

氯烯類污染場址地下水中關鍵微生物與 基因濃度之分佈

Distribution of Key Microbes and Functional Genes in the Chlorinated Ethene-Contaminated Groundwater

國立成功大學
環境工程系
碩士生

游 漢 威

Henry Yew

國立成功大學
永續環境實驗所
助理研究員

莊 蕙 萍

Hui-Ping Chuang

國立成功大學
環境工程系
特聘教授

黃 良 銘

Liang-Ming Whang

國立成功大學
環境工程系
特聘教授

林 財 富*

Tsair-Fuh Lin

摘 要

含氯烯類化合物為地下水中最常見污染類別之一，近期所推崇具有競爭力的現地生物復育法，其關鍵因子為污染場址是否存在或適合培養出具有降解能力的微生物菌群。本研究針對台灣南部兩個受氯烯類污染場址，在 37 口監測井進行採樣、並分析目標化學物質和微生物。微生物分析結果顯示，以 SybrGreen-qPCR 法來定量樣本中總細菌和 *Dehalococcoides* 屬與氯乙烯還原性脫鹵基因(*vcrA* gene)的豐富度，地下水中具還原脫氯能力的 *Dehalococcoides* 屬約佔總細菌群的 0.0001~14.58%，其遞增或遞減趨勢以總氯烯類濃度 0.8 mg/L 為分界。而在厭氧還原脫鹵的過程中，負責中後段降解的 *vcrA* 基因數量與 *Dehalococcoides* 屬的豐富度呈正相關($R^2 = 0.72$)，並與氯乙烯濃度呈現相關性。因此，本研究評估的兩個污染場址為具有生物復育的潛力場址。

關鍵詞：氯乙烯，*Dehalococcoides* 屬，氯乙烯還原性脫鹵基因。

ABSTRACT

Chlorinated ethenes are a group of chemicals commonly found in contaminated groundwater. *In-situ* bio-remediation is a popular and competitive technology for contaminated sites, and the one of the factors to influence the effectiveness of remediation is presence of degrading microbes in the sites. This study is aimed to detect the presence of targeted chemicals and microbes in 37 wells in two sites contaminated with

*通訊作者，國立成功大學環境工程系特聘教授，70101 台南市東區大學路 1 號，tflin@mail.ncku.edu.tw

chlorinated ethenes. Results of microbial analyses with SybrGreen-qPCR showed that genus *Dehalococcoides*, which had the ability to degrade chlorinated ethene, was 0.0001~14.58% of total bacteria, and total chlorinated ethenes of larger than 0.8 mg/L may inhibit the growth of genus *Dehalococcoides*. Abundance of *vcrA* gene, capable of degradation of chlorinated ethenes to ethene, is positive correlated with the abundance of genus *Dehalococcoides* ($R^2 = 0.72$) and the concentration of chlorinated ethenes. The results of study suggested that the two contaminated sites studied have the potential for bio-remediation.

Keywords: Chlorinated ethene, Genus *Dehalococcoides*, Reductive dehalogenase.

一、緒 論

1.1 前言

近年來含氯乙烯類溶劑廣泛應用在不同工業中，因管理不當及其難分解等特性，易造成嚴重的地下水污染問題。污染場址整治技術可分為物理、化學及生物處理，其中生物整治技術具低破壞性和低成本特性，且能將污染物降解至無害物質優勢，具有相當大的應用市場價值。

現地生物整治(*in-situ* bioremediation)係藉由外來刺激來增加現地目標微生物的生長與活化其功能性基因的活性，使地下水飽和層中有機成分被生物降解的一種技術。目前常用的方式，一為直接添加生物製劑(bioaugmentation)，另一則藉由注入營養鹽和碳源來營造合適之微生物生長環境(biostimulation)，以提升微生物降解污染物效率的自然程序(盧至人，2002)。

氯乙烯類化合物的降解途徑主要分為非生物性和生物性，而在生物性的降解過程中，可依據現地氧化還原狀態和氯原子鍵結數再細分為四大類：好氧氧化、好氧共代謝氧化、厭氧氧化和厭氧還原脫氯等降解途徑。

厭氧還原脫氯反應是指在厭氧環境中還原性有機物首先被轉化為氫氣，脫氯菌群再利用氫氣將高氯鍵結的四氯乙烯(PCE)和三氯乙烯(TCE)還原至乙烷，並產生少量的二氯乙烯(DCE)、氯乙烯(VC)和乙烯(ETH) (McCarty, 1997)。其中 *Dehalococcoides* 屬下的數種菌群可合作將四氯

