天的樣品進行相關化學與生物性質分析。流程取 1g 土壤放置於 15ml 塑膠離心管中，並添加 10ml 二次無菌水，以超音波震盪機，進行震盪 30 分鐘。之後將離心管以 10,000 轉的轉速離心 5 分鐘並取得其上清液。上清液再經過 0.20 μm 的濾紙過濾後，以離子層析儀分析其中的氯離子(Cl^-)、硝酸鹽(NO_3^-)以及磷酸鹽(PO_4^{3-})的濃度。另外剩餘的土壤另加入 10ml 甲醇，以超音波震盪 30 分鐘後，離心並萃取其液體分析二氯苯濃度。



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

4.5 二氯苯好氧降解實驗

本研究為了瞭解二氯苯降解在厭氧狀況下與好氧狀況下的差別，另以同樣的方式置備一組好氧之二氯苯土壤，相關的土壤配置與二氯苯濃度設計皆與厭氧培養實驗相同。然而由於好氧微生物的活性一般皆比厭氧微生物反應活性快，因此好氧的培養實驗，以初始(第 0 天)、7、14、21、28 天作為分析頻率，以了解其微生物呼吸速率、氯離子增加速率以及氯苯濃度的變化。

由於好氧環境下氯苯降解途徑從文獻上可知，主要可能的反應透過脫氯微生物進行，而無可能經由絕對厭氧的產甲烷菌進行，因此好氧培養實驗中的碳源僅使用氯苯，而不添加二氧化碳或甲烷。



4.6 土壤微生物族群結構與總量分析

待培養實驗完成後，研究將每個培養瓶均勻混和，並取 0.5g 的土壤，以 Qiagen PowerSoil DNA extraction kits 進行萃取，具體的萃取步驟參考原廠所提供的流程進行，然而在初始破碎微生物細胞的步驟，將原本 kits 中 200 μ L 的 bead solution 替換為 phenol:chloroform:isoamyl alcohol 混和溶液，其餘流程不變。

萃取出 DNA 經過電泳與微量分光光度計確認濃度之後，以 16S rRNA (V4 515F/806R) 之引子對、PCR Taq (Ampliqon Polymerase Master Mix RED 2X) 進行 PCR 擴增。

擴增後的產物以 VIOGENE PCR Cleanup Kits 進行純化，再依據 Illumina Nextera XT 所使用的 i7/i5 引子對，針對每一個樣品分別進行 barcode PCR。產物同樣透過 PCR 純化試劑組處理，再以每個樣品 5ng 的質量進行混和，以建立 DNA Library，並送至國立陽明交通大學基因體中心進行 Miseq 定序。

此外土壤所萃取出之 DNA，另外以 16S rRNA 與 *bphA* 之引子對進行即時螢光定量(real-time PCR)。使用之 qPCR Taq 替換為帶 SYBR Green 之 Taq (Promega GoTaq® qPCR Master Mix)，其餘條件皆與序列定序使用之 PCR 相同。



4.7 土壤微生物與環境數據分析

經由基因體中心定序完成的序列資料，使用 Mothur 1.39 版進行序列組裝。相關的組裝步驟參考 Mothur 官方網站的流程進行。序列經由組裝與質控之後，使用 RDP V18 的序列資料庫，對所有通過質控之序列進行物種辨認比對至菌屬層級。所得之總體微生物數據，利用 Excel 繪製其菌門、菌目與菌屬之相對豐富度。

另外物種豐富度最多之菌屬，透過密西根大學的 Ribosomal RNA Database (rrnDB) 比對其平均 16S rRNA 拷貝數，並利用即時螢光定量實驗所得之樣品 16S 拷貝數，進行菌屬層級的絕對豐富度計算，同時以 Excel 繪製計算所得之菌屬絕對豐富度圖。詳細計算方式參照過去前人研究方法進行 (Jian et al. 2020)。

對於過去文獻所提到，可能的二氯苯降解微生物，包含脫氮微生物族群以及產甲烷微生物族群，透過 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 資料庫中的對應功能性微生物物種名稱，進行微生物的序列挑選。挑選出來的脫氮微生物與產甲烷微生物，再透過前述 rrnDB 資料庫對其 16S rRNA 拷貝數進行較正後，繪製對應的功能性基因絕對豐富度圖。

另外研究亦使用 Mothur 對每個樣品進行隨機取樣，並進行 de novo 的 OTU cluster，之後同樣使用 RDP V18 的序列資料庫，對 OTU 代表序列進行物種比對。同時研究針對各樣品的 OTU 代表序列，計算其 alpha 多樣性指數。另外亦計算 NMDS 族群結構與主成分(PCoA)分析。

針對好氧及厭氧培養實驗中，物種相對豐富度最高之前 50 個 OTU 代表序列，另以 MEGA X (Kumar et al., 2018) 計算其系統發育樹結構。所得之結果再透過 EvolView V3 繪製其發育樹。研究同時計算此 50 個代表序列於各樣品的豐富度，並於 EvolView 繪製系統發育樹的同時，繪製其對應的熱影像圖(Heat Map)。

環境數據的統計分析，則使用 JMP 11.0 (SAS Inc., NC, USA) 進行單因子變異數分析(one-way ANOVA)。另透過 R-Studio 1.3 進行冗餘分析(Redundant Analysis; RDA)，解析其環境因子與微生物菌相之關聯。同時並以 Variation Partitioning Analysis 進行環境因子與微生物族群的視覺化分析。

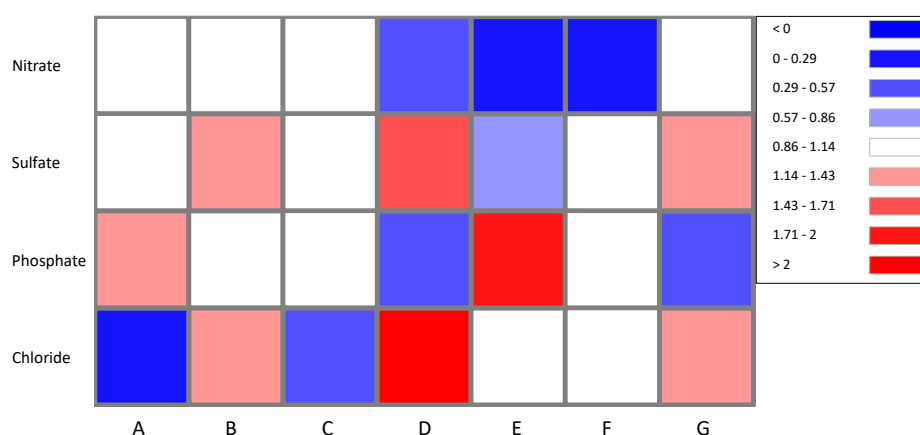
另外對於 OTU 代表物種彼此之間可能存在的共生關係，則透過 JMP 計算其 Kendall's γ 相關性指數，並以 Gephi 0.92 繪製其 Co-occurrence Networks。



(五)結果與討論

5.1 厭氧環境下土壤二氯苯降解、微生物活性與總量變化

在厭氧培養二氯苯降解實驗中，從土壤陰離子濃度的差異可看出，在添加不同無機碳源的部分，經過了 63 天的培養時間後，並沒有顯著改變土壤中氯離子的濃度(組別 C)，此外添加不同無機碳源與氮磷營養鹽的組別(組別 E、F)同樣沒有明顯的氯離子濃度變化(圖十)。然而在僅添加二氯苯的組別中，可發現若同時有添加氮磷營養鹽(組別 D)，其土壤中的氯離子濃度有明顯增加的趨勢，同時所添加的氮磷營養鹽確實有被微生物代謝或吸收之現象。此一結果可推測，厭氧環境中，能夠分解二氯苯之微生物族群可能以有機異營性微生物為主，且同時需要氮磷作為生長所需之營養鹽。



圖十、培養實驗後(Day 63)，土壤陰離子與初始環境之濃度變化率。紅色(大於 1)表示濃度較培養前增加，藍色(小於 1)表示濃度較培養前減少。

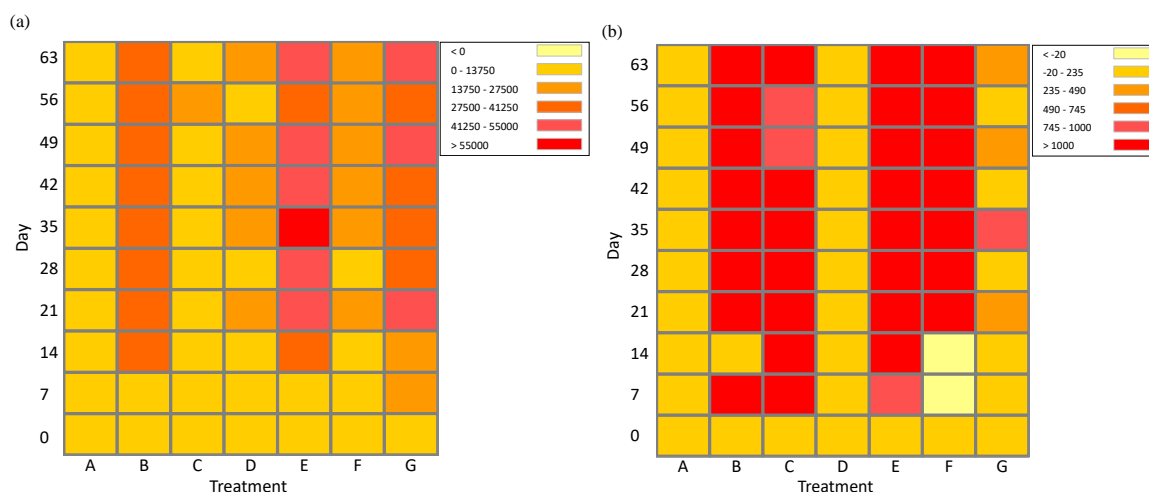
從微生物呼吸作用的氣體分析結果可以看出，在沒有添加二氯苯的對照組中，無論是 CO_2 或是 CH_4 的產量，隨培養時間皆有上升 ($p < 0.05$) (組別 G) (圖十一)，然而相比於有添加二氯苯的其餘六個組別， CO_2 的排放量皆較為下降。由此可推知，在二氯苯添加後，對整體微生物族群活性會產生明顯的抑制效果。此外，對於添加無機碳源的樣品(組別 B、C)，其 CO_2 或是 CH_4 的排放量都有明顯的增加，尤其是在添加無機碳源與氮磷營養鹽的組別(組別 E、F)，其 CO_2 與 CH_4 產量增加更明顯 ($p < 0.05$)，推測其可能原因乃由於無機碳源在系統中屬於較為容易利用之小分子，因此有較快的生命週期循環，故有效增加 CO_2 與 CH_4 淨排放量。此外，組別 D 的二氧化碳與甲烷排放量反應較慢，可能原因推測在於添加氮磷營養鹽之



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

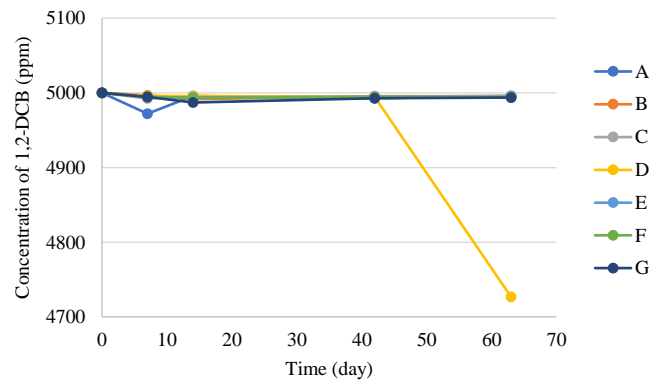
後，土壤脫氮相關之微生物活性增加，抑制產甲烷菌的活性，使甲烷排放量下降。而因為 D 組外來碳源僅有二氯苯，因此對於其它無法降解該污染物之微生物並無促進作用，是故二氧化碳的增加量亦較其它有添加碳源的組別為低。然而雖然 E、F 組的氣體產量較高，其氯離子變化並不明顯，因此推測這些氣體可能來自於非具有降解二氯苯之其它微生物。

這樣的推論可從圖十一得知，氣體變化對於氯離子濃度改變影響較為有限，僅可能有少數利用 CO_2 之微生物或許亦有降解二氯苯之活性。是故，未來研究若欲使用穩定同位素探針探討環境中活性降解二氯苯之微生物族群，所需使用之碳源應該需要提供有機型態的同位素二氯苯為優先，其次則可考慮使用 CO_2 ，才能順利標註該降解之活性微生物染色體。

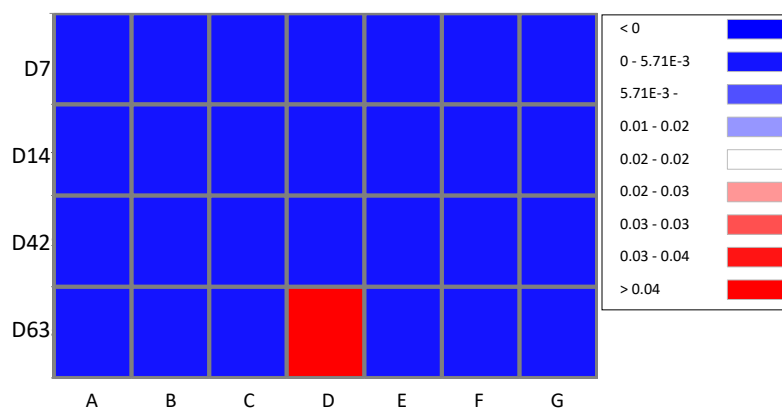


圖十一、厭氧培養實驗中，碳源與氮磷營養鹽添加處理下，其微生物二氧化碳(a)與甲烷(b)隨時間變化之排放量 (單位：ppm)

由圖十二與圖十三顯示，二氯苯在經過 63 天的厭氧培養實驗後，濃度僅有組別 D 在培養 63 天後 5%左右的濃度下降 ($p < 0.05$)，其他組別氯苯濃度並無太明顯的變化，推測可能厭氧微生物降解反應過程較慢。亦可能與過去文獻所提厭氧狀態下主要的反應生物以古菌為主有關。對於 D 組別在第 63 天才觀察到變化的可能在於，後期兩次採樣時間分別為培養後第 42 與第 63 天，間隔時間較久，因此微生物可能反應速率為非線性，在後期才有比較明顯生長。另外雖然本實驗過程的每個取樣階段皆儘量將土樣混合均勻，不過此差異亦有可能來自於土樣均勻度影響。



