中華民國第 57 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高級中等學校組　動物與醫學學科

佳作

052002

油汙環境中微生物群聚感應與生物降解的探討

學校名稱：臺北市立建國高級中學

作者：	指導老師：
高二 郭正浩 高二 施　維	周麗芬

關鍵詞：原油汙染、散油劑、群聚感應

摘要

本研究是以油汙環境下微生物群聚感應為主軸，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。因此，比起過往研究聚焦在單一微生物的除油潛能，我們利用 PhyloTags 來進行微生物 16S rDNA 的全序列定序，再將結果以 MetaMIS 軟體分析菌種間的交互作用，探討微生物處理油汙的發展潛力。

本研究中，我們發現海水中一株 *Rhodobacteraceae* 科的細菌(代號 OTU3)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，*Thalassobius mediterraneus* 具有促進多數微生物生長的能力，具發展的潛能。此外，在加入散油劑之後，則是 *Nautella italica* 促進其他細菌生長。未來我們希望進一步探討此群聚感應更完整的面貌，期望能應用在生物除油的發展上。

壹、前言

一、研究動機

去年(2016)三月，一起發生在石門外海的原油事件引起了我們的興趣。該案乃因本國籍「德翔台北」貨輪於 3 月 10 日擱淺於石門外海，加上當時氣象不佳，造成船身完全破裂，大量油汙漏出。此起事件直到兩個月後才將岸際油汙全面清除完畢，而至於當地生態的復育，則至少還要三至五年的時間。此顯示原油汙染對於環境生態、國家經濟等皆有極大的破壞與影響。在蒐集與油汙汙染相關的資料與文獻之後發現，目前處理原油問題的方法以機械打撈和化學藥劑分解為主。這些方式雖能清除油汙，卻有成本過高、耗時、造成二次汙染等潛在問題，也因此激發了我們的研究發想。本研究目標即是期望透過生物性的方法來解決油汙汙染問題，找出環保而高效率的除油方式，以降低油汙汙染對生態的破壞。

二、研究目的

1. 探討原油汙染發生後的即時性菌相變化，找出詳細且具地域性的菌相結果。
2. 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。

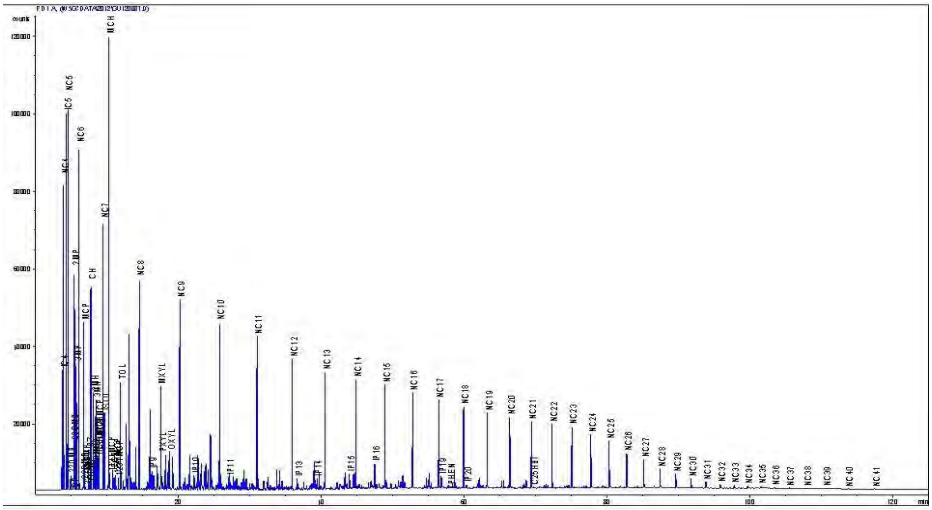
3. 透過 PacBio PhyloTags 技術與 MetaMIS 軟體來了解微生物群聚感應。

4. 以群集概念代替族群，從多方微生物的相互關係來分析其降解油汙之可行性。

三、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。我們將 TPH 初步分成長鏈的飽和烴類(Saturates)與芳香烴類(Aromatics)。其中，具有較高毒性之多環芳香烴(Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAH)便是屬於芳香烴類之碳氫化合物。然而，即便已找出能有效分解 TPH 之菌屬，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代謝後所造成的二次汙染，以及現實環境變數的考量。



圖一、原油所含的 TPH 經氣相層析(GC)後所得到的色譜

(出自 https://goo.gl/dTY8jq)

另外，利用微生物自然分解原油的方式亦有其他困難。影響分解的因子包括營養源、油的物理狀態、氧氣、溫度、鹽分、壓力等。其中，在營養源方面，研究顯示在碳氫化合物的氧化過程中，氮的來源極為重要。在開放式系統中，如海洋等，石油汙染物的降解會受限於氮源的供應。因為石油中只含微量的氮，生物所需要的氮源勢必需要來自周圍環境，也因此增加了此法的困難性 (Hamme, Singh, Ward, 2003) 。

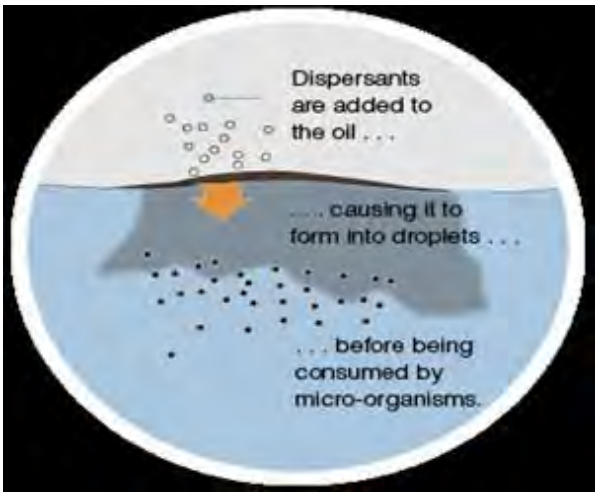
(二) 群聚感應(Quorum Sensing)

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，增加該種的生存率(Atkinson and Williams, 2009)。

然而，一般在討論群聚感應時多半是在探討單一物種之間的反應，但在探討多種生物間的交互作用與相互溝通時，亦會有群聚感應的發生。當環境產生變動時，此群聚感應亦會發生變動，使此群聚感應底下的各種族得以適應新的環境。本研究於是利用此概念，探討當原油洩入海水後，群聚感應的變化，以及探討加入散油劑所造成的變化。

(三) 散油劑

對於可高效除油的散油劑，是由界面活性劑與作為界面活性劑載體的溶劑合成，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。)



圖二、散油劑作用示意圖

(出自 https://goo.gl/PzB0os)

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。

貳、研究方法與過程

一、實驗原理

(一) 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。兩者之優缺點如下：

1. Sanger sequence 屬於 long-read 的定序方式，可允許到幾乎 full length 的 16S rDNA 基因定序(長約 1500bp)。然而其產量小、價格昂貴，且須針對每一種微生物進行個別培養，難以應用在了解微生物群集的系統中，來了解各菌種間的交互關係。
2. *in silico* generated V4 sequence 屬於 short-read 的定序方式，在定序時通常選擇一段變異區來進行。作為次世代定序的技術(Next-Generation Sequencing, NGS)，其優點為具高產量、高效能，且價格較 Sanger sequence 便宜許多，適用在大量樣品的定序。然而，由於其只能處理單一變異區，定序結果約為 100bp-500bp，故難以精確分辨 16S rDNA 基因細微差異的微生物。

去年，Pacific Biosciences (PacBio)所研發出之 PhyloTags sequence 綜合了兩種定序方式的優點，不僅能進行 FL(full length)的定序，也因其產量高且價格便宜，故在分析微生物複雜的交互作用中具其潛能 (Singer,et. al,2016) 。

表二、三種定序方式之特性

	Sanger	***in silico* 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/預期長度	27 F, 1392 R / 接近 full-length	視各變異區而異/最多 500bp	27 F, 1492 R/ full-length
過程中的 PCR 增幅	不需要	需要	不需要
資料輸出量	~0.1 Mb per 96-well plate	8 Gb per Flowcella	0.3 Gb per SMRT Cell
每 mb 資料的價格	~US$2000.00	US$0.11	US$2.50

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 FL Sequencing 的優點，以及其可鑑定至種的特性，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。

二、研究方法

(一) 海水環境模擬培養、取樣

圖三、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(Bacosa, Liu, Erdner, 2015)；溫室內維持 26℃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(見表三)。

表三、各水缸之內容物

tank	components
A	sea water 5L
B	sea water5L、MF-380 100mL
C	sea water5L、MF-380 100mL、dispersant 10mL

裝置完成後，於下列各時間點取樣：

0hr (Day0)、8hr (Day1/3)、24hr (Day1，C 組加入散油劑後)、48hr (Day2)、72hr(Day3)

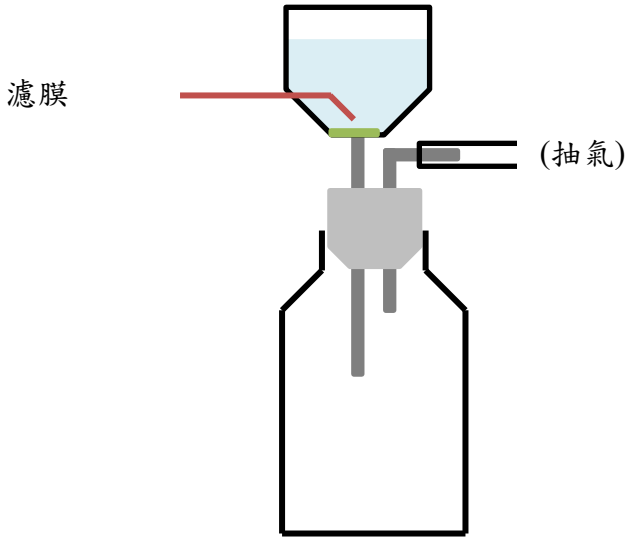
取樣時使用拋棄式針筒，將針筒口伸入水面抽取表層海水。海水表面有油汙者，則抽取油汙層以下之表層海水，避免直接抽取油汙。每次取樣，每水缸各抽取 250mL 海水樣品。將同種三重複之海水樣品混合，得每種 750mL：其中 650mL 為微生物組成分析實驗使用，100mL 則保存於-20℃冷凍庫(用於之後使用於含氮量檢測)。

- Residual Marine Fuel 380(台灣簡稱 MF-380)：

  原油經蒸餾後可分為蒸餘油(residual fuel)及蒸餾油(distillate oil)。蒸餘油有沸點高、油色黑之特點；蒸餾油則反之，油色偏褐色。

  在 ISO8217 (Inter-national Standard Organization8217)中有對於原油之命名的詳細規範。以 MF-380 為例，MF 代表海運燃油(marine fuels)；數字代表其黏度(cSt)，為該由於 50℃ 所測得的數值，單位為 mm^2/S。

(二) 樣本抽氣過濾



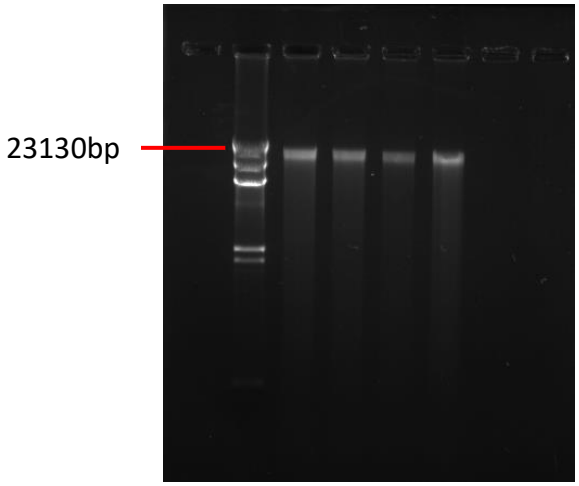
圖四、抽氣過濾裝置示意圖

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℃水浴 60min 使其作用。加入 Proteinase K，50℃水浴 30min 使其作用。加入 NaCl、CTAB/NaCl solution，65℃水浴 10min。將液體分裝至 1.5mL eppendorf tube 中，加入 Chloroform/isoamyl alcohol，於 4℃低溫離心 5min，抽取上清液至新的 eppendorf tube 中。加入 Phenol/chloroform/isoamyl alcohol，4℃低溫離心 5min，抽取上清液至新的 eppendorf tube 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 eppendorf tube 以 20μL 1/10X TE buffer 回溶。

