

國立台灣大學工學院環境工程學研究所

碩士論文

Graduate Institute of Environmental Engineering

College of Engineering National Taiwan University

Master Thesis

含氯鹵乙酸於飲用水淨水流程中之

生物降解作用研究與探討

Investigation of Chlorinated Haloacetic Acids

Biodegradation in Drinking Water Treatment Process

丁士鈞

Ting,Shin-Chun

指導教授：童心欣 博士

Advisors:Tung, Hsin-Hsin, Ph.D.

中華民國 98 年 6 月

June, 2009

## 摘要

飲用水在處理過程中，為了去除水中之病原菌，多採用含氯消毒劑進行消毒。而含氯消毒劑會與水中固有之天然有機物(nature organic matters; NOMs)反應，產生各樣的消毒副產物(disinfection by-products; DBPs)；其中又以三鹵甲烷(Trihalomethanes; THMs)與含鹵乙酸(Haloacetic acids; HAAs)兩者為最大宗之消毒副產物。鹵乙酸經由動物實驗證實，會影響肝功能，同樣對成長、生育有極大的影響。更多研究也顯示，鹵乙酸具有致畸與致癌性。

研究指出，鹵乙酸於淨水流程中之變化可能與生物降解有關(Rodriguez et al. 2004)。而本研究針對台灣南部，具有較高鹵乙酸含量之某淨水廠，於不同季節檢測該水廠三種含氯鹵乙酸(一氯乙酸、二氯乙酸、三氯乙酸)含量，發現鹵乙酸好生成於夏季，並經過該水廠之快濾單元處理後明顯下降。本研究欲證實快濾池內附著於濾砂之微生物具有降低鹵乙酸之功效，選用變性膠體凝膠電泳(Denature Gradient Gel Electrophoresis)此種分子生物技術探討該淨水流程中微生物菌群結構的變化，並分析快濾砂上主要菌種，以期建立鹵乙酸濃度與實廠內微生物菌群之關連性。

關鍵字：鹵乙酸、生物降解、快濾砂、DGGE、淨水流程

## Abstract

In order to reduce the human health impacts due to pathogens in drinking waters, it is important to apply disinfection before distribution. Disinfectants widely used nowadays are chlorine or chloramides. These disinfectants react with nature organic matters in water, and produce disinfection by-products (DBPs). Trihalomethanes (THMs) and Haloacetic acids (HAAs) are two of the DBPs with highest amount by weight from chlorination. HAAs affect to influence hepatic, reproductive, and developmental functions possibly, and they may be mutagenic and carcinogenic in animal studies.

Previous studies had showed that HAA biodegradation could happen during water treatment process. This study aimed at one of the water treatment plant in southern Taiwan which had high HAA concentrations and investigated the changes of three HAAs (MCAA、DCAA and TCAA) during treatment process at different seasons. The results showed that HAAs were produced mostly at summer, and could be reduced significantly after passing through the rapid sand filtration process. It is considered to be connected with biodegradation upon filtration sands. This study used DGGE to explore the microbial's population in each treatment process, as well as analyzing the main bacterial species in filtration sands, and this result could help us to understand microbial communities in water treatment process.

Key words : Haloacetic acids、Biodegradation、Rapid sand filtration、DGGE、Water Treatment

# 目錄

摘要	I
ABSTRACT	II
目錄	III
圖目錄	V
表目錄	VI
附錄	VII
第一章 前言	1
1-1 研究背景	1
1-2 研究目的	3
第二章 文獻回顧	4
2-1 消毒副產物(DISINFECTION BY-PRODUCT)	4
2-2 含鹵乙酸(HALOACETIC ACIDS)	8
2-3 影響鹵乙酸生成因子	10
1. 消毒劑種類	10
2. 酸鹼度(pH)	10
3. 天然有機物(Nature organic materials; NOMs)	11
4. 溫度	12
5. 消毒劑接觸時間	13
6. 溴離子	14
2-4 含鹵乙酸與微生物之關係	15
2-5 本研究相關分子生物技術簡介	18
1. 核糖體與 16SrRNA gene	18
2. 聚合酶鏈鎖反應(Polymerase chain reaction)	20
3. 變性梯度凝膠電泳(denaturing gradient gel electrophoresis; DGGE)	23
2-6 分子生物技術於環境上之應用與優缺點。	25
第三章 材料與方法	27
3-1 全流程一氯、二氯、三氯乙酸濃度檢測	27
I. 藥品材料	27
II. 儀器設備	28
III. 步驟方法	29
3-2 一氯、二氯、三氯乙酸濾砂降解試驗	30
I. 藥品材料	30
II. 儀器設備	30
III. 步驟方法	31

3-3 全流程單元生物膜與水體微生物菌群分析	33
I. 藥品材料	33
微生物核酸萃取用藥品	33
變性梯度凝膠電泳藥品	34
II. 儀器設備	34
III. 步驟方法	34
(1) 微生物 DNA 萃取及純化實驗	34
(2) 引子(primer)的選用	35
(3) 聚合酶鏈鎖反應(Polymerase chain reaction; PCR)	36
(4) 變性梯度凝膠電泳(DGGE)	36
(5) 染色：銀染 (Silver staining)與 SYBR Green I	36
(6) 核酸序列結果分析	43
(7) 圖譜分析	44
第四章 結果與討論	46
4-1 一氯、二氯、三氯乙酸於自來水廠處理單元之變化。	46
4-2 快氯砂降解一氯、二氯、三氯乙酸批次試驗。	50
4-3 水廠處理單元之生物膜及水體之菌相與菌種分析。	57
4-3-1 池壁生物膜與濾砂 PCR-DGGE 菌相之探討。	59
4-3-2 各單元水體微生物 PCR-DGGE 菌相之探討。	62
4-3-3 以 16SrDNA 鑑定附著於快濾砂之微生物菌種。	69
4-3-4 HAA 降解後，濾砂菌群之變化。	71
第五章 結論與建議	72
5-1 結論	72
5-2 建議	74
第六章 參考文獻	77
附錄	81

## 圖目錄

圖 3-1 GC357-907 PCR 反應控制圖。	41
圖 3-2 357F-907R PCR 反應控制圖。	41
圖 4-1 春季 DCAA 與 TCAA 在淨水廠全流程中濃度變化。	47
圖 4-2 夏季 DCAA 與 TCAA 在淨水廠中濃度變化。	48
圖 4-3 冬季 DCAA 與 TCAA 在淨水廠中濃度變化。	49
圖 4-4、MCAA 於 288 小時內降解批次實驗結果。	54
圖 4-5、DCAA 於 288 小時內降解批次實驗結果。	54
圖 4-6、TCAA 於 288 小時內降解批次實驗結果。	55
圖 4-7 MCAA 平均降解速率曲線。	56
圖 4-8 DCAA 平均降解速率曲線。	56
圖 4-9 不同溫度下進行 GC357-907 之 PCR 反應結果。	59
圖 4-10 單元池池壁生物膜與快濾砂 PCR-DGGE 電泳結果圖。	61
圖 4-11 單元池池壁生物膜與快濾砂菌相經 UPGAMA 類聚分析之親源樹狀圖。	62
圖 4-12 各單元水體 PCR-DGGE 電泳結果圖。	67
圖 4-13 各單元水體菌相經 UPGAMA 類聚分析後之親源樹狀圖。	68
圖 4-14 沉澱出水與濾砂 DGGE 圖譜之對照。	68
圖 4-15 快濾砂與快濾池出水 DGGE 圖譜之對照。	69
圖 4-16 快濾砂降解 HAA 前與降解後的 DGGE 圖譜。	71

## 表目錄

Table 2-1 常見的 Chlorinated DBPs。	7
Table 2-2 鹵乙酸物理性質。	9
Table 2-3 DBPs in Canadian drinking water。	12
Table 2-4 目前常用的分子生物技術。	22
Table 3-1 本研究所使用之引子。	39
Table 3-2 PCR 反應試劑成分。	40
Table 3-3 本實驗用之 Acryamide/bis 濃度所能分離之核酸長度。	42
Table 3-4 6% Acryamide 變性梯度凝膠成分。	42
Table 3-5 10% Ammonium Persulfate 成分。	43
Table 4-1 水廠內水質參數表。	65
Table 4-2 快濾砂 DGGE 圖譜上亮帶鑑定結果。	70



## 附錄

附錄一、傳統法 DNA 萃取步驟 -----	81
附錄二、商品化試劑 DNA 萃取步驟 (Biomen kit) -----	83
附錄三、商品化試劑 DNA 純化步驟 (Promega kit) -----	85
附錄四、銀染(Silver staining) -----	86





# 第一章 前言

## 1-1 研究背景

自從有歷史記錄人類的足跡，人類自古的棲息地皆必須靠近水源。人體內有百分之七十是水，水份的攝取對於維持生命之重要性可見一斑。飲用水品質向來是文明社會關注的議題，提供穩定並高品質的自來水更是每個先進國家所追求的理想。隨著科學發展，我們已知有著各式各樣的微生物存在於自然界中，飲水之來源；河流，湖泊等同樣是微生物喜好的生長環境，其中不乏有影響人類健康的致病菌。為了確保民眾使用飲用水的安全與衛生，自來水的處理便扮演一個重要的角色。

目前全球的自來水廠，大多添加氯氣或次氯酸鹽等含氯消毒劑來控制、淨化與改善自來水品質。自來水經由混凝、沉澱、過濾、消毒等程序後經配水管網送至各給水區之民眾。自然界水體存在各式各樣的天然有機物，這些有機物大多來自動物、植物殘骸分解而成，不過隨著社會進步，也有越來越多的人為有機物進入表水的水體內。含氯消毒劑有可能與這些有機物質發生化學反應產生消毒副產物，某部分消毒副產物已被證實會影響人體健康，例如：三鹵甲烷 (Trihalomethanes)、鹵化乙酸等(Haloacetic acids)、鹵化乙晴

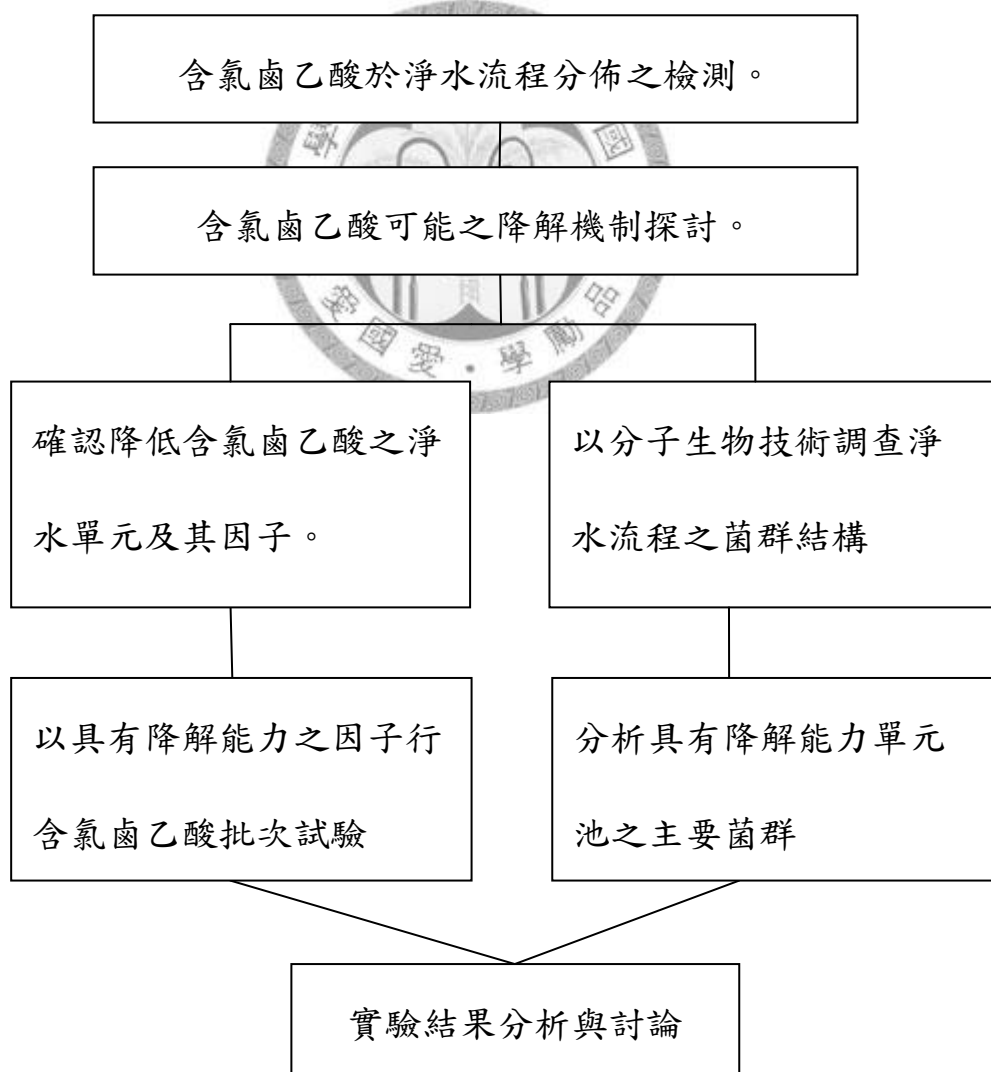
(haloacetonitrile; HANs) 鹵化氰(cyanogen halides)與 halopicrins。三鹵甲烷是第一個被發現的物種(Rook 1976)，由於是消毒副產物中含量最多的類別，三十年來各種三鹵甲烷之議題不斷的受到研究與廣泛的討論。鹵化乙酸是第二大類的消毒副產物，又以二氯、三氯乙酸(Di-, Trichloroacetic acid)為其中最主要的物種(Reckhow et al. 1984)。部分鹵乙酸經研究證實，具有基因毒性，神經毒性或生殖毒性等危害，目前美國環保署(USEPA)將二氯乙酸列為B2級致癌物，三氯乙酸列為C2級致癌物，並在1988年所公告之消毒劑-消毒副產物法(Disinfectant-Disinfection Byproduct Rule; D-DBP)中，規範五種含鹵乙酸(HAA5; Monochloroacetic acid、Dichloroacetic acid、Trichloroacetic acid、Monobromoacetic acid、Dibromoacetic acid)在飲用水中之最大容許濃度(Maximum Contamination Level)不得超過60ug/L。雖台灣目前尚未對鹵乙酸訂定管制標準，然而有越多針對台灣飲用水鹵乙酸之相關研究逐漸被發表，以期加速環保署極對於鹵乙酸管制的擬定。

本研究針對含鹵乙酸濃度較高的台灣南部之淨水場，檢測三種含氯鹵乙酸(MCAA、DCAA、TCAA)在自來水場內各淨化單元池之分佈，並將可能具有降低鹵乙酸能力之快濾池濾砂進行降解測試，再輔以分子

生物技術研究水廠內各淨水單元池微生物菌群結構，試圖瞭解自來水淨水過程中此三種含鹵乙酸之變遷與微生物作用之關係。

## ✚ 1-2 研究目的

- (1) 調查台灣淨水場流程中，含氯鹵乙酸之變化。
- (2) 研究快濾池濾砂對含氯鹵乙酸之影響。
- (3) 以分子生物技術調查各單元與濾砂池的菌群結構。
- (4) 建立含氯鹵乙酸與淨水廠內微生物之關係。研究架構如下：



## 第二章 文獻回顧

### ✚ 2-1 消毒副產物(Disinfection by-product)

傳統淨水流程中，包括混凝、沉澱、過濾、消毒等，消毒劑添加的目的是為了殺死水體中多數致病微生物，提升飲用水品質。而在消毒過程中，環境中天然有機物(Nature Organic carbon)會與消毒劑產生消毒副產物(Disinfection by-products)，簡稱 DBPs。目前最常用消毒方式，在淨水處理前後添加含氯消毒劑，例如：氯氣( $\text{Cl}_2$ )、次氯酸( $\text{HOCl}$ )、二氧化氯( $\text{ClO}_2$ )、氯胺( $\text{ClNH}_2$ )等。

科學研究指出，加氯消毒會導致衍生出多種DBPs，部分的DBPs已被證實會對人體健康產生影響，提升致癌風險。這些因加氯而產生的消毒副產物，又稱為Chlorination by-products (CBPs)。DBPs主要有數個種類，三鹵甲烷(Trihalomethanes；THMs)、鹵乙酸(Haloacetic acids；HAAs)、鹵化乙睛(haloacetonitrile；HANs) 鹵化氰(cyanogen halides)與 halopicrins (Krasner et al. 1989)，常見DBPs的物種如Table 2-1所示。科學家分析淨水場內消毒副產物種類與濃度之相關文獻證實，THMs為加氯消毒最大宗之消毒副產物，HAAs為第二大類，研究上也指出某些鹵乙酸物種其毒性更甚於THMs (Singer 2002)，使得鹵乙酸近年來被科學家所重視。以美國猶他州

為例，科學家於1993年調查了十四個中型及大型淨水場以及二十一個小型淨水場。發現THMs佔被檢出消毒副產物總量的64%，HAAs次多佔30%，Cyanogen halides 3%，Haloketones 1% (Nieminski et al. 1993)。

如今已有更多的新興消毒副產物被發現，例如：硝化二甲胺 (N-nitrosodimethylamine; NDMA)，氯化硝化甲烷 (halonitromethanes; HNM) 等，近來逐漸受重視。NDMA在初始是被用來增加土壤氮肥的藥劑，與各式工廠使用的中間介質，是一種高度致癌之化合物(Najm and Trussell, 2001)。如今被發現於表水 (surface water)與飲用水中，第一次證實NDMA存在於飲用水中是在1989年被加拿大科學家所發現(Charrois et al. 2007)，其原因可能源自水處理時加氯消毒與水體中胺類的反應所致(Mitch et al., 2003)。美國環檢所評估，飲用水中若含7 ng/L的NDMA，對人類一生致癌之風險達 $10^{-5}$  (US EPA, 2009a)。有研究統計全球各地之自來水廠，NDMA好生成於高溫的夏季，並於含胺類最高的raw water有最多生成 (Asami et al. 2009)。HNM結構上與Halomethane類似，多一個胺基，會產生於行加氯或臭氧消毒之水體中。越多研究顯示，HNM具有基因毒性(genotoxicity)(Liviac et al. 2009)。

