

以微生物群系再造進行本土戴奧辛污染物降解菌群研究

王宇珊，國立中興大學環境工程學系碩士班研究生

張書奇，國立中興大學環境工程學系副教授

計畫編號：109-2221-E-005 -005 -MY2

一、前言

持久性有機污染物 (persistent organic pollutants, POPs) 可長期存在於環境，並藉著風力和水力的傳播，從單一區域污染演變成全球性的議題。根據我國環保署毒化局的資訊，有別於其他 POPs 來源，戴奧辛 (dioxins) 是因某些工業過程和燃燒所產生的無意衍生 (unintended emission) 之污染物，因此未被納入為公告毒性化學物質。戴奧辛物化特性導致其難溶於水、容易吸附於底泥有機質且難以自然降解，在環境中具有高度持久性，且為確定之人類致癌及致畸胎物質，為 2001 年斯德哥爾摩公約所列之 12 種持久性有機污染物之一。且具有高度生物累積性，若一旦進入自然環境並經食物鏈傳遞，所衍生的問題極其嚴重。在底泥污染整治技術中，普遍採用之物理化學整治法進行相對低濃度戴奧辛之底泥污染進行整治 (其他同時存在之污染物相對濃度較高)，具有成本昂貴且耗能之缺點，目前較少針對戴奧辛污染底泥進行生物降解及去毒性之研究。相較於物化整治，生物整治成本較低且對於環境衝擊較小，因此本研究針對受戴奧辛污染之底泥生物整治進行研究探討，

有關戴奧辛污染生物整治的文獻多半是以生物刺激與生物擴增方式進行整治研究，前者是以添加營養物、電子供給者或是改變現地環境因子來刺激現地菌群進行污染物質降解；後者則是加入外來已經證實具有較佳降解能力之特定菌種或是菌群進行生物整治。但是前者往往無法有效整治現地污染，後者則是導入外來菌群或是功能性基因，有生物安全疑慮。本研究以採取不同以往之微生物群系再造 (microbiome reengineering, MBRE) 技術進行現地菌群結構改造後，再進行生物降解與整治之研究。此方法與生物刺激與生物擴增截然不同，MBRE 是以多種環境因子組合進行短時間之微生物群系篩選改造並經適度培養後，在同一種環境條件下 (即現地環境條件) 進行實際底泥中法規表列之「底泥品質指標之分類管理及用途限制辦法」17 種戴奧辛物質降解實驗，此種方法為一種減少微生物菌種數目之減式方法 (subtractive approach)，而非生物擴增之增加微生物菌種數目之加式方法 (additive approach)，故無生物安全疑慮。測試結果可提供如何篩選環境中可有效降解該 17 種戴奧辛物質之現地菌群並且證實是否可以提升現地菌群之降解能力。

二、研究方法

1. 菌群篩選與批次降解實驗：本次實驗利用田口玄一博士提出針對 4 種控制因子 (溫度、pH 值、鹽度及含水率) 以及 3 種變動水準所組成之 $L_9 (3^4)$ 之直交表，即 9 組環境條件進行菌群篩選 (Tran et al. 2020)，控制水準分為低、

中、高三種設定，所有參數數值及單位參見表 1。完成 45 分鐘篩選後，參考 Hendrickson et al. (2002) 之厭氧培養基進行洗下菌群合併於 500mL 血清瓶（共 9 瓶），添加 0.5% 甲醇後置於 30°C 恆溫培養箱中，進行菌群的馴養，待各瓶菌數達足量（即 10^7 cells/ml 以上）才開始進行批次三重複之生物降解實驗。本研究於第 0、28、56 與 84 天進行採樣，除進行化學分析外，也進行菌相分析，以了解 MBRE 對於微生物群系之影響。