得 DNA 回溶樣品後，各取 5μL 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。



圖五、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。我們將萃取出的 DNA 樣品進行 PCR 增幅，以放大定序所需之 16S rDNA 片段。如表五所示配置 PCR mixture。這裡我們使用的 DNA 聚合酶為 TaKaRa Ex Taq^{TM} (HS)，引子為 27F 與 1492R，預期 DNA 片段長度為 1465bp。

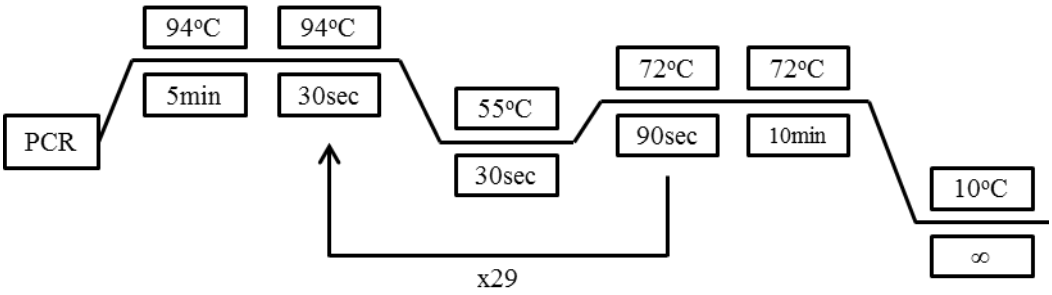
表五、PCR mixture 各藥劑使用量

chemicals	volume(μL)
Sterilized ddH_2O	35.7
Buffer (10X Ex Taq Buffer)	5
dNTP mixture	4
Primer-Forward (27F)	1
Primer-Reverse (1492R)	1
DNA polymerase (TaKaRa Ex Taq^{TM} (HS))	0.3
DNA template	3
total	50

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

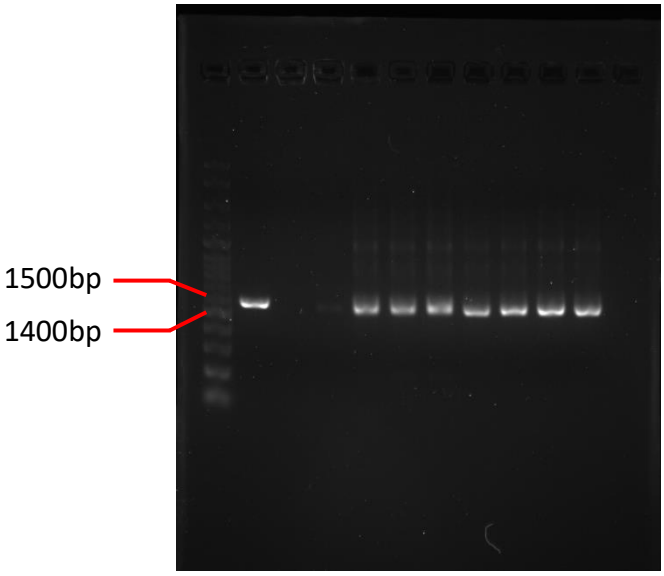
*1492R primer: 5'-RGYTACCTTGTTACGACTT-3'

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六所示。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。



圖六、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 50μL PCR product，取其中 5μL 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。



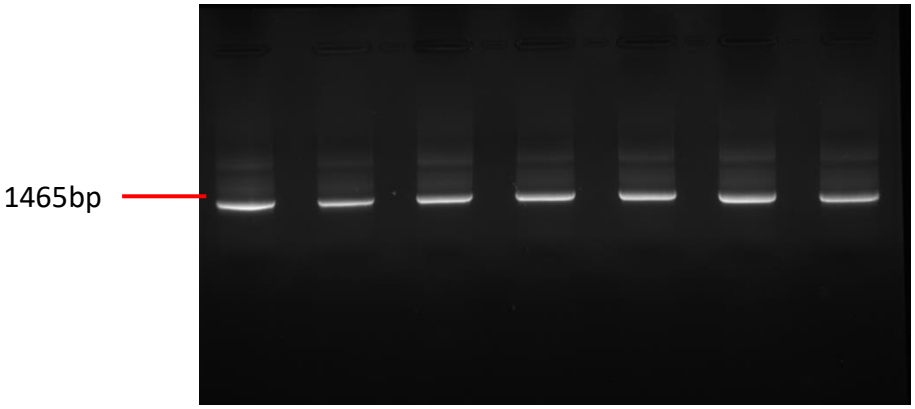
圖七、PCR products 電泳圖. 由左至右: Marker、Positive、Negative、樣本

(五) 純化 DNA

將 45μL 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 eppendorf tube 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 40μL ddH_2O，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。



圖八、Gel extraction 電泳圖

(六) DT-PCR

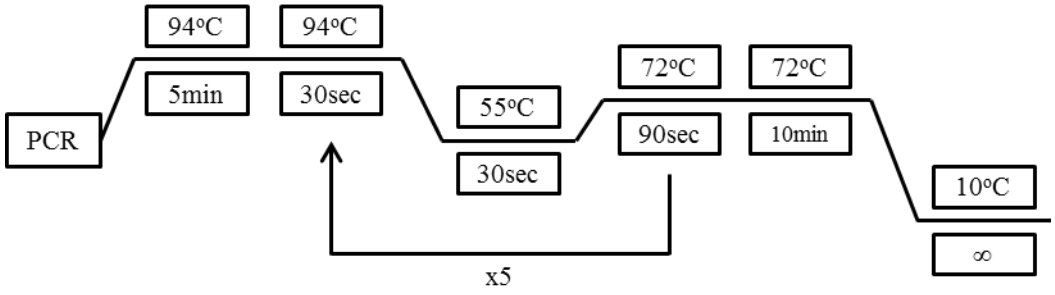
本實驗在每組樣品中接上一組對應的 barcode，作為之後在 NGS 定序時辨識樣本之用。實驗方法與 PCR 相似，但每組使用之 forward primer 與 reverse primer 之一端分別有一組辨識用之 DNA 序列，稱為 barcode。

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。

表六、DT-PCR mixture 各藥劑使用量

chemicals	volume(μL)
Sterilized ddH_2O	28.7
Buffer (10X Ex Taq Buffer)	5
dNTP mixture	4
Primer mixture(with barcode)	2
DNA polymerase (TaKaRa Ex Taq™ (HS))	0.3
DNA template	10
total	50

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 次 cycle。



圖九、DT-PCR cycle

取 5μL DT-PCR product 進行膠體電泳，確定 PCR 成功。將雙重複的 PCR product（各剩餘 45μL）混合，得 90μL。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 30μL ddH_2O 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 750μL 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 eppendorf tube，以 25μL ddH_2O 回溶，放置五分鐘後室溫離心 13000rpm 3min。

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

(八) 濃度測定

由於送定序之 DNA 量需達 2μg 以上，而本研究中樣品共 15 組，故每組樣品約需至少 150ng 以上之 DNA。使用 NanoDrop Spectrophotometer，清洗完儀器探測器後，每個樣本以 2μL 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。

表七、混合純化後的最終樣本(final product). 經 NanoDrop 得到的 DNA 濃度、蛋白質量值、鹽離子濃度數值

sample	conc.(ng*μL^{-1})	260/280	260/230
final product	**121.1**	**1.87**	**2.11**

由表七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，並依表八配製 mixture。

表八、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 Flourometer 測量最後濃度。測量各 DNA 體積，乘以該樣品濃度後，得到各 DNA 量。

表九、混合純化後的最終樣本(final product).

經 Qubit 測得之 DNA 濃度數值/由 DNA 濃度值*測得體積得最終 DNA 量

sample	1st conc. (ng*μL^{-1})	2nd conc. (ng*μL^{-1})	average conc. (ng*μL^{-1})	volume(μL)	DNA(ng)
final product	94.40	94.60	94.50	22	2079

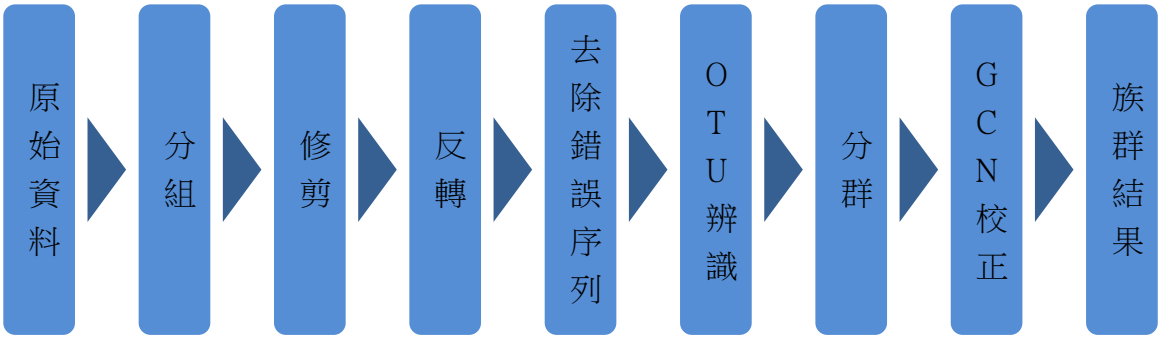
由表九最終樣品測定結果可得知，最終樣品內 DNA 含量達到 2μg，且濃度幾乎為 100 ng*μL^{-1}，符合送定序所需的數值。

(九) PacBio PhyloTags 16S rDNA 定序與分析

將 15 組 DNA sample 送交 PacBio 進行 16S rDNA 第三世代定序。

送回之定序結果 raw data，先利用 putty 程式進行 OTU 分群，各步驟如圖十三所示。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。



圖十、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：

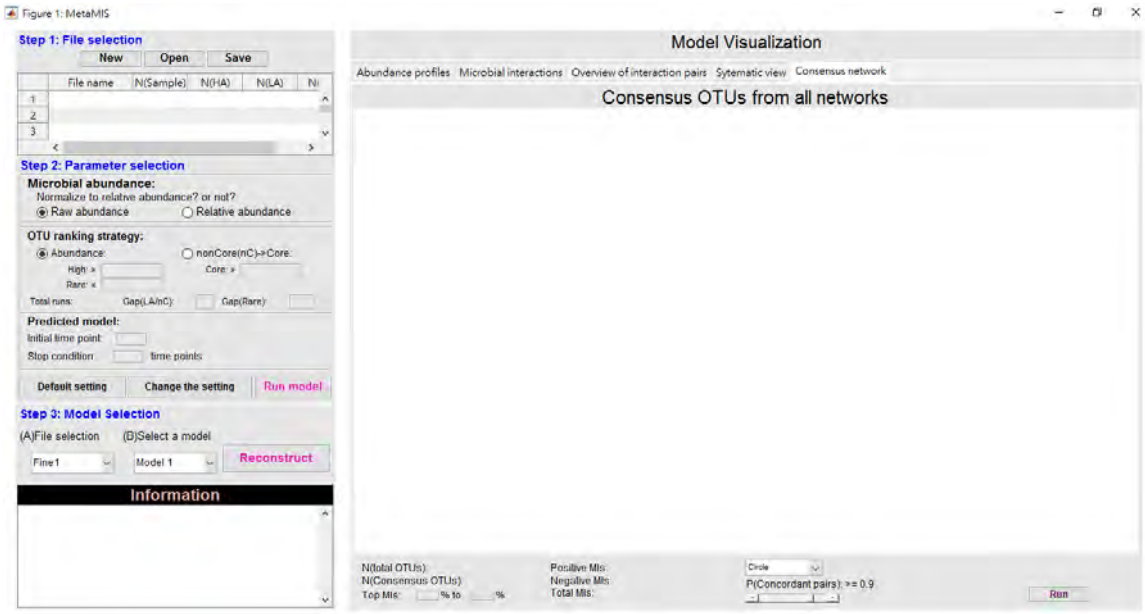
1. 某些物種間的基因序列相似程度 >97%，分類後的 OTU 將包含多個物種。
2. 單一物種可能含有序列相似度 <97%的旁系同源基因，會造成物種被區分至多個不同的 OTU。

