

以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(1/2)

EPA-106-E3S5-02-03

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：106 年 3 月 11 日起至 106 年 12 月 31 日止

中華民國一百零六年十二月

以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(1/2)

EPA-106-E3S5-02-03

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：106 年 3 月 11 日起至 106 年 12 月 31 日止

計畫經費：2,100,000 元

計畫主持人：童心欣 教授

共同主持人：于昌平教授、郭獻文教授

「以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(1/2)」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、郭獻文	
年度	106	
研究性質	☒ 基礎研究 ☐ 應用研究 ☐ 技術發展	
研究領域	生物類	
計畫屬性	☒ 科技類 ☐ 非科技類	
全程期間	106 年 3 月～106 年 12 月	
本期期間	106 年 3 月～106 年 12 月	
本期經費	2,100.0 千元	
	資本支出	經常支出
	土地建築 0 千元	人事費 814.931 千元
	儀器設備 0 千元	業務費 39.0 千元
	其他 0 千元	材料費 869.069 千元
		其他 377.0 千元
摘要關鍵詞(中英文各三則)		
硫酸銅、底泥、微生物菌群分布		
copper sulfate, sediment, microbial community profile		

計畫成果中英文摘要(簡要版)

一、中文計畫名稱：

以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(1/2)

二、英文計畫名稱：

Pollution source identification by microbial community profile

三、計畫編號：

EPA-106-E3S5-02-03

四、執行單位：

國立臺灣大學

五、計畫主持人（包括/共同主持人）：

童心欣，于昌平，郭獻文

六、執行開始時間：

106 年 3 月 11 日

七、執行結束時間：

106 年 12 月 31 日

八、報告完成日期：

106 年 11 月 24 日

九、報告總頁數：

140 頁

十、使用語文：

中文、英文

十一、報告電子檔名稱：

以菌群分布作為鑑識污染源技術建立[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：

硫酸銅，底泥，微生物菌群分布

十四、英文摘要關鍵詞：

copper sulfate, sediment, microbial community profile

十五、中文摘要：

本研究探討以微生物菌群變化作為污染源鑑識之可行性。研究方法分為模擬河川反應槽及現地樣本分析。以河水添加不同濃度硫酸銅連續暴露底泥的方式，定時採取反應槽進出流水樣及底泥樣品，檢測其水樣及底泥菌群變化。現地樣品比較則是採取老街溪底泥及河水樣品，分析其水樣化學特性及底泥生物相。底泥反應槽部分，取用老街溪河水並添加硫酸銅作為進流，定時採取進出流分析，並於第 0, 2, 4, 8 週取底泥樣品檢測微生物菌群變化。現地樣品部分，由老街溪上游至下游總共採取了 13 個底泥樣品，19 個河水樣品分析。所有的水樣及底泥其核

酸進行次世代定序。結果顯示，*Aeromonadaceae*, *Burkholderiales_incertae_sedis*, *Caldilineaceae*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Planctomycetaceae*, *Pseudomonodaceae*, 及 *Xanthobacteraceae* 皆重複出現在現場溪中底泥、溪水、及工廠放流水具有高濃度金屬銅的樣品中，有機會成為銅污染之普遍性指標判斷菌群。另外，由反應槽、老街溪河水及底泥菌相及樣品銅濃度交叉比對，結果顯示，*Burkholderiaceae*, *Hydrogenophilaceae*, *Methylophilaceae*, *Chitinophagaceae*, 及 *Flavobacteriaceae* 等之豐富度消長與銅濃度相關。未來建議增加現地試驗驗證後可利用其消長變化作為鑑識污染來源的指標。

十六、英文摘要：

This study investigates the possibility of applying microbial community profile changes to pollution source identification. Due to the time constraint on this project, two directions were deployed simultaneously. One is a laboratory scale sediment microcosm monitoring, the other is field investigation. In the sediment microcosm, river water spiked with different concentrations of copper sulfate was used as the influent and cultured for 8 weeks. Water samples (influent and effluent) were collected periodically, and sediments were collected at 0, 2nd, 4th, and 8th weeks. Field sampling were performed 3 times up to date. Chemical parameters such as nitrate, phosphate, and heavy metal concentrations were analyzed for all water samples from both reactor and field samples. And, crude nucleic acids were also extracted, cleaned and sent for 16S r-RNA gene amplicon sequencing by next generation sequencing with MiSeq platform (Illumina). The results showed that copper sulfate may accumulate in the reactor sediments and may reduce nitrification processes. For the field study, water samples show increasing trends of chloride in both water and sediments from river upstream to downstream. And, high concentrations of metals were observed in several sampling sites along the river. The microbial sequence results from the sediment microcosms, river sediments, river waters, and factory effluents showed that *Aeromonadaceae*, *Burkholderiales_incertae_sedis*, *Caldilineaceae*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Planctomycetaceae*, *Pseudomonodaceae*, and *Xanthobacteraceae* were observed in all samples and were correlated with copper concentration in CCA analysis. In addition, the abundance of *Burkholderiaceae*, *Hydrogenophilaceae*, *Methylophilaceae*, *Chitinophagaceae*, and *Flavobacteriaceae* from were correlated with copper sulfate exposures in microcosm sediments. With proper field testing to verify their repeatability and reproducibility, these families were possible candidates for copper pollution source tracking in rivers or streams.

目錄

一、前言.....	1
1.1 計畫緣起	1
1.2 計畫目標	1
1.2.1 計畫工作內容.....	2
1.2.2 計畫執行人員資料表.....	3
1.2.3 計畫執行進度及成效.....	4
二、背景文獻回顧	5
2.1 河川水域污染下微生物生態變化.....	5
2.2 底泥土壤重金屬污染與微生物生理變化	9
2.3 高通量定序應用於受污染底泥中微生物分析現有文獻	11
三、研究方法與原理.....	13
3.1 現地採樣分析	13
3.1.1 採樣點位資訊.....	13
3.1.2 採樣分析項目	16
3.1.3 採樣方法	16
3.1.4 水樣分析項目及方法.....	17
3.1.5 底泥分析項目及方法.....	20
3.1.6 微生物.....	21
3.2 實驗室模擬底泥接觸反應槽	24
3.2.1 反應槽設置	24
3.2.2 水樣、底泥採樣頻率.....	25
3.2.3 進出流水樣分析	26
3.2.4 底泥分析	27

3.2.5 反應槽底泥樣品核酸萃取及前處理.....	30
3.3 高通量定序	32
四、結果與討論	37
4.1 蒐集文獻.....	37
4.2 河川水樣.....	42
4.2.1 現地量測	42
4.2.2 實驗分析	45
4.2.3 河川水樣中微生物.....	50
4.3 工廠放流水	52
4.3.1 現地量測	52
4.3.2 實驗分析	54
4.3.3 工廠放流水中微生物.....	57
4.4 底泥.....	59
4.4.1 物理化學性質	59
4.4.2 底泥中微生物	63
4.5 反應槽.....	64
4.5.1 進出流水質	64
4.5.2 底泥.....	68
4.6 次世代定序	70
4.6.1 定序結果基本資料.....	70
4.6.2 微生物族群分析與環境因子影響探討	72
4.6.3 操作分類單元 Operational taxonomic unit (OTU)與污染源關聯分析.....	89
五、結論.....	101
5.1 計畫完成進度	101
5.2 老街溪現地採樣	101

5.3 反應槽.....	101
5.4 次世代定序	102
六、建議事項	103
參考文獻.....	105
附錄	109
附錄一 評選會議意見及廠商回覆表	109
附錄二 期初工作會議意見及廠商回覆表	113
附錄三 期中審查會議委員意見及廠商回覆意見表	115
附錄四 期末審查會議委員意見及廠商回覆意見表	121
附錄五 科技計畫成果效益事實報告表	128
附錄六 科技計畫成果效益自評表.....	133
附錄七 次世代定序使用之 barcodes	136

圖目錄

圖 2-1 未暴露銅之土壤與暴露約 1000ppm 硫酸銅之土壤細菌群落組成圓餅圖(Wakelin et al., 2010)	10
圖 3-1 老街溪採樣點分布	14
圖 3-2 採樣分析項目一覽	16
圖 3-3 採樣分析流程圖	17
圖 3-4 模擬底泥接觸反應槽之設置圖	24
圖 3-5 模擬底泥接觸反應槽之劑量與天數配置示意圖	25
圖 3-6 模擬底泥接觸反應槽於恆溫箱之實際設置照片	25
圖 3-7 高通量定序之實驗流程及序列生物資訊分析步驟	33
圖 4-2 河川水樣導電度分布	43
圖 4-3 河川水樣葉綠素 a 分布	44
圖 4-4 河川水樣中 TOC 及 COD 分布	46
圖 4-5 河川水樣中 TIN 分布	47
圖 4-6 河川水樣中陰離子分布	47
圖 4-7 河川水樣中微生物 DNA 濃度	51
圖 4-8 工廠放流水 pH 及溶氧量	52
圖 4-9 工廠放流水導電度	53
圖 4-10 工廠放流水 TOC 及 COD 數值	55
圖 4-11 工廠放流水 TIN 數值	55
圖 4-12 工廠放流水陰離子數值	56
圖 4-13 工廠放流水微生物 DNA 濃度	58
圖 4-14 底泥 pH 及導電度分布	59
圖 4-15 底泥 CNSH 元素組成	61

圖 4-16 底泥粒徑體積累計百分比分布圖	62
圖 4-17 底泥中微生物 DNA 濃度	63
圖 4-18 反應槽之進出流 pH 隨時間(day)變化圖	64
圖 4-19 反應槽之進出流導電度(μ s/cm)隨時間(day)變化圖	65
圖 4-20 反應槽之進出流濁度(NTU)隨時間(day)變化圖	65
圖 4-21 反應槽之進出流總有機碳(mg/L)隨時間(day)變化圖	66
圖 4-22 反應槽之進出流銅濃度(mg/L)隨時間(day)變化圖	66
圖 4-23 反應槽之進出流硫酸根濃度(mg/L)隨時間(day)變化圖	67
圖 4-24 反應槽之進出流氨氮濃度(mg/L)隨時間(day)變化圖	67
圖 4-25 反應槽之進出流正磷酸鹽濃度(mg/L)隨時間(day)變化圖	68
圖 4-26 反應槽之底泥銅濃度(mg/L)於三次採樣時間比較圖	69
圖 4-27 反應槽之底泥有機質含量(%)於三次採樣時間比較圖	69
圖 4-28 高通量定序各樣品所得之序列對(read pairs)數量(a), 所屬細菌界與古菌界 比例(b), 序列對組裝後各長度範圍之序列數(c), 及各樣品序列數及累積之 OTUs 數量關係(d)	71
圖 4-29 不同樣品群組(包括現場底泥 soil、現場溪水 water、工廠放流水 factory_water、及實驗室連續流試驗 exam)中 OTUs 重疊性分析	72
圖 4-30 實驗室連續流試驗之底泥樣品中微生物族群(依據高通量定序之 16S rRNA 基因序列)受不同進流水條件(如金屬銅)影響之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果	75
圖 4-31 實驗室連續流試驗中底泥樣品之組成菌群(以菌科分類為依據)受不同進流 水條件(如金屬銅)影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA) 結果	76

圖 4-32 實驗室連續流試驗之底泥樣品中微生物族群(依據高通量定序之 16S rRNA 基因序列)受不同出流水條件(如金屬銅)影響之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果	77
圖 4-33 實驗室連續流試驗中底泥樣品之組成菌群(以菌科分類為依據)受不同出流水條件(如金屬銅)影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果	78
圖 4-34 實驗室連續流試驗之底泥樣品中微生物族群(依據高通量定序之 16S rRNA 基因序列)受不同底泥條件(如金屬銅) 影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果	79
圖 4-35 實驗室連續流試驗中底泥樣品之組成菌群(以菌科分類為依據)受不同底泥條件(如金屬銅)影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果	80
圖 4-36 溪中底泥樣品之微生物族群(依據高通量定序之 16S rRNA 基因序列)受不同底泥條件(如金屬銅) 影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果	81
圖 4-37 溪中底泥樣品之組成菌群(以菌科分類為依據)受不同底泥條件(如金屬銅)影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果	82
圖 4-38 溪水樣品之微生物族群(依據高通量定序之 16S rRNA 基因序列)受不同水質條件(如金屬銅) 影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果	83
圖 4-39 溪水樣品之組成菌群(以菌科分類為依據)受不同水質條件(如金屬銅)影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果	84
圖 4-40 工廠放流水樣品之微生物族群(依據高通量定序之 16S rRNA 基因序列)受不同水質條件(如金屬銅) 影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果	85

圖 4-41 工廠放流水樣品之組成菌群(以菌科分類為依據)受不同水質條件(如金屬銅)影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果	86
圖 4-42 實驗組底泥(a)及現場底泥(b)樣品微生物族群組成	87
圖 4-43 現場溪水(a)及工廠放流水(b)樣品微生物族群組成	88
圖 4-44 實驗室反應槽底泥中菌屬隨時間變動組成熱圖(150ppm)	90
圖 4-45 實驗室反應槽底泥中菌屬隨時間變動組成熱圖(300ppm)	91
圖 4-46 實驗室反應槽底泥中菌屬隨時間變動組成熱圖(600ppm)	92
圖 4-47 實驗室反應槽底泥中菌屬隨時間變動組成熱圖(blank)	93
圖 4-48 反應槽底泥 <i>Methylobacter</i> 占總量的百分比隨時間變化	93
圖 4-49 反應槽底泥 <i>Thiobacillus</i> 占總量的百分比隨時間變化	94
圖 4-50 反應槽底泥 <i>Longilinea</i> 占總量的百分比隨時間變化	94
圖 4-51 反應槽底泥 <i>Mycobacterium</i> 占總量的百分比隨時間變化	95
圖 4-52 反應槽底泥 <i>Methylocystis</i> 占總量的百分比隨時間變化	95
圖 4-53 現地樣品篩選出可能與銅相關之菌屬 <i>Hydrogenophilaceae</i> 在實驗室底泥反應槽中所占比例隨培養時間的變化	97
圖 4-54 現地樣品篩選出可能與銅相關之菌屬 <i>Methylophilaceae</i> 在實驗室底泥反應槽中所占比例隨培養時間的變化	97
圖 4-55 現地樣品篩選出可能與銅相關之菌屬 <i>Burkholderiaceae</i> 在實驗室底泥反應槽中所占比例隨培養時間的變化	98
圖 4-56 現地樣品篩選出可能與銅相關之菌屬 <i>Chitinophagaceae</i> 在實驗室底泥反應槽中所占比例隨培養時間的變化	98
圖 4-57 現地樣品篩選出可能與銅相關之菌屬 <i>Flavobacteriaceae</i> 在實驗室底泥反應槽中所占比例隨培養時間的變化	99

表目錄

表 1-1 計畫預定進度	4
表 3-1 老街溪 2017 年 5 月 17 日第一次採樣點資訊	14
表 3-2 老街溪 2017 年 5 月 23 日第二次採樣點資訊	15
表 3-3 老街溪 2017 年 5 月 24 日工廠放流水採樣點資訊	15
表 4-1 河川水樣現地量測數值	42
表 4-2 河川水樣實驗分析數值	45
表 4-3 河川水樣重金屬濃度 (單位：mg/L)	49
表 4-4 河川水樣中微生物 DNA 濃度	50
表 4-5 工廠放流水現地量測數值	52
表 4-6 工廠放流水測值 (單位：mg/L)	54
表 4-7 工廠放流水樣重金屬濃度 (單位：mg/L)	57
表 4-8 工廠放流水微生物 DNA 濃度	58
表 4-9 底泥 pH 及導電度分布	59
表 4-10 底泥重金屬含量(單位：mg/kg)	60
表 4-11 底泥 CNSH 元素重量百分比例	61
表 4-12 底泥粒徑分布表	62
表 4-13 底泥中微生物 DNA 濃度	63
表 4-14 反應槽主要變化菌屬與現地樣品銅濃度之相關性	95
表 4-15 所有現地樣品(老街溪水、底泥及工廠放流水篩選出與銅濃度相關之菌科)	96

報告大綱

本計畫以連續流模擬底泥環境反應槽培養及以高通量次世代定序技術（Next Generation Sequencing），針對重金屬（硫酸銅）污染河川之底泥環境中微生物族群進行分析，探討硫酸銅排放對土壤環境中微生物結構變化之影響，瞭解菌群分佈的差異性；另外，以菌群分析結果篩選出主要差異菌群，並建立菌群變化與污染物之相關性，評估以菌群變化分析作為污染鑑識之可能性。

本計畫主要目的分三點如下：蒐集國內外利用微生物菌群分布與污染來源之相關文獻。分析河川底泥中微生物菌群河川底泥中微生物菌群受到污染物後所衍生的變化。並以菌群分析結果評估鑑識污染源之可能標的菌株。在這三個項目研究團隊都順利達成。

本計畫經費 210 萬元，並規劃五大項：其中人事費 81.4931 萬元，材料費 86.9069 萬元，業務費 3.9 萬元，旅運費 2.7 萬元，管理費 35 萬元。

本計畫之執行進度均依規定時間內完成。包含

1. 蒐集國內外利用微生物族群變異檢測遭受重金屬污染之底泥環境相關文獻。
2. 建立連續流反應槽模擬底泥環境培養，並探討微生物結構變化之影響，瞭解菌群結構在受污染及未受污染河水的差異性。
3. 採取選定河川底泥，並分析其表水及底泥重金屬含量並分析其菌群結構。
4. 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」以河川水域污染下微生物生態變化、底泥土壤重金屬污染與微生物生理變化、高通量定序應用於受污染底泥微生物分析，這三項目為分類進行文獻回顧。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，包含現地採樣、反應槽設置、水樣與底泥之分析、實驗流程、定序前處理、高通量定序和結果之數據整理解析等。第四章「結果與討論」包含六小節，包含了蒐集相關文獻結果、現地採樣分析結果、反應槽進出流與底泥分析結果以及定序結果與環境因子影響微生物族群分析探討。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：以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(1/2)

計畫編號：EPA-106-E3S5-02-03

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，郭獻文

計畫期程：106 年 3 月 11 日至 106 年 12 月 31 日

計畫經費：貳百壹拾萬元

摘要

本研究探討以微生物菌群變化作為污染源鑑識之可行性。研究方法分為模擬河川反應槽及現地樣本分析。以河水添加不同濃度硫酸銅連續暴露底泥的方式，定時採取反應槽進出流水樣及底泥樣品，檢測其水樣及底泥菌群變化。現地樣品比較則是採取老街溪底泥及河水樣品，分析其水樣化學特性及底泥生物相。底泥反應槽部分，取用老街溪河水並添加硫酸銅作為進流，定時採取進出流分析，並於第 0, 2, 4, 8 週取底泥樣品檢測微生物菌群變化。現地樣品部分，由老街溪上游至下游總共採取了 13 個底泥樣品，19 個河水樣品分析。所有的水樣及底泥其核酸進行次世代定序。結果顯示，Aeromonadaceae,

Burkholderiales_incertae_sedis, Caldilineaceae, Chloroflexi, Firmicutes, Planctomycetaceae, Pseudomonodaceae, 及 Xanthobacteraceae 皆重複出現在現場溪中底泥、溪水、及工廠放流水具有高濃度金屬銅的樣品中，有機會成為銅污染之普遍性指標判斷菌群。另外，由反應槽、老街溪河水及底泥菌相及樣品銅濃度交叉比對，結果顯示，Burkholderiaceae, Hydrogenophilaceae, Methylophilaceae, Chitinophagaceae, 及 Flavobacteriaceae 等之豐富度消長與銅濃度相關。未來建議增加現地試驗驗證後可利用其消長變化作為鑑識污染來源的指標。

Abstract

This study investigates the possibility of applying microbial community profile changes to pollution source identification. Due to the time constraint on this project, two directions were deployed simultaneously. One is a laboratory scale sediment microcosm monitoring, the other is field investigation. In the sediment microcosm, river water spiked with different concentrations of copper sulfate was used as the influent and cultured for 8 weeks. Water samples (influent and effluent) were collected periodically, and sediments were collected at 0, 2nd, 4th, and 8th weeks. Field sampling were performed 3 times up to date. Chemical parameters such as nitrate, phosphate, and heavy metal concentrations were analyzed for all water samples from both reactor and field samples. And, crude nucleic acids were also extracted, cleaned and sent for 16S r-RNA gene amplicon sequencing by next generation sequencing with MiSeq platform (Illumina). The results showed that copper sulfate may accumulate in the reactor sediments and may reduce nitrification processes. For the field study, water samples show

increasing trends of chloride in both water and sediments from river upstream to downstream. And, high concentrations of metals were observed in several sampling sites along the river. The microbial sequence results from the sediment microcosms, river sediments, river waters, and factory effluents showed that Aeromonadaceae, Burkholderiales_incertae_sedis, Caldilineaceae, Chloroflexi, Firmicutes, Planctomycetaceae, Pseudomonadaceae, and Xanthobacteraceae were observed in all samples and were correlated with copper concentration in CCA analysis. In addition, the abundance of Burkholderiaceae, Hydrogenophilaceae, Methylophilaceae, Chitinophagaceae, and Flavobacteriaceae from were correlated with copper sulfate exposures in microcosm sediments. With proper field testing to verify their repeatability and reproducibility, these families were possible candidates for copper pollution source tracking in rivers or streams.

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現實狀況下並不適用，例如工廠夜間或雨季偷排等，多半發生在非環保單位採樣時日，無法以放流口水樣化學分析直接追蹤或作為污染來源證據。由於環境毒理、生態研究日漸盛行，許多研究也朝向以微生物的角度追蹤污染源，或是以不同指標物種辨識水域污染程度或毒性（例如以藤壺類生物的重金屬累積辨識污染源）。

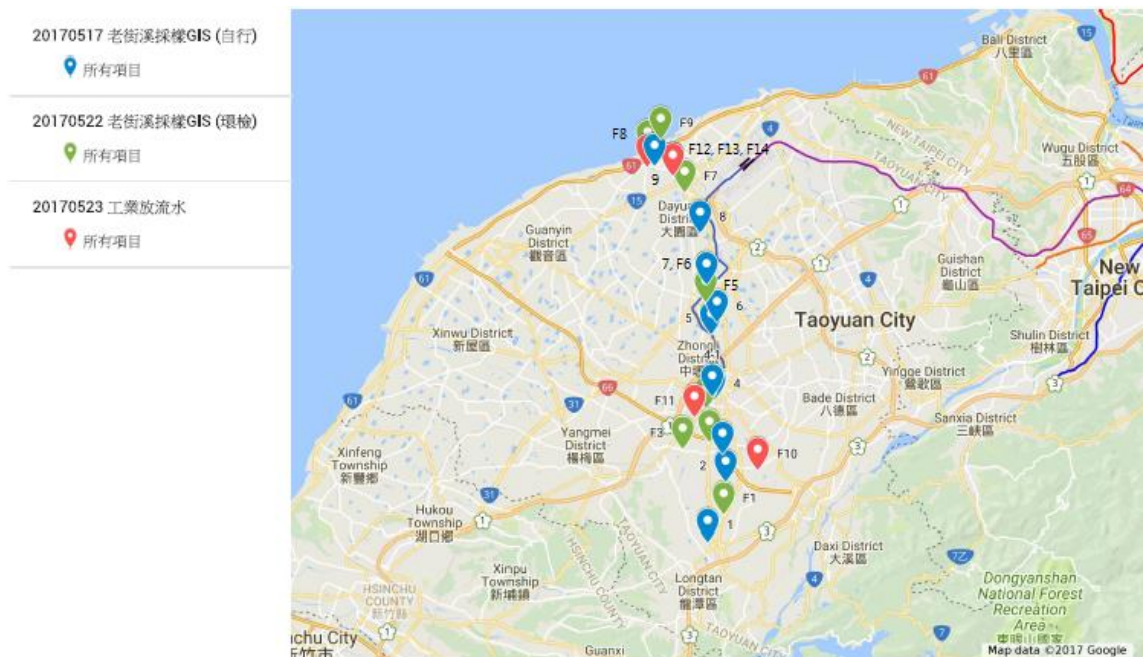
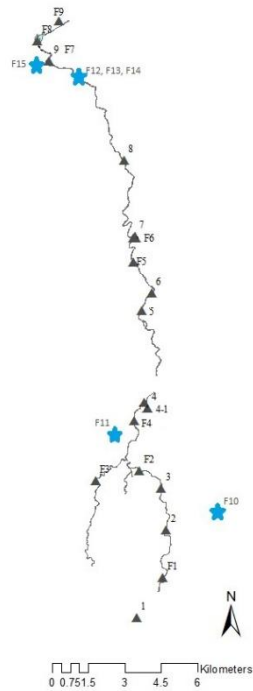
但由於我國部分污染嚴重溪流中，水生生物物種缺乏，以水生生物辨識污染程度或污染源較為困難。不過，在污染水域中底泥中的微生物仍可能存在。許多污染物在底泥中可能累積或者接觸底泥微生物造成微生物生態變化甚至基因表現變化，即使污染物短暫消失，微生物族群的變化仍可代表現地長期受到污染的可能性。

因此，本計畫以連續流模擬底泥環境反應槽培養及以高通量次世代定序技術（Next Generation Sequencing, NGS），針對重金屬（硫酸銅）污染河川之底泥環境中微生物族群進行分析，探討硫酸銅排放對土壤環境中微生物結構變化之影響，瞭解菌群分佈的差異性；另外，以菌群分析結果篩選出主要差異菌群，並建立菌群變化與污染物相關性，再以現地樣品驗證，評估以菌群變化分析作為污染鑑識可能

性。

研究方法

1. 蒐集國內外針對污染源鑑識、菌群分布及污染物與微生物生態變化之文獻資料。
2. 選取一主要污染河川(老街溪)，於河段之上、中、下游取樣，分析其菌相變化，並評估標的菌株作為污染鑑識之可能性。採樣點位如下圖所示：



圖一、老街溪採樣點分佈(藍、綠色點為水樣、紅色點為工廠放流水)

3. 水樣分析項目有溫度、pH、導電度、溶氧量、葉綠素 a、COD、總有機碳、氨氮、水中陰離子、重金屬、微生物族群。底泥分析項目則有 pH、粒徑、CNSH 元素比例、重金屬濃度、微生物族群等。
4. 建立實驗室模擬底泥環境之反應槽，以連續進流方式模擬河川底泥生態，並添加標的污染物，以高通量定序方式分析底泥中微生物菌群組成變化並對照控制組獲得主要變化菌群，評估與污染物之相關性。

模擬底泥接觸反應槽主要由數個附有溢流管的玻璃製血清瓶所組成，每個瓶子皆有通氣栓覆蓋以避免來自外部的污染並維持透氣。玻璃瓶的直徑為 10 公分，高為 20 公分。每個反應槽會裝填約 10 公分厚的老街溪上游底泥，並使用蠕動幫浦把採樣來的老街溪上游河水送至反應槽內。其水力停留時間約為 4 小時。採樣來的老街溪河水會加入不同劑量的硫酸銅(Copper(II) sulfate, CuSO₄)做為反應槽之進流，加入之劑量以銅為單位分別是 150mg/L、300mg/L、600mg/L，同時也以無添加劑量的河水做為實驗之空白對照組。培養於第 14、28、56 天採集底泥樣品。反應槽進出水樣分析 pH 值、導電度、濁度、總有機碳、重金屬、硫酸

鹽、氨氮、正磷酸鹽；底泥則分析銅含量及微生物相。

5. 水樣及底泥樣品微生物分析：高通量定序以 Illumina MiSeq 系統進行，定序結果初步品質篩選以設定之品質分數(quality score, Q)做判斷依據，另外小於 35 bps 之序列會被系統捨棄不用。高通量定序所得之序列先經過去適配子(trim illumine adapter sequence)、品質篩選(quality and ambiguity trimming)、序列對組裝(merge overlapping paired reads)、及引子與編碼序列確認、分樣品、和去除不含 16S 引子的序列；其中利用” Cutadapt v.1.4.2” 系統[Martin, 2011] 去除適配子；接著利用” Seqtk v.1.2-r94” 進行品質篩選(quality trimming)，將短序列(小於 35 bp)及非配對之單一序列(singlet reads)去除；品質篩選後的配對序列(paired-end reads)或序列對(read pairs)再利用” FLASH(Fast Length Adjustment of Short reads, v1.2.9)” [Magoc and Salzberg, 2011]將序列對重疊(overlapping merged)成較長的組裝序列，組裝後序列長度小於 200 bps 之序列於以捨棄，另外如配對序列有缺乏 16S 引子者亦會被捨棄。整理後之組裝序列進一步利用” UPARSE implemented

in USEARCH (v9.2.64)” 系統[Edgar , 2013]進行調整(包括 dereplication, singlet discarding, 和 chimera filtering)後並做操作分類單元 Operational taxonomic unit (OTU)分類，並建構樣品的 OTUs 表；接著以” RDP Classifier v2.12” [Wang, 2007]將各別 OTUs 之代表序列進行菌種鑑定，做為樣品中微生物族群組成之依據。

樣品微生物族群受水質條件影響以典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)進行，以各樣品所含之 OTUs 進行微生物族群組成差異性分析，及水質條件關聯性分析，分析結果中樣品落點之相對位置代表微生物族群組成差異度，兩樣品落點越相近代表兩樣品之微生物族群組成越相似，反之，代表兩樣品之微生物族群組成越不同；此外，環境水質條件對樣品微生物族群之影響趨勢以箭頭方向表示，而影響程度則以箭頭長度表示之。

結果

搜集了國內外相關文獻，並依河川水域污染下微生物生態變化、底泥土壤重金屬污染與微生物生理變化、高通量定序應用於受污染底

泥中微生物分析三項目進行分類。

本研究選定之受污染河川為桃園老街溪，至 2017 年 7 月底止，分別於 5 月 17 日、5 月 23 日及 5 月 24 日，至老街溪流域進行 3 次採樣，依據上游至下游順序採集了河川水樣、河川底泥以及工廠放流水做為現地樣品進行實驗分析，總共採取了 13 個底泥樣品，19 個河水樣品分析，主要重金屬濃度如下表一所示。

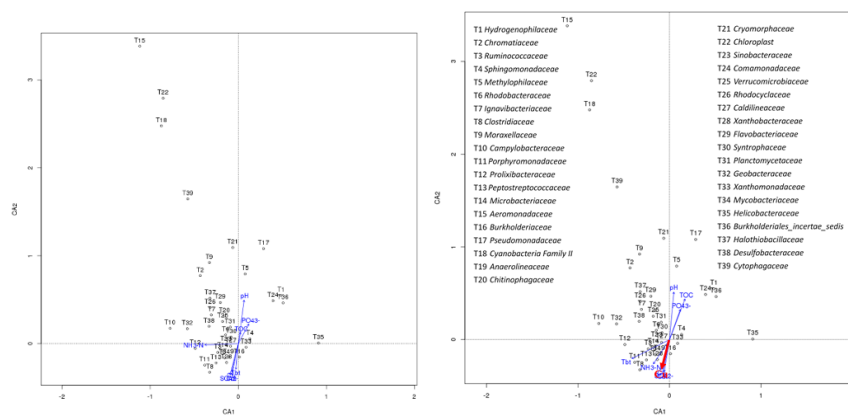
表一、河川水樣重金屬濃度（單位：mg/L）

樣本名	銀(Ag)	鎘(Cd)	鋁(Al)	錳(Mn)	鐵(Fe)	鉛(Pb)	鋅(Zn)	銅(Cu)
1	<0.01	<0.01	0.329	0.041	0.458	<0.01	0.061	<0.01
F1	<0.01	<0.01	0.113	0.013	0.218	<0.01	0.022	0.005
2	<0.01	<0.01	0.338	0.056	0.419	0.012	0.033	0.032
3	<0.01	<0.01	0.216	0.028	0.391	0.012	0.034	0.019
F2	<0.01	<0.01	0.317	0.034	0.402	0.011	0.024	0.013
F3	<0.01	<0.01	1.363	0.129	1.110	0.020	0.103	0.088
F4	<0.01	<0.01	0.223	0.057	0.350	0.012	0.054	0.035
4-1	<0.01	<0.01	0.305	0.068	0.431	0.018	0.037	0.016
4	<0.01	<0.01	0.523	0.089	0.696	0.020	0.054	0.024
5	<0.01	<0.01	0.345	0.116	0.782	0.017	0.078	0.043
6	<0.01	<0.01	0.378	0.112	0.673	0.016	0.031	0.017
F5	<0.01	<0.01	0.278	0.068	0.298	<0.01	0.114	0.036
F6	<0.01	<0.01	0.314	0.033	0.241	<0.01	0.056	0.010
7	<0.01	<0.01	0.385	0.042	0.340	0.014	0.035	0.018
8	<0.01	<0.01	0.446	0.043	0.404	0.011	0.022	0.014
F7	<0.01	<0.01	1.198	0.130	1.950	0.011	0.222	0.051
9	<0.01	<0.01	0.507	0.097	0.582	<0.01	0.107	0.021
F8	<0.01	<0.01	0.028	0.024	0.028	<0.01	<0.01	<0.01
F9	<0.01	<0.01	0.293	<0.01	0.326	<0.01	0.011	<0.01
平均數	<0.01	<0.01	0.416	0.062	0.531	0.009	0.058	0.023
標準差	—	—	0.328	0.040	0.418	0.008	0.051	0.021
最小值	<0.01	<0.01	0.028	<0.01	0.028	<0.01	<0.01	<0.01

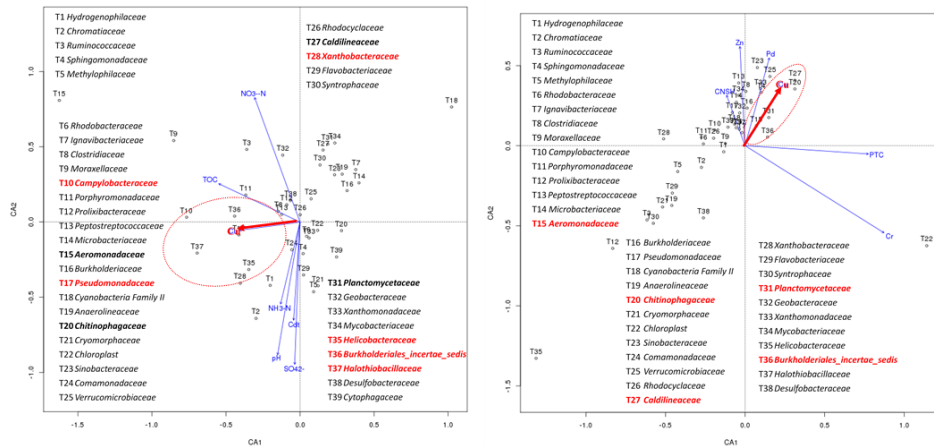
最大值	<0.01	<0.01	1.363	0.130	1.950	0.020	0.222	0.088
-----	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

註：測值加底框者為個別金屬最高濃度出現點位。

底泥反應槽部分，使用老街溪河水並添加硫酸銅作為進流，定時採取進出流做水樣分析，並於第 0, 2, 4, 8 週取反應槽底泥做為樣品。現地水樣、底泥樣品在萃取出核酸後進行次世代定序。定序結果與水質條件分析如圖二所示。老街溪現地採樣微生物分析如圖三所示。



圖二、實驗室連續流試驗中底泥樣品之組成菌群(以菌科分類為依據)受不同進流水條件(左)及出流(右)之水質影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果



圖三、溪水(左)溪中底泥(右)樣品之組成菌群(以菌科分類為依據)受不同底泥條件(如金屬銅)影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果

對現地採樣及反應槽樣品定序結果進行分析比較後，發現受重金屬污染之溪水和底泥中之微生物有可能受金屬銅之影響而造成族群組成變化，然而，其它影響微生物族群之環境條件因子，經 CCA 典型關聯分析雖有金屬銅影響微生物族群組成的一些相關性，但影響性並不十分明顯。由於以樣點全體微生物族群分析無法與單一污染物取得相關性，因此選擇部分較相關之 OTUs 進行分析。*Thiobacillus*, *Methylobacter*, *Mycobacterium*, *Longilinea*, 以及 *Methylocystis* 此五屬的 OTUs 於實驗室反應槽底泥 copy numbers 中有較明顯的增減，除 *Thiobacillus* 外，皆與甲烷代謝相關。經皮爾森相關係數與現地所量測之底泥及水樣銅濃度之相關性分析可得，現地樣品中，僅有 *Methylobacter* 和 *Methylocystis* 其與現地銅濃度有中度相關，適

合作汙染指標。另外，由所有環境樣品菌科與環境因子 CCA 分析，篩選出對應銅濃度最相關的菌科，共有 19 科。對照實驗室底泥反應槽序列分析中的菌科 copy numbers 所占總數之百分比依不同時間及進流銅濃度的變化，發現其中有五科在底泥反應槽對硫酸銅的添加與否有較明顯的變化。其中，Burkholderiaceae 在銅的添加初期相較於空白組，其所占比例升高；而其他 Hydrogenophilaceae, Methylophilaceae, Chitinophagaceae, 及 Flavobacteriaceae 等四菌科相較於空白組，在含有硫酸銅的進流後所占比例下降。此五科可能可篩選成為未來檢視受硫酸銅污染的底泥中數量消長的菌科。

結論

1. 本計畫所訂定之工作目標及工作項目皆已完成。
2. 現地採樣河川水質部分，19 個點位中有 11 個點其氨氮濃度為中度污染，TIN 濃度高者有集中於中游段趨勢；測得重金屬較高的濃度點位，集中落於許厝港一號橋點位(F7)。
3. 現地採樣工業放流水部分，皮革製品廠(F14)放流水之導電度、COD 及氨氮數值高，光電廠(F10)及精密工業廠(F13)的硼濃度偏高。

4. 現地底泥部分，碳氮硫氫重量百分比除了中壢區公園橋點位(F5)及大園區許厝港一號橋點位(F7)大於 10%外，其餘 CNSH 占總重量比例均小於 4%；各點位平均粒徑值差異大；部分點位金屬銅、鋅及鉛濃度偏高，此外，老街溪流域底泥重金屬銅、鋅、鋁濃度最高值，均落於大園工業區下游約 1 公里處之許厝港一號橋點位(F7)
5. 反應槽部分進出流測得的銅濃度未達到所添加的銅濃度，且有添加硫酸銅三組進流的濁度較未添加的高。最後出流的濁度減少可能是沉澱之硫酸銅經過反應槽後沉積於底泥。
6. 反應槽部分硫酸銅的添加使得出流無法有氨氮明顯減少的現象，這可能是由於硫酸銅抑制了硝化作用(Nitrification)。
7. 反應槽進流添加硫酸銅會使得底泥的銅濃度增加。底泥含銅量與進流濃度相關。底泥中有機質會影響銅於底泥中對生物的毒性，然而有機質含量的測定發現整體實驗其差異並不明顯，因此有機質的影響於本次實驗每組應無太大差異。
8. 以 CCA 典型關聯分析顯示金屬銅對微生物族群組成有一些影響之相關性，但整體而言並不十分明顯，因此，以全體族群分析可能較不適用於單一污染源。然而，Aeromonadaceae,

Burkholderiales_incertae_sedis, Caldilineaceae, Chloroflexi, Firmicutes, Planctomycetaceae, Pseudomonodaceae, 及 Xanthobacteraceae 重複出現在現場溪中底泥、溪水、及工廠放流水具有高濃度金屬銅的樣品中，有機會成為銅污染之普遍性指標判斷菌群。

9. 由 CCA 典型關聯性分析中，所有樣品總和與銅濃度相關可篩選出 19 菌科，比對實驗室底泥反應槽中菌相變化，其中 5 科 Burkholderiaceae, Hydrogenophilaceae, Methylophilaceae, Chitinophagaceae, 及 Flavobacteriaceae 等與空白組相較變化較大，最有機會成為硫酸銅污染之指標菌科。
10. 以硫酸銅馴養底泥之反應槽菌相分析，得出 *Thiobacillus*, *Methylobacter*, *Mycobacterium*, *Longilinea*, 及 *Methylocystis* 等菌屬消長與反應槽銅添加相關，然而比較老街溪底泥樣品菌相、銅含量及水中銅濃度之相關性，僅有 *Methylobacter* 和 *Methylocystis* 其與現地銅濃度有中度相關。此仍需要後續增加不同現地樣品確認其消長做為指標判斷菌屬之可能性。

建議事項

1. 本計畫研究結果可供後續河川污染進行微生物鑑識進行比較參考。
2. 本團隊於 10 月中旬至老街溪流域採樣，採集第 3 批河水及底泥樣本各 10 個，期能持續進行本計畫，完成樣本物化性質及微生物群落分析，並可進一步觀察季節時序於本研究之影響。
3. 未來現地試驗可直接採取工廠放流口淤泥及管口上下游底泥比較這些物種的豐富度差異，評估硫酸銅暴露之可能性並於現地驗證。
4. 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。
5. 如進一步探討與金屬轉化相關之酵素(如氧化酶 oxidase 或還原酶 reductase 等)或其基因，應可更精準推測環境樣品是否長期受重金屬之污染，有助於建構污染狀況之概念模型。
6. 以工廠污水廠進流、處理單元至放流口全流程採樣分析生物相，並比較放流口上、下游底泥菌相或基因型。可用以追蹤污染源。

一、前言

1.1 計畫緣起

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現實狀況下並不適用，例如工廠夜間或雨季偷排等，多半發生在非環保單位採樣時日，無法以放流口水樣化學分析直接追蹤或作為污染來源證據。由於環境毒理、生態研究日漸盛行，許多研究也朝向以微生物的角度追蹤污染源，或是以不同指標物種辨識水域污染程度或毒性（例如以藤壺類生物的重金屬累積辨識污染源）。

但由於我國部分污染嚴重溪流中，水生生物物種缺乏，以水生生物辨識污染程度或污染源較為困難。不過，在污染水域其底泥中的微生物仍可能存在。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變化甚至基因表現變化，即使污染物短暫消失，微生物族群的變化仍可代表現地長期受到污染的可能性。