飲用水中的總THMs濃度在台灣已被規範於飲用水水質標準，已佔

消毒副產物第二大宗之鹵化乙酸，尚未被規範入台灣的飲用水水質標準，而目前國內也有許多關於台灣淨水流程內鹵乙酸的研究正在進行，試圖充分了解鹵乙酸於台灣飲中水中之特性，以提供足夠的資訊訂定飲用水水質標準。而本研究是針對淨水流程內之含氯鹵乙酸，探討該物質與微生物作用之關係。



Table 2-1 常見的 Chlorinated DBPs (Taha F. Marhaba 2000)

<b>Chemical class</b>	<b>Chemical compound</b>
Trihalomethanes(THM)	Chloroform
	Bromodichloromethane
	Dibromochloromethane
	Bromoform
Haloacetic acids (HAAs)	Monochloroacetic acid (MCAA)
	Dichloroacetic acid (DCAA)
	Trichloroacetic acid (TCAA)
	Monobromoacetic acid (MBAA)
	Dibromoacetic acid (DBAA)
	Tribromoacetic acid (TBAA)
	Bromochloroacetic acid (BCAA)
	Bromodichloroacetic acid (BDCAA)
	Chlorodibromoacetic acid (CDBAA)
Haloacetonitrile (HANs)	Dichloroacetonitrile
	Trichloroacetonitrile
	Dibromoacetonitrile
	Bromochloroacetonitrile
Cyanogen halides	Cyanogen chloride

## ✚ 2-2 含鹵乙酸(Haloacetic acids)

鹵乙酸是僅次於三鹵甲烷，含量最多的氯後消毒副產物。化學結構上以鹵素取代乙酸上的氫，取代反應以氯、溴最多。根據不同取代基總類及數量命名，目前常見的鹵乙酸有九種，分別為一氯乙酸 (Monochloroacetic acid; MCAA)、二氯乙酸(Dichloroacetic acid; DCAA)、三氯乙酸(Trichloroacetic acid; TCAA)、一溴乙酸 (Monobromoacetic acid; MBAA)、一溴一氯乙酸(bromochloroacetic acid; BCAA)、二溴乙酸 (Dibromoacetic acid, DBAA)、一溴二氯乙酸 (Bromodichloroacetic acid, BDCAA)、一氯二溴乙酸 (Chlorodibromoacetic acid, CDBAA) 及三溴乙酸 (Tribromoacetic acid, TBAA)。Table 2-2 為九種鹵乙酸之物化特性及化學結構。鹵乙酸具有極性及親水的官能基，由於鹵乙酸的pKa皆偏低(0.5~2.8)，在飲用水內會幾乎完全解離(>99.9%)以離子態存在於水體(Urbansky 2000)。

鹵乙酸已在動物實驗中被證實，當體內鹵乙酸達一定含量時會影響器官發育且具有致畸、致突變的可能。DCA (dichloroacetate)累積會抑制體內脂質與葡萄糖代謝，並影響神經系統運作。(Stacpoole 1989 )



Table 2-2 鹵乙酸物理性質 (Helaleh et al. 2003)

Name	MW	Mp(°C)	Bp(°C)	pKa	Chemical structure
Monochloroacetic acid	94.4	61-63	189	2.87	$\text{ClCH}_2\text{COOH}$
Dichloroacetic acid	128.9	10	194	1.26	$\text{Cl}_2\text{CHCOOH}$
Trichloroacetic acid	163.3	57-58	196	0.51	$\text{Cl}_3\text{CCOOH}$
Monobromoacetic acid	138.9	50	208	2.89	$\text{BrCH}_2\text{COOH}$
Bromochloroacetic acid	173	38	215	--	$\text{BrClCHCOOH}$
Dibromoacetic acid	217.8	39-41	250	1.47	$\text{Br}_2\text{CHCOOH}$
Bromodichloroacetic acid	207.8	70.5-74.5	215	--	$\text{BrCl}_2\text{CCOOH}$
Chlorodibromoacetic acid	252.2	95-98	233	--	$\text{ClBr}_2\text{CCOOH}$
Tribromoacetic acid	296.7	129-135	245	--	$\text{Br}_3\text{CCOOH}$

## 2-3 影響鹵乙酸生成因子

### 1. 消毒劑種類

加拿大學者 Williams 等人在 1993 年針對加拿大地區五十三座淨水場內清水及配水系統內進行採樣，分別於冬季及夏季採樣，並檢測水樣中各種 DBPs 的濃度，包括 DCAA 及 TCAA。五十三座水廠中，有三十五座採用 Chlorine-Chlorine 的消毒方式(以前消毒方式-後消毒方式 表示之)，十座採 Chlorine-Chloramine 模式，七座採用 Ozone-Chloramine 模式。從該實驗檢測結果發現，前後消毒方式皆用 chlorine 消毒的水樣，不論在冬夏兩季，皆明顯含有較高的 DCAA 與 TCAA。Ozone-Chloramine 與 Chlorine-Chloramine 兩者所產生的 HAA 多寡在冬夏季有不同的順序，夏季時 Ozone-Chloramine 模式的 DCAA 明顯比 Chlorine-Chloramine 多，但在冬季時，Ozone-Chloramine 模式比 Chlorine-Chloramine 模式產生較少量的 DCAA 及 TCAA (Williams et al. 1997)。

### 2. 酸鹼度(pH)

文獻指出不同 pH 條件下對各種 DBPs 的生成有不一樣的影響。Pourmoghaddas 針對 haloacetic acids(HAAs)與 trihalomethanes (THMs)在不同 pH 的生成量比較發現，THMs/TOX 值會隨 pH 升高而增

加，HAAs/TOX 值在鹼性環境下較低，弱酸性及中性條件下(pH5、pH7) 會生成較多 HAAs。因此，在淨水過程中，pH 值便成為控制 DBPs 生成的重要因素之一 (Pourmoghaddas et al. 1995)。

### 3. 天然有機物(Nature organic materials; NOMs)

飲用水中消毒副產物多寡普遍被認為與原水中天然有機物濃度與物種有關。水體中有機物含量通常以總有機碳(Total organic carbon; TOC)的數值來表示。TOC常作為原水中消毒副產物前驅物(DBPs precursor)含量的指標，當水體有餘氯存在時，這些餘氯會與 NOMs (eg. Humic acid; Fulvic acid)反應，生成THMs與HAAs等消毒副產物 (Reckhow et al. 1990)。



#### 4. 溫度

溫度提高有助於化學反應進行，一般而言，THMs 與 HAAs 在夏季的生成量比冬季時來的高。Williams 等人於冬夏兩季針對不同消毒劑種類(Chlorine ; Chloramine ; Ozone)與 DBPs 生成量比較，結果顯示夏季時 DBPs 生成量明顯比冬季多。

Table 2-3 DBPs in Canadian drinking water (Williams, LeBel et al. 1997)

DBPs	Treatment	site	Winter	Summer
			Mean (ug/L)	Mean(ug/L)
THMs	Cl <sub>2</sub>	Plant	16.8	33.5
	Cl <sub>2</sub>	Distribution sysyem	33.4	62.5
	Cl <sub>2</sub>	Plant	12.1	31.2
	NH <sub>4</sub> Cl	Distribution sysyem	13.7	32.8
	O <sub>3</sub>	Plant	6.8	44.0
	NH <sub>4</sub> Cl	Distribution sysyem	9.9	66.7
DCAA	Cl <sub>2</sub>	Plant	13.2	21.1
	Cl <sub>2</sub>	Distribution sysyem	15.6	19.0
	Cl <sub>2</sub>	Plant	9.8	12.5
	NH <sub>4</sub> Cl	Distribution sysyem	10.0	11.4
	O <sub>3</sub>	Plant	6.9	21.2
	NH <sub>4</sub> Cl	Distribution sysyem	4.6	14.1
TCAA	Cl <sub>2</sub>	Plant	27.8	34
	Cl <sub>2</sub>	Distribution sysyem	56.7	48.9
	Cl <sub>2</sub>	Plant	13.7	25.1
	NH <sub>4</sub> Cl	Distribution sysyem	13.2	21.4
	O <sub>3</sub>	Plant	5.8	24.6
	NH <sub>4</sub> Cl	Distribution sysyem	4.1	28.3

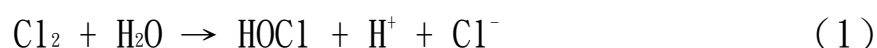
## 5. 消毒劑接觸時間

一般而言，接觸時間越長，總三鹵甲烷與鹵乙酸生成量越高。THMs及HAAs濃度隨著接觸時間增加濃度越高，但Trichloroacetone (TCAC)卻隨著時間而減少。可能原因為鹵化酮類消毒副產物會因水解作用或與多餘的氯離子發生反應，隨接觸時間增加而減少。(Singer 1994)

總HAAs雖隨接觸時間漸增而增加，但各物種之變化卻未必與接觸時間呈正向關係；Dalvi等科學家針對不同來源之水體比較HAA的個別物種與消毒劑接觸時間之關係，TCAA在四種實驗水體中濃度比其他物種高，具有最大的生成潛能。而作者推論，DCAA的生成機制由pH控制，濃度低但變化卻較其他物種穩定。TCAA因接觸初期尚有其他氧化物會競爭氯離子，所以需達適當接觸時間才開始增加，至最高點後，TCAA開始被生物利用而有些微的減少。此外，研究結果也顯示，MBAA會隨CBAA增加而漸減，可能是CBAA生成的前驅物質。

## 6. 溴離子

自然環境水體中多少都存在著微量的溴離子，而溴離子會與含氯消毒劑作用，進而間接式的影響鹵乙酸物種的變化。含氯消毒劑首先與水反應，根據pH產生次氯酸(HOCl)、次氯酸鹽(OC1<sup>-</sup>)或氯氣(Cl<sub>2</sub>)等不同型式之具消毒力的分子或離子(反應式1、2)。而這些分子與離子在與溴離子反應產生次溴酸(HOBr)、次溴酸離子(OBr)或溴氣(Br<sub>2</sub>)(反應式3、4、5)，接著再和水中天然有機物作用，產生含溴之鹵乙酸物種。(Dalvi et al. 2000)



由上述反應可知，溴離子會與含氯消毒劑的氯離子共同競爭與天然有機物反應。研究指出，對HAAs而言，當水中氯溴比(Cl<sub>2</sub>/Br<sup>-</sup>)增加時，會促使BCAA、DCAA、TCAA增加，DBAA減少，如圖 2-4所示。研究中也發現，HOBr對天然有機物氧化產生二鹵乙酸的能力是HOCl的25倍 (Chang et al. 2001)。

目前普遍將 Total Organic halides (TOX) 濃度做為 DBPs 的指標之一，已有實驗證實，當飲用水體中 TOX 會隨溴離子濃度增高而增加。而研究也顯示 THMs 與 HAAs 在適當的 pH 條件下 (pH 9 for THMs ; pH5~7 for HAAs )，水體中溴離子濃度越高，THMs 與 HAAs 的濃度也會越高 (Pourmoghaddas and Stevens 1995)。

#### ✚ 2-4 含鹵乙酸與微生物之關係

自然環境中的微生物已被證實可以降解含鹵乙酸。生物利用的方式包含在好氧的環境下進行共代謝或是直接以含鹵乙酸做為獨立碳源 (Lignell et al. 1984; Yu et al. 1995)。

Ellis 針對四種含鹵乙酸；MCAA、DCAA、TCAA 與 TFA；研究其代謝過程中的可能化學機制與中間代謝產物，並比較此四種含鹵乙酸在人工水池中被微生物降解速度的快慢 (初始鹵乙酸濃度約 20ug/mL)。研究結果說明，鹵乙酸除 TFA 外都可被微生物所降解，生物性降解發生時，初步會利用酵素水解，將 C1-C 之間的共價鍵打斷，使得氯脫離乙酸，而釋放出氯離子。MCAA 中間代謝產物為 glycolic acid、DCAA 為 glyoxalic、TCAA 為 oxalic acid。圖 2-5。三種含鹵乙酸在人工水

池中降解的速度: DCAA > MCAA > TCAA (Ellis et al. 2001)。

McRae以汙水處理廠取得之biomass分別用MCAA與TCAA做為獨立碳源進行微生物馴養。馴養後的biomass以PCR-DGGE分析微生物菌群結構，也將biomass上的微生物轉接(transfer)至含有MCAA or TCAA的Agar plate上。DGGE圖譜分析結果顯示，MCAA馴養後之菌群，主要屬於 $\alpha$ - or  $\beta$ -substitution of Proteobacteria，而TCAA馴養之菌群，多屬於 $\alpha$ -、 $\beta$ -、與 $\gamma$ -substitution of Proteobacteria。由MCAA agar plate所分離出菌種，屬於*Xanthobacter sp.* 與*Sphingomonas sp.* TCAA agar plate之菌種屬於*Chrysobacterium sp.* PCR-DGGE圖譜主要色帶與agar plate所培養出之獨立菌種，無一相同，說明可培養之菌種非是biomass馴養後的主要菌群。作者認為以PCR-DGGE結果較接近真實的菌群結構。此外，研究也顯示MCAA馴養出之菌群同樣具有代謝MBAA的能力 (McRae et al. 2004)。

而目前許多研究顯示，含鹵乙酸在飲用水系統中，如慢濾池、配水管網等，皆有降解之情況發生，這些系統內HAAs降解的原因，與該系統內微生物活性有密切的關係。例如, Baribeau 設計一套模擬的配水系統，於入流端行加氯或氯胺消毒，在不同餘氯及溫度條件下採集出流水，並檢測HAA濃度變化。該研究發現，模擬配水系統中，溫度較高的水體內(17-22°C)，二鹵乙酸(dihalogenated HAA)的含量會



隨水體中餘氯濃度的變化而有改變，而餘氯量最直接關係到水體內微生物之生物活性，餘氯量高時，生物活性低，鹵乙酸的變動就不明顯。而三鹵乙酸(trihalogenated HAA)於此實驗低餘氯環境下，降解之情形仍不明顯，說明飲用水系統內之微生物，較不易代謝三鹵乙酸 (Baribeau et al. 2005)。

另一飲用水系統中降解含鹵乙酸的例子也發生在以活性碳 (biological active carbon) 進行過濾處理的快濾池，該研究說明，活性碳使用初期具有吸附鹵乙酸的功能，但會隨時間增加而逐漸飽和，取而代之的可能降解因素是附著於活性碳逐漸增長之微生物 (Kim 2009)。

Ping Zhang由美國境內九處淨水廠內的GAC filter、tap water 與配水管網，成功分離出8種 HAA degradable bacteria，所有分離出的菌種分類上屬於Proteobacteria，其中6種分離出的菌株為 *Afipia spp.*，且多來自於GAC filter與配水管線，僅兩種菌株來自 tap water，說明 *Afipia spp.* 可能是biofilm降解鹵乙酸的主要角色。該學者並針對 *Afipia Felis* 進行7種含鹵乙酸代謝能力的降解試驗 (DCAA, TBAA, MCAA, MBAA, MIAA, TCAA, DBAA)，實驗結果也顯示，以 TCAA為獨立碳源是最難被HAA degradable bacteria所利用。MCAA、DCAA則根據不同的菌種，具有不同的喜好 (Zhang et al. 2009)。

## ✚ 2-5 本研究相關分子生物技術簡介

### 1. 核糖體與 16SrRNA gene

核糖體是細胞合成多胜肽鏈(polypeptide)所需之胞器，普遍存在於自然界所有生命體的細胞中，最主要的功能是作為mRNA轉譯出蛋白質的場所，就原核生物而言，核糖體本身包含兩個次單元 (subunits)，大次單元 (large subunit) 與小次單元 (small subunit)。大次單元包括了約30種蛋白質、5S rRNA (約120 base)、23S rRNA (約2900 base)，小次單元則含有約20種蛋白質以及16S rRNA (約1540 base) (圖 2-6)，而真核生物的大次單元則包括約50種蛋白質、5S、5.8S 及28S rRNA，小次單元包括33種蛋白質及18S rRNA。由於核糖體中的rRNA 具有廣泛的普遍性 (universal)、高度保守性 (highly conservation)、演化速率慢以及基因序列包含豐富的遺傳訊息等特性，所以rRNA gene常被用來分析微生物菌群間的演化關係 (phylogenetic relationship)。但並非所有的rRNA gene皆適合用來做為親緣關係分析之依據，例如，5S rRNA gene序列過短，不同生物間的基因序列差異性太低，難以分析不同菌種基因之歧異度。而23S rRNA gene序列又過長，增加了分析基因序列時的花費與時間，而16S rRNA gene的長度大小適中，能夠區分物種基因序列間的差異，因此，16SrRNA gene 的分析在學術上被廣泛利用，且現今之菌種資

料庫多以16S為分類依據，亦較為完善。依據16S rRNA gene 分類，可將生物體區分為三個主要domian: *Archaea*、*Bacteria* 以及 *Eukarya* (Woese 1987)。



## 2. 聚合酶鏈鎖反應(Polymerase chain reaction)

聚合酶鏈鎖反應是美國Cetus 公司的Kary Mullis 於1983 年所發明，具有能在短的時間內，準確地在試管中(in vitro)將某一段特定的核酸序列放大，PCR直至今日被廣泛應用在分子生物技術上，Mullis於1993年因PCR對生命科學之貢獻而獲頒諾貝爾化學獎。(Bartlett et al. 2003)

PCR 名稱來自於此技術之核心關鍵酵素；DNA 聚合酶。DNA 聚合酶是細胞合成核酸序列所必須之蛋白質酵素。PCR 的原理包括三個主要步驟：1、雙股 DNA 的變性(denaturing)；2、引子的黏合(Annealing)及 3、DNA 的複製(Extension)，在第一步驟中欲使雙股 DNA 變性，加熱破壞其氫鍵是最簡單的方式，因此在此三步驟核酸複製反應的過程中，DNA 聚合酶必須具備耐高溫的特性，而某一嗜熱菌(*Thermus aquaticus*；於 1976 年自溫泉中分離而得)的 DNA 聚合酶可在高溫下進行 DNA 合成；稱做 Taq DNA Polymerase。它的特性就在於能耐高溫，因此在 PCR 的過程中不會變性而破壞掉。能在高溫中進行 DNA 複製的酵素反應。PCR 三步驟不斷的重複，使原先可能非常微量，只有幾個 picogram( $10^{-12}$  gram)的 DNA，增加至 microgram, ( $10^{-6}$  gram)，甚至到 miligram, ( $10^{-3}$  gram)。但由於 Taq Polymerase 複製 DNA 時有一定的錯誤率，因此 PCR 重複的循環數(cycles)不能過多(一般以

