




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

含氯污染場址之現地微生物整治技術開發與本土菌群篩選

期末報告(定稿)

主辦單位： 行政院環境保護署
專案執行單位：國立中正大學／地球與環境科學系所
專案主持人：許曷慕教授
專案執行期間：110 年 03 月 19 日起至
111 年 02 月 28 日止



目次

專案基本資料表.....	3
計畫摘要.....	8
計畫目的.....	11
研究方法與步驟.....	21
結果與討論.....	33
結論.....	55
參考文獻.....	56
甘特圖.....	61
期中&期末審查意見回覆.....	63



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		國立中正大學 地球與環境科學系					
機構地址		621 嘉義縣民雄鄉大學路一段 168 號					
專案主持人		許昌基		職等／職稱		教授	
協同主持人		黃士偉		職等／職稱		副教授	
協同主持人		陳榮盛		職等／職稱		助理研究員	
專案名稱	中文	含氣污染場址之現地微生物整治技術開發與本土菌群篩選					
	英文	The development of in-situ microbial remediation techniques and functional bacteria isolation from local chlorine-contaminated sites					
	關鍵字	生物復育,具功能性之現地細菌,三氯乙烯,四氯乙烯					
執行期程		自民國 110 年 3 月 19 日起 至 民國 111 年 02 月 28 日止					
專案主持人		姓名：許昌基		Email： bmhsu@eq.ccu.edu.tw		專線：052720411#66218 手機：0952840868	
專任助理		姓名：林重延		E-mail： nmsaulin@gmail.com		專線：05-2720411#61233 手機：0929402267	
經費分析總表		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	440,000		(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	470,250		(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	17,000		(1~6 項相加之 5%為限)	
		6.	行政管理費	92,725		(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)		1,019,975		總金額：1,019,975	
		計畫總金額(1~7 項)		1,019,975		總金額：1,019,975	

專案主持人(簽名及蓋章)：_____ 日期：_____



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

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 17 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 研究主題		
申請機構系所	國立中正大學地球與環境科學系	專案主持人	許曷慕
專案名稱	含氯污染場址之現地微生物整治技術開發與本土菌群篩選		
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

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 原因或學術產 出發表名稱)
A 學術 產 出 及 活 動	1.國內投稿 (篇數)	(1)論文					
		(2)研討會論文	1	0	0		預計改投 國際期刊
	2.國外投稿 (篇數)	(1)期刊論文			1		已有一篇 成果發表 於國際期 刊，第二篇 整理中。
		(2)研討會論文					
	3.報告 (篇數)	(1)技術報告					
		(2)研究報告	1	0	1		
	4.專著 (本數)						
	5.辦理學術 會議(場數)	(1)研討/說明會					
		(2)成果發表會					
		(3)論壇					
	6.研發改良 技術(項數)	(1)已開發技術	1	0	3		1. 土壤汙 染之 Ecoplate評 估技術 2. 第三 代 16s全基因 定序技術



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 原因或學術產 出發表名稱)
							應用於乳 壤汙染場 址之菌群 分析。 3.KEGG 菌 群代謝預 測技術。
		(2)技術平台					
B 人 才 培 育	7.研發人員 (人數)	(1)碩士	1	1	1		
		(2)博士	1	1	1		
	8.研究團隊 (個數)	(1)跨領域團隊					
		(2)跨機構團隊	1	0	1		
		(3)形成研究中 心					
		(4)形成實驗室					
9.其他指標 (請自行命名)		(請自填)					



(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					
			新型/設計					
			合計					
		申請中	發明					
			新型/設計					
			合計					
B 研發技術轉移	2.先期技術 成果移轉	件數						
		授權金(仟元)						
		衍生利益金(仟元)						
	3.技術移轉 (專利)	件數						
		授權金(仟元)						
		衍生利益金(仟元)						
	4.技術移轉 (應用技術)	件數						
		授權金(仟元)						
		衍生利益金(仟元)						
	5.可移轉 產業技術	(1)技術(件數)						
		(2)品種/系(件數)						
C 產學研合作	6.促成合作 研究	件數						
		金額(仟元)						
	7.促成投資	件數						
		投資金額(仟元)						
	8.促成取得 業界科專	件數						
		業界投資金額(仟元)						
9.其他指標 (請自行命名)		(請自填)						



(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	2		2		
		收入(仟元)					
	2.諮詢服務	次數	2		2		
		收入(仟元)					
B 支 援 合 作	3.協助政府制定 (件數)	(1)政策					
		(2)法規					
		(3)規範					
		(4)標準					
D 社 會 效 益	4.獲得認證(件數)						
	5.獲得獎項(件數)						
	6.提升能源效率(%)						
	7.節能減碳效率(%)						
8.其他指標 (請自行命名)		(請自填)					



三、請依前述學術面、產業面、政策面等預期量化成果，具體敘明研究成果對本署政策推動之助益。（200 字為限）

學術面(如國內外研討會、期刊投稿件數、或人才培育碩博士生說明)

研究成果將發表國際期刊論文 1 篇、國內研討會發表論文一篇以及本計畫結案報告一份;培育碩士級及博士級學生各一名;透過合作意向書之簽訂，形成跨機構的研究團隊一個。藉由國內外學術之交流，確實掌握核心技術之技術成熟度（TRL），進行滾動式修正。人才培育的部分，將藉由本國生與外籍生的共同參與以及跨機構合作，訓練產業所需人才。

產業面(如合作研發產業、申請專利、洽談技術移轉廠商件數說明)

申請加入「臺印度人工智慧海外科研中心」，藉由跨機構的研究團隊，共同參與台印合作之計畫申請與產學合作。配合政府之新南向政策進行技術輸出與交流，希望未來能有經濟效益之產出。

政策面(如整治費用降低、特定污染物整治效益提升、或提供政府作為監測/管制標準、污染址管理等政策及法規研訂之參考)

本研究目的在提昇含氯污染場址之整治效益以及監控整治過程菌群及汙染物間之消長關係。在服務便民項目，本計畫提供污染場址之業主及整治廠商兩場次之技術服務與兩場次之諮詢服務。本研究已擬定使用 EcoPlate 結合菌群分析作為整治場址狀態評估，且提供 EcoPlate 與 KEGG 之比較方法，可作為前期評估與營養源添加參考。此外，本研究認為泥火山具有優勢菌群，可作為後續整體添加使用，但仍需透過實驗室評估對整治現地菌群之影響評估，以免有破壞生態之疑慮，將可作為未來整治之參考。



二、計畫摘要

(一) 中文部分：

國內土壤及地下水含氯有機溶劑污染事件以四氯乙烯(PCE)和三氯乙烯(TCE)最為常見。本研究團隊擬定六年期生物復育整治計畫，預期達成下列最終目標：(1)評估污染場址自然衰減所需期程。(2)使用本土菌株添加，進行生物強化(Bioaugmentation)整治。(3)使用基質改良法，並利用高通量檢驗技術評估生物刺激(Biostimulation)之成效。評估現地生物復育技術可行性其中最重要條件之一是場址本身須具有可降解污染物之微生物，任何單一菌種微生物是無法完成所有的代謝反應進而達成含氯有機污染物的降解。需要透過不同的細菌群落，共同交互執行的代謝反應才可完成。因此，快速、深入分析菌相變動及其可能的生物降解代謝途徑為評估現地生物復育的關鍵步驟。本年度計畫重於：(1)土壤及地下水現地整治策略開發。(2)泥火山風化土壤的甲烷及含氯污染物共代謝菌株/群篩選與場址評估。(3)以第三代定序技術、化學分析、生物分子分析、磷脂質脂肪酸分析法，了解污染場址之整治現況與探討後續整治策略。(4)使用 Biolog EcoPlate™ 結合菌相組成代謝分析，提供評估現地整治污染物代謝方式及其代謝效率之方法。本研究完成 Ecoplate 與高通量定序分析之代謝結果預測整合，能有效提供污染現地背景資料與後續整治策略菌群資訊。本研究調查泥火山樣本帶有甲烷營養菌以及對氯代謝有關之菌種，做為含氯污染場址之菌群添加試驗之研究基礎。研究發現，在噴發初期樣本中甲烷營養菌以及對氯代謝有關之菌種比較多，但甲烷營養菌的佔比較低，但隨著時間拉長，在該樣本中仍可發現甲烷營養菌的存在。另外，針對南臺灣不同區域的泥火山樣本中甲烷營養菌以及對氯代謝之 KEGG 代謝預測發現，花蓮及高雄甲仙泥火山相關代謝基因比例較高，可作為後續整治場址之參考依據。綜整兩年場址檢測結果發現，已進行過生物及化學整治場址，其相關氯代謝有關之菌種多樣性及相關基因檢測結果均較為豐富。後續本研究團隊將以微生物電化學之觀點評估該技術對含氯污染場址之整治效益。

關鍵字：生物復育、具功能性之現地細菌、三氯乙烯、四氯乙烯



二、計畫摘要

(二)英文部分：

Many domestic cases regarding soil and groundwater contaminated by volatile organic compounds have been reported to date. The most frequently detected volatile compounds in these cases include the two most pervasive chlorinated solvents namely Perchloroethene (PCE) and trichloroethene (TCE). The six-year project will be proposed for bioremediation of the PCE and TCE contaminated sites with the following three aims: (1) Assessing the efficacy for natural attenuation of the contaminated sites; (2) Isolation the indigenous bacteria for bioaugmentation; (3) Assessing the efficacy of biostimulation by high-throughput metagenomic technologies. One of the most key points for assessing the viability of bioremediation technology is that there are microorganisms with the potential to degrade contaminants. Any single microorganism cannot complete all the metabolisms to degrade contaminants, and only complex bacterial communities can perform all of the metabolic pathways to biodegrade contaminants. Therefore, the key step of bioremediation technology is to predominate bacterial communities' variation and metabolic pathways, and bacterial communities are also the indicators for natural attenuation. This year's plan focuses on: (1) Development of on-site soil and groundwater remediation strategies; (2) Screening and site assessment of methane and TCE co-metabolizing strains/groups in the weathered soil of mud volcano; (3) Using the third-generation sequencing technology, chemical analysis, biomolecular analysis, and phospholipid fatty acid analysis methods to understand the current situation of the remediation of contaminated sites and discuss the follow-up remediation strategies; (4) Using Biolog EcoPlate™ combined with bacterial composition and metabolism analysis to provide a method to evaluate the metabolic mode and efficiency of on-site remediation of pollutants. This study completed the integration of the metabolic results prediction of Ecoplate and high-throughput sequencing analysis, which can effectively provide the bacterial information of the contaminated sites and the follow-up remediation strategy. The study investigates the methanotrophic bacteria and the chlorine-metabolized bacteria in mud volcano samples. The results will be the research basis for the microflora addition test of chlorine-contaminated sites. The study found that there were more methanotrophs and chlorine-metabolized bacteria in the samples collected at the beginning of the eruption. As time went on, the methanotrophs were still found in the sample. In addition, the KEGG metabolism prediction for methanotrophs and chlorine-metabolized bacteria in mud volcano samples found that the proportion of



metabolic genes is relatively high in Jiashian and Hualian mud volcano samples which can be used as a reference for subsequent research. Based on the two-year site study, the biological and chemical remediation sites carried out high bacterial species diversity and chlorine metabolic genes. In the follow-up, we will evaluate the effect of microbial electrochemistry for bioremediation.

Keyword : bioremediation, functional groups of indigenous bacteria, trichloroethene (TCE), perchloroethene (PCE)



三、計畫目的

一、背景

近幾十年來，工業、農業、醫學及人為活動等等向自然環境排放了許多合成化學物質，例如：有機溶劑、塑化劑、殺蟲劑、除草劑及合成藥物衍生物等，產生許多嚴重的生態毒害問題，對人類及整體環境造成相當大的負擔與危害(Rodríguez-Eugenio et al. 2018)，其中有機氯化物更的問題更是日益嚴重 (ATSDR 2007)。氯碳化合物一直都是相對難以解決的環境汙染問題，主要是這些有機氯化物容易汙染到地下水，因此擴散較快。國內土壤與地下水受揮發性有機物汙染事件頻傳，目前我國環保署所列管登記之重大地下水汙染事件中，有機溶劑所佔有的比例極高，其中又以含氯揮發性有機溶劑之地下水汙染事件所佔的比例最大，而非法棄置為主要汙染來源，其次則是工廠(環保署，土壤及地下水整治網)。含氯揮發性有機物(Chlorinated Volatile Organic Compounds, CVOCs) 主要以C1 烷類及C2 烯類使用最多，因其具有高溶解力、低可燃性、高蒸氣密度、低沸點及高蒸氣壓等特性，通常為工業製程中重要之原料或有機溶劑。CVOCs 於自然界中無法自行合成，汙染來源主要為人為製造排放。CVOCs 在環境中轉化過程(fate)甚慢，易累積於環境中，因此被列為環境毒性汙染物質。CVOCs 具有滲透、脂溶及揮發性，對環境及生物體容易造成危害，通常進入人體的途徑多以呼吸吸入及皮膚接觸為主，當長時間暴露於 CVOCs 環境下，對人體呼吸系統、肝、腎及造血系統等皆會造成危害，且經實驗證實對動物具有致癌性。四氯乙烯(PCE)和三氯乙烯(TCE)為常用的含氯有機物溶劑，因對脂類具溶解性高之特性，在工業用途常作為清潔劑及脫脂劑使用，用來清洗金屬物件上的油脂、樹脂等污漬，或是作為油漆及黏著劑的稀釋劑，也可在有機化合物或藥劑的製作中當溶劑使用，因此廣泛的運用在乾洗業、電子業及化學合成。針對不同的土壤及地下水汙染場址及汙染物特性，在國內外已有許多包括物理、化學及生物等各種不同的整治處理技術被成功開發，甚至是使用串聯式(整治列車)的方法，依不同的整治階段選用不同的配套措施。但不論是採用何種技術或方案，欲將汙染場址改善至符合法規標準，均需龐大的整治費用。因此，在場址概念模型的建立以及場址整治經驗皆相當重要，亦是整治技術及方案選用的重要依據，同時也是場址汙染整治之效益及成功與否的重要因子。

含氯有機物是種汙染物被大量發現在世界各地的工業區(Adamson et al. 2014)因其分子構造密度比水大、高密度、低黏滯性、水中溶解度小、低吸附性、易揮發等特性，故含氯有機化合物通常視為「比水重之非水相液體」(Dense non-Aqueous Phase Liquid，簡稱 DNAPL)，常見的有機溶劑包括四氯乙烯(PCE)、三氯乙烯(TCE)、四氯化碳(CTET)、



二氯乙烯(DCE)、二氯乙烷(DCA)及氯乙烯(VC)等，其中重要的是，氯乙烯是比三氯乙烯更危險，對人體的毒性更大。美國癌症研究總署(IARC)將其中 PCE、TCE 及 VC 等多種含氯污染物及其代謝產物分類為「很可能對人體具致癌性(2A)」或「確定對人體具致癌性(Group 1)」(IARC et al. 2002)。四氯乙烯比重較水大且低溶解度為重質非水相溶液(dense non-aqueous phase liquids, DNAPL)容易累積在地下水層底部。從化學角度看，高度氧化態的物質比較容易接受電子，不易進行氧化反應，在一般有氧的環境中四氯乙烯呈現高穩定性，不易被生物分解，半衰期可以長達六年之久(董瑞安 1992)。四氯乙烯屬脂溶性物質，當進入到人體後容易囤積於人體的脂肪層難以代謝、排出。但有部份會經由呼吸作用排出體外或者代謝轉換成三氯乙酸從尿液中排出(董瑞安 1992)。Hamada 等人經由山羊進行動物實驗發現，四氯乙烯比其他污染物較容易出現在乳汁中，推測如果母體遭受到四氯乙烯污染，嬰兒也很容易經由餵食母乳後受到四氯乙烯的傷害，臨床發現可能會使嬰兒發生肝腫大或黃疸症狀(Hamada and Tanaka 1995)。人體代謝毒性途徑與酵素相關，但若接觸外來物質可能轉換成更具毒性的中間產物(蔡文田 1992)。三氯乙烯可經由食入、吸入和皮膚接觸等三途徑進入人體，迅速且廣泛地被人體吸收，吸收後三氯乙烯會分佈於全身，並累積在脂肪和其他組織。人體急性暴露於三氯乙烯 100 ppm 濃度下，對中樞神經系統會造成神經毒性，產生頭暈、頭痛、嗜睡、噁心、混亂、視覺模糊和虛弱；濃度達 2,000 ppm 時出現麻痺現象，暴露於 10,000 ppm 濃度的 TCE 下會導致死亡，與心律不整和瀰漫性肝損傷，更有文獻提到肝癌、腎臟癌、非何杰金氏淋巴瘤、前列腺癌和多發性骨髓癌與接觸 TCE 有關(ATSDR 2007)。IARC 將三氯乙烯歸為第二類 2A(人類可能致癌物質)。在地下水管制方面，行政院環保署地下水污染管制標準訂定三氯乙烯飲用水水源水質保護區內之地下水管制值為 0.005 mg/L，其餘之地下水管制值為 0.05mg/L(EPA 2001)。1,2-DCA 為工業製程上常用之有機溶劑，帶有類似氯仿氣味之無色液體，難溶於水。經加熱分解可產生光氣，主要用於臘、脂肪、橡膠的溶劑，還可用於製造氯乙烯(Chloroethene, VC)及聚碳酸酯(Polycarbonate, PC)，亦被用作穀倉的熏蒸及土壤的消毒。其為一合成化合物，於自然界中無法自行生成，水體中若存有 1,2-DCA，通常是因為工業製程中所使用之 1,2-DCA 因揮發及外洩而進入環境中。

近年來隨著 NGS 的發展，因其具高通量特性且不需額外克隆等諸多優點，可大幅增進對未知菌種的瞭解，所以極具分析地質微生物的潛力。也由於這類新興分生工具，這幾年遂衍生出所謂多源基因體學(Metagenomics)，又稱為環境基因體學(Environmental Genomics)，可呈現真實的環境生化代謝圖譜，最有效的方式就是直接萃取環境中的總 DNA 或 RNA 加以分析，藉由基因體的資訊，對環境做全面性的了解。Metagenomics



可專門針對微生物族群，從樣品中萃取特定 DNA 並加以定序後，進行多項分析，例如菌種判定，親緣關聯及功能基因變化等，可進一步推測菌種之間的共生關係，細菌如何適應特殊環境或細菌致病能力的演變等。NGS 技術亦有助於尋找帶有特殊基因之新型菌種。例如在污染的場址當中，找尋可快速代謝特定污染物之細菌。過去分析微生物的生理特性有許多方法，包含革蘭氏染色、生化八管試驗及血清抗原凝集試驗等，在分子生物學分析上，也有許多依據功能性基因 PCR 所開發出的測試法。針對特殊基因進行 PCR 監測，這些分析可以瞭解其中功能代謝基因的數量與菌種種類等等。雖然如此，上述的技術卻只僅侷限於片段式的資訊，只能針對微生物在特殊區域基因體的研究，沒有辦法全面性的瞭解。因此，使用多源基因體學配合傳統 PCR-based 的分子檢驗技術可以更有有效的全面性瞭解整體菌群菌相的分布與其功能代謝檢定。

一般來說，一群微生物可能是相互合作降解環境污染物。然而，不是所有菌種可降解各種各樣的污染物，可藉 Metagenomics 了解在污染場址內具有分解污染物潛力菌種種類和其在所有菌種種類分佈比率，然而透過分析污染場址的微生物群落基因序列，並經由生物分類資訊軟體分析，可提供污染物及其化合物存在的污染場址其微生物群落組成。這種做法在初期擬定整治策略時，將有利於鑑定是否具有特定微生物，參與降解途徑的關鍵生化反應步驟，以擬定適當的整治策略如加強式生物整治的參數設定或需直接擇定物化方式的整治技術，避免整治時間和整治方式不適當而造成整治費用的虛耗。亦或是整治過程中不同污染形態和參數變化如下：原始污染物的濃度(如四氯乙烯和三氯乙烯)、代謝污染物的濃度(如氯乙烯)、目標最終產物濃度(如乙烯或甲烷)、營養鹽添加濃度和頻率等，都可透過微生物群落的變化，而達到預測或調整相關的整治參數。

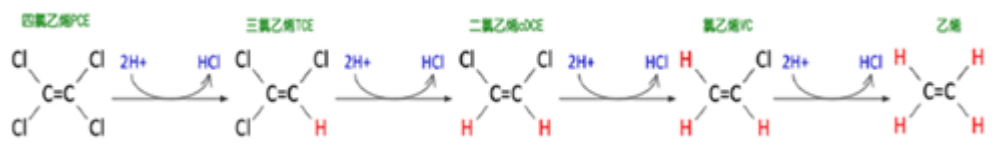
有機氯汙染的生物整治研究上，目前已有針對氯乙烯、多氯聯苯、鹵代烷、氯苯和氯酚(Nikel et al. 2013)，四氯乙烯和三氯乙烯之代謝是以生物性還原脫氯(reductive dechlorination)作用為主(Lee et al. 2008)。以四氯乙烯為例，還原脫氯過程中，會產生中間產物如三氯乙烯、順-二氯乙烯(cis-1,2 DCE)和極少量反-二氯乙烯(trans-1,2 DCE)及氯乙烯(Aulenta et al., 2006)。含氯有機物之還原脫氯反應是利用氫原子逐步取代氯原子(Bennett et al. 2007, Hughes et al. 2002)，現地生物的厭氧還原脫氯主要可藉由電子供給者(如氫氣、乳酸鹽、碳水化合物、醇類)傳遞至電子接受者(TCE 或 cDCE)降解 TCE 及 cDCE。另醋酸鹽、甲烷、葡萄糖、酚、烷基苯、甲基胺及苯甲酸鹽等有機物亦可當做還原脫氯之電子供給者之一(Kao and Prosser 1999)。在許多實場整治試驗中，添加有機基質如醣類(碳水化合物)於含氯乙烯類污染物之地下水中，具有提升現地微生物數量與促進現地微生物經由間接還原脫氯的過程中降解 TCE 及 cDCE，也被證實為有效之改善策略



(Ritalahti et al. 2006)。生物還原脫氯有幾個重要的因素:場內有無脫氯菌種、有無產氫菌存在與活動等,主要可利用生物刺激(採取一些可促進微生物繁殖與生長的手段,如添加營養物等,來增加現地微生物之活動,從而增加現地微生物降解污染物之能力)和生物強化法(於現地環境中添加對污染物具有分解能力的特殊菌種或利用基因工程技術發展具特定污染物分解能力之微生物以達到提升菌量與優勢菌種類之效益)。

一群微生物可能是藉由共生(Symbiosis)降解環境污染物。藉由 Metagenomics 了解在污染場址內具有分解污染物潛力菌種之種類和其在所有菌種種類分佈比率,再透過分析污染場址的微生物群落基因序列,並經由生物分類資訊軟體分析,可提供污染物及其化合物存在的污染場址微生物群落組成與代謝資訊。這種做法在初期擬定整治策略時,將有利於鑑定是否具有特定微生物,了解參與降解途徑菌群與支持其養分供給菌群之關鍵生化反應步驟,以擬定適當的整治策略。如加強式生物整治的參數設定或需直接擇定物化方式的整治技術,避免整治時間和整治方式之誤判而造成整治費用的虛耗。整治過程中污染物種之轉變和參數變化如:原始污染物的濃度(如四氯乙烯和三氯乙烯)、限制反應速率污染物的濃度(如氯乙烯)、目標最終產物濃度(如乙烯或甲烷)、營養鹽添加濃度和頻率等,都可透過微生物群落的變化,而達到預測或調整相關的整治參數。