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。

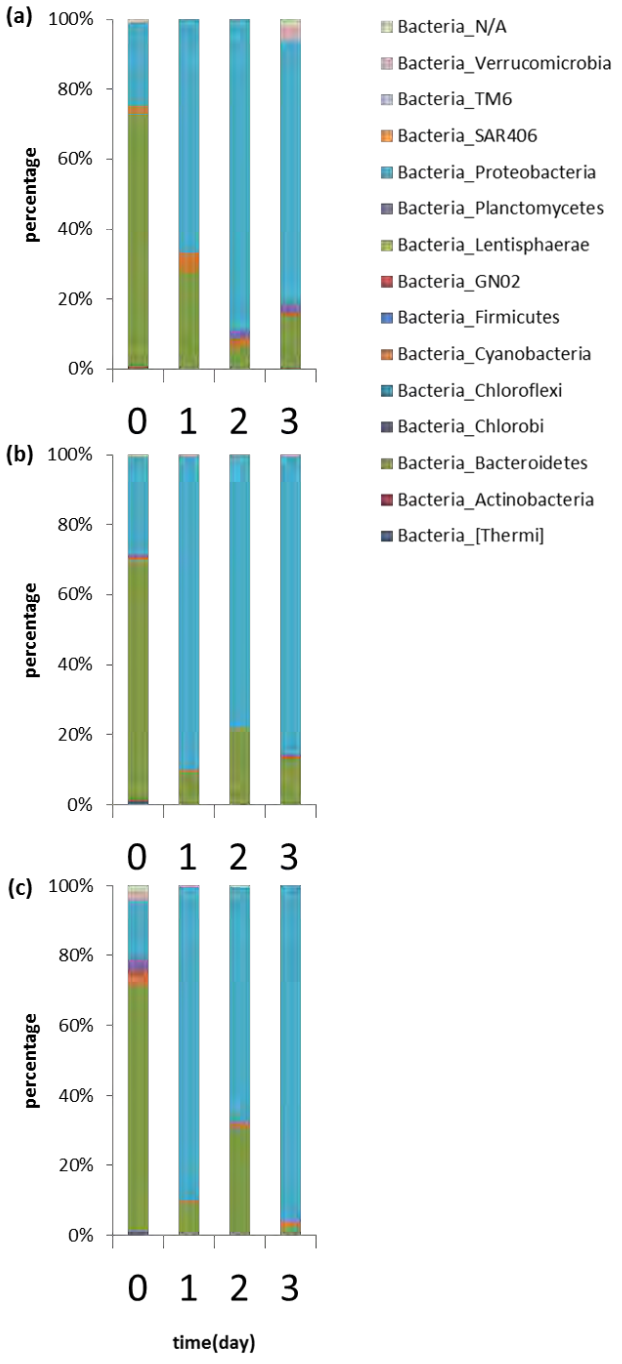
在軟體參數的設定方面，本研究是以 Relative abundance 來進行分析，Abundance High>0.01、Abundance Rare<0.0001；Gap(LA/nC):1、Gap(Rare):2，而 Stop Condition: 58 time points(見圖十一)。



圖十一、MetaMIS 介面

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 的數據來進行群聚感應的探討。

參、研究結果與討論



圖十二、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。

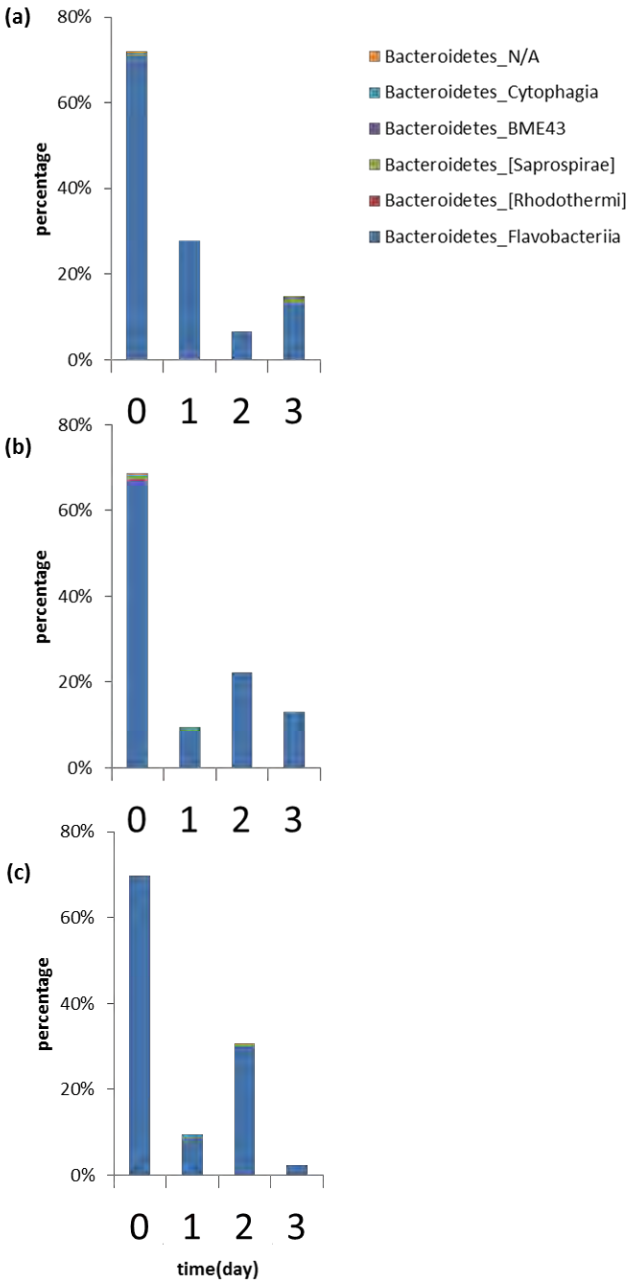
本實驗經過採樣、抽 DNA、16S rDNA 的 PCR 增幅、定序等步驟後，共計定序了 4033 株菌，刪除重複的菌後，共得到 651 種菌。由於 A1/3、B1/3 定序失敗，故往後的分析捨棄 Day1/3 的數據；另外，由於 B1 定序失敗，但其結果理論上與 C1 相同，所以在結果中 B1 的數據皆由 C1 代替，藉此進行分析。

(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。從圖十二可看出，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，*Bacteroidetes*、*Proteobacteria* 此二門微生



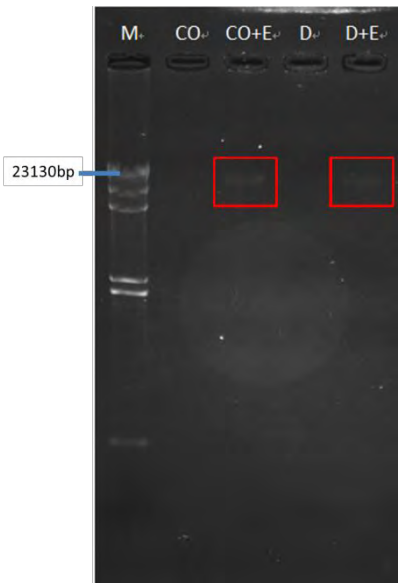
圖十三、海水與原油環境中 *Bacteroidetes* 各綱比例.. (a)為海水樣本 A、(b)為原油樣本 B、(c)為原油+散油劑樣本 C。樣本中無法辨別綱之分類階層的微生物，以 N/A 表示之。

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。

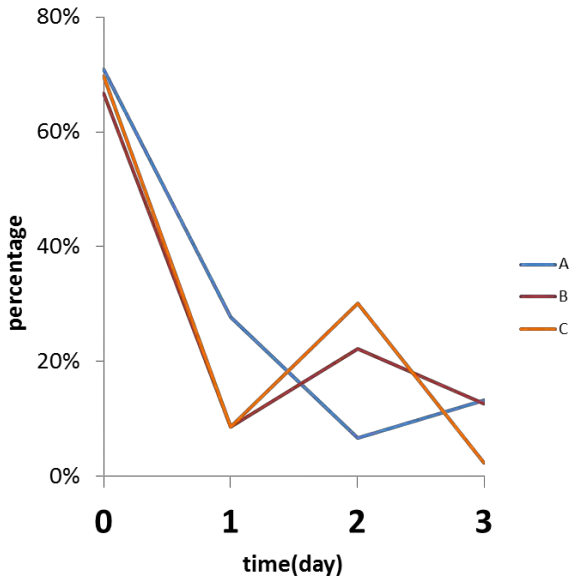
另外，由圖十二亦可看出，剛加入原油的海水樣本(B0、C0)，其微生物多樣性較海水來的高。然而經測試得知原油內並無微生物存在(見圖十四)，故推測在原油洩入海水的瞬間，即有即時性的變化。

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(見圖十三)。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(見圖十五)，此目中又以 *Flavobacteriaceae*、*Crymorphaceae* 兩科為多(見圖十六)。



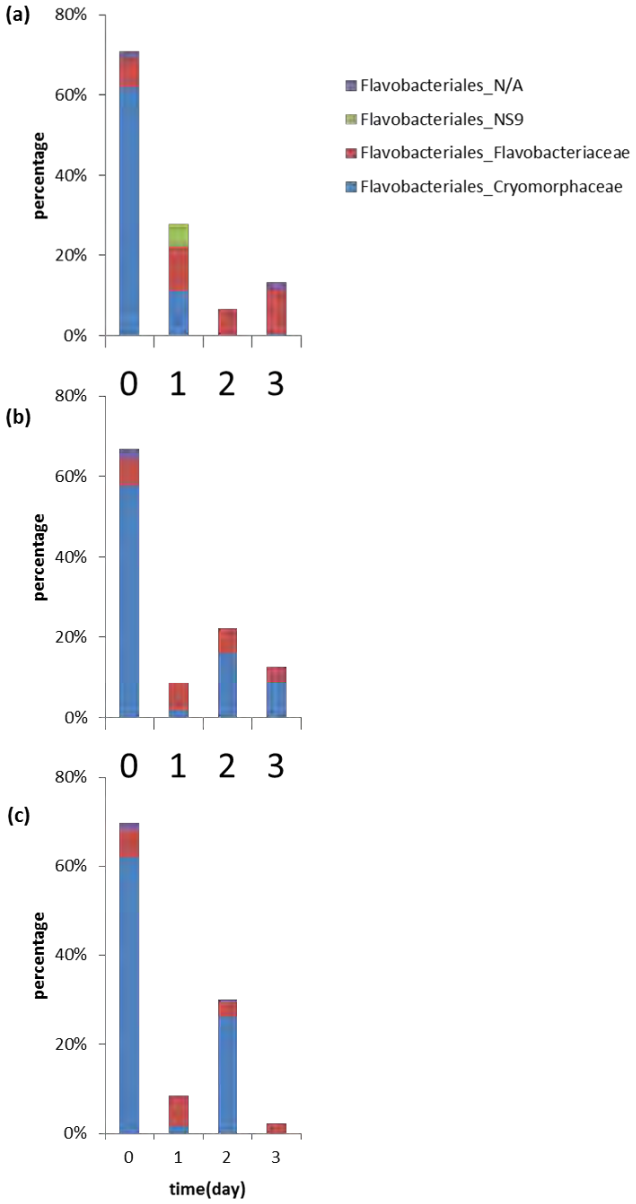
圖十四、原油和散油劑中微生物測試. M 為 Marker、CO 為原油、D 為散油劑、E 為 E. coli DNA。圖中可發現加入 E. coli DNA 的原油或散油劑皆有 DNA 表現出(紅色方框中)，原油或散油劑單獨存在時則無，故推測原油與散油劑內皆無微生物存在。



圖十五、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，*Crymorphaceae* 多生長於有機碳豐富的海洋、鹹水等環境。由圖十六發現，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 *Crymorphaceae* 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。



