

# 2018 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 070008  
參展科別 微生物學  
作品名稱 迪化汙水處理廠降解雌激素之菌種純化及  
生理測試  
得獎獎項 大會獎：四等獎

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學  
指導教師 江殷儒、賴廷倫  
作者姓名 張雅鈞、李語珊

關鍵詞 雌激素、迪化汙水處理廠、新鞘氨醇桿菌屬

## 作者簡介



我們是李語珊跟張雅鈞，對於不了解的事物會追根究底，十分熱衷於科學。目前就讀於北一女中的數理資優班，因此，讓我們有機會在就學階段即進入實驗室進行研究，學習更多實驗技巧及增進邏輯思考和口語表達，擁有不一樣的高中生活。感謝教授、老師、學長姐及父母，在我們的研究之路上給予我們許多協助及鼓勵，使我們日益精進，未來也會繼續努力使我們的研究更臻完美。

## 摘要

雌激素為一種環境賀爾蒙，若水生動物長期暴露於其中，即會導致其生理及行為異常。我們企圖從迪化汙水處理廠中純化出能降解雌激素之菌株，希冀了解其雌激素降解機制與生理特性。首先於菌液添加高濃度雌激素（1~2 毫莫耳／升）培養以純化菌株，而後測定其 16S 核糖體核糖核酸序列確認純化出之菌株身分並設計引子，觀察此細菌之生長情形，並進行該菌株之生理測試，包含功能基因定序、代謝產物分析、脂肪酸組成分析、利用其它固醇為碳源之降解測定等。我們純化出一株新鞘氨醇桿菌屬（*Novosphingobium*）的變形菌，於雌激素濃度 1 毫莫耳／升的環境下能大量生長，確實能降解雌激素並生成代謝產物，具有與 *Sphingomonas* sp. strain KC8 相似之降解雌激素功能基因（*oecC*），且能降解其他固醇，包含雄烯二酮、膽酸、孕酮和甾酮，然而並不能降解乙炔雌二醇。該菌株具修復受汙染環境及製備雌激素相關藥品之應用潛力。

## Abstract

The occurrence of estrogens in surface water worldwide is of great concern as these compounds have been classified as group I carcinogens by the World Health Organization. Moreover, estrogens are environmental hormones; long-term exposure to these compounds, even at sub-nanogram-per-liter concentrations, may adversely affect physiology and behaviors of aquatic organisms. Thus far, only a few estrogen-degrading bacteria have been described. In the present study, we attempted to isolate and characterize the estrogen-degrading microorganisms from the activated sludge of the Dihua Sewage Treatment Plant, hoping to realize both the ability in degrading estrogens and the physiological characteristics of these microorganisms. To increase populations of estrogen-degrading microorganisms in the microbial community, estrogen (1 mM) was added to the activated sludge samples. Thin-layer chromatography was applied to monitor the consumption of estrogen and the production of the degradation metabolites. The sludge samples were also spread on agar plates containing 2 mM estrogen. The resulting colonies were picked up for PCR amplification, and the amplified 16S rRNA gene of individual colonies was sequenced. Real-time Quantitative PCR was implemented to observe the growth of target bacterium at high concentration of estrogen. Other physiological tests were subsequently performed, such as functional gene sequencing, degradation metabolites analysis, and fatty acid composition analysis. The substrate utilization pattern of the bacterial isolate was also investigated. Consequently, we isolated and characterized a new species of *Novosphingobium* which is an alphaproteobacterium capable of degrading estrogens (estradiol and estrone) and producing specific degradation metabolites (pyridinestrone acid). Its functional gene for estrogen degradation was found with high similarity to that of *Sphingomonas* sp. strain KC8. The bacterium also has the ability of degrading other steroids, including androst-4-en-3,17-dione, cholic acid, progesterone, and testosterone. However, its growth with ethynylestradiol, a popular synthetic estrogen, was not observed. This bacterium has the potential applications in bioremediation of steroid-contaminated ecosystems as well as the biotechnological production of estrogenic drugs.

# 前言

## 一、研究動機及背景介紹

雌激素是一種荷爾蒙，會對動物生理特徵造成不同影響，例如雌性動物中生殖系統的調節和第二性徵的發展（Ryan, 1982）。所有脊椎動物以及部分無脊椎動物體內皆可偵測到雌激素（Mechoulam *et al.*, 1984；Tarrant *et al.*, 2003）。然而，動物並不能降解雌激素，而是將其修飾後，通過排便和排尿釋放到環境中（Palme *et al.*, 1996）。

都會水域中，人畜所排放的雌激素，包含天然的雌酮（Estrone, E1）、雌二醇（ $17\beta$ -estradiol, E2），以及人工合成的乙炔雌二醇（ $17\alpha$ -ethynylestradiol, EE2）等，均會匯集至污水處理廠。這類化合物在污水淨化過程中無法完全清除，致使其排放後，持續存在於水域環境中，濃度達奈克／升等級（Herberer, *et al.*, 2002; Williams, *et al.*, 2003; Schlüsener *et al.*, 2005）。而水中生物長期生長於含雌激素的環境，即使在低於 1 奈克／升的濃度下，即可能對其生理和行為有不良影響（Massart *et al.*, 2006; Ghayee and Auchus, 2007）。世界各地有不少報導指出，在雌激素污染的環境中曾發現雌雄魚（Sumpter, 1998; Jobling *et al.*, 2006; Iwanowicz *et al.*, 2009）。此外，也有研究報告提及，雌激素可能影響野生兩棲動物群體的性別比例（Lambert *et al.*, 2015）。對人類而言，世界衛生組織（World Health Organization, WHO）更將其列為一級致癌物（[http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest\\_classif.php](http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php)）。

根據文獻（Chen *et al.*, 2017），我們已知 *Sphingomonas* sp. strain KC8 為一能降解雌激素之菌株，其雌激素降解之主要途徑如圖一，該菌株首先將 E2 降解為 E1，其作用酶為  $17\beta$ -estradiol dehydrogenase (OecA)，而後 E1 被作用酶 estrone 4-hydroxylase (OecB) 降解為 4-羥基雌酮 (4-hydroxyestrone, 4-OH-E1)，再由作用酶 4-hydroxyestrone 4,5-dioxygenase (OecC) 進行 A 環裂解，形成不穩定之開環產物。該開環產物易與環境中之硝酸根 ( $\text{NO}_3^-$ ) 結合形成吡啶雌酮酸 (pyridinesterone acid, PEA)。其中以開環之 OecC 最為重要，該步驟能使雌激素失去作用活性，達到降低環境危害的目的（Chen *et al.*, 2017）。因此功能基因 *oecC* 及代謝產物 PEA 將會是本研究確認雌激素已被降解的指標。

在本研究中，我們自迪化汙水處理廠採集水樣，冀望分離純化出迪化汙水處理廠中能有效降解雌激素之優勢菌株，並進一步瞭解雌激素降解菌之生理特性及降解雌激素之作用機制。期許未來能將研究成果實際應用於汙水處理，改善此環境荷爾蒙造成的生態衝擊。

圖一 *Sphingomonas* sp. strain KC8 降解雌激素主要途徑 (Reference from Chen *et al.*, 2017)

## 二、研究目的

- (一) 純化具雌激素降解活性的菌株
- (二) 找出該菌株作用基因片段及降解機制
- (三) 了解該菌株之生理特性

## 壹、 研究方法及過程

### 一、 研究材料及設備

#### (一) 培養基

1. R2A
2. LB
3. 基礎培養基 (Chemical defined medium) (表一)

表一 Chemical defined medium

	成分	1L
1	NH <sub>4</sub> Cl (g)	2
2	Phosphate buffer (pH 7.4; mL)	25
	1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mL)	4.95
	1M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (mL)	20.05
3	dd H <sub>2</sub> O (ml)	925
4	E1/E2 (1~2 mM; g)	
Autoclave, Sonication for dissolving carbon source		
5	1M CaCl <sub>2</sub> (mL)	0.7
6	1M MgSO <sub>4</sub> (mL)	2
7	Trace mental mix (mL)	1.5
8	Vitamin mix (mL)	1.5
9	Selenite (mL)	1.5
10	菌液 (佔總體積 1/20; ml)	50

(二) 藥品

1. 雌酮 (estrone, E1)
2. 雌二醇 (17  $\beta$ -estradiol, E2)
3. 乙炔雌二醇 (17  $\alpha$ -ethinylestradiol, EE2)
4. 雄烯二酮 (androst-4-en-3,17-dione, AD)
5. 膽酸 (cholic acid)
6. 孕酮 (progesterone)
7. 睪酮 (testosterone)
8. 膽固醇 (cholesterol)
9. 吡啶雌酮酸 (pyridinestrone acid, PEA)
10. 二甲基亞砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)
11. 乙酸乙酯 (ethyl acetate, EA)
12. 甲醇 (methanol, MtOH)
13. 展層液
  - (1) 二氯甲烷：乙酸乙酯：乙醇 (7：2：0.025, v/v/v)
  - (2) 乙酸乙酯：水：乙酸 (85：10：10, v/v/v)
14. 濃度 30% 硫酸溶液
15. 氫氧化鈉
16. 鹽酸
17. 己烷
18. 甲基第三丁基醚
19. 飽和食鹽水
20. PCR 引子
  - (1) 細菌 *16S rRNA* gene 通用引子 (Frank *et al.*, 2008)  
27F：5' -AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'  
1492R：5' -TACCTTGTTACGACTT-3'



- (2) *Sphingomonas* sp. strain KC8 *oecC* gene (Chen *et al.*, 2017)  
forward (E-RC F05) : 5' -TTGAAGATCTGCGGCTTGGGCT-3'  
reverse (E-RC R14) : 5' -TCAGCCTGCGGCCACATCGTCGGC-3'

21. PCR 試劑

- (1) 2X SuperRed PCR Master mix  
(2) KAPA Tag ReadyMix

22. DNA 染劑 Safe View DNA stain

23. 即時定量聚合酶連鎖反應引子

- (1) 通用引子 341F、534R (Muyzer *et al.*, 1993)  
341F : 5' -CCTACGGGAGGCAGCAG-3'  
534R : 5' -ATTACCGCGGCTGCTGGC-3'  
(2) *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 *16S rRNA* gene  
forward (qE2-3-7\_16S\_F1) : 5' -GGCGCAGCTAACGCATTAAG-3'  
reverse (qE2-3-7\_16S\_R1) : 5' -GCGCGTTGCTTCGAATTA-3'

24. 即時定量聚合酶連鎖反應試劑 Power SYBR Green PCR master mix

(三) 器皿用具

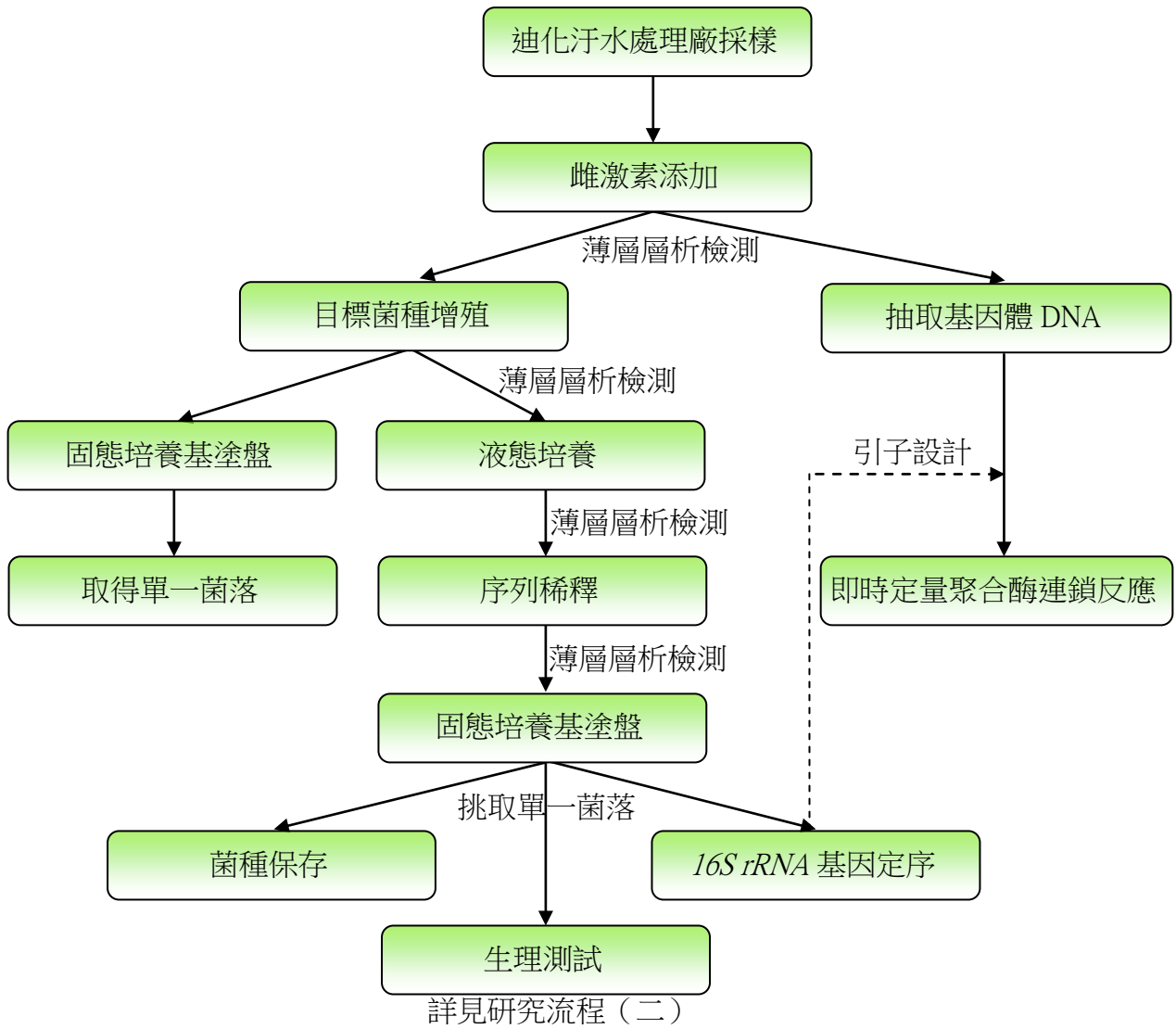
1. 秤量匙、秤量紙
2. 錐形瓶、培養皿
3. 薄層層析鋁箔片
4. 試管架、鐵架
5. 離心管、PCR 管
6. 養菌管、凍菌管
7. 微量吸取器、安全吸球、注射針筒過濾器
8. 電泳槽
9. 玻璃滴管