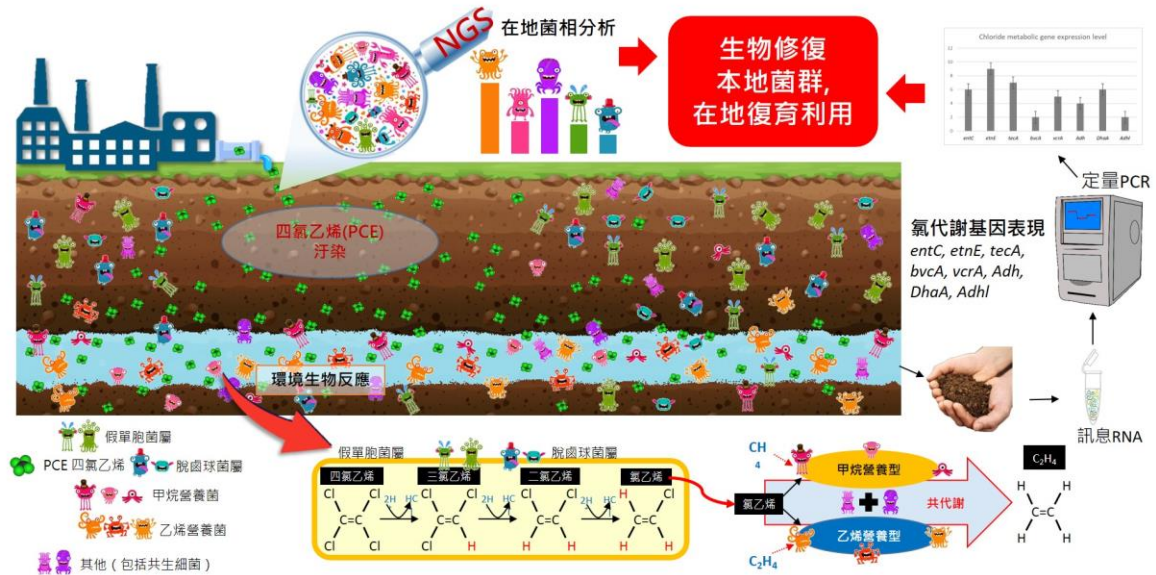
含氯有機污染物的生物整治研究上,目前已包括有針對氯乙烯、多氯聯苯、鹵代烷、氯苯和氯酚(Nikel et al. 2013)之整治方式。四氯乙烯和三氯乙烯之代謝是以生物性還原脫氯(reductive dechlorination)作用為主(Lee et al. 2008),以四氯乙烯為例,還原脫氯過程中,會產生中間產物如三氯乙烯、順-二氯乙烯(cis-1,2 DCE)和極少量反-二氯乙烯(trans-1,2 DCE)及氯乙烯(Aulenta et al., 2006)。含氯有機物之還原脫氯反應是利用氫原子逐步取代氯原子(Bennett et al. 2007, Hughes et al. 2002),現地生物的厭氧還原脫氯主要可藉由電子供給者(如氫氣、乳酸鹽、碳水化合物、醇類)傳遞至電子接受者(TCE 或 cDCE)降解 TCE 及 cDCE。另醋酸鹽、甲烷、葡萄糖、酚、烷基苯、甲基胺及苯甲酸鹽等有機物亦可當做還原脫氯之電子供給者之一(Kao and Prosser 1999)。在許多實場整治試驗中,添加有機基質如醣類(碳水化合物)於含氯乙烯類污染物之地下水中,具有提升現地微生物數量與促進現地微生物經由間接還原脫氯的過程中降解 TCE 及 cDCE (Ritalahti et al. 2006)。生物還原脫氯有幾個重要的因素:場內有無脫氯菌種、有無產氫菌存在與活動等。相關技術包括:利用生物刺激法(採取一些可促進微生物繁殖與生長的手段,如添加營養物等,來增加現地微生物之活動,從而增加現地微生物降解污染物之能力)和生物強化法(於現地環境中添加對污染物具有分解能力的特殊菌種或利用基因工程技術發展具特定污染物分解能力之微生物以達到提升菌量與優勢菌種類之效益)。



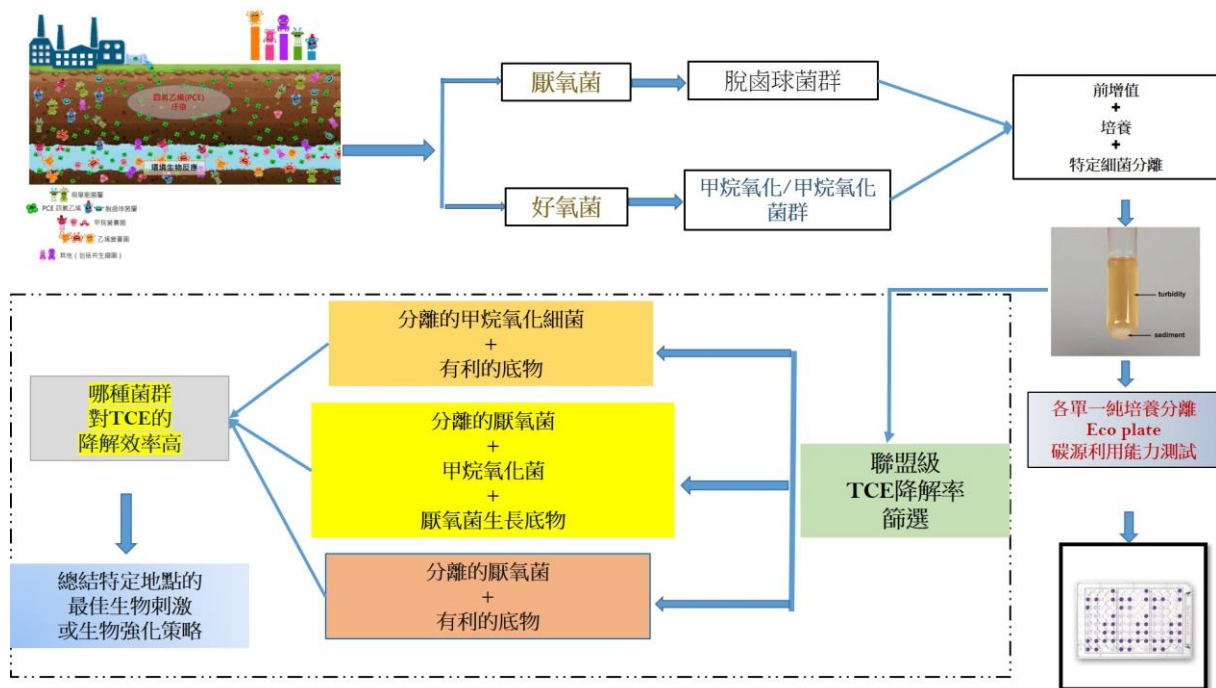
圖一、四氯乙稀厭氧還原脫氯途徑

二、研究目的

本計畫乃以四氯乙稀及三氯乙稀污染場址之生物整治作為母體。本研究的第一年計畫執行期間已針對兩處現地污染場址進行一系列含氯有機物之化學分析，並檢測受四氯乙稀及三氯乙稀土壤及地下水體的微生物群落，透過高通量檢驗分析瞭解其菌相分布。後續已透過生物資訊學與化學分析數據進行相關氯代謝功能基因預測、菌種預測及四氯乙稀等相關化學數據關聯性分析，並配合傳統 PCR 檢測定性，了解氯相關代謝菌種及主要含氯有機物之代謝基因。此外，本研究團隊於先前台灣南部地區泥火山研究中發現大量甲烷代謝菌存在於該地質層。由於該類菌群帶有 Methane Monooxygenase (MMO) 酵素，同時對三氯乙稀具分解作用，形成甲烷與三氯乙稀共代謝(Cometabolism)狀態。故本研究亦將泥火山中的甲烷代謝菌直接添加於污染場址，進行整治效能評估。本研究全程計畫願景如圖二所示，主要概念如圖三所示。本期計畫成果之實務應用的適用情境包括：(1)以 Ecoplate 與高通量定序分析之代謝結果整合預測，提供污染現地微生物代謝背景資料與後續整治策略所需之菌群資訊。(2)泥火山土壤樣本用於污染場址，進行含氯污染物整治之效能評估。(3)分析污染場址之生物及化學整治工法區域之含氯污染物濃度及其 TCE 降解功能菌之組成，了解整治工法之使用對現地 TCE 降解功能菌之可能影響，評估是否有加乘效益。(4)透過不同污染場址的含氯有機代謝菌群以代謝預測分析判定在台灣不同場址/不同土壤深度之氯代謝菌群是否有顯著差異，評估異地添加之可行性，以利於後續年度進行小規模模場試驗之參採，並以評估何種方式最為有利。



圖二、全程計畫願景圖



圖三、菌種/群篩選架構流程圖

三、重要性

進行實驗室規模的生物性加強式衰減試驗及本土菌株篩選，透過添加本土菌種或菌群(泥火山甲烷菌)、改良基質與最佳化菌種生長環境進行加強式衰減試驗，以評估何種方式最為有利於整體整治。另一部分將進行模場試驗，透過場址現地整治，進行整體生物性整治評估，並將整體技術專利化後進行商轉，本研究期望三年後可進入模場試驗，整體計畫規劃為六年期研究型加模場型研究計畫。透過前一年度調查微生物特定分解作用多樣性、活性及微生物族群大小、多樣性可了解現地所具有生物降解的潛力及可能的本土分解菌種，本研究依據前一年度成果，用以選用適當之整治方式或調整生物整治方式之相關參數。對於可降解污染物之微生物的種類、濃度、活性及具有潛力之功能的了解可作為未來技術開發之參考，包含：

- (1) 菌種(群)相關驗證與特性之參考。
- (2) 生物整治進度及效率的監測指標。
- (3) 加強式衰減生物整治方法建立之參考。
- (4) 自然衰減推估之依據等。

四、國內外相關執行情形

目前雖有許多物理，化學和生物學方法已用於消除工業廢水中的有機氯化物，其中仍以化學方法相對有效且快速，但因成本較為昂貴，且容易產生具危害之副產物，乃為其缺點。生物整治法通常比化學方法便宜，且被喻為自然、環保及節能的處理技術，也是目前環境污染整治的趨勢。美國環保署及其許多州政府皆將自然生物處理當作污染場



址整治之最優先選擇。加強式生物整治法是一種於現地藉由添加微生物生長所需之基質如碳源及營養鹽或添加而額外菌株，進而加速自然生物處理的方法，可區分為生物刺激(Biostimulation)及生物強化(Bioaugmentation)兩種模式。地下水中的含氯有機溶劑因毒性強，一般微生物無法像分解石油烴烴類一樣容易。一旦地下水遭受含氯溶劑的污染，就很難單靠地下水中的現有微生物自然分解，往往須藉由微生物共代謝方式將其分解去除(Lee et al. 2008)。生物整治方法較為人詬病的是因其有不可回復性，外加細菌可能造成的生態問題。但是許多國內外文獻均指出，在一般有機物自然衰減的污染場址就有具降解能力之菌群存在其土壤環境中。於有機氯化物污染場址常見的細菌包括鞘氨醇單胞菌屬(Sphingomonas spp.)、產鹼菌屬(Alcaligenes spp.)、紅球菌屬(Rhodococcus spp.)、假單胞菌屬(Pseudomonas spp.)、脫鹵菌屬(Dehalococcoides spp.)、甲烷營養細菌(Methanotrophic bacteria)及乙烯營養菌(Etheneotrophic bacteria)，大多為厭氧細菌，其中Dehalococcoides菌屬被認為是降解氯乙烯類化合物的關鍵細菌，在厭氧環境下可以有效的降解四氯乙烯或三氯乙烯等較高毒性氯乙烯化合物，但對於氯乙烯的還原分解則以甲烷營養細菌以及乙烯營養菌共代謝作用(Cometabolism)最為有效。以長遠角度而言，建立台灣本土有機氯化物污染降解之微生物資料庫有其前瞻性與重要性，可作為有機氯化物污染場址整治時本土菌種之添加依據。相關研究更可了解菌株特性與其有機氯化物毒性降解能力，進而作為污染場址選擇自然降解或加強式降解之參考依據。另外，透過現地調查與菌種分析，亦可估算選擇自然降解所需之時間。目前化學整治方法仍有其限制，例如：化學轉化效率與地下水流等化學動力問題等，但目前許多期刊指出在自然降解情況下，只要改變地下水中微生物生長之環境條件，即可透過本身微生物將水中氯乙烯等污染降解(Bennett et al. 2007)。故生物整治法應用於有機氯化物污染場址有其重要性，但為了消除微生物物種污染之疑慮，對於台灣本土污染場址的背景調查與本土(現地)功能菌群篩選就顯得相當重要。另外，本研究強調利用本土菌株進行整治及現地整治技術開發，將著重於瞭解現地狀況，透過基質改良來改善現地微生物組成，以強化整治速率並兼顧生態永續議題。

五、前一年度計畫研究成果

第一年度特殊代謝細菌與功能性基因檢測結果如表一所示，詳細樣本檢測成果請參考表五。綜論場址檢測結果，頭份(TF)場址在土壤樣本及地下水樣本的脫鹵菌屬(Dehalococcoides spp.及 Dehalogenimonas spp.)與功能性代謝基因(chloroethene - reductive dehalogenase (vcrA), alpha subunit of alkene monooxygenase (AkMO), epoxyalkane coenzyme M transferase (EaCoMT), Soluble methane monooxygenase (sMMO), particulate methane monooxygenase (pMMO)相關基因的檢測率高於安定(AD)場址。TF 土壤樣本約有 42.9%的特殊菌屬陽性率，AD 則有 20 %及 40 %兩類不同菌屬陽性率(Dehalococcoides



spp.及 *Dehalogenimonas* spp.)。在不同功能性基因的檢測，TF 土壤樣本約有 14.3-85.7% 檢測率區間，而 AD 則 10-40%。同樣的，在 TF 的地下水樣本，有 28%及 32%特殊菌屬檢出，及 12-52%的不同功能性代謝基因的檢出區間，相對也高於 AD 地下水樣本的整體檢出數據。

本研究團隊本年度總共送 26 個樣本至陽明大學基因體中心進行高通量定序分析(樣本包括苗栗頭份廠 9 個地下水樣本及 7 個土壤樣本、台南安定場 10 個土壤樣本)，後續分析需要透過國家高速網路中心的多核心電腦運算。本研究將經過 QIIME 軟體進行 ASV 分類進行 Greengene 序列資料庫比對後的結果分成門(phylum)及屬(genus)的分類菌種豐富度比較，從屬(genus)探討發現總共有 206 個屬，根據菌屬的資料庫可比對出 206 屬之細菌讀值，但 50-80%之序列無法比對出分類層次至屬。占有樣本讀值比例前三高的屬分別為(1) 脫硫尿單胞菌屬 *Desulfuromonas* (2) 假單胞菌屬 *Pseudomonas* (3) 鏈黴菌屬 *Streptomyces*。根據文獻指出，脫鹵菌屬種類多且在 16s 的片段上有較為相近之處，故可能在判讀上需要使用較多區間。分析結果中可發現，樣本中除了含脫鹵菌外，亦可發現甲烷菌 *Methanospaerula*，該菌屬被分類在古細菌界，主要在 TF_A43 的地下水中被發現，另外還包含不同的甲烷營養菌 *Methylobacterium*、*Methylobacter*、*Methylobacterium*、*Methylococcus*、*Methylomonas*、*Methylosarcina*、*Methylosinus*、*Methylotenera*、*Methyloversatilis* 9 個菌屬，但是佔比約 1%左右的比。這些菌屬對於氯乙炔的裂解是有幫助的菌屬。此外，亦可發現 *Mycobacterium* 菌屬主要歸類為乙炔營養菌，在整體氯乙炔降解過程中，可以與甲烷營養菌相互共生，使得氯乙炔降解速率更為快速。

有機氯化物污染場址中，脫鹵反應扮演重要角色，其中脫鹵菌被認為是降解氯乙炔化合物關鍵細菌，在厭氧環境下可將四氯乙炔降解至乙炔，因此在本研究以 *Dehalococcoides* spp.及 *Dehalogenimonas* spp.作為脫鹵菌活性指標，並以具脫氯功能的氯乙炔還原脫鹵酶(chloroethene-reductive dehalogenase, *vcrA*)作為脫鹵功能性基因指標評估(Adrian and Löffler, 2016)。此外，有機氯化物污染的場址常見細菌的還有鞘氨醇單胞菌屬(*Sphingomonas* spp.)、產鹼菌屬(*Alcaligenes*)，紅球菌屬(*Rhodococcus* spp.)、假單胞菌屬(*Pseudomonas* spp.)、甲烷營養細菌(*Methanotrophic bacteria*)及乙炔營養菌(*Etheneotrophic bacteria*)等。由文獻指出，在有機氯化物污染環境下，有些細菌可以利用乙炔和氯乙炔生長進而達到土壤淨化功能，例如：分歧桿菌屬(*Mycobacterium* spp.)、紅球菌屬(*Rhodococcus* spp.)、黃桿菌屬(*Xanthobacter* spp.)，其主要是利用烯烴單加氧酶(alkene monooxygenase)及環氧烷烴輔酶 M 轉移酶(epoxyalkane coenzyme M transferase)進行氯乙炔及乙炔之同化途徑，後再進入 CoA 代謝路徑(Allen et al., 1999; Krum et al.,



2000; Coleman et al., 2003)。因此在本研究以烯烴單加氧酶(alkene monooxygenase, AkMO, etnC)及環氧烷烴輔酶 M 轉移酶(epoxyalkane coenzyme M transferase, EaCoMT, etnE)作為其他非脫氯菌進行氯乙烯降解的其他功能性基因活性指標。故本研究透過 NGS 分析亦有發現上述相關菌屬的存在，顯示透過高通量分析結合其他檢測方法可以更有效的評估該現地的菌群狀況及後續整治上的建議與評估，最後本計畫於今年度(110 年)整合 Ecoplate 以及後續補正實驗，為本研究今年度初期成果，詳述於結果與討論第一段落。



四、研究方法及步驟

(一) 汙染場址採樣規劃與描述

本研究團隊已與台灣氯乙烯工業股份有限公司-環保技術開發部達成合作協議，合作意向書如下附件所示，場址位於頭份工業區內，為台灣氯乙烯工業股份有限公司之廢棄場址，目前該公司整治計畫書認定汙染至第二含水層，主要污染物為：1,2-二氯乙烷、氯乙烯、1,1,2-三氯乙烷，及其代謝產物，三氯乙烯、1,1-二氯乙烯、順 1,2-二氯乙烯，目前探勘資料顯示，第一含水層深度約 15m，滯水層分佈深度約 15-30m，第二含水層深度約 30-40m 間。目前監測井與整治井等資訊如下圖四所示。本次期末成果主要針對彰化地區汙染場址之新設井，進行採樣與規劃，合作廠商已於 11 年 4 月 21 至 22 日進行地下水採樣，本研究團隊原於 110 年 5 月底前往合作廠商在彰化廠址(氯乙烯相關汙染物)進行採樣，但因 5 月中旬爆發本土 COVID-19 群聚及大規模流行，所以採樣受到限縮，且校方規定實驗室需分流且實驗降載，因此，相關研究試驗受到延宕，但已於 8 月 5 日前往該場址進行採樣，共採集 10 處地下水體樣本，目前已完成實驗室進行核酸萃取及 QA/QC 確認，將透過第三代定序分析驗證，並進行實驗室菌株篩選及基質改良試驗等整治技術修正與開發。總共採集 10 處地下水樣本，本研究採及地下水深度界於 6.2-11.5 公尺深度，水位則為 4.817 至 5.619 公尺，pH 值介在 5.6-7.2 之間，相關濁度、DO 等水質參數請參考下表三。目前已完成場址地下水含氯汙染物化學檢測、菌群分析、功能性基因探討、磷脂質脂肪酸分析法等。此外，本研究團隊於 110 年 9 月 18-23 日間，進行另一新汙染場址土壤採樣(位於新北)，共計採集 12 口井，每口井採上中下層(以 3-5 公尺為一個深度差異，部分樣本有所缺漏)，共計採集 34 個土壤樣本；另外，本研究團隊亦於 10 月 2-18 之間，針對廠區內新設之 6 口井及廠區外 8 口井進行採樣，廠區外僅收集深處土壤樣本，共計 26 個土壤樣本，總計兩次土壤採樣共計 60 個土壤樣本。土壤樣本均已完成含氯相關汙染物化學檢驗(表 1)。本團隊就化學分析結果擬定後續採樣及微生物分析計畫，以利收集有效樣本進行相關實驗室整治改善試驗。在表 1 中同時顯示，本次研究樣本所進行的相關重要分析項目，包含磷脂質脂肪酸分析法(PLFA 檢測)、第三代定序分析(TGS)、氯相關化學分析及常規化學分析項目，此外，所有樣本均進行特殊菌種(*Dehalococcoides spp.*、*Dehalogenimonas spp.*)及功能性基因(*vrcA*、*entC*、*entE*、*mmoX*、*pmoA*)PCR 檢測。



表 1、本年度含氯污染場址樣本清單

sample id	sample type	sampling date	PLFA analysis	chemical analysis	DNA(TGS)
SBW#01-upper	soil	2021/9/19	✓	✓	-
SBW#01-middle	soil	2021/9/19	✓	✓	-
SBW#01-deep	soil	2021/9/19	✓	✓	-
SBW#02-upper	soil	2021/9/18	✓	✓	-
SBW#02-middle	soil	2021/9/18	✓	✓	-
SBW#02-deep	soil	2021/9/18	✓	✓	-
SBW#03-upper	soil	2021/9/18	✓	✓	-
SBW#03-middle	soil	2021/9/18	✓	✓	-
SBW#03-deep	soil	2021/9/18	✓	✓	-
SBW#04-upper	soil	2021/9/18	✓	✓	-
SBW#04-middle	soil	2021/9/18	✓	✓	-
SBW#04-deep	soil	2021/9/18	✓	✓	-
SBW#05-upper	soil	2021/9/19	✓	✓	-
SBW#05-middle	soil	2021/9/19	✓	✓	-
SBW#05-deep	soil	2021/9/19	✓	✓	-
SBW#06-upper	soil	2021/9/19	✓	✓	-
SBW#06-middle	soil	2021/9/19	✓	✓	-
SBW#06-deep	soil	2021/9/19	✓	✓	-
SBW#07-upper	soil	2021/9/20	✓	✓	-
SBW#07-middle	soil	2021/9/20	✓	✓	-
SBW#07-deep	soil	2021/9/20	✓	✓	-
SBW#08-upper	soil	2021/9/20	✓	✓	-
SBW#08-middle	soil	2021/9/20	✓	✓	-
SBW#08-deep	soil	2021/9/20	✓	✓	-
SBW#09-upper	soil	2021/9/23	✓	✓	-
SBW#09-middle	soil	2021/9/23	✓	✓	-
SBW#09-deep	soil	2021/9/23	✓	✓	-
SBW#10-upper	soil	2021/9/23	✓	✓	-
SBW#10-middle	soil	2021/9/23	✓	✓	-
SBW#10-deep	soil	2021/9/23	✓	✓	-
SBW#11-upper	soil	2021/9/22	✓	✓	-
SBW#11-middle	soil	2021/9/22	✓	✓	-
SBW#11-deep	soil	2021/9/22	✓	✓	-
SBW#12-upper	soil	2021/9/22	✓	✓	-
SBW#13upper	soil	2021/10/8	✓	✓	-
SBW#13medium	soil	2021/10/8	✓	✓	-
SBW#13out	soil	2021/10/8	✓	✓	-
SBW#14-upper	soil	2021/10/3	✓	✓	-
SBW#14-middle	soil	2021/10/3	✓	✓	-
SBW#14-deep	soil	2021/10/3	✓	✓	-
SBW#15-upper	soil	2021/10/3	✓	✓	-
SBW#15-middle	soil	2021/10/3	✓	✓	-
SBW#15-deep	soil	2021/10/3	✓	✓	-
SBW#16-upper	soil	2021/10/3	✓	✓	-
SBW#16-middle	soil	2021/10/3	✓	✓	-
SBW#16-deep	soil	2021/10/3	✓	✓	-
SBW#17-upper	soil	2021/10/2	✓	✓	-
SBW#17-middle	soil	2021/10/2	✓	✓	-
SBW#17-deep	soil	2021/10/2	✓	✓	-
SBW#18-upper	soil	2021/10/16	✓	✓	-
SBW#18-middle	soil	2021/10/16	✓	✓	-
SBW#18-deep	soil	2021/10/18	✓	✓	-
SBW#1out	soil	2021/10/16	✓	✓	-
SBW#3out	soil	2021/10/16	✓	✓	-
SBW#4out	soil	2021/10/18	✓	✓	-
SBW#8out	soil	2021/10/17	✓	✓	-
SBW#9out	soil	2021/10/17	✓	✓	-
SBW#10out	soil	2021/10/17	✓	✓	-
SBW#11out	soil	2021/10/15	✓	✓	-
SBW#12out	soil	2021/10/15	✓	✓	-
GM03-11M	Water	2021/8/5	-	✓	✓
GM10-11M	Water	2021/8/5	-	✓	✓
GM17-11M	Water	2021/8/5	-	✓	✓
N00431-7M	Water	2021/8/5	-	✓	✓
N00430-7M	Water	2021/8/5	-	✓	✓
GM02-11M	Water	2021/8/5	-	✓	✓
GM05-9.5M	Water	2021/8/5	-	✓	✓
GM15-11M	Water	2021/8/5	-	✓	✓
GM18-11M	Water	2021/8/5	-	✓	✓
GM20-11M	Water	2021/8/5	-	✓	✓



除了該場址外，本研究團隊已與其他環保整治公司簽屬 MOU(附件一)。未來若菌種/菌群商品開發成功，將由台灣環境友善資材有限公司，協助本團隊進行菌群大量生產。本團隊並與沛典環保有限公司及勤智興業有限公司達成協議，協助業者進行含氯污染場址整治計畫招標之場址評估與技術合作。上述廠商將成為本研究團隊第二年度研究計畫開發議題與第三及第四年度進行模場組整治之合作班底。目前四家公司均願意參與本研究團隊進行含氯污染場址之現地微生物整治技術開發與本土菌群篩選計畫。本研究團隊將持續與企業合作，期望可為含氯有機物污染場址生物整治貢獻所長，提升生物整治能量與未來技術開發應用。

