

教育部教學實踐研究計畫成果報告  
Project Report for MOE Teaching Practice Research Program

計畫編號/Project Number：PAG1100183

學門專案分類/Division：生技農科

執行期間/Funding Period：2021/08/01 ~ 2022/07/31

(計畫名稱/Title of the Project)

解析環境菌相及厭氧菌分離

(配合課程名稱/Course Name)

解析環境菌相及厭氧菌分離

計畫主持人(Principal Investigator)：陳師慶

共同主持人(Co-Principal Investigator)：

執行機構及系所(Institution/Department/Program)：國立中央大學生科系

成果報告公開日期：

立即公開 延後公開(統一於 2024 年 9 月 30 日公開)

繳交報告日期(Report Submission Date)：111/09/20

## 一. 報告內文(Content)

### 1. 研究動機與目的(Research Motive and Purpose)

大數據分析之應用在國內逐漸被重視，人工智慧的開發也為我國重要科研方針，對於生物科技從業人員極為重要，但是，雖大數據分析對於現場整治可以提供趨勢參考，業界對於如何將大數據應用於實場還欠缺可行性評估，必須搭配實驗進行佐證。因此，學生可以利用大數據分析之結論提取有效菌群，將理論應用到現實以達到業界需求，分離有效降解污染物之菌群，開發生物菌劑是目前業界應用生物整治之剛需。

本計畫以開發降解環境污染之生物菌劑為主，指導學生如何應用微生物學的知識以及大數據分析，結合環境工程進行跨領域合作，並請產業之業師提供正確之人才培育方向，使得學生未來可以直接投入產業，達到產學合作之目的。

### 2. 文獻探討(Literature Review)

#### (一) 生物整治工法

**生物刺激法(biostimulation)**的定義是以人工提供碳源等限制營養鹽及界面活性劑，以刺激活化場址中的現地微生物生長，增強原污染場地的微生物菌種對於原本場地的污染物降解能力，生物刺激法的優點是提供利於現地微生物合宜的生長環境，使在原本存在於現地的微生物可在原場地進行降解，降低外源微生物對於現地環境生態改變的潛在風險，生物刺激法的限制:(1)仍受外界因素影響，如營養鹽、酸鹼值、溫度、水分、濕度、土壤特性及污染物等可能因素影響場地整治效率，(2)現地培養微生物所耗時間長，且培養不一定可成功(Adesodun and Mbagwu, 2008; Al-Sulaimani et al., 2011)。

**生物強化法(bioaugmentation)**是可直接在污染場址添加具有分解污染物之特殊菌種，或利用基因工程技術合成可分解污染物之重組微生物，以增強污染區域的微生物降解能力 (Abatenh et al., 2017; Pal et al., 2020)，運用本土已培養成功的微生物菌群投放至場地中，可縮短重新培養的時間及風險，且可以利用馴化過的微生物菌群針對場地污染物進行快速降解，然而，添加外源微生物或基因改造微生物，需謹慎考量對於環境破壞的風險(Nzila et al., 2016)。

生物強化法的限制原因，與許多因素有關：(1)細菌的增長量與地下水流的沖

洗率失衡，造成細菌菌數不足以提供降解現地污染物；(2)投放至現地的細菌接種量不足(Heavner et al., 2019)；(3)投入之細菌與場址既有之細菌相互競爭造成細菌數量迅速減少；(4)微生物投入後難以擴散，造成生存空間不足(Gentry et al., 2001)。

## (二) 多氯乙烯之厭氧生物復育及脫鹵球菌

多氯乙烯污染物 (如三氯乙烯、四氯乙烯…等)溶解度低、密度大於水，屬於重質非水相液體 (Dense Nonaqueous-Phase Liquids, DNAPLs)，當 TCE 經由不當的排放或儲槽及管線的洩漏而存在於土壤或地下水時，容易增加土壤污染之深度及範圍 (Kuo et al., 2016)。含氯有機污染物質的地下水整治是有一定困難的，但地下水對於全人類來說又是至關重要，且美國癌症研究總署(IARC)將其中四氯乙烯、三氯乙烯及氯乙烯等多種含氯污染物及其代謝產物分類為「很可能對人體具致癌性 (2A)」或「確定對人體具致癌性 (Group 1)」。現地處理因為不須挖掘土壤，且可利用生物、化學針對大範圍污染場址區域重複操作進行整治，節省離場的運輸和挖掘成本，且可在現場直接操作，近年來被大量應用在台灣的含氯有機物污染場址(Simon et al., 2002)。

脫鹵球菌(*Dehalococcoides mccartyi*, Dhc)生存環境需絕對厭氧，脫鹵球菌以多氯乙烯(PCE、TCE、DCE 或 VC)作為電子受體和氫作為電子供體，氧化電位(ORP)須落在-100mV-250mV 間，pH 值須落在 6~8 範圍間，最適溫度 30°C，以醋酸當作碳源，脫鹵球菌在脫氯的過程中需利用維他命 B12 作為輔酶，幫助電子至還原脫氯酵素上，進而啟動還原脫氯酵素(reductive dehalogenase, RDase)進行脫氯(Hug et al., 2013)。在多氯乙烯污染的場址中，脫鹵球菌 *Dehalococcoides mccartyi* (Dhc)的存在以及環境中能否持續提供脫鹵球菌生長所需物質就顯得尤為重要。然而，脫鹵球菌因為自身沒辦法合成必要的生長物質，所以其生長時必須要依賴其他微生物去提供(Maphosa et al. 2012)，其進行多氯乙烯厭氧呼吸時，需要氫氣作電子提供者並且使用醋酸作為生長碳源，並且還需要合成還原性脫鹵酵素所需的輔酶維他命 B12，因此多數研究認為量產純種脫鹵球菌是相當困難(Yohda et al. 2017)。在自然環境中，當厚壁菌(*Firmicutes*)及變形菌門(*d/ε-Proteobacteria*)常與脫鹵球菌共同存在(Hatt and Löffler 2012)，這類細菌常常扮演者發酵者的角色，將不同營養基質發酵成醋酸與氫氣，提供給脫鹵球菌去進行多氯乙烯還原脫氯反應。

## (三) 產業實務應用

目前台灣現有生物整治含氯有機物所使用的技術主要為生物刺激法，透過添加營養鹽或者生物可利用基質提升地下水菌群，用以降解多氯乙烯污染物。然而如先前所述，生物刺激法之成效僅依靠場地現有細菌，取決於關鍵脫氯細菌之存在與否，整治應用上存在其限制，因此目前的生物整治工法可能無法符合目前場池整治需求。為解決此問題，生物強化法可以

作為最根本的整治策略，不同脫鹵球菌株具有不同的脫氯能力，因此可以依據相應的污染物(多氯乙烯)投入應對的生物菌劑，在國外已經有商業化的菌劑 KB-1(Polasko et al. 2019)和 SDC-9(Schaefer et al. 2010)並且該菌劑中皆有多株的脫鹵球菌去降解多氯乙烯(Kucharzyk et al. 2020, Kanitkar et al. 2016)，但是根據環保署毒物及化學局的「環境用藥許可證及病媒防治業網路查詢系統中」，正面表列「不得含有微生物」(151 項)與「環境用藥微生物製劑成分禁止含有微生物種類」(10 項)，這些涵蓋了大多的致病微生物、真菌以及病毒，這也使得國外的生物菌劑因無法確定其是否含有相關管制微生物，而難以進口至台灣本土做生物整治使用。目前國外已有許多研究表明生物菌劑可以有效的應用，如 KB-1 生物菌劑結合零價鐵藥劑投放於多氯乙烯的污染場址內，在十二個月內將 592ppm 的三氯乙烯降至 11ppm 左右(Peale et al. 2010)。KB-1 菌群更是可以在酸鹼值為 6.0 時持續將氯乙烯降解到乙烯(Puentes Jácome et al. 2019)。而 Li 等人的研究中，使用 SDC-9 菌群以及 *Azoarcus* sp. DD4 菌株去分兩階段去完全降解三氯乙烯以及 1,4-二噁烷(Li et al. 2021)。這些菌劑成功改變土壤內的菌群生態，可以有效解決污染物降解的問題，一旦生物菌劑停止供應後，憑靠在地菌種間互相制衡的特性，脫氯菌群不能再利用污染物作為能量來源，菌群會再一次回到自然平衡的狀態，使得土壤恢復最原始的風貌，不會有二次污染的問題。