(四) 儀器設備

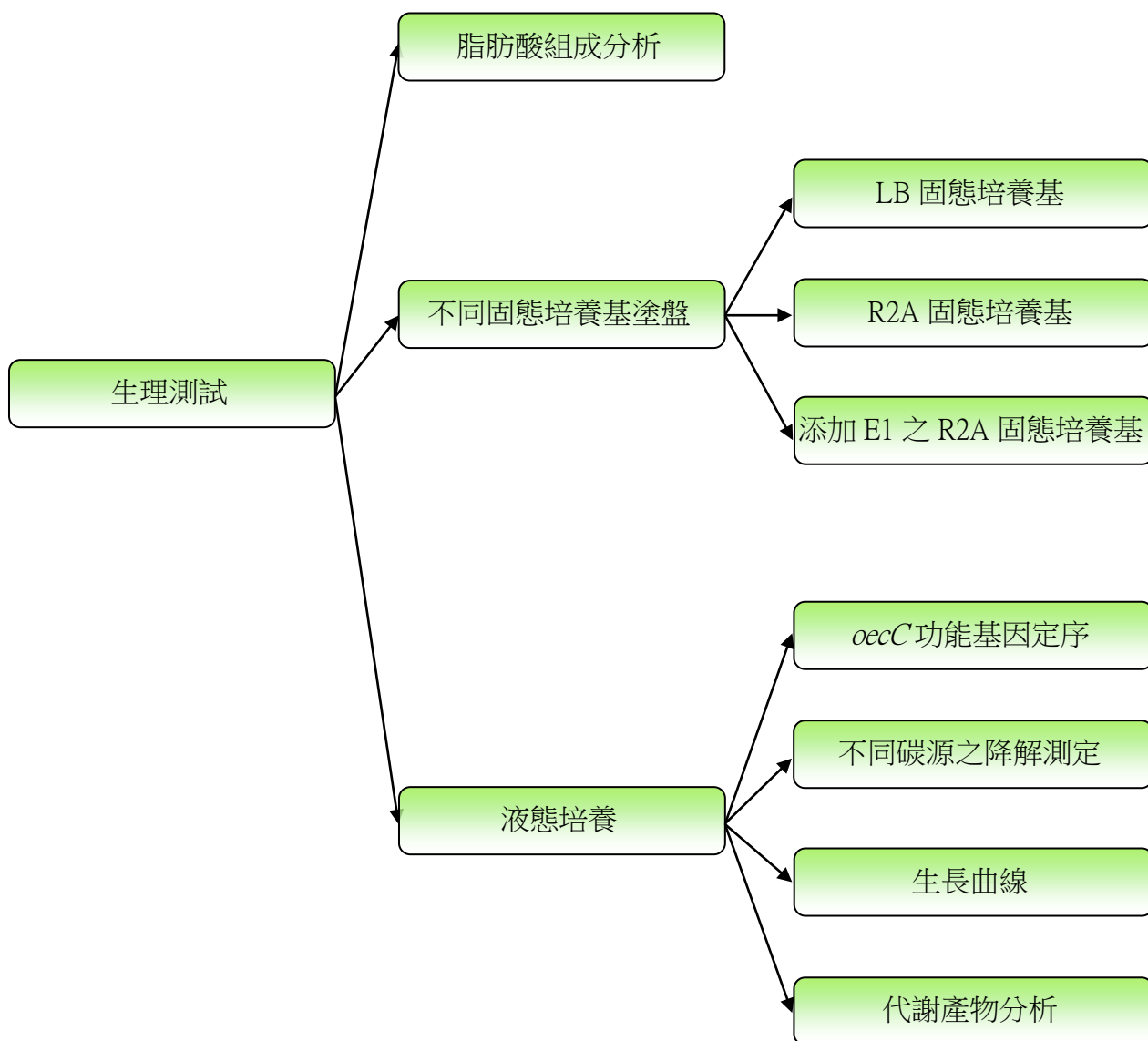
1. 電子秤
2. 無菌操作台
3. 震盪培養器
4. 離心機
5. 低溫冷凝濃縮機
6. 抽風櫃
7. 聚合酶連鎖反應儀 (PCR machine)
8. 氣相層析儀 (Agilent 7890B GC)
9. 超微量分光光度計 (Nanodrop spectrophotometer)
10. 螢光定量儀 (Qubit)
11. 乾式加熱器、培養箱
12. -80°C / -20°C / 4°C 冷凍櫃

## 二、研究流程

### (一) 菌株純化



(二) 菌株生理測試



### 三、研究方法

#### (一) 迪化汙水處理廠採樣

迪化汙水處理廠是全國規模最大的二級汙水處理廠，其匯集來自家庭、畜牧、工業等來源之汙水，其中含有天然及人工合成之雌激素，故本研究至迪化汙水處理廠之耗氧池（圖二）採集汙水樣品 2 升，希望純化出迪化汙水處理廠中主要降解雌激素之優勢菌種。



圖二 迪化汙水處理廠 耗氧池

#### (二) 確認採集之樣品具雌激素降解活性

菌種增殖將自迪化汙水處理廠採集之樣品，直接添加 2mM E2 或 EE2 培養，並以薄層層析（於研究方法（四）詳述步驟流程）進行三重複實驗，確認樣品中確實具有能降解雌激素之菌株，始得進行後續菌種純化。

#### (三) 目標菌種增殖

##### 1. 固態培養基培養

將汙水樣本以營養豐富的 R2A、LB 固態培養基塗盤，冀得單一菌落。

##### 2. 液態培養基培養

- (1) 由於固態培養基含多種碳源，多數菌種並不會優先選擇降解雌激素以獲取碳源，故無法篩選出能降解雌激素的菌種。改將汙水樣本接種至添加 E2 或 EE2 的液態基礎培養基（chemical defined medium）進行繼代培養，此可淘汰無法以雌激素為碳源之菌種，且使能降解 E2、EE2 之菌種比例

隨繼代次數提升，進而有效篩選出能降解雌激素之目標菌種。

(2) 於錐形瓶中，將 2mM E2 及 EE2 加至 95 毫升 chemical defined medium，並加入 5 毫升汙水樣本。隨即以鋁箔封口，並進行震盪培養。

(3) 進行數次轉殖，提高能降解雌激素之菌種比例。

#### (四) 薄層層析

1. 純化過程中於固定時間點抽取 0.5 毫升菌液，以 0.5 毫升有機溶劑乙酸乙酯萃取，以震盪器進行 2 分鐘震盪充分萃取後，以 18000xg 離心 5 分鐘。
2. 取 0.4 毫升上清液至另一微量離心管後，重複步驟 1，再抽取 0.4 毫升上清液，並將共 0.8 毫升上清液之微量離心管放置低溫冷凝濃縮機抽乾 1 小時。
3. 將抽乾後的微量離心管加入 50 微升的乙酸乙酯回溶雌激素，取 10 微升進行點片後，浸泡展開液 (1) 12 分鐘，以波長 302nm 之紫外光照射並拍照記錄。以 30% 之硫酸溶液浸泡後，以 120°C 烤片顯色並拍照記錄，確認雌激素是否有減少，以推論其中有無能降解雌激素之菌種。

#### (五) 序列稀釋

1. 將繼代培養數代後，具顯著降解雌激素活性的菌液抽取 1 毫升，加入 9 毫升 chemical defined medium 及 1mM E2 至  $10^1$  管中混和均勻，再從  $10^1$  管抽取 1 毫升菌液，加入 9 毫升 chemical defined medium 及 1mM E2 至  $10^2$  管中，以此類推進行 10 倍序列稀釋至  $10^{11}$ ，冀得單一純化菌株。

#### (六) 固態培養基塗盤

1. 先將各稀釋倍率進行 PCR 及定序，從定序結果可得知， $10^5 \sim 10^9$  之菌液較純，故取此 5 個稀釋倍率進行固態培養基塗盤。
2. 使用添加 1mM E2 的固態基礎培養基，以四區象限法於無菌操作台塗盤。
3. 固態培養基塗盤能確保菌株是否遭到汙染，也能從中挑選適合的單一菌落。

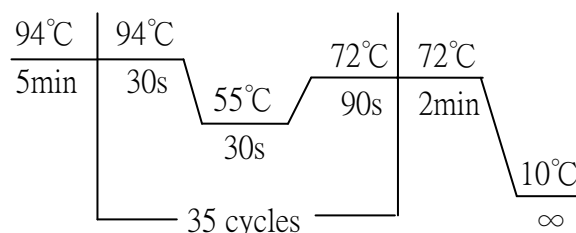
#### (七) *16S rRNA* 基因定序

1. 配製 PCR 預混料 (PCR premix) (表二)

表二 PCR premix (*16S rRNA*)

Reagent	Volume (微升)
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	7.5
primer 27F (2 μM)	2.5
primer 1492R (2 μM)	2.5
2X SuperRed PCR Master mix	12.5
Colony	0
Total	25

2. 從固態培養基上挑選單一菌落至 premix 中，放置聚合酶連鎖反應機進行 colony PCR (圖三)，將該菌株之 *16S rRNA* 基因片段放大。



圖三 *16S rRNA* PCR 流程

3. 配製 1.5% 洋菜膠體 (agarose gel)，秤取 0.75 公克的洋菜膠加入 50 毫升 TAE buffer 中，秤重後加熱以幫助溶解，後以 ddH<sub>2</sub>O 補充因加熱而喪失之水分。加入 DNA 染劑 Safe View DNA Stain 5 微升至洋菜膠混和均勻，並倒入鑄膠槽中至齒梳尖端 1/3~1/2 處，並以箱子蓋著靜置 30 分鐘，避免在洋菜膠體凝固過程中染劑因照光而裂解。
4. 於電泳槽中倒入 TAE buffer 至防呆線，並放入洋菜膠，於 well 加入 5 微升標準品及 10 微升 PCR 產物進行洋菜膠體電泳分析，確認其為含有目標 *16S rRNA* 基因片段後進行定序。
5. 由定序結果的訊號判斷菌株的純度，並進一步以 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 之 Blastn 功能與資料庫菌種資料比對，推論該菌

株的身分。

(八) 即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, qPCR)

1. 本實驗所使用的 DNA 樣本，來自 2014-2015 年間至迪化汙水處理廠採集 3 次汙水樣本，分為添加 1mM E1 溶於 DMSO 的處理組，以及只添加 DMSO 的控制組，實驗體積皆為 1 公升，於不同培養時間所抽取的 gDNA (詳細流程參考研究方法 (十一) 步驟 1.)。
2. 本實驗使用通用引子 341F 和 534R (Muyzer *et al.*, 1993) 以及由本研究純化出的菌株之 16S rRNA 序列所設計的引子 qE2-3-7\_16S\_F1 和 qE2-3-7\_16S\_R1。
3. 配製兩種 qPCR 預混料 (qPCR premix) (表三) (表四)

表三 qPCR premix (general)

Reagent	Volume (微升)
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	2
primer 341F (2 $\mu$ M)	3
primer 534R (2 $\mu$ M)	3
Power SYBR Green PCR master mix	10
DNA template (10g/L)	2
Total	20

表四 qPCR premix (qE2-3-7\_16S)

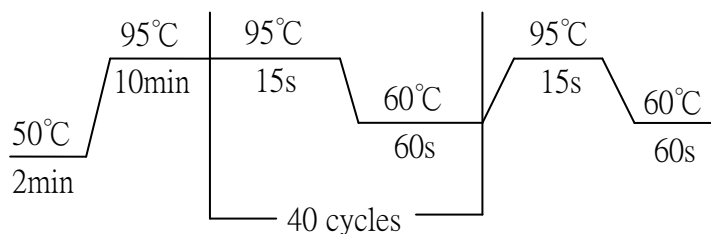
Reagent	Volume (微升)
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	2
primer qE2-3-7_16S_F1 (2 $\mu$ M)	3
primer qE2-3-7_16S_R1 (2 $\mu$ M)	3
Power SYBR Green PCR master mix	10



DNA template (10g/L)	2
Total	20

#### 4. 上機

以 ABI 7300 sequence detection system 進行 qPCR (圖四)



圖四 qPCR 流程

#### 5. 圖表繪製

將 qPCR 結果進行數據之整理分析並繪製成圖表，觀察單一菌種在高濃度 (1mM) 雌激素的培養下，其數量於菌群中所佔的比例隨時間之變化。

#### (九) 不同固態培養基培養

從固態培養基挑取單一菌落，分別塗盤於無添加雌激素的 LB、R2A 固態培養基，以及添加 1mM E1 的 R2A 固態培養基，置 28°C 培養箱培養，每日觀察菌株並照相紀錄，希冀瞭解其於各培養基的生長情形。

#### (十) 脂肪酸組成分析

##### 1. 菌體培養

從固態培養基挑取單一菌落，將菌株培養至 6 片添加 2mM E2 的 R2A 固態培養基，於 28°C 培養 4 天。

##### 2. 脂肪酸萃取

##### (1) 收菌

以接種環刮取生長於固態培養基第三區、第四區的菌落 4 個接種環的量，約 40 微克，置入 13x100 毫米之螺旋蓋玻璃試管內底部，共刮取 6 片固態培養基，收集 3 管。另準備一空管不加菌只加各步驟試劑，做為空白組。