氯乙烯分階段地降解至乙烯(Loffler *et al.*, 2013)。

厭氧還原脫氯反應是藉由還原性脫鹵酵素進行催化作用，目前已知負責編碼(encode)此類酵素的基因有 *pceA*、*tceA*、*bvcA*、*vcrA* 及 *mbrA* (Chow *et al.*, 2010; Krajmalnik-Brown *et al.*, 2004; Magnuson *et al.*, 2000; Muller *et al.*, 2004; Sung *et al.*, 2006)，其中氯乙烯還原性脫鹵基因(*vcrA* gene)負責在氯乙烯類降解過程中將 TCE、DCE 和 VC 還原至乙烯(Muller *et al.*, 2004)。目前已知在 *Dehalococcoides* 屬中，擁有 *vcrA* 基因的菌群包含 strain VS、strain ANAS2、strain GT 和 strain 11a。

近年來，分子生物技術廣泛地應用於自然或工程環境中，定性及定量分析系統中目標微生物與其功能性基因。目前較常用的技術有菌相結構分析(clone library)、尾端限制片段長度多型性(T-RFLP)、變性梯度明膠電泳(DGGE)、即時定量聚合酶鏈鎖反應(qPCR)、螢光原位雜交(FISH)、DNA 生物晶片(DNA microarray)等。然而菌相結構分析雖可獲得完整的族群結構，但分析耗時長；而 T-RFLP 和 DGGE 多用於進行半定量的指紋譜分析；FISH 和 DNA microarray 的定量準確度及實驗技術門檻較高。qPCR 技術因其定量具有可再現性、靈敏度高的優點，廣泛應用於環境微生物族群及功能性基因的監測 (Smith and Osborn, 2009)，且因其實驗技術門檻較低，常用於監測現地污染場址中微生物的種類與數量，可做為現地生物復育工法可行性與有效性評估的依據，將有利於更進一步了解污染物在系統

或環境中消長的潛勢(Smit *et al.*, 2004)。

1.2 研究目的

本研究目的為利用 SybrGreen-qPCR 法定量位於台灣南部兩個受氯烯類污染場址中 37 個採樣點的總細菌群、*Dehalococcoides* 屬和 *vcrA* 基因的數量，配合現地水質數據，以評估污染場址未來是否有利於進行生物復育，並可藉由微生物的定量法來評估整治前中後期的成效與可行性。

二、研究方法

2.1 樣本來源

本研究地下水水樣取自台灣南部兩個受氯烯類污染場址(場址 A 和 B)，場址 A 主要是遭受氯烯類和氯烷類污染的場址，自 2013 年於規劃場址區域上下游兩端架設生物透水性反應牆(Bioscreen)，並於同年進行九個月的加藥灌注；此場址於 2015 年重新被規劃為生物復育模場試驗，進行五個月的生物整治。

場址 B 則以三氯乙烯為主要的污染物，於 2014 年規劃為生物復育整治模場，並於整治期間額外添加碳源和營養鹽來優勢培養現地微生物，促進污染物降解。研究中針對兩場址中共 37 口井的地下水進行取樣。樣品以三重方式，分別裝入 80 毫升揮發性有機物專用的棕色採樣瓶和 5 公升的微生物樣本保存瓶，以提供後續的水質與微生物分析。

2.2 氯乙烯類化合物分析

本研究採集之地下水樣本中的氯乙烯類化合物(含四氯乙烯、三氯乙烯、1,2-二氯乙烯和氯乙烯等)分析，係委託具有認證的檢驗公司，以環檢所公告之水中揮發性有機化合物檢測方法—吹氣捕捉/氣相層析質譜儀法(NIEA W785.55B)進行分析。

2.3 DNA 萃取

本研究首先將 37 個地下水水樣以 0.3 μm 的玻璃纖維濾紙(Advantec Grade GF75, 47 mm, Japan)濃縮過濾後，接著以商用套件 PowerLyzer™

PowerSoil® DNA Isolation Kit (MOBIO, CA)為基礎的改良法進行萃取後(游漢威等, 2015)，回溶並定量至 50 μl 後，並以 Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, USA)分析其濃度和純度。

2.4 分子選殖(PCR-Cloning)

