

次世代定序方法應用於污染鑑識技術開發

行政院環境保護署環境檢驗所委託研究計畫

委託單位：行政院環境保護署環境檢驗所

執行單位：國立臺灣大學

執行期間：108年3月25日起至108年12月31日止

中華民國一百零八年十二月

次世代定序方法應用於污染鑑識技術開發

行政院環境保護署環境檢驗所委託研究計畫

委託單位：行政院環境保護署環境檢驗所

執行單位：國立臺灣大學

執行期間：108 年 3 月 25 日起至 108 年 12 月 31 日止

計畫經費：3,150,000 元

計畫主持人：童心欣 教授

共同主持人：于昌平 教授、江殷儒 教授

中華民國一百零八年十二月

「次世代定序方法應用於污染鑑識技術開發」計畫期末報告基本資料表

委辦單位	行政院環境保護署環境檢驗所	
執行單位	國立臺灣大學	
參與計畫人員姓名	童心欣、于昌平、江殷儒	
年度	108	
研究性質	<input checked="" type="checkbox"/> 基礎研究 <input type="checkbox"/> 應用研究 <input type="checkbox"/> 技術發展	
研究領域	生物類	
計畫屬性	<input checked="" type="checkbox"/> 科技類 <input type="checkbox"/> 非科技類	
全程期間	108年3月~108年12月	
本期期間	108年3月~108年12月	
本期經費	3,150.0 千元	
	資本支出	經常支出
	土地建築 0__千 元	人事費 <u>660.246</u> 千元
	儀器設備 0__千 元	業務費 <u>59.0</u> 千元
	其他 0__千 元	材料費 <u>2,095.754</u> 千元
		旅運費 <u>20.0</u> 千元
		管理費 <u>315.0</u> 千元
摘要關鍵詞(中英文各三則)		
河口底泥、微生物菌群分布、總體基因體學		
estuarine sediment, microbial community profile, metagenomics		

基本摘要內容

一、中文計畫名稱：

次世代定序方法應用於污染鑑識技術開發

二、英文計畫名稱：

Application of Next Generation Sequencing to Pollution Source Identification

三、執行單位：

國立臺灣大學

四、計畫主持人（包括/共同主持人）：

童心欣、于昌平、江殷儒

五、執行開始時間：

108 年 3 月 25 日

六、執行結束時間：

108 年 12 月 31 日

七、報告完成日期：

108 年 12 月 13 日

八、報告總頁數：

183 頁

十、使用語文：

中文、英文

十一、報告電子檔名稱：

次世代定序方法應用於污染鑑識技術開發[期末報告].docx

十二、報告電子檔格式：

MS WORD

十三、中文摘要關鍵詞：

河口底泥、重金屬、垂直分布、微生物菌群分布、次世代定序

十四、英文摘要關鍵詞：

estuarine sediment, heavy metal, vertical distribution, microbial community profile, next generation sequencing

十五、中文摘要：

本研究探討以次世代定序方法應用於環境污染鑑識技術開發之可行性。透過採集不同深度之河口底泥(客雅溪、三姓公溪、鹽港溪、二仁溪)，分析底泥微生物群落受歷史重金屬污染之影響；此外，分析各深度底泥之重金屬累積，造成微生物功能性基因之變化，以獲得與重金屬污染相關之基因。菌群與環境因子之典型關聯分析結果顯示 *Bacteroidetes_vadinHA17_ge*、*GIF9_ge*、*JS1_ge*、*Methanolinea*、*Methanosaeta*、*Odinarchaeaia_ge*、*Smithella*、*Vibrio* 經鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅篩選下重複於不同深度出現，有機會成為河口重金屬污染之普遍性指標菌屬。而環境基因體學的分析結果顯示銅抗性基因主要來自兩個類群：銅輸出蛋白 P-type ATPase 及

銅氧化酶 multicopper oxidase，顯示受污染河口的微生物，包括細菌與古菌，主要透過去毒(將一價銅氧化成低毒性的二價銅)以及銅離子輸出機制來降低銅離子對細胞生理的負面影響。未來將可利用這些抗性基因的多樣性數字化，用以評估銅污染程度。

十六、英文摘要：

The objective of this study was to explore the applications of next generation sequencing in pollution source identification. Sediment samples were collected from several estuarine regions (Keiyaxi, Sanxinggongxi, Yangangxi, Errenxi), chemical characteristics, heavy metal contents, microbial diversity and functional genes related to copper resistance were analyzed in different depths. The Canonical Correlation Analysis showed that bacterial genus *Bacteroidetes_vadinHA17_ge*, *GIF9_ge*, *JS1_ge*, *Methanolinea*, *Methanosaeta*, *Odinarchaeia_ge*, *Smithella*, and *Vibrio* were positively correlated with the concentrations of cadmium, chromium, copper, lead, nickel and zinc at different depths of sediments. These bacterial genus may be potential bioindicators for heavy metal pollution in the estuary regions. In addition, the metagenomic analysis showed that copper resistance genes which correlated with copper concentration were mainly P-type ATPase and multicopper oxidase, suggesting that detoxification (lowering toxicity by oxidizing monovalent copper to divalent one) and copper ion export are the major detoxification mechanisms for these microbial communities in estuaries. In addition, the diversity and abundance of these resistance genes can be applied for pollution sources identification in the future.

目錄

第一章 前言	1
1.1 計畫緣起	1
1.2 計畫目標	2
1.2.1 計畫工作內容	2
1.2.2 計畫執行進度及成效	4
第二章 背景文獻回顧	7
2.1 河口底泥	7
2.2 重金屬於河口底泥	8
2.3 河口底泥微生物生態	9
2.4 重金屬影響底泥中微生物生態	10
2.5 次世代定序應用於微生物生態分析	10
第三章 研究方法與原理	17
3.1 現地採樣	17
3.1.1 採樣點位資訊	17
3.1.2 採樣方法	18
3.1.3 底泥分析流程圖	19
3.2 底泥物化分析	19
3.3 底泥微生物 DNA 萃取	21
3.4 高通量定序	21
3.4.1 MiSeq 16S-rRNA 菌群	21
3.4.2 metagenomic 高通量定序及組裝	23
第四章 結果與討論	27
4.1 底泥物理化學性質	27
4.2 經 PCR 放大後之底泥 DNA 量	46
4.3 微生物族群分析與環境因子影響之探討	47
4.3.1 0-10 公分分層之樣品	49

4.3.2 10-20 公分分層之樣品	53
4.3.3 20-30 公分分層之樣品	56
4.3.4 30-40 公分分層之樣品	59
4.3.5 40-50 公分分層之樣品	62
4.3.6 菌群與環境因子之綜合分析	65
4.3.6 使用改良 V4 region primer 對定序結果之影響.....	68
4.4 底泥樣本之環境基因體分析結果.....	69
4.5 環境基因體學分析方法可行性.....	76
第 五 章 結 論	79
5.1 客雅溪、三姓公溪、鹽港溪及二仁溪底泥物化分析數據.....	79
5.2 微生物族群分析.....	79
5.2.1 主座標分析(PCoA).....	79
5.2.2 底泥菌群與環境因子之典型關聯分析(CCA).....	80
5.2.3 改良的 V4 region primer 對定序結果影響.....	80
5.3 環境基因體分析.....	81
第 六 章 建 議 事 項 及 後 續 工 作	83
參 考 文 獻	85
附 錄	91
附錄一 評選會議委員意見及廠商回覆表	91
附錄二 期初工作報告 廠商回覆意見表	94
附錄三 期中工作報告 廠商回覆意見表	95
附錄四 期末工作報告 廠商回覆意見表	101
附錄五 樣本的 DNA 濃度	109
附錄六 7 個顯著表現之銅抗性基因的 DNA 及胺基酸序列	111
附錄七 科技計畫成果效益事實報告表	121
附錄八 科技計畫成果效益自評表	125

圖目錄

圖 3-1 新竹出海口採樣點分布	18
圖 3-2 二仁溪出海口採樣點分布.....	18
圖 3-3 底泥分析流程圖	19
圖 3-4 總體基因體學分析的流程.....	24
圖 4-1 底泥 pH 分布	28
圖 4-2 底泥電導度分布	29
圖 4-3 底泥氯離子分布	30
圖 4-4 底泥總有機碳分布.....	34
圖 4-5 底泥鎘分布.....	38
圖 4-6 底泥鉻分布.....	38
圖 4-7 底泥銅分布.....	39
圖 4-8 底泥鎳分布.....	39
圖 4-9 底泥鉛分布.....	40
圖 4-10 底泥鋅分布	40
圖 4-11 底泥汞分布	41
圖 4-12 第一次採樣客雅溪底泥碳氮氫分布	43
圖 4-13 第二次採樣客雅溪底泥碳氮氫分布	43
圖 4-14 第一次採樣鹽港溪底泥碳氮氫分布	43
圖 4-15 第二次採樣鹽港溪底泥碳氮氫分布	43
圖 4-16 第一次採樣二仁溪底泥碳氮氫分布	44
圖 4-17 第一次採樣三姓公溪底泥碳氮氫分布	44
圖 4-18 第二次採樣二仁溪底泥碳氮氫分布	44
圖 4-19 第二次採樣三姓公溪底泥碳氮氫分布	44
圖 4-20 第一次採樣 0-10 公分底泥碳氮氫分布.....	44
圖 4-21 第二次採樣 0-10 公分底泥碳氮氫分布.....	44
圖 4-22 第一次採樣 10-20 公分底泥碳氮氫分布.....	45
圖 4-23 第二次採樣 10-20 公分底泥碳氮氫分布.....	45
圖 4-24 第一次採樣 20-30 公分底泥碳氮氫分布.....	45
圖 4-25 第二次採樣 20-30 公分底泥碳氮氫分布.....	45
圖 4-26 第一次採樣 30-40 公分底泥碳氮氫分布.....	45
圖 4-27 第二次採樣 30-40 公分底泥碳氮氫分布.....	45
圖 4-28 第一次採樣 40-50 公分底泥碳氮氫分布.....	46
圖 4-29 第二次採樣 40-50 公分底泥碳氮氫分布.....	46
圖 4-30 河口底泥樣品之主座標分析 (Principal Co-ordinates Analysis) 結果.....	48
圖 4-31 河口底泥樣品之主座標分析 (Principal Co-ordinates Analysis) 結果.....	48

圖 4-32 河口 0-10 公分底泥樣品之菌屬受不同環境條件影響之典型關聯分析 (canonical correspondence analysis, CCA)結果	50
圖 4-33 河口 0-10 公分底泥樣品之菌屬受不同重金屬條件影響之典型關聯分 析(canonical correspondence analysis, CCA)結果	50
圖 4-34 選定與鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅相關之 16 屬菌屬於不同樣點所占總 數之百分比.....	53
圖 4-35 河口 10-20 公分底泥樣品之菌屬受不同環境條件影響之典型關聯分析 (canonical correspondence analysis, CCA)結果	54
圖 4-36 河口 10-20 公分底泥樣品之菌屬受不同重金屬條件影響之典型關聯分 析(canonical correspondence analysis, CCA)結果	54
圖 4-37 選定與鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅相關之 13 屬菌屬於不同樣點所占總 數之百分比.....	56
圖 4-38 河口 20-30 公分底泥樣品之菌屬受不同環境條件影響之典型關聯分析 (canonical correspondence analysis, CCA)結果	57
圖 4-39 河口 20-30 公分底泥樣品之菌屬受不同重金屬條件影響之典型關聯分 析(canonical correspondence analysis, CCA)結果	57
圖 4-40 選定與鉻、銅、鎳、鋅相關之 2 屬菌屬於不同樣點所占總數之百分 比	58
圖 4-41 選定與汞相關 4 屬菌屬於不同樣點所占總數之百分比	59
圖 4-42 河口 30-40 公分底泥樣品之菌屬受不同環境條件影響之典型關聯分析 (canonical correspondence analysis, CCA)結果.....	60
圖 4-43 河口 30-40 公分底泥樣品之菌屬受不同重金屬條件影響之典型關聯分 析(canonical correspondence analysis, CCA)結果	60
圖 4-44 選定與鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅相關 4 屬菌屬於不同樣點所占總數 之百分比	61
圖 4-45 選定與汞相關 2 屬菌屬於不同樣點所占總數之百分比	62
圖 4-46 河口 40-50 公分底泥樣品之菌屬受不同環境條件影響之典型關聯分 (canonical correspondence analysis, CCA)結果.....	63
圖 4-47 河口 40-50 公分底泥樣品之菌屬受不同重金屬條件影響之典型關聯分 析(canonical correspondence analysis, CCA)結果	63
圖 4-48 選定與鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅相關 4 屬菌屬於不同樣點所占總數 之百分比	64
圖 4-49 不同深度分層與重金屬正相關之菌屬總數.....	65
圖 4-50 選定與鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅正相關之菌屬於不同樣品所占之百 分比.....	67
圖 4-51 不同樣品間不同界所占總 OTU 之比例.....	69
圖 4-52 鹽港溪 (藍色) 及二仁溪 (橘色) 底泥中, 銅離子抗性以及代謝相	

關的基因種類以及數量 (log CPM) ◦ 75

表目錄

表 1-1 計畫預定進度	4
表 1-2 本計畫預期目標及目前執行成效.....	5
表 3-1 客雅溪、三姓公溪、鹽港溪、二仁溪採樣點資訊.....	18
表 3-2 序列品質過濾 (quality trimming) 的結果	24
表 3-3 總體基因體學的 DNA 序列片段品質檢測.....	26
表 4-1 底泥 pH 分布.....	27
表 4-2 底泥導電度分布	28
表 4-3 底泥氯離子分布	29
表 4-4 底泥粒徑種類佔比.....	31
表 4-5 第一次採樣底泥體積粒徑累計百分比	32
表 4-6 第二次採樣底泥體積粒徑累計百分比	33
表 4-7 總有機碳百分比	34
表 4-8 客雅溪底泥重金屬含量(單位：mg/kg).....	35
表 4-9 鹽港溪底泥重金屬含量(單位：mg/kg).....	36
表 4-10 三姓公溪底泥重金屬含量(單位：mg/kg).....	36
表 4-11 二仁溪底泥重金屬含量(單位：mg/kg)	37
表 4-12 重金屬與其他環境因子之皮爾森相關性分析	41
表 4-13 第一次採樣底泥 CNH 元素重量百分比例	42
表 4-14 第二次採樣底泥 CNH 元素重量百分比例	42
表 4-15 經 PCR 放大後之底泥 DNA 量	46
表 4-16 河口 0-10 公分底泥樣品之菌屬與不同重金屬之 pearson 相關性分析結果	51
表 4-17 河口 0-10 公分底泥樣品與鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅皆呈正相關之菌屬	52
表 4-18 河口 10-20 公分底泥樣品之菌屬與不同重金屬之 pearson 相關性分析結果.....	55
表 4-19 河口 10-20 公分底泥樣品與鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅皆呈正相關之菌屬	55
表 4-20 河口 20-30 公分底泥樣品之菌屬與不同重金屬之 pearson 相關性分析結果.....	58
表 4-21 河口 30-40 公分底泥樣品之菌屬與不同重金屬之 pearson 相關性分析結果.....	61
表 4-22 河口 40-50 公分底泥樣品之菌屬與不同重金屬之 pearson 相關性分析結果.....	64
表 4-23 不同河口深度底泥樣品與鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅皆正相關之菌屬 ..	66

表 4-24	二仁溪 10-20 公分底泥中，與銅離子抗性以及代謝相關的基因.....	73
表 4-25	低銅污染的鹽港溪河口底泥中所發現的銅抗性以及代謝相關的基因 .	74

報告大綱

本計畫擬透過採集不同深度之河口底泥(客雅溪、三姓公溪、鹽港溪、二仁溪)，分析深度之重金屬濃度及微生物群落、功能性基因變化，建立彼此之相關性，並評估以次世代定序技術 (Next Generation Sequencing) 分析微生物群落變化應用於河川歷史污染鑑識技術的可行性。

本計畫經費 3,150.0 千元，並規劃五大項：其中人事費 660.246 千元，材料費 2,095.754 千元，業務費 59.0 千元，旅運費 20.0 千元，管理費 315.0 千元

本計畫之執行進度，包含:

1. 蒐集國內外河口底泥微生物分層基因表現分析相關文獻。
2. 採集河口底泥樣品，底泥分層物化特性分析。
3. 底泥分層萃取總核酸並進行次世代定序(16S-rRNA amplicon sequencing & metagenome shotgun sequencing)
4. 定序結果分析，建立微生物體與底泥環境物化特性關聯性。
5. 完成研究報告 1 件。

本計畫共分六個章節，各章節內容說明如下：第一章「前言」中介紹計畫源起、目標，以及計畫工作內容其執行進度與成效。第二章「背景文獻回顧」以河口底泥、重金屬於河口底泥、河口底泥微生物生態、重金屬影響底泥中微生物生態、次世代定序應用於微生物生態分析，這五項目進行文獻回顧。第三章「研究方法與原理」將本計畫使用之研究方法進行說明，包含地採樣、底泥之物化分析、核酸萃取、16S-rRNA 及全基因高通量定序。第四章「結果與討論」包含小節，包含了現地採樣物化分析結果、河口底泥基因體分析結果、微生物族群分析與環境因子影響探討。第五章「結論」與第六章「建議事項」以條列敘述方式，敘述本計畫的實驗結果，並

針對部分結果進行探討，另提出後續的研究方向以及參考意見。

計畫成果摘要(詳細版)

計畫名稱：次世代定序方法應用於污染鑑識技術開發

計畫執行單位：國立臺灣大學

計畫主持人(包括協同主持人)：童心欣、于昌平、江殷儒

計畫期程：108年3月25日至108年12月31日

計畫經費：參佰壹拾伍萬元

摘要

本研究探討以次世代定序方法應用於環境污染鑑識技術開發之可行性。透過採集不同深度之河口底泥(客雅溪、三姓公溪、鹽港溪、二仁溪)，分析底泥微生物群落受歷史重金屬污染之影響；此外，分析各深度底泥之重金屬累積，造成微生物功能性基因之變化，以獲得與重金屬污染相關之基因。菌群與環境因子之典型關聯分析結果顯示 *Bacteroidetes_vadinHA17_ge*、*GIF9_ge*、*JS1_ge*、*Methanolinea*、*Methanosaeta*、*Odinarchaeia_ge*、*Smithella*、*Vibrio* 經鎳、鉻、銅、鉛、鎳、鋅篩選下重複於不同深度出現，有機會成為河口重金屬污染之普遍性指標菌屬。而環境基因體學的分析結果顯示銅抗性基因主要來自兩個類群：銅輸出蛋白 P-type ATPase 及銅氧化酶 multicopper oxidase，顯示受污染河口的微生物，包括細菌與古菌，主要透過去毒

(將一價銅氧化成低毒性的二價銅)以及銅離子輸出機制來降低銅離子對細胞生理的負面影響。未來將可利用這些抗性基因的多樣性數字化，用以評估銅污染程度。

Abstract

The objective of this study was to explore the applications of next generation sequencing in pollution source identification. Sediment samples were collected from several estuarine regions (Keiyaxi, Sanxinggongxi, Yangangxi, Errenxi), chemical characteristics, heavy metal contents, microbial diversity and functional genes related to copper resistance were analyzed in different depths. The Canonical Correlation Analysis showed that bacterial genus *Bacteroidetes_vadinHA17_ge*, *GIF9_ge*, *JS1_ge*, *Methanolinea*, *Methanosaeta*, *Odinarchaeia_ge*, *Smithella*, and *Vibrio* were positively correlated with the concentrations of cadmium, chromium, copper, lead, nickel and zinc at different depths of sediments. These bacterial genus may be potential bioindicators for heavy metal pollution in the estuary regions. In addition, the metagenomic analysis showed that copper resistance genes which correlated with copper concentration were mainly P-type ATPase and multicopper oxidase, suggesting

that detoxification (lowering toxicity by oxidizing monovalent copper to divalent one) and copper ion export are the major detoxification mechanisms for these microbial communities in estuaries. In addition, the diversity and abundance of these resistance genes can be applied for pollution sources identification in the future.

前言

由於污染物排放可能為非連續性，水域中能直接即時連續偵測的方法在許多現地並不適用，例如工廠夜間或雨季違法排放等，無法以水樣直接追蹤。但許多污染物在底泥中可能累積或者接觸底泥微生物造成微生物生態或基因體變化，即使污染物短暫消失，微生物生態的變化仍可量測並代表現地長期受到污染的可能性。

本計畫主要目標為透過採集不同深度之河口底泥(客雅溪、三姓公溪、鹽港溪、二仁溪)，分析各深度之重金屬濃度及微生物群落、功能性基因變化，建立彼此之相關性，並評估以次世代定序技術分析微生物群落變化應用於河川歷史污染鑑識技術的可行性。

研究方法

1. 蒐集國內外河口底泥微生物分層基因表現分析相關文獻
2. 選取新竹香山濕地及二仁溪河口位置採取底泥樣品，分析重金屬污染造成菌群及功能性基因之變化結果，評估主要差異菌群及功能性基因作為污染源鑑識之可能性。於 2019 年 4 月 10 日於客雅溪、三姓公溪、鹽港溪等 3 個點位的出海口進行底泥採樣，每個點位取得 2 管底泥管柱，依深度每 10 公分為一層，其中客雅溪出海口底泥採

集深度為 50 公分(共分 5 層)、三姓公溪出海口底泥採集深度為 30 公分(共分 3 層)、鹽港溪出海口底泥採集深度一點為 30 公分(共分 3 層)，另一點為 50 公分(共分 5 層)詳細點位分佈如下圖 1。另於 2019 年 4 月 30 日於二仁溪出海口進行底泥採樣，取得 2 管底泥管柱，依深度每 10 公分為一層，採集深度為 50 公分(共分 5 層)，詳細點位如下圖 2。

3. 底泥分析項目則有 pH、粒徑分布、TOC、CNH 元素比例、氯離子濃度、重金屬濃度、微生物族群等。
4. 底泥樣品微生物分析：將底泥樣本利用 QIAGEN 公司研發之 DNeasy PowerSoil Kit 試劑盒進行 DNA 萃取。經萃取後，DNA 產量大部分偏低，濃度為 0.1~39.4 ng/ul 之間。接續進行 PCR 擴增，使用與細菌 16S 核糖體核糖核酸基因(16S rRNA gene) V4 序列互補的一對正反引子，利用聚合酶連鎖反應(PCR)放大出 V4 片段，長度約 390bp，放大後產物使用 QIAGEN 公司研發之 QIAquick Gel Extraction Kit 試劑盒進行片段的純化。由於放大後的序列尾端皆設計有 Illumina 突出轉接子(overhang adapters)，因此可以藉此突出轉接子序列(overhang adapters)，以 Illumina 公司研發之 Nextera XT Index 試劑盒，利用內含條碼 barcodes 與 Illumina 定

序接頭序列(P5, P7)進行建庫。並使用 Agilent bioanalyzer 2100 測量待測建庫之大小及使用螢光定量法(Qubit)測量待測文庫濃度，調整待測文庫濃度後，將樣本加入表面帶有互補轉接子序列的定序晶片上，並利用次世代定序儀(MiSeq)之橋式聚合酶鏈鎖反應(bridge amplification)將樣本擴增以放大螢光檢測的訊號，藉由定序過程中不同鹼基的螢光標記擁有不同的螢光顏色來辨認互補的鹼基對，經重覆進行螢光標記移除與偵測，即可偵測眾多環境菌種的基因序列（雙邊定序長度 2*250bp）。

5. 總體基因體學(metagenomics)定序的樣區為鹽港溪以及二仁溪的匯流口不同深度的底泥，依序為 0-10cm，10-20cm 以及 20-30cm，每個樣點 2 個樣品，總共 12 個樣品。DNA 樣本則由中研院生物多樣性研究中心的新世代基因體定序核心實驗室進行的 metagenome DNA 建庫。建庫使用的方法為 Illumina 公司研發的 Nextera DNA Flex Kit, 將 DNA 利用隨機 transposase（轉坐酶）將 DNA 打斷，並接上內含條碼 barcode 以便利用 HiSeq 2500 進行定序，條件為 HiSeq Rapid Mode pair-end 2 x 250，總體的輸出量為 300 Giga bases.

結果與討論

1. 底泥重金屬結果

於 2019 年 4 月 10 日及 2019 年 4 月 30 日於客雅溪、三姓公溪、鹽港溪、二仁溪 4 個點位進行不同深度底泥採樣，共取得 34 個底泥樣本，主要重金屬濃度如下表 1、表 2、表 3、表 4 所示。

2. 微生物族群分析與環境因子影響之探討

基於各樣本之間微生物族群結構的 Bray-Curtis 距離，以及環境因子的濃度，進行主座標分析 (Principal Co-ordinates Analysis) 結果(圖 5)，其中客雅溪代號 K、三姓公溪代號 T、鹽港溪代號 B、二仁溪代號 R，可以看出 R1、R2 之底層樣點之菌群組成較為相似，皆聚集於 PCoA 圖的右上部，其餘樣點分布則較無規律，若將同一深度之樣點以 95%信心水準之橢圓作圖，可以看出不同深度並不會有明顯之分群，這顯示在考慮不同物種組成及豐度的情況下，所有樣點間不同深度的樣品並無明顯的差異。圖 6 則將不同樣點之樣品以 95%信心水準之橢圓作圖，可以看出 R1、R2 與 K1、K2、B1、B2、T1、T2 明顯分為兩群，這顯示 R1、R2(重金屬濃度高)的物種組成及豐度與 K1、K2、B1、B2、T1、T2(重金屬濃度低)有所差異。

將各樣品高通量定序結果與環境因子進行典型關聯分析 (canonical correspondence analysis, CCA)，可以看出不論在任何深度分層，單獨以重金屬作為環境因子之典型關聯分析結果，與納入全部環境因子分析之結果皆相似，顯示重金屬在任何深度皆可能為造成菌群結構不同之主要影響因子，不過由於重金屬鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅彼此皆呈顯著正相關(表 5)，因此其於 CCA 圖中相當接近，較難區分，為了解單一重金屬對於各菌屬之影響程度，另外採用皮爾森相關性分析求得彼此之相關係數及其顯著性，將 CCA 及皮爾森分析篩選出之菌屬取交集，即為可能具有重金屬污染鑑識潛力之指標微生物，以下根據不同深度分層依序進行分析：

2.1 0-10 公分分層之樣品

圖 7 顯示在 0-10 公分分層之底泥中，與重金屬鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅正相關之菌屬有 34 屬，與汞正相關之菌屬則有 8 屬。另外列出經 pearson 相關性分析後與重金屬顯著相關之菌屬，交叉比對 CCA 與 pearson 結果後，與鎘顯著正相關之菌屬有 28 屬、鉻有 19 屬、銅 23 屬、鉛 19 屬、鎳 18 屬、鋅 18 屬、汞則有 1 屬為 *Photobacterium*，其中同時與鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅皆為顯著正相關有 16 屬，由圖 8 可以看出這 16 屬菌屬在鎘、鉻、銅、鎳、鋅

濃度最高之二仁溪樣點 2(R2)具有最高之豐度。

2.2 10-20 公分分層之樣品

圖 9 顯示在 10-20 公分分層之底泥中，與重金屬鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅正相關之菌屬有 14 屬，與汞正相關之菌屬則有 2 屬。另外列出經 pearson 相關性分析後與重金屬顯著相關之菌屬，交叉比對 CCA 與 pearson 結果後，與鉻、銅、鉛、鎳、鋅顯著正相關之菌屬有 13 屬且皆為相同菌屬，鎘為 14 屬，多出 *Bathyarchaeia_ge*，汞則無法篩選出共同菌屬。由圖 10 可以看出這 13 屬菌屬在鎘、鉻、銅、鎳、鋅濃度最高之二仁溪樣點 2(R2)具有最高之豐度。

2.3 20-30 公分分層之樣品

圖 11 顯示在 20-30 公分分層之底泥中，與重金屬鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅正相關之菌屬僅有 2 屬，與汞正相關之菌屬則有 5 屬。另外列出經 pearson 相關性分析後與重金屬顯著相關之菌屬，交叉比對 CCA 與 pearson 結果後，與鉻、銅、鎳、鋅皆顯著正相關之菌群有 2 屬，分別為 *Fusobacteriaceae_unclassified*、*Vibrio*，與汞顯著正相關之菌屬有 4 屬，為 *Oceanisphaera*、*Planococcaceae_unclassified*、*Pseudomonadaceae_unclassified*、*Shewanella*，另外並無法篩選出與鎘及鉛相關之菌屬。圖 12 顯示

Fusobacteriaceae_unclassified、*Vibrio* 在鉻、銅、鎳、鋅濃度最高之二仁溪樣點 1(R1)樣點具有最高之豐度，而圖 13 則可以看出 *Oceanisphaera*、*Planococcaceae_unclassified*、*Pseudomonadaceae_unclassified*、*Shewanella* 在汞濃度最高之鹽港溪樣點 2(B2)具有最高之豐度。

2.4 30-40 公分分層之樣品

圖 14 顯示在 30-40 公分分層之底泥中，與重金屬鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅正相關之菌屬有 11 屬，與汞正相關之菌屬則有 5 屬。另外列出經 pearson 相關性分析後與重金屬顯著相關之菌屬，交叉比對 CCA 與 pearson 結果後，與鎘顯著正相關之菌屬有 3 屬、鉻有 6 屬、銅 5 屬、鉛 5 屬、鎳 2 屬、鋅 6 屬，其中 *Acetothermia_ge*、*Napoli-4B-65_ge* 僅與鎘顯著正相關，*GIF9_ge*、*JS1_ge*、*Methanolinea* (Archaea)、*Methanosaeta* (Archaea)、*Odinarchaeia_ge* (Archaea)、*Smithella* 則與兩種重金屬以上顯著正相關，與汞顯著正相關則為 *Anaerolineae_unclassified*、*Dehalococcoidia_ge* 此 2 屬。圖 15 顯示出 *GIF9_ge*、*JS1_ge*、*Methanolinea*、*Methanosaeta*、*Odinarchaeia_ge*、*Smithella* 在鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅濃度最高之二仁溪樣點 2(R2)具有最高之豐度，而圖 16 則可看出

Anaerolineae_unclassified、*Dehalococcoidia_ge* 在汞濃度最高之客雅溪樣點 2(K2)具有最高之豐度。

2.5 40-50 公分分層之樣品

圖 17 顯示在 40-50 公分分層之底泥中，與重金屬鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅正相關之菌屬有 3 屬，與汞正相關之菌屬則無法篩選出來。另外列出經 pearson 相關性分析後與重金屬顯著相關之菌屬，交叉比對 CCA 與 pearson 結果後，與鎘顯著正相關之菌屬有 2 屬、鉻有 1 屬、銅 2 屬、鉛 1 屬、鎳 2 屬、鋅 2 屬，來自 *GIF9_ge*、*SCGC-AB-539-J10*、*vibrio* 這 3 種菌屬，汞則無共同菌屬。圖 18 顯示 *GIF9_ge*、*SCGC-AB-539-J10*、*vibrio* 在鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅濃度最高之二仁溪樣點 2(R2)具有最高之豐度，其中 *vibrio* 占相當高的比例 (44%)。

2.6 菌群與環境因子之綜合分析

綜合所有分層菌群組成及環境因子之典型關聯分析(CCA)結果，可以看出單就重金屬進行分析，或與所有環境因子一起分析，其 CCA 的結果都相同，顯示重金屬為此次實驗影響底泥菌群結構之主要因子，此外，由 CCA 的圖可以看出重金屬鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅之線段相當接近，同時表 5 皮爾森相關性分析結果也顯示這六種重金

屬彼此之間呈顯著正相關，也因此較難分析單一重金屬對於特定菌屬之影響。而汞則與這六種重金屬有不同之趨勢，若不考慮深度則篩選出主要差異菌屬為 *Oceanisphaera*、*Planococcaceae_unclassified*、*Pseudomonadaceae_unclassified*、*Shewanella*、*Anaerolineae_unclassified*、*Dehalococcoidia_ge* 等 6 屬。若將不同深度以鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅所能篩選出之菌屬進行統整，可以發現於不同深度重複出現之菌屬共有 8 屬，分別為 *Bacteroidetes_vadinHA17_ge*、*GIF9_ge*、*JS1_ge*、*Methanolinea* (Archaea)、*Methanosaeta* (Archaea)、*Odinarchaeia_ge* (Archaea)、*Smithella*、*Vibrio*，顯示這些菌屬較有可能生存於重金屬濃度較高之環境，可能具有鑑識的河口重金屬污染之潛力。

3. 使用改良 V4 region primer 對定序結果之影響

本次 16S rRNA 菌群分析使用改良的 V4 region primer，此 primer 主要的特色為對於環境中的古菌(archaea)偵測性較高。現今生物演化學將所有生物分為三域：細菌(Bacteria)、古菌(Archaea)及真核(Eukarya)域。古菌，亦稱為古細菌。雖然與真細菌(bacteria)同屬於原核生物，古菌與真細菌在細胞結構，生理生化，代謝行為乃至環境適應方面都有很大的差異。舉例來說，古細

菌的細胞壁結構大多為 pseudopeptidoglycan 而真細菌則以 peptidoglycan 以及多醣體為主。古菌的細胞膜結構較細菌穩定，且較為黏稠，使他們可以生長在高壓高熱以及厭氧的極端環境。另外，古菌往往較細菌能耐受較高濃度的重金屬。對於能量來源的利用，古菌多利用無機物質，例如硫，鐵或是氫氣當作電子捐贈者(能量來源)。圖 19 為不同樣品間不同界所占總 OTU 的比例，可以看出在重金屬濃度較高之二仁溪樣品，其 archaea 比例較高(8%~44%)，其中 R1 的 10-20 公分以及 R2 的 10-20 公分、20-30 公分、30-40 公分樣品，archaea 比例皆超過 35%；而 street1~5 則是去年(2018)「以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(2/2)」的結果，去年的計畫使用未改良的 V3-V4 region 的 primer，可以看出 archaea 所占比例相當低(僅 0.2%~3%)，與今年結果有相當大之差異，同時，今年透過多變量分析所篩選出最具有鑑識河口重金屬污染之潛力的 8 種菌屬 *Bacteroidetes_vadinHA17_ge*、*GIF9_ge*、*JS1_ge*、*Methanolinea*、*Methanosaeta*、*Odinarchaeia_ge*、*Smithella*、*Vibrio*，其中 3 屬 *Methanolinea*、*Methanosaeta*、*Odinarchaeia_ge* 即為古菌，顯示這些古菌可能具有較高的金屬耐受性，並可能在重金屬濃度高的環境下扮演不同的生化反應角色，也因此使用此改良

後的 V4 region primer 將給予我們更多環境菌群組成的資訊，以幫助我們了解實際環境的變化。

4. 底泥樣本之環境基因體分析結果

由於兩個樣區的銅離子濃度在底泥深度 10 到 20 公分的樣本之間差異最大，分別為 22(鹽港溪)及 487ppm(二仁溪)。因此我們針對鹽港溪以及二仁溪底泥深度 10 到 20 公分(分別採樣 2 樣品)的 4 個環境基因體樣本進行基因數量的差異性分析。分析結果，在此深度的鹽港溪底泥，在數量上有高達 71,831 個基因，其相對豐度顯著地比二仁溪相同深度的底泥多；而在二仁溪則只有 8,197 個基因在數量上是顯著性的高於鹽港溪。雖然鹽港溪以及二仁溪的底泥樣本有數萬個基因的相對豐度存在顯著差異，但值得注意的是，絕大多數的具有顯著數量差異的基因，並未與銅離子的吸收、排出、代謝或氧化功能有關；甚至與其它重金屬的吸收、排出與代謝功能亦無明顯相關性。這些基因多數與細菌的生存與複製有關，例如核酸、蛋白質、脂質或細胞壁結構的生合成、複製與調控，或用來進行無氧呼吸或發酵等基礎生理代謝。二仁溪底泥樣本的部分顯著基因與有機質的降解程序有關，此乃因為該樣區除了重金屬(例如鎘、鉻、銅)污染外，有機污染物濃度也顯著地比鹽港溪高出許多(總有機碳

含量 TOC(%)分別為 1.06%及 0.03%)。總而言之，這兩個樣區的底泥樣本，除了重金屬污染程度有明顯差異外，有機污染物的含量亦存在明顯差異。因此，兩個樣區底泥之間的微生物群落與功能基因相對豐度之差異，其成因相當複雜，可能也包含抗生素等有機污染物之抗性基因或降解基因[44]，不應全然歸因於重金屬(尤其是銅離子)含量之差異。

根據目前的微生物學研究，原核生物(主要為細菌與古菌)對抗環境中的高濃度銅離子(尤其是高毒性的一價銅(Cu(I))的抗性機制至少存在有下列 3 項：(I)使用依賴 ATP 的運輸蛋白質(CopA；亦稱為 P-type ATPase)來主動將銅離子送出細胞外 (Rensing and Grass, 2003)；(II) 使用反向運輸蛋白質(CusA；藉由吸收鈉鉀離子來將銅離子送出細胞外) [45]；以及(III) 使用位於膜間區(periplasmic space)的氧化酶(multicopper oxidase；包含 PcoA 及 CueO 兩種氧化酶)來將高毒性的一價銅離子氧化為二價銅 [45] [46] [47]。然而，這些研究都是使用大腸桿菌(*E. coli*)或丁香假單胞菌(*Pseudomonas syringae*) 等好氣或兼性好氣細菌等為人所熟知的模式微生物所獲致的研究成果，河口底泥的微生物群落幾乎都是由絕對厭氣的細菌或古菌占多數；這些厭氧微生物由於培養困

難，其抗銅機制與相關基因的研究付之闕如。針對台灣本土的河口底泥樣本，為了找出與銅離子抗性有明顯相關的功能性基因，我們將這些在數量上有顯著差異的基因，利用 NCBI RefSeq 的資料庫進行功能性註解 (gene annotation)，檢測銅離子相關的抗性基因是否在受到高濃度銅離子污染的二仁溪底泥 DNA 中，在數量上有顯著的差異。分析結果發現，僅有 19 個顯著基因(相對豐度有顯著增加)跟銅離子的抗性或代謝有關(表 6)。其中有 7 個被註解為 periplasmic copper-binding protein (NosD)，4 個為 PFAM periplasmic copper-binding，5 個為 copper-translocating P-type ATPase，2 個 multicopper oxidase，以及 1 個 copper amine oxidase。有趣的是，63%的基因(12/19)是來自古菌，其他基因分別屬於 Deltaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Firmicutes 以及 Chloroflexi 等細菌(表 6)。而這些基因在數量上，可以發現最多數的為 PFAM periplasmic copper-binding 基因，所有的該基因數量為 32.53 CPM，其次為 multicopper oxidase (1.54 CPM)，Periplasmic copper-binding protein (NosD) (1.50 CPM)，以及基因數最少的 copper amine oxidase (0.21)。其中，multicopper oxidase 與 copper-translocating P-type ATPase

明顯與銅離子的氧化以及排出細胞有關。這些受到高濃度銅污染的二仁溪底泥的顯著基因，分別來自古菌與細菌。結果顯示，底泥中的厭氧古菌及細菌偏好使用不同的機制來降低銅離子對細胞生理的危害。細菌傾向耗費 ATP 將銅離子排出細胞外，古菌則傾向將一價銅氧化為低毒性的二價銅。這些銅抗性基因可以優先作為可能的生物標誌分子(molecular biomarker)使用。Besaury et al. (2013) 針對智利海岸受銅污染(平均銅濃度為 1500ppm)的底泥之銅抗性基因進行 PCR 放大與定序，亦發現 CopA 運輸蛋白質(P-type ATPase)的相對豐度亦明顯高於反向運輸蛋白質(CusA) [48]。惟因為其設計的核酸引子是根據已知菌株(多屬於 betaproteobacteria 的脫硝菌)，因此放大的基因多來自同一細菌親源類型。使用環境基因體定序及分析技術的明顯優勢之一，即在於無須分離純化菌株或 PCR 放大，即可獲得其功能性基因的序列與表現量等資訊。透過這些方法，我們首先獲得了台灣本土受銅污染底泥的抗銅基因序列(個別 DNA 及胺基酸序列請參見附錄五)。

河口底泥由於帶有大量的含氮化合物，因此氮循環相關反應相當活躍。其中厭氧底泥常常進行脫硝反應[49]。該生物程序的最後一個反應是使用含銅酵素— N_2O 還原酶(nitrous oxide reductase)

來將 N_2O 進一步還原成氮氣。由於這個含銅酵素位於膜間區，因此為了將銅離子鍵結於這個酵素，需透過 periplasmic copper-binding protein (NosD) 或 PFAM periplasmic copper-binding protein 來進行銅離子與 N_2O 還原酶的鍵結與活化。這些 copper-binding protein 因此不屬於銅抗性基因，與銅離子的運輸與去毒無直接關係。微生物對銅離子的敏感性隨菌株有很大的差異。常見的模式菌株--大腸桿菌(*E. coli*)、枯草桿菌(*Bacillus subtilis*) 或丁香假單胞菌(*Pseudomonas syringae*) --的銅耐受濃度多數落在 10 ppm 以下[50]。這些微生物因此難以在二仁溪底泥長期生存。由於該處 10-20 公分深度的底泥呈現深黑色，其為鐵硫化合物，顯示該處長期處於未受擾動的缺氧狀態。我們可以合理推斷，該處的菌相結構穩定，且大多數的菌株多能適應該處的高濃度銅離子，進而利用銅做為輔酶因子來進行脫硝等無氧代謝行為。這可以解釋，何以二仁溪底泥中的 8,197 個顯著基因僅有 7 個基因(5 個為 copper-translocating P-type ATPase 及 2 個 multicopper oxidase)與銅抗性有直接相關(圖 20)。

值得注意的是，在低銅污染的鹽港溪河口底泥(該處 10-20 公分深度的底泥樣本之銅離子濃度為 22 ppm)，我們觀察到有高達 116

個顯著基因與銅污染的抗性以及代謝有相關（表七），而且這些抗銅基因絕大多數來自真細菌。其中高達 58%(67/116)的顯著基因為依賴 ATP 的 CopA 或類似的運輸蛋白質（亦稱為 P-type ATPase），其功能是主動將銅離子送出細胞外。這些 P-type ATPase 運輸蛋白質多來自於 delta-類群的變形菌門細菌(protobacteria)，以及無氧光合作用（anoxygenic phototrophs）的非硫綠細菌（green non-sulfur Chloroflexi），但是在該基因豐度上以來自於革蘭氏陽性菌 Firmicutes（CPM 17.02）為最多。另外，存在於鹽港溪河口底泥第二大類(27%； 31/116)的抗銅基因其基因產物為銅氧化酶（multicopper oxidase），用來將高毒性的一價銅離子氧化為二價銅。這些銅氧化酶基因都是來自於綠硫菌群 Bacteroidetes/Chlorobi。剩下的顯著基因也都與銅抗性有關，包括 copper resistance protein CopD(8%； 9/116)、copper chaperone(2%； 2/116)及銅運輸蛋白(copper ABC transporter permease； 3%； 3/116)（表七）。這些蛋白質都與保護細菌細胞免於受到銅離子(尤其是一價銅)的毒害有關。這樣也發現也反映出細菌在河口或海岸的厭氧底泥中大量存在，絕大多數為絕對厭氧菌，使用鐵或硫酸作為電子接受者，透過無氧呼吸來降解有機物[49]。

環境基因體學分析方法可行性

本計畫除了希望利用次世代定序找出與銅離子污染相關的菌群以及抗性基因，我們也針對 DNA 定序、定性（功能預測）及定量（個別基因之相對豐度）等新興環境體學方法的可行性進行討論。

首先，根據不同底泥的 DNA 含量以及品質，可以發現超過大部分靠近表層底泥（0 到 20 公分）的 DNA 含量以及品質都有合乎定序標準。DNA 濃度介於 10.1 到 67.2 納克/微升($\text{ng}/\mu\text{L}$)，而蛋白質（波長 260/280 的吸光值）以及有機質（260/230 的吸光值）的污染也偏低（附錄四）。但是隨著底泥的深度增加，DNA 含量有明顯減少的趨勢，DNA 的純度也偏低。次世代定序的優點之一，就是所需要的 DNA 濃度很低。根據美國 Illumina 公司的試劑以及定序技術，底泥的菌群結構，需要經由 PCR 放大 16S rRNA 片段上的變異區域 (hypervariable region)，並經由生物資訊分析以及資料庫的比對，來鑑定其中的多樣性以及數量，低濃度的 DNA 對此並無明顯影響。雖然環境基因體學定序 (metagenome sequencing) 的建庫 (library preparation) 所需要的 DNA 總量可以低至 1ng ，但是 DNA 的含量以及純度會影響建庫所用的試劑種類。Illumina 建庫的試劑種類有兩種，分別為 TruSeq DNA PCR-Free preparation kit

以及 Nextera Flex preparation kit。前者的優點在 DNA 建庫首先要進行的片段化 (fragmentation)，是物理性的，而且所產生的片段不需要經由 PCR 放大；但是缺點在於所需的 DNA 總量要高達 0.5 到 1 μg ；後者的優點在於所需的 DNA 總量只要 1ng，但是這個片段化的步驟需要 Illumina 專利的跳躍子 (transposome) 隨機的把 DNA 切斷，並且經由聚合酶連鎖反應(PCR)把片段放大到足夠的量。這兩個步驟都會對 DNA 本身的序列以及污染程度產生不可預期的偏差，導致在定序上有失真的可能性。不過由於這些樣區之底泥樣本的含量都達不到 TruSeq DNA PCR-Free preparation kit 的標準，因此選擇建庫的方式只有利用 Nextera Flex preparation kit 一途。

根據中央研究院生物多樣性研究中心之次世代核心實驗室的記錄，本計畫之細菌親源基因(16S amplicon)的定序大約費時 30 個工作天 (2019 年 7 月 24 日到 8 月 27 日)；而環境基因體的定序大約費時 60 天 (2019 年 6 月 4 日到 8 月 14 日)。以方法上來看，以次世代定序的方式去找出在銅離子或其他重金屬污染源相關的菌屬以及功能基因具有可行性；但是定序所需要的時間，以及龐大的資料量對於非電腦工程科系的學術單位，可能造成沈重負擔。此

外，環境基因體學分析目前難以應用於即時的分析。

結論

1. 底泥分析項目中，碳氮氫比例落在 0.34%到 2.72%不等，鹽港溪相較之下碳氮氫比例偏低，其餘採樣點則大多介於 1% ~ 2%之間；粒徑分析的部分，除二仁溪砂壤土比例較高外，其他採樣點的差異並不大，多以粉土及粉壤土為主；二仁溪的重金屬濃度與總有機碳比例分布相似。從重金屬濃度檢測可以得知，二仁溪的鎘濃度皆超標，且在 10-20 公分處出現最高值，二仁溪第一次採樣於 20-30 公分處其銅濃度超標，在同一採樣點，鉻、銅、鎳三個重金屬的表現在 20-30 公分處達到最高濃度，對照其元素分析，二仁溪第一次採樣的 20-30 公分處相較於其他採樣點有較高的碳氮氫比；第二次採樣於 10-20 公分處其鎘、鉻、銅、鎳、鉛、鋅皆超標，對照其元素分析，二仁溪第二次採樣的 10-20 公分處相較於其他採樣點有較高的碳氮氫比，總有機碳比例也最高，土壤種類與其他採樣點不同，以砂壤土為主；另二仁溪第二次採樣的深度 40-50 公分處銅、鎳、鋅皆超標，30-40 公分處鉛濃度超標。鹽港溪在鉻、鎳、鉛、鋅的趨勢一致，其重金屬濃度隨著深度加深而降低，客雅溪在鉻濃度的表現

則是隨著深度而增加。重金屬汞以三姓公溪表面所測得最高濃度，其餘重金屬以二仁溪 10-20 公分處測得最高濃度；皮爾森相關性分析結果(表 5)也顯示導電度及氯離子對於重金屬濃度並無顯著關聯，而鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅等六種重金屬彼此呈顯著相關。

2. 基於 Bray-Curtis 距離之主座標分析，其中客雅溪代號 K、三姓公溪代號 T、鹽港溪代號 B、二仁溪代號 R，可以看出 R1、R2 之底層樣點之菌群組成較為相似，皆聚集於 PCoA 圖的右上部，其餘樣點分布則較無規律，若將同一深度之樣點以 95%信心水準之橢圓作圖，可以看出不同深度並不會有明顯之分群，這顯示在考慮不同物種組成及豐度的情況下，所有樣點間不同深度的樣品並無明顯的差異。若將不同樣點之樣品以 95%信心水準之橢圓作圖，則可以看出 R1、R2 與 K1、K2、B1、B2、T1、T2 明顯分為兩群，這顯示 R1、R2(重金屬濃度高)的物種組成及豐度與 K1、K2、B1、B2、T1、T2(重金屬濃度低)有所差異。
3. 綜合所有分層之菌群組成及環境因子之典型關聯分析(CCA)結果，可以看出單就重金屬進行分析，或與所有環境因子一起分析，其 CCA 的結果都相同，顯示重金屬為此次實驗影響底泥菌群結構之主要因子。

4. 由菌群組成及環境因子之典型關聯分析(CCA)結果的圖可以看出重金屬鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅之線段相當接近，皮爾森相關性分析也顯示重金屬鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅彼此皆呈顯著正相關(表5)，也因此較難分析單一重金屬對於特定菌屬之影響。汞與這六種重金屬有不同之趨勢，若不考慮深度則篩選出主要差異菌屬為 *Oceanisphaera*、*Planococcaceae_unclassified*、*Pseudomonadaceae_unclassified*、*Shewanella*、*Anaerolineae_unclassified*、*Dehalococcoidia_ge* 等 6 屬。
5. *Bacteroidetes_vadinHA17_ge*、*GIF9_ge*、*JS1_ge*、*Methanolinea* (Archaea)、*Methanosaeta* (Archaea)、*Odinarchaeia_ge* (Archaea)、*Smithella*、*Vibrio* 等 8 種菌屬在經由鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅篩選下，重複於不同深度出現，顯示這些菌屬較有可能生存於重金屬濃度較高之環境，可能具有鑑識的河口重金屬污染之潛力。
6. 如同預期，利用環境基因體技術來定序並分析底泥樣本中的 DNA，我們確實可以獲得銅抗性基因的序列。這些序列大多數來自尚有待分離培養的絕對厭氧細菌或古菌。這些銅抗性基因主要來自兩個類群：銅輸出蛋白 P-type ATPase 及銅氧化酶 multicopper oxidase。顯示受污染河口的微生物，包括細菌與古菌，主要透過去毒(將一

價銅氧化成低毒性的二價銅)以及銅離子輸出機制來降低銅離子對細胞生理的負面影響。這些本土的銅抗性基因的序列將有助於設計專一性強且適合台灣本土環境的核酸引子，透過定量PCR(quantitative PCR)，我們可以獲得受污染場址的銅抗性基因的定量資訊。另外，輕微受污染場址的銅抗性基因幾乎都來自細菌，且其抗性基因的多樣性遠高於嚴重污染場址。未來也可以思考透過簡單的數學模式，比較古菌與細菌基因型多樣性作為指標，評估樣點受污染程度；或將這些抗性基因，尤其是銅輸出蛋白 P-type ATPase 及銅氧化酶 multicopper oxidase 的多樣性數字化，用以評估銅污染程度。

建議事項

1. 環境數據及微生物群落組成等，均不斷隨著時間改變。建議未來持續蒐集環境數據及微生物等相關資訊，以增加分析結果精確性。
2. 本計畫透過菌群分布及鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅等濃度篩選出 *Bacteroidetes_vadinHA17_ge*、*GIF9_ge*、*JS1_ge*、*Methanolinea*、*Methanosaeta*、*Odinarchaeia_ge*、*Smithella*、*Vibrio* 等 8 種菌屬，可供後續河口底泥污染進行微生物鑑識進行比較參考。
3. 透過底泥總體基因定序分析，獲得銅輸出蛋白 P-type ATPase 及銅

氧化酶 multicopper oxidase 等基因與銅濃度相關，另發現基因 diversity 與古菌、細菌之比例與污染程度相關，未來可能利用此數據建立數值化之鑑識指標。

圖表



圖 1 新竹出海口採樣點分布



圖 2 二仁溪出海口採樣點分布

表 1 客雅溪底泥重金屬含量(單位：mg/kg)

採樣點	深度	重金屬濃度 (mg/kg)及含水率(%)					
		鎘(Cd)		鉻(Cr)		銅(Cu)	
		①	②	①	②	①	②
客雅溪	0-10	1.18	1.27	42.16	43.21	40.34	45.41
	10-20	1.43	1.32	60.51	48.19	51.96	48.98
	20-30	1.46	1.39	60.65	55.02	46.57	96.00
	30-40	1.36	1.49	52.86	51.16	36.14	66.03
	40-50	1.41	1.36	49.12	46.93	26.50	62.62
採樣點	深度	汞(Hg)		鎳(Ni)		鉛(Pb)	
		①	②	①	②	①	②

