

第十六屆旺宏科學獎

成果報告書

參賽編號：SA16-576

作品名稱：油汙環境中微生物群聚感應
與生物降解的探討

姓名：郭正浩

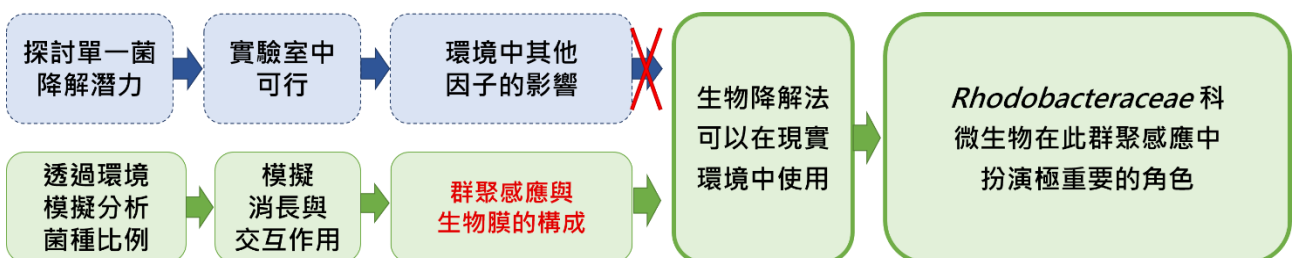
關鍵字：原油汙染、群聚感應、
生物降解

摘要

本研究以油汙環境下微生物群聚感應與生物膜為主軸，探討以生物性方式處理海洋原油問題的可行性。自然環境中，微生物之間有著緊密而複雜的交互作用，支持著整個龐大的生態系統，幫助生物體在突發的逆境環境中適應並成長。海洋原油的過往研究常聚焦在單一微生物的除油潛能，我們的研究透過環境的模擬來觀察即時性的菌相變化，並探討微生物之間的交互作用，透過群聚感應的數值分析，期待找到最有效解決重油汙染的環境微生物復育方法。

本研究中，我們認為 *Rhodobacteraceae* 科的微生物在海水中的群聚感應中扮演極為重要的角色：我們目前發現海水中一株 *Rhodobacteraceae* 科的細菌(研究中代號為 OTU3)，其大量存在並抑制它種菌的特性，可能是導致現實生活中生物性除油法無效的原因；我們也發現在原油環境中，名為 *Thalassobius mediterraneus* (*Rhodobacteraceae* 科)的菌具有促進多數微生物生長的能力，具除油發展的潛能；此外，在加入散油劑之後，另一種名為 *Nautella italica* (*Rhodobacteraceae* 科)的菌則會促進其他細菌生長，可能具有輔助化學除油法的能力。我們已分離出這些菌並培養，希望以探討此群聚感應更完整的面貌，並進行原油降解產物的定量分析，期望能應用在生物除油的發展上。

本研究與過往研究最大的不同是，我們希望在生物降解的領域中提出一套全新的想法：利用群集取代單一族群的概念，找出在現實環境中真實存在且具影響力的物種間交互作用，並利用此群聚感應來促進可降解的微生物生長、發揮作用。



壹、前言

一、研究動機

隨著科技的進步，環境污染的問題日益嚴重，而相對應之處理方式卻往往顧此失彼，無法同時考量環保、效率等不同面向。以原油汙染為例，目前國際間普遍的處理方式以機械打撈和化學藥劑處理為主，卻有著成本過高、耗時、造成二次汙染等潛在問題。故科學家近年來逐漸以環境微生物的層面來看待這些汙染問題，期望可以找到較為環保而高效率的處理方式。

然而直至現今，即使已有不少相關研究發表並找出能夠降解汙染物所含物質的菌株，生物性除油方法只成功應用在實驗室裡，仍然沒有在現實生活中使用生物降解法的案例。因此本研究以原油汙染為例，欲提出一個新的概念：以微生物群集為單位，探討更貼見實際環境的生物降解潛能。

二、研究背景

(一) 生物性除油方法的困難

對於石油中的總碳氫化合物(Total Petroleum Hydrocarbons, TPH)，我們將可分解 TPH 的微生物稱為 hydrocarbon degrading bacteria (Jonathan et al., 2003)。然而，即便已找出能有效分解 TPH 之菌株，利用其來代替油汙處理的方法仍不可行，最大的挑戰便來自於現實環境變數的考量，譬如營養物的缺乏、物種間競爭的壓力等。

(二) 群聚感應(Quorum Sensing) 與生物膜(Biofilm)

在任何開放系統中，只要個體之間可以評估會和其有交互作用的其他個體之數量，且在達到一個門檻值後便會有表現出特定行為的現象，即可稱之為群聚感應。因此，群聚感應是一種與生物數量多寡相關的刺激與反應系統，許多細菌因此能根據局部的個體密度來協調某些基因的表現，增加生存率(S. Atkinson & P. Williams, 2009)。

透過群聚感應，微生物會逐漸聚集，形成生物膜。生物膜是一堆微生物形成的社群，目的在於抵禦外在環境的壓力，例如營養缺乏、極端溫度、或甚至是環境的驟變。形成生物膜的步驟包含附著與建立微生物社群(microcolony)：附著指的是，當環境改變時，部分的浮游狀態(planktonic form)微生物會黏附於無機或有機物表面，作為接下來增殖的基礎(niche)；附著後，微生物個體間的黏著和累積會使生物膜逐漸發展成三維的立體結構，外表則包覆著多醣體，形成一個穩定的固著狀態(sessile form)。微生物在其中藉由群聚感應進行整體的調控，最後因環境改變等特定因素破體而出(dispersal)，再度回到單一自由營生的浮游狀態，如此為一個生物膜的週期(李 et al., 民 99)。

(三) 散油劑

散油劑是由界面活性劑與作為界面活性劑載體的溶劑合成，可高效處理油汙，其組成包含乙二醇單丁醚(2-Butoxy Ethanol)、磺酸酯類(Sulfonate)、丙二醇(Propylene Glycol)、山梨醇酐(Sorbitan)、丁二酸(Butanedioic Acid)、烯類(Alkene) 及芳香烴類(Aromatics)，其中部分成分已被證實具有致癌性。(此處所指的散油劑為 2010 年墨西哥灣原油事件時所傾倒的 Corexit 9500 與 9527。)因此目前亦有許多國家開始著手於生物性散油劑及生物降解法的研究，希望利用微生物，使油汙自行降解，已達到環境保護之效用。

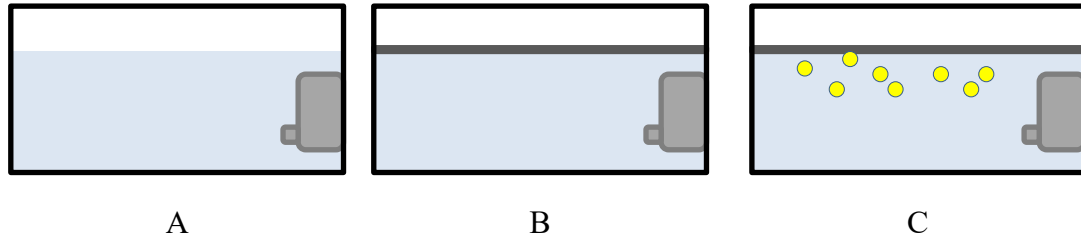
三、研究目的

1. 探討原油汙染發生後的即時性菌相變化。
2. 以群集概念出發，從多方微生物的相互關係來分析其降解油汙之可能性。
3. 探討散油劑對環境微生物之影響，並考慮與除油方法結合之可能性。

貳、研究方法與過程

一、模擬環境探討

(一) 海水環境模擬培養、取樣



圖一、海水環境模擬示意圖

本實驗使用之海水為來自基隆八斗子地區之沿岸海水，於 2016 年 7 月 25 日取樣。

實驗在溫室中進行；各水缸中設有打水幫浦，使海水得以流動、循環；溫室中設有日光燈和計時器，使環境光照為 12 小時/天(H.Bacosa et al., 2015)；溫室內維持 26°C 恆溫。

本實驗中共設有三種模擬環境，每種皆進行三重複，分別標示為 A1、A2、A3、B1、B2、B3、C1、C2、C3。A 組為對照組，模擬條件只含海水；B 組為原油環境模擬，模擬條件加入海運燃油 MF-380；C 組則是為了模擬化學處理而進行，故除海水與 MF-380 外，將於 1 天後加入散油劑以模擬處理狀況(見表一)。

表一、各水缸之內容物

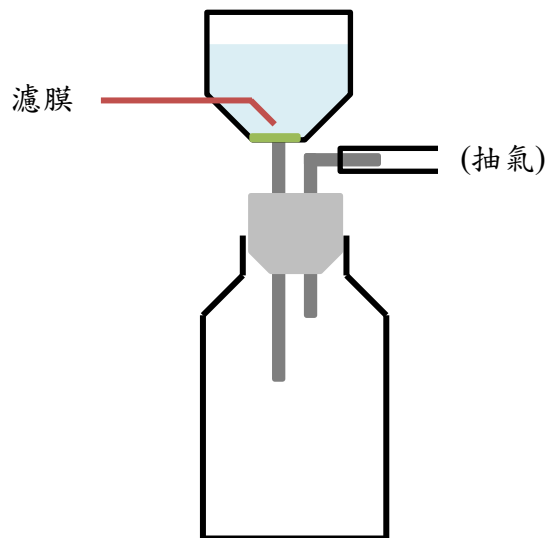
水缸編號	模擬環境組成物
A	海水 5L
B	海水 5L、MF-380 100mL
C	海水 5L、MF-380 100mL、散油劑 10mL

裝置完成後，於下列各時間點取樣：

Day0、Day1/3、Day1(C 組加入散油劑後)、Day2、Day3

取樣時使用拋棄式針筒，將針筒口伸入水面抽取表層海水。海水表面有油汙者，則抽取油汙層以下之表層海水，避免直接抽取油汙。每次取樣，每水缸各抽取 250mL 海水樣品。將同種三重複之海水樣品混合，得每種 750mL；其中 650mL 為微生物組成分析實驗使用，100mL 則保存於-20°C 冷凍庫。