合作協議書

立書人： 勤智興業有限公司 (以下簡稱甲方)
中正大學地球與環境科學系許萬基教授 (以下簡稱乙方)

甲方秉持企業社會責任及友善環境之企業經營理念，同意協助乙方推動土壤及地下水污染整治之科學動能，執行「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(乙方申請)」科研計畫，提供甲方研究上之整治參考與技術合作開發平台，並建立合作基礎。期望，未來若有污染整治場址，將共同合作爭取整治計畫，共同進行整治與開發，基於互信互惠原則，特簽訂本合作同意書(以下稱本同意書)，以雙方執行合作之依據：

第一條 合作範圍

本研究執行內容與後續合作接洽整治計畫。

第二條 合作內容

乙方本次研究主要目的，在與甲方建立技術合作與未來整治案進行，並從乙方建立的基質改良整治技術及分離及複製能分解環境污染物質之菌種，以作為未來發展環境污染整治作業生物製劑之基石，合作方式及內容說明如下：

1. 甲方提供整治規劃與未來模場整治場址，乙方自行進行研究技術開發與整治場址評估工作。
2. 甲乙雙方進行本研究溝通協調作業，乙方執行現場作業可透過甲方或其同意代表人協助計畫進行與討論，乙方作業應不干涉甲方既有工作，並定期開會整合後續發展及整治案接洽。
3. 乙方進行土壤及地下水中微生物菌相評析研究，其研究內容及成果可與甲方共同討論與商業化開發。
4. 乙方研究期間提供相關微生物整治諮詢服務與技術服務，以及未來相關研究成果之甲方優先權利與產品優惠。

立書人

甲方：
勤智興業有限公司
聯絡人：張博銘、楊青憲
代表人：陳俊明
聯絡電話：02-22261158#307
地址：新北市中和區中正路 753 號 5 樓之 1

乙方：
中正大學地球與環境科學系
計畫主持人：許萬基教授(簽章)
聯絡電話：05-2720411#52100
地址：嘉義縣民雄鄉大學路一段 168 號

合作協議書

立書人： 沛典環保有限公司 (以下簡稱甲方)
中正大學地球與環境科學系許萬基教授 (以下簡稱乙方)

甲方秉持企業社會責任及友善環境之企業經營理念，同意協助乙方推動土壤及地下水污染整治之科學動能，執行「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(乙方申請)」科研計畫，提供甲方研究上之整治參考與技術合作開發平台，並建立合作基礎。期望，未來若有污染整治場址，將共同合作爭取整治計畫，共同進行整治與開發，基於互信互惠原則，特簽訂本合作同意書(以下稱本同意書)，以雙方執行合作之依據：

一、 合作範圍

本研究執行內容與後續合作接洽整治計畫。

二、 合作內容

乙方本次研究主要目的，在與甲方建立技術合作與未來整治案進行，並從乙方建立的基質改良整治技術及分離及複製能分解環境污染物質之菌種，以作為未來發展環境污染整治作業生物製劑之基石，合作方式及內容說明如下：

1. 甲方提供整治規劃與未來模場整治場址，乙方自行進行研究技術開發與整治場址評估工作。
2. 甲乙雙方進行本研究溝通協調作業，乙方執行現場作業可透過甲方或其同意代表人協助計畫進行與討論，乙方作業應不干涉甲方既有工作，並定期開會整合後續發展及整治案接洽。
3. 乙方進行土壤及地下水中微生物菌相評析研究，其研究內容及成果須與甲方共同討論與商業化開發。

立書人

甲方：
沛典環保有限公司
聯絡人：楊青憲 經理
代表人：王敏星
聯絡電話：06-3038118
地址：710 台南市永康區中華路 280 之 33 號

乙方：
中正大學地球與環境科學系
計畫主持人：許萬基教授(簽章)
聯絡電話：05-2720411#52100
地址：嘉義縣民雄鄉大學路一段 168 號



合作備忘錄 (MOU)

立書人： 中正大學地球與環境科學系許萬基教授 (以下簡稱甲方)
台灣泥火山工業股份有限公司環境部顧問陳明達 (以下簡稱乙方)

茲因甲方為執行「土壤及地下水污染整治基金管理會」科研計畫透過乙方協助甲方進行學術研究樣本採集，基於雙方互惠原則，及推動土壤及地下水污染整治之科學動能，特簽訂本合作備忘錄（以下稱本備忘錄），以為雙方進行合作之依據：

第一條 合作範圍

本合作僅限於受計前之土壤及地下水樣品事宜與其他雙方後續協調同意之事項，甲方不干涉乙方整治作為，甲方願提供相關微生物整治諮詢服務，並保留雙方後續合作之優先權利。

第二條 保密義務

本樣品與研究僅為學術研究，甲方僅針對樣本進行學術分析，不涉及乙方相關隱私與權利，甲方研究成果僅提供乙方參考，保密義務不因本備忘錄期限屆滿或提前終止而失效，雙方應自本備忘錄失效後，繼續受保密義務之約束達三年，除非雙方另有協議約定。

第三條 無限制規定

本備忘錄之簽訂，除另有約定外，並未創設任何雙方合作關係，亦不代表任一方有義務簽署任何契約，或授權一方得代理他方，或限制任一方與任何第三人締結其他合作關係。

第四條 期限

本備忘錄自簽訂日起生效，效期自雙方簽署日起，迄109年12月31日或雙方簽訂正式之合作契約書時止（以二者先發生之時間點為準，任一方得於二個月前，以書面通知他方終止本備忘錄）。

本備忘錄正本1式2份，由甲乙雙方各執正本1份為憑。

甲方： 中正大學地球與環境科學系
計畫主持人：許萬基教授 (簽章)
聯絡人：陳明達
聯絡電話：05-2720411#52100
地址：嘉義縣民雄鄉大學路一段168號
國立中正大學地球與環境科學系
中華民國109年11月14日

乙方： 台灣泥火山工業股份有限公司
聯絡人：吳一言董事長 (簽章)
代表人：吳一言董事長 (簽章)
聯絡電話：TEL:05-2719333
地址：600嘉義市林森東路163巷113-1號

合作協議書

立書人： 台灣環境友善資材有限公司 (以下簡稱甲方)
國立中正大學地球與環境科學系許萬基教授 (以下簡稱乙方)

甲方秉持企業社會責任及友善環境之企業經營理念，同意協助乙方推動土壤及地下水污染整治之科學動能，執行「110年度土壤及地下水污染整治基金補助研究與現場試驗專案(乙方申請)」科研計畫，提供甲方研究上之菌種商業化諮詢與技術協助，並建立合作基礎，期望乙方開發菌種後可委由甲方共同進行菌種專利申請、生產、製造、商品化及後續行銷與推廣，基於互惠互惠原則，特簽訂本合作同意書(以下稱本同意書)，以雙方執行合作之依據：

第一條 合作範圍

本研究執行內容與菌種開發後續合作。

第二條 合作內容

乙方本次研究主要目的，在與甲方建立菌種專利申請與商業化模式，並從乙方建立的基質改良整治技術及分離及複製能分解環境污染物質之菌種，以作為未來發展生物製劑之基石，合作方式及內容說明如下：

1. 甲方提供菌種生產與相關技術，乙方自行進行研究技術開發、生物製劑及基質改良劑開發之工作。
2. 甲乙雙方進行本研究溝通協調作業，乙方執行現場作業可透過甲方或其同意代表人協助計畫進行與討論，乙方作業應不干涉甲方既有工作，並定期開會整合菌種及改良劑專利申請接洽。
3. 乙方進行土壤及地下水中微生物菌種及改良劑開發研究，其研究內容及成果可與甲方共同討論與商業化開發。

立書人

甲方：
台灣環境友善資材有限公司
聯絡人：吳一言董事長 (簽章)
代表人：吳一言董事長 (簽章)
聯絡電話：TEL:05-2719333
地址：600嘉義市林森東路163巷113-1號

乙方：
國立中正大學地球與環境科學系
計畫主持人：許萬基教授 (簽章)
聯絡電話：05-2720411#52100
地址：嘉義縣民雄鄉大學路一段168號

(二) 泥火山場址採樣描述

本研究團隊針對烏松泥火山樣本，萃取核酸後，經過 QA/QC 確校後，將樣本送次世代定序分析，該場址如圖 4 所示，共計隨著時序採集 7 個樣本(從噴發後第 1、4、8、22、96、158 及 418 天)，主要用以探討不同時間點泥火山對於含氯汙染降解有關菌種的消長。此外，本研究團隊亦針對高雄甲仙(JS)、高雄烏山頂 8 號(WST-H)、台東雷公火(LGH)、花蓮羅山 1 號(LS1a)、烏山頂 7 號(WSD7)及嘉義中崙溫泉(CLHS)共計 6 處泥火山噴發點樣本進行次世代分析，以利瞭解何種泥火山樣本中對於含氯代謝相關菌種最多，適合做為第三年小規模模場試驗之泥火山樣本來源。

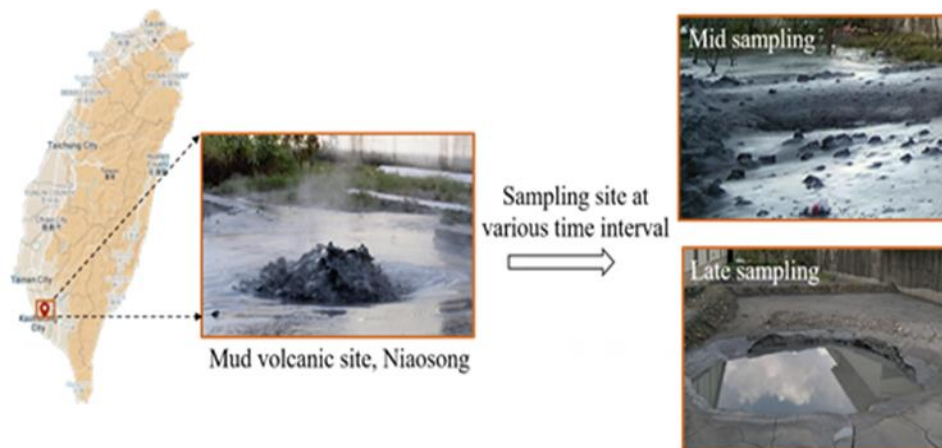


圖 4、泥火山樣本位置及相關採樣資訊圖



2. 菌種培養方法

Dehalococcoides spp. (Cheng et al., 2010)

(1) 以 60 mL 血清瓶中當容器。取 10 g 樣本混入 25 mL bicarbonate-buffered mineral salts medium(含 0.2 mM L-cysteine, 0.2 mM sodium sulfide and 0.5 mM DL-dithiothreitol)。瓶子用 black butyl rubber septa 及 aluminum crimp caps 密封，此外瓶中再添加 10 mM lactate and 55 mM PCE。

(2) 在 PCE 或 TCE 存在下培養轉移 20 次後，以 10% 序列稀釋的培養物，以 20 mL 瓶中為容器，放入 10 mL of mineral salts medium(含有 50-300 mg /L ampicillin, 0.2 mM TCE, 10 mM acetate and 500 000 ppmv hydrogen)。進行三次 dilution-to-extinction series and agar shakes。

(3) 收集個菌落重新接種到液體培養基中，以測試暴露在 TCE 時的脫氯活性。

(4) 脫氯過程中，以 160 mL 血清瓶為容器，以 100 mL mineral salts medium(含有 0.5 mM TCE 或 PCE, 10 mM lactate or 10 mM acetate, 500 000 ppmv hydrogen, 0.05 mg/L vitamin B12 及 2% of inocula。在黑暗中於 30°C 靜態培養。

Dehalogenimonas spp. (Maness et al., 2012)

(1) 以 butyl rubber stoppers 及 aluminum crimp caps 的 25 mL 血清瓶為容器。血清瓶中含 10 mL titanium-citrate reduced anaerobic basal medium(含 0.05 mM acetate, pyruvate, and lactate)，頂部 15 mL 的空間則充滿 80% H₂ / 20% N₂。

(2) 瓶中加入過濾除菌的 1,2-DCA 或 1,2-DCP 或 1,1,2-TCA，調整為 0.5 至 15 mM 初始濃度。

(3) 瓶中放入 0.3 mL 樣本接種物(3% v / v)，在黑暗中以 30°C 不晃動培養八周，以分析氯化溶劑和潛在的降解產物。

(4) 使用配備火焰離子化檢測器和氣相色譜儀 GC 測量氯化溶劑和降解產物，利用熱導檢測器偵測氣體頂空中的氫氣濃度。

Ethene-degrading bacteria (Etheneotrophs) (Chuang et al., 2010)

(1) 取 40 mL 地下水樣本或是 40 mL 土壤樣本粗過濾溶解液，加入 60 mL 礦物鹽培養基，使用 160 mL 血清瓶為容器。礦物鹽培養基配方(pH 6.9, 含 288 mg/L KNO₃, 120 mg/L KH₂PO₄, 200 mg/L Na₂HPO₄, 100 mg/L MgSO₄, 20 mg/L CaCl₂·2H₂O, 40 mg/L KCl, 246 mg/L NaCl, 3 mg/L FeSO₄·7H₂O 以及 1 mL 的微量金屬混合液)。微量金屬混合液配方(7 mg/mL ZnSO₄·7 H₂O, 2 mg/mL MnCl₂·4 H₂O, 1.5 mg/mL H₃BO₃, 5 mg/mL CoCl₂·6 H₂O, 1 mg/mL CuCl₂·2 H₂O, 1 mg/mL NiCl₂·6 H₂O and 3 mg/mL Na₂MoO₄·2H₂O)。



(2) 加入乙烯至初始濃度為 2.85mM。將瓶子在 $22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 下培養 63-64 天，每週三天用手搖動 20 秒。利用 EPA 方法 5021A 取瓶中頂部空間樣本(100 uL)，分析火焰離子化檢測(flame ionization detection)(乙烯測量)和熱導率檢測(thermal conductivity detection)(%氧氣和%CO₂ 濃度測量)。

(3) 如果在培養 60 天後乙烯被降解，氧氣被消耗釋出 CO₂，則顯示乙烯營養反應為陽性。

Methanotrophic bacteria (Methanotrophs) (Kwon et al., 2019)

(1) 使用 Nitrate Mineral Salts (NMS) media 為本方法專用培養基。取 40 mL 地下水樣本或是 40 mL 土壤樣本粗過濾溶解液，加入 45 mL 已滅菌過的 Nitrate Mineral Salt (NMS) medium，並使整體體積為 100mL，使用 160 mL 血清瓶為容器，然後用橡皮塞密封。

(2) 透過滅菌後過濾器注入的甲烷氣體 (15 ml, 0.67 mmol)，始得瓶的頂部空間獲得約 10% (vol / vol) 的甲烷氣體，然後在 37°C 下孵育 1 至 2 週，並以 260 rpm 振盪。

(3) 從懸浮液將其稀釋為 10 的 1 次方至 9 次方後，進行平板培養基(NMS)培養。

(4) 使用從第一次平板培養基中挑選適合菌落至第二次培養基中培養，並於培養基中加入甲烷氣體(1:4)，挑選單一菌落保存並萃取核酸試驗，進行菌種驗證。

Dehalo group bacteria-Anaerobic bacteria (Yohda et al., 2017)

(1) 使用 Anaerobic mineral salts medium 為本方法專用培養基/液。取 3.6 mL 地下水濃縮樣本或是 3.6 mL 土壤樣本濃縮粗過濾溶解液，添加至已含有 86.4ml 培養液的 100mL 玻璃瓶中，將瓶口用特氟龍塗層的丁基橡膠蓋密封，並用鋁環壓接。培養液體需使用氮氣注入清洗三分鐘並使用高壓滅菌後添加維生素溶液及還原劑使用。

(2) 從培養瓶上端抽取 5mL 的上端空氣，再注入 5mL 的氮氣，並加入 TCE 使其初始濃度為 100 μM ，然後放置於 21 $^{\circ}\text{C}$ 培養 1 至 2 周時間(期間需要燈光)。

(3) 將從培養液體中取出至含有 TCE 及厭氧礦物鹽培養基一起培養，大約每個稀釋倍率均放三個培養盤，然後放置於厭氧缸中培養(90% N₂-10% H₂)，最後採限制法分離。

3. 高效液相色譜法(high performance liquid chromatography, HPLC)

以溶液為移動相以膠體為固定相，樣品因與固定相及移動相之作用力不同而將混合物分離之層析法稱為液相層析，高效液相層析係將固定相之膠體顆粒降低至 5-10 μm 以提高分析及分離能力，但因為液體通過細微膠體時阻力增大，故需藉由高壓幫浦輸送液體以利移動相流動。主要用來檢測環境或產品中有機氣的殘留量，屬微量分析；高效能液相層析法用來檢測主成分約數%至數 10%。採樣後前處理完畢之樣本乃由協同主持人於正修科技大學進行有機氣分析。



4. 氣相質譜(Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 含氯有機物分析

地下水管制標準之含氯有機物測項進行水質分析，分析方法將遵造環檢所之公告方法進行。本場址主要污染物種為 1,2 二氯乙烷、氯苯、二氯甲烷、氯乙烯，VOCs 乃以 NIEA W785.55B 水中揮發性有機化合物檢測方法—吹氣捕捉／氣相層析質譜儀法進行檢測。本方法乃將含揮發性有機物之水樣以自動進樣設備注入吹氣捕捉裝置的吹氣管中，於室溫下通以氮氣進行吹氣，被吹氣出來的成份通過一連接管線進入捕捉管中，當吹氣完成後，將捕捉管加熱並以氮氣逆吹洗，使其上的待測樣品成份被脫附出來後，立即導入氣相層析儀管柱中，利用昇溫程式將每一待測化合物分離，並以界面連結之質譜儀來偵測化合物，以每個化合物相對滯留時間及電子撞擊質譜來確認樣品中的待測物，再以待測物與內標準品的主要離子相對強度及所建立的檢量線來定量待測物。氣相層析儀：Agilent Technologies 7890A Network GC system，層析管柱：Agilent 122-1364，DB-624：60 m × 0.25 mm 內徑，1.4 μm 膜厚，內覆 6 % Cyanopropyl-phenyl，94 % Dimethyl polysiloxane 屬於中極性管柱適用溫度範圍 -20 ~ 260°C 或同級品。質譜儀：Agilent Technologies 5973 Network MSD / 5975VL MSD，設定掃描範圍 40 ~ 350 amu，掃描速率 4.58 Scans/sec，當注入 25 ng GC/MS 儀器校準標準品 4-溴氟苯 (BFB) 時，必需能產生符合要求之 BFB 質譜。採樣後前處理完畢之樣本乃由協同主持人於正修科技大學進行有機氯分析。

5. 磷脂質脂肪酸分析法 (Bossio et al., 1998)

藥品

1. 0.15 M 檸檬酸鹽緩衝液：將 14.4 g 檸檬酸溶於 250 mL 去離子水中，加入 210 mL 0.5 M 氫氧化鈉溶液，將 pH 值調至 4，定量至 500 mL。
2. 單相混合萃取液 (One phase extraction buffer)：將氯仿、甲醇與檸檬酸鹽緩衝液以 1：2：0.8 體積比均勻混合。
3. 甲醇/甲苯 (Methanol/Toluene) 混合溶液：將甲醇與甲苯以 1：1 體積比均勻混合。
4. 0.2 M 氫氧化鉀 (Potassium hydroxide, KOH) 溶液：將 0.5611 g 氫氧化鉀溶於 50 mL 甲醇均勻混合。
5. 正己烷/氯仿 (Hexane/Chloroform) 混合溶液：將正己烷與氯仿以 4：1 體積比均勻混合。
6. 1 M 醋酸：將 57.417 mL 冰醋酸以去離子水定量至 1 L。

步驟

1. 取 4 g 冷凍乾燥之土壤樣品於鐵氟龍離心管中。



2. 加入 19 mL 單相混合萃取液，內含氯仿：甲醇：檸檬酸鹽緩衝液 = 1 : 2 : 0.8 v/v/v (one phase extraction buffer, chloroform: methanol: phosphate buffer = 1 : 2 : 0.8 v/v/v)，避光震盪二小時。以 2,500 rpm 離心 10 分鐘後將上清液移至分液漏斗。此步驟進行二次，第二次加入 8 mL 萃取液避光震盪半小時且離心過濾後，將上清液移至與前次之上清液混合。加入 7.1 mL 氯仿和 5.0 mL 檸檬酸鹽緩衝液於分液漏斗中。劇烈振盪均勻一分鐘，避光靜置 18 小時。
3. 取出分液漏斗的下層溶液（氯仿層）於試管中，以氮氣使氯仿揮發，待乾燥後，將試管避光儲存於 -20°C 中。
4. 將脂質以每次 250 μ L 氯仿回溶，轉移至固相矽膠 (silica gel) 萃取層析管柱，此步驟重複進行四次。接著加入 5 mL 氯仿淋洗固相萃取層析管柱。再分別加入 5 mL 丙酮淋洗層析管兩次。最後加入 5 mL 甲醇淋洗層析管，並收集此次淋洗液，在淋洗的過程中可以利用抽氣增加淋洗速度。以氮氣使甲醇揮發後，避光儲存於 -20°C 中。
5. 加入 1 mL 甲醇/甲苯混合溶液（甲醇：甲苯 = 1 : 1 v/v）及 1 mL 0.2 M 氫氧化鉀溶液（氫氧化鉀溶於甲醇），旋轉振盪器 (vortex) 震盪混合均勻，以 35°C 避光水浴 15 分鐘。
6. 加入 2 mL 正己烷氯仿混合溶液（正己烷：氯仿 = 4 : 1 v/v）及 0.3 mL 1 M 醋酸溶液調整 pH 值。加入 2 mL 超純水後 vortex 30 秒。以 2,000 rpm 離心五分鐘，將上清液移至氣相層析儀專用樣品瓶。此步驟進行二次，以氮氣將溶液揮發後，避光儲存於 -20°C 下。
7. 以 150 μ L 含十九酸甲酯 (19 : 0) (bacterial acid methyl ester mix CP, 47080, Sigma Aldrich) 正己烷回溶後，使用氣相層析儀 - 火焰離子化偵測器 (gas chromatography with a flame ionization detector, GC-FID) 配備 MIDI 峰值識別軟體，分析樣品各脂肪酸含量。
8. 樣品中未知的甲基酯化脂肪酸之相對滯留時間與標準品 (19 : 0) 之相對滯留時間相比，即可判定為何種脂肪酸。
9. 使用管柱為直徑 0.25 mm、60 m 長之 Thermo TR-5 column，載流氣體為氮氣，注射器為毛細式管柱注射器 (split mode)。
10. 溫度條件：管柱起始溫度為 70°C 持續二分鐘，接著每分鐘提升 30°C 升溫至 160°C，再以每分鐘 2.5°C 提升至最終溫度 280°C 持續 15 分鐘。
12. 脂肪酸之命名：總碳數：雙鍵數，雙鍵數後數字為雙鍵位置（從甲基端數來第幾個



碳上)。在總碳數前代號 i 及 a 分別代表 iso- 與 anteiso- 側鏈；雙鍵位置後 代號 c 及 t 分別代表 cis 及 trans 異構物；10 Me 代表從羧基端數來第十個碳上 有一甲基；cy 表示含有環丙烷 (cyclopropane) 結構； ω 表示倒著數 (從羧基端開始數)。

13. 各微生物群落之代表性 PLFA (Willers et al., 2015)：

- a. 總細菌群落- i15:0, a15:0, 15:0, i16:0, 16:1 ω 7c, 17:0, i17:0, cy17:0, 18:1 ω 7c, cy19:0 之加總；
- b. 革蘭氏陽性菌(Gram-positive bacteria)- i15:0, a15:0, i16:0, i17:0 及 a17:0；
- c. 革蘭氏陰性菌(Gram-negative bacteria)- 16:1 ω 7c, 16:1 ω 9c, cy17:0, 18:1 ω 7c, cy19:0；
- d. 放線菌 (Actinomycete)- 16:0 (10Me), 17:0(10Me), 18:0 (10Me)；
- e. 叢枝菌根菌 (Arbuscular mycorrhizal fungi, AMF)- 16:1 ω 5c；
- f. 真菌(Fungi)- 18:2 ω 6, 9c, 18:1 ω 9c；
- g. 原生動物(Protozoan)- 20:4 ω 6c