客雅溪	0-10	14.50	13.65	26.30	28.11	54.06	53.12
	10-20	14.67	13.78	31.13	29.97	63.85	58.78
	20-30	14.39	14.07	32.02	32.88	64.44	60.61
	30-40	13.79	14.41	31.77	31.23	55.93	61.61
	40-50	13.77	14.16	28.50	29.27	58.77	58.04
採樣點	深度	鋅(Zn)		含水率 (%)			
		①	②	①	②		
客雅溪	0-10	90.32	99.55	1.63	1.23		
	10-20	113.35	110.96	1.76	1.76		
	20-30	112.73	121.90	1.79	1.79		
	30-40	97.78	115.72	0.98	1.87		
	40-50	88.80	108.97	0.88	2.89		

表 2 鹽港溪底泥重金屬含量(單位：mg/kg)

採樣點	深度	重金屬濃度 (mg/kg)及含水率(%)					
		鎘(Cd)		鉻(Cr)		銅(Cu)	
		①	②	①	②	①	②
鹽港溪	0-10	0.95	0.85	32.83	28.84	25.17	22.19
	10-20	0.74	0.95	28.31	31.00	20.22	24.08
	20-30	0.81	0.67	27.75	25.50	22.00	19.07
	30-40	0.49	x	12.49	x	10.52	x
	40-50	0.38	x	13.05	x	9.13	x
採樣點	深度	汞(Hg)		鎳(Ni)		鉛(Pb)	
		①	②	①	②	①	②
鹽港溪	0-10	13.15	14.2	21.50	19.53	39.39	34.69
	10-20	13.78	13.57	17.30	21.10	32.29	37.52
	20-30	13.93	16.94	18.35	17.55	32.53	30.96
	30-40	13.51	x	9.27	x	15.13	x
	40-50	13.72	x	9.20	x	16.63	x
採樣點	深度	鋅(Zn)		含水率 (%)			
		①	②	①	②		
鹽港溪	0-10	87.26	74.16	3.35	3.66		
	10-20	67.27	77.94	3.40	2.91		
	20-30	76.82	64.37	4.20	3.81		
	30-40	45.18	x	2.02	x		

	40-50	41.51	x	4.03	x
--	-------	-------	---	------	---

表 3 三姓公溪底泥重金屬含量(單位：mg/kg)

採樣點	深度	重金屬濃度 (mg/kg)及含水率(%)					
		鎘(Cd)		鉻(Cr)		銅(Cu)	
		①	②	①	②	①	②
三姓公溪	0-10	1.60	1.65	58.80	59.57	51.91	58.74
	10-20	1.66	1.45	60.37	53.88	50.65	49.51
	20-30	1.71	1.12	51.17	40.74	36.47	101.73
採樣點	深度	汞(Hg)		鎳(Ni)		鉛(Pb)	
		①	②	①	②	①	②
三姓公溪	0-10	23.62	15.88	36.72	35.02	66.44	66.05
	10-20	17.17	15.47	34.64	35.53	67.44	59.90
	20-30	15.06	14.69	35.50	27.20	53.29	46.73
採樣點	深度	鋅(Zn)		含水率 (%)			
		①	②	①	②		
三姓公溪	0-10	153.98	146.72	2.50	2.38		
	10-20	140.11	141.30	3.24	2.46		
	20-30	116.25	123.64	0.83	1.45		

表 4 二仁溪底泥重金屬含量(單位：mg/kg)

採樣點	深度	重金屬濃度 (mg/kg)及含水率(%)					
		鎘(Cd)		鉻(Cr)		銅(Cu)	
		①	②	①	②	①	②
二仁溪	0-10	4.59	4.66	80.16	143.66	111.05	207.06
	10-20	4.47	6.92	74.39	438.04	147.97	826.20
	20-30	4.92	5.31	175.29	117.00	261.54	127.79
	30-40	4.32	5.16	56.60	149.14	59.37	190.24
	40-50	4.38	5.63	54.24	175.99	134.82	403.07
採樣點	深度	汞(Hg)		鎳(Ni)		鉛(Pb)	
		①	②	①	②	①	②
二仁溪	0-10	14.96	13.93	46.65	92.97	79.77	94.40
	10-20	14.47	13.91	46.00	238.86	105.86	430.27
	20-30	13.69	13.95	79.49	62.51	121.98	112.54
	30-40	14.21	13.79	32.82	63.48	50.53	184.24
	40-50	14.46	13.89	37.41	84.81	62.83	151.01

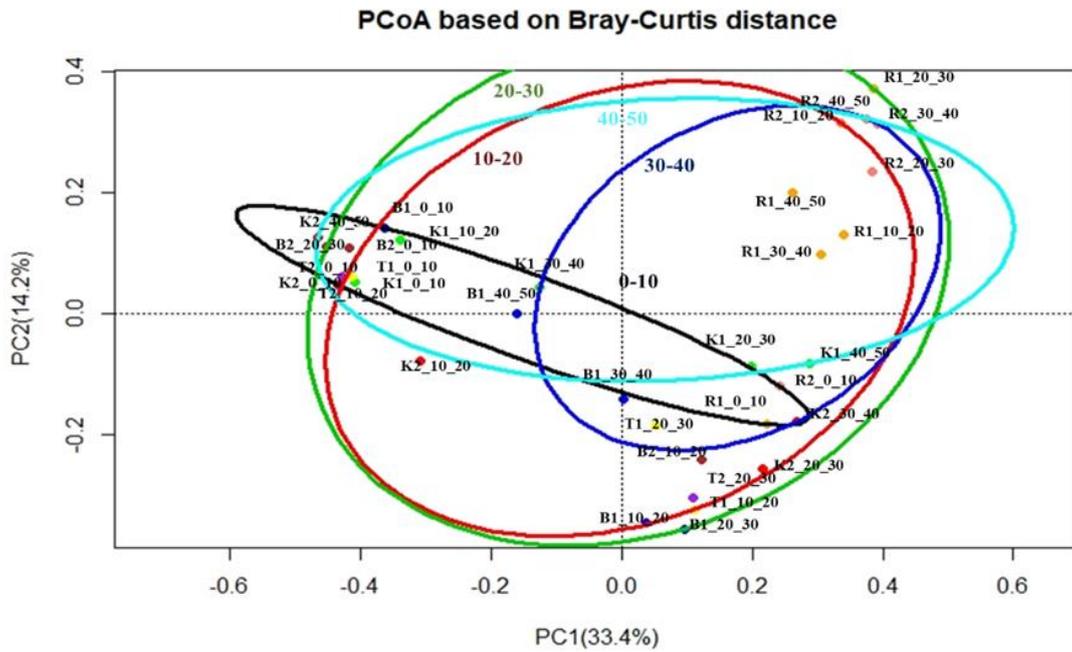
採樣點	深度	鋅(Zn)		含水率 (%)	
		①	②	①	②
二仁溪	0-10	165.87	256.96	0.81	1.20
	10-20	224.96	863.44	1.11	5.16
	20-30	356.26	205.64	1.82	3.12
	30-40	108.92	311.39	1.62	3.17
	40-50	215.00	490.37	1.50	2.38

表 5 重金屬與其他環境因子之皮爾森相關性分析

	Hg	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	TOC	pH	ec	C	N	H	Cl	sand	silt	clay
Hg	1	-0.122	-0.096	-0.124	-0.076	-0.074	-0.069	-0.221	-0.095	0.2	0.316	0.323	0.235	0.077	-0.204	0.205	0.186
Cd	-0.122	1	.785**	.769**	.762**	.751**	.807**	.735**	.820**	-0.18	.343*	.512**	0.125	-0.207	0.125	-0.107	-0.325
Cr	-0.096	.785**	1	.974**	.990**	.977**	.977**	.727**	.453**	-0.107	.575**	.643**	0.33	0.044	-0.069	0.083	-0.09
Cu	-0.124	.769**	.974**	1	.969**	.954**	.989**	.719**	.447**	-0.163	.482**	.549**	0.229	0.036	0.04	-0.026	-0.196
Ni	-0.076	.762**	.990**	.969**	1	.966**	.963**	.720**	.420*	-0.106	.569**	.632**	0.314	0.056	-0.047	0.06	-0.104
Pb	-0.074	.751**	.977**	.954**	.966**	1	.960**	.719**	.435*	-0.074	.601**	.663**	.377*	0.09	-0.138	0.151	-0.024
Zn	-0.069	.807**	.977**	.989**	.963**	.960**	1	.703**	.492**	-0.148	.523**	.608**	0.265	0.004	-0.004	0.019	-0.166

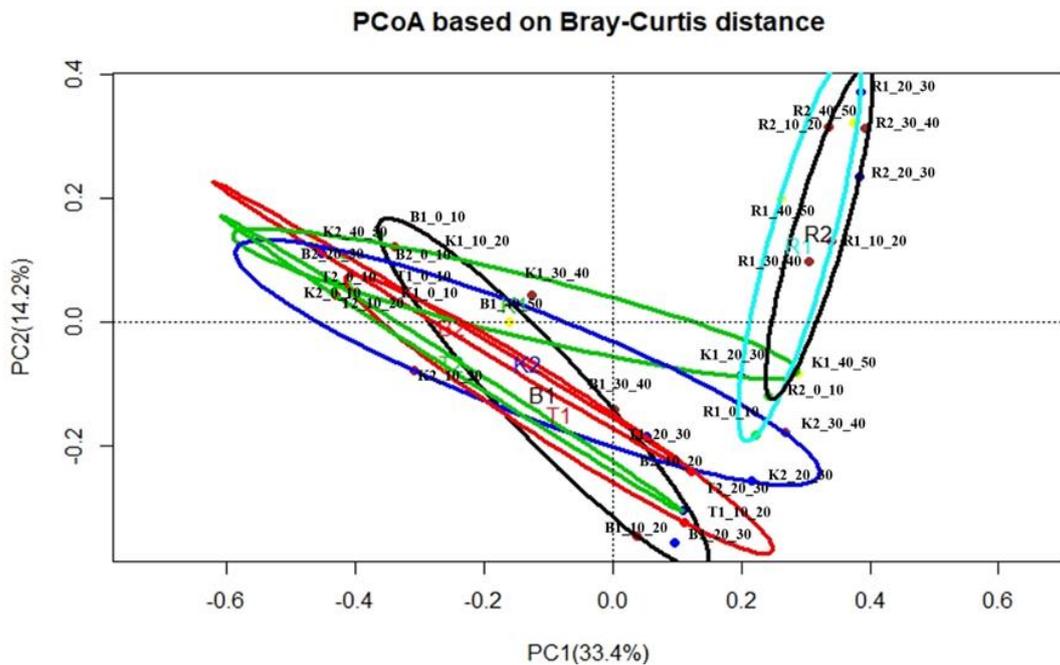
* 相關性在 0.05 層級上顯著 (雙尾)

** 相關性在 0.01 層級上顯著 (雙尾)



(註: 橫座標表第一主成分, 縱座標表第二主成分; 每個深度樣本平均值以 95%常態信心橢圓的中心標示, 圖中每個點代表一個樣品, 同一個樣點樣品使用同種顏色表示。)

圖 5 河口底泥樣品之主座標分析 (Principal Co-ordinates Analysis) 結果



(註: 橫座標表第一主成分, 縱座標表第二主成分; 每個樣點樣本平均值以 95%常態信心橢圓的中心標示, 圖中每個點代表一個樣品, 同一個深度樣品使用同種顏色表示。)

圖 6 河口底泥樣品之主座標分析 (Principal Co-ordinates Analysis) 結果

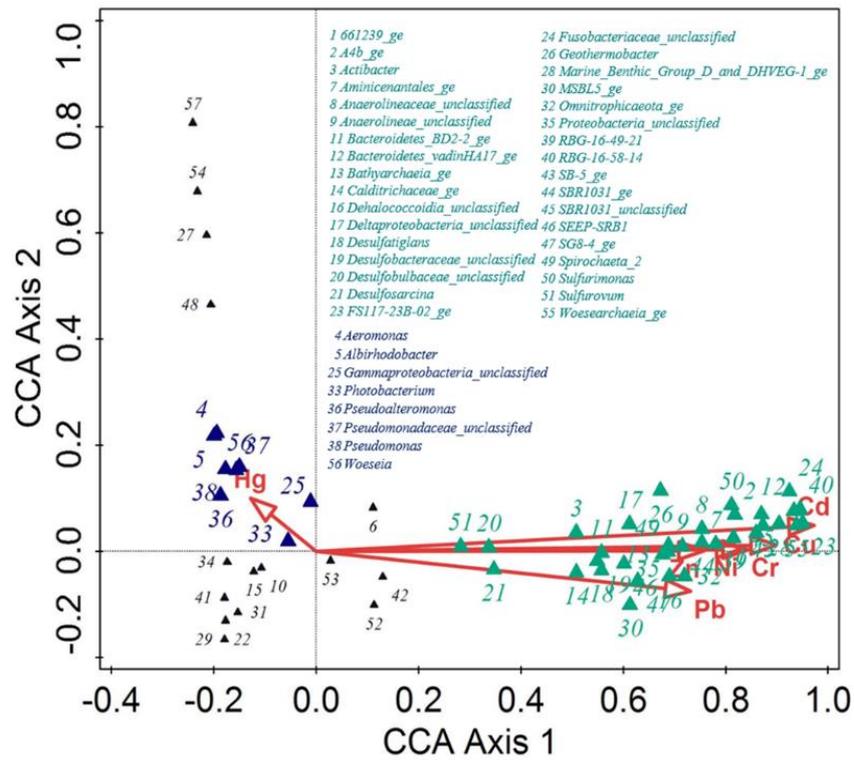


圖 7 河口 0-10 公分底泥樣品之菌屬受不同重金屬條件影響之典型關聯分析 (canonical correspondence analysis, CCA) 結果

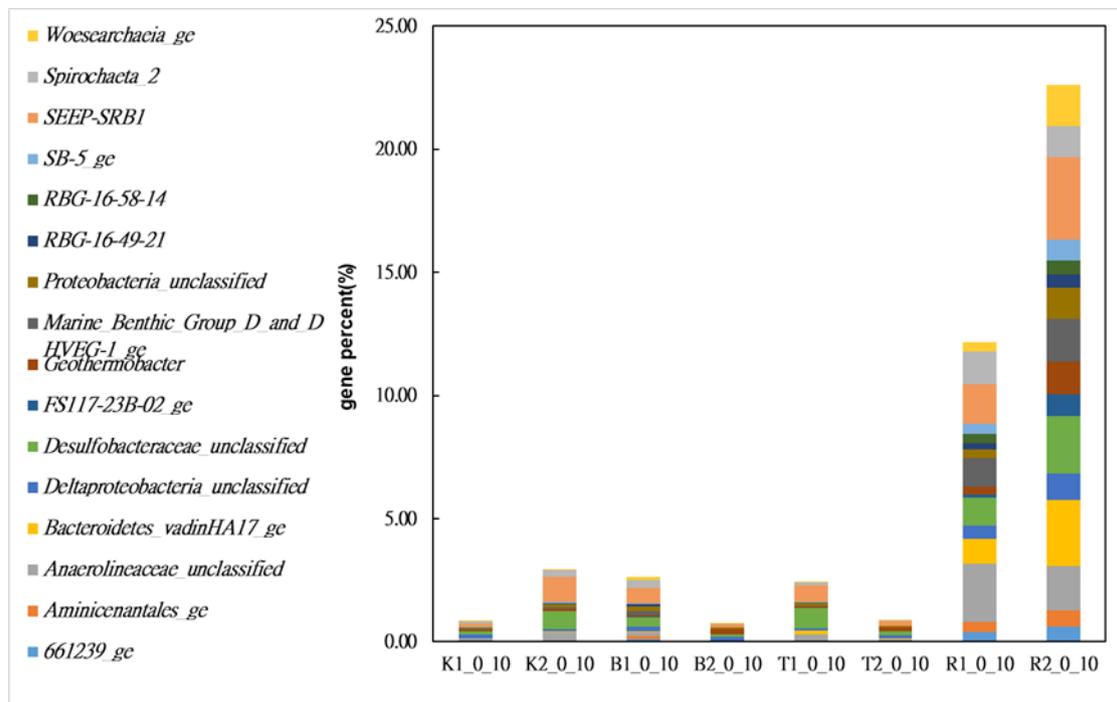


圖 8 0-10 公分選定與鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅相關之 16 屬菌屬於不同樣點所占總數之百分比

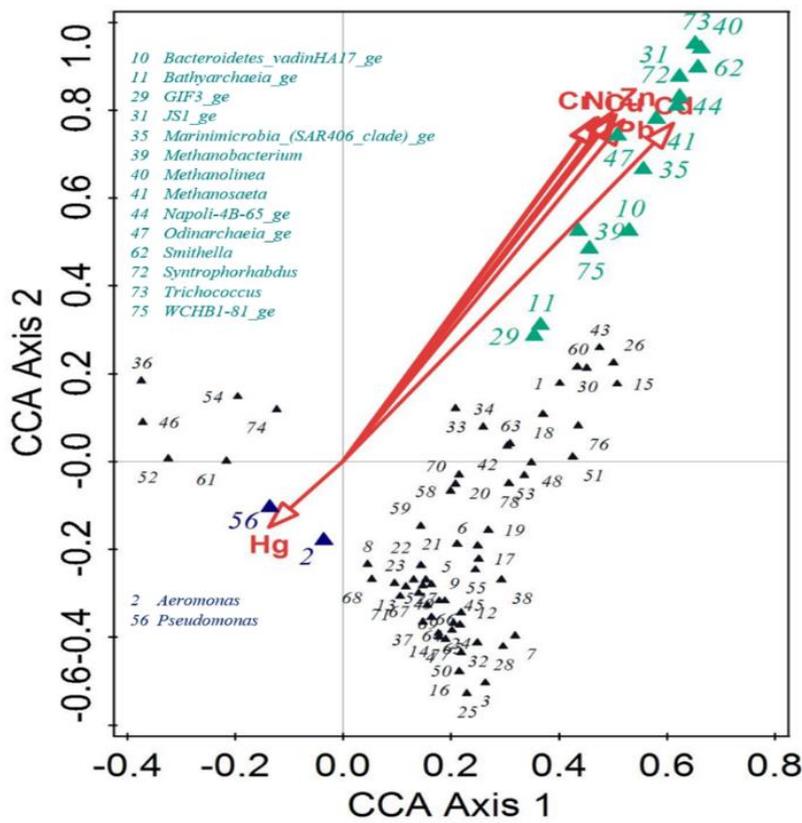


圖 9 河口 10-20 公分底泥樣品之菌屬受不同重金屬條件影響之典型關聯分析 (canonical correspondence analysis, CCA) 結果

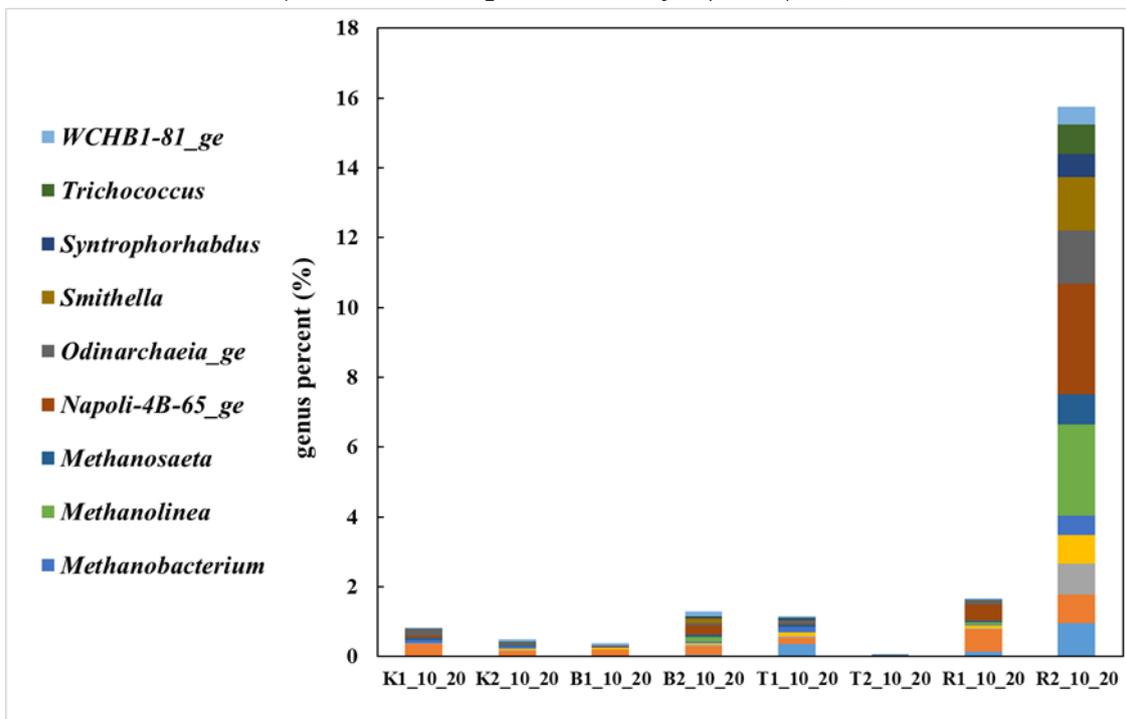


圖 10 10-20 公分選定與鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅相關之 13 屬菌屬於不同樣點所占總數之百分比

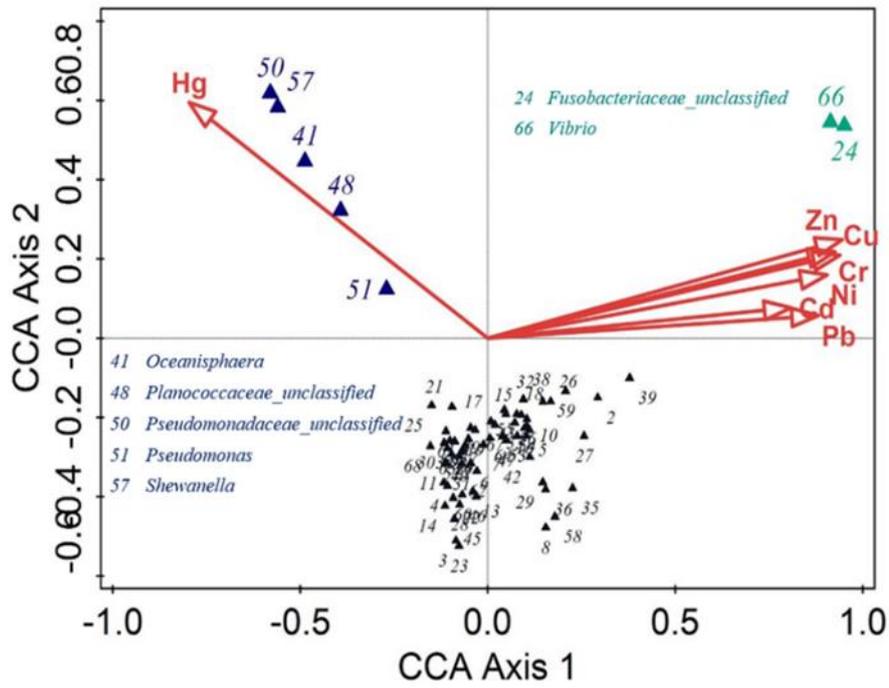


圖 11 河口 20-30 公分底泥樣品之菌屬受不同重金屬條件影響之典型關聯分析 (canonical correspondence analysis, CCA)結果

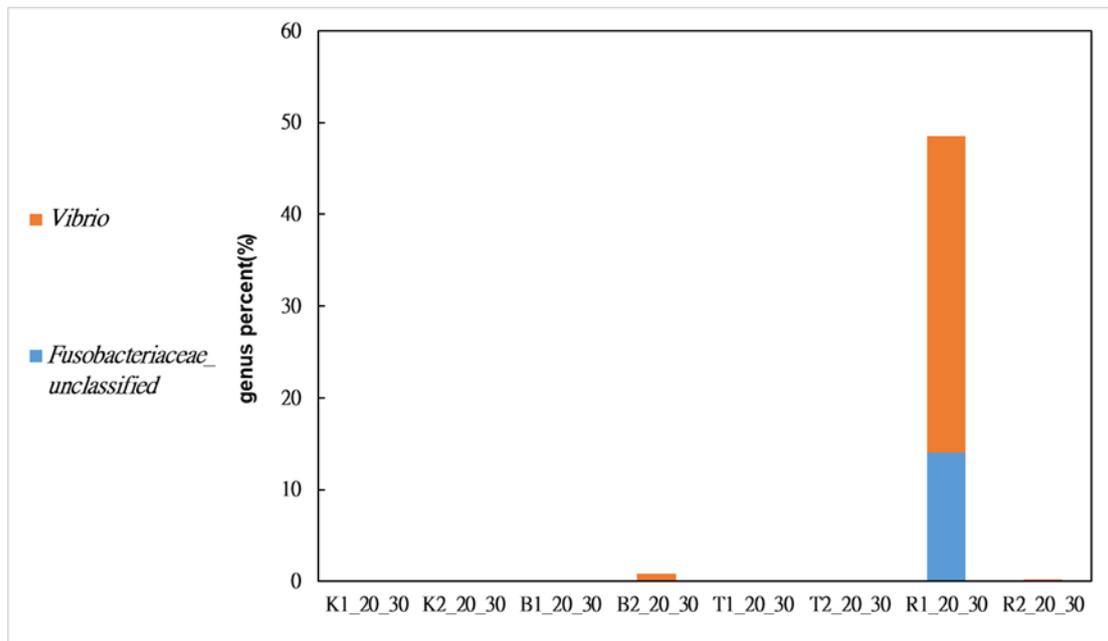


圖 12 20-30 公分選定與鎘、銅、鎳、鋅相關之 2 屬菌屬於不同樣點所占總數之百分比

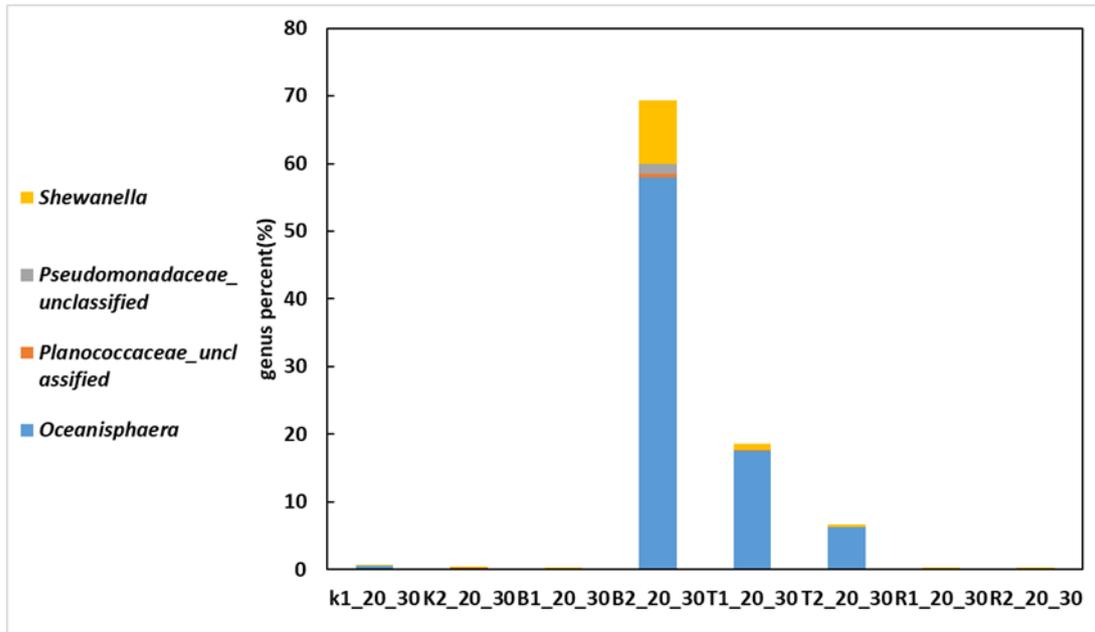


圖 13 20-30 公分選定與汞相關 4 屬菌屬於不同樣點所占總數之百分比

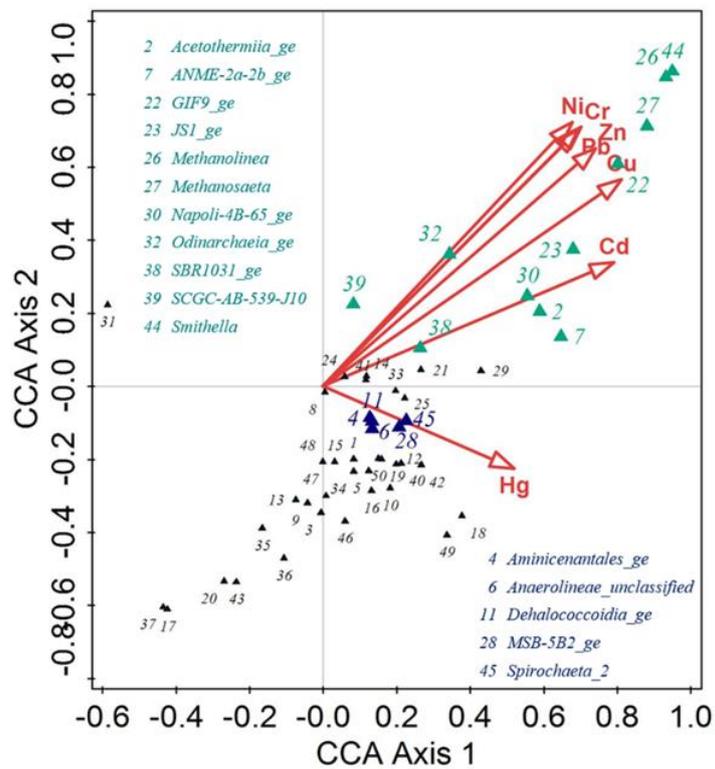


圖 14 河口 30-40 公分底泥樣品之菌屬受不同重金屬條件影響之典型關聯分析 (canonical correspondence analysis, CCA)結果

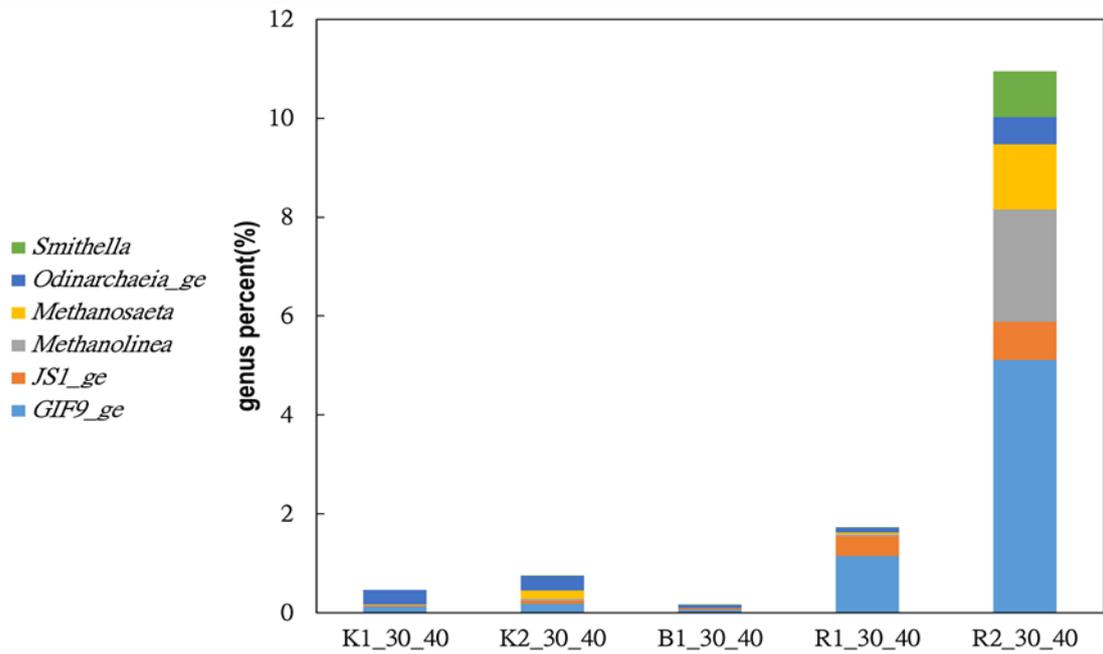


圖 15 30-40 公分選定與鎳、鉻、銅、鉛、鎳、鋅相關 4 屬菌屬於不同樣點所占總數之百分比

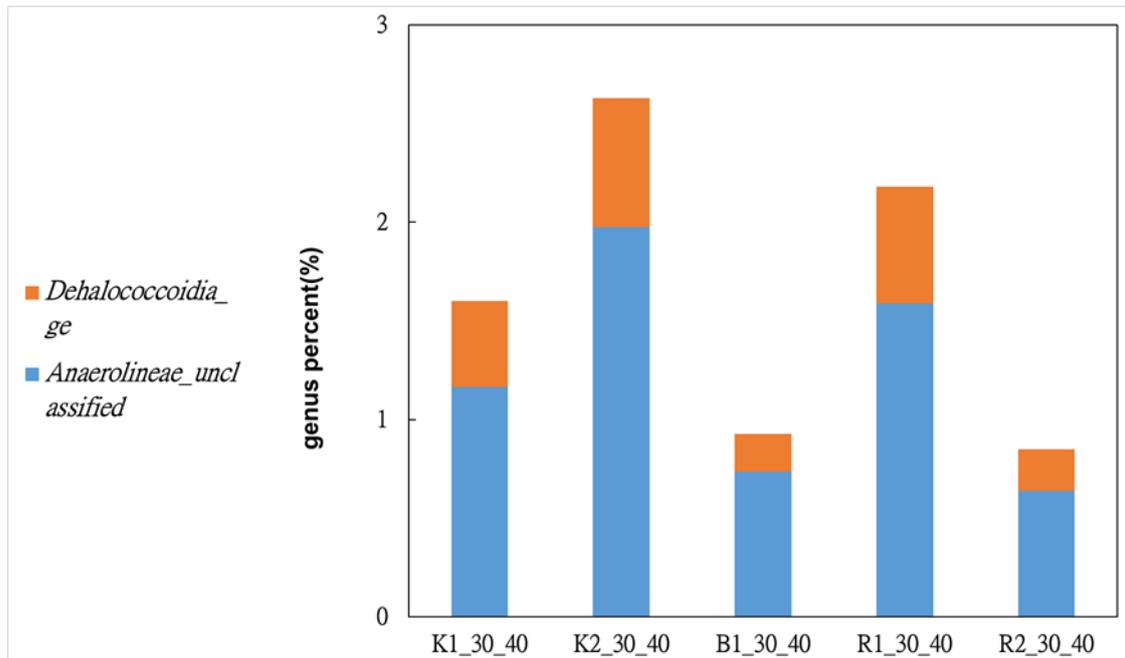


圖 16 30-40 公分選定與汞相關 2 屬菌屬於不同樣點所占總數之百分比

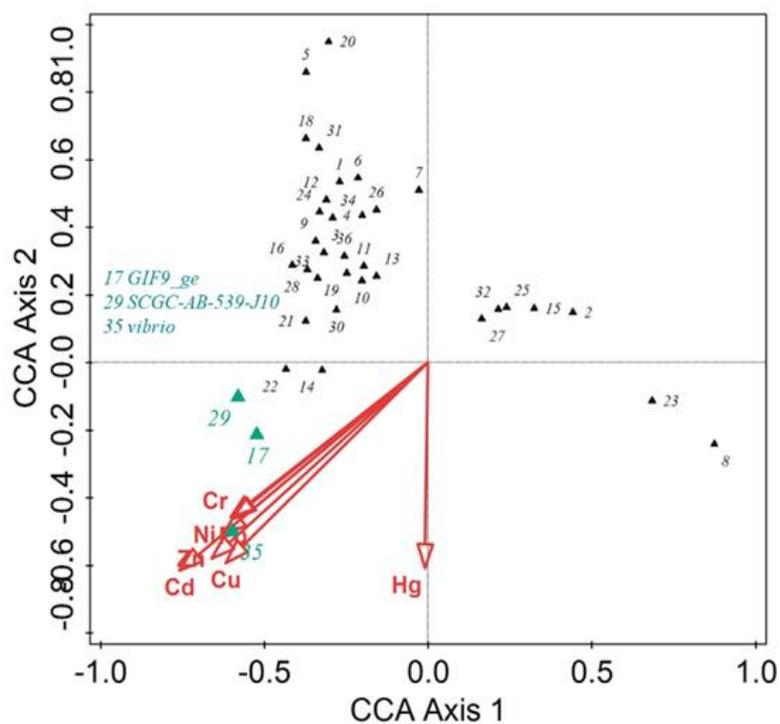


圖 17 河口 40-50 公分底泥樣品之菌屬受不同重金屬條件影響之典型關聯分析 (canonical correspondence analysis, CCA)結果

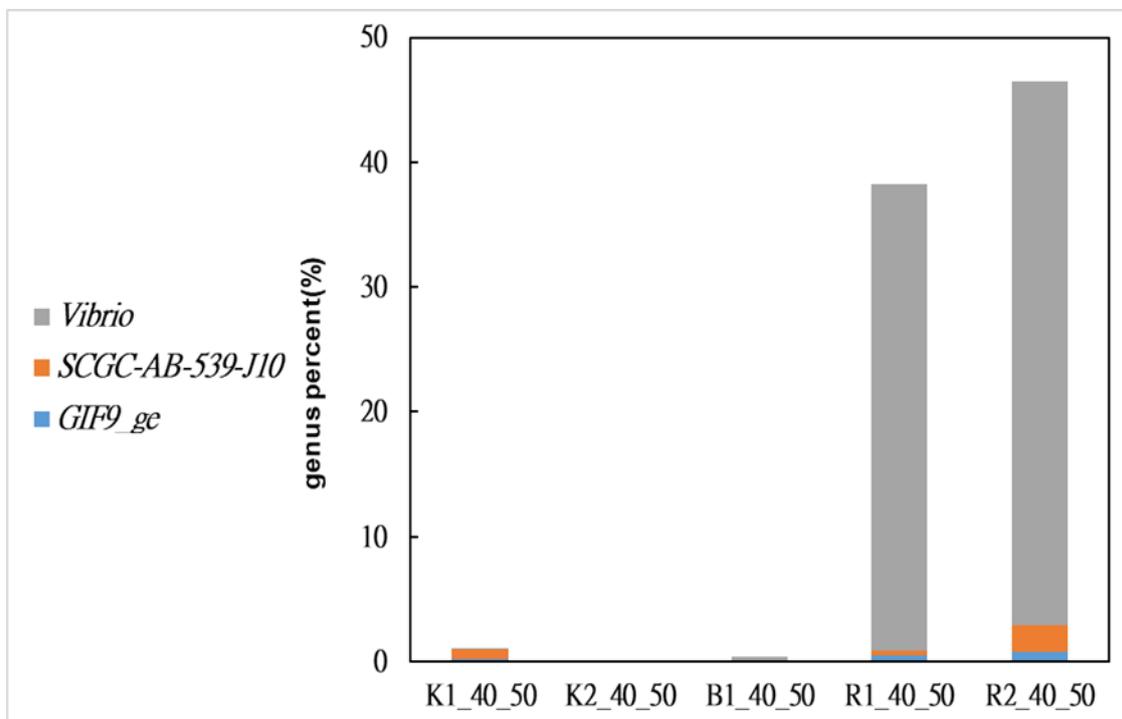


圖 18 40-50 公分選定與鎳、鉻、銅、鉛、鎘、鋅相關 4 屬菌屬於不同樣點所占總數之百分比

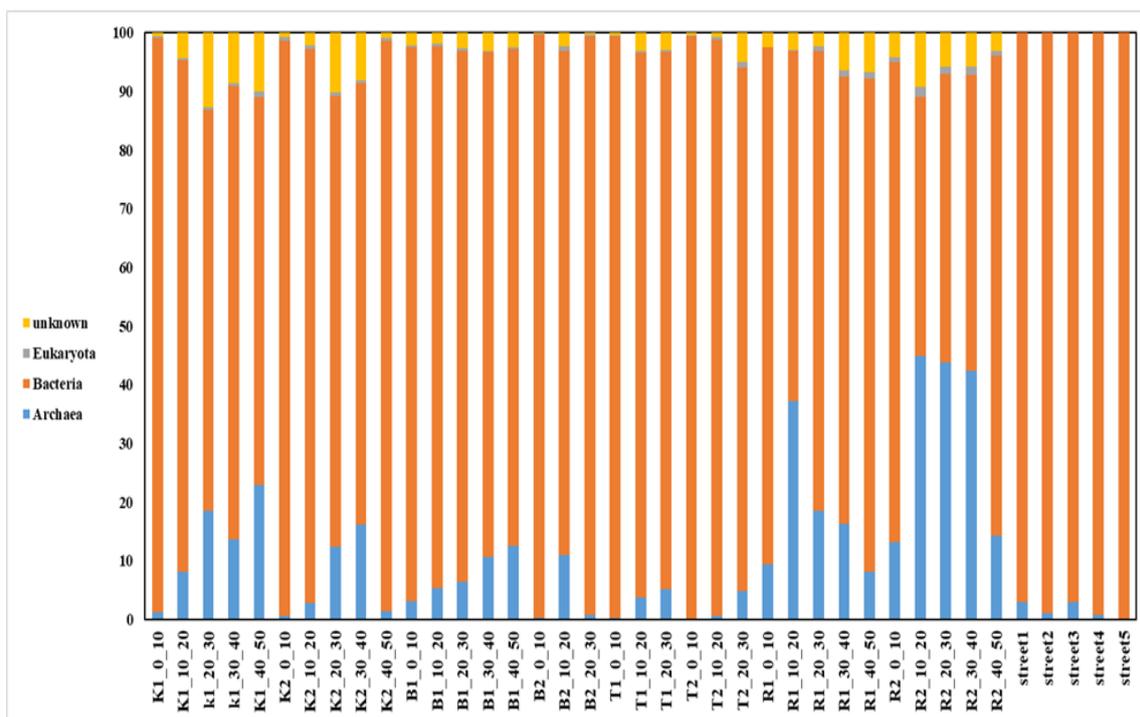


圖 19 不同樣品間不同界所占總 OTU 之比例

表 6 二仁溪 10-20 公分底泥中，與銅離子抗性以及代謝相關的基因

Gene ID	Annotation	Taxonomic group	Expect value	CPM
k127_35775783_2	Multicopper oxidase	Euryarchaeota (Archaea)	4.1e-140	1.50103183
k127_3607561_3	Multicopper oxidase	Thermoanaerobacterales	6e-58	0.04371482
k127_3557623_2	Periplasmic copper-binding protein (NosD)	Archaea	9.2e-75	0.039060157
k127_46824643_1	Periplasmic copper-binding protein (NosD)	Archaea	2.3e-34	0.080092222
k127_36685908_2	Periplasmic copper-binding protein (NosD)	Euryarchaeota (Archaea)	4.2e-08	0.023860539
k127_54595033_1	Periplasmic copper-binding protein (NosD)	Euryarchaeota (Archaea)	2.2e-43	0.729211463
k127_2197912_2	Periplasmic copper-binding protein (NosD)	Euryarchaeota (Archaea)	3.3e-47	0.289454233
k127_10962460_1	Periplasmic copper-binding protein (NosD)	Euryarchaeota (Archaea)	7.3e-10	0.039060157
k127_32995086_32	Periplasmic copper-binding protein (NosD)	Gammaproteobacteria	3.4e-205	0.222985787
k127_22957812_3	PFAM periplasmic copper-binding	Bacteria	1.6e-11	0.63035102
k127_40153518_4	PFAM periplasmic copper-binding	Euryarchaeota (Archaea)	1.9e-10	0.144500773
k127_14323367_3	PFAM periplasmic copper-binding	Euryarchaeota (Archaea)	2.1e-06	31.73475637
k127_21372085_4	PFAM periplasmic copper-binding	Euryarchaeota (Archaea)	7.7e-07	0.023860539
k127_540026_4	Copper amine oxidase	Euryarchaeota (Archaea)	1.80e-40	0.20822628
k127_5217671_1	Copper-translocating P-type ATPase	Deltaproteobacteria	6.60E-232	0.072938833

k127_40935517_12	Copper-translocating P-type ATPase	Chloroflexi	1.20E-256	0.133638075
k127_4711859_12	Copper-translocating P-type ATPase	Chloroflexi	4.40E-285	1.000583609
k127_28254005_5	Copper-translocating P-type ATPase	Gammaproteobacteria	2.30E-233	0.023860539
k127_14914590_1	Copper-translocating P-type ATPase	Firmicutes	5.50E-205	0.039060157

表 7 低銅污染的鹽港溪河口底泥中所發現的銅抗性以及代謝相關的基因

Function	Taxonomy	Number of genes	CPM
Copper amine oxidase	Firmicutes	2	0.83
Copper chaperone	Chloroflexi	2	0.11
Copper ABC transporter permease	Chloroflexi	3	0.46
Copper-binding protein	Thaumarchaeota (Archaea)	2	0.14
Copper resistance CopD protein	Thaumarchaeota (Archaea)	4	0.25
	Gammaproteobacteria	1	1.21
	Alphaproteobacteria	2	0.85
	Actinobacteria	1	0.02
Copper-translocating P-type ATPase	Acidithiobacillus	2	0.09
	Actinobacteria	3	4.84
	Alphaproteobacteria	2	0.08
	Aquificae	1	0.09
	Bacteroidetes/Chlorobi	6	9.56
	Bathyarchaeota (Archaea)	1	0.10
	Betaproteobacteria	3	5.53
	Candidatus Bipolaricaulis	1	1.14
	Chloroflexi	17	10.10
	Deltaproteobacteria	11	2.15
	Firmicutes	7	17.02
	Gammaproteobacteria	6	2.53
	Haloplasmatales	1	0.09
	Nitrospinae/Tectomicrobia	1	2.16
	Nitrospirae	4	0.31
Sulfuricaulis	1	0.49	
Multicopper oxidase	Actinobacteria	4	0.41
	Alphaproteobacteria	5	0.37
	Bacteroidetes/Chlorobi	11	5.54

Betaproteobacteria	1	0.03
Chloroflexi	3	2.00
Deltaproteobacteria	1	0.18
Firmicutes	2	0.43
Gammaproteobacteria	5	0.31

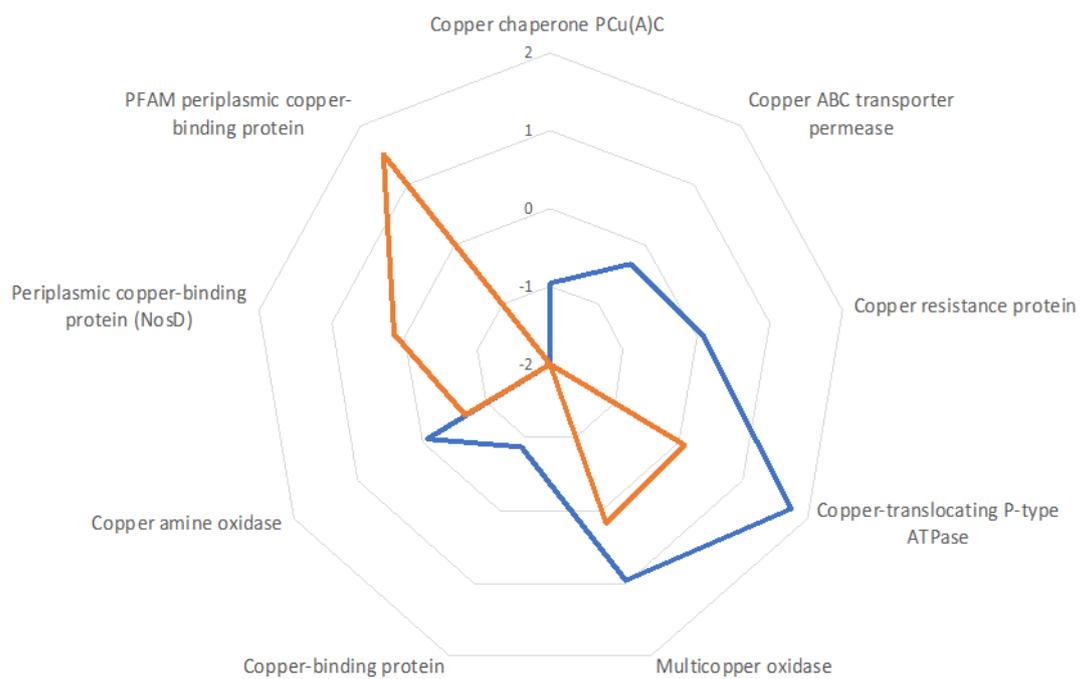


圖 20 鹽港溪（藍色）及二仁溪（橘色）底泥中，銅離子抗性以及代謝相關的基因種類以及數量 (log CPM)。

第一章 前言

1.1 計畫緣起

隨著現今化學工業科技的蓬勃發展，人類使用化學產品日漸普遍，雖帶來不少的便利，但後續也造成許多的天然災害及環境污染。其中，工廠不當排放廢水，造成重金屬及有機污染物進入自然水體的案件層出不窮，尤其是重金屬，無論是短期超標排放或長期低濃度排放都可能在水域底泥累積，可能衍生出許多生態環境問題，甚至有可能對人類健康構成嚴重風險。

一般而言，環保單位對於重金屬的檢測方式以水體檢測為主，不過由於檢測頻率不高，加上污染物排放時間並非固定，許多不肖工廠常利用夜間或雨季違法排放，使檢測水體無法有效反映環境真實污染程度，不過即便如此，重金屬也不會從環境中消失，沉積於出海口之底泥為河川長期累積沖刷而成，底泥對重金屬具有沉澱、吸附與錯合作用進而使其移動性降低，因此河口底泥中重金屬的演變可以反映出一個地區的地質化學歷史及所有人為污染，對於河口底泥垂直剖面的研究也成為重建重金屬污染歷史的有效工具。

此外，河口底泥中的微生物被視為地球物質循環的重要一部分，其對於底泥中碳、氮、磷、硫等基本元素，以及許多金屬於河口生態系統裡的循環具有強烈的調節作用，同時，微生物群落對環境變化非常敏感，會隨著不同環境因子而改變群落中微生物的組成結構或是產生功能性基因改變，因此常常被當做為環境指標。隨著次世代定序技術越趨成熟，資料庫越趨完備，不論是透過 16S-rRNA gene amplicon sequencing 或是 whole genome shotgun sequencing 等分析方式，都逐漸開始應用於環境方面的研究。因此，藉由次世代定序的幫助，了解微生物群落為了因應環境因素所產生的變化，以及這些變化在河口生態系統內的分佈，對於管理河口生態系統及其上、中游的污染行為追溯幫助甚大。

綜合以上，本計畫主要目標為透過採集不同深度之河口底泥(客雅溪、三姓公溪、鹽港溪、二仁溪)，分析各深度之重金屬濃度及微生物群落、功能性基因變化，建立彼此之相關性，並評估以次世代定序技術分析微生物群落變化應用於河川歷史污染鑑識技術的可行性。

1.2 計畫目標

本計畫預計目標如下：

1. 建構國內河口環境微生物體學及重金屬濃度背景資料。
2. 評估長期重金屬污染物在底泥中累積量與底泥微生物菌相組成差異。利用微生物菌相差異找尋主要受污染物影響之菌群。
3. 透過各深度底泥功能性基因之消長變化，分析其與河川污染源之關聯與追溯性。

1.2.1 計畫工作內容

1. 選取代表性河口，於河岸採取不同深度底泥，分別萃取總核酸進行次世代定序及消化分析重金屬含量，並交叉比對重金屬含量及微生物體。
 - (1). 選取於客雅溪口、三姓公溪口、鹽港溪口及二仁溪口沉積底泥樣點，採取底泥樣品並分層分析底泥中各式重金屬含量，並分析底泥物理顆粒組成特性。
2. 以相關性分析建立可能受重金屬累積影響較大的微生物族群。
 - (1). 以微生物體學方式，分析 16S rRNA 序列分析各分層中微生物體組成。
 - (2). 比較不同分層中環境因子與菌相差異之關聯性。
3. 以微生物系統發生學資料，評估菌群之總體代謝表現，並比較相對應底泥重金

屬濃度，評估底泥重金屬污染累積對於微生物菌群代謝表現之影響可能性。

- (1). 以微生物基因體學方式，利用 shotgun sequencing 分析不同深度底泥微生物基因體組成。
- (2). 比較不同分層中環境因子與微生物基因體之關聯性，並評估以此差異作為污染歷史辨識之可能性。

1.2.2 計畫執行進度及成效

表 1-1 計畫預定進度

預定進度(以甘特圖表示)											
工作內容項目	月次	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	年別	108	108	108	108	108	108	108	108	108	108
	月份	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. 蒐集國內外河口底泥微生物分層基因表現分析相關文獻。											
2. 採集河口底泥樣品，底泥分層物化特性分析。											
3. 底泥分層萃取總核酸並進行次世代定序(16S-rRNA amplicon sequencing & whole shotgun sequencing)											
4. 定序結果分析，建立微生物體與底泥環境物化特性關聯性。											
5. 完成研究報告 1 件。											
預定進度累積百分比 (%)		6	10	16	28	30	35	45	79	95	100
查核點	預定完成時間	查核點內容說明									
第一次工作報告	108 年 5 月	蒐集國內外文獻，並進一步整理成簡報，完成採樣及送定序									
期中報告	108 年 8 月	完成現地樣品物化分析									
期末報告	108 年 11 月	解析總基因體變化及菌群變化									
結案	108 年 12 月	完成結案報告									