因此，本計畫以連續流模擬底泥環境反應槽培養及以高通量次世代定序技術（**Next Generation Sequencing**），針對重金屬（硫酸銅）污染河川之底泥環境中微生物族群進行分析，探討硫酸銅排放對土壤環境中微生物結構變化之影響，瞭解菌群分佈的差異性；另外，以菌群分析結果篩選出主要差異菌群，並建立菌群變化與污染物之相關性，再以現地樣品驗證，評估以菌群變化分析作為污染鑑識之可能性。

1.2 計畫目標

本計畫預計目標如下：

1. 蒐集國內外利用微生物菌群分布與污染來源之相關文獻。
2. 分析河川底泥中微生物菌群受到污染物後所衍生的變化。

3. 以菌群分析結果評估鑑識污染源之可能標的菌株。
4. 完成研究報告 1 件。

1.2.1 計畫工作內容

1. 蒐集國內外針對污染源鑑識、菌群分布及污染物與微生物生態變化之文獻。
2. 以實驗室模擬底泥環境之反應槽，連續進流方式模擬河川底泥生態，並添加標的污染物，以高次世代定序方式分析底泥中微生物菌群組成分布變化並對並對照控制組獲得主要變化菌群，評估與污染物之相關性。
3. 選取一主要污染河川，於河段之上、下游採取底泥樣品，分析汙染造成之菌相變化結果，並評估標的菌株作為污染源鑑識之可能性。
4. 完成研究報告 1 件。

1.2.2 計畫執行人員資料表

重要參與計畫人員資料表				
參與計畫 人員姓名	計畫職稱	投入主要工作	學、經歷	
童心欣	計畫主持人	計畫管理、資料蒐集、實驗執行、數據結果分析、報告整理	學歷	賓州州立大學土木環境工程學系博士
			經歷 ● 國立臺灣大學環境工程學研究所教授 ● 曾任：賓州州立大學土木與環境工程系博士後研究員	
于昌平	共同計畫主持人	資料蒐集、實驗執行、數據結果分析、報告整理	學歷	國立臺灣大學環境工程學研究所博士
			經歷 ● 國立臺灣大學環境工程學研究所副教授 ● 曾任：中國科學院城市環境研究所研究員	
郭獻文	共同計畫主持人	資料蒐集、實驗執行、數據結果分析、報告整理	學歷	田納西大學土木環境工程博士
			經歷 ● 東海大學環境科學與工程系副教授 ● 曾任：東海大學永續科學與工程學程主任	
周鈺鋁	兼任研究助理	樣品處理、實驗分析、報告撰寫	學歷	臺灣大學環境工程學研究所碩士生
鄭奕晴	兼任研究助理	樣品處理、實驗分析、報告撰寫	學歷	臺灣大學環境工程學研究所碩士生

1.2.3 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	106	106	106	106	106	106	106	106	106	106
	月份	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. 蒐集國內外利用微生物族群變異檢測遭受重金屬污染之底泥環境相關文獻。											
2. 建立連續流反應槽模擬底泥環境培養，並探討微生物結構變化之影響，瞭解菌群結構在受污染及未受污染河水的差異性。											
3. 採取選定河川底泥，分析其表水及底泥重金屬含量並分析其菌群結構											
4. 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	106 年 5 月	蒐集國內外文獻，並進一步整理成簡報									
期中報告	106 年 8 月	完成模擬底泥反應槽試驗，現地採樣及並送高通量定序分析。									
期末報告	106 年 11 月	解析模擬底泥的菌群結構變化及比較現地底泥樣品菌群變化									
結案	106 年 12 月	完成結案報告									

本計畫在期末結案報告前完成項目皆已完成。

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。

二、背景文獻回顧

2.1 河川水域污染下微生物生態變化

眾多研究發現河川水質與周邊生態環境具相互影響關係，以下由整體生態環境、微生物群落組成，至微生物功能基因表現三個層面，探討河川水質對於周遭生態產生之影響。

整體生態環境

Peplow, D.和 Edmonds, R.研究(Peplow and Edmonds., 2005)受金屬污染的底泥對環境中各生物階層的不良影響。研究地點是喀斯開山上的數個礦區與鄰近的Methow 河。此地區由於開採礦物的關係使的周圍環境受到重金屬污染，此研究發現當地礦渣、酸礦排水和底泥中有 8 種污染物質(砷、鉻、鎘、銅、鉛、鎳、硒、鋅)，這些污染物對生態環境到群集、族群、個體、細胞及胞內分子皆有影響。

污染物經化學及生物反應並溶出，再藉由雨水以入滲或地表逕流的形式擴散出去，影響森林土壤中的微生物，這些微生物作為分解者可分解土壤中的有機物並轉換成植物可利用的養份，或是自身被更高階的生物攝食，污染物便藉由植物生長吸收或動物攝食行為這兩種途徑進入食物鏈中，影響著環境中各階層的生物。以受污染地區白雲杉的葉子為食的石斑蛾幼蟲為例，除體積較未受污染環境下的石斑蛾體積小外，生長速率也明顯較慢。在受污染區域內，熊的毛髮裡有砷蓄積，而魚的肝臟中也有鎘蓄積，這代表著不論是水棲的生物或是陸生的生物皆會受污染物影響。在受污染的 Methow 河下游段中，鱒魚體形較未受污染河段中的鱒魚小，且死亡率也較高，進一步研究這些受污染的鱒魚的肝細胞，發現由於銅、鎘等污染物影響肝細胞中的基因調控，造成有肝醣夾雜物的累積，而產生了第四型肝醣儲積症病徵。

當環境中污染物的含量超過一定的基準時，會改變環境中細菌的組成結構，使

較能忍受該污染物的細菌所占的比例上升，無法忍受該污染物質的細菌比例下降，這些細菌組成發生的變化會一步一步往更高的階級影響，進而使得環境內的所有個體皆受到影響。

微生物群落變化方面

Zhao 等學者(Zhao et al., 2014)採集中國東北条子河水樣底泥，分析河流污染對底泥微生物群落的影響。該河川接收中國東北四平市污水，主要的金屬污染物為鋅及砷。利用變性梯度膠體電泳技術(DGGE)偵測河流不同區段的微生物群落變化，發現重金屬確實對微生物的族群造成影響，研究區段分成河川上游未受污染區域、中游流經污染區域及下游回復區，重金屬濃度為中游最高、下游次之而上游最低，其微生物優勢族群組成不同。

河段上游因居住人口少只有鄉村和山區且沒有工廠設置，所以上游河段水質乾淨，不論是 COD、SS、總氮、總磷、數值皆偏低，且 DO 值也很高，唯有 pH 值為弱鹼性約莫在 8.7 左右。河段中游是污染最嚴重的區域，此河段的污染來源主要來自鄰近的市鎮與工廠，除了 COD、總氮、總磷相較於上游有明顯上升外，溶氧量也一度降至 1.6 mg/L，除有機污染外，重金屬污染也相當嚴重，鉻、鎘、鉛、汞、砷、銅、鋅的濃度相較於上游，在中游環境中都有有明顯增加，其中砷與鋅在水中的濃度最高來到 5.72 $\mu\text{g/L}$ 與 420 $\mu\text{g/L}$ ，而底泥中測得最高濃度為 1.92 mg/kg 與 1704 mg/kg。河段下游因有與其他支流匯集的關係，所以水中各項污染濃度皆有下降，但下游底泥的鋅濃度仍很高(1160 mg/kg)。

在對不同河段中的底泥進行採樣與 DGGE 分析，以得知不同河段中的菌種組成，上游河段因未受污染所以物種多樣性明顯較好，但到中游河段時，因有機物及重金屬污染嚴重，故生物多樣性大幅下降許多上游河段出現過的菌種紛紛消失。中游河段內只剩對污染有耐受性的微生物存活了下來，其中細菌以 *Acinetobacter johnsonii*、*Clostridium cellulovorans* 和 *Trichococcus pasteurii* 為優勢物種，而原生動物

及後生動物以 *Lepadella patella*、*Limnodrilus hoffmeisteri*、*Filinia longiseta*、*Brachionus calyciflorus* 和 *Lepidosphaeria nicotiae* 為優勢物種。下游河段因污染情形較為舒緩，故生物多樣性與中段相比有所提升，並出現了一些中段未曾出現過的微生物。總結來說，砷及鋅對微生物有毒性，被污染後河段中，對於金屬無抗性的微生物種類消失，污染造成生物歧異度下降，而對金屬抵抗力強的 *Limnodrilus hoffmeisteri* 則大量繁殖。

Dean 等學者(Dean et al., 2013)則是針對 Afon Goch 河受酸礦排水污染，對微生物及底棲無脊椎動物造成的影響進行分析。Afon Goch 河位於英國安格爾西島，其源頭受 Parys 山礦區所流出的酸礦排水所污染，Parys 山礦區主要是以銅的開採為主，主要污染為鐵、銅、鋅及低 pH 的酸性排水，該地政府於 2003 年將酸礦排水導出 Afon Goch 河，大幅減少酸礦水對河川的影響。

受污染的河段濕地中在 2003 年以前測得銅、鋅分別的濃度為 28 及 19 mg/L，在 2003 年後銅和鋅的濃度降至 8.7 及 3.4 mg/L。河川上游的 pH 值不論導流前後都是在 2~3 之間，導流前河川下游的 pH 值仍約在 3~6 間。在受污染的河段濕地中，微生物相大多以嗜酸菌和硫還原菌(SRB)為主，SRB 在整個環境系統中佔有很重要的地位，除了可以產鹼提升 pH 值外，也可以促使金屬離子與硫反應生成金屬硫化物進而沉澱去除金屬離子。河段中底棲的無脊椎動物數量和種類與污染濃度有很大的關係，在河段上游極低 pH 的環境連對酸性環境容忍性強的搖蚊科和泥蛉科生物都有受到抑制的情形，而在下游河段多增加了划椿科和仙女蟲科生物的出現。

微生物功能基因表現方面

Jie 等學者(Jie et al., 2016)運用功能基因陣列(GeoChip 5.0) 來研究湘江中功能基因結構、組成、多樣化及微生物群落對三個地點的重金屬污染的代謝潛力。調查的三個目標地點底泥中金屬濃度，銅濃度為 392 至 570 mg/kg、砷濃度為 177 至 2480 mg / kg、鉻濃度為 61.1 至 88.5 mg/kg 及汞濃度為 1.6 至 24.3 mg/kg，這些金屬的存在和大量的抵抗性基因有關。

在湘江之三個地點中的微生物發現共有 2 萬 5,595 個功能基因參與不同的生化過程。再經由基因重疊分析，發現具有較高重金屬污染的地方，明顯具有較豐富的抗金屬基因，包括具有硫還原力之基因(*cueo*、*mer*、*metc*、*merb*、*tehb*、*terc*)，及更高的微生物功能多樣性。推測是長期的污染使微生物適應污染環境，並保持多樣性之機制，Mantel 試驗並顯示 S、Cu、Cd、Hg、Cr 的濃度與微生物群落之功能結構顯著相關。

Magalhães 等學者(Magalhães et al., 2011)研究主要是專注在杜羅河口潮間帶底泥中因金屬銅濃度上升，而影響微生物脫硝途徑及不同脫氮菌族群的基因表現。結果顯示脫硝速度會因為銅濃度上升而有明顯的變化，根據觀察，當每克濕重底泥之銅濃度達到 60 µg 時，會有 85%的代謝途徑被抑制。此外，銅的增加會使一氧化氮以及二氧化氮累積、同時三氧化氮的利用被抑制。進一步利用 real-time PCR 可觀察出，既使在銅最低濃度時，與硝化及一氧化氮還原有關之 *nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 基因的表現量也會大幅降低(79%至 81%)，同時，反轉錄 PCR 變性梯度電泳分析可看出 *nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 的轉錄產物量，也會因為銅的濃度而減少。

環境中污染物的影響不僅僅侷限於單一的生物，透過食物鏈等循環，污染物會在各種不同階級的生物間轉換。較低階的生物吸收污染物後，再被較高階的生物攝食，進而使得污染物在各種階級的生物體內累積，使得環境中原先對高階生物沒有

甚麼影響的污染物，其濃度透過不斷累積，直到對各階層生物造成不同的危害。

微生物做為污染物第一接觸的對象也是對污染物反應最為敏感的一個族群。微生物受到污染物刺激後會造成一些功能性基因上的改變，再藉由一些基因分析結果，可以得知特定污染物對特定基因段造成的影響，進而利用這個現象來鑑定河川受到污染的程度及種類。透過研究菌相的變化亦可作為指標，反應河川污染現象，監測環境中微生物有助於分析環境污染變化，並在第一時間做出分析及找到問題所在，在造成重大污染前先從根源解決問題。

2.2 底泥土壤重金屬污染與微生物生理變化

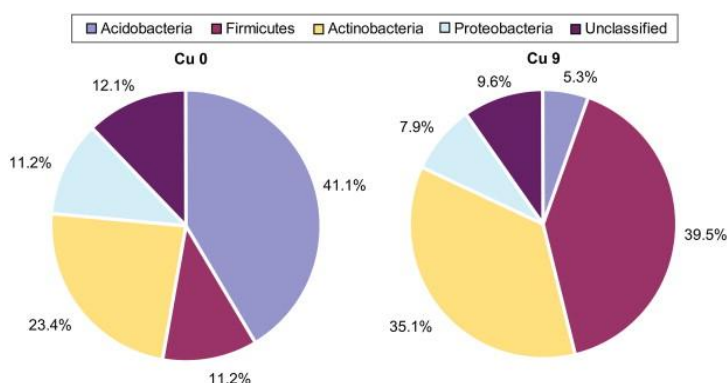
在 2006 年，SHU-JUAN SUN 等學者(Sun et al., 2006)在中國天津的銅電解工場，對其附近採集到的受到銅污染之土壤進行分析。分析結果發現在銅污染土壤中，與未受污染的對照土壤相比其敏感細菌數量減少，而同時細菌群落的耐受性增加。

2008 年 Dell' Amico 等學者(Dell' Amico et al., 2008)利用了前葡萄園的土壤來研究長期銅污染對細菌群落多樣性的影響。他們分析了相同區域同樣有銅污染，但其中可交換銅（Ex-Cu）濃度差了三倍的兩個位置的土壤來進行比較。最後發現這兩種皆含有高比例的銅耐受細菌(67%,70%)，與土壤中 Ex-Cu 的含量無關。同時也根據組成的變化發現革蘭氏陽性菌(Gram-positive bacteria)在污染較少的土壤中佔優勢，而污染較嚴重的土壤則為革蘭氏陰性菌(Gram-negative bacteria)。

而 Wakelin 等學者(Wakelin et al., 2010)在 2010 年發表的論文中，他們使用了南澳大利亞的某間農場的土壤來進行實驗，添加了不同濃度的硫酸銅進行一次性暴露，並在近六年後對其細菌群落組成進行分析。其結果發現土壤細菌群落之間的不相似性與土壤施加的銅濃度增加有密切相關。對未暴露銅的土壤和施加約

1000ppm 硫酸銅的土壤其細菌群落組成進行比較(圖一)，在未暴露銅的土壤其微生物組成以酸桿菌(*Acidobacteria*)佔了整體 41.1%為主，然而在暴露銅的土壤微生物組成中酸桿菌(*Acidobacteria*)則只佔 5.3%；後壁菌在暴露銅的土壤中微生物組成為 39.5%佔據優勢地位，但在未暴露的土壤中只有 11.2%而已。

圖 2-1 未暴露銅之土壤與暴露約 1000ppm 硫酸銅之土壤細菌群落組成圓餅



圖(Wakelin et al. 2010)

在 2012 年 Altimira 等學者(Altimira et al., 2012)發表的論文中，他們採集了智利中部瓦爾帕萊索地區被高濃度銅污染的農業用土壤和沒有被污染的農業用土壤進行分析比較。結果發現，銅污染土壤中銅耐受性培養細菌的數量明顯大於非污染土壤，高出了 13~46 倍。也發現到僅在 Cu 污染土壤的基因組 DNA 中發現多銅氧化酶的 *copA* 基因，並在五種顯示出高耐銅性的細菌分離物中的其中四種的質體中檢測到 *copA* 基因。表明了移動遺傳因子參與了污染環境中銅遺傳決定因子的擴散，使 *copA* 基因在污染環境中廣泛傳播。

Besaury 等學者(Besaury et al., 2016)在 2016 年使用了塞納河口泥灘的沉積物來建立微觀系統，並藉由其銅濃度梯度來觀察銅耐受性基因 *cusA* 和 *copA* 的豐富度 (abundance) 和表達(expression)。結果發現無論 *cusA* 還是 *copA* 基因其隨著銅濃度的增加豐富度都會降低，同時 *cusA* 基因豐富度比起 *copA* 基因高達了十倍左右。在表達方面，只有 *copA* 基因在有氧和缺氧條件下其 RNA 表達是恆定的。而

在觀察了兩種基因的分子系統發育(molecular phylogeny)後，發現了銅的增加使得 *copA* 和 *cusA* 基因序列的多樣性皆增加。

2.3 高通量定序應用於受污染底泥中微生物分析現有文獻

各類元素(如 C、N、P、及重金屬等) 在地球上的循環中，微生物扮演了相當重要的角色，因而全球有一些研究乃針對各式環境(如空氣、淡水、海水、土壤及底泥等)中之微生物族群進行分析，藉以更瞭解或更進一步掌控各類元素的循環與平衡(Gilbert et al., 2014, Earth Microbiome Project, EMP)。多數研究皆發現微生物族群組成會隨著環境中的有機物(Castine et al., 2009)、營養鹽(Kuo et al., 2010; 2016)、或重金屬(Gillan et al., 2005; Costa et al., 2015; Yin et al., 2015)的含量變化而發生改變，並發現多樣性的功能基因可在樣品中測得，例如 Kuo 等人在活性污泥系統中測得氨氧化菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)的族群隨氨氮濃度/負荷之變化而改變；而 Costa 等人(2015)在受重金屬污染的河川底泥中發現多樣性的金屬抗性基因(metal resistance genes)，Yin 等人(2015)也在高度受重金屬污染的河川底泥中發現金屬穩態之功能基因(metal homeostasis genes)，並發現微生物族群以 Firmicutes、Chloroflexi 和 Crenarchaeota 等菌門為主；此外，Castine 等人在含有較高有機負荷的水產養殖區域內之底泥中發現含有較優勢的 epsilon-Proteobacteria 和 *Virio* sp.，現階段研究成果皆顯示環境中微生物族群與所在環境中的物質元素條件有相當程度的關連性，然而有些關連性並未十分清楚。

次世代高通量定序法(next generation high throughput sequencing) 最開始問世時大多僅應用於重要生物/微生物全基因體之解序，隨後逐漸應用於農業、環境方面的研究，此方法因一次可以比克隆定序法獲得相對龐大的基因片段數量，可更深入鑑定環境樣品中混合微生物之種類及分析其族群組成(Ward, 2006; Kuo et al., 2016)。針對環境中之微生物族群分析可利用基因標的高通量定序法(gene target high throughput sequencing)(Illegheems et al., 2012)或散彈槍式宏基因定序法(shotgun

metagenomic sequencing) (Costa et al., 2015)，針對選定之目標基因或隨機之基因片段進行解序。

Pereira 等人(Pereira et al., 2015)針對巴西銅礦場址利用 16S rDNA pyrosequencing 分析水體及土壤中之微生物組成，並指出 *Meiothermus*, *Acidobacteria*, *Bradyrhizobium*, *Shingomonas*, 及 *Gemmatimonas* 等具有高金屬濃度之耐受度。另外，2012 年龍江發生嚴重鎘污染事件，此實驗採集龍江的水分析(Zhang et al., 2017)，使用 FLASH 合併來自高通量測序的原始 DNA 片段的成對讀取，再利用 QIIME 分析 16SrRNA，Cd 含量較高的污水中兩門(*Gemmatimonadetes* 和 *Proteobacteria*)，跟 39 屬(eX: *Pseudoxanthomonas*, *Halomonas*, and *Methanomassiliicoccus*..)，豐度與 Cd 分佈呈顯著正相關($p < 0.05$)，而有十門(*GOUTA4*, *Fibrobacteres*, *Kazan-3B-28*, *WS2*, *WS4*, *OP8*, *KSB3*, *Planctomycetes*, *Chlamydiae* and *Caldiserica*)，跟六屬(EX: *C1_B004*, *Clostridium*, and *vadinHB04*)，與 Cd 呈現顯著負相關。

章節摘要：

以 2.1 河川水域污染下微生物生態變化、2.2 底泥土壤重金屬污染與微生物生理變化、2.3 高通量定序應用於受污染底泥微生物分析，這三項目進行文獻回顧。

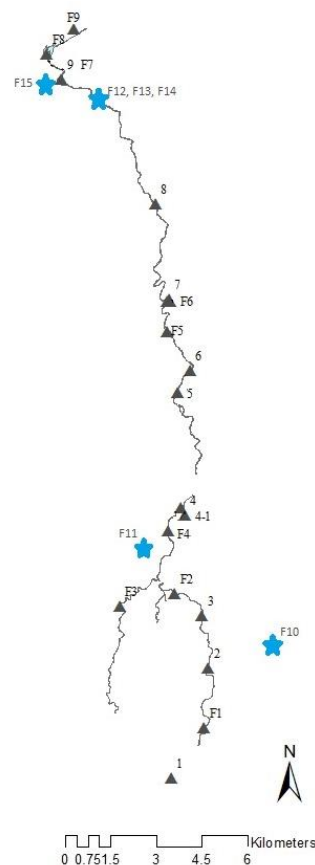
三、研究方法與原理

3.1 現地採樣分析

老街溪全長 36.7 公里，起源於龍潭區，流經平鎮市區及中壢市區，後於大園區出海，流域面積大約 82 平方公里，中下游河段多生活污水及工廠排放廢水污染源。

3.1.1 採樣點位資訊

至 2017 年 7 月底止，分別於 5 月 17 日、5 月 23 日及 5 月 24 日，至老街溪流域進行 3 次採樣，共採得水樣 25 個及底泥樣本 13 個。水樣包括 19 個老街溪河水樣本及 6 個工廠放流水樣本，採樣點位分布如下圖。歷次採樣資訊詳如後。



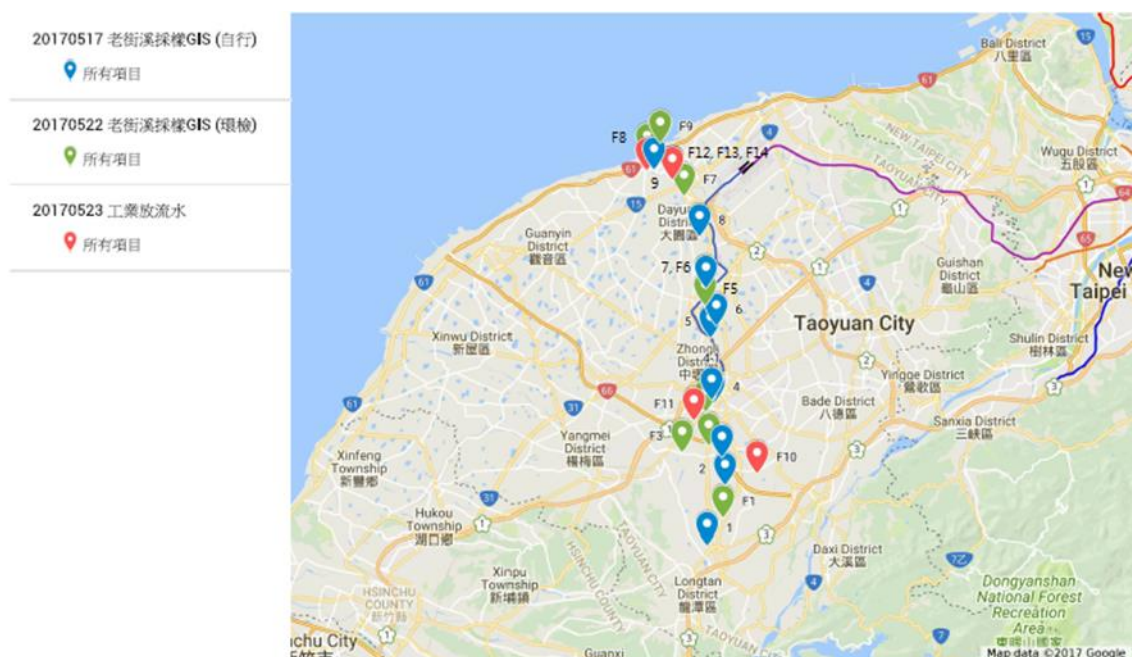


圖 3-1 老街溪採樣點分布(藍、綠色點為水樣、紅色點為工廠放流水)

1. 2017 年 5 月 17 日老街溪第一次採樣：由上游至下游，共 10 個採樣點，採樣區域包括龍潭區 1 個點位、平鎮區 4 個點位、中壢區 2 個點位及下游大園區 3 個點位，其中 5 點有採集底泥樣本，採樣資訊詳如下表 3-1。

表 3-1 老街溪 2017 年 5 月 17 日第一次採樣點資訊

樣本名	點位	行政區	採樣日期	採樣時間	緯度	經度	底泥樣本
1	國驕橋	龍潭區	20170517	10:27	24.87039	121.2111	●
2	南天橋	平鎮區	20170517	11:30	24.90304	121.2221	●
3	南華街	平鎮區	20170517	12:22	24.91858	121.2202	●
4	河濱步道	平鎮區	20170517	13:52	24.94839	121.2152	無
4-1	環北橋	平鎮區	20170517	14:30	24.95034	121.2139	●
5	芝和橋	中壢區	20170517	15:55	24.98456	121.2132	無
6	芝和路上	中壢區	20170517	16:24	24.99118	121.2167	無
7	洽溪橋	大園區	20170517	17:05	25.01209	121.2104	●
8	水源路上	大園區	20170517	17:45	25.04049	121.2065	無
9	許厝港一號橋	大園區	20170517	18:47	25.07735	121.1786	無

2. 2017 年 5 月 23 日老街溪第二次採樣：由上游至下游，共 9 個採樣點，採樣區域包括龍潭區 1 個點位、平鎮區 3 個點位、中壢區 1 個點位及下游大園區 4 個

點位，其中 8 點有採集底泥樣本，採樣資訊詳如下表 3-2。

表 3-2 老街溪 2017 年 5 月 23 日第二次採樣點資訊

樣本名	點位	行政區	採樣日期	採樣時間	緯度	經度	底泥樣本
F1	燈潭橋	龍潭區	20170523	09:31	24.8852	121.2209	無
F2	北勢橋	平鎮區	20170523	11:20	24.9251	121.2122	●
F3	平鎮一號橋	平鎮區	20170523	13:47	24.9213	121.1958	●
F4	環鄉橋	平鎮區	20170523	14:55	24.9437	121.2102	●
F5	公園橋上游	中壢區	20170523	15:00	25.0117	121.2100	●
F6	中正橋	大園區	20170523	13:50	25.0024	121.2100	●
F7	許厝港 一號橋	大園區	20170523	18:30	25.0629	121.1970	●
F8	老街溪出海 口	大園區	20170523	12:08	25.0847	121.1744	●
F9	大園石蚵	大園區	20170523	10:30	25.0921	121.1824	●

3. 老街溪流域工廠放流水採樣：於 106 年 5 月 24 日至 4 個採樣點取樣，共取得 6 個樣本，包括光電廠、合成纖維廠及皮革廠等工廠放流水，樣本類型全為水樣，無底泥樣本，採樣資訊詳如下表 3-3。

表 3-3 老街溪 2017 年 5 月 24 日工廠放流水採樣點資訊

樣本名	點位	行政區	採樣日期	採樣時間	緯度	經度	底泥樣本
F10	××股份有限公司平鎮廠 放流口	平鎮區	20170524	09:45	24.90962	121.2416	無
F11	××股份有限公司中壢廠 放流口	中壢區	20170524	10:35	24.93884	121.2031	無
F12	××股份有限公司大園廠 放流口	大園區	20170524	13:33	25.07187	121.1898	無
F13	××股份有限公司大園廠 放流口	大園區	20170524	13:45	25.07187	121.1898	無
F14	××股份有限公司放流口	大園區	20170524	13:55	25.07187	121.1898	無
F15	××大園工業區服務中心 放流口	大園區	20170524	15:10	25.07696	121.1741	無

3.1.2 採樣分析項目(如圖 3-2)

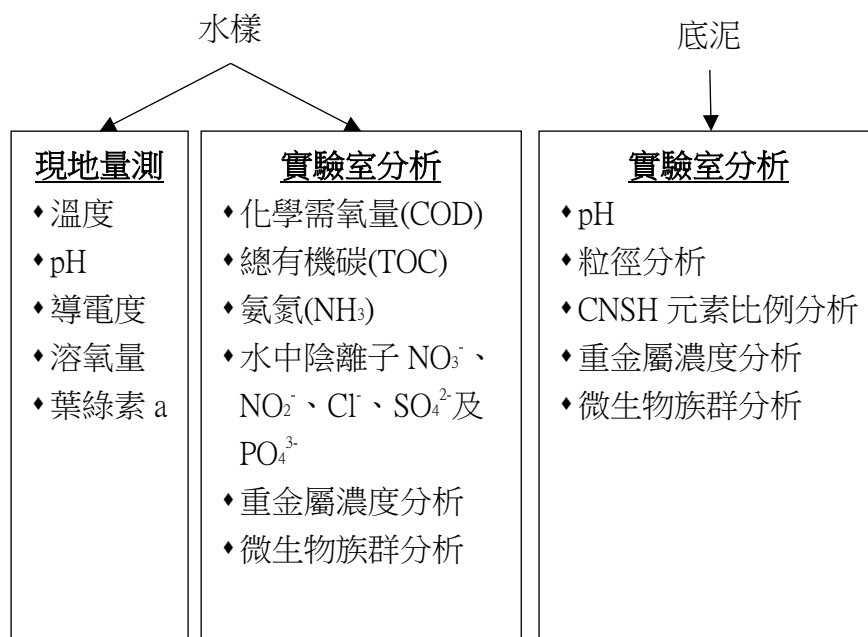


圖 3-2 採樣分析項目一覽

3.1.3 採樣方法

1. 水樣：使用塑膠水桶，以垂吊方式撈取水樣，微生物實驗之水樣經 20 μm 濾布粗濾後，收集於 2L 寶特瓶，其餘收集於採樣玻璃瓶或塑膠 PP 瓶中，並視情況酸化處理後，再放入裝有冰塊的行動冰箱，當日回實驗室即保存於 4 °C 冰箱冷藏待後續分析。
2. 底泥：使用艾克曼採泥器，以垂吊方式垂降河床，抓夾底泥；如可下水，則以不鏽鋼製採泥鏟，挖取底泥，儲存於採樣袋後放入裝有冰塊的行動冰箱，當日回實驗室過篩(2 mm)後保存於 -20 °C 冰櫃待後續分析。

3.1.4 水樣分析項目及方法

分析方法有現地量測，及實驗室分析兩部分，分析流程如圖 3-3。

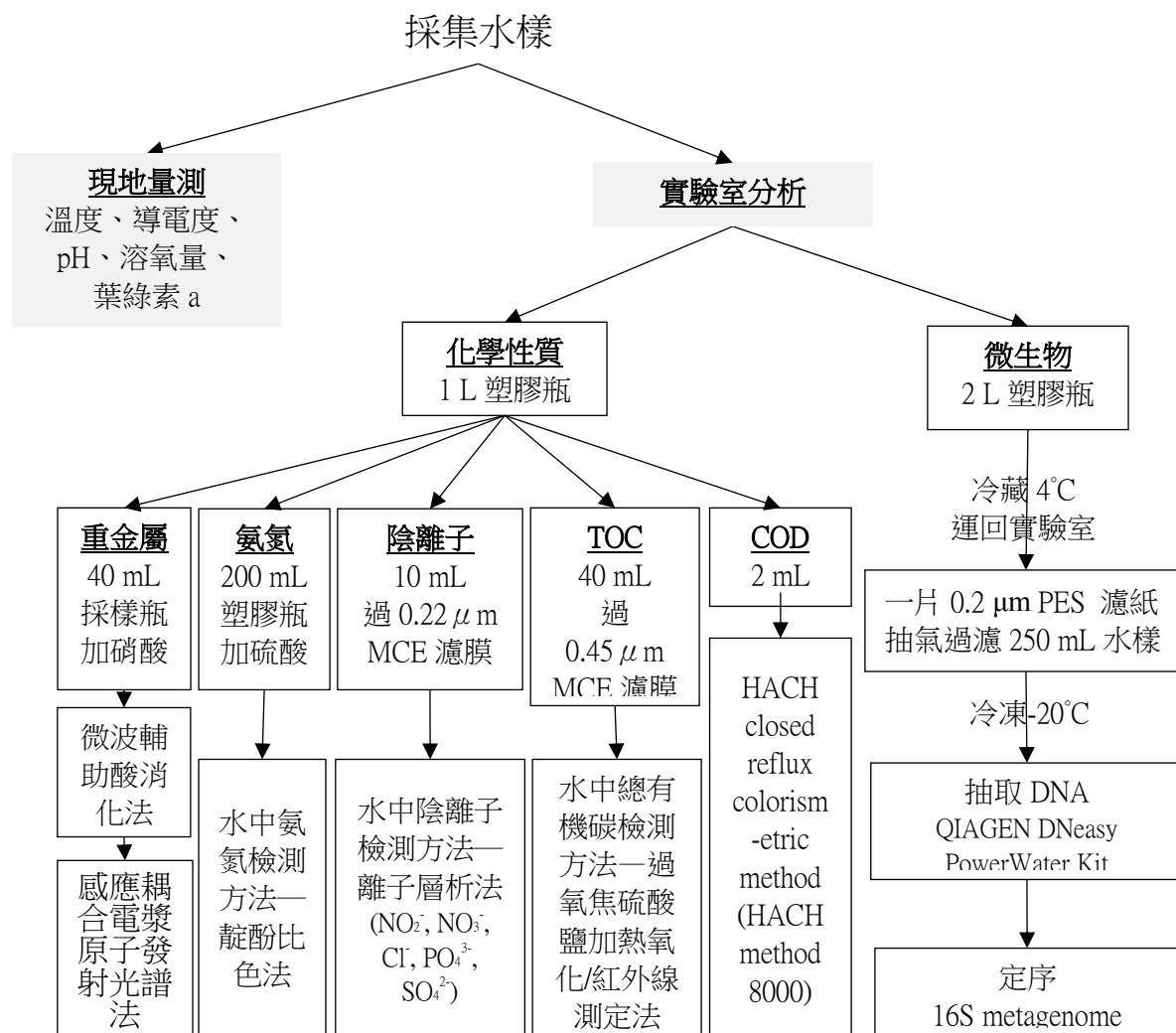


圖 3-3 採樣分析流程圖

河川水質現地量測

現地量測項目有溫度、pH、溶氧量、導電度、葉綠素 a 等數值，於現地取水避免晃動，於水桶中快速以攜帶式雙埠多參數主機 HACH HQ40D 測量參數，而葉綠素 a 則把水樣帶回實驗室後以 YSI-EXO 水質儀測量，偵測儀器資訊如下：

1. 溫度

以雙埠多參數主機 HACH HQ40D 之 pH 探針量測，量測範圍為 0 °C 至 50 °C。

2. pH

以雙埠多參數主機 HACH HQ40D 之 pH 探針量測，儀器額定可量測之範圍為 0.0 至 14.0，量測之準確性為 ± 0.002 。

3. 溶氧量

以雙埠多參數主機 HACH HQ40D 之 DO 探針量測，儀器額定可量測溶氧量範圍為 0.01 至 20.0 mg/L，量測溶氧量之準確性為 $\pm 1\%$ 。

4. 導電度

以雙埠多參數主機 HACH HQ40D 之導電度探針量測，量測導電度之準確性為 $\pm 0.5\%$ 。

5. 葉綠素 a

以多參數水質儀 YSI-EXO 量測，可量測之範圍為 0.07 to 400 $\mu\text{g/L}$ ，解析度 0.01 $\mu\text{g/L}$ 。

河川與水樣實驗分析

實驗室分析項目有化學需氧量(COD)、總有機碳濃度(TOC)、硝酸根離子(NO_3^-)、亞硝酸根離子(NO_2^-)、氯離子(Cl^-)、硫酸根離子(SO_4^{2-})、磷酸根離子(PO_4^{3-})、氨氮($\text{NH}_3\text{-N}$)及多種重金屬，分析方法如下：

1. 化學需氧量(COD)

使用 HACH closed reflux colorimetric method (HACH method 8000)，為經 USEPA 核准認可之檢驗方法。COD 濃度代表消耗每公升水樣所需的耗氧量 (mg/L)，水樣經過濾後加入 HACH COD 含有重鉻酸鉀之消化劑試管內混合均勻，以 150 °C 加熱消化 2 小時，進行有機物之氧化反應，冷卻後以水質分析儀 HACH DR3900 進行分析，量測範圍為 3 至 150 mg/L (Low Range 試劑)。

2. 總有機碳濃度(TOC)

使用水中總有機碳檢測方法—過氧焦硫酸鹽加熱氧化/紅外線測定法(NIEA W532.52C)，配合 Aurora 1030W TOC Analyzer 儀器測定，樣本經 0.45 μm 濾紙過濾、稀釋及磷酸酸化前處理後上機分析，水樣先經過酸化，把無機碳轉換成二氧化碳吹氣排出，剩餘有機碳再加入過氧焦硫酸鹽溶液，氧化轉換為二氧化碳，以非分散式紅外線分析儀，量測水樣中總有機碳的濃度。

3. 硝酸根離子(NO_3^-)、亞硝酸根離子(NO_2^-)、氯離子(Cl^-)、硫酸根離子(SO_4^{2-})、磷酸根離子(PO_4^{3-})等陰離子

使用水中陰離子檢測方法—離子層析法(NIEA W415.53B)，水樣經 0.45 μm 濾紙過濾稀釋後上機，採用 Dionex ICS-1100 離子層析儀，以 9 mM 之碳酸鈉作為移動相溶液，水樣中之待測陰離子，隨移動相溶液流經陰離子層析管柱時，因與強鹼性陰離子交換樹脂間之親和力不同而被分離，陰子分離後經轉換再流經電導度偵測器，即可依其滯留時間及波峰面積推測陰離子種類及濃度，儀器量測範圍為 0.001-10 mg/L。

4. 氨氮($\text{NH}_3\text{-N}$)

使用水中氨氮檢測方法—靛酚比色法(NIEA W448.51B)，次氯酸鹽(Hypochlorite)及酚溶液會和水中氨氮及銨離子反應，生成深藍色之靛酚(Indophenol)，使用分光光度計於波長 640 nm 處進行比色分析，吸光度與氨氮濃度成正比，藉由檢量線吸光值回歸公式，計算氨氮濃度，再乘上稀釋倍數，即可求得水樣中氨氮之濃度。

5. 重金屬

先以水中元素萃取消化法—微波輔助酸消化法(NIEA W312.51C)，使用濃硝酸及濃鹽酸消化液，再配合微波加熱，進行水中金屬元素之萃取。含有金屬萃取物之消化液，再以水中金屬及微量元素檢測方法—感應耦合電漿原子發射光譜法(NIEA W311.53C)，以感應耦合電漿原子發射光譜儀(ICP)測量樣本金屬

濃度。樣品先經霧化形成氣膠，再經由無線電波感應耦合電漿的加熱，樣品所含元素會被激發射出的光譜線，經由光柵分光出各特定波長的發射譜線後，再由光檢器偵測。

3.1.5 底泥分析項目及方法

底泥過 2 mm 篩網篩除大顆粒碎石雜物後，保存於-20 °C 冰櫃待後續分析，分析項目有 pH、碳氮硫氫重量百分比、重金屬及粒徑分布等。

1. pH

使用土壤酸鹼值（pH 值）測定方法－電極法（NIEA S410.62C），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。

2. 碳氮硫氫元素

使用碳、氮、硫、氧、氫元素含量檢測方法－元素分析儀法(NIEA M403.01B)，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，碳、氮、硫等元素完全轉換成二氧化碳、水氣、氮氧化物及硫氧化物等混合氣體，再利用熱傳導偵測器（Thermal conductivity detector, TCD）檢測氮氣、二氧化碳、水氣及二氧化硫，換算即可求得樣品中氮、碳、氮、硫之重量百分比。

3. 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。

4. 粒徑分布

使用雷射粒徑分析儀 Coulter LS230 量測顆粒直徑與粒徑分佈。雷射粒徑分析儀使用光源為 732 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 ~2000 μm 。

3.1.6 微生物

採樣水樣於 24 小時內，以抽氣過濾法過濾 250 mL 水樣在 0.2 μm PES 材質濾膜上，濾膜冷凍於 -20 °C 冰櫃內，待抽取 DNA 進行後續分析；採集底泥樣本則經過 2 mm 篩網過濾後，冷凍於 -20 °C 冰櫃內，待抽取 DNA 進行後續分析，抽取 DNA 方法如下：

1. 河水樣本中微生物 DNA，本次 DNA 萃取方法採用 QIAGEN DNeasy Power Water Kit，萃取步驟如下：
 - (1) 濾紙取出，以無菌剪刀剪除邊緣空白區域、過濾區域剪成細小碎片，放入 5 mL PowerWater® Bead Tube 中，加入 1 mL Solution PW1。
 - (2) 5 mL PowerWater® Bead Tube 以最大震盪速度震盪 5 分鐘，而後以室溫(轉速 $\leq 4000\text{ g}$)離心 1 分鐘。
 - (3) 上清液移到新的 2 mL 之微量離心管中。於室溫下以 13,000 g 離心 1 分鐘，使大分子與小分子分離。
 - (4) 上清液移到新的 2 mL 之微量離心管中。添加 200 μL Solution PW2，反覆倒置離心管使之充份混合，再冰浴 5 分鐘。
 - (5) 室溫下再以高轉速(13,000g)離心 1 分鐘，吸取上清液到新的 2 mL 微量離心管中。添加 650 μL Solution PW3，反覆倒置離心管使之充份混合。
 - (6) 取 650 μL 包含沉澱物之混合溶液到已經裝置於 collection tube 的 spin column 中，高轉速(13,000g)離心 1 分鐘，使溶液穿過濾膜，直到樣品全過濾膜。

