

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：PAG1090112

學門專案分類/Division：生技農科

執行期間/Funding Period：109/08/01 ~ 110/07/31

(計畫名稱/Title of the Project)

生物整治及菌相人工智慧分析

(配合課程名稱/Course Name)

生物整治及菌相人工智慧分析

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

繳交報告日期(Report Submission Date)：110/09/17

生物整治及菌相人工智慧分析

一. 報告內文(Content)

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

大數據分析已漸漸成為生命科學學生未來就業市場所需技能，本系在過去曾開設數堂程式語言課程，主要以短時間內教授深澀的語言，學生無法了解此類生物資訊技術應該用於何種場合，但是限於過去本類課程經費缺乏，無法導入現實案例於此課程。為要完備此課程訓練，因此擬申請本計畫補助，又鑒於大數據分析是目前就業市場的趨勢，本計畫擬以此技術併入生物復育為例(因本實驗室專長為生物復育)，訓練學生如何進入生物技術領域，培養具備大數據分析能力之專業素養。

2. 文獻探討(Literature Review)

(一) 生物整治工法

現地 (in-situ)生物復育重點工作為提供適當的環境因子，以提高現地可降解污染物之微生物族群數量，促進現地微生物族群代謝污染物之活性，使其得以有效分解污染物。目前已發展之處理技術大致可分為下列兩項：

1. 生物刺激法 (biostimulation)：添加生物營養基質於污染場址，活化場址可降解污染物的微生物族群。

2. 生物加強法 (bioaugmentation)：直接添加對污染物具有分解能力的特殊菌種於污染場址，或利用基因工程技術，發展具特定污染物分解能力之基因重組微生物。

Ademola 等人於 2006 年針對受到 cis-DCE 及 trans-DCE 污染之土壤及地下水進行自然衰減、生物刺激、生物強化及生物刺激結合生物強化等方式進行試驗。結果顯示結合生物刺激與生物強化，將可得到最佳的整治成效。

(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)。TCE 污染後的地下水整治技術有許多，如氣提法-air

sparging、化學氧化法-chemical oxidation 及生物降解法-biodegradation (Tobiszewski and Namieśnik, 2012)。由於以物理或化學方法處理，通常只是污染相的轉移，並非對污染物完全的破壞，且成本較高，此類污染物不適用物理或化學方式整治。因此具有將污染物減毒或去毒，整治後尚能維持污染場址原有用途，以及經濟效益較佳等優點的生物處理法，在應用上最具發展潛力。

脫鹵球菌(*Dehalococcoides* spp.)主要是藉由還原性脫氯作用將三氯乙烯的氯原子脫除置換上氫原子，以獲得能量提供細胞代謝和生長所需。三氯乙烯因還原性脫氯而形成順-1,2-二氯乙烯 (*cis*-1,2-dichloroethene)、反-1,2-二氯乙烯 (*trans*-1,2-dichloroethene)及 1,1-二氯乙烯 (1,1-dichloroethene)，繼之形成氯乙烯 (vinyl chloride)及乙烯 (ethane)。同時，厭氧脫氯過程中，若脫氯不完全，易產生毒性比三氯乙烯更高的二氯乙烯及氯乙烯等中間產物累積，對生物復育的過程是一個挑戰 (Shukla et al., 2012)。

(三) 產業實務應用

目前，有幾種方法可協助我們評估 TCE 污染場址整治方法如生物刺激 (biostimulation)，生物強化 (bioaugmentation)，或兩者並用 (Maphosa et al., 2010)。大多數生物整治方法依賴於 *Dehalococcoides* 物種的 16S rRNA 的基因作鑑定是否可能有該物種對 TCE 脫氯之可能性 (Hendrickson et al., 2002; Rahm et al., 2006)。然而，這方法仍然無法確立有脫氯功能性基因存在，因 *Dehalococcoides* 物種含有多種脫氯基因，並非所有脫氯基因 (RDases) 參與從 DCE 到乙烯的最後一步完全脫氯所需 (Dugat-Bony et al., 2012)。因此，新的分子生物技術用於檢測 RDase 基因的，才能確立提供更完整的脫氯證據 (Müller et al., 2004; Regeard et al., 2004; Tas et al., 2009; van der Zaan et al., 2010)。

了解有 TCE 生物降解受污染的分佈場址以及微生物相互作用關係，可提供有效的生物復育策略至為重要，目前常用在汙染場址菌相調查如總體基因體 (metagenomics)及定量 PCR (qPCR)。

(四) 即時定量 PCR 應用於測定脫鹵球菌

Dehalococcoides 屬可利用脫氯反應還原環境污染物，能夠從氯苯還原脫氯而獲得能量 (Holscher et al., 2003; Jayachandran et al., 2003)。但是，脫鹵球菌生長緩慢，難以人為培養 (Maymo Gatell et al., 1997)。為解決在檢測環境中含量甚低的菌種技術，

目前已經開發了各種方法，原理主要基於 PCR，證明菌株存在。可從環境樣品直接利用 directed PCR 或 Nested PCR 檢測脫鹵球菌甚至定量，qPCR 技術之結果可顯示 PCR 產物的生成和脫氯程度之間相關關係。利用 qPCR 可定量脫鹵球菌還原脫氯酶基因表現，因為具有相同的 16S rDNA 基因序列的菌株，也有不同的脫氯能力，而脫氯還原酶基因表現測定，可反映出脫鹵球菌脫氯程度大小 (Cupples, 2013)。

