

以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(2/2)

EPA-107-E3S5-02-01

行政院環境保護署環境檢驗所委託研究計畫

委託單位：行政院環境保護署環境檢驗所

執行單位：國立臺灣大學

執行期間：107 年 3 月 28 日起至 107 年 12 月 31 日止

中華民國一百零七年十二月

以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(2/2)

EPA-107-E3S5-02-01

行政院環境保護署環境檢驗所委託研究計畫

委託單位：行政院環境保護署環境檢驗所

執行單位：國立臺灣大學

執行期間：107 年 3 月 28 日起至 107 年 12 月 31 日止

計畫經費：1,900,000 元

計畫主持人：童心欣 教授

共同主持人：于昌平 教授、郭獻文 教授、蔡孟勳 教授

「以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(2/2)」計畫期末報告基本資料表

委辦單位	行政院環境保護署環境檢驗所		
執行單位	國立臺灣大學		
參與計畫人員姓名	童心欣、于昌平、郭獻文、蔡孟勳		
年度	107	計畫編號	EPA-107-E3S5-02-01
研究性質	☒ 基礎研究 ☐ 應用研究 ☐ 技術發展		
研究領域	生物類		
計畫屬性	☒ 科技類 ☐ 非科技類		
全程期間	107 年 3 月～107 年 12 月		
本期期間	107 年 3 月～107 年 12 月		
本期經費	1,900.0 千元		
	資本支出	經常支出	
	土地建築 0__千元	人事費 830.716 千元	
	儀器設備 0__千元	業務費 27.0__千元	
	其他 0__千元	材料費 840.284 千元	
		其他 202.0__千元	
摘要關鍵詞(中英文各三則) 硫酸銅、底泥、微生物菌群分布 copper sulfate, sediment, microbial community profile			

基本摘要內容

- 一、中文計畫名稱：
以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(2/2)
- 二、英文計畫名稱：
Pollution source identification by microbial community profile (2/2)
- 三、計畫編號：
EPA-107-E3S5-02-01
- 四、執行單位：
國立臺灣大學
- 五、計畫主持人（包括/共同主持人）：
童心欣、于昌平、郭獻文、蔡孟勳
- 六、執行開始時間：
107 年 3 月 28 日
- 七、執行結束時間：
107 年 12 月 31 日
- 八、報告完成日期：
107 年 12 月 25 日
- 九、報告總頁數：
160 頁
- 十、使用語文：
中文、英文
- 十一、報告電子檔名稱：
以菌群分布作為鑑識污染源技術建立[期末報告].docx
- 十二、報告電子檔格式：
MS WORD
- 十三、中文摘要關鍵詞：
硫酸銅、底泥、微生物菌群分布
- 十四、英文摘要關鍵詞：
copper sulfate, sediment, microbial community profile
- 十五、中文摘要：

本研究探討以微生物菌群變化作為污染源鑑識之可行性。本計畫第一年研究受硫酸銅影響之菌群變化，分為實驗室模擬反應槽暴露試驗及現地樣品測試。結果顯示 *Aeromonadaceae*, *Burkholderiales_incertae_sedis*, *Caldilineaceae*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Planctomycetaceae*, *Pseudomonodaceae*, 及 *Xanthobacteraceae* 皆重複出現在現場溪中底泥、溪水、及工廠放流水具有高濃度金屬銅的樣品中，有機會成為銅污染之普遍性指標判斷菌群。另外，由反應槽、老街溪河水及底泥菌相及

樣品銅濃度交叉比對，結果顯示，Burkholderiaceae, Hydrogenophilaceae, Methylophilaceae, Chitinophagaceae, 及 Flavobacteriaceae 等之豐富度消長與銅濃度相關。第二年研究以高通量次世代定序技術獲得菌株受硫酸銅污染下之基因表現變化。於老街溪工業區放流口上、下游共 5 個點位進行水質與底泥採樣，共取得 5 個水樣與 5 個底泥樣本。萃取底泥樣本中總 DNA，並以 MiSeq 次世代定序分析 16S-rRNA gene amplicon 獲得菌群組成資訊。菌群分析結果除篩選出主要差異菌群外，並以 PICRUSt 運算模式評估菌群基因表現。另外，也同步利用 illumina shotgun sequencing 分析各底泥樣品總基因體，取得與銅污染相關的基因表現。結果顯示，工業區放流口下游有明顯增加趨勢的菌門為 Microscillaceae 及 Geobacteraceae。而在受到工業區放流口影響趨勢較高的菌門則為 Hydrogenophilaceae 及 Gallionellaceae。此中，Hydrogenophilaceae 菌門與第一年結果相符，在工業區放流口後豐度迅速減少，未來可能成為主要辨識污染之菌群。由不同菌群組成之基因表現預測(PICRUSt)分析，得到 20 種基因功能其相關基因豐度隨著上游至下游降低。大部分皆與代謝功能相關，次要則屬於細胞生化反應及遺傳信息處理，其中 Calcium signal pathway 與 Photosynthesis - antenna proteins 兩種基因豐度與底泥中重金屬銅、鉻、錳的濃度相關性非常高。這兩種的功能基因可能可作為未來篩選的標的基因。另外，以 shot gun sequencing 底泥基因型分析結果顯示，僅有少數基因在放流口下游樣品豐度較上游高。尤其是與銅、鋅、鎳在細胞膜間傳輸相關之 ATPase activity (transporting or exporting)，未來也可能具有應用潛力。

十六、英文摘要：

This study investigates the possibility of applying microbial community profile changes to pollution source identification. In the first-year study, sediment microcosm was established and exposed to copper sulfate. In addition, water and sediments were sampled from a local river to verify the results. The results showed that Aeromonadaceae, Burkholderiales_incertae_sedis, Caldilineaceae, Chloroflexi, Firmicutes, Planctomycetaceae, Pseudomonadaceae, and Xanthobacteraceae can be found from microcosm, river sediments and factory discharge. And, the correlation analysis showed that Burkholderiaceae, Hydrogenophilaceae, Methylophilaceae, Chitinophagaceae, and Flavobacteriaceae were closely related to copper concentration. In the second year, sediments and water samples from both upstream and downstream of an actual industrial park discharging point were collected and analyzed. These samples will be used to verify the possibility of using the microbial change analysis as a pollution source identification. 16S-rRNA gene amplicon sequencing was performed for all 5 sediment samples collected from the river receiving industrial discharge and metagenomics function from each sample was estimated by PICRUSt (v1.1.3). In

addition, whole sediment genome was also analyzed by illumina shot gun sequencing. The amplicon sequencing results showed that Microscillaceae and Geobacteraceae were increased after discharging point. The Hydrogenophilaceae and Gallionellaceae were two groups mostly affected by the industrial discharge. Especially, the Hydrogenophilaceae group is in agreement as the finding from the first year's results. The results from PICRUSt estimation, there were 20 gene functions were affected by the industrial discharge, within those function, calcium signal pathway and photosynthesis – antenna proteins were the two major functions affected significantly by the industrial discharge, and may be considered as functional gene indicators in the future. From the whole genome analysis, the metal related (Cu, Zn, Cr) ATPase activity (transporting or exporting) gene expressed highest impact from the industrial discharge. It can also be considered and indicating functional gene for the future applications.