##### (2) 皂化

於步驟（1）試管中加入 1 毫升試劑 1（氫氧化鈉 45 公克，甲醇 150 毫升，ddH<sub>2</sub>O 150 毫升），蓋上含鐵氟龍內墊之螺旋蓋，震盪 5-10 秒，再置入 100°C 水浴作用 5 分鐘，取出再震盪 5-10 秒，再置回 100°C 水浴，作用 25 分鐘。

### （3）甲基化

步驟（2）反應試管經冷卻後加入 2 毫升試劑 2（6N 鹽酸 325 毫升，甲醇 275 毫升），蓋上蓋子震盪 5-10 秒，置入 80°C 水浴 10 分鐘後，迅速放至冷水浴中冷卻。

### （4）萃取

於步驟（3）反應試管中加入 1.25 毫升試劑 3（己烷 200 毫升，甲基第三丁基醚 200 毫升），蓋上蓋子後，置入試管旋轉器旋轉 10 分鐘，打開蓋子，以玻璃滴管穿越上層將下層液吸出置廢液桶，留上層液。

### （5）鹼洗

於步驟（4）反應試管中加入 3 毫升試劑 4（氫氧化鈉 10.8 公克，甲醇 150 毫升，dd H<sub>2</sub>O 150 毫升），蓋上蓋子，再置試管旋轉器旋轉 5 分鐘，靜置數分鐘後加入數滴飽和食鹽水使上層液澄清，以玻璃滴管吸取上層液，取 2 毫升置入 GC 樣品瓶，蓋上鋁蓋以封蓋器密封。

3. 以氣相層析儀（Agilent 7890B GC）和 MIDI Sherlock MIS 軟體進行脂肪酸組成分析。將脂肪酸組成分析結果，與其他同屬菌株的脂肪酸組成進行觀察與比對。

## （十一）菌種保存

1. 將挑選出的菌落再次進行液態培養後取 0.5 毫升菌液至凍菌管，以 0.5 毫升 40% 甘油作菌種保存於 -80°C 冰箱。
2. 之後若有需要從事其他研究，可將其重新回復活性。

## （十二）*oecC* 功能基因定序

1. 抽取基因體 DNA（Genomic DNA, gDNA）

使用 Presto Mini Genomic DNA Kit (Geneaid) 抽取 gDNA

(1) 細胞樣品製備

將自固態培養基上挑取之單一菌落進行液態培養後取 1 毫升至微量離心管，以 15000xg 離心 1 分鐘後去除上清液。加入 180 微升 GT buffer 使細胞懸浮，再加入 20 微升蛋白酶 K (proteinase K)，置 60°C 10 分鐘。

(2) 細胞裂解

加入 200 微升 GB buffer 後震盪，置 70°C 10 分鐘。再加入 5 微升核糖核酸酶 A (RNase A)，震盪至裂解液轉為澄清後置室溫 5 分鐘。

(3) DNA 纏繞結合

加入 200 微升純酒精後震盪，另取一 GD Column 放 1.5 毫升 collection tube，將震盪後之混合液經由 GD Column 過濾至 collection tube。將 collection tube 連同 GD Column，以 15000xg 離心 2 分鐘後去除濾液。

(4) 去除雜質

加入 400 微升的 W1 buffer 至 GD Column 中，連同 collection tube 以 15000xg 離心 30 秒後去除濾液。再加入 600 微升的 Wash buffer 至 GD Column，重複離心步驟且去除濾液。最後以 15000xg 離心 3 分鐘，使 GD Column 呈乾燥狀態。

(5) 洗脫 DNA

將乾燥的 GD Column 移至新的 collection tube，加入 50 微升預熱好的 H<sub>2</sub>O，待 3 分鐘後以 15000xg 離心 30 秒，其濾液即為本實驗所需的 gDNA。

2. 核酸濃度與純度測量

以超微量分光光度計 (Nanodrop spectrophotometer) 測量步驟 1.0 之 gDNA 濃度與純度，協助瞭解 gDNA 抽取情況，利於後續 PCR 等實驗進行。

3. 配製 PCR 預混料 (PCR premix) (表五)

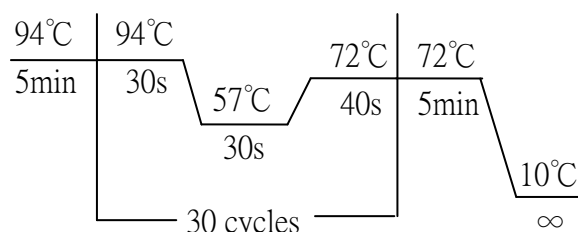
本次進行 PCR 時使用專為 *oecC* 基因設計的引子 (Chen *et al.*, 2017)，且以準

確性較高的 KAPA Tag ReadyMix 取代一般 2X SuperRed PCR Master mix，同時將 PCR 第二個循環的作用溫度提高為 57°C，以增加引子黏合準確度。

表五 PCR premix (*oecC*)

Reagent	Volume (微升)
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	6.5
primer E-RC F05 (2 μM)	2.5
primer E-RC R14 (2 μM)	2.5
KAPA Tag ReadyMix	12.5
DNA template	1
Total	25

- 將步驟 1. 抽取之 gDNA 稀釋後與 PCR premix 混合，放置聚合酶連鎖反應機進行 PCR (圖五)，將該菌株之 *oecC* 基因片段放大。



圖五 *oecC* PCR 流程

- 重複研究方法 (七) 步驟 3、4，確認其含有目標 *oecC* 基因片段後進行定序，並進一步以 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 之 Blastx 及 Alignment 功能與 *Sphingomonas* sp. strain KC8 的 *oecC* 胺基酸序列進行比對，推論該菌株具有相似功能之可能性。
- 將本研究純化之菌株與其它能裂解固醇類 A 環之菌株 (Chen *et al.*, 2017)，使用 MEGA 7 軟體 (Kumar *et al.*, 2016) 中的 MUSCLE (Edgar, 2008) 功能進行 *oecC* 胺基酸序列比對，並利用 Model Test 功能推算出最適合的變異模式，再以最大似然法 (Maximum Likelihood) (Le *et al.*, 2008) 建構親緣關係演化樹，同時以 1000 次的 Bootstrap 分析，檢測其樹型信賴度。藉由繪製演化樹進一步了解功能基因 *oecC* 之親緣關係。

(十三) E2、EE2 共代謝探討

因 EE2 較難降解，將 E2 及 EE2 各 1mM 同時加入菌液中，震盪培養後進行薄層層析觀察是否有共代謝現象。

(十四) 不同碳源之降解測定

1. 以其他固醇類作為碳源，測定純化之菌株能力

雌酮 (estrone, E1)

雌二醇 (estradiol, E2)

雄烯二酮 (androst-4-en-3,17-dione, AD)

膽酸 (cholic acid)

孕酮 (progesterone)

睪酮 (testosterone)

膽固醇 (cholesterol)

2. 各取 1mM 步驟 1.所述碳源至 50 毫升離心管中，加入 10 毫升 chemical defined medium 及 0.5 毫升純化之菌液，並進行震盪培養。
3. 定時抽點並進行薄層層析以觀測其降解結果。

(十五) 代謝產物分析

1. 在本實驗進行前已確認該菌株確實能夠降解雌激素 E1，且根據文獻 (Chen *et al.*, 2017)，E2 被代謝後會轉換成 E1。考量成本因素，本實驗改以 E1 作為碳源培養。
2. 從固態培養基挑取單一菌落，分別接種至 200 毫升液態的基礎培養基和 R2A 培養基於 500 毫升錐形瓶，皆添加 1mM E1 作為碳源，進行震盪培養。
3. 培養期間每日拍照紀錄菌液狀態變化，並於固定時間點抽取樣本，以薄層層析檢測雌激素 E1 的減少，步驟同研究方法 (四)，唯本次抽萃時添加 0.4 微升的 EE2 作為內標準品，且不浸泡硫酸及烤片。
4. 承步驟 3.，將已浸泡過展開液 (1) 之薄層層析片，再浸泡展開液 (2) 20 分鐘，使與固定相親和力較大的中間代謝產物 (pyridinestrone acid, PEA)，

藉由極性較大的展開液帶至層析片較上方處，使之更易於觀察 PEA 的生成與變化。

5. 觀察薄層層析結果，從中挑選 PEA 訊號較強之樣本，取其未添加乙酸乙酯之菌液 1 毫升，以 18000xg 離心 3 分鐘，抽取上清液至兩管新的微量離心管各 0.5 毫升。取其中一管上清液與原管剩餘的菌塊，分別以 0.5 毫升的乙酸乙酯和 50% 甲醇萃取，同研究方法（四）步驟 1、2。
6. 將抽乾後的微量離心管分別以 50 微升的乙酸乙酯和 50% 甲醇回溶，取 10 微升進行點片，直接浸泡極性較大的展開液（2）20 分鐘，以波長 302nm 之紫外光照射，觀察 PEA 訊號出現於上清液或菌塊，藉此瞭解菌株會將代謝產物 PEA 排至細胞外或者留在細胞內。

#### （十六） 生長曲線

1. 進行代謝產物分析實驗時，於不同時間點多抽取一管 0.5 毫升菌液（不添加乙酸乙酯萃取），以 18000xg 離心 10 分鐘，去除上清液後加入 50 微升 dd H<sub>2</sub>O 與剩餘菌塊混合震盪，再將微量離心管加上防爆夾，於 110°C 加熱 10 分鐘，將菌株細胞打破並釋放出蛋白質。
2. 使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 測量蛋白質濃度
  - （1） 配製適量作用溶液（working solution, Qubit reagent : Qubit buffer = 1 : 200），置室溫。
  - （2） 取 10 微升不同濃度（每微升 0、200、400 奈克）的蛋白質標準品，分別與 190 微升的作用溶液混合，震盪約 2 至 3 秒，置室溫 15 分鐘。
  - （3） 取 5 微升的蛋白質樣品（步驟 1.），與 195 微升的作用溶液混合，震盪約 2 至 3 秒，置室溫 15 分鐘。
  - （4） 取步驟（2）的標準品，利用螢光定量儀（Qubit） 測量蛋白質濃度之功能，先製作一標準曲線。再以 Qubit 依序測量步驟（3）樣品的蛋白質濃度，以紙筆紀錄數據。
3. 以 50% 甲醇將標準品 E1 和 PEA，以 2.5 倍稀釋成 6 種不同濃度，利用薄層

層析點片、浸泡展開液，而後以波長 302nm 之紫外光照射並拍照。將結果以 ImageJ 軟體進行影像處理，分別製作 E1 和 PEA 的濃度標準曲線。再將代謝產物之薄層層析結果，同樣透過 ImageJ 軟體進行定量分析，由標準曲線換算實際濃度。

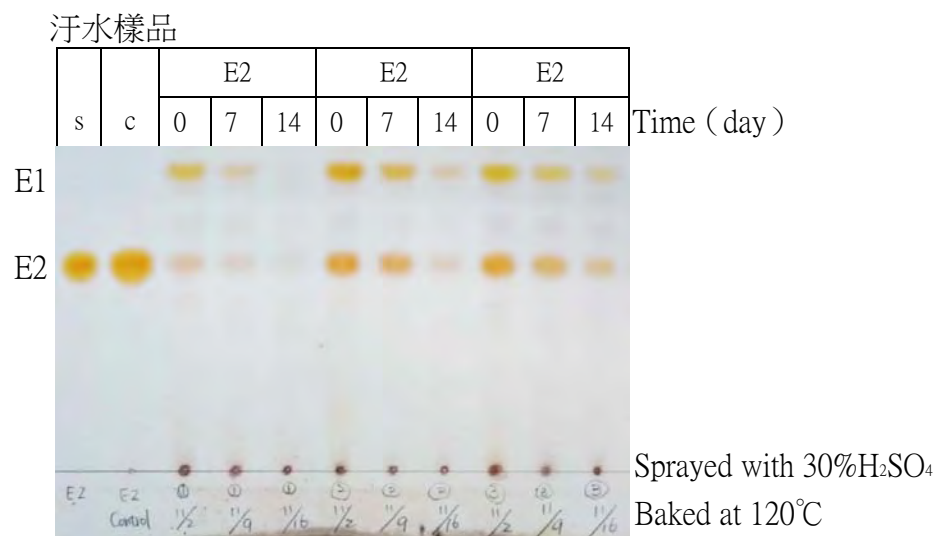
4. 以 Excel 軟體將步驟 2.與步驟 3.之數據，組合成一包含 E1、PEA 以及蛋白質濃度隨時間變化之生長曲線。

## 貳、 研究結果與討論

### 一、 研究結果

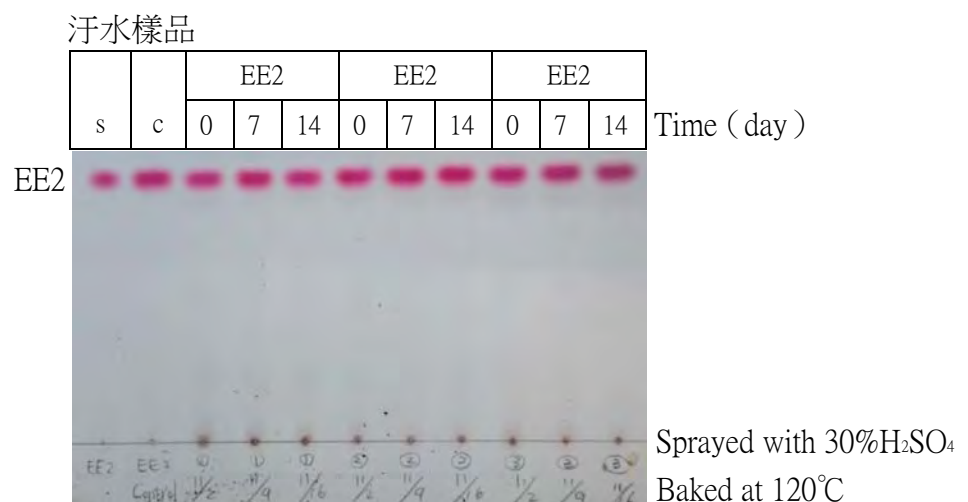
#### (一) 迪化汙水處理廠樣品降解雌激素能力測定結果

圖六為迪化汙水處理廠汙水樣品添加 E2 進行三重複，經萃取後薄層層析的結果，可看到添加 E2 的樣品中，E2 經過兩星期後明顯減少，能確認汙水樣品中確實有具降解雌激素能力的菌種，始進行後續菌株純化實驗。