利 qPCR 研究 *Dehalococcoides* 屬，可解決其他方法的不足之處如菌數過低、低增長率和所佔族群比率太小。例如，調查 VC 的富集培養細胞的生長，研究人員證明 *Dehalococcoides* 屬的細胞生長即可使用 qPCR 證明，但卻無法以光度計測得其生長 (Heryei et al, 2003)。另一項研究報告，qPCR 提供的數據，更具有可重複性、準確和比細胞計數方法更快地獲得結果 (Duhamel et al., 2004)。然而，最近一個利用生物資訊輔助細胞直接計數的研究，確認 qPCR 可證明脫鹵球菌 CBDB1 培養的正確性 (Adrian et al., 2007)，確認 qPCR 絕不遜色與其他的分子生物技術。例如：在有乳酸，甲醇，丙酸和丁酸環境中定量脫鹵球菌屬，結果其它分子生物技術無法定量脫鹵球菌屬但 qPCR 卻能準確定量。比較 T-RFLP、clone library 和 qPCR 測定脫鹵球菌屬結果。T-RFLP 和 clone library，只有在含甲醇培養基測得。相反，qPCR 可在培養有乳酸，甲醇，丙酸和丁酸環境中檢測出脫鹵球菌屬 (Freeborn et al., 2005)。同樣，在三個分子技術 (T-RFLP、clone library 和 qPCR) 在兩個受污染場地調查微生物群落的比較，研究人員發現，qPCR 對脫鹵球菌提供最有效和最直接的預測 (Rahm et al., 2006)。因此，qPCR 是重要研究脫鹵球菌屬的動態方法之一，為目前主流監測脫氯菌群之方法，但 qPCR 在一定時間只能測定少數定基因，無法測定多數基因，耗時且成本高，勢必有其他技術可以取代此法。

(五) 總體基因體 (Metagenome)

Metagenomics 是近年來才發展出來的興新學門，主要是透過研究分析環境基因體，進而描繪環境生物的代謝特性。一個完整的環境系統，是由許多種生物所組成，除了看的見的生物之外，當然也包括看不見的微生物族群，這些族群的數量遠比動植物多 (Kimura, 2006)，然而，如要描繪一個真實的環境生化代謝圖譜，最有效的方式就是直接萃取環境中的總 DNA 或 RNA 加以分析，藉由基因體的資訊，對環境做全面性的了解。目前，有許多研究大量使用 Metagenomics 分析整治場址前後菌相變化，藉以評估整治策略效率。

實施有效的生物修復策略依賴於微生物與生俱來的群落的動態、結構和功能 (Shah et al., 2013)。根據生物和非生物因素，微生物適應環境和相應的環境條件具有特定的關聯。微生物群落組成在生態系統中分解、代謝人為/外源性化合物，發揮著關鍵作用 (Shah et al., 2011)。因此了解微生物群落生態系統內的生物化學轉換，有助於預測未來的環境變遷所造成危機。微生物群落分析可提供生態系統的損害程度評估。許多工業性污染的地區可發現微生物群落組成改變 (Desai et al., 2009)。在含污染物污染的環境中，環境中可分解污染物的細菌可能因此廣泛地分佈在這些環境，進一步進行分解代謝。任何單一微生物是無法完成所有的代謝反應進而降解環境污染物。然而，不同的細菌群落，可共同交互執行所有的代謝反應，完成生物修復 (Shah et al., 2011)。因此，快速、深入分析菌相變動及可能的生物降解代謝途徑為現地生物復育的關鍵步驟。

3. 研究問題(Research Question)

(1) 脫氯酶基因影響環境整治

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。經由測定脫氯酶基因變化量，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。

(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選擇使用生物刺激或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氯球菌(*Dehalococcoides* sp.)為生物整治，脫氯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，倘若甲烷菌生長過多則會大大影響到整治效果，因此透過大數據分析可以讓我們掌握現地菌群狀況。

4. 研究方法(Research Methodology)

本課程搭配生命科學系每周三節之“生物整治及菌相人工智慧分析”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(生物整治調查)：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(菌相調查及人工智慧分析)：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。此部分亦將結合 R 語言學習平台 DataCamp 進行學習，學生的練習結果將由學習平台紀錄並統計於後台，作為掌握學習進度的回饋。

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-分子生物及菌相大數據分析
生物整治工法	課程介紹 微生物應用：清理場址及策略 演講課程：生物整治及復育-污染場址整治策略	生物整治工法參觀 邀請環境公司業師指導
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	總體基因學 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
大數據： 資料視覺化與人工智慧分析	R 程式語言概論 資料視覺化 人工智慧分析 業界之大數據報告撰寫技巧	R 與 Tidyverse 應用 ggplot2 基本概念與應用 PCA、Cluster 分析 大數據報告撰寫練習

(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，透過實作課程熟練定量 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. 脫氯酶基因影響環境整治

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)。脫氯球菌(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，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，培養學生進入生物技術領域