表 1-2 本計畫預期目標及目前執行成效

契約書之預定進度累積百分比 (%)		100%			實際執行 進度 (%)	100%	
工作內容項目	實際執行情形	差異分析 (打✓)			落後原因	困難檢 討及對 策	預計改 善完成 日期
		符合	落後	超前			
蒐集國內外河口底泥微生物分層基因表現分析相關文獻。	已整理於文獻回顧	✓					
採集河口底泥樣品，底泥分層物化特性分析。	底泥物化分析已全部完成	✓					
底泥分層萃取總核酸並進行次世代定序 (16S-rRNA amplicon sequencing & whole genome shotgun sequencing)	定序完成並已進行微生物體與底泥環境物化特性關聯性之分析	✓					
查核點		預定完成時間			查核點內容說明		
期中報告		108 年 8 月			完成現地採樣、送高通量定序分析。		
期末報告		108 年 11 月			解析河口分層底泥基因體及菌群變化。		

章節摘要：本章主要說明計畫源起、目標，以及計畫工作內容其執行進度與成效。

第二章 背景文獻回顧

2.1 河口底泥

底泥依土壤及地下水污染整治法定義，係指因重力而沉積於地面水體底層之物質[1]。由於其對化學物質具有沉澱、吸附及錯合作用能使污染物移動性降低[2][3]，底泥可以成為污染物的儲存庫，也因此成為反映人類活動造成污染的重要環境指標[4]。

河口作為陸海相互作用的重要界面和陸源物質進入海洋的主要過渡區，對各種地表形成過程和物質循環相當重要[5]，此外，河口身為地球上生物生產力最高的地區之一，同時也是將污染物納入食物鏈最終回歸到人類的主要場所[6]，而沉積於河口之底泥為河川長期累積沖刷而成，因此可以透過分層分析反映出不同時期的污染物累積程度，除了可以重建河川污染歷史，了解河口污染程度也對評估環境風險相當重要[7]。

Chen (2016)於高雄港採集六個底泥岩心，四個主要河流入口（即愛河、五號船渠、鳳山溪和鹽水港溪）和高雄港的兩個港口入口，對其垂直剖面做重金屬的調查，評估 enrichment factor (EF)、geo-accumulation index (I_{geo})和 pollution load index (PLI)值，以及這些重金屬的來源和潛在生態影響，結果顯示河口底泥重金屬濃度在垂直剖面的差異並不大，顯示上游河流的污染物持續不斷排入港口，並在河口累積。此外作者也分析不同重金屬及生態風險的主要貢獻者，例如五號船渠和愛河既是汞的主要來源(占 88.4%)，也是河口生態風險的主要貢獻者。透過這些資訊，可以對高雄港口重金屬污染有更詳細的了解，也能進一步做最有效的管理[8]。

2.2 重金屬於河口底泥

重金屬因其毒性、持久性和生物累積性而成為生態系統中的一個重要問題 [9] [10] [11]。隨著工業發展及人口增加，許多民生、工業廢水未經妥善處理即排放，使大量重金屬及有機污染物進入自然水體，透過沉澱、吸附與錯合作用累積於底泥當中[3]，這些累積於底泥之重金屬，可能因河口的複雜流體動力學或是暴雨、颱風等強烈擾動，使其透過再懸浮作用回到水體，造成二次污染[12]。因此，綜合上述複雜情況，欲評估河口底泥重金屬的影響，除了了解重金屬的全量濃度外，也需考慮重金屬的移動性及生物可利用性[13]。

影響重金屬於底泥中的移動性及生物有效性因素有許多，例如 pH、氧化還原電位(Eh)、有機質(OM)、鹽度、粒徑分布等[14] [15]。其中有機質及粒徑分布是最常見的兩種因子，有機質具有較大表面積及官能基得以吸附較多重金屬，此外有機質也能與重金屬形成穩定的錯合物[16]，而細粒狀(fine-grained)的底泥具有較高比表面積，對於有機質及重金屬的吸附能力較強[17]。

Nazneen (2019)於 Chilika lagoon 採集 5 個底泥管柱，並對其做垂直分層，分析重金屬各相態隨著深度及不同環境因子的改變，提出有機碳、總氮、總磷和粒徑大小對於重金屬於底泥的豐度產生影響，而其中鉛、銅、鋅濃度與上述因子呈正相關 [18]；Sun(2018)於長江三角洲，由河道向河口採集 40 個表層底泥進行物化分析，提出越接近河口，較弱的水力活動使的細粒狀的底泥沉積，加上 pH、SPM 升高，可能是重金屬從水轉移到河口底泥的驅動力，其中鋅、銅和鉻與黏土加壤土的比例呈顯著正相關[19]。

此外，由於河口位於淡水及海水交界處，鹽度變化甚大，目前已有許多文獻指出鹽度的提高會使重金屬移動性上升[20] [21]，其主要原理為（1）鹽類產生的陰離子會與原本吸附於固相基質的重金屬產生錯合使其釋出（2）鹽類產生的陽離子與帶正電荷的重金屬物質對固相吸附點位的競爭，也會使帶正電荷的重金屬釋出[22]，

然而，不同種類的重金屬對於不同的鹽類影響並不一致，Acosta (2011)利用 CaCl_2 、 MgCl_2 、 NaCl 、 Na_2SO_4 做為鹽度來源，對銅、鎘、鉛、鋅個別的移動性影響進行探討，提出上述四種鹽類對鎘的移動性皆有明顯提升；鉛主要受 CaCl_2 影響，主要機制為 Ca^{2+} 與其吸附位點的競爭，隨後是其與 Cl 的錯合反應；銅主要受 Na_2SO_4 影響，主要機制是形成硫酸銅；鋅則主要受 CaCl_2 影響，主要機制與鉛相同，但效果為上述四種金屬中最差的[23]。此外，Bai(2019)透過採集不同鹽度梯度之沿海濕地土壤，提出砷、鎘、鉻、銅、鉛、鋅的平均濃度隨著鹽度的降低而增加，其中鎘、銅、鉛、鋅經皮爾森相關性分析皆與氯離子濃度呈顯著負相關[24]。

2.3 河口底泥微生物生態

由於底泥中富含有機質可以提供微生物營養，存在於底泥之微生物群落相當多樣[25]。在河口，這些底泥微生物群落對於河口系統的地球化學循環、植物生產力、污染物的修復扮演相當重要的角色[26]。此外，微生物群落對於周遭環境相當敏感，其組成結構會隨著環境條件不同而改變，因此常做為環境指標[27]。

在河口底泥岩心中，不同深度其環境條件，如溶氧、鹽度、氧化還原電位等基本物化性質可能不同，此外由於底泥具有固定污染物之能力[4]，不同深度累積污染物的程度也會不同，然而上述因子皆有可能影響微生物群落的組成及功能，藉由了解這些微生物群落對環境因素的響應以及這些響應在河口系統的分佈，對於管理河口生態系統以及其上、中游的污染行為追溯幫助甚大[28] [29]。

Hong(2018)於美國維吉尼亞州格洛斯特角的河口採集底泥岩心(100 公分)，以每 10 公分深度為間隔，利用 16S rRNA 基因的高通量定序，分析底泥中細菌及古菌群落的組成、多樣性和潛在功能。在菌群方面，細菌數量較古菌多出 2 到 3 個 order，而隨著深度的增加，古細菌的相對豐度從 4.4% 逐漸增加到 22%，其中 *Crenarchaea* 佔古菌數目的 50% 以上，顯示其在深層底泥中可能扮演更重要的角色；在功能性方面，作者提出在表層好氧區的微生物主要進行有氧代謝，包括甲烷氧化、氨氧化

和亞硫酸鹽氧化，而在好氧-厭氧過度區，幾乎所有微生物功能皆與反硝化、亞硫酸鹽還原有關，表明在過渡層中可能發生好氧和無氧代謝，這也顯示溶氧量在底泥岩心中為主要影響微生物功能表現的因子[30]。

Qiao(2018)於南黃海及東海採集底泥岩心 30 公分並分為 8 層，利用 16S rRNA 基因的高通量定序，分析底泥中細菌及古菌群落的組成及多樣性，作者提出上層和深層底泥的菌群的多樣性和組成有顯著差異，原因可能為不論好氧或厭氧的細菌及古菌都可以在上層底泥中共存，從而使上層底泥具有高度多樣性。此外 *Proteobacteria*、*Acidobacteri* 和 *Bacteroidete* 在上層佔比較高，而 *Lactococcus*、*Pseudomonas* 和 *Dehalococcoidia* 則在深層佔比較高，顯示上層及深層底泥菌群可能分別扮演著不同的地球化學循環角色[31]。

2.4 重金屬影響底泥中微生物生態

現今已有許多研究闡明化學污染物對沿海底泥中微生物產生影響[32] [33]。其中高濃度的重金屬已被證明可以影響底棲細菌的代謝途徑，如酶的合成及活性[34]，進而影響地球的生化循環及底棲生物的營養傳輸[35]，此外，重金屬也會造成環境優勢菌群的變化及其與其他細菌群落的相互作用，使微生物生態系統的結構、功能和穩定性產生改變，並能藉此將微生物群落做為環境指標[36]。

Zampieri(2016)於巴西 Araça Bay 採集 0-10cm 底泥，研究重金屬如何影響細菌的多樣性和分佈，他提出重金屬濃度越高的底泥，其具有重金屬抗性基因的細菌也越多(如鋅、鎘)，此外，作者發現在污染較嚴重的底泥，*Bacillus sp.* 被分離出來的頻率最高，其可能為存在於重金屬污染之底泥主要的屬，對重金屬污染嚴重的海洋及河口地區，具有生物修復的巨大潛力[37]。

2.5 次世代定序應用於微生物生態分析

次世代高通量定序(next generation high throughput sequencing)技術目前已逐漸應

用於環境方面的研究，此項技術促進了我們對微生物生態學的理解的重大進展，常見方法如細菌和古菌的 16S rRNA 基因的分析經常用於區分環境樣品的分類組成和系統發育多樣性。然而，16S rRNA 標記的基因通常集中在一個或幾個通用基因上，所以無法直接鑑定微生物的功能基因。而另一個方法如散槍式宏基因組定序(shotgun metagenomic sequencing)，目的在於從樣品中採集所有基因，並可以得到詳細的代謝或其他功能[38] [39]。

Guo (2017)於陝西採集受重金屬污染之農地土壤，並利用 16S rRNA 分析菌群變化，提出環境因子（SOM、pH、Zn、Cd、Pb）對微生物群落結構有顯著影響。其中 *Ralstonia*、*Gemmatimonas*、*Rhodanobacter* 和 *Mizugakiibacter* 對 Cd、Pb、Zn 和 Hg 是高度敏感的群體，而 *unidentified-Nitrospiraceae*、*Blastocatella* 和 *unidentified-Acidobacteria* 是對這些重金屬的高度耐受的群體，透過了解這些耐受性和敏感性微生物，有助於重金屬污染區域的生物修復及污染鑑識[40]。

Xavier(2019)針對巴西 Riacho dos Macacos 受重金屬污染之河岸底泥研究細菌群落及功能與重金屬之關聯性，並以 Rio Grangeiro 此未受污染地區底泥進行對照，metagenomics 數據顯示 Riacho dos Macacos 底泥，其重金屬調節相關之基因，如調節，運輸，代謝和金屬抗性等，皆高於 Rio Grangeiro。此外作者也提到 *Anaeromixobacter* 和 *Geobacter* 這兩屬具有最高的鋅抗性基因豐度；*Pseudomonas* 和 *Nocardioides* 則具有更高的銅抗性基因豐度，而最豐富的基因屬於 *czcD* 家族，涉及鋅抗性和銅抗性的 P-type ATPase 或 CopA[41]。

以下為文獻回顧列表

文獻名稱	文獻重點
河口底泥	
<p>C.-F. Chen, Y.-R. Ju, C.-W. Chen, and C.-D. Dong, "Vertical profile, contamination assessment, and source apportionment of heavy metals in sediment cores of Kaohsiung Harbor, Taiwan," <i>Chemosphere</i>, vol. 165, pp. 67-79, 2016.</p>	<p>Chen 於高雄港採集六個底泥岩心，對其垂直剖面做重金屬的調查，評估這些重金屬的來源和潛在生態影響，結果顯示河口底泥重金屬濃度在垂直剖面的差異並不大，顯示上游河流的污染物持續不斷排入港口，並在河口累積。此外作者也分析不同重金屬及生態風險的主要貢獻者，透過這些資訊，可以對高雄港口重金屬污染有更詳細的了解，也能進一步做最有效的管理。</p>
重金屬於河口底泥	
<p>S. Nazneen, S. Singh, and N. J. Raju, "Heavy metal fractionation in core sediments and potential biological risk assessment from Chilika lagoon, Odisha state, India," <i>Quaternary International</i>, vol. 507, pp. 370-388, 2019.</p>	<p>Nazneen 於 Chilika lagoon 採集 5 個底泥管柱，並對其做垂直分層，分析重金屬各相態隨著深度及不同環境因子的改變，提出有機碳、總氮、總磷和粒徑大小對於重金屬於底泥的豐度產生影響，而其中鉛、銅、鋅濃度與上述因子呈正相關。</p>
<p>X. Sun, D. Fan, M. Liu, Y. Tian, Y. Pang, and H. Liao, "Source identification, geochemical normalization and influence factors of heavy metals in Yangtze River Estuary sediment," <i>Environmental pollution</i>, vol. 241, pp. 938-949, 2018.</p>	<p>Sun 於長江三角洲，由河道向河口採集 40 個表層底泥進行物化分析，提出越接近河口，較弱的水力活動使的細粒狀的底泥沉積，加上 pH、SPM 升高，可能是重金屬從水轉移到河口底泥的驅動力，其中鋅、銅和鉻與黏土加壤土的比例呈顯著正相關。</p>

<p>J. Acosta, B. Jansen, K. Kalbitz, A. Faz, and S. Martínez-Martínez, "Salinity increases mobility of heavy metals in soils," <i>Chemosphere</i>, vol. 85, no. 8, pp. 1318-1324, 2011.</p>	<p>Acosta 探討鹽度對於銅、鎘、鉛、鋅移動性之影響，提出鉛主要受 CaCl_2 影響，主要機制為 Ca^{2+} 與其吸附位點的競爭，隨後是其與 Cl^- 的錯合反應；銅主要受 Na_2SO_4 影響，主要機制是形成硫酸銅；鋅則主要受 CaCl_2 影響，主要機制與鉛相同，但效果為上述四種金屬中最差的。</p>
<p>J. Bai et al., "Arsenic and heavy metals pollution along a salinity gradient in drained coastal wetland soils: Depth distributions, sources and toxic risks," <i>Ecological indicators</i>, vol. 96, pp. 91-98, 2019.</p>	<p>Bai 透過採集不同鹽度梯度之沿海濕地土壤，提出砷、鎘、鉻、銅、鉛、鋅的平均濃度隨著鹽度的降低而增加，其中鎘、銅、鉛、鋅經皮爾森相關性分析皆與氯離子濃度呈顯著負相關。</p>
<p>河口底泥微生物生態</p>	
<p>Y. Hong, J. Wu, and B. Song, "Vertical stratification of sediment microbial communities along geochemical gradients of a subterranean estuary located at the Gloucester beach of Virginia, USA," <i>Frontiers in microbiology</i>, vol. 9, p. 3343, 2018.</p>	<p>Hong 於美國維吉尼亞州格洛斯特角的河口採集底泥岩心，利用 16S rRNA 基因的高通量定序，分析底泥中細菌及古菌群落的組成、多樣性和潛在功能。在菌群方面，細菌數量較古菌多出 2 到 3 個 order，而隨著深度的增加，古細菌的相對豐度從 4.4 % 逐漸增加到 22 %，其中 Crenarchaea 佔古菌數目的 50% 以上，顯示其在深層底泥中可能扮演更重要的角色；在功能性方面，作者提出在表層好氧區的微生物主要進行有氧代謝，包括甲烷氧化、氨氧化和亞硫酸鹽氧化，而在好氧-厭氧過度區，幾乎所有微生物功能皆與反硝化、亞硫酸鹽還原有關，表明在過渡層中可能發生好氧和無氧代謝，這也顯示溶氧量在底泥岩心中為主要影響微生物功能表現的因子。</p>

<p>Y. Qiao, J. Liu, M. Zhao, and X.-H. Zhang, "Sediment depth-dependent spatial variations of bacterial communities in mud deposits of the eastern China marginal seas," <i>Frontiers in microbiology</i>, vol. 9, p. 1128, 2018.</p>	<p>Qiao 於南黃海及東海採集底泥岩心，利用 16S rRNA 基因的高通量定序，分析底泥中細菌及古菌群落的組成及多樣性，提出上層和深層底泥的菌群的多樣性和組成有顯著差異，原因可能為不論好氧或厭氧的細菌及古菌都可以在上層底泥中共存，從而使上層底泥具有高度多樣性。此外 Proteobacteria、Acidobacteri 和 Bacteroidete 在上層佔比較高，而 Lactococcus、Pseudomonas 和 Dehalococcoidia 則在深層佔比較高，顯示上層及深層底泥菌群可能分別扮演著不同的地球化學循環角色。</p>
<p>重金屬影響底泥中微生物生態</p>	
<p>B. D. B. Zampieri, A. B. Pinto, L. Schultz, M. A. de Oliveira, and A. J. F. C. de Oliveira, "Diversity and distribution of heavy metal-resistant bacteria in polluted sediments of the Araça Bay, São Sebastião (SP), and the relationship between heavy metals and organic matter concentrations," <i>Microbial ecology</i>, vol. 72, no. 3, pp. 582-594, 2016.</p>	<p>Zampieri 於巴西 Araça Bay 採集 0-10cm 底泥，提出重金屬濃度越高的底泥，其具有重金屬抗性基因的細菌也越多(如鋅、鉻)，此外在污染較嚴重的底泥，<i>Bacillus</i> sp. 被分離出來的頻率最高，其可能為存在於重金屬污染之底泥主要的屬，對重金屬污染嚴重的海洋及河口地區，具有生物修復的巨大潛力。</p>
<p>次世代定序應用於微生物生態分析</p>	
<p>H. Guo, M. Nasir, J. Lv, Y. Dai, and J. Gao, "Understanding the variation of microbial community in heavy metals contaminated soil using high throughput sequencing," <i>Ecotoxicology and environmental safety</i>, vol. 144, pp. 300-306, 2017.</p>	<p>Guo 於陝西採集受重金屬污染之農地土壤，並利用 16S rRNA 分析菌群變化，提出 SOM、pH、Zn、Cd、Pb 對微生物群落結構有顯著影響。其中 <i>Ralstonia</i>、<i>Gemmatimonas</i>、<i>Rhodanobacter</i> 和 <i>Mizugakiibacter</i> 對 Cd、Pb、Zn 和 Hg 是高度敏感的群體，而 unidentified-<i>Nitrospiraceae</i>、<i>Blastocatella</i> 和 unidentified-Acidobacteria 是對這些重金屬的高度耐受的群體。</p>

<p>J. Xavier et al., "Evaluation of the microbial diversity and heavy metal resistance genes of a microbial community on contaminated environment," <i>Applied Geochemistry</i>, vol. 105, pp. 1-6, 2019.</p>	<p>Xavier 針對巴西重金屬污染之河岸底泥研究細菌群落及功能與重金屬之關聯性，metagenomics 數據顯示受重金屬污染之底泥，其重金屬調節相關之基因，如調節，運輸，代謝和金屬抗性等，皆高於不受污染之底泥。此外 <i>Anaeromixobacter</i> 和 <i>Geobacter</i> 這兩屬具有最高的鋅抗性基因豐度；<i>Pseudomonas</i> 和 <i>Nocardioides</i> 則具有更高的銅抗性基因豐度。</p>
---	---

章節摘要：

以 2.1 河口底泥、2.2 重金屬於河口底泥、2.3 河口底泥微生物生態、2.4 重金屬影響底泥中微生物生態、2.5 次世代定序應用於微生物生態分析，這五項目進行文獻回顧。

第三章 研究方法與原理

3.1 現地採樣

客雅溪流長約 24 公里，流域面積約 45.6 平方公里，涵蓋新竹縣寶山鄉與新竹市。其發源於竹東丘陵，流經新竹平原，在香山濕地北部與三姓公溪合流，注入臺灣海峽。

三姓公溪流長 7.5 公里，流域總面積為 10.64 平方公里，佔新竹市總面積的 10%。其發源於竹東丘陵，流經新竹平原，最後注入臺灣海峽。其下游彎繞穿越香山工業區，入海之前，受到沙丘的阻擋，形成廣大的香山濕地。

鹽港溪流長 13.43 公里，位於臺灣北部新竹縣市及苗栗縣交界地區。其發源於竹東丘陵西端，向西流入新竹市香山區境內，最後注入台灣海峽。

二仁溪流長 61.20 公里，流域面積約 350.04 平方公里，其發源於高雄市內門區木柵里，流經高雄縣、台南縣及台南市，在高雄茄萣的白砂崙北方流入台灣海峽。

3.1.1 採樣點位資訊

於 2019 年 4 月 10 日於客雅溪、三姓公溪、鹽港溪等 3 個點位的出海口進行底泥採樣，每個點位取得 2 管底泥管柱，依深度每 10 公分為一層，其中客雅溪出海口底泥採集深度為 50 公分(共分 5 層)、三姓公溪出海口底泥採集深度為 30 公分(共分 3 層)、鹽港溪出海口底泥採集一點深度為 30 公分(共分 3 層)另一點則為 50 公分(共分 5 層)，詳細點位分佈如圖 3-1。

另於 2019 年 4 月 30 日於二仁溪出海口進行底泥採樣，取得 2 管底泥管柱，依深度每 10 公分為一層，採集深度為 50 公分(共分 5 層)，詳細點位如下圖 3-2。詳細採樣點資訊如下表 3-1



圖 3-1 新竹出海口採樣點分布



圖 3-2 二仁溪出海口採樣點分布

表 3-1 客雅溪、三姓公溪、鹽港溪、二仁溪採樣點資訊

地點	樣點代號	採樣日期	採樣時間	緯度	經度	採集深度(cm)	分層數	岩心數
客雅溪	K	20190410	09:38	24.80969	120.91161	50	5	2
三姓公溪	T	20190410	10:54	24.80200	120.91700	30	3	2
鹽港溪	B	20190410	12:14	24.74638	120.90119	50、30	5、3	2
二仁溪	R	20190430	12:30	22.92133	120.19061	50	5	2

3.1.2 採樣方法

於各出海口岸邊，以全新壓克力管插入底泥並配合敲打，拔出壓克力管並取出完整底泥柱體，利用捲尺測量，地表為 0 公分向下，每十公分為區間並各自裝入採樣袋進行標記。分生樣品以滅菌 tips 取出後存放於裝有 LifeGuard Soil Preservation Solution 之離心管，剩餘樣品則放入無菌採樣袋後存入冰櫃以 4° C 冰存，隨即運回實驗室後保存於 -20° C 冰箱待後續分析。

3.1.3 底泥分析流程圖

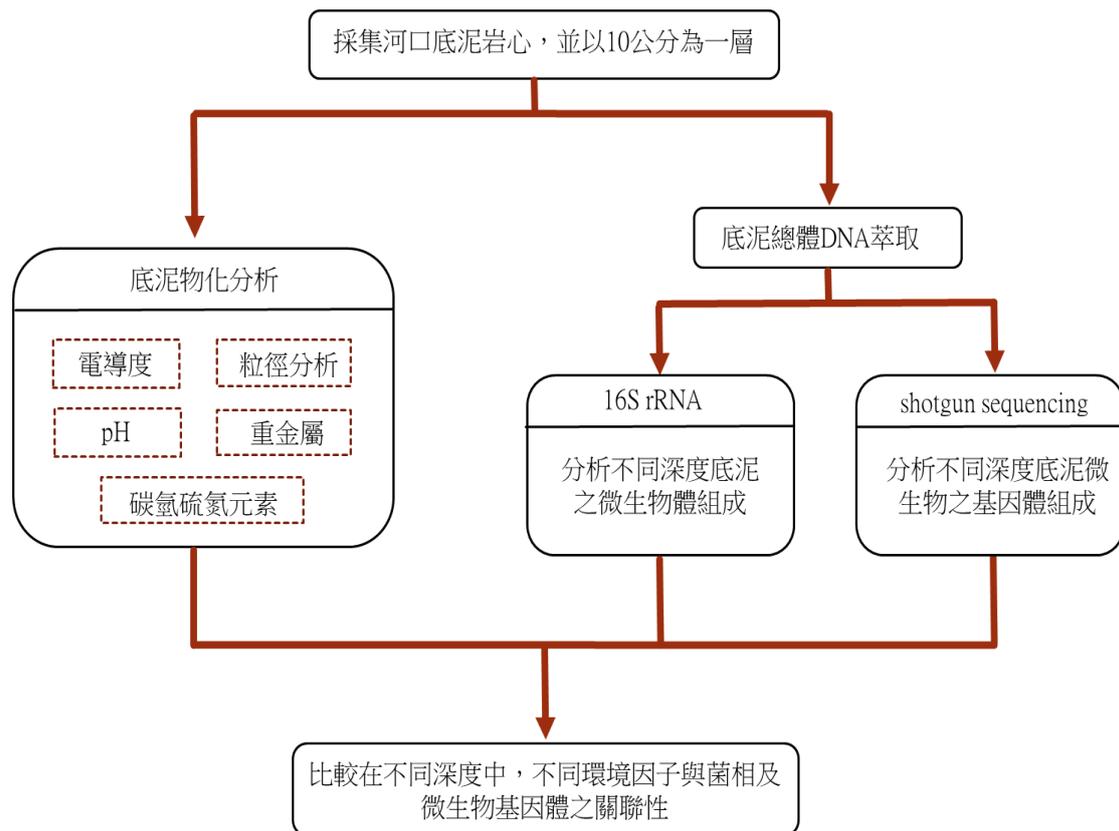


圖 3-3 底泥分析流程圖

3.2 底泥物化分析

底泥陰乾一週並以 2 mm 篩網篩除大顆粒碎石雜物後，保存於 4° C 冰櫃待後續分析，分析項目有 pH、總有機碳、氯離子濃度、碳氮氫重量百分比、重金屬濃度、粒徑分布及電導度等。

pH

使用土壤酸鹼值 (pH 值) 測定方法—電極法 (NIEA S410.62C)，將土壤樣品 20 g 與試劑水 20 mL 混合，攪拌 5 分鐘後靜置沉澱 1 小時，再吸取上清液離心，使用 Hach HQ40D 之 pH 電極測定樣品之酸鹼值。

電導度

依據土壤中電導度測定方法(TARI S101.1B)，土壤樣品以土水比 1:5 之比例加入去離子水，置於往覆式震盪機以 140rpm 震盪 1 小時，以 Whatman 5 號

濾紙過濾後，濾液以電導度計量測其電導度值。

氯離子濃度

利用農試所 TARI S101.1B 土壤電導度測定方法取得底泥樣品之濾液，再以離子層析儀 IC 對氯液進行氯離子檢測。

粒徑分布

使用雷射粒徑分析儀 CILAS 1090L 量測顆粒直徑與粒徑分佈。雷射粒徑分析儀使用光源為 830 nm 之紅光固體雷射，雷射光入射懸浮於分散相中之粒子，利用大粒子繞射角度小，小粒子繞射角度大之差異計算粒徑大小，可量測粒徑範圍為 0.04 ~500 μm 。

總有機碳

土壤有機值測定方法－燃燒/紅外線測定法(TARI S201.1B)，使用總有機碳分析儀以高溫裂解/燃燒樣品，產生二氧化碳，使用檢測器(NDIR, 非分散式紅外線)檢測二氧化碳含量。再以總有機碳分析儀所測得之總有機碳含量乘以轉換係數 1.723 計算得有機質含量。

重金屬

土壤中重金屬檢測方法－微波輔助王水消化法(NIEA S301.60B)，土壤樣品以鹽酸和硝酸混合，配合微波加熱進行消化前處理，所得消化液稀釋至適當體積後，以感應耦合電漿原子發射光譜儀（ICP）進行分析。

碳氫氮元素

使用碳、氫、硫、氧、氮元素含量檢測方法－元素分析儀法(NIEA M403.01B)，將風乾的底泥樣本磨碎過 1 mm 篩網後，於 105 ° C 烘箱烘乾 2 小時，乾燥後樣本使用德國 Elementar vario EL cube 型儀器進行分析，樣品在高溫純氧環境下燃燒，將碳、氫、氮等元素完全轉換成二氧化碳、水氣、氮氧化物等混合氣體，再利用熱傳導偵測器（Thermal conductivity detector, TCD）檢測氮氣、二氧化碳、水氣，換算即可求得樣品中氮、碳、氫之重量百分比。

3.3 底泥微生物 DNA 萃取

本次萃取底泥樣本中微生物 DNA 的方法為採用 QIAGEN DNeasy Power Soil Kit，萃取步驟如下：

1. 取 0.25 g 底泥樣本添加入 PowerBead Tubes 中，添加 60 μ L 之 Solution C1，以最大震盪速度震盪 8 分鐘，使樣本及溶液混合均勻。
2. 於室溫下以高轉速(10,000g)離心 1 分鐘，使大分子與小分子分離。
3. 把上清液移到新的 2 mL 之微量離心管中。添加 250 μ L Solution C2，震盪 5 秒鐘使之充份混合，再冰浴 5 分鐘。
4. 室溫下再以高轉速(10,000g)離心 1 分鐘，吸取上清液到新的 2 mL 微量離心管中。
5. 添加 200 μ L of Solution C3，震盪 5 秒鐘使之充份混合，再冰浴 5 分鐘。
6. 室溫下再以高轉速(10,000g)離心 1 分鐘，吸取上清液到新的 2 mL 微量離心管中。
7. 取 750 μ L 上清液移到新的 2 mL 之微量離心管中。添加 1200 μ L 事先搖晃均勻之 Solution C4，震盪 5 秒鐘使之充份混合。
8. 吸取 675 μ L 之混合溶液到已經裝置於 collection tube 的 spin column 中，離心 1 分鐘，使溶液穿過濾膜，直到樣品全過濾膜。
9. 過濾液丟棄，添加 500 μ L 之 Solution C5 以高轉速(10,000g)離心 1 分鐘。把過濾液丟棄後再離心 1 分鐘。
10. spin column 移到新的 2 mL 之微量離心管中，添加 25 μ L 之 Nuclease-Free Water 滴於 spin column 中心，以 10,000 g 離心 3 分鐘。
11. 下方溶液即為本次萃取之 DNA，保存在-20° C 待後續使用。

3.4 高通量定序

3.4.1 MiSeq 16S-rRNA 菌群

將底泥樣本利用 QIAGEN 提供之 DNeasy PowerSoil Kit 試劑盒進行 DNA 萃取。

經萃取後，DNA 產量大部分偏低，濃度為 0.1~39.4 ng/ul 之間。接續進行 PCR 擴增，使用與細菌 16S 核糖體核糖核酸基因(16S rRNA gene) V4 序列互補的一對正反引子：

16S Amplicon PCR Forward Primer = 5'

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGYCAGCMGCCGCGGTAA

16S Amplicon PCR Reverse Primer = 5'

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACNVGGGTWTCTAA

T 利用聚合酶連鎖反應(PCR)放大出 V4 片段，長度約 390bp，放大後產物使用 QIAGEN 公司研發之 QIAquick Gel Extraction Kit 試劑盒進行片段的純化。此部分目前已經完成。由於放大後的序列尾端皆設計有 Illumina 突出轉接子(overhang adapters)，因此可以藉此突出轉轉接子序列(overhang adapters)，以 Illumina 公司研發之 Nextera XT Index 試劑盒，利用內含條碼 barcodes 與 Illumina 定序接頭序列 (P5,P7)進行建庫。並使用 Agilent bioanalyzer 2100 測量待測建庫之大小及使用螢光定量法(Qubit)測量待測文庫濃度，調整待測文庫濃度後，將樣本加入表面帶有互補轉接子序列的定序晶片上，並利用次世代定序儀(MiSeq)之橋式聚合酶連鎖反應(bridge amplification)將樣本擴增以放大螢光檢測的訊號，藉由定序過程中不同鹼基的螢光標記擁有不同的螢光顏色來辯認互補的鹼基對，經重覆進行螢光標記移除與偵測，即可偵測眾多環境菌種的基因序列 (雙邊定序長度 2*250bp)。

分析方法：之後的分析將進行下列六項步驟：(一) 以定序品質過濾軟體 Trimmomatic (Java)將品質低於 QS30 的序列去除，同時序列短於 36 bp 的也一並移除。(二) 使用 PEAR 軟體將雙邊定序後的序列利用彼此重疊之區域進行合併，並去除重疊區域小於 10bp 的序列資料(Zhang et al., 2014)，並且將步驟一與步驟二通過品質測定與合併後的序列稱之為 assembled reads。(三) 去除上述 assembled reads 中連續 3 bp 品質小於 Q20 的序列供後續分析稱為 effective reads。(四) 以 UCLUST 軟體將相似度大於 97%以上的序列合並為一個叢集(cluster)，並稱之為 operational

taxonomical unit (OTU)(RC E., 2010)，接續使用 QIIME software package (version 1.9.1) 軟體進行預設值分析(Caporaso et al., 2014)，並將序列與 Silva 資料庫(release 13_8)(TZ1 et al., 2006)進行比對，比對完之序列者為 taxon reads。(五) 挑選出樣本 taxon reads 大於 50000。(六) 利用 R 軟體進行 The alpha diversity, beta diversity, microbiome structure, multi-variant statistical analysis and Cooccurrence network analysis 繪圖，並以 Mann-Whitney-Wilcoxon Test 進行各組間的比較並計算出 p-value。

3.4.2 metagenomic 高通量定序及組裝

總體基因體學定序與分析

環境基因體學分析的研究樣區為鹽港溪(B)(低重金屬濃度)以及二仁溪(R)(高重金屬濃度)，並採集底泥樣本進行分層(依序為 0-10cm, 10-20cm 以及 20-30cm)，每個樣點進行採樣 2 樣品，總共取得 12 個分層樣品(表 3-2)。總體基因體學分析的流程請見圖 3-4。萃取的 DNA 必須經過建庫 (library preparation) 才可以上機到 HiSeq 2500 進行定序，每個樣點輸出的原始序列數 (raw reads) 介於 57,132,745 到 77,459,774 之間(表 3-2)。原始序列經過品質過濾 (quality trimming) 的步驟，把定序品質低於 QS 30 (即單一序列的平均正確率低於 99.9%) 的不良序列移除。結果顯示個別分層樣本中的高品質序列之含量高達 98% 以上(表 3-2)。

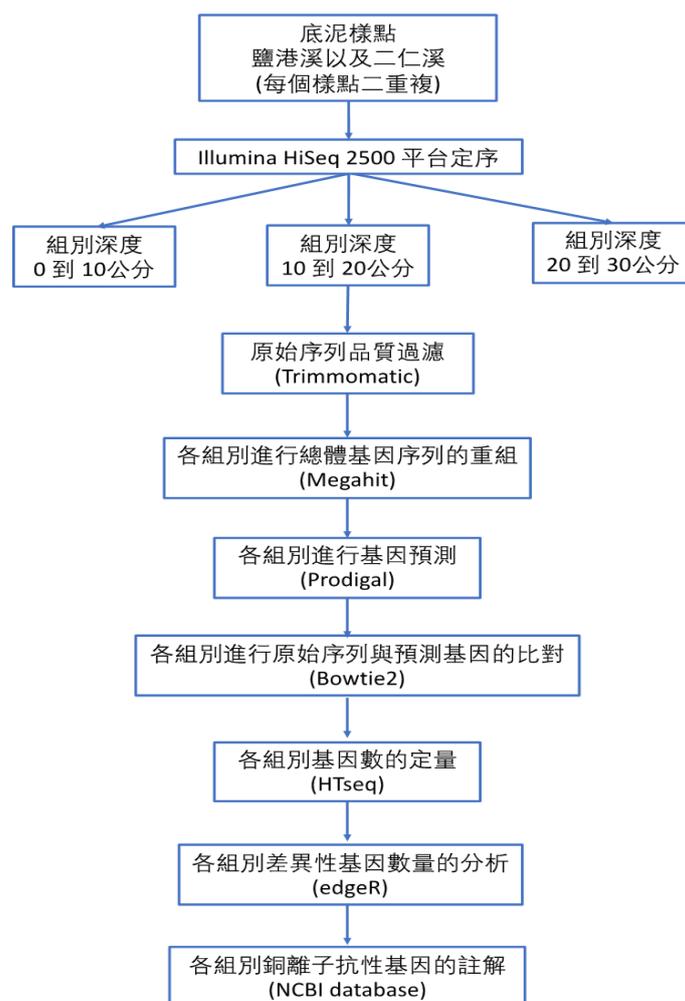


圖 3-4 總體基因體學分析的流程

表 3-2 序列品質過濾 (quality trimming) 的結果

Samples	Mega Bases	Numbers of raw reads	Numbers of reads after quality trimming	Survival rate (%)
B1 0 to 10 cm	34,950	69,620,502	68,749,759	98.75
B1 10 to 20 cm	38,885	77,459,774	76,405,319	98.64
B1 20 to 30 cm	34,726	69,174,019	68,235,191	98.64
B2 0 to 10 cm	34,493	68,710,615	67,829,057	98.72
B2 10 to 20 cm	33,639	67,010,355	66,306,436	98.95
B2 20 to 30 cm	30,957	61,666,598	61,007,441	98.93
R1 0 to 10 cm	30,269	60,298,885	59,502,479	98.68
R1 10 to 20 cm	33,012	65,761,830	65,039,978	98.90
R1 20 to 30 cm	28,681	57,132,745	56,279,434	98.51
R2 0 to 10 cm	31,834	63,415,434	62,636,269	98.77
R2 10 to 20 cm	34,811	69,344,157	68,793,697	99.21
R2 20 to 30 cm	35,550	70,814,849	70,187,699	99.11

為了比較鹽港溪(低重金屬濃度)及二仁溪(高重金屬濃度)相對應深度之底泥樣本之間的微生物群是否因為銅離子濃度的影響，而造成銅離子抗性的基因數量有顯著的差異，我們將不同深度的底泥樣本之原始序列 (每一組別 $n=4$)，利用 Megahit 程式，進行總體基因體學的運算重組 (de novo assembling)，來產生長度較長的 DNA 片段 (contigs)。隨後利用 QUAST 進行分析每一組別的 DNA 片段大小，數量以及鹼基 GC 之比例，可以得知個組別的最大 DNA 片段介於 507321 到 1020983 bp 之間 (表 3-3)。為了預測重組 DNA 片段上的編碼區域 (coding region)，即所謂的片段上是否帶有可能為基因序列，我們接著利用 Prodigal 程式來進行運算。欲測定個別基因的相對豐度，則需要先將每一個樣本的原始序列 (raw reads)，利用 Bowtie2 的程式，比對 (mapping) 到預測的基因上，隨後再利用 HTseq 程式進行目標基因數量的定量。例如，要比較 0 的 10 公分，鹽港溪以及二仁溪之間的基因數量的定量，必須把以下四個原始序列：B1 0 to 10 cm，B2 0 to 10 cm，R1 10 to 20 cm 以及 R2 10 to 20 cm，比對到預測的基因片段上。而定量的單位，則使用 counts per million (CPM)，表示如果每個原始序列 (raw reads) 被比對 (mapping) 到一個特定基因的次數在一百萬次裡面，該原始序列所佔的次數。接著利用 R 程式語言的 edgeR package 來進行差異性分析 (differential gene expression)，判定哪些基因數量是在銅離子濃度高的底泥中具有顯著差異 (p value < 0.05)，之後再利用基因資料庫 NCBI RefSeq 去進行基因功能的註解(annotation)，觀察這些具有顯著數量差異的基因，是否跟銅離子抗性有關。

表 3-3 總體基因體學的 DNA 序列片段品質檢測

	0 到 10 公分的底泥	10 到 20 公分的底泥	20 到 30 公分的底泥
Numbers of contigs	13012869	12301577	11612386
Largest contig (bp)	1020983	691372	507321
Total lengths (bp)	10826321631	10775718247	10301522020
N50 (bp)	781	825	838
GC%	56.34	53.91	53.59

Numbers of contigs:樣本中所帶有的 DNA 序列片段

Largest contig:最大 DNA 序列片段的長度

N50: 在全部的 DNA 序列片段中，該序列片段長度，亦即 N50 的數值，大於一半以上(50%)片段的個別長度。以 N50 781bp 為例，表示在 0 到十公分的底泥中，有一半的 DNA 序列片段，是小於 781 bp。

章節摘要：

依據計畫之研究方法逐項進行執行方式說明，從現地採樣、底泥之物化分析、核酸萃取、16S-rRNA 及 metagenomic 高通量定序等，分節予以說明。

第四章 結果與討論

4.1 底泥物理化學性質

pH、電導度與氯離子濃度

底泥 pH、導電度及氯離子濃度分布如圖 4-1、圖 4-2、圖 4-3、表 4-1、表 4-2 及表 4-3。將土壤樣品 20 g 與試劑水 20 mL 混合後，經沉澱離心後，沉澱一小時之上清液，以電極法測 pH。另依農試所公布之方法，將土壤樣品以土水比 1:5 之比例加入去離子水，置於往覆式震盪機以 140 rpm 震盪一小時後以濾紙過濾，取濾液進行 IC 氯離子檢測。

底泥 pH 介於 6.82 至 7.88 間，二仁溪整體 pH 值高於其他採樣點。

表 4-1 底泥 pH 分布

採樣點	深度(cm)	pH	
		第一次採樣	第二次採樣
客雅溪	0-10	7.44	6.85
	10-20	7.02	6.82
	20-30	7.01	6.97
	30-40	7.02	7.09
	40-50	7.05	6.86
鹽港溪	0-10	7.16	6.85
	10-20	7.14	7.12
	20-30	7.25	7.19
	30-40	7.08	無取樣
	40-50	7.07	無取樣
三姓公溪	0-10	7.05	7.14
	10-20	7.19	7.21
	20-30	7.30	7.30
二仁溪	0-10	7.85	7.50
	10-20	7.67	7.47
	20-30	7.53	7.77
	30-40	7.65	7.88
	40-50	7.55	7.71

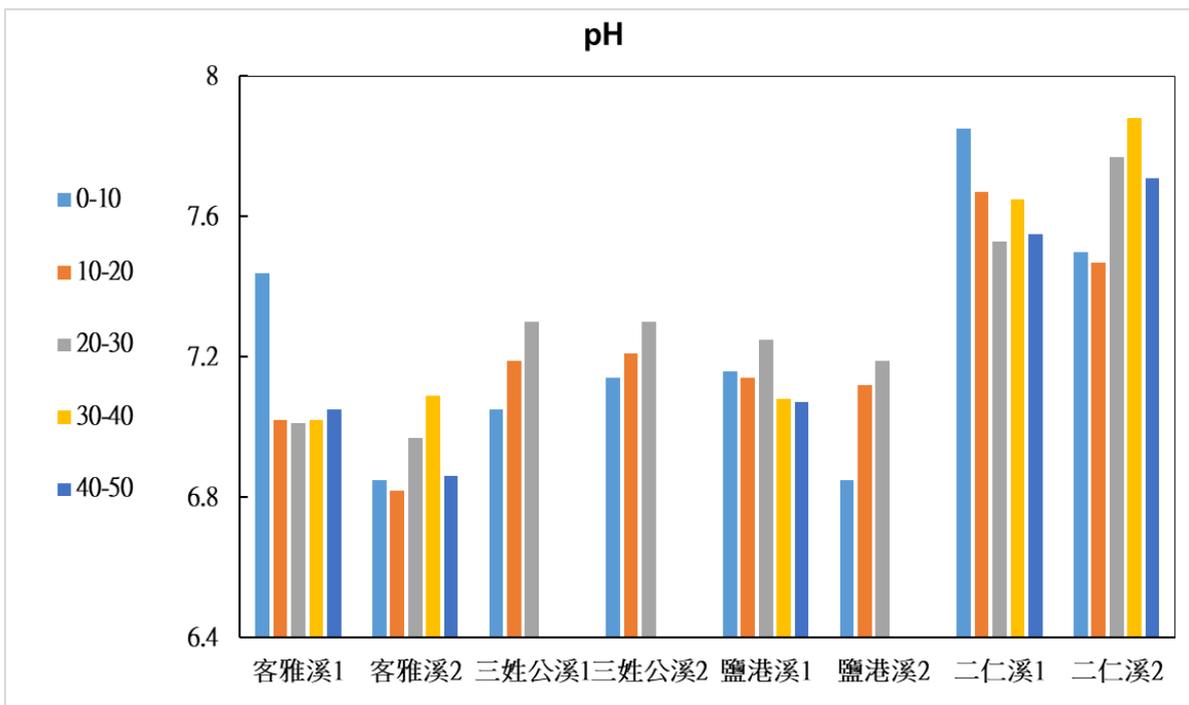


圖 4-1 底泥 pH 分布

表 4-2 底泥導電度分布

採樣點	深度(cm)	導電度(ms/cm)	
		第一次採樣	第二次採樣
客雅溪	0-10	3.58 under 26.5°C	4.41 under 26.8°C
	10-20	4.79 under 26.8°C	4.28 under 26.8°C
	20-30	5.26 under 26.6°C	4.64 under 26.8°C
	30-40	4.61 under 26.6°C	4.85 under 26.8°C
	40-50	4.84 under 26.6°C	5.39 under 27.0°C
鹽港溪	0-10	2.75 under 26.3°C	3.16 under 26.6°C
	10-20	2.45 under 26.5°C	2.49 under 26.4°C
	20-30	2.78 under 26.3°C	2.54 under 26.4°C
	30-40	2.55 under 26.3°C	無取樣
	40-50	2.35 under 26.4°C	無取樣
三姓公溪	0-10	4.68 under 26.7°C	4.33 under 26.6°C
	10-20	4.09 under 26.3°C	3.52 under 26.3°C
	20-30	1.56 under 26.4°C	2.52 under 26.2°C
二仁溪	0-10	2.65 under 26.6°C	3.15 under 26.6°C
	10-20	4.05 under 26.6°C	2.88 under 26.7°C

	20-30	3.42 under 26.8°C	3.46 under 26.8°C
	30-40	3.24 under 26.8°C	2.62 under 26.9°C
	40-50	2.91 under 26.7°C	2.62 under 26.7°C

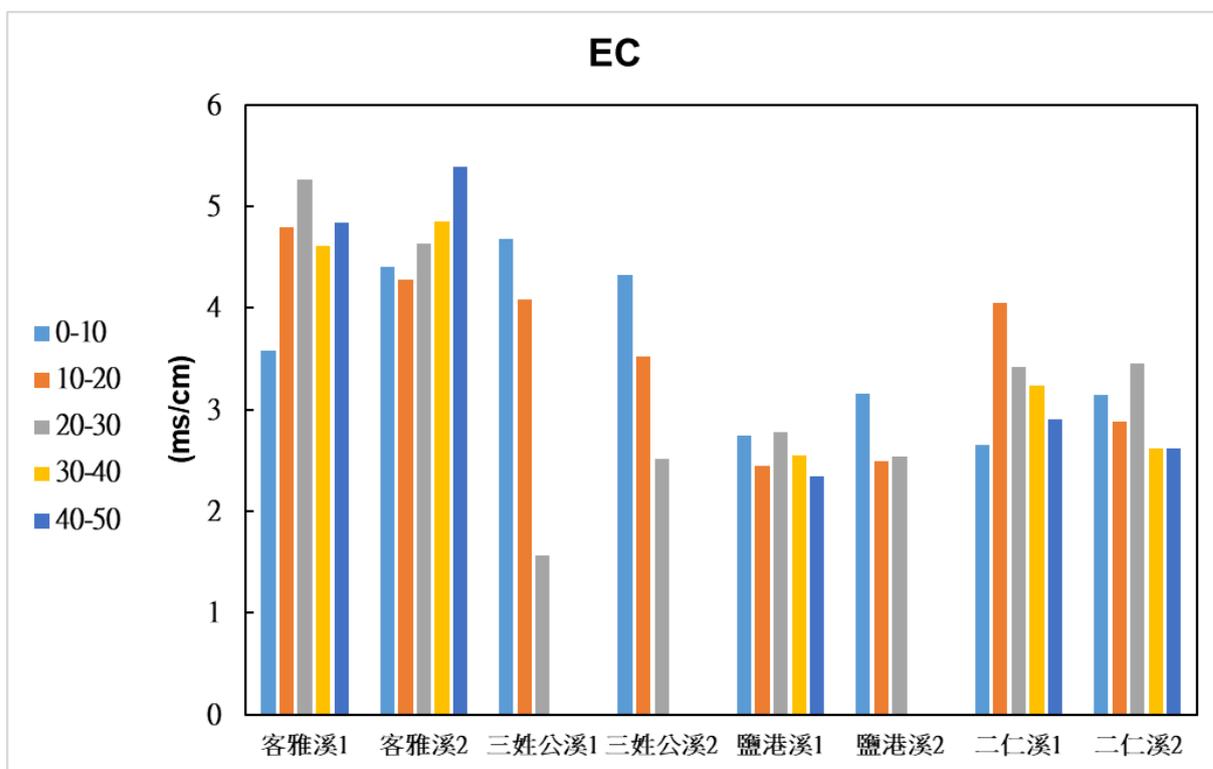


圖 4-2 底泥電導度分布

表 4-3 底泥氯離子分布

採樣點	深度(cm)	氯離子濃度(mg/L)	
		第一次採樣	第二次採樣
客雅溪	0-10	4856.48	3502.54
	10-20	5261.49	1749.17
	20-30	3186.31	5130.65
	30-40	5535.47	11936.28
	40-50	5907.13	7439.46
鹽港溪	0-10	2220.81	1840.29
	10-20	1877.25	1519.87
	20-30	1769.43	1780.02
	30-40	1794.58	無取樣
	40-50	2157.02	無取樣

三姓公溪	0-10	4553.08	2724.76
	10-20	3020.34	1659.73
	20-30	250.83	818.77
二仁溪	0-10	243.59	897.31
	10-20	1792.53	5402.51
	20-30	1065.01	2266.61
	30-40	1264.48	507.33
	40-50	1366.62	1965.78

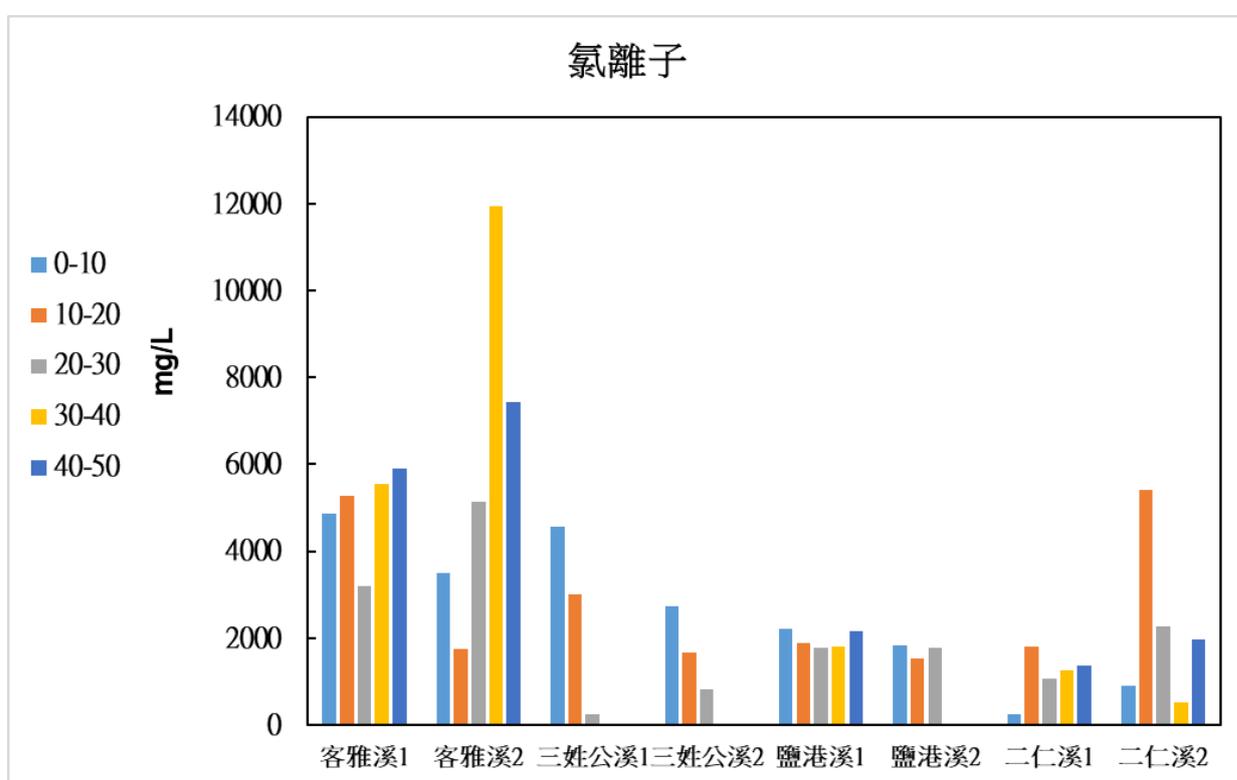


圖 4-3 底泥氯離子分布

粒徑分布

將採樣底泥以雷射粒徑分析儀分析粒徑，分析範圍從 0.04 μ m 到 500.0 μ m，將 0.04 μ m 到 2.0 μ m 的比例加總為粘粒，2.0 μ m 到 50 μ m 為粉粒，50 μ m 到 500 μ m 為砂粒，並比對質地三角圖將其歸類，統計如表 4-4。從下表可以看出其底泥種類以粉