2. 化學分析：戴奧辛分析分成前處理和三重四極柱之氣相層析質譜儀（GC-qQq-MS）兩個部分，前處理根據本實驗室編號 B002 版作為戴奧辛樣品標準作業程序進行，而後根據 LCTech DEXTech Pure（LCTech GmbH, Obertaufkirche, Germany）操作手冊進行含戴奧辛樣品的管柱流洗淨化處理（見圖 1），再由經前處理之樣品送屏東科技大學的謝季吟教授實驗室進行 GC-qQq-MS 分析。GC-qQq-MS 分析條件簡述如下：以 TG-Dioxin（長 60 m，口徑 0.25 mm，膜厚 0.25 μ m）以 1.2 mL/min He 於注射口在 280°C 時 120 mL/min 注入 2 μ L 樣品，其中升溫過程為 120°C 維持 2 mins、25°C/min 升溫至 250°C、2.5°C/min 升溫至 285°C、10°C/min 升溫至 320°C 並保持 15 mins。
3. 第三代菌群定序分析（third generation sequencing, TGS）：DNA 萃取是以 DNeasy 之 DNA 萃取商業套組（DNeasy® PowerSoil® Pro Kit, 50 preps）進行、DNA 預先定量是以 NanoDrop（ThermoFisher, Waltham, MA, U.S.A.）、TGS 及資料統計分析是委託外界專業公司處理。

表 1 控制因子及變動水準

控制因子	溫度 (°C)	pH 值	含水 (%)	鹽度 (‰)
Level 1	50	5	10.0	0.0
Level 2	70	7	50.0	17.5
Level 3	95	9	100.0	35.0

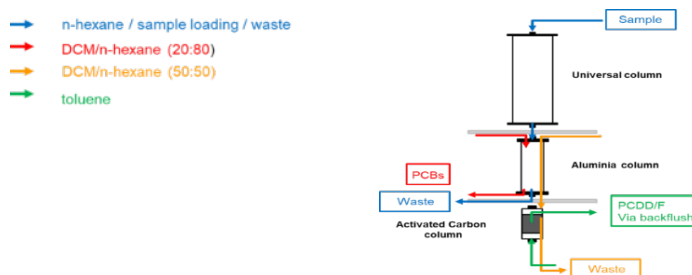


圖 1 前處理之管柱流洗示意圖

三、 結果與討論

本實驗結果由脫氯能力與減毒效果兩個面向進行討論，由於微生物群系再造是經由不同環境壓力和生存條件下篩選而得的菌群，是否能在面對現地戴奧辛污染情形下，仍具有良好適應生長及更佳之脫氯能力，故以總氯數變化作為判別各組降解脫氯之效果；另外戴奧辛同源物之毒性當量因子不同，可能因降解脫氯過程中，反而造成整體毒性當量的提高導致環境風險升高，因此也以總毒性當量濃度變化進行討論。

1. 總毒性當量結果

本研究取用的底泥毒性當量濃度為 10,202~12,989 ng-I-TEQ/kg。圖 2a 為各組 4 個採樣時間之 I-TEQ 以 C/C_0 呈現。其中以第 7 組減少得最顯著，為 69.6%（熱篩溫度 95°C、pH 5、含水率 100%、鹽度 17.5‰）；其次則為第 9 組（熱篩溫度 95°C、pH 9、含水率 50%、鹽度 0‰）和第 8 組（熱篩溫度 95°C、pH 7、含水率 10%、鹽度 35‰），分別去除 52.1% 和 42.1% 的 I-TEQ (ng/kg)。