(二) 樣本抽氣過濾



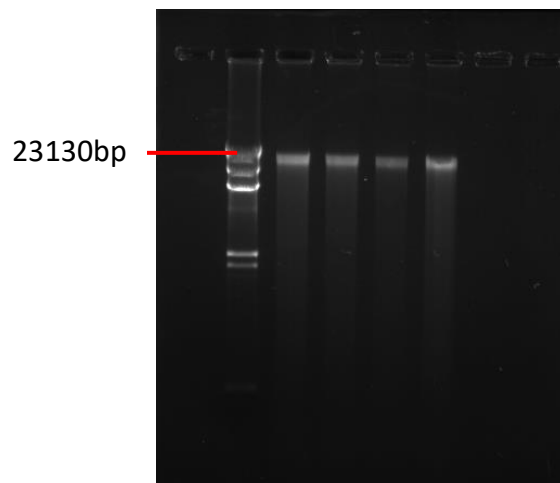
圖二、抽氣過濾裝置示意圖

以 200nm 濾膜進行抽氣過濾，使微生物與海水分離並固定在濾膜上，以便進行萃取。全實驗皆在無菌操作台中進行。

(三) 萃取 DNA

本實驗採取 Phenol-Chloroform 法。先在裝有濾膜之 50mL 離心管中加入 1X TE buffer、SDS solution、RNase A，37°C 水浴 60min 使其作用。加入 Proteinase K，50°C 水浴 30min 使其作用。加入 NaCl、CTAB/NaCl solution，65°C 水浴 10min。將液體分裝至 1.5mL 離心管中，加入 Chloroform/isoamyl alcohol，於 4°C 低溫離心 5min，抽取上清液至新的離心管中。加入 Phenol/chloroform/isoamyl alcohol，4°C 低溫離心 5min，抽取上清液至新的離心管中。加入 Isopropanol，室溫離心 5min，抽出液體。剩餘 pellet 中加入 70% 酒精，室溫離心 5min，抽出液體。將剩餘液體風乾，每個離心管以 20 μ L 1/10X TE buffer 回溶。

得 DNA 回溶樣品後，各取 5 μ L 進行膠體電泳。使用 1% Agarose gel，在 100V 條件下進行電泳 30-40min，以 λ / Hind III DNA Marker 做為比對，確認樣品中確實有微生物 DNA 存在。



圖三、DNA extraction 電泳圖. 由左至右: Marker、樣本

(四) PCR 增幅

聚合酶連鎖反應是一種將 DNA 片段放大的技術。我們將萃取出 DNA 樣品進行 PCR 增幅，以放大定序所需之 16S rDNA 片段。如表二所示配置 PCR mixture。這裡我們使用的 DNA 聚合酶為 TaKaRa Ex Taq™ (HS)，引子為 27F 與 1492R，預期 DNA 片段長度為 1465bp。

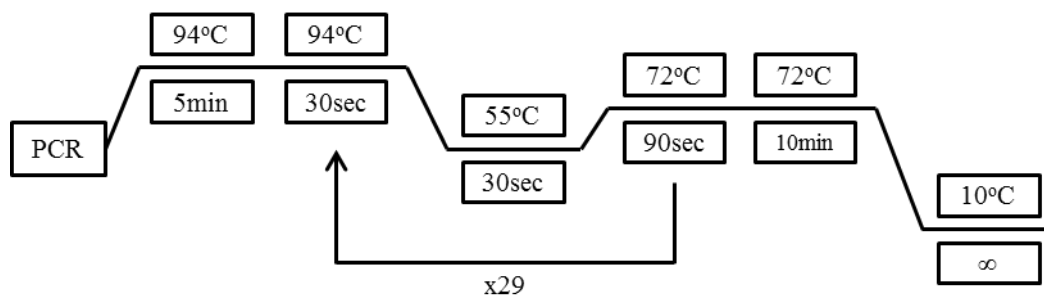
表二、PCR mixture 各藥劑使用量

成分	體積(μL)
Sterilized ddH ₂ O	35.7
Buffer (10X Ex Taq Buffer)	5
dNTP mixture	4
Primer-Forward (27F)	1
Primer-Reverse (1492R)	1
DNA polymerase (TaKaRa Ex Taq™ (HS))	0.3
DNA template	3
總和	50

*27F primer: 5'-AGRGTTYGATYMTGGCTCAG-3'

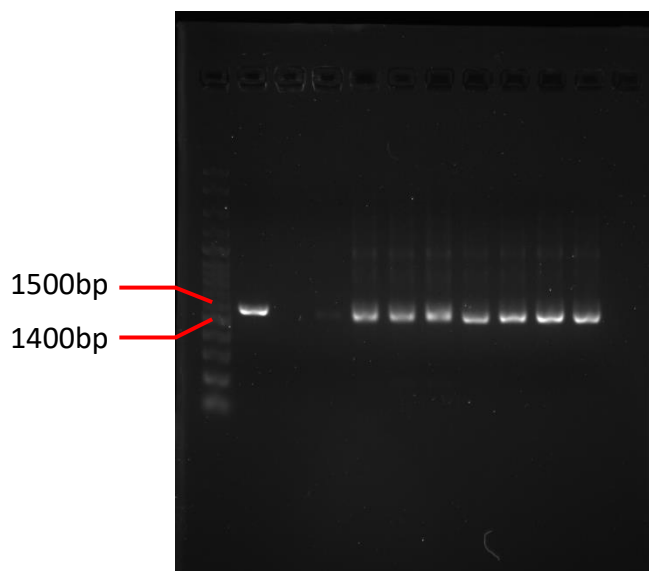
*1492R primer: 5'-RGYTACCTTGTTACGACTT-3'

接著將配好的 PCR mixture 置入 Thermocycler 進行反應。各反應階段溫度與時間設定如圖四所示。我們設定的溫度為 94°C、55°C 與 72°C。94°C 使 DNA 雙股分開(Denaturation)，55°C 使引子接上(Annealing)，72°C 使 dNTP 接上(Elongation)。重複 30 個循環，使 DNA 片段放大 2^{30} 倍。



圖四、PCR cycle

每次進行 PCR 時，多配置一組以 E.coli DNA 取代 DNA template 之 positive control，以及不加入任何 DNA template 之 negative control。PCR 結束後，共得 50 μ L PCR product，取其中 5 μ L 進行膠體電泳。使用 1% Agarose gel，在 100V 條件下進行電泳 30-40min，以 100bp DNA Ladder 做為比對（PCR 後之 DNA 片段預期為 1465bp，對應到 marker，應界於 1400-1500 之間）。並觀察 positive control 與 negative control 是否正常顯示，確定 PCR 成功。



圖五、PCR products 電泳圖。由左至右: Marker、Positive、Negative、樣本

(五) 純化 DNA

將 45 μ L PCR product 進行膠體電泳。使用 1% Agarose gel，在 100V 條件下進行電泳 30-40min，以 100bp DNA Ladder 做為比對。跑膠完後，將膠體移至切膠台上，以滅菌刀片分別切下各組樣品在 1400-1500bp 處含有 band 之膠體，分別裝入 1.5mL 離心管中。

以 Gel extraction Kit 將切下之 DNA 純化。加入 QXI buffer、QIAEX buffer。置入 50°C Incubate 中，直到 gel 完全溶解。常溫高速 10000xg 離心 30sec，移除上清液。加入 QXI buffer，

清洗 pellet。常溫高速 10000xg 離心 30sec，移除上清液。加入 PE buffer，清洗 pellet。常溫高速 10000xg 離心 30sec，移除上清液。重複此步驟一次。將 pellet 風乾，加入 40 μ L ddH₂O，清洗 pellet。靜置 5min。常溫高速 10000xg 離心 30sec，抽取上清液，移入乾淨的 eppendorf tube 中。

(六) DT-PCR

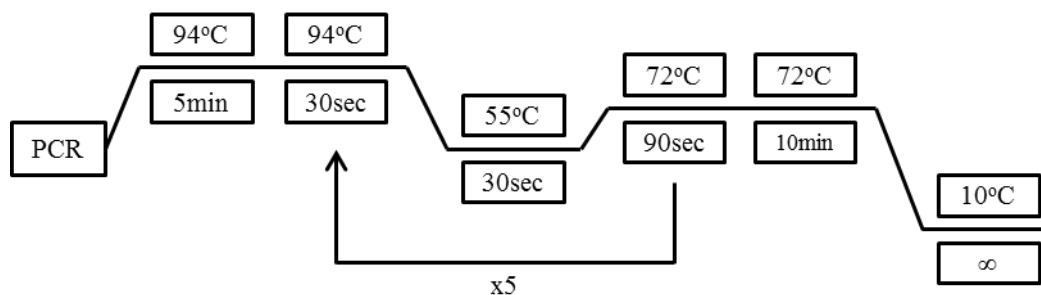
本實驗在每組樣品中接上一組對應的 barcode，作為之後在定序時辨識樣本之用。實驗方法與 PCR 相似，但每組使用之 forward primer 與 reverse primer 之一端分別有一組辨識用之 DNA 序列，稱為 barcode(參見附錄一)。

表三、DT-PCR mixture 各藥劑使用量

成分	體積(μ L)
Sterilized ddH ₂ O	28.7
Buffer (10X Ex Taq Buffer)	5
dNTP mixture	4
Primer mixture(with barcode)	2
DNA polymerase (TaKaRa Ex Taq TM (HS))	0.3
DNA template	10
總和	50

樣品共有 15 組 (A0、B0、C0、A1/3、B1/3、C1/3、A1、B1、C1、A2、B2、C2、A3、B3、C3)，依序對應一組 primer (01、02、03、04、05、06、07、08、09、10、11、12、13、14、15)。所有樣品皆做雙重複，共 30 組。另外再做一組 negative control，作為對照。

經過前一次的 PCR，DNA 已達預期長度 1465bp，本次 PCR 目的僅在於加入 barcode，故設定略作調整，Stage 2 只需做 5-6 次 cycle。



圖六、DT-PCR cycle

取 5 μ L DT-PCR product 進行膠體電泳，確定 PCR 成功。將雙重複的 PCR product（各剩餘 45 μ L）混合，得 90 μ L。進行純化，與第一次純化步驟相同（跑膠、切膠、純化）。最後每組各得約 30 μ L ddH₂O 回溶樣品。

(七) PCR 樣品純化

由於在進行 PCR 及切膠純化時，會有有機鹽類殘餘在樣品中，因此使用 QIAquick kit PCR purification kit 進行最後純化的動作。將 5 倍 PB buffer 加入 1 倍 PCR product 中，逐次注進裝有 QIAquick spin column 的 2mL collection tube，室溫離心 13000rpm 60sec，並加入 750 μ L PE buffer，室溫離心 13000rpm 60sec，移除過濾液，再離心 2min 以移除全數酒精。將 column 放入乾淨 1.5mL 離心管，以 25 μ L ddH₂O 回溶，放置五分鐘後室溫離心 13000rpm 3min。