目錄

一、前言.....	1
1.1 計畫緣起.....	1
1.2 計畫目標.....	2
1.2.1 計畫工作內容.....	2
1.2.2 計畫執行進度及成效.....	4
二、第一年計畫結果概要.....	7
2.1 第一年計畫研究方法.....	7
2.2 第一年計畫結果.....	9
2.3 第一年計畫結論.....	12
三、背景文獻回顧.....	15
3.1 河川水域底泥汙染下微生物活性及基因表現變化.....	15
3.2 底泥土壤重金屬銅汙染與微生物基因表現變化.....	18
四、研究方法與原理.....	21
4.1 現地採樣分析.....	21
4.1.1 採樣點位資訊.....	21
4.1.2 採樣分析項目.....	23
4.1.3 採樣方法.....	24
4.1.4 水樣分析項目及方法.....	25
4.1.5 底泥分析項目及方法.....	28
4.1.6 微生物.....	29
4.2 高通量定序.....	31
4.2.1 MiSeq 16S-rRNA 菌群.....	31
4.2.2 高通量定序及組裝.....	32

4.2.3 PICRUSt 菌群代謝功能評估分析.....	36
4.2.4 Shotgun metagenomics 定序及分析	37
4.3 實驗室純菌暴露硫酸銅批次實驗.....	40
4.3.1 純菌暴露硫酸銅批次實驗設置.....	40
4.3.2 核酸萃取及前處理.....	40
4.3.3 菌株功能性基因分析.....	40
五、結果與討論.....	45
5.1 現地採樣分析	45
5.1.1 河川水樣現地測量.....	45
5.1.2 河川水樣實驗室分析.....	48
5.1.3 河川底泥物理化學性質	52
5.2 純菌暴露硫酸銅批次實驗	56
5.2.1 批次實驗生長曲線.....	56
5.2.2 RNA 抽取品質分析.....	58
5.3 河川底泥基因體分析.....	59
5.3.1 河川底泥菌群分析.....	59
5.3.2 PICRUSt 微生物功能性基因表現評估分析.....	68
5.3.3 放流口對底泥 PICRUSt 微生物預測基因表現影響	75
5.3.4 Shotgun metagenomics 總體基因學分析結果.....	80
六、結論.....	96
6.1 老街溪水質及底泥檢測	96
6.2 以 PICRUSt 預測功能性基因表現.....	96
6.3 河川底泥總基因體分析	97
七、建議事項.....	99

參考文獻.....	101
-----------	-----

附錄.....	105
---------	-----

附錄一 第一次工作會議意見及廠商回覆表.....	105
--------------------------	-----

附錄二 期中審查會議委員意見及廠商回覆意見表	106
------------------------------	-----

附錄三 期末審查會議委員意見及廠商回覆意見表	111
------------------------------	-----

附錄四 科技計畫成果效益事實報告表	117
-------------------------	-----

附錄五 科技計畫成果效益自評表.....	121
----------------------	-----

附錄六 以 PICRUS _t 評估底泥中功能性基因在各樣品中之豐度	124
--	-----

圖目錄

圖 2-1 老街溪採樣點分佈(藍、綠色點為水樣、紅色點為工廠放流水)	7
圖 2-2 實驗室連續流試驗中底泥樣品之組成菌群(以菌科分類為依據)受不同進流水條件(左)及出流(右)之水質影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果	11
圖 2-3 溪水(左)溪中底泥(右)樣品之組成菌群(以菌科分類為依據)受不同底泥條件(如金屬銅)影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果	11
圖 4-1 老街溪採樣點分布	21
圖 4-2 採樣分析項目一覽	23
圖 4-3 採樣分析流程圖	25
圖 4-4 高通量定序流程圖	35
圖 4-5 PICRUS 分析基本流程示意圖	36
圖 4-6 總基因體學分析流程圖	39
圖 4-7 Metatranscriptome 分析流程的兩大策略。(一)有參考基因組分析流程。(二)無參考基因組分析流程	42
圖 4-8 Metatranscriptome 分析結果呈現示意圖。(一) Metatranscriptome 量化分析。(二) Metatranscriptome 分析與菌相分布之關係。(Abu-Ali et al., 2018)	43
圖 5-1 河川水樣酸鹼度分布	46
圖 5-2 河川水樣溫度及溶氧分布	46
圖 5-3 河川水樣導電度分布	47
圖 5-4 河川水樣葉綠素 a 分布	47
圖 5-5 河川水樣中 TOC 及 COD 分布	49
圖 5-6 河川水樣中 TIN 分布	49
圖 5-7 河川水樣中陰離子分布	50
圖 5-8 水中懸浮固體物濃度分布	50
圖 5-9 底泥 pH 分布	53
圖 5-10 底泥 CNSH 元素組成	54
圖 5-11 純菌暴露硫酸銅批次實驗生長曲線測定結果	57
圖 5-12 純菌暴露硫酸銅批次實驗萃取 RNA 微流體電泳分析儀結果	58
圖 5-13 現地樣品中 tags 及 OTU 數量圖	60
Street 1~5 樣品分別表示老街溪採樣點 1 至 5，以下所有圖表標示皆然	60

圖 5-14 OTU 分佈維恩圖	60
圖 5-15 street1 樣品物種註釋階層比例圖	61
圖 5-16 street2 樣品物種註釋階層比例圖	61
圖 5-17 street3 樣品物種註釋階層比例圖	62
圖 5-18 street4 樣品物種註釋階層比例圖	62
圖 5-19 street5 樣品物種註釋階層比例圖	63
圖 5-20 現地底泥定序結果菌門(family)組成比例圖	64
圖 5-21 採樣點 UPGMA 集群分析圖	65
圖 5-22 採樣點 PCoA 主座標分析圖	66
圖 5-23 採樣點底泥菌門組成熱圖	67
圖 5-24 利用 PICRUS _t 評估底泥不同功能的基因種類數量	68
圖 5-25 PICRUS _t 預測基因功能豐度熱圖(a-d)	73
圖 5-26 選定 44 種預測基因功能豐度熱圖	74
圖 5-27 street1 為基準選定與細胞生化反應(Cellular Processes)預測基因功能相關基因數量趨勢圖	74
圖 5-28 street1 為基準選定與遺傳信息處理(Genetic Information Processing)預測基因功能相關基因數量趨勢圖	75
圖 5-29 street1 為基準選定與代謝(Metabolism)預測基因功能相關基因數量趨勢圖	75
圖 5-30 選定 20 種預測基因功能豐度熱圖	76
圖 5-31 street1 為基準選定 20 種預測基因功能相關基因數量趨勢圖	77
圖 5-32 篩選出 20 種底泥基因與重金屬濃度之關聯性分析	79
圖 5-33 細菌總 DNA 電泳結果圖	80
圖 5-34 street1 樣本 FASTQ 修剪前 (上) 和修剪後 (下) 的 MultiQC 輸出結果 ..	82
圖 5-35 street1 樣本以 GraPhlAn 繪製之菌種演化樹 (cladogram)	83