6. PCR (RT-PCR, qPCR, PCR)檢測

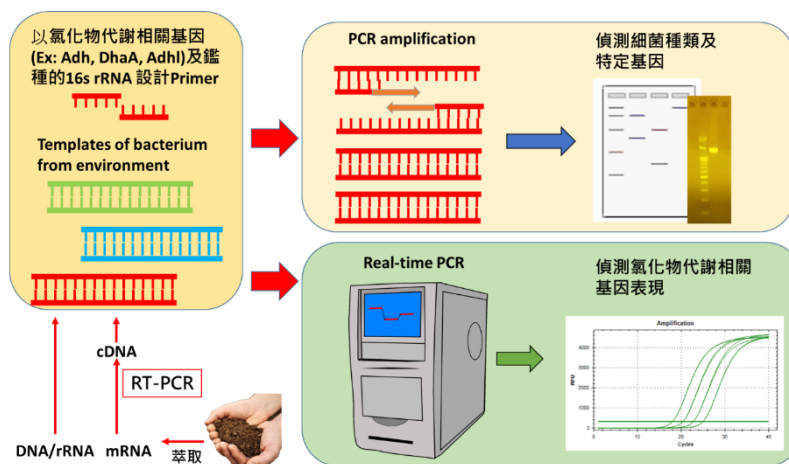


圖 5、PCR (RT-PCR, qPCR, PCR)檢測示意圖

7. 汙染物特殊降解菌之 qPCR 偵測資訊(圖 5)

將經萃取完成之樣本 DNA，參照文獻所示之 qPCR program 條件進行分析。厭氧菌方面，*Dehalococcoides* 以 16S rRNA 基因以及功能性基因(bvcA, vcrA, tceA)作為菌屬的定量分析；*Dehalogenimonas* 以 16S rRNA 基因做為分析；好氧乙烯降解菌則以 alpha subunit of alkene monooxygenase, AkMO (etnC), epoxyalkane coenzyme M transferase, EaCoMT (etnE), particulate methane monooxygenase (pMMO) pmoA gene 及 Soluble methane monooxygenase (sMMO) mmoX gene 作為分析。



8. 特殊汙染物降解菌之 RNA 萃取與反轉錄以定量功能性基因 mRNA

細菌 RNA 萃取利用 Sigma GenElute Bacterial Total RNA Purification Kit，詳細步驟參照圖十一使用說明書萃取流程圖。將萃取好的細菌 RNA 利用 Pro-tech MMLV-RT-KIT 並遵照原廠操作程序。取 50 μ l 細菌 RNA 加入 2.5 μ l 的 Random hexamers，加熱 65°C，5 分鐘，後置冰上至少 1 分鐘。添加 20 μ l 的 5X Reaction buffer、2.5 μ l 的 Rnase inhibitor、10 μ l 的 10mM dNTP Pre-Mix、2.5 μ l 的 MMLV Reverse Transcriptase、12.5 μ l 的 DEPC water，並以 pipet 混勻(此步驟需冰上操作)。最後上 PCR 機器以 25°C，10 分鐘、42°C，60 分鐘、70°C，10 分鐘，運作完成 RNA 的反轉錄。將反轉錄完成的 cDNA 參照表一所示分析功能性基因之活性。厭氧菌方面，Dehalococcoides 功能性基因(bvcA, vcrA, tceA)作為的 mRNA 活性定量分析；Dehalogenimonas 以 16S rRNA 基因做為分析；好氧乙烯降解菌則以 alpha subunit of alkene monooxygenase, AkMO (etnC)及 epoxyalkane coenzyme M transferase, EaCoMT (etnE)作為分析(Behrens et al. 2008)。

9. 次世代定序(Next generation sequencing, NGS)分析

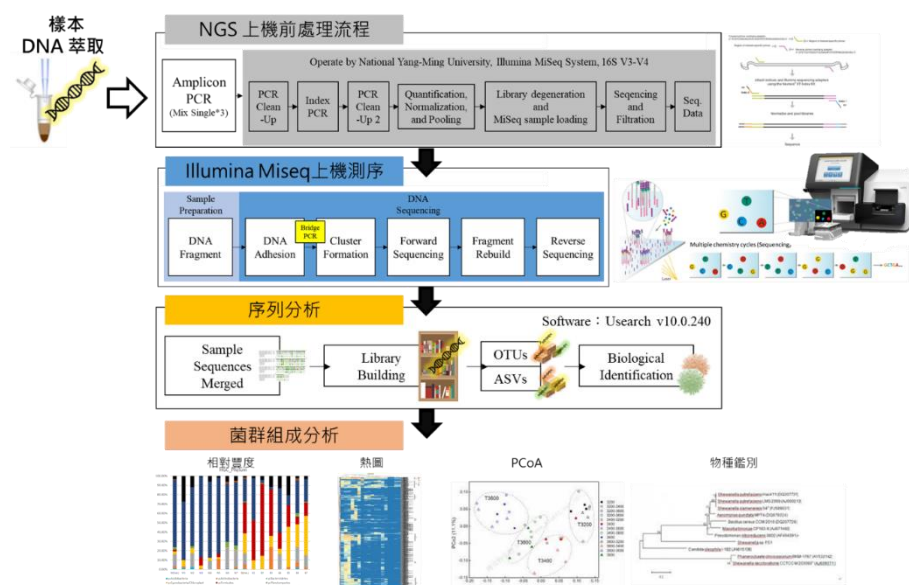


圖 6、NGS 實驗與分析流程圖

Illumina Genome Analyzer 將樣本 DNA 打成 200-500 bp 的小片段，於兩端接上接合器(Adaptor)後貼附於帶有 Adaptor 互補序列的晶片。透過橋式 PCR 增幅快速獲得大量的定序資訊，最後以軟體分析出完整 DNA 序列(圖 6)。

本研究是利用 Illumina Miseq 儀器定序分析，主要以 Standard V2，進行 2 X 150 方式定序，可以獲得 4.5Gb/lane 以上的資料量，與資料庫比對分析預測 16S rRNA 基因。預測的方式有很多種，第一個方式是以公開的序列資料庫基因將 DNA 重疊群(contigs)進



行比對，推斷歸屬於哪一族群的基因。第二個方式是根據從相關物種而來的 gene training sets 來預測比對並進行統計分析。針對各種基因的相對數量、功能總體基因體之間的比較或是透過與 COG 或 KEGG 等參考資料庫進行比較並進行多變量分析。利用細菌 16S rRNA 基因中的 V3-V4 之高度可變區間與 MacVector 6.5.1 的 Primers 應用程序設計引子，並進行 BLAST 比較篩選出專一性最好的引子。細菌(16S rRNA)基因引子設計如下：16S Amplicon PCR Forward Primer：5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3'、16S Amplicon PCR Reverse Primer：5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'。NGS 定序的數據將進行初步檔案篩選，包含：Paired-End Merge，連接兩端 reads 得到完整 16s Amplicon 序列以及 Data Cleaning，去除 Quality 較差與嵌合體序列，以確保後續分析的正確性。篩選後將使用密西根大學 (University of Michigan) 的 Dr. Patrick Schloss 團隊開發的 (<https://read01.com/Nx00a.html>) 軟體與 Dr. Robert Edgar 所開發之 USAERCH 軟體進行 operational taxonomic units (OTUs) 序列群集分類分析，以及使用 Qiime2 進行 amplicon sequence variants (ASVs) 群集分析，再利用相關統計軟體進行繪圖以利了解整體環境中細菌分布與組成，及是否存在目標感染細菌，以提供未來防治與管控之用。

NGS 獲得結果有：1. 對 OTU、ASV 代表序列進行註解 (OTU/ASV Annotation)、2. 物種豐富度評估 (Alpha Diversity)、3. 樣品間物種差異評估 (Beta Diversity)、4. 聚類分析 (Heatmap)、5. 群類結構分析、6. 利用 Mega6.1 軟體進行物種間親緣比對分析。上述 NGS 分析實驗乃與陽明大學基因體中心合作，已由中心助理研究員董建億博士協助 NGS 相關研究與分析。

10. 第三代定序 (Third generation sequencing, PacBio system) 分析

Pacbio system 將樣本 16s-DNA amplicons，於兩端接上接合器 (hyerpin) 後貼附於帶有 Adaptor 互補序列的晶片。透過橋式 PCR 增幅快速獲得大量的定序資訊，最後以軟體分析出完整 DNA 序列 (圖 6)。本研究是利用 **Pacbio system** 儀器定序分析，主要以 Standard V2，進行循環定序方式進行，可以獲得 4.5Gb/lane 以上的資料量，與資料庫比對分析預測 16S rRNA 基因。預測的方式有很多種，第一個方式是以公開的序列資料庫基因將 DNA 重疊群 (contigs) 進行比對，推斷歸屬於哪一族群的基因。第二個方式是根據從相關物種而來的 gene training sets 來預測比對並進行統計分析。針對各種基因的相對數量、功能總體基因體之間的比較或是透過與 COG 或 KEGG 等參考資料庫進行比較並進行多變量分析。利用細菌 16S rRNA 基因全長進行分析，細菌(16S rRNA)基因全長引子設計如下：27F (5'-AGA GTT TGA TYM TGG CTC AG-3'), and 1387r (5'-CGG CGG WGT GTA



CAA GGC-3')。NGS 定序的數據將進行初步檔案篩選，包含: Paired-End Merge，連接兩端 reads 得到完整 16s Amplicon 序列以及 Data Cleaning，去除 Quality 較差與嵌合體序列，以確保後續分析的正確性。篩選後將使用密西根大學(University of Michigan) 的 Dr. Patrick Schloss 團隊開發的(<https://read01.com/Nxooa.html>mothur)軟體與 Dr. Robert Edgar 所開發之 USAERCH 軟體進行 operational taxonomic units (OTUs)序列群集分類分析，以及使用 Qiime2 進行 amplicon sequence variants (ASVs)群集分析，再利用相關統計軟體進行繪圖以利了解整體環境中細菌分布與組成，及是否存在目標細菌，以提供未來防治與管控之用，且全長分析可以代表更為準確的菌種資訊。

全長定序獲得結果有：1. 對 OTU、ASV 代表序列進行註解 (OTU/ASV Annotation)、2. 物種豐富度評估(Alpha Diversity)、3. 樣品間物種差異評估(Beta Diversity)、4. 聚類分析(Heatmap)、5.群類結構分析、6. 利用 Mega6.1 軟體進行物種間親緣比對分析。上述 NGS 分析實驗乃與陽明大學基因體中心合作，已由中心助理研究員董建億博士協助 NGS 相關研究與分析。



五、結果與討論

(一) 安定場址樣本主代謝活性分析

本研究團隊針對台南安定場址之樣本進行土壤樣本之 Ecoplate 分析。Ecoplate 總共由 31 種不同碳源代謝基質組成，而 31 種基質可分成 6 大類，包含胺基酸類(amino acid)、羧酸類(carboxylic acid)、聚合物類(polymers)、胺類(amines)、酚類(phenols)、碳水化合物類(carbohydrates)。土壤樣本中對於這 6 類主要碳源代謝的多寡排序，大多為碳水化合物類>胺基酸類>羧酸類>聚合物類>胺類>酚類。在 IW03 的 0m、3m 及 6m 樣本中，這 6 類主要碳源利用組成占比較為相近，僅胺類(amines)與酚類(phenols)有些微變化。本研究後續透過菌相組成分析與特用基因分析，可以了解哪一類碳源代謝利用與含氯抗性或代謝相關菌群最有關連性。後續亦可以評估以 Ecoplate 進行初步菌種篩選機制，將有利於後續菌種篩選與微生物整治之參考。

土壤微生物群落功能預測中的代謝豐富度 (PICRUSt) 於本研究中用於預測不同深度和不同 TCE 濃度脅迫下土壤碳源利用和 TCE 降解的微生物群落功能代謝途徑，結果如圖 7 所示。根據 KEGG 數據庫，所有子途徑被分類為六個主要的超級途徑。在碳水化合物代謝途徑中，抗壞血酸(ascorbate)和醛糖酸(aldarate)代謝、半乳糖(galactose)代謝和 TCA 循環亞途徑比澱粉和蔗糖代謝以及戊糖更為突出。在所有氨基酸的預測途徑中，精氨酸(arginine)和脯氨酸(proline)代謝是所有土壤樣品中主要次級代謝途徑，其他胺基酸代謝途徑尚有穀胱甘肽(glutathione)、苯丙氨酸(phenylalanine)、甘氨酸(glycine)、絲氨酸(serine)和蘇氨酸(threonine)。在本研究中，與 9 米和 3-6 米深的土壤樣品相比，0-1 米深的土壤顯示出最高的精氨酸和脯氨酸代謝百分比讀數。

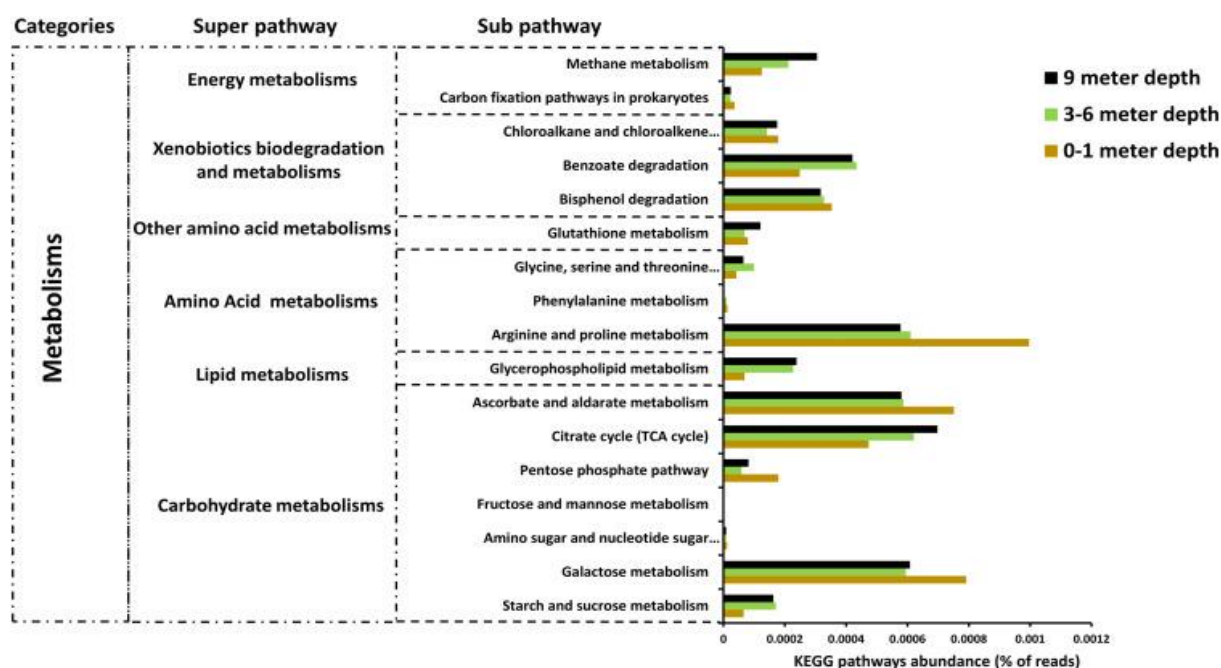


圖 7、碳源利用和 TCE 降解代謝相關的細菌群落中 KEGG 預測途徑的豐度及其在不同土壤深度的分佈



甘油磷脂代謝僅在脂質代謝通路下觀察到。在本案例中，深度 9 米和深度 3-6 米的土壤樣品顯示出比深度 0-1 米的土壤樣品更高的值。此外，在能量代謝途徑下觀察到原核生物中的甲烷代謝和固碳途徑。9 m 深度組土壤中的甲烷代謝途徑豐度高於 3-6 m 和 0-1 m 組土壤樣品。氯代烷(chloroalkane)和氯代烯烴(chloroalkene)、雙酚(bisphenol)和苯甲酸酯(benzoate)降解途徑也顯著存在於所有樣品的三個深度。與 0-1 m 組的豐度相比，3-6 m 和 9 m 組的整體碳水化合物和氨基酸代謝超級途徑豐度降低。與三個地點的 0-1 m 深度土壤相比，3-6 m 和 9 m 深度的異生化物生物降解、能量利用和脂質代謝途徑增加（圖 8）。

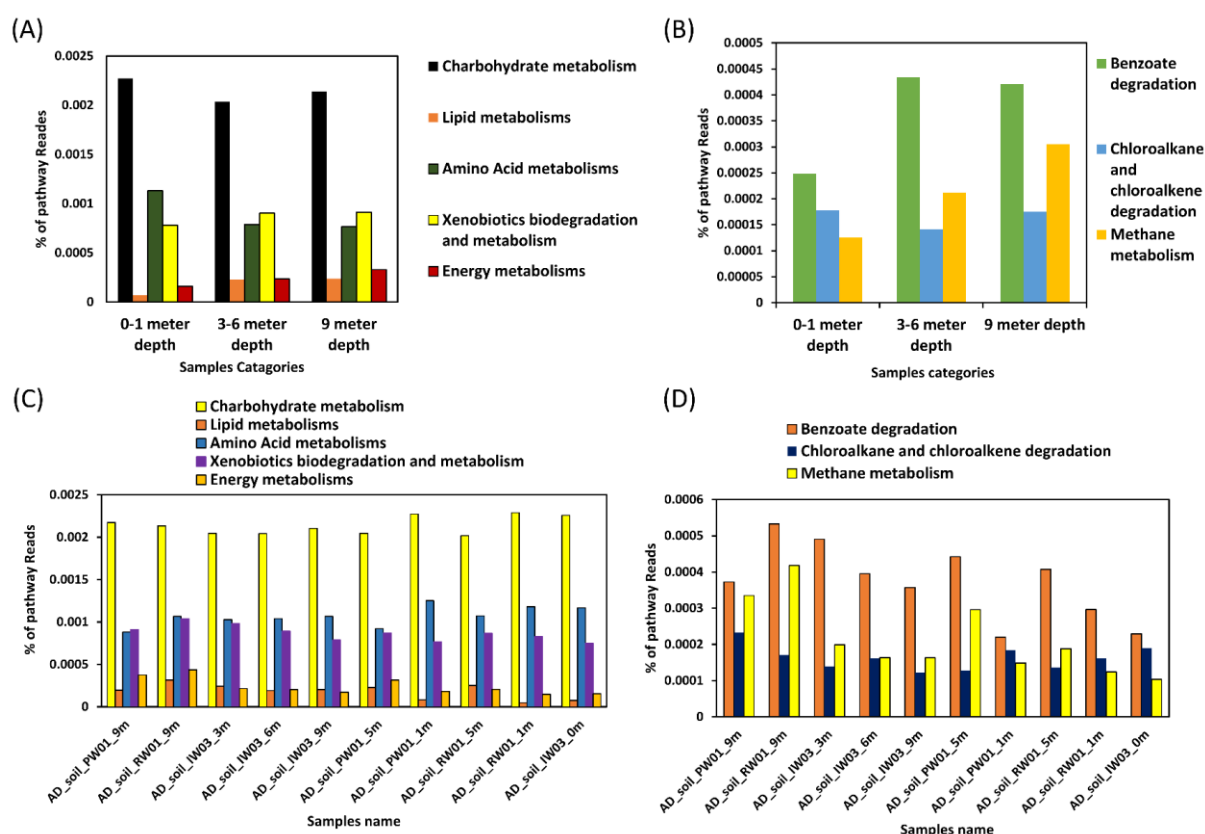


圖 8、(A&B) 不同土壤深度的 KEGG 代謝途徑和 TCE 降解相關途徑的豐度，
(C&D) 土壤樣品中 KEGG 代謝途徑和 TCE 降解相關途徑的豐度

在所有樣品中的細菌屬的研究結果顯示，黃桿菌屬(*Flavobacterium*)、梭菌屬(*Clostridium*)、脫硫菌屬(*Desulfotomaculum*)，硝化螺旋菌(*Nitrospira*)，食酸菌屬(*Acidovorax*)和假單胞菌屬(*Pseudomonas*)是與 TCE 潛在功能活性最相關之菌屬。如圖 9 中的熱圖顯示上述菌屬它們在上層、中層和下層土壤樣品中的分佈趨勢幾乎相似。皮爾遜相關係數 r 值表明硝化螺旋菌和鞘氨醇單胞菌屬(*Sphingomonas*)的豐度與 TCE 和整個樣品中相關子產物濃度呈顯著正相關。TCE 降解相關功能基因 PCR 分析的檢出率顯示 *vcrA* 和 *pmoA* 基因在 40% 的總樣本中呈陽性。然而，分別在 20%、30% 和 10% 的樣本中檢測到 *AkMO* 和 *EaCoMT* (*etnC*, *etnE*)

和 mmoX 基因（表 2）。

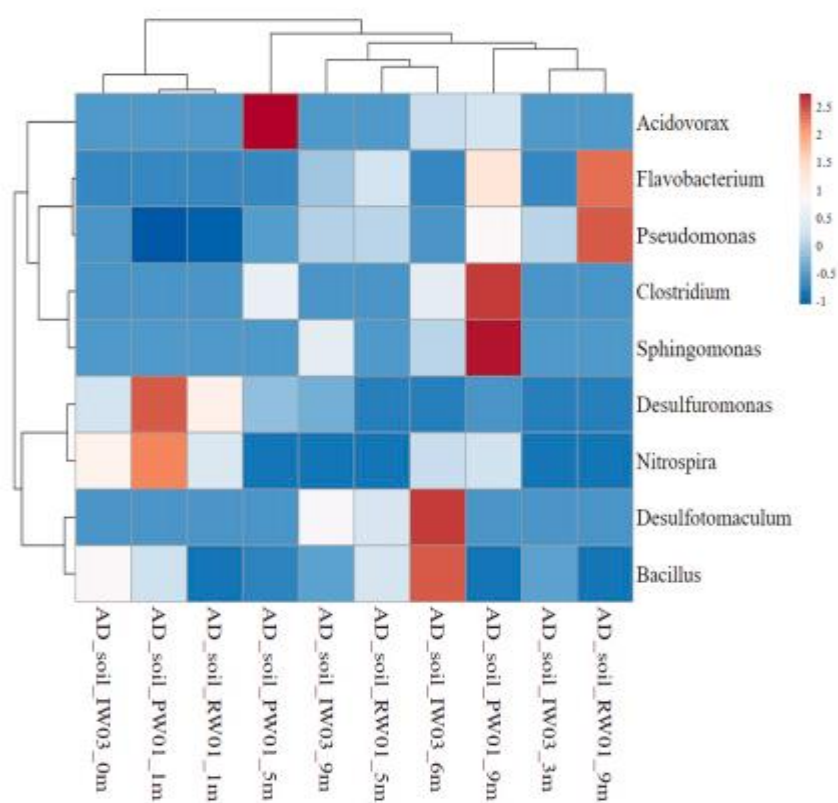


圖 9、每個土壤樣品中與 TCE 降解相關的特定屬的熱圖

表 2 PCR 檢測土壤樣品中涉及 TCE 降解的功能基因

Name of genes	Chloroethene-reductive dehalogenase(<i>vcrA</i>)	Alpha subunit of alkene monooxygenase (AkMO)(<i>etnC</i>)	Epoxyalkane coenzyme transferase (EaCoMT)(<i>etnE</i>)	particulate methane monooxygenase gene (<i>pmoA</i>)	Soluble methane monooxygenase gene (<i>mmoX</i>)
0 to 1-meter depth soil (n=3)	1 (33.3%)	1 (33.3%)	3 (100%)	1 (33.3%)	0 (0%)
3 to 6-meter depth soil (n=4)	1 (25 %)	1 (25 %)	0 (0%)	2 (50%)	1 (25%)
9-meter depth soil (n=3)	2 (66.7%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33.3%)	0 (0%)
Total % of PCR detection rate	4 (40%)	2 (20%)	3 (30%)	4 (40%)	1 (10%)

為了評估生物刺激方法在這些受污染的採樣點的不同單一碳源下的潛在適應性，本研究對 Biolog EcoPlate™的 31 個特異性基質和預測功能途徑進行了分析。在圖 10 中，根據 Pearson 的相關性測試結果，發現某些特定的 Biolog EcoPlate™基質利用與 KEGG 的碳固定途徑具關連性。結果表明，在外源性生物降解和代謝中，雙酚、氯代烷(chloroalkane)和氯代烯烴(chloroalkene)降解的豐度與赤蘚糖醇



(i-erythritol)、L-精氨酸(L-arginine)、苯乙胺(phenylethylamine)和 γ -羥基丁酸(γ -hydroxybutyric acid)在樣品中的利用具關連性。主要化合物與 TCE 降解屬豐度之間的皮爾遜相關係數 r 值整理於表 3 中。