圖六 迪化汙水處理廠汙水樣品添加 E2 三重複薄層層析烤片結果

圖七為迪化汙水處理廠汙水樣品添加 EE2 進行三重複，經萃取後薄層層析的結果，可看見添加 EE2 的樣品中，EE2 含量經過兩星期後並無明顯變化，推測汙水樣品中能夠降解人工雌激素 EE2 的菌種比例相當稀少甚或沒有。

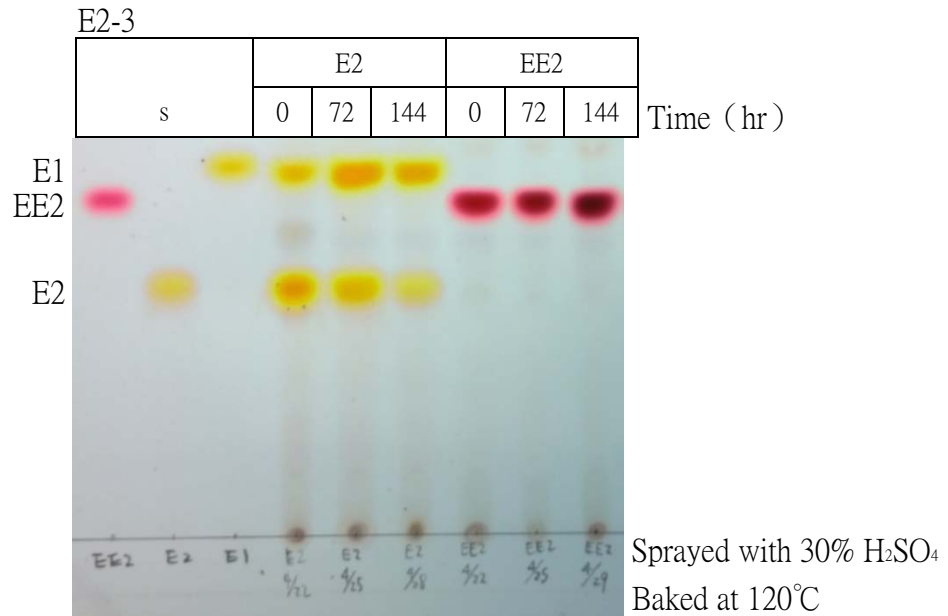


圖七 迪化汙水處理廠汙水樣品添加 EE2 三重複薄層層析烤片結果



(二) 純化中菌種降解雌激素能力分析結果

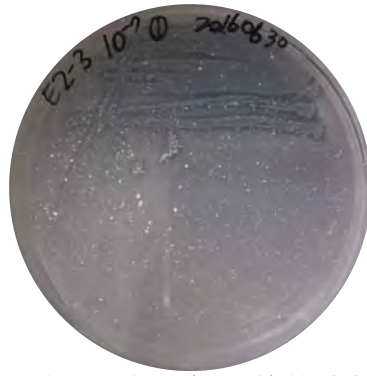
圖八為目標菌種增殖、繼代培養第三代之菌液（命名為 E2-3）經萃取後以薄層層析的結果，可看到加入 E2 的菌液中，E2 經過六天後減少，而 E1 則增加，可推知菌種將 E2 轉換成 E1。而 EE2 則沒有被降解，毫無減少跡象。



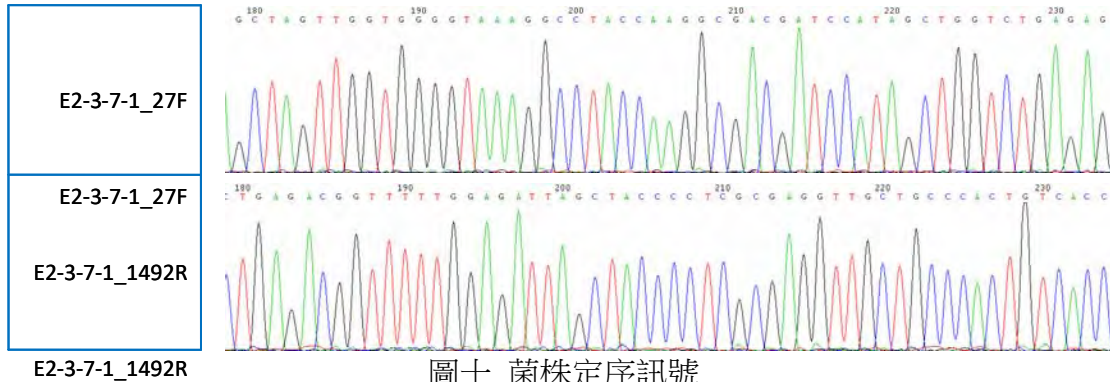
圖八 E2-3+E2/EE2 薄層層析烤片結果

(三) 單一菌落菌種鑑定結果

將繼代培養第三代、具有降解 E2 活性的菌液經序列稀釋後，取不同稀釋倍率菌液進行固態培養基培養。培養結果自 10<sup>-7</sup> 稀釋液成功獲得單一菌落，且菌落周圍有明顯降解 E2 後所產生之澄清環，證實此菌落確實有降解 E2 能力（圖九）。針對此菌落進行 colony PCR 增幅 16S rRNA 基因片段後，定序分析。定序之部分結果（圖十），序列訊號單一無雜訊，顯示該菌落確實為單一菌種。將該序列經 NCBI Blatsn 比對分析後，確認為 *Novosphingobium* 屬的細菌，且與其序列相似度最高者只有 98%（圖十一），極有可能為一新菌種，命名為 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7。



圖九 添加 E2 之固態培養基塗盤結果



圖十 菌株定序訊號

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 2

[Alignments](#) [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured Sphingomonas sp. clone DHy97 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2108	2108	98%	0.0	98%	<a href="#">KC502963.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured Sphingomonas sp. clone DHy15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2108	2108	98%	0.0	98%	<a href="#">KC502958.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured Sphingomonas sp. clone AHy13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2095	2095	98%	0.0	97%	<a href="#">KC502947.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured Sphingomonas sp. clone AHy33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2084	2084	98%	0.0	97%	<a href="#">KC502948.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured Sphingomonas sp. clone DHy25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	2063	2063	98%	0.0	97%	<a href="#">KC502959.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Novosphingobium tardaugens strain NBRC 16725 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1986	1986	98%	0.0	96%	<a href="#">NR_113869.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured sludge bacterium clone ASB32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1986	1986	98%	0.0	96%	<a href="#">FJ947132.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Novosphingobium tardaugens strain ARI-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1986	1986	98%	0.0	96%	<a href="#">NR_028630.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Sphingomonas sp. JEM-1 gene for 16S rRNA</a>	1975	1975	98%	0.0	96%	<a href="#">AB219359.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured bacterium clone BD07267 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1967	1967	98%	0.0	96%	<a href="#">JQ186230.1</a>

圖十一 菌株經 NCBI Blastn 比對分析結果

(四) *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 與 *Novosphingobium tardaugens* 之比對

圖十二為本研究純化出的菌株 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 之序列進行 NCBI Blastn 分析後，與其相似菌株 *Novosphingobium tardaugens* 序列比對的結果。兩者相似度達 96%。且根據文獻 (Fuji *et al.*, 2003)，*Novosphingobium tardaugens* 同樣具有降解 E2 之能力。

Download [GenBank](#) [Graphics](#) Next Previous Descriptions

Novosphingobium tardaugens strain ARI-1 16S ribosomal RNA gene.

partial sequence  
**Sequence ID:** [NR\\_028630.1](#) **Length:** 1418 **Number of Matches:** 1  
[See 1 more title\(s\)](#)

**Related Information**

**Range 1: 15 to 1245** [GenBank](#) [Graphics](#) Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1986 bits(1075)	0.0	1188/1240(96%)	18/1240(1%)	Plus/Plus
Query 8	GCATG-CT-ACACATGCAAGTCGAACGAAGCCTTCGGGCTTAGTGCCGCACGGGTGCGTA			65
Sbjct 15	GCATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAACCTTCGGGGT TAGTGCCGCACGGGTGCGTA			74
Query 66	ACGCGTGGGAACCTGCCTTTAGGTTTCGGAATAACACAGAGAAATTTGTCTAATACCGGA			125
Sbjct 75	ACGCGTGGGAACCTGCCTTTAGGTTTCGGAATAACAGTTAGAAATGACTGCTAATACCGGA			134
Query 126	TGATGTCTTCGGACCAAAGATTATCGCCTTTAGATGGGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTT			185
Sbjct 135	TGATGTCTTCGGACCAAAGATTATCGCCTTTAGATGGGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTT			194
Query 186	GGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCA			245
Sbjct 195	GGTGGGGTAAAGGCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCA			254
Query 246	CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGACAGTGGGGAATATTGGACA			305
Sbjct 255	CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGACAGTGGGGAATATTGGACA			314
Query 306	ATGGGGGAAACCTTGATCCAGCAATGCCGCGTGGTGTGAGGAGGCTTAGGGTTGTAAAG			365
Sbjct 315	ATGGGGGAAAGCCTTGATCCAGCAATGCCGCGTGGTGTGAGGAGGCTTAGGGTTGTAAAG			374
Query 366	CTCTTTTACCAGGGATGATAATGACAGTACCTGGAGAATAAGCTCCGGCTAACCCGTCG			425
Sbjct 375	CTCTTTTACCAGGGATGATAATGACAGTACCTGGAGAATAAGCTCCGGCTAACCCGTCG			434
Query 426	CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGAGCTAGCGTTGTTTCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGC			485
Sbjct 435	CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGAGCTAGCGTTGTTTCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGC			494
Query 486	GCGTAGGCGGCTATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAACGCTTT			545
Sbjct 495	GCGTAGGCGGCTATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAACGCTTT			554
Query 546	GAAACTGGGTAGCTAGAATCTGGAGAGGCGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATT			605
Sbjct 555	GAAACTGGGTAGCTAGAATCTGGAGAGGCGAGTGGAAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATT			614
Query 606	CGTAGATATTCGGAAGAACCACAGTGGCGAAGGCGACTCGTGGACAGGTATTGACGCTG			665
Sbjct 615	CGTAGATATTCGGAAGAACCACAGTGGCGAAGGCGACTCGTGGACAGGTATTGACGCTG			674
Query 666	AGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACG			725
Sbjct 675	AGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACG			734
Query 726	ATGATAACTAGCTGTCCGGTTCATGGAACCTGGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTAT			785
Sbjct 735	ATGATAACTAGCTGTCCGGTTCATGGAACCTGGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTAT			794
Query 786	CCGCCTGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGTCAAGGAATGACGGGGGCTGCACAA			845
Sbjct 795	CCGCCTGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGTCAAGGAATGACGGGGGCTGCACAA			854
Query 846	GCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCGTTTGACATC			905
Sbjct 855	GCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCGTTTGACATC			914
Query 906	CCGCCTAACCCGAGAGATCGGGTGTCCCTTCGGGGACGCGGTGACAGGTGCTGCATGG			965
Sbjct 915	CCGCCTAACCCGAGAGATCGGGTGTCCCTTCGGGGACGCGGTGACAGGTGCTGCATGG			974
Query 966	CTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGT			1025
Sbjct 975	CTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGT			1034
Query 1026	CCTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGAAACCGC-GGTGATAGCCGGAGGA			1084
Sbjct 1035	CCTTAGTTGCCATCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGAAACCGC-GGTGATAGCCGGAGGA			1094
Query 1085	AGGTGGGGATGACGTC-AGTCTCATGGCCCTTAACACCGTGGGCTAACACACGTGCT			1143
Sbjct 1095	AGGTGGGG-ATGACGTCAGTCTCATGGCCCTTA-CAC-GCTGGGCT-ACACACGTGCT			1150
Query 1144	ACA-TGT-GGTGACAGTGGGCAGCCACCTCGCGAGGGTTAGCTA-TCTC-AAA-CCGGT			1198
Sbjct 1151	ACAAATGGCGGTGACAGTGGGCAGCAACCTCGCG-AGGGGTAGCTAATCTCAAAAACCTG			1209
Query 1199	CTCAGCTCCGATGGATCTCTCTGCACCTCGGAGAAGCATG 1238			
Sbjct 1210	CTCAGTTCGGATTG-T-TCTCTGCAACTCG-AGA-GCATG 1245			

圖十二 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 與 *Novosphingobium tardaugens* 序列比對結果

(五) 脂肪酸組成分析結果

表六為本研究純化之菌株 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 與同屬菌株 *Novosphingobium tardagens* strain ARI-1 之脂肪酸組成分析結果 (Fuji *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2014; Yabuuchi *et al.*, 1990; Takeuchi *et al.*, 1993, 1994, 2001; Kampf *et al.*, 1997)。兩株菌的飽和脂肪酸皆以 16:0 為主，不飽和脂肪酸以 sum in feature 8 (18:1 $\omega$ 7*c*, 18:1 $\omega$ 6*c*) 為主，羥基脂肪酸也同樣都以 14:0 2-OH 為主。雖兩株菌之脂肪酸組成有些許相似，但仍可見多處不同，此再次說明 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 與 *Novosphingobium tardagens* 間的差異。