### 3. 研究問題(Research Question)

#### (1) 脫氯菌群進行環境整治

土壤和地下水的污染近年來，已產生廣泛的環境問題，需要被有效的解決。氯化溶劑污染的生物修復已經被應用廣泛。然而，另一個主要的問題是有毒的中間產物的積累，如順式-二氯乙烯 (順式 - DCE)，1,1-二氯乙烯 (1,1-DCE)，反式 -二氯乙烯 (反式 - DCE) 和氯乙烯 (VC) (Sharma et al., 1996)。脫鹵球菌(*Dehalococcoides*)，可以用來判斷 VC 是否成功轉換成乙烯。到今天為止 *tceA*、*vcrA* 及 *bvcA* 已被確認為是判斷脫鹵球菌中是否具有

氯乙烯脫氯酶基因 (Victor et al., 2006) *tceA* 基因可以透過共代謝脫氯產生乙烯、*bvcA* 基因可以將所有 DCE 的異構體脫氯和參予 VC 代謝，*vcrA* 基因是一個關鍵的脫氯酶基因，可能參予 VC 代謝 (Victor et al., 2006)。這些脫氯酶基因在脫鹵球菌存在，因此量化這些基因可能代表脫鹵球菌屬的相對含量。這些脫氯酶具有不同的特異性，可能會強烈地影響脫氯率。但是，在許多情況下，含有脫氯酶基因菌種可能只含有三脫氯酶基因的一種或兩種。此外，在許多情況下，即使所有三種類型的脫氯酶基因存在，完全脫氯也很少發生，順 DCE 和 VC 可能會積累，特別是在高度污染的場所，然而，為什麼這些脫氯酶不能有效運作的原因仍不清楚。因此，透過培養這些含有脫氯基因之菌種，並且將非致病菌之菌群施作於污染場址中，可直接提升還原脫氯之效率，可作為模場整治策略的修正與改進。

### (2) 次世代定序分析菌相動態變化

調查污染場址中之微生物族群為使用生物復育法之關鍵步驟，Reiss 等人於 2016 報導，使用次世代定序 (NGS) 技術分析 TCE 污染場址環境總基因體，未處理前之微生物以 Gammaproteobacteria 為主要族群，使用生物刺激法處理後則以 Epsilonproteobacteria 和 Deltaproteobacteria 等兩大族群為主。在 TCE 降解過程中 Epsilonproteobacteria 產生還原脫氯酶將 TCE 分解為 DCE，而後再由 *Dehalococcoides* 菌屬將其降解為乙烯。此外本團隊使用 NGS 於 2016 年調查台南永康一處 TCE 污染場址之菌相，成功鑑定 TCE 降解關鍵菌屬 *Dehalococcoides* 存在，並利用緩釋型營養基質刺激此場址成功整治 (Kao et al., 2016)。因此以 NGS 技術分析完整環境菌相有利後續篩選菌群並且提升生物強化復育程序整治污染場址。

### (3) 教學實踐研究應用

講授課程將整合本校跨院系教師、外校教師、研究單位學者、與業界專家共同授課。實作課程將安排學生學習環境分子生物鑑定以及大數據分析等技術、本系設備與空間可供本計畫實作課程使用。授課對象以生命科學系大三以上同學為對象，他們已有生化和微生物學等相關學識，研究步驟是對於多氯乙烯整治中之場地進行微生物菌相之調查，透過大數據分析進而評估生物整治之成效。多氯乙烯關鍵菌株脫鹵球菌 (*Dehalococcoides* sp.) 為生物整治，脫鹵球菌已被證實可以將多氯乙烯轉為無毒之乙烯，達到生物整治之功效，其功能性基因 (*bvcA*, *vcrA*, *tceA*, *16s rRNA*) 可以利用即時定量 qPCR 進行測定，監測關鍵菌株之消長以及活性。此外，我們可以針對地下水或者土壤抽取環境 DNA，進一步進行次世代定序，獲得總體基因之菌相資料，菌相的組成對於場地是否適合進行脫氯反應，最後利用大數據分析從中找到關鍵功能性菌株，並且將其分離製作成菌劑等一系列產品。

#### 4. 研究方法(Research Methodology)

本課程搭配生命科學系每周三節之“解析環境菌相及厭氧菌分離”課程，共一學期，主要教學對象為生命科學系大三以上之學生，因教授內容極具專業知識基礎，需具微生物學和分子生物基本概念，而此技術內容於生命科學系大三課程已教授。

整體課程以翻轉教育為主軸，實作課程整體架構分為兩階段，每階段實施半學期：

第一階段(生物整治工法及分子生物技術)：提供大量相關資料供學生閱讀並自行歸納尋找答案，帶領學生進行實驗實作，藉由實驗結果佐證知識本體後，再分組發表分享報告。

第二階段(菌相調查及菌群分離及量產)：本實驗室提供多氯乙烯生物整治實作案例，學生於實作案例中找尋欲探討之開放性問題，自行分組設計實驗解決問題並獲得答案，分組報告發表。此部分讓同學學習從菌相分析到菌種分離，最後量產出自己獨特的菌群產品。

參與本計畫的學生與人員將可學習到最新之環境生物科技、分子生物科技、生物化學與微生物學知識之整合，並將其應用於環境科學與工程上研究議題。在執行計畫的研究過程中，執行計畫的研發人員與學生也能從過程中學習到問題分析與實驗設計及如何進行實驗數據之整理、分析及討論等學術訓練，這些專業知識與技能將能提供參與的學生及人員均有非常大的助益。

表格 1 教學課程大綱

	前導理論課程	實作課程-從菌相分析到菌種分離
生物整治工法	課程介紹 演講課程：生物整治及復育-污染場址整治策略 氣相層析儀原理	生物整治工法參觀 邀請環境公司業師指導 應用氣相層析測定脫氯菌降解成效
分子生物實驗	微生物整治策略技術 DNA 萃取原理 即時定量 PCR 原理	DNA/plasmid 萃取 環境監測定量標準品製作 即時定量 PCR 實作
大數據： 基因體分析及資料視覺化	總體基因學 R 程式語言概論 資料視覺化 次世代定序技術原理 大數據分析概論	Metagenome 分析及 Miseq 定序 Galaxy 和 Mothur 套件使用 R 與 Tidyverse 應用 ggplot2 基本概念與應用 PCA、Cluster 分析
菌相分析到菌種分離	從菌相資料庫挑選特殊碳源進行培養	厭氧菌分離技術 厭氧發酵桶操作