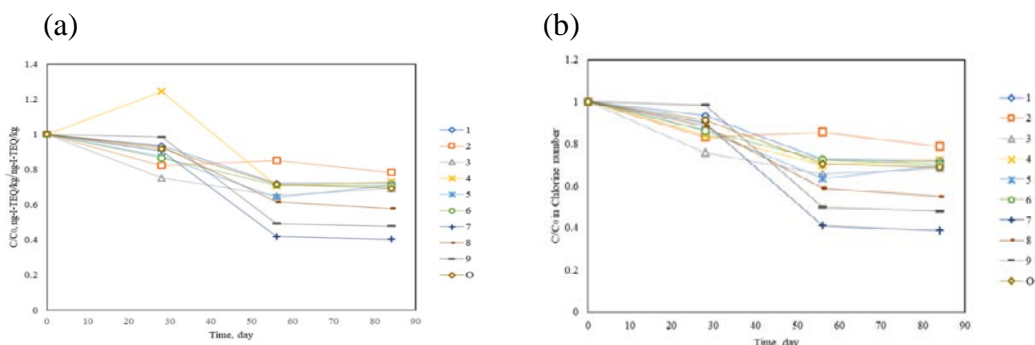


圖 2 各組總毒性當量濃度 C/C_0 變化(a)與各組總氯數之 C/C_0 變化(b)

2. 脫氯效果

圖 2b 為各組以 17 種同源物之樣品濃度 (I-TEQ, ng/kg) 乘上該同源物上鍵結位置帶有之氯原子數進行加總後於採樣時間點的變化率以 C/C_0 方式彙整。其中以第 7 組 61.3% 減少得最顯著，其次則為第 9 組和第 8 組，分別去除 52.1% 和 45.1%，與總毒性當量去除率結果一致。不論是降低毒性或是脫氯程度，均較原菌群為佳（圖 2 中圖例標記為菱形，標示為 O 者代表原菌群）。

3. 最佳因子組合

將批次實驗之最後總毒性當量濃度去除率進行因子反應圖繪製，如圖 3 所示，可知最佳因子組合為溫度 95°C、pH 5、含水率 100% 與鹽度 17.5‰，與批次實驗最佳降解效果之第七組因子組合一致。批次實驗去除率前三名組別皆為 95°C，最差三組多落於 50°C，與因子反應圖相符，顯示溫度是篩選有效菌群顯著控制因子。