- (7) 丟棄過濾液，spin column 移到新的 2 mL 之微量離心管中，添加 650 μ L 事先搖晃均勻之 Solution PW4，以高轉速(13,000g)離心 1 分鐘。
 - (8) 丟棄過濾液，添加 650 μ L 之 Solution PW5，以高轉速(13,000g)離心 1 分鐘。
 - (9) 丟棄過濾液，在高速離心 2 分鐘使殘餘溶液完全移除。
 - (10) 丟棄過濾液，spin column 移到新的 2 mL 之微量離心管中，添加 100 μ L Solution PW6，等待 1-2 分鐘，以 13,000 g 離心 1 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。
2. 底泥樣本中微生物 DNA，本次 DNA 萃取方法採用 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 已預熱 60-70°C 之 Solution C1，以最大震盪速度震盪 10 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 30 秒，使大分子與小分子分離。
 - (3) 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 包含沉澱物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 30 秒。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 100 μ L 之 Solution C6 滴於 spin column 中心，以 10,000 g 離心 30 秒。
- (11) 下方溶液即為本次萃取之 DNA，保存在-20°C 待後續使用。

3.2 實驗室模擬底泥接觸反應槽

3.2.1 反應槽設置

模擬底泥接觸反應槽主要由數個附有溢流管的玻璃製血清瓶所組成(圖 3-4)，每個瓶子皆有通氣栓覆蓋以避免來自外部的污染並維持透氣。玻璃瓶的直徑為 10 公分，高為 20 公分。每個反應槽會裝填約 10 公分厚的老街溪上游底泥，並使用蠕動幫浦把採樣來的老街溪上游河水送至反應槽內。瓶內河水約為 250mL 過多的河水會由瓶側的溢流管流出，蠕動幫浦流速調整為 1mL/min，其水力停留時間約為 4 小時。

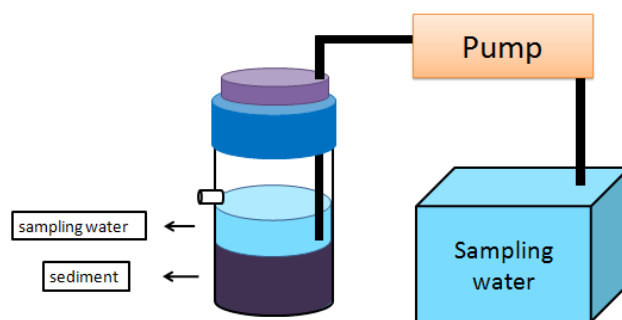


圖 3-4 模擬底泥接觸反應槽之設置圖

採樣來的老街溪河水會加入不同劑量的硫酸銅(Copper(II) sulfate, CuSO_4)做為反應槽之進流，加入之劑量以銅為單位分別是 150mg/L、300mg/L、600mg/L，同時也以無添加劑量的河水做為實驗之空白對照組(以下稱為 Blank)。每一個劑量各設置三瓶反應槽以利在第 14、28、56 天這三個不同採樣時間採集整瓶底泥(圖 3-5)。整組實驗設置之模擬底泥接觸反應槽會置於 25°C 恆溫箱內(圖 3-6)，避免溫度變化干擾之影響。

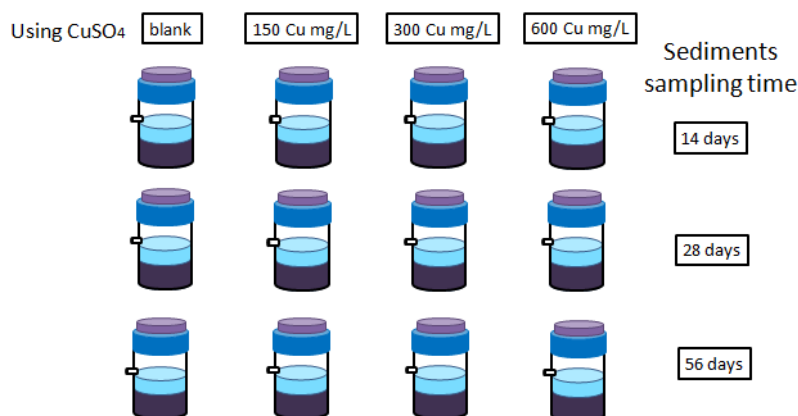


圖 3-5 模擬底泥接觸反應槽之劑量與天數配置示意圖



圖 3-6 模擬底泥接觸反應槽於恆溫箱之實際設置照片

3.2.2 水樣、底泥採樣頻率

模擬底泥接觸反應槽的採樣分成進出流水樣及底泥兩種。進出流水樣方面，為了瞭解水質在反應槽中的變化，設置了兩個採水樣點，分別為：(1)進入蠕動幫浦前加入不同硫酸銅劑量的河水，即為反應槽之進流；(2)瓶側溢流管流出的過多河水，即為反應槽之出流。水樣以合適之樣品瓶直接承接收集至足量。反應槽設置當天定義為第 0 天並開始進行採樣，並在之後的第 7、14、21、28、35、42、49、56 天每隔一個禮拜採一次水樣，共兩個月之連續採樣。

而在底泥方面，採樣時把整瓶反應槽從實驗設置中取出，並把瓶子中的底泥以採樣袋直接收集並均勻混和。底泥採樣分別在第 14、28、56 天進行，共計三次採樣時間。

3.2.3 進出流水樣分析

pH 值、導電度、濁度測量

本研究中，pH 值、導電度、濁度皆為採樣後立即進行現場測量。前兩者皆使用攜帶式水質測量儀(Orion 5 star plus pH/conductivity/DO meter, Thermo Scientific, USA)測量；而濁度則是以攜帶式濁度測量儀(Micro TPW turbidimeter, HF scientific, USA)測量。

水中總有機碳分析(Total Organic Carbon, TOC)

水樣中總有機碳濃度的量測方法係依據行政院環保署環境檢測所於西元 2009 年公告之 NIEA E532.52C 「水中總有機碳檢測方法－過氧焦硫酸鹽加熱氧化/紅外線測定法」。本研究採用濕式氧化法 TOC 分析儀搭配圓盤式自動進樣器(Aurora Model 1030W/1088, OI Analytical, USA)分析水中總有機碳濃度。過濾後的水樣導入反應器後以 5%磷酸將其酸化，使水樣中的無機碳轉換成二氧化碳，之後以載流氮氣導入非擴散性紅外線偵測器(Nondispersive infrared spectrometry)，而反應器於溫度 98°C 條件下，使水中剩餘之有機碳以 10%過氧焦硫酸鈉氧化為二氧化碳，並同樣以相同的非擴散性紅外線偵測器探測，所測得之訊號值對照檢量線可得知水樣中總有機碳的濃度。

水中銅濃度分析

水樣中銅濃度的量測方法係以行政院環保署環境檢測所於西元 2012 年公告之 NIEA W306.55A 「水中銀、鎘、鉻、銅、鐵、錳、鎳、鉛及鋅檢測方法－火焰式原子吸收光譜法」。其原理為過濾後的水樣經過霧化後由載流氣體送入火焰中，在適當火焰條件下進行原子化。而由中空陰極燈管(Hollow cathode lamp)或無電極放電燈管(Electrodeless discharge lamp)所產生的特性光，穿過火焰時會被原子化的特定金屬元素所吸收，再經過單光分光器處理後，由偵測器量測特定波長的強度，再換算求得樣品中待測金屬元素的濃度。

水中硫酸鹽分析

水樣中硫酸鹽的量測方法係以行政院環保署環境檢測所於西元 2015 年公告之 NIEA W415.53B「水中陰離子檢測方法－離子層析法」。原理為水樣中待測陰離子隨移動相溶液流經陰離子層析管柱時，因其與強鹼性陰離子交換樹脂間之親和力不同而被分離，分離後流經抑制裝置被轉換成具高導電度酸之形態，移動相溶液則轉換成低導電度之溶液。經轉換後待測陰離子再流經電導度偵測器，即可依其滯留時間及波峰面積、高度或感應強度予以定性及定量。

水中氨氮分析

水樣中氨氮的量測方法係以行政院環保署環境檢測所於西元 2005 年公告之 NIEA W448.51B「水中氨氮檢測方法－靛酚比色法」。其原理為含有氨氮及銨離子之水樣於加入次氯酸鹽(Hypochlorite)及酚溶液反應，生成深藍色之靛酚(Indophenol)，此溶液之顏色於亞硝醯鐵氰化鈉溶液(Sodium nitroprusside)之催化後會更加強烈。使用分光光度計於波長 640 nm 處進行比色分析，即可求得水樣中氨氮之濃度。

水中正磷酸鹽分析

水樣中正磷酸鹽的量測方法係以行政院環保署環境檢測所於西元 2010 年公告之 NIEA W427.53B「水中磷檢測方法－分光光度計／維生素丙法」。原理為水樣中正磷酸鹽與鉬酸銨(Ammonium molybdate)和酒石酸銻鉀(Antimony potassium tartrate)在酸性條件下反應生成錯合物，接著此錯合物被維生素丙溶液(Ascorbic acid solution)還原為藍色複合物鉬藍(molybdenum blue)，藉由量測 880 nm 波峰之吸光值，以定量水樣中正磷酸鹽之含量。

3.2.4 底泥分析

底泥之銅濃度分析

底泥中銅濃度的量測方法係以行政院環保署環境檢測所於西元 2015 年公告之 NIEA S301.60B「土壤中重金屬檢測方法－微波輔助王水消化法」經過微波消化等前處理程序，再配合西元 2012 年公告之 NIEA M111.01C「火焰式原子吸收光譜法」使用火焰式原子吸收光譜儀(Flame atomic absorption spectrometry, FLAA)進行銅濃度分析。

微波消化法的處理程序為：

首先把已風乾並通過 100 mesh(0.149 mm)篩網的底泥乾樣秤量 0.25g 後，置入鐵氟龍(Teflon)製的消化瓶中，接著於抽風櫃中依序加入 6 ± 0.1 ml 的濃鹽酸與 2 ± 0.1 ml 的濃硝酸混合均勻，確認反應平緩後進行加蓋密封。

接著把密封好的消化瓶置入微波消化裝置(Milestone model EYHOS PLUS)中，進行用 $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率加熱達到 $1175 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 並維持在該溫度 10 ± 1 min 的模式，以防升溫太快造成放熱反應而讓待測物從自動洩壓閥散失。

消化完成等待消化瓶冷卻至室溫約 30 分鐘後，於抽風櫃轉鬆洩壓閥使消化瓶中之氣體洩出。接著把消化瓶中的消化液倒入 50ml 定量瓶中，並以去離子水潤洗消化瓶及瓶蓋數次收集於定量瓶，定量至標線後得到消化稀釋液。最後把稀釋液搖晃均勻後使用過濾裝置通過 $0.45\mu\text{m}$ 的濾膜，便可進行 FLAA 的分析。

儀器測得的銅濃度可由下式 3-1 回推至底泥樣品中銅之含量 C_M ，以 mg/kg 底泥乾重表示。

式 3-1

$$C_M = \frac{A \times V \times f \times 1000}{W \times 100 / (100 + W_{H_2O})}$$

A：經儀器分析求得之消化稀釋液濃度，以 mg/L 表示。

V：消化稀釋液定量後之體積，本研究為 0.05L(50mL)。

f：上機測試時之稀釋倍數。

W：底泥樣本乾樣的取樣量，以 g 表示，本研究中為 0.25g。

W_{H_2O} ：底泥樣品之水分含量(%) (測量方法係依據行政院環保署環境檢驗所於西元 2012 公告之 NIEA S280.62C 「土壤及底泥水分含量測定方法－重量法」)。

底泥之有機質含量分析

底泥之有機質含量測定係參考環檢所 NIEA S301.60B 「土壤中重金屬檢測方法－微波輔助王水消化法」中的建議，以 Walkley-Black 濕式氧化法來測定(Nelson and Sommers., 1982)。步驟與方法大致參考上述，但由於指示劑部分其建議之二苯胺(Diphenylamine)具有毒性，因此改用菲羅琳(Ferrouin)替代，其會在 pH 2-9 時與亞鐵離子(Fe^{2+})形成穩定的鄰二氮菲亞鐵離子($[Fe(phen)_3]^{2+}$)，可藉此達到使樣品呈色之目的。菲羅琳配置方法為溶解 1.485g 的 1,10-鄰二氮雜菲(110-Phenanthroline monohydrate, $C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$)和 0.695g 流酸亞鐵於試劑水中並定量至 100mL，或是購買市售品而得。

有機質含量分析程序為：

首先秤取 0.25g 之風乾底泥樣品於 500mL 錐形瓶中，再加入 10mL 之 1N 重鉻酸鉀($K_2Cr_2O_7$)後均勻搖晃，接著迅速加入 20mL 濃硫酸，搖晃均勻後靜置 30 分鐘以上。同時需作空白試驗，於 500mL 錐形瓶中僅加入上述相同的重鉻酸鉀與濃硫酸。

接著加入 200mL 去離子水及 10mL 的 85%磷酸，待其冷卻後以滴管滴入約十滴的菲羅琳指示劑後，以 0.5N 的硫酸亞鐵銨($(NH_4)_2Fe(SO)_4 \cdot 6H_2O$)溶液來進行滴定。滴定的過程變色範圍為：黃綠色→草綠色→碧綠色→灰綠色→紅棕色(終點)。滴定結束後以下式 3-2 以樣品與空白試驗的硫酸亞鐵銨溶液消耗量進行比較，即可得到該樣品有機碳(Organic carbon, OC)的含量，以 g/kg 來表示。

$$\text{式 3-2} \quad OC(g/kg) = V[1 - \frac{V_S}{V_B}] \times \frac{12}{4000} \times 1.3 \times \frac{1000}{W_d}$$

V：1 N 重鉻酸鉀($K_2Cr_2O_7$)，本研究為 10 mL。

以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(1/2)

V_S ：樣品滴定 0.5N 的硫酸亞鐵銨之體積(mL)。

V_B ：空白試驗 0.5N 的硫酸亞鐵銨之體積(mL)。

12：碳之原子量。

4：碳原子之價數改變，即換算為當量。

1.3：方法之校正係數。

1000：mg 與 g 之換算值，及毫當量數與當量數之換算。

W_d ：風乾樣本重，本研究為 0.25g。

求出底泥樣品之有機碳含量之後，根據行政院農業委員會農業試驗所公告之 TARI S201.1B「土壤有機質測定方法－燃燒／紅外線測定法」中提到由於土壤的平均有機質含碳量為 58%，有機質含量大約是有機碳的 1.723 倍，藉此可略估有機質的含量，以 g/kg 表示，並可進一步換算為在整體風乾底泥樣品之佔比 (%) (w/w)，以下式 3-3 所示。

$$\text{式 3-3} \quad OM(\%) = \frac{OC}{1000} \times 1.723 \times 100\%$$

OC：式 3-2 求得的樣品有機碳含量，以 g/kg 表示。

1000：g/kg 和 g/g 的換算值。

1.723：有機碳換算成有機質的經驗參數。

3.2.5 反應槽底泥樣品核酸萃取及前處理

底泥樣品的 DNA 萃取是利用 QIAGEN 的 DNeasy PowerSoil kit (QIAGEN, USA)，其萃取方法依照廠商說明書，詳細步驟如下。

1. 底泥樣品 0.25g 置於 PowerBead Tube 中，並震盪混合。
2. 加入 60 μ L 的 C1 溶液(如有沉澱需加熱至 60°C 使其溶解)並震盪。
3. PowerBead Tube 水平固定至震盪器上。

4. 以最大速率震盪 10 分鐘。
5. PowerBead Tube 以 10000 $\times g$ 離心 30 秒。
6. 上清液約 400-500 μ L 移至 2mL collection tube 中。
7. 加入 250 μ L 的 C2 溶液於上清液並震盪 5 秒，之後於 4°C 保存 5 分鐘。
8. collection tube 以 10000 $\times g$ 離心 1 分鐘。
9. 上清液最多 600 μ L 移至新的 2mL collection tube 中。
10. 加入 200 μ L 的 C3 溶液於上清液並震盪，之後於 4°C 保存 5 分鐘。
11. collection tube 以 10000 $\times g$ 離心 1 分鐘。
12. 上清液最多 750 μ L 移至新的 2mL collection tube 中。
13. 加入 1200 μ L 的 C4 溶液於上清液並震盪 5 秒。
14. 取出 675 μ L 的混合液置於 MB Spin Column 中，接著把 MB Spin Column 以 10000 $\times g$ 離心 1 分鐘，再倒棄濾液。
15. 重複步驟 14 直到混合液濾完。
16. 加入 500 μ L 的 C5 溶液於 MB Spin Column 中，接著把 MB Spin Column 以 10000 $\times g$ 離心 30 秒。
17. 倒棄濾液並再次使 MB Spin Column 以 10000 $\times g$ 離心 30 秒。
18. 小心地把 MB Spin Column 移至新的 2mL collection tube，過程中避免 MB Spin Column 沾上 C5 溶液。
19. 加入 100 μ L 的 C6 溶液於 MB Spin Column 的白色濾膜上。
20. 以 10000 $\times g$ 離心 30 秒後丟棄 MB Spin Column，便可得到從底泥樣品中萃取的 DNA。

3.3 高通量定序

高通量定序之實驗流程及序列生物資訊分析步驟如圖 3-7 所示，進一步樣品處理、定序方法、序列整理、及統計分析之細節分述如下。

底泥樣品微生物核酸萃取：

底泥樣品中之總和酸萃取利用商業化之試劑組(Qiagen DNeasy® PowerSoil® Kit)，水樣核酸則以以 QIAGEN DNeasy Power Water Kit 萃取。詳細萃取步驟請參閱 3.1.6 及 3.2.5。萃取核酸的質與量以 Nano Vue Plus Spectrophotometer(GE Healthcare, UK)量測後，把其冰存於 -20°C 低溫冷凍櫃，作為後續之 PCR 反應。

聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR):

PCR 是利用正/反股引子對(f / r)針對萃取獲得的微生物基因體 DNA 之目標 16S rRNA 基因進行擴增反應，所使用之 341f 及 805r 引子序列分別為 341f: 5'- CCT ACG GGN GGC WGC AG -3' 及 805r: 5'- GAC TAC HVG GGT ATC TAA TCC - 3'，針對 16S rDNA 複製出較大片段的 DNA 序列。為了區分樣品的種類，便在 PCR 反應中使用之引子 5' 端位置添加一段小片段序列做為特定編碼(Barcode)序列進行分群辨識。本研究中各樣品所使用的 barcodes 請參閱附錄六。

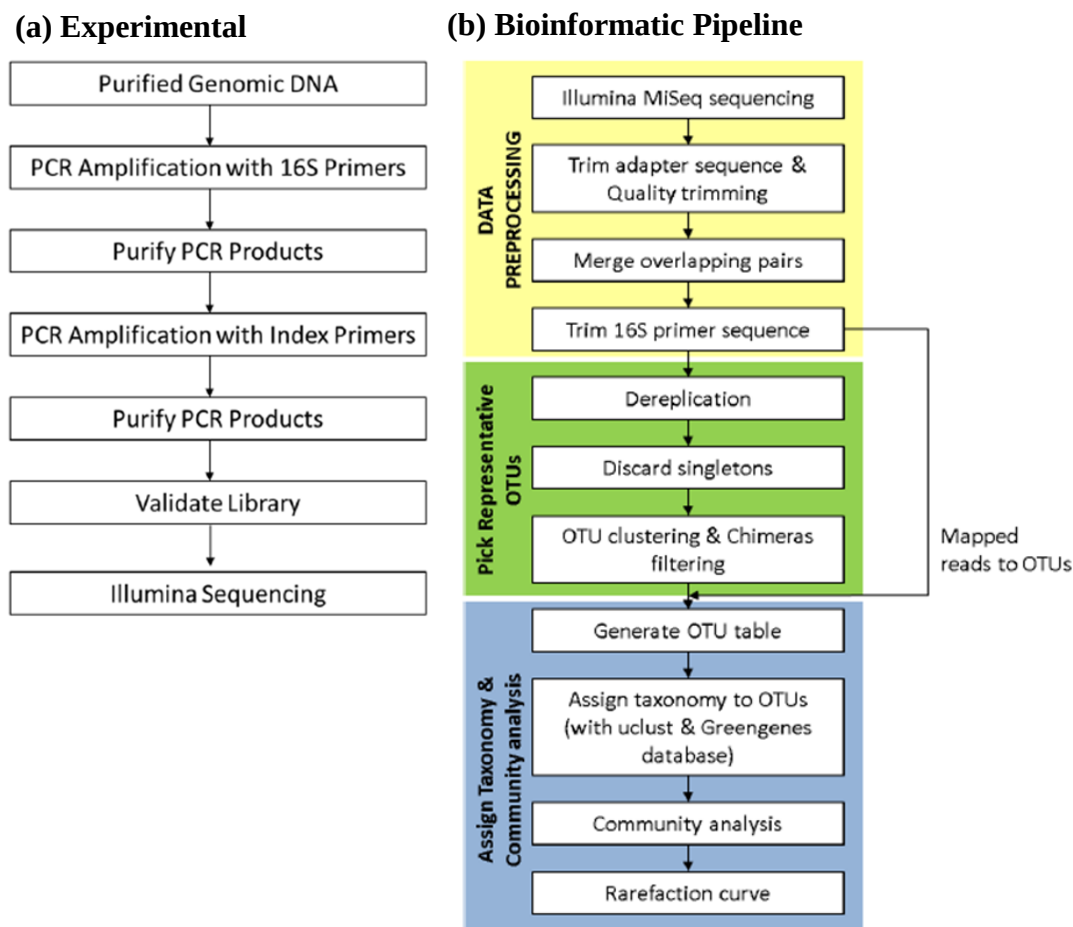


圖 3-7 高通量定序之實驗流程及序列生物資訊分析步驟

PCR 之反應總體積 $25\ \mu\text{L}$ ，包含 $12.5\ \mu\text{L}$ 的 MAX HS PCR Master Mix(2X) (EmeraldAmp, TaKaRa)， $1\ \mu\text{L}$ 的正/反股引子($10\ \mu\text{M}$)， $7.5\ \mu\text{L}$ 的水(PCR grade)，及 $3\ \mu\text{L}$ 的 DNA 萃取液；反應溫度條件為 98°C 3 分鐘，接著 40 個循環的放大反應 (94°C 1 分鐘、 57°C 1 分鐘、 72°C 1 分鐘)，最終於 72°C 反應 10 分鐘後以 4°C 保存。PCR 產物以 1.5% 電泳觀測。進行定序前，再把 PCR 產物純化(clean up)，並再加上一段定序所須之適配子(Adapter)序列(Illumina Netera XT Adapter sequence: AGA TGT GTA TAA GAG ACA G)。製備完成之定序基因庫(libraries)再經由 Q-PCR，Experion，和 Qubit 等系統/方法檢視 libraries 的質與量。

高通量定序 (high throughput sequencing):

高通量定序以 Illumina MiSeq 系統進行，定序結果初步品質篩選以設定之品質分數(quality score, Q)做判斷依據，另外小於 35 bps 之序列會被系統捨棄不用。

序列整理 (reads pre-processing):

高通量定序所得之序列先經過去適配子(trim illumine adapter sequence)、品質篩選(quality and ambiguity trimming)、序列對組裝(merge overlapping paired reads)、及引子與編碼序列確認、分樣品、和去除不含 16S 引子的序列；其中利用” Cutadapt v.1.4.2” 系統[Martin, 2011] 去除適配子；接著利用” Seqtk v.1.2-r94” 進行品質篩選(quality trimming)，將短序列(小於 35 bp)及非配對之單一序列(singlet reads)去除；品質篩選後的配對序列(paired-end reads)或序列對(read pairs)再利用” FLASH(Fast Length Adjustment of Short reads, v1.2.9)” [Magoc and Salzberg, 2011]將序列對重疊(overlapping merged)成較長的組裝序列，組裝後序列長度小於 200 bps 之序列於以捨棄，另外如配對序列有缺乏 16S 引子者亦會被捨棄。

操作分類單元 Operational taxonomic unit (OTU)分類與菌種分析:

OTUS 指操作分類單元(Operational Taxonomic Unit)，是將序列相近之序列(如 >98%相似度)歸類為一個 OTU 的一種菌種分類方式。這個以分叢概念分類的名稱最早由 Sokal RR 和 Sneath PHA(1963)所提出，隨後並習慣被用於微生物之鑑定分類。(Robert R. Sokal und Peter H. A. Sneath, Principles of Numerical Taxonomy 1. Aufl. XVI, 359 S., 38 Abb., 21 Tab. San Francisco and London 1963: W. H. Freeman and Company 60 s)

整理後之組裝序列進一步利用” UPARSE implemented in USEARCH (v9.2.64)” 系統[Edgar, 2013]進行調整(包括 dereplication, singlet discarding, 和 chimera filtering)後並做 OTUs 分類，並建構樣品的 OTUs 表；接著以” RDP Classifier

v2.12” [Wang, 2007]將各別 OTUs 之代表序列進行菌種鑑定，做為樣品中微生物族群組成之依據。

微生物族群組成百分比分析:

微生物族群組成以 excel 統計各樣品中所含之菌門(phylum)之 OTUs 數量，在取總和為 100%，藉以呈現各樣品中之微生物族群組成。為方便不同性質之樣品比較分析，所有樣品分為 4 種分組(包括現場底泥 soil、現場溪水 water、工廠放流水 factory_water、及實驗室連續流試驗 exam 等)。

樣品微生物族群受水質條件影響分析:

樣品微生物族群受水質條件影響以典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)進行，以各樣品所含之 OTUs 進行微生物族群組成差異性分析，及水質條件關聯性分析，分析結果中樣品落點之相對位置代表微生物族群組成差異度，兩樣品落點越相近代表兩樣品之微生物族群組成越相似，反之，代表兩樣品之微生物族群組成越不同；此外，環境水質條件對樣品微生物族群之影響趨勢以箭頭方向表示，而影響程度則以箭頭長度表示之。

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、反應槽設置、水樣與底泥之分析、實驗流程、定序前處理、高通量定序和結果之數據整理解析等分節予以說明。

以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(1/2)

四、結果與討論

4.1 蒐集文獻

蒐集之文獻已於第二章、背景文獻回顧中進行回顧介紹。蒐集之文獻清單如下：

文獻名稱	文獻重點
河川水域污染下微生物生態變化	
Dean, A. P., S. Lynch, P. Rowland, B. D. Toft, J. K. Pittman and K. N. White. 2013. " <i>Natural wetlands are efficient at providing long-term metal remediation of freshwater systems polluted by acid mine drainage.</i> " <u>Environ Sci Technol</u> 47(21): 12029-12036.	1. 針對位於英國安格爾西島 Afon Goch 河受酸礦排水污染，河段中底棲的無脊椎動物數量和種類與污染濃度有很大的關係。 2. 在受污染的河段濕地中，微生物相大多以嗜酸菌和硫還原菌(SRB)為主，SRB 可以產鹼提升 pH 值外，也可以促使金屬離子與硫反應生成金屬硫化物進而沉澱去除金屬離子。
Jie, S., M. Li, M. Gan, J. Zhu, H. Yin and X. Liu. 2016. " <i>Microbial functional genes enriched in the Xiangjiang River sediments with heavy metal contamination.</i> " <u>BMC Microbiol</u> 16(1): 179.	1. 運用功能基因陣列(GeoChip 5.0) 來研究湘江中功能基因結構、組成、多樣化及微生物群落對三個地點的重金屬污染的代謝潛力。 2. 有較高重金屬污染的地方，明顯具有較豐富的抗金屬基因。
Magalhaes, C. M., A. Machado, P. Matos and A. A. Bordalo. 2011. " <i>Impact of copper on the diversity, abundance and transcription of nitrite and nitrous oxide reductase genes in an urban European estuary.</i> " <u>FEMS Microbiol Ecol</u> 77(2): 274-284.	1. 杜羅河口潮間帶底泥中因金屬銅濃度上升，而影響微生物脫硝途徑及不同脫氮菌族群的基因表現。

Peplow, D. and R. Edmonds. 2005. <i>"The effects of mine waste contamination at multiple levels of biological organization."</i> <u>Ecological Engineering</u> 24(1-2): 101-119. Zhao, J., X. Zhao, L. Chao, W. Zhang, T. You and J. Zhang. 2014. <i>"Diversity change of microbial communities responding to zinc and arsenic pollution in a river of northeastern China."</i> <u>Journal of Zhejiang University. Science. B</u> 15(7): 670-680.	1. 喀斯開山上的數個礦區與鄰近的 Methow 河周圍環境受到重金屬污染)，這些污染物對生態環境到群集、族群、個體、細胞及胞內分子皆有影響。 1. 利用變性梯度膠體電泳技術(DGGE)偵測中國東北条子河不同區段的微生物群落變化，發現重金屬確實對微生物的族群造成影響。
底泥土壤重金屬污染與微生物生理變化	
Altimira, F., C. Yáñez, G. Bravo, M. González, L. A. Rojas and M. Seeger. 2012. <i>"Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile."</i> <u>BMC Microbiology</u> 12(1): 193. Besaury, L., B. Pawlak and L. Quillet. 2016. <i>"Expression of copper-resistance genes in microbial communities under copper stress and oxic/anoxic conditions."</i> <u>Environmental Science and Pollution Research</u> 23(5): 4013-4023.	1. 採集了智利中部瓦爾帕萊索地區被高濃度銅污染的農業用土壤和沒有被污染的農業用土壤進行分析比較。銅耐受性培養細菌的數量有所差異。 2. 移動遺傳因子參與了污染環境中銅遺傳決定因子的擴散，使 copA 基因在污染環境中廣泛傳播。 1. 觀察塞納河口泥灘的沉積物，發現銅耐受性基因 cusA 和 copA 的豐富度（abundance）和表達(expression)皆會隨著銅濃度的增加而有所不同。

Dell'Amico, E., M. Mazzocchi, L. Cavalca, L. Allievi and V. Andreoni. 2008. "Assessment of bacterial community structure in a long-term copper-polluted ex-vineyard soil." <u>Microbiological Research</u> 163(6): 671-683. Sun, S. J., J. Xu, S. G. Dai and X. Han. 2006. "Influences of copper speciation on toxicity to microorganisms in soils." <u>Biomed Environ Sci</u> 19(6): 409-413.. Wakelin, S. A., G. Chu, R. Lardner, Y. Liang and M. McLaughlin (2010). "A single application of Cu to field soil has long-term effects on bacterial community structure, diversity, and soil processes." <u>Pedobiologia</u> 53(2): 149-158.	1. 前葡萄園的土壤來研究長期銅污染對細菌群落多樣性的影響，發現銅耐受細菌與土壤中 Ex-Cu 的含量無關。 2. 革蘭氏陽性菌(Gram-positive bacteria)在銅污染較少的土壤中佔優勢，而銅污染較嚴重的土壤則為革蘭氏陰性菌(Gram-negative bacteria) 1. 於中國天津銅電解工場附近採集到的受到銅污染之土壤進行分析。發現在銅污染土壤中，與未受污染的對照土壤相比其敏感細菌數量減少，而同時細菌群落的耐受性增加。 1. 澳大利亞的某間農場的土壤添加了不同濃度的硫酸銅進行一次性暴露，發現土壤細菌群落之間的不相似性與土壤施加的銅濃度增加有密切相關。
高通量定序應用於受污染底泥中微生物分析	
Illegheems K, De Vuyst L, Papalexandratou Z, Weckx S. 2012. "Phylogenetic analysis of a spontaneous cocoa bean fermentation metagenome reveals new insights into its bacterial and fungal community diversity." <u>Plos One</u> 7(5): e38040.	1. 環境中之微生物族群分析可利用基因標的高通量定序法，針對選定之目標基因或隨機之基因片段進行解序。

Kuo HW, Huang CY, Chang CN, Lee PL, Chen YW, Huang CF, Chang HH, Tang YH, Zeng SZ, Li GY, Lin CR, Chen LZ. 2016. "<i>Identification of diverse bacterial communities for potential bio-aids capable of troubleshooting for wastewater biological treatment processes.</i>" <u>International Journal of Environmental Science and Technology</u> Doi: 10.1007/s13762-016-1176-z.	1. 活性污泥系統中測得氨氧化菌 (ammonia-oxidizing bacteria, AOB)的族群隨氨氮濃度/負荷之變化而改變。 2. 次世代高通量定序法 (next generation high throughput sequencing)可深入鑑定環境樣品中混合微生物之種類及分析其族群組成。
Zhang MJ, Huang FK, Wang GY, Liu XY, Wen JK, Zhang XS, Huang YS, Xia Y. 2017. "Geographic distribution of cadmium and its interaction with the microbial community in Longjiang River: risk evaluation after a shocking pollution accident." <i>Scientific Reports</i> 7:227.	1. 採集發生嚴重鎘污染事件之龍江的水進行分析，尋找與鎘正相關或負相關之微生物。 2. 分析方式為使用 FLASH 合併來自高通量測序的原始 DNA 片段的成對讀取，再利用 QIIME 分析 16SrRNA。

Costa PS, Reis MP, Ávila MP, Leite LR, de Araújo FMG, Salim ACM, et al. 2015. Metagenome of a Microbial Community Inhabiting a Metal-Rich Tropical Stream Sediment. PLoS ONE 10(3): e0119465 . https://doi.org/10.1371/journal.pon	1. 在受重金屬污染的河川底泥中發現多樣性的金屬抗性基因(metal resistance genes)。 2. 針對環境中之微生物族群分析可利用散彈槍式基因定序法(shotgun metagenomic sequencing)，針對選定之目標基因或隨機之基因片段進行解序。
Pereira LB, Vicentini R, Ottoboni LMM. 2015. "Characterization of the core microbiota of the drainage and surrounding soil of a Brazilian copper mine." <u>Genetics and Molecular Biology</u> 38:484-489.	1. 巴西銅礦場址利用 16S rDNA pyrosequencing 分析水體及土壤中之微生物組成，並指出 <i>Meiothermus</i>, <i>Acidobacteria</i>, <i>Bradyrhizobium</i>, <i>Shingomonas</i>,及 <i>Gemmatimonas</i> 等具有高金屬濃度之耐受度。
Ward N. 2006. "Minireview: New directions and interactions in metagenomics research." <u>FEMS Microbiol Ecol</u> 55: 331-338.	1. 次世代高通量定序法 (next generation high throughput sequencing)因一次可以比克隆定序法獲得相對龐大的基因片段數量，可更深入鑑定環境樣品中混合微生物之種類及分析其族群組成。

4.2 河川水樣

4.2.1 現地量測

現地量測項目有溫度、pH、溶氧量、導電度、葉綠素 a 等數值，樣本名係依照上游至下游排序，詳細數據如下表 4-1。

表 4-1 河川水樣現地量測數值

樣本名	溫度 (°C)	pH	溶氧量 (mg/L)	導電度 (μS/cm)	葉綠素 a (μg/L)
1	25	6.78	7.14	294	14.9
F1	25.1	6.92	-	226	4.19
2	26.1	7.22	-	451	4.24
3	27.1	7.48	7.17	373	4.94
F2	27.3	7.54	8.17	358	7.97
F3	27.3	7.51	5.88	997	5.73
F4	29.1	7.53	6.93	705	5.48
4-1	26.4	7.39	5.36	517	5.09
4	27.1	7.52	5.86	444	5.89
5	26.5	7.27	5.11	441	4.29
6	26.2	7.32	5.99	408	4.85
F5	29	7.52	6.50	294	5.47
F6	30.6	8.91	10.74	440	11.83
7	24.9	7.21	6.09	331	5.09
8	25.6	7.26	7.09	422	5.3
F7	28.8	7.70	4.90	1966	15.44
9	26.2	7.37	8.37	968	7.64
F8	28.9	7.70	6.79	11710	14.42
F9	27.1	8.18	6.67	48200	6.73
平均數	27.1	7.49	6.75	3660	7.34
標準差	1.6	0.45	1.41	11091	3.81
最小值	24.9	6.78	4.90	226	4.19
最大值	30.6	8.91	10.74	48200	15.44

pH 及溶氧量

圖 4-1 為 pH 及溶氧量分布，由左而右代表由上游至下游數據，pH 最大值為 8.91，最小值為 6.78，pH 平均值為 7.49 ± 0.45 ；溶氧量最大值為 10.74 mg/L，測得於下游大園區中正橋 F6 點位，最小值為 4.9 mg/L，測得於下游大園區許厝港一號橋 F7 點位，溶氧量平均值為 6.75 ± 1.40 mg/L，其中上游龍潭區燈潭橋 F1 及平鎮區南天橋 2 號點位溶氧量超出量測範圍。

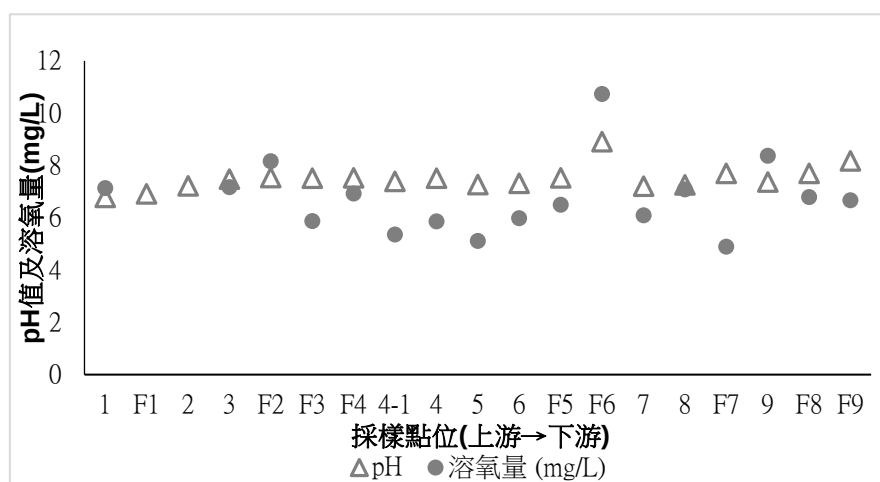


圖 4-1 河川水樣 pH 及溶氧量分布

導電度

圖 4-2 為導電度分布，縱座標軸以對數方式呈現，導電度最大值為 48,200 mg/L，最小值為 226 mg/L，下游導電度數值高於上游，除了下游 F7、F8 及 F9 點位導電度高至 1,966、11,710 及 48,200 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 外，其餘數值均落在 226 及 968 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 內。

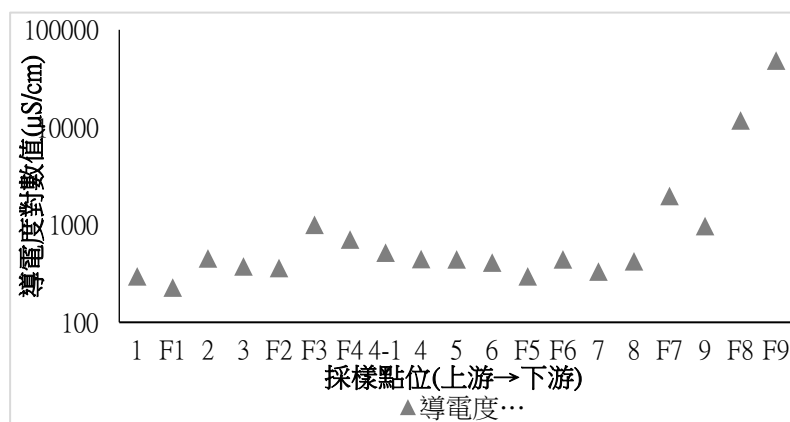


圖 4-2 河川水樣導電度分布

葉綠素 a

圖 4-3 為葉綠素 a 分布，測得數值最大值為 15.44 $\mu\text{g/L}$ ，於大園區點位 F7 許厝港一號橋測得，最小值為 4.19 $\mu\text{g/L}$ ，於上游龍潭區燈潭橋點位 F1 測得。

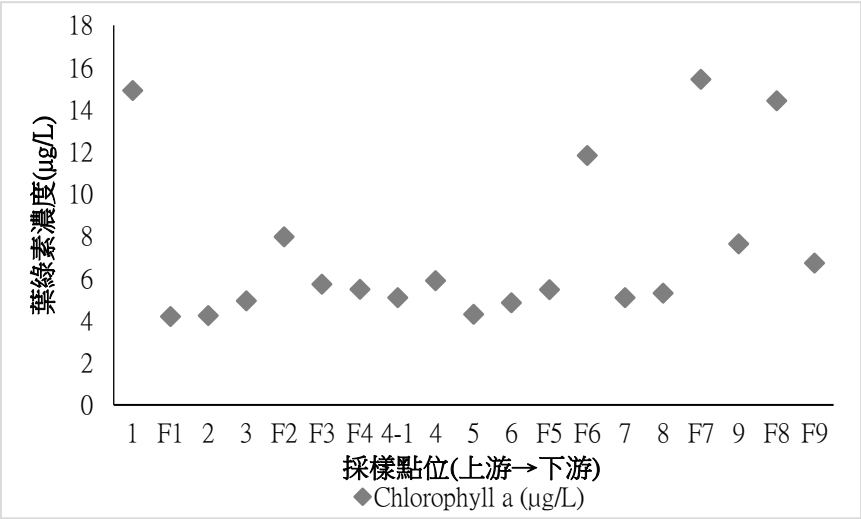


圖 4-3 河川水樣葉綠素 a 分布

4.2.2 實驗分析

實驗室分析項目有化學需氧量(COD)、總有機碳濃度(TOC)、硝酸氮(NO_3^- -N)、亞硝酸氮(NO_2^- -N)、氯離子(Cl^-)、磷酸根離子(PO_4^{3-})、硫酸根離子(SO_4^{2-})及多種金屬離子，下表 4-2 為河川水樣實驗碳元素、氮元素及陰離子分析數值。

表 4-2 河川水樣實驗分析數值 (單位：mg/L)