	厭氧菌分離技術 脫氯菌群大規模培養	菌液實場灌注操作
成果報告	分組討論及結果檢討	海報製作

## (1) 講授

目前微生物用於生物整治日漸重要，其背景知識包含微生物的代謝、基因體學、分子鑑定技術、監測技術、污水處理技術等，本計畫講授課程包含如下：

- A. 微生物的代謝: 微生物的代謝(microbial metabolism)是指微生物細胞內發生的各種生物化學反應的總稱。微生物通過這些反應，利用各種基質獲得能量和合成細胞物質的前驅物，以滿足細胞生長、繁殖和產物合成的需求。透過了解微生物代謝可以使學生學習生物整治法的基礎原理。
- B. 微生物基因體學: 隨著分子生物學的發展，特別是體學(omic)技術的廣泛應用，微生物遺傳的研究深入積累了大量的資訊，透過既有微生物資料庫可以對於整治場地能有更深入的認識。學生可以由此學習大數據分析如何應用至真實案例。
- C. 環境菌種分子鑑定技術: 微生物分子鑑定技術包括微生物基因組水平的圖譜分析、特殊基因的限制酵素片段長度多態性、DNA 同源性分析、16S/26S/ITS rDNA 等系統演化學分析等等。此部分將著重在業界最常見的 16s rDNA 定序技術，讓學生能夠掌握產業真實需求。
- D. 環境微生物監測技術: 生物監測是利用各種生物對於環境汙染或環境變化所產生的反應，及研究生物個體、族群、群落在各種汙染物水平中發出的各種訊號，來判斷環境汙染的程度，以便從生物學的角度為環境質量的監測和評價、汙染控制、環境管理等提供依據，包括利用核酸探針和定量 PCR 技術監測評價環境。此部分加強生命科學系同學們本科的專業，透過實作課程熟捻定量 PCR 技術，加強專業實力。
- F. 有機汙染物的微生物降解途徑: 大多數進入環境的有機汙染物結構大多為脂肪烴、環烷烴以及芳香烴，微生物可以直接利用溶解的有機汙染物，了解這類細菌之汙染物代謝途徑可以提共更多環境整治之策略。

## (2) 實作

### A. 使用脫鹵球菌菌劑影響環境整治

土壤和地下水的汙染近年來，已產生廣泛的環境問題，需要被有效的解決。氯化溶劑汙染的生物修復已經被應用廣泛。然而，另一個主要的問題是有毒的中間產物的積累，如順式-二氯乙烯 (順式 - DCE)，1,1 -二氯乙烯 (1,1-DCE)，反式 -二氯

乙烯 (反式 - DCE) 和氯乙烯 (VC) (Sharma et al., 1996)。脫鹵球菌(Dehalococcoides)，可以用來判斷 VC 是否成功轉換成乙烯。到今天為止 tceA、vcrA 及 bvcA 已被確認是判斷脫鹵球菌中是否具有氯乙烯脫氯酶基因 (Victor et al., 2006) tceA 基因可以透過共代謝脫氯產生乙烯、bvcA 基因可以將所有 DCE 的異構體脫氯和參與 VC 代謝，vcrA 基因是一個關鍵的脫氯酶基因，可能參與 VC 代謝 (Victor et al., 2006)。這些脫氯酶基因在脫鹵球菌存在，因此量化這些基因可能代表脫鹵球菌屬的相對含量。這些脫氯酶具有不同的特異性，可能會強烈地影響脫氯率。但是，在許多情況下，含有脫氯酶基因菌種可能只含有三脫氯酶基因的一種或兩種。此外，在許多情況下，即使所有三種類型的脫氯酶基因存在，完全脫氯也很少發生，順 DCE 和 VC 可能會積累，特別是在高度污染的場所，然而，為什麼這些脫氯酶不能有效運作的原因仍不清楚。經由測定脫氯酶基因變化量，添加生物菌劑，可間接了解還原脫氯之效率，可作為模場整治策略的修正與改進。

#### B. 次世代定序分析菌相動態變化

調查污染場址中之微生物族群為使用生物復育法之關鍵步驟，Reiss 等人於 2016 報導，使用次世代定序 (NGS) 技術分析 TCE 污染場址環境總基因體，未處理前之微生物以 Gammaproteobacteria 為主要族群，使用生物刺激法處理後則以 Epsilonproteobacteria 和 Deltaproteobacteria 等兩大族群為主。在 TCE 降解過程中 Epsilonproteobacteria 產生還原脫氯酵素將 TCE 分解為 DCE，而後再由 Dehalococcoides 菌屬將其降解為乙烯。此外本團隊使用 NGS 於 2016 年調查台南永康一處 TCE 污染場址之菌相，成功鑑定 TCE 降解關鍵菌屬 Dehalococcoides 存在，並利用緩釋型營養基質刺激此場址成功整治 (Kao et al., 2016)。因此以 NGS 技術分析完整環境菌相有利後續選擇使用生物刺激或生物強化復育程序整治污染場址。

## 5. 教學暨研究成果(Teaching and Research Outcomes)

### (1) 教學過程與成果

#### A. 產學結合：邀請業師分享生物產業，培養學生進入菌群培養領域

邀請業師分享生物應用實例，使教學緊扣產業現狀，由淺入深，帶領學生熟悉環境整治的全貌，並靈活的學習課本上的專業知識。



圖 1 解析環境菌相及厭氧菌分離業師課程。(左)產業生物科技應用實例分享；(右)產業講師提供微生物培養之業界資訊。

#### B. 菌相大數據分析：透過大數據分析使得學生可以找到關鍵功能菌種，以利於近一部分離菌群

由於科技進展快速，處理的資料趨向龐大，因此大數據分析在發展上受到重視。在本課程中，透過經常用於處理生物資訊的 R 語言作為工具，對於污染場地調查出之資料進行分析，而能評估菌相變化以及合適的整治策略，在多變的現地應用環境中，是評估場地條件極為重要的一項技術。

本課程結合線上教學平台 DataCamp 進行 R 語言教學，奠定學生 R 語言基礎，本期課程之基本養成訓練包括：

1. Metagenome 分析及 Miseq 定序
2. Galaxy 和 Mothur 套件使用
3. R 與 Tidyverse 應用
4. ggplot2 基本概念與應用

## 5. PCA、Cluster 分析

透過這些基本的分析及視圖化教學，讓學生從頭掌握數據處理，以及分析、圖像化等等操作，為業界所缺之專業人才培訓。



圖 2 菌相大數據分析課程剪影。(上圖)總體基因學理論課；(左下圖)蛋白質體學理論課；(右下圖)菌相分析理論課程。

### C. 生物技術實作：分組操作實驗，培養學生具備實作及解決問題的能力

在生物整治策略中，瞭解環境中污染物濃度變化以及菌相變化，有助於整治策略上的滾動式調整，以因應環境的變化。這個部分的課程設計主要目的為讓學生具備基本分子生物檢測能力，在環境整治過程中收集參數變化，而這些數據則能應用 R 作為工具進行分析，並銜接底下課程。