表目錄

表 1-1 計畫預定進度	4
表 1-2 本計畫預期目標及目前執行成效	5
表 2-1 河川水樣重金屬濃度 (單位：mg/L)	9
表 4-1 老街溪 2018 年 5 月 26 日第一次採樣點資訊	22
表 5-1 河川水樣現地量測數值	45
表 5-2 河川水樣實驗分析數值 (單位：mg/L)	48
表 5-3 河川水樣重金屬濃度 (單位：mg/L)	51
表 5-5 底泥 pH 分布	52
表 5-6 底泥 CNSH 元素重量百分比例	53
表 5-7 底泥粒徑分布表	54
表 5-8 底泥重金屬含量(單位：mg/kg)	55
表 5-9 樣品 street1 高通量宏基因定序結果與重金屬相關生物途徑(Biological process)的基因	84
表 5-10 樣品 street1 高通量宏基因定序結果與重金屬相關之分子功能(molecular function)基因	86
表 5-11 樣品 Street1~5 高通量宏基因定序結果與金屬(含重金屬)或重金屬相關生物途徑(Biological process)及分子功能(molecular function)基因總數量比較	89
表 5-12 樣品 Street1~5 高通量宏基因定序結果與金屬鐵(Fe, iron)相關生物途徑(Biological process)及分子功能(molecular function)基因整理	89
表 5-13 樣品 Street1~5 高通量宏基因定序結果與重金屬銅(Cu, copper)及鋅(Zn, zinc)相關生物途徑(Biological process)及分子功能(molecular function)基因整理	92
表 5-14 樣品 Street1~5 高通量宏基因定序結果分別與重金屬鎘(Cd, cadmium)、錳(Mn, manganese)、及鉛(Pd, lead)相關生物途徑(Biological process)及分子功能(molecular function)基因整理	93
表 5-15 樣品 Street1~5 高通量宏基因定序結果分別與重金屬銀(Ag, silver)、鎳(Ni, Nickel)、砷(As, arsenic)、鈷(Co, cobalt)及汞(Hg, mercury)相關生物途徑(Biological process)及分子功能(molecular function)基因整理	94

報告大綱

本計畫擬接續第一年所研究之菌群變化成果，在實驗室以添加硫酸銅批次培養純菌方式，並以高通量次世代定序技術（**Next Generation Sequencing**）獲得菌株受硫酸銅污染下之基因體變化。針對重金屬(硫酸銅)污染之底泥環境中微生物族群進行分析，探討硫酸銅對土壤環境中微生物結構變化之影響，瞭解菌群分佈的差異性；另外，以菌群分析結果篩選出主要差異菌群，並建立菌群變化與污染物之相關性，再以現地樣品驗證，評估以菌群變化分析作為污染鑑識之可能性。

本計畫主要目的分三點如下：蒐集國內外利用微生物總基因體學功能性基因與污染來源之相關文獻。延續第一年分析之可能菌群，分析河川底泥中微生物總轉錄體學功能性基因受到污染物後所衍生的變化。以總基因體學分析結果評估鑑識污染源之可能標的功能性基因，評估以污染指標表現基因鑑識污染來源可能性。

本計畫經費 190 萬元，並規劃五大項：其中人事費 83.0716 萬元，材料費 84.0283 萬元，業務費 2.7 萬元，旅運費 1.2 萬元，管理費 19 萬元。

本計畫之執行進度。包含

1. 蒐集國內外針對污染源鑑識、微生物總基因體學功能性基因及污染物與微生物生態變化之文獻資料。
2. 延續第一年之菌群分布結果，以總轉錄體學方法分析污染物所造成微生物功能性基因變化，並評估可利用於污染源鑑識之主要功能性基因。
3. 選取一主要污染河川，並於可能之污染源排放口上、下游區段採取底泥樣品，分別以菌群及功能性基因分析污染造成之變化結果，評估標的菌株及功能性基因作為污染源鑑識之可能性。

4. 完成研究報告 1 件。

本計畫共分六個章節，各章節內容說明如下：第一章「前言」中介紹計畫源起、目標，以及計畫工作內容其執行進度與成效。第二章「第一年計畫結果概要」回顧第一計畫的方法與結果。第三章「背景文獻回顧」以河川水域底泥污染下微生物活性及基因表現變化、底泥土壤重金屬銅污染與微生物基因表現變化，這兩項目為分類進行文獻回顧。第四章「研究方法與原理」將本計畫使用之研究方法進行說明，包含現地採樣、水樣與底泥之分析、實驗流程、定序前處理、高通量定序、純菌暴露實驗和結果之數據整理解析等。第五章「結果與討論」包含四小節，包含了蒐集相關文獻結果、現地採樣分析結果、純菌暴露實驗結果、河川底泥基因體分析結果。第六章「結論」與第七章「建議事項」以條列敘述方式，敘述本計畫的實驗結果，並針對部分結果進行探討，另提出後續的研究方向以及參考意見。

計畫成果摘要(詳細版)

計畫名稱：以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(2/2)

計畫編號：EPA-107-E3S5-02-01

計畫執行單位：國立臺灣大學

計畫主持人（包括協同主持人）：童心欣，于昌平，郭獻文，

蔡孟勳

計畫期程：107 年 3 月 28 日至 107 年 12 月 31 日

計畫經費：壹佰玖拾萬元

摘要

本研究探討以微生物菌群變化作為污染源鑑識之可行性。本計畫第一年研究受硫酸銅影響之菌群變化，分為實驗室模擬反應槽暴露試驗及現地樣品測試。結果顯示 *Aeromonadaceae*, *Burkholderiales_incertae_sedis*, *Caldilineaceae*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Planctomycetaceae*, *Pseudomonodaceae*, 及 *Xanthobacteraceae* 皆重複出現在現場溪中底泥、溪水、及工廠放流水具有高濃度金屬銅的樣品中，有機會成為銅污染之普遍性指標判斷菌群。另外，由反應槽、老街溪河水及底泥菌相及樣品銅濃度交叉比

對，結果顯示，Burkholderiaceae, Hydrogenophilaceae, Methylophilaceae, Chitinophagaceae, 及 Flavobacteriaceae 等之豐富度消長與銅濃度相關。第二年研究以高通量次世代定序技術獲得菌株受硫酸銅污染下之基因表現變化。於老街溪工業區放流口上、下游共 5 個點位進行水質與底泥採樣，共取得 5 個水樣與 5 個底泥樣本。萃取底泥樣本中總 DNA，並以 MiSeq 次世代定序分析 16S-rRNA gene amplicon 獲得菌群組成資訊。菌群分析結果除篩選出主要差異菌群外，並以 PICRUSt 運算模式評估菌群基因表現。另外，也同步利用 illumina shotgun sequencing 分析各底泥樣品總基因體，取得與銅污染相關的基因表現。結果顯示，工業區放流口下游有明顯增加趨勢的菌門為 Microscillaceae 及 Geobacteraceae。而在受到工業區放流口影響趨勢較高的菌門則為 Hydrogenophilaceae 及 Gallionellaceae。此中，Hydrogenophilaceae 菌門與第一年結果相符，在工業區放流口後豐度迅速減少，未來可能成為主要辨識污染之菌群。由不同菌群組成之基因表現預測(PICRUSt)分析，得到 20 種基因功能其相關基因豐度隨著上游至下游降低。大部分皆與代謝功能相關，次要則屬於細胞生化反應及遺傳信息處理，其中 Calcium signal pathway 與 Photosynthesis - antenna proteins 兩種基因豐度與底泥中重金屬銅、鉻、錳的濃度