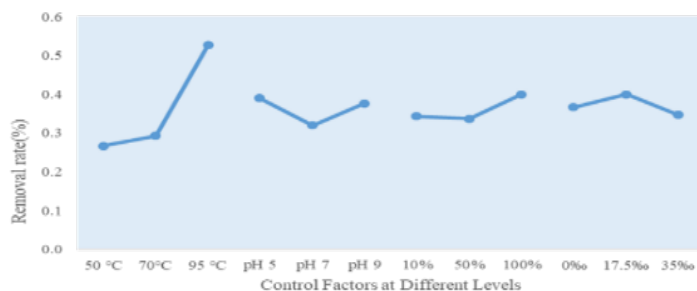


圖 3 批次降解率之因子反應圖

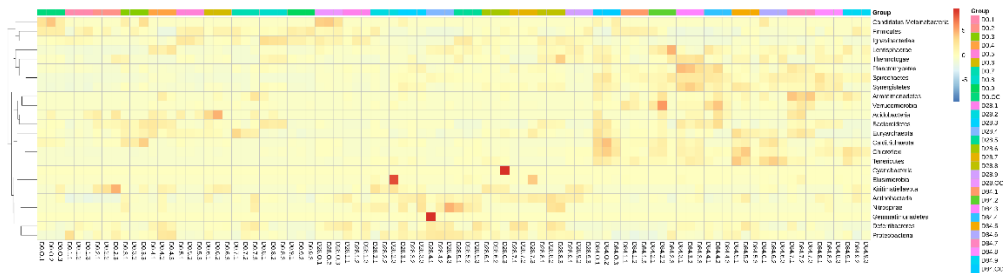


圖 4 TGS 前 25 種菌門豐度熱圖

4. 降解菌群豐度圖

以批次實驗第 0、28、84 天三個時間點進行 TGS 分析，前 25 種菌門豐度如圖 4 所示。圖上方為各組別於不同時間點之三重複做一顏色區塊，左方則為經過群集分析 (cluster analysis) 將在 90 個樣品中具有類似豐度表現之菌門進行歸類分析，可了解是否優勢菌於不同樣品間展現類似豐度並探討其變化。戴奧辛之厭氧生物降解效果仰賴多種菌群間交互關係，其中，厭氧脫鹵球菌不只需要產氫菌作電子供給者行還原性脫氯，且需要其他發酵菌群提供乙酸作為碳源，亦須藉由其他菌種供給相關為維生素因子 (如 vitamin B₁₂) 才能穩定生存並促進其呼吸反應。與絕對厭氧脫鹵球菌不同的是，兼性厭氧脫氯菌其優勢為可以藉由多種電子供給者所提供之電子如丙酮酸鹽、乳酸鹽等。*Firmicutes*、*Proteobacteria* 具有被證實可脫氯之兼性厭氧菌之成員；*Ignavibacteriae* 為厭氧嗜熱耐鹽菌，可將三氯苯酚打開苯環並完全脫氯 (Song et al. 2019)，並且可作為實驗後期第 7 組之菌群仍能維持於實驗條件組合及穩定環境。作為生產電子供給者之菌群由圖 4 所見，*Thermotogae* 可將乙酸發酵成氫氣和二氧化碳；*Spirochaetes*、*Synergistetes*、*Acidobacteria*、*Bacteroidetes* 等皆已證實可由發酵作用產乙酸、甲酸和氫氣等；而 *Verrucomicrobia* 可利用甲烷作唯一碳源進行氧化反應形成甲酸和二氧化碳。另外，菌群所處環境條件變化是影響菌相豐度的因素之一，*Planctomycetes* 為厭氧氨氧化菌可提供環境厭氧條件 (Wiegand et al. 2018)，而 *Euryarchaeota* 對環境具有高耐受性，能在高鹽度和酸性環境下產甲烷。

四、 結論

藉由 84 天批次實驗結果中得知降解最佳組別為第 7 組，其戴奧辛總毒性當量濃度減少 69.6%，總氯數去除 61.3%，並與較佳降解之因子組合 (熱篩溫度 95°C、pH 5、鹽度 17.5‰ 和 100% 含水率) 相同，且經 MBRE 之菌群的確可改善菌群之脫氯與降低毒性之效果，且批次實驗結果之因子反應圖結果顯示溫度是有效之菌群篩選顯著控制因子。物種豐度聚類熱圖中 *Firmicutes*、*Proteobacteria* 為脫氯之兼性厭氧菌；*Thermotogae*、*Spirochaetes*、*Synergistetes*、*Acidobacteria*、*Bacteroidetes*、*Verrucomicrobia* 等可作為生產電子供給者之菌群；而 *Planctomycetes* 提供環境厭氧條件；而脫氯菌 *Ignavibacteriae* 與甲烷生成菌 *Euryarchaeota* 可作為菌群背景環境穩定。經由以上結果顯示，MBRE 技術確實具有提升生物整治效果的潛力，且無生物安全疑慮。

五、 參考文獻

1. Hendrickson ER, Payne JA, Young RM, Starr MG, Perry MP, Fahnestock S, Ellis DE, Ebersole RC (2002): Molecular analysis of *Dehalococcoides* 16S ribosomal DNA from chloroethene-

- contaminated sites throughout North America and Europe. *Appl Environ Microbiol* 68, 485-495
2. Song J, Zhao Q, Guo J, Yan N, Chen H, Sheng F, Lin Y, An D (2019): The microbial community responsible for dechlorination and benzene ring opening during anaerobic degradation of 2,4,6-trichlorophenol. *Sci Total Environ* 651, 1368-1376
 3. Tran HT, Lin C, Hoang HG, Nguyen MT, Kaewlaoyong A, Cheruiyot NK, Bui X-T, Vu CT (2020): Biodegradation of dioxin-contaminated soil via composting: Identification and phylogenetic relationship of bacterial communities. *Environmental Technology & Innovation* 19, 101023
 4. Wiegand S, Jogler M, Jogler C (2018): On the maverick Planctomycetes. *FEMS Microbiology Reviews* 42, 739-760