圖十二、厭氧培養實驗二氯苯濃度與時間變化

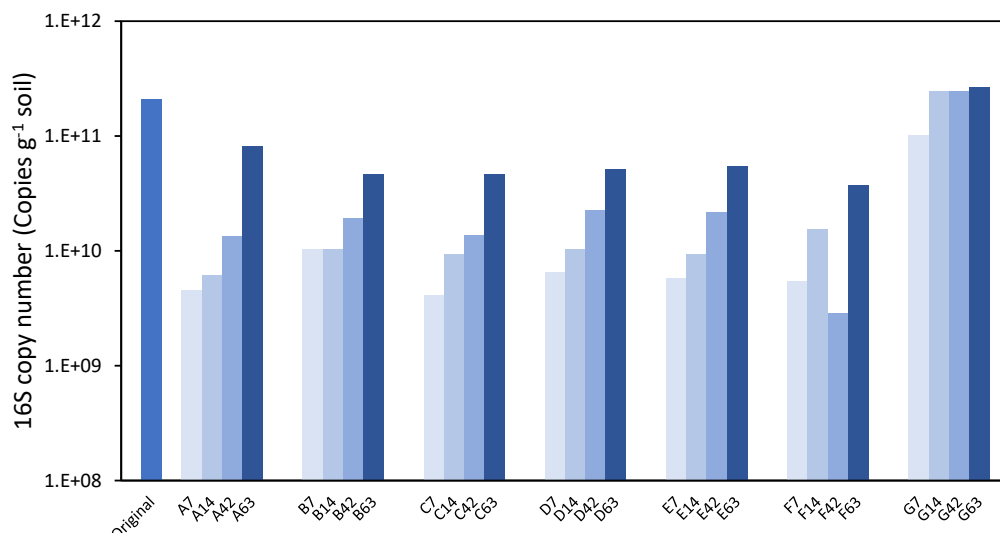


圖十三、厭氧培養實驗二氯苯濃度減少率 (圖例：削減率)

透過即時螢光定量 PCR，針對厭氧培養微生物總量的分析結果顯示，在不同處理的微生物總量變化上可明顯看出，二氯苯添加後可能因為物質毒性，對整體土壤微生物族群產生明顯的影響，微生物總體族群接近減少了 90% 以上的總量 ($p < 0.05$) (圖十四)。隨培養時間經過，其各種碳源與氮磷源添加之處理樣品的微生物總量皆回升至每克土超過 1×10^{10} 拷貝數，且其復原速率與不同營養鹽添加方式並無明顯差異，然而其總量皆小於未添加二氯苯之對照組與初始土壤樣品。對照氯離子濃度與土壤培養所產生之氣體推測，微生物總量上的變化，主要應該跟整體微生物菌群有關，而較無法直接反應二氯苯的降解速度。



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性



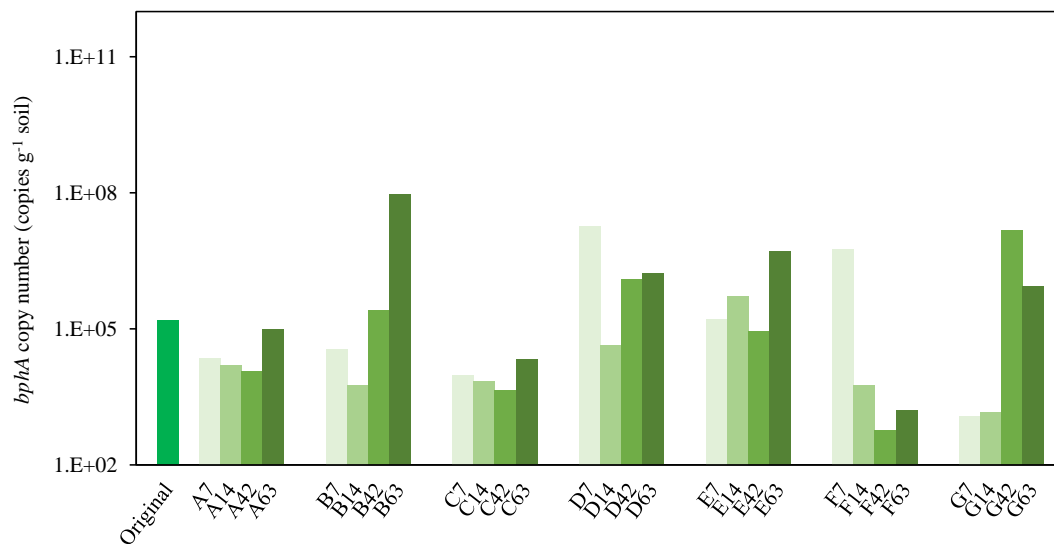
圖十四、厭氧培養實驗，不同碳源與氮磷營養鹽添加處理下，土壤總體微生物 16S rRNA 數量隨時間變化 (Y 軸為對數刻度)

進一步分析樣品中脫氯的 *bphA* 功能性基因總量變化可發現，無論是原始樣品或是添加二氯苯以及不同營養鹽的處理，其 *bphA* 的含量相比於總體微生物量，約為萬分之一以下，可見脫氯微生物在環境中所占比極小。此外在不同的處理下，拷貝數亦無規律性的變化。值得一提的是，組別 D 在先前的離子分析結果可發現，該樣品應有二氯苯降解的反應發生，且對應其 *bphA* 拷貝數有略為較高的總量。另外在組別 B 的 *bphA* 拷貝數尤其在培養後期亦較其他處理之樣品拷貝數高，對照離子分析的結果，亦可發現其土壤中氯離子的濃度在培養過後具有上升的趨勢，因此推測 B 組可能於培養後期出現可降解二氯苯之微生物族群發展。此結果對照圖十一亦同樣可證實，其可能有部分利用 CO₂ 之無機自營性微生物，在降解二氯苯之後會升高環境中的氯離子濃度。然而其反應相較於直接使用二氯苯之組別 D 微生物，其反應速率可能較慢。

另外需要一提的是，由功能性基因的總量可發現，土壤環境中功能性基因總量，並不完全能反應於其土壤對於二氯苯整體的降解速率或活性。自然環境中存在各種不同類型的微生物，在本研究初步的結果顯示，即便 CO₂ 能促進某些無機性的二氯苯降解微生物，並產生可能類似共代謝的過程，然而其反應速率相比於異營性之微生物整體而言仍然較為緩慢。此外，從 DNA 層級所進行的功能性基因總量的分析，亦無法充分反應出實際上當下具有“活性”之微生物的總量。生物可能在不利環境中以休眠的方式存在於土壤環境中，然而這部分的 DNA 仍就會在實驗過程被偵測到。此一結果也顯示，未來若要探討真正具有降解活性之微生物



物，需透過 RNA 或是 SIP 的實驗方法，才能得到較直接的結果。然而此功能基因占總體微生物 16S 基因之比例僅有萬分之一，後續若透過 RNA 層級進行分析，如何萃取並純化濃縮真正具有降解二氯苯之 RNA，會是很大的挑戰。因此，此結果更顯示未來相關研究可能透過發展 SIP 技術成功率較高。



圖十五、厭氧培養實驗，不同碳源與氮磷營養鹽添加處理下，土壤功能基因 *bphA* 拷貝數變化 (Y 軸為對數刻度)

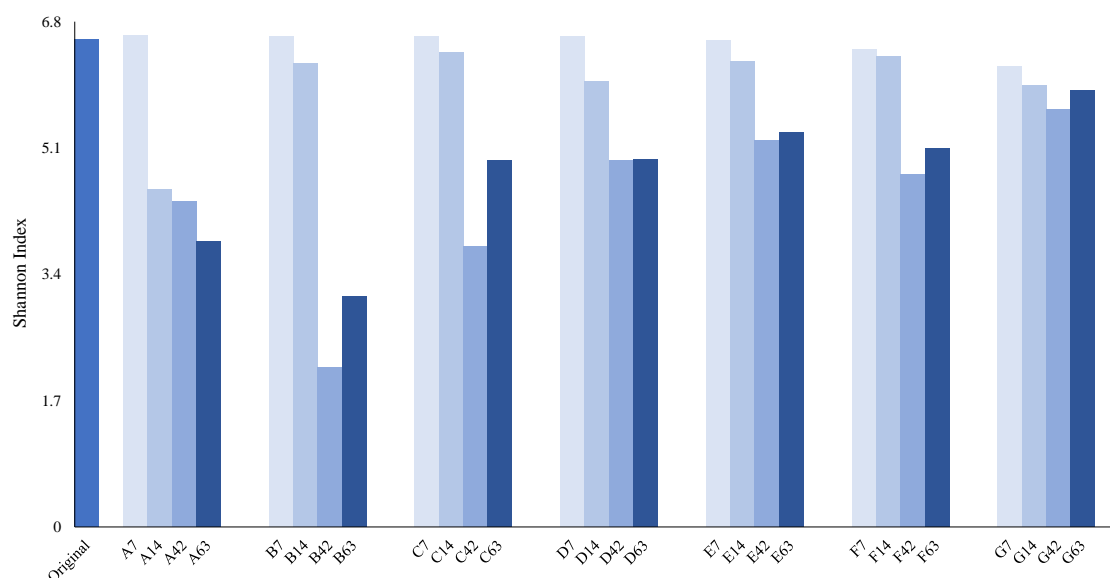


以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

5.2 厭氧培養實驗之總體與功能性微生物

經由次世代定序的結果，本研究發現，若以不同培養處理之土壤微生物 alpha 多樣性來看，在有添加二氯苯的環境下，其微生物多樣性隨時間有減少之趨勢（圖十六）。在剛添加二氯苯的樣品中，其微生物多樣性的結構與初始狀況並無明顯變化。此一結果與圖十四對照後可進一步證明，二氯苯對於土壤微生物整體而言具有相當程度的毒性，而此毒性會全面性的削減微生物的總量，然而多樣性指數計算的依據是各物種的相對占比，因此整體而言並無明顯變化。

然而在添加二氯苯之後的培養過程中，可發現無論進行何種碳源與氮磷營養鹽的添加組合，其多樣性指數皆呈現下向的趨勢。此一結果顯示，絕大多數環境中的微生物並無降解二氯苯之能力，因此在長期培養的狀況下，僅剩對二氯苯耐受性較佳之微生物具有存活能力，是故整體多樣性下降。而對照的組別 G，則因為無添加二氯苯，因此多樣性指數並無明顯變化。

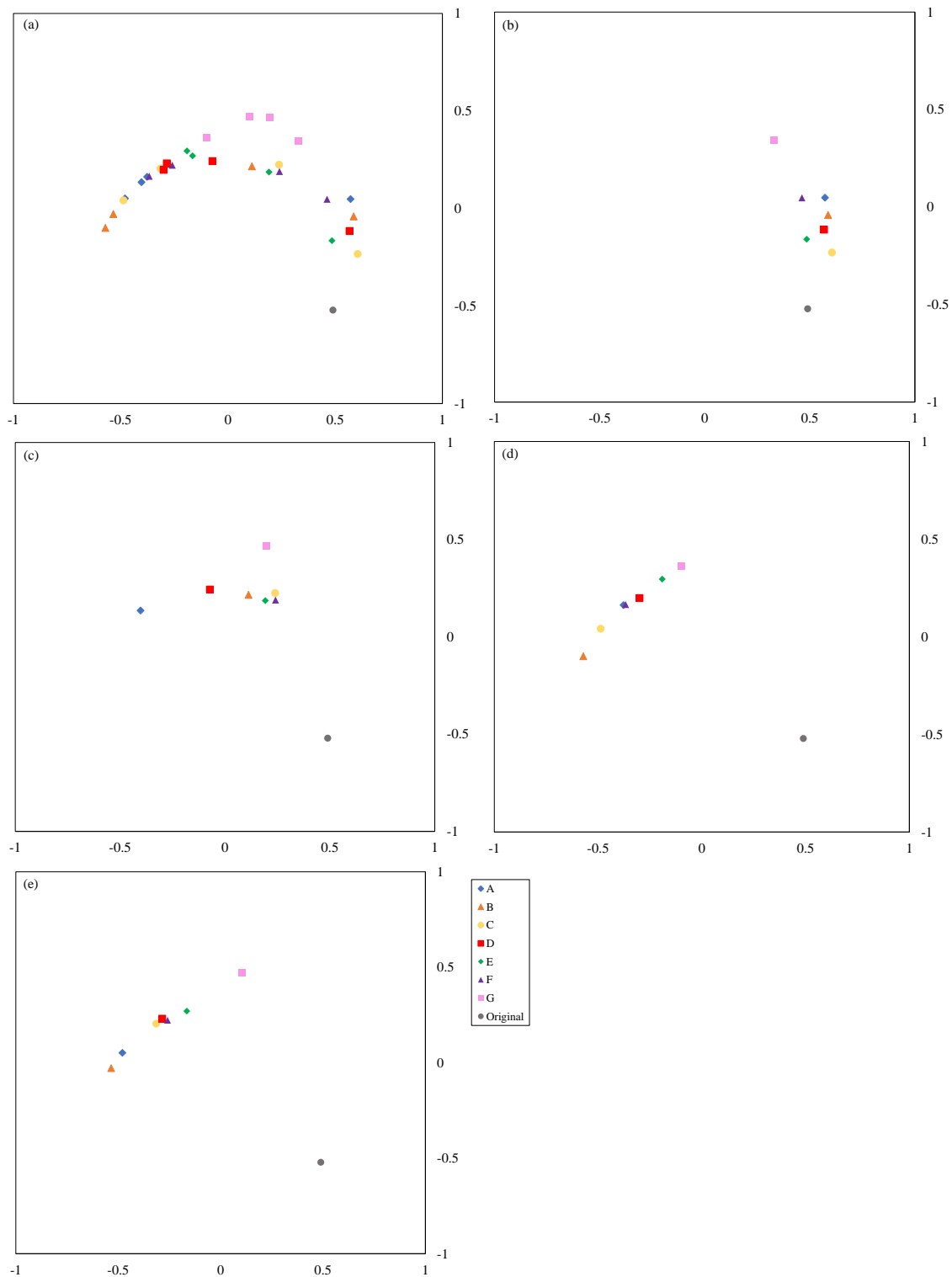


圖十六、厭氧培養實驗中，不同碳源與氮磷營養鹽添加下，其土壤 alpha 多樣性指數之變化

透過非度量多維度分析（Non-metric Multidimensional Scaling; NMDS）更可以清楚看出，無論是何種的碳源與氮磷的處理方式，其微生物菌相的變化在初期較為劇烈，而在培養後第 42 天與第 63 天的菌相才漸趨穩定，然而其整體菌相相對於初始的土壤微生物，則有很明顯的偏移(圖十七)。此外特別在組別 D，其微生物整體的菌相變異在培養後 14 天即漸趨穩定 (圖十七 C、D、E)，此一結果表