相關性非常高。這兩種的功能基因可能可作為未來篩選的標的基因。

另外，以 shot gun sequencing 底泥基因型分析結果顯示，僅有少數

基因在放流口下游樣品豐度較上游高。尤其是與銅、鋅、鎳在細胞膜

間傳輸相關之 ATPase activity (transporting or exporting)，未來

也可能具有應用潛力。

Abstract

This study investigates the possibility of applying microbial community profile changes to pollution source identification. In the first-year study, sediment microcosm was established and exposed to copper sulfate. In addition, water and sediments were sampled from a local river to verify the results. The results showed that Aeromonadaceae, Burkholderiales_incertae_sedis, Caldilineaceae, Chloroflexi, Firmicutes, Planctomycetaceae, Pseudomonadaceae, and Xanthobacteraceae can be found from microcosm, river sediments and factory discharge. And, the correlation analysis showed that Burkholderiaceae, Hydrogenophilaceae, Methylophilaceae, Chitinophagaceae, and Flavobacteriaceae were closely related to copper concentration. In the second year, sediments and water samples from both upstream and downstream of an actual industrial park discharging point were collected and analyzed. These samples will be used to verify the possibility of using the microbial change analysis as a pollution source identification. 16S-rRNA gene amplicon sequencing was performed for all 5 sediment samples collected from the river receiving industrial discharge and metagenomics function from each sample was estimated by PICRUSt (v1.1.3). In addition, whole sediment genome was also analyzed by illumina shot gun sequencing. The amplicon sequencing results showed that Microscillaceae and Geobacteraceae were increased after discharging point. The Hydrogenophilaceae and Gallionellaceae were two groups mostly affected by the industrial discharge. Especially, the Hydrogenophilaceae group is in agreement as the finding from the first year's results. The results from PICRUSt estimation, there were 20 gene

functions were affected by the industrial discharge, within those function, calcium signal pathway and photosynthesis – antenna proteins were the two major functions affected significantly by the industrial discharge, and may be considered as functional gene indicators in the future. From the whole genome analysis, the metal related (Cu, Zn, Cr) ATPase activity (transporting or exporting) gene expressed highest impact from the industrial discharge. It can also be considered and indicating functional gene for the future applications.

前言

由於污染物排放可能為非連續性，水域中能直接即時連續偵測的方法在許多現地並不適用，例如工廠夜間或雨季違法排放等，無法以水樣直接追蹤。但許多污染物在底泥中可能累積或者接觸底泥微生物造成微生物生態或基因體變化，即使污染物短暫消失，微生物生態的變化仍可量測並代表現地長期受到污染的可能性。

本計畫接續第一年所研究之菌群變化成果，在實驗室以添加硫酸銅批次培養純菌方式，並以高通量次世代定序技術（Next Generation Sequencing）獲得菌株受硫酸銅污染下之基因體變化。針對重金屬（硫酸銅）污染之底泥環境中微生物族群進行分析，探討硫酸銅對土壤環境中微生物結構變化之影響，瞭解菌群分佈的差異性；另外，以菌群分析結果篩選出主要差異菌群，並建立菌群變化與污染物之相關性，再以現地樣品驗證，評估以菌群變化分析作為污染鑑識之可能性。

研究方法

1. 蒐集國內外針對污染源鑑識、微生物總基因體學功能性基因及污染物與微生物生態變化之文獻資料。

2. 延續第一年之菌群分布結果，以總轉錄體學方法分析污染物所造成微生物功能性基因變化，並評估可利用於污染源鑑識之主要功能性基因。依第一年研究結果顯示，甲基氧化菌類(methylobacteriophages)在反應槽中受硫酸銅影響較顯著，因此選取 *Methylobacterium aquaticum* 此一菌屬進行培養繪製其生長曲線。培養至吸光值在 0.3~0.5 之間後，將菌液以離心方式取得菌體後，以去核酸水回溶倒入研鉢中，加入液態氮研磨後以 TRIZOL 萃取 RNA。得到的 RNA 進行菌株功能性基因分析：(一)RNA Libaray 基因庫製備和定序 (transcriptome)、(二)Metatranscriptome 高通量定序、組裝及分析。
3. 選取一主要污染河川，並於可能之污染源排放口上、下游區段採取底泥樣品，分別以菌群及功能性基因分析污染造成之變化結果，評估標的菌株及功能性基因作為污染源鑑識之可能性。在 2018 年 5 月 26 日於老街溪 5 個點位進行水質與底泥採樣，共取得 5 個水樣與 5 個底泥樣本。分析點位集中於老街溪下游，以直接接收工廠放流水匯入的 Street3 點位為中心，往上游及下游個採集 2 個點位，藉由較密集的點位選擇，以比較老街溪水質與底泥受工業區放流水

(Street3)排入前後的影響。其中除了 Street1 外，其餘 4 點附近皆有觀察到老街溪沿岸設有民生或工業污水排放口。



圖一、老街溪採樣點分佈(藍、綠色點為水樣、紅色點為工廠放流水)

4. 水樣分析項目有溫度、pH、導電度、溶氧量、葉綠素 a、COD、總有機碳、氨氮、水中陰離子、重金屬、微生物族群。底泥分析項目則有 pH、粒徑、CNSH 元素比例、重金屬濃度、微生物族群等。

5. 底泥樣品微生物分析：將底泥檢體利用 QIAGEN 提供之 DNeasy PowerSoil Kit 試劑盒進行細菌脫氧核糖核酸(DNA)提取。接續進行 PCR 擴增，利用聚合酵素鍊鎖反應(PCR)放大出 V3-V4 片段，長度約 550bp，放大後產物使用 GeneHlow Gel / PCR 純化試劑盒純化 (Geneaid)，由於放大後的序列尾端皆設計有 Illumina 突出轉接子 (overhang adapters)，因此可以藉此突出轉轉接子序列(overhang adapters)，以 Illumina 提供之 Nextera XT Index 試劑盒，利用 內含條碼 barcodes 與 Illumina 定序接頭序列(P5, P7)的正反引子 將，上述純化過後的產物進一步以 PCR 反應放大並利用 AMPure XP 磁珠純化成約 630bp 大小的文庫(library)。使用 Agilent bioanalyzer 2100 測量待測文庫之大小及使用螢光定量法(Qubit) 測量待測文庫濃度，調整待測文庫濃度後，將樣本加入表面帶有互 補轉接子序列的定序晶片上，並利用次世代定序儀(MiSeq)之橋式 聚合酶鍊鎖反應(bridge amplification)將樣本擴增以放大螢光檢 測的訊號，藉由定序過程中不同鹼基的螢光標記擁有不同的螢光顏 色來辯認互補的鹼基對，經重覆進行螢光標記移除與偵測，即可偵 測眾多環境菌種的基因序列（雙邊定序長度 2*300bp）。

6. PICRUST 的分析流程分首先對測序獲得的 16S rRNA 基因序列，進行封閉式參考 OTU 劃分 (Closed-reference OTU picking)，通過與 Greengenes 資料庫比對，尋找每一條測序序列的“參考序列最臨近鄰居”，並歸為參考 OTU；再來根據“參考序列最臨近鄰居”的 rRNA 基因數量，對獲得的 OTU 豐度矩陣進行校正；最後根據“參考序列最近鄰居”對應的 KEGG 等基因功能譜資料，換算預測菌群的整體代謝功能。
7. Shotgun metagenomics 定序及分析首先進行 DNA Library 基因庫製備和定序 (shotgun sequencing)，之後總基因體學分析方法分為序列品質控管、計算菌種豐富度、基因預測分群及豐富度及基因功能註解、豐富度及功能蛋白序列比對

結果

搜集了國內外相關文獻，並依重金屬污染之底泥環境中，微生物族群總基因體學與污染相關、蒐集重金屬暴露後，微生物功能性基因表現變化二項目進行分類。

在 2018 年 5 月 26 日於老街溪 5 個點位進行水質與底泥採樣，共取得 5 個水樣與 5 個底泥樣本，主要重金屬濃度如下表一、表二所示。

表一、河川水樣重金屬濃度（單位：mg/L）

樣本名	銀(Ag)	鎘(Cd)	鈷(Co)	鉻(Cr)	鋁(Al)	銻(Sr)	錳(Mn)	鐵(Fe)
Street1	ND	ND	ND	ND	0.214	ND	0.024	0.319
Street2	ND	ND	ND	ND	0.076	ND	0.025	0.129
Street3	ND	ND	ND	ND	0.034	0.013	0.062	0.079
Street4	ND	ND	ND	ND	0.055	0.017	0.028	0.138
Street5	ND	ND	ND	ND	0.014	0.014	0.056	0.128
平均數	-	-	-	-	0.078	0.013	0.039	0.159
標準差	-	-	-	-	0.07	0.003	0.017	0.083
最小值	-	-	-	-	0.014	ND	0.024	0.079
最大值	-	-	-	-	0.214	0.017	0.062	0.319
基準值	0.05	0.01	-	-	-	-	0.05	-