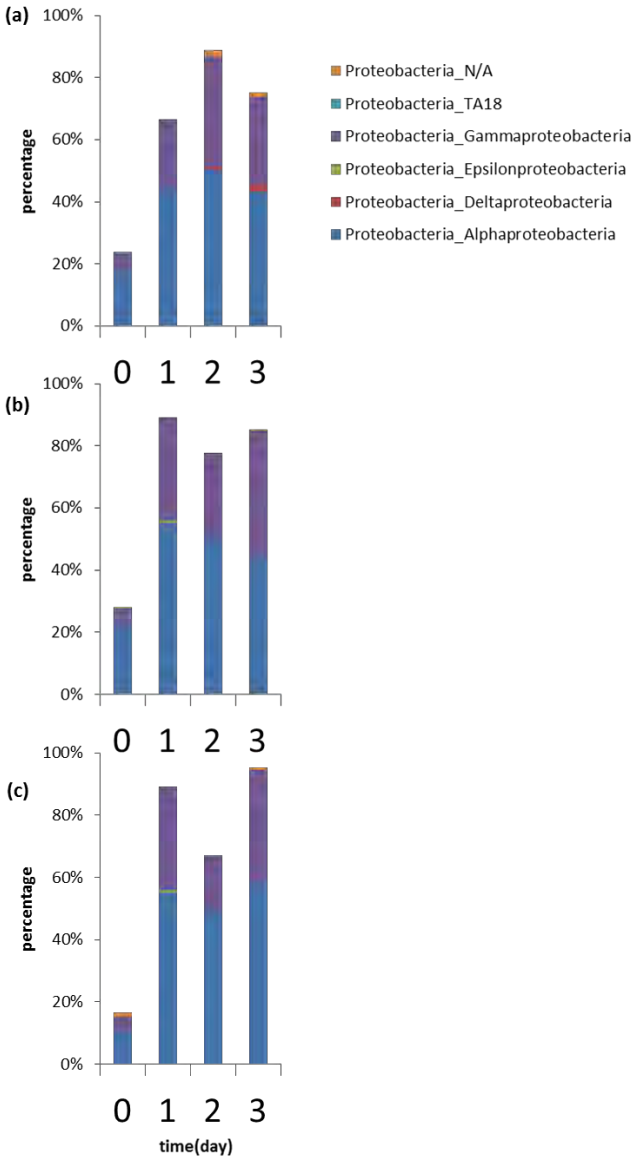
圖十六、海水與原油環境中 *Flavobacteriales* 各科比例. (a)為海水樣本 A、(b)為原油樣本 B、(c)為原油+散油劑樣本 C。樣本中無法辨別科之分類階層的微生物，以 N/A 表示之。

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(見圖十七)。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。

圖十七中亦可發現，唯獨海水樣本有 *Deltaproteobacteria* 的出現，且會隨時間增長。推測此綱微生物無法生存在原油環境中。而在閱讀他人研究後得知此綱的部分微生物可以還原硫酸鹽類以獲得能量，關於此部分的關係，值得再探討。

進一步分析 *Alphaproteobacteria* 此綱後發現，在樣本中普遍呈正成長的趨勢(見圖十八)。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。圖十八中可觀察到，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

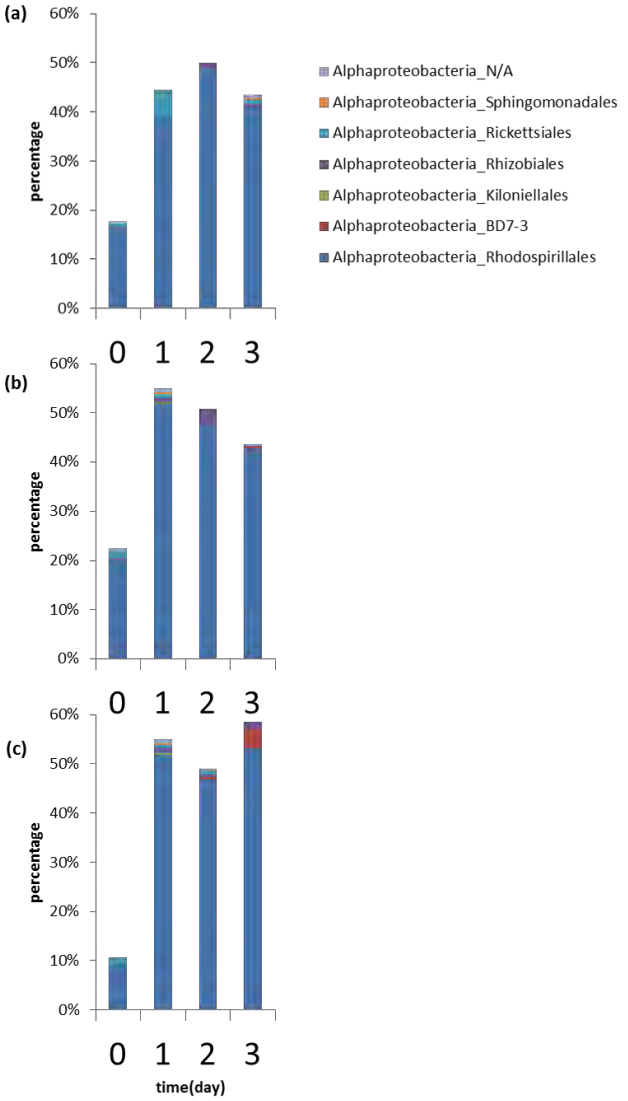


圖十七、海水與原油環境中 *Proteobacteria* 各綱比例. (a)為海水樣本 A、(b)為原油樣本 B、(c)為原油+散油劑樣本 C。樣本中無法辨別綱之分類階層的微生物，以 N/A 表示之。

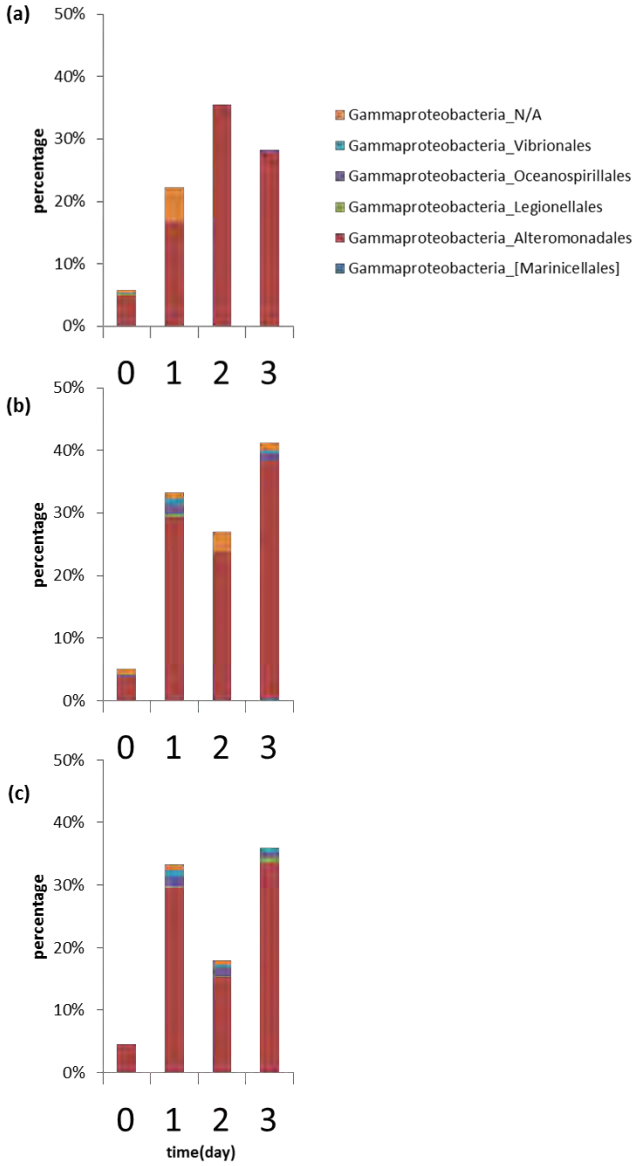
容易溶於海水中，故使 C 樣本較 B 樣本更早出現 *BD7-3* 此目微生物。由於降解過程中，原油是否能溶解是一大重要因素，而此目微生物的生長與原油的溶解速率具正向關係，因此我們認為 *BD7-3* 可能具有降解原油的潛力。

另一方面，分析 *Gammaproteobacteria* 後發現，此綱微生物隨時間普遍呈正成長的關係(見圖十九)。而其在 Day2 時，有與 *Bacteroidetes* 相反的變化趨勢：比例在 A 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 *Bacteroidetes* 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*，由圖十九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，值得進一部探討其作為降解原油的群聚感應一環的角色。



圖十八、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。

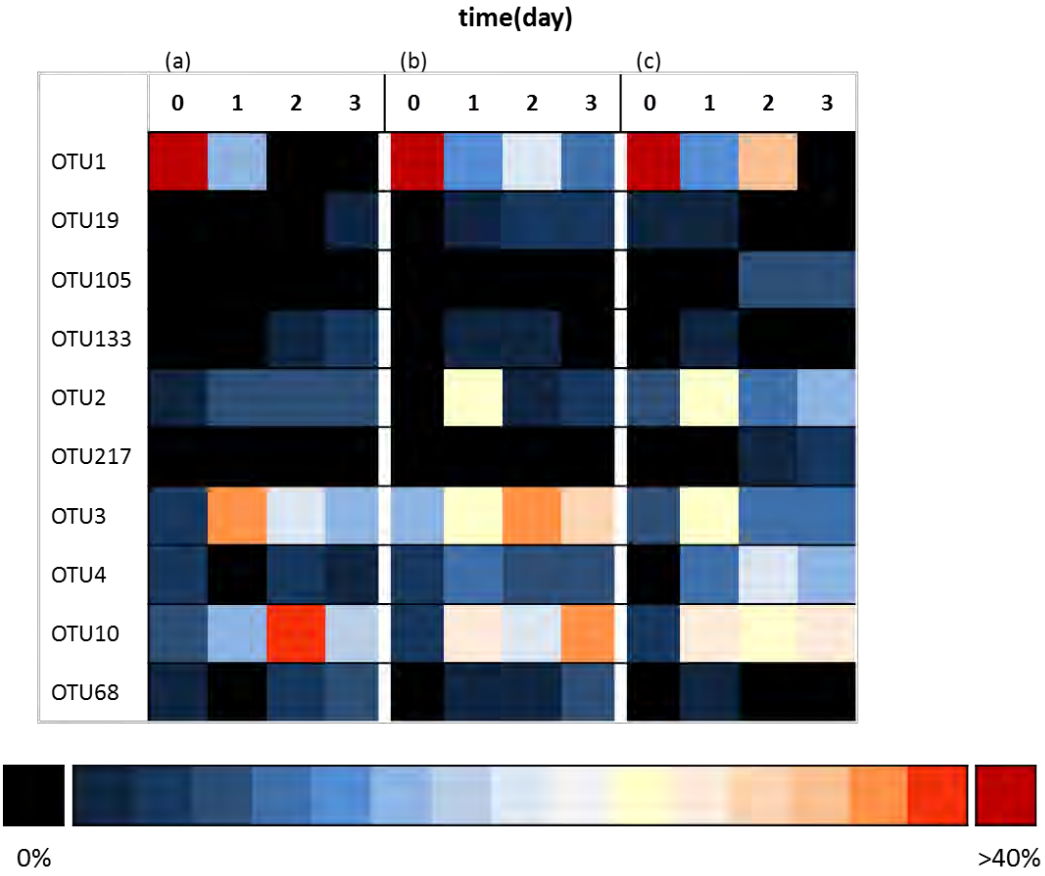


圖十九、海水與原油環境中 *Gammaproteobacteria* 各目比例. (a)為海水樣本 A、(b)為原油樣本 B、(c)為原油+散油劑樣本 C。樣本中無法辨別目之分類階層的微生物，以 N/A 表示之。

4. OTU 分析

我們取占全部 OTU 中比例最高的前十個進行分析(見圖二十)。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。



圖二十、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，OTU10 有著與 OTU1 相反的變化趨勢：比例在 A 樣本中於 Day2 時來到

最高，但在 B 與 C 樣本中則來到極小值，其中可能有負向的交互作用。另外，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。

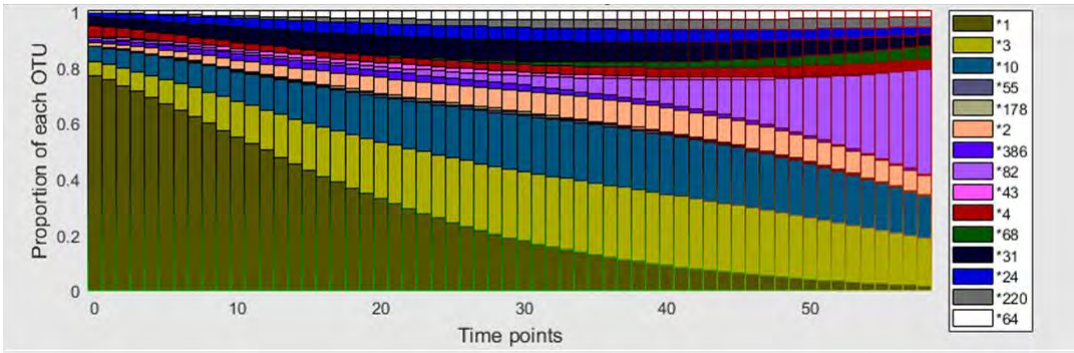
OTU19、OTU3、OTU68 則在加入散油劑後有受抑制的現象。圖中可看出 C2 的 OTU19、OTU3、OTU68 比例皆較 C1 掉了不少。OTU3、OTU68 在原油環境中皆普遍呈現上升的趨勢，然在加入散油劑後，便較原本原油環境的比例跌下許多，並隨時間呈負成長；OTU19 則是在原油環境下比例穩定，但加入散油劑後比例便直接下掉。這三種微生物，應是適應原油的微生物，且會受散油劑的加入而遭抑制，而它們是否具有降解原油的能力，還有待進一步的研究。