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。



圖表 1 生物整治及菌相人工智慧分析業師演講剪影。(左)產業生物科技應用實例分享；(右)產業講師提供生物復育之業界資訊。

B. 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. 整治藥劑投放



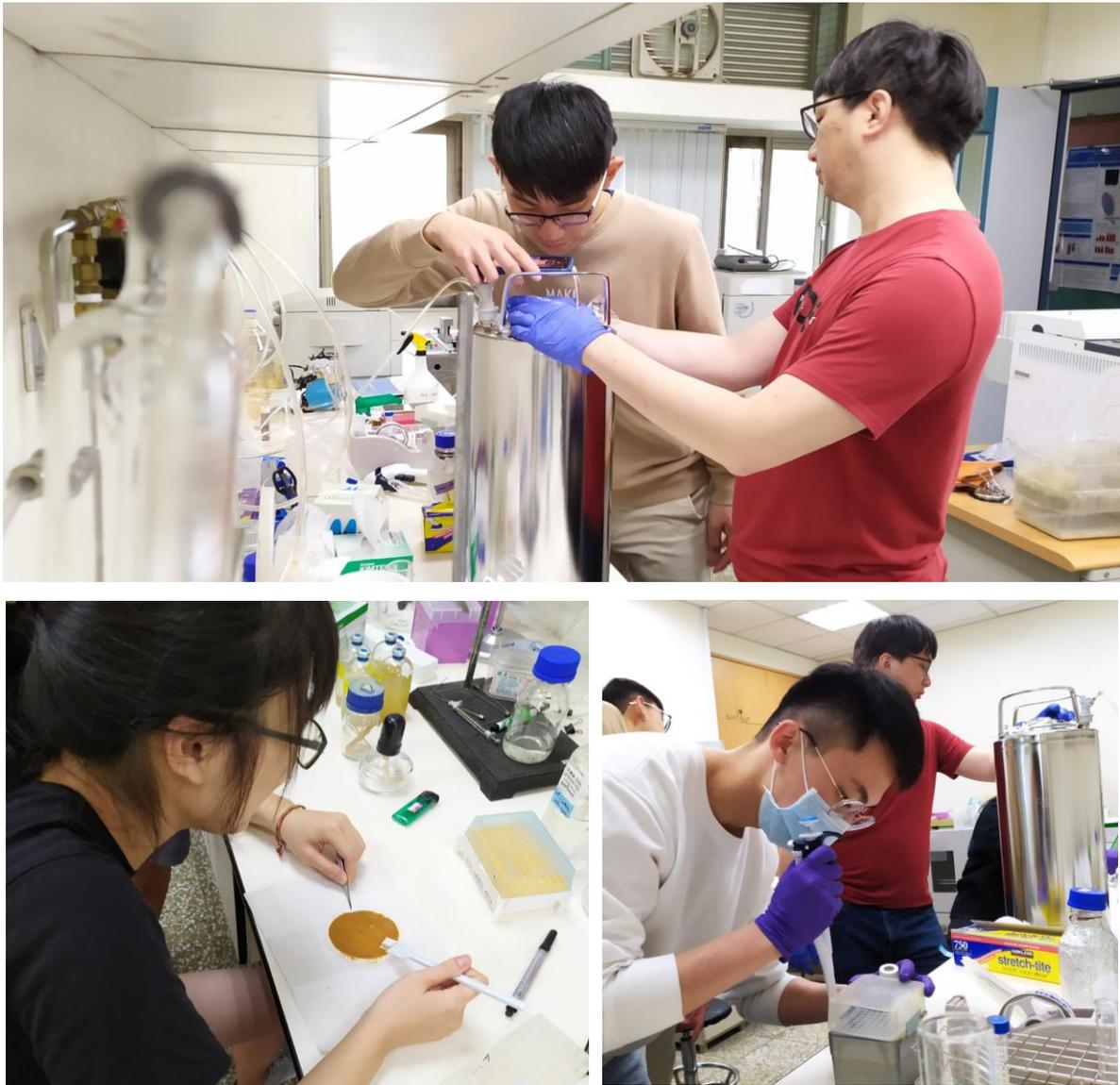
圖表 2 污染整治參訪剪影。(左上圖)藥劑施放作業系統；(左下圖)厭氧藥劑配置；(右上圖)污水採樣；(右下圖)生物整治法之脫氣膠體施放。

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. gDNA 萃取
3. 即時定量 PCR 檢測基因含量



圖表 3 生物技術實作剪影。(上圖)生物整治之脫氮菌發酵培養；(左下圖)過濾污水樣本以抽取 DNA 進行菌相分析；(右下圖)添加必須營養物供脫氮菌生長發酵。

D. 菌相大數據分析：透過 DataCamp 平台，確實掌握每個學生學習狀態

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。



圖表 4 大數據上機課程剪影。(上圖)總體基因學理論課；(左下圖)大數據分析上機課程針對學生問題進行講解；(右下圖)結合線上教學平台 DataCamp 實際操作練習。

該線上平台之教學特點如下：(1)影片教學，關於程式碼的運用以及數據分析邏輯的完整教程；(2)循序漸進的編程練習，並且具有提示功能，大幅降低學生自學難度；(3)透過後台經驗值的紀錄，能夠確切掌握每個學生的學習狀態。