示，添加氮磷營養鹽的環境下，降解二氯苯之微生物族群馴化較快，此結果亦反應到該組可明顯在培養後期觀察到高濃度的氯離子於土壤中。

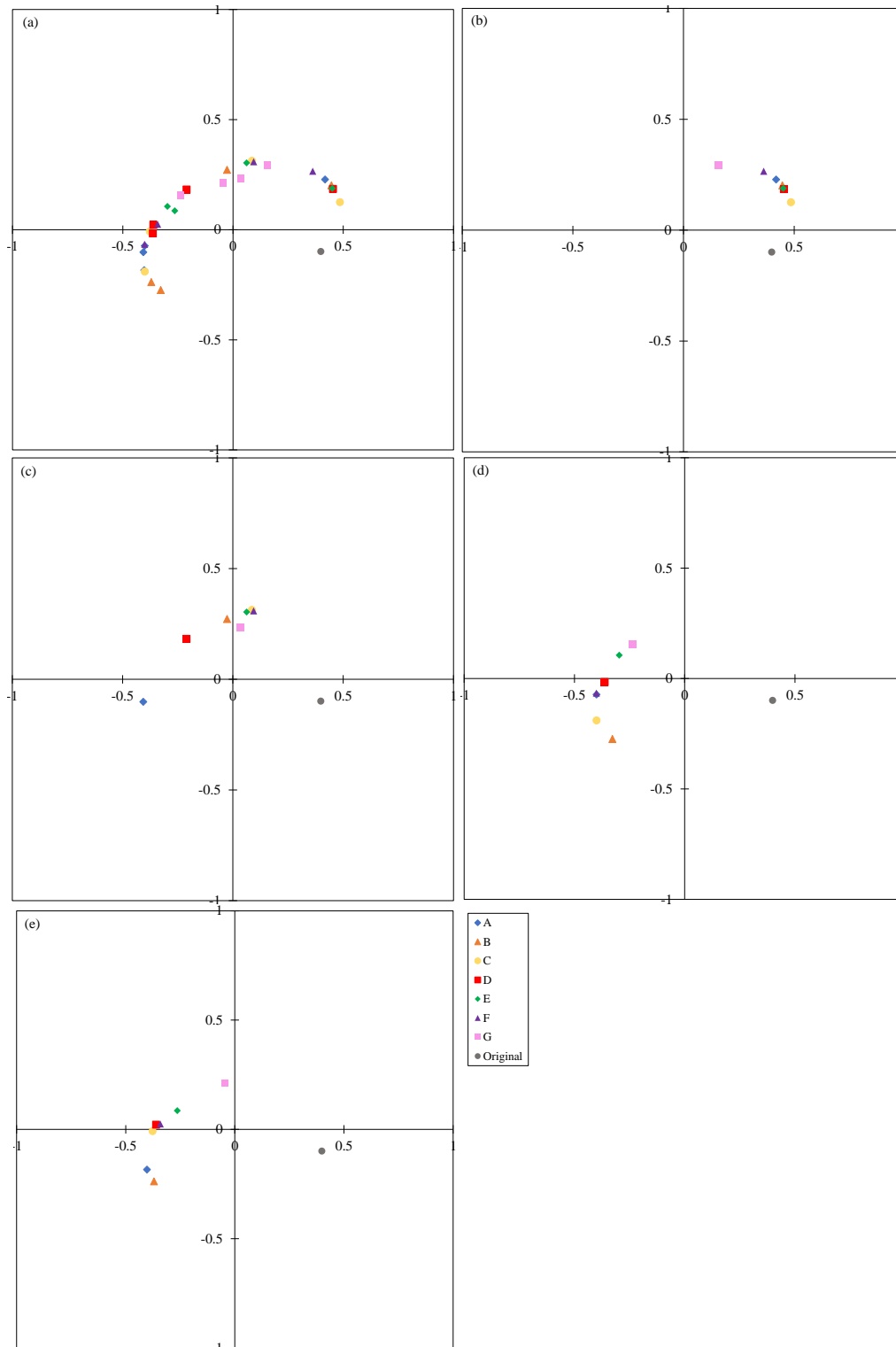


圖十七、厭氧培養實驗之土壤微生物 NMDS 分析。(a)全培養週期；(b)培養 7 天後；(c)培養 14 天後；(d)培養 42 天後；(e)培養 63 天後。



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

如同 NMDS 的分析結果，主成分 (PCoA) 分析結果亦發現，微生物在二氯苯添加後，除組別 D 以外，約需 30 天以上才能使其微生物族群結構漸趨穩定，且添加氮磷對於其微生物馴化有正面的幫助 (圖十八)。

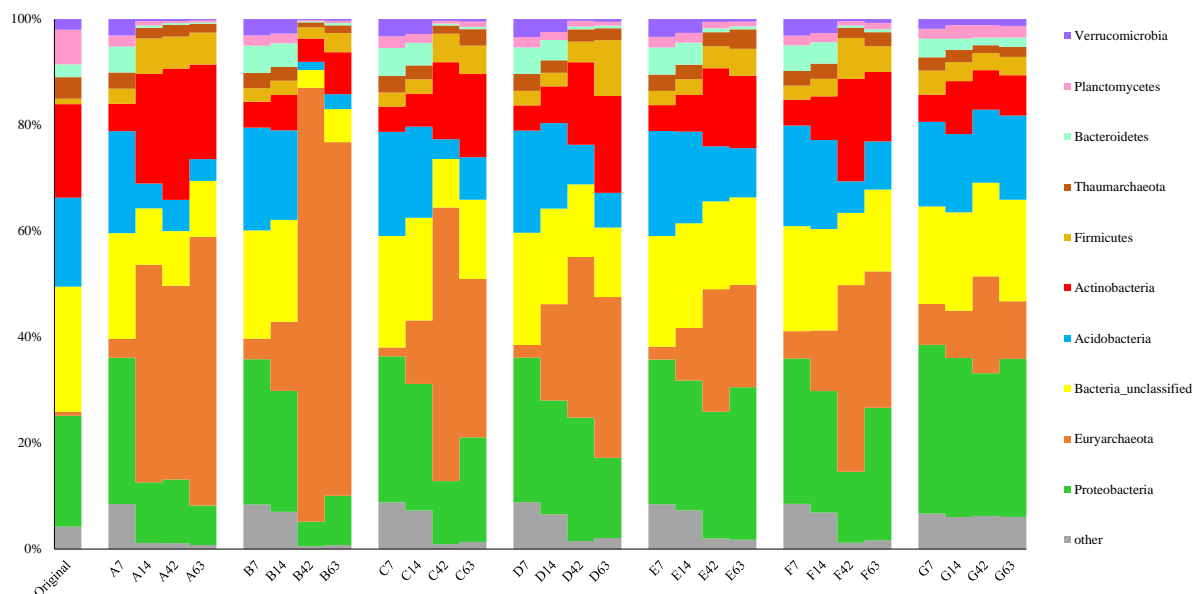


圖十八、厭氧培養實驗之土壤微生物 PCoA 分析。(a)全培養週期；(b)培養 7 天後；(c)培養 14 天後；(d)培養 42 天後；(e)培養 63 天後。



經由次世代定序並進行微生物物種鑑定比對的結果可發現，在菌門層級的相對豐富度，其多數菌門隨時間占比皆減少，相對豐富度比例增加最多的為廣古菌門 (Euryarchaeota) (圖十九)。其構成本菌門主要的生物有相當大比例是與自然界產甲烷機制有關之菌綱。過去的研究亦顯示，在厭氧環境下，含氯有機物的分解，有一部分極可能透過環境中的產甲烷菌進行。例如過去即有文獻顯示產甲烷菌具有代謝六氯環己烷的能力 (Yuan et al., 2021)；亦有研究觀察到產甲烷菌具有降解五氯酚的可能 (Zhu et al., 2019)。因此本研究推測，此菌門的相對豐富度，在培養的過程中呈現增加的趨勢，可能與代謝二氯苯有關。

此外，定序結果也發現，放射菌門 (Actinobacteria) 亦為少數在培養實驗中，相對豐富度增加的菌門。由於放射菌門一般而言所包含的許多菌綱，皆有抵抗含氯抗生素的能力，甚至過去本菌門之許多微生物更是用於醫學上提煉抗生素的來源，過去研究更表示這類型的菌門，在高鹽份與高氯離子濃度 (~5%) 的環境之下仍然具有環境的耐受性 (Remenar et al., 2014; Cruz-Morales et al., 2017; Amin et al., 2020)，因此推測本研究該菌門的相對豐富度增加，雖無法確認是否其能降解含氯有機物，但是該菌門的微生物多數應對氯離子忍受度較高。



圖十九、厭氧培養實驗中，不同處理的菌門相對豐富度與培養時間變化

變形菌 (Proteobacteria) 門亦是本厭氧培養實驗中，另一個含量較多的菌門。尤其在添加了氮磷營養鹽的組別 D、E 以及 F 三組中，Proteobacteria 相對的豐富度都維持在 20-30%之間。過去研究即表示 Proteobacteria 門的微生物族群，許多

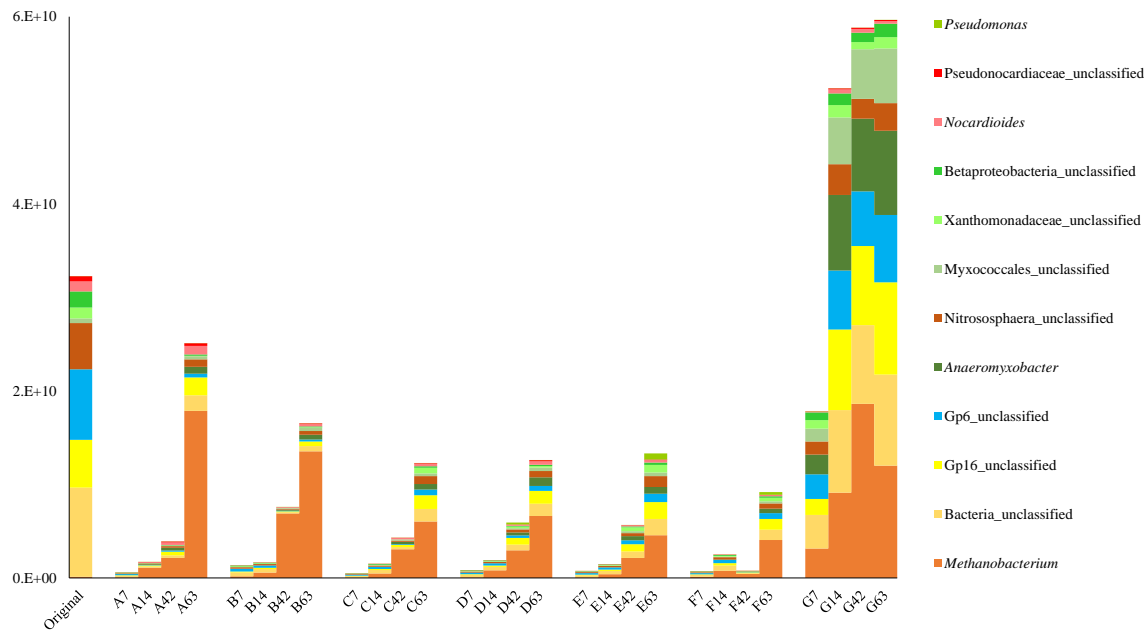


以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

都具有降解如含有機質、氮及磷等污染物能力之微生物 (Ma et al., 2018)。尤其是此菌門中的 δ -proteobacteria、 γ -proteobacteria 以及 β -proteobacteria 等菌綱，在過去的研究中，皆發現常出現在厭氧環境中的優勢微生物菌綱，尤其是 β -proteobacteria 中，包含了許多自然界中常見之脫氮微生物 (Ligi et al., 2014; Wang et al., 2012)。因此本研究結果的組別 D、E 以及 F 三組其 proteobacteria 門含量能隨培養時間維持穩定，推測主要因其為異營性微生物，甚至是具有脫氮能力之菌群為主的結構，是故添加氮磷營養鹽有助於維持此異營微生物的族群結構穩定。相比之下，組別 A、B 以及 C 三組由於土壤本身所含之氮磷元素有限，可能導致培養後期營養鹽缺乏，致使 proteobacteria 的菌門豐富度下降。

由於次世代定序可取得微生物族群結構全面的數據結果，因此細分的微生物菌數較多，本研究乃針對在培養實驗中，相對豐富度占比含量超過總體微生物族群大於 1% 之優勢菌屬進行篩選，並將所得之菌屬比例，搭配即時螢光定量結果，進行絕對豐富度的計算，得到厭氧培養實驗之菌屬絕對豐富度 (圖二十)。從優勢菌屬的層級可清楚發現，在二氯苯降解的厭氧培養實驗中，最優勢的菌屬即為產甲烷菌 *Methanobacterium*。另外亦有少量 *Pseudomonas*、*Nocardioides* 以及 *Anaeromyxobacter*。而這三種菌屬，在過去已有許多研究表示其具備降解含氯有機物的能力 (Zhang, 2017; Sanford et al., 2002; Ito et al., 2020)，因此推測本研究該三種菌屬之絕對豐富度具優勢的現象與二氯苯降解應該有一定程度之關聯。

值得一提的是，本研究在厭氧培養過程發現，優勢的微生物菌屬，除了上述四種以外，土壤環境中，存在非常大量現今微生物序列資料庫 (RDP Database) 無法比對之 Unclassified 菌屬。此一結果顯示，過去雖然許多文獻證實環境中如 *Pseudomonas*、*Nocardioides* 以及 *Anaeromyxobacter* 降解含氯有機物的功能，然而自然界中，仍然有相當可能存在為數不少的微生物具備降解含氯有機物的能力，然而其物種可能因為受限於厭氧環境條件，較難在實驗室進行菌株的分離，以至於至今仍然無法確認其菌屬。此一結果亦充分顯示，未來若要廣泛應用微生物進行土壤污染整治技術，對於微生物種類的挑選，可能不僅限使用文獻上目前已知的幾種常見物種，對於新物種的調查，可能會是讓微生物整治技術發展更成熟的關鍵之一。此外，如同前面所述，未來研究亦可考慮透過 RNA 層次或是 SIP 層次的研究，搭配全基因體的定序來釐清這些未知物種種類與代謝含氯有機物的機制。