土及坩壤土為主，三姓公溪及客雅溪坩粒比例較高，鹽港溪及二仁溪顆粒較大，多由砂粒組成，粘粒比例極低。一般而言，小粒徑比表面積大，提供較多空間予微生物生長，但每一個採樣點的差異性皆大，深度與粒徑無相關性。

表 4-4 底泥粒徑種類佔比

樣品		粒徑種類佔比(%)			種類
採樣點	深度(cm)	砂粒	坩粒	粘粒	
三姓公溪①	0-10	12.66	81.01	6.33	坩土
	10-20	8.77	83.49	7.74	坩土
	20-30	48.96	46.54	4.50	砂壤土
三姓公溪②	0-10	10.95	82.41	6.64	坩土
	10-20	20.14	74.34	5.52	坩壤土
	20-30	43.1	51.72	5.18	坩壤土
客雅溪①	0-10	19.89	74.24	5.87	坩壤土
	10-20	11.07	81.41	7.52	坩土
	20-30	9.84	82.55	7.61	坩土
	30-40	16.67	76.15	7.18	坩壤土
	40-50	19.15	73.04	7.81	坩壤土
客雅溪②	0-10	18.90	74.95	6.15	坩壤土
	10-20	17.91	76.59	5.50	坩壤土
	20-30	14.52	79.32	6.16	坩土
	30-40	13.95	78.95	7.10	坩壤土
	40-50	16.46	76.83	6.71	坩壤土
鹽港溪①	0-10	21.53	72.13	6.34	坩壤土
	10-20	40.25	55.02	4.73	坩壤土
	20-30	44.19	51.24	4.57	坩壤土
	30-40	87.93	10.59	1.48	砂土
	40-50	85.55	12.81	1.64	壤砂土
鹽港溪②	0-10	38.08	57.46	4.46	坩壤土
	10-20	29.72	65.09	5.19	坩壤土
	20-30	42.15	53.13	4.72	坩壤土
二仁溪①	0-10	71.77	26.24	1.99	壤砂土
	10-20	65.83	31.92	2.25	砂壤土
	20-30	51.21	45.75	3.04	砂壤土
	30-40	38.07	58.41	3.52	坩壤土

	40-50	62.59	35.06	2.35	砂壤土
二仁溪②	0-10	57.73	39.16	3.11	砂壤土
	10-20	25.94	69.33	4.73	粉壤土
	20-30	10.46	83.02	6.52	粉土
	30-40	6.03	87.71	6.26	粉土
	40-50	48.7	48.11	3.19	粉壤土

表 4-5 第一次採樣底泥體積粒徑累計百分比

第一次採樣樣品		體積粒徑累計百分比(μm)			平均值
採樣點	深度(cm)	<10%	<50%	<90%	
三姓公溪	0-10	2.82	16.19	54.69	23.15
	10-20	2.41	13.28	47.77	19.78
	20-30	3.90	46.98	345.46	119.20
客雅溪	0-10	2.96	20.96	67.18	28.88
	10-20	2.44	12.99	52.15	20.72
	20-30	2.42	12.85	49.71	20.02
	30-40	2.52	14.72	62.37	24.67
	40-50	2.38	15.85	67.03	26.53
鹽港溪	0-10	2.75	17.10	81.06	31.34
	10-20	3.50	34.01	133.69	54.39
	20-30	3.53	38.32	176.15	68.32
	30-40	34.47	209.77	385.79	214.76
	40-50	20.12	176.90	324.98	181.27
二仁溪	0-10	9.81	115.55	256.07	126.16
	10-20	8.80	70.18	140.81	73.82
	20-30	5.67	51.77	126.81	59.94
	30-40	5.70	40.06	82.42	42.70
	40-50	8.65	68.08	146.92	74.27
平均值		6.94	54.20	144.50	67.22
標準差		8.17	57.61	110.25	57.74
最大值		34.47	209.77	385.79	214.76
最小值		2.38	12.85	47.77	19.78

表 4-6 第二次採樣底泥體積粒徑累計百分比

第二次採樣樣品		體積粒徑累計百分比 (μm)			平均值
採樣點	深度(cm)	< 10%	< 50%	< 90%	
三姓公溪	0-10	2.67	14.56	51.84	21.51
	10-20	3.04	17.82	74.38	29.60
	20-30	3.29	33.56	250.45	88.03
客雅溪	0-10	2.86	18.91	66.24	27.70
	10-20	3.05	18.25	64.59	27.08
	20-30	2.83	15.95	59.01	24.36
	30-40	2.52	14.13	60.56	24.24
	40-50	2.62	14.53	68.14	27.08
鹽港溪	0-10	3.77	32.79	133.29	53.41
	10-20	3.24	24.50	100.09	39.61
	20-30	3.60	37.25	127.89	53.43
二仁溪	0-10	5.76	71.72	213.25	92.75
	10-20	3.59	24.62	79.34	34.23
	20-30	2.70	16.06	50.74	22.14
	30-40	2.78	16.36	43.80	20.33
	40-50	5.35	47.85	132.49	59.71
平均值		3.35	26.18	98.51	40.33
標準差		0.94	15.65	60.00	23.10
最大值		5.76	71.72	250.45	92.75
最小值		2.52	14.13	43.80	20.33

總有機碳

總有機碳結果如下表 4-7，客雅溪及二仁溪第二次採樣的總有機碳比例有明顯變化，兩者的總有機碳比例自表面逐漸升高，分別於 20-30 公分及 10-20 公分處測得最高的總有機碳比例，爾後便隨著深度的增加而逐漸減少。採樣點中以二仁溪第二次採樣 10-20 公分處的總有機碳佔比最高，其次為客雅溪的 20-30 公分處。

表 4-7 總有機碳百分比

採樣點	深度	TOC (%)	
		第一次採樣	第二次採樣
客雅溪	0-10	0.030	0.031
	10-20	0.035	0.945
	20-30	0.032	0.954
	30-40	0.031	0.812
	40-50	0.031	0.772
鹽港溪	0-10	0.033	0.029
	10-20	0.030	0.026
	20-30	0.032	0.028
	30-40	0.027	無取樣
	40-50	0.027	無取樣
三姓公溪	0-10	0.038	0.044
	10-20	0.033	0.033
	20-30	0.030	0.032
二仁溪	0-10	0.898	0.708
	10-20	0.438	1.683
	20-30	0.749	0.899
	30-40	0.550	0.815
	40-50	0.454	0.653

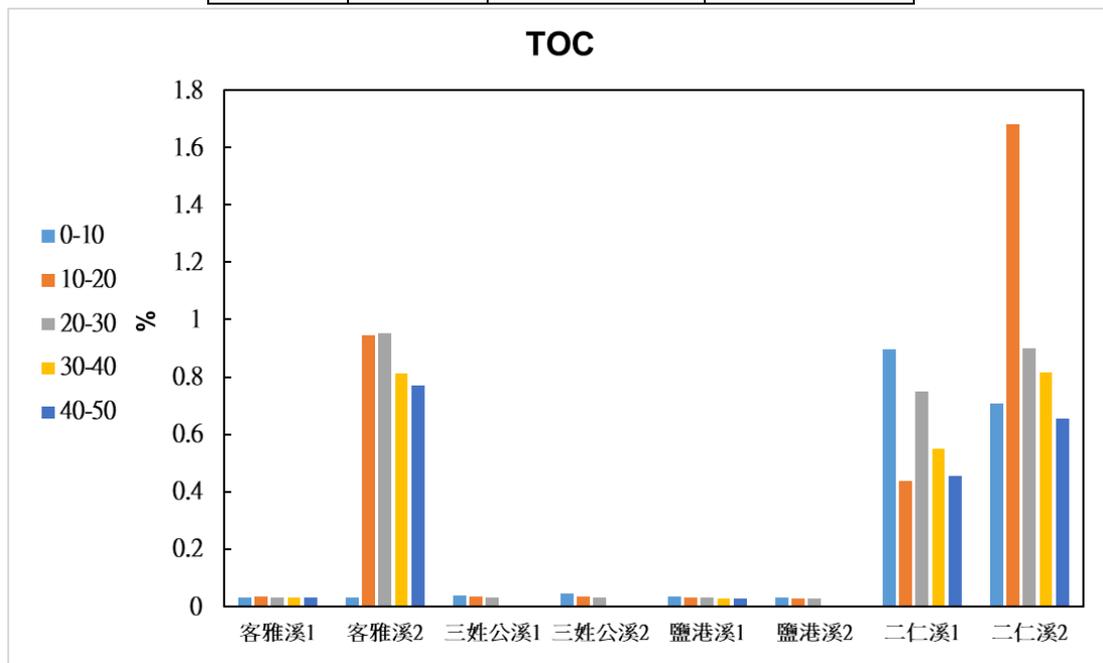


圖 4-4 底泥總有機碳分布

底泥重金屬

底泥經微波消化後以 ICP 儀器測量消化液中重金屬濃度，結果如表 4-8、表 4-9、表 4-10、表 4-11。本計畫分析目標中之鎘、鉻、鋅、鎳、鉛及銅等 6 種重金屬之濃度最高點集中於採樣點二仁溪，汞則為三姓公溪；若以新竹境內採樣點互相比較，三姓公溪及客雅溪在各個重金屬測量值皆有較高的濃度。

而深度與重金屬濃度的關係，則是隨著底泥深度達 10-20 公分處時出現較高的重金屬濃度，再往更深處重金屬濃度再度逐漸下降；7 項重金屬所檢測出平均值中，鋅的濃度最高，其次為銅。

表 4-8 客雅溪底泥重金屬含量(單位：mg/kg)

採樣點	深度	重金屬濃度 (mg/kg)及含水率(%)					
		鎘(Cd)		鉻(Cr)		銅(Cu)	
		①	②	①	②	①	②
客雅溪	0-10	1.18	1.27	42.16	43.21	40.34	45.41
	10-20	1.43	1.32	60.51	48.19	51.96	48.98
	20-30	1.46	1.39	60.65	55.02	46.57	96.00
	30-40	1.36	1.49	52.86	51.16	36.14	66.03
	40-50	1.41	1.36	49.12	46.93	26.50	62.62
採樣點	深度	汞(Hg)		鎳(Ni)		鉛(Pb)	
		①	②	①	②	①	②
		客雅溪	0-10	14.50	13.65	26.30	28.11
10-20	14.67		13.78	31.13	29.97	63.85	58.78
20-30	14.39		14.07	32.02	32.88	64.44	60.61
30-40	13.79		14.41	31.77	31.23	55.93	61.61
40-50	13.77		14.16	28.50	29.27	58.77	58.04
採樣點	深度	鋅(Zn)		含水率 (%)			
		①	②	①	②		
		客雅溪	0-10	90.32	99.55	1.63	1.23
10-20	113.35		110.96	1.76	1.76		
20-30	112.73		121.90	1.79	1.79		
30-40	97.78		115.72	0.98	1.87		
40-50	88.80		108.97	0.88	2.89		

表 4-9 鹽港溪底泥重金屬含量(單位：mg/kg)

採樣點	深度	重金屬濃度 (mg/kg)及含水率(%)					
		鎘(Cd)		鉻(Cr)		銅(Cu)	
		①	②	①	②	①	②
鹽港溪	0-10	0.95	0.85	32.83	28.84	25.17	22.19
	10-20	0.74	0.95	28.31	31.00	20.22	24.08
	20-30	0.81	0.67	27.75	25.50	22.00	19.07
	30-40	0.49	無取樣	12.49	無取樣	10.52	無取樣
	40-50	0.38	無取樣	13.05	無取樣	9.13	無取樣
採樣點	深度	汞(Hg)		鎳(Ni)		鉛(Pb)	
		①	②	①	②	①	②
鹽港溪	0-10	13.15	14.2	21.50	19.53	39.39	34.69
	10-20	13.78	13.57	17.30	21.10	32.29	37.52
	20-30	13.93	16.94	18.35	17.55	32.53	30.96
	30-40	13.51	無取樣	9.27	無取樣	15.13	無取樣
	40-50	13.72	無取樣	9.20	無取樣	16.63	無取樣
採樣點	深度	鋅(Zn)		含水率 (%)			
		①	②	①	②		
鹽港溪	0-10	87.26	74.16	3.35	3.66		
	10-20	67.27	77.94	3.40	2.91		
	20-30	76.82	64.37	4.20	3.81		
	30-40	45.18	無取樣	2.02	無取樣		
	40-50	41.51	無取樣	4.03	無取樣		

表 4-10 三姓公溪底泥重金屬含量(單位：mg/kg)

採樣點	深度	重金屬濃度 (mg/kg)及含水率(%)					
		鎘(Cd)		鉻(Cr)		銅(Cu)	
		①	②	①	②	①	②
三姓公溪	0-10	1.60	1.65	58.80	59.57	51.91	58.74
	10-20	1.66	1.45	60.37	53.88	50.65	49.51
	20-30	1.71	1.12	51.17	40.74	36.47	101.73
採樣點	深度	汞(Hg)		鎳(Ni)		鉛(Pb)	
		①	②	①	②	①	②
三姓公溪	0-10	23.62	15.88	36.72	35.02	66.44	66.05
	10-20	17.17	15.47	34.64	35.53	67.44	59.90

	20-30	15.06	14.69	35.50	27.20	53.29	46.73
採樣點	深度	鋅(Zn)		含水率 (%)			
		①	②	①	②		
三姓公溪	0-10	153.98	146.72	2.50	2.38		
	10-20	140.11	141.30	3.24	2.46		
	20-30	116.25	123.64	0.83	1.45		

表 4-11 二仁溪底泥重金屬含量(單位：mg/kg)

採樣點	深度	重金屬濃度 (mg/kg)及含水率(%)					
		鎘(Cd)		鉻(Cr)		銅(Cu)	
		①	②	①	②	①	②
二仁溪	0-10	4.59	4.66	80.16	143.66	111.05	207.06
	10-20	4.47	6.92	74.39	438.04	147.97	826.20
	20-30	4.92	5.31	175.29	117.00	261.54	127.79
	30-40	4.32	5.16	56.60	149.14	59.37	190.24
	40-50	4.38	5.63	54.24	175.99	134.82	403.07
採樣點	深度	汞(Hg)		鎳(Ni)		鉛(Pb)	
		①	②	①	②	①	②
二仁溪	0-10	14.96	13.93	46.65	92.97	79.77	94.40
	10-20	14.47	13.91	46.00	238.86	105.86	430.27
	20-30	13.69	13.95	79.49	62.51	121.98	112.54
	30-40	14.21	13.79	32.82	63.48	50.53	184.24
	40-50	14.46	13.89	37.41	84.81	62.83	151.01
採樣點	深度	鋅(Zn)		含水率 (%)			
		①	②	①	②		
二仁溪	0-10	165.87	256.96	0.81	1.20		
	10-20	224.96	863.44	1.11	5.16		
	20-30	356.26	205.64	1.82	3.12		
	30-40	108.92	311.39	1.62	3.17		
	40-50	215.00	490.37	1.50	2.38		

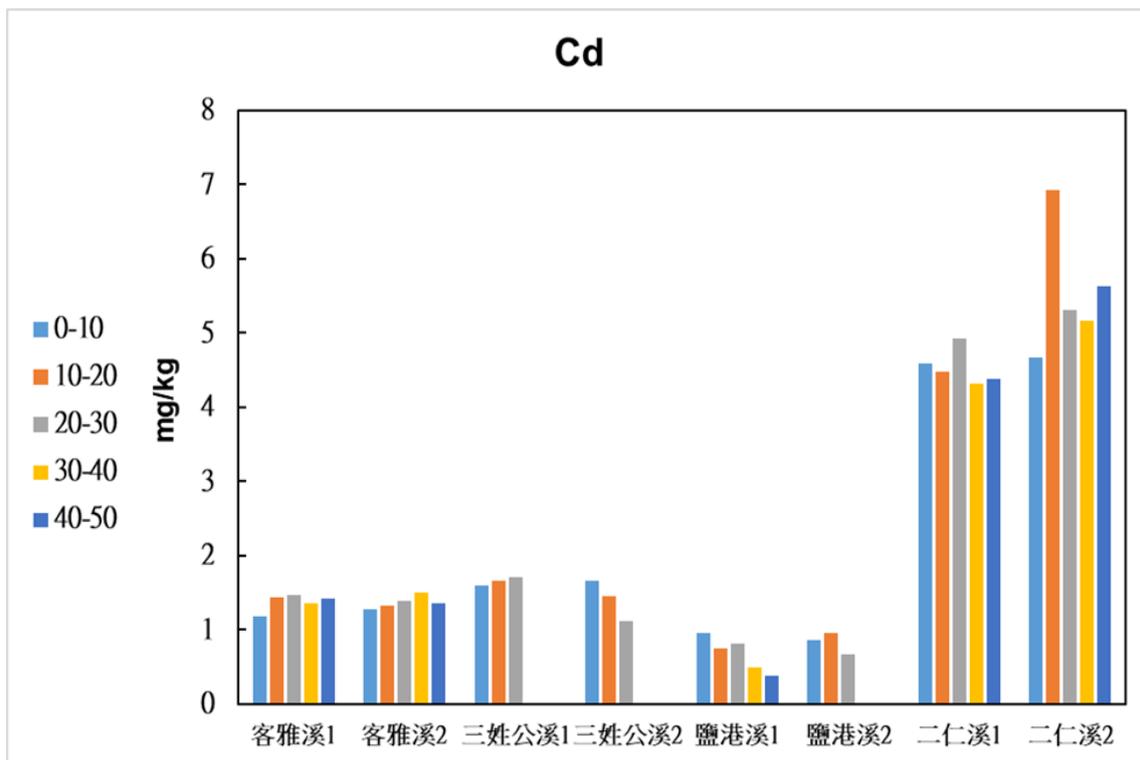


圖 4-5 底泥鎘分布

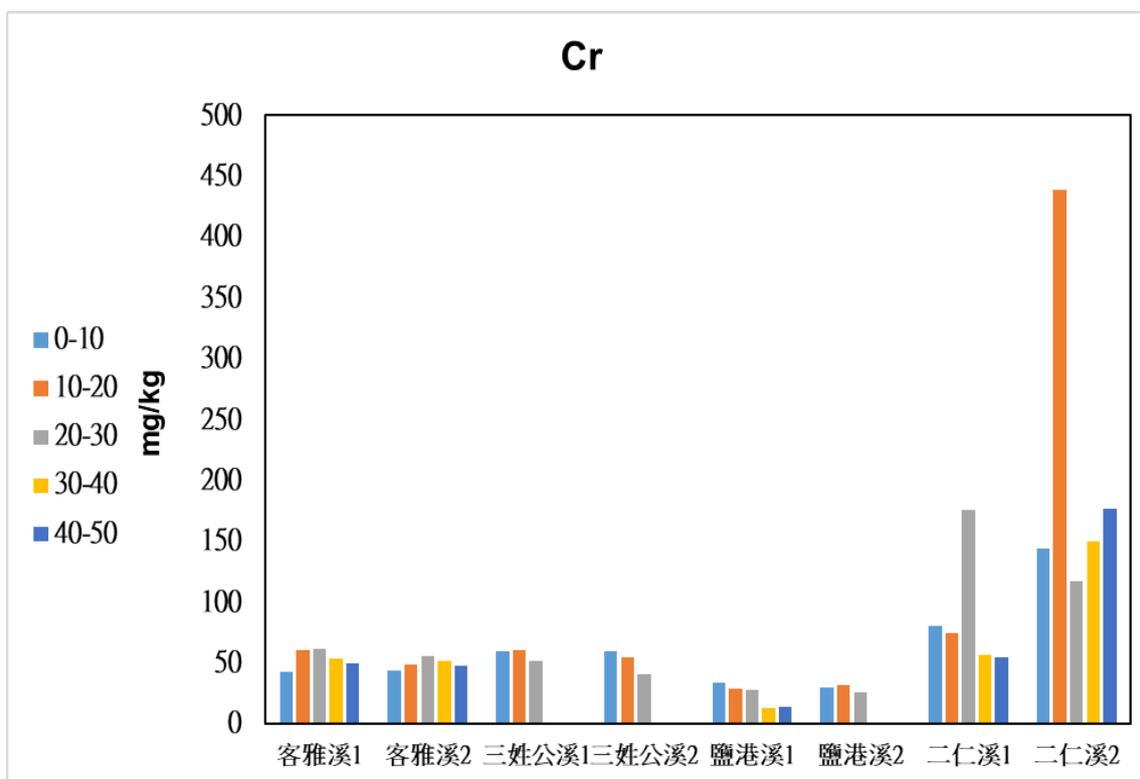


圖 4-6 底泥鉻分布

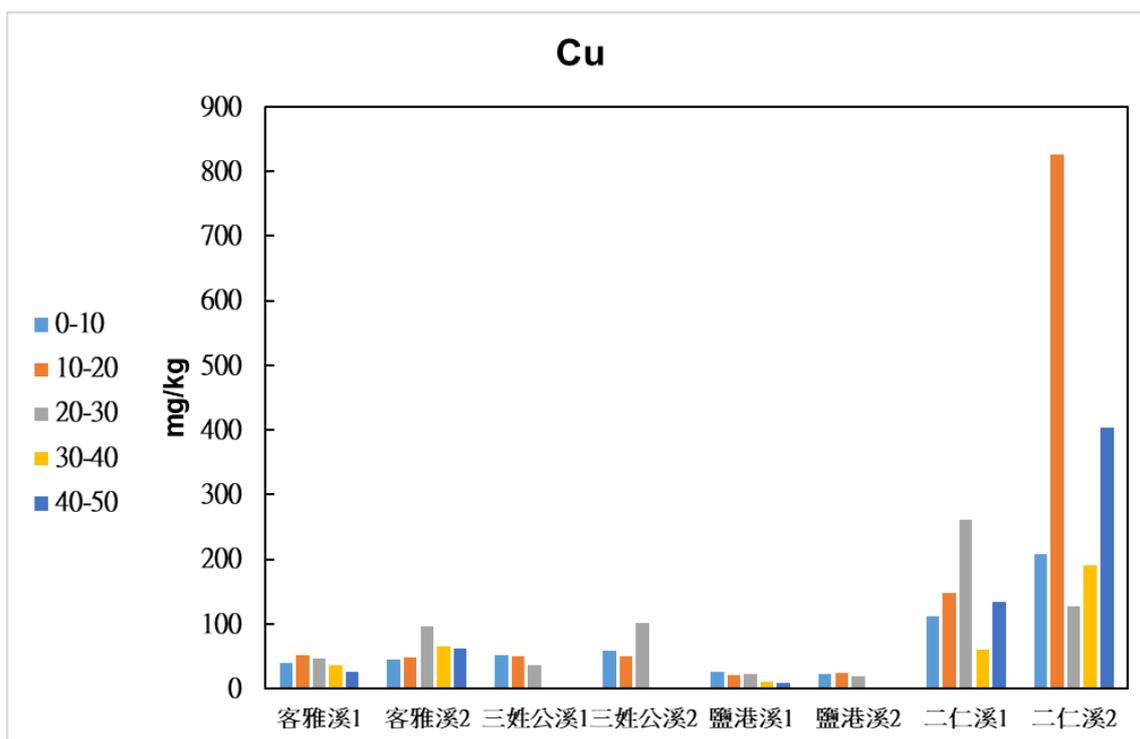


圖 4-7 底泥銅分布

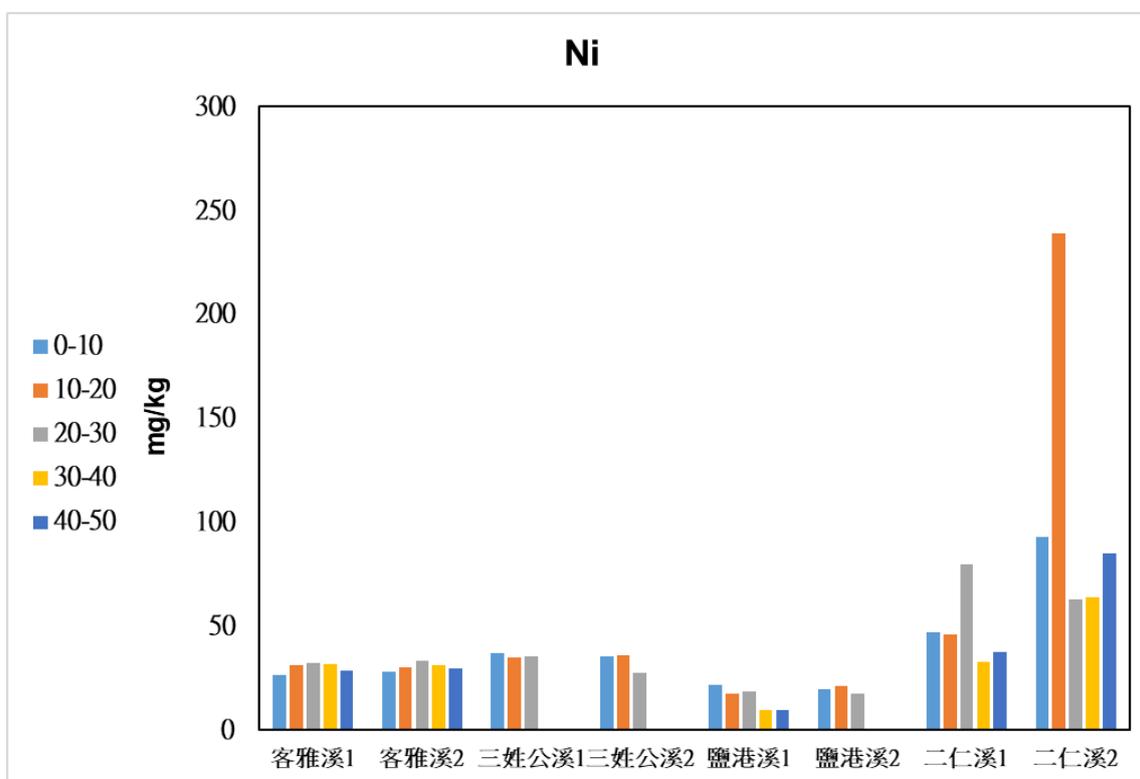


圖 4-8 底泥鎳分布

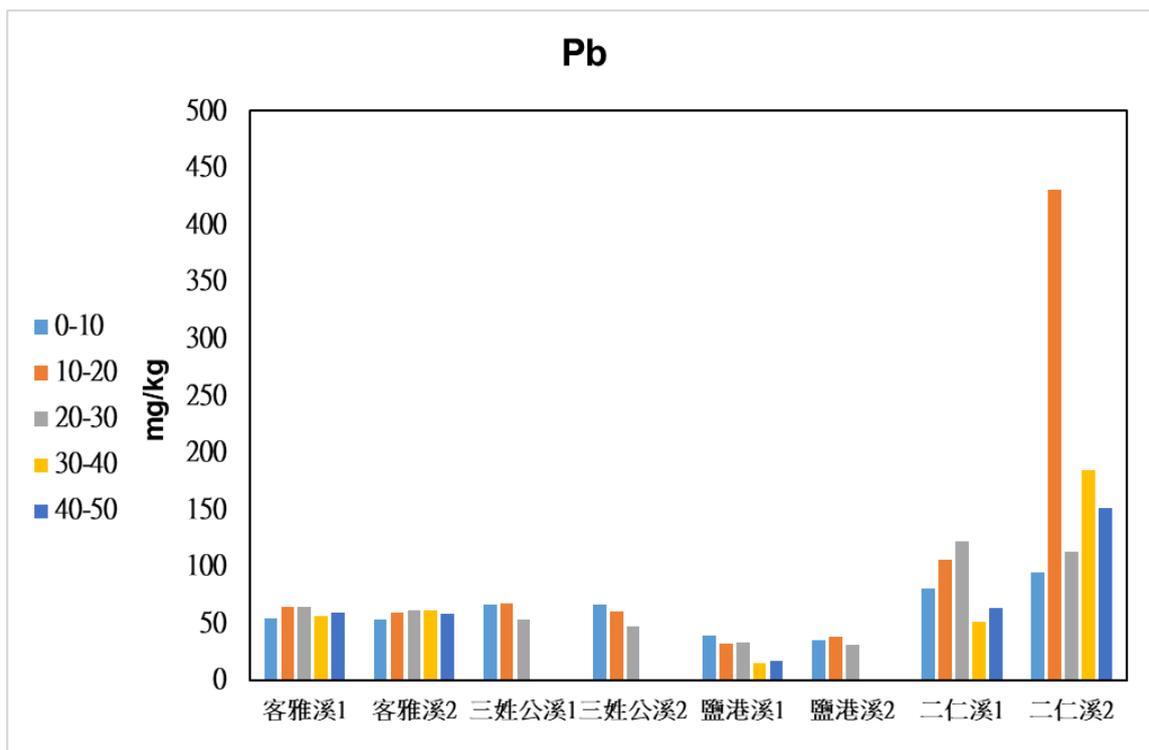


圖 4-9 底泥鉛分布

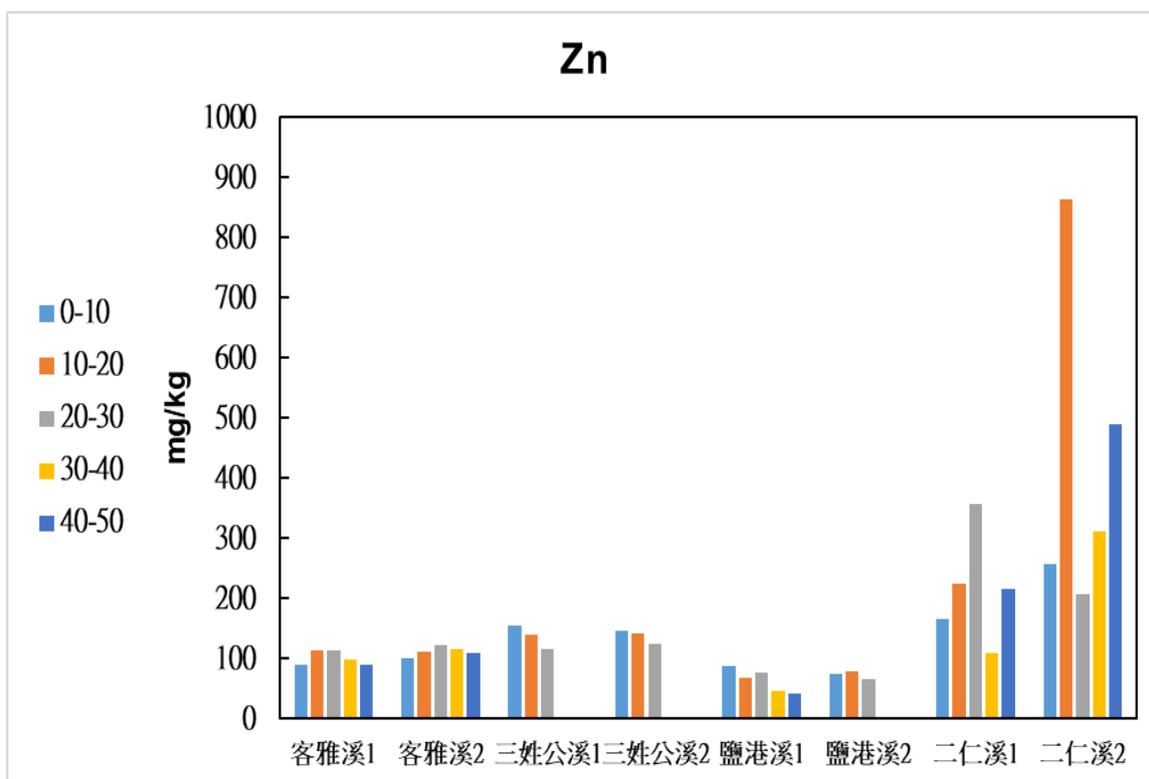


圖 4-10 底泥鋅分布

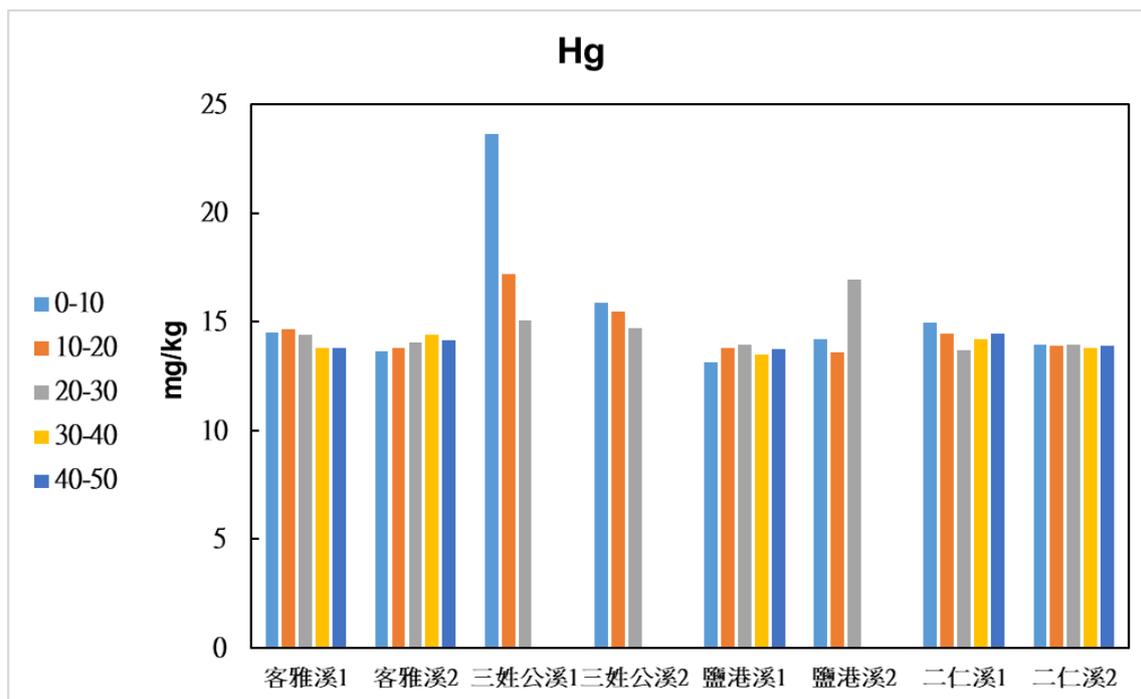


圖 4-11 底泥汞分布

表 4-12 重金屬與其他環境因子之皮爾森相關性分析

	Hg	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	TOC	pH	ec	C	N	H	Cl	sand	silt	clay
Hg	1	-0.122	-0.096	-0.124	-0.076	-0.074	-0.069	-0.221	-0.095	0.2	0.316	0.323	0.235	0.077	-0.204	0.205	0.186
Cd	-0.122	1	.785**	.769**	.762**	.751**	.807**	.735**	.820**	-0.18	.343*	.512**	0.125	-0.207	0.125	-0.107	-0.325
Cr	-0.096	.785**	1	.974**	.990**	.977**	.977**	.727**	.453**	-0.107	.575**	.643**	0.33	0.044	-0.069	0.083	-0.09
Cu	-0.124	.769**	.974**	1	.969**	.954**	.989**	.719**	.447**	-0.163	.482**	.549**	0.229	0.036	0.04	-0.026	-0.196
Ni	-0.076	.762**	.990**	.969**	1	.966**	.963**	.720**	.420*	-0.106	.569**	.632**	0.314	0.056	-0.047	0.06	-0.104
Pb	-0.074	.751**	.977**	.954**	.966**	1	.960**	.719**	.435*	-0.074	.601**	.663**	.377*	0.09	-0.138	0.151	-0.024
Zn	-0.069	.807**	.977**	.989**	.963**	.960**	1	.703**	.492**	-0.148	.523**	.608**	0.265	0.004	-0.004	0.019	-0.166

* 相關性在 0.05 層級上顯著 (雙尾)

** 相關性在 0.01 層級上顯著 (雙尾)

元素分析

底泥經元素分析儀測得碳、氮、氫之重量百分比，結果如及，碳、氮、氫元素可提供微生物生長所需能源，百分比總和高者，可能含有較多微生物。結果顯

示，碳氮氫重量的總和百分比不高，範圍由 0.335%到 2.104%，若不考慮深度，以客雅溪最高。

考慮深度後，最高者落於三姓公溪 0-10 公分處，其次為客雅溪 20-30 公分處，其總和百分比除了客雅溪的樣品之外，其他採樣點皆隨著深度的增加而減少。

表 4-13 第一次採樣底泥 CNH 元素重量百分比

①	深度 (cm)	Weight (mg)	C (%)	N (%)	H (%)	Total CNH 百分比
客雅溪	0-10	9.95	0.69	0.13	0.58	1.40
	10-20	9.26	1.03	0.13	0.82	1.98
	20-30	9.40	1.06	0.14	0.90	2.10
	30-40	9.95	0.93	0.12	0.82	1.88
	40-50	10.19	1.13	0.12	0.81	2.06
鹽港溪	0-10	9.74	0.48	0.09	0.58	1.14
	10-20	9.82	0.23	0.08	0.49	0.81
	20-30	9.68	0.24	0.09	0.54	0.87
	30-40	11.45	0.00	0.06	0.31	0.37
	40-50	11.07	0.00	0.05	0.29	0.34
三姓公溪	0-10	9.60	1.29	0.17	0.83	2.28
	10-20	9.11	0.92	0.16	0.79	1.88
	20-30	10.54	0.52	0.09	0.58	1.20
二仁溪	0-10	9.83	0.75	0.14	0.77	1.66
	10-20	9.56	0.36	0.11	0.43	0.91
	20-30	9.62	0.71	0.14	1.18	2.03
	30-40	9.73	0.47	0.11	0.50	1.08
	40-50	9.76	0.36	0.10	0.45	0.90

表 4-14 第二次採樣底泥 CNH 元素重量百分比

②	深度 (cm)	Weight (mg)	C (%)	N (%)	H (%)	Total CNH 百分比
客雅溪	0-10	10.31	0.75	0.13	0.65	1.53
	10-20	10.51	0.74	0.12	0.74	1.60
	20-30	10.38	0.80	0.12	0.77	1.69
	30-40	9.67	0.66	0.11	0.83	1.61
	40-50	9.31	0.63	0.14	0.80	1.57

鹽港溪	0-10	10.06	0.30	0.09	0.45	0.83
	10-20	9.87	0.34	0.10	0.51	0.95
	20-30	10.34	0.20	0.09	0.43	0.72
三姓公溪	0-10	9.43	1.02	0.15	0.75	1.92
	10-20	9.39	0.80	0.14	0.71	1.65
	20-30	9.81	0.55	0.09	0.54	1.18
二仁溪	0-10	10.13	0.59	0.13	0.48	1.20
	10-20	9.72	1.62	0.19	0.90	2.72
	20-30	9.61	0.80	0.13	0.68	1.61
	30-40	9.85	0.84	0.15	0.74	1.72
	40-50	9.50	0.76	0.13	0.58	1.47