純化之 PCR product 取 3 μ L 作為 NanoDrop、Qubit、跑膠體電泳之用。

(八) 濃度測定

使用 NanoDrop Spectrophotometer，每個樣本以 2 μ L DNA 測其濃度，若蛋白質量值(260/280) 界於 1.7-1.9 之間，表示其 DNA 純度較高；鹽離子濃度（260/230）數值越靠近 2 表示其鹽離子濃度越低，鹽離子濃度低越佳。

表四、混合純化後的最終樣本. 經 NanoDrop 得到的 DNA 濃度、
蛋白質量值、鹽離子濃度數值

樣本	conc.(ng* μ L ⁻¹)	260/280	260/230
最終樣本	121.1	1.87	2.11

由表四最終樣品測定結果可得知，蛋白質量值(260/280)介於 1.7-1.9，代表其 DNA 純度高，顯示純化成功；鹽離子濃度（260/230）數值大於 2，代表其鹽離子濃度低，亦顯示純化的成功。

雖然 Nanodrop 可測定濃度，但以 Qubit 來測量可得更精準之 DNA 濃度數值。以 Quant-iT Reagent:Quant-iT buffer=1:199(v/v)的比例配製 working buffer，並依表五配製 mixture。

表五、Qubit mixture 配置

	Standard	DNA
Volume of Working Buffer(μL)	190	199
Volume of Standard(μL)	10	–
Volume of Sample(μL)	–	1
Total Volume(μL)	200	200

放置於室溫 2min 後 spin down，以 Qubit Fluorometer 測量最後濃度。測量各 DNA 體積，乘以該樣品濃度後，得到各 DNA 總量 (需 2ng 以達定序所需)。

表六、混合純化後的最終樣本. 經 Qubit 測得之 DNA 總量
(DNA 濃度值*測得體積得最終 DNA 量)

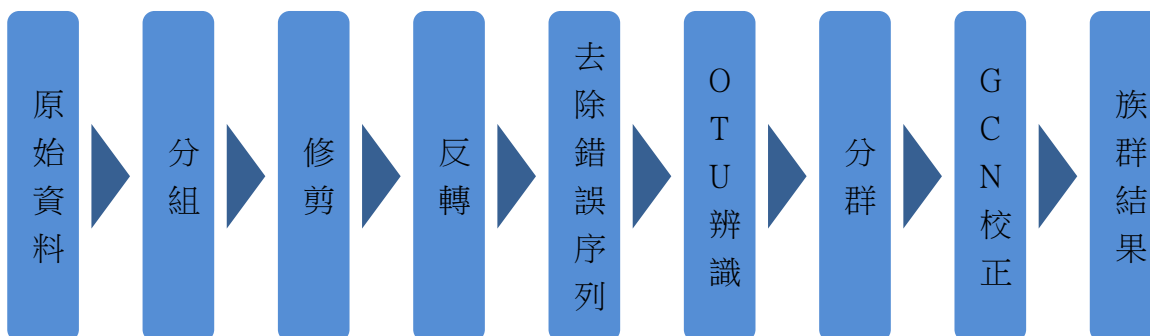
樣本	conc. ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	volume(μL)	DNA 總量(ng)
最終樣本	94.50	22	2079

由表六最終樣品測定結果可得知，最終樣品內 DNA 含量達到 $2\mu\text{g}$ ，且濃度幾乎為 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ，符合送定序所需的數值。

(九) PacBio PhyloTags 16S rDNA 定序與分析

將 15 組 DNA 樣本送交進行 16S rDNA 定序。(定序方式參見附錄二)

送回之定序結果的原始數據，先利用 putty 程式進行 OTU 分群，各步驟如圖七所示。OTU (Operational Taxonomic Unit)是 16S metagenomics 中，根據序列相似性進行分類的操作分類單元，其方法為叢集相似的 16S rDNA 序列，且每個叢集中根據特定相似性程度呈現一個 OTU。本實驗的 OTU 叢及分析門檻設為 97%。該程式亦可初步判定每個 OTU 之門、綱、目、科、屬、種等分類階層。



圖七、OTU 序列分群步驟

進行 16S 序列相似性分類後，將得到的每一個 OTU 與資料庫的菌種層級進行分類，以進行後續分析流程。然而並非單一 OTU 一定會完全對應單一菌種，原因如下：

1. 某些物種間的基因序列相似程度 $>97\%$ ，分類後的 OTU 將包含多個物種。
2. 單一物種可能含有序列相似度 $<97\%$ 的旁系同源基因，會造成物種被區分至多個不同的 OTU。

比較各組樣品的數據，進行分析。觀察各菌種在不同環境下隨時間的生長狀況。將 OTU 序列進行 NCBI-Blast，依相似程度判斷該序列可能屬於的菌種。

(十) 微生物交互作用模擬分析

將已進行 OTU 分群的各樣本數據，依樣本的時間順序進行排序，並以 MetaMIS 軟體進行交互作用的模擬來探討微生物群聚感應。

在軟體參數的設定方面，本研究是以相對比例的方式來進行分析，Abundance High >0.01 、Abundance Rare <0.0001 ；Gap(LA/nC):1、Gap(Rare):2，而 Stop Condition: 58 time points。我們取 Predicted Abundance Profile 及 Consensus Network 作為本實驗的分析結果，配合 Microbial Interactions 和 Interaction Pairs 來進行群探討。

二、菌株分離培養

(一) 製作固態培養基

取北海岸海水，以 200nm 濾膜過濾掉其中的微生物，並保留海水的營養物質。配置海水固態培養基(SW plate，過濾海水:agar=100:1)，配置約 150 盤，每盤液體量約 20-25mL。將所有培養基放置於無菌操作台中冷卻，在隔天確認無微生物長出後密封保存。

(二) 初步培養

取 150mL 未過濾海水用於設置培養環境，並以每 50mL 裝入一加蓋且滅過菌的 100mL 錐形瓶的方式，設置 3 組模擬裝置，此為三重複。首先加入 240 μ L 的 MF-280，一天後，再加入 24 μ L 的散油劑。

將所有錐形瓶放置於震盪器上，行 26°C、100rpm 震盪培養。

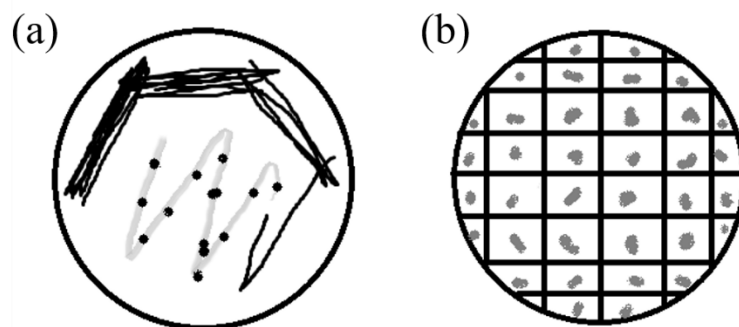
設置完成後，於 Day0, Day1, Day2 進行取樣，並於取樣後立即進行圖塗盤。

(三) 塗盤

將取樣的三組重複樣本混合，並進行 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 的序列稀釋。取每一稀釋樣本 0.1mL，在 SW plate 上進行塗盤，每組皆做三重複。塗盤後的培養基，裝於保鮮盒中保濕，並放置於 26°C 恆溫箱，每天記錄新長出的菌落。

(四) 四區劃線

在塗盤後的培養基上挑選 20-40 個菌落(不全挑同一天長出的)，命名為 SW0H1, SW0H2, ...; SW24H1, SW24H2, ...; SW48H1, SW48H2, ...，並於新的培養基上進行四區劃線已取得單一菌(見圖八 a)。最後再將劃線取得之單一菌塗抹於新的培養基上暫時保存菌種(見圖八 b)。



圖八、四區劃線與菌種保存示意圖。(a)為四區劃線、(b)為菌種暫存。

(五) 鑑種

取每一個菌株進行 DNA 萃取，以 PCR 增幅其 FL 16S rDNA(此部分可參照一、**模擬環境**探討的步驟(三)~(六))。進行 16S rDNA 的定序，並與原有的菌種序列比對，找出 OTU2、3、4。

(六) 菌保

取 15mL 離心管，加入 5mL marine broth 2216 (37.4g/1L ddH₂O)，並沾取原本暫存的菌於液態培養基中。待其長菌後，取菌保用耐冷管(1.8mL)，加入 500mL 甘油與 500mL 菌液(每株菌三重複)，放置於-80°C 冰箱。

參、研究結果與討論

一、模擬環境探討

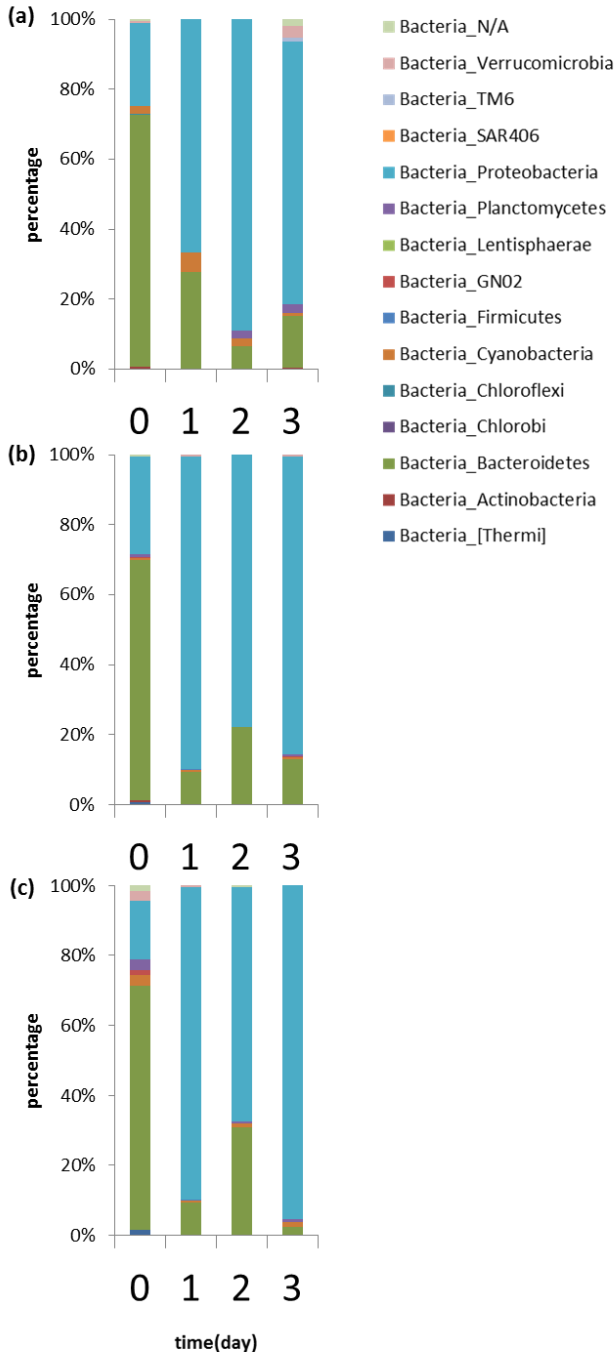
本實驗經過採樣、抽 DNA、16S rDNA 的 PCR 增幅、定序等步驟後，共計定序了 4033 株菌，刪除重複的菌後，共得到 651 種菌。由於 A1/3、B1/3 定序失敗，故往後的分析捨棄 Day1/3 的數據；另外，由於 B1 定序失敗，但其結果理論上與 C1 相同，所以在結果中 B1 的數據皆由 C1 代替，藉此進行分析。