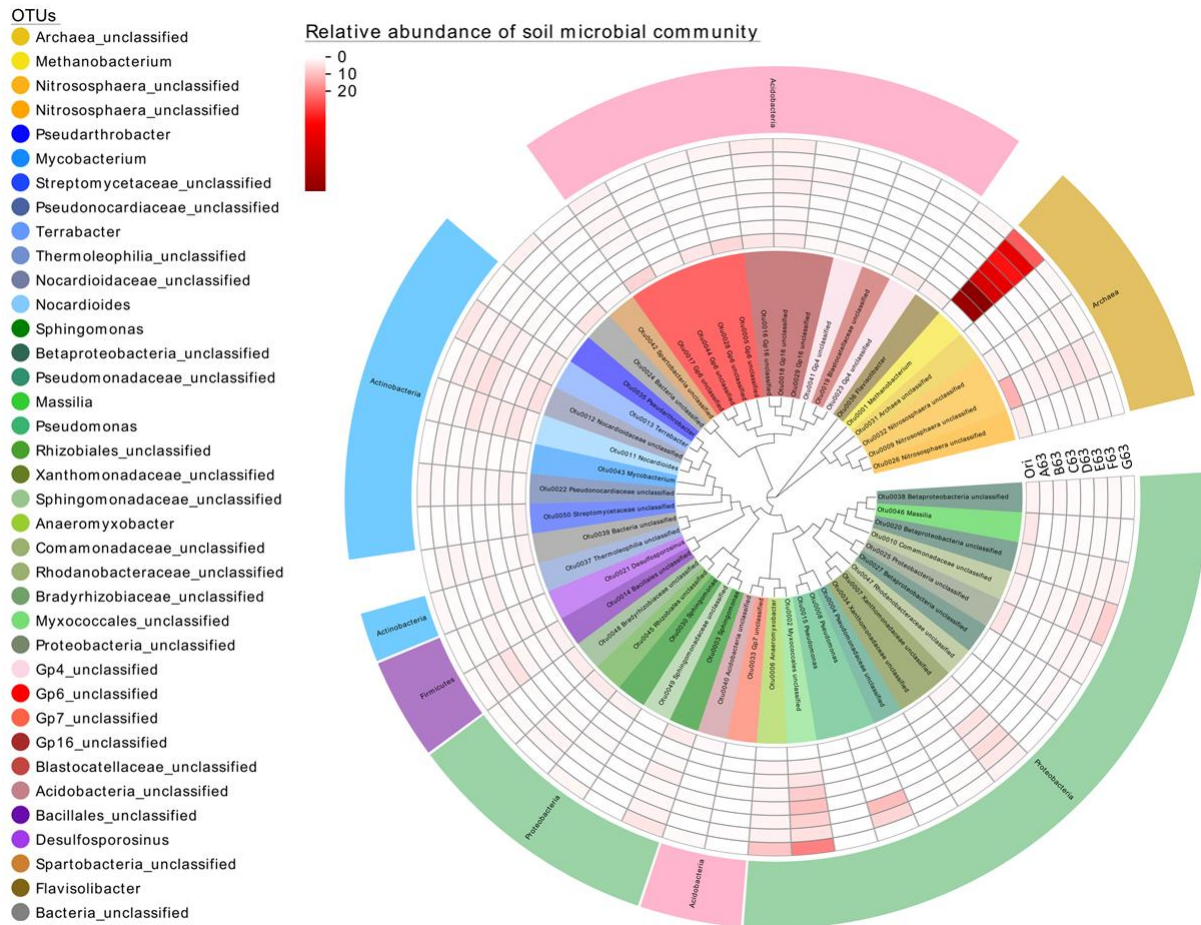
圖二十、厭氧培養實驗中，不同處理的優勢菌屬絕對豐富度與培養時間變化

經由透過 OTU 代表序列的分析，整合性的挑出在本厭氧培養實驗中，最具優勢的 50 個 OTU 代表序列進行系統發育樹的繪製（註：OTU 邊號數字越小表示其物種豐富度排序越高），同時搭配其豐富度占比可發現，如同先前菌屬絕對豐富度的分析，最具代表的 50 種 OTU 序列以未知物種為主（圖二十一）。此外，在相對豐富度占比最多（尤其以降解氯苯可能最高之組別 B 與組別 D）的菌屬即為產甲烷菌。另外變型菌門(Proteobacteria)在前 50 種 OTU 代表序列中，種類最多且最廣，然而其豐富度則較為次要。

另外值得注意的是，未知菌中歸屬於黏球菌目(myxococcales)的某菌屬，其豐富度僅次於產甲烷古菌 *Methanobacterium*。由於黏球菌目屬於變形菌門中的 δ -proteobacteria 菌綱，在此菌綱中已有發現許多與脫氮機制有關之微生物物種，因此本研究結果顯示，可能在本菌目中，亦存在具有降解含氯有機物之微生物物種。然而過去對於本菌目並無提及太多有關於代謝污染物的討論。未來也許可針對這個菌目進行更深入的分析研究。



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性



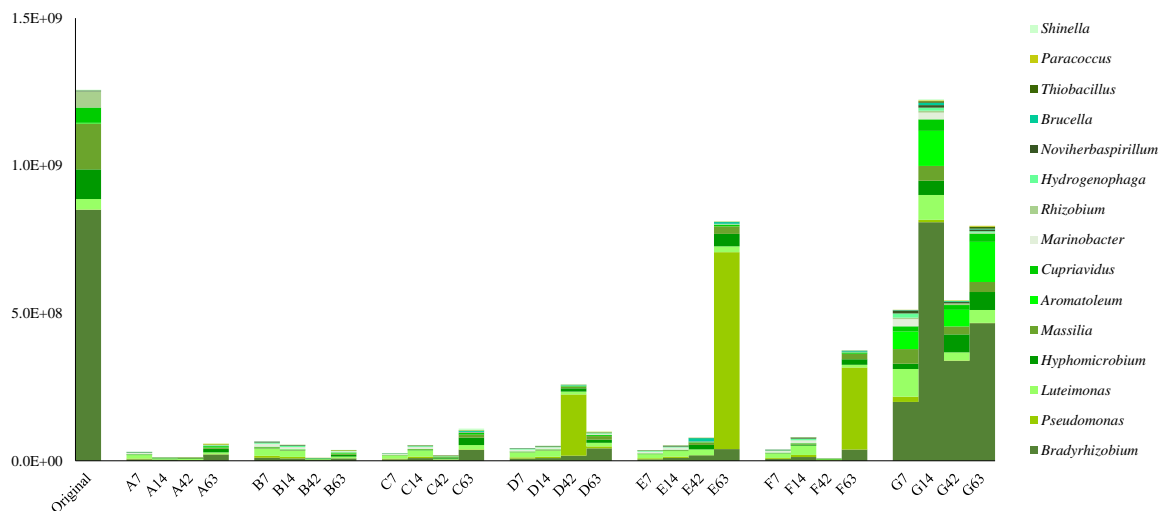
圖二十一、二氯苯降解之厭氧培養實驗，前 50 個 OTU 代表序列與碳氮磷元素添加與否之培養結果的系統發育樹與豐富度

由於過去研究表示，自然界中可能進行含氯有機物代謝的微生物可能除了產甲烷微生物以外 (Yuan et al., 2021)，另一個主要的功能微生物類型可能為脫氮微生物。如 Liang 等人 (2016) 研究顯示厭氧環境的微生物菌群包括脫硝細菌 denitrifying bacteria、厭氧發酵細菌 anaerobic fermentative bacteria、嗜乙酸產氫細菌 hydrogen-producing acetogenic bacteria 會隨著鄰二氯苯濃度的提高而對菌群豐度產生影響。

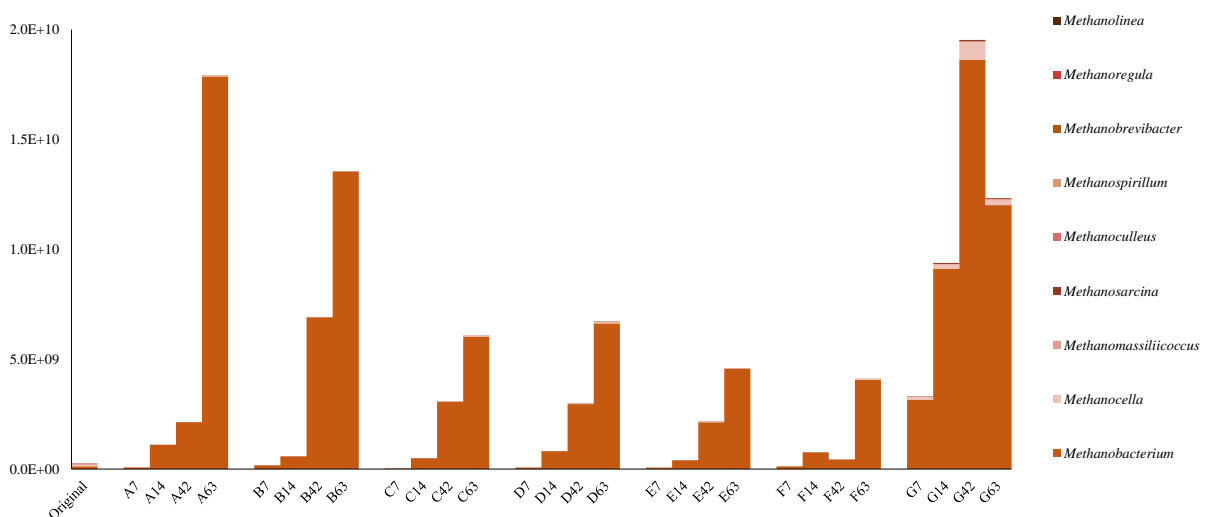
因此本研究經由 KEGG 代謝資料庫中已知的脫氮以及產甲烷微生物菌群進行更進一步的挑選分析，並藉由即時螢光定量結果計算此兩種菌群之各種菌屬絕對豐富度，得到結果如下圖二十二與二十三。結果顯示，脫氮微生物與產甲烷微生物，在二氯苯降解實驗的厭氧培養過程中，以產甲烷微生物占絕對優勢，其產甲烷微生物總量於培養實驗後期，尤其以沒有添加氮磷之組別，其產甲烷菌約可達脫氮菌數的百倍之多 (10^9 vs 10^7 數量級)。然而如組別 D 為例，雖然脫氮菌總



量較少，但是因其為細菌而非古菌，因此代謝二氯苯的活性可能較大。此一結果也可解釋在功能基因總量的差異上，B 組別的脫氯基因含量多，然而其氯苯降解的相關參數卻較其他組別而言沒有明顯差異。此外研究結果亦可看出，添加了氮磷營養鹽之後，刺激了脫氯相關微生物族群的生長，相反的抑制了產甲烷菌的族群豐富度，因此在組別 D 較高的氯離子產量，應可能歸因於脫氯菌的增加。尤其是在組別 D、E 與 F，其最主要的脫氯菌即為過去文獻中證明具有脫鹵酵素的 *Pseudomonas*，因此更可推測本研究的二氯苯降解一定程度上由本菌屬所貢獻。



圖二十二、厭氧培養實驗中，不同處理的脫氯微生物菌屬絕對豐富度與培養時間變化



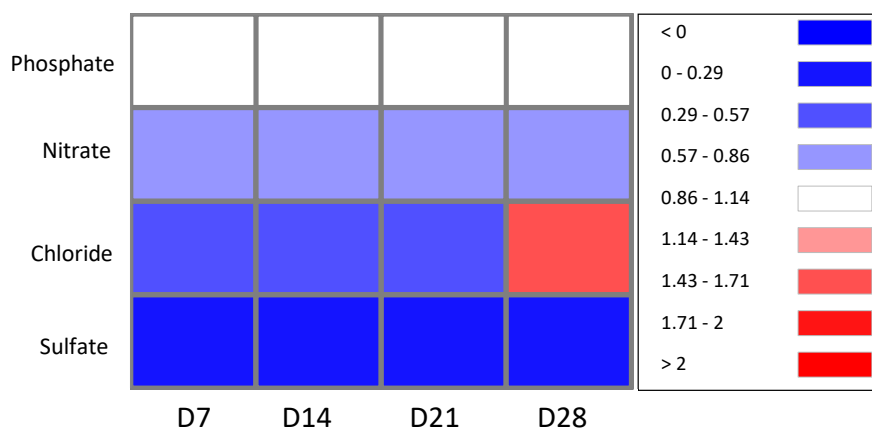
圖二十三、厭氧培養實驗中，不同處理的產甲烷微生物菌屬絕對豐富度與培養時間變化



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

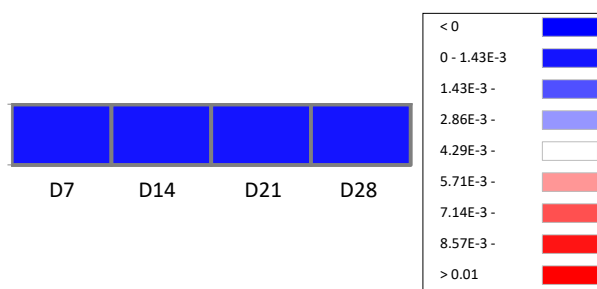
5.3 好氧環境下土壤二氯苯降解之微生物活性、總量與族群結構變化

本研究在透過好氧培養實驗條件下，亦針對二氯苯降解進行實驗做為對照。由於原預期好氧分解速率應會比厭氧分解速率快，且由於後續定序與數據分析需要時間之故，設定的好氧培養時間為 0 至 28 天，且以每周為單位進行相關的分析，此外由於是好氧培養，因此碳源的部分僅使用二氯苯而無添加無機碳。氮磷營養鹽的部分則因為厭氧實驗結果顯示，以二氯苯為碳源之微生物可能同時會有氮磷之需求，因此本好氧培養實驗皆添加 10mM 之 NH_4NO_3 與 K_2HPO_3 。然而其結果顯示，在僅有 28 天的培養下，氯離子的濃度除了在 28 天時略有少量增加以外，並無太明顯的脫氯反應，推測可能需要更長的培養時間才能看到明顯結果 (圖二十四)。



圖二十四、好氧培養實驗，土壤陰離子濃度隨時間之變化率。紅色(大於 1)表示濃度較培養前增加，藍色(小於 1)表示濃度較培養前減少。

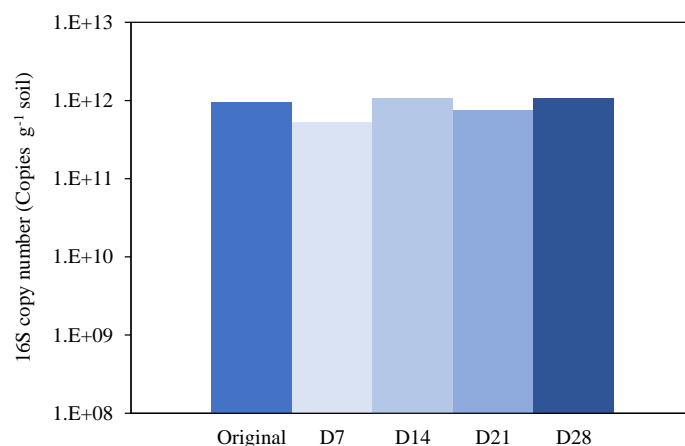
在二氯苯濃度的變化上，可能由於培養時間較短，微生物族群尚未達到穩定馴化的現象，因此氯苯降解的反應並不明顯 (圖二十五)。