30 個循環數為最佳)。PCR 的基本原理就是在試管中以因受熱變性而脫離的單股 DNA 作為模版(template)，使 DNA 聚合酶在具有專一性、適當的引子 (primer) 做為前導下，將一個個核苷酸(Nucleotide)依照模版加以複製而成為完整的雙股 DNA，完成之雙股 DNA 再分離，持續進行下一個 cycle，如此一來，便達到在生物體外大量合成 DNA 片段的目的。



Table 2-4 目前常用的分子生物技術(Schlöter et al. 2000)

Abbreviation	Standing for
AFLP	amplified (DNA) fragment length polymorphism
AP-PCR	arbitrary primed polymerase chain reaction (for DNA)
ARDRA BOX-PCR	amplified ribosomal DNA restriction analysis polymerase chain reaction of (DNA sequence between) BOX elements
DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis
FAME	fatty acid methyl ester analysis
IGS	intergenic spacer analysis
Inter-LINE-PCR	polymerase chain reaction of (DNA sequences between) long Interspersed elements
MLEE	multilocus enzyme electrophoresis
PFGE	pulsed field gel electrophoresis
PCR-RFLP	restriction fragment length polymorphism of polymerase chain reaction-generated amplicons
RAP-PCR	polymerase chain reaction of random-amplified polymorphic DNA
REP-PCR	polymerase chain reaction of (DNA sequences between) repetitive extragenic palindromic elements
RISA	ribosomal intergenic spacer analysis
TGGE	temperature gradient gel electrophoresis
ERIC-PCR	polymerase chain reaction of (DNA sequence between) enterobacterial repetitive intergenic consensus

### 3. 變性梯度凝膠電泳(denaturing gradient gel electrophoresis; DGGE)

DGGE是一種利用變性劑來補強傳統電泳分析的分子生物技術，傳統DNA電泳技術只能分離不同電荷比核酸片段，意即只能分離不同大小的DNA，無法分離不同序列的DNA片段。而DGGE不但能分離大小不同之DNA，更可以分離大小相同但序列不同的基因片段。理論上來說，若DGGE條件操作得宜，甚可分離僅有一個核苷酸差異之較短的兩股DNA片段。由於具有此種特性，DGGE早期是用來偵測基因上的點突變，進行醫學研究為主。Muyzer將此種技術加以改良後，應用於分析環境微生物的菌群結構上，有著相當不錯的成果，而且結合PCR

(polymerase chain reaction)後的PCR-DGGE，更能夠準確地偵測不同環境下複雜的微生物菌相。(Muyzer et al. 1993)。DGGE 原理主要是在acrylamide/bis 電泳的過程中，加入能使雙股DNA變性的化學物質，如urea 和formamide，使得雙股DNA 發生變性而局部或完全分離。雙股的DNA之間，鍵結力量是是以鹼基(base)間的氫鍵為主，一般的DNA具有四種鹼基且兩兩配對，腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)、鳥糞嘌呤(G)與胞嘧啶(C)。(A)僅與(T)配對，(A)(T)之間會形成兩個氫鍵，而(G)與(C)配對會形成三個氫鍵。因此在基因序列中，如果(C)與(G)的總和數量越多，打開雙股所需要的力量越大，亦即所需

要變性劑的濃度要越高，。這也就是DGGE所應用的基本原理，利用變性劑的濃度梯度不同，使雙股DNA在通過電泳膠時，由於變性分開而改變形狀，雙股DNA形狀改變後，DNA在電泳膠中的泳動速率就會改變，意謂著DGGE電泳中，GC含量高的DNA片段，會出現在高變性劑濃度的區域。藉由這項特性，只要DNA的序列不同，便會在電泳膠上分離，DGGE電泳分為兩種，原理皆相同，一是水平電泳，用來評估合適的變性劑濃度範圍，二是垂直電泳，用於分離不同序列的基因片段。

DGGE 的應用相當的廣泛，可以用來作分析混合菌群的結構組成和分佈變化，甚至可以用來篩選clone libraries 等，但DGGE 應用最廣的功能還是為分析微生物樣品的組成和群落的分佈變化。Muyzer的研究結果顯示，PCR-DGGE 的指紋圖譜 (gene fingerprinting) 對於DNA 的序列變異性有相當高的靈敏性，在DGGE圖譜中的色帶(band)，每一條都代表著一個微生物群落，不同的band 帶即代表著不同的菌群，因此觀察DGGE 電泳的band 帶分佈，就可以觀察出環境中微生物的分佈及消長，進而判斷樣品中的微生物結構。



## ✚ 2-6 分子生物技術於環境上之應用與優缺點。

環境中微生物的群落分佈可做為觀測環境狀況的指標，因此一直是學者想要了解的。以往環境微生物的分析方式，多是利用培養純化的方法，來得到環境樣本中的菌種。但事實上環境中還有更多菌種因為有著複雜難解的共生關係與生存條件，無法被傳統的培養方式分離出來，使分析環境樣本的菌群實際狀況與微生物物種增添了不少難度(Rollins et al. 1986)。文獻指出，以目前的分離技術，環境中的微生物有高達90~99%無法在實驗室中培養出來(Roszak et al. 1987)。近來由於分子生物學的發展與進步，使得分子生物分析技術已成為分析環境生物樣本的一種新趨勢。

DGGE具有分離不同序列基因的特性，常被用來分離環境樣本中16SrDNA的，以達檢視菌群結構之目的。此種分析方法克服了現行培養菌種技術的瓶頸，也縮短研究的時間，提高時效性，因此被廣泛的使用在微生物菌相及生態的研究上。實際應用的例子包含土壤、河川、海洋等各式的環境樣本(Gray et al. 1996; Macnaughton et al. 1999; Watanabe et al. 2001)。

分子生物技術雖解決傳統法無法培養的問題，但仍舊有許多困難需要克服與修正。如DNA萃取效率，不同環境樣本需可能需要選擇不同的萃取方式，已達最佳的萃取效率(Martin-Laurent et al. 2001)。

由於PCR是多數分子生物技術最重要的一環，PCR效果的好壞，將大大影響分析的結果。例如土壤及沉積物的環境樣本含有腐質酸(humic acids)與富啡酸(fulvic acid)，會阻礙DNA的雜交(Steffan et al. 1988)，也會抑制Taq polymerase的聚合作用(Tebbe et al. 1993)，所以萃取出DNA樣本中，須先加以去除此類物質。此外，引子(primer)的設計模式，可能導致不同的實驗結果，進行PCR前，需將引子的增幅效果也考慮進去(Polz et al. 1998; Schmalenberger et al. 2001)。

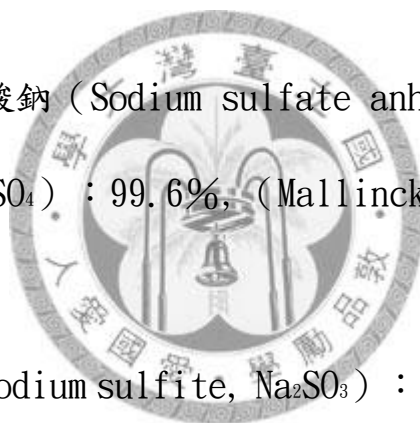


## 第三章 材料與方法

### 3-1 全流程一氯、二氯、三氯乙酸濃度檢測

#### I. 藥品材料

- (1) 甲基第三丁基醚 (Methyl tert-butyl ether, MTBE) : 99.8 % , (Riedel-de Haen, Shanghai ; China)
- (2) 甲醇 (Methanol, CH<sub>3</sub>OH) :  $\geq 99.9\%$ , GC grade, (Merck, NJ ; USA)
- (3) 粒狀無水硫酸鈉 (Sodium sulfate anhydrous, Granular 10-60 Mesh, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) : 99.6%, (Mallinckrodt Chemicals, St, Louis ; MO)
- (4) 亞硫酸鈉 (Sodium sulfite, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>) : 98.4%, (J. T. Baker, NJ ; USA)
- (5) 硫酸 (Sulfuric acid, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) : 95~97%, (Merck, NJ ; USA)
- (6) 氯胺 (Ammonium Chloride, NH<sub>4</sub>Cl) :  $\geq 99.8\%$  , (Merck, NJ ; USA)
- (7) 鹵化乙酸標準品 (SUPELCO, PA ; USA)  
EPA 552 Halogenated Acetic Acids Mix
  - (a) Bromoacetic acid (一溴乙酸) : 98.6%



- (b) Bromochloroacetic acid (一溴一氯乙酸) : 98.4%
- (c) Chloroacetic acid (一氯乙酸) : 99.9%
- (d) Dibromoacetic acid (二溴乙酸) : 97.4%
- (e) Dichloroacetic acid (二氯乙酸) : 99.9%
- (f) Trichloroacetic acid (三氯乙酸) : 97.0%
- (8) 擬似標準品 (Surrogate standard) : 2-溴丁酸  
(2-bromobutyric acid) :  $\geq 98\%$ , (Merck, NJ; USA)
- (9) 內標準品 (Internal standard) : 1,2-二溴丙烷  
(1,2-dibromopropan) :  $\geq 97\%$ , (Merck, NJ; USA)

## II. 儀器設備

- (1) 氣相層析儀(GC- $\mu$ ECD) : 分析一氯、二氯、三氯乙酸

美國安捷倫製 (Agilent Technology) , 型號 6890 series N ,  
搭配微電子捕捉器 ( $\mu$ ECD) 偵測器 , 層析管柱為 AB-1701 (Abel  
Bonded, Wilmington, DE, USA) , 長度為 30m , 管徑 0.32mm。

氣相層析儀分析條件 : Injector 溫度 210°C , 不分流模式  
(Splitless Mode) 。微電子捕捉器溫度 290°C 。Column 流量  
1.0ml/min , 平均速度為 19cm/sec 。Oven 升溫程式 : 初始 40°C 維持

10 分鐘，接著每分鐘升溫 2.5°C 直至 65°C，再以每分鐘 10°C 升溫至 85°C 後，改以每分鐘 20°C 升溫至 205°C 持續 7 分鐘，

### III. 步驟方法

本研究鹵乙酸分析實驗步驟是依據 US EPA Method 552.3，再依實際情況之需要而調整。

首先將實廠採回之水樣與室溫平衡，量取各淨水單元水樣 30 毫升，置入 40 毫升含鐵氟龍墊片之樣品瓶中。以微量注射針添加 15  $\mu$ L 之擬似標準品 (20  $\mu$ g/mL of 2-bromobutanoic acid in MTBE)，再以玻璃滴管添加 1.5ml 濃硫酸使 pH  $\leq$  0.5，避免水樣中鹵乙酸以非離子狀態存在造成分析的誤差。精確地加入 3 毫升萃取液含內標準品 (Internal standard, 300  $\mu$ g/L of 1,2-dibromopropan in MTBE)。加入適量的粒狀硫酸鈉(約 11g) 後，以震盪機或手搖晃數分鐘達到飽和狀態後靜置，使有機層與水層分離。硫酸鈉之目的在於使水層的離子強度增加，促使鹵乙酸由水層進入至有機層，此步驟亦可降低 MTBE 的水溶性，以得較佳之回收效率。使用玻璃滴管吸取 1 毫升上層有機層至 15 mL 圓柱試管中，添加 1mL 10% 硫酸甲醇後，放置於 50°C 水浴槽 2 個小時進行甲酯衍生化。完成後將樣品移出水浴槽與室溫平衡，再依序添加 1 mL MTBE 與 3mL 硫酸鈉溶液 (150 g/L)，劇烈搖

晃後靜置。取上層 1 毫升的有機層至乾淨的 15mL 圓柱試管，隨即加入 1mL 硫酸鈉溶液再劇烈搖晃後靜置，避免靜置過久使酯化物水解。最後從試管中取出 1mL 上層液至 1.5mL 樣品瓶中，儘快分析樣品並保存  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中。

### ✚ 3-2 一氯、二氯、三氯乙酸濾砂降解試驗

#### I. 藥品材料

- (1) Sodium monochloroacetate (ALDRICH ; USA)
- (2) Sodium dichloroacetate (ALDRICH ; USA)
- (3) Sodium trichloroacetate (ALDRICH ; USA)
- (4) 0.22um membrane filter (MILLIPORE ; USA)
- (5) Phosphate buffer (pH 7)

1M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Nacalai Tesque ; Japan)

1M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Nacalai Tesque ; Japan)

#### II. 儀器設備

- (1) 液相層析儀(LC)：分析降解過程中一氯、二氯、三氯乙酸濃度變化。


美國安捷倫製 (Agilent Technology) ，型號 1200 series ，搭配光二極體陣列式檢測器 (Diode Array Detector ; DAD) ，層析管

柱為 ZOBAX Eclipse Plus C18(Agilent ; USA) , 長度為 150mm , 管徑 4.6mm , 平均孔隙大小 5 $\mu$ m 。

液相層析儀分析條件：注射體積 10 $\mu$ L。Column 流量 1.0ml/min , 溫度 30 $^{\circ}$ C。Mobile Phase 為 97.5% Phosphate buffer 加上 2.5% Methanol , Retention time 為 12mins。DAD 設定之分析波長為 UV-210nm 。

(2) 真空 pump (GAST ; USA)

### III. 步驟方法



將由實場採集之快濾砂保存於 4 $^{\circ}$ C , 暫緩微生物之活性 , 至實驗使用前 , 才將濾砂與室溫平衡。為了刺激濾砂上之微生物利用鹵乙酸做為營養來源 , 進行批次實驗前 , 先將 50 $\mu$ g/L 含氯鹵乙酸 , 取 1mL 各別加入內含 20mL 快濾砂之容器內 , 置於 25 $^{\circ}$ C 恆溫箱培養 24 小時。配置 1g/L 一氯、二氯、三氯鹵乙酸、1mM phosphate buffer、0.22 $\mu$ m 濾膜過濾後之自來水。每種鹵乙酸分別架設四瓶批次反應瓶 , 方式如下：

- A. 刺激活化後之快濾砂 20mL + 1g/L 含氯鹵乙酸 10mL + 1mM phosphate buffer 10mL + 過濾後自來水定量至 200mL。(鹵乙酸濃度：50 mg/L、Phosphate buffer 濃度：0.1mM)

- B. 高溫高壓滅菌後之快濾砂 20mL + 1g/L 含氯鹵乙酸 10mL + 1mM phosphate buffer 10mL + 過濾後自來水定量至 200mL。含氯鹵乙酸最終濃度：50 mg/L、Phosphate buffer 最終濃度：0.1mM。
- C. 1g/L 含氯鹵乙酸 10mL + 1mM phosphate buffer 10mL + 過濾後自來水定量至 200mL。含氯鹵乙酸最終濃度：50 mg/L、Phosphate buffer 最終濃度：0.1mM。
- D. 1g/L 含氯鹵乙酸 10mL + 1mM phosphate buffer 10mL + 純水定量至 200mL。含氯鹵乙酸最終濃度：50 mg/L。

將此 12 瓶反應瓶以鋁箔覆蓋，避免鹵乙酸在實驗過程中光解而減少，置於 25°C 恆溫箱震盪培養。適當時間間隔採集水樣，將樣品以 0.22 $\mu$ m 濾膜過濾後，依上述 HPLC 操作條件進行鹵乙酸分析。



### 3-3 全流程單元生物膜與水體微生物菌群分析

#### I. 藥品材料

##### 微生物核酸萃取用藥品

- (1) Phenol/chloroform/IAA (25 : 24 : 1) (AppliChem ; Germany)
- (2) Phenol/IAA (24 : 1) (AppliChem ; Germany)
- (3) Chloroform (AppliChem ; Germany)
- (4) Achlopeptidase (SIGMA ; USA)
- (5) Proteinase K (SIGMA ; USA)
- (6) Lysis buffer :
  1. Tris-HCl (BioShop ; Canada)
  2. EDTA (BioShop ; Canada)
  3. Sucrose (J. T Baker ; USA)
- (7) PBS buffer (Biomen ; Taiwan)
- (8) Ethanol (Scharlau ; Spain)
- (9) SDS (J. T Baker ; USA)
- (10) Isopropanol (Scharlau ; Spain)
- (11) Ammonium acetate (J. T Baker ; USA)
- (12) Genomic DNA extraction kit (bioman, Taiwan)
- (13) Wizard DNA clean up system (Promega, USA)

## 變性梯度凝膠電泳藥品

- (1) Acryamide/bis (37.5 : 1 ; 40%) (BioShop ; Canada)
- (2) Formamide (deionized) (BioShop ; Canada)
- (3) Urea (BioShop ; Canada)
- (4) Ammonium persulphate (APS) (AppliChem ; Germany)
- (5) TEMED (BioShop ; Canada)
- (6) SYBR GreenI (Lonza ; USA)

## II. 儀器設備

- (1) 控溫水浴槽 (FIRSTTEK ; Korea)
- (2) 聚合酶鏈鎖反應器 (Biometra ; Germany)
- (3) 變性梯度凝膠電泳設備 (Bio-Rad ; USA)
- (4) UV-box (WEALTEC ; USA)

## III. 步驟方法


- (1) 微生物 DNA 萃取及純化實驗

本研究濾砂與池壁生物膜的 DNA 萃取採用兩種方式，一是使用 phenol/chloroform 傳統法，二是使用市售商品化微生物 DNA 萃取試劑組(Easy Pure Genomic DNA mini Kit ; Bioman, Taiwan)進行微生物總 DNA 萃取。傳統法之萃取步驟如附錄一，由於傳統法較耗時且 phenol、chloroform 等藥劑對人體有一定程度的毒害，於是在實驗

後期，便採用萃取試劑組，做為水體經過濾收集之濾膜的 DNA 萃取方式；步驟如附錄二。

萃取後之 DNA 溶液中，可能含有聚合酶連鎖反應(PCR)抑制物(如腐植酸)，所以在進行 PCR 之前，必須將這些可能抑制酵素反應的雜質去除。進一步的總 DNA 純化方式，本實驗採用 Wizard DNA Clean-Up kit，詳細的純化步驟，詳見附錄三。