(一) 微生物階層分類

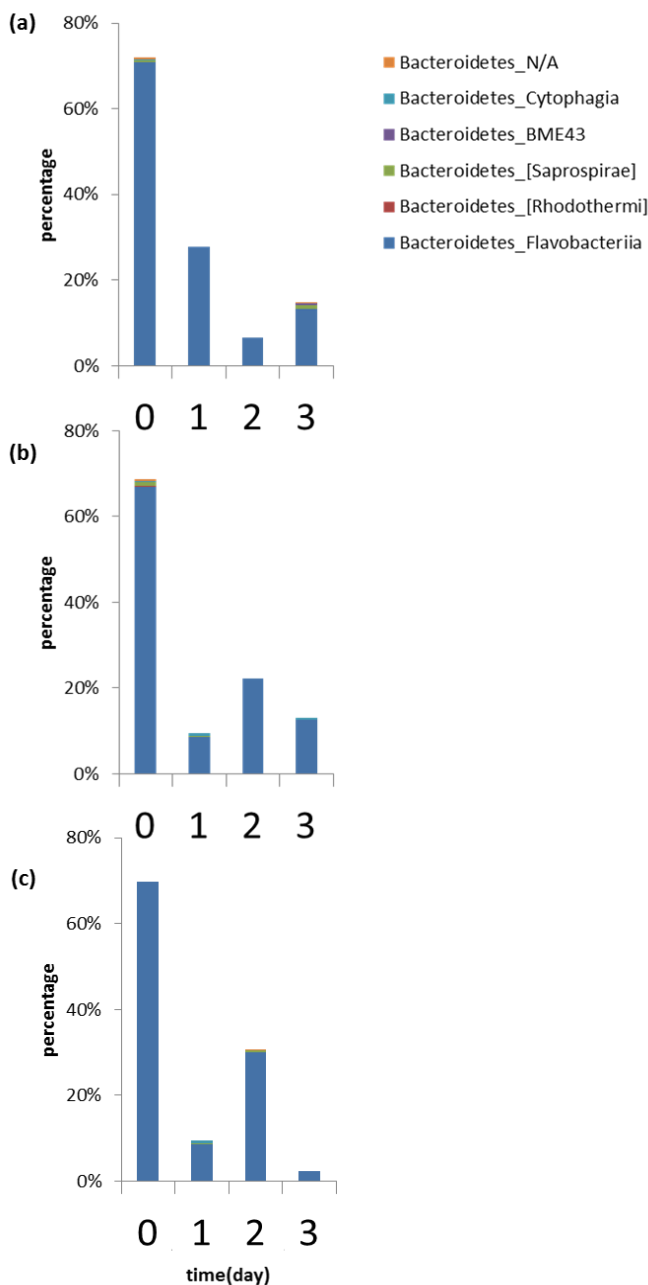
1. 細菌界

由於 16S rDNA 只存在於原核生物中，在界的分類上皆屬 *Bacteria*，故先以門來進行分類。從圖九可看出，在所有樣本中，普遍有 *Bacteroidetes* 比例下降、*Proteobacteria* 比例上升的趨勢，且此二門微生物占所有樣本中極多。但在 B 與 C 樣本中可看出，原油有抑制 *Planctomycetes* 的效果，而散油劑則會使 *Cyanobacteria* 在原油環境中成長。

經 NCBI-blast 分析後得知，



圖九、海水與原油環境中微生物比例。(a)為海水樣本 A、(b)為原油樣本 B、(c)為原油+散油劑樣本 C。樣本中無法辨別門之分類階層的微生物，以 N/A 表示之。



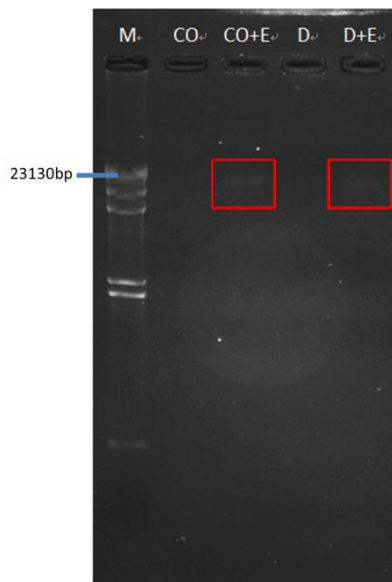
圖十、海水與原油環境中 *Bacteroidetes* 各綱比例。(a)為海水樣本 A、(b)為原油樣本 B、(c)為原油+散油劑樣本 C。樣本中無法辨別綱之分類階層的微生物，以 N/A 表示之。

Bacteroidetes、*Proteobacteria* 此二門微生物為海水微生物，在多數海水樣本中皆占多數。而 *Cyanobacteria* 一門屬自營細菌，能自行利用日光合成營養物質，推測其在散油劑環境成長的原因可能是因為散油劑能使油汙分子變小的特性，使原本由大片油汙覆蓋的海水面得以透入光線，供 *Cyanobacteria* 利用。

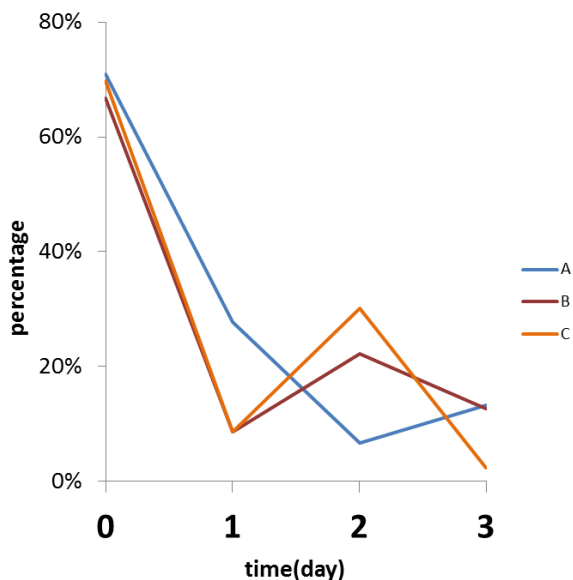
另外，由圖九亦可看出，剛加入原油的海水樣本(B0、C0)，其微生物多樣性較海水來的高。然而經測試得知原油內並無微生物存在(見圖十一)，故推測在原油洩入海水的瞬間，即有即時性的變化。

2. 擬桿菌門 *Bacteroidetes*

從數據可看出 *Bacteroidetes* 中的 *Flavobacteriia* 在各樣本中有漸少的趨勢(見圖十)。然而海水樣本(A)中，該綱微生物的比例在 48hr 時來到最低，但在 B 與 C 樣本中則來到極大值，可能與其生長曲線有關，值得再探討。更進一步分析該綱中各目的比例，發現所有樣本中皆為 *Flavobacteriales* 一目(見圖十二)，此目又以 *Flavobacteriaceae*、*Crymorphaceae* 兩科為多(見圖十三)。



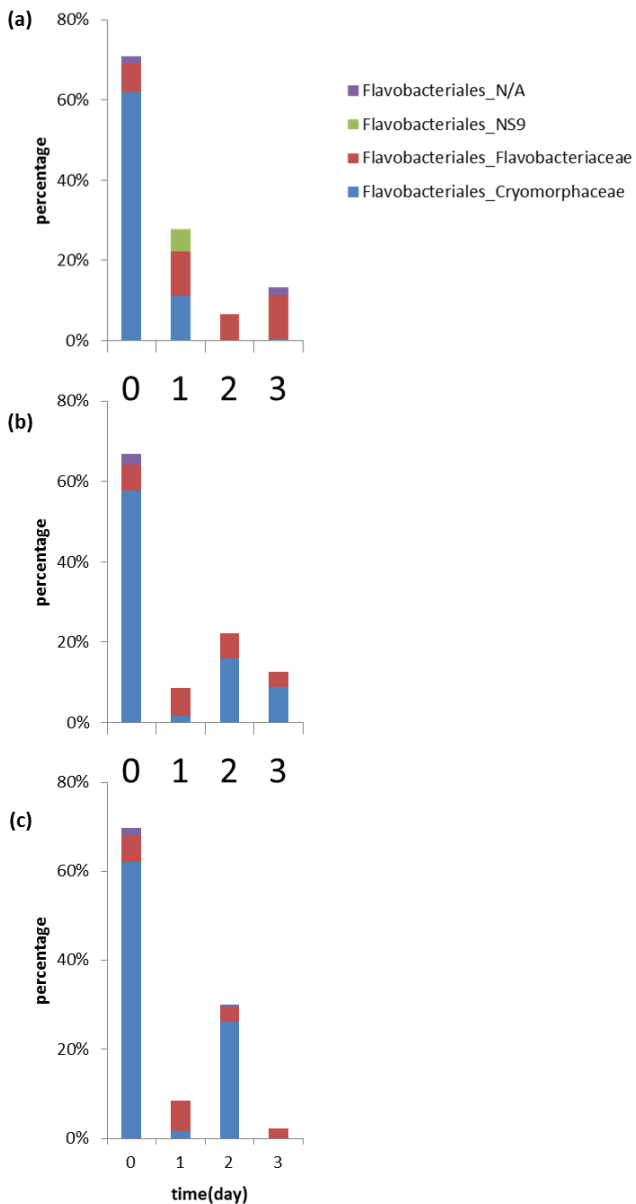
圖十一、原油和散油劑中微生物測試。M 為 Marker、CO 為原油、D 為散油劑、E 為 *E. coli* DNA。圖中可發現加入 *E. coli* DNA 的原油或散油劑皆有 DNA 表現出(紅色方框中)，原油或散油劑單獨存在時則無，故推測原油與散油劑內皆無微生物存在。



圖十二、海水與原油環境中 *Flavobacteriia* 中 *Flavobacteriales* 比例。(A)為海水樣本 A、(B)為原油樣本 B、(C)為原油+散油劑樣本 C。