圖二十五、好氧培養實驗土壤二氯苯濃度變化 (圖例：削減率)



總體微生物的族群數量上，透過即時螢光定量 PCR 的分析，亦呈現無顯著差異的結果（圖二十六）。由於好氧環境的微生物普遍上生長較厭氧微生物快速，因此即便二氯苯添加對土壤微生物具有毒性的影響，其微生物族群結構的生長速度亦可能在七天內復原回原本的豐富度大小，因此導致在培養期間總體微生物的數量沒有顯著變化。此外值得一提的是，在好氧培養的樣品中，土壤總體微生物的總量，約為厭氧培養實驗中的 10-100 倍，更可顯示好氧環境對於大多數微生物的生長具有正面效益。



圖二十六、好氧培養實驗土壤總體微生物 16S rRNA 數量隨時間變化 (Y 軸為對數刻度)

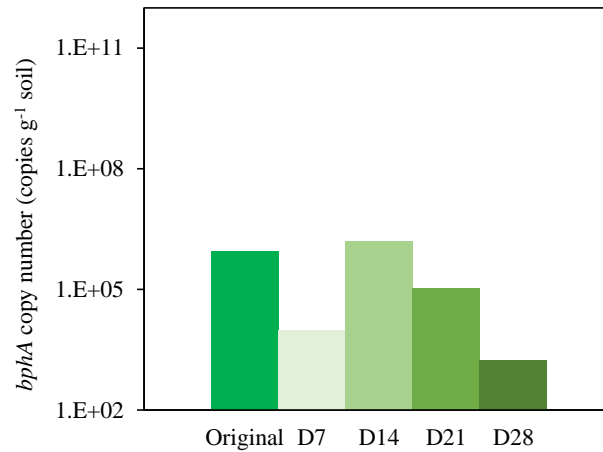
同樣的在分析樣品中脫氯的 *bphA* 功能性基因總量變化可發現，雖然好氧環境的總體微生物總量相較於厭氧多了數十倍，但是功能性微生物總量相比於厭氧培養的實驗結果卻是不增反減（圖二十七）。因此使得該功能基因占總體微生物的 16S 基因僅不到千萬分之一(0.0000001)。推測可能的原因是因為過去文獻上所提到的脫氯微生物主要以脫氯菌與產甲烷菌為主，這兩種菌大多都是在厭氧環境條件較有利。在好氧的環境條件下，推測可能因為需要與其他好氧微生物共同競爭，因此反而不利其生長，導致 *bphA* 下降。此一結果亦反應在前述圖二十四的結果，整體好氧培養的過程，土壤中的氯離子濃度增加幅度並不大，可能即因為相關代謝氯苯之生物並無在 28 天的培養時間內形成較具優勢的菌群。

過去亦有研究顯示(郭紘志，2018；國立成功大學吳哲宏教授研究團隊)，部分含氯有機物的代謝須先由厭氧脫氯後，才經由好氧菌進行代謝。亦有研究顯示其他含氯有機物在厭氧環境下處理效果更加理想。本研究所得之結果初步證實，對於二氯苯的降解在厭氧環境條件下可能較好氧環境更佳。另一個可能原因是好



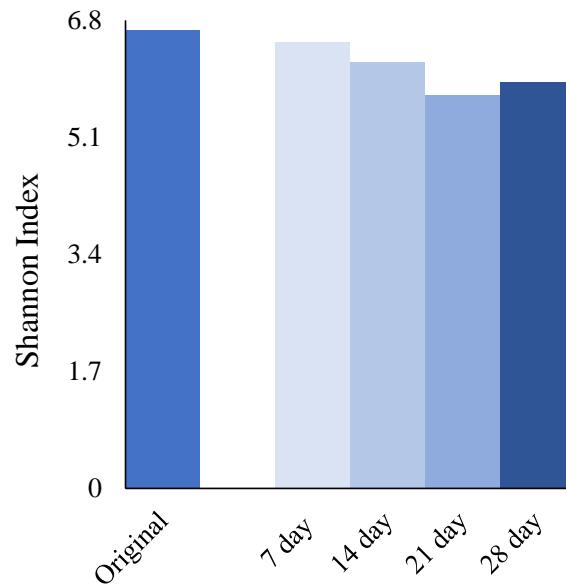
以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

氧的培養時間較短，未有足夠的時間讓相關降解微生物馴化。



圖二十七、好氧培養實驗下，土壤功能基因 *bphA* 拷貝數變化 (Y 軸為對數刻度)

同樣在經由次世代定序結果分析之後，本研究發現好氧培養的土壤微生物 alpha 多樣性隨時間並沒有呈現太多的變化，且整體多樣性在不同時間點，皆高於厭氧培養實驗的微生物多樣性 (圖二十八)。然而其對於二氯苯的代謝卻不如厭氧培養實驗，這結果與前述資料一致，可能原因在於能夠降解二氯苯微生物族群尚未發展完全，或是相關微生物尚未馴化完成。這樣的結果亦可能暗示，對於二氯苯降解之微生物族群，在自然環境中屬於生態學中的 *K*-selection strategy 物種，對於環境逆境較小的好氧條件下，其微生物族群在競爭營養鹽上 (尤其是外源添加之氮磷營養鹽)，相比起其它 γ -selection strategy 物種而言競爭力較弱。

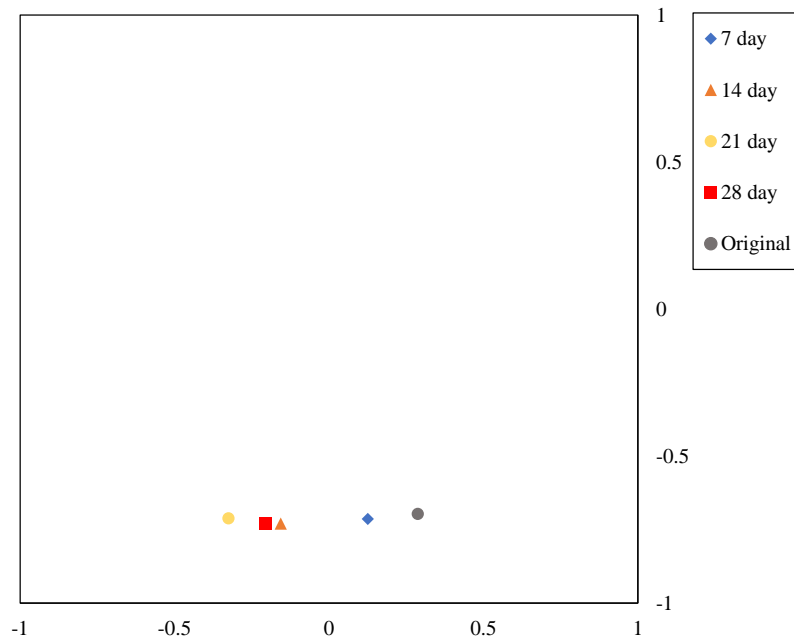


圖二十八、好氧培養實驗中，土壤 alpha 多樣性指數隨時間之變化

透過非度量多維度分析 (Non-metric Multidimensional Scaling; NMDS) 可以清楚看出，其整體微生物的菌群變動並不大 (圖二十九)。同時由前述數據結果可更佳印證，土壤在好氧的環境條件下，能夠降解二氯苯的微生物，其族群活性可能較其他物種而言趨於弱勢，且由於該微生物對於氮源與磷源等營養鹽在生長上為必備需求，因此其生長速度受限與其他物種競爭，導致可能需要更長的培養時間才能看出降解二氯苯的效果。過去研究亦表示，對於含氯有機物如二氯酚，其好氧下的降解時間依據不同的菌液來源，可能會在 4—20 天之間 (陳谷汎, 2001; 國立中山大學高志明教授研究團隊)。而本研究的二氯苯在好氧的環境條件下可能因為具有苯環的關係，需要 20 天以上的時間才能出現些微的降解反應。

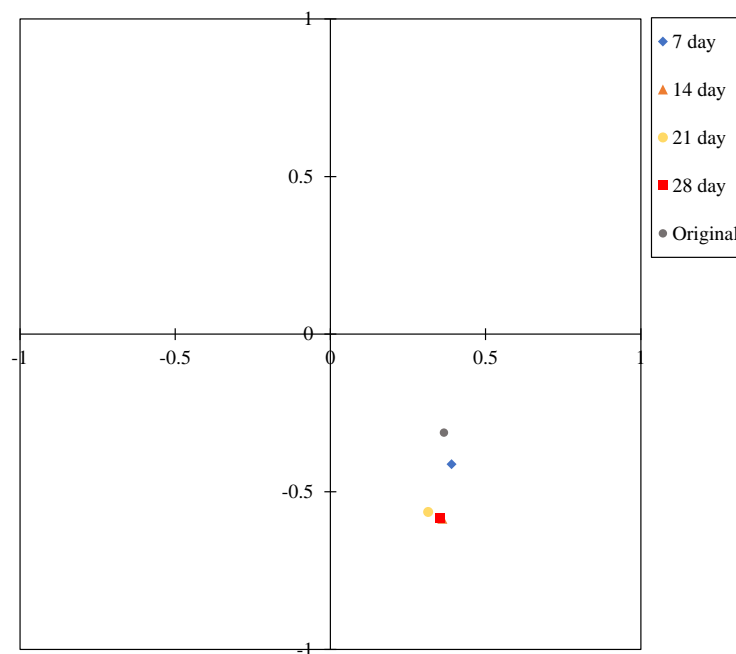


以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性



圖二十九、好氧培養實驗之土壤微生物 NMDS 分析

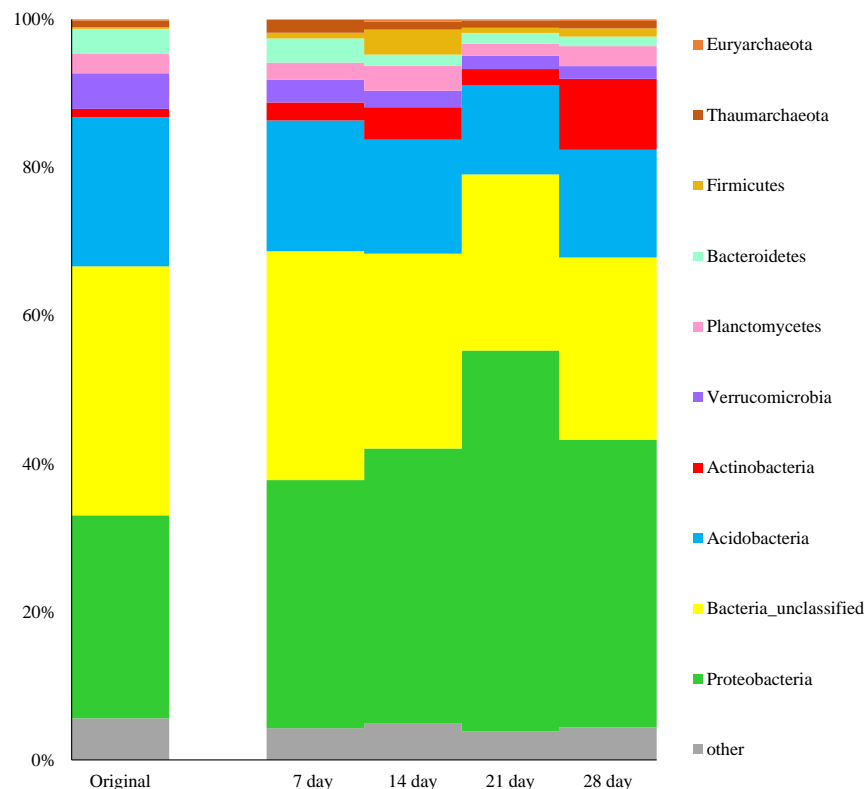
如同 NMDS 的分析結果，在好氧培養實驗中，微生物的組成結構透過主成分 (PCoA) 分析結果亦發現，整體的微生物菌相並沒有太大的變異 (圖三十)。其推論如同 NMDS 的結果，呈現的應該是因為二氯苯降解微生物與其他環境微生物的生長策略差異造成 (γ/K selection strategy)。



圖三十、好氧培養實驗之土壤微生物 PCoA 分析



經由次世代定序並進行微生物物種鑑定比對的結果可發現，在菌門層級的相對豐富度，與厭氧培養實驗最大的差異在於，本好氧實驗主要的優勢菌門為變形菌 (Proteobacteria)，另外亦有占比約 20 % 左右無法分類之未知微生物 (圖三十一)。由於本研究使用之 16S 引子對為 515F/806R 之片段，其單股片段長度小於 300 base pairs，因此這些未知物種應該非正反序列互相拼接時所可能產生的嵌合體。是故，在好氧環境中，可能存在許多未知微生物種，然而這些物種是否與二氯苯降解有直接關聯，仍然需要更進一步的研究才能確認。

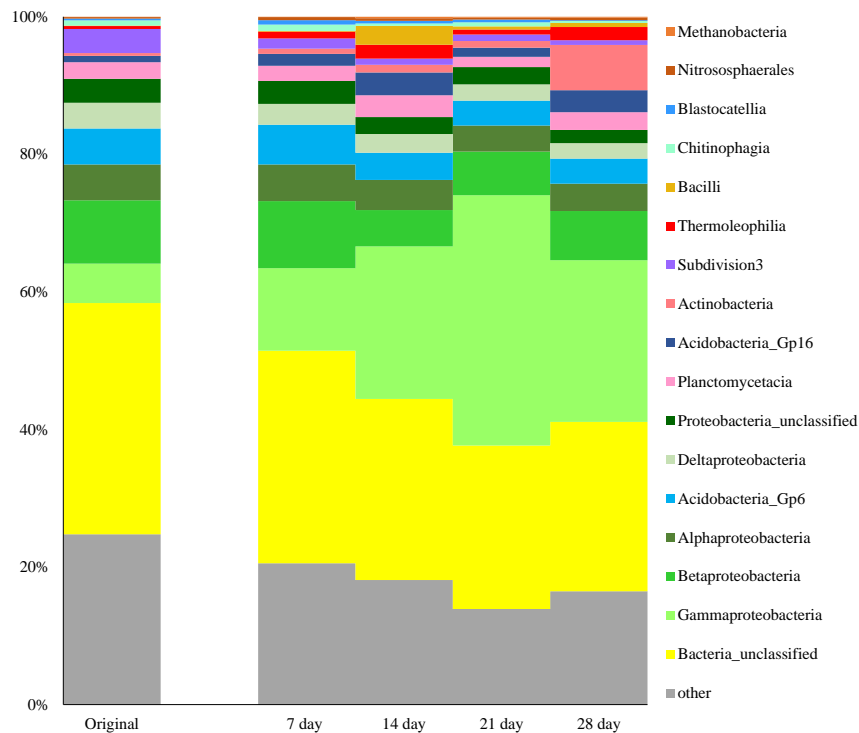


圖三十一、好氧培養實驗中，不同菌門相對豐富度與培養時間變化

進一步分析好氧培養實驗中定序結果，可發現若從菌綱層級來看，最大量的微生物菌綱為屬於變形菌門的 γ -proteobacteria 菌綱，且在培養後期其菌綱相對豐富度有呈現上升的趨勢 (圖三十二)。然而由於 γ -proteobacteria 菌綱在生態系中，涵蓋了包含絕對好氧與兼性厭氧菌，且細分的各種物種亦可能有無機自營、有機化營、光合自營與有機異營菌等各式種類，因此其菌綱對於二氯苯降解的具體影響無法從此層級推知。然而這個菌綱裏面包含了過去許多研究中，大量被提及具有降解含氯有機物的 *Pseudomonas* 菌屬，因此亦不能排除此菌綱與二氯苯降解無直接關聯。