樣本名	TOC	COD	$\text{NH}_3\text{-N}$	$\text{NO}_2\text{-N}$	$\text{NO}_3\text{-N}$	TIN	Cl^-	PO_4^{3-}	SO_4^{2-}
1	6.98	36	1.268	0.214	1.513	2.995	54.771	< 0.001	33.396
F1	5.03	15	2.615	0.915	1.737	5.267	21.645	< 0.001	24.642
2	7.90	22	1.705	0.327	3.025	5.057	35.787	3.145	107.367
3	14.3	35	0.384	< 0.001	3.358	3.742	35.216	< 0.001	17.175
F2	3.44	12	< 0.01	< 0.001	1.496	1.496	32.583	< 0.001	113.67
F3	7.89	28	1.666	< 0.001	11.216	12.882	174.66	< 0.001	277.524
F4	6.87	23	2.820	0.582	0.603	4.005	107.66	< 0.001	204.179
4-1	31.2	53	1.972	< 0.001	6.159	8.131	88.237	< 0.001	119.184
4	6.26	27	2.143	< 0.001	5.753	7.895	61.572	< 0.001	107.893
5	8.47	25	1.351	1.099	6.014	8.464	62.524	< 0.001	125.059
6	6.51	48	1.259	< 0.001	4.897	6.156	49.098	< 0.001	94.438
F5	5.41	17	0.551	< 0.001	5.239	5.790	41.961	< 0.001	311.972
F6	4.33	24	< 0.01	< 0.001	1.084	1.083	30.842	< 0.001	86.674
7	5.01	23	0.564	< 0.001	3.507	4.070	36.621	11.036	84.278
8	6.12	22	< 0.01	< 0.001	5.075	5.081	41.910	11.099	128.285
F7	7.40	40	2.532	< 0.001	0.306	2.837	188.11	< 0.001	810.795
9	8.42	35	0.389	< 0.001	4.850	5.239	102.23	< 0.001	423.227
F8	7.36	208	1.552	< 0.001	< 0.001	1.552	2525.1	< 0.001	807.8
F9	1.23	432	< 0.01	< 0.001	< 0.001	< 0.001	21732	< 0.001	2838.2
平均數	7.90	59.21	1.199	0.165	3.465	4.829	1338.0	1.33	353.46
標準差	6.20	99.76	0.955	0.335	2.863	3.078	4970.8	3.51	645.27
最小值	1.23	12	< 0.01	< 0.001	< 0.001	< 0.001	21.645	< 0.001	17.18
最大值	31.2	432	2.820	1.099	11.216	12.882	21732	11.10	2838.20

總有機碳(TOC)及化學需氧量(COD)

河川水樣中 TOC 及 COD 分布如圖 4.4 主坐標軸為 TOC 數值，最大值為 31.2mg/L，最小值為 1.24 mg/L；副座標軸為 COD 數值，除靠近出海口的 F8 及 F9 採樣點外，COD 最大值為 53 mg/L，最小值為 12 mg/L。TOC 及 COD 趨勢一致，最濃度最高點均位於平鎮區環北橋採樣點 4-1，最低濃度點則位於平鎮區北勢橋之採樣點 F2。

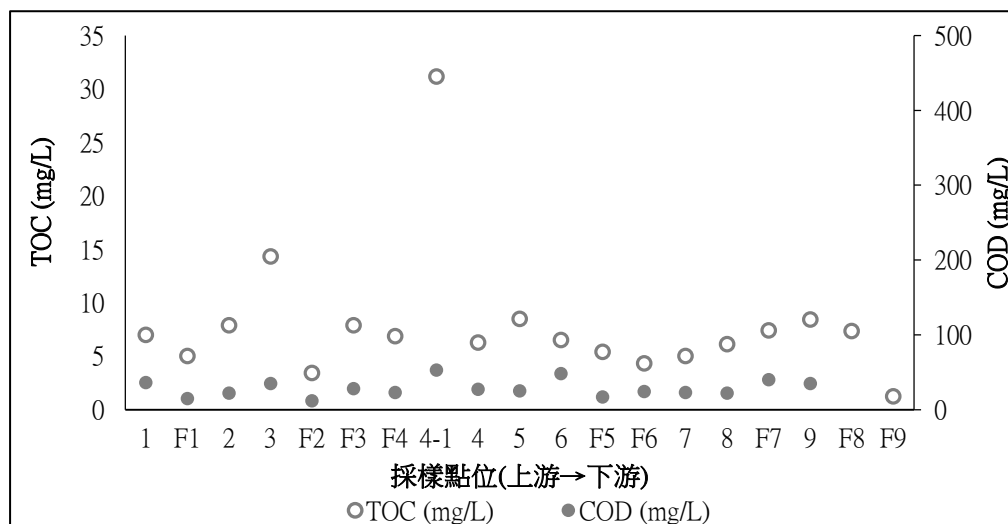


圖 4-4 河川水樣中 TOC 及 COD 分布

總無機氮 (Total Inorganic Nitrogen, TIN)

總無機氮為氨氮、硝酸氮及亞硝酸氮之總和。圖 4-5 為總無機氮分布，總無機氮最大值為 12.88 mg/L，最小測於 F9 點位測得低於 0.01 mg/L，以河川污染指數評估，多數點位之氨氮濃度介於 1 至 3 mg/L，於河川污染指標中，其氨氮項目分類為中度污染，於 F1、F4、F7 及 F8 點位氨氮濃度大於硝酸氮濃度，其餘點位皆呈硝酸氮濃度大於氨氮濃度。

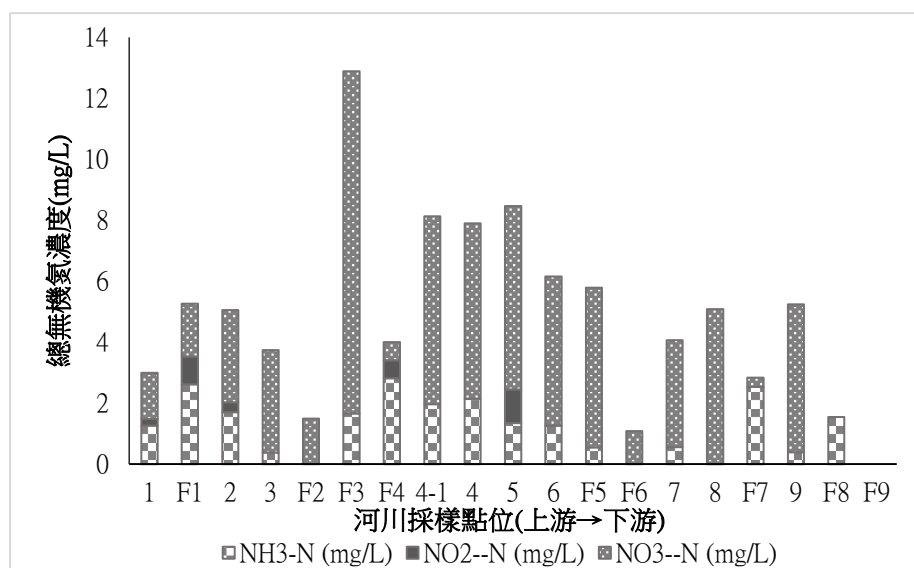


圖 4-5 河川水樣中 TIN 分布

硫酸根離子(SO_4^{2-})、氯離子(Cl^-)及磷酸根離子(PO_4^{3-})

河川水樣中陰離子分布如圖 4-6，縱座標軸以對數方式呈現，硫酸根離子最大值为 2,838 mg/L，最小值为 17.18 mg/L，氯離子最大值为 21,731 mg/L，最小值为 21.65 mg/L，硫酸根離子及氯離子越接近下游濃度越高，可能為接近出海口導致；磷酸根離子僅於採樣點 2、7 及 8 測得，最大值為 25.28 mg/L，最小值於為 11.10 mg/L。

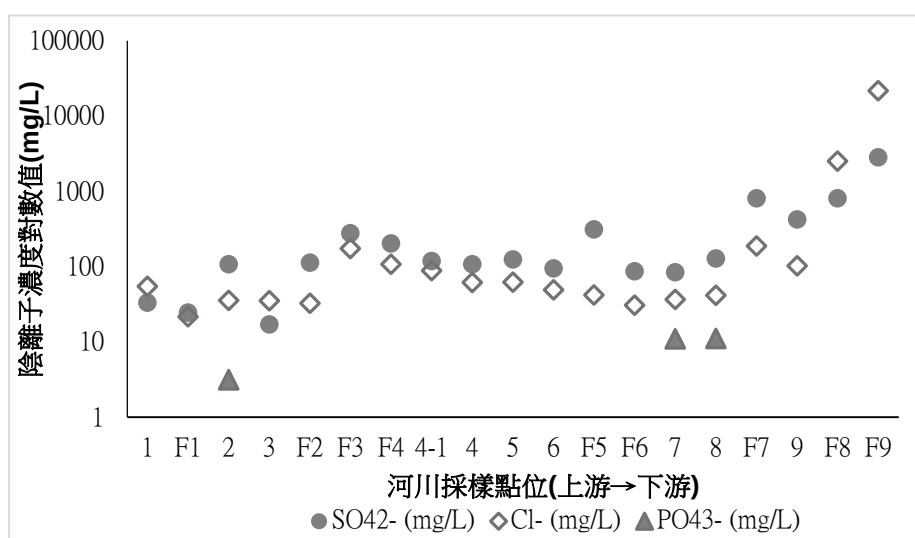


圖 4-6 河川水樣中陰離子分布

重金屬

以 ICP 儀器偵測重金屬在河川中濃度(詳如表 4.3)，其中銀(Ag)及鎘(Cd)等 2 種重金屬在河川水樣中濃度均小於 0.01 mg/L；銅濃度介於小於 0.010 至 0.088 mg/L，而錳濃度範圍介於小於 0.010 至 0.130 mg/L，多數點位測值偏高；另外，各金屬濃度最高值多出現於老街溪下游點位，許厝港一號橋點位(F7)測得鐵(Fe)、錳(Mn)及鋅(Zn)濃度為所有採樣點中最高值。

對照環保署全國水質資訊網資料，2017 年度 1 月至 9 月份老街溪流域 7 個測站之測值，除了銀濃度於 9 月 6 日平鎮一號橋測站測得 0.002 mg/L 數值外，銀及鎘測值均小於 0.001 mg/L；銅濃度測值落於 0.002 到 0.098 mg/L，平均值為 0.027 ± 0.028 mg/L，錳濃度測值落於 0.014 至 0.488 mg/L 間，下游銅濃度高於上游；鉛濃度落於 0.003 至 0.020 mg/L，鋅濃度落於 0.012 至 0.421 mg/L。整體來說，水質資訊網資料範圍和本計畫測得數值趨勢相符。

表 4-3 河川水樣重金屬濃度 (單位：mg/L)

樣本名	銀(Ag)	鎘(Cd)	鋁(Al)	錳(Mn)	鐵(Fe)	鉛(Pb)	鋅(Zn)	銅(Cu)
1	<0.01	<0.01	0.329	0.041	0.458	<0.01	0.061	<0.01
F1	<0.01	<0.01	0.113	0.013	0.218	<0.01	0.022	0.005
2	<0.01	<0.01	0.338	0.056	0.419	0.012	0.033	0.032
3	<0.01	<0.01	0.216	0.028	0.391	0.012	0.034	0.019
F2	<0.01	<0.01	0.317	0.034	0.402	0.011	0.024	0.013
F3	<0.01	<0.01	1.363	0.129	1.110	0.020	0.103	0.088
F4	<0.01	<0.01	0.223	0.057	0.350	0.012	0.054	0.035
4-1	<0.01	<0.01	0.305	0.068	0.431	0.018	0.037	0.016
4	<0.01	<0.01	0.523	0.089	0.696	0.020	0.054	0.024
5	<0.01	<0.01	0.345	0.116	0.782	0.017	0.078	0.043
6	<0.01	<0.01	0.378	0.112	0.673	0.016	0.031	0.017
F5	<0.01	<0.01	0.278	0.068	0.298	<0.01	0.114	0.036
F6	<0.01	<0.01	0.314	0.033	0.241	<0.01	0.056	0.010
7	<0.01	<0.01	0.385	0.042	0.340	0.014	0.035	0.018
8	<0.01	<0.01	0.446	0.043	0.404	0.011	0.022	0.014
F7	<0.01	<0.01	1.198	0.130	1.950	0.011	0.222	0.051
9	<0.01	<0.01	0.507	0.097	0.582	<0.01	0.107	0.021
F8	<0.01	<0.01	0.028	0.024	0.028	<0.01	<0.01	<0.01
F9	<0.01	<0.01	0.293	<0.01	0.326	<0.01	0.011	<0.01
平均數	<0.01	<0.01	0.416	0.062	0.531	0.009	0.058	0.023
標準差	-	-	0.328	0.040	0.418	0.008	0.051	0.021
最小值	<0.01	<0.01	0.028	<0.01	0.028	<0.01	<0.01	<0.01
最大值	<0.01	<0.01	1.363	0.130	1.950	0.020	0.222	0.088

註：測值加底框者為個別金屬最高濃度出現點位。

4.2.3 河川水樣中微生物

使用 QIAGEN 公司之 DNeasy PowerWater Kit 抽取河水樣本中微生物 DNA，DNA 濃度如表 4-4。過濾在 PES 濾膜上水量均為 250 mL，DNA 濃度最高者採樣於平鎮區南華橋 3 號點位，濃度最低者位於大園鄉出海口大園石蚵 F9 點位，如圖 4-7 顯示。

表 4-4 河川水樣中微生物 DNA 濃度

樣本名	過濾水樣 (mL)	DNA 濃度(ng/μL)
1	250	115.1
F1	250	24.03
2	250	40.25
3	250	127.1
F2	250	46.73
F3	250	82.71
F4	250	70.44
4-1	250	53.93
4	250	77.81
5	250	78.84
6	250	49.19
F5	250	34.19
F6	250	38.56
7	250	25.02
8	250	26.54
F7	250	95.37
9	250	58.09
F8	250	85.36
F9	250	6.810
平均數		67.22
標準差		39.73
最小值		6.810
最大值		127.1

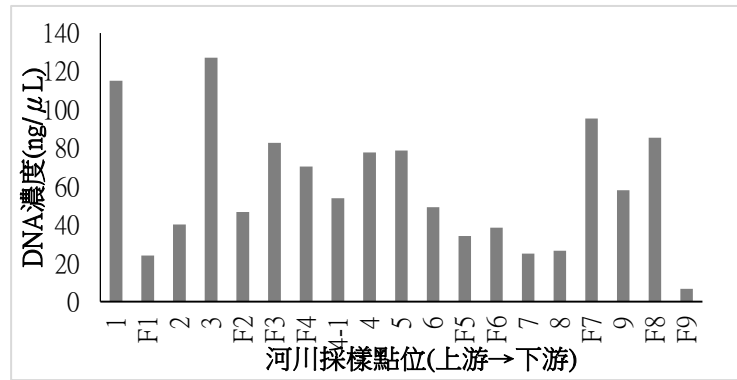


圖 4-7 河川水樣中微生物 DNA 濃度

以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(1/2)

4.3 工廠放流水

4.3.1 現地量測

現地量測數值包括溫度、pH、溶氧量及導電度，各採樣點數值如表 4-5。

表 4-5 工廠放流水現地量測數值

樣本名	工廠別	溫度(°C)	pH	溶氧量(mg/L)	導電度 (μS/cm)
F10	光電科技工廠	29.2	7.39	6.22	1187
F11	合成纖維工廠	31.8	7.33	5.4	990
F12	電腦工廠	30.9	7.46	7.23	5950
F13	精密工業工廠	30	7.38	7.3	2157
F14	皮革製品廠	32	7.50	4.71	10940
F15	工業區污水廠	32.8	7.13	6.81	3940
平均數		31.1	7.37	6.28	41940
標準差		1.3	0.13	1.05	3798
最小值		32.8	7.13	4.71	990
最大值		29.2	7.50	7.30	10940
基準值		38°C	6.0-9.0	-	-

註：基準值參照「放流水標準」附表一

pH 及溶氧量

圖 4.8 為工廠放流水 pH 及溶氧量，測得工廠放流水的 pH 介於 7.13 到 7.5 間，符合法規標準 pH 於 6.0 至 9.0 區間，溶氧量於 4.71 至 7.23 mg/L 間。

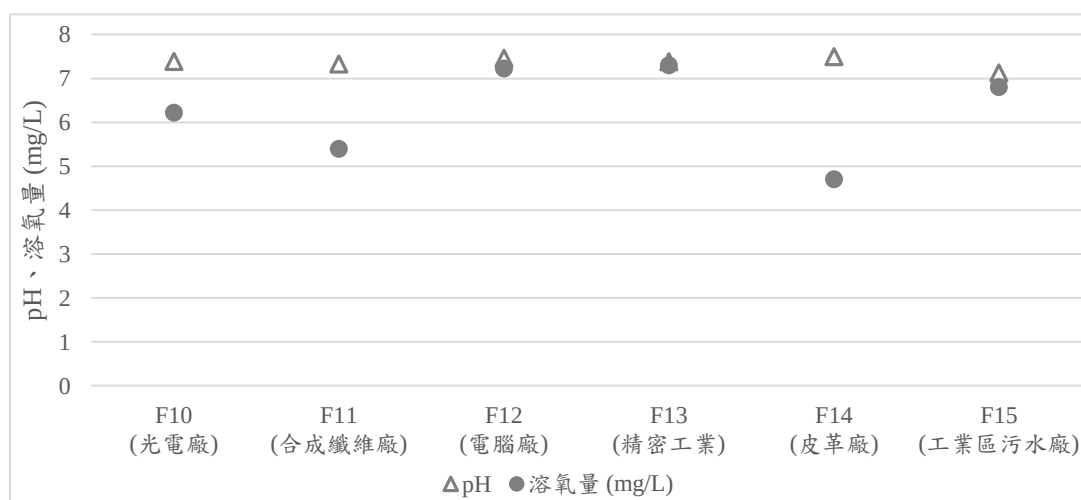


圖 4-8 工廠放流水 pH 及溶氧量

導電度

工廠放流水導電度分布如圖 4.9，最小值為 990 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 於 F11 合成纖維工廠測得，最大值為 10,940 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 落於點位 F14 皮革製品工廠。

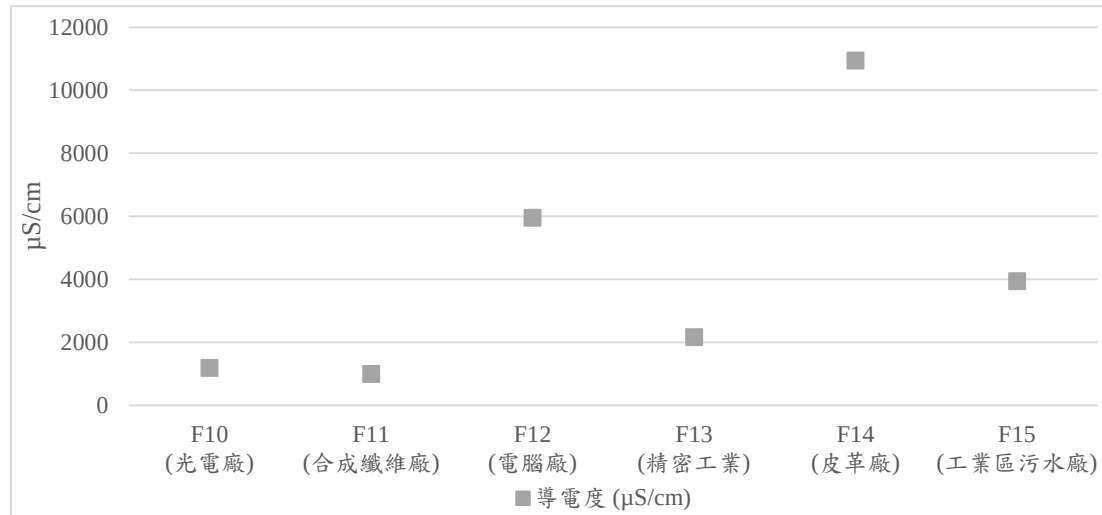


圖 4-9 工廠放流水導電度

4.3.2 實驗分析

實驗室分析項目有化學需氧量(COD)、總有機碳濃度(TOC)、硝酸根離子(NO_3^-)、亞硝酸根離子(NO_2^-)、氯離子(Cl^-)、硫酸根離子(SO_4^{2-})、磷酸根離子(PO_4^{3-})及多種金屬離子，下表 4-6 為工廠放流水樣實驗分析數值。

表 4-6 工廠放流水測值 (單位：mg/L)

樣本名	COD	TOC	$\text{NH}_3\text{-N}$	$\text{NO}_2^-\text{-N}$	$\text{NO}_3^-\text{-N}$	TIN	Cl^-	PO_4^{3-}	SO_4^{2-}
F10 (光電廠)	44	11.14	0.120	< 0.001	< 0.001	0.12	< 0.001	< 0.001	578.9
F11 (合成纖維 廠)	14	4.200	0.030	< 0.001	< 0.001	0.03	1.000	< 0.001	30.20
F12 (電腦廠)	83	15.14	2.910	< 0.001	< 0.001	2.91	289.4	< 0.001	2202
F13 (精密工業)	12	2.770	0.640	< 0.001	< 0.001	0.64	282.4	< 0.001	513.8
F14 (皮革廠)	720	214.8	174.4	< 0.001	< 0.001	174.4	2683	< 0.001	3390
F15 (工業區污水 廠)	84	16.84	29.26	< 0.001	93.403	122.7	575.9	< 0.001	4999
平均數	160	44.14	34.56	< 0.001	15.567	50.13	638.7	< 0.001	1952
標準差	276	83.78	69.45	0	38.132	77.97	1025	0	1953
最小值	12	2.770	0.030	< 0.001	< 0.001	0.03	< 0.001	< 0.001	30.20
最大值	720	214.8	174.4	< 0.001	93.403	174.4	2683	< 0.001	4999

總有機碳(TOC)及化學需氧量(COD)

圖 4-10 為工廠放流水 TOC 及 COD 數值，主坐標軸為 TOC 數值，最大值為 214.76 mg/L，副座標軸為 COD 數值，最大值為 720 mg/L，TOD 與 COD 數值趨勢一致，兩指標最高值均落於點位 F14 皮革製品工廠。

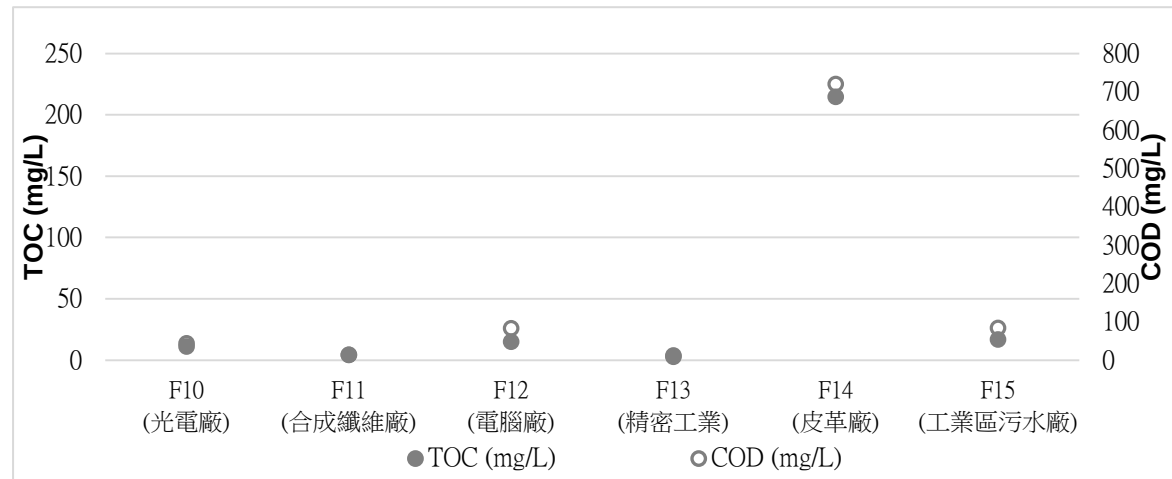
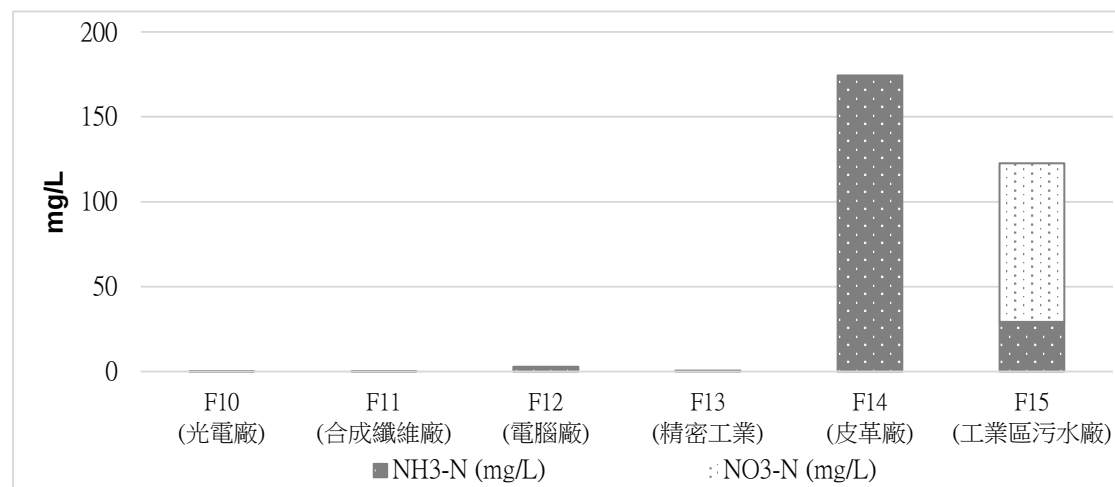


圖 4-10 工廠放流水 TOC 及 COD 數值

總無機氮 (TIN)

總無機氮為氨氮、硝酸氮及亞硝酸氮之總和。圖 4-11 為工業放流水總無機氮分布，除了 F15 工業區污水處理廠測得硝酸氮之外，其餘幾乎無法測得硝酸氮及亞硝酸氮濃度；氨氮部分則以 F14 皮革製品廠出流水濃度 174 mg/L 為最高，點位 F15 工業區污水處理廠測得數值 29.26 mg/L 次之。

圖 4-11 工廠放流水 TIN 數值



硫酸根離子(SO_4^{2-})、磷酸根離子(PO_4^{3-})及氯離子(Cl^-)

工廠放流水陰離子數值分布如圖 4-12，硫酸根離子濃度最高者發生於點位 F15 工業區污水處理廠，濃度高達 4,999 mg/L；氯離子濃度於 F14 皮革製品廠放流水測得，最高濃度達 2,683 mg/L；磷酸根於各點位濃度均小於 0.001 mg/L。

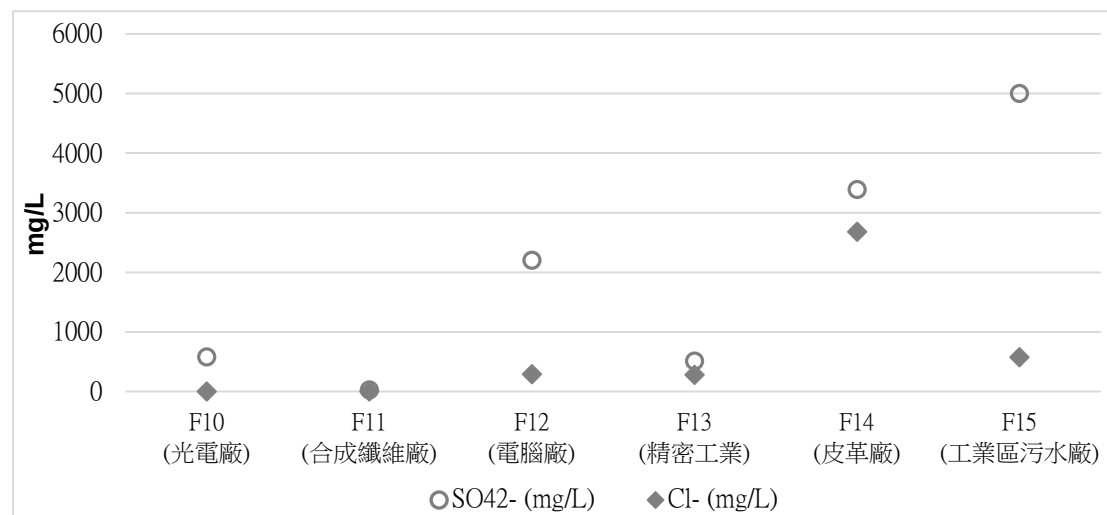


圖 4-12 工廠放流水陰離子數值

重金屬

以 ICP 儀器偵測重金屬在放流水中濃度(詳如附表 4-6)，其中銀(Ag) 及鎘(Cd) 等 2 種重金屬在放流水中濃度均小於 0.01 mg/L；另有光電廠(F10)及精密工業廠(F13)點位之硼(B)濃度值偏高。

表 4-7 工廠放流水樣重金屬濃度 (單位：mg/L)

樣本名	銀(Ag)	鎘(Cd)	鉻(Cr)	錳(Mn)	鐵(Fe)	硼(B)	鉛(Pb)	鋅(Zn)	銅(Cu)
F10 (光電廠)	<0.01	<0.01	<0.01	0.132	<0.01	6.696	<0.01	2.415	0.074
F11 (合成纖維廠)	<0.01	<0.01	<0.01	0.202	<0.01	0.285	<0.01	0.046	<0.01
F12 (電腦廠)	<0.01	<0.01	<0.01	0.132	<0.01	0.250	0.017	0.039	0.738
F13 (精密工業)	<0.01	<0.01	0.028	0.137	0.028	2.150	<0.01	0.025	0.069
F14 (皮革廠)	<0.01	<0.01	0.214	0.174	0.214	0.305	<0.01	0.024	0.012
F15 (工業區污水廠)	<0.01	<0.01	<0.01	0.032	<0.01	0.157	0.011	<0.01	<0.01
平均數	<0.01	<0.01	0.040	0.098	0.135	1.641	0.005	0.425	0.149
標準差	0	0	0.086	0.146	0.058	2.591	0.008	0.975	0.291
最小值	<0.01	<0.01	<0.01	0.032	<0.01	0.157	<0.01	<0.01	<0.01
最大值	<0.01	<0.01	0.214	0.202	0.214	6.696	0.017	2.415	0.738

註：測值加底框者為個別金屬最高濃度出現點位。

4.3.3 工廠放流水中微生物

使用 QIAGEN 公司之 DNeasy PowerWater Kit 抽取放流水樣本中微生物 DNA，結果如表 4-8。過濾在 PES 濾膜上水量均為 250 mL，抽取之 DNA 濃度範圍為 123.08 至 51.57 ng/μL 間，最高者為 F12 之電腦工廠，濃度最低者為 F11 之合成纖維廠，如圖 4-13 顯示。

表 4-8 工廠放流水微生物 DNA 濃度

樣本名	過濾水樣 (mL)	DNA 濃度(ng/μL)
F10(光電廠)	250	123.08
F11(合成纖維廠)	250	51.57
F12(電腦廠)	250	185.16
F13(精密工業)	250	53.23
F14(皮革廠)	250	52.87
F15(工業區污水廠)	250	78.54
平均數		90.74
標準差		53.82
最小值		51.57
最大值		185.16

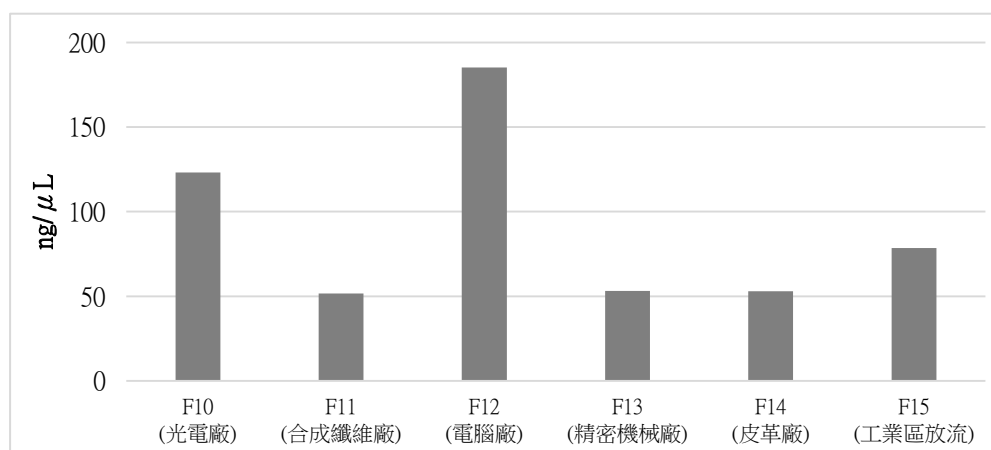


圖 4-13 工廠放流水微生物 DNA 濃度

4.4 底泥

4.4.1 物理化學性質

pH 及導電度

底泥 pH 及導電度分布如表 4-9 及圖 4-14，將土壤樣品 20 g 與試劑水 20 mL 混合後，經沉澱離心後之上清液，以電極法測 pH 及導電度。底泥 pH 介於 6.03 至 6.96 間；導電度數值介於 366 至 12,360 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 間。

表 4-9 底泥 pH 及導電度分布

樣本名	溫度($^{\circ}\text{C}$)	pH	導電度 ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
1	26.2	6.03	2,910
2	26	6.19	537
3	26.1	6.22	1,097
F2	25.8	6.66	900
F3	26	6.61	1,771
F4	25.9	6.62	366
4-1	25.9	6.38	367
F5	26	6.67	1,639
F6	26.1	6.55	848
7	26.2	6.73	1,216
F7	25.8	6.30	1,571
F8	26.1	6.75	6,210
F9	26.2	6.96	12,360
平均數	26.0	6.51	2,446
標準差	0.1	0.27	3,355
最小值	25.8	6.03	366
最大值	26.2	6.96	12,360

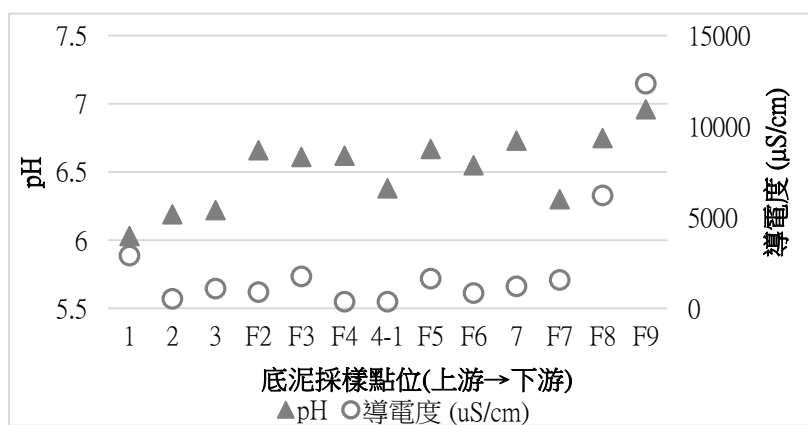


圖 4-14 底泥 pH 及導電度分布

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 4.9。
其中銅(Cu)、鋅(Zn)及鉛(Pb)部分樣本測值偏高，而鋁(Al)、鋅(Zn)及銅(Cu)等 3
種重金屬之濃度最高點位，則集中於大園區許厝港一號橋點位(F7)測得。

參考行政院環境保護署全國環境水質監測資訊網 2008 至 2009 年河川整體
調查結果，報告內容包括平鎮區北勢橋、中壢區中正橋及大園區許厝港一號橋
之底泥重金屬含量，許厝港一號橋點位之鋁鋅銅濃度亦是所有調查點位中最
高者，該點位測得鋁濃度範圍為 17,500 至 32,100 mg/kg、鋅濃度範圍為 981 至
9,940 mg/kg 及銅濃度範圍為 834 至 2,490 mg/kg。

表 4-10 底泥重金屬含量(單位：mg/kg)

樣本名	重量(g)	含水量(%)	鎘(Cd)	鉻(Cr)	鋁(Al)	錳(Mn)	鐵(Fe)	鉛(Pb)	鋅(Zn)	銅(Cu)
1	0.272	0.262	ND	55.4	1.53E+04	302	1.56E+04	41.1	288	40
2	0.266	0.257	ND	137	1.86E+04	424	2.60E+04	67.7	425	353
3	0.261	0.298	ND	70.8	2.77E+04	494	2.25E+04	47.2	407	291
F2	0.282	0.275	ND	35.1	6.17E+03	284	1.01E+04	50.2	329	271
F3	0.262	0.573	ND	111	2.96E+04	503	2.47E+04	283	833	369
F4	0.274	0.240	ND	81.4	2.63E+04	565	3.22E+04	172	707	414
4-1	0.269	0.305	ND	24.3	5.93E+03	310	7.60E+03	64.8	362	93
F5	0.261	2.532	ND	68.0	4.38E+04	1850	2.85E+04	99.9	989	539
F6	0.274	0.289	ND	40.4	1.08E+04	428	1.42E+04	49.3	320	73.5
7	0.266	0.508	ND	89.0	2.80E+04	717	2.71E+04	66.6	713	485
F7	0.269	1.765	ND	88.1	4.40E+04	988	3.76E+04	67.6	2557	573
F8	0.260	1.429	ND	62.5	3.75E+04	752	4.09E+04	34.6	383	362
F9	0.266	0.356	ND	63.2	2.29E+04	722	4.81E+04	34.5	123	23
平均數	0.268	0.699		71.2	2.44E+04	6.42E+02	2.58E+04	83.0	649	299
標準差	0.006	0.734		30.8	1.28E+04	4.19E+03	1.21E+04	70.3	624	189
最小值	0.260	0.240	ND	24.3	5.93E+03	2.84E+02	7.60E+03	34.5	123	23.0
最大值	0.282	2.532	ND	137	4.40E+04	1.85E+03	4.81E+04	283	2557	573

註：測值加底框者為個別金屬最高濃度出現點位。

元素分析

底泥經元素分析儀測得碳、氮、硫及氫之重量百分比，結果如表 4-11 及圖 4.15，碳、氮、硫及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，碳氮硫氫重量百分比總和由 0.6910 %至 14.8225 %，最高者落於中壢區公園橋 F5 點位，其次為大園區許厝港一號橋 F7 點位。

表 4-11 底泥 CNSH 元素重量百分比

樣本名	重量(mg)	C %	N %	S %	H %	total CNSH 百分比 (%)
1	8.5185	0.5035	0.0905	0.1895	0.4535	1.2370
2	9.0805	0.1805	0.0665	0.0905	0.4215	0.7590
3	8.7220	0.3345	0.0735	0.0975	0.4095	0.9150
F2	9.6860	0.5395	0.0975	0.0530	0.4110	1.1010
F3	9.1710	1.3995	0.2175	0.1445	0.5525	2.3140
F4	9.2745	0.2545	0.0550	0.0340	0.3475	0.6910
4-1	9.0965	0.2760	0.0735	0.0300	0.3665	0.7460
F5	8.4055	10.059	2.0150	0.5980	2.1510	14.823
F6	9.4665	0.2980	0.0725	0.0680	0.4405	0.8790
7	8.7195	2.6165	0.2525	0.1345	0.6470	3.6505
F7	9.1145	8.6205	1.1485	0.5800	1.7515	12.101
F8	8.5195	2.2605	0.2390	0.4700	0.7795	3.7490
F9	9.2985	0.3035	0.0555	0.0635	0.4835	0.9060
平均數	9.0056	2.1266	0.3428	0.1964	0.7088	3.3747
標準差	0.3961	3.3119	0.5819	0.2081	0.5699	4.6332
最小值	8.4055	0.1805	0.0550	0.0300	0.3475	0.6910
最大值	9.6860	10.059	2.0150	0.5980	2.1510	14.823

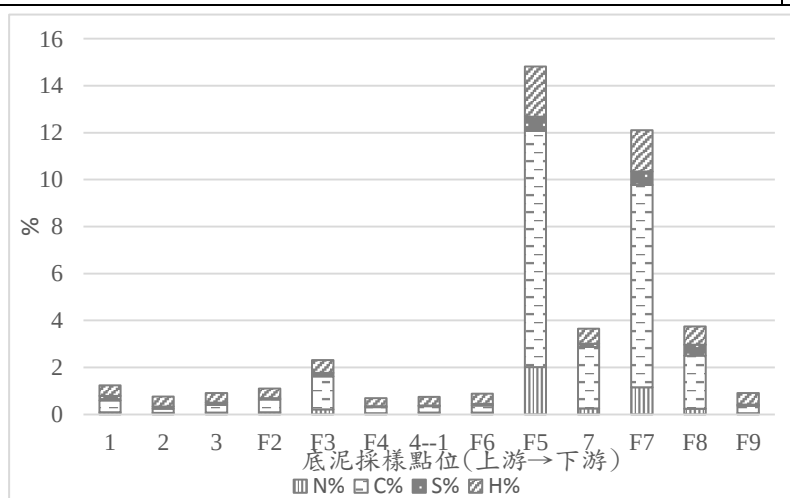


圖 4-15 底泥 CNSH 元素組成

粒徑分布

將採樣底泥風乾後，以 105 °C 烘乾後以雷射粒徑分析儀分析粒徑，底泥粒徑分布統計如表 4-12，體積累計百分比如圖 4-16。小粒徑比表面積大，提供較多空間予微生物生長，平均粒徑最大者測得於中壢區中正橋點位(F6)，平均粒徑最小者測得於上游龍潭區國驕橋點位(1)。

表 4-12 底泥粒徑分布表

樣本名	體積累計百分比粒徑 (μm)					平均值 (μm)	眾數 (μm)
	<10%	<25%	<50%	<75%	<90%		
1	1.221	3.369	9.221	25.24	52.01	17.98	7.775
2	22.64	255	480.9	745.1	1042	531.5	623.3
3	31.4	299.2	478	678.3	967.3	532.6	567.7
F2	2.753	6.737	16.41	37.39	68.95	26.06	18
F3	15.71	73.94	135.8	251.5	485.6	196.4	127.6
F4	113.1	301.8	450.4	646.7	866.6	485.8	471.1
4-1	1.856	4.257	11.58	35.32	63.34	22.71	50.22
F5	5.83	14.09	40.25	112.1	198.3	70.6	223.4
F6	199.9	302.9	447	675.3	990.2	530.1	429.2
7	183.2	289.4	411.4	583.7	786.2	462.5	390.9
F7	6.571	22.18	71.96	162.7	206.2	93.3	185.4
F8	4.985	13.71	44.5	139.1	167	73.31	153.8
F9	181.6	221.5	278.1	353.8	448.3	301.9	269.2