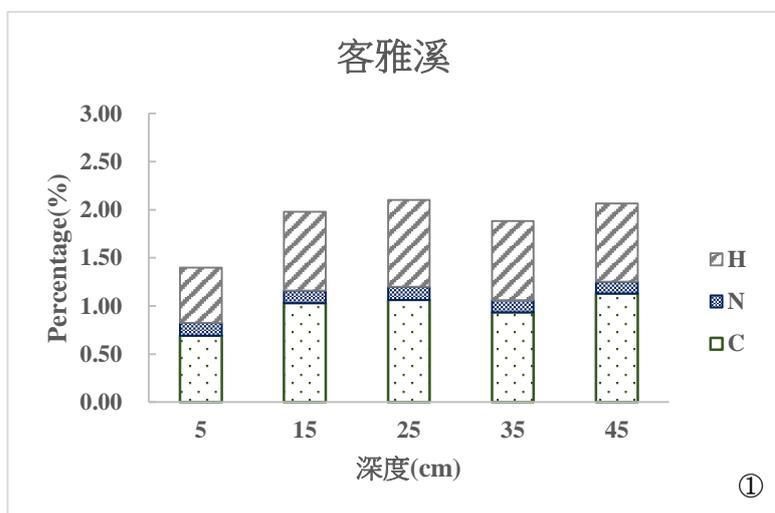


圖 4-12 第一次採樣客雅溪底泥碳氮氫分布

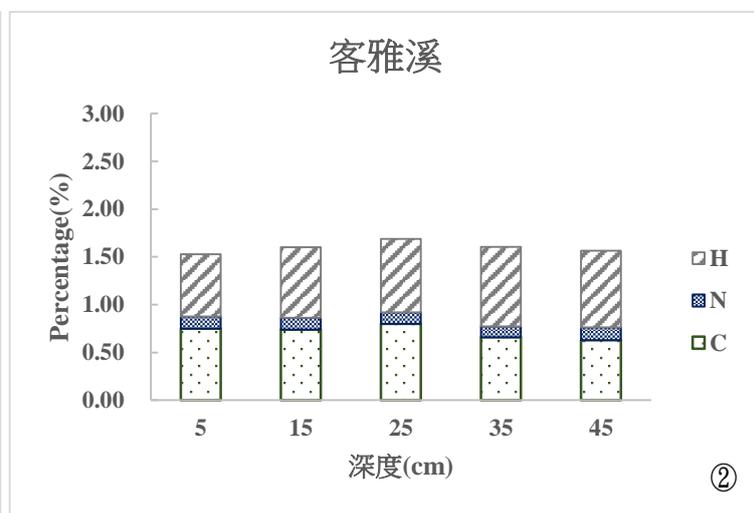


圖 4-13 第二次採樣客雅溪底泥碳氮氫分布

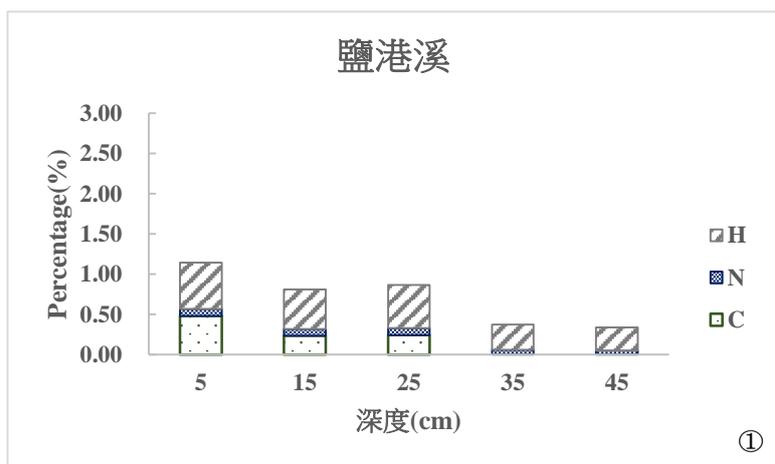


圖 4-14 第一次採樣鹽港溪底泥碳氮氫分布

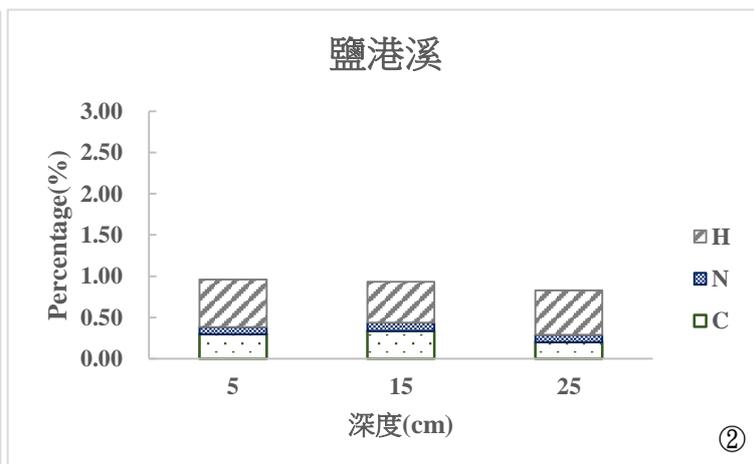


圖 4-15 第二次採樣鹽港溪底泥碳氮氫分布

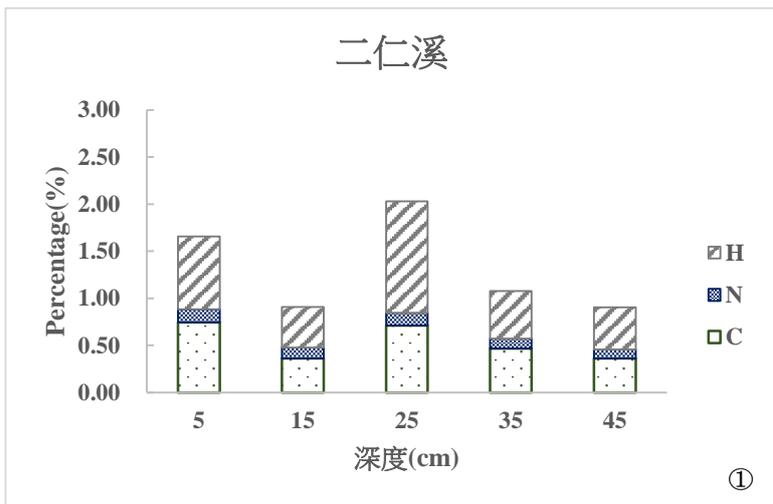


圖 4-16 第一次採樣二仁溪底泥碳氮氫分布

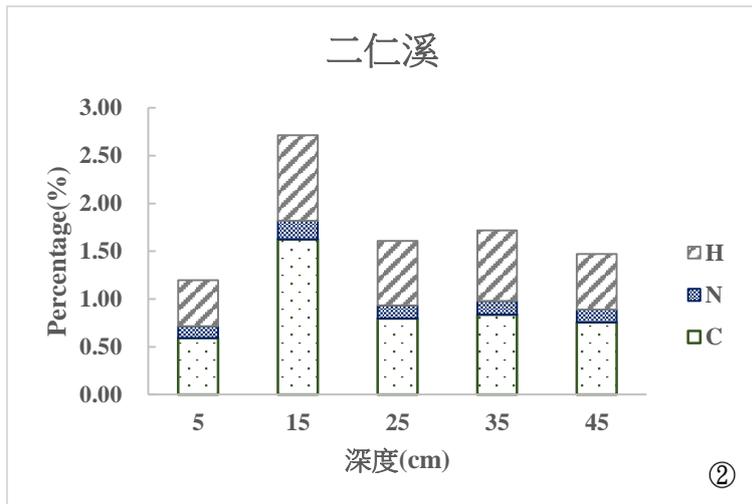


圖 4-18 第二次採樣二仁溪底泥碳氮氫分布

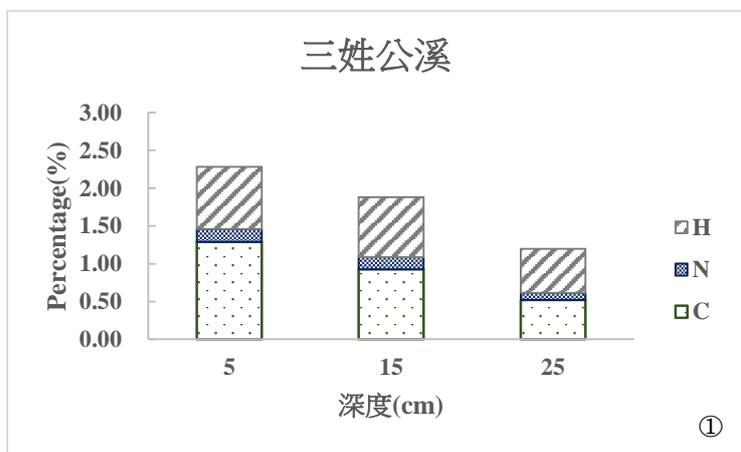


圖 4-17 第一次採樣三姓公溪底泥碳氮氫分布

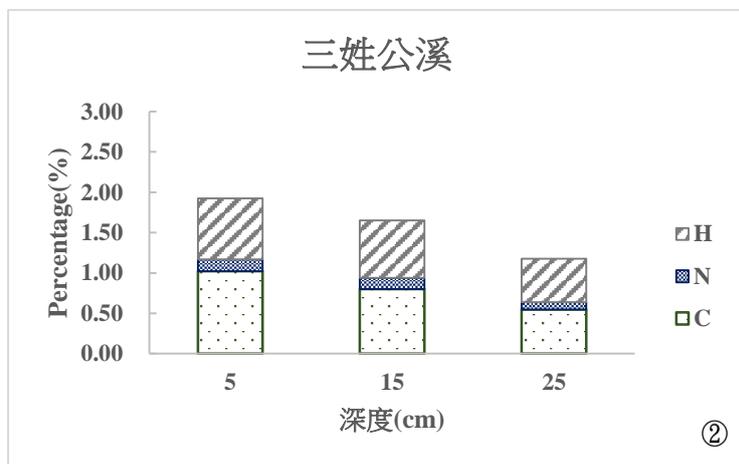


圖 4-19 第二次採樣三姓公溪底泥碳氮氫分布

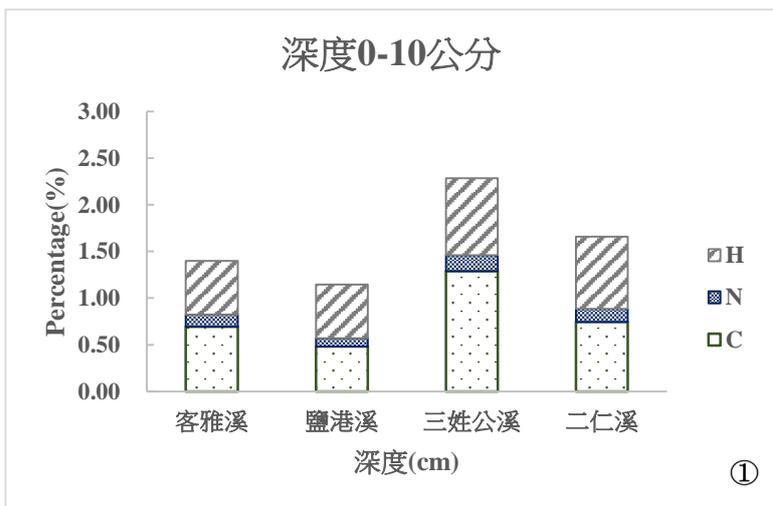


圖 4-20 第一次採樣 0-10 公分底泥碳氮氫分布

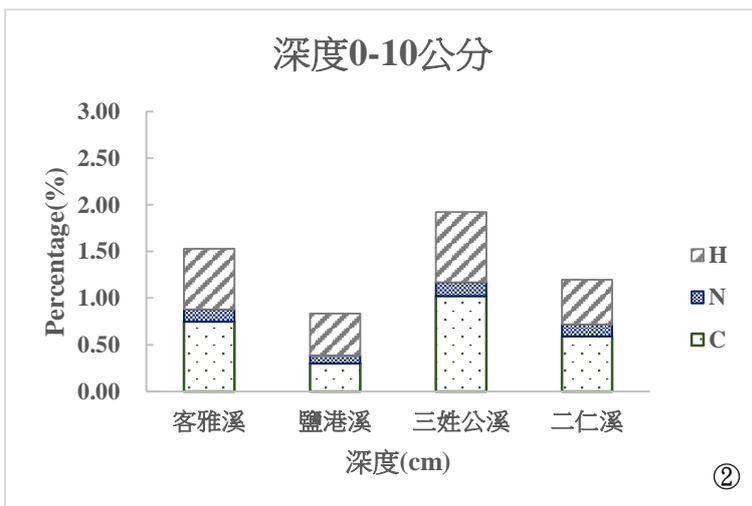


圖 4-21 第二次採樣 0-10 公分底泥碳氮氫分布

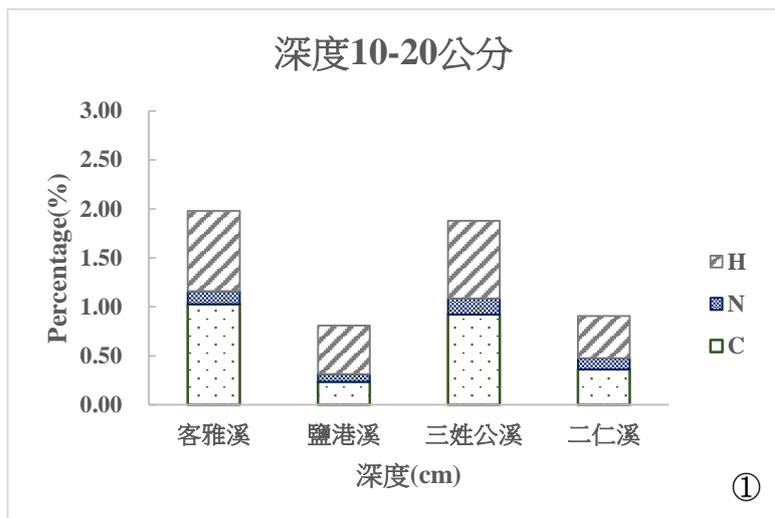


圖 4-22 第一次採樣 10-20 公分底泥碳氮氫分布

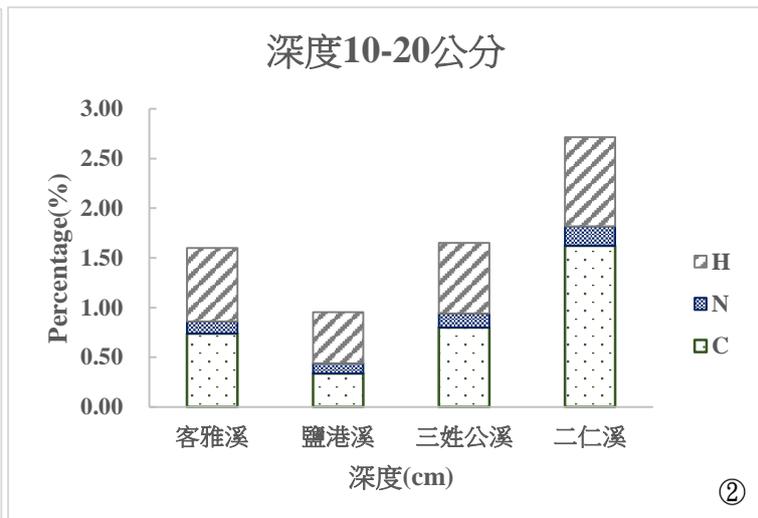


圖 4-23 第二次採樣 10-20 公分底泥碳氮氫分布

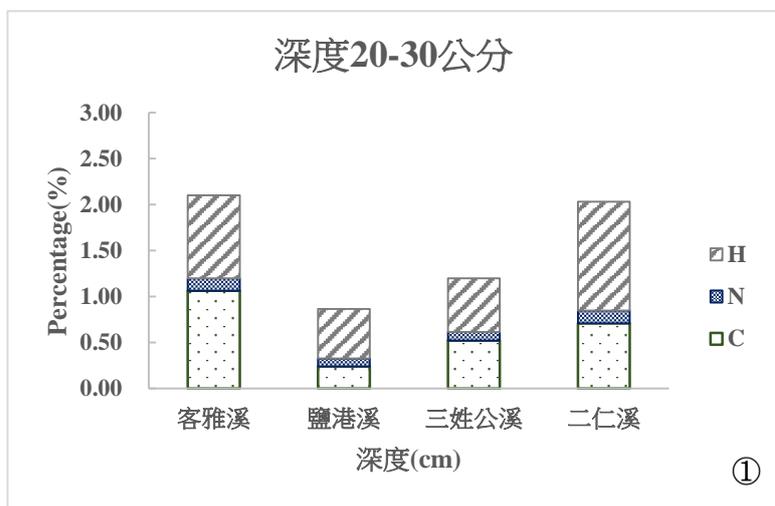


圖 4-24 第一次採樣 20-30 公分底泥碳氮氫分布

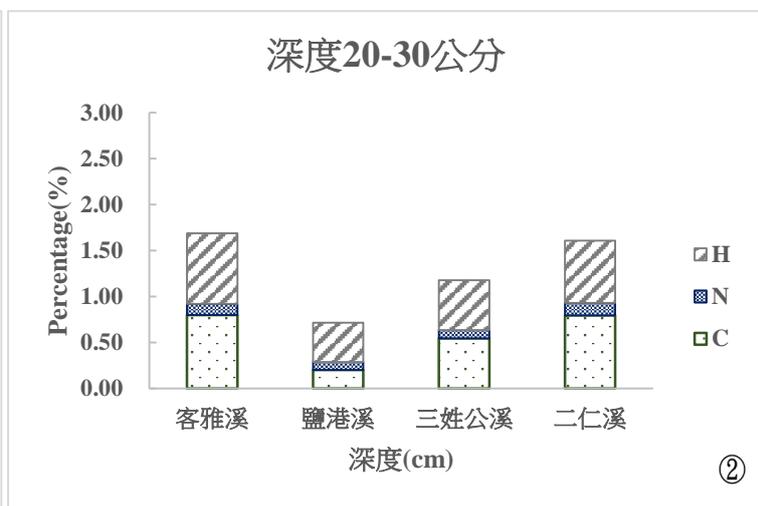


圖 4-25 第二次採樣 20-30 公分底泥碳氮氫分布

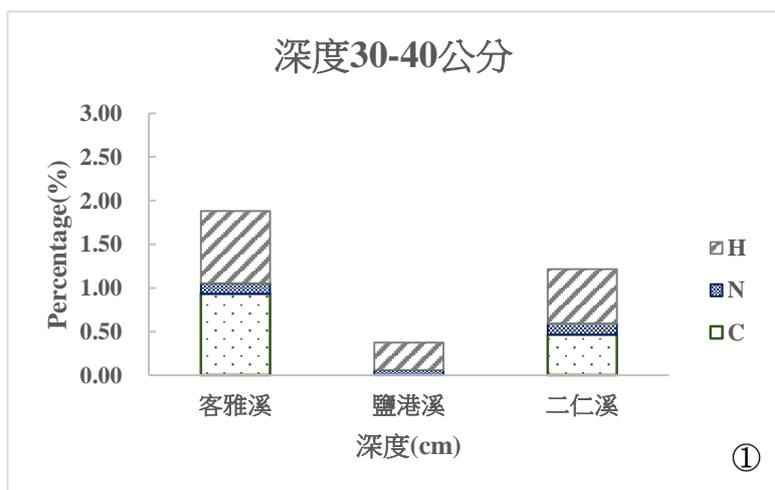


圖 4-26 第一次採樣 30-40 公分底泥碳氮氫分布

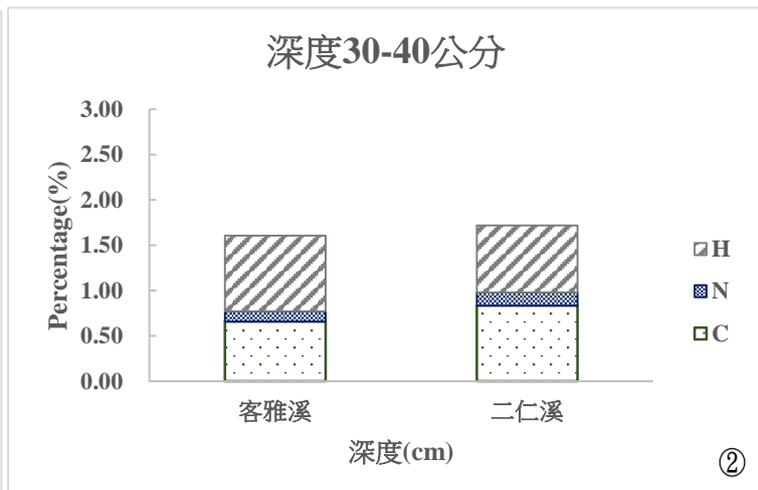


圖 4-27 第二次採樣 30-40 公分底泥碳氮氫分布

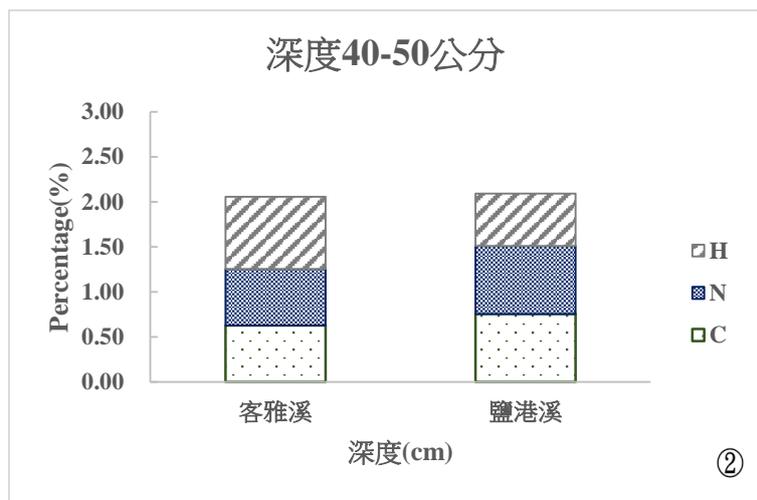
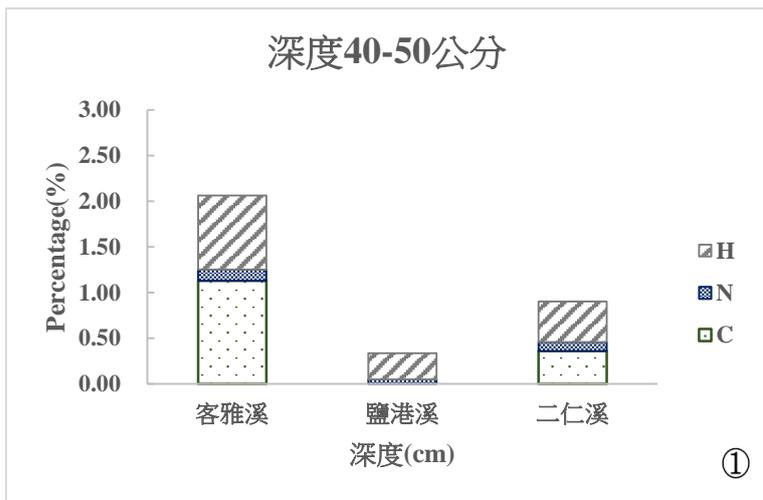


圖 4-28 第一次採樣 40-50 公分底泥碳氮氫分布

圖 4-29 第二次採樣 40-50 公分底泥碳氮氫分布

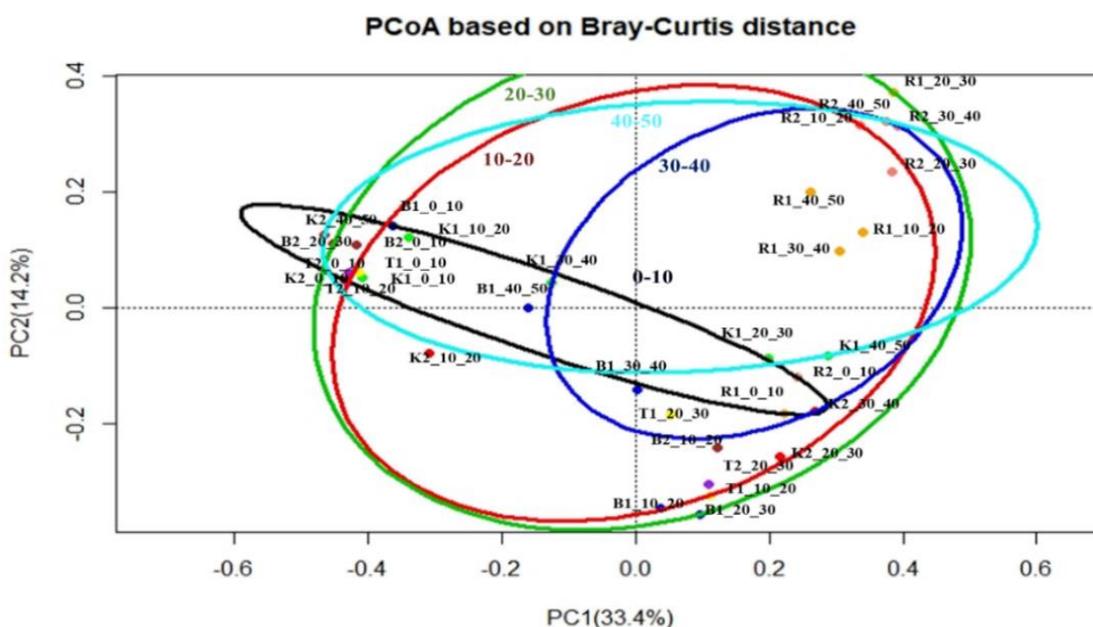
4.2 經 PCR 放大後之底泥 DNA 量

表 4-15 經 PCR 放大後之底泥 DNA 量

採樣點	深度	DNA conc. (ng/ul)		Vol. (ul)		Amt. (ug)	
		①	②	①	②	①	②
客雅溪	0-10	36.6	31.2	22	22	0.805	0.686
	10-20	30.7	25.7	22	22	0.675	0.565
	20-30	12.1	10.2	24	24	0.29	0.245
	30-40	27.2	1.9	22	22	0.598	0.041
	40-50	8.5	28.0	24	22	0.204	0.616
鹽港溪	0-10	4.8	8.2	22	24	0.105	0.197
	10-20	2.1	9.2	22	24	0.045	0.221
	20-30	39.4	9.6	22	24	0.867	0.230
	30-40	0.9	無取樣	22	無取樣	0.020	無取樣
	40-50	0.1	無取樣	22	無取樣	0.003	無取樣
三姓公溪	0-10	16.1	19.7	24	22	0.386	0.433
	10-20	1.1	19.1	22	22	0.023	0.420
	20-30	0.4	0.2	22	22	0.009	0.004
二仁溪	0-10	3.8	16.1	22	20	0.083	0.322
	10-20	7.8	18.2	22	17	0.171	0.309
	20-30	22.6	7.6	22	20	0.497	0.153
	30-40	1.4	8.7	22	20	0.031	0.174
	40-50	1.8	14.9	22	20	0.039	0.298

4.3 微生物族群分析與環境因子影響之探討

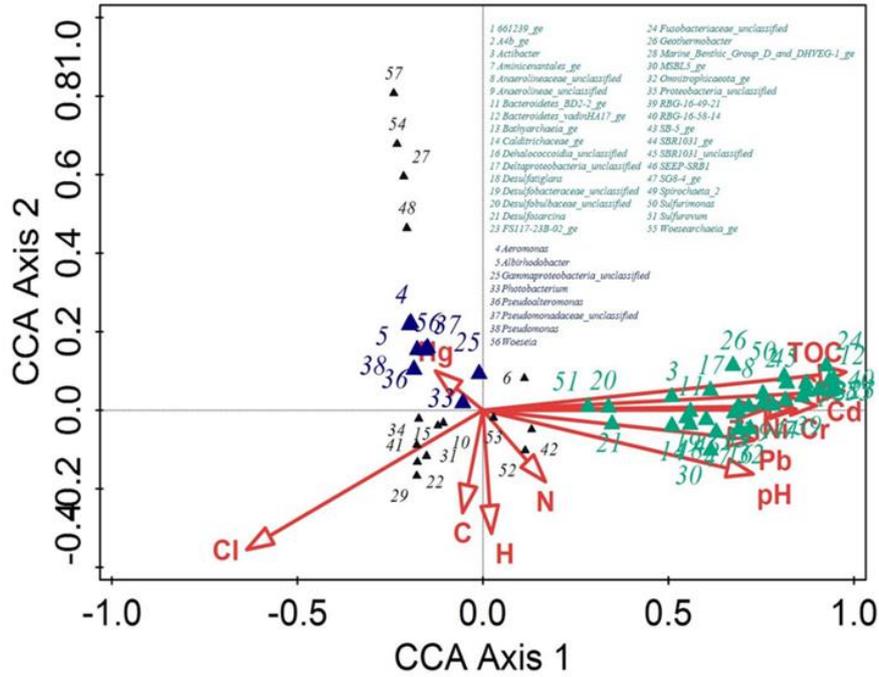
將所有樣品高通量定序結果進行主座標分析 PCoA (Principal Co-ordinates Analysis) 分析, PCoA 目的在於藉由一系列的特徵值和特徵向量排序, 進而從多維資料中找出最主要的元素和結構。本次 PCoA 分析基於 Bray-Curtis 距離來進行(Bray-Curtis similarity 含義為物種共有的個體數與兩群集規模平均的比值, 不僅考量物種組成也採計了各物種的豐度), 並選取貢獻率最大的主座標進行作圖。如果樣品距離越接近, 表示物種組成結構越相似, 因此群落結構相似度高的樣品會聚集在一起, 反之則分開。圖 4-30 為基於 Bray-Curtis 距離之 PCoA 圖, 其中客雅溪代號 K、三姓公溪代號 T、鹽港溪代號 B、二仁溪代號 R, 可以看出 R1、R2 之底層樣點之菌群組成較為相似, 皆聚集於 PCoA 圖的右上部, 其餘樣點分布則較無規律, 若將同一深度之樣點以 95%信心水準之橢圓作圖, 可以看出不同深度並不會有明顯之分群, 這顯示在考慮不同物種組成及豐度的情況下, 所有樣點間不同深度的樣品並無明顯的差異。圖 4-31 則將不同樣點之樣品以 95%信心水準之橢圓作圖, 可以看出 R1、R2 與 K1、K2、B1、B2、T1、T2 明顯分為兩群, 這顯示 R1、R2(重金屬濃度高)的物種組成及豐度與 K1、K2、B1、B2、T1、T2(重金屬濃度低)有所差異。



不過由於重金屬鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅彼此皆呈顯著正相關(表 4-12)，因此其於 CCA 圖中相當接近，較難區分，為了解單一重金屬對於各菌屬之影響程度，另外採用 pearson 相關性分析求得彼此之相關係數及其顯著性，將 CCA 及 pearson 分析篩選出之菌屬取交集，即為可能具有重金屬污染鑑識潛力之指標微生物。此外，由於相同樣點間不同深度分層之重金屬濃度差異不足以讓 CCA 分析及 pearson 相關性分析篩選出主要差異菌群，因此本計畫分析方式係將不同樣點之同一深度分層(如 0-10 公分)分為一群，探討不同樣點之同一分層的菌群組成差異是否受重金屬及其他環境因子影響，以下根據不同深度分層依序進行分析：

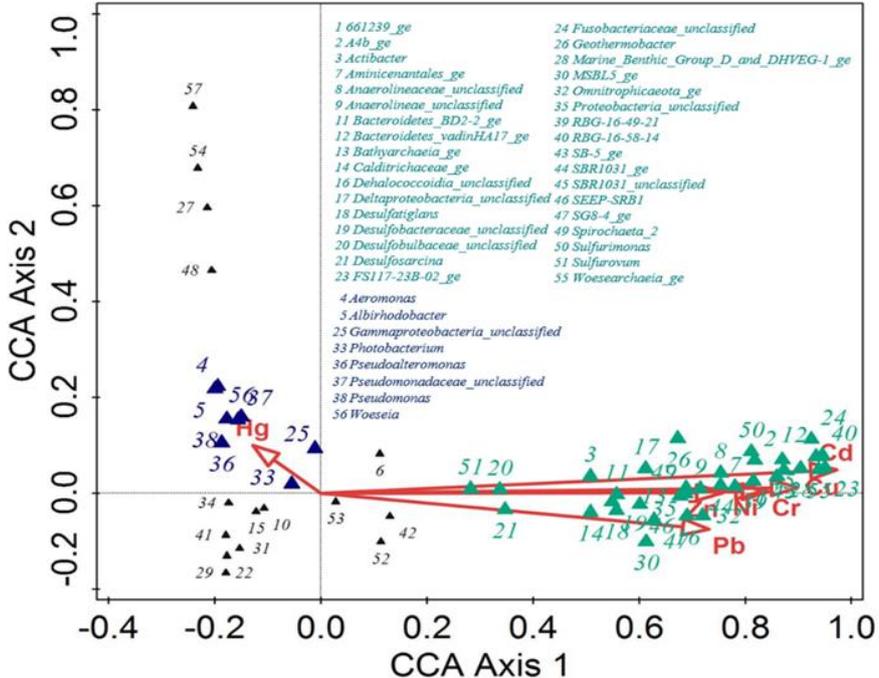
4.3.1 0-10 公分分層之樣品

圖 4-33 顯示在 0-10 公分分層之底泥中，與重金屬鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅正相關之菌屬有 34 屬，與汞正相關之菌屬則有 8 屬。另外，表 4-16 列出經 pearson 相關性分析後與重金屬顯著相關之菌屬，交叉比對 CCA 與 pearson 結果後，與鎘顯著正相關之菌屬有 28 屬、鉻有 19 屬、銅 23 屬、鉛 19 屬、鎳 18 屬、鋅 18 屬、汞則有 1 屬為 *Photobacterium*，其中同時與鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅皆為顯著正相關有 16 屬(表 4-17)。圖 4-34 選定與鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅相關之 16 屬菌屬於不同樣點所占總數之百分比 顯示這 16 屬菌屬在鎘、鉻、銅、鎳、鋅濃度最高之二仁溪樣點 2(R2)具有最高之豐度。



(註：綠色標記為該深度之樣品中與鎳、鉻、銅、鉛、鋅影響趨勢有正相關之菌屬(genus)，藍色標記則為與汞影響趨勢有正相關的菌屬(genus))

圖 4-32 河口 0-10 公分底泥樣品之菌屬受不同環境條件影響之典型關聯分析 (canonical correspondence analysis, CCA)結果



(註：綠色標記為該深度之樣品中與鎳、鉻、銅、鉛、鋅影響趨勢有正相關之菌屬(genus)，藍色標記則為與汞影響趨勢有正相關的菌屬(genus))

圖 4-33 河口 0-10 公分底泥樣品之菌屬受不同重金屬條件影響之典型關聯分析 (canonical correspondence analysis, CCA)結果

表 4-16 河口 0-10 公分底泥樣品之菌屬與不同重金屬之 pearson 相關性分析結果

genus	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Hg
<i>661239_ge</i>	0.928**	0.895**	.933**	.891**	.756*	.825*	-0.259
<i>A4b_ge</i>	0.886**	0.571	0.632	0.521	0.645	0.535	-0.17
<i>Actibacter</i>	0.868**	0.566	0.613	0.51	.718*	0.561	-0.027
<i>Aminicenantales_ge</i>	.928**	.915**	.949**	.914**	.781*	.850**	-0.224
<i>Anaerolineaceae_unclassified</i>	.970**	.757*	.808*	.723*	.770*	.717*	-0.15
<i>Anaerolineae_unclassified</i>	.922**	0.674	.732*	0.639	0.666	0.632	-0.21
<i>Bacteroidetes_BD2-2_ge</i>	.885**	0.644	0.688	0.605	.744*	0.634	0.015
<i>Bacteroidetes_vadinHA17_ge</i>	.878**	.966**	.982**	.974**	.812*	.902**	-0.15
<i>Bathyarchaea_ge</i>	.835**	0.508	0.574	0.464	0.546	0.471	-0.227
<i>Calditrichaceae_ge</i>	.895**	0.706	.758*	0.681	.730*	0.668	-0.145
<i>Dehalococcoidia_unclassified</i>	.805*	.771*	.812*	.774*	0.584	0.701	-0.339
<i>Deltaproteobacteria_unclassified</i>	.878**	.932**	.962**	.940**	.757*	.852**	-0.262
<i>Desulfatiglans</i>	.843**	.846**	.885**	.855**	0.669	.772*	-0.296
<i>Desulfobacteraceae_unclassified</i>	.854**	.936**	.943**	.945**	.827*	.902**	0.003
<i>Desulfobulbaceae_unclassified</i>	.718*	0.53	0.529	0.487	.731*	0.594	0.428
<i>Desulfosarcina</i>	0.601	0.565	0.535	0.546	0.701	0.646	0.568
<i>FS117-23B-02_ge</i>	.744*	.925**	.935**	.950**	.709*	.848**	-0.215
<i>Geothermobacter</i>	.759*	.924**	.937**	.946**	.716*	.846**	-0.217
<i>Marine_Benthic_Group_D_and_DHVEG-1_ge</i>	.952**	.909**	.947**	.901**	.793*	.842**	-0.235
<i>MSBL5_ge</i>	0.606	0.683	.709*	0.706	0.425	0.611	-0.36
<i>Omnitrophicaeota_ge</i>	0.7	.834*	.853**	.860**	0.584	.756*	-0.304
<i>Photobacterium</i>	-0.083	-0.014	-0.11	-0.027	0.165	0.156	.990**
<i>Proteobacteria_unclassified</i>	.776*	.930**	.945**	.953**	.724*	.855**	-0.223
<i>RBG-16-49-21</i>	.899**	.933**	.962**	.938**	.775*	.865**	-0.226
<i>RBG-16-58-14</i>	.962**	.920**	.957**	.911**	.820*	.854**	-0.205
<i>SB-5_ge</i>	.910**	.952**	.979**	.956**	.810*	.882**	-0.202
<i>SBR1031_ge</i>	.885**	0.59	0.652	0.548	0.611	0.552	-0.217
<i>SBR1031_unclassified</i>	.904**	0.602	0.662	0.556	0.658	0.569	-0.164
<i>SEEP-SRB1</i>	.858**	.925**	.948**	.936**	.782*	.865**	-0.162
<i>SG8-4_ge</i>	.782*	0.659	.709*	0.652	0.507	0.599	-0.342
<i>Spirochaeta_2</i>	.958**	.803*	.856**	.783*	.750*	.745*	-0.236
<i>Sulfurovum</i>	0.428	0.251	0.205	0.194	0.525	0.401	.734*
<i>Woesearchaea_ge</i>	.794*	.936**	.951**	.956**	.732*	.860**	-0.227

次世代定序方法應用於污染鑑識技術開發

* 相關性在 0.05 層級上顯著 (雙尾)

** 相關性在 0.01 層級上顯著 (雙尾)

表 4-17 河口 0-10 公分底泥樣品與鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅皆呈正相關之菌屬

genus
<i>661239_ge</i>
<i>Aminicenantales_ge</i>
<i>Anaerolineaceae_unclassified</i>
<i>Bacteroidetes_vadinHA17_ge</i>
<i>Deltaproteobacteria_unclassified</i>
<i>Desulfobacteraceae_unclassified</i>
<i>FS117-23B-02_ge</i>
<i>Geothermobacter</i>
<i>Marine_Benthic_Group_D_and_DHVEG-1_ge</i>
<i>Proteobacteria_unclassified</i>
<i>RBG-16-49-21</i>
<i>RBG-16-58-14</i>
<i>SB-5_ge</i>
<i>SEEP-SRB1</i>
<i>Spirochaeta_2</i>
<i>Woesearchaeia_ge</i>

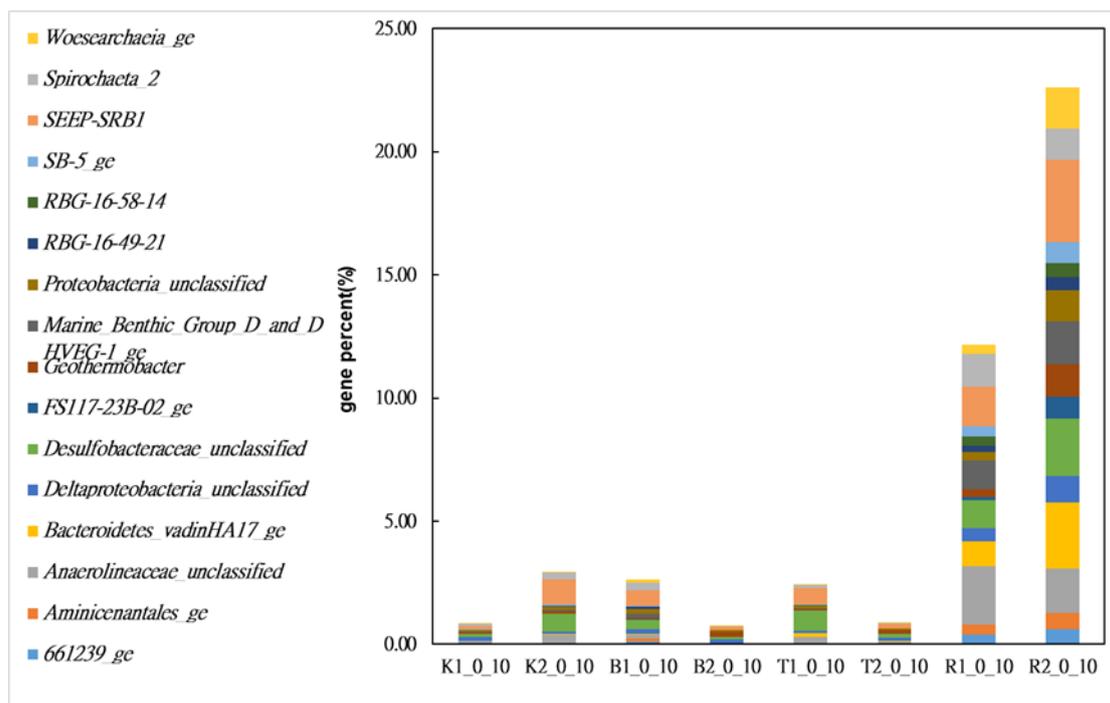
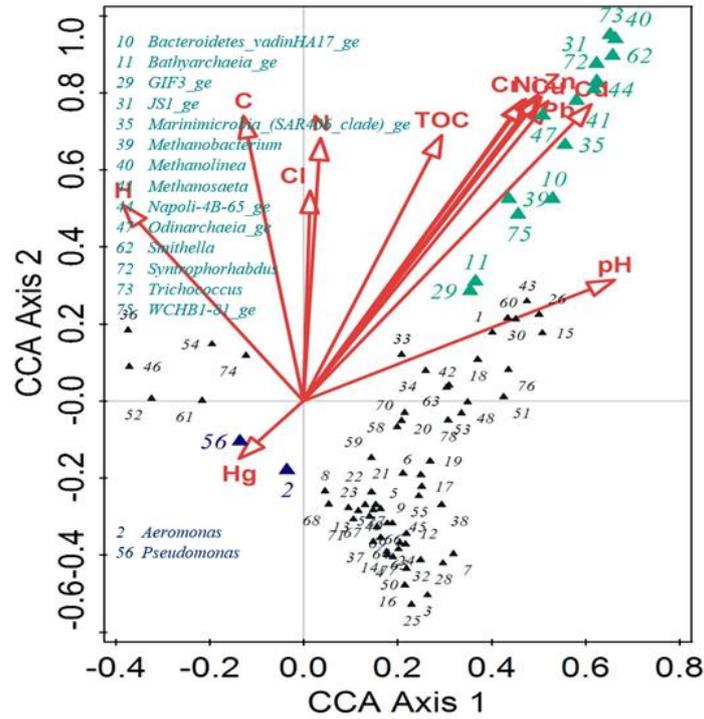


圖 4-34 選定與鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅相關之 16 屬菌屬於不同樣點所占總數之百分比

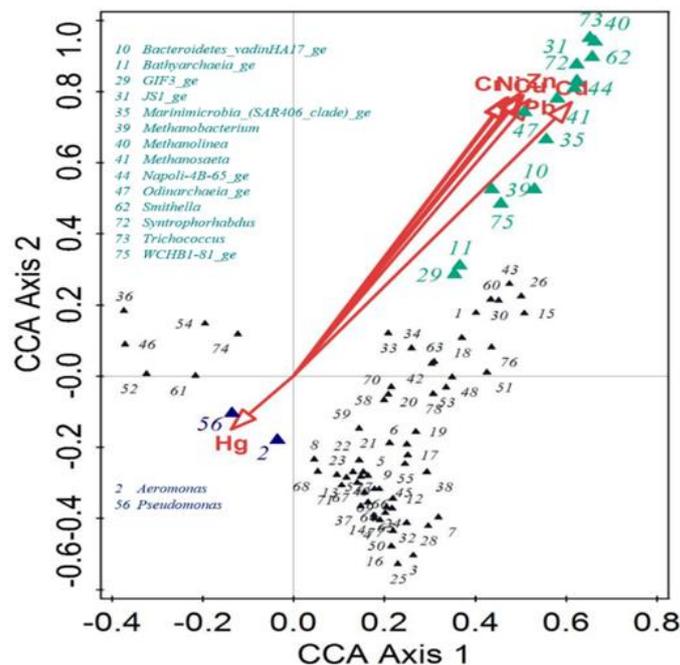
4.3.2 10-20 公分分層之樣品

表 4-18 顯示在 10-20 公分分層之底泥中，與重金屬鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅正相關之菌屬有 14 屬，與汞正相關之菌屬則有 2 屬。另外，表 4-18 列出經 pearson 相關性分析後與重金屬顯著相關之菌屬，交叉比對 CCA 與 pearson 結果後，與鉻、銅、鉛、鎳、鋅顯著正相關之菌屬有 13 屬且皆為相同菌屬(表 4-19)，鎘為 14 屬，多出 *Bathyarchaia_ge*，汞則無法篩選出共同菌屬。圖 4-37 顯示這 13 屬菌屬在鎘、鉻、銅、鎳、鋅濃度最高之二仁溪樣點 2(R2)具有最高之豐度。



註：綠色標記為該深度之樣品中與鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅影響趨勢有正相關之菌屬(genus)，藍色標記則為與汞影響趨勢有正相關的菌屬(genus))

圖 4-35 河口 10-20 公分底泥樣品之菌屬受不同環境條件影響之典型關聯分析 (canonical correspondence analysis, CCA)結果



(註：綠色標記為該深度之樣品中與鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅影響趨勢有正相關之菌屬(genus)，藍色標記則為與汞影響趨勢有正相關的菌屬(genus))

圖 4-36 河口 10-20 公分底泥樣品之菌屬受不同重金屬條件影響之典型關聯分析 (canonical correspondence analysis, CCA)結果

表 4-18 河口 10-20 公分底泥樣品之菌屬與不同重金屬之 pearson 相關性分析結果

genus	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Hg
<i>B2M28_ge</i>	-0.416	-0.376	-0.413	-0.374	-0.386	-0.377	.822*
<i>Bacteroidetes_vadinHA17_ge</i>	.844**	.941**	.933**	.940**	.940**	.940**	0.073
<i>Bathyarchaeia_ge</i>	.861**	0.614	0.663	0.618	0.659	0.66	-0.334
<i>Chloroplast_ge</i>	-0.081	-0.014	-0.053	-0.021	-0.026	-0.025	.791*
<i>GIF3_ge</i>	.914**	.767*	.802*	.766*	.799*	.795*	-0.305
<i>JS1_ge</i>	.844**	.993**	.988**	.992**	.985**	.982**	-0.209
<i>Marinimicrobia_(SAR406_clade)_ge</i>	.869**	.990**	.989**	.989**	.986**	.984**	-0.181
<i>Methanobacterium</i>	.817*	.974**	.960**	.969**	.964**	.957**	-0.086
<i>Methanolinea</i>	.847**	.991**	.989**	.991**	.984**	.981**	-0.249
<i>Methanosaeta</i>	.860**	.993**	.990**	.992**	.987**	.984**	-0.22
<i>Napoli-4B-65_ge</i>	.897**	.989**	.995**	.990**	.990**	.988**	-0.268
<i>Odinarchaeia_ge</i>	.851**	.994**	.987**	.991**	.987**	.981**	-0.201
<i>Smithella</i>	.838**	.986**	.984**	.986**	.978**	.976**	-0.264
<i>Sulfurovum</i>	-0.309	-0.25	-0.289	-0.251	-0.26	-0.256	.793*
<i>Syntrophorhabdus</i>	.846**	.990**	.987**	.989**	.983**	.980**	-0.23
<i>Trichococcus</i>	.839**	.992**	.988**	.991**	.984**	.981**	-0.231
<i>WCHB1-81_ge</i>	.805*	.963**	.963**	.963**	.954**	.950**	-0.306

* 相關性在 0.05 層級上顯著 (雙尾)

** 相關性在 0.01 層級上顯著 (雙尾)

表 4-19 河口 10-20 公分底泥樣品與鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅皆呈正相關之菌屬

genus	
<i>Bacteroidetes_vadinHA17_ge</i>	<i>Napoli-4B-65_ge</i>
<i>GIF3_ge</i>	<i>Odinarchaeia_ge</i>
<i>JS1_ge</i>	<i>Smithella</i>
<i>Marinimicrobia_(SAR406_clade)_ge</i>	<i>Syntrophorhabdus</i>
<i>Methanobacterium</i>	<i>Trichococcus</i>
<i>Methanolinea</i>	<i>WCHB1-81_ge</i>
<i>Methanosaeta</i>	

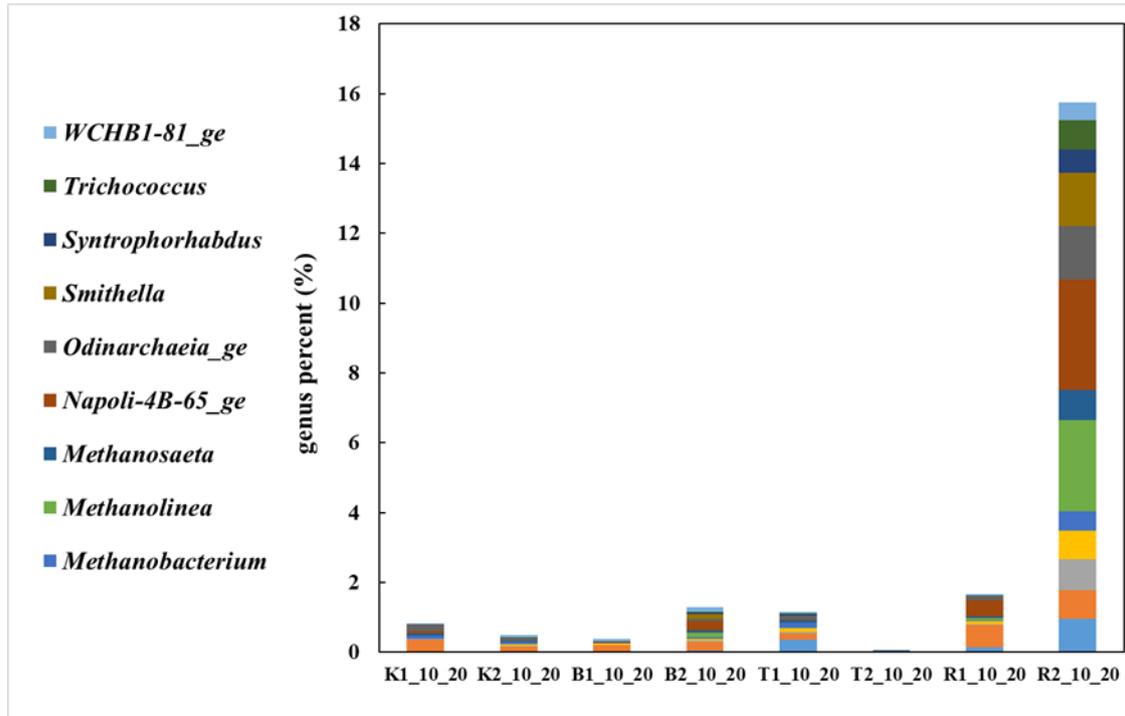
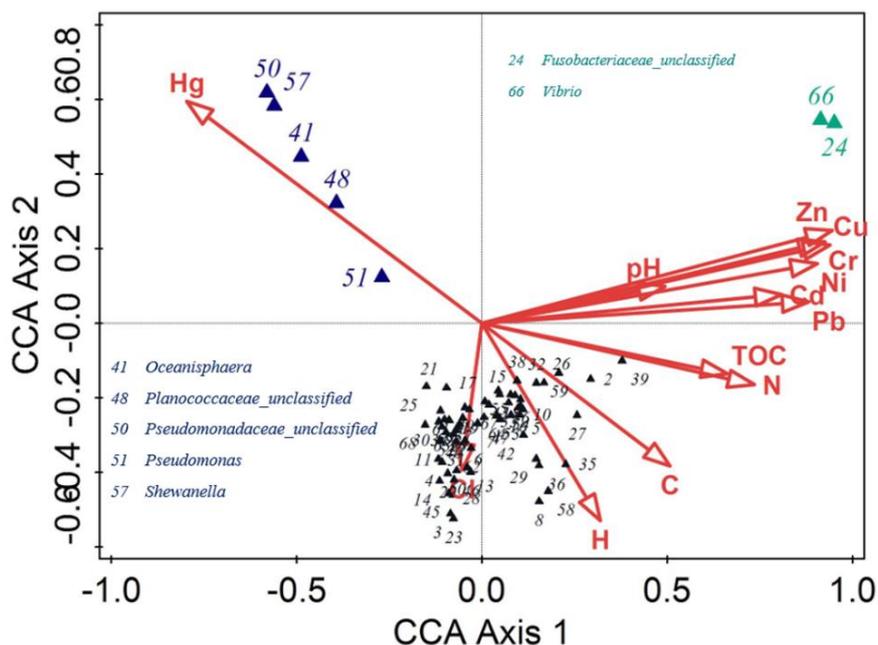


圖 4-37 選定與鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅相關之 13 屬菌屬於不同樣點所占總數之百分比

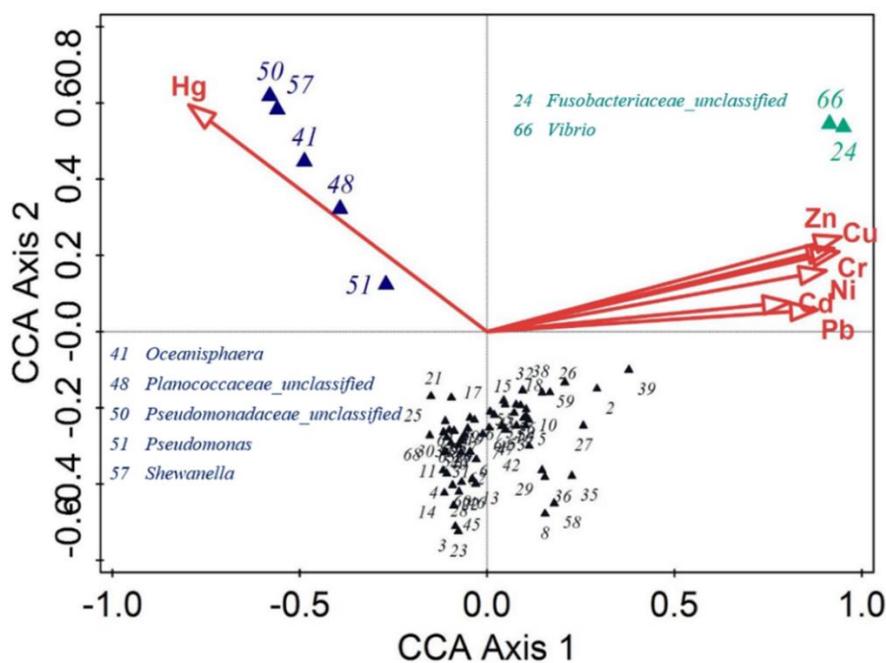
4.3.3 20-30 公分分層之樣品

圖 4-39 顯示在 20-30 公分分層之底泥中，與重金屬鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅正相關之菌屬僅有 2 屬，與汞正相關之菌屬則有 5 屬。另外，表 4-20 列出經 pearson 相關性分析後與重金屬顯著相關之菌屬，交叉比對 CCA 與 pearson 結果後，與鉻、銅、鎳、鋅皆顯著正相關之菌群有 2 屬，分別為 *Fusobacteriaceae_unclassified*、*Vibrio*，與汞顯著正相關之菌屬有 4 屬，為 *Oceanisphaera*、*Planococcaceae_unclassified*、*Pseudomonadaceae_unclassified*、*Shewanella*，另外並無法篩選出與鎘及鉛相關之菌屬。圖 4-40 顯示 *Fusobacteriaceae_unclassified*、*Vibrio* 在鉻、銅、鎳、鋅濃度最高之二仁溪樣點 1(R1)具有最高之豐度，而圖 4-41 則顯示 *Oceanisphaera*、*Planococcaceae_unclassified*、*Pseudomonadaceae_unclassified*、*Shewanella* 在汞濃度最高之鹽港溪樣點 2(B2)具有最高之豐度。



註：綠色標記為該深度之樣品中與鎳、鉻、銅、鉛、鎳、鋅影響趨勢有正相關之菌屬(genus)，藍色標記則為與汞影響趨勢有正相關的菌屬(genus)

圖 4-38 河口 20-30 公分底泥樣品之菌屬受不同環境條件影響之典型關聯分析 (canonical correspondence analysis, CCA)結果



(註：綠色標記為該深度之樣品中與鎳、鉻、銅、鉛、鎳、鋅影響趨勢有正相關之菌屬(genus)，藍色標記則為與汞影響趨勢有正相關的菌屬(genus))

圖 4-39 河口 20-30 公分底泥樣品之菌屬受不同重金屬條件影響之典型關聯分析 (canonical correspondence analysis, CCA)結果

表 4-20 河口 20-30 公分底泥樣品之菌屬與不同重金屬之 pearson 相關性分析結果

genus	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Hg
<i>Oceanisphaera</i>	-0.391	-0.415	-0.431	-0.427	-0.48	-0.413	.975**
<i>Planococcaceae_unclassified</i>	-0.365	-0.404	-0.429	-0.437	-0.464	-0.418	.921**
<i>Spirochaeta_2</i>	.862**	.890**	.846**	.898**	.895**	.882**	-.845**
<i>Pseudomonadaceae_unclassified</i>	-0.333	-0.349	-0.361	-0.387	-0.411	-0.362	.916**
<i>Shewanella</i>	-0.349	-0.366	-0.376	-0.398	-0.431	-0.373	.935**
<i>Acetothermiiia_ge</i>	.948**	.844**	.773*	.881**	.930**	.784*	-0.595
<i>Napoli-4B-65_ge</i>	.980**	.877**	.745*	.901**	.948**	.801*	-0.51
<i>GIF9_ge</i>	.853**	0.612	0.465	0.678	.759*	0.512	-0.383
<i>Fusobacteriaceae_unclassified</i>	0.606	.836**	.869**	.772*	0.673	.899**	-0.35
<i>Vibrio</i>	0.593	.826*	.860**	.760*	0.659	.890**	-0.325
<i>Methanolinea</i>	.756*	0.468	0.288	0.54	0.636	0.348	-0.291
<i>Methanosaeta</i>	.717*	0.417	0.227	0.499	0.601	0.290	-0.284

* 相關性在 0.05 層級上顯著（雙尾）

** 相關性在 0.01 層級上顯著（雙尾）

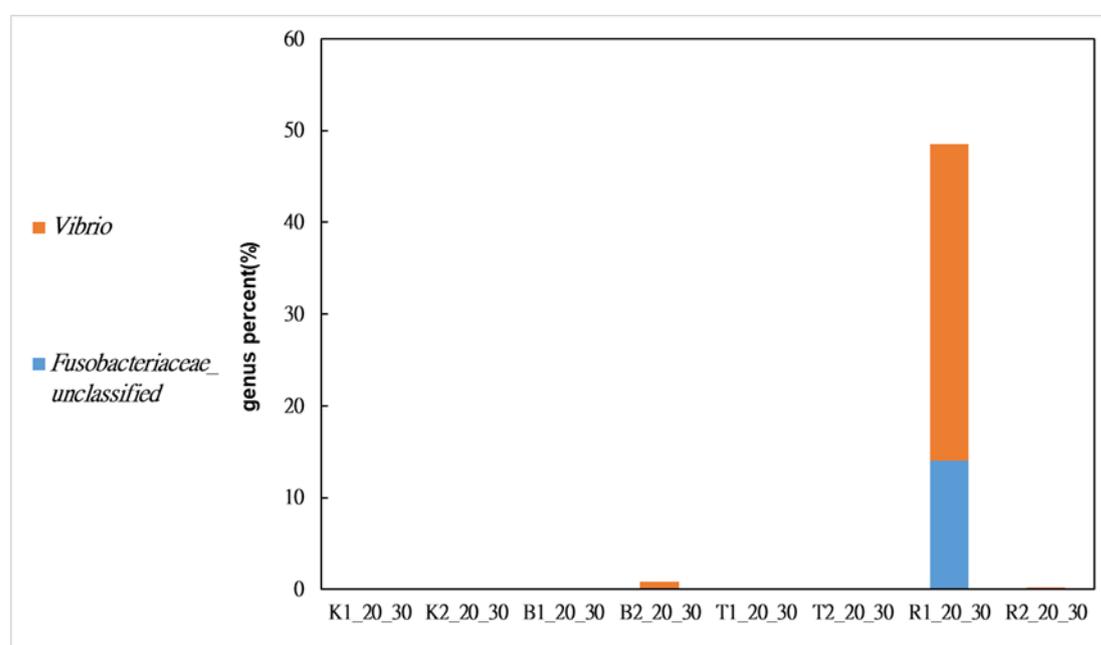


圖 4-40 選定與鉻、銅、鎳、鋅相關之 2 屬菌屬於不同樣點所占總數之百分比

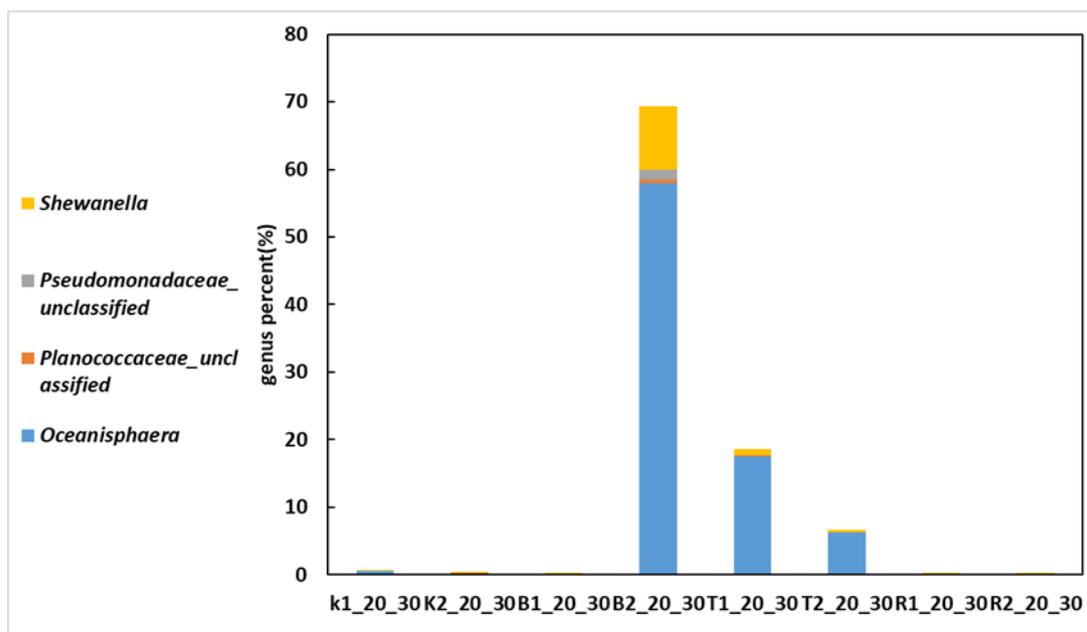
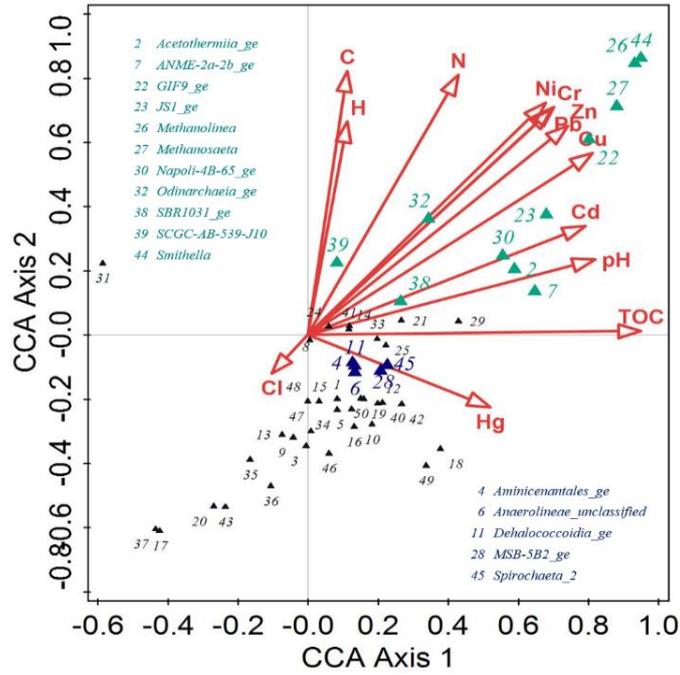