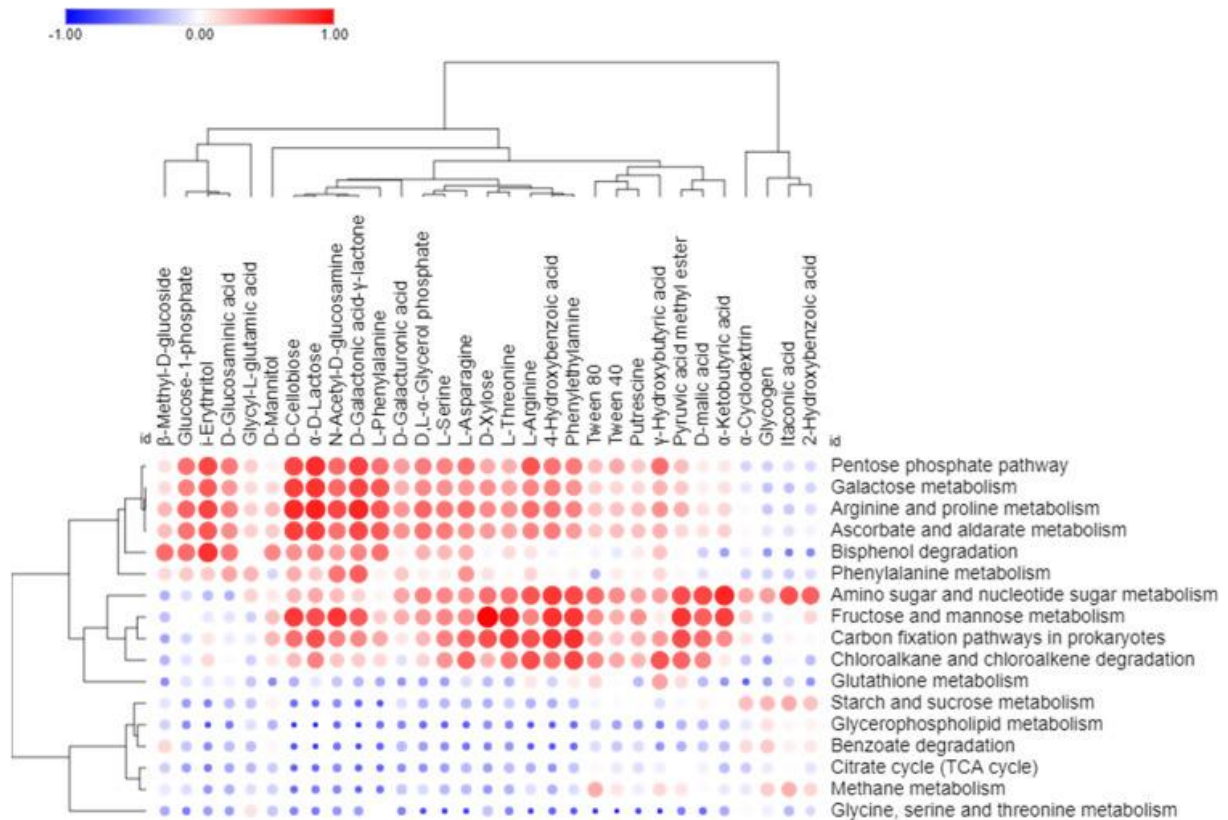


圖 10、碳基質與 TCE 降解代謝相關的預測功能途徑與土壤樣品中土壤細菌群落的 Biolog EcoPlate™ 碳源利用能力之間的 Pearson 相關性測試結果。(紅色和藍色分別表示正相關和負相關，而圓圈的大小和顏色梯度表示皮爾遜相關 r 值的大小)。



表 3 主要化合物與 TCE 降解屬豐度之間的皮爾遜相關係數 r 值

Growth conditi on	Phylum	Genus	Met		1,2-		Meta/ Paraxy lene	Dimet hylbe nzene
			hylyb enze ne	cis-1,2- Dichloroet hylene	Trichlor oethylen e	Dichlo roetha ne		
Anaero bic	Bacteroid etes	<i>Flavobacteri um</i>	0.12 3	0.590	0.487	0.497	0.388	0.406
			0.60			0.887*	0.901*	0.899*
	Firmicutes	<i>Clostridium</i>	8	0.853**	0.887**	*	*	*
		<i>Desulfotoma</i>	0.14					
	Firmicutes	<i>culum</i>	6	0.167	-0.171	0.203	-0.097	-0.126
	Proteobact eria	<i>Desulfurom onas</i>	0.06 8	-0.398	-0.219	-0.341	-0.167	-0.171
Aerobic			0.47					
	Nitrospirae	<i>Nitrospira</i>	2	-0.032	0.048	0.042	0.109	0.100
	Proteobact eria	<i>Sphingomon as</i>	0.64 2*	0.831**	0.935**	0.865*	0.933*	0.937*
	Proteobact eria		-			*	*	*
		<i>Acidovorax</i>	0.118	0.081	0.087	0.082	0.085	0.089
			0.12					
	Firmicutes	<i>Bacillus</i>	9	0.023	-0.271	0.079	-0.200	-0.223
	Proteobact eria	<i>Pseudomona s</i>	0.04 8	0.507	0.353	0.388	0.230	0.251

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

為了探索通過功能性微生物進行生物強化方法的潛在應用，使用多元數據分析 (PCA) 概念圖來可視化 TCE 相關細菌屬與每個樣品中化合物濃度和主要碳基質利用之間的關係，結果如圖 11 所示。其中的黃桿菌屬、梭狀桿菌屬、脫硫菌屬、硝化螺菌屬、嗜酸菌屬和假單胞菌屬不僅存在於類似於甲苯、順式-1,2-二氯乙烯、TCE、氯乙烯和二甲苯的幾何坐標中，而且也和 Biolog EcoPlate 主要碳源利用基質有關。在 PW01 和 IW03 點的 6、5 和 9 m 深度處，這種共存作用現象更為明顯。假單胞桿菌和脫硫單胞菌之間的關係以及碳水化合物消耗則僅在採樣點的 0-1 m 深度土壤樣品中觀察到。

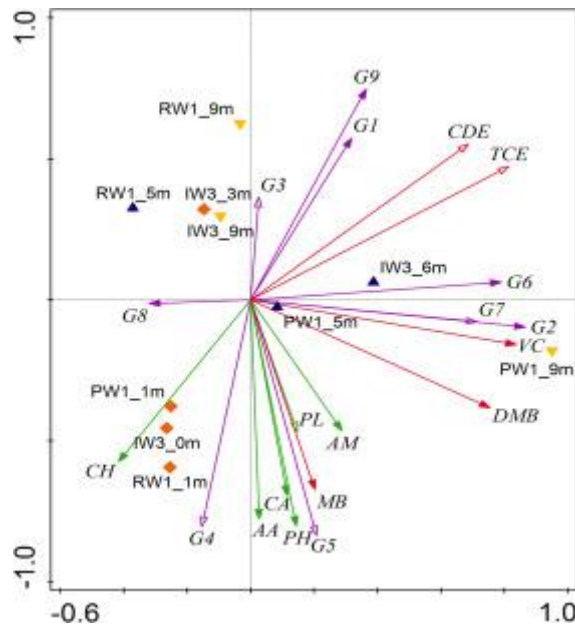


圖 11、基於 Biolog EcoPlate™ 的土壤樣品中 TCE 降解特定屬和現有化合物以及六種主要碳源的主成分分析。(G1：黃桿菌屬；G2：梭菌屬；G3：脫硫菌屬；G4：脫硫單胞菌屬；G5：硝化螺菌屬；G6：鞘氨醇單胞菌屬；G7：食酸桿菌屬；G8：芽孢桿菌屬；G9：假單胞菌屬；MB：甲苯；CDE：順式-1,2-二氯乙烯；TCE：三氯乙烯；VC：氯乙烯；DMB：二甲苯；CH：碳水化合物；AA：氨基酸；CA：羧酸，PI：聚合物；AM：胺；PH：酚類)。

通過 Biolog Ecoplate 對土壤微生物群落的代謝活性結果表明，在表層土壤中，IW03 採樣點的 AWCD (average well color development)值最高，而 PW01 採樣地點的地下土壤的 AWCD 值最大。與深層土壤相比，上表層土壤的多樣性增強了基質的消耗力。在深層土壤中，則在微生物豐度和多樣性上受到限制。此外，根據土壤深度梯度，降低氧氣和養分有效性已被證明會對異養細菌產生負面影響並調節其代謝率。例如，Biolog EcoPlate™ AWCD 中唯一的碳利用能力在 9 m 深度處，低於所有採樣點上表層土壤樣品的水平。六大類碳源，如氨基酸、碳水化合物、羧酸、聚合物、酚類和胺類在表層土壤中的消耗量遠高於在地下土壤中的消耗量。由 AWCD 結果亦能看出，高度和中度 TCE 污染的土壤樣品的碳源利用率較低，代謝能力受限，在 TCE 濃度低的土壤中觀察到相反的趨勢。此外，特定的碳源利用率與本研究的功能微生物的豐度呈正相關(表 4)。



表 4 TCE 降解屬豐度與 Biolog Ecoplate 特定碳源利用之間的皮爾遜相關係數

	<i>Flavobacterium</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Desulfotomaculum</i>	<i>Desulfuromonas</i>	<i>Nitrospirillum</i>	<i>Sphingomonas</i>	<i>Acidovorax</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>
Pyruvic acid methyl ester	0.224	0.051	-0.383	0.155	0.413	-0.039	-0.053	0.079	0.173
Tween 40	0.015	0.306	-.692*	0.156	0.071	0.260	0.268	- 0.611	-0.054
Tween 80	0.224	0.190	-.706*	0.224	0.228	0.134	0.207	- 0.487	0.217
α -Cyclodextrin	-0.536	0.133	0.082	-0.159	-0.151	-0.263	0.674*	0.200	-0.360
Glycogen	-0.297	0.195	-0.083	-0.044	-0.289	-0.183	0.952**	- 0.175	-0.229
D-Cellobiose	-0.413	-0.323	-0.262	0.479	0.559	-0.296	-0.282	0.156	-0.466
α -D-Lactose	-0.310	-0.205	-0.281	0.648*	0.780* *	-0.174	-0.323	0.176	-0.439
β -Methyl-D-glucoside	-0.362	-0.283	-0.404	0.231	-0.086	-0.458	0.152	- 0.396	-0.267
D-Xylose	-0.227	-0.158	-0.077	0.088	0.363	-0.125	-0.183	0.371	-0.193
i-Erythritol	-0.388	-0.244	-0.214	0.702*	0.544	-0.272	-0.222	- 0.095	-0.519
D-Mannitol	-0.414	-0.007	-0.069	0.010	0.124	-0.249	0.117	0.168	-0.257
N-Acetyl-D-glucosamine	-0.205	-0.425	-0.288	0.347	0.426	-0.400	-0.357	0.146	-0.266
D-Glucosaminic acid	-0.240	-0.176	-0.164	0.344	0.137	-0.176	-0.127	- 0.247	-0.350
Glucose-1-phosphate	-0.187	-0.454	-0.467	0.584	0.236	-0.534	0.015	- 0.391	-0.248
D, L- α -Glycerol phosphate	-0.385	-0.086	-.642*	0.570	0.429	-0.337	0.352	- 0.269	-0.407
D-Galactonic acid- γ -lactone	-0.398	-0.421	-0.254	0.554	0.582	-0.389	-0.368	0.176	-0.519
D-Galacturonic acid	-0.433	-0.072	-0.323	0.269	0.072	-0.319	0.486	- 0.194	-0.449
2-Hydroxybenzoic acid	-0.292	0.185	-0.173	-0.032	-0.176	-0.202	0.921**	- 0.090	-0.216



4-Hydroxybenzoic acid	-0.286	0.221	-0.380	0.386	0.598	0.161	0.097	0.074	-0.370
γ -Hydroxybutyric acid	0.188	0.302	-0.629	0.579	0.554	0.226	0.054	-0.428	-0.068
Itaconic acid	-0.153	0.480	-0.266	0.032	-0.080	0.104	0.958**	-0.232	-0.166
α -Ketobutyric acid	-0.286	0.106	-0.252	0.018	0.114	-0.135	0.521	0.104	-0.224
D-malic acid	-0.151	0.413	-0.472	-0.030	0.207	0.309	0.220	-0.111	-0.094
L-Arginine	-0.080	0.274	-0.552	0.612	0.716*	0.190	0.076	-0.149	-0.301
L-Asparagine	-0.194	0.178	-0.586	0.435	0.560	0.129	-0.136	-0.164	-0.337
L-Phenylalanine	-0.570	-0.306	-0.084	0.752*	0.794**	-0.302	-0.273	0.344	-0.621
L-Serine	-0.409	0.175	-0.594	0.396	0.451	0.062	0.114	-0.219	-0.424
L-Threonine	-0.237	0.123	-0.300	0.098	0.419	0.104	-0.157	0.169	-0.196
Glycyl-L-glutamic acid	-0.309	-0.148	-0.109	0.530	0.331	-0.355	0.331	0.079	-0.433
Phenylethylamine	0.003	0.231	-0.443	0.318	0.577	0.236	-0.092	-0.009	-0.112
Putrescine	-0.178	0.226	-0.547	-0.002	0.032	0.159	0.147	-0.377	-0.125
**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).									
*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).									

基於預測的 PICRUST 分析用於確定代謝過程中涉及的代謝途徑，本研究結果顯示，與表層土壤樣品相比，兩種表層土壤樣品中土壤微生物群落的外源性化合物生物降解和代謝均略有增加。考慮到本研究側重於氯代烷和氯代烯烴降解途徑，這些途徑在地表和地下土壤樣品中均顯著存在（圖 12B）。特別是在受污染的 9 m 深度樣品中。結果顯示高濃度的 TCE 積累可以提高 TCE 降解功能微生物的豐度及其代謝潛力。此外，在碳水化合物等初級碳源下，與表層土壤相比，地下樣品中的氨基酸代謝途徑豐度降低，而地下樣品中的脂質和能量代謝途徑增加（圖 3-5A）。在高到中等 TCE 污染或壓力的樣品中，脂質、氨基酸和外源性化合物的生物降解和能量代謝相關途徑顯著增加（圖 3-5C）。在本研究中，在外源性化合物生物降解和能量代謝類別下，氯烷和氯烯烴、苯甲酸鹽和甲烷代謝途徑的豐度在高到中等 TCE 濃度的樣品中明顯更豐富（圖 3-5D）。氯烷和氯烯烴途徑和甲烷代謝可能代表厭氧和好氧 TCE 生物降解。此外，相關性分析及統計數據證實了預測的功能途徑，這些途徑與大多數土壤樣品中相關的特定碳源利用具有顯著的正相關。

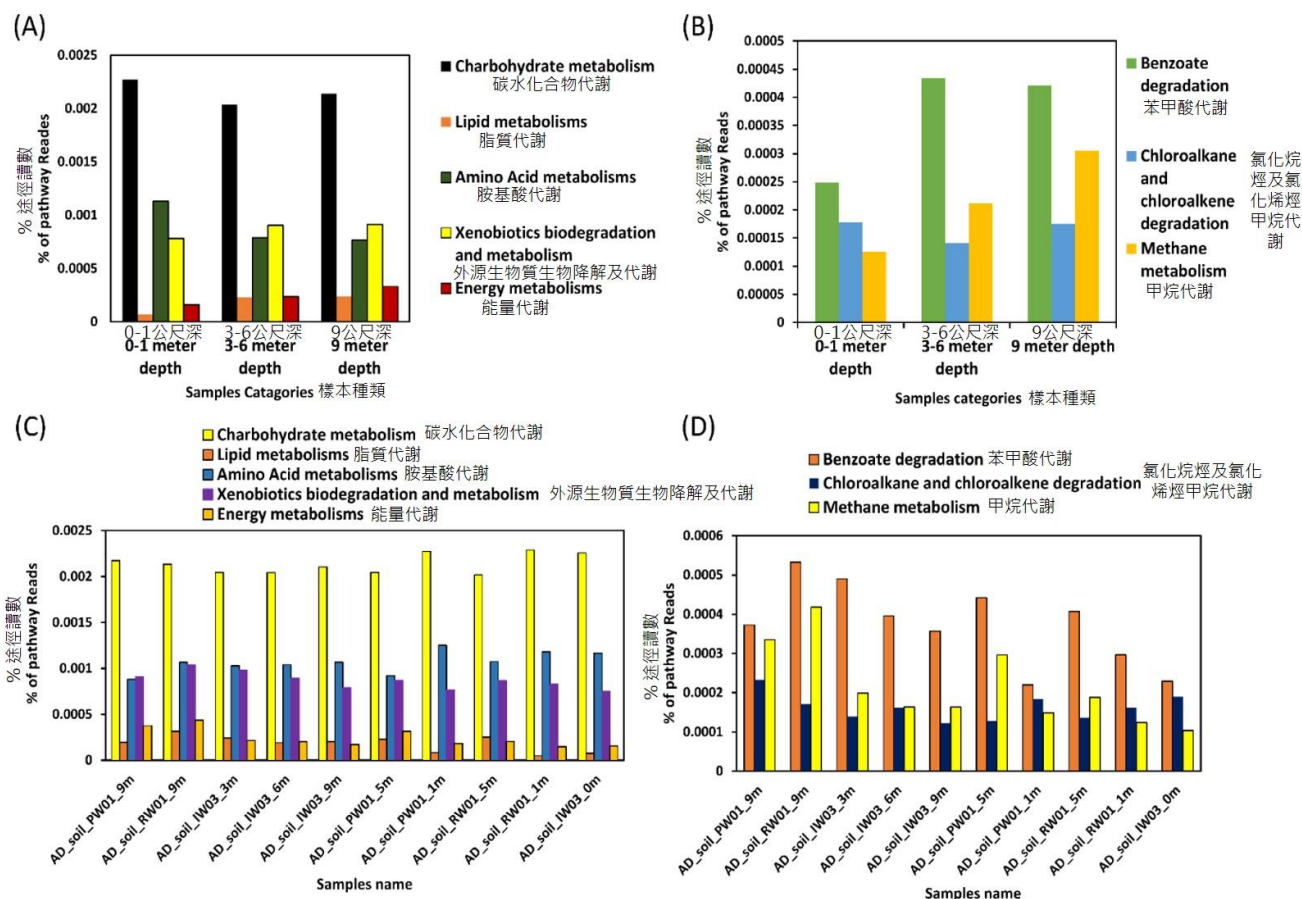


圖 12、(A&B) 不同土壤深度的 KEGG 超級途徑和 TCE 降解相關途徑的豐度，
(C&D) 土壤樣品中 KEGG 超級途徑和 TCE 降解相關途徑的豐度

Gushgari-Doyle & Alvarez-Cohen (2020)對 *Dehalococcoides mccartyi* 195 進行的研究顯示，包括 L-精氨酸和苯乙胺在內的外源氨基酸補充劑可以促進 TCE 脫氯。而 γ -羥基丁酸的利用也顯示 γ -氨基丁酸 (GABA) 分流途徑的作用可以維持足夠的谷氨酸水平，同時為 α -酮戊二酸轉化為琥珀酸 (TCA 循環) 提供支持能量和還原電位的替代途徑。此外，作為碳源及氮源的氨基酸補充劑對碳氫化合物降解菌群活性有顯著影響 (Semboung Lang et al., 2016)。在土壤微生物群落水平，本研究也顯示 L-精氨酸、苯乙胺和 γ -羥基丁酸的利用曲線與 TCE 降解途徑 (氯代烷和氯代烯烴降解) 呈顯著正相關。

對於有效的 TCE 降解，消耗電子的還原脫氯過程是關鍵步驟。大多數受 TCE 污染的生態位都缺乏營養和電子供體。在受污染的地下貧營養環境中合適的電子供體的可及性支持還原脫氯。因此，前人已提出了添加電子供體作為增強微生物還原脫氯的做法。在微觀層面上，He et al. (2002)比較了乙酸鹽與氫氣作為直接電子供體刺激微生物還原脫氯的適用性，表明單獨的乙酸鹽可以驅動完全脫氯成乙烯。氫作為電子供體的選擇也受到挑戰，因為其他非脫氯微生物與脫氯降解劑競爭氫氣作為基質，已經建議設計緩釋氫氣供體如丙酸鹽和丁酸鹽來支持氫營養脫氯降解劑 (He et al., 2002)。最終，碳源是為微生物提供能量和構件，包括



脫氯過程所需的電子供體。

本研究將去年結果結合今年計畫初期所進行的進階實驗整合，本研究團隊已將整合後成果投稿於 Journal of Hazardous Materials (IF:10.588)，目前已線上出版(圖 13)，文章題目為 Depth-resolved microbial diversity and functional profiles of trichloroethylene-contaminated soils for Biolog EcoPlate based biostimulation strategy。



Journal of Hazardous Materials

Volume 424, Part A, 15 February 2022, 127266



Research paper

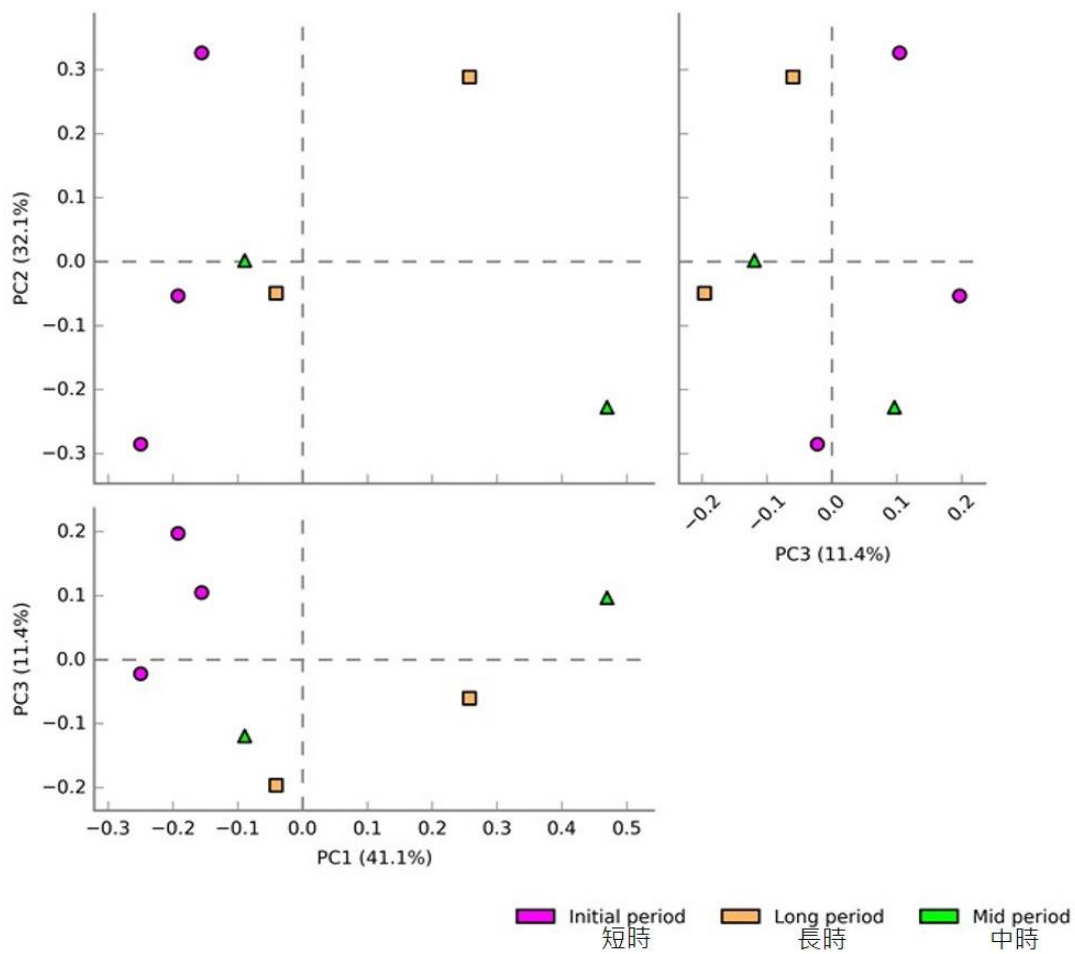
Depth-resolved microbial diversity and functional profiles of trichloroethylene-contaminated soils for Biolog EcoPlate-based biostimulation strategy

Suproakash Koner ^{a, b, 1}, Jung-Sheng Chen ^{c, 1}, Bing-Mu Hsu ^{b, 2}, Jagat Rathod ^d, Shih-Wei Huang ^{e, f}, Hua-Yi Chien ^{g, h}, Bashir Hussain ^{a, b}, Michael W.Y. Chan ^a