註：基準值參照「地面水體分類及水質標準」；測值加底框者為個別金屬最高濃度出現點位。

續表一、河川水樣重金屬濃度（單位：mg/L）

樣本名	硼(B)	鋇(Ba)	銅(Cu)	鎳(Ga)	銦(In)	鉛(Pd)	鋅(Zn)
Street1	0.203	ND	ND	0.049	0.045	0.016	0.017
Street2	0.102	ND	ND	0.022	0.018	0.016	ND
Street3	0.13	ND	0.054	0.019	ND	0.01	ND
Street4	0.108	ND	ND	0.02	0.014	ND	ND
Street5	0.079	ND	ND	0.017	ND	0.012	0.19
平均數	0.124	-	0.015	0.026	0.022	0.012	0.044
標準差	0.042	-	0.020	0.012	0.014	0.003	0.073
最小值	0.079	-	ND	0.017	ND	ND	ND
最大值	0.203	-	0.054	0.049	0.045	0.016	0.19
基準值	-	-	0.03	-	-	0.1	0.5

註：基準值參照「地面水體分類及水質標準」；測值加底框者為個別金屬最高濃度出現點位。

表二、底泥重金屬含量(單位：mg/kg)

樣本名	銀 (Ag)	鎘 (Cd)	鈷 (Co)	鉻 (Cr)	鋁 (Al)	銦 (Sr)	錳 (Mn)	鐵 (Fe)
Street1	ND	ND	71.4	78.6	2.89E+04	11.9	134.5	2.13E+04
Street2	ND	ND	59.9	70	2.31E+04	16.7	139.7	1.74E+04
Street3	ND	ND	119	247.2	5.47E+04	33.4	551.4	3.9E+04
Street4	ND	ND	140	415.4	5.23E+04	57.1	574.8	3.17E+04
Street5	ND	ND	76.6	78.5	3.13E+04	14.6	142.6	1.75E+04
平均數	-	-	93.4	177.9	3.81E+04	26.7	308.6	2.54E+04
標準差	-	-	30.7	136.1	1.29E+04	16.9	207.9	8.55E+03
最小值	ND	ND	59.9	70	2.31E+04	11.9	134.5	1.74E+04
最大值	ND	ND	140	415.4	5.47E+04	57.1	574.8	3.89E+04
上限值		2.49		233				
下限值		0.65		76.0				

註：標有 ND 值者為消化液測得之金屬濃度小於 0.01 mg/L；測值加底框者為個別金屬最高濃度出現點位；底泥重金屬項目銀(Ag)與鎘(Cd)之 MDL 分別為 20.1 mg/kg 與 44.8 mg/kg。

續表二、底泥重金屬含量(單位：mg/kg)

樣本名	硼(B)	鋇(Ba)	銅(Cu)	鎳(Ga)	銦(In)	鉛(Pd)	鋅(Zn)
Street1	183.6	128	83.10	362.5	259.6	240.4	114.4
Street2	167.5	112.8	47.30	365.1	145.9	207.9	35.8
Street3	193.7	249.4	326.9	366.2	282.3	225.2	699.5
Street4	183.5	299	1002	386.5	250.6	291.8	823.7
Street5	148.2	128.2	9.300	352.5	240.6	192.9	281.2
平均數	175.3	183.5	293.7	366.6	235.8	308.6	390.9
標準差	15.9	75.9	371.2	11.1	47.0	34.0	315.3
最小值	148.2	112.8	9.300	352.5	145.9	192.9	35.8
最大值	183.6	249.4	1002	386.5	282.3	291.8	823.7
上限值			2157			1161	1384
下限值			50.0			248.0	2140

註：標有 ND 值者為消化液測得之金屬濃度小於 0.01 mg/L；測值加底框者為個別金屬最高濃度出現點位。

純菌暴露硫酸銅批次實驗及 RNA 抽取部分測定出的生長曲線表示 100 ppm 銅濃度過高使得 *Methylobacterium aquaticum* 無法在培養液中生長。而銅濃度 50 ppm 的培養液也和空白組曲線上有落差代表硫酸銅對其生長造成影響。至於添加劑量 3 ppm 及 10 ppm 的實驗組則和空白組在生長曲線上無明顯的差異。以此生長曲線結果為基準，後續對空白組、3 ppm、10 ppm 及 50 ppm 這四組進行 RNA 萃取。將抽取出的 RNA 進行分析之後，發現四組細菌 RNA 的樣本完整度高，適合進行後續的定序作業。

現地樣本微生物族群分析部分，從各樣品的菌門組成比例圖來看，放流口下游 street4 的底泥微生物組成和 street1 至 street3 的組成有所差異，而 street5 的微生物組成則是和其上游四採樣點的微生物組成有明顯的不同。其後以各個採樣點所辨別出的菌門比例對各個採樣點進行了 UPGMA 集群分析，從分析結果來看，street2 及 street3 的微生物組成最為接近，而最上游採樣點 street1 與 street2、street3 雖接近但為不同組可能和現場觀測到：除了 street1 外，其餘 4 點附近皆有觀察到老街溪沿岸設有民生或工業污水排放口有所關係。而下游兩採樣點則和 street1 至 street3 組別之 Height 值有一定落差，表

示 street4 及 street5 採樣點底泥微生物組成和上游及選定放流口差異甚大。接著同樣進行 PCoA 主座標分析，其結果和 UPGMA 相似，street2 及 street3 採樣點的底泥微生物組成最為接近，而 street1 與這兩組較為接近，而下游兩採樣點和這三組距離較遠表示放流口下游的底泥菌群組成相較於上游及放流口有不小的差異在。熱圖分析結果顯示出下游 street4 採樣點及 street5 採樣點分別有不少菌門異於其他採樣點有明顯增加的趨勢在，而此下游兩個採樣點皆有明顯增加趨勢在的菌門有兩個，分別為 Microscillaceae 及 Geobacteraceae。而在上游包含出流口採樣點趨勢較高的菌門則有 Sulfuricellaceae、Anaerolineaceae 及 Hydrogenophilaceae。

利用熱圖(heat map)分析了 PICRUST 得到的預測基因功能豐度，分析結果發現整體代謝功能來說，最上游的 street1 採樣點其預測代謝相關基因豐度在五個樣品中較高，可能是由於其採樣點附近皆沒有民生或工業污水排放口的關係。而與之相反選定放流口採樣點 street3 的基因預測代謝相關基因豐度在五個樣品中整體偏低。之後根據整體預測基因功能豐度熱圖結果找出了上游至下游豐度呈現下降趨勢的預測基因功能，共有 44 種預測基因功能其相關基因數量隨著上游至下游

有降低的趨勢。根據其預測基因功能進行分類，共分類出細胞生化反應(Cellular Processes)、遺傳信息處理(Genetic Information Processing)及代謝(Metabolism)，從趨勢變化來看上游至下游相關基因數量的確有下降的趨勢在，其中這 44 種預測基因功能大半部分皆和代謝功能有關係，次要則屬於細胞生化反應及遺傳信息處理，這些預測基因功能表現的相關基因數量之變化表示排放口的污染排放可能會主要導致底泥微生物族群的代謝變化、影響微生物細胞生長甚至導致遺傳表現的變化。