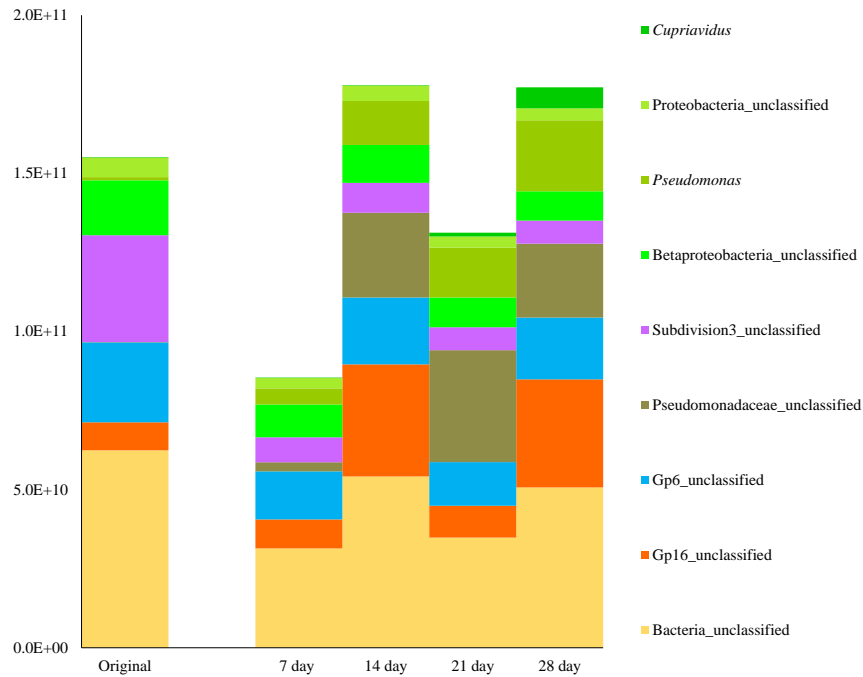
以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性



圖三十二、好氧培養實驗中，不同菌綱相對豐富度與培養時間變化

如同厭氧培養實驗的分析，本研究在利用定序所得之菌屬比例，搭配即時螢光定量結果，進行絕對豐富度的計算，得到好氧培養實驗之菌屬絕對豐富度 (圖三十三)。由本研究結果可發現，在培養後期可見到 *Pseudomonas* 的絕對豐富度有明顯的增加，尤其是在 Day 21 到 Day 28，其豐富度接近達到兩倍的增加量。由於該菌屬在過去許多文獻皆被大量用來進行含氯有機物的降解實驗，因此本研究最後氯離子濃度的增加，應該與本菌屬增加有相當程度的正向關聯。另一項在 Day 28 有大量增加的菌數則為 *Cupriavidus* 屬。過去亦有研究針對本菌屬討論其作為生物復育降解環境污染物的可行性，並發現該菌屬可能具備降解如 2,4-D 的含氯有機物 (Don et al., 1985; Huang et al., 2017)。因此本研究亦推測在好氧環境條件下，該菌屬可能具備降解二氯苯的能力。

除此兩種已知菌屬以外，本研究發現在好氧培養條件下，超過 80% 的微生物菌屬皆為目前資料庫的未知菌屬，尤其以屬於嗜酸菌門 (Acidobacteria) 中的 Gp16 這個群集的微生物在培養後亦有明顯豐富度增加趨勢。未來亦可針對這個群集中的微生物進行更深入的研究探討，以了解其是否對於含氯有機物具有降解能力。

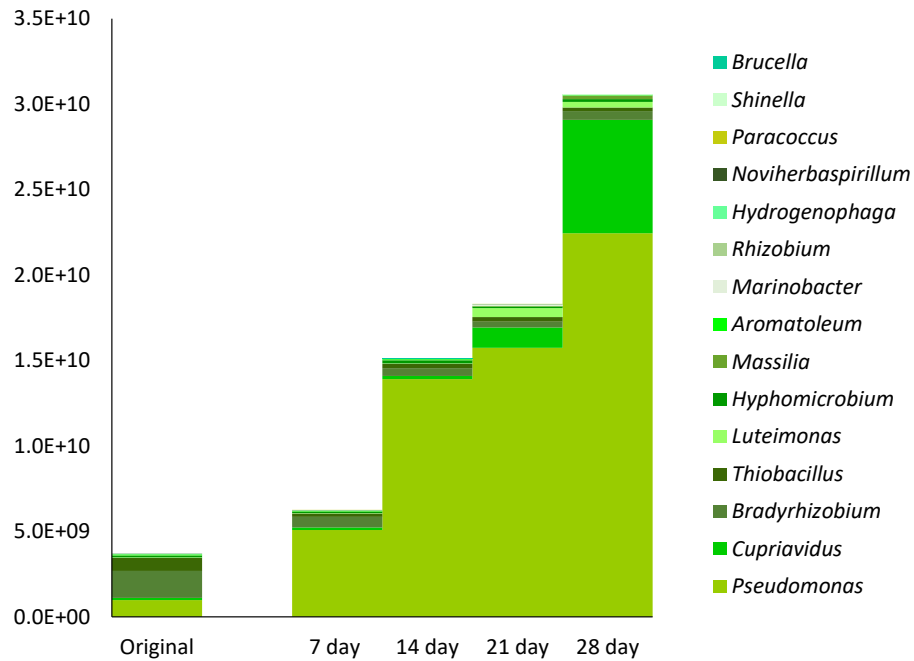


圖三十三、好氧培養實驗中，優勢菌屬絕對豐富度與培養時間變化

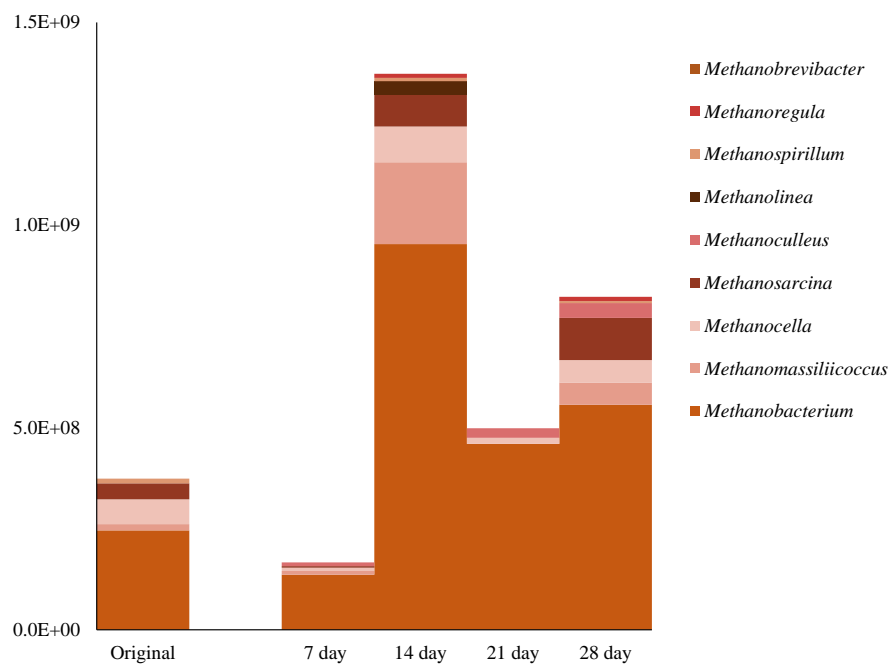
研究同樣針對 KEGG 代謝資料庫，挑選好氧培養實驗中，已知的脫氮與產甲烷微生物菌屬，並計算絕對豐富度後，得到結果如下圖三十四與圖三十五。結果可明顯發現，在好氧培養的條件下，產甲烷古菌的絕對量相比於脫氮菌的絕對量僅有其十分之一到百分之一的量。由於未知微生物的菌屬不列在本兩個功能微生物菌群中，因此更可清楚看出，至少在目前已知的脫氮菌屬主要就是以 *Pseudomonas* 為主，且其豐富度隨時間增加。而產甲烷菌由於大多屬於絕對厭氧菌，也因此絕對量較少，但是主要最優勢的產甲烷菌仍為 *Methanobacterium*。然而在好氧培養實驗過程中，這些絕對的優勢物種是否有實際進行二氯苯降解的反應，從氯離子濃度的增加量以及二氯苯濃度的變化量看起來，可能行反應的機會不大。



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性



圖三十四、好氧培養實驗下，脫氮微生物菌屬絕對豐富度隨時間的變化



圖三十五、好氧培養實驗下，產甲烷微生物菌屬絕對豐富度隨時間的變化



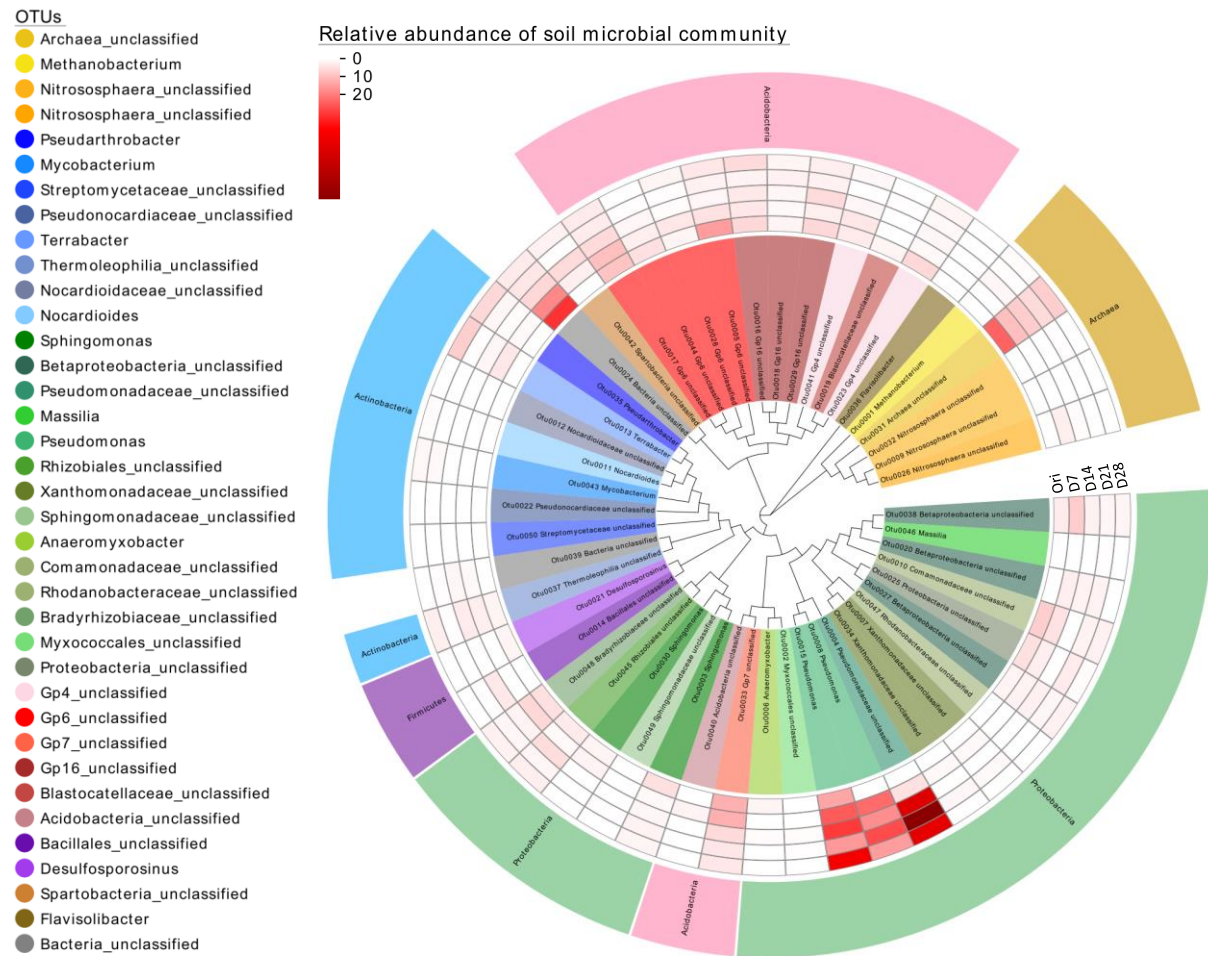
經由透過 OTU 代表序列的分析，最具優勢的 50 個 OTU 代表序列進行系統發育樹的繪製並搭配其豐富度占比可發現，主要的 50 種 OTU 序列以未知物種為主 (圖三十六)。此外變形菌門 (Proteobacteria) 在前 50 種 OTU 代表序列中，種類最多且最廣。然而與厭氧培養占比最高的廣古菌門不同的是，在好氧培養實驗中，變形菌門亦是占比最高的菌門。

此外，如同先前菌屬絕對豐富度的分析，其中豐富度占比最高之菌屬為 *Pseudomonas*，另外亦有相當比例，歸屬於 *Pseudomonadaceae* 科的未知微生物。此外在培養後期也觀察到 *Terrabacter* 菌屬的相對豐富度有呈現上升的趨勢，然而查詢過去文獻，並沒有任何研究提到該菌屬與含氯有機物降解的關聯，此外在其他 OTUs 的相對豐富度占比在好氧培養實驗相比於厭氧培養實驗更加均勻分布。因此推測這些較優勢的 OTU 代表序列中，應該有許多與二氯苯降解無關，然而卻在環境中與能降解含氯有機物的物種競爭，導致整體二氯苯降解速率不如預期。