(二) 微生物交互作用

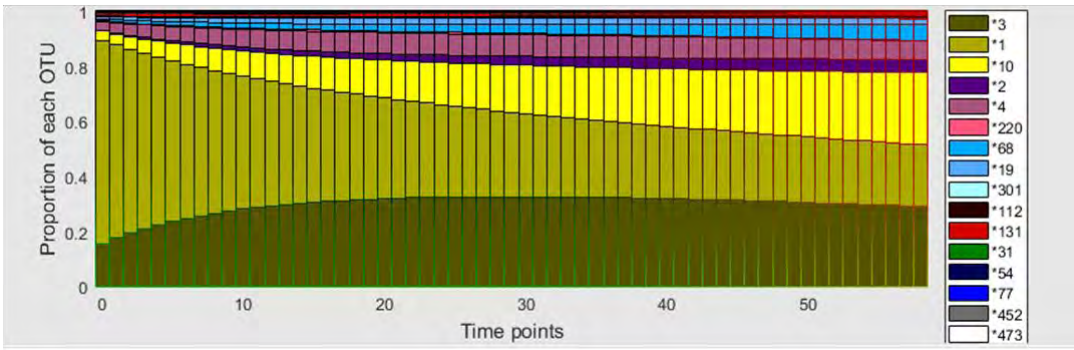
1. Predicted Abundance Profile

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(見圖二十一)。

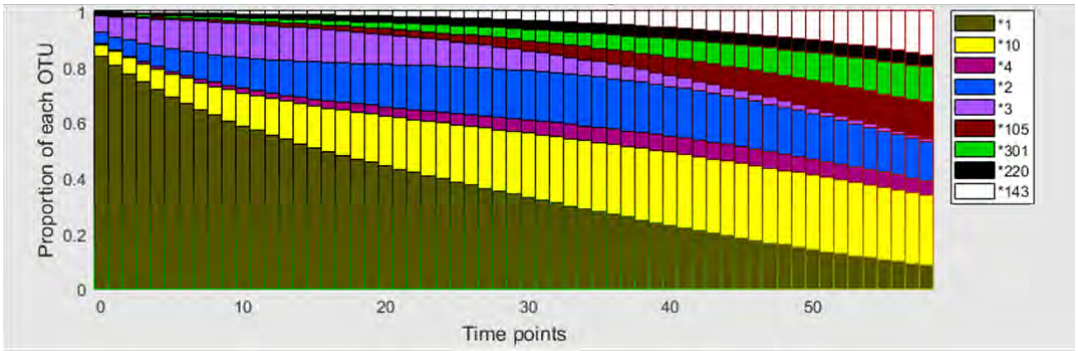
(a)



(b)



(c)



圖二十一、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 數值接不低。因此這個結果是作為參考的依據，會配合圖二十一起進行分析。

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。圖二十中可得知在 B 與 C 樣本中的 Day2 會有突然攀升的情況，但在圖二十一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、OTU2 最佳生長的時間點是在 30-50hr 左右，所以如果發現其有降解原油的潛力，於此區間中將有較佳的效率。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。

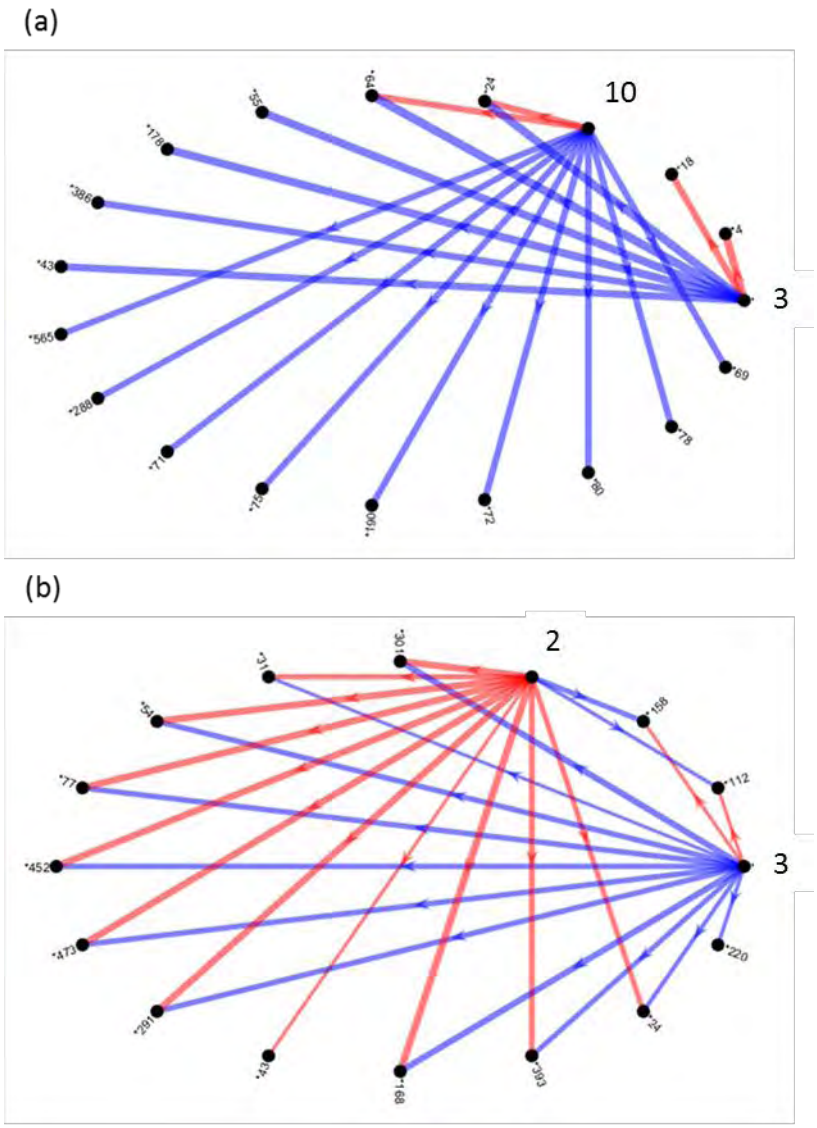
B 樣本中，OTU3 與 OTU10 皆有比例上升的情況。不同的是，OTU3 與約 20hr 後達穩定狀態，比例無甚起伏。配合 Interaction Pairs 的結果可以發現，OTU3 對於某些細菌有強烈片利共生(+/0)的效果，亦對多數微生物有競爭(-/-)的現象，推測其生長可能是造成其他 OTU 比例下降的原因。OTU10 的比例則是隨時間演變緩慢上升。

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，

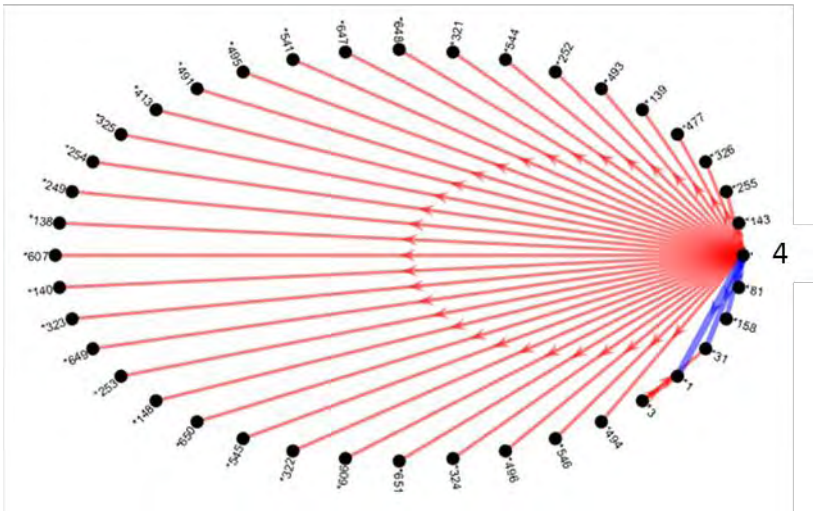
在 B 中表現量穩定的 OTU3 在加入散油劑後比例下降，顯示其可能受散油劑抑制，或是受因散油劑而成長之 OTU 的抑制。

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(見圖二十二)。我們選擇分析的 Top MIs: 0%-0.125%，P(Concordant pairs)≥0.95。



(c)



圖二十二、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。

從圖二十二中可以大致發現，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。

在 OTU 分析的討論當中，我們提出 OTU1 與 OTU10 有著負向交互作用的關係，然而經過此分析與 Microbial interactions 的分析後，我們發現此二種微生物存在的是偏弱的正向交互作用。因此我們認為此中應有第三者扮演促進一方並抑制另一方的角色，且其影響力偏強，但至於是何種微生物，則還需近一步的研究。

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%)而 OTU3 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%)。

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，在原油汙染後期(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 italic* (OTU4)在原油+散油劑的環境下，能幫助 OTU143 適應該環境，具有配合化學性除油法的潛力。

二、未來展望

1. 測量氮源在海水樣本中的含量，討論含氮量是否會限制原油受微生物的降解率以及其對微生物降解的實際影響。
2. 透過 OTU2、OTU3、OTU4 和 OTU10 的培養，及微生物生長曲線與原油降解率的觀測，來驗證微生物的群聚感應與降解原油的關聯性。
3. 以 SPE-HPLC 分析原油降解後的產物及內含有毒物質 PAH(萘(Naphthalene)、菲(Phenanthrene)、芴(Flourene)、䓛(Chrysene))，評估對生態環境的影響。

伍、參考文獻

1. 徐伯安. (民 95). **變性梯度膠電泳(DGGE)技術在環境微生物多樣性與污染整治上的研究與應用**(碩士論文). 國立中山大學生物科學系.
2. Christoph Gertler, Peter N. Golyshin, Daniela J. Nather. (2012). *Composition and dynamics of biostimulated indigenous oil-degrading microbial consortia from the Irish, North and Mediterranean Seas: a mesocosm study.* FEMS Microbiol Ecol, 81, 520 – 536.
3. D. R. Arahal, M. C. Macian, E. Garay, M. J. Pujalte. (2005). *Thalassobius mediterraneus gen. nov., sp. nov., and reclassification of Ruegeria gelatinovorans as Thalassobius gelatinovorus comb. nov.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55, 2371 – 2376.
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. E. Węgrzyn, S. Grześkiewicz, W. Popławska, B. K. Głód. (2006). *Modified Analytical Method for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Using SEC for Sample Preperation and RP-HPLC with Fluorescence Detection.* Meat and Fat Research Institute, ul. Jubilerska 4, 04-190 Warszawa, Poland.
6. 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.
7. Joel E. Kostka, Om Prakash, Will A. Overholt, Stefan J. Green, Gina Freyer, Andy Canion, Jonathan Delgardio, Nikita Norton, Markus Huettel. (2011, November). *Hydrocarbon-Degrading Bacteria and the Bacterial Community Response in Gulf of Mexico Beach Sands Impacted by the Deepwater Horizon Oil Spill.* Applied and Environmental Microbiology, 7962 – 7974.
8. 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.