圖 4-41 選定與汞相關 4 屬菌屬於不同樣點所占總數之百分比

4.3.4 30-40 公分分層之樣品

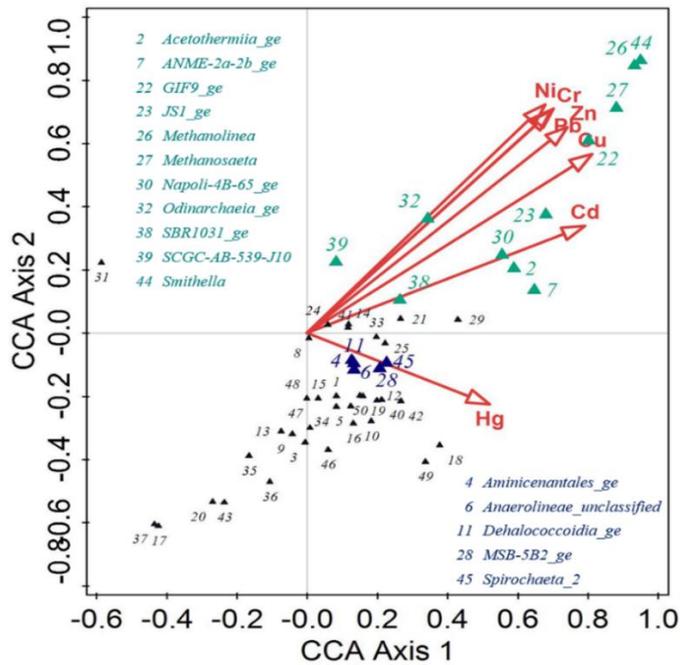
圖 4-43 顯示在 30-40 公分分層之底泥中，與重金屬鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅正相關之菌屬有 11 屬，與汞正相關之菌屬則有 5 屬。另外，表 4-21 列出經 pearson 相關性分析後與重金屬顯著相關之菌屬，交叉比對 CCA 與 pearson 結果後，與鎘顯著正相關之菌屬有 3 屬、鉻有 6 屬、銅 5 屬、鉛 5 屬、鎳 2 屬、鋅 6 屬，其中 *Acetothermia_ge*、*Napoli-4B-65_ge* 僅與鎘顯著正相關，*GIF9_ge*、*JS1_ge*、*Methanolinea*、*Methanosaeta*、*Odinarchaeia_ge*、*Smithella* 則與兩種重金屬以上顯著正相關，與汞顯著正相關則為 *Anaerolineae_unclassified*、*Dehalococcoidia_ge* 此 2 屬。

圖 4-44 顯示 *GIF9_ge*、*JS1_ge*、*Methanolinea*、*Methanosaeta*、*Odinarchaeia_ge*、*Smithella* 在鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅濃度最高之二仁溪樣點 2(R2)具有最高之豐度，而圖 4-45 則顯示 *Anaerolineae_unclassified*、*Dehalococcoidia_ge* 在汞濃度最高之客雅溪樣點 2(K2)具有最高之豐度。



註：綠色標記為該深度之樣品中與鎳、鉻、銅、鉛、鎳、鋅影響趨勢有正相關之菌屬(genus)，藍色標記則為與汞影響趨勢有正相關的菌屬(genus))

圖 4-42 河口 30-40 公分底泥樣品之菌屬受不同環境條件影響之典型關聯分析 (canonical correspondence analysis, CCA)結果



(註：綠色標記為該深度之樣品中與鎳、鉻、銅、鉛、鎳、鋅影響趨勢有正相關之菌屬(genus)，藍色標記則為與汞影響趨勢有正相關的菌屬(genus))

圖 4-43 河口 30-40 公分底泥樣品之菌屬受不同重金屬條件影響之典型關聯分析 (canonical correspondence analysis, CCA)結果

表 4-21 河口 30-40 公分底泥樣品之菌屬與不同重金屬之 pearson 相關性分析結果

genus	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Hg
<i>Acetothermii</i> _ge	.973**	0.846	0.87	0.845	0.801	0.837	0.311
<i>Anaerolineae_unclassified</i>	-0.13	-0.317	-0.293	-0.172	-0.359	-0.351	.926*
<i>Dehalococcoidia</i> _ge	-0.026	-0.248	-0.255	-0.091	-0.311	-0.304	.922*
<i>GIF9</i> _ge	0.838	.952*	.963**	.891*	.953*	.967**	-0.135
<i>JS1</i> _ge	.950*	.895*	.906*	0.852	0.865	.894*	0.002
<i>Marine_Benthic_Group_D_and_DHVEG-1</i> _ge	-0.003	-0.027	0.054	0.078	-0.027	-0.018	.925*
<i>Methanolinea</i>	0.718	.939*	.953*	0.866	.962**	.965**	-0.223
<i>Methanosaeta</i>	0.702	.943*	.969**	0.878	.972**	.974**	-0.142
<i>Napoli-4B-65</i> _ge	.978**	0.819	0.825	0.788	0.77	0.807	0.065
<i>Odinarchaeia</i> _ge	0.516	.900*	0.877	.901*	.927*	.901*	0.041
<i>Smithella</i>	0.717	.937*	.951*	0.862	.960**	.963**	-0.229

* 相關性在 0.05 層級上顯著 (雙尾)

** 相關性在 0.01 層級上顯著 (雙尾)

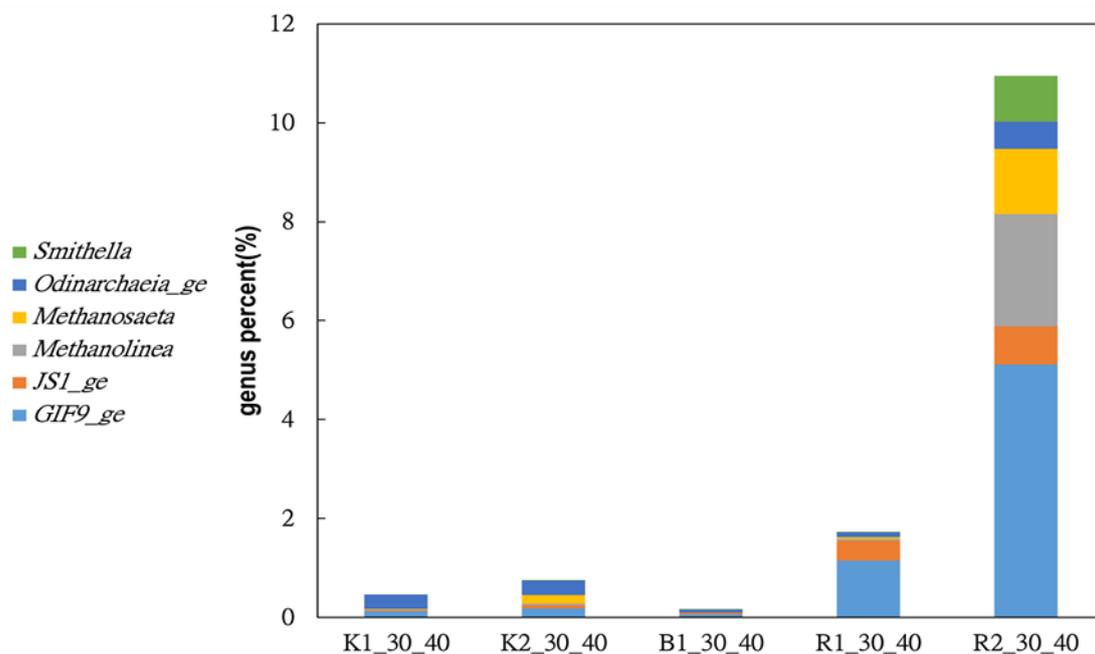


圖 4-44 選定與鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅相關 4 屬菌屬於不同樣點所占總數之百分比

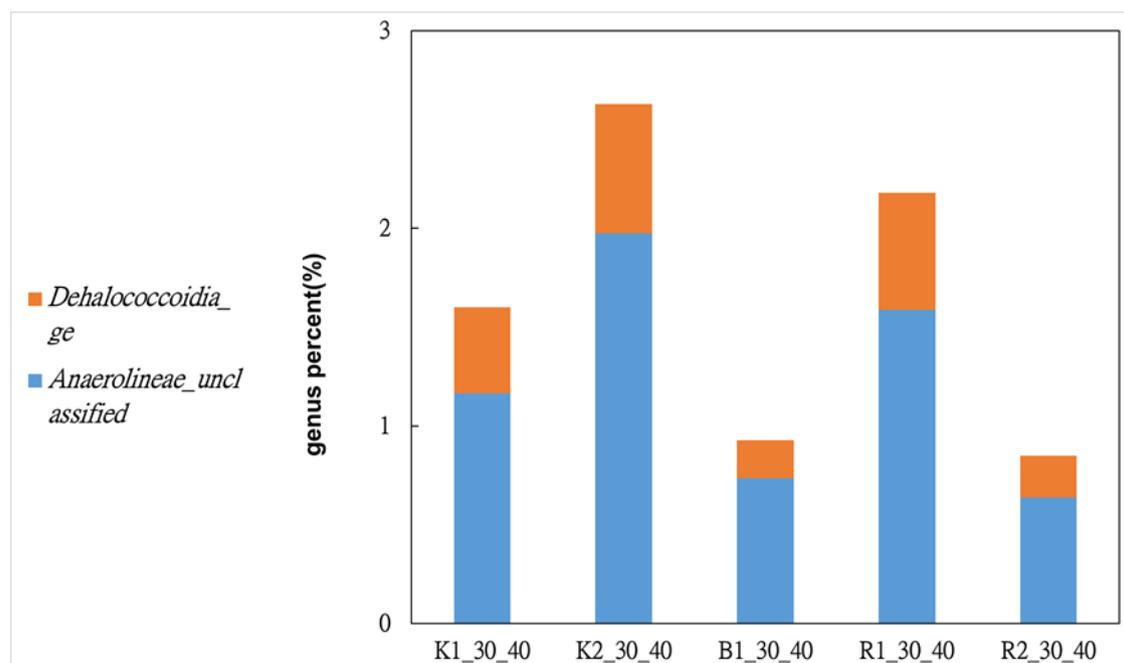
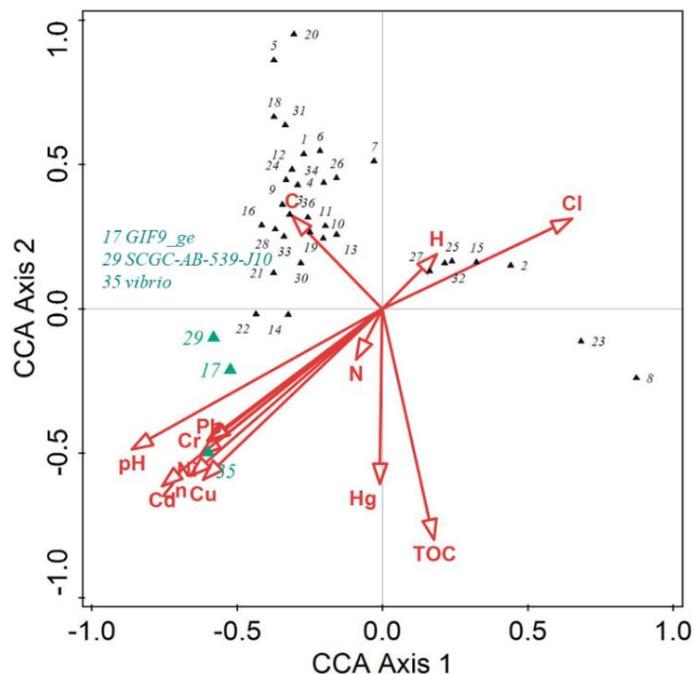


圖 4-45 選定與汞相關 2 屬菌屬於不同樣點所占總數之百分比

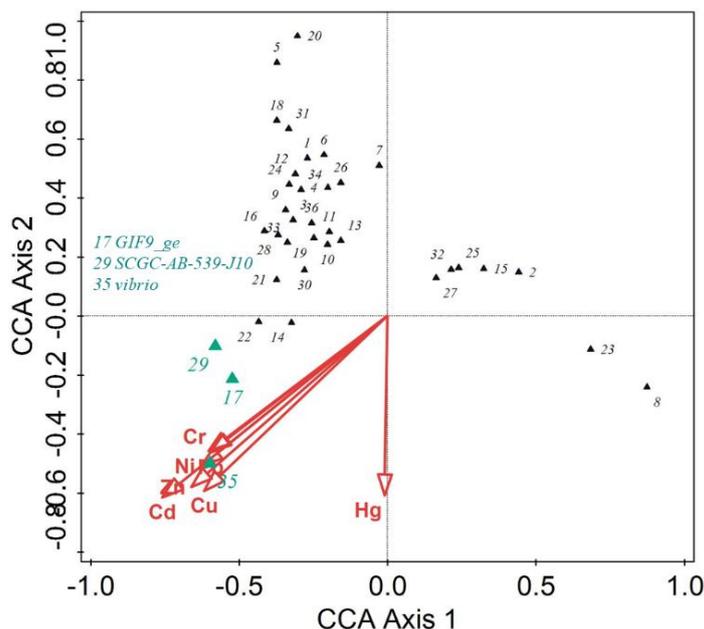
4.3.5 40-50 公分分層之樣品

圖 4-47 顯示在 40-50 公分分層之底泥中，與重金屬鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅正相關之菌屬有 3 屬，與汞正相關之菌屬則無法篩選出來。另外，表 4-22 列出經 pearson 相關性分析後與重金屬顯著相關之菌屬，交叉比對 CCA 與 pearson 結果後，與鎘顯著正相關之菌屬有 2 屬、鉻有 1 屬、銅 2 屬、鉛 1 屬、鎳 2 屬、鋅 2 屬，來自 *GIF9_ge*、*SCGC-AB-539-J10*、*vibrio* 這 3 種菌屬，汞則無共同菌屬。圖 4-48 顯示 *GIF9_ge*、*SCGC-AB-539-J10*、*vibrio* 在鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅濃度最高之二仁溪樣點 2(R2)具有最高之豐度，其中 *vibrio* 占相當高的比例（44%）。



(註：綠色標記為該深度之樣品中與鎳、鉻、銅、鉛、鎳、鋅影響趨勢有正相關之菌屬(genus))

圖 4-46 河口 40-50 公分底泥樣品之菌屬受不同環境條件影響之典型關聯分析 (canonical correspondence analysis, CCA)結果



(註：綠色標記為該深度之樣品中與鎳、鉻、銅、鉛、鎳、鋅影響趨勢有正相關之菌屬(genus)，藍色標記則為與汞影響趨勢有正相關的菌屬(genus))

圖 4-47 河口 40-50 公分底泥樣品之菌屬受不同重金屬條件影響之典型關聯分析 (canonical correspondence analysis, CCA)結果

表 4-22 河口 40-50 公分底泥樣品之菌屬與不同重金屬之 pearson 相關性分析結果

genus	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Hg
<i>GIF9_ge</i>	.955*	0.863	.906*	.888*	0.852	.929*	0.172
<i>SCGC-AB-539-J10</i>	0.756	.952*	.899*	.924*	.929*	.902*	-0.244
<i>Vibrio</i>	.977**	0.752	0.854	0.805	0.75	0.878	0.45

* 相關性在 0.05 層級上顯著（雙尾）

** 相關性在 0.01 層級上顯著（雙尾）

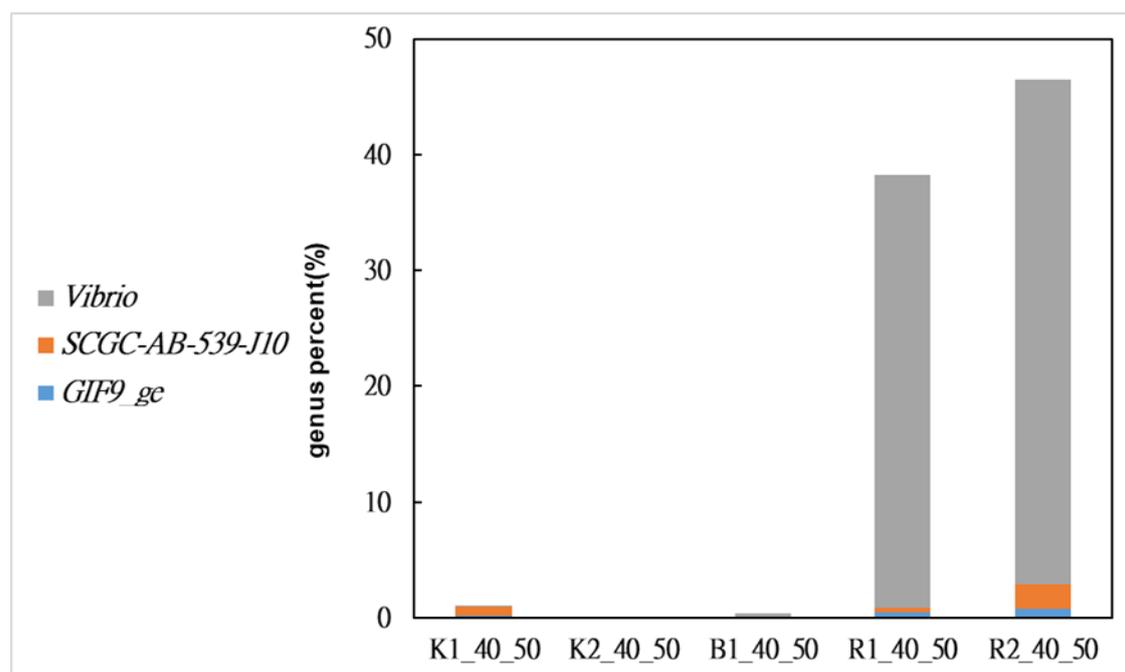


圖 4-48 選定與鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅相關 4 屬菌屬於不同樣點所占總數之百分比

4.3.6 菌群與環境因子之綜合分析

1. 綜合所有分層菌群組成及環境因子之典型關聯分析(CCA)結果，可以看出單就重金屬進行分析，或與所有環境因子一起分析，其 CCA 的結果都相同，顯示重金屬為此次實驗影響底泥菌群結構之主要因子，此外，由 CCA 的圖可以看出重金屬鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅之線段相當接近，同時表 4-12 皮爾森相關性分析結果表也顯示這六種重金屬彼此之間呈顯著正相關，也因此較難分析單一重金屬對於特定菌屬之影響。而汞與這六種重金屬則有不同之趨勢，若不考慮深度則篩選出主要差異菌屬為 *Oceanisphaera*、*Planococcaceae_unclassified*、*Pseudomonadaceae_unclassified*、*Shewanella*、*Anaerolineae_unclassified*、*Dehalococcoidia_ge* 等 6 屬。
2. 若以不同深度綜合比較菌群組成及環境因子之典型關聯分析(CCA)及皮爾森相關性分析結果，再將篩選出與重金屬顯著相關之菌屬數量進行比較，(圖 4-49)，可以看出 0-10 公分所能篩選出之菌屬數量最多，其次是 10-20 公分，接續是 30-40 公分、20-30 公分、40-50 公分，總體而言，上層底泥與重金屬相關之菌屬較下層多。

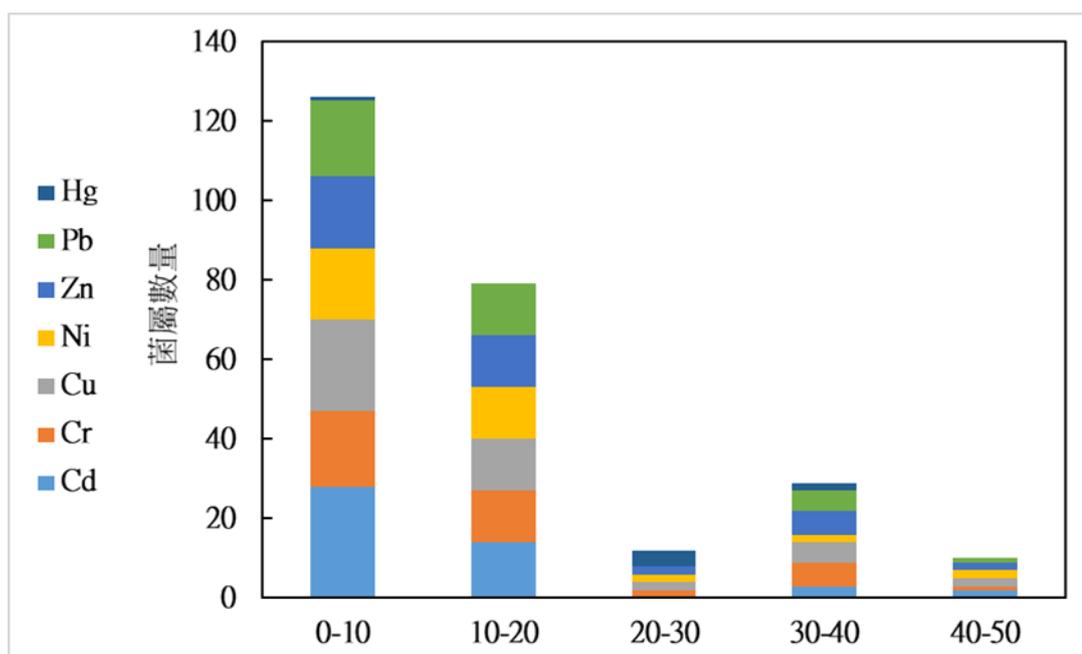


圖 4-49 不同深度分層與重金屬正相關之菌屬總數

3. 綜合以上資料，將不同深度以鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅所能篩選出之菌屬進行統整(如下表 4-23)，將所選菌屬其於不同樣品所佔之比例進行作圖 4-50，可以看出二仁溪樣點 1(R1)、二仁溪樣點 2(R2) (重金屬濃度高)所有深度樣點這些菌屬皆有較高之豐度，此外，於不同深度重複出現之菌屬共有 8 屬，分別為 *Bacteroidetes_vadinHA17_ge*、*GIF9_ge*、*JS1_ge*、*Methanolinea* (Archaea)、*Methanosaeta* (Archaea)、*Odinarchaeia_ge* (Archaea)、*Smithella*、*Vibrio*，顯示這些菌屬較有可能生存於重金屬濃度較高之環境，可能具有鑑識的河口重金屬污染之潛力。

表 4-23 不同河口深度底泥樣品與鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅皆正相關之菌屬

0-10	10-20	20-30	30-40	40-50
<i>661239_ge</i>	<i>Bacteroidetes_vadinHA17_ge</i>	<i>Fusobacteriaceae_unclassified</i>	<i>GIF9_ge</i>	<i>vibrio</i>
<i>Aminicenantales_ge</i>	<i>GIF3_ge</i>	<i>Vibrio</i>	<i>JS1_ge</i>	<i>GIF9_ge</i>
<i>Anaerolineaceae_unclassified</i>	<i>JS1_ge</i>		<i>Methanolinea</i>	<i>SCGC-AB-539-J10</i>
<i>Bacteroidetes_vadinHA17_ge</i>	<i>Marinimicrobia_(SAR106_clade)_ge</i>		<i>Methanosaeta</i>	
<i>Deltaproteobacteria_unclassified</i>	<i>Methanobacterium</i>		<i>Odinarchaeia_ge</i>	
<i>Desulfobacteraceae_unclassified</i>	<i>Methanolinea</i>		<i>Smithella</i>	
<i>FS117-23B-02_ge</i>	<i>Methanosaeta</i>			
<i>Geothermobacter</i>	<i>Napoli-4B-65_ge</i>			
<i>Marine_Benthic_Group_D_and_DHVEG-1_ge</i>	<i>Odinarchaeia_ge</i>			
<i>Proteobacteria_unclassified</i>	<i>Smithella</i>			
<i>RBG-16-49-21</i>	<i>Syntrophorhabdus</i>			
<i>RBG-16-58-14</i>	<i>Trichococcus</i>			
<i>SB-5_ge</i>	<i>WCHB1-81_ge</i>			
<i>SEEP-SRB1</i>				
<i>Spirochaeta_2</i>				
<i>Woesearchaeia_ge</i>				

* 相關性在 0.05 層級上顯著 (雙尾)

** 相關性在 0.01 層級上顯著 (雙尾)

(註：紅色字體為重複出現之菌屬)

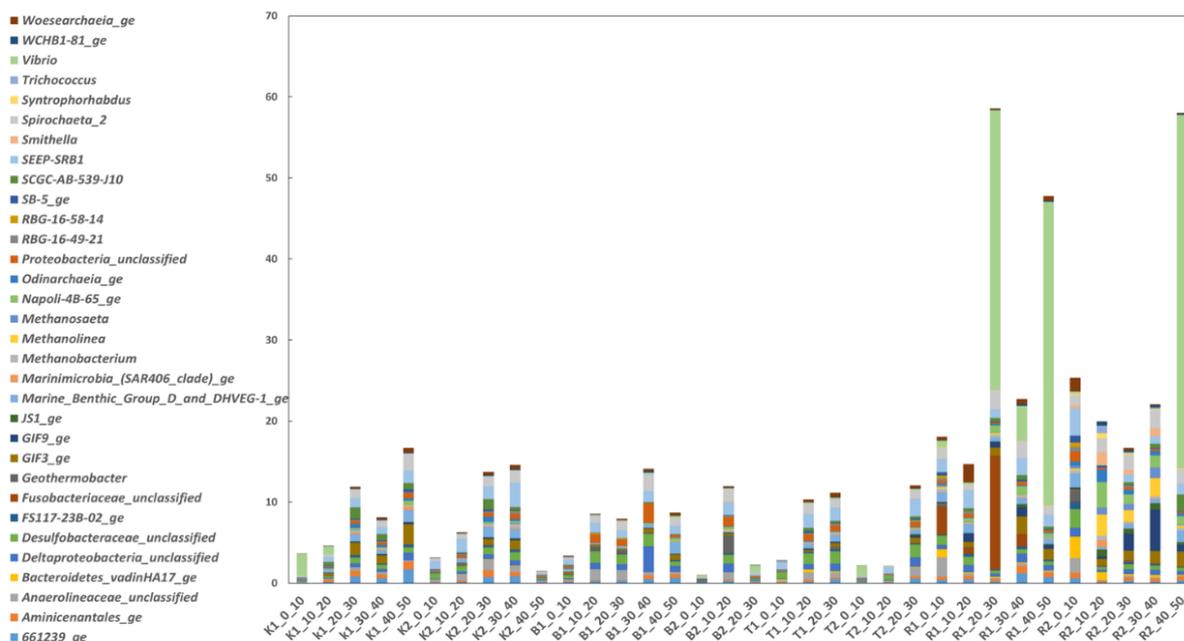


圖 4-50 選定與鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅正相關之菌屬於不同樣品所占之百分比

針對本計畫篩選出之菌屬，進行文獻的比較，與汞正相關之菌屬為 *Oceanisphaera*、*Planococcaceae_unclassified*、*Pseudomonadaceae_unclassified*、*Shewanella*、*Anaerolineae_unclassified*、*Dehalococcoidia_ge*，其中在菌屬階層能辨別出來的為 *Shewanella* 及 *Oceanisphaera*，其中的 *Shewanella* 已有文獻指出其底下的菌種 *Shewanella* sp. BC20 可以在汞濃度 $25 \mu\text{M}$ 下生長，此外若不考慮外排泵基因，*Shewanella* sp. BC20 具有 148 種與金屬抗性有關之同源基因，其中不乏對砷、鎘和汞具有抗性之同源基因[42]；而 *Oceanisphaera* 目前並無指出其具有汞抗性之文獻。另外四屬因無法辨別菌屬，因此需從不同階層討論，若從門的角度來看 *Anaerolineae_unclassified*、*Dehalococcoidia_ge* 同屬 Chloroflexi，而 *Planococcaceae_unclassified* 屬 Firmicutes，已有許多文獻指出 Chloroflexi 及 Firmicutes 在重金屬污染的環境具有較高之豐度，其對汞的抗性主要為透過 metC (mercury detoxification) 及 merB (mercury detoxification)，因此具有較高之金屬抗性[43] [44]；*Pseudomonadaceae_unclassified* 屬於 Pseudomonadaceae family，已有文獻指出其能忍受環境中高濃度的重金屬[45]，其底下的 *Pseudomonas aeruginosa* 對汞具有生物吸附作用[46]，同時也具有多種重金屬生物修復之功能[47]。此外

Bacteroidetes_vadinHA17_ge、*GIF9_ge*、*JS1_ge*、*Methanolinea*、*Methanosaeta*、*Odinarchaeia_ge*、*Smithella*、*Vibrio* 與鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅顯著正相關，其中 *Methanolinea*、*Methanosaeta*、*Odinarchaeia_ge* 皆屬古菌，前兩者屬於 Euryarchaeota，文獻指出在重金屬濃度較高之環境，Euryarchaeota 的豐度會提升[48]，另外 *Methanolinea* 可以藉由 Czc system 將鎘、鎳、鋅等重金屬外排[49]；*Methanosaeta* 則具有 P-type ATPase 可以將重金屬外排[50]；*Odinarchaeia_ge* 屬於最近才被提議出來的 superphylum Asgardarchaeota，相關資料非常少。細菌部分，*Bacteroidetes_vadinHA17_ge*、*Smithella* 出現於移除重金屬之生物反應槽中並占有一定比例[51] [52]；*Vibrio* 底下的 *Vibrio* spp. T9 及 T21 具有兩種 P_{1B-1}-ATPases 及一種 P_{1B-2}-ATPase，此外 *Vibrio* sp. T9 具有 149 種與金屬抗性相關之同源基因，*Vibrio* sp. T21 則有 154 種，反應它們對重金屬污染具有一定抵抗能力[42]；*GIF9_ge* 屬 Chloroflexi，如上述提到 Chloroflexi 在重金屬污染的環境具有較高之豐度；*JS1_ge* 目前與金屬相關之文獻則較為缺乏。

4.3.6 使用改良 V4 region primer 對定序結果之影響

本次 16S rRNA 菌群分析使用改良的 V4 region primer[53]，此 primer 主要的特色為對於環境中的古菌(archaea)偵測性較高。現今生物演化學將所有生物分為三域：細菌(Bacteria)、古菌(Archaea)及真核(Eukarya)域。古菌，亦稱為古細菌。雖然與真細菌(bacteria)同屬於原核生物，古菌與真細菌在細胞結構，生理生化，代謝行為乃至環境適應方面都有很大的差異。舉例來說，古細菌的細胞壁結構大多為 pseudopeptidoglycan 而真細菌則以 peptidoglycan 以及多醣體為主。古菌的細胞膜結構較細菌穩定，且較為黏稠，使他們可以生長在高壓高熱以及厭氧的極端環境。另外，古菌往往較細菌能耐受較高濃度的重金屬[54]。對於能量來源的利用，古菌多利用無機物質，例如硫，鐵或是氫氣當作電子捐贈者(能量來源)。下圖 4-51 為不同樣品間不同界所占總 OTU 的比例，可以看出在重金屬濃度較高之二仁溪樣品，其中古菌(archaea)的比例較高(8%~44%)，其中二仁溪樣點 1(R1)的 10-20 公

分以及二仁溪樣點 2(R2)的 10-20 公分、20-30 公分、30-40 公分樣品，古菌比例皆超過 35%；而 street1~5 則是去年(2018)「以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(2/2)」的結果，去年的計畫使用未改良的 V3-V4 region 的 primer，可以看出 archaea 所占比例相當低 (僅 0.2%~3%)，與今年結果有相當大之差異，同時，今年透過多變量分析所篩選出最具有鑑識河口重金屬污染之潛力的 8 種菌屬 *Bacteroidetes_vadinHA17_ge*、*GIF9_ge*、*JS1_ge*、*Methanolinea*、*Methanosaeta*、*Odinarchaia_ge*、*Smithella*、*Vibrio*，其中 3 屬 *Methanolinea*、*Methanosaeta*、*Odinarchaia_ge* 即為古菌，顯示這些古菌可能具有較高的金屬耐受性，並可能在重金屬濃度高的環境下扮演不同的生化反應角色，也因此使用此改良後的 V4 region primer 將給予我們更多環境菌群組成的資訊，以幫助我們了解實際環境的變化。

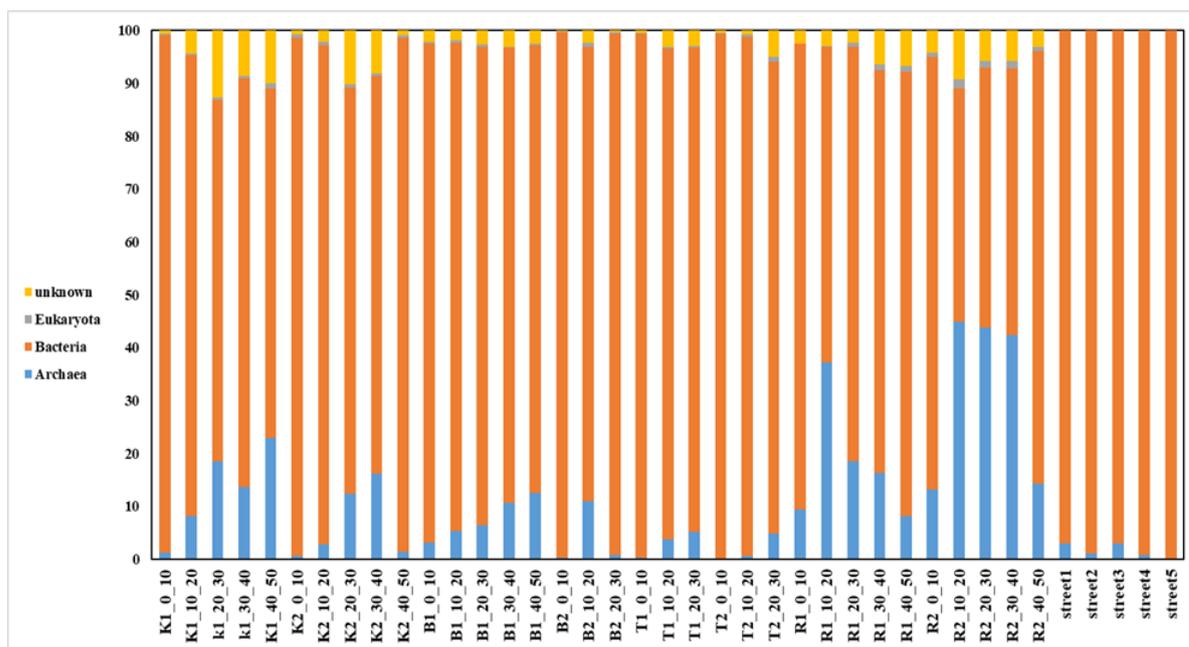


圖 4-51 不同樣品間不同界所占總 OTU 之比例

4.4 底泥樣本之環境基因體分析結果

由於兩個樣區的銅離子濃度在底泥深度 10 到 20 公分的樣本之間差異最大，分別為 22(鹽港溪)及 487ppm(二仁溪)。因此我們針對鹽港溪以及二仁溪底泥深度 10 到 20 公分(分別採樣 2 樣品)的 4 個環境基因體樣本進行基因數量的差異性分

析。分析結果，在此深度的鹽港溪底泥，在數量上有高達 71,831 個基因，其相對豐度顯著地比二仁溪相同深度的底泥多；而在二仁溪則只有 8,197 個基因在數量上是顯著性的高於鹽港溪。雖然鹽港溪以及二仁溪的底泥樣本有數萬個基因的相對豐度存在顯著差異，但值得注意的是，絕大多數的具有顯著數量差異的基因，並未與銅離子的吸收、排出、代謝或氧化功能有關；甚至與其它重金屬的吸收、排出與代謝功能亦無明顯相關性。這些基因多數與細菌的生存與複製有關，例如核酸、蛋白質、脂質或細胞壁結構的生合成、複製與調控，或用來進行無氧呼吸或發酵等基礎生理代謝。二仁溪底泥樣本的部分顯著基因與有機質的降解程序有關，此乃因為該樣區除了重金屬(例如鎘、鉻、銅)污染外，有機污染物濃度也顯著地比鹽港溪高出許多(總有機碳含量 TOC(%)分別為 1.06%及 0.03%)。總而言之，這兩個樣區的底泥樣本，除了重金屬污染程度有明顯差異外，有機污染物的含量亦存在明顯差異。因此，兩個樣區底泥之間的微生物群落與功能基因相對豐度之差異，其成因相當複雜，可能也包含抗生素等有機污染物之抗性基因或降解基因 [55]，不全然歸因於重金屬(尤其是銅離子)含量之差異。

根據目前的微生物學研究，原核生物(主要為細菌與古菌)對抗環境中的高濃度銅離子(尤其是高毒性的一價銅(Cu(I))的抗性機制至少存在有下列 3 項：(I) 使用依賴 ATP 的運輸蛋白質(CopA；亦稱為 P-type ATPase)來主動將銅離子送出細胞外 (Rensing and Grass, 2003)；(II) 使用反向運輸蛋白質(CusA；藉由吸收鈉鉀離子來將銅離子送出細胞外) [56]；以及(III) 使用位於膜間區(periplasmic space)的氧化酶(multicopper oxidase；包含 PcoA 及 CueO 兩種氧化酶)來將高毒性的一價銅離子氧化為二價銅 [56] [57] [58]。然而，這些研究都是使用大腸桿菌(*E. coli*)或丁香假單胞菌(*Pseudomonas syringae*)等好氣或兼性好氣細菌等為人所熟知的模式微生物所獲致的研究成果，河口底泥的微生物群落幾乎都是由絕對厭氧的細菌或古菌占多數；這些厭氧微生物由於培養困難，其抗銅機制與相關基因的研究付之闕如。針對台灣本土的河口底泥樣本，為了找出與銅離子抗性有明顯相關的功能性基因，

我們將這些在數量上有顯著差異的基因，利用 NCBI RefSeq 的資料庫進行功能性註解 (gene annotation)，檢測銅離子相關的抗性基因是否在受到高濃度銅離子污染的二仁溪底泥 DNA 中，在數量上有顯著的差異。分析結果發現，僅有 19 個顯著基因(相對豐度有顯著增加)跟銅離子的抗性或代謝有關(表 4-24)。其中有 7 個被註解為 periplasmic copper-binding protein (NosD)，4 個為 PFAM periplasmic copper-binding，5 個為 copper-translocating P-type ATPase，2 個 multicopper oxidase，以及 1 個 copper amine oxidase。有趣的是，63%的基因(12/19)是來自古菌，其他基因分別屬於 Deltaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Firmicutes 以及 Chloroflexi 等細菌(表 4-24)。而這些基因在數量上，可以發現最多數的為 PFAM periplasmic copper-binding 基因，所有的該基因數量為 32.53 CPM，其次為 multicopper oxidase (1.54 CPM)，Periplasmic copper-binding protein (NosD) (1.50 CPM)，以及基因數最少的 copper amine oxidase (0.21)。其中，multicopper oxidase 與 copper-translocating P-type ATPase 明顯與銅離子的氧化以及排出細胞有關。這些受到高濃度銅污染的二仁溪底泥的顯著基因，分別來自古菌與細菌。結果顯示，底泥中的厭氧古菌及細菌偏好使用不同的機制來降低銅離子對細胞生理的危害。細菌傾向耗費 ATP 將銅離子排出細胞外，古菌則傾向將一價銅氧化為低毒性的二價銅。這些銅抗性基因可以優先作為可能的生物標誌分子(molecular biomarker)使用。Besaury et al. (2013) 針對智利海岸受銅污染(平均銅濃度為 1500ppm)的底泥之銅抗性基因進行 PCR 放大與定序，亦發現 CopA 運輸蛋白質(P-type ATPase)的相對豐度亦明顯高於反向運輸蛋白質(CusA) [59]。惟因為其設計的核酸引子是根據已知菌株(多屬於 betaproteobacteria 的脫硝菌)，因此放大的基因多來自同一細菌親源類型。使用環境基因體定序及分析技術的明顯優勢之一，即在於無須分離純化菌株或 PCR 放大，即可獲得其功能性基因的序列與表現量等資訊。透過這些方法，我們首先獲得了台灣本土受銅污染底泥的抗銅基因序列(個別 DNA 及胺基酸序列請參見附錄六)。

河口底泥由於帶有大量的含氮化合物，因此氮循環相關反應相當活躍。其中厭氧底泥常常進行脫硝反應[60]。該生物程序的最後一個反應是使用含銅酵素— N_2O 還原酶(nitrous oxide reductase)來將 N_2O 進一步還原成氮氣。由於這個含銅酵素位於膜間區，因此為了將銅離子鍵結於這個酵素，需透過 periplasmic copper-binding protein (NosD)或 PFAM periplasmic copper-binding protein 來進行銅離子與 N_2O 還原酶的鍵結與活化。這些 copper-binding protein 因此不屬於銅抗性基因，與銅離子的運輸與去毒無直接關係。微生物對銅離子的敏感性隨菌株有很大的差異。常見的模式菌株--大腸桿菌(*Escherichia coli*)、枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)或丁香假單胞菌(*Pseudomonas syringae*) --的銅耐受濃度多數落在 10 ppm 以下[61]。這些微生物因此難以在二仁溪底泥長期生存。由於該處 10-20 公分深度的底泥呈現深黑色，其為鐵硫化合物，顯示該處長期處於未受擾動的缺氧狀態。我們可以合理推斷，該處的菌相結構穩定，且大多數的菌株多能適應該處的高濃度銅離子，進而利用銅做為輔酶因子來進行脫硝等無氧代謝行為。這可以解釋，何以二仁溪底泥中的 8,197 個顯著基因僅有 7 個基因(5 個為 copper-translocating P-type ATPase 及 2 個 multicopper oxidase)與銅抗性有直接相關(圖 4-52)。

值得注意的是，在低銅污染的鹽港溪河口底泥(該處 10-20 公分深度的底泥樣本之銅離子濃度為 22 ppm)，我們觀察到有高達 116 個顯著基因與銅污染的抗性以及代謝有相關(表 4-25)，而且這些抗銅基因絕大多數來自真細菌。其中高達 58%(67/116)的顯著基因為依賴 ATP 的 CopA 或類似的運輸蛋白質(亦稱為 P-type ATPase)，其功能是主動將銅離子送出細胞外。這些 P-type ATPase 運輸蛋白質多來自於 delta-類群的變形菌門細菌(proteobacteria)，以及無氧光合作用(anoxigenic phototrophs)的非硫綠細菌(green non-sulfur Chloroflexi)，但是在該基因豐度上以來自於革蘭氏陽性菌 Firmicutes (CPM 17.02)為最多。另外，存在於鹽港溪河口底泥第二大類(27%; 31/116)的抗銅基因其基因產物為銅氧化酶(multicopper oxidase)，用來將高毒性的一價銅離子氧化為二價銅。這些銅氧化酶基因都是來自於綠硫菌

群 Bacteroidetes/Chlorobi。剩下的顯著基因也都與銅抗性有關，包括 copper resistance protein CopD(8% ; 9/116)、copper chaperone(2% ; 2/116)及銅運輸蛋白(copper ABC transporter permease ; 3% ; 3/116)(表 4-25)。這些蛋白質都與保護細菌細胞免於受到銅離子(尤其是一價銅)的毒害有關。這樣也發現也反映出細菌在河口或海岸的厭氧底泥中大量存在，絕大多數為絕對厭氧菌，使用鐵或硫酸作為電子接受者，透過無氧呼吸來降解有機物[60]。

表 4-24 二仁溪 10-20 公分底泥中，與銅離子抗性以及代謝相關的基因

Gene ID	Annotation	Taxonomic group	Expect value	CPM
k127_35775783_2	Multicopper oxidase	Euryarchaeota (Archaea)	4.1e-140	1.50103183
k127_3607561_3	Multicopper oxidase	Thermoanaerobacterales	6e-58	0.04371482
k127_3557623_2	Periplasmic copper-binding protein (NosD)	Archaea	9.2e-75	0.039060157
k127_46824643_1	Periplasmic copper-binding protein (NosD)	Archaea	2.3e-34	0.080092222
k127_36685908_2	Periplasmic copper-binding protein (NosD)	Euryarchaeota (Archaea)	4.2e-08	0.023860539
k127_54595033_1	Periplasmic copper-binding protein (NosD)	Euryarchaeota (Archaea)	2.2e-43	0.729211463
k127_2197912_2	Periplasmic copper-binding protein (NosD)	Euryarchaeota (Archaea)	3.3e-47	0.289454233
k127_10962460_1	Periplasmic copper-binding protein (NosD)	Euryarchaeota (Archaea)	7.3e-10	0.039060157
k127_32995086_32	Periplasmic copper-binding protein (NosD)	Gammaproteobacteria	3.4e-205	0.222985787
k127_22957812_3	PFAM periplasmic copper-binding	Bacteria	1.6e-11	0.63035102
k127_40153518_4	PFAM periplasmic copper-binding	Euryarchaeota (Archaea)	1.9e-10	0.144500773
k127_14323367_3	PFAM periplasmic copper-binding	Euryarchaeota (Archaea)	2.1e-06	31.73475637
k127_21372085_4	PFAM periplasmic copper-binding	Euryarchaeota (Archaea)	7.7e-07	0.023860539
k127_540026_4	Copper amine oxidase	Euryarchaeota (Archaea)	1.80e-40	0.20822628
k127_5217671_1	Copper-translocating P-type ATPase	Deltaproteobacteria	6.60E-232	0.072938833
k127_40935517_12	Copper-translocating P-type ATPase	Chloroflexi	1.20E-256	0.133638075
k127_4711859_12	Copper-translocating P-type ATPase	Chloroflexi	4.40E-285	1.000583609
k127_28254005_5	Copper-translocating P-type ATPase	Gammaproteobacteria	2.30E-233	0.023860539
k127_14914590_1	Copper-translocating P-type ATPase	Firmicutes	5.50E-205	0.039060157

Expect value: 代表基因 ID 的序列與 RefSeq database 上最相近蛋白質序列的期待值。越低代表相似度約高。

表 4-25 低銅污染的鹽港溪河口底泥中所發現的銅抗性以及代謝相關的基因

Function	Taxonomy	Number of genes	CPM
Copper amine oxidase	Firmicutes	2	0.83
Copper chaperone	Chloroflexi	2	0.11
Copper ABC transporter permease	Chloroflexi	3	0.46
Copper-binding protein	Thaumarchaeota (Archaea)	2	0.14
Copper resistance CopD protein	Thaumarchaeota (Archaea)	4	0.25
	Gamma proteobacteria	1	1.21
	Alphaproteobacteria	2	0.85
	Actinobacteria	1	0.02
Copper-translocating P-type ATPase	Acidithiobacillus	2	0.09
	Actinobacteria	3	4.84
	Alphaproteobacteria	2	0.08
	Aquificae	1	0.09
	Bacteroidetes/Chlorobi	6	9.56
	Bathyarchaeota (Archaea)	1	0.10
	Betaproteobacteria	3	5.53
	Candidatus Bipolaricaulis	1	1.14
	Chloroflexi	17	10.10
	Deltaproteobacteria	11	2.15
	Firmicutes	7	17.02
	Gamma proteobacteria	6	2.53
	Haloplasmatales	1	0.09
	Nitrospinae/Tectomicrobia	1	2.16
	Nitrospirae	4	0.31
	Sulfuricaulis	1	0.49
Multicopper oxidase	Actinobacteria	4	0.41
	Alphaproteobacteria	5	0.37
	Bacteroidetes/Chlorobi	11	5.54
	Betaproteobacteria	1	0.03
	Chloroflexi	3	2.00
	Deltaproteobacteria	1	0.18
	Firmicutes	2	0.43
	Gamma proteobacteria	5	0.31

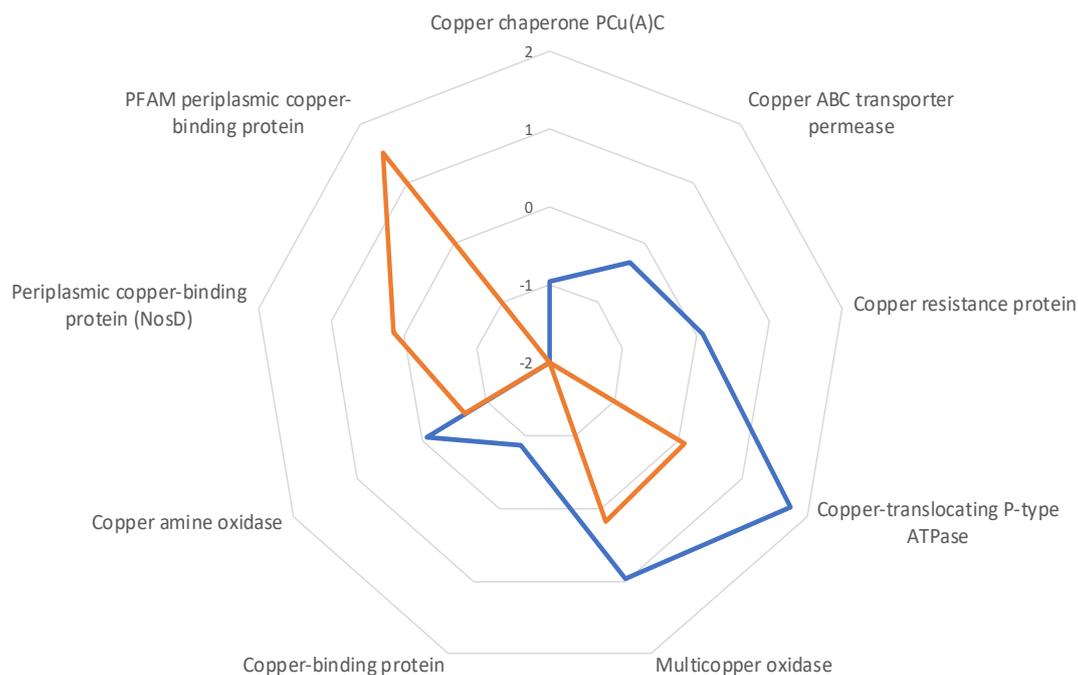


圖 4-52 鹽港溪（藍色）及二仁溪（橘色）底泥中，銅離子抗性以及代謝相關的基因種類以及數量 (log CPM)。

(註:在銅離子濃度高的二仁溪底泥，基因最多的 PFAM periplasmic copper-binding protein，數目為 32.54 CPM (logCPM=1.51)，在較低濃度的鹽港溪底泥，基因最多的為 Copper-translocating P-type ATPase，數目為 56.28 (logCPM=1.75)。另外，兩個樣點之間的基因種類也不同，鹽港溪底泥有偵測到 copper chaperone PCu(A)C，copper-binding protein 而二仁溪的底泥則帶有 PFAM periplasmic copper-binding protein 以及 Periplasmic copper-binding protein (NosD)。(數值-2 代表 原始 CPM 為 0)

4.5 環境基因體學分析方法可行性

本計畫除了希望利用次世代定序找出與銅離子污染相關的菌群以及抗性基因，我們也針對 DNA 定序、定性 (功能預測) 及定量 (個別基因之相對豐度) 等新興環境體學方法的可行性進行討論。首先，根據不同底泥的 DNA 含量以及品質，可以發現超過大部分靠近表層底泥 (0 到 20 公分) 的 DNA 含量以及品質都有合乎定序標準。DNA 濃度介於 10.1 到 67.2 納克/微升($\text{ng}/\mu\text{L}$)，而蛋白質 (波長 260/280 的吸光值) 以及有機質 (260/230 的吸光值) 的污染也偏低 (附錄四)。但是隨著底泥的深度增加，DNA 含量有明顯減少的趨勢，DNA 的純度也偏低。次世代定序的優點之一，就是所需要的 DNA 濃度很低。根據美國 Illumina 公司的試劑以及定序技術，底泥的菌群結構，需要經由 PCR 放大 16S rRNA 片段上的變異區域 (hypervariable region)，並經由生物資訊分析以及資料庫的比對，來鑑定其中的多樣性以及數量，低濃度的 DNA 對此並無明顯影響。雖然環境基因體學定序 (metagenome sequencing) 的建庫 (library preparation) 所需要的 DNA 總量可以低至 1ng，但是 DNA 的含量以及純度會影響建庫所用的試劑種類。Illumina 建庫的試劑種類有兩種，分別為 TruSeq DNA PCR-Free preparation kit 以及 Nextera Flex preparation kit。前者的優點在 DNA 建庫首先要進行的片段化 (fragmentation)，是物理性的，而且所產生的片段不需要經由 PCR 放大；但是缺點在於所需的 DNA 總量要高達 0.5 到 1 μg ；後者的優點在於所需的 DNA 總量只要 1ng，但是這個片段化的步驟需要 Illumina 專利的跳躍子 (transposome) 隨機的把 DNA 切斷，並且經由聚合酶連鎖反應(PCR)把片段放大到足夠的量。這兩個步驟都會對 DNA 本身的序列以及污染程度產生不可預期的偏差，導致在定序上有失真的可能性。不過由於這些樣區之底泥樣本的含量都達不到 TruSeq DNA PCR-Free preparation kit 的標準，因此選擇建庫的方式只有利用 Nextera Flex preparation kit 一途。此外，DNA 樣本定序的深度也是影響環境基因體學分析結果的重要因素之一。簡單來說，對於菌群複雜的 DNA 樣本，定序深度太淺，會造成某些相對豐度較低的基因(可能