表六 脂肪酸組成分析結果

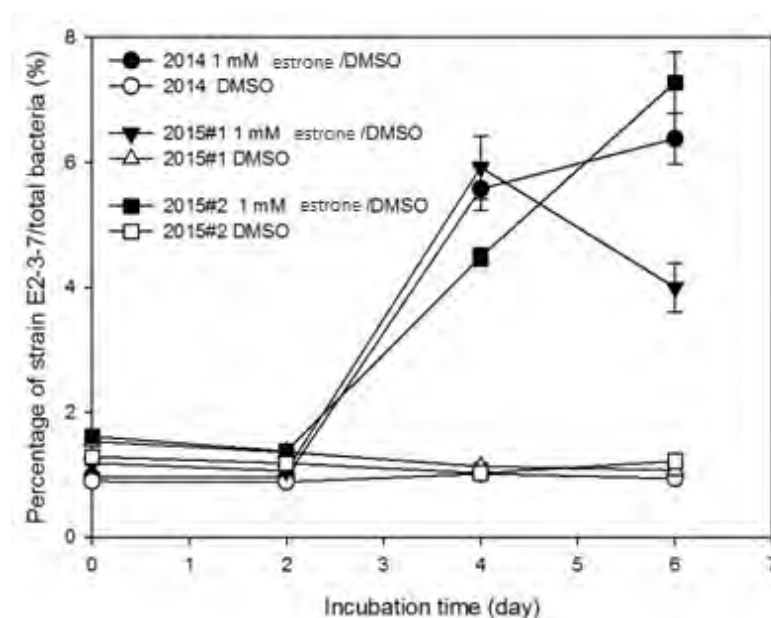
Fatty acid	<i>Novosphingobium</i> sp. strain E2-3-7	<i>Novosphingobium tardagens</i> strain ARI-1
16:0	8.59 ± 0.067	5.40
18:0	ND	0.49
16:1 $\omega$ 5 <i>c</i>	0.4	2.65
17:1 $\omega$ 6 <i>c</i>	2.21 ± 0.360	ND
18:1 $\omega$ 5 <i>c</i>	1.62 ± 0.303	2.00
18:1 $\omega$ 7 <i>c</i> 11-methyl	20.21 ± 0.846	4.49
19:0 cyclo $\omega$ 8 <i>c</i>	4.64 ± 0.563	ND
14:0 2-OH	6.53 ± 0.355	3.17
15:0 2-OH	1.08 ± 0.065	ND
16:0 2-OH	3.92 ± 0.085	1.92
Sum in feature3	2.92 ± 0.075	15.77
Sum in feature8	48.14 ± 0.833	63.72

ND represents none-detected.

Sum in feature represents groups of two or three fatty acids that cannot be separated by GC. Sum in feature 3 contained 16:1 $\omega$ 6*c* and/or 16:1 $\omega$ 7*c*; sum in feature 8 contained 18:1 $\omega$ 7*c* and/or 18:1 $\omega$ 6*c*.

## (六) qPCR 結果

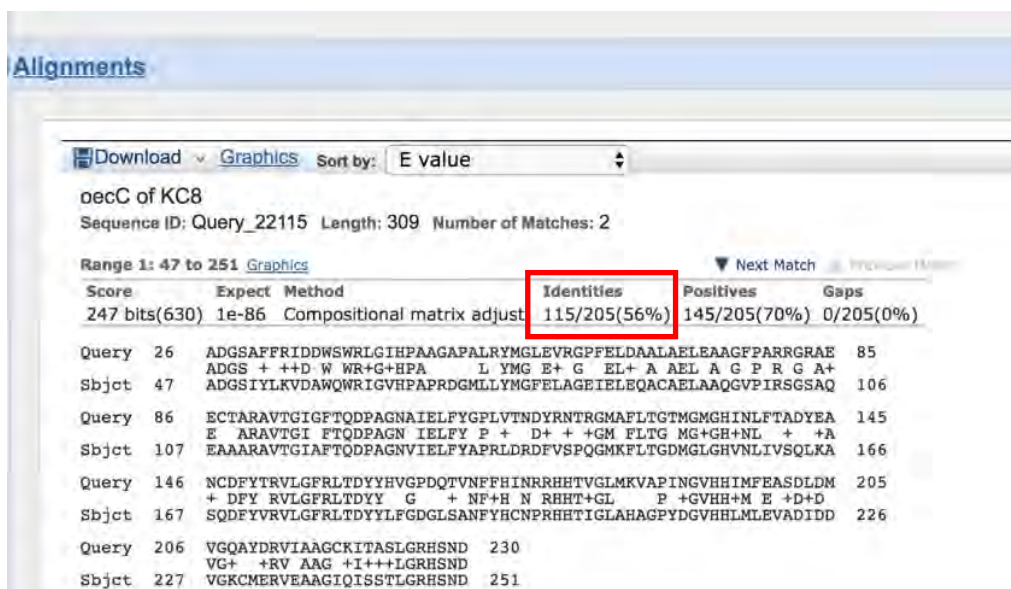
圖十三為使用通用引子以及由本研究純化出之菌株 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 所設計的引子，對 2014 年及 2015 年迪化汙水處理廠的汙水樣品進行 qPCR 之結果。橫軸為培養天數，縱軸為 *Novosphingobium* 屬菌株數量相對於整體菌群數量的比例。可看見添加高濃度雌激素（1mM E1）的處理組，*Novosphingobium* 屬菌量隨時間有明顯增加的趨勢；而未添加雌激素之控制組的菌量則保持穩定。推斷 *Novosphingobium* 屬大部分細菌可利用雌激素作為碳源生長，因此本研究所純化出的菌株 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 確實具有純化意義。



圖十三 迪化汙水處理廠汙水樣品 qPCR 之結果

## (七) 功能基因 *oecC* 鑑定結果

圖十四為前人研究所設計之功能基因 *oecC* 引子 (Chen *et al.*, 2017)，對 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 進行 PCR 後之基因定序結果。可看到其一級結構與具雌激素降解能力之 *Sphingomonas* sp. strain KC8 的功能基因 *oecC* 相似度高達 56%，一般來說，功能基因相似程度若有 40%~60% 以上即可能有類似功能 (Tian *et al.*, 2003; Espadaler *et al.*, 2008)，因此目前可推論本研究所純化之菌株有降解雌激素的功能基因 *oecC*，然而仍須更進一步確認其功能性。



圖十四 *oecC* 胺基酸序列比對結果

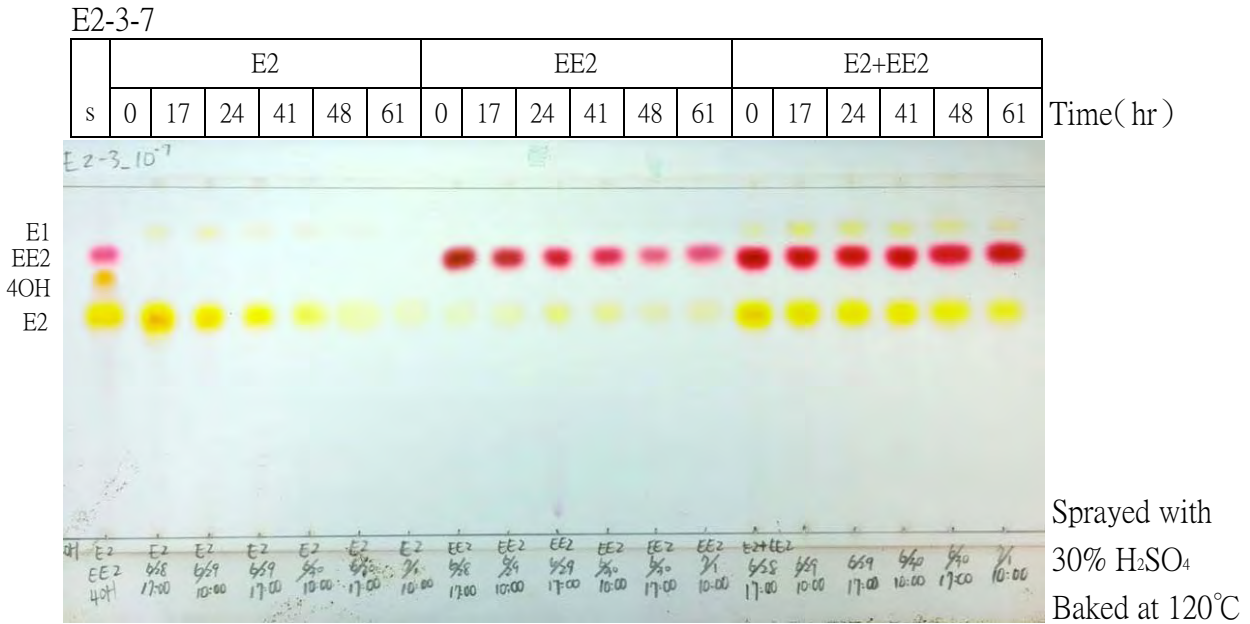
圖十五為使用 Maximum Likelihood 方法建立的 *oecC* 胺基酸序列之親緣關係演化樹 (Chen *et al.*, 2017)。本研究純化出之菌株 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7，其 *oecC* 胺基酸序列，能與其它有裂解固醇類 A 環功能的菌株之 *oecC* 胺基酸序列，繪製於同一演化樹，此說明 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 具有相同功能之高度可能性。而 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 的 *oecC* 和 *Novosphingobium tardaugens* 的 *oecC* 親緣關係最為接近，與 *16S rRNA* 序列比對結果 (圖十一) 相呼應。

圖十五 *oecC* 胺基酸序列之親緣關係演化樹



(八) 純菌株降解 E2、EE2 分析結果

圖十六為本研究所純化出之菌種 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 的薄層層析結果。如圖所示，可明顯看到 E2 及其轉化之 E1 均被完全降解。然而 EE2 仍然無明顯降解跡象。我們同時也進行共代謝分析，比較單獨添加 E2 組與同時添加 E2+EE2 組，經相同天數培養後，E2 存在並不能誘使菌株 E2-3-7 降解 EE2，反而影響其降解 E2 效率。

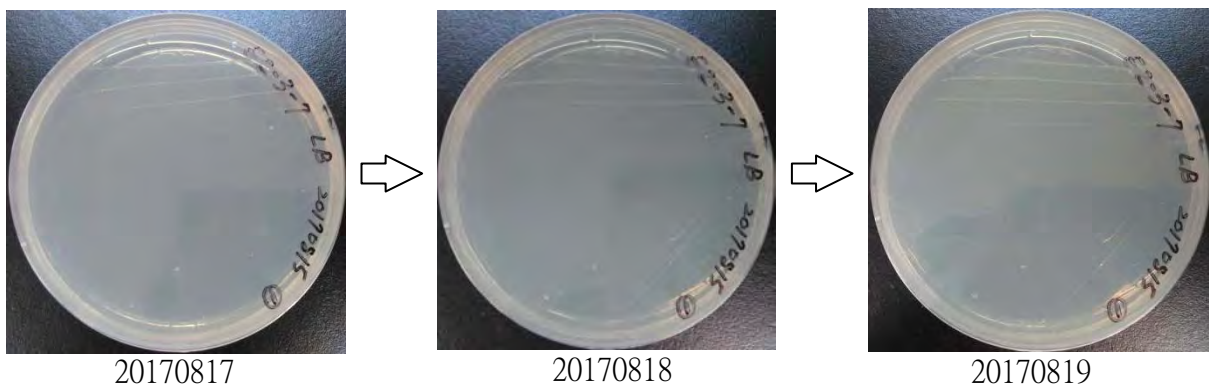


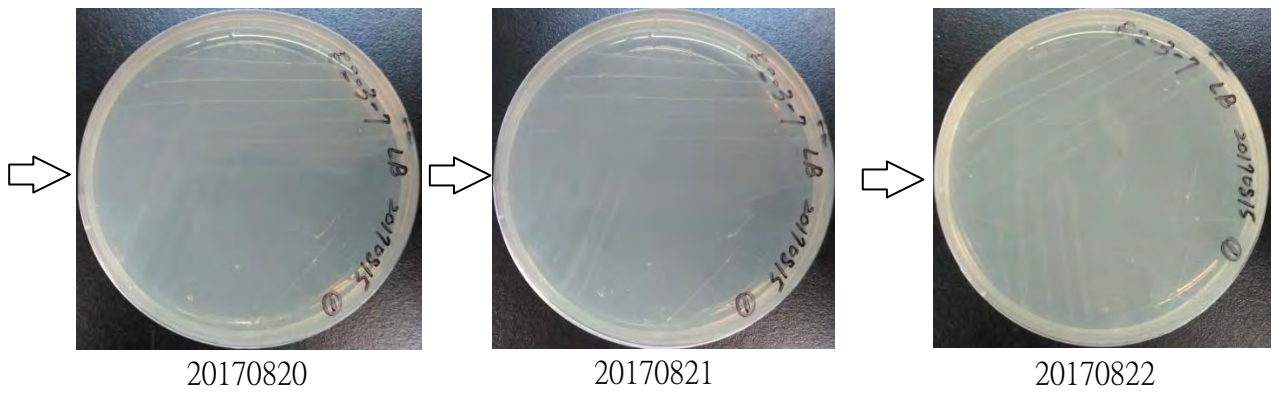
圖十六 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 添加 E2/EE2 薄層層析烤片結果

(九) 菌株於不同固態培養基生長之情況

1. LB 固態培養基

圖十七為 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 培養於 LB 固態培養基上之生長情形。此菌株未隨天數增加而有明顯的菌落，判斷營養豐富的 LB 培養基並不適合培養該菌株。