經 NCBI-blast 分析後得知，*Crymorpaceae* 多生長於有機碳豐富的海洋、鹹水等環境。由圖十三發現，由於模擬環境無外加營養源添入，故在海水的對照組中可能會因有機碳耗盡而導致比例降低；原油環境則因油滴逐漸溶入海水中，能提供適量碳源，使得樣本中仍有不少 *Crymorpaceae* 存在；加入散油劑的原油樣本，由於散油劑會使油滴分子變小而加速溶解，故於 Day2 時可明顯觀察到比例上升的現象，但在 Day3 後便消耗殆盡。

至於 *Flavobacteriaceae*，已知其亦可利用 *Proteorhodopsin* 此種蛋白來利用光線以生成能量，故推測其比例可能與環境透光度有關。再對照組中，由於表層海水透光度良好，該科細菌可利用光線進行能量的製造，使比例保持恆定，甚至增加；至於含有原油的 B 與 C 兩組，則因透光度不佳，導致該科細菌比例下降。



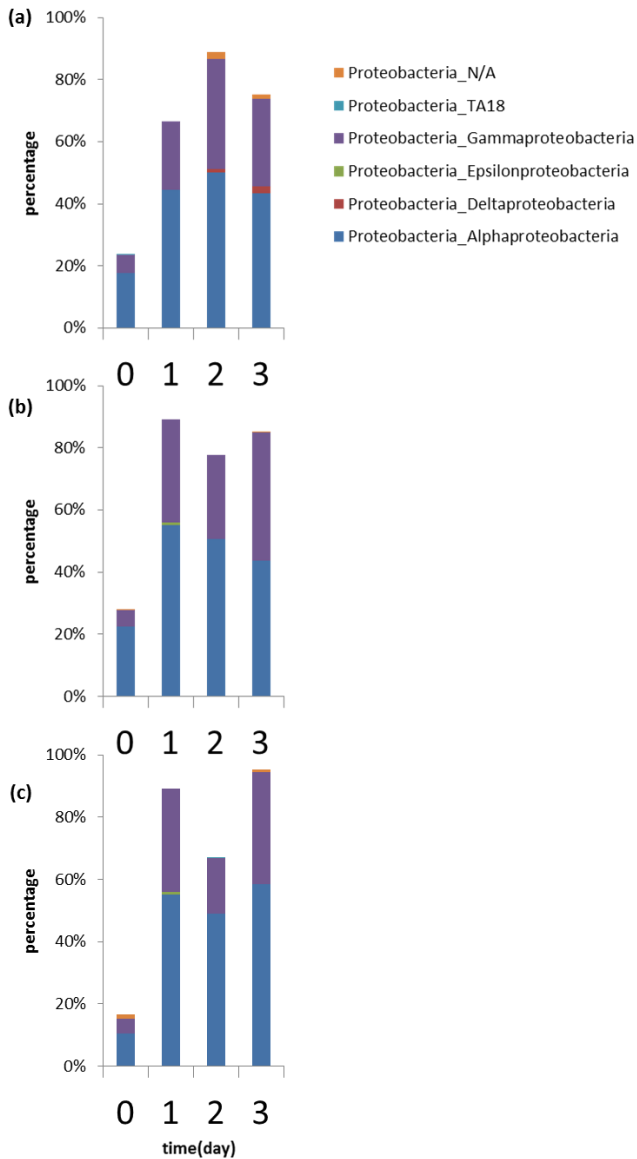
圖十三、海水與原油環境中 *Flavobacteriales* 各科比例。(a)為海水樣本 A、(b)為原油樣本 B、(c)為原油+散油劑樣本 C。樣本中無法辨別科之分類階層的微生物，以 N/A 表示之。

3. 變形菌門 *Proteobacteria*

數據中可看出，*Alphaproteobacteria* 與 *Gammaproteobacteria* 在樣本中占了不少比例(見圖十四)。初步分析後得知，此二綱細菌常大量出現在海水樣本中，屬於海洋微生物。

進一步分析 *Alphaproteobacteria* 此綱後發現，在樣本中普遍呈正成長的趨勢(見圖十五)。值得注意的是，*Alphaproteobacteria* 其中一目 *BD7-3* 的微生物成長，似乎會與溶解於海水中的小油滴分子呈正向關係。圖十五中可觀察到，該目微生物在 B 樣本中，於 Day3 時始出現；但在 C 樣本中，則於 48hr 時出現，Day3 時成長至約 4%。由於 C 樣本是於 Day1 後加入散油劑，其特性是將油滴分子變小，使原油更容易溶於海水中，故使 C 樣本較 B 樣本更早出現 *BD7-3* 此目微生物。由於降解過程中，原油是否能溶解是一大重要因素，而此目微生物的生長與原油的溶解速率具正向關係，因此我們認為 *BD7-3* 可能具有降解原油的潛力。

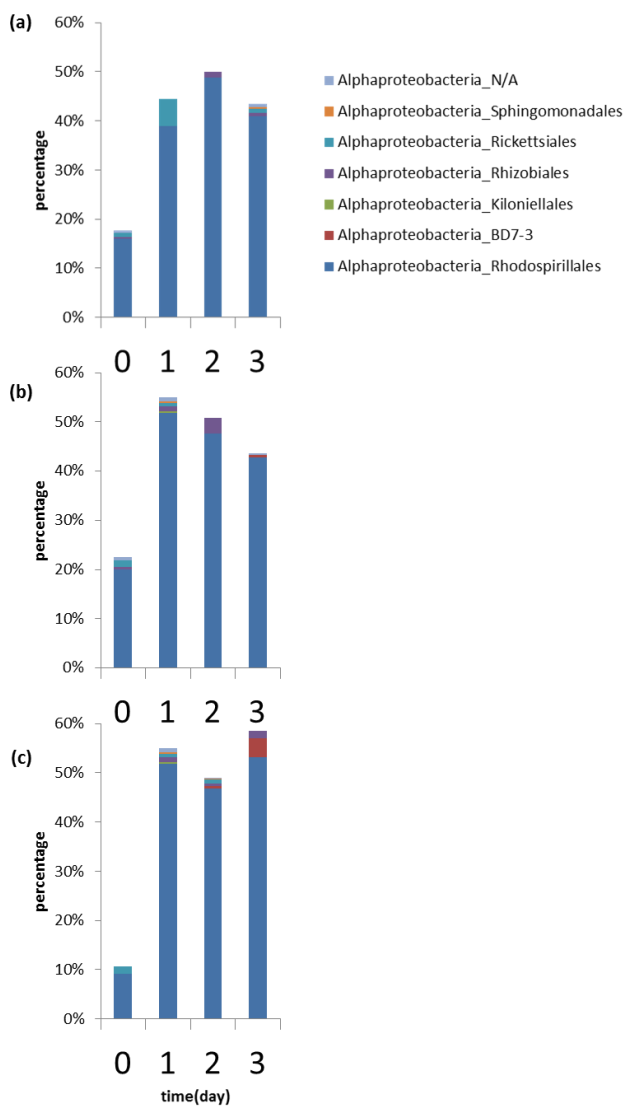
另一方面，分析 *Gammaproteobacteria* 後發現，此綱微生物隨時間亦普遍呈正成長的關係(見圖十六)。而其在 Day2 時，有與 *Cryomorpaceae* 相反的變化趨勢：比例在 A



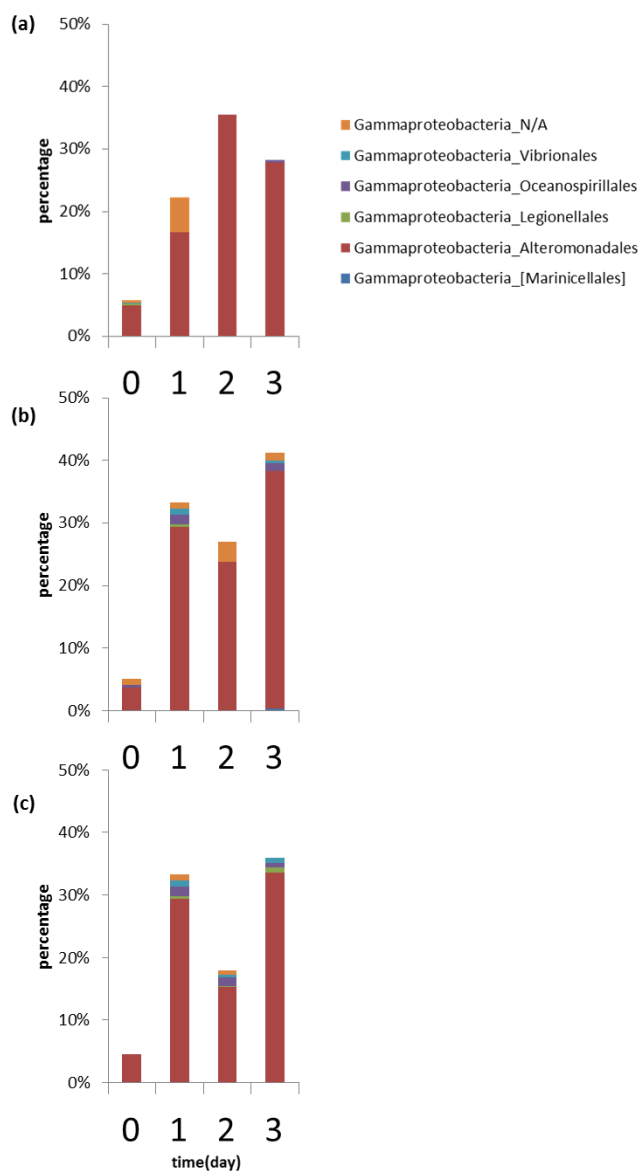
圖十四、海水與原油環境中 *Proteobacteria* 各綱比例。(a)為海水樣本 A、(b)為原油樣本 B、(c)為原油+散油劑樣本 C。樣本中無法辨別綱之分類階層的微生物，以 N/A 表示之。

樣本中於 Day2 時來到最高，但在 B 與 C 樣本中則來到極小值。*Gammaproteobacteria* 與 *Crymorphaceae* 之間，我們認為可能有某種負向的交互關係，而此交互關係，仍有待釐清。

此外，此綱中的 *Vibrionales* 與 *Oceanospirillales*，由圖十六中可發現皆只存在於原油環境中。其中 *Oceanospirillales* 已被指出可以分解烷類，因此可能為適應原油環境之微生物。至於 *Vibrionales* 則甚少文獻討論之，值得進一步探討其作為降解原油的群聚感應一環的角色。