該部分課程屬於實驗課程，由博士班學生作為助教帶領修課學生動手操作，以含氯有機污染物為例，其實作內容如下：

1. 污染水過濾及樣品收集
2. 生物菌劑製作及培養
3. 分離關鍵功能性厭氧菌株

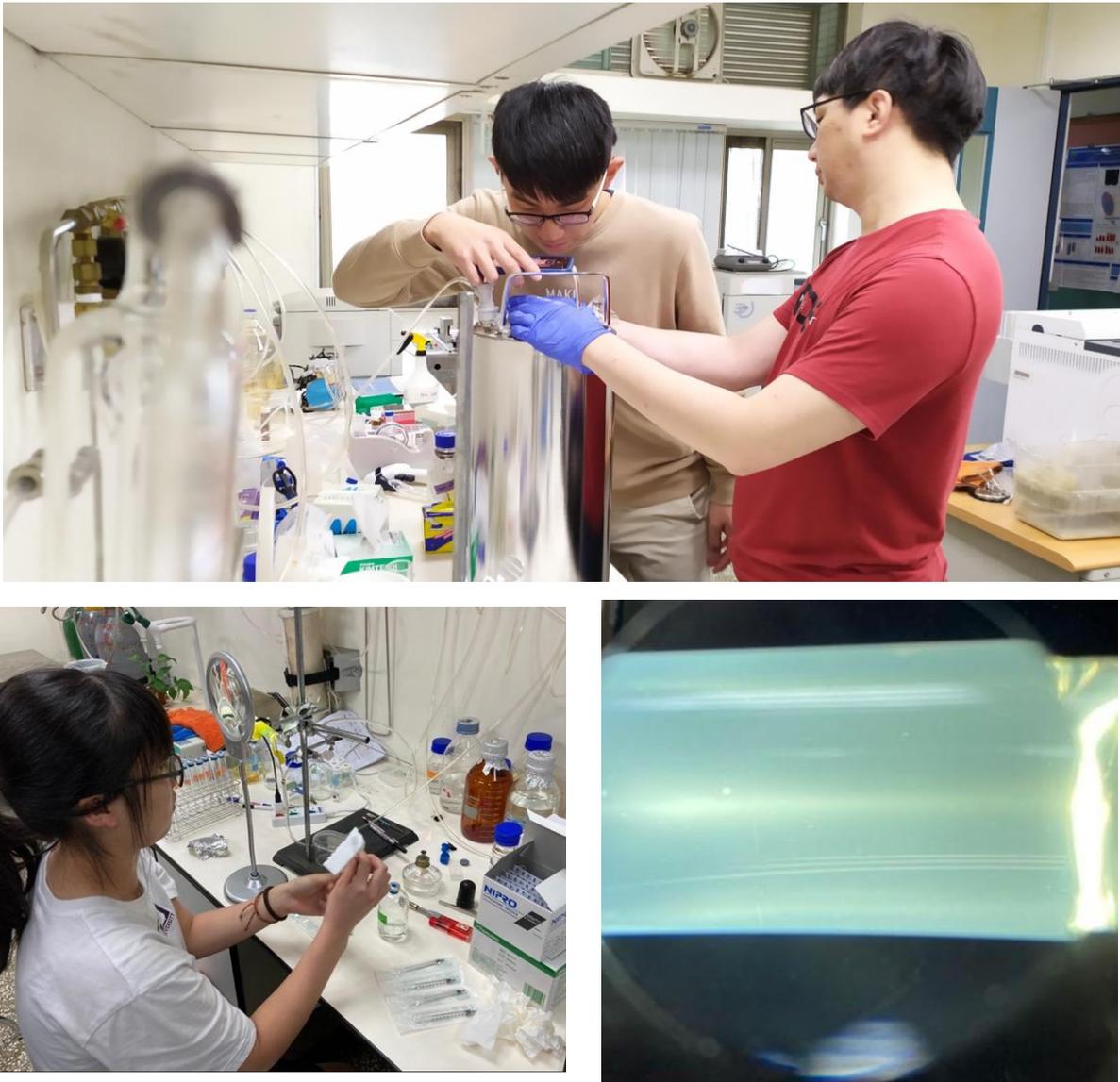


圖 3 生物技術實作剪影。(上圖)生物整治之脫氯菌發酵培養；(左下圖)分離單一厭氧菌落之操作；(右下圖)厭氧菌落之放大照片。

#### D. 微實習：帶領學生熟悉生物整治工法以及提升課堂學習熱忱

本課程結合實驗室產學計畫，帶領學生至污染場址參訪，並協助生物整治工法進行。在此階段除了讓學生透過親身經歷瞭解整治的流程，更藉此銜接後續的課程，提升學生的學習動力。當學生更清楚知道我們要達到的目標，以及整治上需要解決的問題，就能成為後續課程學習中尋找答案的熱忱，並加深學習印象。

此部分結合含氯有機物污染場址進行，並完整包含整治的不同時期：整治前需要對場地進行環境調整、整治期則需定期追蹤污染物降解狀態。學生將瞭解常見的整治難題，並動手參與以下生物整治工法：