## (2) 引子(primer)的選用



引子的選擇乃是參考 Kazuya Watanabe 的實驗結果。該實驗選出三種常用來針對 16SrDNA 保守區塊(conserved region)所設計的引子(GC357f/534r、GC357f/907r、GC968f/1401r)，並比較此三種引子對地下水、受油汙污染之地下水 以及海水三種環境樣本經 PCR-DGGE 分析的結果。結果顯示，GC357f/534r、GC357f/907r 對水體的環境微生物 DNA 有較高的親和力(Watanabe, Kodama et al. 2001)。為了有效突顯菌群結構的豐富性，本實驗選用可放大出較長 16SrDNA 片段的 GC357/907r 此組 primer，做為 PCR 實驗的引子。

### (3) 聚合酶鏈鎖反應(Polymerase chain reaction ; PCR)

微生物總 DNA 經萃取後，以聚合酶鏈鎖反應擴增生物膜及水體中 16SrDNA 基因片段。所使用的引子(primer)Table 3-1 所示，其中一段 primer 5' 端接上約 40 base pair 的 GC clamp 核酸序列，其目的是為了避免雙股 DNA 在接下來的變性梯度凝膠電泳中完全變性而分離成單股。聚合酶鏈鎖反應主要包括三個步驟:Denaturing、Primer annealing 以及 Elongation。PCR 所使用的試劑及溫度條件如 Table 3-2、圖 3-1。

PCR 反應完成後，將產物以 2%瓊脂膠體進行水平電泳，電壓 100 伏特 30 分鐘後，與 Ladder Marker 比對，確認 PCR 產物大小無誤。

### (4) 變性梯度凝膠電泳(DGGE)

實驗中使用變性梯度凝膠電泳來分析全流程池壁、水體微生物與濾砂之菌相關係。取 25uL 聚合酶鏈所反應擴增後 DNA 產物，與 6X DNA loading dye 混合均勻後，注入大小約 10x16cm 含 6% Acryamide/bis 的變性凝膠中，固定電壓 60 伏特、溫度 60℃，於 7L TAE buffer 內電泳 16 小時。

### (5) 染色：銀染 (Silver staining)與 SYBR Green I

電泳完成後，將膠體進行銀染(銀染步驟如附錄四)或 SYBR Green I 染色 40 分鐘。銀染後之膠體置於日光燈板下，以掃描器掃描後存檔。SYBR Green I 染色後則於紫外燈箱下，以 CCD 照相存檔。DGGE 所使用之試劑配方如 Table 3-3、Table 3-4、Table 3-5。

硝酸銀(silver nitrate)在酸性的條件下會與 biopolymers 反應(例如 protein、DNA、RNA 等)。於鹼性的條件下，銀離子會經由甲醛的催化(formaldehyde)還原成銀，達到顯色的效果。銀染具有高解析度，可以偵測出非常微量的 DNA，此優點可以增加 PCR-DGGE 亮帶多樣性，但也同時有數種缺點；由於 protein 與 RNA 同時會被染色，易造成膠片背景顏色過深或模糊，DGGE 電泳前適當的 PCR 產物前處理，可以增加膠片的解析度。銀染處理過程中，等同於對 biopolymer 造成不可逆的化學反應，無法再對膠體進行 Blotting 或 hybridization analysis 等後續的實驗，另外，銀染也會降低序列分析時 DNA re-amplification 的效果。

根據銀染對 DNA 的破壞特質，欲定序的 DGGE 圖譜，不適合使用銀染的方法染色。SYBR Green I 具有比 ethidium bromide 更高的偵測極限，染色結果較接近銀染，且不影響後續 DNA 定序的結果，因而

本實驗選用 SYBR Green I 做為切膠定序前的染色方法，銀染法則用來進行 PCR-DGGE 圖譜的群聚分析(cluster analysis)。



Table 3-1 本研究所使用之引子

Primers	Sequence(5' →3')	specificity	reference
GC-clamp	CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G	--	
GC357F	GC-clamp+ CCT ACG GGA GGC AGC AG	16S rDNA	(Muyzer, Dewaal et al. 1993)
357F	CCT ACG GGA GGC AGC AG	16S rDNA	
907R	CCG TCA ATT C(A/C)T TTG AGT TT	16S rDNA	(Amann et al. 1992)

Table 3-2 PCR 反應試劑成分

component	Volume (uL)	Final Concentration
10X PCR buffer	5	1X
10mM dNTP	2	0.1mM for each dNTP
10uM Primers(forward and reverse)	2	0.2uM for each primer
DNA template	1	10~30ng
Taq polymerase(2U/uL)	0.5	0.5 unit
Distilled water	39.5	---
Final valume	50	---



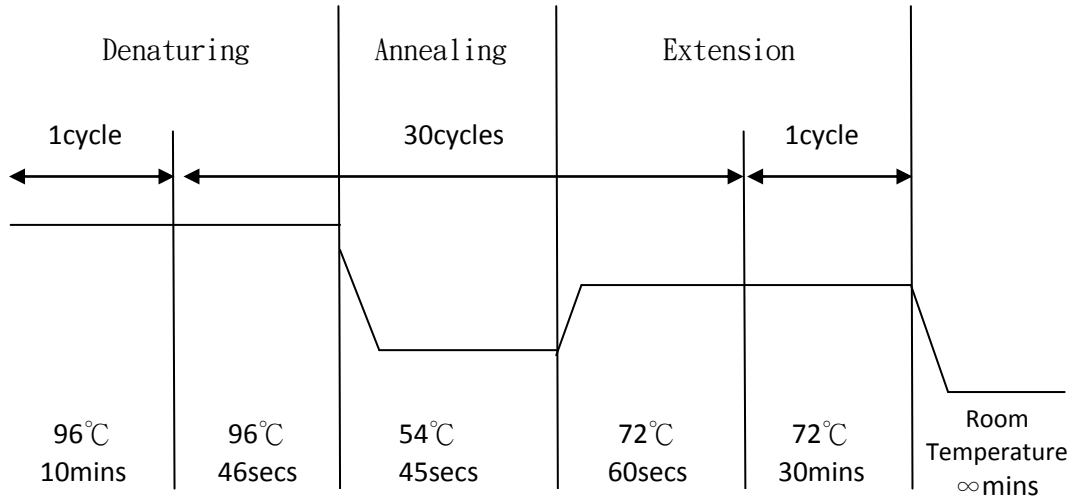


圖 3-1 GC357-907 PCR 反應控制圖

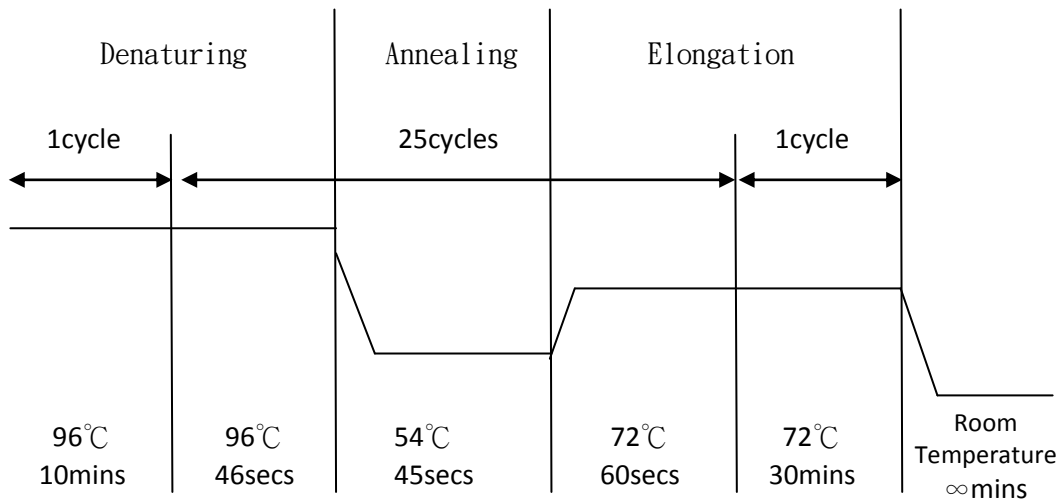


圖 3-2 357F-907R PCR 反應控制圖

Table 3-3 本實驗用之 Acryamide/bis 濃度所能分離之核酸長度

Gel percentage	Base Pair Separation
6%	300-1000 bp

Table 3-4 6% Acryamide 變性梯度凝膠成分

	35% Denaturing solution	65% Denaturing solution
40% Acryamide/bis	15 mL	15 mL
50X TAE	2 mL	2 mL
Formamide (deionized)	14mL	26mL
Urea	14.7g	27.3g
dH <sub>2</sub> O	To 100 mL	To 100 mL

Table 3-5 10% Ammonium Persulfate 成分

Reagent	Amount
Ammonium Persulfate	0.1 g
dH <sub>2</sub> O	1.0 mL

(6) 核酸序列結果分析

從 DGGE 圖譜結果切下所需亮帶，將膠體上之 DNA 溶解於 Tris buffer 中，以不含 GC-clamp 之引子；357F、907R 再一次進行聚合酶鏈鎖反應擴增此片段 16SrDNA，此種方式又稱之為 Nested PCR，即利用第一次 PCR 所得之產物做為第二次 PCR 反應所需的 template，進行該片段第二次擴增。

PCR 操作條件如圖 3-2。由於 Nested PCR 產物容易因 Taq 複製錯誤而改變原有序列，Secondary PCR 的 cycle 數，減低至 25 次，降低第二次擴增之產物與原先 16SrDNA 序列的差異。PCR 反應完成後，以同樣 DGGE 條件進行電泳，確認 PCR 產物僅有單一色帶。

分析完各流程之菌群差異後，將 DGGE 指紋圖譜上有興趣的 partial 16SrDNA band 切下定序後，以得知確切的菌種名稱。DGGE 指紋圖譜亮帶之序列分析，乃委託明欣生物科技公司代為定序，而定序所得之核酸序列，再經由 NCBI(National Center for Biotechnology Information)網站提供核酸資料庫進行比對。利用該網站 BLAST 功能，即可獲得比對之菌種及序列相似度之結果。

#### (7) 圖譜分析

DGGE 所得之圖譜，經由 BIO-Rad 公司出版之分析軟體;Quantity ONE，分析各流程間菌相之相似度。所採用之統計分析法為 UPGMA (Unweighted Pair-Group method using arithmetic average )演算法進行聚類分析(Hayashi et al. 2007)。

為了研究生物膜、單元水體與濾砂菌相之關係，經微生物總 DNA 萃取後，以 PCR-DGGE 法分析混合菌群結構。由於 DGGE 圖譜結果複雜度頗高，不易由肉眼分析，因此本研究採用統計學常用的聚類分析(cluster analysis)方式來分析環境 DNA 指紋圖譜。藉由 BIO-RAD 公司出版的圖譜分析軟體 Quantity ONE，分析 DGGE 結果，選用的方式為 UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages)法，此演算法的假設下，各 DNA 上的鹼基差異與親源遠近

關係大約成正比。藉由軟體計算，便可將 PCR-DGGE 所得之 DNA 指紋圖譜進行計算，並分析 DGGE 指紋圖譜中各 lane 內所有 band 之間的相對位置、總 band 數等差異因子而顯示出量化的分析圖。數值 1 代表相似度 100%，0 則表示 0%相似度。

DGGE 圖譜中，橫向欄位(Lane)各代表每一淨水處理單元內的菌群結構，縱向亮帶(band)則代表某單一菌種，藉由分析 Lane 內每條 band 的強弱與消長變化，即可了解菌群在不同單元內的變異。



## 第四章 結果與討論

### 4-1 一氯、二氯、三氯乙酸於自來水廠處理單元之變化。

本實驗分別於春季、夏季、冬季採集目標淨水廠之各流程出水，依處理流程順序分別為：原水、快混池出水、膠凝池出水、沉澱池出水，快濾池出水、清水、及距實場約 2km 的配水管線，配水樣品選擇離淨水場有一定距離之採樣點採樣，避免民宅當作採樣點，以防止蓄水塔造成的影響。

當原水進入淨化流程時，會先在混合池通氯氣或次氯酸進行前加氯(pre-chlorination)，氧化水中有機物質，進而控制微生物在流程中過度滋長。水體中餘氯在適當的條件下會與環境中天然有機物發生化學反應，產生含氯之有機物，統稱為消毒副產物(disinfection by-product)，含氯鹵乙酸為其中一大類，其中又以二氯乙酸(dichloroacetic acid)、三氯乙酸(trichloroacetic acid)；簡稱 DCAA、TCAA，為含氯乙酸兩個最主要的物種。一氯乙酸(monochloroacetic acid；MCAA)之檢測結果因其濃度在三個季節採樣中皆低於最低偵測極限 1 $\mu$ g/L，因此並未於此列出討論。

圖 4-1 為春季 DCAA 與 TCAA，在實場各流程的檢測結果。原水初始 DCAA、TCAA 含量分別與 1.8 ug/L、2.6 ug/L，經混合池中與氯氣反應，DCAA 與 TCAA，有些微的升高，分別為 7.6 ug/L、4.7 ug/L。膠凝與沉澱單元中 DCAA、TCAA 濃度皆無明顯變化，經快濾池處理後，DCAA 下降至 5.1 ug/L，TCAA 提升至 7.6 ug/L，

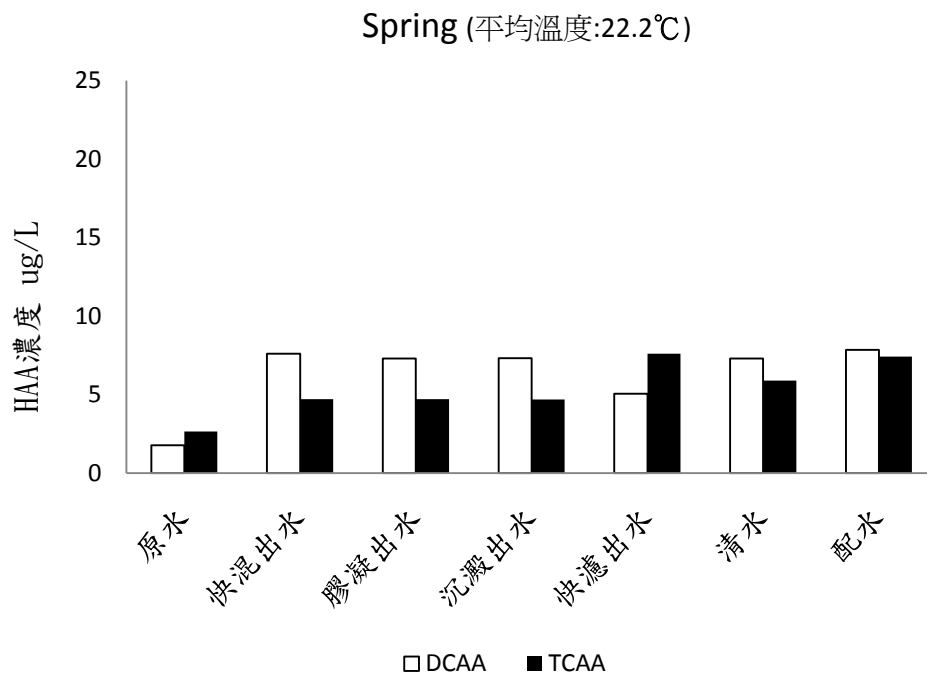


圖 4-1 春季 DCAA 與 TCAA 在淨水廠全流程中濃度變化

春季 DCAA 與 TACC 濃度變化起伏不大，應是受季節溫度之影響。圖 4-2 顯示 DCAA 與 TCAA 在夏季於處理流程之變化，當原水經前加氯進入混合池再進入到膠凝池，DCAA 與 TCAA 濃度有顯著的上升，快混池 DCAA、TCAA 濃度：7.9 ug/L、1.6 ug/L，膠凝池 DCAA、TCAA 濃度：20.3 ug/L、18.1 ug/L。當水體經快濾池過濾後，水中 DCAA、TCAA 濃度便下降至 3.8 ug/L、7.5 ug/L，隨後在清水與配水管線中，兩者濃度無太大的變化。

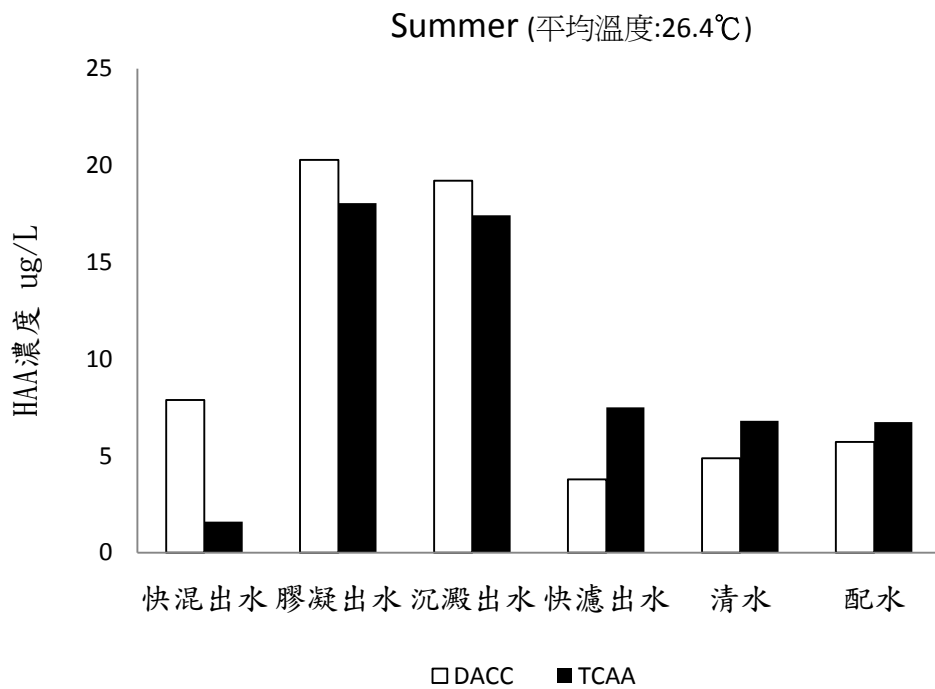


圖 4-2 夏季 DCAA 與 TCAA 在淨水廠中濃度變化



圖 4-3 為冬季採樣的全流程結果，可看出 DCAA、TCAA 改變幅度比春、夏兩季小的許多。值得注意的是，冬季時 DCAA 在沉澱單元才達至最高，6.1 ug/L。春、夏兩季 DCAA 最高濃度位於膠凝單元，可能原因推測是冬季因均溫較低，原水在混合池加氯後需要較長的反應時間生成 DCAA 與 TCAA。