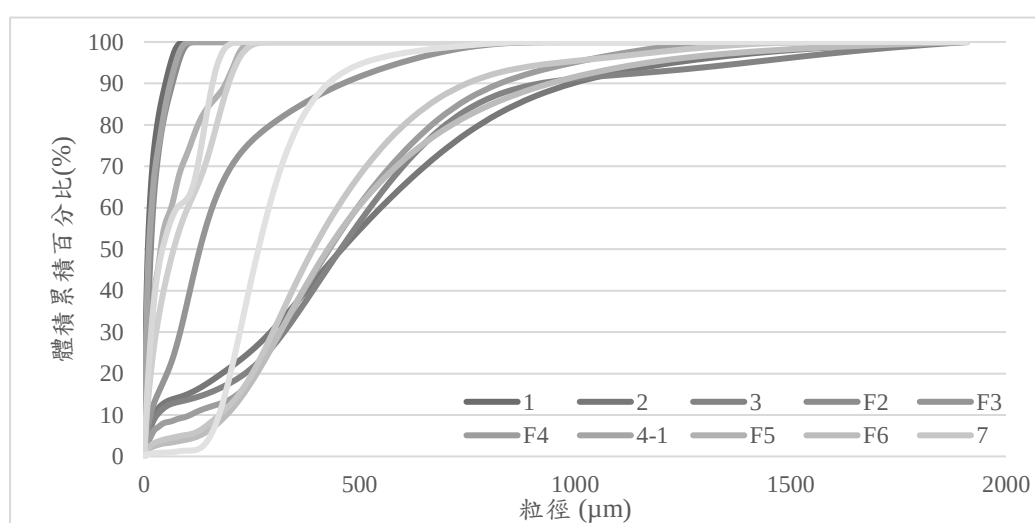


圖 4-16 底泥粒徑體積累計百分比分布圖
(深色線為上游，淺色線為下游)

4.4.2 底泥中微生物

使用 QIAGEN 公司之 DNeasy PowerSoil Kit 抽取底泥樣本中微生物 DNA，結果如表 4-13 及圖 4-17。量測 0.25 g 底泥抽取 DNA，抽取之 DNA 濃度範圍為 4.12 至 150.3 ng/μL 間，最高者為大園區許厝港一號橋點位(F7)，最低者為平鎮區環鄉橋點位(F4)。

表 4-13 底泥中微生物 DNA 濃度

樣本名	底泥重量 (g)	ng/μL
1	0.25	25.20
2	0.25	14.94
3	0.25	18.06
F2	0.25	31.37
F3	0.25	56.27
F4	0.25	4.120
4-1	0.25	8.030
F6	0.25	18.40
F5	0.25	118.879
7	0.25	78.57
F7	0.25	150.126
F8	0.25	82.34
F9	0.25	6.48
平均數		47.14
標準差		47.04
最小值		4.120
最大值		150.126

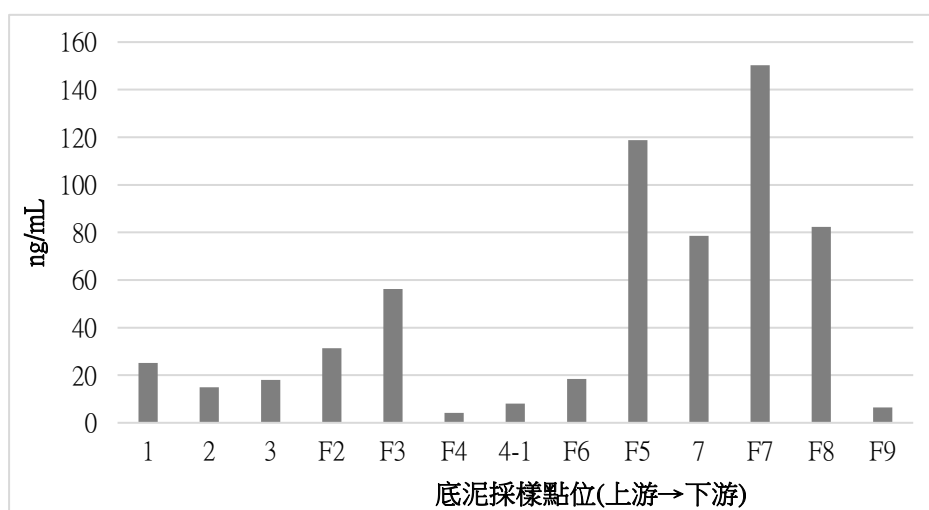


圖 4-17 底泥中微生物 DNA 濃度

4.5 反應槽

4.5.1 進出流水質

pH 值、導電度、濁度

pH 值部分未添加硫酸銅之空白組維持在 7 左右(圖 4-18)，出流之 pH 值微高於進流之 pH 值。而添加硫酸銅的三組進出流皆為弱酸性，並隨著添加劑量的增加其進出流之 pH 值越接近 5。

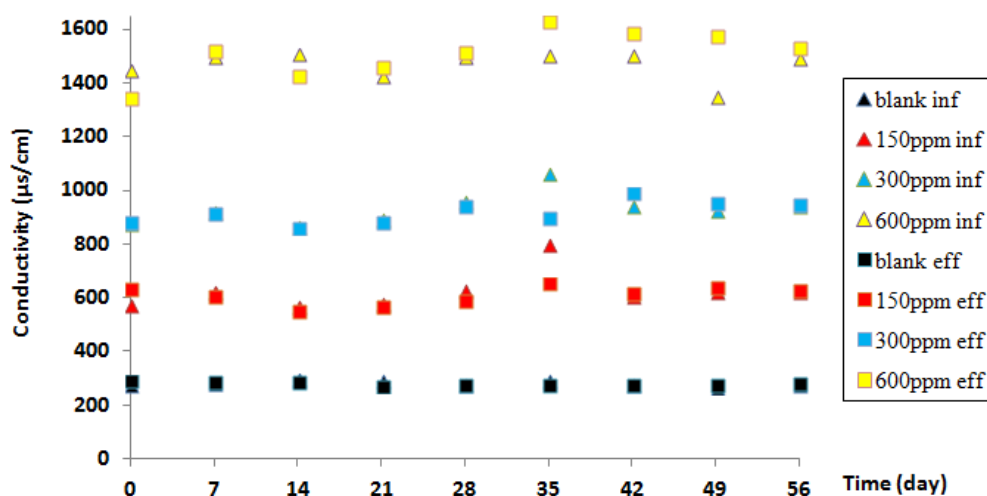


圖 4-18 反應槽之進出流 pH 隨時間(day)變化圖

而導電度部分(圖 4-19)，空白組之進出流導電度皆約為 280 μ s/cm 左右。隨著硫酸銅添加量的增加，其導電度也跟著增加，於 600ppm 銅添加量時可達到 1500 μ s/cm 左右。

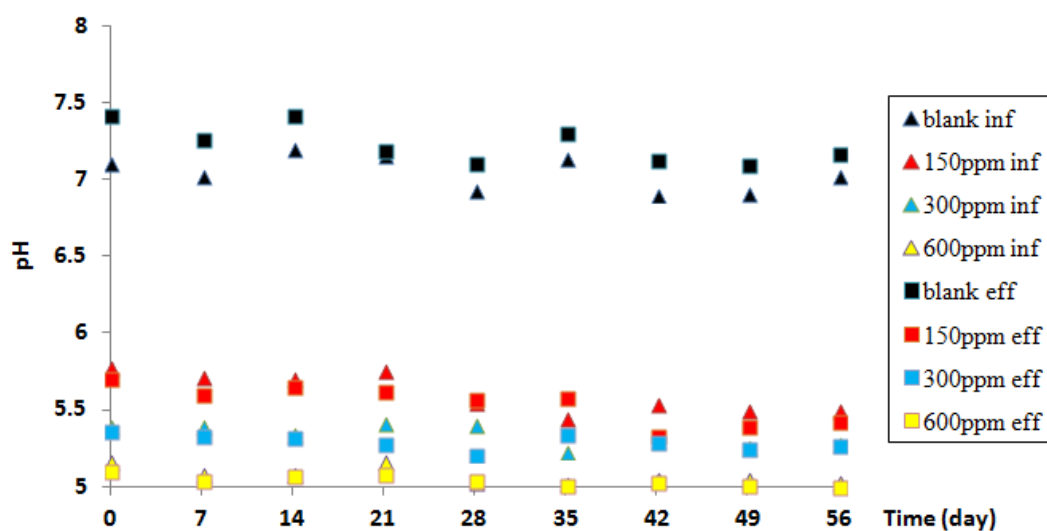


圖 4-19 反應槽之進出流導電度($\mu\text{s/cm}$)隨時間(day)變化圖

比較各組濁度測量值時，發現添加硫酸銅的三組其進流之濁度相較於空白組提升(圖 4-20)，然而三組出流之濁度皆小於其進流甚至接近於 0NTU。從測量結果來看，硫酸銅的添加似乎會增加水樣的濁度，並且經過反應槽後又使得濁度降低。

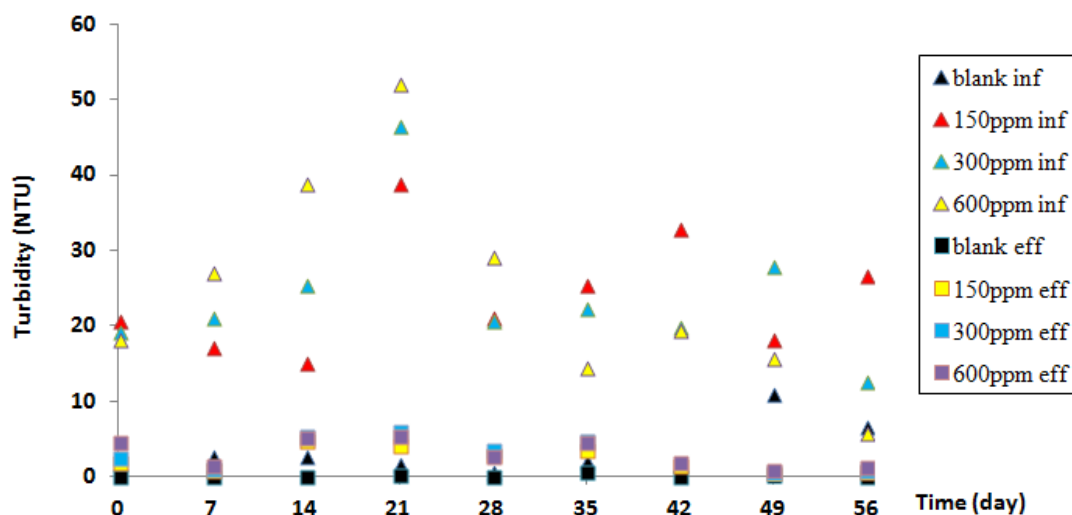


圖 4-20 反應槽之進出流濁度(NTU)隨時間(day)變化圖

總有機碳

進出流的總有機碳含量除了在第 0 天數值差異較大之外(圖 4-21)，之後的數值大約落在 2mg/L 至 5mg/L 之間。從整體來看，進出流的總有機碳含量與是否添加硫酸銅似乎無太大關係。

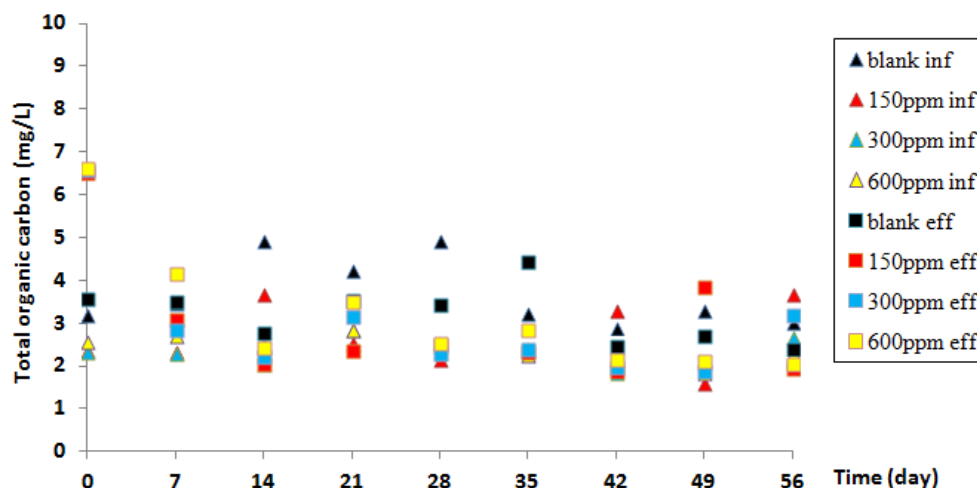


圖 4-21 反應槽之進出流總有機碳(mg/L)隨時間(day)變化圖

銅濃度

空白組的進出流銅濃度比起其它有添加硫酸銅的三組進趨於零(圖 4-22)。而三組添加硫酸銅的進出流銅濃度，幾乎都略小於實驗設計所添加的銅濃度。在實驗時間內進出流濃度變化較小。

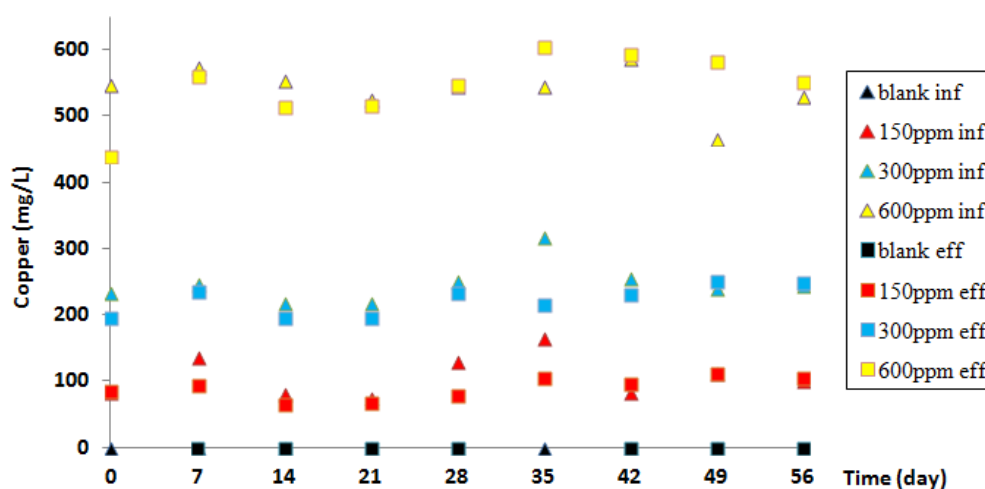


圖 4-22 反應槽之進出流銅濃度(mg/L)隨時間(day)變化圖

硫酸鹽

空白組進出流的硫酸根濃度皆為 30mg/L 左右(圖 4-23)，且隨著加入的硫酸銅增加，其進出流的硫酸根濃度也跟著增加。

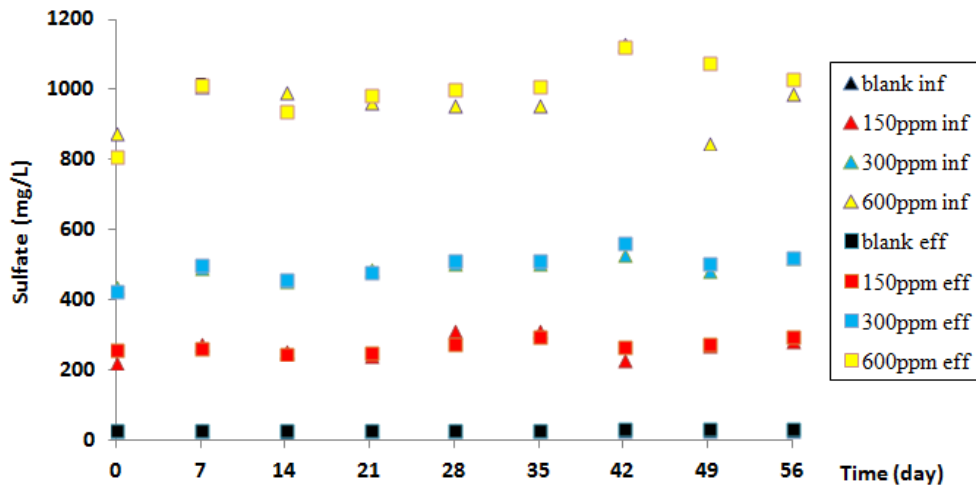


圖 4-23 反應槽之進出流硫酸根濃度(mg/L)隨時間(day)變化圖

氨氮

空白組出流的氨氮濃度幾乎一直維持在 0mg/L 左右(圖 4-24)，不隨著入流的氨氮濃度起伏而有所變化。然而其它添加硫酸銅的三組其出流濃度卻隨著入流的濃度而有所變化，有時測得的氨氮濃度甚至比入流的濃度還高。從測量結果來看，加入了硫酸銅似乎會使得出流氨氮無法有明顯減少的現象產生。

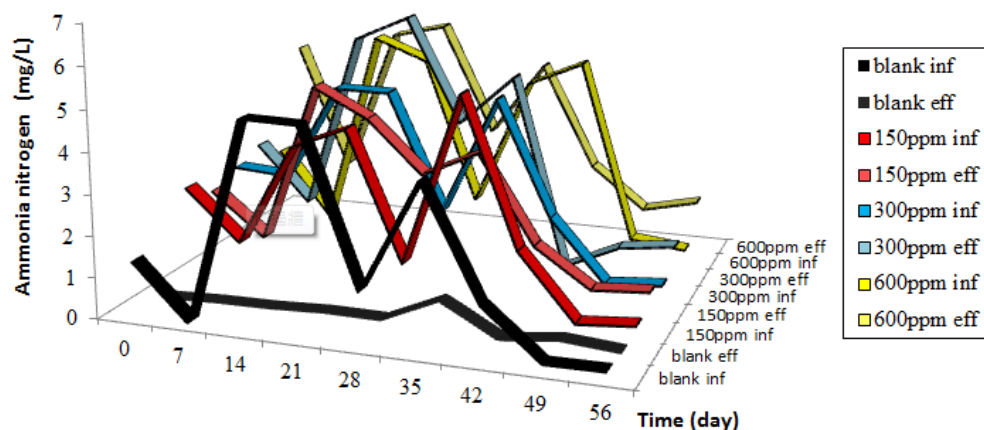


圖 4-24 反應槽之進出流氨氮濃度(mg/L)隨時間(day)變化圖

正磷酸鹽

不論是空白組還是添加硫酸銅的三組，其進出流正磷酸鹽濃度幾乎皆小於 2mg/L 以下(圖 4-25)。整體來看添加硫酸銅似乎跟進出流的正磷酸鹽濃度沒有太大關係。

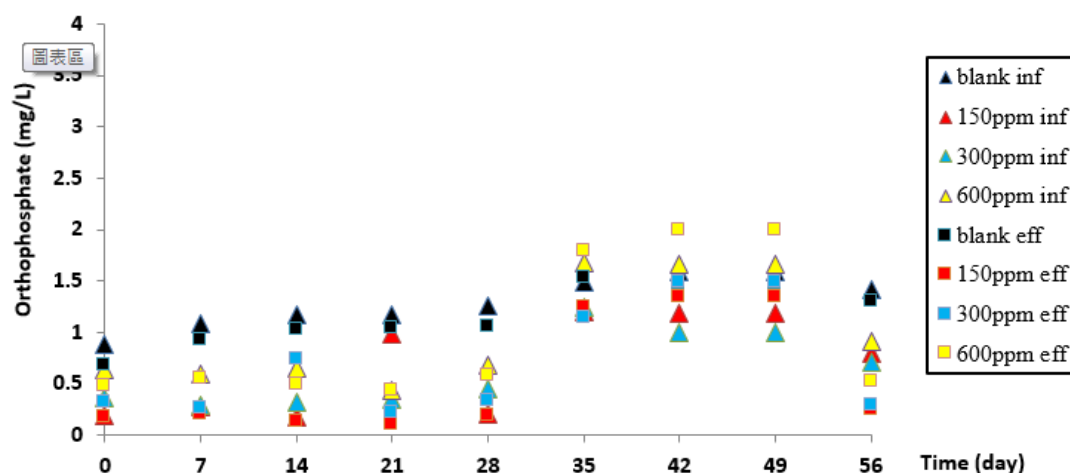


圖 4-25 反應槽之進出流正磷酸鹽濃度(mg/L)隨時間(day)變化圖

4.5.2 底泥

銅濃度

空白組底泥的銅濃度皆為 100mg/L 左右(圖 4-26)，相對添加硫酸銅於進出流的其它三組而言濃度非常小。150ppm 這組銅濃度從第 14 天 470mg/kg 左右持續增加，到第 56 天增加到 2380mg/kg 左右；300ppm 這組在第 14 天銅濃度達到約 800mg/kg，在第 28 天似乎無增長，然而第 56 天增加到 2800mg/kg 左右；而 600ppm 這組第 14 天銅濃度即達到約 2830mg/kg，第 28 天一樣似乎無增加甚至略為減少，至第 56 天時增加到 3560 mg/kg 左右，但是比起 150ppm 和 300ppm 兩組其增加幅度稍微有限。整體來看硫酸銅於進出流的添加，使得底泥的銅濃度跟著上升。

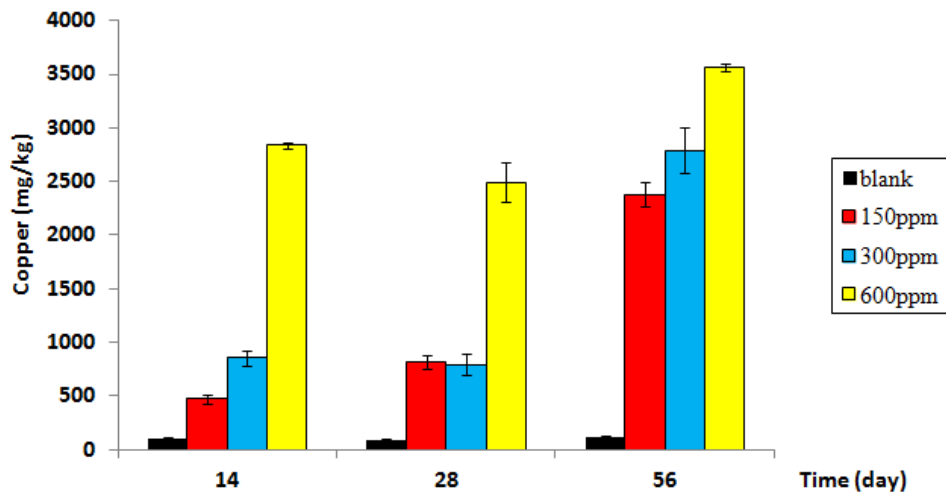


圖 4-26 反應槽之底泥銅濃度(mg/L)於三次採樣時間比較圖

有機質含量

不論是空白組還是在進出流添加硫酸銅的其它三組，其有機質含量彼此之間無太大差別(圖 4-27)，也無隨著時間而有明顯增加或減少的變化。整體的有機質含量約落在 1.9%至 2.6%之間。整體來看硫酸銅於進出流的添加，沒有對底泥的有機質含量有顯著的影響。

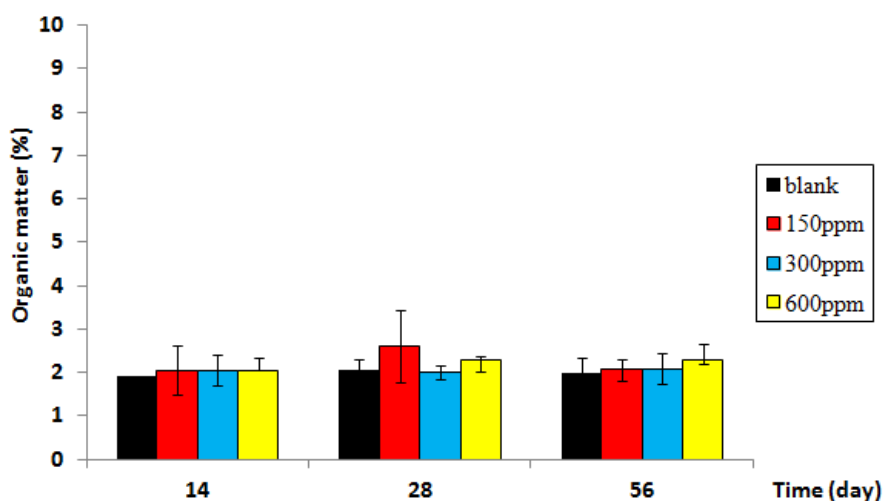


圖 4-27 反應槽之底泥有機質含量(%)於三次採樣時間比較圖

4.6 次世代定序

4.6.1 定序結果基本資料

以 Illumina Miseq 定序系統所得之原始高通量定序量為 25,510,424 條長度為 301 bases/read 的序列 (sequence reads)，相當於 12,755,212 總序列對(total read pairs)及 7,678,637,624 總核苷酸基(total nucleotide bases)，每一個樣品有 181,526 - 326,360 組序列對(read pairs)(圖 4-28a)。經過適配子(adapter)及引子(primer)序列的清除、序列品質篩檢(quality trimming)、及配對序列重組(merging of overlapping paired reads)等步驟，得到 11,195,439 條組裝序列(merged reads)，約佔原始定序量之 87.77%。

組裝序列(共 11,195,439 條)接著進一步進行 OTU(Operational taxonomic unit)分類 (clustering) 前的調整(包括 dereplication, singlet discarding, 和 chimera filtering) 後，共得到 38,973 個 OTUs，其中 99.1%的 OTUs 均屬於 bacteria，只有少部分 OTUs 屬於 archaea (圖 4-28b)。分類之 OTUs 的組裝序列的中位數長度(N50)為 422 bps (base pairs)，而最長組裝序列長度則為 551 bps，當序列對(read pairs)重疊 (overlapping)部分越少時所組裝之序列長度越長；此外，多數分類 OTUs 的組裝序列長度均落在 410 - 430 bps (圖 4-28c)，對於利用 16S rRNA 基因中 V3-V4 區間片段(PCR 放大區間為 341f-805r)作為菌種分類尚屬足夠。所有(50 個)樣品之序列共可分為 38,973 個 OTUs，其中共有 27,789 個 OTUs 可分為 47 門(phylum)，有 19,677 個 OTUs 可分為 76 綱(class)，有 14,269 個 OTUs 可分為 116 目(order)，有 11,340 個 OTUs 可分為 276 科(family)，有 11,138 個 OTUs 可分為 1,023 屬(genus)，各個樣品的序列數量皆足夠被分類至相當的 OTUs 數量接近該有的最大 OTUs 總數(圖 4-28d)。

如將所有 50 個樣品歸類為 4 種分組(包括現場底泥 soil、現場溪水 water、工廠放流水 factory_water、及實驗室連續流試驗 exam 等)，現場底泥及溪水樣品

有較多的 OTUs 數量，而工廠放流水則有最少之 OTUs 數量(7461 個)，樣品族群中的 OTUs 有一些程度的重疊性(OTUs)同時出現在兩種以上的樣品族群)(圖 4-29)，其中現場底泥、溪水樣品、及實驗室試驗底泥的 OTUs 重疊相對較高(6775 種)OTUs，由於實驗室試驗底泥乃以現場底泥殖種，因而具有較多共同 OTUs。

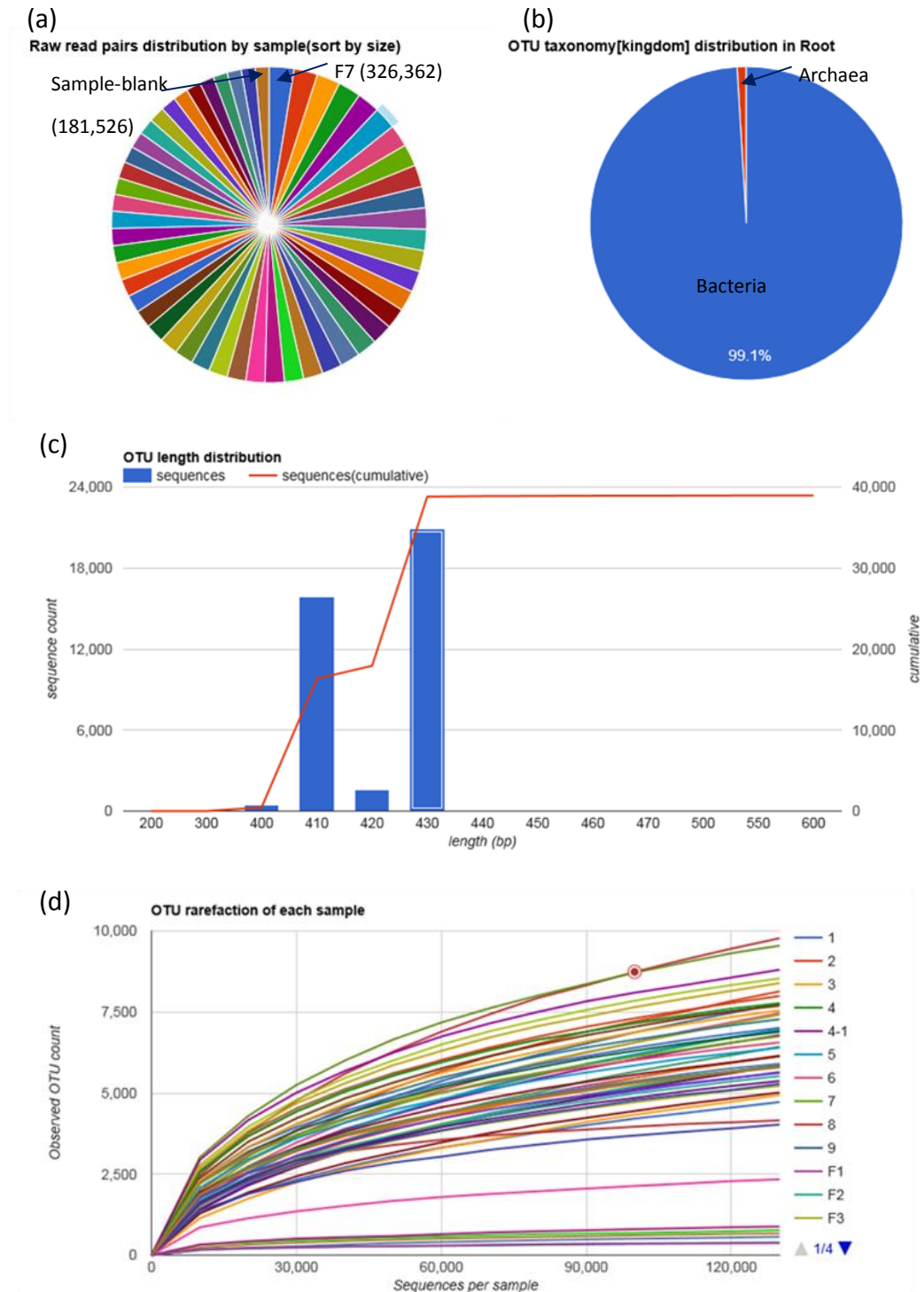


圖 4-28 高通量定序各樣品所得之序列對(read pairs)數量(a)，所屬細菌界與古菌

界比例(b), 序列對組裝後各長度範圍之序列數(c), 及各樣品序列數及累積之 OTUs 數量關係(d)

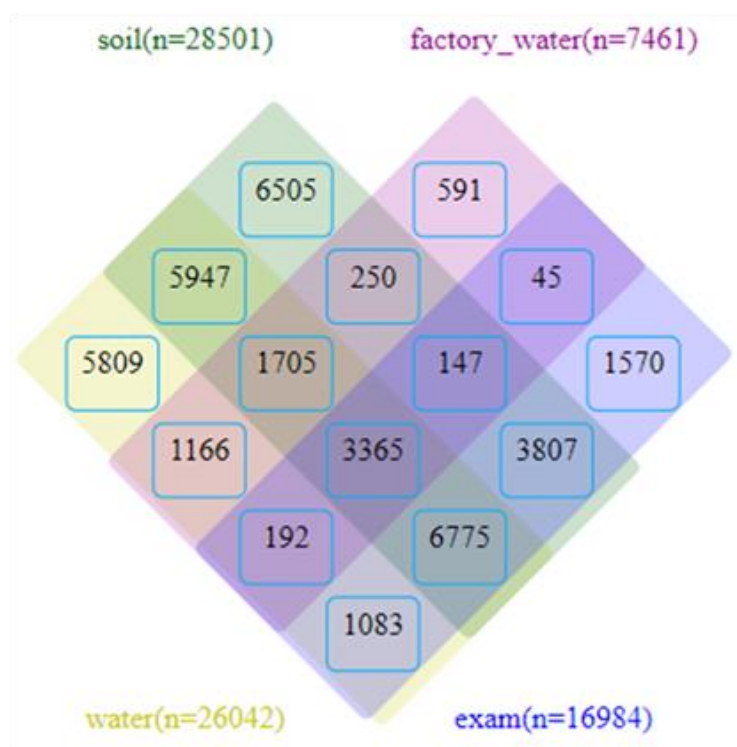


圖 4-29 不同樣品群組(包括現場底泥 soil、現場溪水 water、工廠放流水 factory_water、及實驗室連續流試驗 exam)中 OTUs 重疊性分析

4.6.2 微生物族群分析與環境因子影響探討

根據各樣品高通量定序結果與樣品之水質條件因子進行典型關聯分析 (canonical correspondence analysis, CCA)顯示，各樣品分群中之各別樣品中的微生物族群組成與銅濃度略有相關性(圖 4-30、4-32、4-34、4-36、4-38、及 4-40)，在 CCA 分析中環境水質條件影響趨勢以箭頭方向表示、而影響程度以箭頭長度表示，另外銅濃度在各樣品標記以顏色深淺表示濃度高與底，在 CCA 圖示中銅濃度與微生物族群組成趨勢以工廠放流水樣品具有較明顯的正相關性(圖 4-40)，其中工廠放流水樣品 F12 具有最高之銅濃度(0.738 ppm)，其微生物族群組成之落點也恰為銅之影響趨勢的象限；其次則為實驗室試驗之底泥樣品(圖 4-40、4-42、及 4-44)及現場底泥樣品(圖 4-36)，實驗室試驗組不論是考慮進出流水中或

底泥中之銅濃度，樣品中之微生物族群組成落點也概略與銅影響趨勢稍有相關；而溪水樣品則有最低的正相關性(圖 4-39)，具有較高銅濃度之樣品(如 F3、F7、及 5 等)落點分散在不同象限中，而非統計分析所得之銅影響趨勢(紅色箭頭方向)。此外，在現場溪中底泥樣品分群中進一步探討鉻(Cr)及鉛(Pb)濃度對微生物族群之影響(圖 4-36)，結果顯示相關性亦不明顯，例如樣品 S7 具有最高鉛濃度，但其微生物族群落點卻與鉛的影響趨勢(黃色箭頭所指)不一致，另外雖然樣品 S2 具有最高鉻濃度，其微生物族群落點與鉻的影響趨勢(藍色箭頭)一致，但其它也具有高鉻濃度樣品(如 S7、SF2、SF6、及 SF7 等)都約略落點在鉻的影響趨勢的反方向(圖 4-36)。因此，整體而言，樣品中微生物族群組成僅與金屬濃度略有正相關性，但相關性並不十分顯著，由於微生物族群組成也會受到其它環境水質條件(如 pH 值、營養鹽、或有機物等)影響，單純以微生物族群組成反應單一金屬污染時並不易顯示明顯的正相關性。

進一步分析各個環境水質條件對不同菌類(在菌科層次)之影響趨勢(圖 4-31、4-33、4-35、4-37、4-39、及 4-41)，結果顯示實驗室試驗組並無明顯的菌科與銅濃度有相關性(圖 4-31、4-33、及 4-35)，而現場溪中底泥、溪水、及工廠放流水則有部分菌科與銅的影響趨勢較為一致(圖 4-37、4-39、及 4-41)，這些菌科包括 *Aeromonadaceae*, *Burkholderiaceae*, *Burkholderiales_incertae_sedis*, *Caldilineaceae*, *Campylobacteraceae*, *Chitinophagaceae*, *Comamonadaceae*, *Cytophagaceae*, *Flavobacteriaceae*, *Halothiobacillaceae*, *Helicobacteraceae*, *Hydrogenophilaceae*, *Methylophilaceae*, *Microbacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Planctomycetaceae*, *Pseudomonodaceae*, 及 *Xanthobacteraceae* 等，其中只有數種重複出現在現場溪中底泥、溪水、及工廠放流水樣品中，如 *Aeromonadaceae*, *Burkholderiales_incertae_sedis*, *Caldilineaceae*, *Planctomycetaceae*, *Pseudomonodaceae*, 及 *Xanthobacteraceae* 等，由於多數微生物具有多重功能(如有機碳氧化、氨氮氧化、及金屬還原等)，CCA 分析結果顯示這類微生物與銅有相關性，其中部份菌

群應當與銅的轉化有關。

此外，以菌門之百分組成分析各樣品分群中各別樣品之微生物族群組成，結果顯示微生物屬於 Proteobacteria, Bacteroidetes 及 Actinobacteria 菌門為樣品中優勢菌群(圖 4-42 及 4-43)，比較高銅濃度及低銅濃度樣品之微生物族群組成並無明顯之族群組成樣板/指紋，在實驗室連續流試驗中的底泥樣品最高與最低銅濃度相差大於 50 倍，然而經過 8 週的連續流試驗後，雖微生物族群有明顯改變(圖 4-30、4-32、4-34 及 4-42a)，然而變化後之不同銅濃度試驗組中微生物族群組成並無明顯一致相似的樣板/指紋；另外在現場溪中底泥部份，即使相較於溪水而言較有可能長期累積重金屬，然而銅濃度較高之樣品(最低銅濃度的 25 倍左右)亦沒有呈現明顯一致的相似微生物族群組成樣板/指紋，微生物族群組成變化趨勢似乎沒有與銅的濃度高低有明顯相關性。再者，現場溪中底泥經採樣至實驗室進行連續流試驗後，Proteobacteria 的族群數量有顯著的減少，而 Chloroflexi 及 Firmicutes 的都有顯著的增加(圖 4-42a,b)，與先前報導相近(Yin., 2015)此族群改變是否為強化微生物系統中銅濃度所造成之效應仍有待進一步驗證。

另外，高銅濃度之工廠放流水(如樣品 F10 及 F12)具有較單純化的微生物族群結構(圖 4-43b)，對於部份微生物而言工廠放流水中之具生物毒性的污染物極可能受到生長抑制，在工廠放流水排放口附近即使與溪水混合，即時局部之放流水與溪水混合之微環境似乎亦不利於一些微生物生長，在低銅濃度放流口可被偵測到的 parclubacteriae, planctomycetes 及 Chlamydiae 菌門在高銅濃度放流口皆沒有被發現；然而在高銅濃度的底泥樣品及溪水樣品中微生物族群種類的豐度仍不至於太低，因此，高銅濃度之工廠放流水樣品之低豐度微生物族群亦可能受其它具生物毒性的有機物或無機物所造成。

整體而言，受重金屬污染之溪水和底泥中之微生物有可能受金屬銅之影響

而造成族群組成變化，然而，其它影響微生物族群之環境條件因子，經 CCA 典型關聯分析雖有金屬銅影響微生物族群組成的一些相關性，但影響性並不十分明顯，如進一步探討與金屬轉化相關之酵素(如氧化酶 oxidase 或還原酶 reductase 等)或及其基因，應可更精準推測環境樣品是否長期受重金屬之污染，有助於建構污染狀況之概念模型及擬訂污染整制之策略。

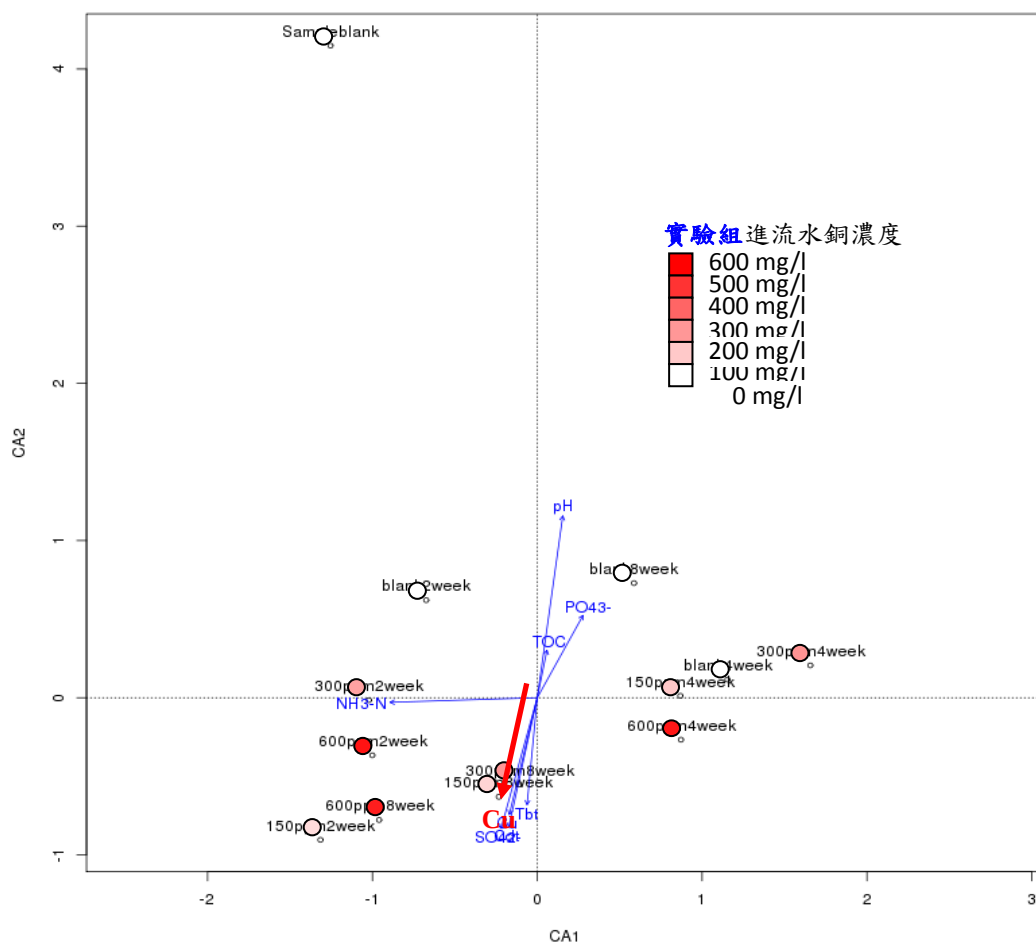


圖 4-30 實驗室連續流試驗之底泥樣品中微生物族群(依據高通量定序之 16S rRNA 基因序列)受不同進流水條件(如金屬銅)影響之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果