本研究首先針對兩種目標菌群(總細菌群和 *Dehalococcoides* 屬)之 16S rRNA 基因和一種功能性基因(*vcrA* 基因)定量分析進行標準 DNA 模板的篩選，其專一性引子分別為 Bac338F/Bac1392R (Lane, 1991)、DHC793F/DHC954R (Yoshida *et al.*, 2005)、VcrA776F/VcrA927R (游漢威等, 2015)，而 PCR 分析條件請參閱游漢威等(2015)。實驗中將三組專一性引子所放大後的正確片段，分別與 pGEM®-T Easy Vektor 套組(Promega, USA)進行反應後，置入勝任細胞培養，再以洋菜培養進行藍白篩選培養後，隨機挑選數十個 clony 確認為具有正確目標片段的樣本再次進行培養後，委託成大基因體醫學中心進行核酸自動定序儀定序。於序列分析後，挑選數量最多、且與目標菌群相似度最高的 clony 做為後續 qPCR 分析實驗的標準 DNA 模板。

2.5 即時定量聚合酶鏈鎖反應分析(qPCR)

本研究是以 2x qPCR SYBr Mix No-ROX 實驗套組進行 qPCR 反應液配製，總反應體積為 20 μl ，並於均勻混合後搭配 LightCycler® 480 Instrument II (Roche, USA)進行 qPCR 反應，三組專一性引子中總細菌群是以 Bac907F/Bac1100R (Lane, 1991)進行定量，其反應條件請參閱游漢威等(2015)。三組引子組檢量線的分析結果彙整如表 1，而待測的樣品則以雙重複試驗搭配控制組進行分析。

三、結果與討論

3.1 現地污染場址中氯乙烯類背景濃度調查

本研究 37 個地下水樣本的氯乙烯類化合物分析結果顯示，除未測到反-1,2-二氯乙烯(trans-1,2-DCE)和 1,1-二氯乙烯(1,1-DCE)外，主要測得物質包括 PCE、TCE、cis-1,2-DCE 及

表 1 三種目標基因於 SybrGreen-qPCR 法之檢量線分析結果

Primer Name	Specificity	Efficiency (%)	R ²	Detection limit	
				(Copies/μl)	(Copies/L groundwater)
Bac907F	domain <i>Bacteria</i> 16S rRNA gene	93.87	0.99653	1.00E+02	2.32E+01
Bac1100R					
DHC793F	genus <i>Dehalococcoides</i> 16S rRNA gene	93.64	0.99828	1.00E+02	2.32E+01
DHC954R					
VcrA776F	genus <i>Dehalococcoides</i> <i>vcrA</i> gene	126.43	0.98949	1.00E+01	2.32E+00
VcrA927R					

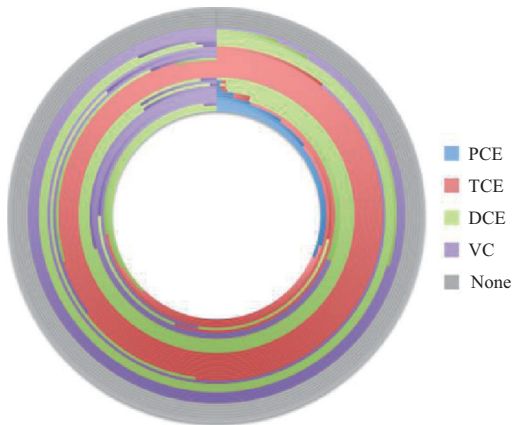


圖 1 污染場址中 37 個採樣點的氯乙烯類化合物比例分佈圖

VC。圖 1 為 37 個樣品中的氯乙烯類化合物比例分佈圖，自採樣點 1 到 37 由圓環內部向外排列。前 12 個採樣點中檢測到四氯乙烯(PCE)濃度約為 0.01~0.06 mg/L (法規標準為 0.05 mg/L)，佔氯乙烯類總量的 31.5~0.01% (由圓環內部向外)，且均檢測到另外三種氯乙烯類化合物(包含 TCE、cis-1,2-DCE 及 VC)。

採樣點 13~24 則以三氯乙烯為主，其濃度約為 0.01~0.19 mg/L (法規標準 0.05 mg/L)，佔氯乙烯類總量的 100~0.02% (由圓環內部向外)，其中 6 個採樣點只存在三氯乙烯。而採樣點 25~29 以順-1,2-二氯乙烯為主要污染物，其濃度為 0.001~4.76 mg/L (法規標準 0.7 mg/L)，佔氯乙烯類總量的 98.1~8.37% (由圓環內部向外)。此外，