上機課程期間，助教會針對較難的運算模型進行解說，同時學生也能針對作業中難以理解的部分進行發問。另外，本課程創建 R 語言學習工坊提供學生互相討論學習的空間，可以相互鼓勵學習。

The left panel shows a video lesson titled "The left_join verb" with a "Recall: inner join" section. The code snippet is:


```
inventory_parts_joined = inventories %>%
  inner_join(inventory_parts, by = c("set" = "inventory_id")) %>%
  select(id, name, color) %>%
  arrange(desc(quantity))
```

 The right panel shows a "Leaderboard" for the course "生物資訊及機器人工...". The table below lists the top performers:

NAME #	EMAIL #	COURSES COMPLETED #	CHAPTERS COMPLETED #	XP EARNED #
1	Hofan Lai	15	65	60558
2	柏冠軒	13	56	58441
3	Briano Jonathanway	15	64	59926
4	梁軒廷	15	65	58464
5	黃晉興	11	52	52700
6	李景林	13	53	47111
7	解梓宇	10	42	38569
8	蔡廷杰	7	31	33274

The left panel shows an exercise titled "What's the most common color?". The instructions are:

- Inner join the `colors` table using the `color_id` column from the previous join and the `id` column from `colors`; use the suffixes `"_set"` and `"_color"`.

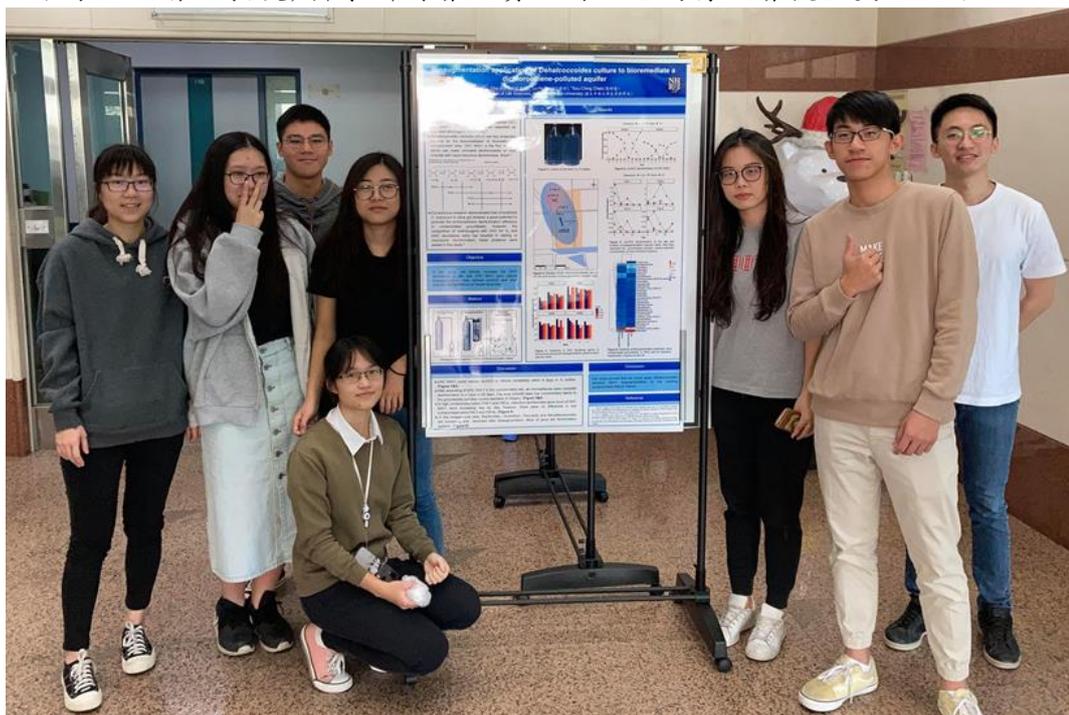
 The right panel shows the R code solution:


```
1 # Add an inner join for the colors table
2 sets %>%
3   inner_join(inventories, by = "set_num") %>%
4   inner_join(inventory_parts, by = c("id" = "inventory_id")) %>%
5   inner_join(colors, by = c("color_id" = "id"), suffix = c("_set", "_color"))
6
```

圖表 5 結合線上課程平台 DataCamp 輔助教學。(左上圖)影片課程引導 R 語言使用；(右上圖)後台可追蹤學生學習進度；(下圖)學習介面簡單易懂協助學生上手。

D. 研討會成果發表

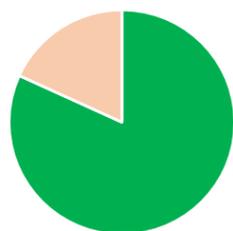
最後，選出研究成果有非常好表現之組別，參與每年度桃園地區四校學生(中央，中原，元智，長庚)科學研討會競賽，前三名均有大會提供獎金鼓勵。



圖表 6 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。

(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
1091	LS5063	生物整治及菌相 人工智慧分析	碩博同修	選修	11	4.91	0.29

綜合評分最高分 5 分該課程拿了 4.91 高分，另外分別有學生回饋：「學了很多，真的很棒」、「上課內容非常清楚讓學生易懂跟上手 老師非常認真」，顯示學生對這門課程的認同。

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，但本課程以翻轉式的教學方式，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，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為 4.91 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)