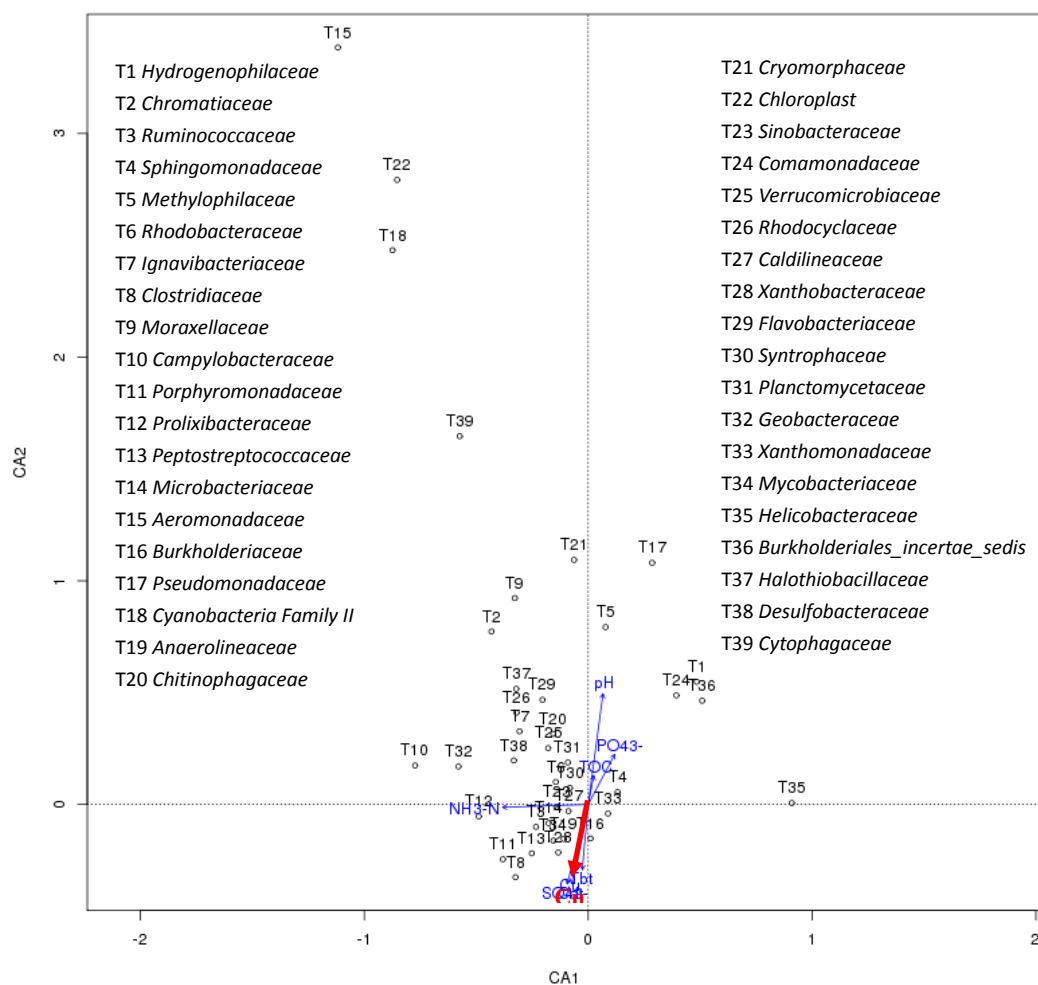


圖 4-31 實驗室連續流試驗中底泥樣品之組成菌群(以菌科分類為依據)受不同進流水條件(如金屬銅)影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果

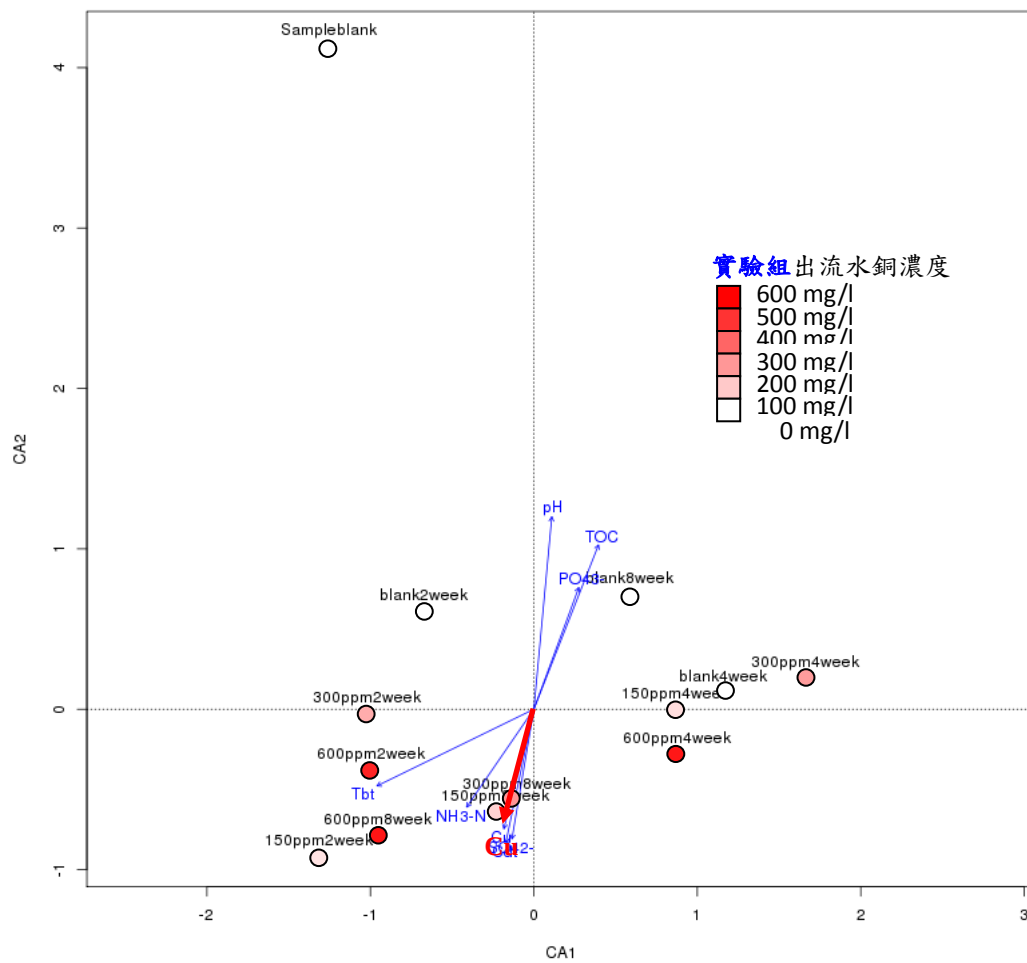


圖 4-32 實驗室連續流試驗之底泥樣品中微生物族群(依據高通量定序之 16S rRNA 基因序列)受不同出流水條件(如金屬銅)影響之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果

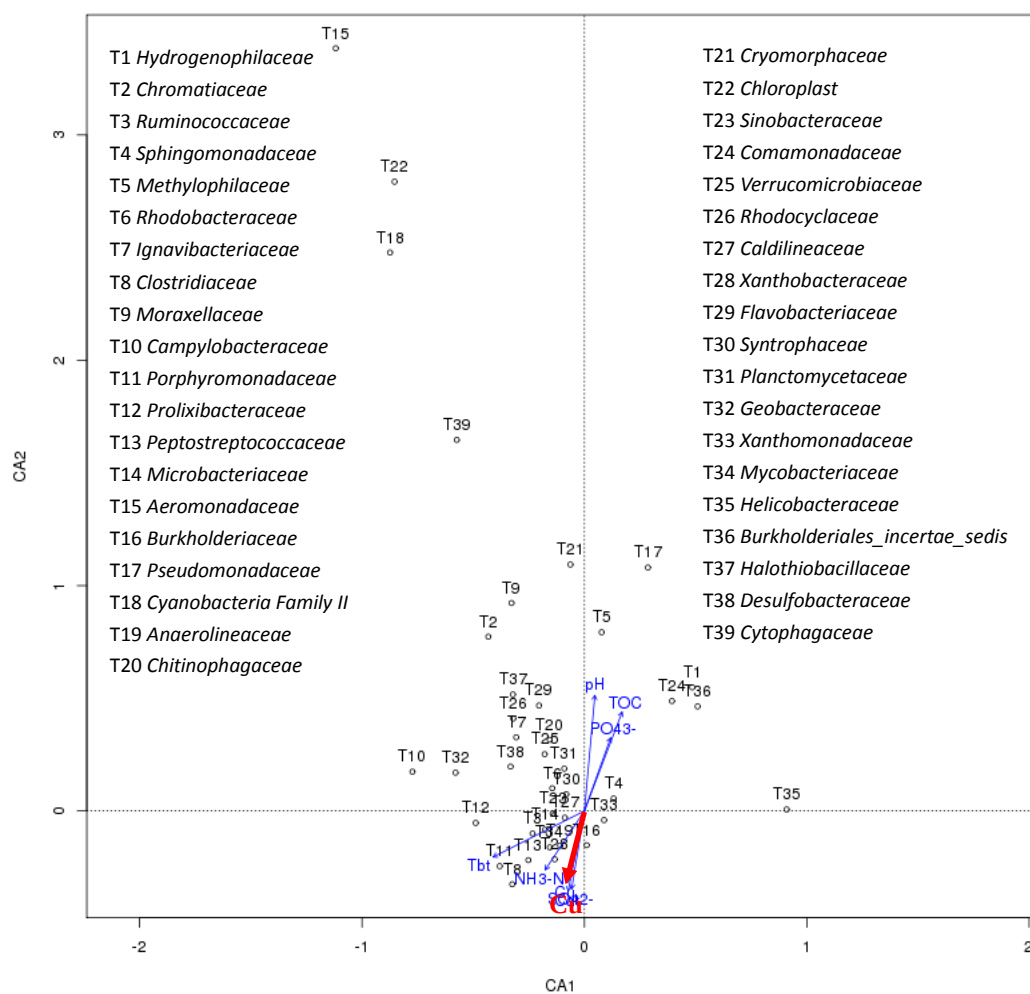


圖 4-33 實驗室連續流試驗中底泥樣品之組成菌群(以菌科分類為依據)受不同出流水條件(如金屬銅)影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果

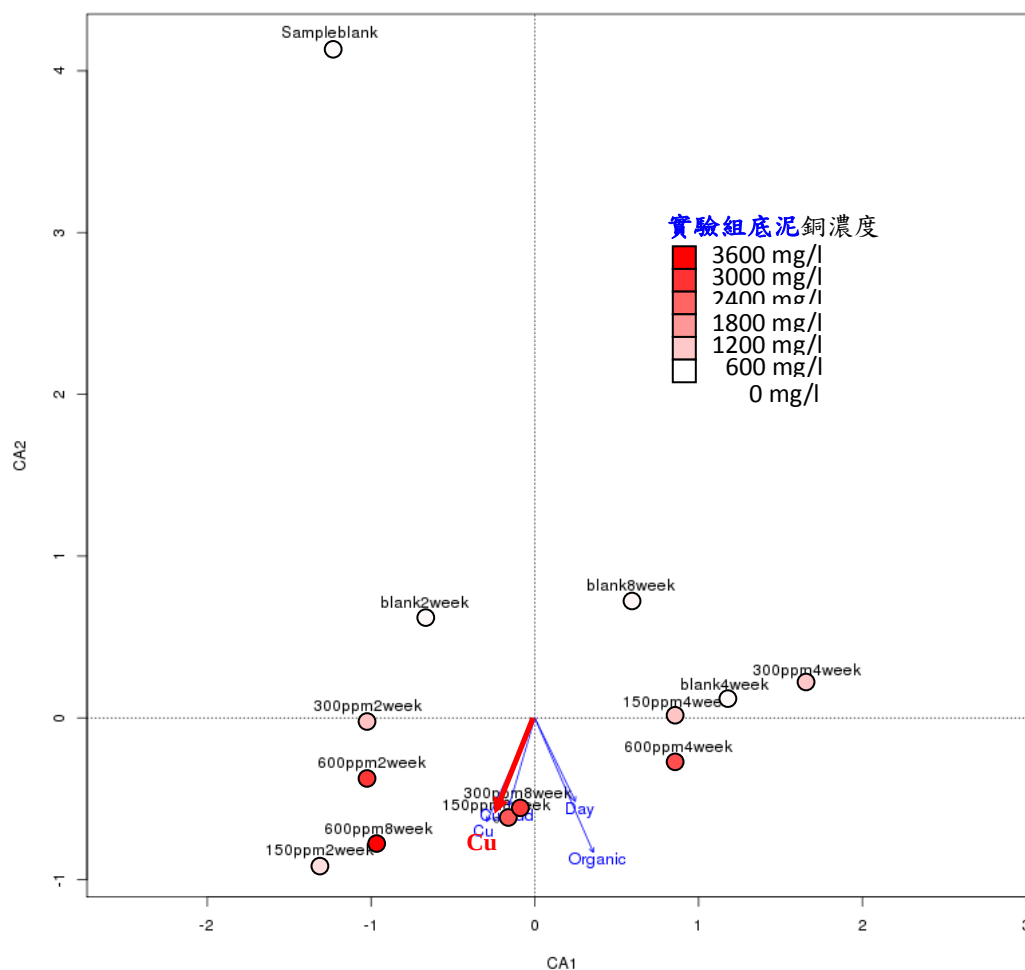


圖 4-34 實驗室連續流試驗之底泥樣品中微生物族群(依據高通量定序之 16S rRNA 基因序列)受不同底泥條件(如金屬銅) 影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果

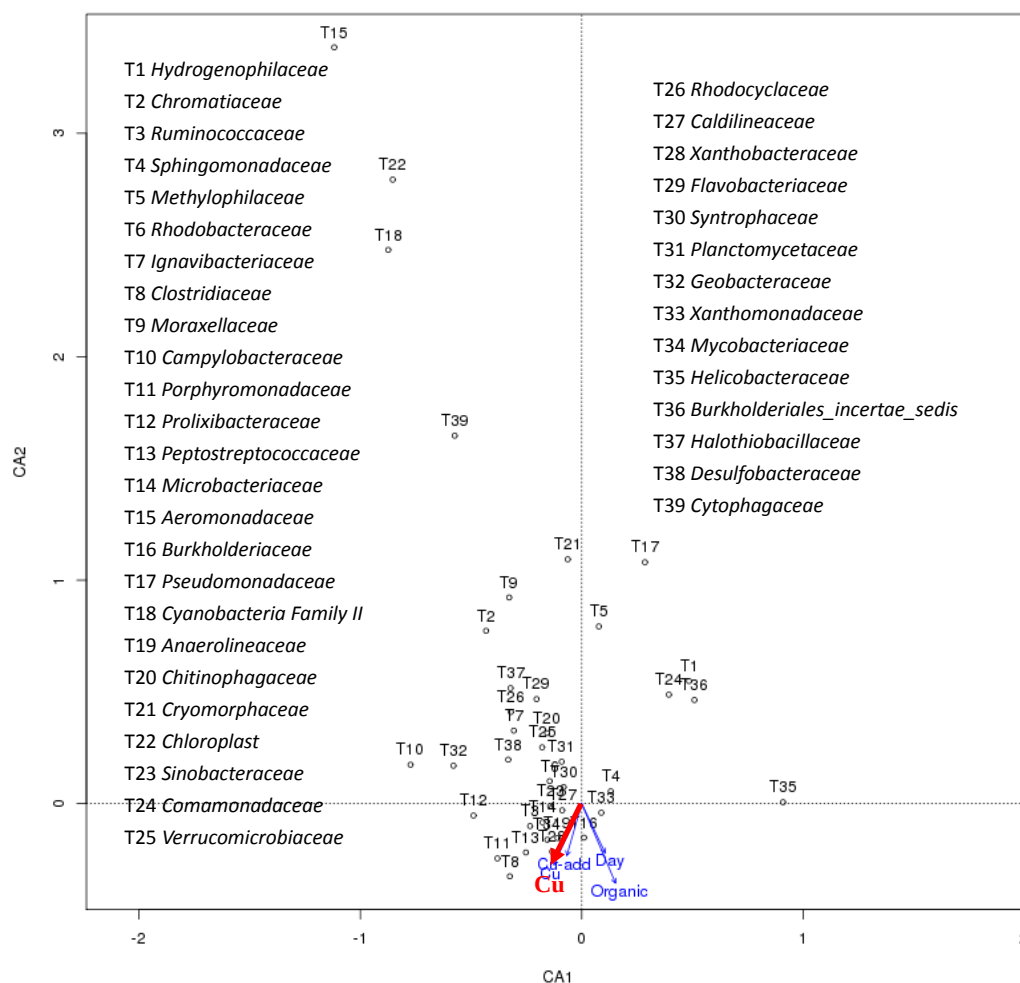


圖 4-35 實驗室連續流試驗中底泥樣品之組成菌群(以菌科分類為依據)受不同底泥條件(如金屬銅)影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果

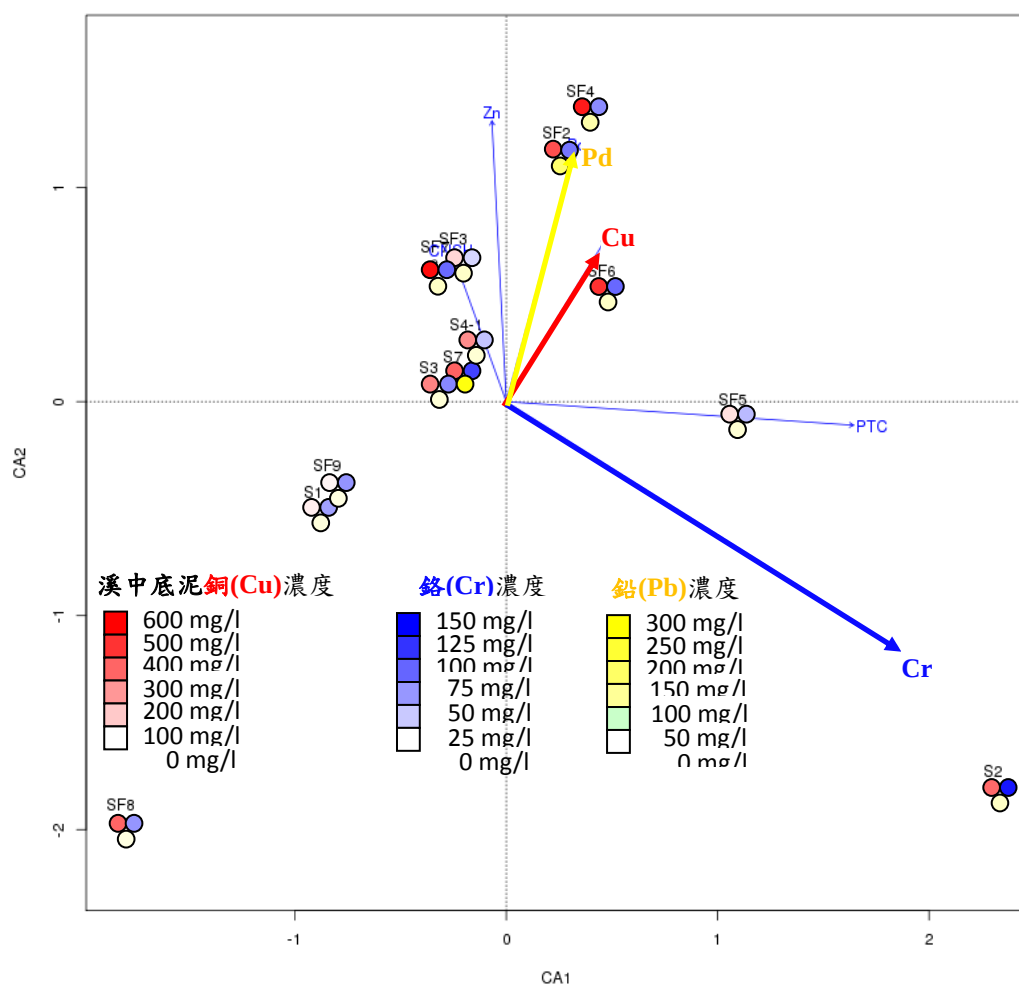
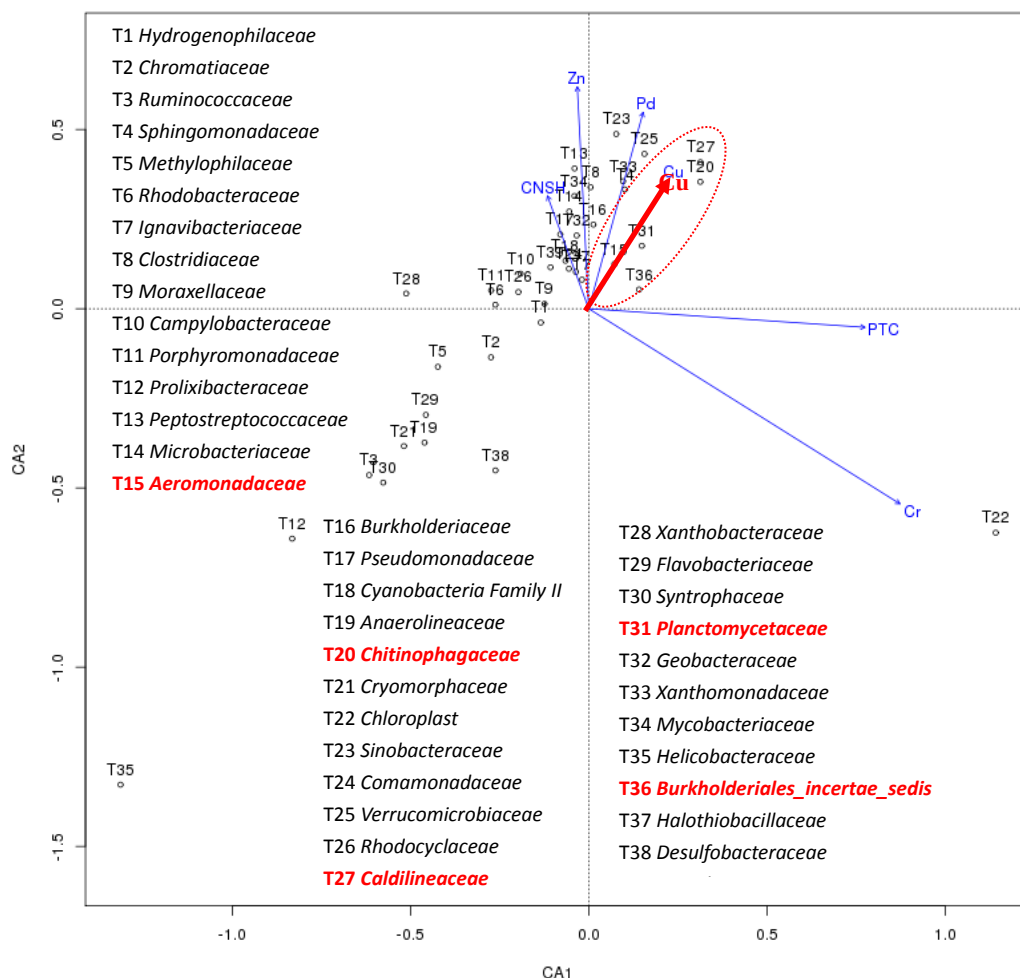


圖 4-36 溪中底泥樣品之微生物族群(依據高通量定序之 16S rRNA 基因序列)受不同底泥條件(如金屬銅) 影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果



註：紅色標記為該樣品中與銅的影響趨勢有正相關的菌科

圖 4-37 溪中底泥樣品之組成菌群(以菌科分類為依據)受不同底泥條件(如金屬銅)影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果

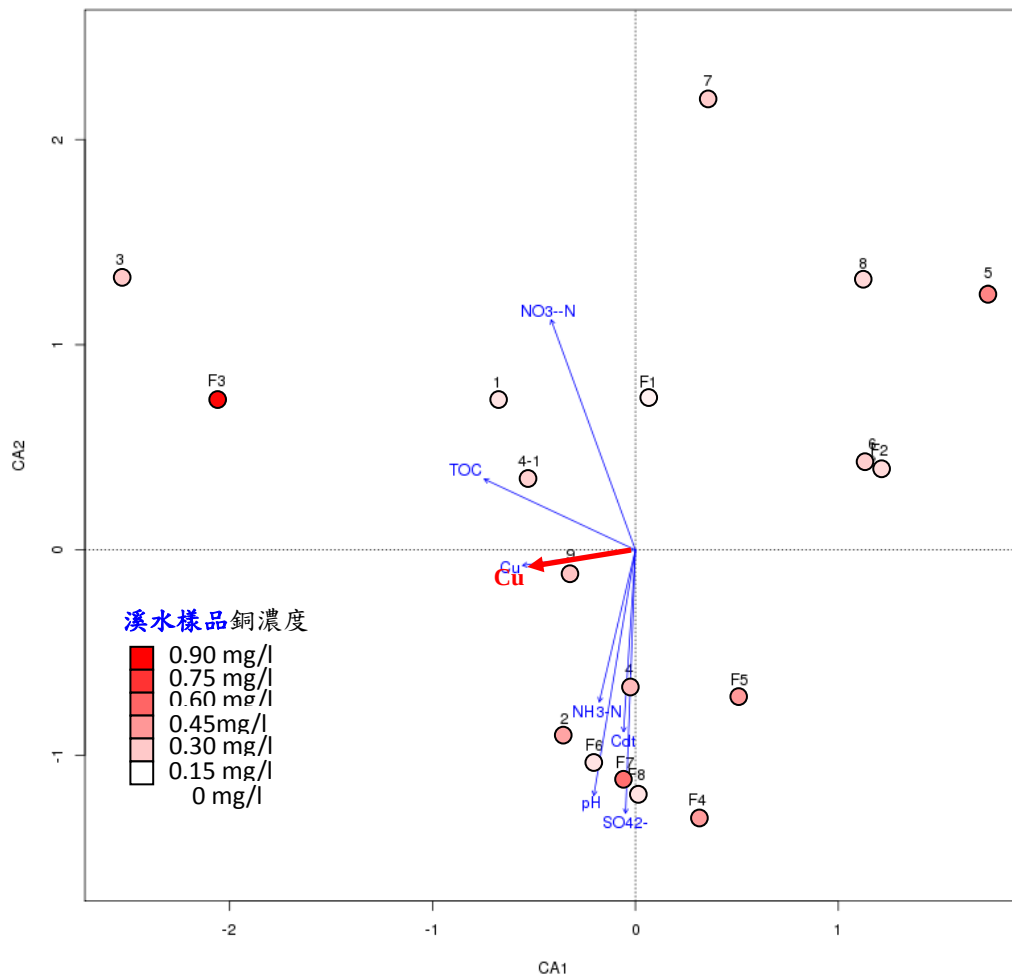
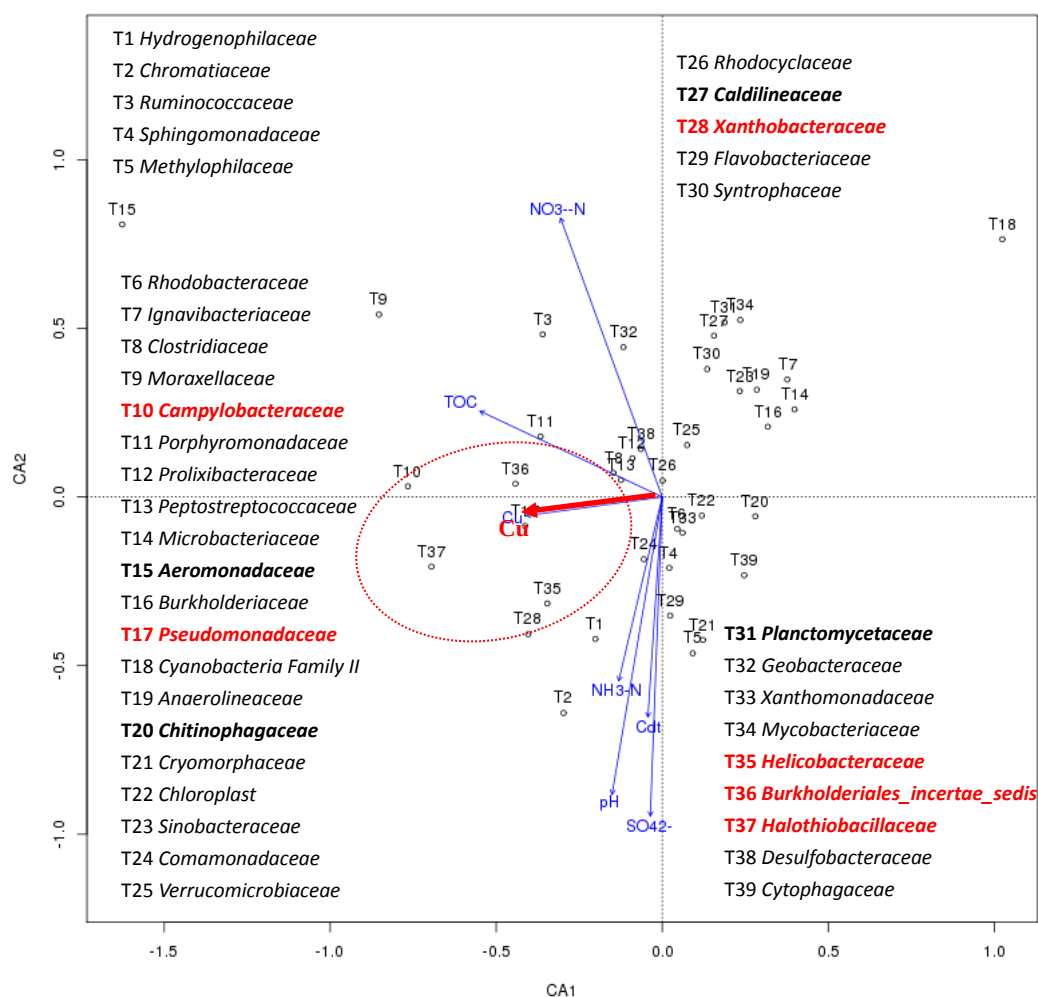


圖 4-38 溪水樣品之微生物族群(依據高通量定序之 16S rRNA 基因序列)受不同水質條件(如金屬銅) 影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果



註：紅色標記為該樣品中與銅的影響趨勢有正相關的菌科，黑字粗體標記為在工廠放流水、溪水或現場底泥中皆有出現與銅的影響趨勢正相關的菌科。

圖 4-39 溪水樣品之組成菌群(以菌科分類為依據)受不同水質條件(如金屬銅)影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果

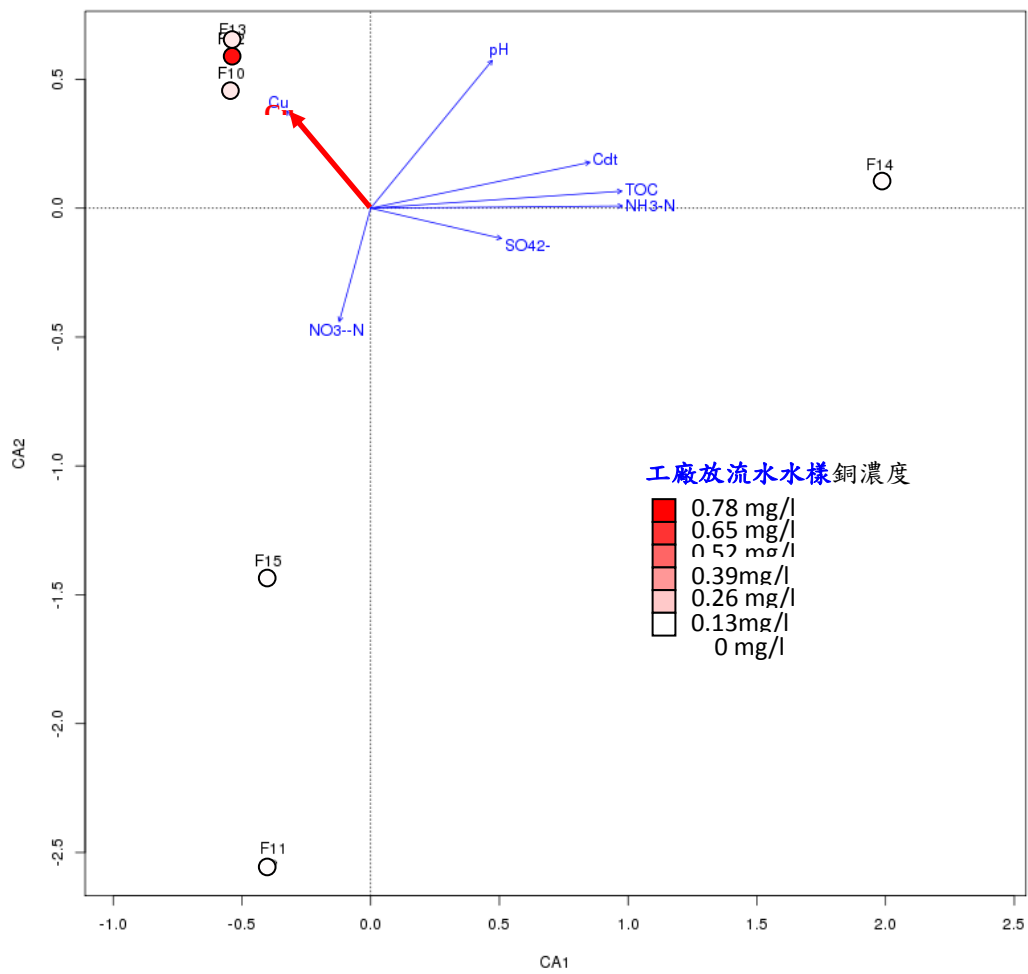
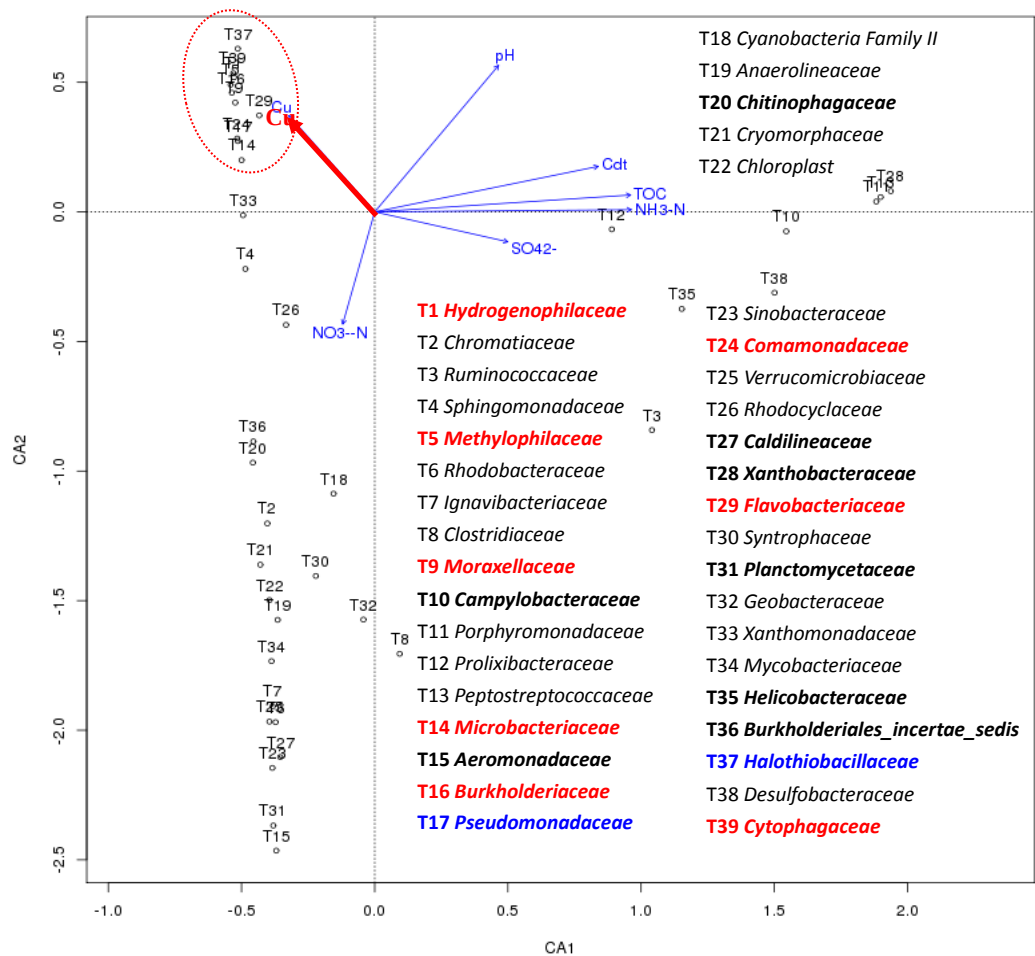


圖 4-40 工廠放流水樣品之微生物族群(依據高通量定序之 16S rRNA 基因序列)受不同水質條件(如金屬銅) 影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果



註：紅色標記為該樣品中與銅的影響趨勢有正相關的菌科；藍色是在工廠放流水及溪水中皆有出現與銅的影響趨勢正相關的菌科；黑字粗體標記為在工廠放流水、溪水或現場底泥中皆有出現與銅的影響趨勢正相關的菌科。

圖 4-41 工廠放流水樣品之組成菌群(以菌科分類為依據)受不同水質條件(如金屬銅)影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果

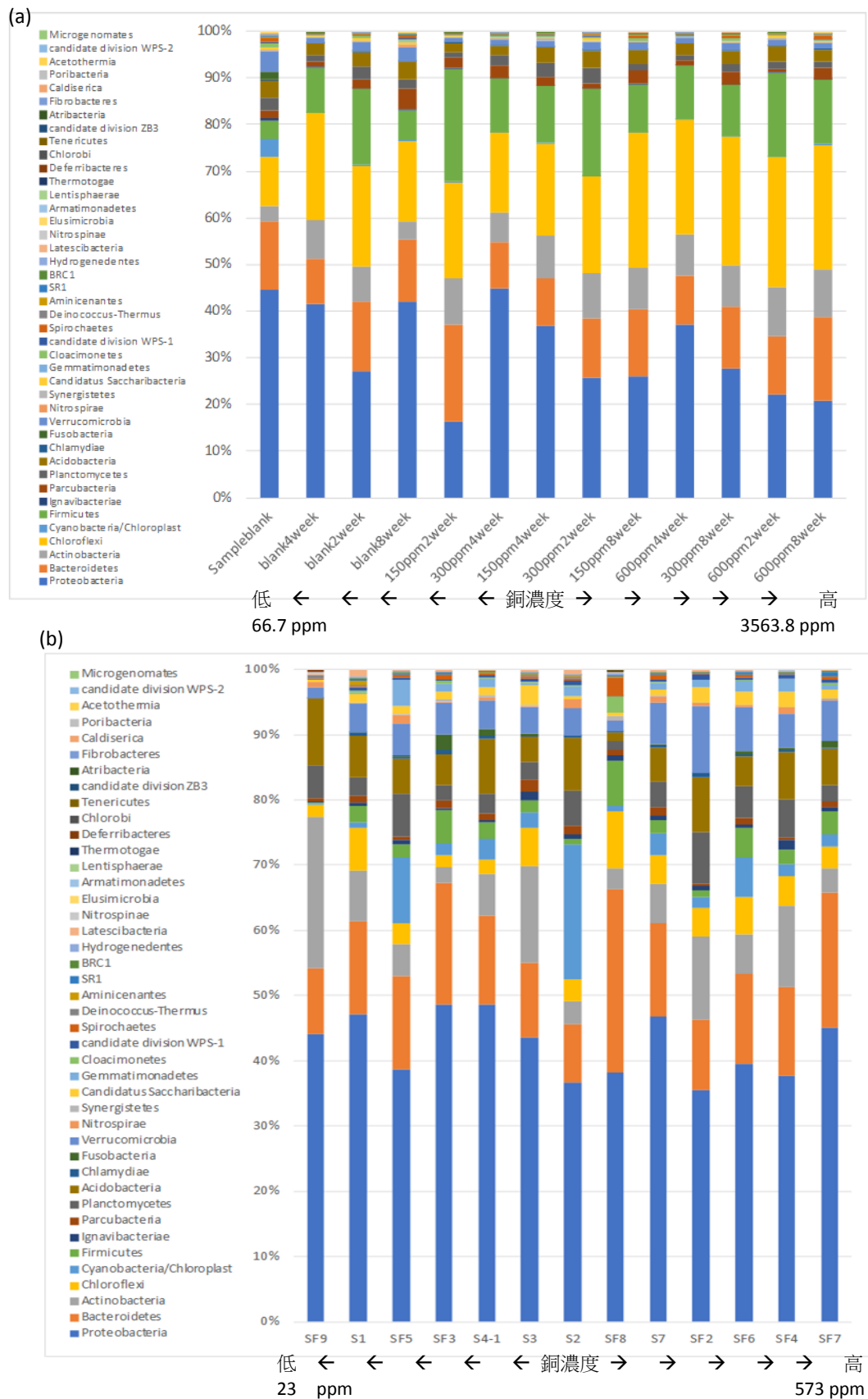


圖 4-42 實驗組底泥(a)及現場底泥(b)樣品微生物族群組成



圖 4-43 現場溪水(a)及工廠放流水(b)樣品微生物族群組成

4.6.3 操作分類單元 Operational taxonomic unit (OTU)與污染源關聯分析

由前節 4.6.2 結果可知，以樣點全體微生物族群分析無法與單一污染物取得相關性，因此以下選擇部分較相關之 OTUs 進行分析。

圖 4-44 至圖 4-47 為實驗室反應槽底泥 copy numbers 大於 0.5%之 OTUs 在不同時間點的熱圖。由熱圖中顯示，部分菌屬在不同培養時期會培養時間而變動。與空白培養比較，有五屬的 OTUs 有較明顯的增減，分別為 *Thiobacillus*, *Methylobacter*, *Mycobacterium*, *Longilinea*, 以及 *Methylocystis*。圖 4-48 至圖 4-52 分別為此五屬的 copy number 占總量的百分比隨時間變化。其中，*Thiobacillus* 及 *Methylobacter* 在含銅進流水的培養下數量被抑制，*Mycobacterium* 及 *Longilinea* 則含量在空白組下降，含銅進流水實驗組中則穩定持平，*Methylocystis* 則在空白組下降而低濃度含銅量(150ppm)時上昇。