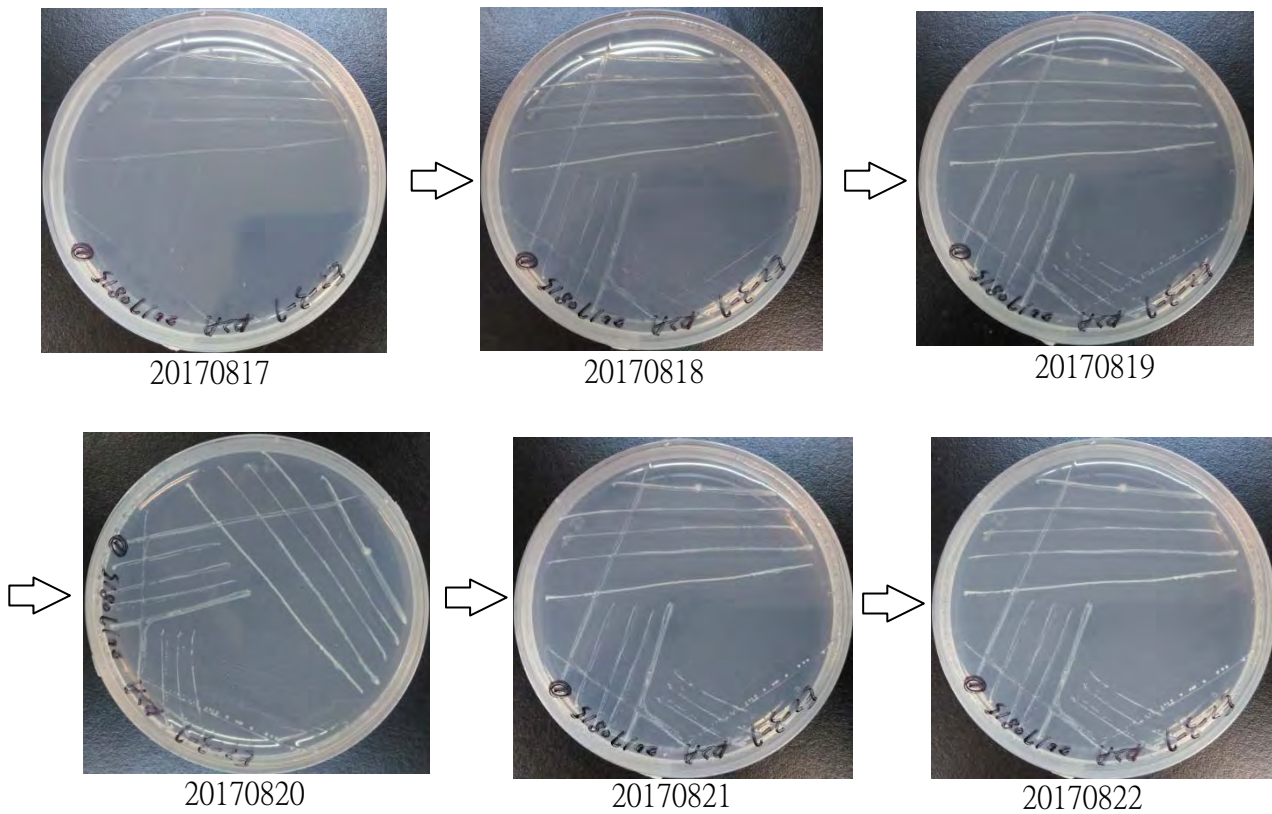




圖十七 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 於 LB 固態培養基上之生長情形

## 2. R2A 固態培養基

圖十八為 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 培養於 R2A 固態培養基上之生長情形。可看到第三天起 R2A 培養基第三象限上即有明顯的單一菌落，可知該菌株於 R2A 培養基上生長良好且快速。而第一象限上有一明顯的單一菌落，推測是實驗操作時雜菌掉落所造成的汙染。

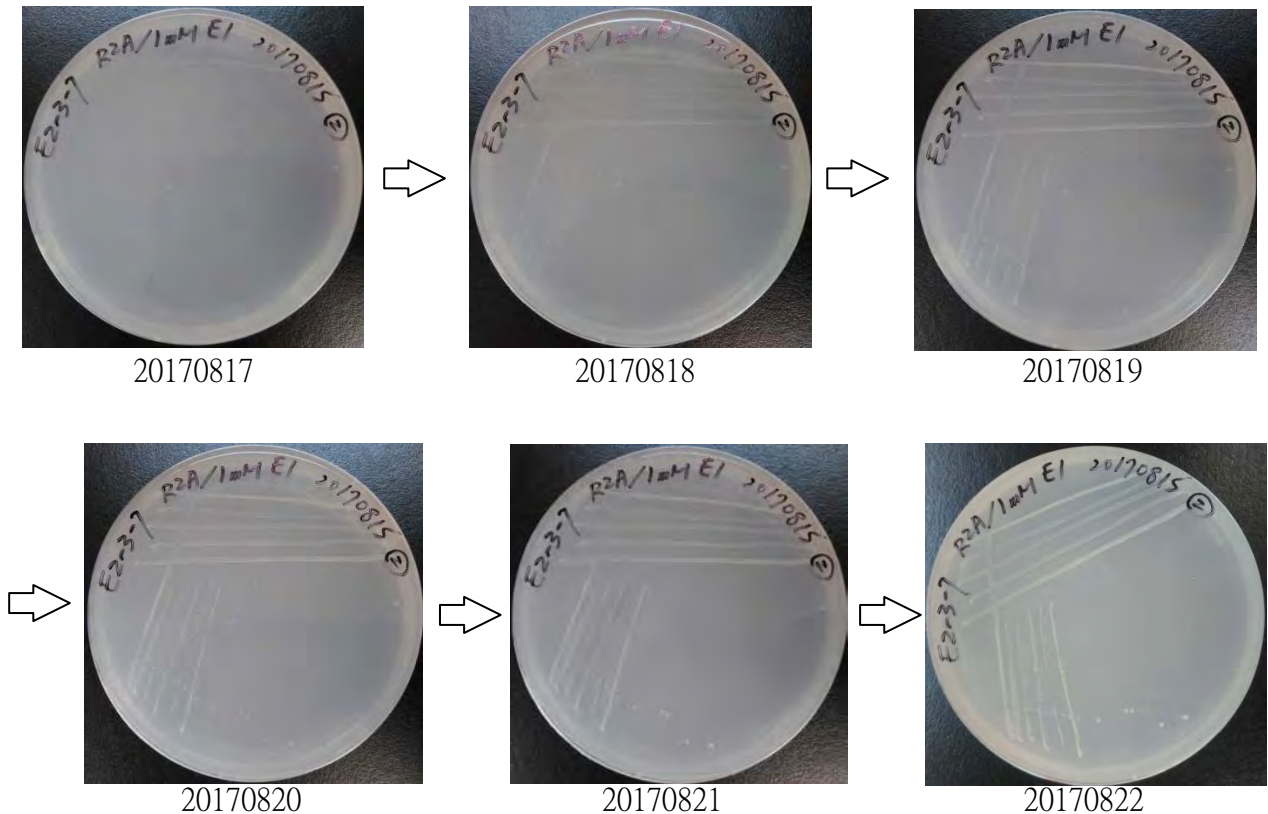


圖十八 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 於 R2A 固態培養基上之生長情形



### 3. R2A 固態培養基添加 1mM E1

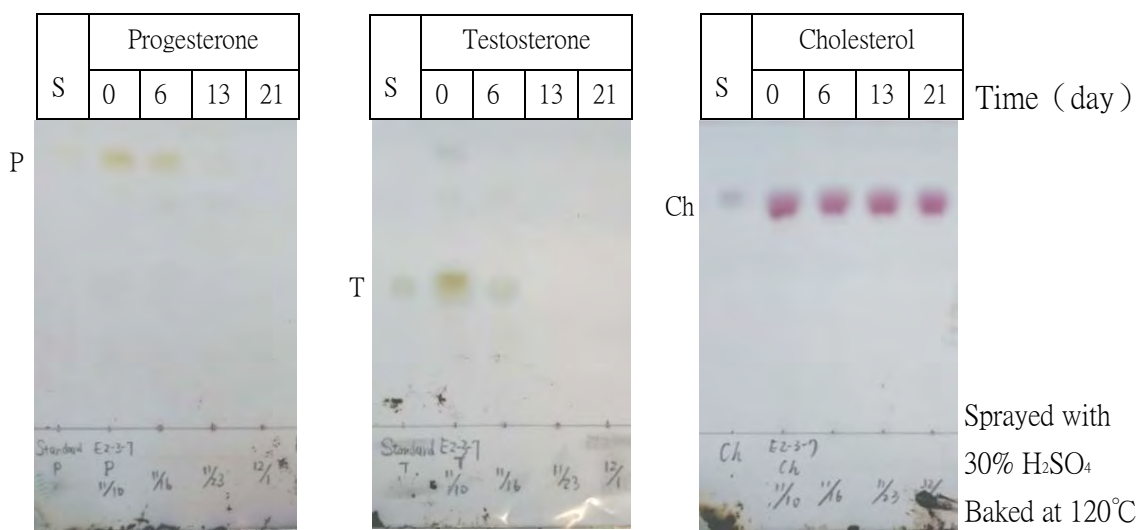
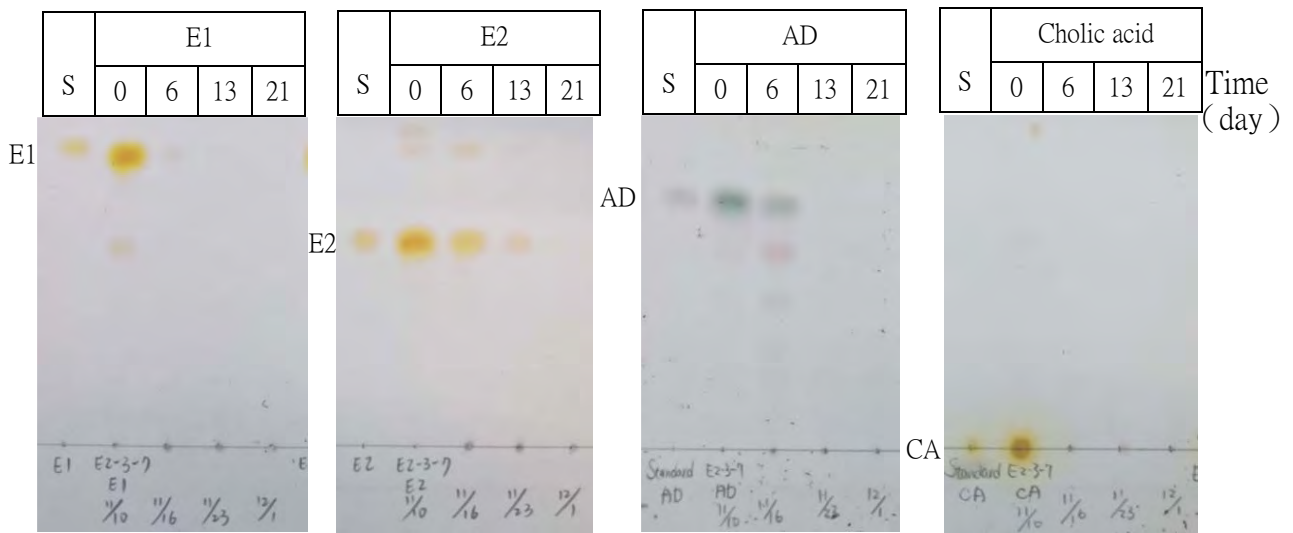
圖十九為 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 培養於添加了 1mM E1 的 R2A 固態培養基上之生長情形。生長情形雖稍慢於生長在未添加 E1 的 R2A 培養基之菌株，但仍於第四天長出明顯之單一菌落。固態培養基中有添加溶解度低（約 1.3-1.5 微克/升）(Shareef *et al.*, 2006) 的雌激素，造成霧面的情形，菌落周圍會產生降解 E1 之澄清環，然而照片中並無法明顯呈現出來。



圖十九 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 於添加 1mME1 的 R2A 固態培養基上之生長情形

#### (十) 純菌降解不同碳源之分析結果

圖二十為本研究所純化出之菌種 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 以不同固醇類為碳源的薄層層析結果。明顯看到，除膽固醇無明顯降解跡象外，E1、E2、AD、膽酸、孕酮及甾酮至第 21 天時皆完全被降解，可得知此菌株具有多樣化的降解能力。