具有生理及代謝功能之重要性)無法被偵測到；而定序深度過深，所產生的資料量太大，除了高額的定序費用之外，也會增加後續的電腦運算的難度。

本次所選擇做為環境基因體樣本總共有 12 個，每個樣本的定序深度介於 Microbiology 的文獻[62]來當作參考。這篇文獻為了找出海洋中石油分解的相關基因，三個樣本的定序深度大約為 113 Giga bases，亦即每個樣本的深度約為 37,000 mega bases。但是這樣的資料量，造成了電腦計算上龐大的負擔。相較於常用的 featureCounts 軟體，HTseq 用來運算較節省時間，但記憶體需求較高。根據中央研究院生物多樣性研究中心之次世代核心實驗室的記錄，本計畫之細菌親源基因 (16S amplicon)的定序大約費時 30 個工作天 (2019 年 7 月 24 日到 8 月 27 日)；而環境基因體的定序大約費時 60 天 (2019 年 6 月 4 日到 8 月 14 日)。以方法上來看，以次世代定序的方式去找出在銅離子或其他重金屬污染源相關的菌屬以及功能基因具有可行性；但是定序所需要的時間，以及龐大的資料量對於非電腦工程科系的學術單位，可能造成沉重負擔。此外，環境基因體學分析目前難以應用於即時的分析。

章節摘要：

依據計畫之實驗結果分述於本章之各節中，分別為底泥物理化學性質、微生物族群分析與環境因子影響之探討、使用改良 V4 region primer 對定序結果之影響、底泥樣本之環境基因體分析結果、環境基因體學分析方法可行性的討論

第五章 結論

5.1 客雅溪、三姓公溪、鹽港溪及二仁溪底泥物化分析數據

底泥分析項目中，碳氮氫比例落在 0.34%到 2.72%不等，鹽港溪相較之下碳氮氫比例偏低，其餘採樣點則大多介於 1%~2%之間；粒徑分析的部分，除二仁溪砂壤土比粒較高外，其他採樣點的差異並不大，多以粉土及粉壤土為主；二仁溪的重金屬濃度與總有機碳比例分布相似。從重金屬濃度檢測可以得知，二仁溪的鎘濃度皆超標，且在 10-20 公分處出現最高值，二仁溪第一次採樣於 20-30 公分處其銅濃度超標，在同一採樣點，鉻、銅、鎳三個重金屬的表現在 20-30 公分處達到最高濃度，對照其元素分析，二仁溪第一次採樣的 20-30 公分處相較於其他採樣點有較高的碳氮氫比；第二次採樣於 10-20 公分處其鎘、鉻、銅、鎳、鉛、鋅皆超標，對照其元素分析，二仁溪第二次採樣的 10-20 公分處相較於其他採樣點有較高的碳氮氫比，總有機碳比例也最高，土壤種類與其他採樣點不同，以砂壤土為主；另二仁溪第二次採樣的深度 40-50 公分處銅、鎳、鋅皆超標，30-40 公分處鉛濃度超標。鹽港溪在鉻、鎳、鉛、鋅的趨勢一致，其重金屬濃度隨著深度加深而降低，客雅溪在鉻濃度的表現則是隨著深度而增加。重金屬汞以三姓公溪表面所測得最高濃度，其餘重金屬以二仁溪 10-20 公分處測得最高濃度；表 4-12 皮爾森相關性分析結果也顯示導電度及氯離子對於重金屬濃度並無顯著關聯，而鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅等六種重金屬彼此呈顯著正相關。

5.2 微生物族群分析

5.2.1 主座標分析(PCoA)

基於 Bray-Curtis 距離之主座標分析，其中客雅溪代號 K、三姓公溪代號 T、鹽港溪代號 B、二仁溪代號 R，可以看出 R1、R2 之底層樣點之菌群組成較為相似，皆聚集於 PCoA 圖的右上部，其餘樣點分布則較無規律，若將同一深度之樣點以 95%信心水準之橢圓作圖，可以看出不同深度並不會有明顯之分群，這顯示

在考慮不同物種組成及豐度的情況下，所有樣點間不同深度的樣品並無明顯的差異。若將不同樣點之樣品以 95%信心水準之橢圓作圖，則可以看出 R1、R2 與 K1、K2、B1、B2、T1、T2 明顯分為兩群，這顯示 R1、R2(重金屬濃度高)的物種組成及豐度與 K1、K2、B1、B2、T1、T2(重金屬濃度低)有所差異。

5.2.2 底泥菌群與環境因子之典型關聯分析(CCA)

1. 綜合所有分層菌群組成及環境因子之典型關聯分析(CCA)結果，可以看出單就重金屬進行分析，或與所有環境因子一起分析，其典型關聯分析結果皆相同，顯示重金屬為此次實驗影響底泥菌群組成結構之主要因子。
2. 由菌群組成及環境因子之典型關聯分析(CCA)結果的圖可以看出重金屬鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅之線段相當接近，皮爾森相關性分析也顯示重金屬鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅彼此皆呈顯著正相關(表 4-12)，也因此較難分析單一重金屬對於特定菌屬之影響。汞與這六種重金屬有不同之趨勢，若不考慮深度則篩選出主要差異菌屬為 *Oceanisphaera*、*Planococcaceae_unclassified*、*Pseudomonadaceae_unclassified*、*Shewanella*、*Anaerolineae_unclassified*、*Dehalococcoidia_ge* 等 6 屬。
3. 若以不同深度綜合比較菌群組成及環境因子之典型關聯分析(CCA)及皮爾森相關性分析結果，再將篩選出與重金屬顯著相關之菌屬數量進行比較，可以看出上層底泥與重金屬相關之菌屬較下層多。
4. *Bacteroidetes_vadinHA17_ge*、*GIF9_ge*、*JS1_ge*、*Methanolinea*、*Methanosaeta*、*Odinarchaeia_ge*、*Smithella*、*Vibrio* 等 8 種菌屬在經由鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅篩選下，重複於不同深度出現，顯示這些菌屬較有可能生存於重金屬濃度較高之環境，可能具有鑑識的河口重金屬污染之潛力。

5.2.3 改良的 V4 region primer 對定序結果影響

使用對古菌有較高偵測性之改良 V4 region primer，定序結果顯示環境中特定

古菌可能具有較高的金屬耐受性，並可能在重金屬濃度高的環境下扮演不同的生化反應角色，這也給予我們更多環境菌群組成的資訊，以幫助我們了解實際環境的變化。

5.3 環境基因體分析

如同預期，利用環境基因體技術來定序並分析底泥樣本中的 DNA，我們確實可以獲得銅抗性基因的序列。這些序列大多數來自尚有待分離培養的絕對厭氧細菌或古菌。這些銅抗性基因主要來自兩個類群：銅輸出蛋白 P-type ATPase 及銅氧化酶 multicopper oxidase。顯示受污染河口的微生物，包括細菌與古菌，主要透過去毒(將一價銅氧化成低毒性的二價銅)以及銅離子輸出機制來降低銅離子對細胞生理的負面影響。這些本土的銅抗性基因的序列將有助於設計專一性強且適合台灣本土環境的核酸引子，透過定量 PCR(quantitative PCR)，我們可以獲得受污染場址的銅抗性基因的定量資訊。另外，輕微受污染場址的銅抗性基因幾乎都來自細菌，且其抗性基因的多樣性遠高於嚴重污染場址。未來也可以思考透過簡單的數學模式，利用比較各地的古菌與細菌多樣性指標比例，評估廠址受污染的程度；或將這些抗性基因，尤其是銅輸出蛋白 P-type ATPase 及銅氧化酶 multicopper oxidase 的多樣性數字化，用以評估銅污染程度。

章節摘要：

本章節針對本計畫所有工作成果以 5.1 底泥物化分析數據、5.2 微生物族群分析、5.3 環境基因體分析等三項目進行工作成果匯整並歸納結論。

第六章 建議事項及後續工作

	理由	建議	主辦機關	協辦機關
立即可行建議	透過鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅篩選出 <i>Bacteroidetes_vadinHA17_ge</i> 、 <i>GIF9_ge</i> 、 <i>JS1_ge</i> 、 <i>Methanolinea</i> 、 <i>Methanosaeta</i> 、 <i>Odinarchaeia_ge</i> 、 <i>Smithella</i> 、 <i>Vibrio</i> 等 8 種菌屬，可供後續河口底泥污染進行微生物鑑識進行比較參考。	本計畫研究結果可供後續河口底泥污染進行微生物鑑識進行比較參考。	行政院環境保護署 環境檢驗所	行政院環境保護署
中長期建議	水質底泥品質等環境數據及微生物群落組成等，均不斷隨著時間改變。	建議未來持續蒐集環境數據及微生物等相關資訊，以增加分析結果精確性。	行政院環境保護署 環境檢驗所	行政院環境保護署
	本研究發現污染程度高，基因型 diversity 低及古菌比例較高，污染程度低處，diversity 高且細菌比例高。	蒐集其他地區環境中 diversity 與 abundance 資料，建立數學模式，用以評估場址長期受污染程度	行政院環境保護署 環境檢驗所	行政院環境保護署

章節摘要：本章節以表格方式針對本計畫提出後續建議事項

參考文獻

- [1] 土壤及地下水污染整治法, 民國 99 年 2 月 3 日.
- [2] U. Förstner and G. Müller, "Heavy metal accumulation in river sediments: a response to environmental pollution," *Geoforum*, vol. 4, no. 2, pp. 53-61, 1973.
- [3] A. Tessier, P. G. Campbell, and M. Bisson, "Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals," *Analytical chemistry*, vol. 51, no. 7, pp. 844-851, 1979.
- [4] P. A. Sodrzeieski, L. C. d. Andrade, T. Tiecher, and F. A. d. O. Camargo, "Physico-chemical variability and heavy metal pollution of surface sediment in a non-channeled section of Dilúvio Stream (Southern Brazil) and the influence of channeled section in sediment pollution," *Revista Ambiente & Água*, vol. 14, no. 1, 2019.
- [5] Z. He, F. Li, S. Dominech, X. Wen, and S. Yang, "Heavy metals of surface sediments in the Changjiang (Yangtze River) Estuary: Distribution, speciation and environmental risks," *Journal of Geochemical Exploration*, vol. 198, pp. 18-28, 2019.
- [6] M. J. Kennish, "Environmental threats and environmental future of estuaries," *Environmental conservation*, vol. 29, no. 1, pp. 78-107, 2002.
- [7] S. K. Sundaray, B. B. Nayak, S. Lin, and D. Bhatta, "Geochemical speciation and risk assessment of heavy metals in the river estuarine sediments—a case study: Mahanadi basin, India," *Journal of hazardous materials*, vol. 186, no. 2-3, pp. 1837-1846, 2011.
- [8] C.-F. Chen, Y.-R. Ju, C.-W. Chen, and C.-D. Dong, "Vertical profile, contamination assessment, and source apportionment of heavy metals in sediment cores of Kaohsiung Harbor, Taiwan," *Chemosphere*, vol. 165, pp. 67-79, 2016.
- [9] S. M. Sakan, D. S. Dordevic, and S. S. Trifunovic, "Geochemical and statistical methods in the evaluation of trace elements contamination: an application on canal sediments," *Polish J. Environ. Stud*, vol. 20, no. 1, p. 187, 2011.
- [10] T. K. Hoang *et al.*, "Bioturbation effects on bioaccumulation of cadmium in the wetland plant *Typha latifolia*: A nature-based experiment," *Science of the total environment*, vol. 618, pp. 1284-1297, 2018.
- [11] M. M. Ali, M. L. Ali, M. S. Islam, and M. Z. Rahman, "Preliminary assessment of heavy metals in water and sediment of Karnaphuli River, Bangladesh," *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, vol. 5, pp. 27-35,

- 2016.
- [12] M. Pourabadehei and C. N. Mulligan, "Effect of the resuspension technique on distribution of the heavy metals in sediment and suspended particulate matter," *Chemosphere*, vol. 153, pp. 58-67, 2016.
- [13] J. Liao *et al.*, "Multi-phase distribution and comprehensive ecological risk assessment of heavy metal pollutants in a river affected by acid mine drainage," *Ecotoxicology and environmental safety*, vol. 141, pp. 75-84, 2017.
- [14] J. Eggleton and K. V. Thomas, "A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events," *Environment international*, vol. 30, no. 7, pp. 973-980, 2004.
- [15] G. Du Laing, D. Vanthuyne, F. Tack, and M. Verloo, "Factors affecting metal mobility and bioavailability in the superficial intertidal sediment layer of the Scheldt estuary," *Aquatic Ecosystem Health & Management*, vol. 10, no. 1, pp. 33-40, 2007.
- [16] H. Elderfield and A. Hepworth, "Diagenesis, metals and pollution in estuaries," *Marine Pollution Bulletin*, vol. 6, no. 6, pp. 85-87, 1975.
- [17] B. A. Bergamaschi, E. Tsamakis, R. G. Keil, T. I. Eglinton, D. B. Montluçon, and J. I. Hedges, "The effect of grain size and surface area on organic matter, lignin and carbohydrate concentration, and molecular compositions in Peru Margin sediments," *Geochimica et Cosmochimica Acta*, vol. 61, no. 6, pp. 1247-1260, 1997.
- [18] S. Nazneen, S. Singh, and N. J. Raju, "Heavy metal fractionation in core sediments and potential biological risk assessment from Chilika lagoon, Odisha state, India," *Quaternary International*, vol. 507, pp. 370-388, 2019.
- [19] X. Sun, D. Fan, M. Liu, Y. Tian, Y. Pang, and H. Liao, "Source identification, geochemical normalization and influence factors of heavy metals in Yangtze River Estuary sediment," *Environmental pollution*, vol. 241, pp. 938-949, 2018.
- [20] S. Zhao, C. Feng, D. Wang, Y. Liu, and Z. Shen, "Salinity increases the mobility of Cd, Cu, Mn, and Pb in the sediments of Yangtze Estuary: relative role of sediments' properties and metal speciation," *Chemosphere*, vol. 91, no. 7, pp. 977-984, 2013.
- [21] I. Riba, E. Garcia-Luque, J. Blasco, and T. DelValls, "Bioavailability of heavy metals bound to estuarine sediments as a function of pH and salinity values," *Chemical Speciation & Bioavailability*, vol. 15, no. 4, pp. 101-114, 2003.
- [22] M. Paalman, C. Van Der Weijden, and J. Loch, "Sorption of cadmium on suspended matter under estuarine conditions; competition and complexation with major sea-water ions," *Water, Air, and Soil Pollution*, vol. 73, no. 1, pp.

- 49-60, 1994.
- [23] J. Acosta, B. Jansen, K. Kalbitz, A. Faz, and S. Martínez-Martínez, "Salinity increases mobility of heavy metals in soils," *Chemosphere*, vol. 85, no. 8, pp. 1318-1324, 2011.
- [24] J. Bai *et al.*, "Arsenic and heavy metals pollution along a salinity gradient in drained coastal wetland soils: Depth distributions, sources and toxic risks," *Ecological indicators*, vol. 96, pp. 91-98, 2019.
- [25] V. Torsvik, L. Øvreås, and T. F. Thingstad, "Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors," *Science*, vol. 296, no. 5570, pp. 1064-1066, 2002.
- [26] H. A. Wiatrowski and T. Barkay, "Monitoring of microbial metal transformations in the environment," *Current opinion in biotechnology*, vol. 16, no. 3, pp. 261-268, 2005.
- [27] F. Fernández-Luqueño, C. Valenzuela-Encinas, R. Marsch, C. Martínez-Suárez, E. Vázquez-Núñez, and L. Dendooven, "Microbial communities to mitigate contamination of PAHs in soil—possibilities and challenges: a review," *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 18, no. 1, pp. 12-30, 2011.
- [28] D. F. Cleary, F. J. Coelho, V. Oliveira, N. C. Gomes, and A. R. Polónia, "Sediment depth and habitat as predictors of the diversity and composition of sediment bacterial communities in an inter-tidal estuarine environment," *Marine Ecology*, vol. 38, no. 2, p. e12411, 2017.
- [29] R. Wilms, H. Sass, B. Köpke, J. Köster, H. Cypionka, and B. Engelen, "Specific bacterial, archaeal, and eukaryotic communities in tidal-flat sediments along a vertical profile of several meters," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72, no. 4, pp. 2756-2764, 2006.
- [30] Y. Hong, J. Wu, and B. Song, "Vertical stratification of sediment microbial communities along geochemical gradients of a subterranean estuary located at the Gloucester beach of Virginia, USA," *Frontiers in microbiology*, vol. 9, p. 3343, 2018.
- [31] Y. Qiao, J. Liu, M. Zhao, and X.-H. Zhang, "Sediment depth-dependent spatial variations of bacterial communities in mud deposits of the eastern China marginal seas," *Frontiers in microbiology*, vol. 9, p. 1128, 2018.
- [32] G. M. Quero, D. Cassin, M. Botter, L. Perini, and G. M. Luna, "Patterns of benthic bacterial diversity in coastal areas contaminated by heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs)," *Frontiers in microbiology*, vol. 6, p. 1053, 2015.
- [33] C. C. Obi, S. A. Adebusoye, E. O. Ugoji, M. O. Ilori, O. O. Amund, and W. J. Hickey, "Microbial communities in sediments of Lagos lagoon, Nigeria:

- elucidation of community structure and potential impacts of contamination by municipal and industrial wastes," *Frontiers in microbiology*, vol. 7, p. 1213, 2016.
- [34] A. Dell'Anno, M. Mei, C. Ianni, and R. Danovaro, "Impact of bioavailable heavy metals on bacterial activities in coastal marine sediments," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 19, no. 1, pp. 93-100, 2003.
- [35] M. Fabiano and R. Danovaro, "Enzymatic activity, bacterial distribution, and organic matter composition in sediments of the Ross Sea (Antarctica)," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, no. 10, pp. 3838-3845, 1998.
- [36] L. Besaury, J.-F. Ghiglione, and L. Quillet, "Abundance, Activity, and Diversity of Archaeal and Bacterial Communities in Both Uncontaminated and Highly Copper-Contaminated Marine Sediments," *Marine Biotechnology*, journal article vol. 16, no. 2, pp. 230-242, April 01 2014, doi: 10.1007/s10126-013-9542-z.
- [37] B. D. B. Zampieri, A. B. Pinto, L. Schultz, M. A. de Oliveira, and A. J. F. C. de Oliveira, "Diversity and distribution of heavy metal-resistant bacteria in polluted sediments of the Araçá Bay, São Sebastião (SP), and the relationship between heavy metals and organic matter concentrations," *Microbial ecology*, vol. 72, no. 3, pp. 582-594, 2016.
- [38] D. H. Parks and R. G. Beiko, "Measures of phylogenetic differentiation provide robust and complementary insights into microbial communities," *The ISME journal*, vol. 7, no. 1, p. 173, 2013.
- [39] R. Knight *et al.*, "Unlocking the potential of metagenomics through replicated experimental design," *Nature biotechnology*, vol. 30, no. 6, p. 513, 2012.
- [40] H. Guo, M. Nasir, J. Lv, Y. Dai, and J. Gao, "Understanding the variation of microbial community in heavy metals contaminated soil using high throughput sequencing," *Ecotoxicology and environmental safety*, vol. 144, pp. 300-306, 2017.
- [41] J. Xavier *et al.*, "Evaluation of the microbial diversity and heavy metal resistance genes of a microbial community on contaminated environment," *Applied Geochemistry*, vol. 105, pp. 1-6, 2019.
- [42] N. A. Lloyd, S. Nazaret, and T. Barkay, "Whole genome sequences to assess the link between antibiotic and metal resistance in three coastal marine bacteria isolated from the mummichog gastrointestinal tract," *Marine pollution bulletin*, vol. 135, pp. 514-520, 2018.
- [43] H. Yin *et al.*, "An integrated insight into the response of sedimentary microbial communities to heavy metal contamination," *Scientific reports*, vol. 5, p.

- 14266, 2015.
- [44] J. Zhu *et al.*, "Phylogenetic analysis of bacterial community composition in sediment contaminated with multiple heavy metals from the Xiangjiang River in China," *Marine pollution bulletin*, vol. 70, no. 1-2, pp. 134-139, 2013.
- [45] S. Abdelbary, M. S. Elgamal, and A. Farrag, "Trends in Heavy Metals Tolerance and Uptake by *Pseudomonas aeruginosa*," in *Pseudomonas Aeruginosa-An Armory Within*: IntechOpen, 2019.
- [46] J. S. Chang and J. Hong, "Biosorption of mercury by the inactivated cells of *Pseudomonas aeruginosa* PU21 (Rip64)," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 44, no. 8, pp. 999-1006, 1994.
- [47] G. Awasthi, A. Chester, R. Chaturvedi, and J. Prakash, "Study on Role of *Pseudomonas aeruginosa* on Heavy Metal Bioremediation," *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, vol. 3, no. 4, pp. 92-100, 2015.
- [48] Q. Guo, N. Li, S. Chen, Y. Chen, and S. Xie, "Response of freshwater sediment archaeal community to metal spill," *Chemosphere*, vol. 217, pp. 584-590, 2019.
- [49] L. M. Paulo, J. Ramiro-Garcia, S. van Mourik, A. J. Stams, and D. Z. Sousa, "Effect of nickel and cobalt on methanogenic enrichment cultures and role of biogenic sulfide in metal toxicity attenuation," *Frontiers in microbiology*, vol. 8, p. 1341, 2017.
- [50] P. Gupta, T. Sreekrishnan, and Z. Shaikh, "Influence of heavy metal Cr (VI) containing effluents on anaerobic microbiome in a novel hybrid anaerobic reactor: Linking with reactor performance for enhanced treatment," *Journal of Environmental Chemical Engineering*, vol. 7, no. 5, p. 103311, 2019.
- [51] A. Adekunle, V. Raghavan, and B. Tartakovsky, "On-line monitoring of heavy metals-related toxicity with a microbial fuel cell biosensor," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 132, pp. 382-390, 2019.
- [52] S. A. Baldwin *et al.*, "The microbial community of a passive biochemical reactor treating arsenic, zinc, and sulfate-rich seepage," *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, vol. 3, p. 27, 2015.
- [53] W. Walters *et al.*, "Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys," *Msystems*, vol. 1, no. 1, pp. e00009-15, 2016.
- [54] A. Orell, C. A. Navarro, R. Arancibia, J. C. Mobarec, and C. A. Jerez, "Life in blue: copper resistance mechanisms of bacteria and archaea used in industrial biomining of minerals," *Biotechnology advances*, vol. 28, no. 6, pp. 839-848, 2010.
- [55] Y. Yin *et al.*, "Effects of copper addition on copper resistance, antibiotic

- resistance genes, and intl1 during swine manure composting," *Frontiers in microbiology*, vol. 8, p. 344, 2017.
- [56] F. W. Outten, D. L. Huffman, J. A. Hale, and T. V. O'Halloran, "The independent cue and cusSystems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 33, pp. 30670-30677, 2001.
- [57] D. R. Brown *et al.*, "The cellular prion protein binds copper in vivo," *Nature*, vol. 390, no. 6661, p. 684, 1997.
- [58] C. Rensing and G. Grass, "Escherichia coli mechanisms of copper homeostasis in a changing environment," *FEMS microbiology reviews*, vol. 27, no. 2-3, pp. 197-213, 2003.
- [59] L. Besaury *et al.*, "Abundance and diversity of copper resistance genes *cusA* and *copA* in microbial communities in relation to the impact of copper on Chilean marine sediments," *Marine pollution bulletin*, vol. 67, no. 1-2, pp. 16-25, 2013.
- [60] C.-J. Shih *et al.*, "Biochemical mechanisms and microorganisms involved in anaerobic testosterone metabolism in estuarine sediments," *Frontiers in microbiology*, vol. 8, p. 1520, 2017.
- [61] R. Kanwal, T. Ahmed, S. Tahir, and N. Rauf, "Lead, Copper, Iron, Manganese and Arsenic," *Pakistan Journal of Biological Sciences*, vol. 7, no. 1, pp. 6-9, 2004.
- [62] N. Dombrowski, J. A. Donaho, T. Gutierrez, K. W. Seitz, A. P. Teske, and B. J. Baker, "Reconstructing metabolic pathways of hydrocarbon-degrading bacteria from the Deepwater Horizon oil spill," *Nature microbiology*, vol. 1, no. 7, p. 16057, 2016.

附錄

附錄一 評選會議委員意見及廠商回覆表

行政院環境保護署環境檢驗所委託研究計畫「次世代定序技術應用於污染鑑識技術開發」評選會議廠商回覆意見表

委員意見	廠商意見回復 (國立臺灣大學)
<p>(一) 楊喜男委員</p> <p>1. 是否執行不同深度底泥之定年？是否有相關研究及未來執行方式？如何補強？</p> <p>2. 河口受鹽度影響極大，本計畫執行時如何排除？</p>	<p>1. 由於台灣河口易受颱風等強烈擾動，目前以同位素定年技術的誤差大約為 1 公尺深度，因此在本研究計畫內採取較淺(較多微生物質量)的底泥深度較無法得知年代。</p> <p>2. 本計畫預計將氯離子列入分析項目，以評估鹽度對於菌群之影響</p>
<p>(二) 何建仁委員</p> <p>1. 同樣厚度底泥在同一水體不同水理位置有不同時空意義，如何採代表性底泥樣品(採樣位置)？如何分層？定年？時間解析？運送？保存？</p> <p>2. 採樣是否有協力團隊？經費分析表無採樣費？</p>	<p>1. 採樣方式為以全新壓克力管插入底泥，取出底泥後以全新不鏽鋼刮版將底泥柱依深度分層，樣品放入無菌採樣袋後置於 4°C 冰櫃，搭高鐵運送回實驗室後放入 -20°C 冰箱保存</p> <p>2. 採樣由三位計畫主持人共同執行，採樣皆由兼任研究助理自行完成，採樣費僅支出差旅費。</p>

<p>3. 後續應用性？生物晶片快篩降低成本？或開發方法？</p>	<p>3. 目前計畫僅著重於建立重金屬濃度與菌相、基因體的相關性。若未來發展順利，有機會朝開發微通道生物快篩晶片或第三代攜帶式全基因定序儀(nanopores)配合軟體分析發展現地操作技術。</p>
<p>(三) 黃克莉委員</p> <p>1. 本計畫係探討底泥重金屬含量與微生物菌相組成差異之相關性，但重金屬分析卻選用水質檢測方法，恐無法測得底泥中重金屬真實濃度</p> <p>2. 計畫主持人與二位共同主持人均為微生物專長，底泥重金屬含量檢測是否委由其他實驗室執行？該實驗室是否獲有相關認證以保證其數據品質？或其他數據品質保證之做法？</p>	<p>1. 本計畫重金屬採用環檢所公告之土壤中重金屬檢測方法－王水消化法 (NIEA S321.65B)</p> <p>2. 重金屬交由于昌平副教授實驗室負責，關於數據品質，會準確執行重金屬檢測時之 QA/QC</p>
<p>(四) 李俊福委員</p> <p>1. 底泥採樣是否分層採樣，預計採多深？如何分層？</p> <p>2. 底泥是否檢測 SOM？重金屬是否檢測全量？多少種？</p>	<p>1. 是，採集 30-50 公分深，以全新壓克力管插入底泥，取出底泥後以全新不鏽鋼刮版將底泥柱依深度分層。</p> <p>2. 是。重金屬檢測為鎘、鉻、銅、鋅、鎳、鉛等 6 種重金屬之全量。</p>

<p>3. 今年污染源或污染物鑑識技術的標的為何？(前兩年已針對硫酸銅)</p> <p>4. 年度目標(p.24)第二點與第三點如何以具體實驗作密切串連？</p>	<p>3. 標的污染物為鎘、鉻、銅、鋅、鎳、鉛等 6 種重金屬。</p> <p>4. 目標二、三為分別兩項不同目標，目標二菌群組成以 16S-rRNA gene V4 region amplicon sequencing 分析；目標三為基因體變化與重金屬相關性，以 whole genome shotgun sequencing 實驗完成。</p>
<p>(五) 黃王瑰委員</p> <p>1. 1.文獻提及金屬隨著鹽度對不同金屬的”移動性”會有所增減，如何在此實驗設計上釐清鹽度在此實驗之影響？</p> <p>2. 請描述採樣過程，如何避免採樣器材污染。不同深度如何規劃，工作內容的”各式”重金屬係指為何？</p>	<p>1. 本計畫預計將氯離子列入分析項目，以評估鹽度對於菌群之影響。</p> <p>2. 每一個採樣點皆以全新壓克力管進行採樣。取出底泥後以全新不鏽鋼刮版將底泥柱依深度分層。重金屬含鎘、鉻、銅、鋅、鎳、鉛等 6 種。</p>

附錄二 期初工作報告 廠商回覆意見表

行政院環境保護署環境檢驗所委託研究計畫「次世代定序應用於污染鑑識開發」期初工作報告 廠商回覆意見表

委員意見	廠商意見回復 (國立臺灣大學)
<p>(一) 客雅溪出海口各採樣點底泥 (0~60 公分) 目前測得每 10 公分之分層重金屬濃度變化不大，較無法比較菌相消長變化差異性，建議更換採樣點或地點。</p>	<p>謝謝委員的意見。 目前確定採樣點為客雅溪、三姓公溪、鹽港溪及二仁溪出海口，並測得底泥分層重金屬有一定的變化。</p>
<p>(二) 執行單位國立臺灣大學可向本所商借柱狀採樣器進行採樣，採集之樣品亦可先至本所利用 X 射線螢光光譜儀快速篩檢重金屬濃度。</p>	<p>謝謝委員的意見。 本次採樣因須避免微生物污染，以全新壓克力管進行採樣，樣品也至環檢所以 XRF 初步得知重金屬濃度，感謝環檢所的協助。</p>
<p>(三) 本所目前有採集二仁溪與三爺宮溪匯流口底泥樣品，測得每 10 公分之分層重金屬銅濃度變化較大執行單位可向本所取回樣品檢測菌相，俾利進行比較總體基因體 之差異；另如需重新至該處採樣檢測，亦可先行通知本所，俾利安排人員協助。</p>	<p>謝謝委員的意見。 本次計畫除了原訂的新竹各出海口採樣點外，也透過事先得知環檢所二仁溪底泥之重金屬數據，確認分層濃度有變化，因而另於 4/30 進行二仁溪的採樣，感謝環檢所的協助。</p>

附錄三 期中工作報告 廠商回覆意見表

行政院環境保護署環境檢驗所委託研究計畫「次世代定序應用於污染鑑識開發」 期中工作報告 廠商回覆意見表

委員意見	廠商意見回覆 (國立臺灣大學)
<p>(一) 楊喜男委員</p> <p>1. 二仁溪底泥污染之重金屬包括 Cu、Cr、Cd、Ni、Pb、Zn 等，均在 10-20 cm 深最高，是否可找文獻反映與過去污染歷史相關？</p> <p>2. 二仁溪污染重金屬種類除 Cu 外，還包括 Cr、Cd、Ni、Pb、Zn 等，後續菌相分析是否具鑑別性？</p>	<p>1. 由於定年技術的誤差大約為 1 公尺深度，因此在本研究之底泥深度無法得知年代，此外由多變量分析可以得知在考慮不同物種組成及豐度的情況下，所有樣點間不同深度的樣品並無明顯的差異，可能原因為常受颱風等干擾使沉積情況不穩定，綜合以上原因，並無法將 10-20 cm 這個深度的重金屬累積情況與過去污染事件的時間點進行直接的連結。</p> <p>2. 由 CCA 結果可以看出此次採樣的樣品，重金屬 Cu、Cr、Cd、Ni、Pb、Zn 彼此關聯性非常大，較難判斷單一重金屬對於特定菌群之影響，因此需輔以 pearson 相關性分析，交叉比對後已將不同深度中不同重金屬所能篩選出之優勢菌群列於結果與討論。</p>
<p>(二) 李俊福委員</p> <p>1. p.13 第三章研究方法中三姓公溪及鹽港溪底泥採集深度為 30cm，為何結果討論鹽港溪深度為 50cm？(p.23)。</p> <p>2. 底泥前處理是否遵循 NIEA 之標準方法？(風乾一周，過 2mm 篩網)</p>	<p>1. 每個樣點皆採二底泥柱，鹽港溪採樣時僅一底泥柱身度達 50 公分，另一底泥柱深度則為 30 公分</p> <p>2. 是</p>

<p>3. TOC 分析方法是否考量無機碳酸鹽之干擾？</p>	<p>3. TOC 分析方法參考土壤有機值測定方法－燃燒/紅外線測定法 (TARI S201.1B)，該方法為不考慮無機碳酸鹽。</p>
<p>4. 表 4-2<百分比之意義為何？</p>	<p>4. 該比例來自體積粒徑累積分部曲線，以第一次採樣點三姓公溪 0-10 公分處為例，0~2.82μm 的粒徑佔總體的 10%，即 0~10%的比例是由 0~2.82μm 的粒徑所構成；而 0~16.19μm 的粒徑佔總體的 50%，即 0~50%的比例是由 0~16.19μm 的粒徑所構成；0~54.69μm 的粒徑佔總體的 90%，即 0~90%的比例是由 0~54.69μm 的粒徑所構成。</p>
<p>5. 底泥金屬含量是否已經過水分含量校正</p>	<p>5. 是</p>
<p>6. 部分河川重金屬含量不隨底泥剖面深度而改變，此結果如何與微生物菌相差異及功能性基因之消長做連結？</p>	<p>6. 新竹的 3 條河川，銅離子濃度不隨底泥深度而有明顯變化。因此本研究會採用異地 (例如客雅溪(低銅場域)與二仁溪(高銅場域)逐層比較的方式為主。</p>
<p>(三) 李永安委員</p>	
<p>1. 實驗結果表 4-3 底泥重金屬含量 (1) 是否可標註哪些重金屬含量超過污染或重污染的含量？ (2) 在二仁溪的 10-20cm 深度，各種重金含量均較高(2 倍多)，是否有重複測試？</p>	<p>1. (1) 已註明 (2) 濃度皆較高</p>

- | | |
|---|--|
| <p>2. 選擇以 V4 的 16S rRNA 區域進行定序以了解微生物菌相方面</p> <p>(1) V4 區域對細菌種(species)或屬(genus)的區分效果如何？</p> <p>(2) 16S rRNA 基因在不同細菌中有不同的 copy number 未來如何判定那種細菌的數量？</p> | <p>2. (1)以 Illumina 平台的定序長度來說（最長 300 x2 所以總長度是最長 600）目前使用 V4 區域，對於細菌的屬，具有明確的鑑別度。但是對於種的區分，還是需要幾近 16S 全長的區段才可以鑑別，目前可以達到長片段定序的平台為 PacBio，但是所需的費用相當高。因此微生物菌相的環境調查還是以 V4 區域進行分析。以下文獻可供參考： Improved Bacterial 16S rRNA Gene (V4 and V4-5) and Fungal Internal Transcribed Spacer Marker Gene Primers for Microbial Community Surveys.</p> <p>(2) 在前幾年的確有學者質疑 copy number 對於細菌數量判定所帶來的影響，所以在某些 16S database 中，例如 rdp classifier 中，會把 copy number 的併入分析的因素之一。問題是 16S copy number 的數目，必須依賴每個基因體的定序，才可以找出每個細菌的基因體具有多少個 16S 的基因。目前已解序的基因體大約 6800 個。2018 年的一篇文獻指出，除非我們環境樣本中的 16S 序列，跟已知細菌基因體的 16S 序列很相近，不然根據 copy number 去校正，對於環境細菌數量判定並沒有很大的影響。可參考 Correcting for 16S rRNA gene copy numbers in microbiome surveys remains an unsolved problem.</p> |
|---|--|

<p>3. 採取的土壤有多種物化性質的差異，微生物相也會有差異，未來在統計分析上，如何進行才能確定那種重金屬的量與微生物相中那一屬(或種)間的關係？</p> <p>4. Metagenomics 分析上，目前是否有要針對的哪些 target genes(如抗銅基因)進行分析？</p> <p>5. 在評選會議中，有提及要做氫離子的分析，目前是否有在進行？</p>	<p>3. 可利用統計上的多變量分析 (multivariate analyses)即可評估那種重金屬的量與微生物相中那一屬(或種)間的關係</p> <p>4. 目前我們會針對由模式生物如大腸桿菌與枯草桿菌所找到的抗銅基因(如 CusA 及 CopA)進行重點分析。已知這些基因也存在於某些厭氧菌如 <i>Shewanella</i> spp.。但我們也會尋找在高銅離子環境中大量表現的非預期性功能基因，並分析其與銅離子的關係，這也是環境基因體學的優勢之處。</p> <p>5. 氫離子分析已完成並將數據附於結果與討論。</p>
---	--

(四) 何建仁委員

<p>1. 表格 1-2 預期目標及目前執行成效，「採集河口底泥樣品、底泥分層物化特性分析」已全部完成，原預計 8 月底完成，差異分析應為超前。</p> <p>2. 3.1.2 採樣方法分層很重要，能否補充如何取出完整底泥柱體？如何量測樣品深度？(厚度)避免膨脹</p>	<p>1. 謝謝委員的指正，以更正</p> <p>2. 以全新壓克力管插入底泥並以鈍器將其敲入，隨後在壓克力管上蓋上塑膠蓋以避免大氣壓力將底泥往下壓，取出之底泥由於具有相當之黏性，因此以適當直徑之棍棒套著乾淨衛生紙並可將管柱內底泥完整推出，以插入時的高度作為零基準面，利用捲尺測量，往下每 10 公分進行分層。附圖為實際底泥採集圖</p>
---	---



<p>3. 3.2 物化分析陰乾一周後以 2mm 篩網過篩分析，是否會有含碳物質氧化減少含量之問題？所以 p.29 碳氮氫的重量百分比不高？</p>	<p>3. 有可能，但是樣品為底泥，陰乾為必要之過程。</p>
<p>4. P.16 底泥重金屬之檢測係用土壤重金屬檢測方法-微波輔助王水消化法(NIEA S301.60B)和底泥金屬檢測方法-微波輔助酸消化法(NIEA M301.00B)有何不同？</p>	<p>4. NIEA S301.61B 於 107 年公告訂定發布，108 年生效，為最新的公告方法，而 NIEA M301.00B 易受到氧化矽、二氧化鈦、氧化鋁等其他物質干擾。</p>
<p>5. 先用 2mm 篩網過篩，粒徑分析以 0.04~500 μm 之雷射粒徑分析儀，能否補充大於 500 μm 小於 2000 μm 的底泥占比為多少？以利資料解決？</p>	<p>5. 0.04~500 μm 為分析儀檢測極限，</p>
<p>6. 表 4-2 粒徑分析表 (1) 鹽港溪 30-40 及 40-50cm 深度的百分比粒徑數值相同，平均為 34.47 及 20.12 μm，請確認？ 另 p.33 5.2 族群分析鹽港溪 30-40 及 40-50cm 底泥成砂質狀，未來可能排除此樣品，一般 63 μm 以下顆粒為粉粒或粘粒，於前述砂質不同？請確認 (2) 表 4-2 能否另以砂粒、粉粒、粘粒之比例表示？</p>	<p>6. (1) 已更正；已重新分類土壤種類 (2) 已更新</p>
<p>7. 4.1 物化性質 p.23 pH 介於 6.92 至 7.765 間，應和表 4-1 圖 4-1 的有效位數一致？</p>	<p>7. 已更正</p>
<p>8. 附錄 p.41,43 楊喜男委員、黃王瑰委員所提鹽度影響問題，均回覆「評估鹽度對菌群之影響」，此部分是否已完成？</p>	<p>8. 謝謝委員，已將鹽度納入多變量分析以了解其對菌群之影響</p>
<p>9. 表 3-1 座標能否換回 TWD97 座標系統？</p>	<p>9. 謝謝委員建議，已修改</p>

<p>(五) 黃王瑰委員</p> <ol style="list-style-type: none">1. DNA 濃度二重複差異大，推估原因為何？如何排除人為萃取技術差異？。2. 取 0.25g 底泥進行萃取，請問是乾重或濕重，如何取才能代表該分層深度樣品？3. 實驗規劃進行之二重複，根據生物變異性大，檢測費用高，此規劃目的為何？目前二重複樣品 DNA 濃度差異大，未來獲得菌種變異推估為何？將如何進行總體評估？二重複加總評估還是取濃度高的進行分析？	<ol style="list-style-type: none">1. 本次實驗的重複樣品，並非技術性重複，而是在取樣的樣點區，在不同區段的底泥，分別採兩個樣本。DNA 濃度的差異性，可能來自於樣本本身的 DNA 含量，同時底泥的理化因子也可能會影響微生物的數量，並非人為差異。此次分析的重點是各環境樣本的菌相結構差異與各優勢菌屬的”相對豐富度”。因此可降低人為萃取差異。2. 沒有進行烘乾的動作，怕熱導致 DNA 的損壞。所謂的 0.25 克是將底泥高速離心之後，把上清液移除後的重量。方法中所謂的 0.25 克是指每一個萃取的反應，底泥的量。每個分層的 DNA 皆使用了至少五個反應，每次的分層取樣，都會去挖不同區塊的分層來進行萃取，不至於失去代表性。3. 重複性的解釋請見 1. 由主座標分析可以看出二重複樣品並不會聚集在一起，因此目前評估方式為捨棄重複的概念，將所有樣品皆視為獨立樣品進行分析，再進行整體評估。
---	--

附錄四 期末工作報告 廠商回覆意見表

行政院環境保護署環境檢驗所委託研究計畫「次世代定序應用於污
染鑑識開發」 期末工作報告 廠商回覆意見表

委員意見	廠商意見回覆 (國立臺灣大學)
<p>(一) 楊喜男委員</p> <p>1. 請補充如古菌等其他專有名詞之說明。</p> <p>2. 上層與重金屬相關之菌屬較下層多，是否與氧氣等因素造成厭氧菌及好氧菌差異所致？</p>	<p>1. 古菌，亦稱為古細菌。雖然與真細菌(bacteria)同屬於原核生物，古菌與真細菌在細胞結構，生理生化，代謝行為乃至環境適應方面都有很大的差異。舉例來說，古細菌的細胞壁結構大多為 pseudopeptidoglycan 而真細菌則以 peptidoglycan 以及多醣體為主。古菌的細胞膜結構較細菌穩定，且較為黏稠，使他們可以生長在高壓高熱以及厭氧的極端環境。另外，古菌往往較細菌能耐受較高濃度的重金屬。對於能量來源的利用，古菌多利用無機物質，例如硫，鐵或是氫氣當作電子捐贈者(能量來源)。</p> <p>2. 由於本次實驗並無將氧氣納入環境因子，並無法確定氧氣對於菌群影響之程度，不過查詢篩選出來之菌群可以發現絕大部分菌屬皆屬於厭氧或兼性厭氧，因此推測氧氣並非導致上層與重金屬相關之菌屬較下層多之原因。</p>

<p>3. CCA 分析中汞之分析結果與其他金屬不同，是否是汞偏高是三姓公溪；而其他金屬是二仁溪偏高，不同溪流底泥特性不同所致？</p>	<p>3. 謝謝委員，確實汞濃度分布與其他重金屬不同會導致 CCA 呈現不同的趨勢，為確認汞篩選出之菌屬可能具有汞的正相關性，將這些菌屬進行文獻比較，補充於 4.3.6 菌群與環境因子之綜合分析。</p>
<p>(二) 李俊福委員</p> <p>1. 比較不同分層中環境因子與微生物基因體之關聯性其中環境因子是否侷限於重金屬濃度(或銅濃度)？</p> <p>2. 鹽港溪、三姓公溪及客雅溪 0-30 公分銅濃度沒有差異，如何比較微生物菌群及基因(抗性)數量的差異為銅濃度差異所引起？</p>	<p>1. 菌群部分由包含所有環境因子與單獨以重金屬為環境因子之 CCA 圖比較，可以看出差異不大，因此推測重金屬為此次造成菌群結構變化之主要因子。 另外，基因體的比較，是以樣點之間銅離子差異性大的來進行基因體學的分析。並且挑選兩個樣點之間，基因數量上有顯著差異的基因，再進行基因功能性註解。由於銅離子的濃度差異較顯著，因此初步只針對銅相關基因進行搜索及評估。如果要探討環境因子是否與其他金屬的抗性基因有相關，在環境基因學的分析上有很大的困難度，需要重新篩選基因及分析。</p> <p>2. 本次比較基因(抗性)數量的樣點為鹽港溪及二仁溪的 10-20 公分樣品，兩者銅濃度分別 22(鹽港溪)及 487ppm(二仁溪)，具明顯差異。另外菌群比較係將四個樣點綜合比較，且指標菌屬與鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅等皆有顯著正相關。</p>

<p>3. 鹽港溪第二次採樣 30-50 公分(X) 代表意義(第二次採樣時間?)</p> <p>4. 客雅溪第一次與第二次樣品 TOC 與銅濃度差異大原因?</p> <p>5. 表 4-8~4-11 重金屬濃度應換算成 mg/kg</p>	<p>3. 謝謝委員指正，X 表示該深度無取樣(已修正)，採樣時間同一樣點兩樣品皆為相同時間採樣，詳見 3.1.1 採樣點位資訊敘述。</p> <p>4. 兩個樣品並非在同一個採樣點進行採樣，僅為附近位置(差距 10 公尺以上)，故並不能算是重複採樣，不一定具有相同的濃度及特性，且從數據看起來深度越深差異也較大，可推估其為較早期的環境所造成，表層也因河口漲退潮等不確定因素，數具差異性較大。</p> <p>5. 謝謝委員指正，已修正</p>
<p>(三) 羅蕙芬委員</p> <p>1. 可否解釋何謂本土受銅污染底泥的抗銅基因?</p>	<p>1. 由於許多細菌抗銅的機制以及基因序列，大多都是針對模式好氧的模式菌株，而且可以培養在人工培養基上的大腸桿菌、枯草桿菌以及 <i>Pseudomonas syringae</i> 等典型的模式菌株當作研究材料。因此，在此報告中的所謂”本土”係指，利用環境基因體學在台灣河口的底泥找到了許多「存在於當地且占有優勢」的抗銅基因序列。這些基因不管是在核酸或是氨基酸序列，經由 NCBI 資料庫的比對，相似度最高的序列來源的菌株幾乎都是無法培養或尚待培養的厭氧細菌或古菌。舉例來說，我們發現的其中一個 multicopper oxidase 的氨基酸序列，在資料庫上做相近的是古細菌 <i>Candidatus Methanoperedens</i> sp. BLZ2 的 copper oxidase (序列編號為 WP_097297867.1)，相似</p>

	<p>度達 54%。註解：Candidatus 在原核生物分類學上表示該微生物無法在培養基上穩定且長期的生長。</p>
<p>2. P.38 頁三姓公溪底泥深度少 40-50 公分(表格中)。</p>	<p>2. 本次計畫三姓公溪底泥僅能採至深度 30 公分，因此無 40、50 公分深度之樣品，詳見 3.1.1 採樣點位資訊敘述。</p>
<p>3. 土壤中原有的礦物質及重金屬有哪幾種，要先說明，再提出鎘等重金屬存在是污染。</p>	<p>3. 由於本計畫並無採集上游底泥，因此無法得知底泥重金屬之背景值，不過本計畫選定之河口過去皆有污染事件報導，例：香山濕地綠牡蠣事件、二仁溪工業廢水污染事件等，顯示這些河口皆長期暴露在人為重金屬污染的風險下，另外再藉由底泥品質指標之分類管理及用途限制辦法的規範標準來判斷哪些河口的何種重金屬屬污染超標。</p>
<p>4. 圖表字體大小要一致，圖表單位也盡量一致</p>	<p>4. 謝謝委員意見，已修正</p>
<p>5. 是否更詳細敘述之所以選客雅溪、三姓公溪、鹽港溪及二仁溪為污染河口的代表河口？</p>	<p>5. 客雅溪、三姓公溪、鹽港溪河口皆位於香山濕地區域，香山濕地過去長期受中上游工廠、科學園區排放廢水污染，且曾爆發綠牡蠣事件；而二仁溪過去一直以污染著名，即便目前熔煉業、電鍍業已消失，其中上游仍有許多養豬業及工廠會排放畜牧廢水、工業廢水，因此選定此四個長期暴露在人為污染風險下的河口作為代表</p>

<p>6. 圖深度對濃度作圖，建議點線圖改為柱狀圖會比較清楚明瞭(圖 4-1~4-19)。</p>	<p>河口。</p> <p>6. 謝謝委員意見，已修正</p>
<p>(四) 吳俊宗委員</p> <p>1. 參考文獻之格式宜一致，如期刊之第一個英文字大寫；引用不完全；期刊不縮寫。</p> <p>2. 嚴重污染場所之抗性基因的多樣性較低，原因為何？是微生物多樣性的問題，還是同一種對污染反應的問題？</p>	<p>1. 謝謝委員指正，已修正</p> <p>2. 抗性基因的表現，只能用來應付一定程度(研究文獻所用的銅離子濃度多在10 ppm 以下)的銅離子濃度。超過這個範圍，銅離子即會造成細菌或古菌的死亡，進而大幅改變微生物族群結構以及造成多樣性降低。因此，我們推測，二仁溪的高銅環境對於微生物是一種非生物性的篩選因子 (abiotic factor)，淘汰了許多無法適應此壓力的微生物，因此族群多樣性以及抗銅機制也趨近於單一化。在銅污染較低的鹽港溪，真細菌 (eubacteria) 的多樣性 (species richness)比在銅污染較高的二仁溪高，因此抗銅基因的多樣性也高，同時這些基因也大多來自於真細菌。</p>

- | | |
|--|--|
| <p>3. 微生物對汞與其他六種重金屬所呈現之典型關聯分析不同，其原因請多說明，是否和微生物對重金屬之抗性機制不同有關？</p> | <p>3. 菌群部分，汞與其他六種重金屬典型關聯分析之趨勢不同，可能原因來自汞的分布濃度與其他六種金屬不同，彼此皮爾森相關性分析呈負相關(詳見表 4-12)，另外細菌或古菌對抗重金屬存在多種不同機制，有些機制(例如銅氧化蛋白)具有離子專一性；有些機制則專一性程度較低，可對抗數種重金屬。由於初始的想法是找與銅離子抗性的基因，因此只針對銅相關基因進行搜索。如果要探討環境因子是否與其他金屬的抗性基因有相關，在環境基因學的分析上有很大的困難度，因為我們第一步的篩選即是針對銅基因表現有顯著差異的基因的來進行討論。</p> |
| <p>4. 本方法應用於污染鑑識有何干擾因子？未來要應用時，有哪些須特別留意的限制因子？</p> | <p>4. 污染程度須有一定程度之差異，菌群結構才可能有明顯之改變(其餘老師並無補充)</p> |
| <p>5. 是否可用抗性基因片段作為鑑定污染之指標？</p> | <p>5. 藉由這次的普查，我們首先得到了某些抗銅基因的核酸序列環境基因體學的一大優勢即是可以避開傳統的菌株(一般認為超過 99% 的原核生物尚無法用現行技術加以分離培養)，尤其是厭氧細菌與古菌，難以分離培養的困境，直接得到環境中的功能性基因及其胺基酸序列。目前在鹽港溪及二仁溪河口底泥得到的抗銅基因有兩大類群：銅運輸蛋白(P-type ATPase)以及銅氧化蛋白(multicopper oxidase)。前者可能用於銅離子的輸出(抗性機制)，但亦</p> |

<p>6. 建議項目(p.83)可增加，特別對於未來執行項目之建議。</p>	<p>可能用於銅離子的輸入(銅代謝及同化機制)，個別蛋白質的功能，有待菌株的純化與後續的生理測試。相對而言，銅氧化蛋白的功能較為單純，且只跟銅的抗性機制有關：在膜間區將毒性較高的一價銅氧化，並避免其進入細胞內。因此，在後續的研究上，我們可以針對這些來自受汙染河口之細菌與古菌的銅氧化蛋白基因序列進行比對，找出共有的虛列區(consensus region)，並且嘗試設計專一性引子(specific primer)或是退化性引子(degenerate primer)。前者的功能在於對特定基因的偵測，可以用於 qPCR 對於該基因進行絕對定量。藉由比較不同樣區的基因數量，來推測該樣區是否長期收到污染。後者則適用於針對待測樣區的抗銅基因的多樣性(頁 37-38)。</p> <p>6. 謝謝委員建議，已更新</p>
<p>(五) 黃王瑰委員</p> <p>1. 本計畫檢出具特定環境因子的菌種，例：汞，可增加國際相關文獻支持佐證。</p> <p>2. 基因萃取效率或技術或樣品特性會影響分析基因總量，本報告討論基因總量比較等，是否有考慮此因子影響程度？</p>	<p>1. 謝謝委員意見，已新增於 4.3.6 菌群與環境因子之綜合分析。</p> <p>2. DNA 濃度的差異性，可能來自於樣本本身的 DNA 含量，同時底泥的理化因子也可能會影響微生物的數量，導致基因總量有所差異。此次分析的重點是各環境樣本的菌相結構差異與各優勢菌屬的「相對豐富度」。因此基因萃</p>