9. Manolito G. Torralba, Andres Gomez, Shibu Yooseph, Karen E. Nelson, James S. Franks. (2017). *Effect of Macondo Prospect 252 Oil on Microbiota Associated with Pelagic Sargassum in the Northern Gulf of Mexico.* Microb Ecol, 73, 91 – 100.
10. Maria Genovese, Francesca Crisafi, Renata Denaro, Simone Cappello, Daniela Russo, Rosario Calogero, Santina Santisi, Maurizio Catalfamo, Francesco Smedile, Lucrezia Genovese, Michail M. Yakimov. (2014, April 14). *Effective bioremediation strategy for rapid in situ cleanup of anoxic marine sediments in mesocosm oil spill simulation.* Frontiers in Microbiology, Volume 5, Article 162.
11. Pirson, S.J. (1977). *Oil Reservoir Engineering.* 303 – 304. Huntington, New York: Robert E. Krieger Publishing.
12. Regina Lamendella, Sharon Borglin, Romy Chakraborty, Neslihan Tas, Steven Strutt. (2014, April 03). *Assessment of the Deepwater Horizon oil spill impact on Gulf coast microbial communities.* Frontiers in Microbiology, Volume 5, Article 130.
13. Rob J. W. Brooijmans, Margreet I. Pastink, Roland J. Siezen. (2009). *Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew.* Microbial Biotechnology, 2(6), 587 – 594.
14. Romy Chakraborty, Sharon E. Borglin, EricA. Dubinsky, Gary L.Andersen, Terry C. Hazen2. (2012, October 11). *Microbial response to the MC-252 oil and Corexit 9500 in the Gulf of Mexico.* Frontiers in Microbiology, Volume 3, Article 357.
15. 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.
16. Teresia Umi Harwati, Yuki Kasai, Yumiko Kodama, Dwi Susilaningsih, Kazuya Watanabe. (2007, January). *Characterization of Diverse Hydrocarbon-Degrading Bacteria Isolated from Indonesian Seawater.* Microbes and Environments, 22(4), 412 – 415.

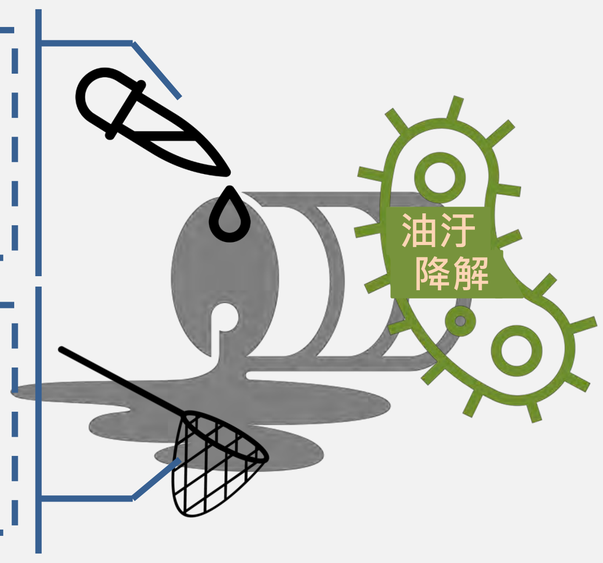
【評語】052002

本研究是以油汙環境下微生物群聚感應為主軸，探討以生物性方式處理海洋原油問題的可行性。作者分析海水油汙環境中微生物群聚感應與生物降解。探討微生物之間的交互作用，並發現海水中一株 Rhodobacteraceae 科的細菌大量存在與抑制它種菌的特性，可能是導致現實生活中生物性除油法無效的原因，立意佳，具有創新性。由目前之結果分析，確實看到一些微生物在油汙環境的消長。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。仍需有更多實驗數據佐證以支持假說。

作品海報

研究動機

- **化學性方法：**
  - ✓ 燃燒、化學藥劑
  - ✓ 二次汙染嚴重
- **物理性方法：**
  - ✓ 打撈、吸附...
  - ✓ 效率低(約10%)



So...WHAT's the problem?

➢ 油汙降解菌在實際中與環境微生物的競爭！

前人研究

- ✓ 從海水中分離可降解原油的細菌
- ✓ 基改出超強細菌
- ✓ 油汙降解菌混合

?

本研究

- ✓ 從海水中的微生物群聚感應出發
- ✓ 透過菌種交互作用提高降解潛力

研究背景

1. 散油劑：
- ✓ 界面活性劑
- ✓ 將大片油汙乳化為小油滴分子，以利生物分解
- ✓ 對環境會造成二度傷害

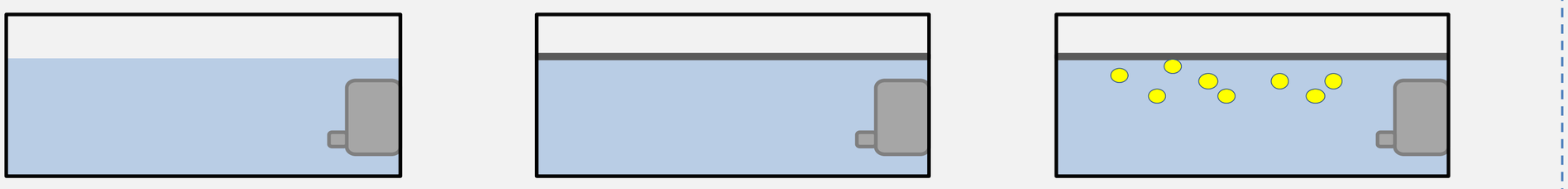
2. 群聚感應：
- ✓ 與生物數量多寡相關的刺激與反應系統
- ✓ 在探討多種生物間的交互作用與相互溝通

3. PacBio Phylo Tags (第三世代定序)：
- ✓ 原核生物的16S rDNA在演化的過程中不易改變，可用在菌種鑑定
- ✓ 能進行全序列(full length)定序，故在分析微生物複雜的交互作用中具其潛能

研究過程及方法

海水環境模擬培養 → 表層海水取樣 → 樣本抽氣過濾

A組：海水 / B組：海水+原油 / C組：海水+原油+散油劑



萃取DNA： 破壞脂質膜 → 去除RNA → 去除蛋白質 → 聚集DNA → 溶解雜質 → 離心分層 → 取上清液 → 沉澱DNA → 離心分層 → 取pellet → 風乾 → 回溶 → 膠體電泳檢測

16S rDNA FL PCR： Primer-27F, Primer-1492R → PCR mixture → PCR ×30 → PCR product → 膠體電泳檢測 → 膠體電泳 → 切膠 → 純化DNA

DT-PCR： Primer-27F, Primer-1492R +barcode → PCR mixture → PCR ×5 → PCR product → 膠體電泳檢測 → 膠體電泳 → 切膠 → 純化DNA

濃度測定： Nanodrop → Qubit → 樣本混合 → PCR樣品純化 → Nanodrop → Qubit

Pyhlo Tags 定序： 序列相似度97%以上，視為同一OTU

以下假設同一個OTU為同一種菌

定序結果整理： OTU 分群 → 分類階層分群 → 優勢菌種 / 特殊適應菌種 判斷 → NCBI blast

交互作用分析： MetaMis軟體交互作用分析

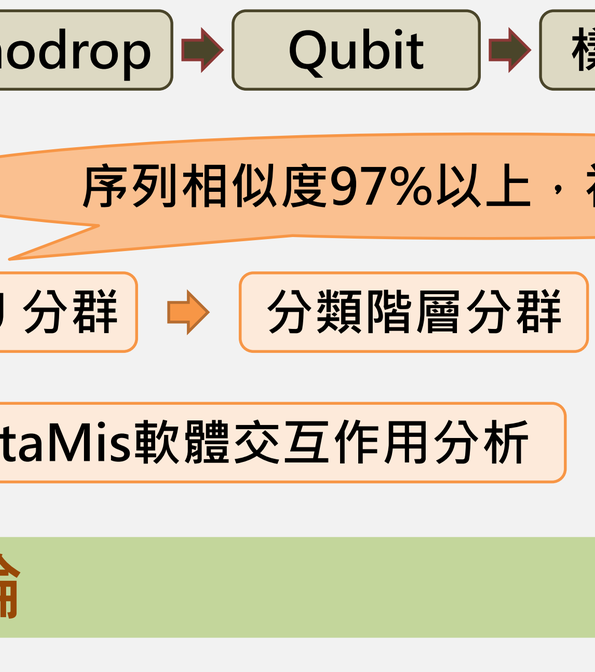
研究結果與討論

1.膠體電泳檢測結果

1) DNA 萃取的檢測

由左至右：
Marker、樣品*4

2) 16S FL PCR 的檢測



由左至右：
Marker、Positive、Negative、樣品*8

→ 此結果顯示DNA萃取與PCR皆成功

2.濃度測定結果

1) 最終樣品的Nanodrop測定結果

sample	conc.(ng*μL^{-1})	260/280	260/230
final product	121.1	1.87	2.11

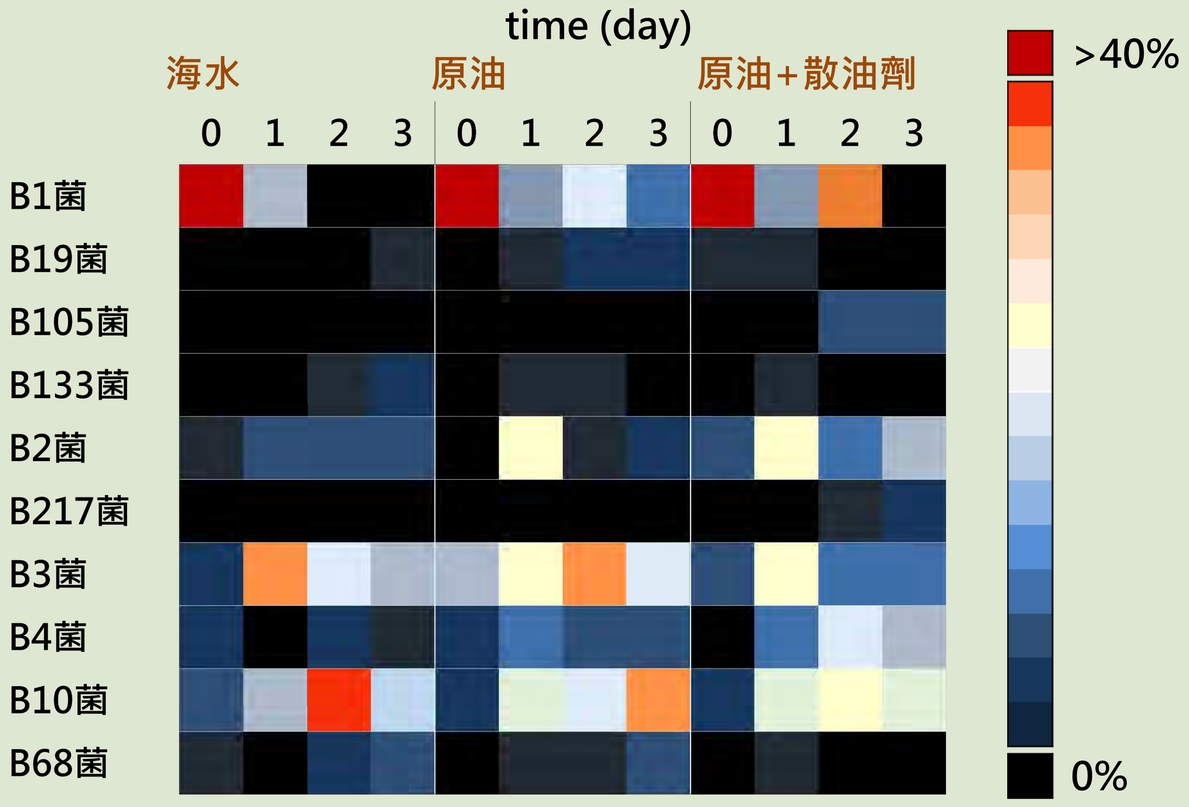
2) 最終樣品的Qubit測定結果

sample	conc. (ng*μL^{-1})	Volume (μL)	total DNA (ng)
final product	94.50	22	2079

→ 此結果顯示樣品的DNA純度與總量皆符合定序所需

3.定序結果整理分析

OTU分析 (Top 10)



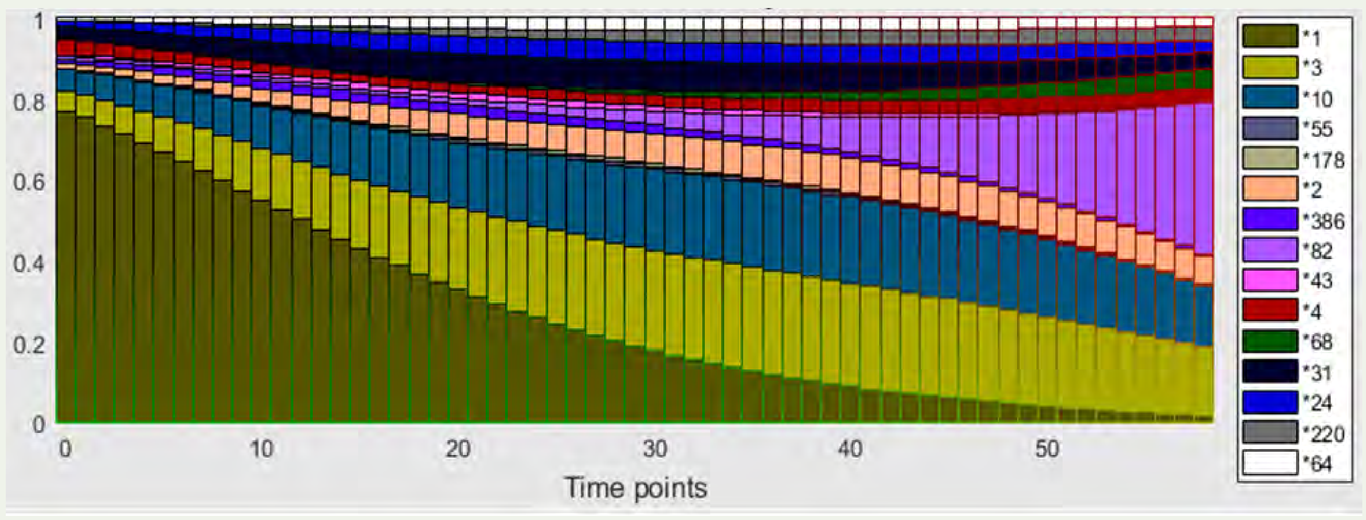
圖一、海水與原油環境中前10大OTU比例.