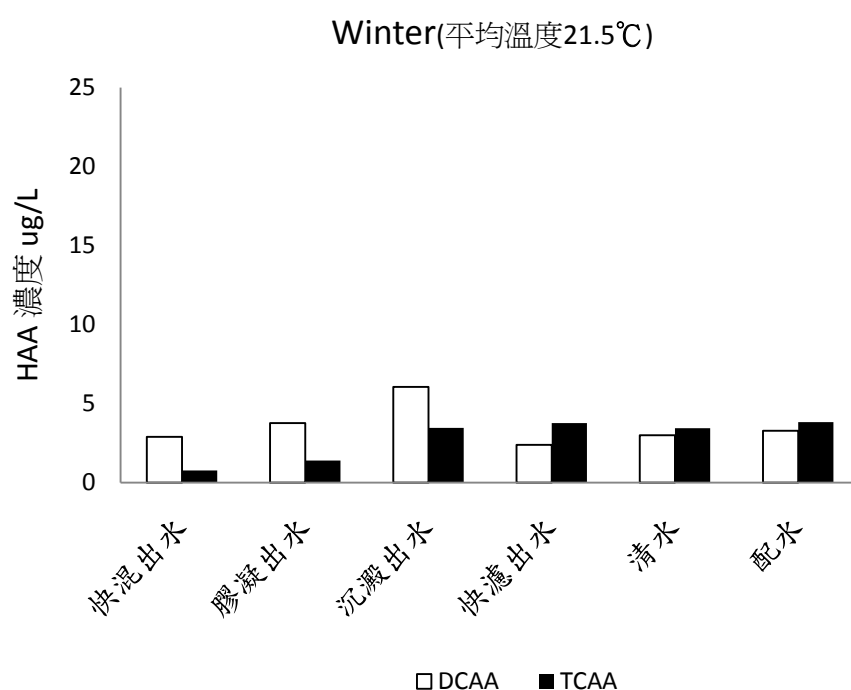


圖 4-3 冬季 DCAA 與 TCAA 在淨水廠中濃度變化

由三季 DCAA 與 TCAA 濃度於各淨水單元的比較，其共同的特點在於，DCAA 在三季中經由快濾池處理過後，濃度有顯著的下降。而快濾池內主要的淨化腳色，便是池中之濾砂，因此合理懷疑，快濾砂上之微生物具有降解 DCAA 之功能。TCAA 在春冬兩季並無濾砂降

解的現象，但在夏季與 DCAA 濃度曲線類似，經快濾砂過濾後有大幅度的下降。MCAA 濃度在三季各個檢測點皆低於最低偵測極限，推測可能原因有二，一是生成量少，二是相較於 DCAA，MCAA 分解快速，微生物較喜好將 MCAA 做為優先的營養來源。

觀察三季中清水與配水內的含氯鹵乙酸，配水內的 DCAA 與 TCAA 濃度會些微大於清水內的濃度。一般認為，含氯鹵乙酸經配水管網附著之微生物作用應有下降的趨勢。查詢文獻發現，配水內鹵乙酸的濃度變化會與自由餘氯含量有關，自由餘氯高不但會再生成鹵乙酸而且也抑制微生物降解鹵乙酸的機制，自由餘氯低的情況下微生物則會在輸水管線中大量降解鹵乙酸 (Speight et al. 2005)。檢測該廠清水與配水內自由餘氯約界於 0.5~0.7 mg/L，與文獻比較是屬於較高的餘氯量，因而得到配水內鹵乙酸濃度會微幅大於清水濃度。

#### 4-2 快氯砂降解一氯、二氯、三氯乙酸批次試驗。

由三季 MCAA、DCAA、TCAA 濃度全流程分布推斷，快濾砂可能具有降低此三種鹵乙酸之特性，其中又以生物性降解為最主要之因素。為證實此論點，此實驗針對潭頂水場快濾池去除一氯、二氯、三氯乙酸的情形做進一步的探討。由於濾砂使用前保存於 4°C 冰箱，首先將實場採回之快濾砂分別加入微量的一氯、二氯、三氯乙酸及無

菌水，使附著於快濾砂之微生物活化，刺激微生物利用此三種鹵乙酸做為生長營養來源。而後取 10mL 活化過之快濾砂分別倒入含有濃度約 45 mg/L MCAA、DCAA、TCAA 三種鹵乙酸的血清瓶中，以滅菌後的自來水及做為培養的基質，並加入適量磷酸鹽緩衝 pH，並給予震盪保持好氧狀態，置於 25°C 恆溫箱中進行降解試驗，一定間隔時間採樣，經無菌過濾保存後，利用 HPLC 量測樣品中 MCAA、DCAA、TCAA 濃度並觀察結果及變化。

圖 4-4 ~圖 4-6 依序為 MCAA、DCAA、TCAA 於 300 小時內經 HPLC 量測之結果。曲線 M、D、T 分別代表 MCAA、DCAA、TCAA 供給實場快濾砂後的濃度變化。b1、b2、b3 依序為滅菌濾砂對照組、無砂空白、HAA 空白，大寫 M、D、T 代表鹵乙酸的種類，M：MCAA，D：DCAA，T：TCAA。

從 MCAA 與 DCAA 降解曲線可觀察出，隨著時間增加，鹵乙酸確實有減少，濃度 45 mg/L 的一氯、二氯乙酸在 288 小時內，降低至 1 mg/L 以下。為了分別出生物性降解與濾砂吸附鹵乙酸，本實驗曲線 Mb1 與 Db1 代表的是滅菌後濾砂的空白試驗，與操作組對照後可以明顯看出，一氯、二氯乙酸的減少，與濾砂吸附鹵乙酸無直接的關係。45 mg/L 三氯乙酸經過 288 小時無顯著的減少，與當初之假

設有出入，此次實驗結果也顯示，同量的濾砂，降解 MCAA 與 DCAA 時間快慢上無顯著差別。

將 MCAA 與 DCAA 降解圖的每個時間點前後濃度差除以時間距離，便可得到圖 4-7，圖 4-8 降解實驗中，MCAA 與 DCAA 的平均降解速率曲線圖。由此二圖可發現有趣的現象，相對於整體降解速率，降解初期(0~7 hour)的 HAA 減少最快，MCAA 與 DCAA 降解速率也迅速下降，MCAA 從  $1.4 \text{ mgL}^{-1}/\text{h}$  降至  $0.3 \text{ mgL}^{-1}/\text{h}$ ，DCAA 從  $0.9 \text{ mgL}^{-1}/\text{h}$  降至  $0.4 \text{ mgL}^{-1}/\text{h}$ ，在 7~12 小時，兩者幾乎無降解發生，速率趨於零。而後速率漸漸提升，達  $0.25 \text{ mgL}^{-1}/\text{h}$  後，HAA 含量已趨近於零。

比對對照組 1 (Mb1、Db1; 無菌濾砂吸附效應控制組)，無 HAA 被吸附之情況發生。MCAA、DCAA 快速下降之原因，應非濾砂本身具有的吸附效果造成。針對初期高降解速率的結果，可能的原因有二，一是實驗分析的誤差，二是降解初期生物膜吸附的結果。文獻指出，生物膜的組成具有多醣體(polysaccharide)，稱為 exopolysaccharide (EPS)，EPS 被證實在適當的條件下具有吸附有機物或無機物的性質(Wang et al. 2002)。但生物膜上 EPS 雖然具有吸附特質，但是否能吸附 HAA，還需進一步証實。

針對 TCAA 無降解的可能原因，實驗用濾砂之採樣時間為 11 月，雖當周該地之天氣均溫達 28 度，但生物膜上之菌群可能已與夏季（八月）時不同，可能是 TCAA 無法降解之原因。

而參照過去文獻，部分已被證實可降解 HAAs 之微生物，其代謝鹵乙酸所需之酵素；(Dehalogenace)，需要其他的基質才能代謝 TCAA，意即 TCAA 的降解過程，是為一共同代謝之生化反應。而在此降解實驗中，僅提供 TCAA 做為生長之營養源，此實驗在缺乏提供其他有機碳做為共同代謝所需基質的條件下，可能是造成 TCAA 無法被濾砂上微生物降解之主因。A. L. Weightman 實驗發現，欲使 *Pseudomonas putida* 與 *Pseudomonas sp.* 降解 TCAA，額外添加 2,2-dichloropropionic acid (2,2DCPA) 會使培養液中 Dehalogenace 活性大幅增加，代謝 TCAA。此外，Pyruvate 與 DCAA 也可做為 TCAA 進行共同代謝所需之基質 (Weightman et al. 1992)。

此批次實驗僅提供含氯鹵乙酸做為獨立碳源，因此在缺乏共同代謝基質的環境下，TCAA 可能無法被微生物所利用，此點也可能是造成 TCAA 無法被快濾砂降解的主要因素。

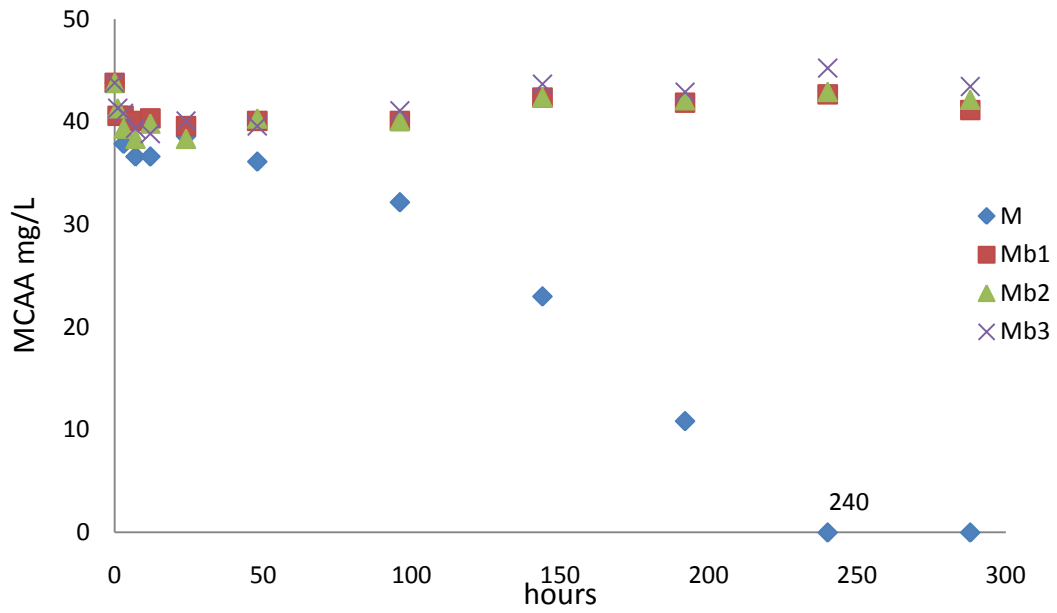


圖 4-4、MCAA 於 288 小時內降解批次實驗結果。M：MCAA+實場氣砂，Mb1：滅菌砂+MCAA，Mb2：無砂空白、Mb3：MCAA 空白。

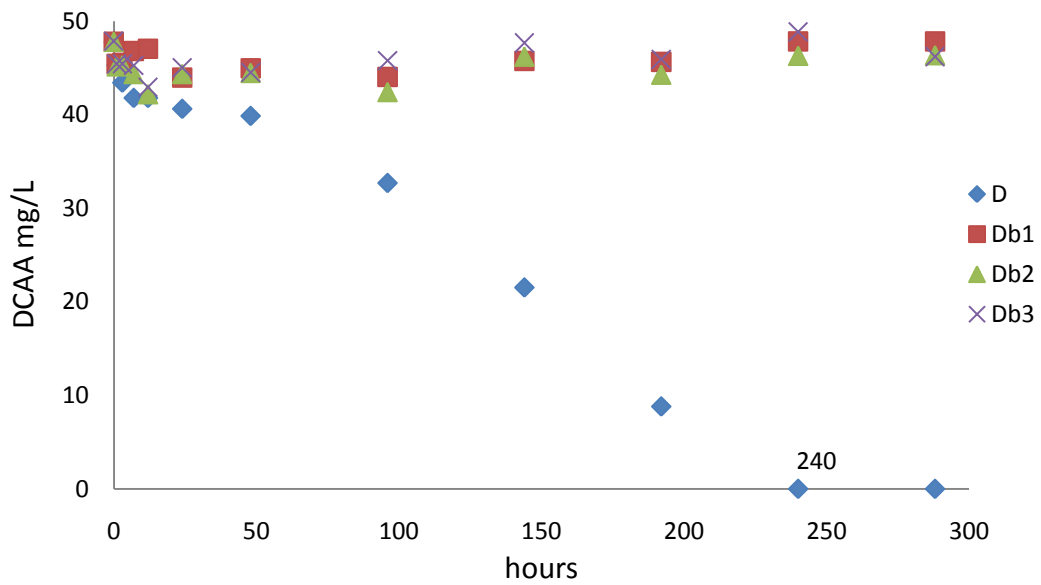


圖 4-5、DCAA 於 288 小時內降解批次實驗結果。D：DCAA+實場氣砂，Db1：滅菌砂+DCAA，Db2：無砂空白、Db3：DCAA 空白。

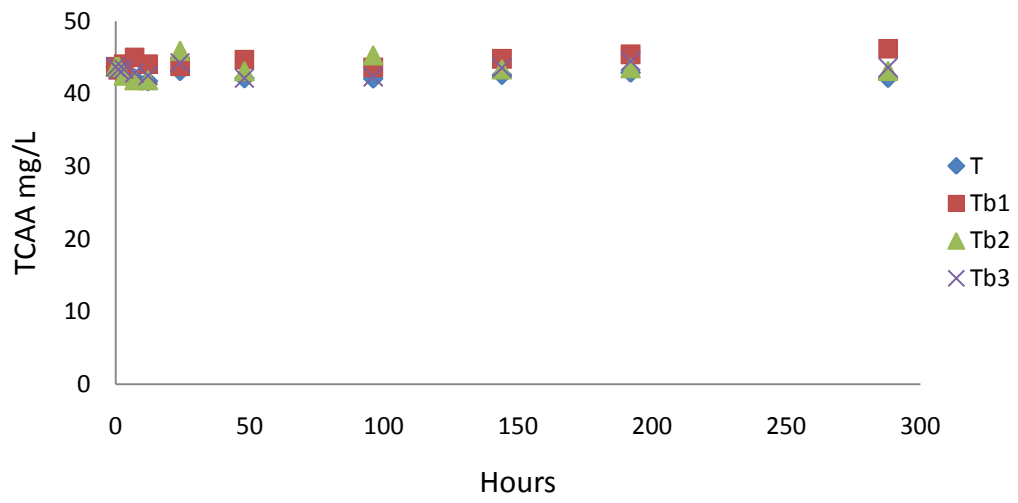


圖 4-6、TCAA 於 288 小時內降解批次實驗結果。T：TCAA+實場氣砂，Tb1：滅菌砂+TCAA，Tb2：無砂空白、Tb3：MCAA 空白。



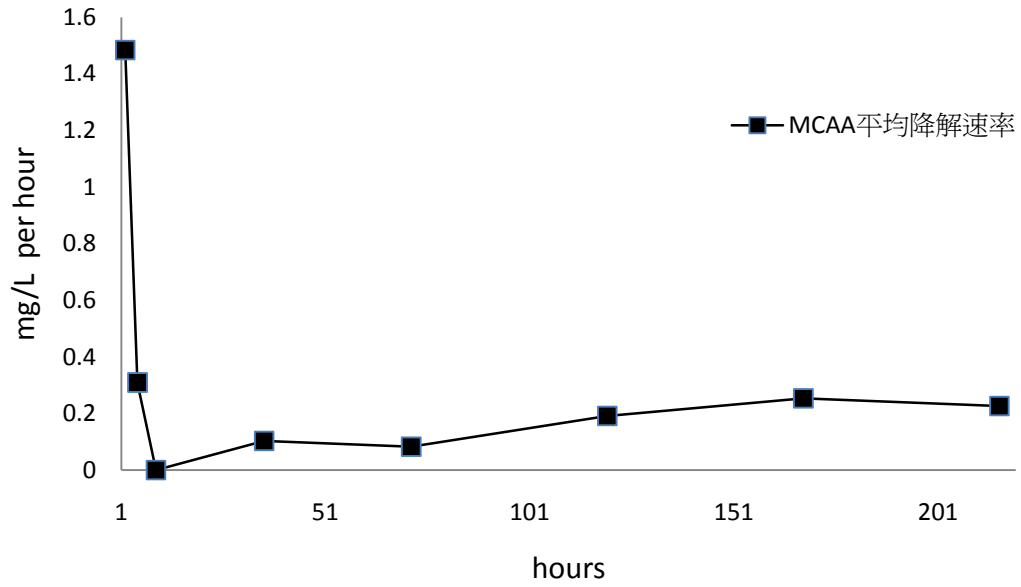


圖 4-7 MCAA 平均降解速率曲線

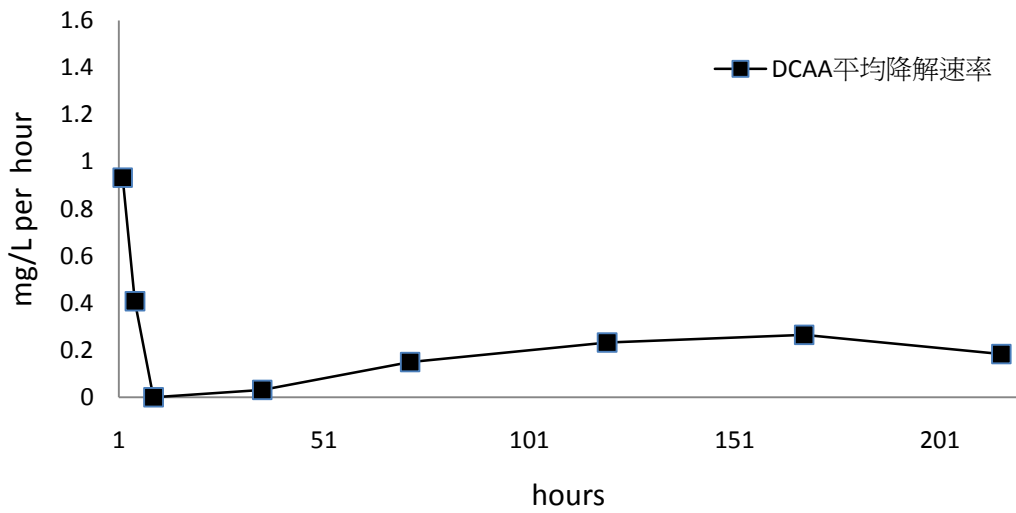


圖 4-8 DCAA 平均降解速率曲線



#### 4-3 水廠處理單元之生物膜及水體之菌相與菌種分析。

本研究嘗試跳過傳統生物培養的方式，直接以 DNA 分子層面的角度來探討水處理流程中微生物菌相之改變。為達到此目的，此部分研究結合了，實場環境樣本 DNA 萃取，16SrDNA 之 PCR 擴增，變性梯度膠凝電泳(DGGE)等分子生物技術，藉由結合分析淨水廠內鹵乙酸與環境樣本菌相之變化，探討淨水處理單元內微生物與鹵乙酸降解之關係。