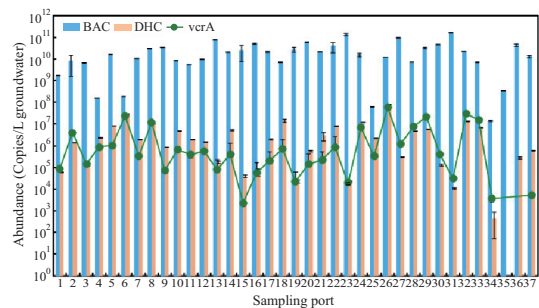


圖 2 現地污染場址地下水樣本中總細菌群、*Dehalococcoides* 屬和氯乙烯還原性脫鹵(*vcrA*) 基因的豐富度

採樣點 30 只檢測到氯乙烯，其濃度為 0.05 mg/L (法規標準 0.02 mg/L)。最後，採樣點 31~37 為位於氯乙烯類污染場址外圍，因此均未檢測到 6 項氯烯類化合物。

3.2 現地污染場址地下水樣本中脫氯菌群的調查

本研究利用 SybrGreen-qPCR 法針對台灣南部兩污染場址中三十七口井地下水樣本，進行目標菌群與氯乙烯還原性脫鹵(*vcrA*)基因的定量，其結果彙整如圖 2。三十七個樣本中總細菌群數量約為 $1.42 \times 10^7 \sim 2.73 \times 10^{11}$ Copies/L groundwater，其中 36 個樣本檢測到具有脫氯功能的 *Dehalococcoides* 屬，數量約為 $4.49 \times 10^2 \sim 1.43 \times 10^7$ Copies/L groundwater，且占總細菌群基因數的 0.0001~14.58%。在 *Dehalococcoides* 屬中不同的種(species)或株(strain)，在厭氧脫鹵反應中所負

責的階段性反應不同(如 strain PCE1 主要催化還原 PCE 至 TCE; strain FL2 主負責將 TCE 降解至 VC 等) (Löffler *et al.*, 2013)。因此可藉由現地污染場址中所檢測到 *Dehalococcoides* 屬的數量和種類來評估現地污染場址生物復育的可行性與有效性。

在現地污染場址地下水中, *Dehalococcoides* 屬的菌數出現濃度約為 $10^4 \sim 10^5$ Copies/L groundwater (Lee *et al.*, 2008), 本研究所評估的 37 口井地下水樣本中, 除了採樣口 34 和 35 較低外, 分佈於兩污染場址有五成六採樣口中的 *Dehalococcoides* 屬數量超過 10^5 Copies/L groundwater, 顯示此兩污染場址為應用生物復育工法的潛力場址。

為進一步評估在厭氧脫氯過程中易累積的二氯乙烯(DCE)和氯乙烯(VC)的降解潛勢, 本研究以氯乙烯還原性脫鹵(*vcrA*)基因做為目標檢測片段, 此基因主要負責催化三氯乙烯還原至順-1,2-二氯乙烯、氯乙烯, 至乙烯的反應過程 (Muller *et al.*, 2004), 因此可做為評估微生物是否具有二氯乙烯和氯乙烯的降解能力的指標。根據圖2的結果發現, 採樣點 35 和 36 並未檢測到 *vcrA* 基因, 比較現地化學背景資料, 此兩點亦未檢測任何氯烯類化合物。另外 35 個水樣中的 *vcrA* 基因數量則約為 $2.38 \times 10^3 \sim 5.82 \times 10^7$ Copies/L groundwater, 其中近三成五的樣本中 *vcrA* 基因數量約等同於總 *Dehalococcoides* 屬數量, 因此推測這些採樣點中的 *Dehalococcoides* 屬主要是以具有降解二氯乙烯和氯乙烯的 strain GT (Sung *et al.*, 2006)、strain VS (Lee *et al.*, 2013)或 strain KB1/VC (Duhamel *et al.*, 2004)為主。

在本研究樣品中, 由於五個採樣點位於場址污染區域外, 因此並未檢測到任何氯烯類化合物, 但仍然檢測到少量的 *Dehalococcoides* 屬和 *vcrA* 基因, 是否與現地污染歷史或是污染物傳輸路徑有關, 待後續深入研究釐清。此外, 有數個樣本中的 *vcrA* 基因數值略高於 *Dehalococcoides* 屬, 此差距可能是因為用於檢測兩組目標基因的引子組涵蓋率在未培養菌群(uncultured bacteria)的數量有差異, 或是分析上的誤差。