針對底泥樣品 street1 所進行的高通量宏基因定序結果，利用基因功能分類 GO (Gene Ontology)的資料庫進行基因的屬性比對分析，結果顯示約有 100 多個基因與金屬和重金屬代謝、傳輸、分解、儲存等有關(表 5-9、表 5-10)，並且分屬於分子功能型(molecular function)和生物途徑型(biological process)的兩項基因分類群中，屬於生物途徑相關的基因中，分別比對到與鐵(Fe)、銅(Cu)、鋅(Zn)、及鎘(Cd)等重金屬有關聯的相關基因，主要包括與金屬傳輸相關的部份(如 ion transport 和 transmembrane 等)。其中與銅有關的基因多達 11 種。此外，也有比對到與砷(As)和汞(Hg)等毒性重金屬相關的基因，還有一

部份與鉀、鈣、鎂等金屬離子相關的基因，其功能也多與 transport 及 transmembrane 有關為主。屬於分子功能(molecular function)相關的基因中，也與重金屬有關聯，其中多與氧化還原酶(oxidoreductase)、去氫酶(dehydrogenase)、及 transmembrane transporter activity 等有關之基因。其中與銅有關的基因有 3 種。上述結果顯示 street1 樣品中的微生物確實含有一些與重金屬反應及轉運相關之功能基因或生物途徑基因，當相關微生物面臨存在環境中的重金屬誘導表現後，方可有機會存活在含有重金屬污染的土壤、水體、或底泥環境中。

而比較 5 個底泥樣品後發現上游樣品 Street1 與金屬或重金屬相關基因比例與數量均略少於其它下游/放流口之數值。5 個樣品比對到個別與重金屬相關基因種類的差異較小，多數重金屬相關基因在 5 個樣品中皆有出現。僅有少數基因在下游樣品豐度較高。下游 Street4 與 Street5 的區域，多發現銅、鋅、鎘與 ATPase activity (transporting or exporting)，可以將溶質從膜的一側轉移到另一側 $[ATP + H_2O + Cu^{2+} + (in) \rightarrow ADP + \text{磷酸鹽} + Cu^{2+} + (out)]$ ，顯示出當長時間受到重金屬污染時，河川中的微生物會對重金屬反應，產生

功能基因的轉變進而適應變化的環境。重金屬相關的基因在下游地區較 Street1 上游(背景值)只發現少數不同的差異，說明此河川上下游地區長時間受到重金屬汙染的程度差異並不非常顯著。

結論

1. 工業放流口下游點位(Street3、Street4、Street5)其濃度值均明顯高於放流口上游的點位(Street1 及 Street2)，而水中銅濃度最高值測得於放流口下方的 Street3 點位，顯示工廠放流水影響河川水質。
2. 現地底泥部分，Street3 及 Street4 點位底泥中銅濃度明顯高於上游 Street1 及 Street2 點位。惟許厝港一號橋(Street5)點位銅濃度僅 9.3 mg/kg 較為異常，推測可能因採樣點附近正進行大規模的河川工程施工，使得底泥組成改變，導致銅濃度測值劇烈變化。
3. *Methylobacterium aquaticum* 此一菌屬於高濃度之硫酸銅暴露下會對其生長產生影響，甚至於銅濃度 100 ppm 時會使得其完全不能生長，表示高濃度的硫酸銅確實會對 *Methylobacterium aquaticum* 產生毒性。而低濃度的硫酸銅以生長曲線來看並未對 *Methylobacterium aquaticum* 造成毒性影響。

4. 次世代定序得到現地樣品的微生物組成比例進行分析。street2 及 street3 的微生物組成最為接近，可能和放流口污染物的排放及下游工程干擾有關。
5. 下游有不少菌門異於其他採樣點有明顯增加的趨勢在，明顯增加趨勢的菌門有兩個，分別為 Microscillaceae 及 Geobacteraceae。而在上游包含出流口採樣點趨勢較高的菌門則有 Sulfuricellaceae、Anaerolineaceae 及 Hydrogenophilaceae。
6. 根據 PICRUSt 發現找出了 44 種預測基因功能其相關基因數量隨著上游至下游有降低的趨勢。大半部分皆和代謝功能有關係，次要則屬於細胞生化反應及遺傳信息處理，這些預測基因功能表現的相關基因數量之變化表示排放口的汙染排放可能會主要導致底泥微生物族群的代謝變化、影響微生物細胞生長甚至導致遺傳表現的變化。
7. Calcium signal pathway 與 Photosynthesis - antenna proteins 兩種基因豐度與重金屬銅、鉻、錳的濃度相關性非常高。這兩種的功能基因可能可作為未來篩選的標的基因。
8. 針對底泥樣品 street1 所進行的高通量宏基因定序結果，約有 100 多個基因與金屬和重金屬代謝、傳輸、分解、儲存等有關，當相關

微生物面臨存在環境中的重金屬誘導表現後，方可有機會存活在含有重金屬污染的土壤、水體、或底泥環境中。

9. 5 個樣品比對到個別與重金屬相關基因種類的差異較小，多數重金屬相關基因在 5 個樣品中皆有出現。僅有少數基因在下游樣品豐度較高。
10. 下游 Street4 與 Street5 的區域，多發現銅、鋅、鎘與 ATPase activity (transporting or exporting)，可以將溶質從膜的一側轉移到另一側 $[ATP + H_2O + Cu^{2+} + (in) \rightarrow ADP + \text{磷酸鹽} + Cu^{2+} + (out)]$ ，顯示出當長時間受到重金屬污染時，河川中的微生物會對重金屬反應，產生功能基因的轉變進而適應變化的環境。
11. 重金屬相關的基因在下游地區較 Street1 上游(背景值)只發現少數不同的差異，說明此河川上下游地區可能皆有長時間受到重金屬暴露影響，且上、下游的差異較小。

建議事項

1. 水質底泥品質等環境數據及微生物群落組成等，均不斷隨著時間改變。建議未來持續蒐集環境數據及微生物等相關資訊，以增加分析結果精確性。
2. 實驗結果發現選定放流口上下游採樣點與微生物族群之間的關係差異，並篩選出未來可成為指標之菌群及基因群。本計畫研究結果可供後續河川污染進行微生物鑑識進行比較參考。

一、前言

1.1 計畫緣起

由於污染物排放可能為非連續性，水域中能直接即時連續偵測的方法在許多現地並不適用，例如工廠夜間或雨季違法排放等，無法以水樣直接追蹤。但許多污染物在底泥中可能累積或者接觸底泥微生物造成微生物生態或基因體變化，即使污染物短暫消失，微生物生態的變化仍可量測並代表現地長期受到污染的可能性。

第一年計畫研究方法分為模擬河川反應槽及現地樣本分析。以河水添加不同濃度硫酸銅連續暴露底泥的方式，定時採取反應槽進出流水樣及底泥樣品，檢測其水樣及底泥菌群變化。現地樣品比較則是採取老街溪底泥及河水樣品，分析其水樣化學特性及底泥生物相。底泥反應槽部分，取用老街溪河水並添加硫酸銅作為進流，定時採取進出流分析，並於第0, 2, 4, 8週取底泥樣品檢測微生物菌群變化。現地樣品部分，由老街溪上游至下游總共採取了13個底泥樣品，19個河水樣品分析。所有的水樣及底泥其核酸進行次世代定序。結果顯示，Aeromonadaceae, Burkholderiales_incertae_sedis, Caldilineaceae, Chloroflexi, Firmicutes, Planctomycetaceae, Pseudomonadaceae, 及 Xanthobacteraceae 皆重複出現在現場溪中底泥、溪水、及工廠放流水具有高濃度金屬銅的樣品中，有機會成為銅污染之普遍性指標判斷菌群。另外，由反應槽、老街溪河水及底泥菌相及樣品銅濃度交叉比對，結果顯示，Burkholderiaceae, Hydrogenophilaceae, Methylophilaceae, Chitinophagaceae, 及 Flavobacteriaceae 等之豐富度消長與銅濃度相關。