此五菌屬除 *Thiobacillus* 外，皆與甲烷代謝相關，*Longilinea* 菌屬中多存在厭氧甲烷生成環境中，其他菌屬則多為甲烷或甲基氧化菌。此五屬菌株在現地底泥樣品中 gene copy number 含量與現地所量測之底泥及水樣銅濃度之相關性(皮爾森相關係數)列於表 4-14。由此分析可得，現地樣品中，僅 *Methylobacter* 和 *Methylocystis* 其與現地銅濃度有中度相關(0.4~0.69)，較有機會作銅污染指標，其中一屬與水樣相關，另一屬與底泥相關；因受研究時程所限制，反應槽的硫酸銅進流濃度相較於現地樣品高出許多，受到硫酸銅影響之菌相與現地受影響的菌相可能較不同。另外，現地環境中仍有其他物理化學因子會影響其菌相表現。此分析僅為同一河川水樣底泥樣品，以及單一水樣採集結果，未來可以其他現地樣品比較，確認此五屬之消長作為硫酸銅污染指標物種。

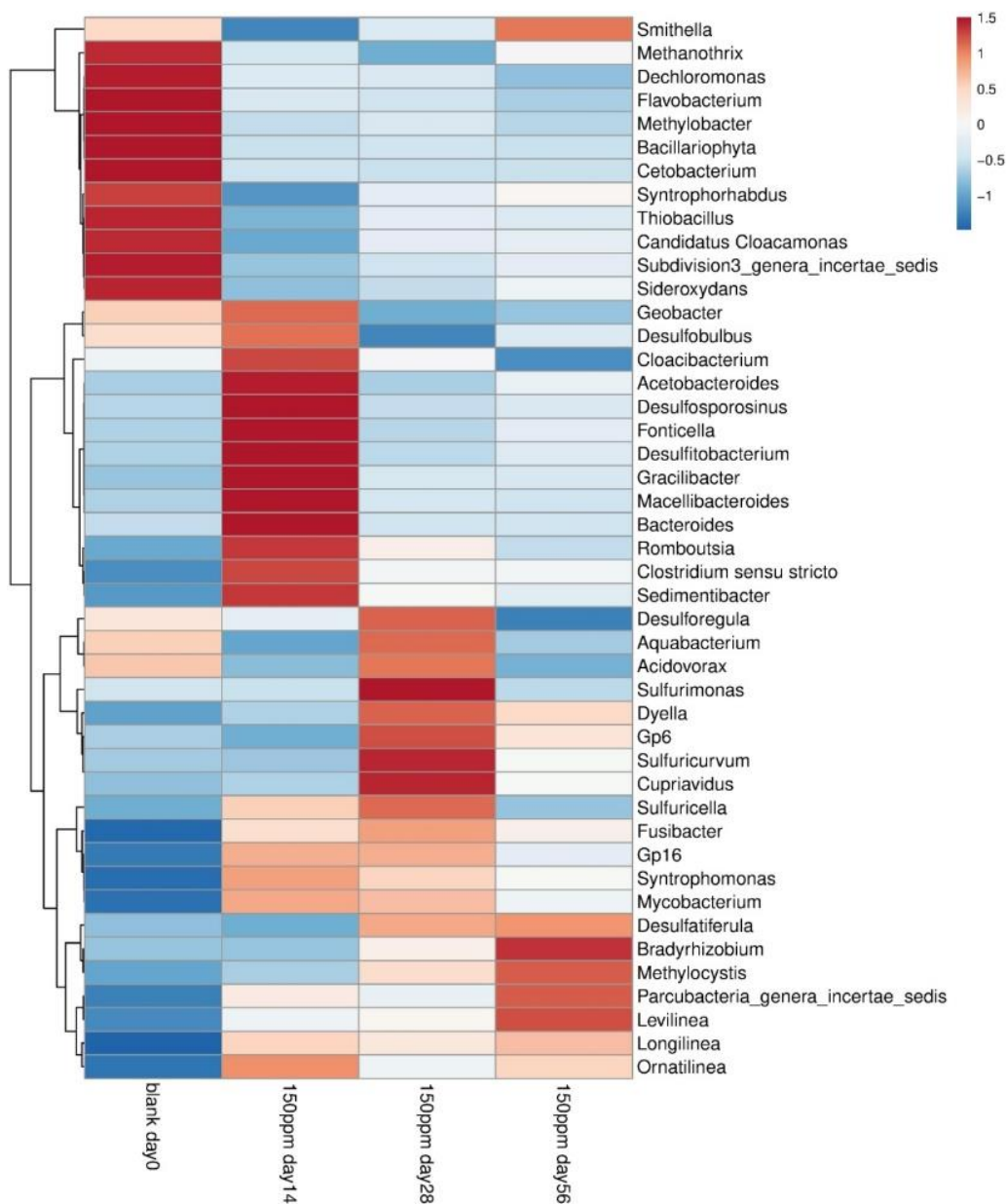


圖 4-44 實驗室反應槽底泥中菌屬隨時間變動組成熱圖(150ppm)

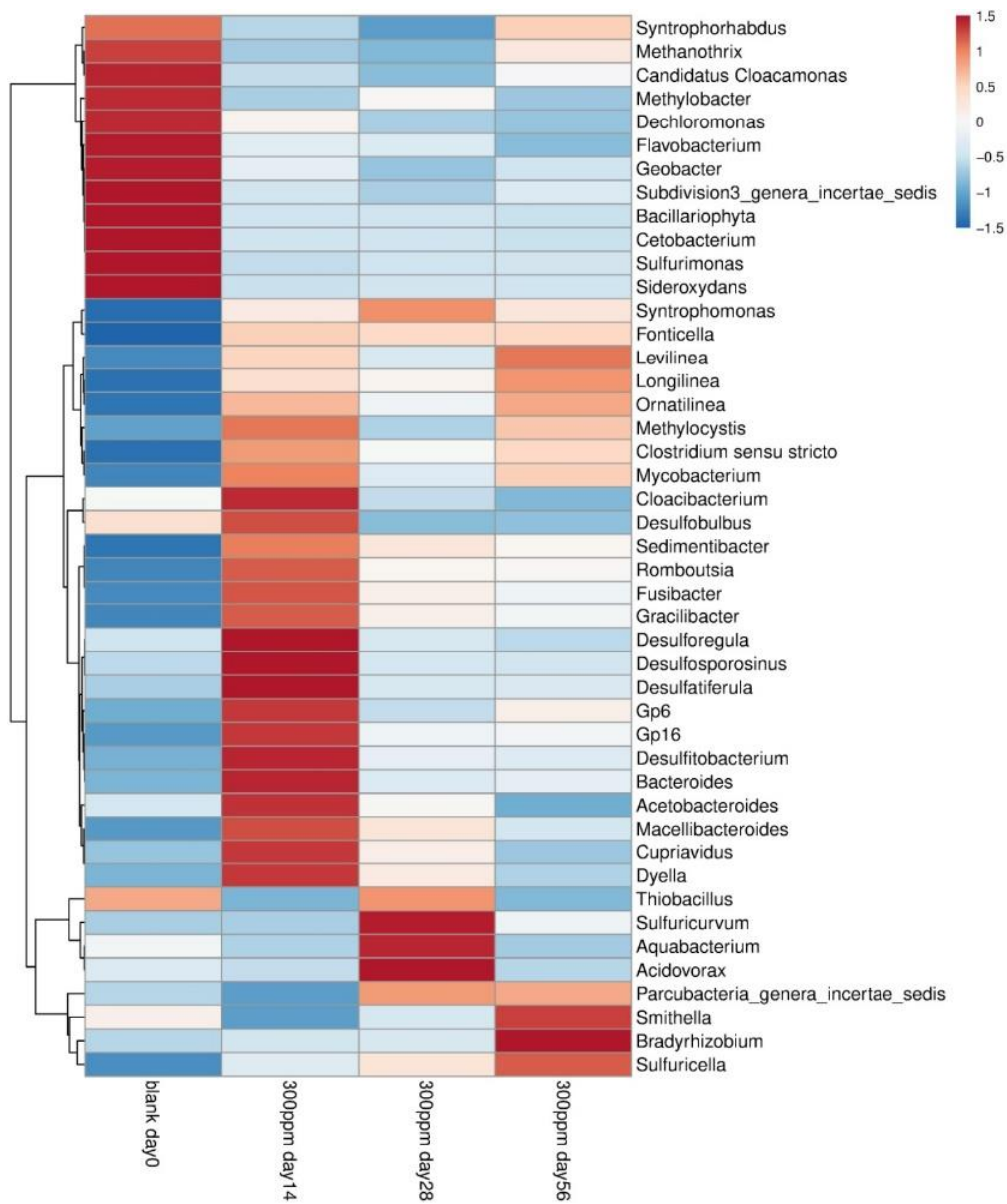


圖 4-45 實驗室反應槽底泥中菌屬隨時間變動組成熱圖(300ppm)

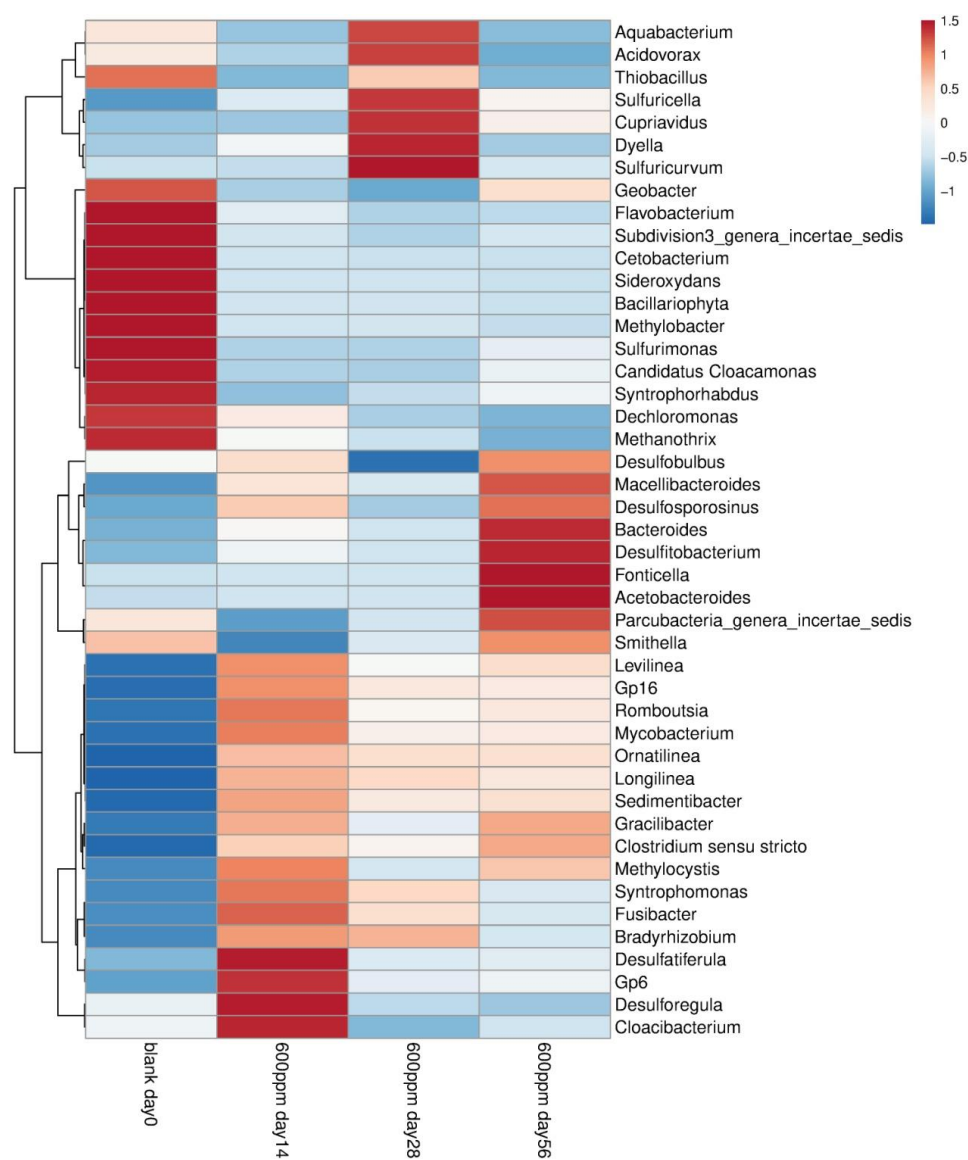


圖 4-46 實驗室反應槽底泥中菌屬隨時間變動組成熱圖(600ppm)

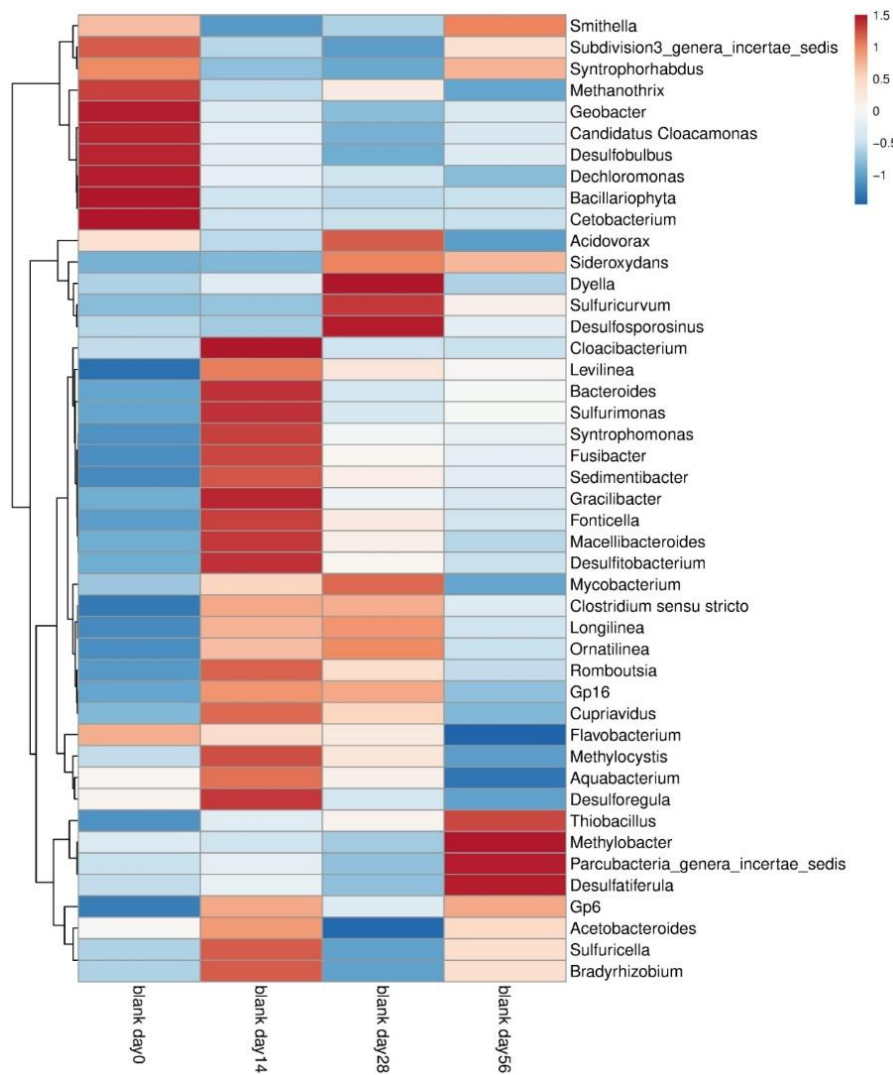
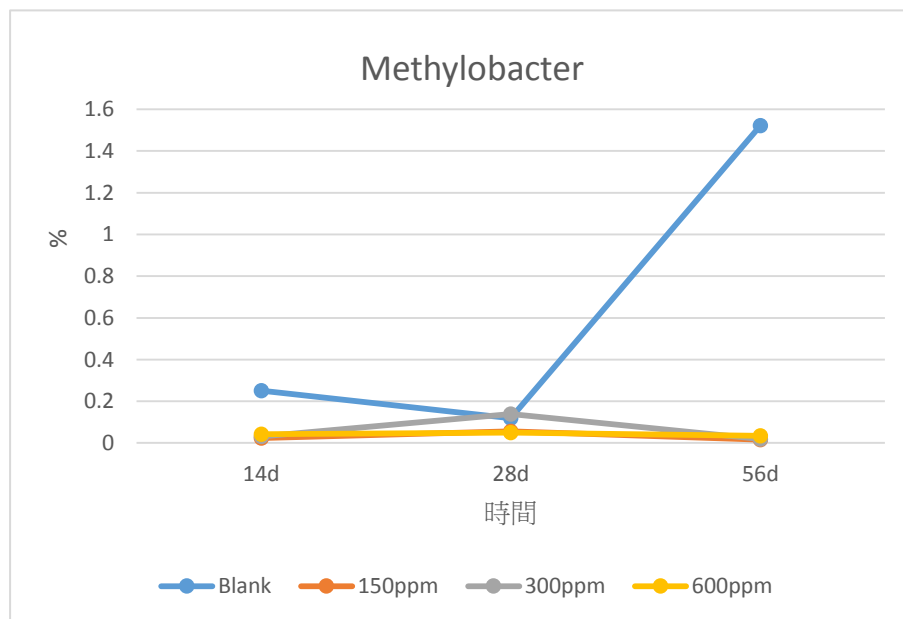


圖 4-47 實驗室反應槽底泥中菌屬隨時間變動組成熱圖(blank)

圖 4-48 反應槽底泥 *Methylobacter* 占總量的百分比隨時間變化

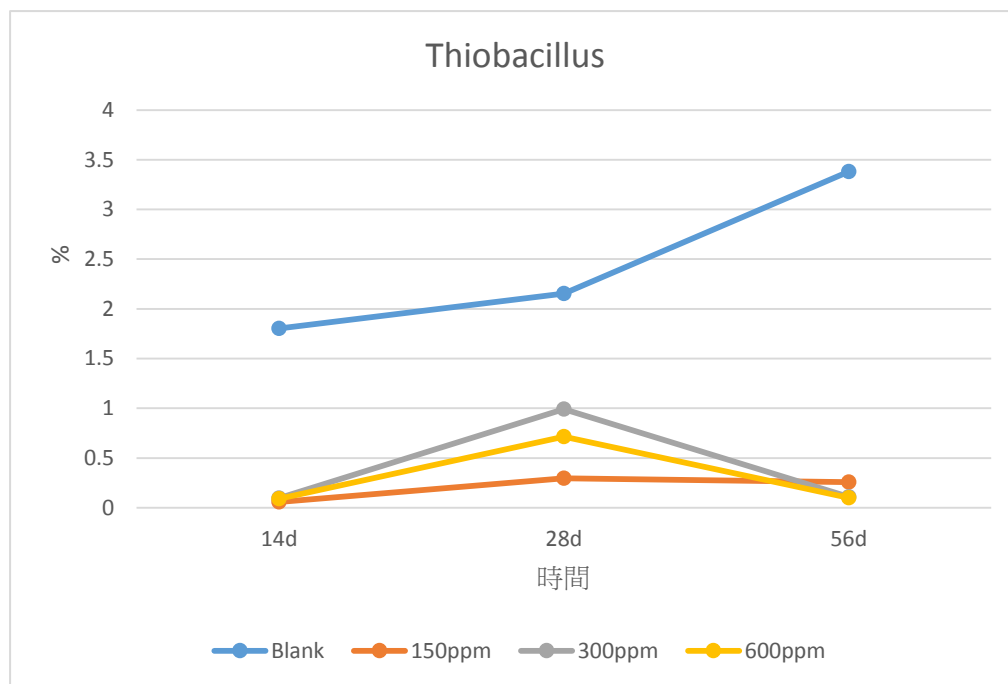


圖 4-49 反應槽底泥 *Thiobacillus* 占總量的百分比隨時間變化

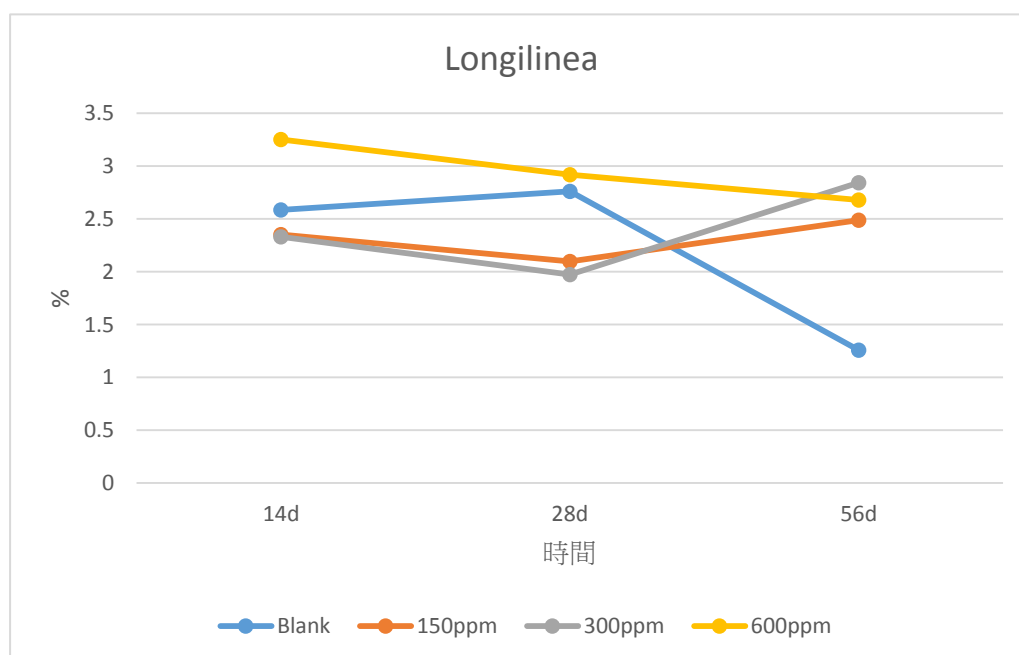


圖 4-50 反應槽底泥 *Longilinea* 占總量的百分比隨時間變化

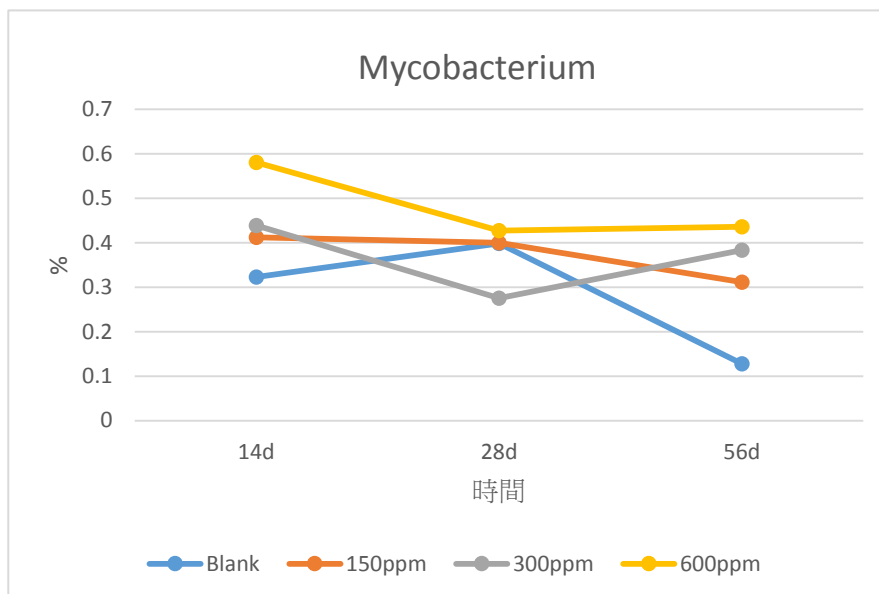
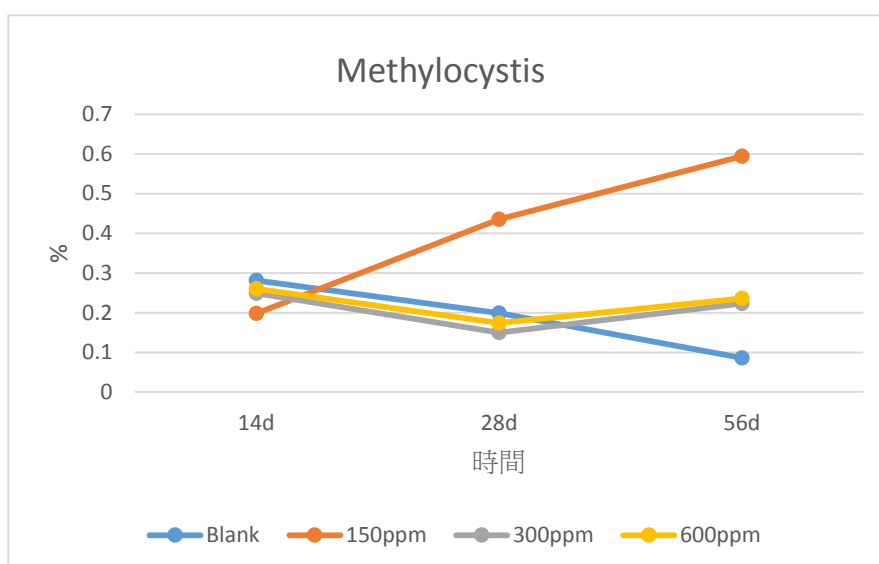
圖 4-51 反應槽底泥 *Mycobacterium* 占總量的百分比隨時間變化圖 4-52 反應槽底泥 *Methylocystis* 占總量的百分比隨時間變化

表 4-14 反應槽主要變化菌屬與現地樣品銅濃度之相關性

菌屬	水樣中銅濃度	底泥銅濃度
<i>Thiobacillus</i>	-0.2094	-0.1841
<i>Methylobacter</i>	0.6582	0.0691
<i>Mycobacterium</i>	-0.1214	0.3337
<i>Longilinea</i>	-0.0068	-0.2079
<i>Methylocystis</i>	-0.1057	0.6059

由圖 4-31, 33, 35, 37, 39, 41 的菌科與環境因子 CCA 分析，篩選出對應銅濃度最相關的菌科，共有 19 科(表 4-15)。由此 19 菌科，對照實驗室底泥反應槽序列分析中的菌科 copy numbers 所占總數之百分比依不同時間及進流銅濃度的變化，發現其中有五科在底泥反應槽對硫酸銅的添加與否有較明顯的變化(圖 4-53~4-57)。其中，Burkholderiaceae 在銅的添加初期相較於空白組，其所占比例升高；而其他 Hydrogenophilaceae, Methylophilaceae, Chitinophagaceae, 及 Flavobacteriaceae 等四菌科相較於空白組，在含有硫酸銅的進流後所占比例下降。此五科可能可篩選成為未來檢視受硫酸銅污染的底泥中數量消長的菌科。

表 4-15 所有現地樣品(老街溪水、底泥及工廠放流水篩選出與銅濃度相關之菌科)

編號	菌科名
T1	Hydrogenophilaceae
T5	Methylophilaceae
T9	Moraxellaceae
T10	Campylobacteraceae
T14	Microbacteriaceae
T15	Aeromonadaceae
T16	Burkholderiaceae
T17	Pseudomonadaceae
T19	Anaerolineaceae
T20	Chitinophagaceae
T24	Comamonadaceae
T27	Caldilineaceae
T28	Xanthobacteraceae
T29	Flavobacteriaceae
T31	Planctomycetaceae
T35	Helicobacteraceae
T36	Burkholderiales_incertae_sedis
T37	Halothiobacillaceae
T39	Cytophagaceae

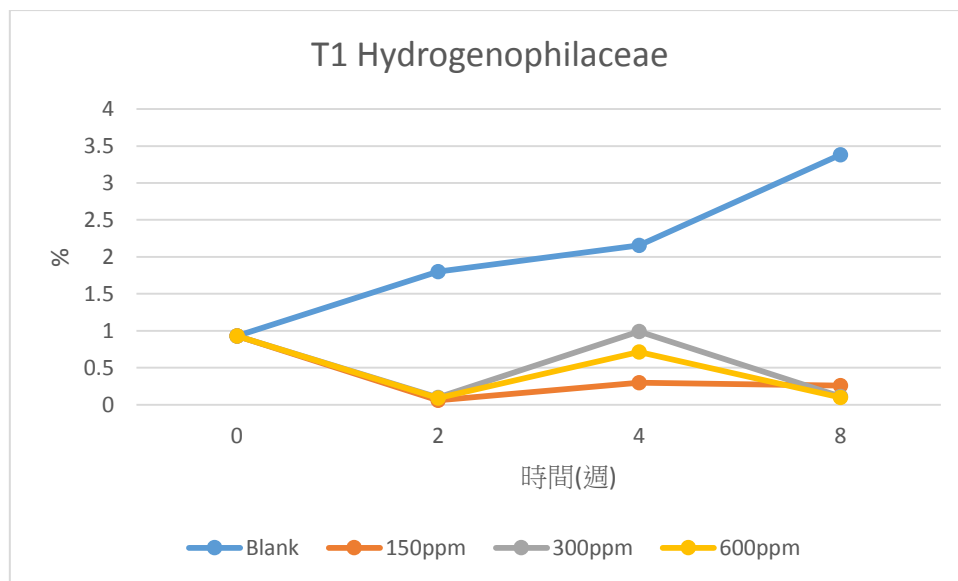


圖 4-53 現地樣品篩選出可能與銅相關之菌屬 *Hydrogenophilaceae* 在實驗室底泥反應槽中所占比例隨培養時間的變化

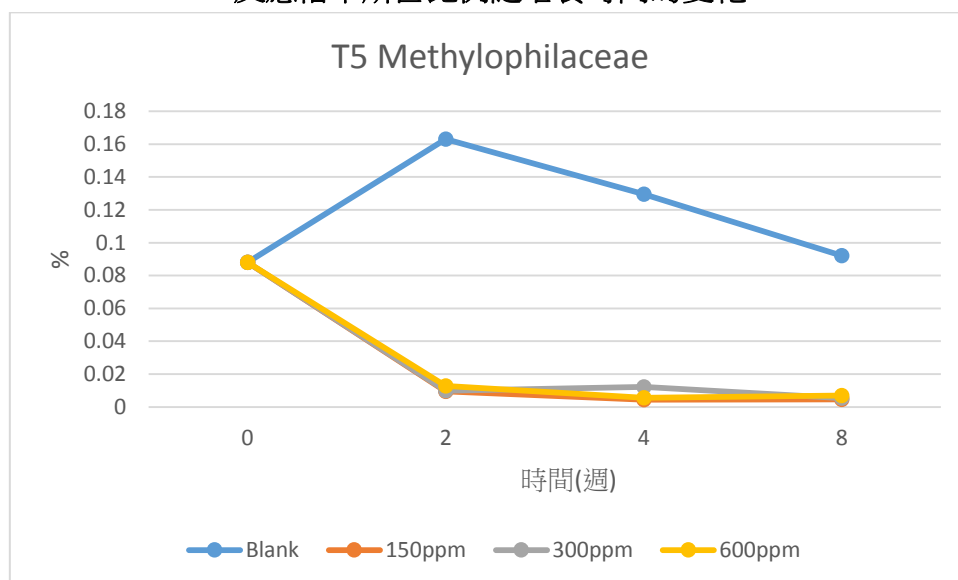


圖 4-54 現地樣品篩選出可能與銅相關之菌屬 *Methylophilaceae* 在實驗室底泥反應槽中所占比例隨培養時間的變化

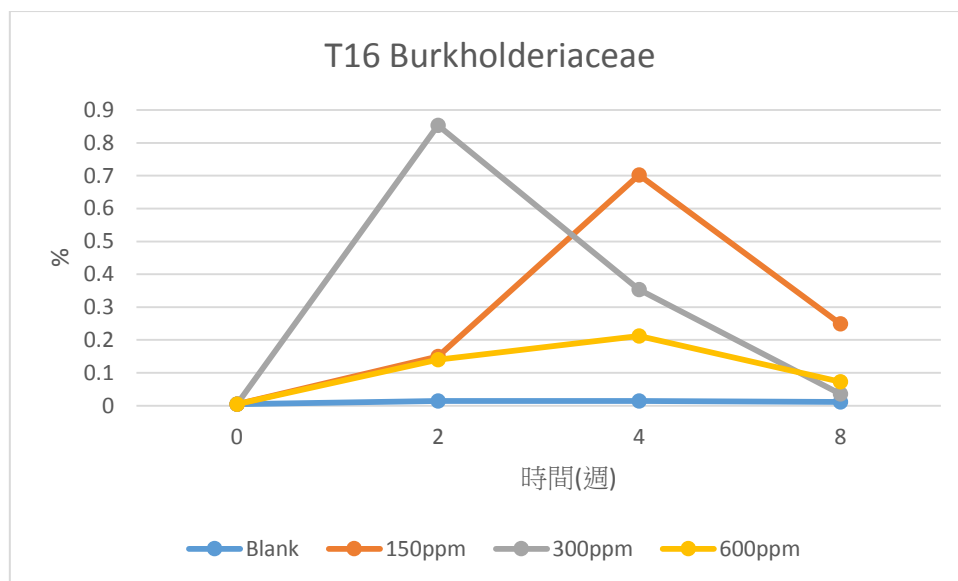


圖 4-55 現地樣品篩選出可能與銅相關之菌屬 Burkholderiaceae 在實驗室底泥反應槽中所占比例隨培養時間的變化

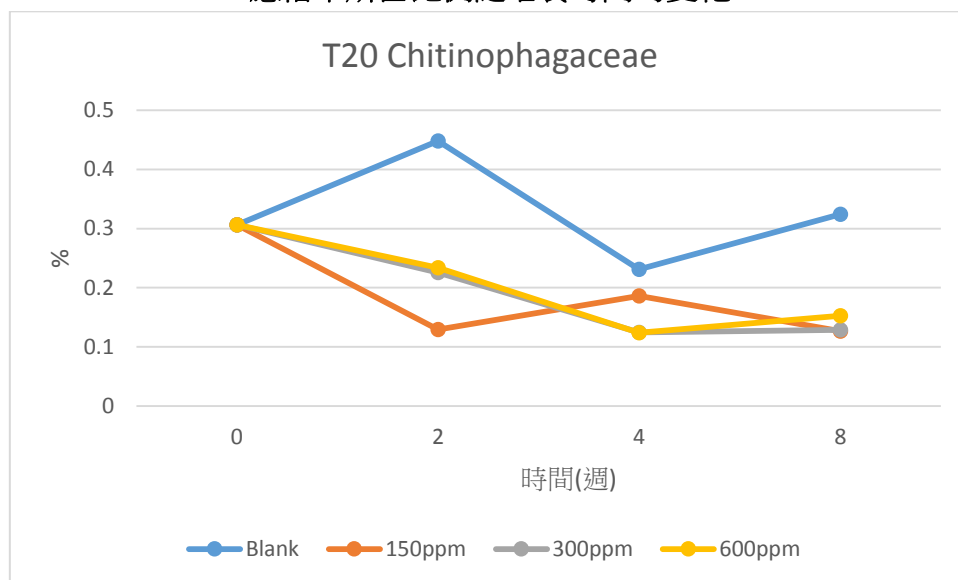


圖 4-56 現地樣品篩選出可能與銅相關之菌屬 Chitinophagaceae 在實驗室底泥反應槽中所占比例隨培養時間的變化

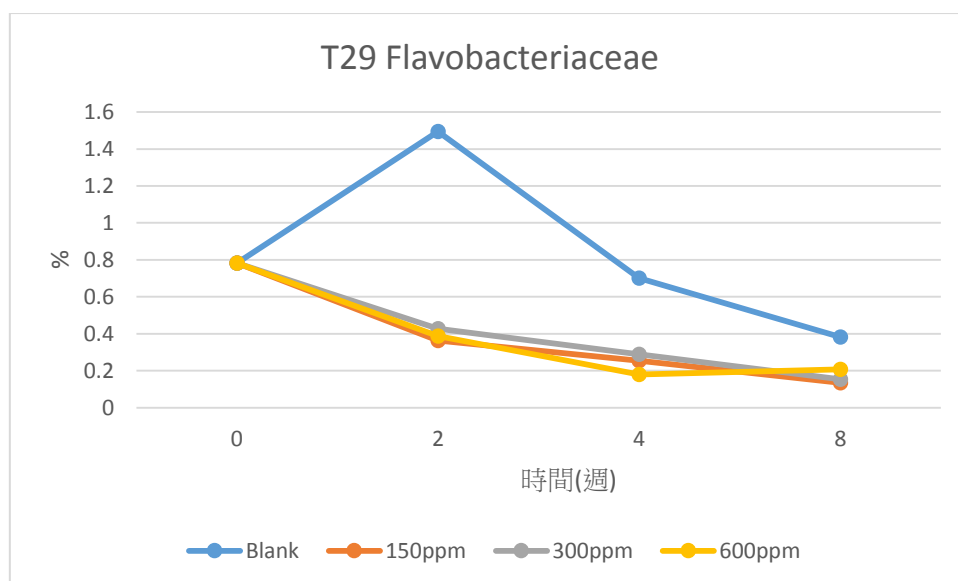


圖 4-57 現地樣品篩選出可能與銅相關之菌屬 *Flavobacteriaceae* 在實驗室底泥反應槽中所占比例隨培養時間的變化

章節摘要：

依據計畫之實驗結果分述於本章之各節中，4.1 蒐集相關文獻結果；4.2 現地河川水樣分析結果；4.3 工廠放流水分析結果；4.4 現地底泥分析結果；4.5 反應槽進出流與底泥分析結果；第 4.6 節為定序結果與環境因子影響微生物族群分析探討。

以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(1/2)

五、結論

5.1 計畫完成進度

本計畫所訂定之工作目標及工作內容皆已完成。

5.2 老街溪現地採樣

河川水質部分，19 個點位中有 11 個點位氨氮濃度介於 1 至 3 mg/L 間，於河川污染指標中，其氨氮項目分類為中度污染，TIN 濃度高者有集中於中游段趨勢；重金屬濃度分布，集中落於許厝港一號橋點位(F7)。

工業放流水部分，所採集點位之溫度及 pH 均符合法規限值，皮革製品廠(F14)放流水之導電度數值高，且 COD 及氨氮超出放流水標準，金屬部分測得光電廠(F10)及精密工業廠(F13)的硼濃度偏高。

底泥部分，碳氮硫氫重量百分比總和由 0.6910 %至 14.823 %不等，除了占比最高的中壢區公園橋點位(F5)為 14.8%，及次之的大園區許厝港一號橋點位(F7)為 12.1%外，其餘 CNSH 占總重量比例均小於 4%；各點位平均粒徑值差異大，由 70.60 至 532.6 μm 不等，平均粒徑最大者測得於中壢區中正橋點位(F6)，平均粒徑最小者測得於上游龍潭區國騏橋點位(1)；部分點位金屬銅、鋅及鉛濃度偏高，此外，老街溪流域底泥重金屬銅、鋅、鋁濃度最高值，均落於大園工業區下游約 1 公里處之許厝港一號橋點位(F7)。

5.3 反應槽

進出流測得的銅濃度未達到所添加的銅濃度，可能為部分沉澱於河水中或底泥中，有添加硫酸銅三組進流的濁度較未添加的高。最後出流的濁度減少可能是因為經過反應槽後沉積於底泥。

而硫酸銅的添加使得出流無法有氨氮明顯減少的現象，這可能是由於硫酸銅抑制了硝化作用(Nitrification)使得氨氮無法被降解成硝酸鹽及亞硝酸鹽而在水體繼續存在。

反應槽進流添加硫酸銅會使得底泥的銅濃度增加。底泥含銅量與進流濃度

以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(1/2)

相關。底泥中有機質可能與金屬離子有所反應，產生螯合等固定作用，因此有機質的多寡會影響銅於底泥中對生物的毒性。然而有機質含量的測定發現整體實驗其差異並不明顯，進出流硫酸銅的添加並沒有使反應槽底泥的有機質有明顯的增加或減少。因此有機質的影響於本次實驗每組應無太大差異。

5.4 次世代定序

以 CCA 典型關聯分析顯示金屬銅對微生物族群組成有一些影響之相關性，但整體而言並不十分明顯，因此，以全體族群分析可能較不適用於單一污染源。然而，Aeromonadaceae, Burkholderiales_incertae_sedis, Caldilineaceae, Chloroflexi, Firmicutes, Planctomycetaceae, Pseudomonodaceae, 及 Xanthobacteraceae 重複出現在現場溪中底泥、溪水、及工廠放流水具有高濃度金屬銅的樣品中，有機會成為銅污染之普遍性指標判斷菌群。