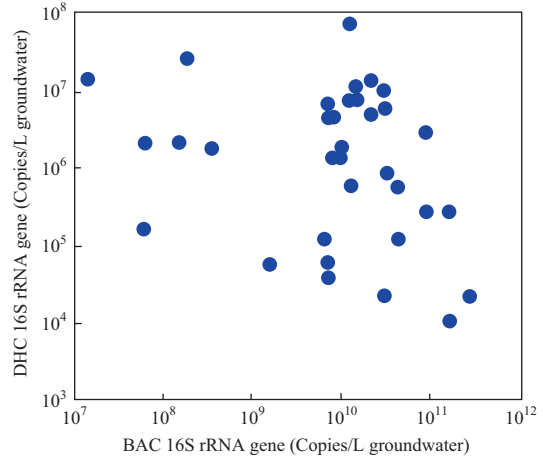


圖 3 現地污染場址中 *Dehalococcoides* 屬與總細菌群的相關性

3.3 現地污染場址中脫氯菌群與其功能性基因的相關性

為進一步了解污染場址地下水井中脫氯菌群是否為優勢族群, 本研究將各樣品中總細菌群數及 *Dehalococcoides* 屬的豐富度繪製於圖 3。在 *Dehalococcoides* 屬(DHC 16S rRNA gene)對於總細菌群(BAC 16S rRNA gene)的相關性分析結果中, 雖然兩者間並無明顯的相關性, 然而 *Dehalococcoides* 屬約佔總細菌群的 $10^{-3} \sim 10^{-4}$, 為易被優勢培養的族群。此結果與 Ritalahti *et al.* (2006)的研究結果相近, 該研究於美國長期受到氯烯類污染場址中, 檢測到 *Dehalococcoides* 屬約佔總細菌群的 3×10^{-4} 。此外, Sutton *et al.* (2015)亦觀察到相似的結果, *Dehalococcoides* 屬存在於荷蘭的氯烯類污染場址約佔總細菌群的 $10^{-3} \sim 10^{-4}$ 。

由於不同 *Dehalococcoides* 屬之 16S rRNA 基因序列相似度極高, 因此無法僅由分析 16S rRNA 基因序列所得的資訊, 來判定菌株代謝氯乙烯類化合物之能力, 例如 strain 11a5、GT 和 CBDB1 的 16S rRNA 基因序列完全相同, 然而他們本身所能負責降解的氯乙烯類化合物均不同 (Lee *et al.*, 2013; Sung *et al.*, 2006; Marco-Urea *et al.*, 2011)。

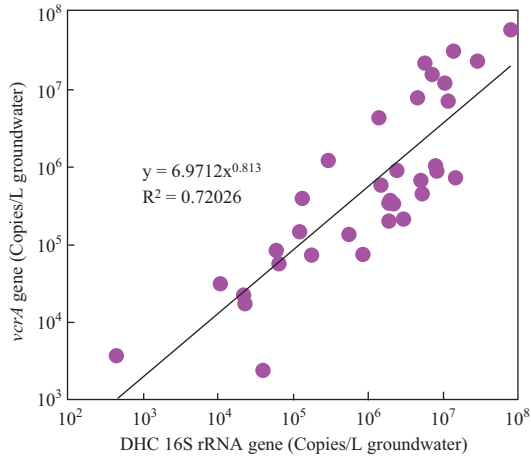


圖 4 現地污染場址中 *Dehalococcoides* 屬與 *vcrA* 基因的相關性

為探討本研究所評估的污染場址觀測井中的 *Dehalococcoides* 屬是否具有還原三氯乙烯至順-1,2-二氯乙烯、氯乙烯至乙烯的能力，氯乙烯還原性脫鹵(*vcrA*)基因與 *Dehalococcoides* 屬(DHC 16S rRNA gene)間的相關性彙整於圖 4。分析結果顯示，*vcrA* 基因數量隨 *Dehalococcoides* 屬豐富度之增加而增加。其中 35 個監測井發現，當 *Dehalococcoides* 屬的數量高於 5×10^2 Copies/L groundwater，平均 *vcrA* 基因/*Dehalococcoides* 屬為 1.29 ± 1.73 ，相關性 R^2 高達 0.721。此結果與 van der Zaan *et al.* (2009)於歐洲檢測 11 個污染場址所觀察到的分析結果相近，該研究指出當 *Dehalococcoides* 屬的數量高於 10^3 Copies/L groundwater，平均 *vcrA* 基因/*Dehalococcoides* 屬為 1.3 ± 0.5 ，相關性 R^2 高達 0.62。上述結果推測樣本中 *Dehalococcoides* 屬可能主要是具有 *vcrA* 基因(即可將三氯乙烯等中間產物還原至最終產物的乙烯)的 strain GT (Sung *et al.*, 2006)、strain VS (Lee *et al.*, 2013)或 strain KB1/VC (Duhamel *et al.*, 2004)等。