由各單元 MCAA、DCAA 濃度檢測結果，明顯看出夏季鹵乙酸降解的比春冬季明顯，因此實驗中的環境 DNA 樣本皆採於夏季。DNA 菌相分析的對象針對兩大種類，一是各單元池壁的表層生物膜(表層微生物以好氧為主)，二是各單元水體內微生物，將上述二類微生物與附著於濾砂之微生物做菌相比較，建立鹵乙酸濃度高低與菌相變化之關係。

研究之第一步是利用傳統 DNA 萃取法或市售 kit 萃取環境樣本總 DNA，由於萃取出來的環境 DNA 濃度低，加上必須確定萃取出來的 DNA 可用於後續之工作，便利用聚合酶鍊鎖反應由特定引子放大片段的 16SrDNA。

研究之第二步是經由本實驗使用之引子(GC357f、907r)放大環境中 16SrDNA。由於 PCR 反應是極為靈敏的酵素反應，倘若在 PCR 反應過程中存在抑制物質，便會導致產物不足或反應失敗。環境樣本中常存在之腐質酸或多環芳香類化合物，有可能抑制 PCR 反應，因此在 DNA 萃取後，PCR 反應前，需將環境總 DNA 進行純化。PCR 反應之條件會影響產物之專一性，嚴苛度過低之 PCR 條件，會發生非專一性複製的情形，因此須先測試出最適當之 PCR 引子黏合溫度 (Annealing Temperature)。結果如圖 4-7，Lane 1 是 100bp 之 ladder marker，Lane 2 至 Lane 11 為完全相同之條件下，調整 annealing temperature 所得之結果，溫度依序為 46°C、47°C、……. 54°C、55°C。可看出 band 顏色隨溫度增加而遞減，為得到較佳之重複性，本研究以 54°C 做為 PCR 反應的黏合溫度。

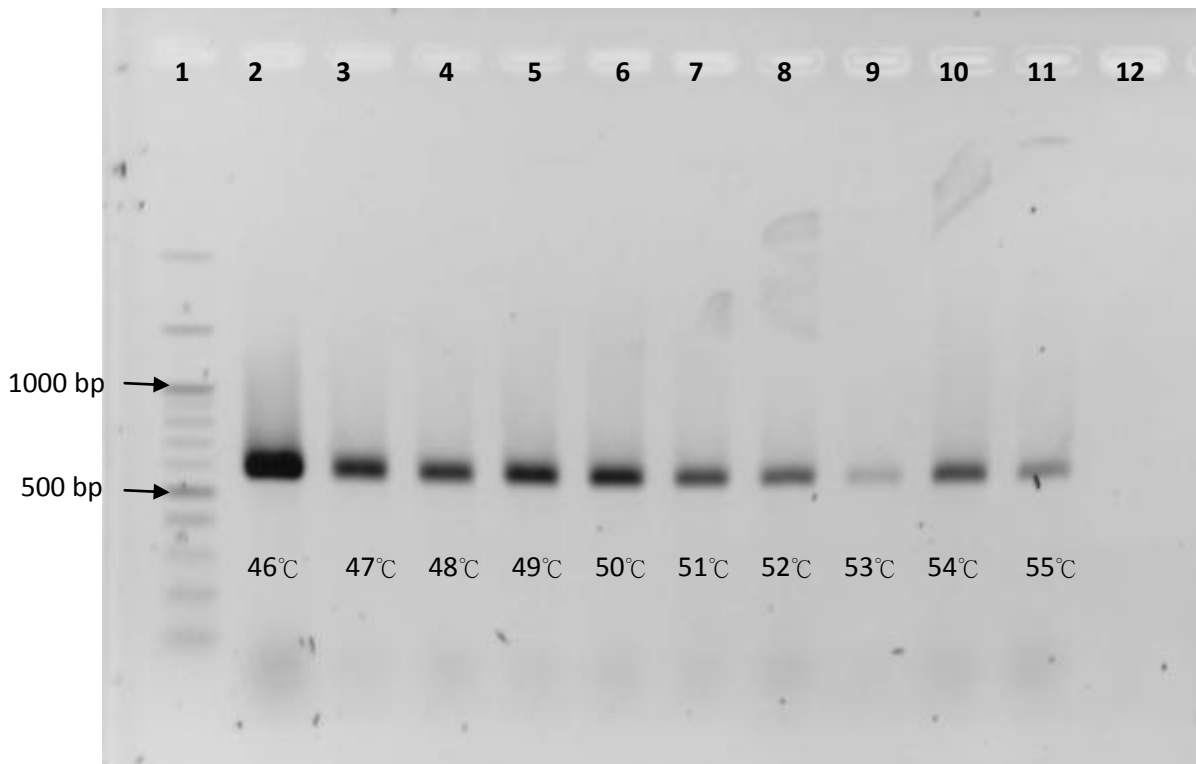


圖 4-9 不同引子接和溫度下進行 GC357-907 之 PCR 反應結果後，於 2% agarose 電泳分析之結果。Lane 2 至 Lane 11 所代表之溫度依序為 46、47、48、49、50、51、52、53、54、55 °C。Lane 1 是 100bp ladder marker，Lane 12 是 negative control。

■ 4-3-1 池壁生物膜與濾砂 PCR-DGGE 菌相之探討。

圖 4-10 為單元池池壁生物膜與濾砂經 DNA 萃取後，進行 PCR-DGGE 之電泳結果圖，下方圖 4-11 為圖譜經 Quantity ONE 軟體以 UPGMA 法類聚分析後所得之親源樹狀圖。Lane 1 to Land 5 所代表的生物樣本依序為：原水池、混合池、膠凝池、沉澱池、快濾砂。在此實場中，由於清水池建立於地底下，無法取得池壁上之生物膜。

配水管線也埋藏於地底，故兩者於此不列入討論。從 PCR-DGGE 之結果可看出，各單元池壁之生物膜相似度差異甚大，菌相相似度最高為混合池與沉澱池之生物膜，具有 60% 相似度。膠凝池與其他四種生物相相似度最低，只有 27%。而快濾砂菌群與原水池、膠凝池、沉澱池池壁生物膜相似度也僅 38%。由池壁生物膜菌相結果可以得知，各單元池之周圍穩定的微生物族群差異性，與 DCAA、TCAA 濃度曲線無直接之關係。

池壁之生物膜為長期受該池內環境影響所累積之最穩定結果，DCAA、TCAA 在環境中僅屬於少量的有機化合物，其濃度變化對穩定的池壁微生物菌相影響甚小。膠凝池壁微生物菌相與前後單元池差異甚大，助凝劑(硫酸鋁鉀化合物)的添加與機械的拌合可能是主要之因素，此單元池動作主要目的便是將多數天然有機物絮聚成較大的顆粒，以利後續的沉澱，如此微生物營養源勢必改變甚多，合理推測是進而影響生物膜改變的重要因素，詳細機制與原因還有待深入研究證明。

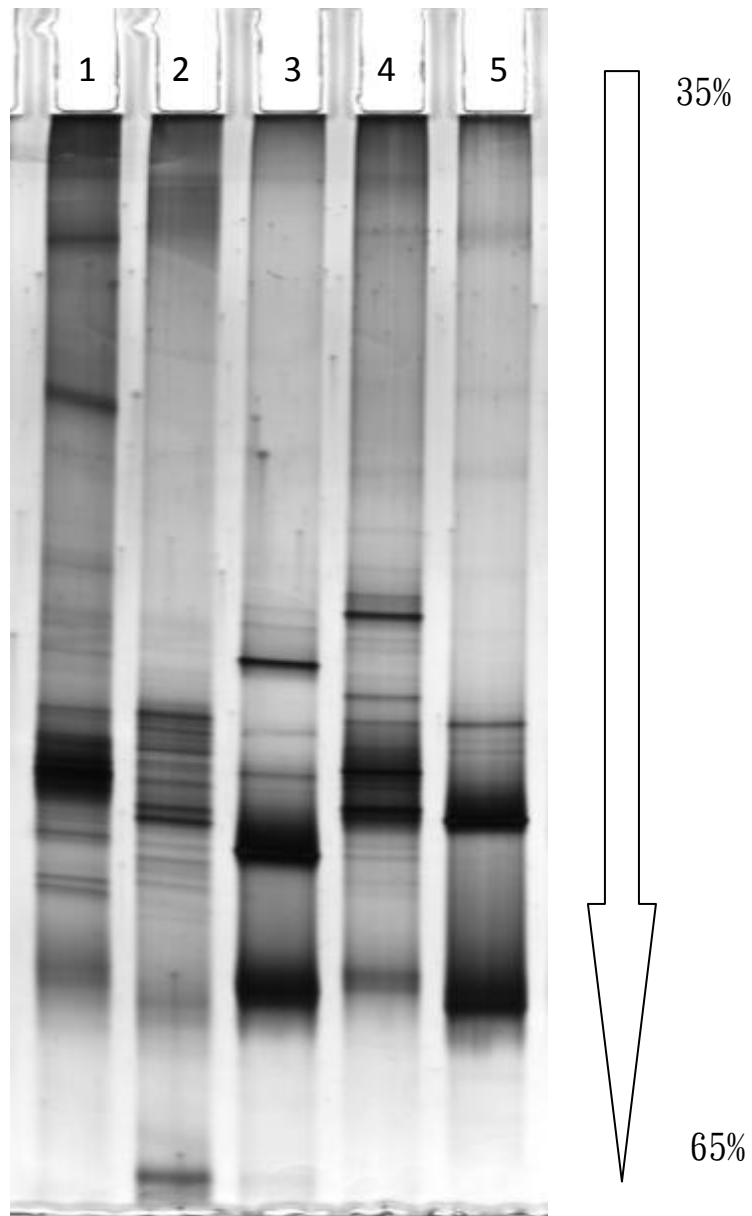


圖 4-10 單元池池壁生物膜與快濾砂 PCR-DGGE 電泳結果圖。  
Lane 1：原水池，Lane 2：快混池，Lane 3：膠凝池，Lane 4：  
沉澱池，Lane 5：快濾砂。圖右為變性劑濃度範圍

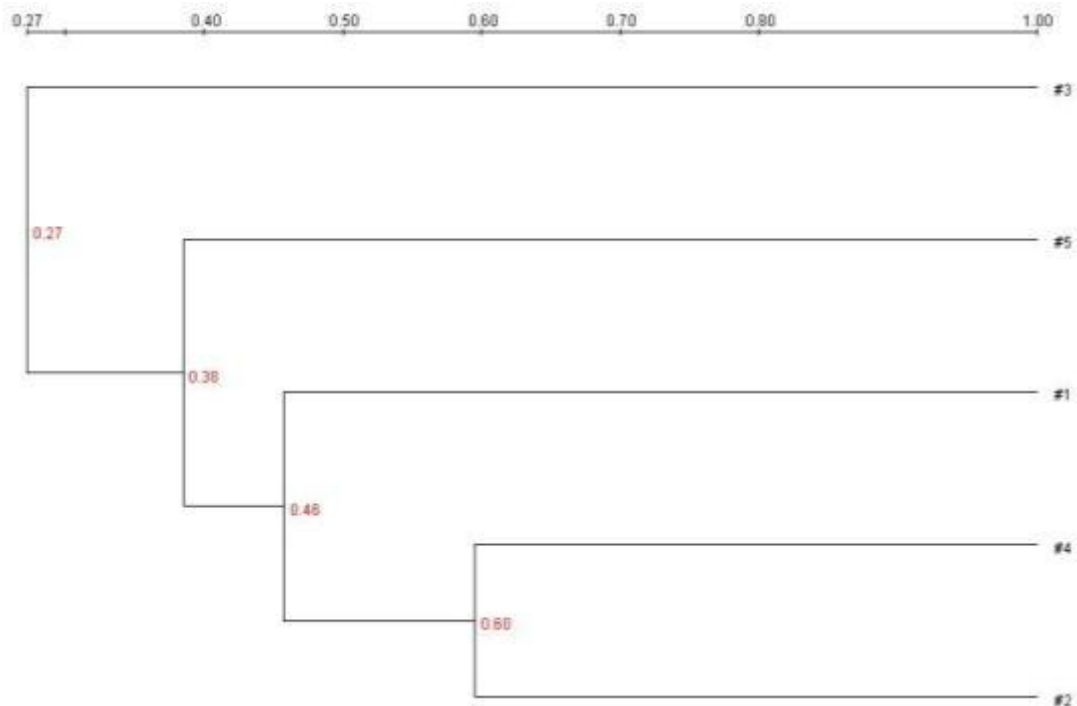


圖 4-11 單元池池壁生物膜與快濾砂菌相經 UPGAMA 類聚分析之親源樹狀圖。#1：原水池，#2：混合池，#3：膠凝池，#4：沉澱池，#5：快濾砂。

#### ■ 4-3-2 各單元水體微生物 PCR-DGGE 菌相之探討。

圖 4-12 是單元水體與濾砂 DNA 經 PCR-DGGE 電泳圖，Lane 1：原水，Lane 2：快混池出水，Lane 3 膠凝池出水，Lane 4 沉澱池出水，Lane 5：快濾出水，Lane 6：清水，Lane 7：配水。從結果可看出，原水的亮帶明顯比其他單元多且複雜，意味著生物多樣性比其他單元水體豐富。水體進入到混合池後，因前加氯通氣消毒的作用，殺死多數的微生物，也改變了菌群結構。混合、膠凝、沉

澱池出水具有相似的圖譜，以肉眼觀之，三者圖譜亮帶的位置與數目無太大的變化。但當水體經過快濾池石英砂過濾處理後，圖譜明顯發生改變，原快混、膠凝、沉澱出水之優勢菌種(dominated species) A 與 B，在快濾池出水的菌群中明顯不再佔有其優勢。觀察快濾出水、清水與配水三者之圖譜，三者同樣具有相似之菌群關係。水體經快濾砂過濾後於清水池前端進行後加氣，保持一定餘氯濃度而後進入配水系統。從 PCR-DGGE 結果比較清水與配水，兩者圖譜頗為類似。色帶出現大約位於 45%~55% 的範圍，密集而狹窄。DNA 序列差異越小，各亮帶會越密集，間接顯示此兩系統內之微生物親緣關係可能很接近。




圖 4-13 是各單元水體 PCR-DGGE 圖譜經 UPGAMA 類聚分析後的結果。數字量化的結果顯示，各單元水體之菌群演變可大致分為三組菌相，一是原水(簡稱 A 組)，二是快混、膠凝、沉澱出水(簡稱 B 組)，三是快濾出水、清水與配水(簡稱 C 組)。清水、配水兩系統有菌群相似度最高；76%，快濾池出水與清水、配水有 66% 的相似性。快混、沉澱出水相似度 57%，膠凝出水與此兩者相似度 52%，僅 5% 的差距說明此三者菌群結構相當接近。A、B、C 三組之比較，B、C 組僅 34% 之相似度，A 與 BC 兩組差距更遠，僅 29%。從圖譜直接觀察與量化的結果皆顯示，淨水流程中之水體經過前加氯與快濾砂過

濾兩種水質處理方式，會對於菌群結構會有顯著的改變。Table 4-1 也說明，原水(餘氯 0.02 ppm)經加氯消毒後進入混合池，該單元出水之餘氯量 1.99 ppm，由於餘氯濃度是控制水體內微生物含量的普遍方法，因此前加氯的消毒處理，可理解是造成前後水體菌群結構改變的主要原因。

觀察快混池、膠凝池與沉澱池出水之菌群與餘氯之關係，餘氯量在膠凝池與沉澱池時，明顯比混合池低，由 1.77 ppm  $\rightarrow$  0.44 ppm， $\rightarrow$  0.31ppm，雖大幅降低，但由菌群結構分析發現，三者之相似度高於 52%，整體結構改變不大，此現象可推測，此三系統內之多數的微生物菌種，對於餘氯之變化較不敏感。

另外值得注意的現象是，快濾池出水與清水中間有經後加氯消毒，由 Table 4-1 可看出兩單元池之餘氯含量差別。清水之自由於氯與總氯濃度(0.67、0.84 ppm)皆高於快濾出水(0.06、0.13 ppm)許多，但由 PCR-DGGE 圖譜分析所得之結果，對整體之菌群結構影響並不特別顯著。顯示該水體內多數微生物菌種、並未因此而消失，快濾出水之微生物總數，經加氯消毒固然而減少，但對菌群整體結構上改變並非明顯。



Table 4-1 水廠內水質參數表

採樣點	溫度 ℃	pH	自由餘氯	總 氯 (ppm)	UV <sub>254</sub>	TOC (mg/L)	SUVA
原水	26.3	8.0	0	0.02	0.043	7.0	0.006
前加氯 出水	26.2	8.2	1.77	1.99	0.034	6.8	0.005
膠凝出 水	26.2	8.13	0.44	0.54	0.015	5.6	0.003
沈澱出 水	26.4	8.03	0.31	0.39	0.015	6.3	0.002
快濾出 水	27.0	8.09	0.06	0.13	0.028	6.3	0.004
清水	26.8	8.3	0.67	0.84	0.021	5.0	0.004
配水	26.4	8.1	0.52	0.64	0.021	6.7	0.003