以硫酸銅馴養底泥之反應槽菌相分析，得出 *Thiobacillus*, *Methylobacter*, *Mycobacterium*, *Longilinea*, 及 *Methylocystis* 等菌屬消長與反應槽銅添加相關，然而比較老街溪底泥樣品菌相、銅含量及水中銅濃度之相關性，僅有 *Methylobacter* 和 *Methylocystis* 其與現地銅濃度有中度相關。此仍需要後續增加不同現地樣品確認其消長做為指標判斷菌屬之可能性。

由 CCA 典型關聯性分析中，所有樣品總和與銅濃度相關可篩選出 19 菌科，比對實驗室底泥反應槽中菌相變化，其中 5 科 Burkholderiaceae, Hydrogenophilaceae, Methylophilaceae, Chitinophagaceae, 及 Flavobacteriaceae 等與空白組相較變化較大，最有機會以其消長比例成為判斷硫酸銅暴露之菌科。

章節摘要：

本章節針對本計畫所有工作成果以 5.1 計畫完成進度、5.2 現地採樣、5.3 反應槽和 5.4 次世代定序這三項目進行工作成果匯整並歸納結論。

六、建議事項

	理由	建議	主辦機關	協辦機關
立即可行建議	1. 實驗結果發現現地採樣與底泥模擬反應槽其與微生物族群之間的關係，以及環境因素影響微生物族群分析得到的結果。	1. 本計畫研究結果可供後續河川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	國立臺灣大學
中長期建議	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。	1. 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	國立臺灣大學
	2. 除了計畫主要研究之微生物的族群構成之外，其它如酵素、基因也與重金屬影響有密切關係。	2. 如進一步探討與金屬轉化相關之酵素(如氧化酶 oxidase 或還原酶 reductase 等)或其基因，應可更精準推測環境樣品是否長期受重金屬之污染，有助於建構污染狀況之概念模型。	行政院環境保護署環境檢驗所	國立臺灣大學

章節摘要：

本章節針對本計畫提出立即可行建議及中長期建議。

參考文獻

- Altimira, F., C. Yáñez, G. Bravo, M. González, L. A. Rojas and M. Seeger. 2012. "Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile." BMC Microbiology 12(1): 193.
- Besaury, L., B. Pawlak and L. Quillet. 2016. "Expression of copper-resistance genes in microbial communities under copper stress and oxic/anoxic conditions." Environmental Science and Pollution Research 23(5): 4013-4023.
- Castine SA, Bourne DG, Trott LA, McKinnon DA. 2009. "Sediment microbial community analysis: Establishing impacts of aquaculture on a tropical mangrove ecosystem." Aquaculture 297:91-98.
- Costa PS, Reis MP, Ávila MP, Leite LR, de Araújo FMG, Salim ACM, et al. 2015. *Metagenome of a Microbial Community Inhabiting a Metal-Rich Tropical Stream Sediment.* PLoS ONE 10(3): e0119465 .
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119465>
- Dean, A. P., S. Lynch, P. Rowland, B. D. Toft, J. K. Pittman and K. N. White. 2013. "Natural wetlands are efficient at providing long-term metal remediation of freshwater systems polluted by acid mine drainage." Environ Sci Technol 47(21): 12029-12036.
- Dell'Amico, E., M. Mazzocchi, L. Cavalca, L. Allievi and V. Andreoni. 2008. "Assessment of bacterial community structure in a long-term copper-polluted ex-vineyard soil." Microbiological Research 163(6): 671-683.
- Gilbert, JA., Jansson, JK., Knight, R. 2014. "The Earth Microbiome project: successes and aspirations." BMC Biology, 12, 69.
<http://doi.org/10.1186/s12915-014-0069-1>
- Gillan DC, Danis B, Pernet P, Joly G, Dubois P. 2005. "Structure of sediment-associated microbial communities along a heavy-metal contamination gradient in the marine environment." Applied and Environmental Microbiology 71(2):679-690.
- Illegheems K, De Vuyst L, Papalexandratou Z, Weckx S. 2012. "Phylogenetic analysis of a spontaneous cocoa bean fermentation metagenome reveals new insights into its bacterial and fungal community diversity." Plos One 7(5): e38040.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038040>
- Jie, S., M. Li, M. Gan, J. Zhu, H. Yin and X. Liu. 2016. "Microbial functional genes

- enriched in the Xiangjiang River sediments with heavy metal contamination.*" BMC Microbiol 16(1): 179.
- Kuo DHW, Robinson KG, Layton AC, Meyers AJ, Sayler GS. 2006. "Real-time PCR quantification of ammonia-oxidizing bacteria (AOB): solids retention time (SRT) impacts during activated sludge treatment of industrial wastewater." Environmental Engineering Science 23(3):507-520.
- Kuo DHW, Robinson KG, Layton AC, Meyers AJ, Sayler GS. 2010. "Transcription levels (*amoA* mRNA-based) and population dominance (*amoA* gene-based) of ammonia-oxidizing bacteria." Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 37:751-757.
- Kuo HW, Huang CY, Chang CN, Lee PL, Chen YW, Huang CF, Chang HH, Tang YH, Zeng SZ, Li GY, Lin CR, Chen LZ. 2016. "Identification of diverse bacterial communities for potential bio-aids capable of troubleshooting for wastewater biological treatment processes." International Journal of Environmental Science and Technology Doi: 10.1007/s13762-016-1176-z.
- Magalhaes, C. M., A. Machado, P. Matos and A. A. Bordalo. 2011. "Impact of copper on the diversity, abundance and transcription of nitrite and nitrous oxide reductase genes in an urban European estuary." FEMS Microbiol Ecol 77(2): 274-284.
- Nelson, D. and L. E. Sommers. 1982. "Total carbon, organic carbon, and organic matter." Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties(methodsofsoilan2): 539-579.
- Peplow, D. and R. Edmonds. 2005. "The effects of mine waste contamination at multiple levels of biological organization." Ecological Engineering 24(1-2): 101-119.
- Pereira LB, Vicentini R, Ottoboni LMM. 2015. "Characterization of the core microbiota of the drainage and surrounding soil of a Brazilian copper mine." Genetics and Molecular Biology 38:484-489.
- Sun, S. J., J. Xu, S. G. Dai and X. Han. 2006. "Influences of copper speciation on toxicity to microorganisms in soils." Biomed Environ Sci 19(6): 409-413.
- Wakelin, S. A., G. Chu, R. Lardner, Y. Liang and M. McLaughlin. 2010. "A single application of Cu to field soil has long-term effects on bacterial community structure, diversity, and soil processes." Pedobiologia 53(2): 149-158.
- Ward N. 2006. "Minireview: New directions and interactions in metagenomics research." FEMS Microbiol Ecol 55: 331-338.
- Yin H, Niu J, Ren Y et al., 2015. "An integrated insight into the response of

sedimentary microbial communities to heavy metal contamination." Scientific Reports 5:14266.

Zhao, J., X. Zhao, L. Chao, W. Zhang, T. You and J. Zhang. 2014. "Diversity change of microbial communities responding to zinc and arsenic pollution in a river of northeastern China." Journal of Zhejiang University. Science. B 15(7): 670-680.

Zhang MJ, Huang FK, Wang GY, Liu XY, Wen JK, Zhang XS, Huang YS, Xia Y. 2017. "Geographic distribution of cadmium and its interaction with the microbial community in Longjiang River: risk evaluation after a shocking pollution accident." Scientific Reports 7:227.

行政院環保署全國環境水質監測資訊網，<https://wq.epa.gov.tw>

章節摘要：報告所參考及引註之書籍、期刊及各項資料。

以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(1/2)

附錄

附錄一 評選會議意見及廠商回覆表

行政院環境保護署環境檢驗所委託研究計畫「以菌群分布作為鑑識

污染源技術建立(1/2)」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)
(一) 吳俊宗委員 1. 本計畫是否會對底泥樣本進行化學分析來與菌落分析作比對，計畫結果是定性或定量指標？ 2. 不同之重金屬是否會相互干擾而使結果有所偏差？ 3. 重金屬在環境中會有不同形態(species)，此計畫之鑑識結果與此形態是否有關？專一性如何？	1. 底泥物化特性將同時分析，計畫成果為定性指標，現今微生物技術對於非微生物基質類污染物較難進行污染程度評估定量。 2. 不同重金屬可能會互相干擾，因此將比較實驗室培養(僅添加硫酸銅)及現地採樣結果。。 3. 銅的不同型態可能影響，預期影響較高的為離子態，氧化銅或銅原子因水溶性低可能影響較小(生物有效性低)。若實驗數據分析需要，將對底泥進行不同樣態銅的分析。
(二) 李俊福委員 1. 三位主持人之責任分工請具體評述。	1. 計畫總主持人負責研究實驗規劃、以及反應槽培養、水質及底泥物化特性及菌相分析、數據統整等；共同主持人(一)于昌平教授負責污染場址採樣比較及菌相分析；共同主持人(二)郭獻文教授負責比較分析反應槽培養中及場址內菌相差異。

2. 反應槽添加未受污染底泥之來源、組成為何？ 3. 選取主要河川探討上、下游菌相指標(污染)之具體執行方式說明不足。 4. 硫酸銅濃度為水質濃度或底泥濃度？二者關聯性如何？	2. 未受污染底泥將已先採取指定污染場址(老街溪)上游之底泥檢測其重金屬濃度，若符合標準，將以此做為未受污染底泥。若無法在目標和川取得未受污染底泥，將以其他較低污染之河川或合成底泥(OECD218)取代。 3. 於研究計畫書中補充。 4. 硫酸銅濃度將以水中濃度為主，連續流培養實驗將定時採樣檢測水中及底泥中濃度。
(三) 柳家瑞委員 1. 人事費編列 3 位主持人每月各 1 萬的費用，但未說明 3 人的任務分工，請說明補充；分工有口頭報告請納入。 2. 模擬底泥為何？實場底泥場址由環檢所提供，是只要受銅污染河川底泥即可？只需一個樣品嗎？亦請說明底泥樣品將分析物化特性及那些？	1. 如李俊福委員意見回復。 2. 反應槽底泥預期為老街溪上游未受污染底泥，若未能成功取得未受污染底泥，將以其他溪流或合成底泥(OECD218)取代。實地將以流域長度分段取樣，預計取底泥及水樣品各 10 個，分析總重金屬、菌相。我們並將分析水體及底泥理化性質，包含水樣中銨態氮、硝態氮、磷酸鹽及總有機碳。採樣站位水體的溫度、導電度、pH、溶氧等參數現場使用多參數水質分析儀現場測定。沉積物擬測定粒徑分布、pH、導電度、銨態氮、硝態氮和磷酸鹽。底泥中碳氮硫元素分析測定使用元素分析儀進行分析。

3. 模擬底泥試驗僅提及用 300 mg/L 硫酸銅一種濃度，如僅 1 濃度如何建立相關性，如 1-3 節(四)、(五)研究都採多種濃度？ 4. 預定進度口頭報告分項更細，現地採樣也有提早更合理，請納入計畫內容。	3. 此研究主要以「菌群」組成 (community profile)在污染物有無狀況下的異同的比較，並非預期建立常見「劑量—反應」關聯。也與 1-3(四)、(五)等研究在分析上不同。 4. 現地採樣計畫如下：具體採樣河川及位點擬合環檢所討論後根據實際情況決定。記錄站位元 GPS 參數(同時在地圖上標註)。用帶吊繩的水桶採及表層水。所有水樣均裝入放有冰塊的保溫箱。標記上站位、日期、採樣批次，帶回研究所後，當天完成過濾，按不同測定項目分裝凍存。其中 150ml 表層水，加入 3ml 硝酸，最終濃度 2%，Ph1~2。標記上站位、日期、採樣批次後立即冷藏，待後續測定 TOC。微生物分析水樣需求 3L 水樣(過濾三張濾膜)，使用抽氣磊，先經過 20 μ m 紗絹預過濾水樣，然後用 0.22 μ m 聚碳酸酯濾膜(Millipore 公司)過濾收及浮游態微生物；標記上站位、日期、採樣批次後用錫箔紙包好立即凍存。表層底泥用抓斗式採泥器採集，置於 50ml 無菌離心管。樣品帶回實驗室後，除應用於模擬底泥環境連續流反應實驗，其餘置於-80°C 冰箱保存。
--	---

(四) 巫月春委員 1. 河川底泥除標的物硫酸銅外，其他污染物對微生物菌群分布之影響為何？其他銅化物之影響為何？ 2. 模擬底泥環境之條件為何？例如水中硫酸銅濃度為何？有幾種濃度？底泥中銅濃度？底泥本身之物化性質、覆蓋水循環頻率等 3. 工作內容 2 及 3 之規劃執行方式請補充詳細執行方式。	1. 污染添加物為硫酸銅，但硫酸銅在水中應為解離態的銅離子，檢測時將以總銅(包含其他銅化合物)為主。 2. 模擬底泥環境為 20°C 下培養，進流硫酸銅為 300mg/L，底泥將取自環檢所提供場只找尋未受污染河段底泥，覆蓋水為連續流，不循環，水力停留時間為 8 小時。 3. 於研究計劃書中補充。
(五) 楊喜男委員 1. 環境底泥污染物可能多種類，如重金屬、有機物等，如何確認所篩出之俊向可做為重金屬之污染源鑑定？ 2. 次世代定序分析之底泥前處理如何處理？ 3. 本計畫成果如何轉移給環檢所？是否有安排期程？	1. 此研究第一年為比較「菌相」在有、無硫酸銅接觸下之差異，將不進行篩菌。第二年研究可能針對細胞表面 copper pump protein 表現追蹤是否可以此作為篩選標的菌株方法。 2. 底泥採樣後將總核酸萃取出後經純化後進行 PCR 放大 V1V3 region 後以高通量序列分析。 3. 此研究若可成功獲得菌相特性對於銅污染之檢測方法，將於期末移轉於環檢所。

附錄二 期初工作會議意見及廠商回覆表

行政院環境保護署環境檢驗所委託研究計畫「以菌群分布作為鑑識

污染源技術建立(1/2)」期初工作會議廠商回覆意見表

討論意見	廠商意見回復 (國立臺灣大學)
1. 報告內容中對於模擬底泥反應槽及次世代定序等方法情執行單位再儘量詳述說明	1. 遵照辦理。
2. 有關後續各項資料庫與污染源鑑識相關性分析，請執行單位辦理技術轉移。	2. 遵照辦理。
3. 後續將進行實驗分析優勢菌群及功能性基因等，因數據量龐大，請掌控制執行進度。	3. 遵照辦理。

以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(1/2)

附錄三 期中審查會議委員意見及廠商回覆意見表

行政院環境保護署環境檢驗所委託研究計畫「以菌群分布作為鑑識
污染源技術建立(1/2)」期中審查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)
(一) 吳俊宗委員 1. 未來擬建立之菌群分佈主要會以定性或定量資料為主？ 2. 有些表格之數據的有效位數宜修正，如 p36、51、53 等。 3. 36-37 頁內之 COD 值較高，是否係因海水樣本導致，請查核。 4. 不同菌群因應金屬污染時，其基因表現有否共通性？或同一菌種對不同重金屬污染其基因(抗性或功能性)有否共通性？ 5. 文獻引用之格式宜修正為一致。 6. 未來是否會對菌群對重金屬污染之反應時間及污染後持續多久可檢測出菌群之表現。	1. 感謝委員提點。菌群分析將以定性為主，並以微生物族群組成概念，利用百分比組成呈現樣品中菌群組成。 2. 感謝委員指正，已修正報告書圖表。 3. 感謝委員指正，COD 值較高者為近出海口之點位，往後將採用適合高濃度鹵離子水樣的分析方法，對照比較以釐清原因。 4. 謝謝委員意見。目前找到的文獻針對同一菌群對應同一重金屬污染為主，不同重金屬污染的表現可能不同，將會進行文獻蒐集。 5. 感謝委員指正，會在之後期末報告進行修正。 6. 謝謝委員意見，之後定序結果出來會以此為方向進行探討。
(二) 李俊福委員 1. 請將本計畫評選意見彙整於附錄中。 2. 第三章研究方法應刪除「擬、將」等字。 3. 第二章文獻回顧部分成果應彙整列於第四章中(工作內容有文獻蒐集)。	1. 感謝委員指正，已將評選意見彙整于附錄中。 2. 感謝委員指正，已進行修正。 3. 感謝委員指正，會在之後期末報告將文現回顧部分成果彙整於期末報告中。

4. p49 工廠放流水抽取 DNA 濃度範圍應為 185.16 至 51.57 之間。	4. 感謝委員指正，已進行修正。
5. 底泥重金屬含量相關標準比較建議使用底泥上、下限值(p51)。	5. 感謝委員指正，已修正報告書圖表。
6. 添加硫酸銅(反應槽)水質 pH 變為 5 是否影響實驗結果(p56)，加老街溪水意義何在？	6. 謝謝委員意見。水質 pH 改變的確可能會影響底泥之菌群分佈，之後菌群定序結果會與文獻進行比
7. 添加 CuSO ₄ 600ppm 但實測SO ₄ ²⁻ 接近 1000ppm，是否來自原水(p36)之SO ₄ ²⁻ ？	7. 謝謝委員意見。實驗方法有寫到添加 CuSO ₄ 的劑量是以銅為單位，600ppm 銅為單位的 CuSO ₄ 約為 9.45 莫耳/L，SO ₄ ²⁻ 的含量約為 908.15ppm，因此進出流SO ₄ ²⁻ 的含量應還是以硫酸銅的添加為主。而原水的SO ₄ ²⁻ 含量應為空白組出入流之SO ₄ ²⁻ 測值，約為 30ppm。
8. 添加不同濃度之 CuSO ₄ 之底泥銅濃度隨時間改變之原因為何？三千多 ppm。	8. 謝謝委員意見。底泥銅濃度增加主要應該是進流中的銅產生與底泥中之有機質結合、沉澱等反應而累積於底泥中，因此造成底泥銅濃度隨著時間而改變。
(三)柳家瑞委員	
1. 符合計畫進度。	1. 感謝委員肯定。
2. 進度表「實際執行情形」欄，請加量化敘述，如文獻篇數、樣品各種類數量及檢驗品項等。	2. 感謝委員指正，已進行修正。
3. 模擬底泥反應槽未見採樣點說明、水量及流速？水係循環或曝氣否？	3. 感謝委員指正，已補充修正。
4. 模擬底泥的水樣及底泥重金屬分析用 AA 而老街溪採樣用 ICP-OES，是否結果可比較性符合？	4. 謝謝委員意見，使用 AA 為量測單一金屬濃度，因反應槽濃度較高。使用 ICP-OES 是為同時量測多種重金屬濃度，兩者皆為測量重金屬濃度因而能比較性符合。

以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(1/2)

5. 老街溪水值、底泥監測文獻加強，以幫忙判斷污染性質來源，如可加強工廠放流水監測數據，尤其是重金屬及銅排放較佳。	5. 謝謝委員意見，文獻資料將於期末報告書中補充說明。
6. 底泥重金屬測值以土壤管制標準為比較對象而非底泥品質指標上下限或文獻底泥影響微生物菌群的數字原因？	6. 感謝委員指正，底泥重金屬的參考標準值已改為底泥品質指標上下限。
7. 反應槽添加硫酸銅導至 pH 降低是否會影響菌群及有無控制方法？	7. 謝謝委員意見，pH 降低的確可能會影響菌群，目的是為了模擬硫酸銅於放流水暴露。
8. 反應槽進出流中含銅量均低於配製值，且進入流差異不大，而且進流水產生沉澱，請問沉澱部分是否含銅？是否影響底泥含銅均勻性，採樣如何避免影響？	8. 謝謝委員意見，從含銅量低於配製值來看，進流水沉澱部分的確有含銅的可能性，從添加劑量與進流測值相差計算來看，添加 150ppm 平均約相差有 41.9ppm；添加 300ppm 平均約相差有 51.1ppm；添加 600ppm 則平均約相差有 58.2g。沉澱應該會以累積再底泥表面為主，而底泥採樣時是把整瓶反應槽的底泥倒入採樣袋中進行混和，以整瓶為單位故應能降低不均勻性造成的影響。
9. 缺反應槽進、出水中硝酸鹽變化圖？	10. 謝謝委員意見，使用 IC 進行硝酸鹽的測定時，由於硫酸銅的添加使得硫酸根過高必須稀釋才能上機測量，稀釋過後除了硫酸根以外無法測量到其它陰離子濃度。而環檢所提供的水中硝酸鹽氮檢測方法—分光光度計法會因為河水中的有機質過高產生干擾而無法測量；水中亞硝酸鹽氮檢測方法—分光光度計法則因為添加的銅過高而產生干擾。故因此只測量空白組中的硝酸鹽及亞硝酸鹽的變化。
(四) 巫月春委員	
1. 反應槽之各項控制條件之設計宜加以說明，例如流速。	1. 感謝委員指正，已補充修正。反應槽的進流流速為 1mL/min，水力停留時間約為 4 小時。

2. 河川工廠放流水口之底泥菌相與反應槽之菌相是否可以比較？尤其 Cu 超過標準的位置底泥。 3. 工廠放流口之菌相可否與工場污水處理廠或廠內污泥或底泥之菌群做比較？ 4. COD 檢測氯鹽過高(大於 200mg/L)檢測方法可能會有干擾。	2. 謝謝委員意見。等之後定序結果出來後會將工廠放流水口底泥菌相與反應槽之菌相進行比較。 3. 感謝委員建議，本年度先以分析水樣中金屬濃度及其菌相變化為主，本意見將做為後續計畫執行之參考。 4. 感謝委員指正，未來遇到氯鹽濃度高之樣本，將採用適合高濃度鹵離子水樣的分析方法。
(五)楊喜男委員 1. 河口因漲退潮之影響，菌群分佈應會與中上游淡水環境差異很大，河口底泥又是污染匯集處，如何去解析兩者影響？ 2. 探討菌相消長與重金屬之相關性，而老街溪污染種類不單單只有重金屬，如何去評析？ 3. 後續 NGS 基因定序後數據龐大，再加上水質底泥資料也不少，後續如何以統計方式解析？ 4. 表 2-1 中優勢微生物族群是否是重金屬特有分解菌？如不是這些族群如何應用於重金屬污染之判斷？	1. 謝謝委員意見，分析菌群分布時，同時會將水樣物化性質及樣本污染物濃度一併納入考量，交叉比對出會受特定污染物影響的特定菌群。 2. 謝謝委員意見。老街溪污染的確不只有重金屬，故因此以模擬底泥反應槽控制變因，並與現地採樣進行比較以利評析。 3. 感謝委員提點。NGS 高通量定序之序列整理主要將以 Qiime (Quantitative Insights Into Microbial Ecology)平台中之應用生物資訊工具加以整理與分析，菌群與環境條件之相關性將利用 CCA (Canonical Correspondence Analysis) ordination 分析。 4. 感謝委員提點。微生物大多具有多重功能，包括重金屬相關的氧化/還原/累積等。本年度計劃目標是探討受重金屬污染衝擊後河川底泥終微生物菌群之變化，是否能應用於重金屬污染判斷需待結果分析後加以評估。另外，於後續計畫中進一步透過宏基因定序分析與重金屬相關之功能基因，應可更確認重金屬之污染。

以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(1/2)

5. 評選會議及第一工作報告中委員意見回復情形，請補列。	5. 感謝委員指正，已進行補列。
------------------------------	------------------

附錄四 期末審查會議委員意見及廠商回覆意見表

行政院環境保護署環境檢驗所委託研究計畫「以菌群分布作為鑑識
污染源技術建立(1/2)」期末審查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)
(一)吳俊宗委員 1. P13 圖 3-1 太小，且無周遭地理位置標示。 2. P50、P63 等表內 DNA 數值是否為單一分析值，可否用統計誤差值表示之。 3. PX V「制」應為「治」，P1 最後一行有重複句。 4. 建議事項宜修飾成委託單位參酌之事宜。 5. 所測定之水質參數中，那些因子可能是影響菌群定性出現較明顯而與銅汙染有相關？。 6. P68 圖 4-25 中第 35 天有 PO₄ 上升之情形，此是否與菌相變動有關？ 7. P4~P9 文內之文獻引用格式宜再修飾。 8. 由次世代定序呈現之菌相因銅而變化之結果是否為地域性？如何找出能較廣泛應用之菌相變化？ 9. 參考文獻(P106~P108)之格式宜修改為一致。	1. 感謝委員指正，已修正地圖呈現方式，並加入周遭環境標示。 2. 感謝委員意見，DNA 濃度數據記錄方式為同一樣本讀取兩次以上，待數值穩定後，取最新量測者填列，報告上為單一分析值。往後將改進記錄方式，以統計誤差值表示。 3. 感謝委員指正，已進行修正。 4. 感謝委員指正，已進行修正。 5. 謝謝委員意見，以反應槽測定之結果來看，氨氮變化明顯與銅汙染有相關，之後若有時間能以此對菌群進行分析 6. 謝謝委員意見，底泥反應槽之進流水是取用老街溪現地之河水，因此 PO₄ 上升原因較可能為現地河川水質之變化影響，因當時採樣之河川水磷酸鹽濃度已較高。 7. 感謝委員指正，已進行修正。 8. 謝謝委員意見，此研究僅針對老街溪因此無法確定菌相之呈現是否僅為地域性，若能增加不同河川之現地樣品應能使此研究結果更有代表性。 9. 感謝委員指正，已進行修正。

(二)柳家瑞委員 1. 參考文獻請完整列出所有文內引用的。 2. 現地樣品的菌相及金屬含量等與文獻比較討論較未見。 3. 請說明彙整全國河川底泥、土壤資訊，建立完善微生物生態及污染物資料庫的判斷依據及意義及採樣分析規劃。 4. 對已篩選出來的菌群、菌科如何找出可能與工廠汙染指標相關的菌種，及菌相消長變化建立污染性？ 5. 反應槽底泥濃度(500-3500mg/kg)與現地樣品(23-573mg/kg)的可比較性？ 6. 錳的濃度與微生物相關性？ 7. 工廠放流水的菌相指標？多樣性降低的可比較性？如何選擇實務上的污染指標？	1. 感謝委員指正，已進行修正。 2. 感謝委員意見，由於計畫時間有限而未能將分析結果與文獻進行比較討論，之後有機會將繼續進行比較探討。 3. 每條河川底泥、土壤的組成因地域條件而不盡相同，污染物也不一定一樣，因此微生物的組成也有可能不同。若能找出類似污染條件下有相同的菌群消長變化，便能落實研究結果且並不僅限於地域性。因此提供給主辦機關作為建議。 4. 未來可從工廠排放口汙泥做菌相分析以找出是否有篩選出之菌群、菌科並分析其消長變化，若能再針對污染物濃度變化與可能菌群數量關聯性進行分析便能建立污染鑑定的可行性。 5. 感謝委員意見，實驗設計時希望能在研究期程內找出明顯受到銅污染的菌群變化而以高濃度的銅做為添加濃度，未來可建議以較低濃度做為銅添加濃度以符合現地狀況。 6. 感謝委員意見，由於本研究針對銅污染進行探討而忽略了錳於現地探測到的高濃度，未來有機會也會以錳進行分析探討。 7. 工廠放流水為最直接污染來源，但由於菌相變化快速，可能因為採樣時間與污染排放時間錯開而無法找出污染菌相指標。若能直接採集工廠排放口汙泥進行菌相分析會是更好的選擇。會影響多樣性降低的因素太多，不太適合針對單一污染物作為污染指標。之後如對篩選出的菌群進行濃度變化關聯性研究，並結合更詳細現地採樣資料，便能建立污染鑑定的可行性。
--	--

以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(1/2)

(三)劉正哲委員 1. 底泥菌相不會立即改變(放流水或因毒性高，菌相較簡單，變化也即時)，因此若要應用於鑑定標準，或需要建立背景值，長期 monitor 再對應汙染時程，或可看出較明顯變化差異？ 2. 實驗中用於 NGS amplication 之放大區段是 V1~V3 或 V3~V4 需確認(結果終看應為 V3~V4)，這會影響定序看到的菌項結果？ 3. 定序的 database 本研究應用 RDP 是否有特定目的(因為 PDR 只能看到 genus)？另 16S 尚有 Silva 及 Greengene 可參考，或許分析菌相稍有不同建議可參考？ 4. 內容(P62~P63)提及粒徑大小與微生物生長數量相關，但就表 4-13 對應表 4-12 來看，似乎兩者無正相關，這部分是否可確認？ 5. 微生物相目前結果僅細菌菌相，或許可參考列入 fungi 這目前文獻上仍少見，或許加入輔助可為鑑定發展潛力？。 6. 無論底泥或水樣抽取 DNA，其中可能包含浮游生物及其他生物核酸，或許不能代表細菌(微生物)量，建議納入 16S 片段分析才能俱代表性。	1. 謝謝委員意見，放流水菌相可能與污水處理流程相關。如有機會分析污水處理單元中菌相，配合放流水菌相，有可能成為指標。底泥菌相因停留時間長，適合做為追蹤長期汙染排放的生物指標。 2. 感謝委員指正。PCR 是由委託之定序廠商利用 341f/805r 引子對 V3-V4 片段進行放大，並進一步訂序之。原期中報告回覆意見提及 V1-V3 為先前規劃自行於學校實驗室進行 PCR 放大再送樣定序所選用之目標片段。隨後因計畫時程緊迫，改由定序廠商統一進行之。 3. 感謝委員建議。應用 RDP database 並無特定目的，RDP database 為 16S rRNA 基因資料庫之始祖之一，並經多次資料更新，為根據基因資訊鑑定微生物最被普遍使用之資料庫之一。由於本次樣品數量較多，加上時程緊迫，並未利用其它資料庫(如 Greengene 或 Silva)比對，爾後若有機會亦可以其它資料庫加以比較。 4. 除了粒徑大小外，尚有其他因子會影響微生物生長數量，例如河川底泥中有機物濃度或金屬濃度等。僅以粒徑大小和微生物生長量做比對，於本實驗尚無法看出正相關性。 5. 謝謝委員意見，由於現今細菌菌相的資料較為完善而沒有考慮 fungi 這部分。但研究顯示抗重金屬的真菌種類為數不少，未來若加入作為分析的標的可能使研究更加完善。 6. 謝謝委員意見，未來會參照委員意見將 16S 片段定量分析納入考量。
(四)巫月春委員 1. 請提供下一年度工作內容之具體建議。	1. 謝謝委員肯定，會在與主辦機關進行討論過後提出。

2. 部分內容敘述前後不一致，例如水質金屬分析方法有 AA 及 ICP 兩個方法。 3. 底泥重金屬分析方法參考環保署底泥分析方法？	2. 謝謝委員意見，使用 AA 為量測單一金屬濃度，因反應槽濃度較高。使用 ICP-OES 是為同時量測多種重金屬濃度，兩者皆為測量重金屬濃度因而能比較性符合。 3. 感謝委員建議，之後如繼續分析底泥會參考使用環保署廢棄物及底泥中金屬檢測方法—酸消化法來進行檢測。
(五)楊喜男委員 1. 期末報告格式請以契約規範修正 2. 老街溪上下游各站抽取出 DNA 總量差異，有何特別意義嗎？ 3. 次世代定序 QA/QC 之方式，是否有合理之誤差值？是否有文獻可參考？ 4. 如只以放流水及模擬槽銅相關之菌相去作為河水銅污染之指標可行性高嗎？如不行未來有何解決之構想嗎？	1. 感謝委員指正，已依契約規範進行修正。 2. DNA 濃度主要作為後續 PCR 及可否接續製作次世代定序 library 之品質篩選參考；除此之外亦可觀察到，就同樣單位(250 mL)的水樣，多數下游採樣點之 DNA 濃度較上游高等現象。 3. 感謝委員意見。次世代定序結果會先經品質篩選(quality trimming)，去除過短序列、品質分數(quality score, Q)不理想序列、缺乏適配子或引子之序列、或正反向非配對之單一序列等。另外，每一樣品總定序量也會參考，並根據序列數量及 OTUs 之相關曲線判斷定序數量是否足夠。 4. 放流水及河水菌項變化快速，除非密集採樣找出變化趨勢否則很難作為污染之指標。檢測工廠排放口底泥之菌相配合模擬槽相關菌相分析或許為未來可行之構想。

以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(1/2)

5. 請補充 OTUs 等重要專業項目之相關背景及文獻說明。	5. 感謝委員提點。OTUs 指操作分類單元(Operational Taxonomic Unit)，是將序列相近之序列(如>98%相似度)歸類為一個 OTU 的一種菌種分類方式。這個以分叢概念分類的名稱最早由 Sokal RR 和 Sneath PHA(1963)所提出，隨後並習慣被用於微生物之鑑定分類。(Robert R. Sokal und Peter H. A. Sneath, Principles of Numerical Taxonomy 1. Aufl. XVI, 359 S., 38 Abb., 21 Tab. San Francisco and London 1963: W. H. Freeman and Company 60 s)
---------------------------------------	--

以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(1/2)

附錄五 科技計畫成果效益事實報告表

106 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、郭獻文

計畫名稱『以菌群分布作為鑑識污染源技術建立』

審議編號_____

計畫期程 106 年 03 月至 106 年 12 月

全程經費 貳佰壹拾萬元 年度經費 _____ 億 _____ 千元

執行機構 國立台灣大學環境工程學研究所

貳、計畫目的與預期成效

1. 蒐集國內外利用微生物菌群分布與污染來源之相關文獻。
2. 分析河川底泥中微生物菌群河川底泥中微生物菌群受到污染物後所衍生的變化。
3. 以菌群分析結果評估鑑識污染源之可能標之可能標的菌株

參、計畫目的主要內容

1. 蒐集國內外針對污染源鑑識、菌群分布及污染物與微生物生態變化之文獻資料。
 - (1) 蒐集重金屬污染之底泥環境中，微生物族群變異與分佈相關文獻。
 - (2) 蒐集遭受重金屬污染之底泥環境中，微生物功能性基因表現變化等相關文獻。
2. 以實驗室模擬底泥環境之反應槽，連續進流方式模擬河川底泥生態，並添加標的污染物，以高通量定序方式分析底泥中微生物菌群組成變化並對並對照控制組獲得主要變化主要變化菌群，評估與屋污染物之相關性。

(1)以高通量次世代定序技術，探討水中硫酸銅對底泥環境中微生物結構變化及菌群分佈的差異性。

3. 選取一主要污染河川，於河段之上、下游取樣，分析其菌相變化，並評估標的菌株作為污染鑑識之可能性。

(1)探討水中硫酸銅對於底泥中微生物生態變化之影響，並由資料結果篩選出差異菌群。

(2)比對河川高污染及低污染中微生物生態差異，並評估以此差異作為污染鑑識之可能性。

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
以菌群分布作為鑑識污染源技術建立	原訂	4	1	2	0	1
	實際	3	1	2	0	7
	差異	0	0	0	0	原定專任研究助理改研究生兼任研究助理
	原定					
	實際					
	差異					

伍、計畫已獲得知主要成就與成果(out put)

1. 總和現地老街溪溪水、底泥及工廠放流水具有高濃度金屬銅的樣品中，定序結果顯示 Aeromonadaceae, Burkholderiales_incertae_sedis, Caldilineaceae, Chloroflexi, Firmicutes, Planctomycetaceae,

Pseudomonadaceae, 及 Xanthobacteraceae 有機會成為銅污染指標菌群。

2. Burkholderiaceae. Hydrogenophilaceae, Methylophilaceae, Chitinophagaceae, 及 FlavobacteriaceaeI 等菌科在底泥之消長，有機會成為鑑識硫酸銅暴露之指標菌科。

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%)

提出以菌相消長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。

2. 技術創新(科技整合創新)(權重 30%)

利用次世代定序於污染源追蹤。

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，追蹤不法排放及維護環境正義。

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、博士研究生共七名

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科及菌屬，研析其在現地樣品及工廠放流水暴露的消長狀況，並在不同現地條件下驗證方法。
2. 可持續收集河川水樣、底泥微生物相資料，以利未來生態系評估。
3. 未來現地試驗可直接採取工廠放流口淤泥及管口上下游底泥比較這些物種的豐富度差異，評估硫酸銅暴露之可能性並於現地驗證。

玖、檢討會與建議

1. 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。建議彙整全國河川底泥、土壤相關資訊，以建立完善的微生物生態及環境污染物資料庫。
2. 如進一步探討與金屬轉化相關之酵素(如氧化酶 oxidase 或還原酶 reductase 等)或其基因，應可更精準推測環境樣品是否長期受重金屬之污染，有助於建構污染狀況之概念模型及擬訂污染整制之策略。
3. 因實驗室馴養環境需要以近似環境濃度培養，需時較長，才能反應出與現地相近的菌相。且次世代定序分析整理也須長時間進行，建議未來此類研究項目時程可以不受年度限制，以較長時間進行。

填表人：_____ 連絡電話：_____ 傳真：_____

附錄六 科技計畫成果效益自評表

106 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、郭獻文
計畫名稱	『以菌群分布作為鑑識污染源技術建立』
審議編號	
計畫期程	106 年 03 月至 106 年 12 月
全程經費	貳佰壹拾萬元 年度經費 億 千元
執行機構	國立台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. 總和現地老街溪溪水、底泥及工廠放流水具有高濃度金屬銅的樣品中，定序結果顯示 Aeromonadaceae, Burkholderiales_incertae_sedis, Caldilineaceae, Chloroflexi, Firmicutes, Planctomycetaceae, Pseudomonodaceae, 及 Xanthobacteraceae 有機會成為銅污染指標菌群。
2. Burkholderiaceae. Hydrogenophilaceae, Methylophilaceae, Chitinophagaceae, 及 FlavobacteriaceaeI 等菌科在底泥之消長，有機會成為鑑識硫酸銅暴露之指標菌科。

肆、計畫主要成就與成果之價值與貢獻度(out put)

提出以菌相消長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。未來此計畫研究方式可應用於發展鑑識方

法、污染源追蹤等科技幫助。此研究成果未來若能於現地試驗成功建立其可信度，並建立標準方法，追蹤不法排放及維護環境正義。

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相消長辨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，研析其在現地樣品及工廠放流水暴露的消長狀況，並在不同現地條件下驗證方法。
2. 可持續收集河川水樣、底泥微生物相資料，以利未來生態系評估。
3. 未來現地試驗可直接採取工廠放流口淤泥及管口上下游底泥比較這些物種的豐富度差異，評估硫酸銅暴露之可能性並於現地驗證。

玖、檢討會與建議

1. 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。建議彙整全國河川底泥、土壤相關資訊，以建立完善的微生物生態及環境污染物資料庫。
2. 如進一步探討與金屬轉化相關之酵素(如氧化酶 oxidase 或還原酶 reductase 等)或其基因，應可更精準推測環境樣品是否長期受重金屬之

污染，有助於建構污染狀況之概念模型及擬訂污染整制之策略。

3. 因實驗室馴養環境需要以近似環境濃度培養，需時較長，才能反應出與現地相近的菌相。且次世代定序分析整理也須長時間進行，建議未來此類研究項目時程可以不受年度限制，以較長時間進行。

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：_____

以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(1/2)

附錄七 次世代定序使用之 barcodes

本研究中次世代定序各樣品所使用的 barcodes

樣品來源	Barcode
反應槽底泥	
Sampleblank	GCTCATGA;ACTGCATA
blank2week	GCTCATGA;AAGGAGTA
blank4week	ATCTCAGG;GTAAGGAG
blank8week	GCTCATGA;CTAAGCCT
150ppm2week	ATCTCAGG;ACTGCATA
150ppm4week	ATCTCAGG;AAGGAGTA
150ppm8week	ATCTCAGG;CTAAGCCT
300ppm2week	ATCTCAGG;CGTCTAAT
300ppm4week	ATCTCAGG;TCTCTCCG
300ppm8week	ACTCGCTA;CTCTCTAT
600ppm2week	ACTCGCTA;TATCCTCT
600ppm4week	ACTCGCTA;GTAAGGAG
600ppm8week	ACTCGCTA;ACTGCATA
老街溪水樣品	
1	TAGGCATG;TCGACTAG

2	TAGGCATG;TTCTAGCT
3	TAGGCATG;CCTAGAGT
4	TAGGCATG;GCGTAAGA
4-1	TAGGCATG;CTATTAAG
5	TAGGCATG;AAGGCTAT
6	TAGGCATG;GAGCCTTA
7	TAGGCATG;TTATGCGA
8	CTCTCTAC;TCGACTAG
9	CTCTCTAC;TTCTAGCT
F1	CTCTCTAC;CCTAGAGT
F2	CTCTCTAC;GCGTAAGA
F3	CTCTCTAC;CTATTAAG
F4	CTCTCTAC;AAGGCTAT
F5	CTCTCTAC;GAGCCTTA
F6	CTCTCTAC;TTATGCGA
F7	AAGAGGCA;TCGACTAG
F8	AAGAGGCA;TTCTAGCT
工廠放流水	

以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(1/2)

F10	AAGAGGCA;CCTAGAGT
F11	AAGAGGCA;GCGTAAGA
F12	AAGAGGCA;CTATTAAG
F13	AAGAGGCA;AAGGCTAT
F14	AAGAGGCA;GAGCCTTA
F15	AAGAGGCA;TTATGCGA
老街溪底泥	
S1	GTAGAGGA;CTCTCTAT
S2	GTAGAGGA;TATCCTCT
S3	GTAGAGGA;GTAAGGAG
S4-1	GTAGAGGA;ACTGCATA
S7	GTAGAGGA;AAGGAGTA
SF2	GTAGAGGA;CTAAGCCT
SF3	GTAGAGGA;CGTCTAAT
SF4	GCTCATGA;CGTCTAAT
SF5	GTAGAGGA;TCTCTCCG
SF6	GCTCATGA;CTCTCTAT
SF7	GCTCATGA;TATCCTCT

SF8	GCTCATGA;GTAAGGAG
-----	-------------------

以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(1/2)

統一編號：EPA154106005

*「本報告係受託單位或計畫主持人個人意見，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，非經行政院環境環保署環境檢驗所同意，任何人均不得重製、仿製或其他之侵害」。