3.4 現地污染場址中脫氯菌群數量與氯乙烯類濃度間的相關性

現地污染場址中氯乙烯類化合物的背景濃

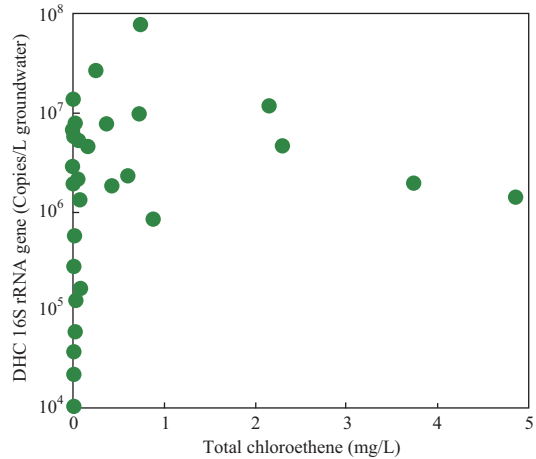


圖 5 現地污染場址中 *Dehalococcoides* 屬與總氯乙烯類間的相關性

度、種類、與污染歷史將影響脫氯菌群的存在與否和生長速率。本研究所篩選的污染場址為長期遭受氯乙烯類化合物污染的區域，近年來開始進行生物整治。因此藉由探討脫氯菌群與氯乙烯類化合物間的相關性，來評估現地是否可利用生物工法進行整治的可行性。

圖 5 為現地污染場址中 *Dehalococcoides* 屬(DHC 16S rRNA gene)與總氯乙烯類(即四氯乙烯、三氯乙烯、順-1,2-二氯乙烯和氯乙烯之總和)間的相關性。分析結果顯示，37 個樣本中 17 個樣本的總氯乙烯類濃度低於 0.02 mg/L，然而其中約三成的採樣點檢測到 *Dehalococcoides* 屬高於 10^5 Copies/L groundwater，推測此採樣點附近曾經遭受氯乙烯類化合物的污染，而馴養出具有脫氯功能的菌群。圖 5 中也顯示即使水中存在低濃度的氯乙烯類化合物時，*Dehalococcoides* 屬仍會有 $10^6 \sim 10^8$ Copies/L groundwater，且具相當穩定數量。

van der Zaan *et al.* (2009)分析約 100 口監測井發現，*Dehalococcoides* 屬的數量與總溶解有機碳具有較高的相關性，而非只針對總氯乙烯類。推測可能是因 *Dehalococcoides* 屬具有降解多種有機碳化合物的能力，而非只限於氯乙烯類化合物。

除了總量評估之外，如何避免在厭氧還原脫

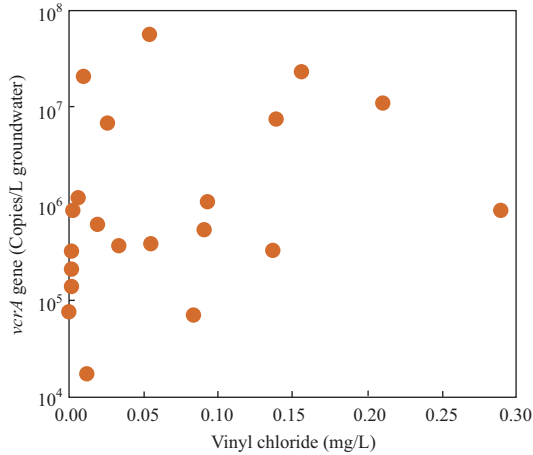


圖 6 現地污染場址中 *vcrA* 基因數量與氯乙烯濃度間的相关性

氯過程中具有高毒性氯乙烯的累積，也是目前在生物整治污染場址中需要考慮的重要問題。氯乙烯還原性脫鹵(*vcrA*)基因為目前常用於評估現地氯乙烯累積潛勢的指標(Muller *et al.*, 2004)，此基因數量與氯乙烯濃度的相關性彙整於圖 6。

圖 6 顯示不論氯乙烯濃度分佈高低，除了兩個距離污染場址較遠的採樣點未檢測出 *vcrA* 基因之外，其餘 35 個採樣點均量測到 $10^4 \sim 10^7$ Copies/L groundwater 的數量，推測這些區域過去曾遭受氯乙烯類化合物的污染，主要是以三氯乙烯、順-1,2-二氯乙烯和氯乙烯等。本研究所檢測的基因豐富度是 DNA 層級，它可以保有在微生物體內或是殘留在環境中的時間較長，也就是只要過去一段時間曾經出現的菌群或是表現的基因均可能再度被檢測到。