圖十五、海水與原油環境中 *Alphaproteobacteria* 各目比例. (a)為海水樣本 A、(b)為原油樣本 B、(c)為原油+散油劑樣本 C。樣本中無法辨別目之分類階層的微生物，以 N/A 表示之。

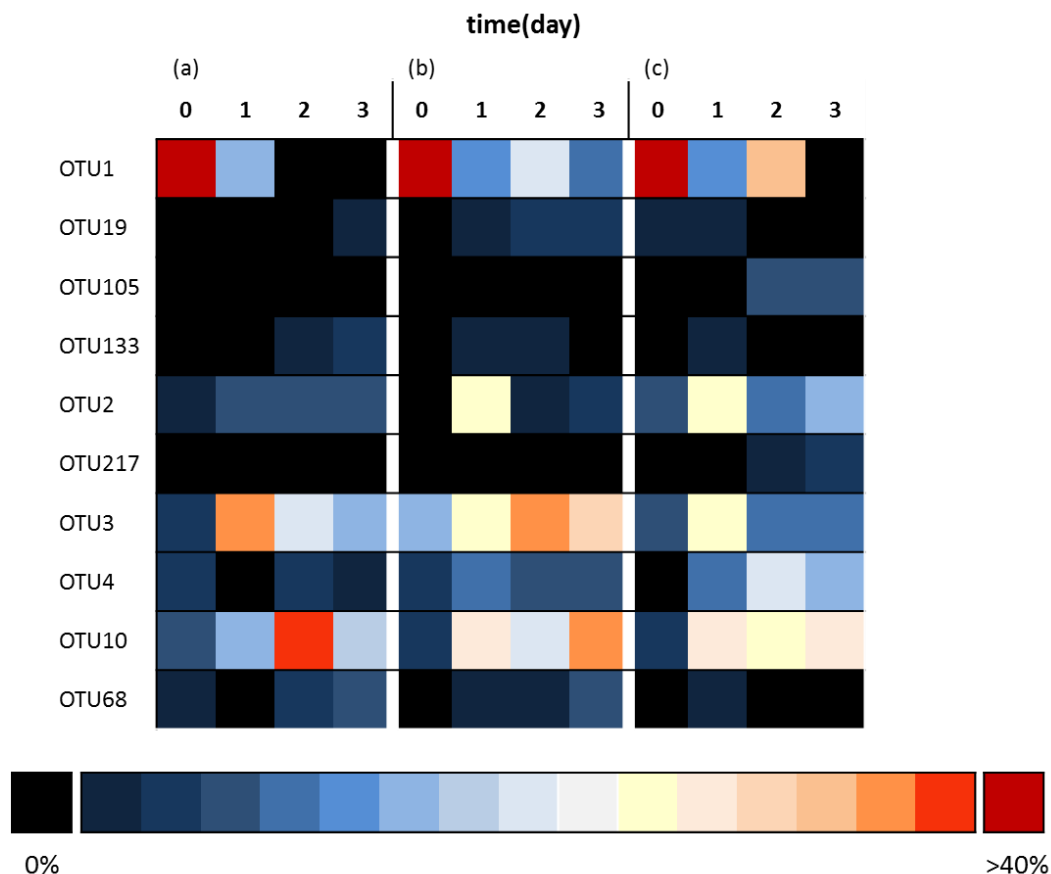


圖十六、海水與原油環境中 *Gammaproteobacteria* 各目比例. (a)為海水樣本 A、(b)為原油樣本 B、(c)為原油+散油劑樣本 C。樣本中無法辨別目之分類階層的微生物，以 N/A 表示之。

4. OTU 分析

我們取占全部 OTU 中比例最高的前十個進行分析(見圖十七)。其中，OTU1 大量出現在 A0、B0、C0 原海水樣本中，文獻指出其在海水環境、沿岸沙地、鹹水環境等皆存在，尤以有機碳源豐富的地方為多。圖中可發現 A 樣本中隨時間大幅度的減少，而 B 與 C 樣本皆在 Day2 時比例升高，原因可能是因為原油裡所含的有機碳源溶入海水的緣故。

此外，OTU105、OTU217、OTU4 皆可發現其在 C 樣本加入散油劑後(Day1 後)，比例上升。此三者中又以 OTU105 最為明顯，圖中除 C2 與 C3 有比例攀升現象，其餘皆零星出現而已；與 OTU217 比較，亦可看出其較敏感的現象，於 Day2 時便已幾近達到其最高比例，OTU217 則於 Day2 至 Day3 中快速攀升。而 OTU4 則是在加入散油劑後比例約上升兩倍。因此我們認為，此三種微生物應具有配合化學除油法的潛力。



圖十七、海水與原油環境中前 10 大 OTU 比例。

(a)為海水樣本 A、(b)為原油樣本 B、(c)為原油+散油劑樣本 C。

值得一提的是，OTU133 的比例，似乎會與溶解於海水中的小油滴分子呈反向關係：圖

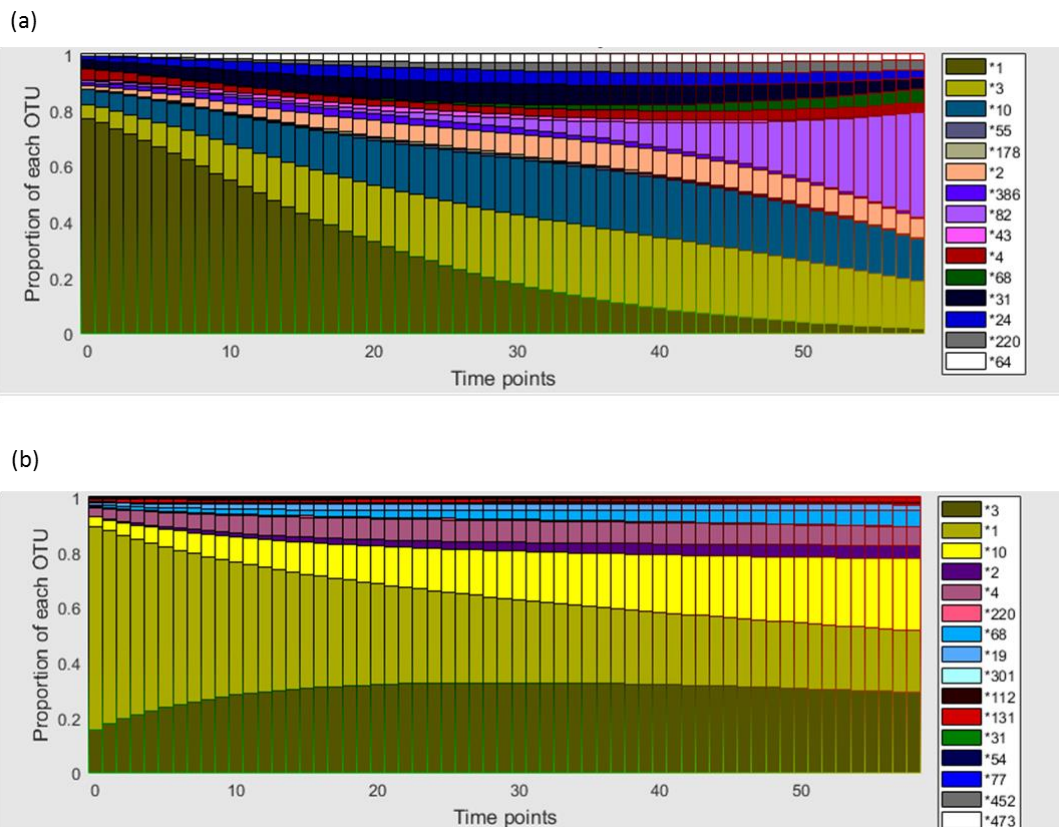
中可看出在 B 樣本中，於 Day3 時比例掉下；但於 C 樣本中則在 Day2 時便掉下。

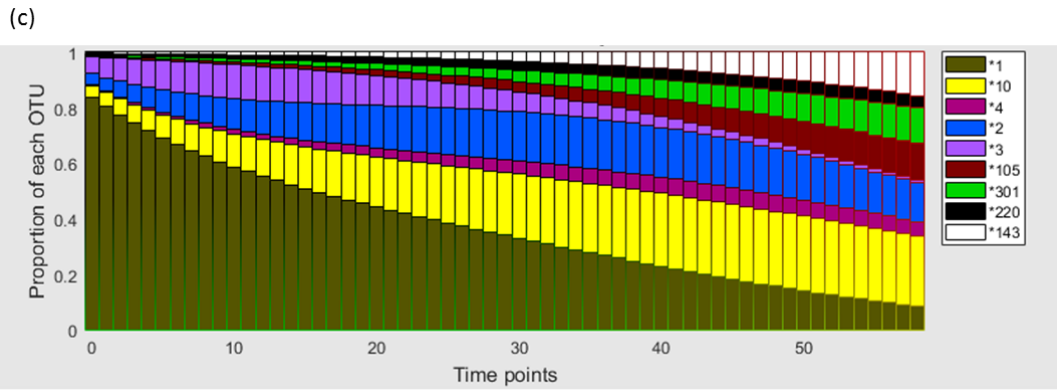
OTU19、OTU3、OTU68 則在加入散油劑後有受抑制的現象。圖中可看出 C2 的 OTU19、OTU3、OTU68 比例皆較 C1 掉了不少。OTU3、OTU68 在原油環境中皆普遍呈現上升的趨勢，然在加入散油劑後，便較原本原油環境的比例跌下許多，並隨時間呈負成長；OTU19 則是在原油環境下比例穩定，但加入散油劑後比例便直接下掉。這三種微生物，應是適應原油的微生物，且會受散油劑的加入而遭抑制，而它們是否具有降解原油的能力，還有待進一步的研究。

(二) 微生物交互作用

1. Predicted Abundance Profile

根據我們輸入的數據，軟體會模擬出一個最符合的變化趨勢模擬圖，並標示變化率最大的數個 OTU(見圖十八)。





圖十八、海水與原油環境中微生物消長情形模擬。X 軸為時間點，單位為 hr；Y 軸為該 OTU 的比例。(a)為海水樣本 A，bc=0.552；(b)為原油樣本 B，bc=0.403；(c)為原油+散油劑樣本 C，bc=0.648。bc(Bray-Curtis dissimilarity)數值介於 0-1，其值越小代表模擬情況越符合輸入數據。

由於我們輸入的樣本只有 Day0-3 四個時間點，在進行模擬時較無法完全符合真實情況，導致各樣本 bc 數值不低。因此這個結果是作為參考的依據，會配合圖十七起進行分析。