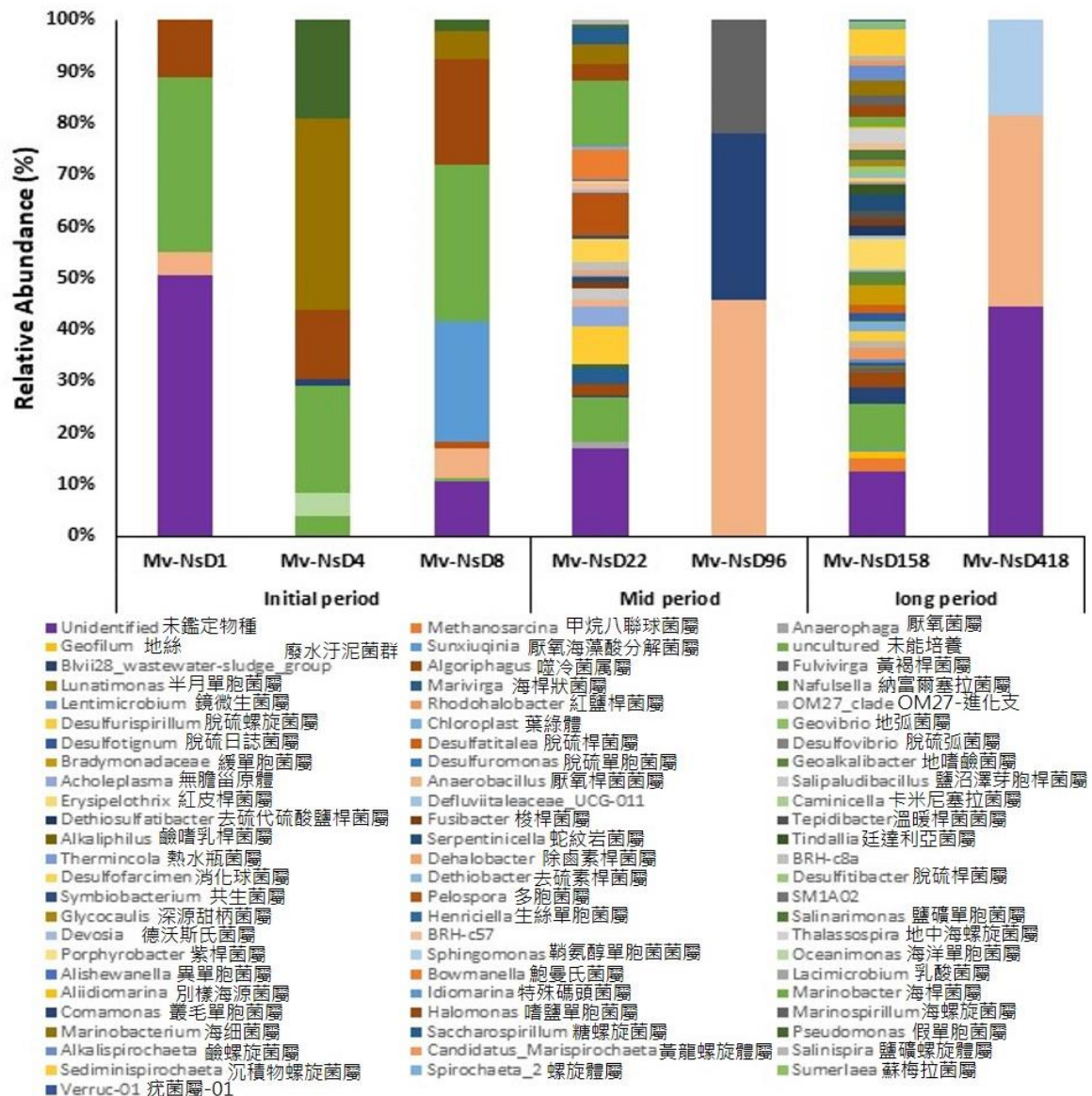
圖 13、成果文章發表圖

(二) 高雄烏松泥火山菌群分析結果及其他地區樣本分析結果

泥火山為溫室氣體—甲烷的重要地質來源區(Dimitrov, 2003; Milkov et al., 2003; Etiope & Milkov, 2004)。本研究首先是針對泥火山區域之甲烷代謝菌進行調查。AOM(Anaerobic oxidation of methane) 的代謝途徑是在泥火山中最重要的研究主題，主要與古細菌(archaea)有關，而與甲烷無氧代謝有關的古細菌被稱為 ANME(anaerobic methanotroph) 古細菌，迄今為止可以確定有下列三個 ANME 簇：ANME-1，具有亞類-2a，-2b 和-2c 的 ANME-2 以及 ANME-3。細菌部分則以 Desulfosarcina 和 Desulfococcus 屬的硫酸鹽還原細菌被認為與 ANME-1 和 ANME-2 古細菌之存在具關聯性。本研究已針對南台灣烏松泥火山噴發點樣本進行細菌菌群之時序分析，菌群分析結果如圖 14 所示。其中與含氯代謝有關的菌屬包含：Desulfobulbus、Desulfuromonas、Desulfotignum、Methanosarcina、Methylophaga 等，這些菌屬對於氯都有降解之功能，尤其 Methanosarcina、Methylophaga 等 Meth-associated bacteria 對於氯乙烯的降解更是重要之菌屬，根據 2006 年發表於 Appl Environ Microbiol 文章指出 Methanosarcina 可透過氫轉移促使氯乙烯脫氯，是相當有整治潛力的菌屬(Heimann et al., 2006)。此外，在時序分系上發現 D8 之前菌屬中，具有較高比例的含氯代謝有關菌屬，但中長期樣本中還是可以發現甲烷相關菌屬存在，因此可作為後續採樣時之參考。



(A)



(B)

圖 14、泥火山樣本屬相對比例(A)PCOA 圖(B)豐度圖

此外，本研究使用 STAMP 軟體分析不同間隔樣本中細菌多樣性和屬水平的豐度變化(圖 15)。結果表明，鹽單胞菌屬(Halomonas)和海桿菌屬(Marinobacter)的豐度在短時間和中時間樣本之間存在顯著差異，並且豐度在短時間樣本中較高。該屬的平均比例在中時間時顯著下降。同樣，鹽單胞菌屬、海菌屬(Marinobacter)、假單胞菌屬(Pseudomonas)、海桿菌屬、海洋單胞菌屬(Oceanimonas)和珍珠孢屬(Pelospora)在初始和長期樣本之間存在顯著差異，並且它們的豐度在初始時期樣本中富集。然而，在長期樣本中，上述屬的平均比例顯著下降。

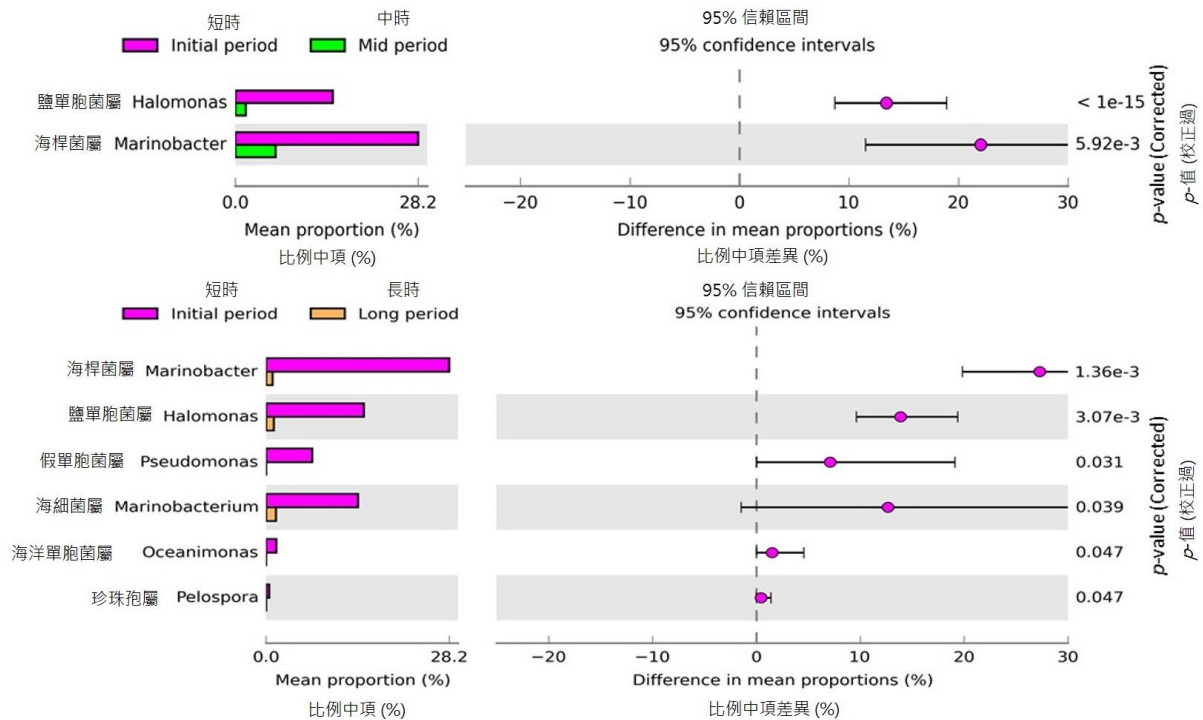


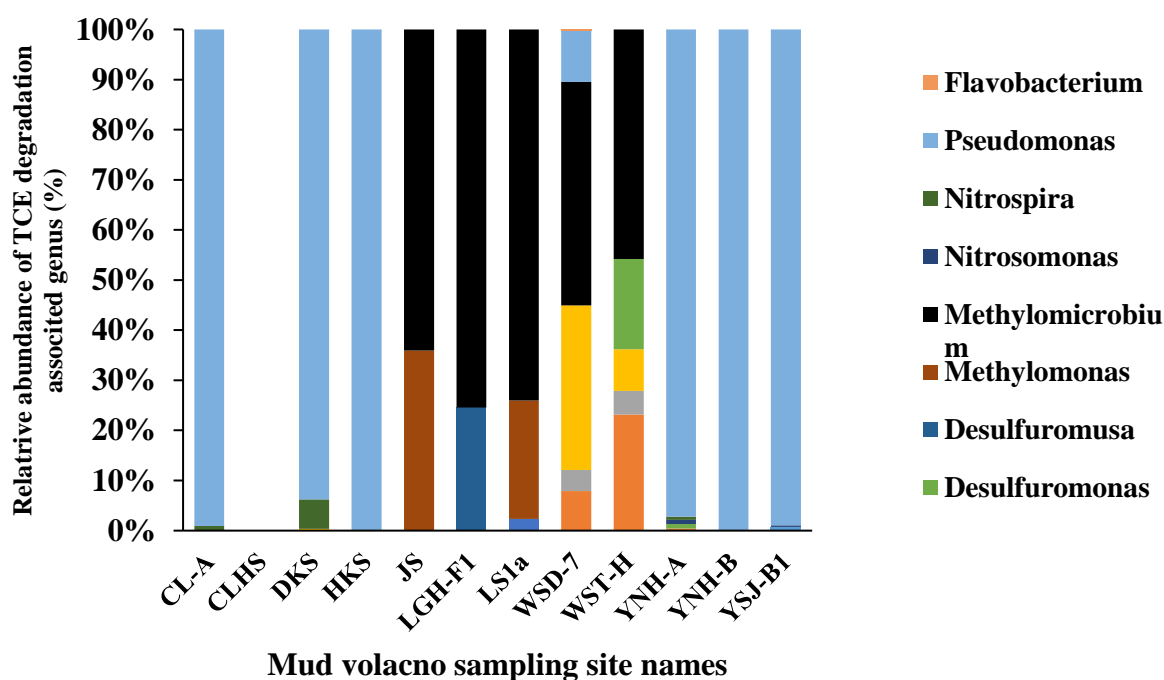
圖 15、菌屬豐富度統計分析圖(長時、中時與短時分析)

火山所在位置與地球化學過程都會影響泥火山的物理化學特徵(Liu et al., 2009)。從烏松泥火山樣本的物理化學特徵，可以說與海水非常相似，例如說鈉離子(Na^+)及氯離子(Cl^-)含量高，可能與海洋非常有關(Liu et al., 2013)。通常，甲烷生成作用促進了在厭氧生態位的初級生產者產生的碳水化合物、脂質和蛋白質等複雜分子礦化。從功能預測結果顯示，在最初幾天的樣品中發現脂質生物合成，如棕櫚油酸、硬脂酸和油酸生物合成占主導地位。在我們的泥火山樣區（如 *Desulfurispirillum* 和 *Desulfofarcimen*）中豐富的硫酸鹽還原細菌(SRB) 促進了脂質生物合成過程 (Jiang et al., 2012)。此外，另一項研究表明，環境中脂質生物標誌物的存在與 *Desulfurispirillum*、*Desulfofarcimen* 和其他 SRB 的存在相關 (Jiang et al., 2012)。特別是油酸鹽和硬脂酸鹽的生物合成，在最初幾天被發現很豐富(8 天前)。超過限度的油酸和硬脂酸濃度會輕微抑制甲烷生成菌的活性(Lalman et al., 2001)，因此在最初幾天比中長期發現甲烷原菌等甲烷生成菌的豐度要少。而葡萄糖和木糖降解途徑在長期樣品中富集。先前之研究顯示，在硫化和產甲烷條件下，木糖的積累更高(Pareek et al., 2000)。此外，在葡萄糖和木糖降解對產甲烷菌（如 *Methanosarcina*）的作用下，積累的葡萄糖和木糖會降解為甲烷和二氧化碳 (Winter et al., 1979; Tang et al., 2008)。在我們的研究地點，在長時間樣品中顯示出大量的甲烷球菌，因此在長時間樣品中發現葡萄糖和木糖降解的超級途徑更高。

根據其他泥火山地點所進行的泥火山樣本採樣共 12 個樣本，與含氯代謝有關菌相組成結果如圖 16 所示，總共包含了 13 個功能性細菌屬，包含：



Dehalogenimonas, *Desulfobulbus*, *Desulfomicrobium*, *Desulfurivibrio*, *Desulfuromonadaceae*, *Desulfuromonas*, *Desulfuromusa*, *Methyломicrobium*, *Methyломonas*, *Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*，其中中崙溫泉 CLHS 樣本均未發現功能性細菌屬，而 *Pseudomonas* 是佔比最多的菌屬之一，其次為 *Methyломicrobium*。許多文獻均指出 *Pseudomonas* 對於聚氯乙烯的降解非常有效，其中以菌屬中的 *P. citronellolis* 種對於 PVC 的生物降解非常有效 (Giacomucci et al., 2019; Triandafillu et al., 2003)。 *Methyломicrobium* 菌屬則被發現對於氯代謝有顯著效果，主要是其帶有 pMMO 基因，且表現能力非常好，所以可以有效的降解氯化化合物 (Han et al., 1999; Mattes et al., 2015)。除此之外，*Methanosarcina* 是被認為可以有效將氯乙烯生物降解的物種之一 (Heimann et al., 2006)。其他 Methy 相關菌屬與 SRB 菌屬對於整體氯化物生物降解都是有挹注，且可以維持該環境特色的菌屬。綜觀上述，目前本研究認為烏山頂(WSD、WST)是最適合做為後續泥火山樣本添加至氯乙烯污染場址，主要因為其相關代謝菌的多樣性組成較為豐富，且採樣地點相對較為容易，另外可以使用單配不同泥火山樣本進行降解試驗，將列為第三年度計畫重點。



CL-A：中崙、CLHS：中崙溫泉、DKS：大滾水、HKS：小滾水、

JS：甲仙、LGH-F1：雷公火 F1、LS1a：羅山 1 號、WSD-7：烏山頂 7 號、

WST-H：烏山頂 8 號、YNH-A：養女湖、YNH-B：新養女湖、YSJ-B1：月世界

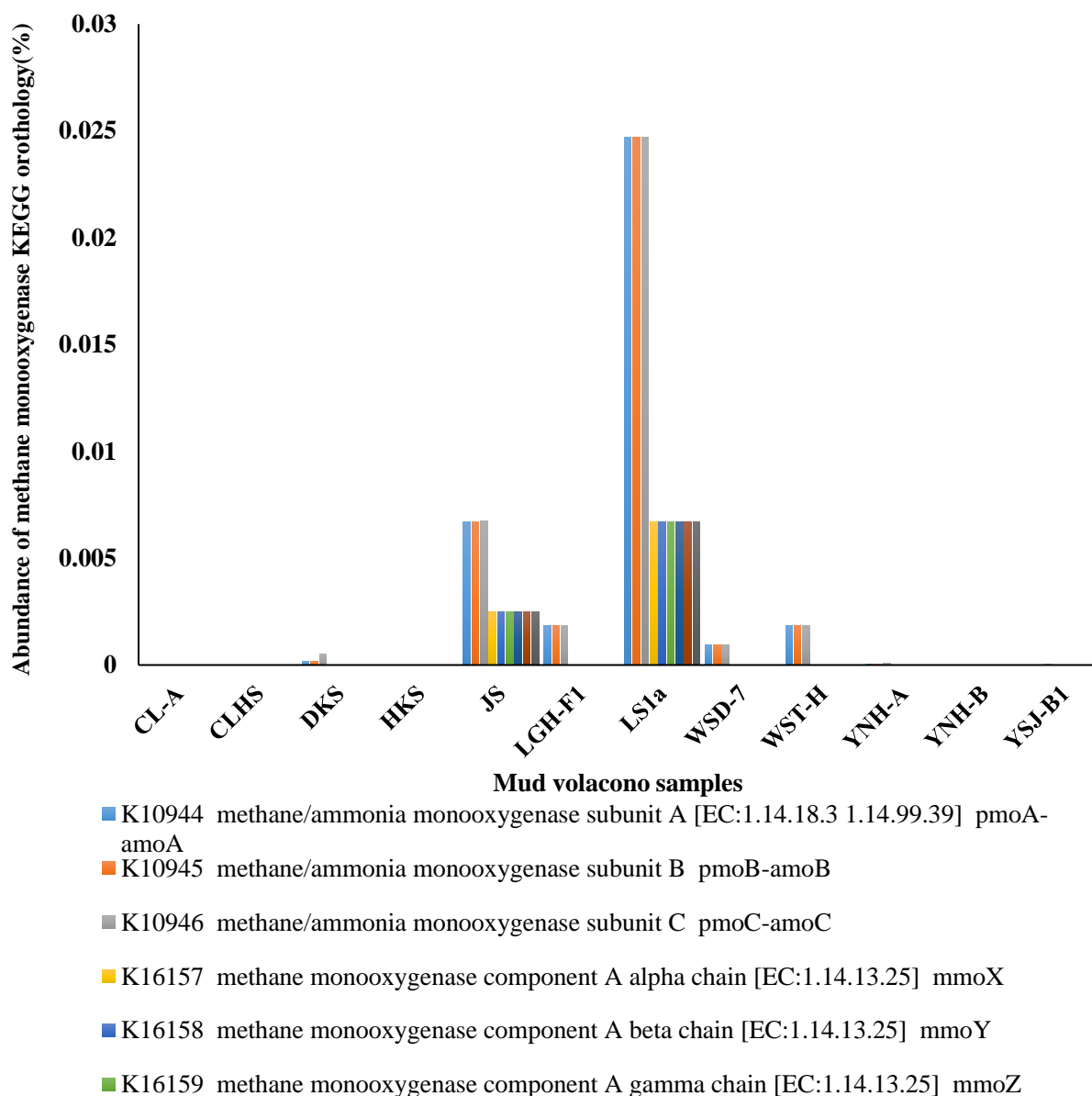
圖 16、不同泥火山樣本中含氯代謝相關菌屬總成比例圖

本研究同時使用 KEGG 探討菌群中跟 TCE 降解相關基因(pmoA-ammoA, pmoB-ammoB, pmoC-ammoC、mmoX, mmoY, mmoZ, mmoB, mmoC, mmoD)等，結果如圖 17 所示，在 JS 及 LS1a 這兩個點同時具有 methane / ammonia monooxygenase subunit



A, B, C and methane monooxygenase genes，而 DKS、LGH-F1、WSD-7 及 WST-H 僅具有 methane monooxygenase genes，因此根據 KEGG 給的註解發現，在這些泥火山樣本中，雖然烏山頂樣本多樣性多(圖 16)，但是 JS 甲仙樣本及 LS1a 似乎具有氯化物降解之能力，故下一年度(第三年)重點將會在於這些不同泥火山樣本實場生物整治成效評估與相關技術開發。

CL-A：中崙、CLHS：中崙溫泉、DKS：大滾水、HKS：小滾水、



JS：甲仙、LGH-F1：雷公火 F1、LS1a：羅山 1 號、WSD-7：烏山頂 7 號、

WST-H：烏山頂 8 號、YNH-A：養女湖、YNH-B：新養女湖、YSJ-B1：月世界

圖 17、泥火山樣本中 KEGG 預測甲烷單價氧化酵素基因比例圖

根據 TCE 相關降解相關細菌及特定基因的關聯分析，使用 pearson 相關性檢定，以瞭解泥火山樣本中 TCE 降解菌屬與預測的特定功能基因之間的關聯，結果



如圖 18 所示，在 13 個功能菌屬中 *Methylomicrobium* 及 *Methylomonas* 菌屬豐度較高，且與 methane / ammonia monooxygenase subunit A, B & C transcribed functional genes (pmoA-amoA, pmoB-amoB, pmoC-amoC) 和 methane monooxygenase genes (mmoX, mmoY, mmoZ, mmoB, mmoC, mmoD) 在 95% 的信心水準下，呈現正相關，從文獻上也可發現這兩類菌屬大多菌種均帶有上述基因，雖種別之間有所差異 (Lontoh et al., 2000; Nakamura et al., 2007)。因此，本研究認為這些資訊都提供了非常大的信心可以使用泥火山樣本來提供受氯化物污染場址之生物整治來源。

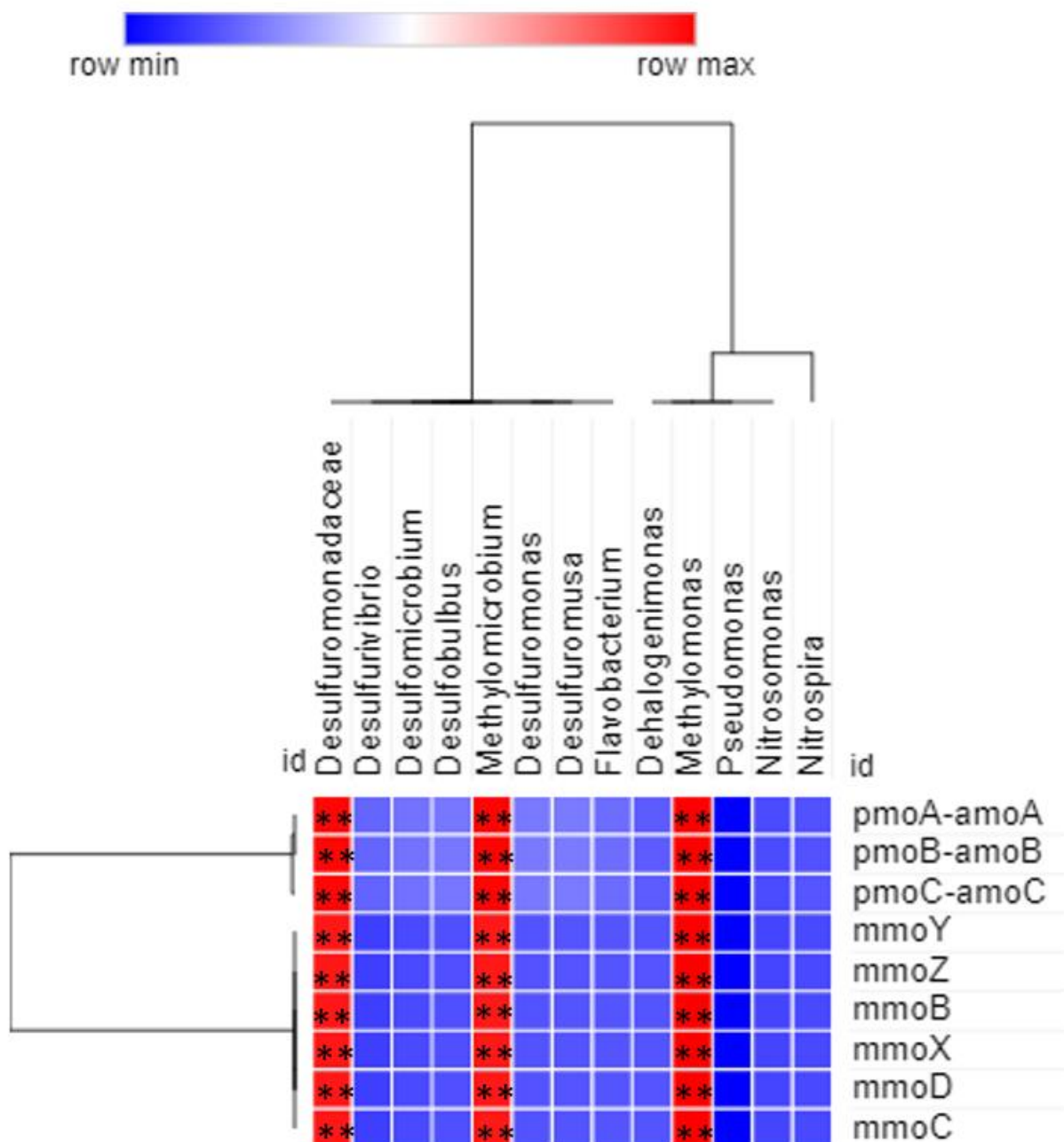


圖 18、基因與菌種統計分析圖



(三) 含氯有機汙染物分析結果

本計畫於今年度樣本數為 10 個新地下水樣本。在含氯有機汙染物分析當中，共檢測含氯化合物及含苯化合物共 22 項(1,1,1-三氯乙烷;1,1,2-三氯乙烷;1,1-二氯乙烯;1,1-二氯乙烷;1,2-二氯苯;1,2-二氯乙烷;1,4-二氯苯;苯;四氯化碳;氯苯;三氯甲烷(氯仿);氯甲烷;順-1,2-二氯乙烯;乙苯;二甲苯;二氯甲烷;萘;四氯乙烯;甲苯;反-1,2-二氯乙烯;三氯乙烯;氯乙烯)，並針對甲基第三丁基醚、硫化物、氨氣、硝酸鹽及總有機碳等進行化驗(表三)。主要汙染物為 1,1-二氯乙烯、順-1,2-二氯乙烯、三氯乙烯及氯乙烯，主要汙染物集中在 GW02、GW03、GW10 這三口井中，這三口井的採樣深度大約都是 11 公尺深，另外在 GW18 及 N00431 這兩口井有發現三氯乙烯濃度超標(0.0597 及 0.0638ppm)，其他相關含氯化合物則為超標或低於檢測濃度，這兩口井的採樣深度則為 9 及 7 公尺深。其餘井口地下水則均有檢測到低於監測標準的含氯化合物，主要以三氯乙烯及二氯乙烯異構物為主。