此外值得一提的是，雖然好氧培養實驗結果看到 *Pseudomonadaceae* 菌科中，包含 *Pseudomonas* 菌屬相對豐富度加總相當高，然而實際的二氯苯降解效率仍然較厭氧低，因此推測這菌科或菌屬的微生物即使本身具備降解含氯有機物的能力，但是在好氧條件下，也許會選擇其他能量循環機制或是土壤中殘存的難分解有機物，而不使用氯苯作為生物唯一的碳源來源。



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

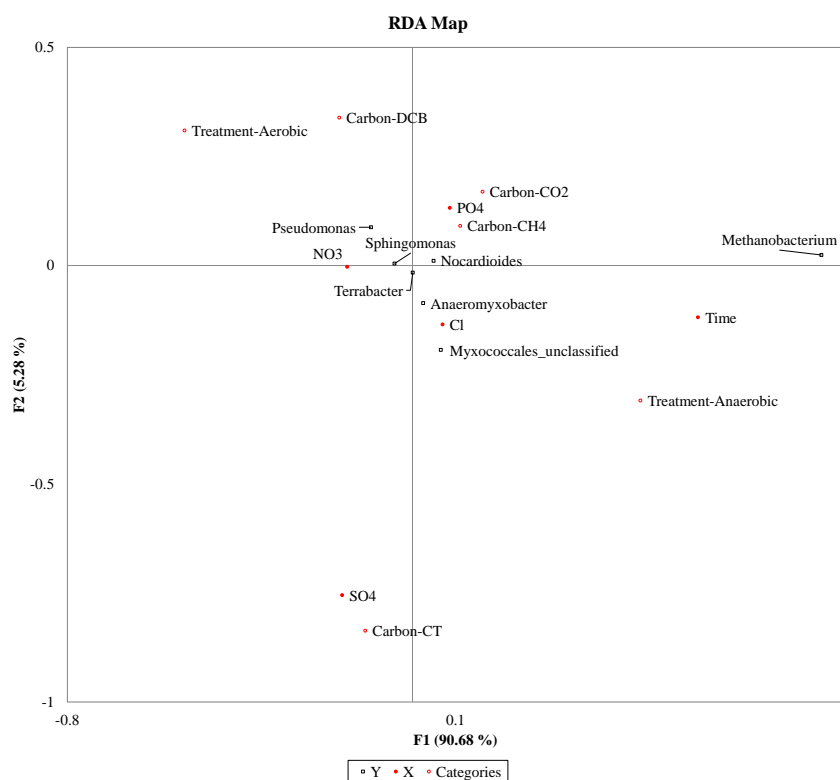


圖三十六、二氯苯降解之好氧培養實驗，前 50 個 OTU 代表序列與時間變化的系統發育樹與豐富度



5.5 微生物族群與環境因子關聯

本研究將所有微生物族群的資料與所量測之土壤環境因子進行多變量統計分析的冗餘分析之後發現 (圖三十七)，對於過去文獻上多所提到的產甲烷菌，其生長限制的環境條件主要為培養時間，其可能原因在於這類生物屬於古菌界的廣古菌門，自然界的生長速率本就不若細菌界的微生物。因此若透過產甲烷菌行脫氯反應需要較長的反應時間才可能看到成果。另外對於研究中所觀察到的幾個較為主要的 OTU，皆與土壤中的營養鹽類有一定關聯，因此添加氮磷應能有效刺激其生長，然而其是否會降解二氯苯，在經過好氧與厭氧培養實驗的結果顯示因為生物生長形式多元，因此並不一定。另外對於前述所說，OTU2 的未知 Myxococcales 菌目，其生長與環境的氯離子有正向的關係，因此推測可能在二氯苯降解上扮演某些角色，亦是未來研究可著重的方向之一。



圖三十七、培養實驗之數個已知代表 OTU 豐富度與環境因子之關聯性



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

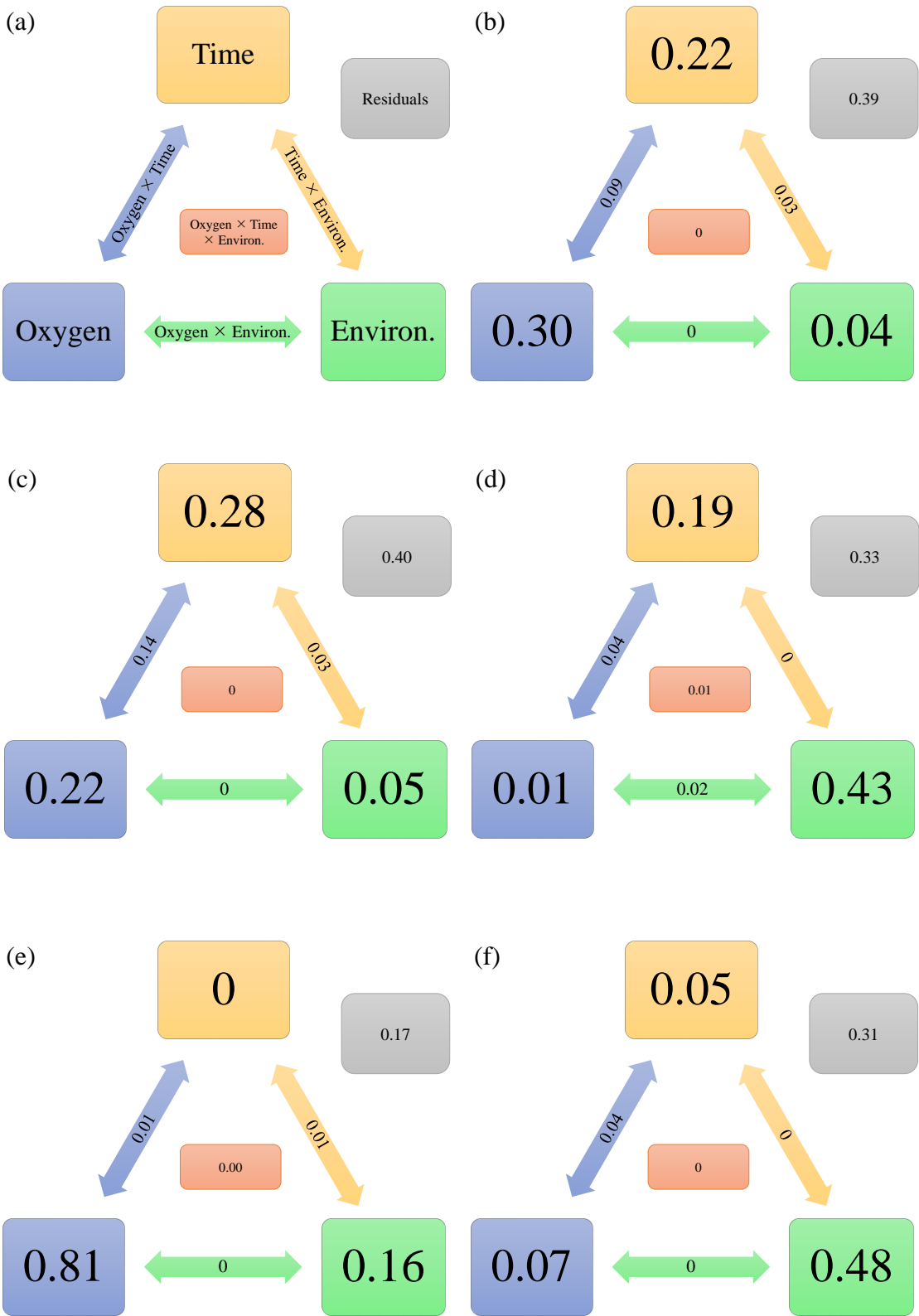
此外經由 Variation Partitioning Analysis 進行環境因子與微生物族群的視覺化分析結果顯示 (圖三十八)，若將本研究的眾多參數分組成氧氣的有無、培養時間長短、以及其他營養鹽添加與否的三種特性對本實驗所探討之微生物生長狀況進行分析，可發現，在總體微生物部分 (圖三十八 b)，其總體族群的變化與好氧或厭氧的培養占有 30% 的相關性，而培養時間長短亦有 22% 的相關性。相比之下，營養鹽的添加與否，對於總體的微生物結構影響較小。然而另外本研究沒有探討的環境物理或化學因子，可能亦占有 39% 的影響性，未來研究可針對更多的環境因子進行量測，以取得更全面的結果。

而在厭氧培養實驗中，對於二氯苯降解可能扮演最重要角色的 *Methanobacterium* 菌屬，其族群豐富度的變化，培養時間對其影響最大，占有 28% 的影響力 (圖三十八 c)。另外氧氣的有無，亦是相當重要的因子，占了 22% 的影響力。相比之下，氮源的添加影響較小。同樣的，其他本研究沒討論的物化因子仍有 40% 的影響力，不可小覷。

在前述所說，培養實驗中發現的大量未知 *Myxococcales* 菌目，其生長的狀況與環境中氮源或磷源的添加關聯性最大，占了 43% 的影響力 (圖三十八 d)。而培養時間亦有 19% 的影響力，相比之下，厭氧條件的有無，對這類菌目影響較不明顯。

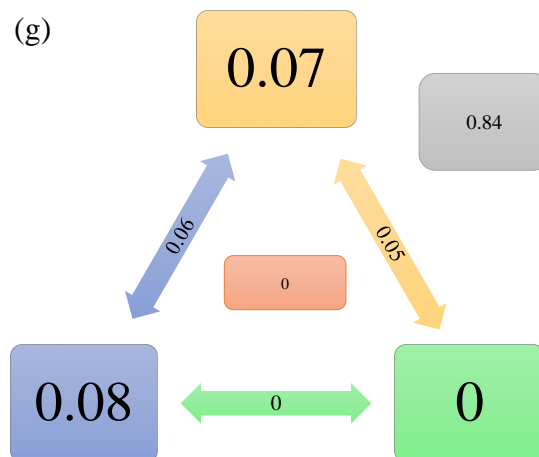
而在過去研究皆大量被討論到的 *Pseudomonas* 菌屬，在本研究中，氧氣的供給反而成為該物種是否成為優勢種的最大影響因子，占了 81% 的影響力 (圖三十八 e)。然而如同好氧培養實驗的結果，雖然該生物在好氧環境且添加氮磷的條件下可大量生長，然而其生物或許在有其他土壤有機碳的環境下，並不一定要選擇二氯苯作為其碳源，因此物種數量上的多寡，其實不見得代表其實際的降解活性，未來仍然有需要透過更直接的實驗證明活性降解物種，才是難分解污染物微生物降解最關鍵的證據。

另外研究中曾提及的 *Anaeromyxobacter* 菌屬，在本研究中則主要受到環境因子中的營養鹽影響，占了 48% 的影響力 (圖三十八 f)。而其他諸如培養時間或是氧氣提供與否影響較小。此外，*Nocardioides* 菌屬，生長的受控因子並不屬於任何本研究所觀察的因子，有高達 84% 的影響力可能來自於其他環境的物化因子 (圖三十八 g)。過去其實有文獻提到這個菌屬對於環境中的重金屬如銅鋅等，亦有相關降解或利用的能力，因此未來若要探討本物種在難分解有機物的降解，環境中的金屬離子可能是可以檢測的項目之一。



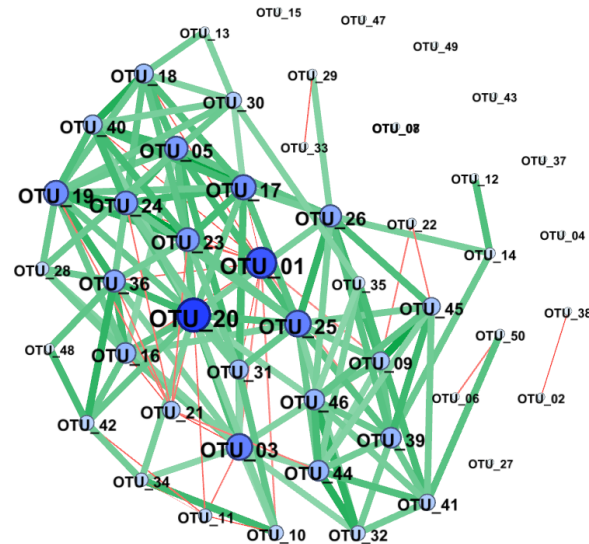


以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性



圖三十八、環境因子與微生物族群的視覺化分析結果。(a)圖示中各因子的位置；(b) 總體微生物族群與各因子關聯性；(c) *Methanobacterium* 菌屬與各因子關聯性；(d) *Myxococcales* 菌目與各因子關聯性；(e) *Pseudomonas* 菌屬與各因子關聯性；(f) *Anaeromyxobacter* 菌屬與各因子關聯性；以及(g) *Nocardioides* 菌屬與各因子關聯性。

生物生長於一個環境中，除了受制於各種環境因子，以及可能受到時間變異的影響以外，另一個相當可能的影響，即是環境中可能存在互相共生或是互利的菌群，共同合作代謝難分解有機物的作用。本研究利用 Co-occurrence Network 視覺化分析研究中主要觀察到的前五十個代表 OTUs。結果發現在厭氧環境條件下，產甲烷菌 OTU1，在生長的過程中，與 OTU20—未知的 β -變形菌，以及 OTU25—未知的變形菌，具有相當高可能的共生現象 (圖三十九)。是否這些生物在代謝環境基質(本研究二氯苯)過程中，可能透過互相合作共代謝的機制達成。亦是未來可以探討的重點。

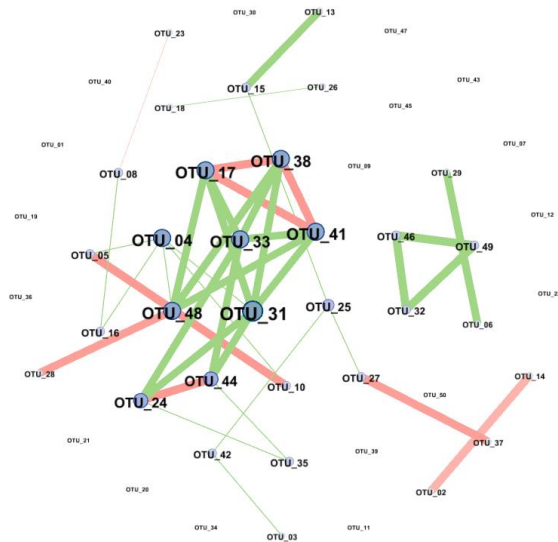


圖三十九、厭氧培養實驗主要 OTU 代表序列的 Co-occurrence Network 分析結果。綠色線表示正相關而紅色線表示負相關。線條越深表示相關性越強。藍色圓圈部分越大且越深，表示其在培養的菌群中扮演的關鍵性越大。