我們可以發現，不論在海水或原油環境中，OTU1 比例皆有明顯下降的趨勢，尤其於海水樣本中下降幅度最急遽。圖十七中可得知在 B 與 C 樣本中的 Day2 會有突然攀升的情況，但在圖十八中只發現其下降趨勢有漸緩的情形，並無成長的現象，故可推測即使原油的有機碳溶入水中，仍無法完全支持這類高有機碳需求的微生物。

A 樣本中，OTU3、OTU10 最佳生長的時間點是在 30-50hr 左右，推測兩者間可能具有競爭關係。另外可以發現，隨時間演變，營養源漸缺的情況下，OTU82 有顯著的成長現象，代表其在營養源缺乏的情況下依然能生存，甚至成為優勢菌種。

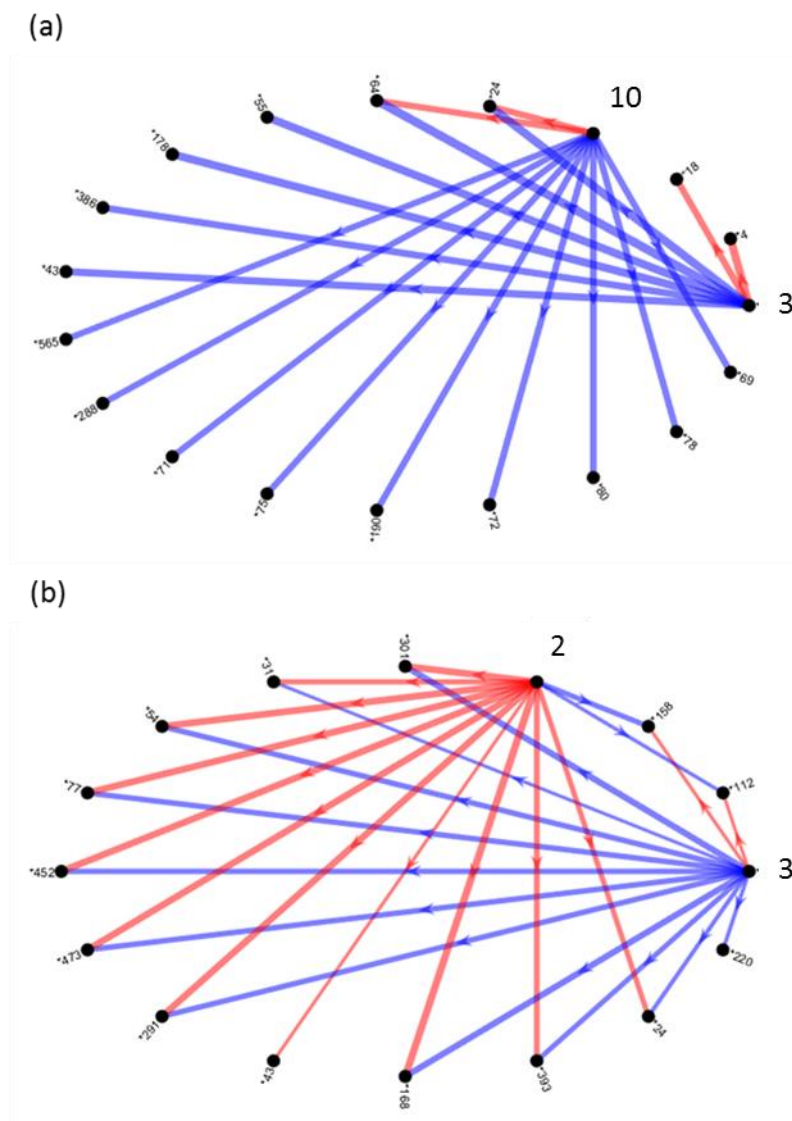
B 樣本中，OTU3 與 OTU10 皆有比例上升的情況。不同的是，OTU3 與約 20hr 後達穩定狀態，比例無甚起伏。配合 Interaction Pairs 的結果可以發現，OTU3 對於某些細菌有強烈片利共生(+/0)的效果，亦對多數微生物有競爭(-/-)的現象，推測其生長可能是造成其他 OTU 比例下降的原因。OTU10 的比例則是隨時間演變緩慢上升。與 A 樣本比對，我們推測在加入額外碳源(原油)後，OTU3、OTU10 兩者間的競爭關係會因碳源增加而延遲。

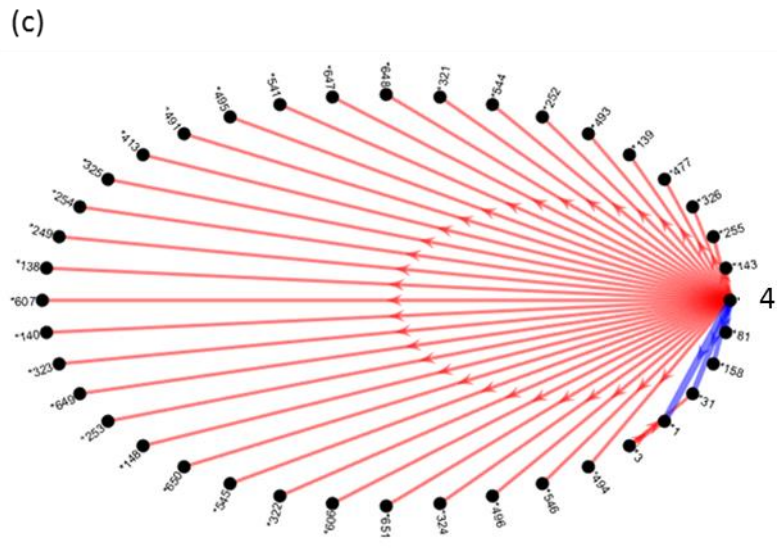
C 樣本中，OTU10 約略在 40hr 時達到穩定狀態，OTU105、OTU301、OTU143 比例上升的趨勢。可以發現，OTU105、OTU301、OTU143 比例開始大幅度上升的時間點幾乎都是在加入散油劑(於 24hr)後，故認為這三個在此環境的群聚感應中皆扮演正成長的角色。另外，在

B 中表現量穩定的 OTU3 在加入散油劑後比例下降，顯示其可能受散油劑抑制，或是受因散油劑而成長之 OTU 的抑制。

2. Consensus Network

藉由分析各 OTU 比例的變化，以及各微生物在環境中扮演的角色關係，可繪製出一張微生物交互作用的關係圖(見圖十九)。我們選擇分析的 Top MIs: 0%-0.125%， $P(\text{Concordant pairs}) \geq 0.95$ 。





圖十九、海水與原油環境中微生物交互作用模擬。(a)為海水樣本 A、(b)為原油樣本 B、(c)為原油+散油劑樣本 C。紅色箭頭代表 Positive，藍色箭頭代表 Negative。

從圖十九中可以大致發現，在一般海水的情況下 Negative interactions 比例較多(P: N=4: 15)，在原油+散油劑的環境 Positive interactions 比例較多(P: N=32: 4)。原油環境則是兩者比例各佔一半(P: N=12: 12)。推測在一般環境中，由於營養源缺乏而導致微生物之間的競爭關係，以利自身的存活；但在越嚴重的逆境下(假設原油的威脅性<原油+散油劑的威脅性)，物種間必須透過合作才能存活，故互利共生的情況會變得更多，符合群聚感應的假設。

A 樣本中，可發現 OTU3 與 OTU10 皆扮演競爭者的角色，對大部分微生物而言都是負向的交互作用，惟對於 OTU4、OTU18 (OTU3)與 OTU24、OTU64 (OTU10)是正向的交互作用。與 Microbial interactions 結果比對，發現當 OTU3 或 OTU10 其中一者抑制某一微生物時，另一個即會微量的促進其生長，似乎可以分成兩大派系的競爭。與 OTU table 比對後發現，OTU3 是 *Alphaproteobacteria*，而 OTU10 是 *Gammaproteobacteria*，然而兩者所促進或抑制的 OTU 並無特別關聯性，舉凡 *Alphaproteobacteria*、*Gammaproteobacteria* 皆存在。故此是否是 *Alphaproteobacteria* 與 *Gammaproteobacteria* 之間的競爭關係仍有待商榷。

B 樣本中，OTU2 扮演著輔助者的角色，對大部分微生物而言具正向交互作用，因此我們相信其在原油降解中，具有關鍵的地位；OTU3 則正好相反，會阻礙多數微生物的成長，且由於他們在原油環境中會自然的生長成一定的比例(約 30%)，故此我們認為 OTU3 是導致實際環境中無法使用生物性除油方法的原因。值得注意的是，對於 OTU158 與 OTU152，OTU2、

OTU3 所扮演的角色會顛倒過來，即 OTU2 將會抑制，而 OTU3 將會促進。經 NCBI-blast 分析後得知，OTU2 是 *Thalassobius mediterraneus*(100%, *Rhodobacteraceae* 科)而 OTU3 亦屬於 *Rhodobacteraceae* 科。

C 樣本中，可以很明顯的看出 OTU4 扮演著輔助者的角色，對於幾乎所有微生物具有正向的交互作用。與 Predicted abundance 與 Microbial interactions 結果比對後，發現 OTU4 對於 OTU143 具有顯著的正向影響力，促使 OTU143 比例明顯上升。因此我們認為此二種微生物或許可以搭配化學性除油法來做使用。經 NCBI-blast 分析後得知，OTU4 是 *Nautella italic*(100%, *Rhodobacteraceae* 科)。

由上述討論可以發現，海水中 *Rhodobacteraceae* 科的微生物，似乎在海水群聚感應中，無論正面或負面影響，皆扮演著極為重要的角色。文獻指出，*Rhodobacteraceae* 科在生物膜中的微生物社群中屬於較為優勢的成員，約佔整個社群組成的 30%-70%；而相較於剛形成的生物膜，在形成兩個禮拜的生物膜中此科微生物的比例有下降的趨勢(Elifantz et al., 2013)。故此根據我們的實驗結果與文獻探討，我們推論 *Rhodobacteraceae* 科的微生物是生物膜構成前期中極為重要的一科微生物，甚至可能是改變生物膜組成的關鍵，因而可作為生物性環境復育地著手點。

二、菌株分離培養

本實驗最終挑選出了 86 株菌(SW0H 共 36 株、SW24H 共 22 株、SW48H 共 28 株)，目前已選其中 45 株(SW0H、SW24H、SW48H 各 15 株)進行定序，並將這些菌進行菌保。我們已成功分離出 OTU2 *Thalassobius mediterraneus* (99%)與 OTU4 *Nautella italic* (100%)，可作為後續定量研究的實驗器材。