本計畫接續第一年所研究之菌群變化成果，以純菌進行硫酸銅添加培養，並分析其 mRNA 表現量，得到硫酸銅影響基因表現差異。另以現地工業區放流口上、下游底泥樣品之總 DNA，經由高通量次世代定序技術 (Next Generation Sequencing)

獲得環境中菌群基因體表現差異。

1.2 計畫目標

本計畫預計目標如下：

1. 蒐集國內外利用微生物總基因體學功能性基因與污染來源之相關文獻。
2. 延續第一年分析之可能菌群，分析河川底泥中微生物總轉錄體學功能性基因受到污染物後所衍生的變化。
3. 以總基因體學分析結果評估鑑識污染源之可能標的功能性基因，評估以污染指標表現基因鑑識污染來源可能性。

1.2.1 計畫工作內容

1. 蒐集國內外針對污染源鑑識、微生物總基因體學功能性基因及污染物與微生物生態變化之文獻資料。
 - (1). 蒐集重金屬污染之底泥環境中，微生物族群總基因體學與污染相關文獻。
 - (2). 蒐集重金屬暴露後，微生物功能性基因表現變化等相關文獻。
2. 延續第一年之菌群分布結果，以總轉錄體學方法分析污染物所造成微生物功能性基因變化，並評估可利用於污染源鑑識之主要功能性基因。
 - (1). 在實驗室以硫酸銅添加批次培養微生物，取其 RNA 並以總轉錄體學分析方法研析受硫酸銅影響之功能性基因
3. 選取一主要污染河川，並於可能之污染源排放口上、下游區段採取底泥樣品，分別以菌群及功能性基因分析污染造成之變化結果，評估標的菌株及功能性基因作為污染源鑑識之可能性。

- (1). 比對排放口上、下游之菌群差異。
- (2). 比對排放口上、下游之微生物基因體差異，並評估以此差異作為作為污染鑑識之可能性。

1.2.2 計畫執行進度及成效

表 1-1 計畫預定進度

預定進度(以甘特圖表示)											
工作內容項目	月次	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	年別	107	107	107	107	107	107	107	107	107	107
	月份	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. 蒐集國內外底泥微生物遭受重金屬污染與基因表現分析相關文獻。											
2. 採集放流口上下游底泥樣品，萃取總核酸進行次世代定序											
3. 採購 Methylophilus 菌株，進行硫酸銅暴露批次培養，萃取 mRNA 進行定序											
4. 定序結果分析											
5. 完成研究報告 1 件。											
預定進度累積百分比 (%)		6	10	16	28	30	35	45	79	95	100
查核點	預定完成時間	查核點內容說明									
第一次工作報告	107 年 5 月	蒐集國內外文獻，並進一步整理成簡報									
期中報告	107 年 8 月	完成現地採樣、批次暴露培養及送高通量定序分析。									
期末報告	107 年 11 月	解析放流口底泥樣品菌群及評估基因體表現變化。									
結案	107 年 12 月	完成結案報告									

表 1-2 本計畫預期目標及目前執行成效

契約書之預定進度累積百分比 (%)		100%			實際執行 進度 (%)	100%	
工作內容項目	實際執行情形	差異分析 (打✓)			落後原因	困難檢討及對策	預計改善完成日期
		符合	落後	超前			
蒐集國內外底泥微生物遭受重金屬污染與基因表現分析相關文獻。	已完成(1). 蒐集重金屬污染之底泥環境中, 微生物族群總基因體學與污染相關文獻。(2). 蒐集重金屬暴露後, 微生物功能性基因表現變化等相關文獻。並持續關注最新研究發展。	✓					
採購 Methylotheobacter 菌株, 進行硫酸銅暴露批次培養, 萃取 mRNA 進行定序。	菌株已完成培養並萃取 RNA, 共有四種暴露劑量 (blank、3 ppm、10 ppm、50 ppm) 核酸樣品送至定序。	✓					
採集放流口上下游底泥樣品分析並送高通量定序分析, 並評估其基因體表現	已完成老街溪採樣分析, 共五個現地樣品萃取核酸並完成定序菌群組成及 PICRUSt 基因表現分析。同時也完成 Shotgun metagenomics 總體基因學分析	✓					
查核點		預定完成時間			查核點內容說明		
期中報告		107 年 8 月			完成現地採樣、批次暴露培養及		

		送高通量定序分析。
期末報告	107 年 11 月	解析放流口底泥樣品菌群及評估基因體表現變化。

章節摘要：本章主要說明計畫源起、目標，以及計畫工作內容其執行進度與成效。

二、第一年計畫結果概要

2.1 第一年計畫研究方法

1. 蒐集國內外針對污染源鑑識、菌群分布及污染物與微生物生態變化之文獻資料。
2. 選取一主要污染河川(老街溪)，於河段之上、中、下游取樣，分析其菌相變化，並評估標的菌株作為污染鑑識之可能性。採樣點位如圖 2-1 所示：

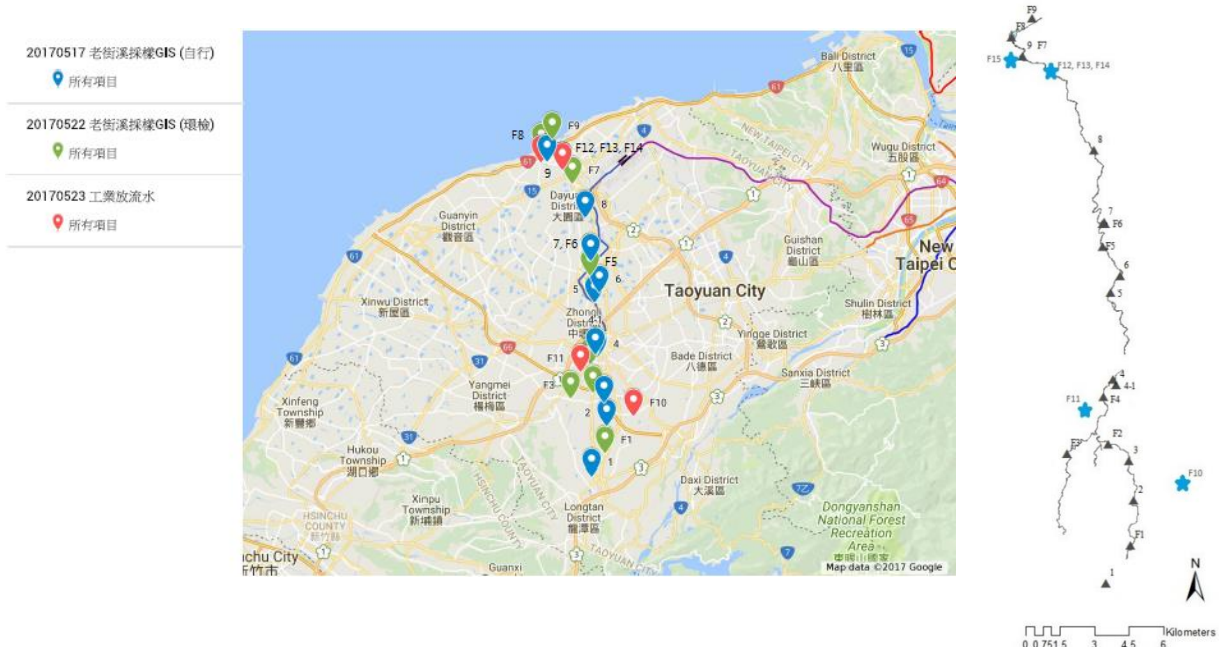


圖 2-1 老街溪採樣點分佈(藍、綠色點為水樣、紅色點為工廠放流水)