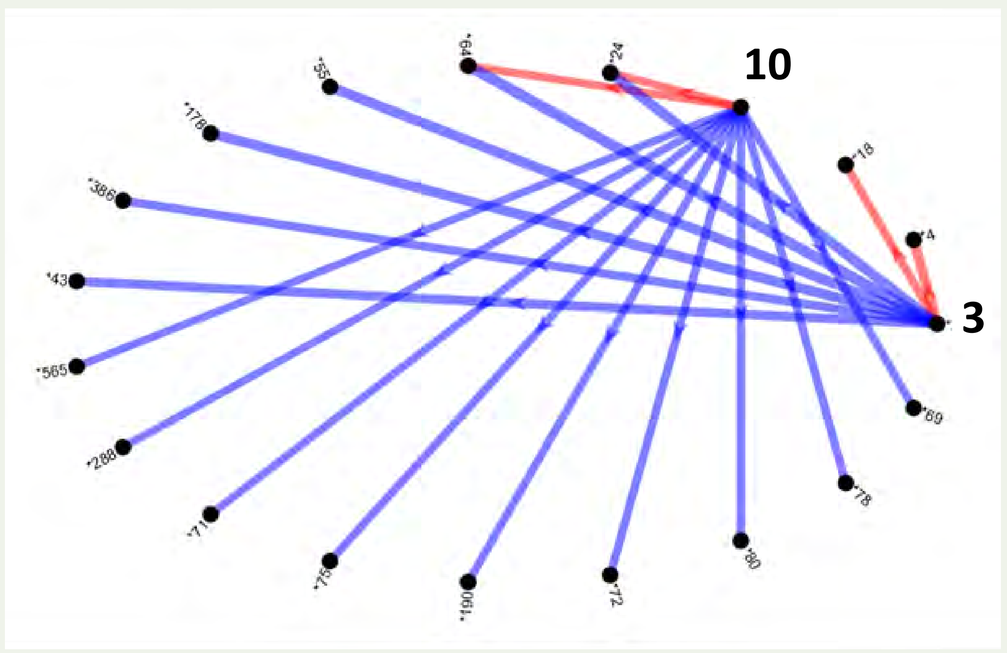
(a)為海水樣本A、(b)為原油樣本B、
(c)為原油+散油劑樣本C。

- ✓ B1菌在有機碳豐富的海水環境中會大量出現
  1. 在A樣本中隨時間大幅度的減少
  2. 在B、C樣本中皆在Day2時比例升高
- ✓ B1、B10有相反的變化趨勢
- ✓ B105、B217、B4在加入散油劑後比例上升
- ✓ B19、B3、B68在加入散油劑後有受抑制現象

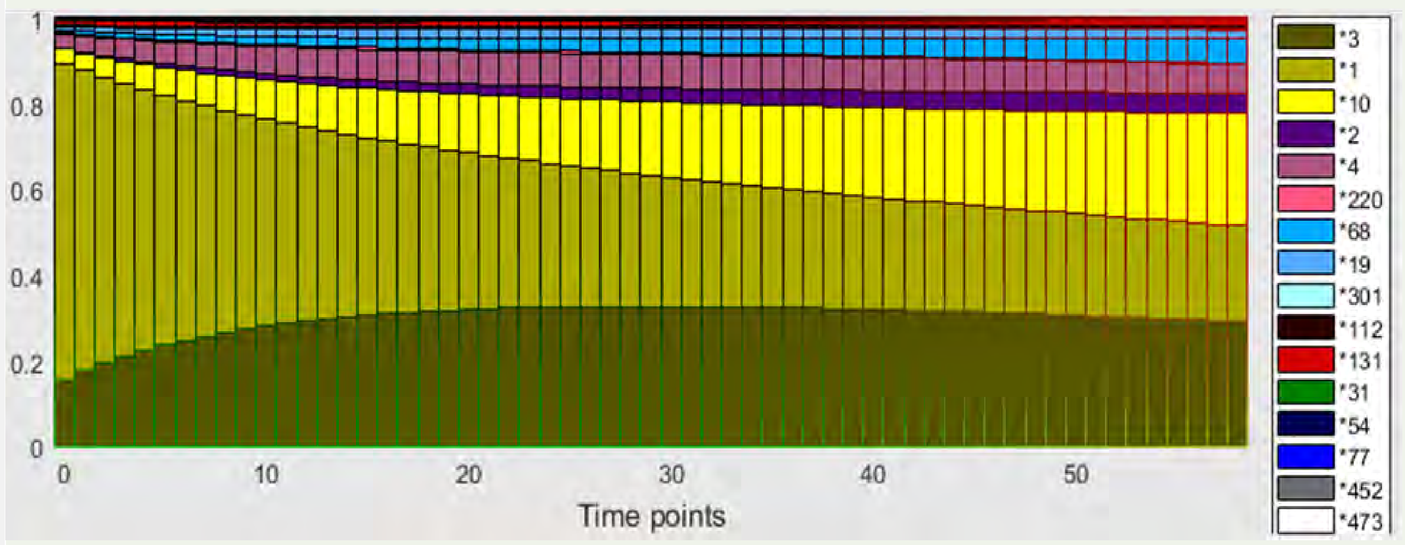
4.群聚感應討論

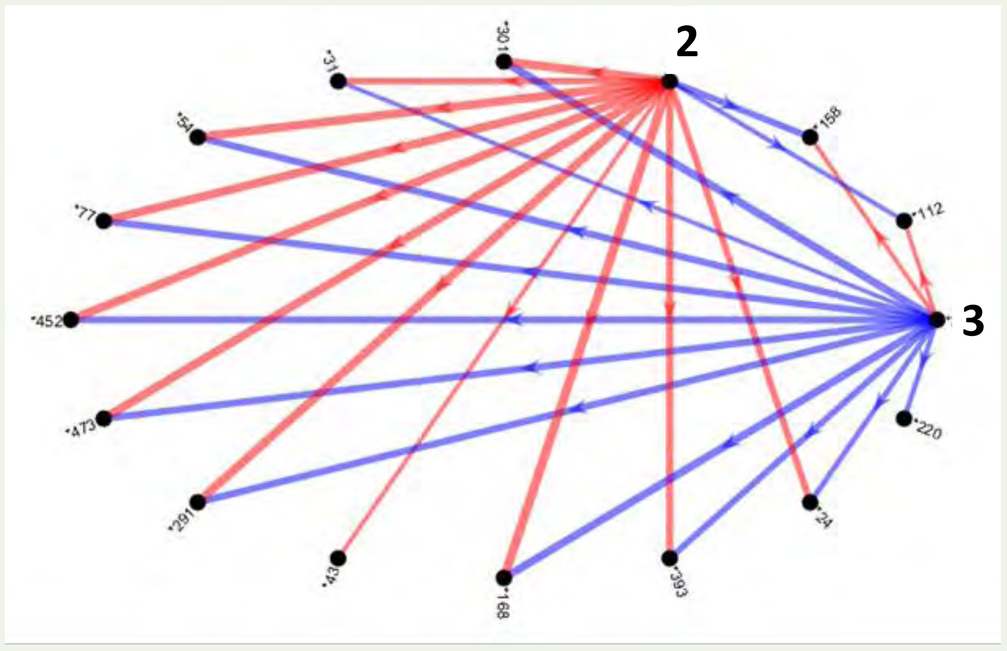
海水



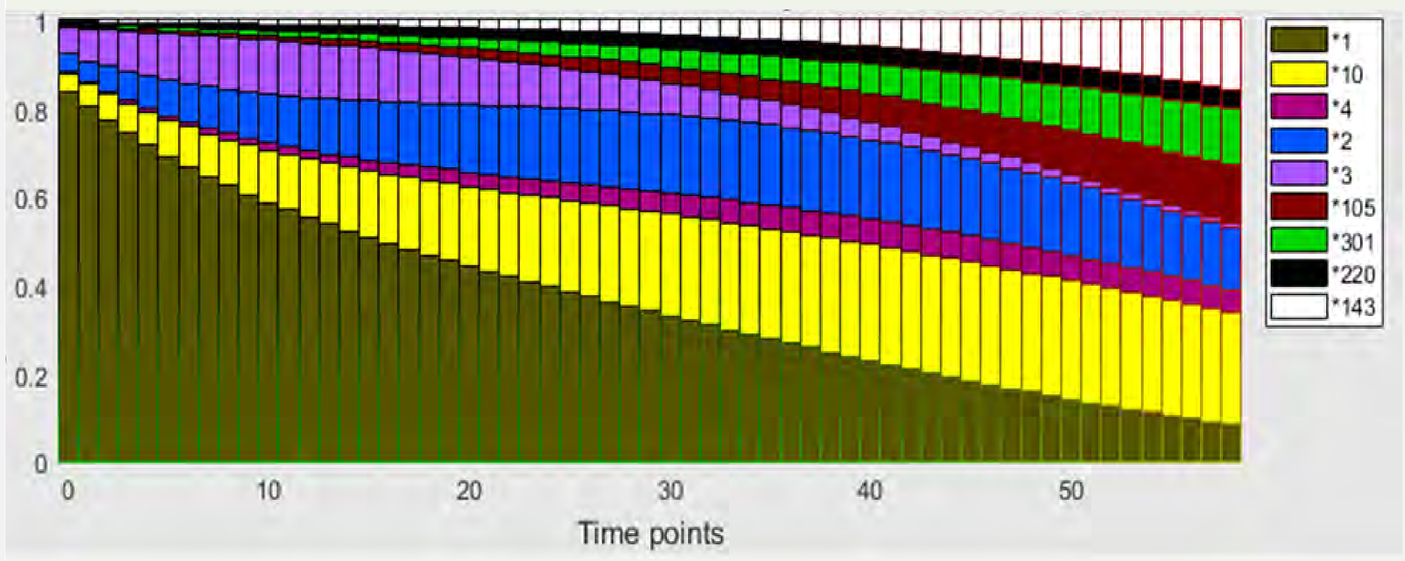


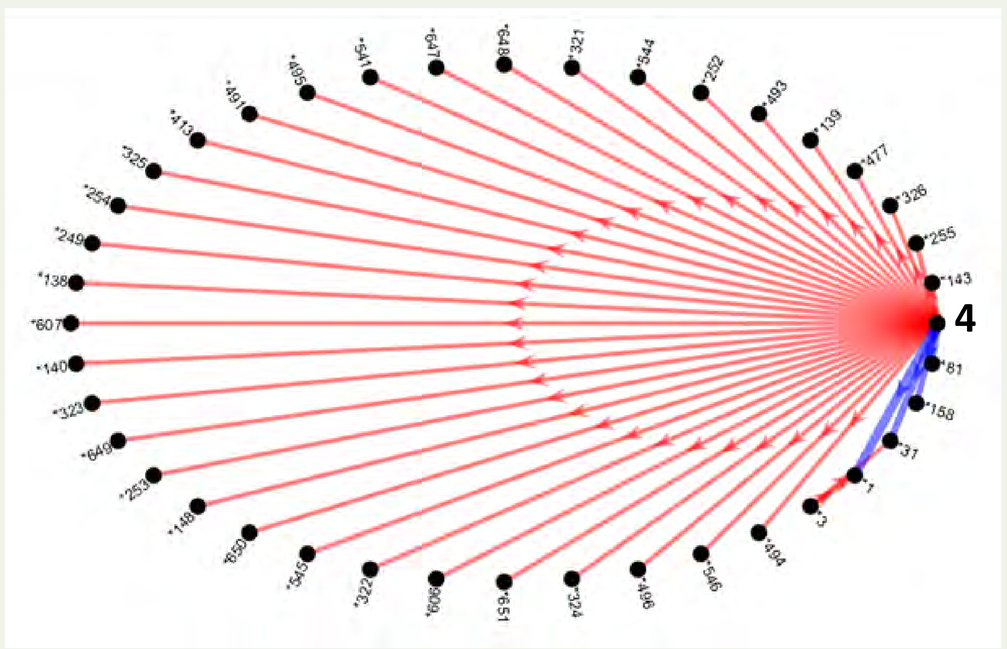
原油





原油+散油劑





圖二、環境中微生物消長情形模擬.