表 5 地下水中水質參數與氯化物濃度表

井號	地下水污染 管制標準 (第二類)	地下水污染 監測標準 (第二類)	單位	GW02	GW03	GW05	GW10	GW15	GW17	GW18	GW20	N00430	N00431
採樣時間				110/4/22	110/4/22	110/4/22	110/4/21	110/4/22	110/4/21	110/4/21	110/4/22	110/4/21	110/4/21
採樣深度	-	-	m	11	11	10.25	10.5	10.5	7	9	11.5	6.2	7
水位	-	-	m	5.291	5.066	4.817	5.109	5.619	5.230	4.968	4.940	4.884	4.675
pH	-	-	-	5.6	6.6	7.2	5.90	6	6.2	6.5	6.5	6.5	5.7
EC	-	-	umho/cm	1640	828	1820	906	1550	1160	885	1070	943	550
DO	-	-	mg/L	0.3	0.6	0.5	0.4	0.5	0.2	1.4	0.7	0.6	0.2
ORP	-	-	mV	-154	-115	-113	-147	-154	-134	222	95.8	234	-221
濁度	-	-	NTU	40.2	241	70.2	76.6	31.6	118	99.6	73.6	40.4	621
鐵	-	1.5	mg/L	-	10.3	-	-	-	-	-	-	-	28.6
硫酸鹽	-	625	mg/L	-	123	-	-	-	-	-	-	-	2.65
硫化物	-	-	mg/L	-	0.63	-	-	-	-	-	-	-	2.92
氨氣	-	0.25	mg/L	-	<0.05(0.04)	-	-	-	-	-	-	-	0.21
亞硝酸鹽	10	5	mg/L	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	<1.00
硝酸鹽	100	50	mg/L	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	<4.00
總有機碳	-	10	mg/L	-	1	-	-	-	-	-	-	-	149
1,1,1-三氯乙烷	2	1	mg/L	<0.0100	<0.0100	ND	<0.0100	ND	<0.0100	ND	ND	ND	ND
1,1,2-三氯乙烷	0.05	0.025	mg/L	<0.0100	<0.0100	ND	<0.0100	ND	<0.0100	ND	ND	ND	ND
1,1-二氯乙烯	0.07	0.035	mg/L	<0.0100	0.192	0.0284	0.0358	0.00366	<0.0100	ND	0.00422	ND	<0.00100
1,1-二氯乙烷	8.5	4.25	mg/L	<0.0100	0.152	<0.00100	<0.0100	ND	<0.0100	ND	0.00109	ND	ND
1,2-二氯苯	6	3	mg/L	<0.0100	<0.0100	ND	<0.0100	ND	<0.0100	ND	ND	ND	ND
1,2-二氯乙烷	0.05	0.025	mg/L	<0.0100	<0.0100	ND	<0.0100	ND	<0.0100	ND	ND	ND	ND
1,4-二氯苯	0.75	0.375	mg/L	<0.0100	<0.0100	ND	<0.0100	ND	<0.0100	ND	ND	ND	ND
苯	0.05	0.025	mg/L	<0.0100	<0.0100	ND	<0.0100	ND	<0.0100	ND	ND	ND	ND
四氯化碳	0.05	0.025	mg/L	<0.0100	<0.0100	ND	<0.0100	ND	<0.0100	ND	ND	ND	ND
氯苯	1	0.5	mg/L	<0.0100	<0.0100	ND	<0.0100	ND	<0.0100	ND	ND	ND	ND
三氯甲烷(氯仿)	1	0.5	mg/L	<0.0100	<0.0100	ND	<0.0100	ND	<0.0100	ND	ND	ND	ND
氯甲烷	0.3	0.15	mg/L	<0.0100	<0.0100	ND	<0.0100	ND	<0.0100	ND	ND	ND	ND
順-1,2-二氯乙烯	0.7	0.35	mg/L	0.632	1.52	0.0222	0.742	0.0275	0.104	<0.00100	0.0883	ND	<0.00100
乙苯	7	3.5	mg/L	<0.0100	<0.0100	ND	<0.0100	ND	<0.0100	ND	ND	ND	ND
二甲苯	100	50	mg/L	<0.0300	<0.0300	ND	<0.0300	ND	<0.0300	ND	ND	ND	ND
二氯甲烷	0.05	0.025	mg/L	<0.0100	<0.0100	ND	<0.0100	ND	<0.0100	ND	ND	ND	ND
萘	0.4	0.2	mg/L	<0.0100	<0.0100	ND	<0.0100	ND	<0.0100	ND	ND	ND	ND
四氯乙烯	0.05	0.025	mg/L	<0.0100	<0.0100	ND	<0.0100	ND	<0.0100	ND	ND	ND	ND
甲苯	10	5	mg/L	<0.0100	<0.0100	ND	<0.0100	ND	<0.0100	ND	ND	ND	ND
反-1,2-二氯乙烯	1	0.5	mg/L	<0.0100	<0.0100	ND	<0.0100	ND	<0.0100	ND	ND	ND	ND
三氯乙烯	0.05	0.025	mg/L	0.0382	0.459	ND	0.0685	0.00235	0.0161	0.0597	0.00528	0.0165	0.0638
氯乙烯	0.02	0.01	mg/L	0.0889	0.0108	<0.00100	0.112	0.00104	<0.0100	ND	ND	ND	ND
甲基第三丁基醚	1	0.5	mg/L	<0.0100	<0.0100	ND	<0.0100	ND	<0.0100	ND	ND	ND	ND

註：***紅字粗體**表示測值超過地下水污染管制標準(第二類)

***藍字粗體**表示測值超過地下水污染監測標準(第二類)



(四) 代謝基因及 EcoPlate 分析結果

特殊代謝細菌與功能性基因檢測結果如表 6 所示。本年度新北場址的土壤樣本，除了驗出 *Dehalococcoides spp.* 外，其他功能代謝基因及 *Dehalogenimonas spp.* 均未驗出，而彰化場址地下水樣本有驗出兩類脫鹵菌屬，基因方面則僅一個樣本驗出 epoxyalkane coenzyme M transferase (EaCoMT) 相關基因(entC gene)。本年度新北場址的土壤檢測結果與前一年度台南安定廠址檢測結果非常迥異，本研究深入分析發現，今年度新北場址土壤中核酸萃取的濃度均偏低，且在進行磷脂質脂肪酸分析亦呈現全部陰性結果，就上述結果顯示該土壤中細菌多樣性與數量相對偏低。推測可能與該地土壤型態、氣候及周遭仍有持續性使用下導致之結果，且從土壤的化學分析數據上發現，相關含氯化合物檢測亦呈現未檢出，在地理與氣候因素判讀下，認為受到北部降雨頻率相對較高，濕度也呈現長期潮濕下，污染物大多都已沉降至地下水，導致土壤中並無檢測出氯化物污染。然因台南安定場址已荒廢多年，在自然修復以及該地土壤特性下，期已發展出該場址含氯代謝菌群多樣性，因此針對新北場址目前建議可能需要添加相關含氯代謝菌種，以及土壤基質改良後，對於該場址整治上會有所挹注，將列為後續泥火山樣本小規模添加試驗之場域。

另外，就彰化地下水而言，在不同深度的地下水中均有發現脫鹵菌屬的存在，對於氯化物降解是非常正向的結果，但在相關基因檢測上，僅 11m 深的地下水中發現 entC gene 的存在，與前期台南安定(AD)或苗栗頭份(TF)地下水檢測結果差異非常大，但就前一年度成果顯示，苗栗頭份以經過約 6 年期整治(化學、生物整治)期後，其地下水中鹵菌屬及其他功能代謝基因均非常豐富，而安定相對偏少。而本次彰化場址也還未進行整治作業，就兩年期結果推論經過整治期後生物多樣性會有所增加之趨勢，氯化物降解之生物種類也變多，比較表如表 6 所示。在過往研究中也有相似成果，中山大學高志明教授團隊在 2018 年發表於 Journal of Cleaner Production 期刊的文章” Enhanced bioremediation of TCE-contaminated groundwater using gamma poly-glutamic acid as the primary substrate”，其中提到透過添加 γ -聚谷氨酸 (γ -PGA) 做為基質添加至三氯乙烯(TCE)污染的地下水中，經過實驗發現可有效提升生物整治的成效，主要透過總有機碳的增加及 TCE 脫氯率提升，其研究也發現在這種情況下，生物多樣性有增加(Sheu et al., 2018)。該文章比較可惜之處在於僅使用 DGGE 進行菌相變化分析，如使用 NGS 等定序之菌相組成分析會更有證據力。此外，Fan 等人在 2022 年 1 月發表於 Journal of Hazardous Materials 的文章” Mechanism of bio-electrokinetic remediation of pyrene contaminated soil: Effects of an electric field on the degradation pathway and microbial metabolic processes” 也提到使用電動力場結合生物整治苯芘 pyrene 污染的土壤，使得整治成效更佳優化，且微生物菌相更有利於單獨的整治方法(Fan et al., 2022)。



因此可評估不同整治方法的整合，且可擬定更加地整治策略。，但仍需進一步探究並擬定更加地整治策略。

表 6 場址土壤與地下水樣本特殊細菌與功能性代謝基因檢測

PCR detection rate	Species			functional genes			
	<i>Dehalococcoides</i> <i>spp.</i>	<i>Dehalogenimonas</i> <i>spp.</i>	chloroethene- reductive dehalogenase(<i>vcrA</i>)	alpha subunit of alkene monooxygenase (<i>AkMO</i>)(<i>etnC</i>)	epoxyalkane coenzyme M transferase (<i>EaCoMT</i>)(<i>etnE</i>)	particulate methane monooxygenase gene (<i>pmoA</i>)	Soluble methane monooxygenase gene (<i>mmoX</i>)
7m-water (n=2)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
11m-water (n=7)	4 (57.1%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (14.3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
9.5m-water (n=1)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
SB_soil_surface layer(upper) (n=18)	2 (11.1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
SB_soil_surface-middle layer(middle) (n=17)	1 (5.9%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
SB_soil_deep layer (deep) (n=16)	2 (12.5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
SB_soil_outside layer(outside) (n=9)	5 (55.5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
TF_water (n=25)前一年度	7 (28%)	8 (32%)	9 (36%)	6 (24%)	13 (52%)	5 (20%)	3 (12%)
AD_water (n=3)前一年度	0 (0%)	2 (66.7%)	1 (33.3%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33.3%)	1 (33.3%)



(五) 地下水樣本 16s 菌相分析結果

本研究將不同深度的地下水樣本進行 16s 全長序列分析，透過 Venn 圖分析結果如下圖 19 所示。在三種不同深度的樣本中，有 8 個 ASVs 分類是相同的，但兩兩間並無相同的 ASVs 分類，而深度 11 公尺的地下水樣本具有最多的 ASVs 分類。進一步對 ASV 分析結果顯示，在屬水平上，所有實驗組可被分為 10 個分類屬，與門相似。9.5 m 深度的樣品 GM05，在屬階層上顯示出較多樣化的細菌群落。在屬階層中，發酵單胞菌(Actinobacteriota)在大多數樣品中佔優勢，除了 9.5 m 深度的樣品。在 9.5m 深度樣本中 *Amphiplicatus* 更為豐富。然而，在屬於 7 m 和 11 m 深度樣本的所有其他樣本中，*Amphiplicatus* 是第二豐富的細菌。

在物種層面(圖 20)，16S rRNA 全長測序共檢測到 8 個物種。物種豐度和組成顯示出與門和屬水平相似的分佈模式。9.5 m 深度的樣本顯示出更多樣化的細菌群落，其次是 11 m，最後是 7 m 深度樣本。在這些物種中，運動發酵單胞菌(*Zymomonas mobilis*)在所有樣品中占主導地位，與採樣深度無關。此外，在 9.5 m 深度和 11 m 深度的樣品中觀察到更多的 *Treponema zuelzeriae* 和 *Staphylococcus carnosus*。然而，在 7 m 深度的樣品中沒有檢測到該細菌，顯示深度會影響到優勢菌種的存在。目前在數據分析上相對可被分類的菌屬太少，這是受到分析軟體及數據庫的影響，目前本研究團隊仍持續改善中。

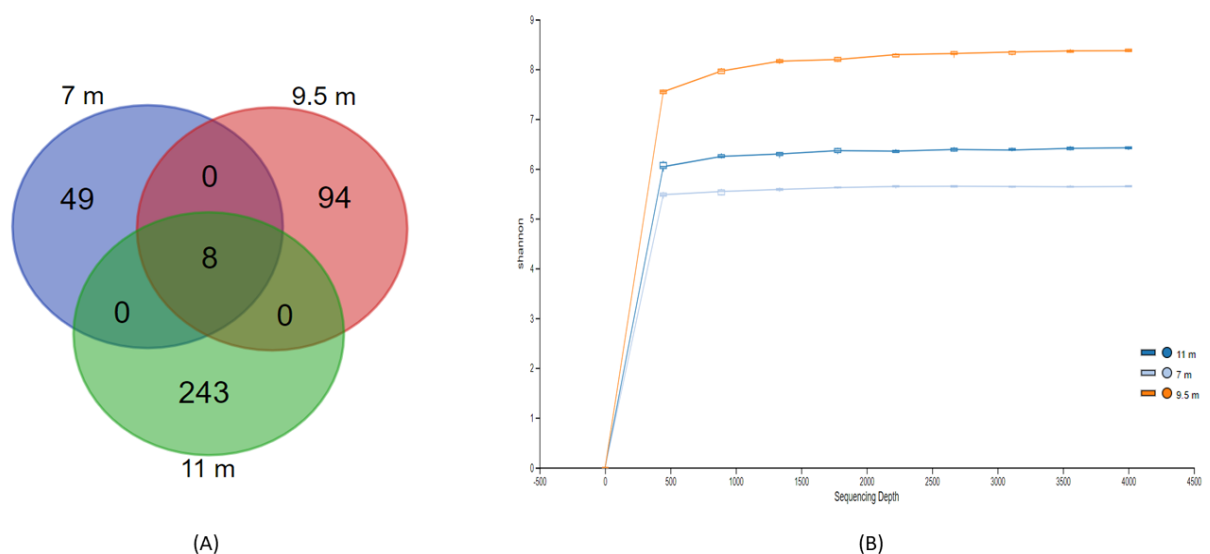


圖 19、Venn 分析菌相組成相似性結果圖

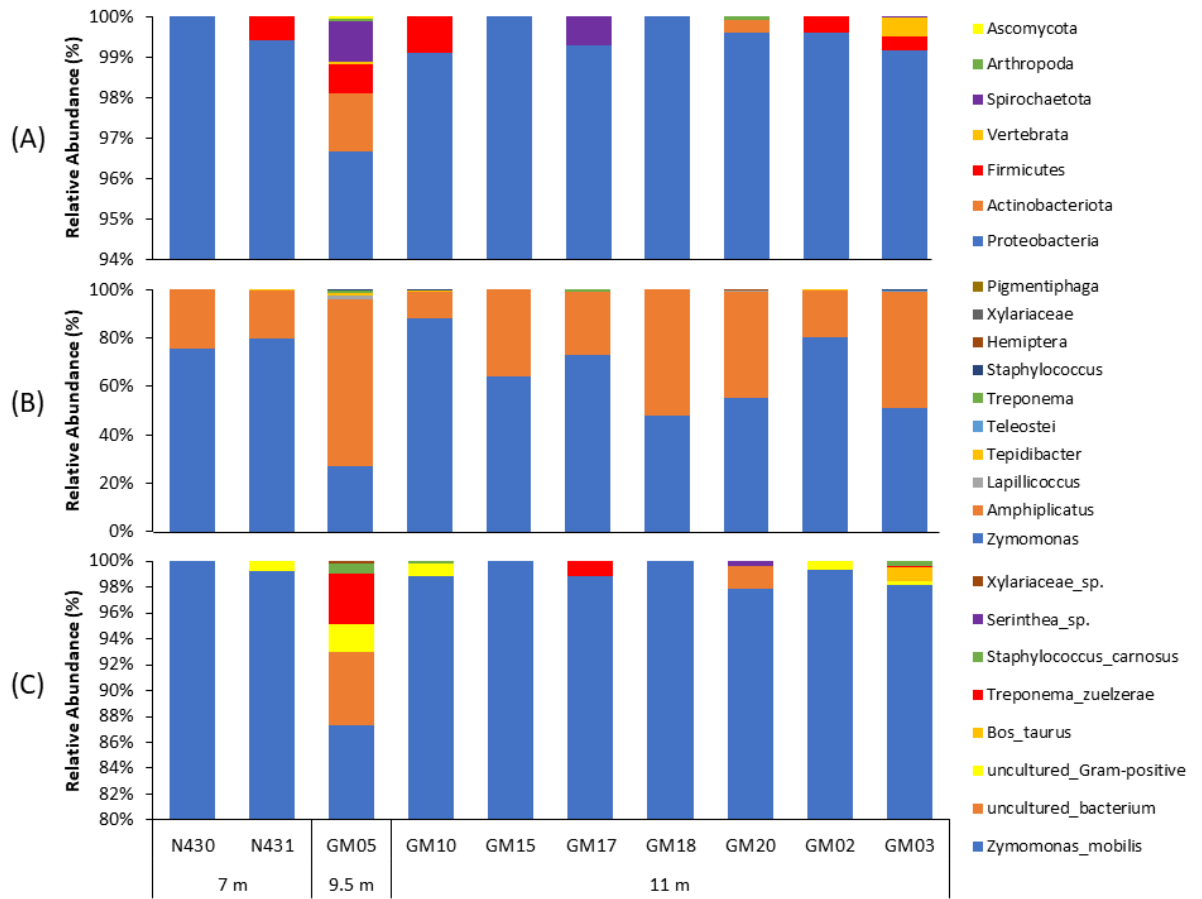


圖 20、PICRUST 分析預測結果圖



六、結論

- 一、Ecoplate 結合高通量分子定序技術是非常有效提供汙染現地背景資料與後續整治策略的方式之一，成果亦已發表於高影響係數期刊 Journal of Hazardous Materials。
- 二、泥火山樣本中大多帶有甲烷營養菌以及對氯代謝有關之菌種，是後續菌群添加試驗之潛力來源。
- 三、泥火山樣本經過時序分析，在不同時間點會有非常大的差異，經過本研究成果發現，在噴發初期樣本中甲烷營養菌以及對氯代謝有關之菌種比較多，但甲烷營養菌的佔比較低，但隨著時間拉長，在該樣本中仍可發現甲烷營養菌的存在，對於後續整治是非常有益之成果。
- 四、在台灣主要泥火山集中在嘉義、高雄、屏東、台東、花蓮等處，在不同區域的泥火山樣本中甲烷營養菌以及對氯代謝差異非常大，其中以高雄、台東、花蓮等處的多樣性較高，但透過 KEGG 代謝預測發現，花蓮及高雄甲仙泥火山反而相關代謝基因比例較高。因此在下一年度整治上可配合不同區域泥火山進行整治評估。
- 五、本年度新污染場址中，土壤中核酸濃度非常低，而地下水樣本中也較前一年度成果較低，故相對特殊菌種及基因檢測結果與前一年度有非常大之差異。綜合兩年結果顯示，已進行過生物及化學整治場址，其相關氯代謝有關之菌種多樣性及相關基因檢測結果均較為豐富，尤其以化學整治過之樣本，相對該類菌種檢出率有所提升。



參考文獻

1. Adamson, D.T., Mahendra, S., Walker Jr, K.L., Rauch, S.R., Sengupta, S. and Newell, C.J. (2014) A multisite survey to identify the scale of the 1, 4-dioxane problem at contaminated groundwater sites. *Environmental Science & Technology Letters* 1(5), 254-258.
2. ATSDR (2007) Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act (CERCLA) Priority List of Hazardous Substances. Agency, U.S.E.P. (ed).
3. Bennett, P., Gandhi, D., Warner, S. and Bussey, J. (2007) In situ reductive dechlorination of chlorinated ethenes in high nitrate groundwater. *Journal of Hazardous Materials* 149(3), 568-573.
4. Behrens, S., Azizian, M.F., McMurdie, P.J., Sabalowsky, A., Dolan, M.E., Semprini, L. and Spormann, A.M. (2008) Monitoring abundance and expression of “Dehalococcoides” species chloroethene-reductive dehalogenases in a tetrachloroethene-dechlorinating flow column. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(18), 5695-5703.
5. Chen, J., Bowman, K.S., Rainey, F.A. and Moe, W.M. (2014) Reassessment of PCR primers targeting 16S rRNA genes of the organohalide-respiring genus *Dehalogenimonas*. *Biodegradation* 25(5), 747-756.
6. Hamada, T. and Tanaka, H. (1995) Transfer of methyl chloroform, trichloroethylene and tetrachloroethylene to milk, tissues and expired air following intraruminal or oral administration in lactating goats and milk-fed kids. *Environmental pollution* 87(3), 313-318.
7. Kao, C. and Prosser, J. (1999) Intrinsic bioremediation of trichloroethylene and chlorobenzene: field and laboratory studies. *Journal of Hazardous Materials* 69(1), 67-79.
8. Lee, M.H., Clingenpeel, S.C., Leiser, O.P., Wymore, R.A., Sorenson, K.S. and Watwood, M.E. (2008) Activity-dependent labeling of oxygenase enzymes in a trichloroethene-contaminated groundwater site. *Environmental pollution* 153(1), 238-246.
9. Nikel, P.I., Pérez-Pantoja, D. and de Lorenzo, V. (2013) Why are chlorinated pollutants so difficult to degrade aerobically? Redox stress limits 1,3-dichloroprop-1-ene metabolism by *Pseudomonas pavonaceae*. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 368(1616), 20120377-20120377.
10. Ritalahti, K.M., Amos, B.K., Sung, Y., Wu, Q., Koenigsberg, S.S. and Löffler, F.E. (2006) Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple *Dehalococcoides* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*



- 72(4), 2765-2774.
11. Rodríguez-Eugenio, N., McLaughlin, M. and Pennock, D. (2018) Soil pollution: a hidden reality, FAO.
 12. 董瑞安 (1992) 微量含氯有機物在地下水中生物轉換及傳輸模式之研究. 國立台灣大學環境工程研究所博士論文.
 13. 蔡文田 (1992) 含氯有機物之毒性及新陳代謝機制. 工業污染防治 第43期.
 14. 行政院環境保護署 (2001) 地下水污染管制標準. 行政院環境保護署
 15. Alison S. Waller. Molecular Investigation of Chloroethene Reductive Dehalogenation by the Mixed Microbial Community KB1. 2010. Doctoral These.
 16. Coleman NV and Spain JC. Epoxyalkane:Coenzyme M Transferase in the Ethene and Vinyl Chloride Biodegradation Pathways of Mycobacterium Strain JS60. J Bacteriol. 2003 Sep; 185(18): 5536–5545.
 17. Allen JR, Clark DD, Krum JG, and Ensign SA. A role for coenzyme M (2-mercaptoethanesulfonic acid) in a bacterial pathway of aliphatic epoxide carboxylation. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jul 20; 96(15): 8432–8437.
 18. Krum JG and Ensign SA. Heterologous Expression of Bacterial Epoxyalkane:Coenzyme M Transferase and Inducible Coenzyme M Biosynthesis in Xanthobacter Strain Py2 and Rhodococcus rhodochrous B276. J Bacteriol. 2000 May; 182(9): 2629–2634.
 19. Adrian L and Löffler FE. Organohalide-Respiring Bacteria. 2016. pp 283-308
 20. Oona Snoeyenbos-West, Catherine Gaw Van Praagh, and Derek R. Lovley. Trichlorobacter thiogenes Should Be Renamed as a Geobacter Species. Appl Environ Microbiol. 2001 Feb; 67(2): 1020–1022. doi: 10.1128/AEM.67.2.1020-1022.2001
 21. Tamzen W. Macbeth, David E. Cummings, Stefan Spring, Lynn M. Petzke, Kent S. Sorenson Jr. Molecular Characterization of a Dechlorinating Community Resulting from In Situ Biostimulation in a Trichloroethene-Contaminated Deep, Fractured Basalt Aquifer and Comparison to a Derivative Laboratory Culture. **DOI:** 10.1128/AEM.70.12.7329-7341.2004
 22. Nicholas V. Coleman and Jim C. Spain. Epoxyalkane:Coenzyme M Transferase in the Ethene and Vinyl Chloride Biodegradation Pathways of Mycobacterium Strain JS60. J Bacteriol. 2003 Sep; 185(18): 5536–5545. doi: 10.1128/JB.185.18.5536-5545.2003
 23. E. Hutchens, S. Radajewski, M.G. Dumont, I.R. McDonald, J.C. Murrell Analysis of methanotrophic bacteria in Movile Cave by stable isotope probing Environ. Microbiol., 6 (2004), pp. 111-120
 24. Grostern, Ariel; Edwards, Elizabeth A. (2006-01-01). "Growth of Dehalobacter and Dehalococcoides spp. during Degradation of Chlorinated Ethanes". Applied and Environmental Microbiology. 72 (1): 428–436. doi:10.1128/aem.72.1.428-436.2006.