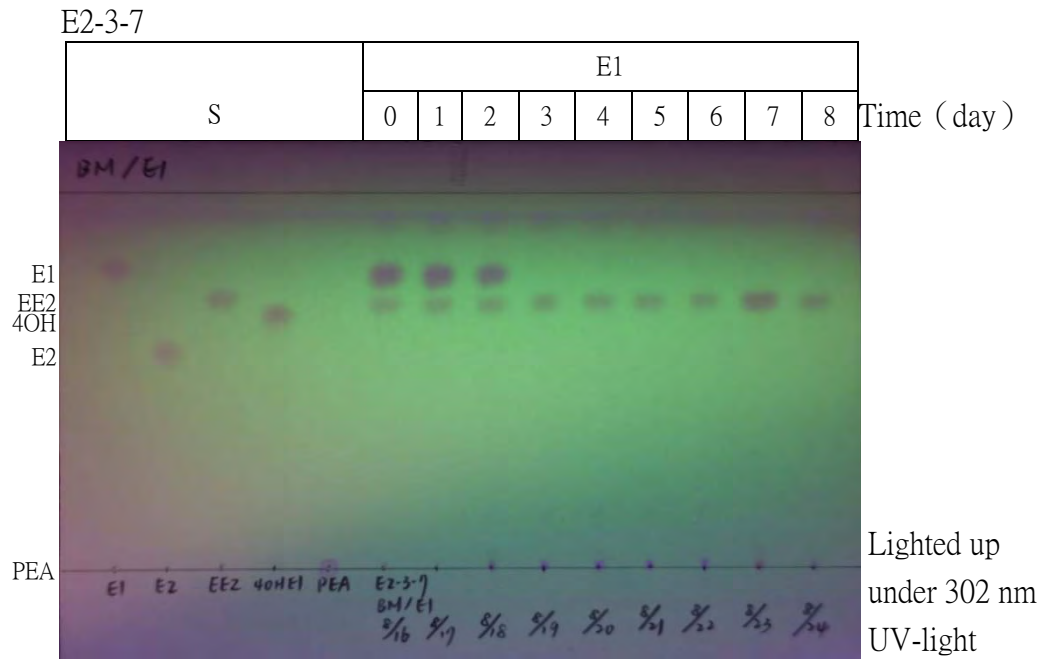


圖二十 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 利用不同固醇作為碳源之薄層層析烤片結果

### (十一) 中間代謝產物分析結果

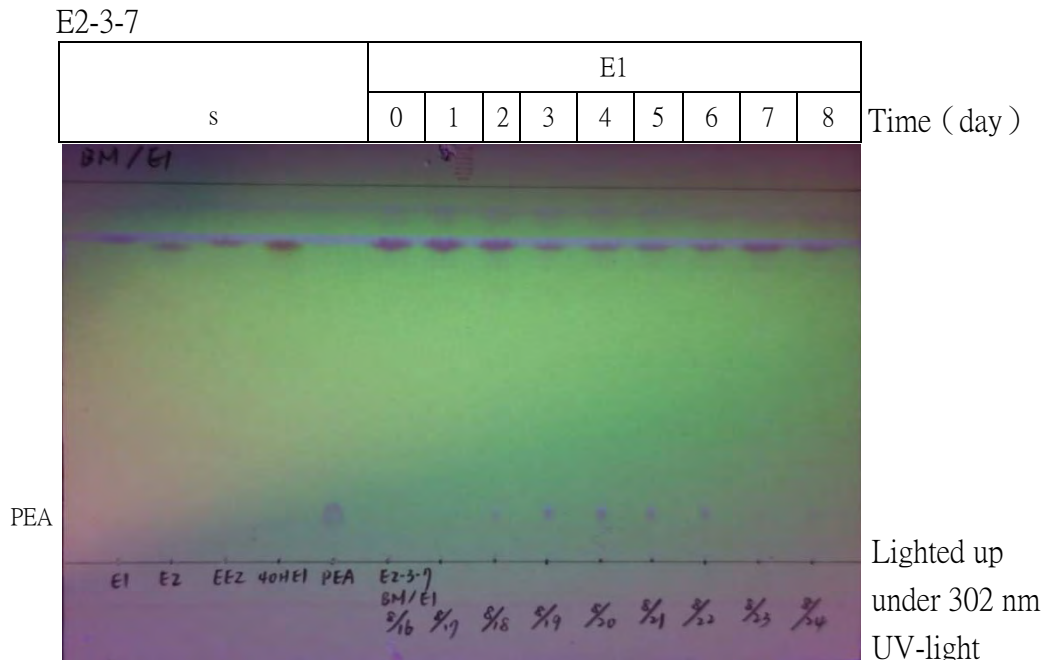
#### 1. 基礎培養基

圖二十一為 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 於基礎液態培養基培養，萃取後浸泡展開液 (1) 的結果。可看見 E1 於第四天起即無訊號，推測該菌株已將 E1 消耗完畢。而作為內標準品的 EE2 並無明顯變化，可知萃取回收量穩定，減少實驗誤差。而第七天因添加內標準品時誤加體積，因此訊號較其它天強。



圖二十一 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 培養於添加 1mM E1 之基礎培養基 浸泡展開液 (1) 薄層層析結果

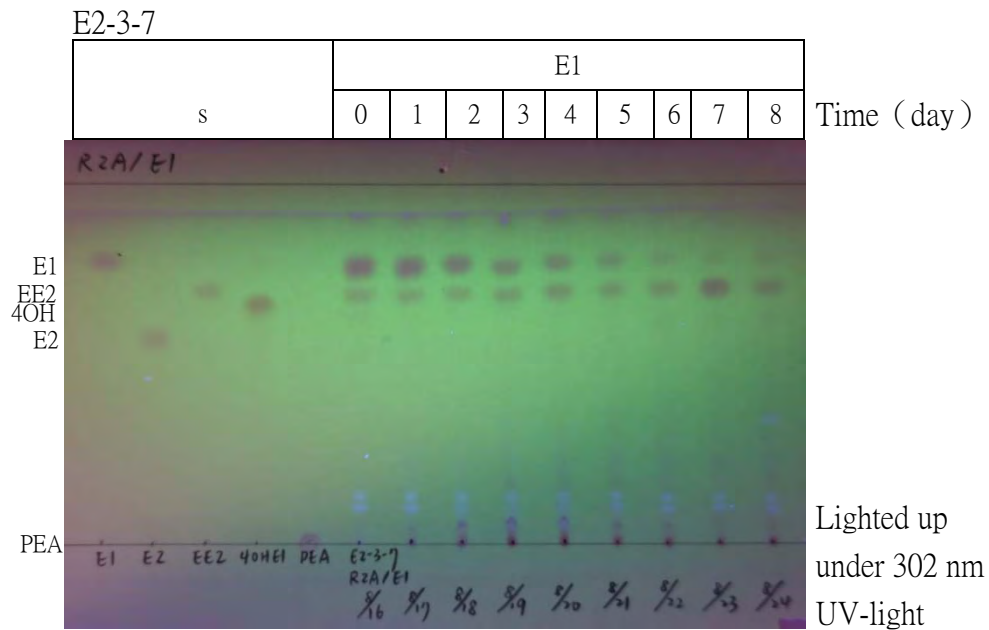
圖二十二為圖二十一浸泡展開液 (2) 後之結果，於第三天起即有明顯 PEA 生成，由此結果可確認該菌株主要降解途徑。PEA 含量隨時間增加，而後則是不規律之起伏變化。



圖二十二 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 培養於添加 1mM E1 之基礎培養基 浸泡展開液 (2) 薄層層析結果

## 2. R2A 培養基

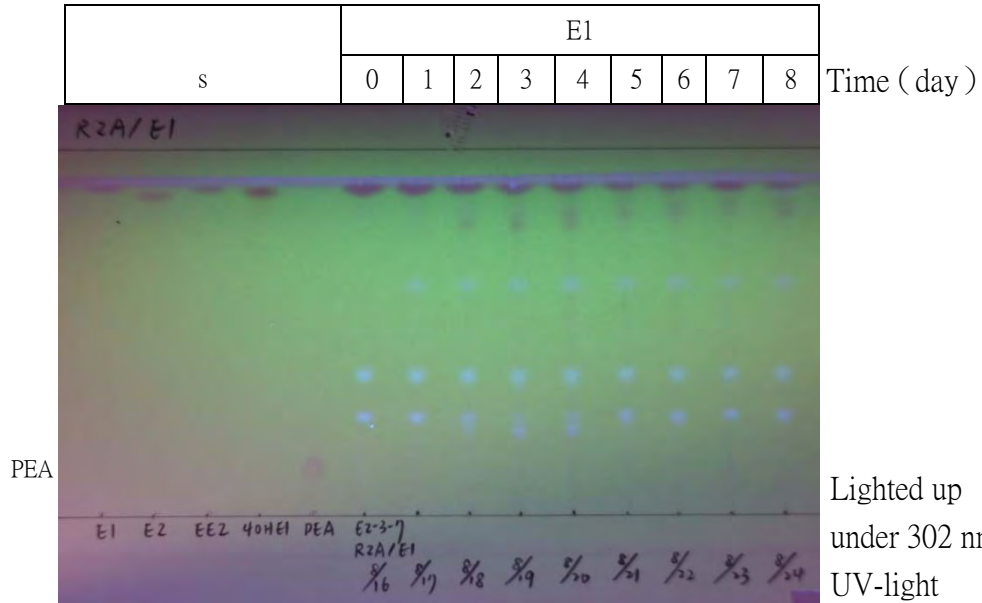
圖二十三為 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 於 R2A 液態培養基培養，萃取後浸泡展開液 (1) 的結果。可看見 E1 隨時間緩慢減少，降解效率明顯比培養於基礎培養基中差，推測該菌株先將 R2A 培養基中更容易利用之碳源消耗完之後，才開始降解 E1。而第七天因添加內標準品時誤加體積，因此訊號較其它天強。



圖二十三 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 培養於添加 1mM E1 之 R2A 培養基浸泡展開液 (1) 薄層層析結果

圖二十四為圖二十三浸泡展開液 (2) 後之結果，雖有 PEA 訊號生成，但不如圖二十二明顯。於 R2A 培養基的薄層層析中，比基礎培養基中多出許多不明螢光物質，因其於原點即出現，推測為 R2A 培養基中原有物質，及物質被降解後所產生之訊號。

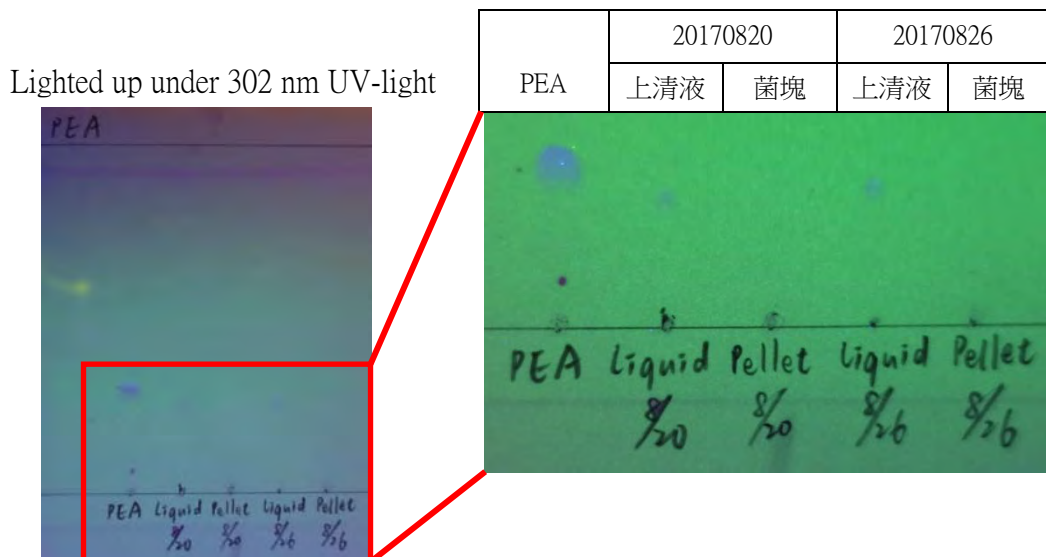
E2-3-7



圖二十四 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 培養於添加 1mM E1 之基礎培養基 浸泡展開液 (2) 薄層層析結果

(十二) 代謝產物位置確認

圖二十五為將基礎培養基之菌塊與上清液分離後、分別萃取及薄層層析的結果，由圖可知，PEA 只存在於上清液中，判斷該菌株將 E1 降解為無雌激素活性之 PEA 後無法再降解，因此將其丟至細胞外 (Lin *et al*, 2015)。



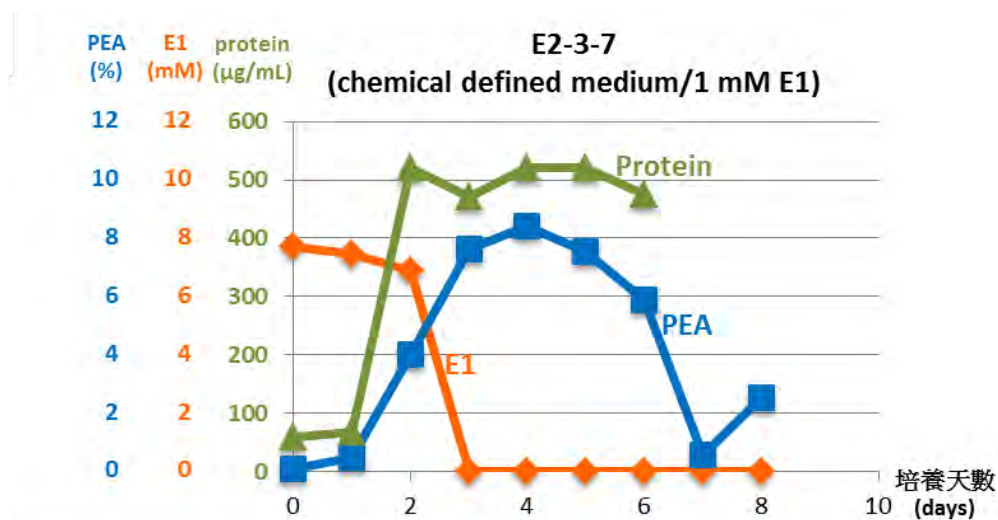
圖二十五 代謝產物位置確認薄層層析結果



### (十三) 生長曲線

#### 1. 基礎培養基

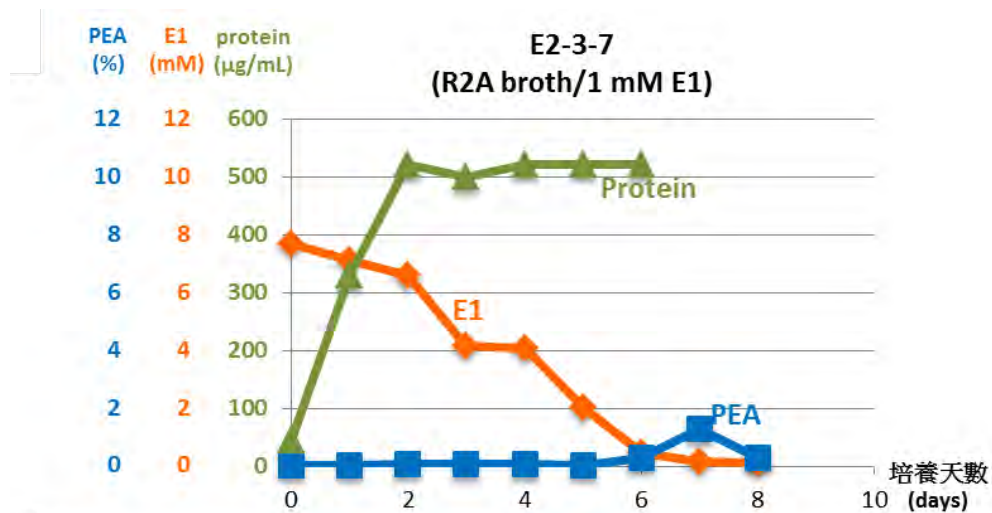
圖二十六為 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 培養於基礎培養基中之生長曲線，可看到蛋白質含量（綠色曲線）於第二天迅速增加，代表該菌株於該時間點附近快速分裂增殖，之後菌含量便趨於飽和。而將結果（十）基礎培養基之薄層層析進行數據分析，可發現菌大量生長後，E1（橘色曲線）迅速被消耗完畢，而 PEA（藍色曲線）也逐漸增加，隨後不規律起伏。