圖 4-14 是沉澱池出水與快濾砂 DGGE 結果比較圖。Lane 1 是沉澱池出水，Lane 2 是快濾砂。可看出兩者的優勢菌種互不相同。快濾砂之優勢菌種之一；Band C，雖有出現於沉澱出水之水體，但非主要之菌種。說明該菌種(Band C)於濾砂上比起其他存在於沉澱池水體內微生物，更具有競爭力。由於兩者為一接和之系統，中間過程水體之停留時間僅數分鐘，兩者菌群的生長條件(營養源、溫度等)除濾砂外應無差異，而微生物與生長表面之附著(親合)程度，會影響其生長好壞。因此造成該菌種具有優勢的原因，可能來自該菌與濾砂親和力之程度優於其他菌種。Band D 在此圖譜中，只出現

於 Lane 2，但並不代表此菌種非由沉澱池水體而來，可能是該菌種在沉澱池水體中所佔比例過少，無法以 PCR-DGGE 此技術測得。

圖 4-15 是快濾砂與快濾池出水之 DGGE 結果圖。Lane 1 是快濾砂、Lane 2 是快濾池出水。由圖譜可看出快濾砂之優勢菌群之一 Band C，該色帶於 Lane 2 並不明顯，此圖與圖 4-12 之結果顯示此菌種於淨水流程中，與其他菌種相比，較依賴附著濾砂而生長。



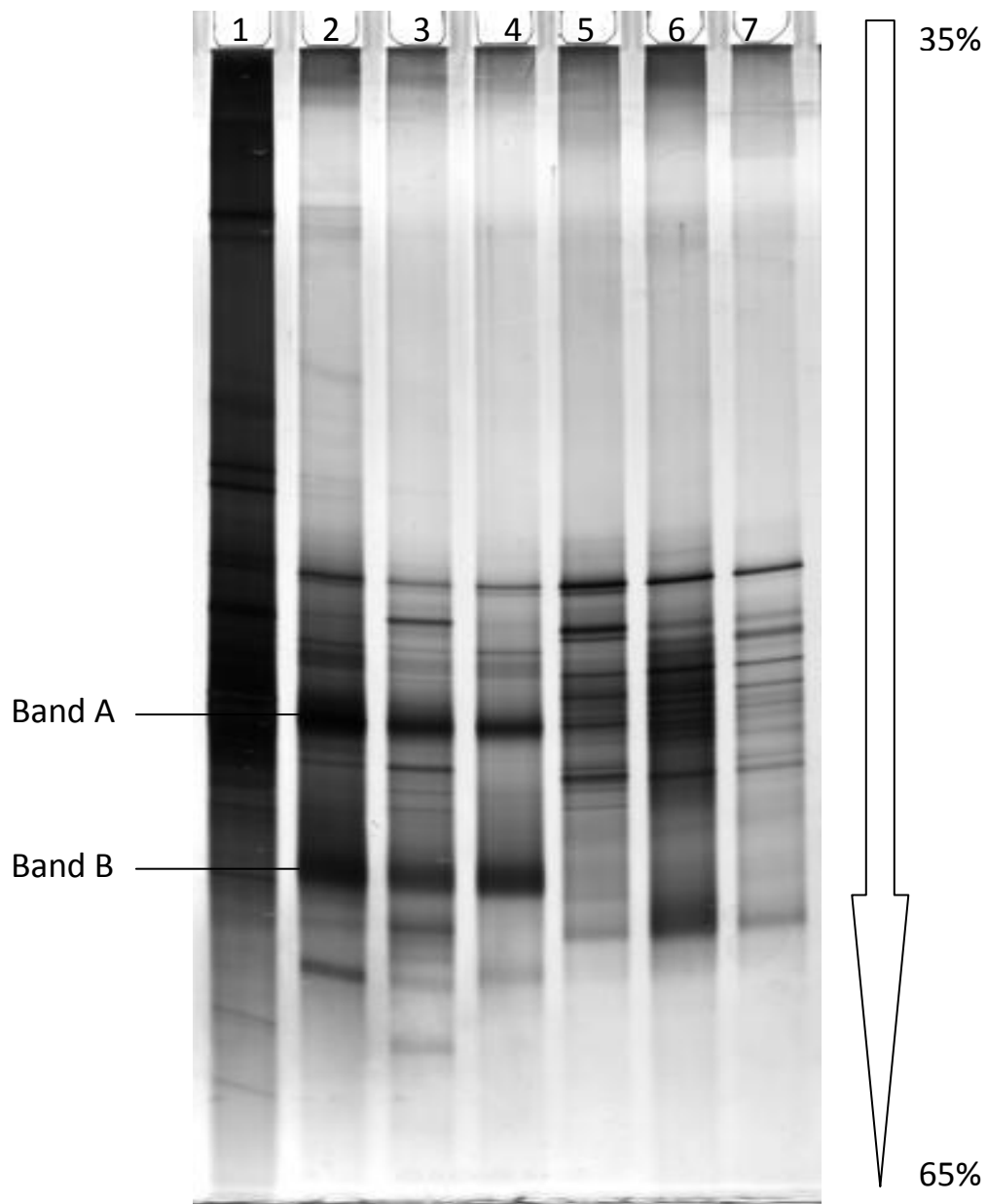


圖 4-12 各單元水體 PCR-DGGE 電泳結果圖。Lane 1：原水，Lane 2：快混池出水，Lane 3 膠凝池出水，Lane 4 沉澱池出水，Lane 5：快濾砂，Lane 6：清水，Lane 7：配水。圖右為變性劑濃度範圍。

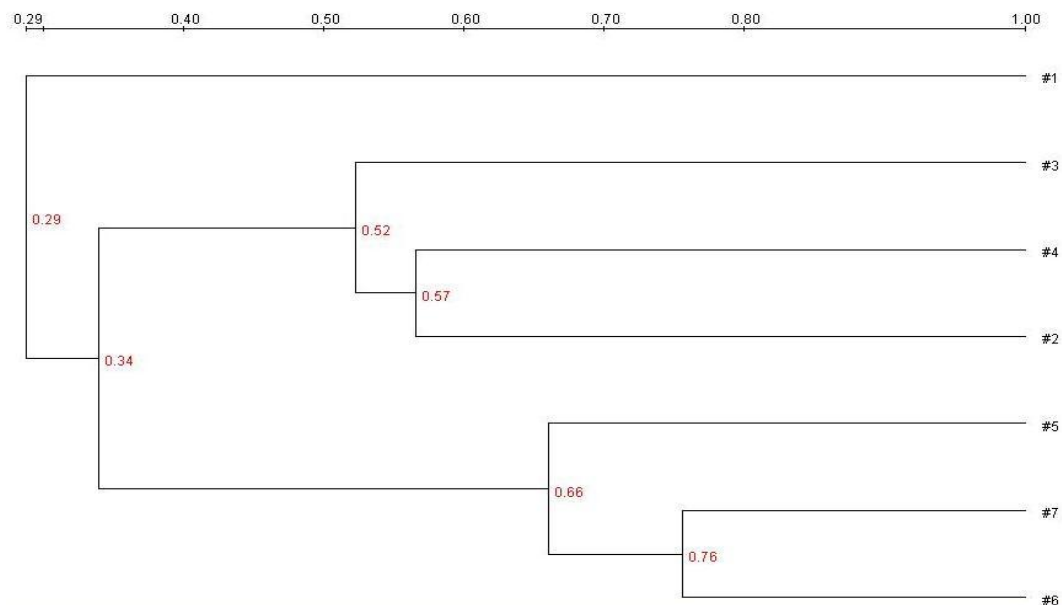


圖 4-13 各單元水體菌相經 UPGAMA 類聚分析後之親源樹狀圖。  
 #1：原水，#2：混合池出水，#3：膠凝池出水，#4：沉澱池出水，#5：快濾砂，#6 清水，#7：配水。

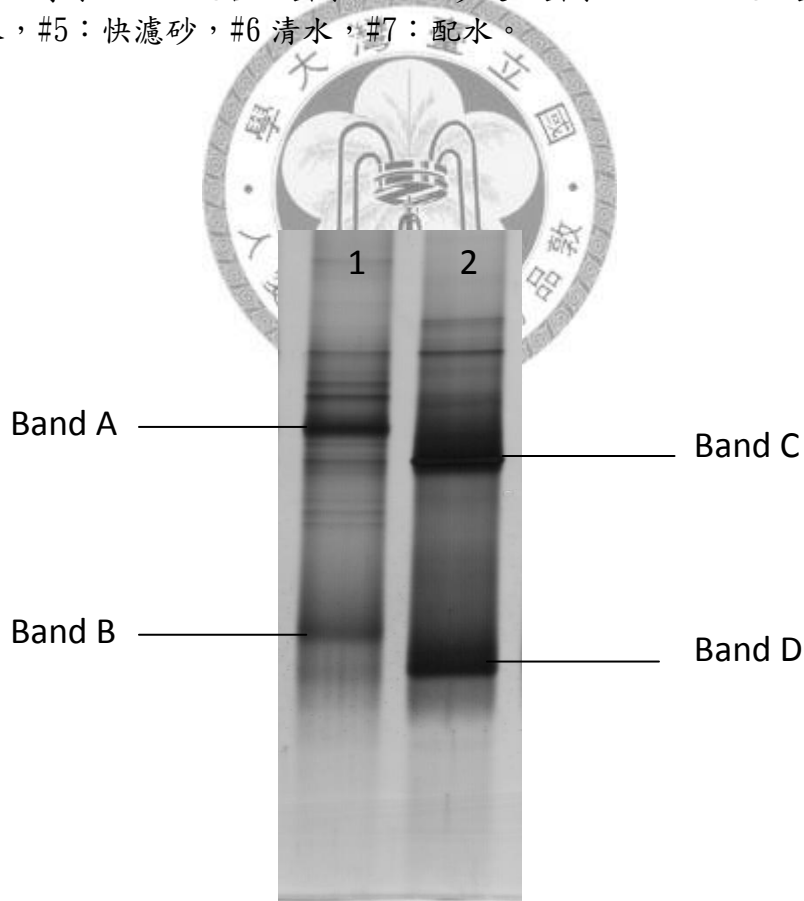


圖 4-14 沉澱出水與濾砂 DGGE 圖譜之對照。Lane1：沉澱出水。  
 Lane2：快濾砂。A、B、C、D 分別表示該單元之優勢菌種。

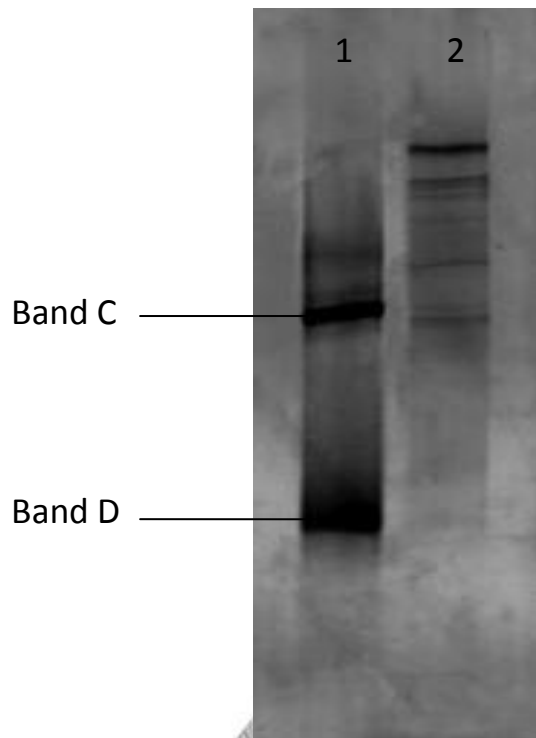


圖 4-15 快濾砂與快濾池出水 DGGE 圖譜之對照。Lane1：快濾砂。Lane2：快濾出水。

■ 4-3-3 以 16SrDNA 鑑定附著於快濾砂之微生物菌種。

本研究第一步結果顯示水體內二氯、三氯乙酸經快濾砂過濾後，會有顯著的減少(三氯乙酸僅在夏季有顯著減少)。第二步的降解批次實驗也證實，附著於快濾砂上之微生物，可以降解二氯乙酸，加上 DGGE 圖譜顯是，濾砂之微生物菌群結構與其他生物膜或水體內的系統相比，具有菌種數目少、優勢菌種明顯的特性，主要之菌種可能與鹵化乙酸之降解有關。為進一步了解快濾砂 DGGE 圖譜上主要亮帶代表的確切菌群，於 PCR-DGGE 電泳分析後，將聚丙烯胺

(acryamide/bis)凝膠於 SYBR GreenI 進行外染 40 分鐘後，以滅菌過的刀片於紫外光燈下切下主要亮帶(圖 4-13 Lane 5, band C、band D)。切割後之亮用滅菌過的研磨棒經搗碎後溶解於 Tris 緩衝液，再以此溶液內 DNA 再次進行 PCR 反應，為避免汙染以及確保切下之亮帶為單一菌種之 DNA，需於 PCR 增殖反應完成後再以 DGGE 電泳確認為單一亮帶，徑送定序進行序列分析。

將 DGGE 指紋圖譜上選出之三條 DNA 序列於 NCBI 網站上進行 16SrDNA 比對，比對結果如 Table 4-1。此二種菌種被發現生長於添加氯胺進行消毒的配水系統中(Noguera, D. R *et al*;2008)，由於該菌種非由培養所得知，為 uncultured bacterium，菌種之生物特性尚無法得知。



Table 4-2 快濾砂 DGGE 圖譜上亮帶鑑定結果

Band number	NCBI 網站比對結果	Similarity
C	Uncultured bacterium clone UWL_CL-110627_OTU-7	96%
D	Uncultured bacterium clone UWL_CL-110625_OTU-7	98%

■ 4-3-4 HAA 降解後，濾砂菌群之變化。

圖 4-16 是濾砂降解批次實驗後，以同樣的 DNA 萃取方式，將降解 HAA 後的濾砂 DNA 進行 PCR-DGGE 的電泳圖。Lane 1 是降解前濾砂，Lane 2 是降解 MCAA 後的濾砂，Lane 3 是降解 DCAA 後的濾砂。HAA 降解前濾砂的優勢菌種，Band C，經 MCAA 與 DCAA 的培養後，已逐漸失去其優勢。其他原先少數的菌群，開始逐漸變多，菌群出現於圖譜的主要區塊也略微上移，顯示菌群結構經 HAA 馴化後是有變化的。HAA degradable bacteria 是存在於濾砂上的少數菌群，而非原先的優勢菌種。圖中 Band C 與圖 4-14, 4-15 的 Band C 相同。

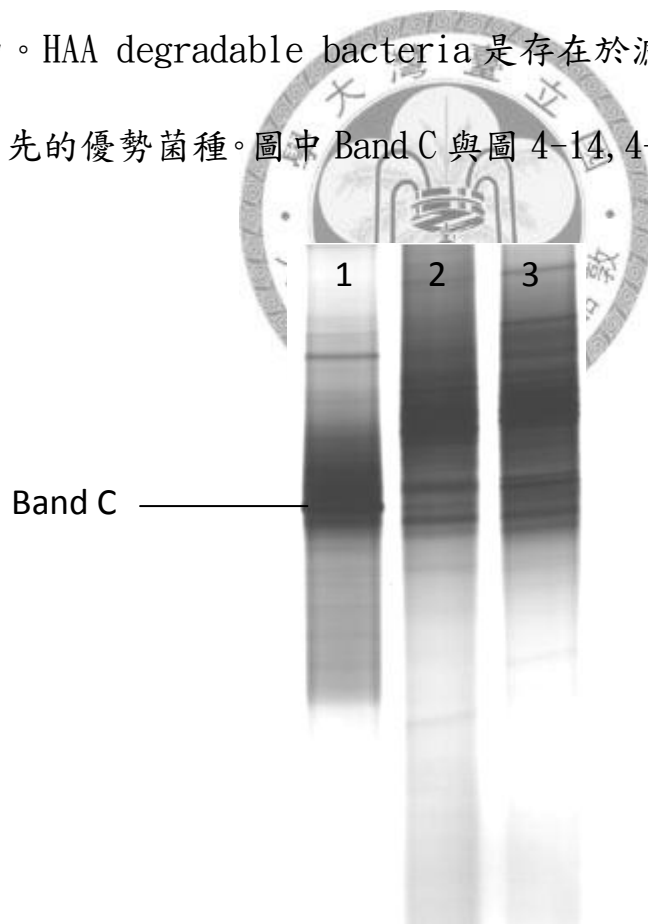


圖 4-16 快濾砂降解 HAA 前與降解後的 DGGE 圖譜。Lane1：降解前快濾砂。Lane2：MCAA 降解後快濾砂。Lane3：DCAA 降解後快濾砂。

## 第五章 結論與建議

### 5-1 結論

- 淨水流程中，含氯鹵乙酸中僅二氯乙酸、三氯乙酸存在於各淨水單源池出水，無一氯乙酸之生成。而含氯鹵乙酸，好生成於夏季，此季節之含氯鹵乙酸濃度增長最終於膠凝池(DCAA、TCAA 濃度分別為 20.3 mg/L、18.1 mg/L)，並經快濾池後過濾後有大幅度減少(DCAA、TCAA 濃度分別為 3.8 mg/L、7.5 mg/L)。
- 快濾砂降解試驗證實，由淨水場取回之快濾砂在好氧條件下可利用一氯乙酸與二氯乙酸做為微生物生長所需之獨立碳源，40 mg/L 的 HAA 約在 10 天內完全降解。
- 淨水廠各單元池壁與濾砂之微生物菌群較水體複雜，而單元出水之水體菌相較有一致性。原水內含有較多的菌種，淨水流程中，快混池與快濾池之處理會顯著改變水體菌群之組成。淨水流程中之水體生物菌群可大致歸納為三組，一是原水，二是快混、膠凝、與沉澱出水，相似度介於 52%~57%，三是快濾出水、清水、與配水，相似度介於 66%~76%。



- 快濾砂內之主要菌種，於西元 2008 被發現存在於以氯胺消毒之配水網中，由於該菌種被研究甚短，未被證實能夠降解含氯鹵乙酸。



## 5-2 建議

於夏季實場全流程檢測之含氯鹵乙酸，可看出三氯乙酸經快濾砂處理後有顯著減少。文獻中證實，三鹵乙酸是可被微生物所降解，乃合理懷疑含氯鹵乙酸之減少，是因附著於快濾砂之微生物所造成。但快濾砂批次實驗只證實可降解一氯乙酸與二氯乙酸，無法降解三氯乙酸。其原因可能是實場環境複雜度高，可降解三鹵乙酸之微生物在簡單的實驗室培養環境下無法生存，或是三鹵乙酸降解機制較一氯、二氯乙酸複雜，此實驗之培養條件無法使濾砂上之微生物有效利用三鹵乙酸做為生長之營養來源。