1. 污染水採樣及樣本保存
2. 污染水質檢測

### 3. 整治藥劑及菌劑投放



圖 4 污染整治參訪剪影。(左上圖)藥劑施放作業系統；(左下圖)厭氧藥劑配置；(右上圖)污水採樣；(右下圖)生物整治法之脫氣膠體施放。

### E. 研討會成果發表

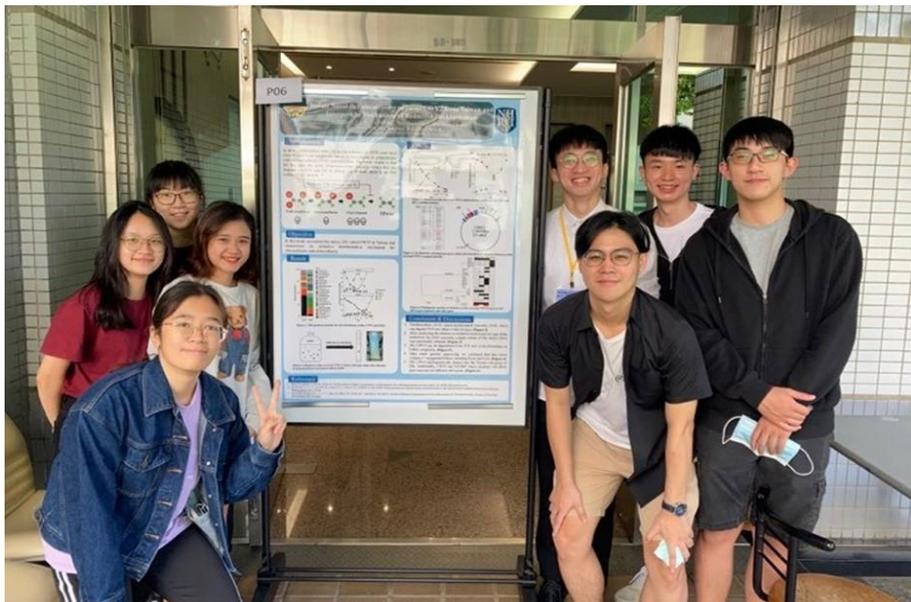


圖 5 桃園地區四校學生(中央, 中原, 元智, 長庚)科學研討會競賽海報展出。

最後，選出研究成果有非常好表現之組別，參與每年度桃園地區四校學生(中央，中原，元智，長庚)科學研討會競賽，前三名均有大會提供獎金鼓勵。

#### F. 降解菌株分離成果

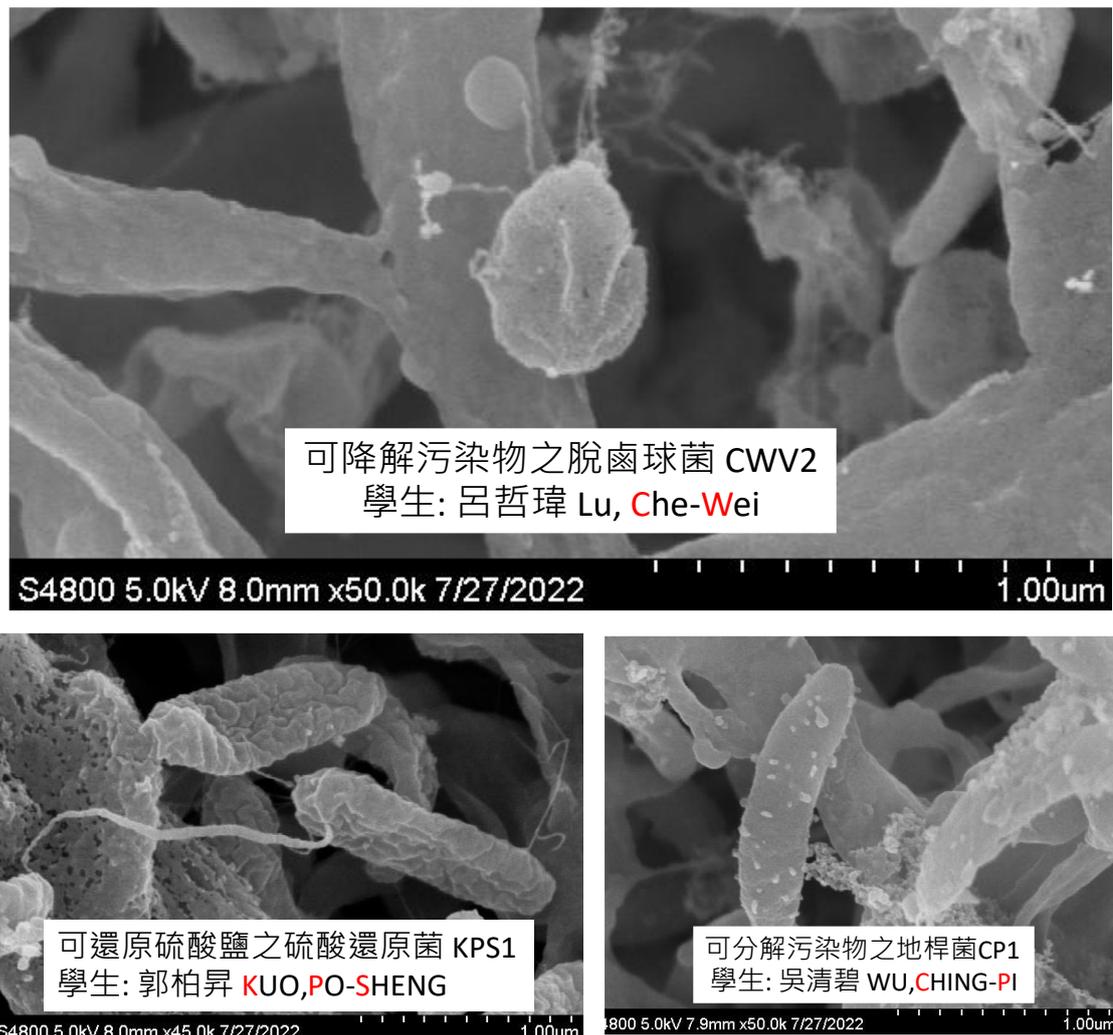
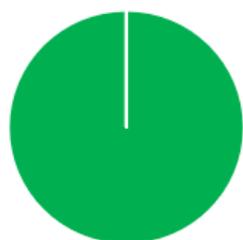


圖 6 菌相大數據分析課程剪影。(上圖)總體基因學理論課；(左下圖)蛋白質體學理論課；(右下圖)菌相分析理論課程。

這次課程中，有幾位同學篩選出有特殊功能的菌株，其中有降解多氯乙烯的脫鹵球菌、可還原硫酸鹽之硫酸還原菌以及可降解三氯乙烯的地桿菌，菌種的名稱皆讓同學以自己的名字命名，增加與科學的參與度以及動力。

## (2) 教學設計提升學習成效

學生出席狀態



平均每週課外付出時間



■ 從不缺課 ■ 缺課1-3週 ■ 10小時以上 ■ 6-9小時 ■ 4-5小時 ■ 1-3小時

## (3) 學生學習回饋

學期	課號	課名	課制	必/選修	修課人數	綜合評分	標準差
1101	LS5071	解析環境菌相及厭氧菌分離	碩博同修	選修	11	4.92	0.37

## 6. 建議與省思(Recommendations and Reflections)

研究與教學擠在短短一學期的課程中，對於部分學生負擔可能較重，但本課程讓同學以自己的名字去命名新的菌種，讓學生願意在課外多花時間投入練習，對學習動力的提升有顯著效果。然而該課程需要投入大量的人力、經費資源，同時菌株篩選有一定難度，不一定有結果，因此難以普遍實施。期望經由多開放此類課程，培養學生勇於發問挑戰的自信，更能擁有自己的想法，並經由培訓成為具備生物學識潛力的產業人才。

另外在學習結果回饋方面，經過這整個學期的學習成果，透過參加研討會、張貼海報來呈現，雖然合作展出海報無法看出個別學習狀態，但卻能訓練團隊合作、溝通表達的能力。此外本課程使用的是校內共通問卷系統(附件一)，根據評鑑結果得到綜合評分有4.92 高分，顯示學生對於課程之正面評價，並且由每周課外付出時間，可以得知學生對此課程的熱忱普遍較高，增強自學力的結果。

## 二. 參考文獻(References)

- Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z. and Wassie, M. 2017. The role of microorganisms in bioremediation-A review. *Open Journal of Environmental Biology* 2(1), 038-046.
- Adams, G.O., Fufeyin, P.T., Okoro, S.E. and Ehinomen, I. 2015. Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation* 3(1), 28-39.
- Adesodun, J. and Mbagwu, J. 2008. Biodegradation of waste-lubricating petroleum oil in a tropical alfisol as mediated by animal droppings. *Bioresource technology* 99(13), 5659-5665.
- Adrian, L. and Löffler, F.E. (2016) *Organohalide-respiring bacteria*, Springer.
- Al-Sulaimani, H., Joshi, S., Al-Wahaibi, Y., Al-Bahry, S., Elshafie, A. and Al-Bemani, A. 2011. Microbial biotechnology for enhancing oil recovery: current developments and future prospects. *Biotechnol Bioinf Bioeng* 1(2), 147-158.
- Azubuikwe, C.C., Chikere, C.B. and Okpokwasili, G.C. 2016. Bioremediation techniques – classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32(11), 1-18.
- Behrens, S., Azizian, M.F., McMurdie, P.J., Sabalowsky, A., Dolan, M.E., Semprini, L. and Spormann, A.M. 2008. Monitoring abundance and expression of "Dehalococcoides" species chloroethene-reductive dehalogenases in a tetrachloroethene-dechlorinating flow column. *Appl Environ Microbiol* 74(18), 5695-5703.
- Bradley, P.M. 2003. History and ecology of chloroethene biodegradation: a review. *Bioremediation journal* 7(2), 81-109.
- Bradley, P.M. and Chappelle, F.H. 2007. Accumulation of dechlorination daughter products: A valid metric of chloroethene biodegradation. *Remediation Journal: The Journal of Environmental Cleanup Costs, Technologies & Techniques* 17(4), 7-22.
- Chiu, W.A., Jinot, J., Scott, C.S., Makris, S.L., Cooper, G.S., Dzubow, R.C., Bale, A.S., Evans, M.V., Guyton, K.Z. and Keshava, N. 2013. Human health effects of trichloroethylene: key findings and scientific issues. *Environmental health perspectives* 121(3), 303-311.
- Duhamel, M., Mo, K. and Edwards, E.A. 2004. Characterization of a highly enriched Dehalococcoides-containing culture that grows on vinyl chloride and trichloroethene. *Applied and Environmental Microbiology* 70(9), 5538-5545.
- Gentry, T.J., Newby, D.T., Josephson, K.L. and Pepper, I.L. 2001. Soil microbial population dynamics following bioaugmentation with a 3-chlorobenzoate-degrading bacterial culture. *Biodegradation* 12(5), 349-357.
- Hatt, J.K. and Löffler, F.E. 2012. Quantitative real-time PCR (qPCR) detection chemistries affect enumeration of the Dehalococcoides 16S rRNA gene in groundwater. *Journal of Microbiological Methods* 88(2), 263-270.
- He, J., Holmes, V.F., Lee, P.K. and Alvarez-Cohen, L. 2007. Influence of vitamin B12 and cocultures on the growth of Dehalococcoides isolates in defined medium. *Appl Environ Microbiol* 73(9), 2847-2853.
- He, J., Ritalahti, K.M., Aiello, M.R. and Löffler, F.E. 2003. Complete detoxification of vinyl chloride by an anaerobic enrichment culture and identification of the reductively dechlorinating population as a Dehalococcoides species. *Appl Environ Microbiol* 69(2), 996-1003.