而在好氧的培養環境下，其主要 50 個代表物種的相關性則較弱，彼此之間並無明顯的互利或共生的現象（圖四十）。且彼此在環境中所扮演的角色並非占據關鍵的角色。由於研究結果顯示二氯苯在 28 天的培養時間中並沒有明顯的降解，因此推測可能微生物彼此合作共生的連結尚未建立，亦或是環境條件不至於達到強烈的逆境，並促使生物透過共代謝來抵抗逆境。



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性



圖四十、好氧培養實驗主要 OTU 代表序列的 Co-occurrence Network 分析結果。綠色線表示正相關而紅色線表示負相關。線條越深表示相關性越強。藍色圓圈部分越大且越深，表示其在培養的菌群中扮演的關鍵性越大。



(六) 結論與建議

6.1 結論

本研究結果具有以下幾項結論：

1. 厭氧環境下，微生物代謝二氯苯，可能以有機異營性微生物為主，無機碳源的提供與否對微生物代謝影響不大。然而適當的氮磷營養鹽提供，可有效加速其代謝活性，然而整體的菌群發展時間與速率較長。
2. 在無營養鹽的條件下，可能存在部分無機化營的厭氧微生物，且具備二氯苯降解能力，然而其降解速率比起有機異營性微生物而言較慢。
3. 厭氧環境下，代謝二氯苯的可能主要優勢微生物，在已知物種資料庫裏面以廣古菌門之產甲烷菌，以及過去文獻提到之 *Pseudomonas*、*Nocardioides* 以及 *Anaeromyxobacter* 為主。然而有相當比例之未知微生物種，尤其是屬黏球菌目(myxococcales)的某菌屬，亦可能存在具有代謝二氯苯能力的菌屬。
4. 微生物在厭氧環境條件下降解二氯苯，可能具有很強的共生互利現象，透過共代謝的方式進行二氯苯的代謝，尤其以 *Methanobacterium* 與其他未知變形菌最可能存在共代謝二氯苯的機制。
5. 好氧環境下，主要的優勢物種以 *Pseudomonas* 為主。然而由於好氧條件給予微生物較小的逆境，生物可能在有其他碳源的狀況下，不會優先代謝難分解有機物。因此二氯苯的降解在好氧條件下比起厭氧培養或無太大優勢。



6.2 建議

1. 厭氧培養條件下，除了常見的幾種具有代謝含氯有機物的菌屬可成為優勢菌群外，亦觀察到其他未知物種，未來可針對這些未知物種對於二氯苯的降解活性、扮演角色以及與其他生物的共生現象進行更進一步的分析。
2. 在厭氧條件下，代謝二氯苯的微生物菌群可能會直接利用氯苯作為其碳源。故未來若要進行 DNA-SIP 實驗標記活性微生物物種，可能需要透過添加同位素氯苯以及氮磷營養鹽才比較可能成功標記活性物種。
3. 若在不添加氮磷營養鹽的條件下，若要進行厭氧條件下的 DNA-SIP，標記代謝降解二氯苯的活性微生物，亦可考慮添加同位素 $^{13}\text{CO}_2$ 作為碳源，因環境中可能存在少量無機化營生物會利用二氧化碳作為代謝二氯苯的碳源來源，然而其機制是共代謝或是透過二次利用仍需進一步研究。
4. 好氧培養條件下，觀察到大量(>80%)未知微生物，對於這些微生物是否具備二氯苯降解能力，仍需要更進一步研究。



(七)參考文獻

1. Amin, D. H., Abdallah, N. A., Abolmaaty, A., Tolba, S., & Wellington, E. M. (2020). Microbiological and molecular insights on rare Actinobacteria harboring bioactive prospective. *Bulletin of the National Research Centre*, 44(1), 1-12.
2. Cho, K. C., Fuller, M. E., Hatzinger, P. B., & Chu, K. H. (2016). Identification of groundwater microorganisms capable of assimilating RDX-derived nitrogen during in-situ bioremediation. *Science of the Total Environment*, 569, 1098-1106. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.06.175
3. Cruz-Morales, P., Ramos-Aboites, H. E., Licona-Cassani, C., Selem-Mójica, N., Mejía-Ponce, P. M., Souza-Saldívar, V., & Barona-Gómez, F. (2017). Actinobacteria phylogenomics, selective isolation from an iron oligotrophic environment and siderophore functional characterization, unveil new desferrioxamine traits. *FEMS microbiology ecology*, 93(9).
4. Don, R. H., Weightman, A. J., Knackmuss, H. J., & Timmis, K. N. (1985). Transposon mutagenesis and cloning analysis of the pathways for degradation of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and 3-chlorobenzoate in *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (pJP4). *Journal of Bacteriology*, 161(1), 85-90.
5. Dumont, M. G., & Murrell, J. C. (2005). Stable isotope probing - linking microbial identity to function. *Nature Reviews Microbiology*, 3(6), 499-504. doi:10.1038/nrmicro1162
6. Dumont, M. G., Radajewski, S. M., Miguez, C. B., McDonald, I. R., & Murrell, J. C. (2006). Identification of a complete methane monooxygenase operon from soil by combining stable isotope probing and metagenomic analysis. *Environmental Microbiology*, 8(7), 1240-1250. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01018.x
7. Field, J. A., & Sierra-Alvarez, R. (2008). Microbial degradation of chlorinated benzenes. *Biodegradation*, 19(4), 463-480. doi:10.1007/s10532-007-9155-1
8. Huang, X., He, J., Yan, X., Hong, Q., Chen, K., He, Q., ... & Jiang, J. (2017). Microbial catabolism of chemical herbicides: microbial resources, metabolic pathways and catabolic genes. *Pesticide biochemistry and physiology*, 143, 272-297.



以穩定同位素探針與次世代定序技術解析降解含氯有機物之微生物族群結構與活性

9. Ito, K., Takagi, K., Kataoka, R., & Kiyota, H. (2020). Biochemical characterization of NADH: FMN oxidoreductase HcbA3 from *Nocardioides* sp. PD653 in catalyzing aerobic HCB dechlorination. *Journal of pesticide science*, 45(3), 125-131.
10. Jia, J. X., Gao, J. F., Dai, H. H., Zhang, W. Z., Zhang, D., & Wang, Z. Q. (2020). DNA-based stable isotope probing identifies triclosan degraders in nitrification systems under different surfactants. *Bioresource Technology*, 302. doi:10.1016/j.biortech.2020.122815
11. Li, J. B., Luo, C. L., Zhang, D. Y., Song, M. K., Cai, X. X., Jiang, L. F., & Zhang, G. (2018). Autochthonous Bioaugmentation-Modified Bacterial Diversity of Phenanthrene Degraders in PAH-Contaminated Wastewater as Revealed by DNA-Stable Isotope Probing. *Environmental Science & Technology*, 52(5), 2934-2944. doi:10.1021/acs.est.7b05646
12. Liang, H., Chen, A., Li, Z., Ashraf, M. A., & Ding, C. (2016). Influences of 1, 2-dichlorobenzene on bacterial community structure in wetland soil. *Sains Malaysiana*, 45(1), 129-134.
13. Löffler, F. E., Yan, J., Ritalahti, K. M., Adrian, L., Edwards, E. A., Konstantinidis, K. T., & Spormann, A. M. (2013). Dehalococcoides mccartyi gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, Dehalococcoidia classis nov., order Dehalococcoidales ord. nov and family Dehalococcoidaceae fam. nov., within the phylum Chloroflexi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 625-635. doi:10.1099/ijs.0.034926-0
14. Lorah, M. M., Walker, C.W., Baker, A.C., Teunis, J.A., Majcher, E.H., Brayton, M.J., Raffensperger, J.P., and Cozzarelli, I.M., (2014). Hydrogeologic characterization and assessment of bioremediation of chlorinated benzenes and benzene in wetland areas, Standard Chlorine of Delaware, Inc. Superfund Site, New Castle County, Delaware, 2009–12:U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2014–5140.
15. Malla, M. A., Dubey, A., Yadav, S., Kumar, A., Hashem, A., & Abd Allah, E. F. (2018). Understanding and Designing the Strategies for the Microbe-Mediated Remediation of Environmental Contaminants Using Omics Approaches. *Frontiers*



- in Microbiology*, 9. doi:10.3389/fmicb.2018.01132
16. Nestler, H., Kiesel, B., Kaschabek, S. R., Mau, M., Schlomann, M., & Balcke, G. U. (2007). Biodegradation of chlorobenzene under hypoxic and mixed hypoxic-denitrifying conditions. *Biodegradation*, 18(6), 755-767. doi:10.1007/s10532-007-9104-z
 17. Neufeld, J. D., Vohra, J., Dumont, M. G., Lueders, T., Manefield, M., Friedrich, M. W., & Murrell, J. C. (2007). DNA stable-isotope probing. *Nature Protocols*, 2(4), 860-866. doi:10.1038/nprot.2007.109
 18. Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N. R., & Murrell, J. C. (2000). Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, 403(6770), 646-649. doi:10.1038/35001054
 19. Redfern, L. K., Gardner, C. M., Hodzic, E., Ferguson, P. L., Hsu-Kim, H., & Gunsch, C. K. (2019). A new framework for approaching precision bioremediation of PAH contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, 378. doi:10.1016/j.jhazmat.2019.120859
 20. Reineke, W. (2001). Aerobic and anaerobic biodegradation potentials of microorganisms. In *The handbook of environmental chemistry* (Beek B ed., Vol. 2K, pp. 1–161). Heidelberg, Berlin: Springer.
 21. Reineke, W., & Knackmuss, H. J. (1984). Microbial-Metabolism of Haloaromatics - Isolation and Properties of a Chlorobenzene-Degrading Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(2), 395-402. doi:10.1128/Aem.47.2.395-402.1984
 22. Remenár, M., Karelová, E., Harichová, J., Zámocký, M., Krčová, K., & Ferianc, P. (2014). Actinobacteria occurrence and their metabolic characteristics in the nickel-contaminated soil sample. *Biologia*, 69(11), 1453-1463.
 23. Sanford, R. A., Cole, J. R., & Tiedje, J. M. (2002). Characterization and description of *Anaeromyxobacter dehalogenans* gen. nov., sp. nov., an aryl-halo-respiring facultative anaerobic myxobacterium. *Applied and environmental microbiology*, 68(2), 893-900.
 24. Sekar, R., Taillefert, M., & DiChristinaa, T. J. (2016). Simultaneous Transformation



- of Commingled Trichloroethylene, Tetrachloroethylene, and 1,4-Dioxane by a Microbially Driven Fenton Reaction in Batch Liquid Cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(21), 6335-6343. doi:10.1128/Aem.02325-16
25. Shiau, Y. J., Cai, Y. F., Jia, Z. J., Chen, C. L., & Chiu, C. Y. (2018a). Phylogenetically distinct methanotrophs modulate methane oxidation in rice paddies across Taiwan. *Soil Biology and Biochemistry*, 124, 59-69. doi:<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.05.025>
 26. Shiau, Y. J., Cai, Y. F., Lin, Y. T., Jia, Z. J., & Chiu, C. Y. (2018b). Community Structure of Active Aerobic Methanotrophs in Red Mangrove (*Kandelia obovata*) Soils Under Different Frequency of Tides. *Microbial Ecology*, 75(3), 761-770. doi:10.1007/s00248-017-1080-1
 27. Shiau, Y.-J., & Chiu, C.-Y. (2020). Biogeochemical Processes of C and N in the Soil of Mangrove Forest Ecosystems. *Forests*, 11(5), 492. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1999-4907/11/5/492>
 28. Shiau, Y.-J., Lin, C.-W., Cai, Y., Jia, Z., Lin, Y.-T., & Chiu, C.-Y. (2020). Niche Differentiation of Active Methane-Oxidizing Bacteria in Estuarine Mangrove Forest Soils in Taiwan. *Microorganisms*, 8(8). doi:10.3390/microorganisms8081248
 29. Tringe, S. G., & Rubin, E. M. (2005). Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. *Nature Reviews Genetics*, 6(11), 805-814. doi:10.1038/nrg1709
 30. Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261-5267. doi:10.1128/aem.00062-07
 31. Wang, Q., Quensen, J. F. I., Fish, J. A., Lee, T. K., Sun, Y., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2013). Ecological patterns of nifH genes in four terrestrial climatic zones explored with targeted metagenomics using FrameBot, a new informatics tool. *Mbio*, 4(5). doi:10.1128/mBio.00592-13
 32. Zhang, C., Wang, B., Dai, X., Li, S., Lu, G., & Zhou, Y. (2017). Structure and function of the bacterial communities during rhizoremediation of



- hexachlorobenzene in constructed wetlands. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(12), 11483-11492.
33. Zhang, M. M., Li, Z., Haggblom, M. M., Young, L., He, Z. J., Li, F. B., & Sun, W. M. (2020). Characterization of Nitrate-Dependent As(III)-Oxidizing Communities in Arsenic-Contaminated Soil and Investigation of Their Metabolic Potentials by the Combination of DNA-Stable Isotope Probing and Metagenomics. *Environmental Science & Technology*, 54(12), 7366-7377. doi:10.1021/acs.est.0c01601
34. Zhang, Y., Deng, W. C., Xie, X. B., & Jiao, N. Z. (2016). Differential Incorporation of Carbon Substrates among Microbial Populations Identified by Field-Based, DNA Stable-Isotope Probing in South China Sea. *PLoS One*, 11(6). doi:10.1371/journal.pone.0157178
35. Zhu, M., Feng, X., Qiu, G., Feng, J., Zhang, L., Brookes, P. C., ... & He, Y. (2019). Synchronous response in methanogenesis and anaerobic degradation of pentachlorophenol in flooded soil. *Journal of hazardous materials*, 374, 258-266.
36. 吳雅婷. (2017). 參加美國 Battelle 「第四屆生物修復與可持續性環境技術國際研討會」：行政院環境保護署土污基管會出國報告. Retrieved from 臺北市(臺灣)
37. 呂蕙芳. (2016). 受農藥污染地下水中氯苯現地生物復育可行性研究. (碩士論文). 國立中興大學, 臺中市(臺灣)
38. 周楊. (2015) 土壤樣品長期保存對微生物群落代謝活性和功能類群的影響。 *微生物學通報*, 42-6: 1017-1024
39. 段鑫霖. (2016). 地下水含氯有機污染物厭氧生物整治案例探討. (碩士論文). 國立中山大學, 高雄市(臺灣)
40. 郭紘志. (2018) 多氯戴奧辛污染土壤缺氧生物復育技術：氧化還原電位控制之效應. (碩士論文). 國立成功大學, 臺南市(臺灣)
41. 陳谷汎. (2001). 以生物復育法整治 2,4-二氯酚污染之地下水. (碩士論文). 國立中山大學, 高雄市(臺灣)