肆、結論與未來展望

一、結論

1. *α-Proteobacteria* 綱中的未知目 *BD7-3* 可適應小油滴分子環境，在原油污染後期(Day3)可能在此群聚感應中扮演重要角色。
2. *γ-Proteobacteria* 綱中的 *Vibrionales* 與 *Oceanospirillales* 目可適應原油環境。*Oceanospirillales* 可作為烴類的降解者，而 *Vibrionales* 則具開發及深入研究的潛力。
3. *Thalassobius mediterraneus* (OTU2)在原油降解中具作為輔助者的潛力，對多數細菌有著正面影響。
4. OTU3 (*Rhodobacteraceae* 科)的出現可能是導致現實生活中生物性除油法無效的原因。
5. *Nautella italica* (OTU4)在原油+散油劑的環境下，能幫助其他微生物適應該環境，具有配合化學性除油法的潛力。
6. *Rhodobacteraceae* 科的微生物在海水群聚感應中，扮演著極為重要的角色。

二、未來展望

(一) 群聚感應定量分析方法

以 marine agar 與已過濾海水配置液態培養基，共配置 105 管，每管液態培養基的量約為 10mL，並依表七所述之方式加入不同菌種與化學物質。

表七、降解實驗培養基配置

樣品編號	加入的菌種	加入的化學物質
Test(1)1-5	OTU2	O/Na/Phe/Flo/Chr
Test(2-1)1-5	OTU4	O/Na/Phe/Flo/Chr
Test(2-2)1-5	OTU4	O+D/Na+D/Phe+D/Flo+D/Chr+D
O _A 1-O _A 5	未過濾海水	O/Na/Phe/Flo/Chr
O _B 1-O _B 5	未過濾海水+OTU2	O/Na/Phe/Flo/Chr

D _A 1-D _A 5	未過濾海水	O+D/Na+D/Phe+D/Flo+D/Chr+D
D _B 1-D _B 5	未過濾海水+OTU4	O+D/Na+D/Phe+D/Flo+D/Chr+D

*所有樣品皆做三重複。

*化學物質：O 原油、Na 萘、Phe 菲、Flo 芴、Chr 蒽、D 散油劑。

[註] 從文獻中我們發現，原油中生物毒性最強的物質為多環芳香族碳氫化合物(Polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH) (D.Pampanin & M.Sydnes, 2013) (P.Albers, 2003)。其可能導致諸如癌症、遺傳物質的破壞等危害，因此我們主要針對此類化合物進行降解分析。根據研究資料顯示，原油中含量最高之四種 PAH 為萘(Naphthalene)、菲(Phenanthrene)、芴(Flourene)、蒽(Chrysene) (D.Pampanin & M.Sydnes, 2013) (M.Hossain & S.Salehuddin, 2010)。因此，本研究以此四者作為主要觀察對象。

設置後於當下及每隔 6hr，以分光光度計測量每個樣品的吸光值，並持續一個禮拜。其中，使用 OD600 觀測微生物的總體生長曲線，以及使用 OD200 觀測化學物質的降解率。

(二) 預期結果

我們預期，OTU2 與 OTU4 在單獨存在於「原油 - 海水」或「原油 - 海水 - 散油劑」的環境時，可以適應此環境的改變，但在降解原油的方面上並不會太有效率，這是因為這兩者主要是作為生物膜的初始建構者，然而後續無其他微生物與之形成微生物社群，便無法使此生物膜建構出，並進行原油的降解。而加入未過濾海水後，海水中的其他微生物因為有了 OTU2 或 OTU4 所開始建構的生物膜基礎，於是在原油 - 海水的介面上逐漸形成生物膜，增加原油被降解的效率。

三、此研究之應用性

有別於以往探討單一物種降解原油的潛力，本研究以微生物群集的角度，來探討現實環境中較為實際的生物性除油法。隨著近年來研究「生物間交互作用」的趨勢上漲，我們希望透過「群聚感應與生物膜」的新觀點，來啟發環境復育中新的可能性。

伍、參考文獻

1. 李育霖, 劉尊榮, 黃美麗. (民 99). *生物膜及相關感染性疾病*. 感染控制雜誌(2011) p44-46.
2. Daniela M. Pampanin and Magne O. Sydnes . (2013). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons a Constituent of Petroleum: Presence and Influence in the Aquatic Environment*. *Hydrocarbo*. Dr. Vladimir Kutcherov (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/48176.
3. Elifantz H1, Horn G, Ayon M, Cohen Y, Minz D. (2013). *Rhodobacteraceae are the key members of the microbial community of the initial biofilm formed in Eastern Mediterranean coastal seawater*. *FEMS Microbiol Ecol* 85 (2013) 348 – 357.
4. Esther Singer, Brian Bushnell, Devin Coleman-Derr, Brett Bowman, Robert M Bowers, Asaf Levy, Esther A Gies, Jan-Fang Cheng, Alex Copeland, Hans-Peter Klenk, Steven J Hallam, Philip Hugenholtz, Susannah G Tringe, Tanja Woyke. (2016). *High-resolution phylogenetic microbial community profiling*. *The ISME Journal* (2016), 1 – 13.
5. Hernando P. Bacosa, Zhanfei Liu, Deana L. Erdner. (2015, December 01). *Natural Sunlight Shapes Crude Oil-Degrading Bacterial Communities in Northern Gulf of Mexico Surface Waters*. *Frontiers in Microbiology*, Volume 6, Article 1325.
6. Jonathan D. Van Hamme, Ajay Singh, Owen P. Ward. (2003). *Recent Advances in Petroleum Microbiology*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Dec. 2003, p. 503 – 549. Doi: 10.1128/MMBR.67.4.503 – 549.2003.
7. M. Amzad Hossain, S.M. Salehuddin. (2010). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in Edible Oils by Gas Chromatography Coupled with Mass Spectroscopy*. *Arabian Journal of Chemistry*.
8. Peter H. Albers. (2003). *Petroleum and Individual Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. *Handbook of Ecotoxicology* Ch14.
9. Steve Atkinson, Paul Williams. (2009). *Quorum sensing and social networking in the microbial world*. Centre for Biomolecular Sciences, School of Molecular Medical Sciences, University of Nottingham, Nottingham NG7 2RD, UK.

附錄一、每組樣品對應之 barcode

sample	27F	1492R
A0	TCAGACGATGCGTCATAGRGTTYGATYMTGGCTCAG	TCAGACGATGCGTCATRGYTACCTTGTTACGACTT
B0	CTATACATGACTCTGCAGRGTTYGATYMTGGCTCAG	CTATACATGACTCTGCRGYTACCTTGTTACGACTT
C0	TACTAGAGTAGCACTCAGRGTTYGATYMTGGCTCAG	TACTAGAGTAGCACTCRGYTACCTTGTTACGACTT
A1/3	TGTGTATCAGTACATGAGRGTTYGATYMTGGCTCAG	TGTGTATCAGTACATGRGYTACCTTGTTACGACTT
B1/3	ACACGCATGACACACTAGRGTTYGATYMTGGCTCAG	ACACGCATGACACACTRGYTACCTTGTTACGACTT
C1/3	GATCTCTACTATATGCAGRGTTYGATYMTGGCTCAG	GATCTCTACTATATGCRGYTACCTTGTTACGACTT
A1	ACAGTCTATACTGCTGAGRGTTYGATYMTGGCTCAG	ACAGTCTATACTGCTGRGYTACCTTGTTACGACTT
B1	ATGATGTGCTACATCTAGRGTTYGATYMTGGCTCAG	ATGATGTGCTACATCTRGYTACCTTGTTACGACTT
C1	CTGCGTGCTCTACGACAGRGTTYGATYMTGGCTCAG	CTGCGTGCTCTACGACRGYTACCTTGTTACGACTT
A2	GCGGATACGATGACTAGRGTTYGATYMTGGCTCAG	GCGGATACGATGACTRGYTACCTTGTTACGACTT
B2	CGCGCTCAGCTGATCGAGRGTTYGATYMTGGCTCAG	CGCGCTCAGCTGATCGRGYTACCTTGTTACGACTT
C2	GCGCACGCACTACAGAARGTTYGATYMTGGCTCAG	GCGCACGCACTACAGARGYTACCTTGTTACGACTT
A3	AACTGACGTCGCGACAGRGTTYGATYMTGGCTCAG	AACTGACGTCGCGACRGYTACCTTGTTACGACTT
B3	CGTCTATATACGTATAARGTTYGATYMTGGCTCAG	CGTCTATATACGTATARGYTACCTTGTTACGACTT
C3	ATAGAGACTCAGAGCTAGRGTTYGATYMTGGCTCAG	ATAGAGACTCAGAGCTRGYTACCTTGTTACGACTT

附錄二、PacBio Phylo Tags (第三世代定序)

在原核生物的基因定序中，由於 16S rDNA 在演化的過程中不易改變，故常用在物種的鑑定。過去在定序時，常使用的兩種定序方式分別為 Sanger sequence 及 *in silico* generated V4 sequence；而去年，Pacific Biosciences (PacBio)研發了一套新的定序系統 PhyloTags sequence，結合了前兩種定序方式的優點。茲整理三者之優缺點，見表一(E.Singer et al.,2016)：

表一、三種定序方式之特性

	Sanger	<i>in silico</i> generated V4	PhyloTags
微生物培養	需要	不需要	不需要
平均定序時間	3hr	8hr	2hr
使用的引子	27 F, 1392 R	視各變異區而異	27 F, 1492 R
預期長度(16S rDNA)	接近 full-length	最多 500bp	full-length
過程中的 PCR 增幅	不需要	需要	不需要
資料輸出量	~0.1Mb per 96-well plate	8 Gb per Flowcella	0.3Gb per SMRT Cell
每 mb 資料的價格	~US\$2000.00	US\$0.11	US\$2.50
與本研究的目不符之處	價格高，難用於分析微生物群集系統	無法進行 FL-16S rDNA 的定序	-

PhyloTags sequence 是基於 PacBio SMRT(Single-Molecule Real-Time) 技術，利用微小的 zero-mode waveguides(ZMW)作為單位，組成一個光波導式感測晶片 (SMRT Cell)。每個 ZMW 中皆只存在一個 DNA 聚合酶，而當聚合反應發生時，具不同螢光的新型 dNTP 會釋放有標定螢光的磷酸根，再加上 ZMW 微小孔洞的設計能大幅減低背景螢光訊號的干擾，故此有標定螢光之磷酸根的激發光源可以即時且有效地偵測並讀取序列，以每秒 1-3base 的速率快速解序。

本研究即利用 PacBio PhyloTags 可進行快速定序的優點，以及其可鑑定至種的特性(利用 FL-16S rDNA)，期望透過此法來分析開放環境中油汙所導致的微生物交互作用，進而透過微生物群聚感應來評估其降解油汙之可能性。