- Heavner, G.L., Mansfeldt, C.B., Wilkins, M.J., Nicora, C.D., Debs, G.E., Edwards, E.A. and Richardson, R.E. 2019. Detection of organohalide-respiring enzyme biomarkers at a bioaugmented TCE-contaminated field site. *Frontiers in microbiology* 10, 1433.
- Henri, C.V., Fernández-García, D. and De Barros, F.P. 2016. Assessing the joint impact of DNAPL source-zone behavior and degradation products on the probabilistic characterization of human health risk. *Advances in water resources* 88, 124-138.
- Hug, L.A., Maphosa, F., Leys, D., Löffler, F.E., Smidt, H., Edwards, E.A. and Adrian, L. 2013. Overview of organohalide-respiring bacteria and a proposal for a classification system for reductive dehalogenases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 368(1616), 20120322.
- Kanitkar, Y.H., Stedtfeld, R.D., Steffan, R.J., Hashsham, S.A. and Cupples, A.M. 2016. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for Rapid Detection and Quantification of Dehalococcoides Biomarker Genes in Commercial Reductive Dechlorinating Cultures KB-1 and SDC-9. *Appl Environ Microbiol* 82(6), 1799-1806.
- Kato, S., Haruta, S., Cui, Z.J., Ishii, M. and Igarashi, Y. 2008. Network relationships of bacteria in a stable mixed culture. *Microb Ecol* 56(3), 403-411.
- Karpenko, O., Lubenets, V., Karpenko, E. and Novikov, V. 2009. Chemical oxidants for remediation of contaminated soil and water. A review. *Chem. Chem. Technol* 3(1), 41-45.
- Kranzioch, I., Ganz, S. and Tiehm, A. 2015. Chloroethene degradation and expression of Dehalococcoides dehalogenase genes in cultures originating from Yangtze sediments. *Environ Sci Pollut Res Int* 22(4), 3138-3148.
- Kruse, S., Türkowsky, D., Birkigt, J., Matturro, B., Franke, S., Jehmlich, N., von Bergen, M., Westermann, M., Rossetti, S., Nijenhuis, I., Adrian, L., Diekert, G. and Goris, T. 2021. Interspecies metabolite transfer and aggregate formation in a co-culture of Dehalococcoides and Sulfurospirillum dehalogenating tetrachloroethene to ethene. *ISME J* 15(6), 1794-1809.
- Kucharzyk, K.H., Meisel, J.E., Kara-Murdoch, F., Murdoch, R.W., Higgins, S.A., Vainberg, S., Bartling, C.M., Mullins, L., Hatzinger, P.B. and Löffler, F.E. 2020. Metagenome-Guided Proteomic Quantification of Reductive Dehalogenases in the Dehalococcoides mccartyi-Containing Consortium SDC-9. *Journal of Proteome Research* 19(4), 1812-1823.
- Lee, P.K., Cheng, D., West, K.A., Alvarez-Cohen, L. and He, J. 2013. Isolation of two new Dehalococcoides mccartyi strains with dissimilar dechlorination functions and their characterization by comparative genomics via microarray analysis. *Environ Microbiol* 15(8), 2293-2305.
- Li, F., Deng, D., Zeng, L., Abrams, S. and Li, M. 2021. Sequential anaerobic and aerobic bioaugmentation for commingled groundwater contamination of trichloroethene and 1,4-dioxane. *Science of The Total Environment* 774, 145118.
- Li, D., Zhong, Y., Zhu, X., Wang, H., Yang, W., Deng, Y. and Huang, W. 2021. Reductive degradation of chlorinated organophosphate esters by nanoscale zerovalent iron/cetyltrimethylammonium bromide composites: Reactivity, mechanism and new pathways. *Water Research* 188, 116447.
- Lin, K.-S., Mdlovu, N.V., Chen, C.-Y., Chiang, C.-L. and Dehvari, K. 2018. Degradation of TCE, PCE, and 1, 2 - DCE DNAPLs in contaminated groundwater using polyethylenimine-modified zero-valent iron nanoparticles. *Journal of Cleaner Production* 175, 456-466.

- Löffler, F.E., Yan, J., Ritalahti, K.M., Adrian, L., Edwards, E.A., Konstantinidis, K.T., Müller, J.A., Fullerton, H., Zinder, S.H. and Spormann, A.M. 2013. *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*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 63(Pt\_2), 625-635.
- Lofrano, G., Libralato, G., Minetto, D., De Gisi, S., Todaro, F., Conte, B., Calabrò, D., Quatraro, L. and Notarnicola, M. 2017. In situ remediation of contaminated marinesediment: an overview. *Environmental Science and Pollution Research* 24(6), 5189-5206.
- Luijten, M.L., Roelofsen, W., Langenhoff, A.A., Schraa, G. and Stams, A.J. 2004. Hydrogen threshold concentrations in pure cultures of halo-respiring bacteria and at a site polluted with chlorinated ethenes. *Environ Microbiol* 6(6), 646-650.
- Madhupriya, M., Gowri, R.S., Saranya, A., Rajarajeswari, P., Prabhavathi, P. and Kumar, S.D. 2020. Remediation techniques for heavy metal contaminated ecosystem – a review. *Journal of Advanced Scientific Research* 11(02), 1-9.
- Maitra, S. 2018. In situ bioremediation—an overview. *Responsibility of Life Science Informatics Publications*.
- Maphosa, F., Lieten, S., Dinkla, I., Stams, A., Smidt, H. and Fennell, D. 2012. Ecogenomics of microbial communities in bioremediation of chlorinated contaminated sites. *Frontiers in Microbiology* 3.
- Maymó-Gatell, X., Chien, Y., Gossett, J.M. and Zinder, S.H. 1997. Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science* 276(5318), 1568-1571.
- McMurdie, P.J., Behrens, S.F., Müller, J.A., Göke, J., Ritalahti, K.M., Wagner, R., Goltsman, E., Lapidus, A., Holmes, S. and Löffler, F.E. 2009. Localized plasticity in the streamlined genomes of vinyl chloride respiring *Dehalococcoides*. *PLoS Genetics* 5(11), e1000714.
- McMurdie, P.J., Hug, L.A., Edwards, E.A., Holmes, S. and Spormann, A.M. 2011. Site-specific mobilization of vinyl chloride respiration islands by a mechanism common in *Dehalococcoides*. *BMC genomics* 12(1), 1-15.
- Molenda, O., Jácome, L.A.P., Cao, X., Nesbø, C.L., Tang, S., Morson, N., Patron, J., Lomheim, L., Wishart, D.S. and Edwards, E.A. 2020. Insights into origins and function of the unexplored majority of the reductive dehalogenase gene family as a result of genome assembly and ortholog group classification. *Environmental Science: Processes & Impacts* 22(3), 663-678.
- Nzila, A., Razzak, S.A. and Zhu, J. 2016. Bioaugmentation: an emerging strategy of industrial wastewater treatment for reuse and discharge. *International journal of environmental research and public health* 13(9), 846.
- Pal, A.K., Singh, J., Soni, R., Tripathi, P., Kamle, M., Tripathi, V. and Kumar, P. (2020) *Bioremediation of pollutants*, pp. 227-249, Elsevier.
- Pan, Y., Zeng, X., Xu, H., Sun, Y., Wang, D. and Wu, J. 2020. Assessing human health risk of groundwater DNAPL contamination by quantifying the model structure uncertainty. *Journal of Hydrology* 584, 124690.