	取效率差異影響較小。
--	------------

附錄五 樣本的 DNA 濃度

樣本	ng/μL	260/280	260/230
客雅溪			
K1 0-10 公分	16.8	1.68	1.31
K1 10-20 公分	67.2	1.33	0.92
K1 20-30 公分	5.5	1.21	0.51
K1 30-40 公分	15.9	1.65	0.54
K1 40-50 公分	9.3	1.46	0.51
K2 0-10 公分	8.2	1.67	0.92
K2 10-20 公分	6.4	1.68	1.02
K2 20-30 公分	20.5	1.55	0.56
K2 30-40 公分	9.0	1.48	0.49
K2 40-50 公分	2.9	0.84	0.42
鹽港溪			
B1 0-10 公分	3.6	1.27	0.32
B1 10-20 公分	7.6	1.5	0.47
B1 20-30 公分	1.8	0.8	0.17
B1 30-40 公分	12.3	1.44	0.49
B1 40-50 公分	16.7	1.47	0.51
B2 0-10 公分	10.1	1.49	0.51
B2 10-20 公分	20.7	1.56	0.52
B2 20-30 公分	71.4	1.53	0.61
三姓公溪			
T1 0-10 公分	40.8	1.94	1.94
T1 10-20 公分	3.4	1.42	0.37
T1 20-30 公分	1.4	0.81	0.13
T2 0-10 公分	20.2	1.71	1.33
T2 10-20 公分	8.3	1.68	0.78
T2 20-30 公分	2.2	1.24	0.41
二仁溪			
R1 0-10 公分	6.4	1.66	0.42
R1 10-20 公分	3.0	0.98	0.51
R1 20-30 公分	4.6	1.29	0.42
R1 30-40 公分	3.2	1.36	0.54
R1 40-50 公分	1.0	1.34	0.16
R2 0-10 公分	4.9	1.36	0.73
R2 10-20 公分	10.8	1.76	1.43

次世代定序方法應用於污染鑑識技術開發

R2 20-30 公分	2.3	1.17	0.22
R2 30-40 公分	1.8	1.24	0.45
R2 40-50 公分	5.7	1.50	0.64

附錄六 7 個顯著表現之銅抗性基因的 DNA 及胺基酸序列

Multicopper oxidase gene sequences:

>k127_35775783_2

GTCGTCAACCAGCATTTCGCTCCTCCTGGGAGTTGCGGAAAGAGCGGATGTGAT
AGTGGACTTCTCGGCATACGCGGGACAGACACTCATCCTCTACAACGATGCAC
CCGCAGCATTCCCGGCACTCGATCCCCACTTCGACTACTACACCGGCAAGCCGG
ATCTGACGGATATCGGCGGAACACCGACAACCTATCCGGGATACGGTCCTAAT
ACCCGGACGATGATGCAGATCAGGGTTGGAAATACCGTCACAAAGGACACCAC
CGAGGTGACCCTTGCAAATCTCCAGGCAGTGTGGCCGATACCCCTGGAAAGA
GGGGTGTATTCGAGGTCTCACAGCCACCGATCATCGTCCCGTCAGCAGAGTAC
AACTCAGCCTATGAGGGAGCGAACTTCCCAGGAGATACCTTTGTCAGGATCTAC
CAGACCTCCCACACGTTCCCTGAACCTCTCAAACGGGCTCATGACCATCCCGTTC
TACCCGATGGCCATCCAGGACGAGATGGGAGAATCGTACGACGAGTATGGGCG
AATGGCAGGATTCCCTCGGACTCCAGTACCTGAACCCGCAGGGACAGCAGCACC
TCCTGCTCTACGGCTATGAAAGCCCACCGCTTGAGATCCTTACCGATTCCAAGT
ACGCCAACAGGTCACCCAACCTCGGAGATGGGACTGAGATATGGAAGATCACC
CATAACGGTGTGCGATACCCACCCGGTTCACTGGCACTTGGTCAACGTCCAGCTG
ATCAACCGGGTAGGATGGGACAATGCAGTGATCCCCCGGACCAGACTGAGCT
CGGATGGAAGGAGACCCTCAGGGTTGATCCCCTCGAGGACACCATTGTGGCGA
TGAGGGCAGTCGCACCCAACCTGCCGTTTGCTATCCCGAACAGCTATCGCCCCG
TTGATCCCACGATGCCGCTTAATCAGCCGATGCGGTCATCTCCGGGCGGAGGTA
ATGCCTGGTTCGATCCGGCCGGCCAGCCGGTTCAGGTGCTGAACCATATTGTCA
ATTCGGATGGGAGTACGTCTTCCACTGCCATATCCTTGCCCACGAAGAGATGG
ACATGATGCATGCCCTGCTCTTTGCTCCCGAGCCGAATGCACCCTCCAACCTGG
TAGCTACCATGAACGGCACAGCGGTCGACCTGACATGGAATGATAATTCACTC
GATGAAACAGGTTTTACCATCCAGAGGGCTGATGATGAAGGATTTACCATGGG
TCTTGTGACCTTCACTACTGGAATGGATACCTTGAAATACATTGATATGAGTAT
CATCCAGGTCAGACCTATTACTIONACAGGGTACAGGCTACTAACGTGGTAGGGG
ATACAACCGCTTATGCTGCACCTGCCGTGGGATTCCCAACCCAATCGGTTAGCT
CTCCCTGGTTCGAACATTGCAATGACCAGCATCGTGCGCCTCCACAATAATTT
CCATCAATCCAACGTCGGGAGTTCGGGGCCAGACGATAATCTTTACTATCACCG
GTACCAACTTCATCGTGGGACAGACAACAGTGACCTTCACCGGTGCTGCGGGC
GCTGTCCTCGCTCCAACGACTATCACTTCGGTGACCCCGACACAGATCACCGGC
AGCATTACAATACCTGCAGGAGCCTCCATCGGACTTTACACCGTAACGGTCACG
ACCACCAGTGGAGGGAGTGCCAGCCTCGTGAACGGATTTGTCGTTTCAGGGAAC
CAATCCACCGACCATCACCTTAATCAGTCCTGTTACCGGTTTCGCTCGGGACTAC
GGTGAACCTTCGCTATCACCGGGACTAACTTCGTGGCCGGCCAGACTACCGTGAT

CTTCACGAATGCTGCTGGAACAGTTCTCGCACCAACAGTGCTGGGCCC GGGTGG
CACCAACACGGATCACTGGCAGTATTGCGATACCCTCTACTGCCAGGTAGGG
CCGTATACGGTCACCGTAATTACCCTTAATGGAGGAGTAGCGAGTCTGGTGAAT
GGATTTACCGTTCAGGGAGCGAATCCCCCGACATTTACATCCATCAATCCAGCT
TCCGGGACAGTCGGGACTGCAGTGACTTATGAGATCATTGGAACAAACTTCGT
ACCAGGCCAGACAACAGTCACGTTTACGAGTGCTACGGGAACAGTACTCGCTC
CCACCACATTGATCGATGTTACCGCAACGCAGATCACCGGCACGATTAGTATCC
CCGCGACGGCTGTGACAGGGGCTTATACGGTCACCATCACAACGACTACAGGG
GGATCTGTCAGTGCAGTGGGTGCCTTACGGTGCTTGGCGGTGCCGGGGCTCCC
CCGACATTCACCTCGATTTCTCCGGTATCCGGAAGGGCAGGGGCTACAATTCGT
TTCATATCACCGGAACCAATTTTATCCCTGGATCAACCACGGTGGAATTCCGT
AACGCGGCAGGAACACTGCTCGCTCCGGCAACTCTGACTTCAGTATCAGCAAT
GCAGATAAAAGGCCAATTGACCATCCCGACAACACTGCCGCAGCTGGTCCTTACA
ACGTCATTATCACGACGCCAGGTGGATCGGCGACTGGAGTGAATGCCTTCACG
GTTTCGTGCACGGTAG

>k127_35775783_2

VVNQHSLLLGV AERADVIVDFSA YAGQTLILYNDAPAAFPALDPHFDY YTGK PDL
TDIGGTPPTYPGYGNTRTMMQIRVGNTVTKDTTEVTLANLQAVFADTPGKRGVF
EVSQPPIIVPSAEYNSA YEGANFPADTFVRIYQTSHTFLNLSNGLMTIPFYPM AIQDE
MGESYDEYGRMAGFLGLQYLN PQGQQHLLLYGYESPPEIL TDSKYANQVTQLGD
GTEIWKITHNGVDTHPVHWHL VNVQLINRVGWDNAVIPPDQTELGWKETLRVDPL
EDTIVAMRAVAPNLPFAIPNSYRPLDPTMPLNQPMRSSPGGGNAWFDPAGQP VQV
LNHIVNFGWEYVFHCHIL AHEEMDMMHALLFAPEPNAPSNLVA TMNGTAVDLTW
NDNSLDETGF TIQRADDEGFTMGLVTFTTGMDTLKYIDMSIIPGQTYYYR VQATNV
VGDTTAYAAPA VGFP TQSVSSPWSNIAMTSIVAPPTIISINPTSGVRGQTIIFTITGNF
IVGQTTVTFTGAAGAVLAPTTITSVTPTQITGSITIPAGASIGLYTVTVTTTSGGSASL
VNGFVVQGTNPPTITLISPVTGSLGTTVNFAITGNFVAGQTTVIFTNAAGTVLAPT
VLGRVAPTRITGSIAIPSTAQVGPYTVTVITLNGGVASLVNGFTVQGANPPTFTSINP
ASGTVGTA VTYEII GTNFVPGQTTVTFTSATGTVLAPTTLIDVTATQITGTISIPATAV
TGAYTVTITTTTGGSVSAVGAFTVLGGAGAPPTFTSISPVSGRAGATIRFTITGNFIP
GSTTVEFRNAAGTLLAPATLTSVSAMQIKGQLTIPTTAAAGPYNVIITTPGGSATGV
NAFTVRAR

>k127_3607561_3

TTGTTGCGAGTGAGTAAAAACGGGCTGGTTTACTATCAGTTCGAAACCTGGGA
GCGATTTGGTAAAAGGGGCGAGTTACAGCACGGCGTGT TTTACCCGCTTGGGGG
GAATCAGTGCACCACCCTTTGCCACACTCAACACCGGTCACACGGTGGGTGAC
GATCCGGCAGCAGTGGCCGAAAACCACCGCGTATCTGTAGCACGCTGGGCAC
GGACGCGGCTTCCATCGCCAGCGGCAGTCAGGTCCACGGGGTGGGCGTGGCCG

TGATTGGGCCCCAGGACCGCGGGTGTGTGCAGCCCTCCACCGATGTGCTGGTG
 ACCAACCAACCTAACATTCCTCTGATGCAACGTTTTGCCGATTGCACGCCGTTG
 TTGTTGTACGACCCGGTACGGCGCGCTCTTGGCTTGGCGCACGCCGGCTGGCGT
 GGCACCGTGCAAGGGGTCGCCATCGAGGCAGTGCGCGCCATGGGCGGGCTTT
 TGGCTGCCGCCCCGGCAGACATTGTTGCCGGCCTGGGGCCGTCCATCGGCCCTG
 TTGCTACGAAATAGGTCAAGTGGCCGGGCAAATACGCAAAGCCTTTCCGAACG
 GCGACCGCTGGCTCGTCGTCCAGCGCAATGGCGCCGTCCACCTGGACTTGTGGA
 GCGCCAACCTCCAGCAATTGCAAGCGATGGGCGTCCGCCAGGTGGAAGTGGCG
 GACATCTGCACAGCCTGCCATACAAAAGAGTTTTTTTCTCACCGGGCAGAGAG
 AGGACACACCGGTCGCTTTGGGGTAATGGCCATGCTGTCTGGCCTAG

>k127_3607561_3

MLRVSKNGLVYYQFETWERFGKRGELQHGVFTRLGGISAPPFATLNTGHTVGDDP
 AAVAENHRRICSTLGTDAASIASGSQVHGVGVAVIGPQDRGCVQPSTDVLTNQP
 NIPLMQRFADCTPLLLYDPVRRALGLAHAGWRGTVQGVVAVRAMGRAFGCRP
 ADIVAGLGPSIGPCCYEIGQVAGQIRKAFPNGDRWLVVQRNGAVHLDLWSANLQQ
 LQAMGVRQVEVADICTACHTKEFFSHRAERGHTGRFGVMAMLSA

Copper-translocating P-type ATPase

>k127_5217671_1

CTCTCAGCCTATCTCTATTCCGCACTTGCCACATTCTTCCCTCATTTCTTCATGC
 ACGCCGGTATCGTACGCCATGTCTATTTTCGACGGCGCCGCCATGATCATCACAT
 TTATTCTCCTGGGGCGTCTTCTGGAGGCCAAGGCCAAGGGGAAGACATCCATG
 GCCATCAAAAGGCTCATGGGACTAAAGCCGAAGACTGCCAGAGTGAAAAGGG
 ATGGGAAGGAGATGGACATCCCTGTAGATGCCTTGATCAAGGGGGACCTGATC
 CTGGTCCGGCCCCGGAGAAAAGGTCCCCACCGATGGGATCGTAGTGGAAGGGAC
 CTCTGCGGTGGATGAATCCATGCTCACAGGTGAGAGCATACTGTATCCAAGA
 CCCGGGGAAGCGAGGTATTCGGGGCCACCATAAACAAGAGCGGGAGTTTCACC
 TTTGAGGCGACCAAGGTGGGTGCCGAGACCGCCCTTTCCAGATCATCCGTCTG
 GTGGAAGAGGCCAGGGCTCCAAGGCCCAATCCAGCGCATCGCGGACAAAGT
 GGCTCCATCTTTGTGCCGGTCGTGATGGGGATTGCCCTGCTCACATTTATCATC
 TGGTACTTTCTGGTTCCGAATCCCATCTTCAGCCGGGCCCTTCTCAACTTCGTAT
 CCGTCTCATCATCGCTGCCCTGCGCCATGGGCCTCGCAACCCCCACGGCCA
 TCATGGTGGGGACAGGGGTGGGAGCCGAAAACGGCATCCTGATCAAAGGGGG
 AGAAAGCCTGGAAAAGGCTTACCAGCTCACCACAGTTGTATTCGACAAGACCG
 GGACTTTGACAAGGGGGGAACCCGAGGTGACGGATATATTCACCATCCGGGAT
 ATAAGTGAAGAAAGACTTCTGGAAGTTGCTGTCTCCATCGAAGCTGTTTCGGAA
 CACCCCTGGCCCAGGCCATTGTCCAAAAGGCCGACAGCATGGGGTGAACCC
 TGTGCCTGTGAAGTCATTCGAGGCAATATCAGGACTGGGGGCAAAGGCAATCC
 TGAACGGCCATCCATGCCTCCTGGGGAATCTGCGCCTCATGCAGGAGAAAAAA

ATAAGGCTGGACACATTGGCAGAGAAGGCACAAGCCCTTGCCGGACAGGGGA
AGACATGCGTATTTGTGGCCGAGGATGACAAAGTCATAGGTATCGTTGCCCTGT
CCGATCTGCCAAAGGAATCCGCTGCGGAAACCATTGCCGCTCTAAAGGCGCTG
GGGCTGGAGGTGGCCATGATCACCGGTGATCATCAAGGCACGGCCCAGGGGAT
CGGCCATACCCTTGATATCGATCATATAATGGCTGAAGTCCTTCCGGGTGAGAA
GGCGGCTGAGATCAAAGACTTCAAGCCGCAGGCAAGGTGGTAGCCATGGTGG
GAGACGGGATCAACGATGCCCCGGCCCTCACTACTGCGGACATCGGGATCGCC
ATAGGAGCGGGTACGGATGTGGCTATGGAGGCAAGCGACATTACACTCATAAC
CGAGGACCTGCGTTTCGGTTCCTTCGGCCATCAGTTTATCCTTCAAGACAATGAG
GGTGATCAGGCAAACCTCTTCTGGGCGTTTTTCTATAACAGCTTGGGCATCCC
CATTGCCGCGGGTATCCTTTACCCCTTTTTGGGTATCCTCCTCAATCCCGTTTTT
GCGGCTGCGGCTATGGCCCTGAGTTCTGTCTCCGTGGTGAGCAATTCATTGCGT
CTGAGAGGGGCAAGGATCAAATAA

>k127_5217671_1_aminoacid

LSAYLYSALATFFPHFFMHAGIVRHVYFDGAAMIITFILLGRLLLEAKAKGKTSMAIK
RLMGLKPKTARVKRDGKEMDIPVDALIKGDLILVRPGEKVPTDGIVVEGTS AVDES
MLTGESIPVSKTRGSEVFGATINKSGSFTFEATKVG AETALSQIIRLVEEAQGSKAPI
QRIADKVASIFVPVVMGIALLTFFIIWYFLVPNPIFSRALLNFVSVLIIACPCAMGLATP
TAIMVGTG VGAENGILIKGGESLEKAYQLTTVVFDKTGTLTRGEPEVTDIFTIRDITE
KRLLEVAVSIEAVSEHPLAQAI VQKGRQHGVNPVPVKSFEAISGLGAKAILNGHPCL
LGNLRLMQEKKIRLDTLAEKAQALAGQGKTCVFVAEDDKVIGIVALSDLPKESAA
ETIAALKALGLEVAMITGDHQGTAQGIGHTLDIDHIMAEVLPGEKAAEIKRLQAAG
KVVAMVGDGINDAPALTTADIGIAIGAGTDVAMEASDITLITEDLRSVPSAISLSFKT
MRVIRQNLFWAFFYNSLGIPIAAGILYPFLGILLNPVFAAAAAMALSSVSVVSNLRL
RGARIK

>k127_40935517_12

TTGGGCATCAAGAAACCAGAGAAGGCTAAAATCCACATAACAGGCATGACCTG
CACTACCTGTGCGGCTACTATTGAGAAGGGGCTTGCCAGACTCCCGGCGTGG
AAAAAGCCGATGTTAGTTTTGCTTCAGAGAAGGCGTCTGTGGAATATGACCCCT
CCAAGGCTAACCTCGCCAATATTGCGAAGACCATCTCGGGATTGGGTTATAGG
GTAGCGACTAAGAAGTCCGTGTTTCCGGTAAATGGGATGACTTGTGCTTCGTGT
GTCGCCCCGAGTGGAAGAGGCTCTTCCAGTGTACCCGGGGTTATTTAGCAAAT
GTTAACCTGGCTTCTGAGAAAGCCACGGTTGAGTATATCGAGGGGCACTGATGT
GAATGAGATGCGACGAGCGGTTGAAGAGGCCGGTTACGGATTGGGATCAGAA
GCGGCAACACTGGAAGATGTCACCACAGCTTCTCAAAGAGAGATAAGGGGTTT
GAGAAACAGGTTTATCTTCGCACTTACCATCGCTGTGGTGATAATGGTGCTGAG
CATGTGGACTGATTTCCAGGGAAGCCTTATTTGCTCTGGGCATTAGCTACTCC
GGTACAGTTCTGGATAGGTTGGCGGTTCTATAAAGGGATGTGGGGAGCGCTGA

AGCACAAGACCGCCGATATGAACACGCTCATCGCTGTTGGCACTTCGGCAGCTT
ATTTCTACAGTATGGTTGCGGTGCTGGCTCCAGGCCTGTTCCGCCGCTGCAGATA
TGGAGCTTGGCCTATATTTTGATACTTCCTCTATGATTATAGCCCTGATTCTCCT
GGGCCGATTTTTGGAGTCTAGGGCTAAAGGTCAGACTTCAGAGGCAATAAAGA
GGCTTATTGGCCTTAAGCCGAAGACTGCCACAGTTATCCGTGACGGTAAAGAA
ATTGAGATTTCTGTGGAAGAGGTGCAGGTTGGTGACATTATATTGGTGCGGCCG
GGTGAGCGGATACCTGTGGATGGTGTCTCGCCAGGGTTATTCCAGCATCGAT
GAGTCTATGATAACCGGAGAGAGTATACCGATGGACAAGAAGGTTGGTGATGC
TGTCATTGGCGGTACTATCAATAGGATGGGCAGCTTTCAATTTGAGGCAACCAG
GGTGGGTAGGGATACCACCCTGGCCCCGATTGTAAGGCTGGTGGAGGAAGCGC
AGGGAAGTAAGGCACCCATTCAGCGCCTGGCTGATGTCATTGCCAGCTACTTCG
TGCCGGTGGTGATAAGTATTGCCATTGTAACCTTCATTGTCTGGTTTTTCTGGG
TCCGCCGCCAGCGCTTACTTATGCACTGCTGAACTTTGTGGCGGTACTGATTAT
CGCTTGCCCGTGTGCTCTAGGTCTGGCTACTCCGACAGCTATCATCGTCGGCAC
TGGCAGGGGGGCTGAAAACGGTGTCTCATTAGAAGCGGTGAAGCTTTGGAGA
GGGCACATAAGATAAACTCGGTACTGCTGGACAAAACAGGAACGTTGACCCGG
GGCGAACCCAAGGTAAGTACTGACATAGTTGCCGCATCATCTATTTCAGAAGATGA
GGTTCTGCGGTTGGCGGCTTCAGTTGAACATGATTCCGGAGCACCCATTGGCGGA
GGCCATCGTAAAAGCATTACAGAAAAGAACTGAAGCTACTTAAGGTCTCAG
ATTTCCAAGCTATGCCGGGACATGGTGTGGAAGCCTTAGCCGGAGGCAAGCAG
GTTTTACTGGGCAATCTTGCCCTTATGAAGGAAAGGAAATTTTCTCTGAATGAC
ATGCAGAAAGAAGCTGAGCGCATGTTGAGCCAGGGTAAGACGGTGTGTTCTCCT
CGGTGTGAACAGCCGGGTAGCGGGCATCATTGGCCTGGCAGATACTCTTAAGC
CGAATGCCACGGAAGTAGTGGAAGCATTACACAAGTTAAATGCTGAGGTGGTG
ATGATTACCGGCATAACCGTCGCACGGCTGAGGCAATTGCGCATGAGGCGGG
CATTGACCGCGTCTTGCTGAGGTGTTGCCGAAAATAAGGCGCGGGAGGTTA
AAAGATTACAGGACGAGGGCAAGGTAGTGCGATGGTAGGCGATGGCATTAAAT
GATGCACCGCGCTGGCCCAAGCGGACGTGGGCATTGCCATAGGCACCGGCAC
AGATGTTGCCATGGAAACCGGCGATGTAACACTCATCAGCGGTGATTTGGATG
GTATTGTAAGTGCATATCTTTGAGCAAACGCACCATGAACACTATCAAACAGA
ACCTGTTCTGGGCTTTTGCCTATAATACTGCCCTTATACCGGTGGCGGCAGGCA
TACTTTACCTTGCTTTTCGGGAATTCCGGTGTCCCTTCGGGGCTTCACTTTGTTTT
TGGAATTATGGTTTTTTGAACCCGATGCTGGCGGCTTTGGCGATGGCTGCCAG
TTCCATCACTGTGGTGTCCAACCTCATTGCGACTGAGGACATTCAAGGCAGTTAA
GTTTGAGAAACTAATGGAAGGAGGTGAAAGGATGGCGATAGACCCAGTGTGCA
AGATGCAGGTGGATGAGAAAAAGGCTGCGGCTATCTCTGATTACAAAGGAAAG
AGGTATTATTTCTGCGCGGTGGGTTGCAAGAAGGCTTTCGACCAGAACCCTGGG
AAATATCTCACCGAGAAAGGCAAATGA

>k127_40935517_12

MGIKKPEKAKIHITGMTCTTCAATIEKGLAQTPGVEKADVSEKASVEYDPSKA
NLANIAKTISGLGYRVATKKSVPVNGMTCASCVARVEEALSSVPGVISANVNLAS
EKATVEYIEGTDVNEMRRAVEEAGYGLGSEAATLEDVTTASQREIRGLRNRIFAL
TIAVVIMVLSMWTDFPGKPYLLWALATPVQFWIGWRFYKGMWGALKHKTADMN
TLIAVGTSAA YFYSMVA VLAPGLFAAADMELGLYFDTSSMIIALILLGRFLESRAKG
QTSEAIKRLIGLKPKTATVIRDGKEIEISVEEVQVGDILVRPGERIPVDGVVRQGYSS
IDESMITGESIPMDKKVGDVIGGTINRMGSFQFEATRVRDRTLARIVRLVEEAQG
SKAPIQRLADVIA SYFVPVVISIAIVTFIVWFFLGPPPALTYALLNFVA VLIIACPCAL
GLATPTAIIVGTGRGAENGLIRSGEALERAHKINSVLLDKTGTLTRGEPKVTDIVA
ASSISEDEVLRLAASVEHDSEHPLAEAIKAFTEKLLKLVSDFAQAMPGHGVEAL
AGGKQVLLGNLALMKERKFSLNDMQKEAERMLSQGKTVLFLGVNSRVAGIIGLA
DTLKPNATEVVEALHKLNAEVVMITGDNRRRTAEIAAHEAGIDRVLAEVL PENKAR
EVKRLQDEGKVVAMVGDGINDAPALAQADV GIAIGTGTDVAMETGDVTLISGDL
DGIVTAISLSKRTMNTIKQNLFWAFAYNTALIPVAAGILYLAFGNSGVPSGLHFVFG
NYGFLNPMLAALAMAASSITVVSNSLRLRTFKAVKFEKLMEGGERMAIDPVCKMQ
VDEKKA AISDYK GKRY YFC AVGCKKAFDQNP GKYLTEK GK

>k127_4711859_12

TTGGGGTCCGGTTCGCGTTTTGCGCTGGAGAGGGATGAGACCGTGTCTACCACA
AAGATTTCACTCCCGGTCACGGGGATGCACTGCGCCAATTGTTTCGACGACGATT
GAGCGCAACCTGAAAAAACTGGAAGGCGTGGCCGAGGCGAATGTCAATTATGC
GAATGAGAAGGCGACGGTGATCTTTGATCCGTCGGTCCTGGACCAAGAGGCGA
TCATTGGCCGGGTGCGCGACGTGGACTATGACGTGGCCACGGCCCGGGTTCGAG
TTACCGATCACCGGTATGACGTGTGCCAACTGCTCGGCTACCATCGAACGGACG
TTGAACCGCAAGGTGCCGGGGGTGATCGCTGCCAGCGTCAACCTGGCCAGCGA
GCGAGCCAGTGTTCGAGTATGTCCCCGGCCTGGTGTGCGCAAGCCGACATTGTGG
CTGCCATCGAGGGCATTGGCTATGGGGTGGTGGAAAGCCGCGAGGAGGCG
ATGGAGGACGCCGAGCGTGCCGCTCGCGAGGCCGAGATCGCCGACCAGGCACA
AAAGTTCTGGGTGGGTGTGATTTTTTCGCTGCCGCTGTTCTTGTGAGCATGGG
GCGCGATTTTGGGTGCTGGGCGATTGGGCCACGCTGCCTGGGTCAATTGGCT
GTTCTTGGCGCTGGCTACGCCGGTGCAGTTCTACACCGGCTGGGATTATTACGT
CGGTGGGTTC AAGAGCCTGCGTCACGGCAGCGCCAACATGGATGTGCTGGTGG
CGATGGGCTCGTCTGTGGCTTATCTCTATAGCATTTTCGTCATGCTGGGGGCCG
TAAGTGGCCATGTCTATTTTGAGACGTCGGCGCTTATCATCACTCTCATCAAGT
TGGGCAAGATGCTGGAGGCGCGTGCCAAGGGCCGACCAGCGAAGCCATCAA
GCGGTTGATGGGCCTTCGTCCCAAGACGGCCCACGTCATCCGCGATGGCGTGC
AGGTGGAGGTGCCGGTGGTGCAGTGGCCGTGGGCGACGTGGTGGTGGTGC

CCCGGCGAGCAGTTTCCGGTTCGATGGCCTCGTCGTCGAGGGGGCACTCGACGGT
 AGACGAGTCGATGCTCACCGGCGAGAGCCTGCCGGTAGACAAGAAGCCGGGTG
 ATGAGGTTGTGGGTGCGACGATCAACAAGCAGGGTTTGCTCAAGTTTGAGGCG
 ACCAAAGTCGGTGCCAGACGGCGCTGGCGCGGATCATTGCTGCTGGTGAAGA
 GGCACAGGGAAGCAAAGCGCCCATCCAACGCCTGGCCGATCGGGTGTGAGGTG
 TCTTTGTGCCGGCGGTCATTGCTATCGCGCTGGTTGTGTTTTTGGCCTGGTTCTT
 TTTCACGCCGCTGGGCTTTACGGCGGCTCTGATTGCGATGGTGGCGGTGCTGGT
 CATCGCTTGTCCGTGTGCGCTGGGCTGGCCACGCCGACAGCTATCATGGTCCG
 CACCGGCAAGGGGGCAGAGAATGGCATTCTGTTCAAGAACAGCGAGGCGCTGG
 AGCGGGCCCATCAGCTCGATGCTGTGGTGTGGACAAGACGGGCACCATTACG
 CAGGGCGAACCATCGGTGACCGACATAGTGGTGGCGGGTTCGAGGTCAAGAGG
 TTAGAGGGGGACAGGACCTTGGAACCTGAGACTTTTCTCCGTCTGGCGGCGA
 GTGCCGAGCGCGGTTTCGGAACATCCTTTGGGGCAGGCGATCGTTCAGGAGGCT
 CGGACCCGGGGCCTGGCACTGGCCGAGGTGGAAGATTTTGAGGCGGTGTGCGG
 TCAGGGCATTGTCGCCCCGGGTGGAAGGACGGGGGGTGGCCGTCGGCACCGCGC
 GCCTGATGGCGGCGCAAGGCGTCTCGCTCAATGGATTGGAAGCCGAGGTAGAC
 CGCCTGCAAGCTGAAGCCAAAAGTCCATGCTGGTGGCAATAGACGGCGATGC
 GGCGGGAGTCATTGCTGTGGCCGACACGATCAAGGCCGGCTCCCGCGAAGCCA
 TTGCCGAGTTGAAGCACCTGGGTCTGGAGGTAATCATGCTCACGGGAGATAAC
 CGGCGCACTGCTGAGGCGATCTCCGCCGAGGCCGGCGTGGACCGCGTCGTGGC
 CGAGGTGCTTCCCGGCGACAAGGCCGCCGGGTAAAGGCACTCCAGGCGGAAG
 GTCAGTTCGTGGGCATGGTGGGCGATGGTATCAACGACGCGCCGGCGCTGGCG
 CAGGCAGACGTCGGCATTGCCATCGGCACAGGCACGGACGTGGCCATGGAGAC
 CGCCGATGTGACGTTGATGAGTGGCGACCTGCGCGGCGTGCCCCGGGCCATTG
 CCTTGAGCAAGGCGACGATGCGCACGATCAAGCAGAATCTCTTTTGGGCCTTTT
 TTTACAACGTGATCTTGATCCCCATCGCGGCCGGGGCGCTTTATCCCTTTGAGG
 GGCTGCCTCCTGTGTTGCGCTCGCTGCACCCGGTGCTGGCGGCGGCGGCGAT
 GGCTTTCAGCTCGGTGACGGTGGTGACAAACTCGCTGCGCCTGCGGCGGGCAC
 GGATCTAG

>k127_4711859_12

MGSGSRFALERDETVSTTKISLPVTGMHCANCSTTIERNLKKLEGVAEANVNYANE
 KATVIFDPSVLDQEAIIGRVRDVDYDVATARVELPITGMTCANCSATIERTLNKVP
 GVIAASVNLASERASVEYVPGLVSQADIVAAIEGIGYGVVEAASEEAMEDAERAAR
 EAEIADQAQKFWVGVIFSLPLFLLSMGRDFLLGDWAHAAWVNWLFLALATPVQ
 FYTGWDYVYVGGFKSLRHGSANMDVLVAMGSSVAYLYSIFVMLGAVSGHVYFETS
 ALIITLIKLGKMLEARAKGRTSEAIKRLMGLRPKTAHVIRDGVEVEVPVVRVAVG
 VVVVRPGEQFPVDGLVVEGHSTVDESMLTGESLPVDKPKGDEVVGATINKQGLLK
 FEATKVGAQTALARIIRLVEEAQGSKAPIQRLADRVSGVFPVAVIAIALVVFLAWFF

FTPLGFTAALIRMVAVLVIACPCALGLATPTAIMVGTGKGAENGLFKNSEALERA
HQLDAVVLDKGTITQGEPSVTDIVVAGSRSGLEGDRITLEPETFLRLAASAERGSE
HPLGQAIVQEARTRGLALAEVEDFEAVSQGIVARVEGRGVAVGTARLMAAQGV
SLNGLEAEVDRLQAEAKTAMLVAIDGDAAGVIAVADTIKAGSREIAELKHLGLE
VIMLTGDNRRRTAEAISAEAGVDRVVAEVLPGDKAARVKALQAEGQFVGMVGDG
INDAPALAQADVGLAIGTGTDVAMETADVTLMSGDLRGVPRAIALSKATMRTIKQ
NLFWAFFYNVILIPAAAGALYPFEGLPVLRSLHPVLAAAAMAFSSVTVVTNSLR
LRARI

>k127_28254005_5

ATGAAGCATGATTCACATGAGGGTAGTTCGCATCATGCAATGATGATCCGTGAT
TACCGGAAACGCTTTATCGTCTCGATGATTCTTACCGTGCCGATCTTGTTACTGT
CTCCATTAGTTCAGACCCTATTAGGGCTGACGCCATTTCTTTCATTCCCTGGATA
CACGCTGGTTCTTTTTGGGTTCTCTACAATTGTCTATCTGTATGGTGGCTATCCT
TTCCTGAAAGGATTTGTCCAAGAGGTCAAGAAACAGCAATTGGGTATGATGAC
CTTAGTGGCGGCTGCCATTACTGTCTCGCCTATGTCTACAGTAGTCCGTTGTCTTT
GGGTTACCTGGTGTTATGTTCTTTTGGGAAGTGGCCACCCTAATTGATGTCATG
CTTTTTGGGCATTGGATGGAAATGCGATCCATCATGGGAGCTTCGCGGGCGTTA
GATGAGTTAGTCAAATTACTCCCCATTACCGCCCACGTTCTACAACCCGATGGA
ACCATCAAAGAAGTGCCCACCACCGAATTACAGCATGGTGATCAGGTTCTCATT
AAACCGGGTGATCGCGTGCCATCTGATGGCGTTATCCTTGAAGGGCAGAGTAG
CATGAACGAGGCTATGATTACTGGTGAATCCCTTCCCGTTGAGAAAGGTCCTGA
TGATCCGGTGATTGGTGGAGCGATTAATGGGGATGGAACCCTCACCGTTGAAA
TCACGAAAGTTGGGAGTGAGACATATTTAGCCCAAGTGATTGATTTGGTTCGCG
AAGCCCAGGAAAGCCGTTTCGCGAACC CAAGACCTGGCAAATCGTGCAGCATT
CTTCTGACAGTAATCGCACTTTCCGTCTGGTGCATTAACATTGGTGACATGGATT
GTGTTAGGTCAAGGGCTTACCTTTGGTATTGAGCGAAGCGTTACCGTGATGGTT
ATTGCATGTCCTCATGCCCTTGGATTGGCAGTTCCTCTTGTAGTGGCAGTTTCGA
CTTCGCTCTCTGCGAAGAATGGTTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
GAGCACGGGGATTAGACGCTATTGTATTGATAAAAACCGGTACGCTGACAGAA
GGCCAATTCTCGGTAACCGATATTTTGGCCCTAGCTGACCTGAATGCTGAAACT
CTGCTCCAATTCCCGCATCACTAGAGAGGTTATCTGAACATCCTATAGCCCAA
GGAATTGTTCTGTTGGAGCAAATGAACAAAAAATCTCTCTCAAATCGGCGAGTAA
TTTTCAAGCCATTCCAGGTAAAGGGGCAGAAGGACAAGTCGATGGCAAACAGA
TCAAAGTCGTGAGTCCGGGATACTTGAAAGAAAAAGGACTGCTTCCTCAAAT
GAAACGATAGAGAAGCTAGCTCAACAGGGAAAAACCATCGTCTATGTACTCGT
CGATAATAAACTTCAAGGTGCTCTAGCCCTTGCAGATGTGATAAGAAAAGAAT
CCAAGACCGCAATTGCTACGCTAAAGCGCATGGGTATTCAGAGCATGATGCTA
ACGGGTGACAATCGACATGTTGCGCAGTGGGTTTCCGAAGAGTTAGGTTTAGA

TGATTATTTTGCAGAAGTGCAACCTCATGAAAAAGCTGCAAAGATCCTTGAAGT
TCAAGCCCGAGGGGCTCACTGTAGCGATGGTAGGTGATGGAATTAATGATGCGC
CTGCTCTTGCCCAAGCAGATGTAGGAATAGCAATCGGAGCCGGAACCGATGTT
GCCATCGAAGCCGCAGATATTGTATTGGTCCGTAATAACCCTGAAGACGCTGTG
GCAATTCTTGATCTATCTCGAGCAACGTACAAGAAGATGGTTCAAATTTGTTA
TGGGCAACTGGTTATAACGCGGTAGCGATTCCATTAGCTGCAGGGCTGCTCCTT
CCGCTAGGAATCTTAATGAGTCCGGCTATTGGGGCAGCGCTCATGTCAATTAGT
ACAATTATTGTTGCAATCAACGCCCGATTTCTCTCCATCAAACTGACTCATGA
>k127_28254005_5

MKHSHEGSSHAMMIRDYRKRFIIVSMILTVPILLLSPLVQTLGLTPFLSFPGYTL
VLFGFSTIVYLYGGYPFLKGFVQEVKKQQLGMMTLVAAAITVAVVYSSAVVFLP
GVMFFWELATLIDVMLFGHWMEMRSIMGASRALDELVKLLPITAHVLQPDGTIKE
VPTTELQHGQVLIKPGDRVPSDGVILEGQSSMNEAMITGESLPVEKGPDDPVIGG
AINGDGLTVEITKVGSETYLAQVIDLVREAQESRSTQDLANRAAFLTVIALSVG
ALTLVTWIVLQGLTFGIERSVTVMVIACPHALGLAVPLVVAVSTSLSAKNGLLVR
DRAAFERARGLDAIVFDKTGTLTEGQFSVTDILPLADLNAETLLQFAASLERLSEHP
IAQGIVRGANEQKISLKSASNFAIPGKGAEGQVDGKQIKVVSPGYLKEKGLLPQN
ETIEKLAQQGKTIVYVLVDNKLQALALADVIRKESKTAIATLKRMGIQSMMLTG
DNRHVAQWVSEELGLDDYFAEVQPHEKAAKILEVQARGLTVAMVGDGINDAPAL
AQADVGAIGAGTDVAIEAADIVLVRNRPEDA VAILDLSRATYKKMVQNLLWATG
YNAVAIPLAAGLLLPLGILMSPAIGAALMSISTIIVAINARFLSIKTD

>k127_14914590_1

GCACCGATGATGGTGCTCATGGGGATTATGATGATTGCCACGTCCACTTTCTT
CACCTCTATCATAACTGGATCATGTTCACTTGCTACCCCGTGGTCTTCTGGG
CGGGACACAGGACGAACAAGTCGGCTCTCAAGGGGTTAATTAAGCTCAATCCC
AGTATGGATGCACTCATCTTTCTTGGTACGTTTTTCATCCTATGCGAGTGCCATAG
GTTCTTTTTTTGTGAACTTACCCAGTTTCGCTGAGTGTGCAGCGATGATTATGGC
CTTTCATTTGATCGGGAGATATTTGGAGACCATGGCGAGGGGCAGGGCCTCAC
AGGCGATCAAGAAGCTCTTGAGACTTGAGGCGAAAAGCGCCCGCATGCTGGTT
GAGGGAAAGGAAGTTGAGATCCCCATCGAAAAGGTTTCAGGTAGGGGATGTACT
GGTGGTGAGACCGGGGGAAAAGATTCCCACCGATGGCGTAGTGGTCGCCGGGG
AGAGCAGCGTTGATGAATCTATGGCTACGGGTGAATCCATGCCGGTAGAAAAA
AAGGAAGGAGATGAGGTAATCGGTGCCACCATCAATCAACAGGGGTTACTCAA
TGTCAGACCACCAAGGTAGGTAAGGATACCTTTCTCTCGCAGGTGATCAAGA
TGGTGGAGGAGTGTGAGGGTACCAAGGTACCCATCCAGGCATTTGCTGACAGG
ATCACCTTTTTCTTTGTTCCACGATTATTGCGATATCGTTGGTGACCTTTGTTG
CCTGGCTCACCTTTCCCGATCTTTTTATGACCATTGCCCGCTGGGCTCAACCCTA
TTTCCCCTGGGTTAACCCTCAGTAGGACTGGTTGCGTTGGCCCTTTTTGCTGCT

ATTACGGTACTGGTGATTGCCTGTCCCTGTGCTTTGGGACTCGCGACCCCTACC
GCCCTGATGGTAGGAAGCGGTATGGGTGCCGAGAGGGGTATCCTCATCCGACG
GGGAGAGGCCATTCAGACACTTCAGCATGTCAAGGCGATCGTGTGGATAAAA
CAGGTACCATTACCAGTGGAAAACCGGGGGTAACGGATATTGTTCCCTGTAAC
AGTTTTAGTGAGACCGAACTGTTGAGGATTGCCGGTCTGTAGAATCAGGGTCT
GAGCACCCACTTGGCCAGGCGATTGTGAGTGAGGCAAAAGTGAGAGGAGTGAC
ACTCAATGGTCTCAAGGAGTTTGAGGCAATCACCGGTCAAGGGGTTAAGGGAA
GGATAGAGGAGAGTGAGGTGCTGGTGGGTAGTCCGAGACTCATGCAGCACTAT
CAGATTTCTTTTGACGGAGTGCGAGCTTCTCTGGAGAGGCTGGAGGATGAAGC
CAAGACGGTGATGCTGGTGGCAGTAGACAACACGCCAGCAGGTATTATTGCGG
TTGCAGACACCCTCAAAGAGGATTCATCTGCTGCCATTGCCGAGCTTAAAAGTA
TGGGGTTTGAGACGGTAATGATCACCGGTGATAACCGGCGAACGGGACAGGCG
ATTGCGAGGAGGGTAGGGATCGAGCGAGTGCTCACCGAGGTTATGCCGGCTGA
TAAGGTCAAAGAGGTTAAAAGGCTCCAGGATGAGGGAGGAATGGTTGCCATGG
TGGGAGACGGGATTAATGATGCGCCAGCCTTAACCCAGGCCAATGTGGGAATT
GCACTGGGAACAGGAACCGATATTGCGATCGAGTCATCTGATATTACCCTGGT
GAGGGGGAAACTCAGTGCAGTGGTCTCTGCGATAAACTCTCCTTGAGCACCTT
TAGAAAGATCAAGCAGAATCTTTTCTGGGCATTCTTCTACAATCTGATTGCGAT
ACCGGTCCGC

>k127_14914590_1

APMMVLMGIMMIAHVHFLHLYHNWIMFILATPVVFWAGHRTNKSALKGLIKLNPS
MDALIFLGTFFSSYASAIGSFFVNLPSFAECAAMIMAFHLIGRYLETMARGRASQAIK
KLLRLEAKSARMLVEGKEVEPIEKVQVGDVLLVVRPGEKIPTDGVVVAGESSVDES
MATGESMPVEKKEGDEVIGATINQQGLLNKTKVKGDTFLSQVIKMVEECQGTK
VPIQAFADRITFFFVPTIIAISLVTFVAWLTFPDLFMTIARWAQPYFPWVNPSVGLVA
LALFAAITVLVIACPCALGLATPTALMVGSGMGAERGILIRGEAIQTLQHVKAIVF
DKTGTITSGKPGVTDIVPCNSFSETELLRIAGSVESGSEHPLGQAIVSEAKVRGVTLN
GLKEFEAITGQGVKGRIESEVLVGSPLMQHYQISFDGVRASLERLEDEAKTVML
VAVDNTPAGIIA VADTLKEDSSAAIAELKSMGFETVMITGDNRRRTGQAIARRVGIER
VLTEVMPADKVKEVKRLQDEGGMVAMVGDGINDAPALTQANVGIALGTGTDIAI
ESSDITLVRGKLSAVVSAIKLSLSTFRKIKQNLFWAFFYNLIAIPVA

附錄七 科技計畫成果效益事實報告表

108 年度科技計畫成果效益事實報告表

壹、計畫基本資料

領域別：_____

計畫主持人 童心欣、于昌平、江殷儒

計畫名稱『次世代定序方法應用於污染鑑識技術開發』

審議編號_____

計畫期程 108 年 03 月至 108 年 12 月全程經費 108 年度經費 3,150 千元執行機構 國立臺灣大學環境工程學研究所

貳、計畫目的與預期成效

1. 蒐集國內外利用河口微生物菌群分布與重金屬污染之相關文獻。
2. 分析不同深度河口底泥中微生物族群、基因體及重金屬濃度關聯。
3. 以菌群及基因體分析結果評估次世代定序應用於鑑識污染源之可能性及方向。

參、計畫目的主要內容

1. 選取代表性河口，於河岸採取不同深度底泥，分別萃取總核酸進行次世代定序及消化分析重金屬含量，並交叉比對重金屬含量及微生物體。
 - (1). 選取於客雅溪口、三姓公溪口、鹽港溪口及二仁溪口沉積底泥樣點，採取底泥樣品並分層分析底泥中各式重金屬含量，並分析底泥物理顆粒組成特性。
2. 以相關性分析建立可能受重金屬累積影響較大的微生物族群。
 - (1). 以微生物體學方式，分析 16S rRNA 序列分析各分層中微生物體組成。
 - (2). 比較不同分層中環境因子與菌相差異之關聯性。

3. 以微生物系統發生學資料，評估菌群之總體代謝表現，並比較相對應底泥重金屬濃度，評估底泥重金屬污染累積對於微生物菌群代謝表現之影響可能性。

(1). 以微生物基因體學方式，利用 shotgun sequencing 分析不同深度底泥微生物基因體組成。

(2). 比較不同分層中環境因子與微生物基因體之關聯性，並評估以此差異作為污染歷史辨識之可能性。

肆、計畫經費與人力

計畫名稱	執行情形	總人力 (人年)	研究員 級	副研究 員級	助理研 究員級	助理
次世代定序方法 應用於污染鑑識 技術開發	原訂	6	1	2	0	3
	實際	8	1	2	0	5(研 究生 兼任 助理
	差異	+2	0	0	0	+2

伍、計畫已獲得知主要成就與成果(out put)

1. *Bacteroidetes_vadinHA17_ge*、*GIF9_ge*、*JS1_ge*、*Methanolinea*、*Methanosaeta*、*Odinarchaeia_ge*、*Smithella*、*Vibrio* 等 8 種菌屬在經由鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅篩選下，重複於不同深度出現，顯示這些菌屬較有可能生存於重金屬濃度較高之環境，可能具有鑑識的河口重金屬污染之潛力。

2. 環境基因體學的分析結果顯示高污染地區之銅抗性基因歧異度較低污染處為低，且高污染區域主要來自古菌，低污染區域基因主要來自細菌。銅抗性基因主要來自兩個類群：銅輸出蛋白 P-type ATPase 及銅氧化酶 multicopper oxidase，顯示受污染河口的微生物，包括細菌與古菌，皆主要透過去毒(將一價銅氧化成低毒性的二價銅)以及銅離子輸出機制來

降低銅離子對細胞生理的負面影響。

陸、評估計畫主要成就及成果之價值與貢獻(out come)

1. 學術成就(科學基礎研究)(權重 30%)

提出以菌群結構及環境基因體變化方式鑑識重金屬暴露的概念，並以次世代定序結果統計分析篩選出適當指標菌群及抗性基因。

2. 技術創新(科技整合創新)(權重 30%)

利用次世代定序應用於污染追蹤。

3. 經濟效益(產業經濟發展)(權重 0%)

4. 社會影響(民生社會發展、環境安全永續)(權重 20%)

此研究可對於未來發展鑑識、污染源追蹤等科技幫助，追蹤歷史汙染對於環境影響。

5. 非研究類成就(人才培育、法規制度、國際合作、推動輔導)(權重 20%)

此研究培育碩士研究生共 5 名

6. 其它效益(科技管理政策及其它)(權重 __%)

柒、與相關計畫之配合

此計畫為先導型研究，目前尚無其他相關計畫配合

捌、後續工作構想及重點

1. 未來將以此計畫所篩選出的菌屬可供後續河口底泥污染進行微生物鑑識進行比較參考。
2. 未來持續蒐集環境數據及微生物等相關資訊，以增加分析結果精確性。
3. 本研究所獲致的 100 個以上的本土菌種之銅抗性基因的序列，未來可應

用於專一性的核酸引子的設計。透過後續的定量 PCR，我們可以獲得受污染場址的銅抗性基因的定量資訊。

4. 未來將可利用本研所得之抗性基因的多樣性數字化，用以評估銅污染程度。

玖、檢討會與建議

- 1.

填表人：_____ 連絡電話：_____ 傳真：_____

附錄八 科技計畫成果效益自評表

108 年度科技計畫成果效益自評表

壹、計畫基本資料

領域別：_____

計畫主持人	童心欣、于昌平、江殷儒
計畫名稱	『次世代定序方法應用於污染鑑識技術開發』
審議編號	
計畫期程	108 年 03 月至 108 年 12 月
全程經費	108 年度經費 3,150 千元
執行機構	國立臺灣大學環境工程學研究所

貳、計畫目標與執行內容是否符合(如有差異，請說明)

計畫目標與內容相符

參、計畫已獲得知主要成就與成果

1. *Bacteroidetes_vadinHA17_ge*、*GIF9_ge*、*JS1_ge*、*Methanolinea*、*Methanosaeta*、*Odinarchaeia_ge*、*Smithella*、*Vibrio* 等 8 種菌屬在經由鎘、鉻、銅、鉛、鎳、鋅篩選下，重複於不同深度出現，顯示這些菌屬較有可能生存於重金屬濃度較高之環境，可能具有鑑識的河口重金屬污染之潛力。
2. 環境基因體學的分析結果顯示高汙染地區之銅抗性基因歧異度較低汙染處為低，且高汙染區域主要來自古菌，低汙染區域基因主要來自細菌。銅抗性基因主要來自兩個類群：銅輸出蛋白 P-type ATPase 及銅氧化酶 multicopper oxidase，顯示受汙染河口的微生物，包括細菌與古菌，皆主要透過去毒(將一價銅氧化成低毒性的二價銅)以及銅離子輸出機制來降低銅離子對細胞生理的負面影響。

肆、計畫主要成就與成果之價值與貢獻度(out put)

1. 學術成就(科學基礎研究)(權重 30%)

提出以菌群結構及環境基因體變化方式鑑識重金屬暴露的概念，並以次世代定序結果統計分析篩選出適當指標菌群及抗性基因。

2. 技術創新(科技整合創新)(權重 30%)

利用次世代定序應用於污染追蹤。

3. 經濟效益(產業經濟發展)(權重 0 %)

4. 社會影響(民生社會發展、環境安全永續)(權重 20%)

此研究可對於未來發展鑑識、污染源追蹤等科技幫助，追蹤歷史汙染對於環境影響。

5. 非研究類成就(人才培育、法規制度、國際合作、推動輔導)(權重 20%)

此研究培育碩士研究生共 5 名

6. 其它效益(科技管理政策及其它)(權重 %)。

伍、評估計畫主要成就及成果之價值與貢獻(out come)

此計畫主要貢獻在於以菌群結構及及環境基因體變化方式鑑識污染源的起始研究，未來可有其他不同污染源鑑識的方法發展。

陸、與相關計畫之配合程度

此計畫為先導型研究，目前尚無其他相關計畫配合

柒、計畫經費的適足性與人力運用的適善性

計畫人力配置及經費皆適宜。

捌、後續工作構想及重點之妥適性

1. 未來將以此計畫所篩選出的菌科及菌屬可供後續河口底泥污染進行微生物鑑識進行比較參考。
2. 未來持續蒐集環境數據及微生物等相關資訊，以增加分析結果精確性。
3. 本研究所獲致的 100 個以上的本土菌種之銅抗性基因的序列，未來可應用於專一性的核酸引子的設計。透過後續的定量 PCR，我們可以獲得受污染場址的銅抗性基因的定量資訊。
4. 本研究獲得汙染可能造成古菌及細菌豐度及歧異度比例差異，未來可以其他樣品驗證後，建立數值化指標用於汙染評估。

玖、檢討會與建議

1. 水質底泥品質等環境數據及微生物群落組成等，均不斷隨著時間改變，建議未來持續蒐集環境數據及微生物等相關資訊，以增加分析結果精確性。
2. 目前的研究著眼於 DNA 樣本序列的分析，由於計畫期程有限，尚未有機會發展指標菌群及基因群定量引子及歧異度定量方法。未來若可以持續進行類似研究，將有機會建立數值化指標。

計畫主持人簽名：_____

填表人：_____ 連絡電話：_____

.....
 主管部會評估意見：

主管簽名：_____

統一編號
EPA154108010

※「本報告係受託單位或計畫主持人個人之意見，僅供本所施政之參考，不代表本所立場」。

※「本報告之著作財產權屬行政院環境保護署環境檢驗所所有，非經行政院環境保護署環境檢驗所同意，任何人均不得重製、仿製或其他之侵害」。