- 廖文彬，污染物在地下水之傳輸現象。地工技術雜誌，第 28-37 頁，1991。
- 賴彥融，董瑞安，李俊錡，金屬離子與腐質植對零價鐵去除四氯乙烯之影響，第二屆土壤與地下水技術研討會，2004。
- 經濟部工業局，「工廠土壤及地下水污染整治技術手冊－石化業」，第 4-75 頁，2003。
- 美國環保署 Hazardous Waste Clean-up Information 網站，網址為 <http://clu-in.org/>
- Acinas, S.G., Klepac-Ceraj, V., Hunt, D.E., Pharino, C., Ceraj, I., Distel, D.L., Polz, M.F., 2004. Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. *Nature* 430, 551-554.
- Adrian, L., Rahnenfuhrer, J., Gobom, J., Holscher, T., 2007. Identification of a chlorobenzene reductive dehalogenase in *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1. *Appl Environ Microbiol* 73, 7717-7724.
- Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59, 143-169.
- Bedient, P.B., Rifai, H.S., and Newell, C.J. *Ground Water Contamination-Transport and Remediation*, Prentice-Hall, Inc., New Jersey, 1994.
- Chen Z-S. (1991) Cadmium and lead contamination of soils near plastic stabilizing materials producing plants in northern Taiwan. *Water Air Soil Pollut.* 57-58: 745-754.
- Chen, K.F., Kao, C.M., Wang, J.Y., Chen, T.Y., Chien, C.C., 2005. Natural attenuation of MTBE at two petroleum-hydrocarbon spill sites. *J Hazard Mater* 125, 10-16.
- Dedysh, S.N., Knief, C., Dunfield, P.F., 2005. *Methylocella* species are facultatively methanotrophic. *J Bacteriol* 187, 4665-4670.
- Dugat-Bony, E., Biderre-Petit, C., Jaziri, F., David, M.M., Denonfoux, J., Lyon, D.Y., Richard, J.Y., Curvers, C., Boucher, D., Vogel, T.M., Peyretailade, E., Peyret, P., 2012. In situ TCE degradation mediated by complex dehalorespiring communities during biostimulation processes. *Microb Biotechnol* 5, 642-653.
- Duhamel, M., Mo, K., Edwards, E.A., 2004. Characterization of a highly enriched *dehalococcoides*-containing culture that grows on vinyl chloride and trichloroethene. *Appl Environ Microbiol* 70, 5538- 5545.
- Freeborn, R.A., West, K.A., Bhupathiraju, V.K., Chauhan, S., Rahm, B.G., Richardson, R.E., Alvarez-Cohen, L., 2005. Phylogenetic analysis of TCE-dechlorinating consortia enriched on a variety of electron donors. *Environ Sci Technol* 39, 8358-8368.
- Fountain, J.C. *Technologies for dense nonaqueous phase liquid source zone remediation. Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center (GWRTAC), TE-98-02, 1998.*
- Fullerton, H., Rogers, R., Freedman, D. L., and Zinder, S. H. (2014). Isolation of an aerobic vinyl chloride oxidizer from anaerobic groundwater. *Biodegradation* 25(6), 893-901.
- Futamata, H., Kaiya, S., Sugawara, M., and Hiraishi, A. (2009). Phylogenetic and Transcriptional Analyses of a Tetrachloroethene-Dechlorinating "Dehalococcoides" Enrichment Culture TUT2264 and Its Reductive-Dehalogenase Genes. *Microbes Environ.* 24(4), 330-337.
- Hakemian, A.S., Rosenzweig, A.C., 2007. The biochemistry of methane oxidation. *Annu Rev Biochem* 76, 223-241.
- Hatt, J.K., Ritalahti, K.M., Ogles, D.M., Lebron, C.A., Löffler, F.E., 2013. Design and application of an internal amplification control to improve *Dehalococcoides mccartyi* 16S rRNA gene enumeration by qPCR. *Environ Sci Technol* 47, 11131-11138.
- He, Z., Gentry, T.J., Schadt, C.W., Wu, L., Liebich, J., Chong, S.C., Huang, Z., Wu, W., Gu, B., Jardine, P., Criddle, C., Zhou, J., 2007. GeoChip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes. *Isme j* 1, 67-77.