圖二十六 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 於基礎培養基生長曲線/E1、PEA 變化曲線

## 2. R2A 培養基

圖二十七為 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 培養於 R2A 培養基中之生長曲線，可看到蛋白質含量（綠色曲線）也於第二天迅速增加，菌含量達飽和。將結果（十）R2A 培養基之薄層層析進行數據分析後，E1（橘色曲線）緩慢減少，無明顯 PEA 生成，直至後期才有少許 PEA（藍色曲線）訊號，與結果（十一）結合來看，*Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 並不會降解 PEA，且 R2A 培養基營養較基礎培養基豐富，推測可能有雜菌生長其中並降解 PEA，因此無明顯 PEA 訊號。



圖二十七 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 於 R2A 培養基生長曲線/E1、PEA 變化曲線

## 二、討論

本研究發現，自污水處理廠取回的樣本，不論是未純化的混雜菌種(如菌液 E2-3)或是已純化之單一菌種 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7，皆無法有效降解人工合成的 EE2 (圖七、圖八及圖十六)。推測其原因除了 EE2 為近代才出現之人造化合物，致使環境菌種難以辨認外，另一原因應該在於結構上之特殊性。如圖二十八所示，A 為 E2 的結構式，B 為 EE2 的結構式，因為 EE2 的 17 位碳上比 E2 多了一個乙炔基，使得其被環境微生物辨識並降解的可能性大幅降低。由共代謝的實驗結果發現 EE2 存在會影響原本能有效降解 E2 的菌株降解 E2 的能力。此有趣現象值得進一步研究探討。

圖二十八-A E2 結構式

圖二十八-B EE2 結構式

而本研究亦將純化出之菌株 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 進行以其他固醇為碳源之降解測定，發現其可降解 E1、E2、雄烯二酮、膽酸、孕酮及甾酮，唯獨膽固醇無法被其降解，觀察碳的個數，除膽固醇為 27 個碳之外，其餘碳個數皆在 20 上下，推測碳個數過大為其無法被降解之原因。

本研究純化之菌株 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 會產生代謝產物 PEA，根據文獻 (Chen *et al.*, 2017)，PEA 為目前已發表之雌激素降解途徑 (圖一) 中的象徵性產物，故本研究純化之菌株極有可能以此途徑降解雌激素。從研究結果可知菌株會將代謝產物 PEA 排至細胞外，推測菌株應無法自行代謝該產物。然而菌株於液態培養時，PEA 卻會隨時間有不規律變化，推測其可能原因：一為抽取菌液時搖晃不均勻，導致萃取結果不一；另一為 PEA 可能依然存在，但因操作上的失誤使其濃度較低，而無法於薄層層析片上顯示訊號。另外由薄層層析結果發現，雖然樣品中 PEA 的訊號位置與標準品大致相符，但訊號的狀態卻有明顯差異，且觀察薄層層析結果(圖二十五)



發現，樣品與標準品的 PEA 訊號位置較其他層析結果的差異都要明顯。此一發現讓人有諸多猜測，不過確切原因仍待未來以更精確之儀器分析，更深入瞭解菌株的降解情況。

本研究發現，純化之菌株 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 於營養豐富之 LB 固態培養基生長狀況不佳，推測其可能無法以培養基中的主要營養成分胰水解蛋白（Tryptone）作為營養來源，須要添加其他特殊養分培養。

另外，觀察 qPCR 結果（圖十三）2015#1 有添加雌激素之處理組，其最後一取樣時間點菌株數量突然下降，推測樣品中可能有其他菌群會抑制 *Novosphingobium* 屬菌株的生長，或者因為培養多天導致生長環境 pH 值下降，不利菌群生長。

## 參、 結論與未來展望

- 一、本研究確實自迪化汙水處理廠純化出具降解雌激素能力之新菌種，命名為 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7。
- 二、本研究純化之菌株 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 會產生中間代謝產物 PEA 且將之排至細胞外。
- 三、本研究純化之菌株 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 於高濃度雌激素之環境下有顯著生長，故該菌株確實具純化意義。
- 四、本研究純化之菌株 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 脂肪酸主要由飽和脂肪酸 16:0、不飽和脂肪酸 18:1  $\omega$ 7c、18:1  $\omega$ 6c 和羥基脂肪酸 14:0 2-OH 組成。
- 五、本研究純化之菌株 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 具有和 *Sphingomonas* sp. strain KC8 之 *oecC* 基因相似之序列，且有極高可能性具備相同功能。
- 六、本研究純化之菌株 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 可降解 E1、E2、雄烯二酮、膽酸、孕酮及甾酮，具多樣化降解能力。
- 七、本研究純化之菌株 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 於 LB 固態培養基生長狀況不佳，在 R2A 固態培養基生長較佳，約需 3 至 5 天可長出明顯單一菌落。
- 八、本研究純化之菌株 *Novosphingobium* sp. strain E2-3-7 於液態培養第 1 至 3 天生長速度較快，該期間菌株活性強，適合實驗操作。
- 九、本研究沒有分離純化出能有效降解 EE2 的菌株，推測汙水處理廠中具有該能力的菌株比例必相當稀少。
- 十、未來將測試能誘發菌株基因表現的最低雌激素濃度。
- 十一、未來將持續找尋菌株最能穩定生長之環境。
- 十二、未來將以更精確之儀器(例如：液相質譜儀)進一步分析確認該菌株之代謝產物。
- 十三、未來將自其他水域採樣，並以多種培養條件，嘗試找出能降解人工雌激素 EE2 之菌株。
- 十四、本研究純化之菌株具有修復受汙染環境及製備雌激素相關藥品之應用潛力，未來將持續深入探究其發展的可能性。

## 肆、 參考文獻

- 一、 Chen YL, Yu CP, Lee TH, Goh KS, Chu KH, Wang PH, Ismail W, Shih CJ, Chiang YR. (2017). Biochemical Mechanisms and Catabolic Enzymes Involved in Bacterial Estrogen Degradation Pathways. *Cell chemical biology* **24(6)**, 712-724.
- 二、 Coombe RG, Tsong YY, Hamilton PB, Sih CJ. (1966). Mechanisms of Steroid Oxidation by microorganisms. *Biological Chemistry* **241**, 1587-1595.
- 三、 Edgar RC. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*. **32(5)**: 1792 – 1797.
- 四、 Espadaler J, Eswar N, Querol E, Avilés FX, Sali A, Marti-Renom MA, Oliva B. (2008). Prediction of enzyme function by combining sequence similarity and protein interactions. *BMC Bioinformatics* **9**: 249.
- 五、 Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA, Olsen GJ. (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* **74**: 2461-2470.
- 六、 Fujii K, Satomi M, Morita N, Motomura T, Tanaka T, Kikuchi S. (2003). *Novosphingobium tardaugens* sp. nov., an oestradiol-degrading bacterium isolated from activated sludge of a sewage treatment plant in Tokyo. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 47-52.
- 七、 Ghayee HK, Auchus RJ. (2007). Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis. *Rev Endocr Metab Disord* **8**: 289-300.
- 八、 Herberer T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data. *Toxicology Letters* **131**, 5-17.
- 九、 Iwanowicz LR, Blazer VS, Guy CP, Pinkney AE, Mullican JE, Alvarez DA. (2009). Reproductive health of bass in the Potomac, U. S. A., drainage: Part 1: Exploring the effects of proximity to wastewater treatment plant discharge. *Environ Toxicol Chem* **28**: 1072-1083.
- 十、 Jobling S, Williams R, Johnson A, Taylor A, Gross-Sorokin M, Nolan M. (2006). Predicted exposures to steroid estrogens in U.K. rivers correlate with widespread sexual disruption in

- wild fish populations. *Environ Health Perspect* **114**: 32-39.
- 十一、 Kampfer, P., Denner, E. B. M., Meyer, S., Moore, E. R. B. & Busse, H.-J. (1997). Classification of ‘*Pseudomonas azotocolligans*’ Anderson 1955, 132, in the genus *Sphingomonas* as *Sphingomonas trueperi* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 577 – 583.
- 十二、 Kumar S, Stecher G, Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* **33**: 1870-1874.
- 十三、 Lambert MR, Giller GS, Barber LB, Fitzgerald KC, Skelly DK. (2015). Suburbanization, estrogen contamination, and sex ratio in wild amphibian populations. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**: 11881-11886.
- 十四、 Le SQ, Gascuel O, Lartillot N. (2008). Empirical profile mixture models for phylogenetic reconstruction. *Bioinformatics*, **24**, 2317-2323.
- 十五、 Lin CW, Wang PH, Ismail W, Tsai YW, El Nayal A, Yang CY, Yang FC, Wang C -H, Chiang YR. (2015). Substrate uptake and subcellular compartmentation of anoxic cholesterol catabolism in *Sterolibacterium denitrificans*. *Biological Chemistry* **290**, 1155-1169.
- 十六、 Massart F, Parrino R, Seppia P, Federico G, Saggese G. (2006). How do environmental estrogen disruptors induce precocious puberty. *Minerva Pediatr* **58**: 247-254.
- 十七、 Mechoulam R, Brueggemeier R, Denlinger D. (1984). Estrogens in insects. *Cell Mol Life Sci* **40**: 942-944.
- 十八、 Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**: 695-700.
- 十九、 Palme R, Fischer P, Schildorfer H, Ismail MN. (1996). Excretion of infused <sup>14</sup>C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. *Anim Reprod Sci* **43**: 43-63.
- 二十、 Schlüsener MP, Bester K. (2005). Determination of steroid hormones, hormone conjugates and macrolide antibiotics in influents and effluents of sewage treatment plants utilising high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry with electrospray

- and atmospheric pressure chemical ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **19**, 3269-3278.
- 二十一、 Shareef A, Angove MJ, Wells JD, Johnson BB. (2006). Aqueous solubilities of estrone, 17  $\beta$ -estradiol, 17  $\alpha$ -ethynylestradiol, and bisphenol A. *J. Chem. Eng. Data* **51(3)**, 879-881.
- 二十二、 Sumpter JP. (1998). Xenoendocrine disruptors--environmental impacts. *Toxicol Lett* **102-103**: 337-342.
- 二十三、 Takeuchi, M., Kawai, F., Shimada, Y. & Yokota, A. (1993). Taxonomic study of polyethylene glycol-utilizing bacteria emended descriptions of the genus *Sphingomonas* and new description of *Sphingomonas macrogoltabidus* sp. nov., *Sphingomonas sanguis* sp. nov., and *Sphingomonas terrae* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* **16**, 227 - 238.
- 二十四、 Takeuchi, M., Sawada, H., Oyaizu, H. & Yokota, A. (1994). Phylo-genetic evidence for *Sphingomonas* and *Rhizomonas* as nonphoto-synthetic members of the alpha-4 subclass of the *Proteobacteria*. *Int J Syst Bacteriol* **44**, 308 - 314.
- 二十五、 Takeuchi, M., Hamana, K. & Hiraishi, A. (2001). Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1405 - 1417.
- 二十六、 Tarrant AM, Blomquist CH, Lima PH, Atkinson MJ, Atkinson S. (2003). Metabolism of estrogens and androgens by scleractinian corals. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **136**: 473-485.
- 二十七、 Tian W, Skolnick J. (2003). How well is enzyme function and conserved as a function of pairwise sequence identity? *J Mol Biol* **333**, 863-882.
- 二十八、 Ryan KJ. (1982). Biochemistry of aromatase: significance to female reproductive physiology. *Cancer Res* **42**: 3342s-3344s.
- 二十九、 Williams RJ, Johnson AC, Smith JLL, Kanda R. (2003). Steroid estrogens profiles

along river stretches arising from sewage treatment works discharges. *Environmental Science and Technology* **37**, 1744-1750.

三十、 Xie F, Quan S, Liu D, He W, Wang Y, Ma H, Chen G, Chao Y, Qian S. (2014).

*Novosphingobium kunmingense* sp. nov., isolated from a phosphate mine. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**, 2324 - 2329.

三十一、 Yabuuchi, E., Yano, I., Oyaizu, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T. & Yamamoto, H.

(1990). Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. *Microbiol Immunol* **34**, 99 - 119.

三十二、 Yu CP, Deeb RA, Chu KH. (2013). Microbial degradation of steroidal estrogens.

*Chemosphere* **91 (9)**, 1225-1235.

## 【評語】 070008

1. 本研究從迪化汙水處理廠中純化出能降解雌激素之菌株

*Novosphingobium* sp. strain E2-3-7，此菌含有功能基因 *oecC*

並能降解多種類固醇激素，但不能降解乙炔雌二醇。本研究是

一完整的作品，令人鼓舞。

2. *Novosphingobium* sp. strain JEM-1 能降解乙炔雌二醇，此菌與

本研究所找到的 E2-3-7 菌到底是在那一個功能基因(*oecA*、

*oecB* 或 *oecC*)不同，導致 JEM-1 能代謝乙炔雌二醇?