- Peale, J.G.D., Mueller, J. and Molin, J. 2010. Successful ISCR-enhanced bioremediation of a TCE DNAPL source utilizing EHC® and KB-1®. *Remediation Journal* 20(3), 63-81.
- Polasko, A.L., Zulli, A., Gedalanga, P.B., Pornwongthong, P. and Mahendra, S. 2019. A Mixed Microbial Community for the Biodegradation of Chlorinated Ethenes and 1,4-Dioxane. *Environmental Science & Technology Letters* 6(1), 49-54.
- Puentes Jácome, L.A., Wang, P.-H., Molenda, O., Li, Y.X., Islam, M.A. and Edwards, E.A. 2019. Sustained Dechlorination of Vinyl Chloride to Ethene in Dehalococcoides-Enriched Cultures Grown without Addition of Exogenous Vitamins and at Low pH. *Environmental Science & Technology* 53(19), 11364-11374.
- Saiyari, D.M., Chuang, H.-P., Senoro, D.B., Lin, T.-F., Whang, L.-M., Chiu, Y.-T. and Chen, Y.-H. 2018. A review in the current developments of genus *Dehalococcoides*, its consortia and kinetics for bioremediation options of contaminated groundwater. *Sustainable Environment Research* 28(4), 149-157.
- Schaefer, C.E., Lippincott, D.R. and Steffan, R.J. 2010. Field-Scale Evaluation of Bioaugmentation Dosage for Treating Chlorinated Ethenes. *Groundwater Monitoring & Remediation* 30(3), 113-124.
- Scheutz, C., Durant, N.D., Dennis, P., Hansen, M.H., Jørgensen, T., Jakobsen, R., Cox, E.E. and Bjerg, P.L. 2008. Concurrent ethene generation and growth of *Dehalococcoides* containing vinyl chloride reductive dehalogenase genes during an enhanced reductive dechlorination field demonstration. *Environmental science & technology* 42(24), 9302-9309.
- Scott, C.S. and Chiu, W.A. 2006. Trichloroethylene cancer epidemiology: a consideration of select issues. *Environmental health perspectives* 114(9), 1471-1478.
- Sharma, P., Pandey, A.K., Kim, S.-H., Singh, S.P., Chaturvedi, P. and Varjani, S. 2021. Critical review on microbial community during in-situ bioremediation of heavy metals from industrial wastewater. *Environmental Technology & Innovation* 24, 101826.
- Siegrist, R.L., Crimi, M. and Brown, R.A. (2011) *In situ chemical oxidation for groundwater remediation*, pp. 1-32, Springer.
- Simon, F.-G., Meggyes, T. and Tünnermeier, T. (2002) *Advanced groundwater remediation: active and passive technologies*, pp. 3-29, Thomas Telford Publishing London.
- Tabrez, S. and Ahmad, M. 2009. Toxicity, biomarkers, genotoxicity, and carcinogenicity of trichloroethylene and its metabolites: a review. *Journal of Environmental Science and Health Part C* 27(3), 178-196.
- Tang, S., Chan, W.W., Fletcher, K.E., Seifert, J., Liang, X., Löffler, F.E., Edwards, E.A. and Adrian, L. 2013. Functional characterization of reductive dehalogenases by using blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology* 79(3), 974-981.
- Tripathi, S., Sharma, P., Singh, K., Purchase, D. and Chandra, R. 2021. Translocation of heavy metals in medicinally important herbal plants growing on complex organometallic sludge of sugarcane molasses-based distillery waste. *Environmental Technology & Innovation* 22, 101434.
- Wang, F.Y.-Y. (2000) *Evaluation of Enhanced Bioremediation for Reductive Dechlorination of Tetrachloroethene (PCE): Microcosm Study*, Virginia Tech.
- Wu, N., Zhang, W., Wei, W., Yang, S., Wang, H., Sun, Z., Song, Y., Li, P. and Yang, Y. 2020. Field study of chlorinated aliphatic hydrocarbon degradation in contaminated groundwater via micron zero-valent iron coupled with biostimulation. *Chemical Engineering Journal* 384, 123349.

- Yang, Y., Higgins, S.A., Yan, J., Şimşir, B., Chourey, K., Iyer, R., Hettich, R.L., Baldwin, B., Ogles, D.M. and Löffler, F.E. 2017. Grape pomace compost harbors organohalide-respiring *Dehalogenimonas* species with novel reductive dehalogenase genes. *The ISME journal* 11(12), 2767-2780.
- Yan, J., Wang, J., Villalobos Solis, M.I., Jin, H., Chourey, K., Li, X., Yang, Y., Yin, Y., Hettich, R.L. and Löffler, F.E. 2021. Respiratory vinyl chloride reductive dechlorination to ethene in TceA-expressing *Dehalococcoides mccartyi*. *Environmental Science & Technology* 55(8), 4831-4841.
- Yi, S., Seth, E.C., Men, Y.-J., Stabler, S.P., Allen, R.H., Alvarez-Cohen, L. and Taga, M.E. 2012. Versatility in corrinoid salvaging and remodeling pathways supports corrinoid-dependent metabolism in *Dehalococcoides mccartyi*. *Applied and environmental microbiology* 78(21), 7745-7752.
- Yohda, M., Ikegami, K., Aita, Y., Kitajima, M., Takechi, A., Iwamoto, M., Fukuda, T., Tamura, N., Shibasaki, J., Koike, S., Komatsu, D., Miyagi, S., Nishimura, M., Uchino, Y., Shiroma, A., Shimoji, M., Tamotsu, H., Ashimine, N., Shinzato, M., Ohki, S., Nakano, K., Teruya, K., Satou, K., Hirano, T. and Yagi, O. 2017. Isolation and genomic characterization of a *Dehalococcoides* strain suggests genomic rearrangement during culture. *Sci Rep* 7(1), 2230.
- Yohda, M., Yagi, O., Takechi, A., Kitajima, M., Matsuda, H., Miyamura, N., Aizawa, T., Nakajima, M., Sunairi, M., Daiba, A., Miyajima, T., Teruya, M., Teruya, K., Shiroma, A., Shimoji, M., Tamotsu, H., Juan, A., Nakano, K., Aoyama, M., Terabayashi, Y., Satou, K. and Hirano, T. 2015. Genome sequence determination and metagenomic characterization of a *Dehalococcoides* mixed culture grown on cis-1,2-dichloroethene. *J Biosci Bioeng* 120(1), 69-77.
- Yu, R., Andrachek, R.G., Lehmicke, L.G. and Freedman, D.L. 2018. Remediation of chlorinated ethenes in fractured sandstone by natural and enhanced biotic and abiotic processes: a crushed rock microcosm study. *Science of the Total Environment* 626, 497-506.
- Zinder, S.H. (2016) Organohalide-respiring bacteria, pp. 107-136, Springer.
- L. Adrian and F. E. L. · · offler, *Organohalide-Respiring Bacteria*, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, 1st edition, 2016.
- 車明道, 董天行, 王子賓, 張益源, and 羅育文%J 土壤及地下水污染整治. 2018. '含有機物場址長時間整治所遭遇傳輸困難與因應改善之案例研究', 5: 67-81.