- He, J., Sung, Y., Krajmalnik-Brown, R., Ritalahti, K. M., and Löffler, F. E. (2005). Isolation and characterization of *Dehalococcoides* sp. strain FL2, a trichloroethene (TCE)- and 1,2-dichloroethene-respiring anaerobe. *Environ. Microbiol.* 7(9), 1442-1450.
- Hendrickson, E.R., Payne, J.A., Young, R.M., Starr, M.G., Perry, M.P., Fahnestock, S., et al., (2002) Molecular analysis of *Dehalococcoides* 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout North America and Europe. *Appl Environ Microbiol* 68:485-495.
- Holscher, T., Gorisch, H., Adrian, L., 2003. Reductive dehalogenation of chlorobenzene congeners in cell extracts of *Dehalococcoides* sp. strain CBDB1. *Appl Environ Microbiol* 69, 2999-3001.
- Holmes, V. F., He, J., Lee, P. K., & Alvarez-Cohen, L. (2006). Discrimination of multiple *Dehalococcoides* strains in a trichloroethene enrichment by quantification of their reductive dehalogenase genes. *Applied and environmental microbiology*, 72(9), 5877–5883.
- Hsu, M.J., Selvaraj, K., Agoramoorthy, G., 2006. Taiwan's industrial heavy metal pollution threatens terrestrial biota. *Environ Pollut* 143, 327-334.
- Huang, C.-J., Chen, K.-S., Lai, Y.-C., Wang, L.-C., Chang-Chien, G.-P. (2011) Characterization of atmospheric dry deposition of polychlorinated dibenzo-p-dioxins/dibenzofuran in a rural area of Taiwan. *Aerosol Air Qual Res.* 11(4): 448-459.
- Hug, L.A., Edwards, E.A., 2013. Diversity of reductive dehalogenase genes from environmental samples and enrichment cultures identified with degenerate primer PCR screens. *Front Microbiol* 4, 341.
- Imhoff, P.T., Gleyzer, S.N., McBride, J.F., Vancho, L.A., Okuda, I., Miller, C.T., 1995. Cosolvent-enhanced remediation of residual dense nonaqueous phase liquids: experimental investigation. *Environ Sci Technol* 29, 1966-1976.
- Jeng M-S., Jeng W-L., Hung T-C., Yeh C-Y., Tseng R-J., Meng P-J., Han B-C. (2000) Mussel Watch: A review of Cu and other metals in various marine organisms in Taiwan, 1991-98. *Environl Pollut.* 110(2): 207-215.
- Kao, C-M., Chen, CS., Tsa, F-Y., Yang, K-H., Chien, C-C., Liang, S-H., Yang, C-A., Chen, SC. (2010a) Application of real-time PCR, DGGE fingerprinting, and culture-based method to evaluate the effectiveness of intrinsic bioremediation on the control of petroleum-hydrocarbon plume. *J Hazard Mater.* 178(1-3): 409-416.
- 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.
- Lee, I. S., Bae, J. H., & McCarty, P. L. (2007). Comparison between acetate and hydrogen as electron donors and implications for the reductive dehalogenation of PCE and TCE. *Journal of Contaminant Hydrology*, 94, 76-85.
- Liang, C., Bruell, C.J., Marley, M.C., Sperry, K.L., 2004. Persulfate oxidation for in situ remediation of TCE. I. Activated by ferrous ion with and without a persulfate-thiosulfate redox couple. *Chemosphere* 55, 1213-1223.
- Löffler, F. E., Yan, J., Ritalahti, K. M., Adrian, L., Edwards, E. A., Konstantinidis, K. T., Muller, 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. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63(Pt 2), 625-635.
- McMurdie, P.J., Behrens, S.F., Muller, J.A., Goke, J., Ritalahti, K.M., Wagner, R., Goltsman, E., Lapidus, A., Holmes, S., Löffler, F.E., Spormann, A.M., 2009. Localized plasticity in the streamlined genomes of vinyl chloride respiring *Dehalococcoides*. *PLoS Genet* 5, e1000714.
- Nocker, A., Sossa, K.E., Camper, A.K., 2007. Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *J Microbiol Methods* 70, 252-260.
- Olaniran, A.O., Pillay, D., Pillay, B., 2006. Biostimulation and bioaugmentation enhances aerobic biodegradation of dichloroethenes. *Chemosphere* 63, 600-608.
- Perez-de-Mora, A., Lacourt, A., McMaster, M.L., Liang, X., Dworatzek, S.M., Edwards, E.A., 2018. Chlorinated electron acceptor abundance drives selection of *Dehalococcoides mccartyi* (D. mccartyi) strains in dechlorinating enrichment cultures and groundwater environments. *Front Microbiol* 9, 812.
- Rahm, B.G., Chauhan, S., Holmes, V.F., Macbeth, T.W., Sorenson, K.S., Jr., Alvarez-Cohen, L., (2006a) Molecular characterization of microbial populations at two sites with differing reductive dechlorination abilities. *Biodegradation* 17, 523-534.
- Rahm, B.G., Morris, R.M., Richardson, R.E., (2006b) Temporal expression of respiratory genes in an enrichment culture containing *Dehalococcoides ethenogenes*. *Appl Environ Microbiol* 72, 5486-5491.
- Rittmann, B.E. (2000) Natural attenuation for groundwater remediation, A report of the National research Council 5-8.
- Roh, S.W., Abell, G.C., Kim, K.H., Nam, Y.D., Bae, J.W., (2010) Comparing microarrays and next-generation sequencing technologies for microbial ecology research. *Trends Biotechnol* 28, 291-299.
- Robinson, C., Barry, D. A., McCarty, P. L., Gerhard, J. I., and Kouznetsova, I. (2009). pH control for enhanced reductive bioremediation of chlorinated solvent source zones. *Sci. Total Environ.* 407(16), 4560-4573. Shukla, A. K., Upadhyay, S. N., and Dubey, S. K. (2014). Current trends in trichloroethylene biodegradation: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 34(2), 101-114.
- Scott, M. J., Metting, F. B., Fruchter, J. S. and Wildung, R. E. "In situ Redox Manipulation for Immobilization of Inorganic Contaminations: Subsurface Barrier Technology Results in Significant Cost Savings, Demonstrating the Value of Basic Science Investments." PNNL-SA-30297, UC-402,1998.
- Shah, V., Zakrzewski, M., Wibberg, D., Eikmeyer, F., Schluter, A., Madamwar, D., 2013. Taxonomic profiling and metagenome analysis of a microbial community from a habitat contaminated with industrial discharges. *Microb Ecol* 66, 533-550.
- Shah V, Jain K, Desai C, Madamwar D 2011. Metagenomics and integrative '-omics' technologies in microbial bioremediation: current trends and potential applications. In: Marco D (ed) *Metagenomics: current innovations and future trends*. Caister Academic Press, Norfolk, pp 211–240
- Sharma, P.K., McCarty, P.L., 1996. Isolation and Characterization of a Facultatively Aerobic Bacterium That Reductively Dehalogenates Tetrachloroethene to cis-1,2-Dichloroethene. *Appl Environ Microbiol* 62, 761-765.
- Shukla, A.K., Upadhyay, S.N., Dubey, S.K., 2014. Current trends in trichloroethylene biodegradation:

- a review. *Crit Rev Biotechnol* 34, 101-114.
- Singh, J., Comfort, S.D., Shea, P.J. (1998) Long-term RDX sorption and fate in soil. *Journal of Environmental Quality* 27, 572-577.
- Smidt, H., de Vos, W.M., 2004. Anaerobic microbial dehalogenation. *Annu Rev Microbiol* 58, 43-73.
- Tas, N., van Eekert, M. H. A., de Vos, W. M., Smidt, H. (2010) The little bacteria that can--diversity, genomics and ecophysiology of 'Dehalococcoides' spp. in contaminated environment. *Microb. Biotechnol.* 3:389-402.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(3), 974-981.
- Tiehm, A., Schmidt, K. R. (2011) Sequential anaerobic/aerobic biodegradation of chloroethenes--aspects of field application. *Curr Opin Biotechnol* 22:415-421.
- Tsai, T.T., Liu, J.K., Chang, Y.M., Chen, K.F., Kao, C.M. (2014) Application of polycolloid-releasing substrate to remediate trichloroethylene-contaminated groundwater: a pilot-scale study. *J Hazard Mater* 68:92-101.
- US Environmental Protection Agency. (2001) National Air Toxics Program: The integrated urban strategy: Report to Congress
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). (1997) Use of monitored natural attenuation at superfund, RCRA corrective action and underground storage tank sites. In: Directive No.9200.4-17 P of office of Solid Waste and Emergency Response, Washington DC, USA: USEPA
- Van der Zaan, B., Hannes, F., Hoekstra, N., Rijnaarts, H., de Vos, W.M., Smidt, H., Gerritse, J., 2010. Correlation of Dehalococcoides 16S rRNA and chloroethene-reductive dehalogenase genes with geochemical conditions in chloroethene-contaminated groundwater. *Appl Environ Microbiol* 76, 843-850.
- Wang, M.-S., Chen, S.-J., Huang, K.-L., Lai, Y.-C., Chang-Chien, G.-P., Tsai, J.-H. (2010) Characterization of persistent organic pollutants emitted from a municipal solid waste incinerator in Taiwan. *Environ Eng Sci.* 27 (11): 955-965.
- Wilson, J. T., and Wilson, B. H. (1985). Biotransformation of trichloroethylene in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 49(1), 242-243.
- Wittlingerova, Z., Machackova, J., Petruzalkova, A., Trapp, S., Vlk, K., and Zima, J. (2013). One-year measurements of chloroethenes in tree cores and groundwater at the SAP Mimon Site, Northern Bohemia. *Environmental science and pollution research international* 20(2), 834-847.
- Yang, Y., Capiro, N.L., Yan, J., Marcet, T.F., Pennell, K.D., Löffler, F.E., 2017. Resilience and recovery of Dehalococcoides mccartyi following low pH exposure. *FEMS Microbiol Ecol* 93.
- Zehr, J.P., Jenkins, B.D., Short, S.M., Steward, G.F., 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ Microbiol* 5, 539-554.

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 3-5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

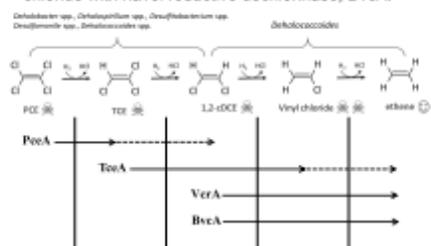
非常同意 同意 普通 不同意 非常不同意 無法回答

Bioaugmentation application of *Dehalococcoides* culture to bioremediate a dichloroethene-polluted aquifer

Che-Wei Lu (呂哲璋), Lu-Yu Ding (丁律好), *Ssu-Ching Chen (陳師慶)
Department of Life Sciences, National Central University (國立中央大學生命科學系)

Introduction

- cis-dichloroethene (cis-DCE) and vinyl chloride (VC) are common groundwater pollutants classified as toxic and carcinogenic to humans.¹
- Dehalococcoides mccartyi* (DHC) are key anaerobic bacteria for the bioremediation of chloroethenes-contaminated sites. DHC BAV1 is the first bacteria which can make complete dechlorination of vinyl chloride with novel reductive dechlorinase, BvcA.²