25. Cheng D, Chow WL, and He J. A Dehalococcoides-containing co-culture that dechlorinates tetrachloroethene to trans-1,2-dichloroethene. ISME J. 2010 Jan;4(1):88-97.
26. Maness AD, Bowman KS, Yan J, Rainey FA, and Moe WM. Dehalogenimonas spp. can Reductively Dehalogenate High Concentrations of 1,2-Dichloroethane, 1,2-Dichloropropane, and 1,1,2-Trichloroethane. AMB Express. 2012; 2: 54.
27. Chuang AS, Jin YO, Schmidt LS, Li Y, Fogel S, Smoler D, and Mattes E. Proteomic analysis of ethene-enriched groundwater microcosms from a vinyl chloride-contaminated site. Environ Sci Technol. 2010 Mar 1;44(5):1594-601.
28. 1. Yohda, M., Ikegami, K., Aita, Y., Kitajima, M., Takechi, A., Iwamoto, M., Fukuda, T., Tamura, N., Shibasaki, J., Koike, S., Komatsu, D., Miyagi, S., Nishimura, M., Uchino, Y., Shiroma, A., Shimoji, M., Tamotsu, H., Ashimine, N., Shinzato, M., Ohki, S., Nakano, K., Teruya, K., Satou, K., Hirano, T. and Yagi, O. (2017) Isolation and genomic characterization of a Dehalococcoides strain suggests genomic rearrangement during culture. Scientific reports 7(1), 2230.
29. 2. He, J., Ritalahti, K.M., Yang, K.-L., Koenigsberg, S.S. and Löffler, F.E. (2003) Detoxification of vinyl chloride to ethene coupled to growth of an anaerobic bacterium. Nature 424(6944), 62-65.
30. 3. Löffler, F.E., Sanford, R.A. and Tiedje, J.M. (1996) Initial Characterization of a Reductive Dehalogenase from Desulfitobacterium chlororespirans Co23. Applied and environmental microbiology 62(10), 3809.
31. 4. Sanford, R.A., Cole, J.R., Löffler, F.E. and Tiedje, J.M. (1996) Characterization of Desulfitobacterium chlororespirans sp. nov., which grows by coupling the oxidation of lactate to the reductive dechlorination of 3-chloro-4-hydroxybenzoate. Applied and environmental microbiology 62(10), 3800-3808.
32. 5. Hahnke, S., Moosmann, P., Erb, T. and Strous, M. (2014) An improved medium for the anaerobic growth of Paracoccus denitrificans Pd1222. Frontiers in microbiology 5(18).
33. 2. Shukla, A.K., Singh, R.S., Upadhyay, S.N. and Dubey, S.K. (2010) Kinetics of bio-filtration of trichloroethylene by methanotrophs in presence of methanol. Bioresource Technology 101(21), 8119-8126.
34. 3. Little, C.D., Palumbo, A.V., Herbes, S.E., Lidstrom, M.E., Tyndall, R.L. and Gilmer, P.J. (1988) Trichloroethylene biodegradation by a methane-oxidizing bacterium. Applied and environmental microbiology 54(4), 951-956.
35. 4. Kwon, M., Ho, A. and Yoon, S. (2019) Novel approaches and reasons to isolate methanotrophic bacteria with biotechnological potentials: recent achievements and perspectives. Applied microbiology and biotechnology 103(1), 1-8.
36. Heimann, A.C., Batstone, D.J. and Jakobsen, R. 2006. Methanosarcina spp. drive vinyl chloride dechlorination via interspecies hydrogen transfer. Appl Environ



- Microbiol 72(4), 2942-2949.
37. Liu, C.-C.; Jean, J.-S.; Nath, B.; Lee, M.-K.; Hor, L.-I.; Lin, K.-H.; Maity, J.P. Geochemical characteristics of the fluids and muds from two southern Taiwan mud volcanoes: implications for water–sediment interaction and groundwater arsenic enrichment. *Applied Geochemistry* 2009, 24, 1793-1802.
 38. Liu, C.-C.; Maity, J.P.; Jean, J.-S.; Li, Z.; Kar, S.; Sracek, O.; Yang, H.-J.; Chen, C.-Y.; Reza, A.S.; Bundschuh, J. The geochemical characteristics of the mud liquids in the Wushanting and Hsiaokunshui Mud Volcano region in southern Taiwan: Implications of humic substances for binding and mobilization of arsenic. *Journal of Geochemical Exploration* 2013, 128, 62-71
 39. Jiang, L.; Cai, C.; Zhang, Y.; Mao, S.; Sun, Y.; Li, K.; Xiang, L.; Zhang, C. Lipids of sulfate-reducing bacteria and sulfur-oxidizing bacteria found in the Dongsheng uranium deposit. *Chinese Science Bulletin* 2012, 57, 1311-1319.
 40. Lalman, J.A.; Bagley, D.M. Anaerobic degradation and methanogenic inhibitory effects of oleic and stearic acids. *Water research* 2001, 35, 2975-2983.
 41. Søballe, B.; Poole, R.K. Microbial ubiquinones: multiple roles in respiration, gene regulation and oxidative stress management. *Microbiology* 1999, 145, 1817-1830.
 42. Pareek, S.; Azuma, J.-I.; Shimizu, Y.; Matsui, S. Hydrolysis of newspaper polysaccharides under sulfate reducing and methane producing conditions. *Biodegradation* 2000, 11, 229-237.
 43. Winter, J.; Wolfe, R.S. Complete degradation of carbohydrate to carbon dioxide and methane by syntrophic cultures of *Acetobacterium woodii* and *Methanosarcina barkeri*. *Archives of microbiology* 1979, 121, 97-102.
 44. Tang, Y.-Q.; Matsui, T.; Morimura, S.; Wu, X.-L.; Kida, K. Effect of temperature on microbial community of a glucose-degrading methanogenic consortium under hyperthermophilic chemostat cultivation. *Journal of bioscience and bioengineering* 2008, 106, 180-187.
 45. Gushgari-Doyle, S., Alvarez-Cohen, L., 2020. Effects of arsenic on trichloroethene–dechlorination activities of *Dehalococcoides mccartyi* 195. *Environ. Sci. Technol.* 54, 1276–1285.
 46. He, J., Sung, Y., Dollhopf, M.E., Fathepure, B.Z., Tiedje, J.M., Löffler, F.E., 2002. Acetate versus hydrogen as direct electron donors to stimulate the microbial reductive dechlorination process at chloroethene-contaminated sites. *Environ. Sci. Technol.* 36, 3945–3952.
 47. Giacomucci, L., Raddadi, N., Soccio, M., Lotti, N. and Fava, F. 2019. Polyvinyl chloride biodegradation by *Pseudomonas citronellolis* and *Bacillus flexus*. *N Biotechnol* 52, 35-41.
 48. Han, J.I., Lontoh, S. and Semrau, J.D. 1999. Degradation of chlorinated and brominated hydrocarbons by *Methylobacterium album* BG8. *Arch Microbiol* 172(6),



- 393-400.
49. Heimann, A.C., Batstone, D.J. and Jakobsen, R. 2006. *Methanosarcina* spp. drive vinyl chloride dechlorination via interspecies hydrogen transfer. *Appl Environ Microbiol* 72(4), 2942-2949.
 50. Mattes, T.E., Jin, Y.O., Livermore, J., Pearl, M. and Liu, X. 2015. Abundance and activity of vinyl chloride (VC)-oxidizing bacteria in a dilute groundwater VC plume biostimulated with oxygen and ethene. *Appl Microbiol Biotechnol* 99(21), 9267-9276.
 51. Triandafillu, K., Balazs, D.J., Aronsson, B.O., Descouts, P., Tu Quoc, P., van Delden, C., Mathieu, H.J. and Harms, H. 2003. Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* strains to untreated and oxygen-plasma treated poly(vinyl chloride) (PVC) from endotracheal intubation devices. *Biomaterials* 24(8), 1507-1518.
 52. Lontoh, S., DiSpirito, A.A., Krema, C.L., Whittaker, M.R., Hooper, A.B. and Semrau, J.D. 2000. Differential inhibition in vivo of ammonia monooxygenase, soluble methane monooxygenase and membrane-associated methane monooxygenase by phenylacetylene. *Environ Microbiol* 2(5), 485-494.
 53. Nakamura, T., Hoaki, T., Hanada, S., Maruyama, A., Kamagata, Y. and Fuse, H. 2007. Soluble and particulate methane monooxygenase gene clusters in the marine methanotroph *Methylomicrobium* sp. strain NI. *FEMS Microbiol Lett* 277(2), 157-164.
 54. Fan, R., Tian, H., Wu, Q., Yi, Y., Yan, X. and Liu, B. 2022. Mechanism of bio-electrokinetic remediation of pyrene contaminated soil: Effects of an electric field on the degradation pathway and microbial metabolic processes. *Journal of Hazardous Materials* 422, 126959.
 55. Sheu, Y.-T., Tsang, D.C.W., Dong, C.-D., Chen, C.-W., Luo, S.-G. and Kao, C.-M. 2018. Enhanced bioremediation of TCE-contaminated groundwater using gamma poly-glutamic acid as the primary substrate. *Journal of Cleaner Production* 178, 108-118.



研究進度及預期完成之工作項目（甘特圖）

年月	第 1 月	第 2 月	第 3 月	第 4 月	第 5 月	第 6 月	第 7 月	第 8 月	第 9 月	第 10 月	第 11 月	第 12 月	備 註
工作項目													
實驗方法建置與採樣													
菌群之生物資訊分析													
功能性基因與菌種定量分析													
本土微生物菌群篩選													
現地整治基質改良試驗													
化學分析評估													
Ecoplate 培養及代謝探討													
泥火山甲烷菌群篩選													
混合式添加試驗													
期中報告撰寫													※報告文件
結案報告撰寫(包含防疫政策建議)													※報告文件
工作進度估計百分比 (累積數)	5 %	10 %	15 %	20 %	40 %	45 %	55 %	65 %	75 %	85 %	95 %	100 %	
預定查核點	期中		現地採樣(含泥火山)之微生物菌群、代謝基因及 Ecoplate 分析結果，與初步篩選結果。										
	期末		菌株純化、菌株功能代謝基因定量、Ecoplate 篩選、基質改良策略、後續研究規劃及結案報告。										



備註:本研究規劃三個月採樣一次，故在期末報告前可能僅有三次數據彙整。

說明：

- 1、 工作項目請視專案性質及需要自行訂定。預定進度以粗線表示其起迄日期。
- 2、 「工作進度百分比」欄係為配合管考作業所需，累積百分比請視工作性質就以下因素擇一估計訂定：(1) 工作天數，(2) 經費之分配，(3) 工作量之比重，(4) 擬達成目標之具體數字。
- 3、 「預定查核點」，請在條形圖上標明※符號，並在「預定查核點」欄具體註明關鍵性工作要項。



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

審查意見回復對照表

☐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 checked="" type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 調查 <input type="checkbox"/> 其它		主持人：許曷慕 NO：C3
計畫名稱	含氣污染場址之現地微生物整治技術開發與本土菌群篩選		
委員審查意見		計畫單位回覆	
委員一 1. 缺目次請補上。 2. 期中報告摘要仍使用計畫摘要標題，而且摘要內文仍是計畫摘要，請改成期中研究成果之重點敘述。 3. 本次是期中報告，然內容都是各年度的工作項目及報告的字眼，已經分不清楚和何種項目為本期中之研究成果內容，建議內容聚焦在本半年之研究成果，以利審查。 4. Page 20 研究方法及步驟中有關污染場址採樣規劃內容，出現「除了該場址外，本研究團隊已與其他環保整治公司簽屬 MOU(附件一)。未來若菌種/菌群商品開發成功，將由台灣環境友善資材有限公司，協助本團隊進行菌群大量生產。」此段和本節不合，建議移到比較相關的章節論述。 5. 結果與討論第一節前期研究投稿證明非研究結果，建議移至附錄。 6. 結果與討論第二節新污染場址採樣背景說明，非研究結果建議移至第四章。 7. 缺結論請補上。		1. 已補上目次。 2. 已改正為期末報告格式。 3. 感謝委員指正，已於期末報告中修正。 4. 已修正改放置未來合作計畫部分。 5. 已修正放置位置。 6. 已照委員建議改放置第四章。 7. 已補上結論。	
委員二 1. 研究方法似與申請計畫書無異，實際執行具體作為宜有說明。		1. 已照委員建議修正。 2. 已修正採樣時間點正確資訊。 3. 感謝委員建議，已照進度執行。	



<p>2. 實際採樣日期為何？P.20/P29 似不一致。採樣期間前期潛在影響地下水之環境因素宜掌握。</p> <p>3. 菌群篩選工作進度似落後(比對甘特圖)，後續進展請掌握。</p>	
<p>委員三</p> <p>1. 8/2 方進行地下水採樣，執行進度似有落後。</p> <p>2. 報告中污染物濃度單位 ppm 與 mg/L 混用，建議統一為 mg/L。</p> <p>3. 表三顯示 GW03 之含氧污染物濃度最高，原因為何？是否有降低趨勢？宜深加探討。</p>	<p>1、受疫情管制影響稍有落後，已趕上進度要求。</p> <p>2、感謝委員建議，已照委員建議處理。</p> <p>3、感謝委員建議，已照委員建議處理。</p>
<p>委員四</p> <p>1. 本研究採樣部分有受疫情之影響，惟 8/2 已進行採樣大致可以趕上原擬之進度。</p>	<p>1、感謝委員肯定。</p>
<p>委員五</p> <p>1. 本研發計畫透過本土菌群篩選、實驗室降解試驗，期能將研究成果應用於含氯污染場址之現地微生物整治，本年度為研究團隊就本項主題之第二年研究，計畫期中成果報告已如期提出。</p> <p>2. 依據研究團隊所提期中成果報告，本計畫期中報告所示之執行內容與方式因受疫情影響稍有調整，含氯有機物污染場址地下水採樣計畫因疫情而調整至 110 年 8 月初執行，惟研究團隊已加速完成地下水樣品分析工作，並已呈現於本次期中報告，後續研究工作應可於預定期程內完成。</p> <p>3. 本計畫期中報告所示之執行內容與方式雖受疫情影響而稍有調整，整體進度仍合乎預期。</p>	<p>1、感謝委員肯定。</p> <p>2、感謝委員鼓勵與肯定。</p> <p>3、受疫情影響，本研究已做些微方向修正，感謝委員鼓勵，已完成期末報告初稿。</p> <p>4、感謝委員建議與肯定，本研究將於接續年度進行實場整治測試。</p>



4. 本計畫期中報告已針對目前研究成果提出說明，包括：前期計畫研究投稿情形、新污染場址採樣說明、地下水含氯有機污染物分析結果、高雄烏松泥火山菌群分析結果及代謝基因及EcoPlate 分析結果等項目，以此為基礎，有助於研究團隊下半年度進行含氯有機物污染現地微生物整治技術實驗與開發，並進一步擴大至模場試驗。



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：許曷慕 NO：C2	
計畫名稱	含氯污染場址之現地微生物整治技術開發與本土菌群篩選		
委員審查意見		計畫單位回覆	
委員一 8. 和期中報告一樣，仍缺目次，請補上。 9. 本報告在結果討論方面，有多方面的引用文獻，值得肯定。 10. 安定場址樣本主代謝活性分析在科技部及本基金的共同支持下，將整合後成於最短時間發表於著名期刊 Journal of Hazardous Materials，值得肯定。 11. 泥火山樣本來自 12 處，但以英文代號表示(圖 16)，建議盡可能以中文表示，予以利了解是何處的泥火山。 12. 就兩年結果推論經過整治期後生物多樣性會有所增加之趨勢，氯化物降解之生物種類也變多，是否可以增加文獻的引用及討論？		1.已確認填寫目次。 2.3.感謝委員肯定與鼓勵。 4.已遵照委員建議修正圖表，均以中英文並列方式呈現，或於圖表說明中備註。 5.已新增相似性研究的引用與討論。在山大學高志明教授 2018 年發表於 Journal of Cleaner Production 期刊的文章 "Enhanced bioremediation of TCE-contaminated groundwater using gamma poly-glutamic acid as the primary substrate"，其中提到透過添加 γ -聚谷氨酸 (γ -PGA) 做為基質添加至三氯乙烯 (TCE) 污染的地下水中，經過實驗發現可有效提升生物整治的成效，主要透過總有機碳的增加及 TCE 脫氯率提升。其研究	



	<p>也發現在這種情況下，生物多樣性有增加，該文章比較可惜之處在於僅使用 DGGE 進行菌相變化分析，如使用 NGS 等定序之菌相組成分析會更有證據力。此外，Fan 等人在 2022 年 1 月發表於 <i>Journal of Hazardous Materials</i> 的文章”Mechanism of bio-electrokinetic remediation of pyrene contaminated soil: Effects of an electric field on the degradation pathway and microbial metabolic processes”也提到使用電動力場結合生物整治苯芘 pyrene 污染的土壤，使得整治成效更佳優化，且微生物菌相更有利於單獨的整治方法。因此可評估不同整治方法的整合，擬定生物整治策略。</p>
<p>委員二</p> <p>4. 計畫成果之政策面助益，請具體補充。</p> <p>5. 計畫摘要、結論應請對稱研究目的四項(P-15)補正執行成果具體說明。</p>	<p>1.已遵照委員建議修正對於政策面之助益如下：在政策面之服務便民項目，本計畫將提供污染場址之業主及整治廠商兩場次之技術服務與兩場次之諮詢服務。本研究已擬定使用 EcoPlate 結合菌群分析</p>



	<p>作為整治場址狀態評估，且提供 EcoPlate 方法較為簡易可作為前期評估與營養源添加參考用。此外，本研究認為泥火山具有優勢菌群，可作為後續整體添加使用，但仍需透過實驗室評估對整治現地菌群之影響評估，以免有破壞生態之疑慮，將可作為未來整治之參考。</p> <p>2. 已遵參照委員建議，進行計畫摘要(中英文)、結論以及研究目的中所提及之四項實務應用適用情境之扣合進行具體說明及補正。</p>
<p>委員三</p> <p>4. 針對各委員所提供之期中報告審查意見應逐條詳實回覆，而非含混帶過。</p> <p>5. 請具體說明本技術未來應用於含氯污染場址之現地整治的潛力及可能之限制。</p>	<p>1.已遵照委員建議，針對各委員所提供之期中報告審查意見，逐條詳實回覆。</p> <p>2.本研究完成 Ecoplate 與高通量定序分析之代謝結果預測整合，能有效提供汙染現地背景資料與後續整治策略菌群資訊。</p> <p>另外，本團隊開始採用第三代定序分析技術，針對細菌 16S 核糖體基因進行全序列分析。此法將有效提升菌群種類之辨識性</p>



	<p>與正確性。本研究調查泥火山樣本帶有甲烷營養菌以及氮代謝有關之菌種，並證實部分泥火山樣本適合做為含氮污染場址之菌群添加試驗材料。後續本團隊將於實際整治場址進行小規模測試。本團隊已於目前整治中之場址，進行相關氮代謝有關之菌種多樣性及相關基因檢測分析，發現整治效果與上述因子具關連性，因此本計畫分子生物分析項目亦可作為評估整治效果之參數。目前生物整治技術較大缺點仍在整治速度及效果的提升。如何藉由微生物電化學之學理，實際應用該技術於含氮污染場址並評估其整治效益亦將為本團隊未來研究重點。</p>
<p>委員四</p> <p>2. 第 16 頁圖二為全程計畫願景圖，宜再整理清楚，中英文夾雜、字跡太小，很難閱讀，因為願景圖很重要。同頁圖三為菌種/群篩選架構流程圖，全部為英文，宜改為中文，或中英對照。</p> <p>3. 報告第 40 頁圖 12、第 41 頁圖 13、第 42 頁圖 14 與圖 15 亦均為英文，字跡太小無法閱讀。</p>	<p>1.2.已遵照委員建議修正，均已補上中英文對照與解析度調整。</p> <p>3.已改用彩色列印相關重要頁數，且線上年本為彩色圖片。</p>



<p>4. 報告第 47 頁，表 5 地下水中水質參數與氯化物濃度，因為黑白，無法辨識紅字粗體與藍色粗體。</p> <p>5. 本研究報告結論部分，並未完全對應第 8 頁摘要之中文部分三個目標與方向，以及本年度計畫著重之論述。</p> <p>6. 本研究報告第 3 頁「110 年度專案成果績效自評表」，有 2 項指標未達成，及研討會論文數 1 及 2 開發技術 1(第一項(2)及第 62 頁(1)之部分)，其所填列達成數均為 0，請該團隊補充確認，倘提不出來，如何補救，或是為未達成？</p> <p>7. 本報告未附甘特圖。過去期初、期中委員提出意見並未見回復，呈現於報告中。</p>	<p>4.已遵照委員建議，進行計畫摘要(中英文)、結論以及研究目的論述主題之扣合及補正。</p> <p>5.研討會論文方面已改為投稿國際期刊，且泥火山中氯乙烯降解相關菌群研究已發表一篇，目前另外一篇泥火山研究預計於 2022 年 4 月進行投稿，且地下水汙染之菌群研究也撰寫中，此部分成果會比原本預期更佳。已開發技術部分為 EcoPlate 評估技術，現已開發，並發表於 Journal of Hazardous Materials，目前也向合作廠商推廣使用，已修正達成數。</p> <p>6.本報告已附甘特圖，且已放置期中審查意見回覆，本次報告亦檢附期末審查意見。</p>
<p>委員五</p> <p>5. 本研究「含氯污染場址之現地微生物整治技術開發與本土菌群篩選」年度研發重點包括:含氯污染場址土壤及地下水現地整治策略開發、泥火山風化土壤的甲烷及含氯汙染物共代謝菌株/群篩選與場址評估、第三代定序技術、化學分析、生物分子分析、磷脂</p>	<p>1.2.感謝審委肯定。</p> <p>3.後續年度將著重在兩項主軸，第一為泥火山添加試驗之實驗室評估平台開發，確認泥火山對於整治之成效，及對現地菌群</p>



<p>質脂肪酸分析法，評析污染場址之整治現況與探討後續整治策略及用 Biolog EcoPlate™ 結合菌相組成代謝分析，評估現地整治污染物代謝方式及其代謝效率之方法等項目，相關研究方法、流程與成果皆已呈現於期末報告。</p> <p>6. 本計畫工作項目內容、進度及成果符合原訂目標及預期。</p> <p>7. 本研究成果顯示：「泥火山樣本中大多帶有甲烷營養菌以及對氯代謝有關之菌種，是後續菌群添加試驗之潛力來源。」，建議後續相關研發計畫考慮納入泥火山樣本甲烷營養菌以及對氯代謝有關之菌種培養及純化，或進一步發展成生物製劑之可行性探討。</p>	<p>生態影響之評估，可作為後續現地整治之參考與法規建立。第二為關鍵性甲烷營養菌以及對氯代謝有關之菌種培養及純化。</p> <p>第三為整合微生物電化學之學理，實際應用該技術於含氯污染場址，評估其整治效益並擬定最佳整治策略。</p>