本研究利用 DGGE 的方式，尋找出快濾砂上的主要菌群，但主要菌種是否有效代謝 HAAs 未得到證實。HAA 降解前後快濾砂的 DGGE 圖譜也顯示，原優勢菌種逐漸失去其優勢，原本少數的菌群開始增加。從水質分析調查發現，此水廠 HAAs 最多佔整體 TOC 含量僅 0.6% (TOC : 7 mg/L, HAAs : 43ug/L)，由此判斷，成為優勢菌群的關鍵應非在於能否代謝 HAA。HAA degradable bacteria 也可能是極少數存在的非優勢菌群。

本實驗選用 DGGE 做為研究方式，其優點在於，環境微生物多數是不可培養的，透過分子生物技術較能直接表達環境樣本中親源結

構之真實性。根據以往的文獻，DGGE 最常使用在土壤內的菌群調查，而水體微生物的應用如海水、河水、井水等環境樣本的分析上，皆有人嘗試(Watanabe, Kodama et al. 2001)。因而選用 DGGE 做為本研究對自來水流程菌群的分析方法。從本實驗對濾砂上菌群結構的圖譜觀之，相較於池壁 biofilm 與水體微生物，優勢菌群極為明顯，且不易觀察出其他非優勢的菌種。

引子(primer)的選用在 PCR-DGGE 分析技術上佔了很重要的因素，針對不同環境樣本，各文獻選用的引子各有不同，各菌種對引子之親和性也不盡相同。本實驗曾試驗過三組引子對；GC357f+534r、GC357f+907r、GC968f+1401r，以 GC357f+907r 所得到之色帶條文較為豐富(data not shown)，便選用此組做為本實驗之引子對，此次濾砂 DNA 分析之結果，未出現已被證實可降解 HAA 之菌種(例：*Xanobacteria sp.* *Afipia sp.*)。也許有其他之引子對更合適於 HAA degradable bacteria。

與 DGGE 類似的另一技術；Temperature gradient gel electrophoresis;TGGE，也被廣泛應用在環境樣本上的微生物分析，該技術之優點在於，以精準調控電泳溫度的方式，取代變性劑濃度梯度膠體的製作。有研究發現，TGGE 對於某些環境樣本具有較好的

菌群解析度(Muyzer et al. 1998)，或許可嘗試用於快濾砂的菌群分析。

現今常用 DNA 膠體染色的方法有三種，ethidium bromide、SYBR Green、銀染。前兩種方法的偵測極限較高，DNA 量需達 ug 的程度，才容易被觀測出，而銀染的敏感度最高，可偵測的最低 DNA 量介於數個至數十個 ng。DGGE 的基因指紋圖分析法可同時分析多個樣品，且可直接觀察到微生物菌相的結構組成，相較於 clon library，可減少很多成本與工作量。但指紋圖譜的分析法仍舊有數點因素可能造成實驗的誤差，例如，DNA 萃取與 PCR 效率，萃取 DNA 需要將細胞外層破碎，有些細胞壁較厚的菌群需要更強力的破菌方式，如 glass beading，但此法也可能破壞已溶出的 DNA。環境中的有機物會直接或間接影響 PCR 的效果。DGGE 適用的 DNA 長度，最多僅達 500bp，親緣關係較為接近的物種，可能會放大出同樣的片段，便無法在圖譜上顯示出差異。此外，PCR 的誤差也可能導致同樣菌種出現不同的條紋，族群比例過低的菌群也不易經由 PCR-DGGE 顯現出來。親源關係接近的族群過多會增加圖譜的複雜度，資料便難以分析，如本文的圖 4-16，HAA 降解後的濾砂微生物族群分佈雖明顯與降解前不同，但降解後的圖譜色帶密集，不易觀察出實際的菌種數目。

## 第六章 參考文獻

- Amann, R. I., J. Stromley, et al. (1992). "MOLECULAR AND MICROSCOPIC IDENTIFICATION OF SULFATE-REDUCING BACTERIA IN MULTISPECIES BIOFILMS." Applied and Environmental Microbiology **58**(2): 614-623.
- Asami, M., M. Oya, et al. (2009). "A nationwide survey of NDMA in raw and drinking water in Japan." Science of The Total Environment **407**(11): 3540-3545.
- Baribeau, H., S. W. Krasner, et al. (2005). "Impact of biomass on the stability of HAAs and THMs in a simulated distribution system." Journal American Water Works Association **97**(2): 69-81.
- Bartlett, J. M. and D. Stirling (2003). A Short History of the Polymerase Chain Reaction. **226**: 3-6.
- Chang, E. E., Y. P. Lin, et al. (2001). "Effects of bromide on the formation of THMs and HAAs." Chemosphere **43**(8): 1029-1034.
- Dalvi, A. G. I., R. Al-Rasheed, et al. (2000). Haloacetic acids (HAAs) formation in desalination processes from disinfectants, Elsevier Science Bv.
- Ellis, D. A., M. L. Hanson, et al. (2001). "The fate and persistence of trifluoroacetic and chloroacetic acids in pond waters." Chemosphere **42**(3): 309-318.
- Gray, J. P. and R. P. Herwig (1996). "Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments." Applied and Environmental Microbiology **62**(11): 4049-4059.
- Hayashi, A., H. Aoyagi, et al. (2007). "Development of novel method for screening microorganisms using symbiotic association between insect (*Coptotermes formosanus* Shiraki) and intestinal microorganisms." Journal of Bioscience and Bioengineering **103**(4): 358-367.
- Helaleh, M. I. H., K. Tanaka, et al. (2003). "Vacancy ion-exclusion chromatography of haloacetic acids on a weakly acidic cation-exchange resin." Journal of Chromatography A **997**(1-2): 133-138.
- Kim, J. (2009). "Fate of THMs and HAAs in low TOC surface water." Environmental Research **109**(2): 158-165.
- Krasner, S. W., M. J. McGuire, et al. (1989). "THE OCCURRENCE OF DISINFECTION BY-PRODUCTS IN USA DRINKING WATER." American Water Works Association Journal **81**(8): 41-53.
- Lignell, R., H. Heinonentanski, et al. (1984). "DEGRADATION OF TRICHLOROACETIC-ACID (TCA) IN SOIL." Acta Agriculturae Scandinavica **34**(1): 3-8.
- Liviác, D., A. Creus, et al. (2009). "Genotoxicity analysis of two halonitromethanes, a novel group of disinfection by-products (DBPs), in human cells treated in vitro." Environmental Research **109**(3): 232-238.

- Macnaughton, S. J., J. R. Stephen, et al. (1999). "Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill." Applied and Environmental Microbiology **65**(8): 3566-3574.
- Martin-Laurent, F., L. Philippot, et al. (2001). "DNA extraction from soils: Old bias for new microbial diversity analysis methods." Applied and Environmental Microbiology **67**(5): 2354-2359.
- McRae, B. M., T. M. LaPara, et al. (2004). "Biodegradation of haloacetic acids by bacterial enrichment cultures." Chemosphere **55**(6): 915-925.
- Muyzer, G., E. C. Dewaal, et al. (1993). "PROFILING OF COMPLEX MICROBIAL-POPULATIONS BY DENATURING GRADIENT GEL-ELECTROPHORESIS ANALYSIS OF POLYMERASE CHAIN REACTION-AMPLIFIED GENES-CODING FOR 16S RIBOSOMAL-RNA." Applied and Environmental Microbiology **59**(3): 695-700.
- Muyzer, G. and K. Smalla (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology, Kluwer Academic Publ.
- Nieminski, C. E., S. Chaudhuri, et al. (1993). "THE OCCURRENCE OF DBPS IN UTAH DRINKING WATERS." Journal American Water Works Association **85**(9): 98-105.
- Polz, M. F. and C. M. Cavanaugh (1998). "Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR." Applied and Environmental Microbiology **64**(10): 3724-3730.
- Pourmoghaddas, H. and A. A. Stevens (1995). "Relationship between trihalomethanes and haloacetic acids with total organic halogen during chlorination." Water Research **29**(9): 2059-2062.
- Reckhow, D. A. and P. C. Singer (1984). "THE REMOVAL OF ORGANIC HALIDE PRECURSORS BY PREOZONATION AND ALUM COAGULATION." Journal American Water Works Association **76**(4): 151-157.
- Reckhow, D. A., P. C. Singer, et al. (1990). "CHLORINATION OF HUMIC MATERIALS - BY-PRODUCT FORMATION AND CHEMICAL INTERPRETATIONS." Environmental Science & Technology **24**(11): 1655-1664.
- Rodriguez, M. J., J.-B. S. 靡 odes, et al. (2004). "Behavior of trihalomethanes and haloacetic acids in a drinking water distribution system." Water Research **38**(20): 4367-4382.
- Rollins, D. M. and R. R. Colwell (1986). "VIABLE BUT NONCULTURABLE STAGE OF CAMPYLOBACTER-JEJUNI AND ITS ROLE IN SURVIVAL IN THE NATURAL AQUATIC ENVIRONMENT." Applied and Environmental Microbiology **52**(3): 531-538.
- Rook, J. J. (1976). "HALOFORMS IN DRINKING-WATER." Journal American Water Works Association **68**(3): 168-172.
- Roszak, D. B. and R. R. Colwell (1987). "SURVIVAL STRATEGIES OF BACTERIA IN THE NATURAL-ENVIRONMENT." Microbiological Reviews **51**(3): 365-379.

- Schlöter, M., M. Leubhn, et al. (2000). "Ecology and evolution of bacterial microdiversity." Fems Microbiology Reviews **24**(5): 647-660.
- Schmalenberger, A., F. Schwieger, et al. (2001). "Effect of primers hybridizing to Different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling." Applied and Environmental Microbiology **67**(8): 3557-3563.
- Singer, P. C. (1994). "CONTROL OF DISINFECTION BY-PRODUCTS IN DRINKING-WATER." Journal of Environmental Engineering-Asce **120**(4): 727-744.
- Singer, P. C. (2002). Occurrence of haloacetic acids in chlorinated drinking water. 3rd World Water Congress of the International-Water-Association, Melbourne, Australia, I W a Publishing.
- Speight, V. L. and P. C. Singer (2005). "Association between residual chlorine loss and HAA reduction in distribution systems." American Water Works Association Journal **97**(2): 82-91.
- Stacpoole, P. W. (1989 ). "The pharmacology of dichloroacetate." Metabolism **Nov 38**(11): 24-44
- Steffan, R. J., J. Goksoyr, et al. (1988). "RECOVERY OF DNA FROM SOILS AND SEDIMENTS." Applied and Environmental Microbiology **54**(12): 2908-2915.
- Taha F. Marhaba, I. H. K. (2000). "Rapid prediction of disinfection by-product formation potential by fluorescence." Environ Engg and Policy **2**: 29-36.
- Tebbe, C. C. and W. Vahjen (1993). "INTERFERENCE OF HUMIC ACIDS AND DNA EXTRACTED DIRECTLY FROM SOIL IN DETECTION AND TRANSFORMATION OF RECOMBINANT-DNA FROM BACTERIA AND A YEAST." Applied and Environmental Microbiology **59**(8): 2657-2665.
- Urbansky, E. T. (2000). "Techniques and methods for the determination of haloacetic acids in potable water." Journal of Environmental Monitoring **2**(4): 285-291.
- Wang, W., W. Wang, et al. (2002). "Adsorption of p-chlorophenol by biofilm components." Water Research **36**(3): 551-560.
- Watanabe, K., Y. Kodama, et al. (2001). "Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting." Journal of Microbiological Methods **44**(3): 253-262.
- Weightman, A. L., A. J. Weightman, et al. (1992). "MICROBIAL DEHALOGENATION OF TRICHLOROACETIC-ACID." World Journal of Microbiology & Biotechnology **8**(5): 512-518.
- Williams, D. T., G. L. LeBel, et al. (1997). "Disinfection by-products in Canadian drinking water." Chemosphere **34**(2): 299-316.
- Woese, C. R. (1987). "BACTERIAL EVOLUTION." Microbiological Reviews **51**(2): 221-271.

- Yu, P. and T. Welander (1995). "GROWTH OF AN AEROBIC BACTERIUM WITH TRICHLOROACETIC-ACID AS THE SOLE SOURCE OF ENERGY AND CARBON." Applied Microbiology and Biotechnology **42**(5): 769-774.
- Zhang, P., T. M. Lapara, et al. (2009). "Biodegradation of Haloacetic Acids by Bacterial Isolates and Enrichment Cultures from Drinking Water Systems." Environmental Science & Technology **43**(9): 3169-3175.





## 附錄

### 附錄一、傳統法 DNA 萃取步驟

1. 取 10mL 濾砂 (or 單元出水過濾之菌膜) 至高速離心管, 加入 8mL Lysis Buffer, 以超音波震盪 10mins。
2. 添加 Lysozyme (0.1ug/uL) 300uL, Achlopeptidase (0.1ug/uL) 30uL, 37°C 水浴 30mins。
3. 添加 Proteinase K (0.2ug/uL) 30uL, 20% SDS 75uL, 37°C 水浴兩小時 (mix per 30mins)
4. 依序添加 5M NaCl 4.2mL、10% CTAB 3mL, 60°C 水浴 30mins。
5. 在通風櫥內取 15mL Phenol/Chloroform/IAA (25 : 24 : 1), 10,000g 以上離心 10mins。移上清液至新的離心管。
6. 加入 15mL Chloroform/IAA (24:1), 10,000g 以上離心 10mins, 移上清液至新的離心管。
7. 添加等量 Isopropanol 後, 再加入 1/10 體積的 10M Ammonium acetate。
8. 置於-20°C 下五小時以上, 使 DNA 沉澱, 再於 4°C 下以 12,000rpm 離心 30mins, 小心除去上清液。

9. 添加 5uL 75% 冰 ethanol 洗出沉澱，12,000rpm 再離心 5mins，  
除去上清液。
10. 將離心管倒置風乾後，溶於 50uL 滅菌過之 Tris buffer。
11. 保存於-20°C



## 附錄二、商品化試劑 DNA 萃取步驟 (Biomen kit)

1. 取 10mL 濾砂(or 單元出水過濾後的菌膜)放入血清瓶，加入適量的 PBS buffer，使濾砂沉浸於液面下。
2. 超音波震盪 10 mins 後，取菌液至 50mL 高速離心管。
3. 以 10,000g 離心 10 分鐘，丟棄上層液。將 pellet 重新溶出，轉移至 2mL 離心管，再以 10,000g 離心，丟棄上層液。
4. 加入 480uL 50mM EDTA 使之再懸浮。
5. 加入 60uL 10mg/mL lysozyme 與 60uL 10mg/uL lysostaphin，用 pipet 輕微混合數次。
6. 將 sample 置於 37°C 恆溫箱或水浴 30~60mins。
7. 加入 600uL Cell Lysis Solution，用 pipet 輕微混合數次。
8. 將 sample 置於 80°C 水浴 10mins 後，加入 3uL RNase Solution，於 37°C 下作用 10mins，去除 RNA。
9. 加入 200uL Protein Precipitation Solution，震盪 20secs。
10. 將 sample 置於冰塊上 5mins。
11. 以 13,000~16,000g 離心 3mins，將上層液轉移至新的 2ml 離心管。
12. 加入 600uL Isopropanol，上下搖晃使其混合。(注意:劇烈震盪會導致 DNA 斷裂)

13. 以 13,000~16,000g 離心 2mins，丟棄上層液。
14. 加入 600uL 70% ethanol，輕微上下搖晃使均勻混合。
15. 13,000~16,000g 離心 2 mins，丟棄 ethanol，將 sample 倒置並風乾 15~30 mins。
16. 加入 50uL 10mM Tris buffer 使沉澱的 DNA 完全溶解。(若有難溶現象，將 sample 至於 37°C 水浴 10~15 mins)
17. 保存於-20°C

(Lysis buffer : 100mM Tris-HCl、100mM EDTA、0.75M Sucrose)



### 附錄三、商品化試劑 DNA 純化步驟 (Promega kit)

1. 將不足 50uL 的 DNA buffer 以無菌水補足。
2. 將 1mL Wizard DNA Clean-up Resin 加入至 1.5mL 離心管，再將補足之 DNA buffer 加入離心管內，輕微搖晃數次。
3. 將 Microcolumn 固定在針筒前端。
4. 將離心管內溶液以 pipet 抽出，轉移至架設好 Microcolumn 之針筒內，並推擠 Plunger，使溶液通過濾心。
5. 卸下 Microcolumn，將 plunger 從針筒拔出後，再將 Microcolumn 固定。
6. 加入 2mL 80% Isopropanol 至針筒後，推擠 plunger 至底部。
7. 從針筒卸下 Microcolumn 後，將其嵌入至 1.5mL 離心管，以 10,000g 離心 2 mins，拋棄離心液後，將 Microcolumn 轉移至新的 1.5mL 離心管。
8. 視原來 DNA bufer 體積，加入等體積之 65°C 預熱的 10mM Tris buffer，靜置 1 min 後以 10,000g 離心。
9. 卸除 Microcolumn，保存 DNA 於 -20°C



#### 附錄四 銀染(Silver staining)

1. 將 Acryamide Gel 沉浸於 ethanol/acetic acid solution 中 5 mins，輕微搖晃。
2. 取出膠體，轉移至內含新鮮 silver nitrate solution 的 tank 內，浸泡 20 mins。
3. 將膠體以無菌水快速浸洗數秒後取出。
4. 沉浸於 developing solution 約 30mins 後取出。(需視亮帶顏色深淺調整時間)
5. 浸泡於 Fixation Solution 10 mins
6. 將膠體固定於白光燈版上照相。(膠體可保存於 fixation solution 或以夾鏈袋保存於 4°C)



#### Solutions & Reagents :

- ethanol/acetic acid solution : 10%(v/v)ethanol、0.5%(v/v)acetic acid
- Silver nitrate solution (prepare freshly) : 0.1% (w/v) in water
- Developing solution(prepare freshly) : 1.5%(w/v)NaOH、0.01% NaBH<sub>4</sub>、  
0.5% 甲醛
- Fixation solution : .75(w/v)Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>