此外，根據 Lee *et al.* (2008)的研究指出，以 *vcrA* 基因為例，RNA 層級(即當下具有活性的基因表現)的基因數量約為 DNA 層級的 10^5 Copies/L groundwater，顯示現地場址中 *vcrA* 基因的實際表現量偏低。圖 6 亦顯示氯乙烯濃度達到 0.01~0.20 mg/L 時，環境中即可檢測到高豐富度的 *vcrA* 基因(10^7 Copies/L groundwater)。此結果與 van der Zaan *et al.* (2009)的研究結果相符，指出 *vcrA* 基因與氯乙烯(VC)濃度有很高的相關性。

四、結 論

本研究應用即時定量 PCR (qPCR)技術來初步調查長期受氯烯類污染場址中現存脫氯菌群與氯乙烯還原性脫鹵(*vcrA*)基因的豐富度，及與現地背景水質數據進行相關性分析，以進一步了解其生物整治的適用性。研究結果顯示，兩受氯烯類污染場址中有近六成的採樣點，其脫氯菌 *Dehalococcoides* 屬的數量超過 10^5 Copies/L groundwater，顯示該區域存在著足夠的氯烯類降解菌群。此外，*vcrA* 基因與 *Dehalococcoides* 屬呈現良好的正相關($R^2 = 0.721$)，推測現地場址中的脫氯菌群主要為還原三氯乙烯至乙烯的 *Dehalococcoides* 屬。

在微生物數量與氯烯類濃度的相關性方面，即使水中氯烯類化合物濃度很低的情況下，*Dehalococcoides* 屬仍會有 $10^6 \sim 10^8$ Copies/L groundwater，而當氯乙烯濃度超過 0.01~0.05 mg/L 時，環境中則可檢測到高濃度的 *vcrA* 基因(10^7 Copies/L groundwater)。

受氯烯類污染的生物復育場址，雖可藉由添加有機碳及營養鹽，促進現地目標微生物的生長、與活化可降解氯烯類污染物的功能性基因，以達到污染場址中氯烯類化合物的轉化或去除之目的。然而影響生物復育的因子尚包括中間產物(如氯乙烯)的累積、微生物生長因子限制、及地下水的傳輸等，在復育評估上尚須納入考量。本研究使用之目標基因定量技術，可藉由定量現地場址中菌群與基因的數量變化，提供即時回饋相關資訊，作為後續整治策略制定及整治效能評估的依據。