### 三. 附件(Appendix)

#### 附件一 教學評量問卷

##### 基本資料

1.這門課我的缺席次數

從不缺課 缺課1-3週 缺課4-6週 缺課7-12週 缺課13週(含)以上

2.我有修習本課程

非常同意 同意 普通 不同意 非常不同意

3.除上課時間外，平均一星期修讀本課程付出的時間

10小時以上 6-9小時 1-3小時 1小時以下

4.我對這門課的學習態度很認真

非常同意 同意 普通 不同意 非常不同意

##### 對本科目之教學意見

5.教師提供完整的課程大綱，且教學內容與課程大綱相符

非常同意 同意 普通 不同意 非常不同意 無法回答

6.教師的課前準備充分，上課內容豐富充實

非常同意 同意 普通 不同意 非常不同意 無法回答

7.我在課程中感受到教師的教學熱忱

非常同意 同意 普通 不同意 非常不同意 無法回答

8.本課程授課內容組織完善，有助學習

非常同意 同意 普通 不同意 非常不同意 無法回答

9.教材設計能顧及學生的學習狀況

非常同意 同意 普通 不同意 非常不同意 無法回答

10.教師具備講授本課程之專業知識

非常同意 同意 普通 不同意 非常不同意 無法回答

11.教師講解表達方式良好，使課程容易瞭解

非常同意 同意 普通 不同意 非常不同意 無法回答

12.教師樂於協助學生解決有關本課程之疑問

非常同意 同意 普通 不同意 非常不同意 無法回答

13.教師(或助教)對試卷、作業或報告的評分公平合理

非常同意 同意 普通 不同意 非常不同意 無法回答

14.本科目教師之整體教學表現值得讚許

非常同意 同意 普通 不同意 非常不同意 無法回答



# Isolate Novel *Dehalococcoides mccartyi* CWV2 from Taiwan and Interpret its Mechanism of Reductive Dechlorination

Che-Wei Lu<sup>1</sup> (呂哲璋), Lu-Yu Ding<sup>1</sup>, Ting-Hsuan Chen<sup>1</sup>, Min-Hsuan Chuang<sup>1</sup>,  
Hsin-Cheng Ho<sup>1</sup>, and Ssu-Ching Chen<sup>1</sup> (陳師慶)

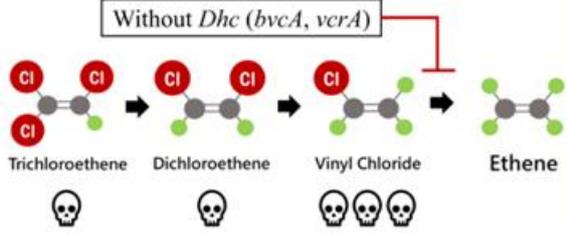
<sup>1</sup>Department of Life Sciences, National Central University, Taoyuan, Taiwan



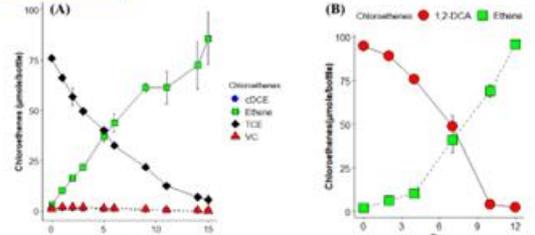
### Introduction

In most contaminated sites, *cis*-dichloroethene (*cis*-DCE) and vinyl chloride (VC) are commonly found to accumulate in groundwater with trichloroethene (TCE) contamination. The main reason is that the site lacks the strain *Dehalococcoides mccartyi* (*Dhc*) that can degrade *cis*-DCE and VC to ethene. Up to now, there is no *Dhc* isolated from Taiwan.<sup>1-3</sup>

Without *Dhc* (*bvcA*, *verA*)



### Result

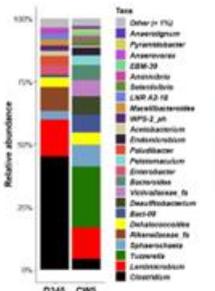


**Figure 3.** *Dehalococcoides mccartyi* CWV2 dechlorination profile for (A) TCE and (B) 1,2-dichloroethane.

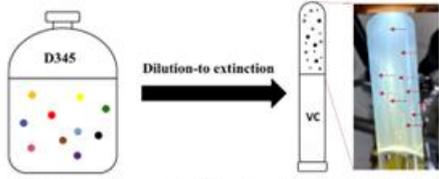
### Objective

In this study we isolate the native *Dhc* strain CWV2 in Taiwan and characterize its reductive dechlorination mechanism for chloroethenes and chloroethanes.

### Result



**Figure 1.** Metagenome analysis for two enrichment culture CW5 and D345.



**Figure 2.** *Dehalococcoides mccartyi* CWV2 colony with agar shake after dilution-to-extinction from enrichment culture D345.

### Conclusion & Discussions

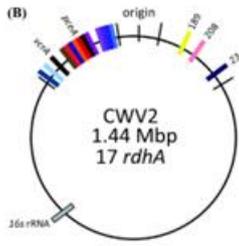
1. Trichloroethene (TCE) enrich dechlorinated consortia, D345, which can degrade TCE into ethene within 25 days. (**Figure 1**)
2. After conducting the dilution-to-extinction method and the agar shake method for the D345 consortia, a single colony of *Dhc* strain CWV2 was successfully obtained. (**Figure 2**)
3. *Dhc* CWV2 can do degradation from TCE and 1,2-dichloroethane to Ethene completely. (**Figure 3**)
4. After whole genome sequencing, we confirmed that this strain contains 17 recognized RDases, including *PceA* and *VcrA*. (**Figure 4**)
5. *Dhc* CWV2 phylogenetically clusters into the Victoria sub-group of *Dhc*. Additionally, CWV2 and UCH007 shares identical 16S rRNA gene sequence but different *rdhA* genes. (**Figure 4**)

### Reference

1. Zhao, S., and He, J. (2019). Reductive dechlorination of high concentrations of chloroethenes by a *Dehalococcoides mccartyi* strain 11G. *FEMS Microbiol Ecol* 95.
2. Lo, K.-H., Lu, C.-W., Lin, W.-H., Chien, C.-C., Chen, S.-C., and Kao, C.-M. (2020). Enhanced reductive dechlorination of trichloroethene with immobilized *Clostridium butyricum* in silica gel. *Chemosphere* 238, 124596.
3. Lin, W.H., Chien, C.C., Lu, C.W., Hou, D., Sheu, Y.T., Chen, S.C., and Kao, C.M. (2021). Growth inhibition of methanogens for the enhancement of TCE dechlorination. *Science of The Total Environment* 787, 147648.

### Figure 4. (A) Reductive dehalogenase genes (*rdhA*s) list and (B) their locus on *Dehalococcoides mccartyi* CWV2 complete genome.

(A)	Gene	CD	Substr. Range
rdhA1	13	Unknown	
rdhA2	306	Unknown	
rdhA3	109	Unknown	
rdhA4	17	Unknown	
rdhA5	17	Unknown	
rdhA6	17	Unknown	
rdhA7	16	Unknown	
rdhA8	17	Unknown	
rdhA9	14	Unknown	
rdhA10	16	PCE, cis-DCE, VC	
rdhA11	88	Unknown	
rdhA12	17	Unknown	
rdhA13	18	Unknown	
rdhA14	12	Unknown	
rdhA15	9	PCE, cis-DCE, VC, 1,1-DCE, 1,1-DCA	
rdhA17	17	Unknown	
rdhA18	17	Unknown	



### Figure 5. Phylogenetic analysis of *Dehalococcoides mccartyi* CWV2 based on 16S rRNA gene sequences and *rdhA* genes