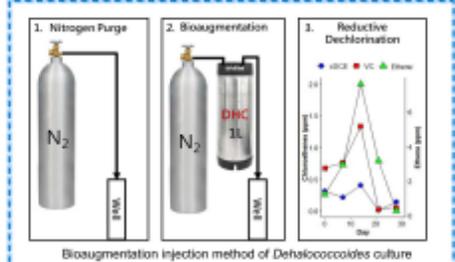


Our previous research demonstrated that immobilized *C. butyricum* in silica gel showed a great potential to promote the trichloroethene dechlorination efficiency in contaminated groundwater. However, the competition of methanogens with DHC for H₂ and DHC abundance were low resulted in stalling or incomplete dechlorination, these problems were solved in this study.³

Objective

In this study, we directly increase the DHC abundance in situ with DHC BAV1 pure culture bioaugmentation, may remove cis-DCE and vinyl chloride contamination in Taiwan local site.

Method



Results



Figure 1. Culture of DHC BAV1 in 1L bottles.

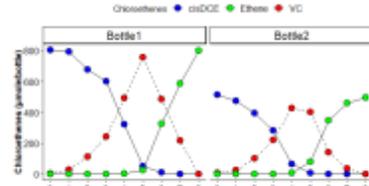


Figure 2. cis-DCE dechlorination of DHC BAV1.

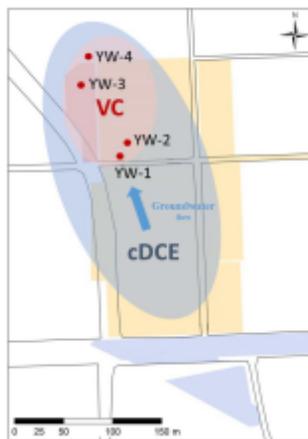


Figure 3. Direction of the natural groundwater flow at the site and location of bioaugmentation injection wells.

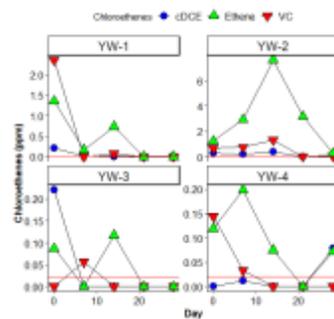


Figure 4. cis-DCE dechlorination at the site and location of bioaugmentation injection wells. Red lines represent the groundwater pollution control standard concentration of vinyl chloride (0.02ppm).

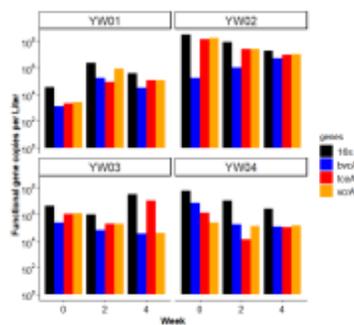


Figure 5. Variations in DHC functional genes in microcosms during the bioaugmentation period at each injection wells.

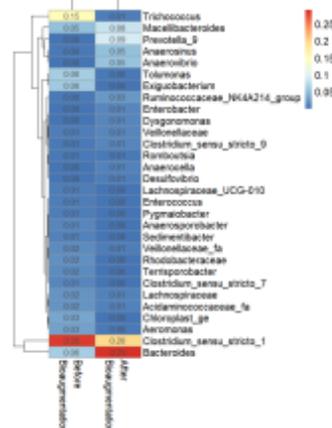


Figure 6. Heatmap of Bioaugmentation treatment (w/o) contaminated groundwater in YW-2 well for bacterial classification of genus at day 28.

Discussion

- DHC BAV1 could reduce cis-DCE to ethene completely within 8 days in 1L bottles. (Figure 1&2)
- After amending of DHC BAV1 in the contaminated site, all chloroethenes were complete dechlorination to ethene in 28 days. The vinyl chloride keep low concentration below to the groundwater pollution control standard (0.02ppm). (Figure 3&4)
- At high contaminated wells (YW-1 and YW-2), reductive dechlorinase gene *bvcA* of DHC BAV1 were increasing day by day; however, there were no difference in low contaminated wells (YW-3 and YW-4). (Figure 5)
- In the metagenome data, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Prevotella* and *Macellibacteroides* are increasing and dominant after bioaugmentation. Most of genera are fermentation bacteria. (Figure 6)

Conclusion

Our study proved that we could apply *Dehalococcoides mccartyi* BAV1 bioaugmentation to the existing contaminated sites in Taiwan.

Reference

- Clark, K., Tigger, D.M., Balaban, B.R., Wataki, K.M., Mukudo, R.M., Katz, J.L., and Löffler, F.E. (2016). Normalized Quantitative PCR Measurements as Predictors for Ethene Formation at Sites Impacted with Chlorinated Ethanes. *Environ. Sci. Technol.* 52, 13410-13420.
- He, J., Wataki, K.M., Yang, K.-L., Kuangsheng, S.S., and Löffler, F.E. (2003). Dechlorination of vinyl chloride to ethene coupled to growth of an anaerobic bacterium. *Nature* 424, 62-65.
- Lu, C.-W., Lu, C.-W., Lin, W.-H., Ding, C.-C., Chen, S.-C., and Chen, C.-H. (2020). Enhanced reductive dechlorination of trichloroethene with immobilized *Dehalobacterium* in silica gel. *Chemosphere* 236, 124199.