五、誌 謝

本研究感謝科技部計畫(MOST 105-2622-E-006-020-CC2)的經費支持。

六、參考文獻

1. 游漢威、莊蕙萍、簡義杰、董珮玲、黃良銘、林財富，「SybrGreen-qPCR 法定量氯烯類污染區域中關鍵微生物菌群與其功能性基

- 因」，中華民國環境工程學會 2015 土壤與地下水研討會，2015。
2. 盧至人，「現地生物復育技術」，台灣土壤及地下水環境保護協會簡訊，第五期第 3 頁-第 5 頁，2002。
 3. Chow, W.L., Cheng, D., Wang, S. and He J., "Identification and Transcriptional Analysis of Trans-DCE-producing Reductive Dehalogenases in *Dehalococcoides* species", ISME J., No. 4, pp. 1020-1030, 2010.
 4. Duhamel, M., Mo, K. and Edwards, E., "Characterization of a highly enriched Dehalococcoides-contaminated site", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 70, No. 9, pp. 5538-5545, 2004.
 5. He J., Sung, Y., Krajmalnik-Brown, R., Ritalahti, K.M. and Löffler, F.E., "Isolation and Characterization of *Dehalococcoides* sp. Strain FL2, A Trichloroethene (TCE)- and 1,2-Dichloroethene-Respiring Anaerobe", Environ. Microbiol., Vol. 7, 1442-1450, 2005.
 6. Krajmalnik-Brown, R., Holscher, T., Thomson, I.N., Saunders, F.M., Ritalahti, K.M., and Löffler, F.E., "Genetic Identification of A Putative Vinyl Chloride Reductase in *Dehalococcoides* sp. Strain BAV1", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 70, pp. 6347-6351, 2004.
 7. Lane, D.J., "16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics", John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom, pp. 115-175, 1991.
 8. Lee, P.K.H., Macbeth, T.W., Sorenson, K.S., Deeb, Jr. R.A. and Alvarez-Cohen, L., "Quantifying Genes and Transcripts To Assess the In Situ Physiology of "*Dehalococcoides*" spp., in A Trichloroethene-Contaminated Groundwater Site". Appl. Environ. Microbiol., Vol. 74, No. 9, pp. 2728-2739, 2008.
 9. Lee, P.K.H., Cheng, D., West, K.A., Alvarez-Cohen L. and He, J.Z., "Isolation of Two New *Dehalococcoides mccartyi* Strains with Dissimilar Dechlorination Functions and Their Characterization by Comparative Genomics via Microarray Analysis", Environ. Microbiol., Vol. 15, pp. 2293-2305, 2013.
 10. Löffler, F.E., Yan, J., Ritalahti, K.M., Adrian, L., Edwards, E.A., et al., "*Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., Obligately Organohalide-Respiring Anaerobic Bacteria Relevant to Halogen Cycling and Bioremediation, belong to A Novel Bacterial Class, *Dehalococcoidia* classis nov., Order *Dehalococcoidales* ord. nov. and Family *Dehalococcoidaceae* fam. nov., within the Phylum *Chloroflexi*", Int. J. Syst. Evol. Microbiol., Vol. 63 (Pt 2), 2013.
 11. McCarty, P.L., "Microbiology- Breathing with Chlorinated Solvents", Science, Vol. 276, pp. 1521-1522, 1997.
 12. Magnuson, J. K., Romine, M. F., Burris D. R. and Kingsley, M.T., "Trichloroethene Reductive Dehalogenase from *Dehalococcoides ethenogenes*: Sequence of *tceA* and substrate range characterization", Appl. Environ. Microbiol., Vol. 66, pp. 5141-5147, 2000.
 13. Marco-Urea, E., Nijenhuis, I. and Adrian, L., "Transformation and Carbon Isotope Fractionation of Tetra- and Trichloroethene to Trans-Dichloroethene by *Dehalococcoides* sp. Strain CBDB1", Environ. Sci. Technol., Vol. 45, pp. 1555-1562. 2011.
 14. Maymo-Gatell, X., Chien, Y.T., Gossett, J.M., and Zinder, S.H., "Isolation of A Bacterium That Reductively Dechlorinates Tetrachloroethene to Ethane", Science, Vol. 276, pp. 1568-1571, 1997.
 15. Muller, J. A., Rosner, B. M., von Abendroth, G., Meshulam-Simon, G., McCarty, P.L. and Spormann, A.M., "Molecular Identification of The Catabolic Vinyl Chloride Reductase from

- Dehalococcoides* sp. Strain VS and Its Environmental Distribution”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, pp. 4880-4888, 2004.
16. Smith, C.J. and A.M., Osborn, “Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology”, *Fems Microbiology Ecology*, Vol. 67, No. 1, pp. 6-20, 2009.
 17. Smits, T.H.M., Devenoges, C., Synalski, K., Maillard, J., Holliger, C., “Development of real-time PCR Method for Quantification of the three *Dehalobacter*, *Dehalococcoides*, and *Desulfotobacterium* in Microbial Communities”, *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 57, pp. 369-378, 2004.
 18. Sung, Y., Ritalahti, K.M., Apkarian, R.P., and Loffler, F.E., “Quantitative PCR Confirms Purity of Strain GT, A Novel Trichloroethene- to-Ethene-Respiring *Dehalococcoides* isolate”, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 72, pp. 1980-1987, 2006.
 19. Sutton, N.B., Atashgashi, S., van der Wal, J., Wijn, G., Grotenhuis, T., Smidt, H., and Rijnaarts, H.H.M., “Microbial Dynamics During and After In Situ Chemical Oxidation of Chlorinated Solvent”, *Groundwater*. Vol. 53, No. 2, pp. 261-270.
 20. van der Zaan. B., Hannes, F., Hoekstra, N., Rijnaarts, H., Vos, W.M., Smidt, H., Gerritse, J., “Correlation of *Dehalococcoides* 16S rRNA and Chloroethene- Reductive Dehalogenase Genes with Geochemical Conditions in Chloroethene-Contaminated Groundwater”, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 76, No. 3, pp. 843-850, 2009.
 21. Yoshida, N., Takahashi, N., and Hiraishi, A., “Phylogenetic Characterization of A Polychlorinated-Dioxin-Dechlorinating Microbial Community by Use of Microcosm Studies”, *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 71, No. 8, pp. 4325-4334, 2005.

收稿日期：民國 105 年 4 月 26 日
 修正日期：民國 105 年 6 月 27 日
 接受日期：民國 105 年 8 月 3 日