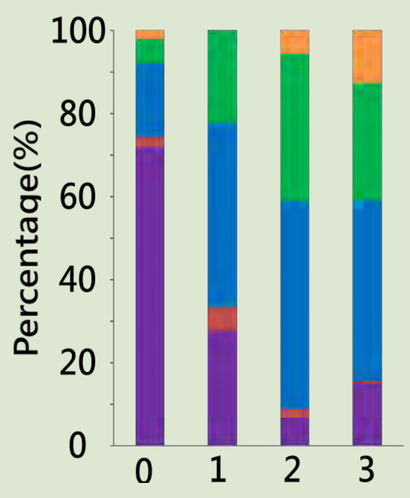
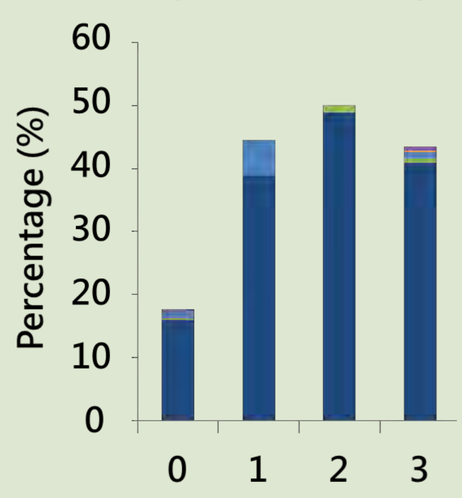
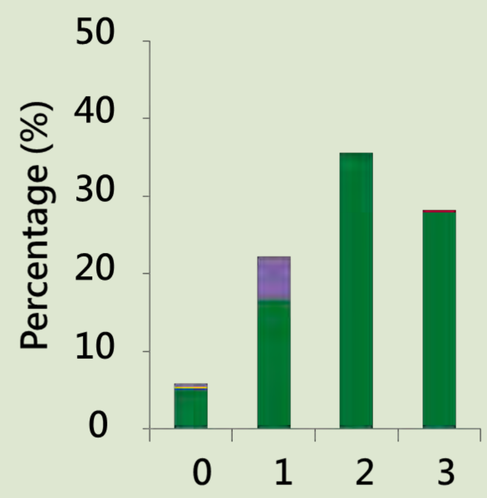
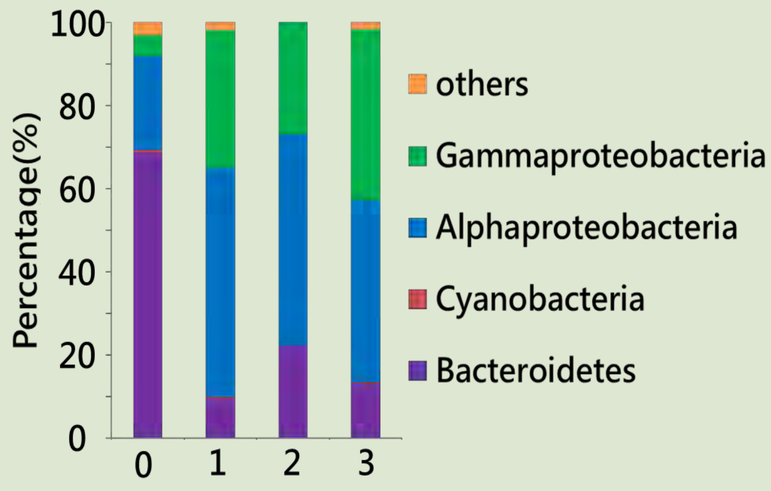
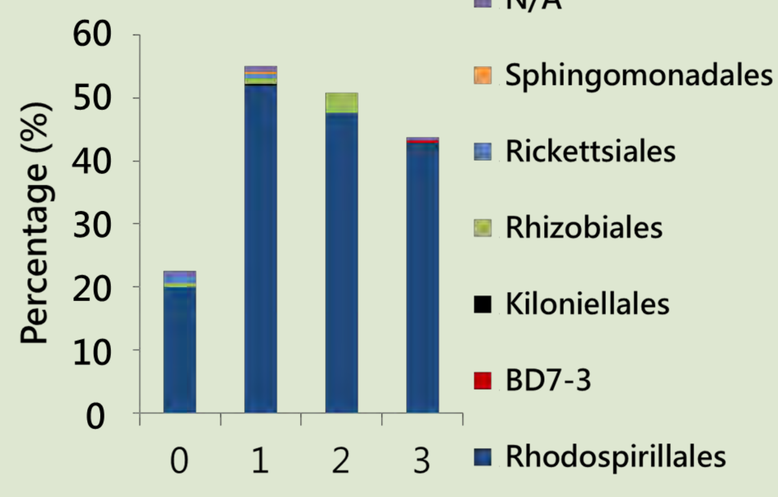
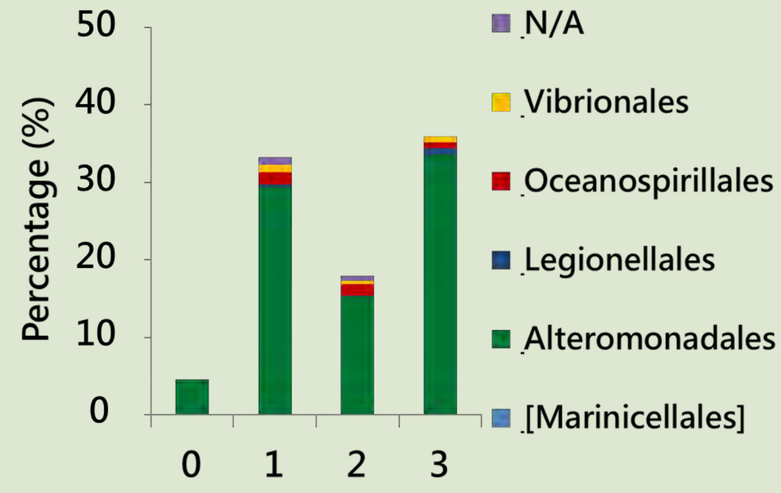
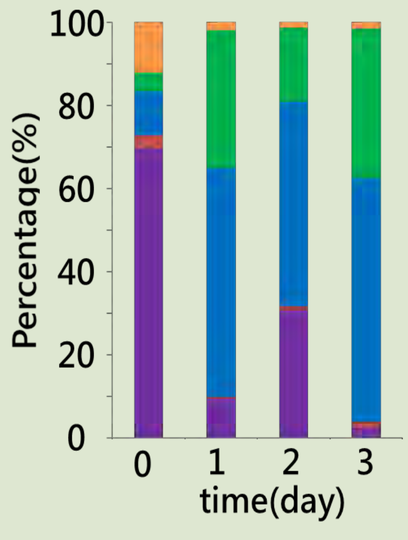
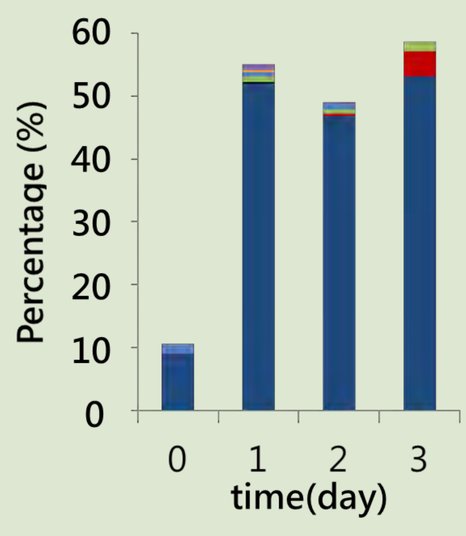
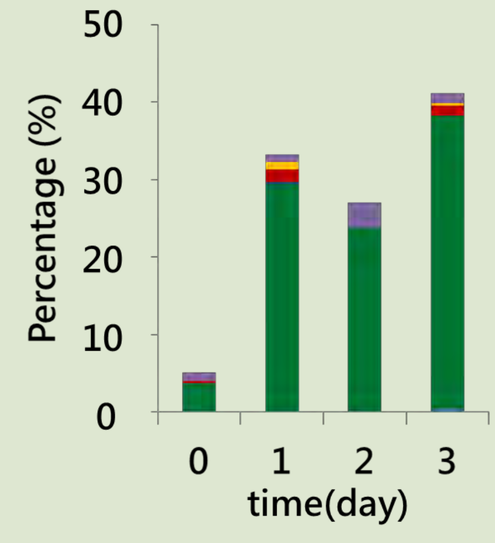
X軸為時間點，單位為hr；Y軸為該種菌的比例。

圖三、環境中微生物交互作用模擬.

紅色箭頭代表正面影響，藍色箭頭代表
負面影響；箭頭由源頭指向對象。

- ✓B2菌在原油環境中扮演輔助者的角色 / 在原油+散油劑環境下無甚影響力
- ✓B3菌適應海水、原油環境的能力強，且皆扮演負面阻礙者的角色 / 在原油+散油劑環境下，適應能力下降，負面影響力亦然
- ✓B4菌在原油+散油劑環境中扮演輔助者的角色
- ✓受B4菌正面影響，B143可以在原油+散油劑環境中適應良好

5.菌種階群分析

(1-1) *Bacteria*	(2-1) *α-proteobacteria*	(2-2) *γ-proteobacteria*
海水  	海水  	海水 
原油  	原油  	原油 
原油+散油劑  	原油+散油劑  	原油+散油劑 
圖四、海水與原油環境中微生物比例	圖五、海水與原油環境中 *α-proteobacteria*各目比例.	圖六、海水與原油環境中 *γ-proteobacteria*各目比例.
✓海水、原油、原油+散油劑中，以*Proteobacteria* 門的生物與為多	✓ *BD7-3* 的生長與小油滴分子數量呈正關係	✓ *Vibrionales* 與 *Oceanospirillales* 只存在於原油環境中

結論與應用

本研究發現了生物群聚與物質降解之間可能的相關性，提出一套與過往研究不同的想法。不同於過去探討單一菌的降解潛力，我們以菌種的交互作用為基礎，分析在現實環境中會影響油汙降解菌生長的微生物，並提出有別以往的新興生物除油法。

探討單一菌降解潛力 → 實驗室中可行 → 環境中影響因子的干擾 ✗ → 生物降解法可以在現實環境中使用

透過環境模擬分析菌種比例 → 模擬消長與交互作用 → 增加海水B2菌比例 降低海水B3菌比例 → 生物降解法可以在現實環境中使用

未來展望

1. 透過B1菌、B2菌、B3菌、B4菌和B10菌的培養，及微生物生長曲線與原油降解率的測定，來驗證微生物的群聚感應與降解原油的關聯性。
2. 以SPE-HPLC定量原油降解後的產物及內含有毒物質 — PAH : 萘(Naphthalene)、菲(Phenanthrene)、芴(Flourene)、䓛(Chrysene)的降解效率，評估對生態環境的影響。

參考文獻

1. 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.
2. Teresia Umi Harwati, Yuki Kasai, Yumiko Kodama, Dwi Susilaningsih, and Kazuya Watanabe. (2007). ***Characterization of Diverse Hydrocarbon-Degrading Bacteria Isolated from Indonesian Seawater.*** Microbes and Environments, 22(4), 412–415.
3. Terry J McGenity, Benjamin D Folwell, Boyd A McKew, and Gbemisola O Sanni. (2012). ***Marine crude-oil biodegradation : a central role for interspecies interactions.*** Aquatic Biosystems 2012, **8**:10.