3. 水樣分析項目有溫度、pH、導電度、溶氧量、葉綠素 a、COD、總有機碳、氨氮、水中陰離子、重金屬、微生物族群。底泥分析項目則有 pH、粒徑、CNSH 元素比例、重金屬濃度、微生物族群等。
4. 建立實驗室模擬底泥環境之反應槽，以連續進流方式模擬河川底泥生態，並添加標的污染物，以高通量定序方式分析底泥中微生物菌群組成變化並對照控制組獲得主要變化菌群，評估與污染物之相關性。

模擬底泥接觸反應槽主要由數個附有溢流管的玻璃製血清瓶所組成，每個瓶子皆有通氣栓覆蓋以避免來自外部的污染並維持透氣。玻璃瓶的直徑為 10 公分，高為 20 公分。每個反應槽會裝填約 10 公分厚的老街溪上游底泥，並使用蠕動幫浦把採樣來的老街溪上游河水送至反應槽內。其水力停留時間約為 4 小時。採樣來的老街溪河水會加入不同劑量的硫酸銅(Copper(II) sulfate, CuSO_4) 做為反應槽之進流，加入之劑量以銅為單位分別是 150mg/L、300mg/L、600mg/L，同時也以無添加劑量的河水做為實驗之空白對照組。培養於第 14、28、56 天採集底泥樣品。反應槽進出水樣分析 pH 值、導電度、濁度、總有機碳、重金屬、硫酸鹽、氨氮、正磷酸鹽；底泥則分析銅含量及微生物相。

5. 水樣及底泥樣品微生物分析：高通量定序以 Illumina MiSeq 系統進行，定序結果初步品質篩選以設定之品質分數(quality score, Q)做判斷依據，另外小於 35 bps 之序列會被系統捨棄不用。高通量定序所得之序列先經過去適配子(trim illumine adapter sequence)、品質篩選(quality and ambiguity trimming)、序列對組裝(merge overlapping paired reads)、及引子與編碼序列確認、分樣品、和去除不含 16S 引子的序列；其中利用” Cutadapt v.1.4.2” 系統[Martin, 2011] 去除適配子；接著利用” Seqtk v.1.2-r94” 進行品質篩選(quality trimming)，將短序列(小於 35 bp)及非配對之單一序列(singlet reads)去除；品質篩選後的配對序列(paired-end reads)或序列對(read pairs)再利用” FLASH(Fast Length Adjustment of Short reads, v1.2.9)” [Magoc and Salzberg, 2011]將序列對重疊 (overlapping merged)成較長的組裝序列，組裝後序列長度小於 200 bps 之序列於以捨棄，另外如配對序列有缺乏 16S 引子者亦會被捨棄。整理後之組裝序列進一步利用” UPARSE implemented in USEARCH (v9.2.64)” 系統[Edgar, 2013]進行調整(包括 dereplication, singlet discarding, 和 chimera filtering)後並做操作分類單元 Operational taxonomic unit (OTU)分類，並建構樣品的 OTUs 表；接著以” RDP

Classifier v2.12” [Wang, 2007]將各別 OTUs 之代表序列進行菌種鑑定，做為樣品中微生物族群組成之依據。

樣品微生物族群受水質條件影響以典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)進行，以各樣品所含之 OTUs 進行微生物族群組成差異性分析，及水質條件關聯性分析，分析結果中樣品落點之相對位置代表微生物族群組成差異度，兩樣品落點越相近代表兩樣品之微生物族群組成越相似，反之，代表兩樣品之微生物族群組成越不同；此外，環境水質條件對樣品微生物族群之影響趨勢以箭頭方向表示，而影響程度則以箭頭長度表示之。

2.2 第一年計畫結果

搜集了國內外相關文獻，並依河川水域污染下微生物生態變化、底泥土壤重金屬污染與微生物生理變化、高通量定序應用於受污染底泥中微生物分析三項目進行分類。

本研究選定之受污染河川為桃園老街溪，至 2017 年 7 月底止，分別於 5 月 17 日、5 月 23 日及 5 月 24 日，至老街溪流域進行 3 次採樣，依據上游至下游順序採集了河川水樣、河川底泥以及工廠放流水做為現地樣品進行實驗分析，總共採取了 13 個底泥樣品，19 個河水樣品分析，主要重金屬濃度如下表 2-1 所示。

表 2-1 河川水樣重金屬濃度 (單位：mg/L)

樣本名	銀(Ag)	鎘(Cd)	鋁(Al)	錳(Mn)	鐵(Fe)	鉛(Pb)	鋅(Zn)	銅(Cu)
1	<0.01	<0.01	0.329	0.041	0.458	<0.01	0.061	<0.01
F1	<0.01	<0.01	0.113	0.013	0.218	<0.01	0.022	0.005
2	<0.01	<0.01	0.338	0.056	0.419	0.012	0.033	0.032
3	<0.01	<0.01	0.216	0.028	0.391	0.012	0.034	0.019
F2	<0.01	<0.01	0.317	0.034	0.402	0.011	0.024	0.013

F3	<0.01	<0.01	1.363	0.129	1.110	0.020	0.103	0.088
F4	<0.01	<0.01	0.223	0.057	0.350	0.012	0.054	0.035
4-1	<0.01	<0.01	0.305	0.068	0.431	0.018	0.037	0.016
4	<0.01	<0.01	0.523	0.089	0.696	0.020	0.054	0.024
5	<0.01	<0.01	0.345	0.116	0.782	0.017	0.078	0.043
6	<0.01	<0.01	0.378	0.112	0.673	0.016	0.031	0.017
F5	<0.01	<0.01	0.278	0.068	0.298	<0.01	0.114	0.036
F6	<0.01	<0.01	0.314	0.033	0.241	<0.01	0.056	0.010
7	<0.01	<0.01	0.385	0.042	0.340	0.014	0.035	0.018
8	<0.01	<0.01	0.446	0.043	0.404	0.011	0.022	0.014
F7	<0.01	<0.01	1.198	0.130	1.950	0.011	0.222	0.051
9	<0.01	<0.01	0.507	0.097	0.582	<0.01	0.107	0.021
F8	<0.01	<0.01	0.028	0.024	0.028	<0.01	<0.01	<0.01
F9	<0.01	<0.01	0.293	<0.01	0.326	<0.01	0.011	<0.01
平均數	<0.01	<0.01	0.416	0.062	0.531	0.009	0.058	0.023
標準差	-	-	0.328	0.040	0.418	0.008	0.051	0.021
最小值	<0.01	<0.01	0.028	<0.01	0.028	<0.01	<0.01	<0.01
最大值	<0.01	<0.01	1.363	0.130	1.950	0.020	0.222	0.088

註：測值加底框者為個別金屬最高濃度出現點位。

底泥反應槽部分，使用老街溪河水並添加硫酸銅作為進流，定時採取進出流做水樣分析，並於第 0, 2, 4, 8 週取反應槽底泥做為樣品。現地水樣、底泥樣品在萃取出核酸後進行次世代定序。定序結果與水質條件分析如圖 2-2 所示。老街溪現地採樣微生物分析如圖 2-3 所示。

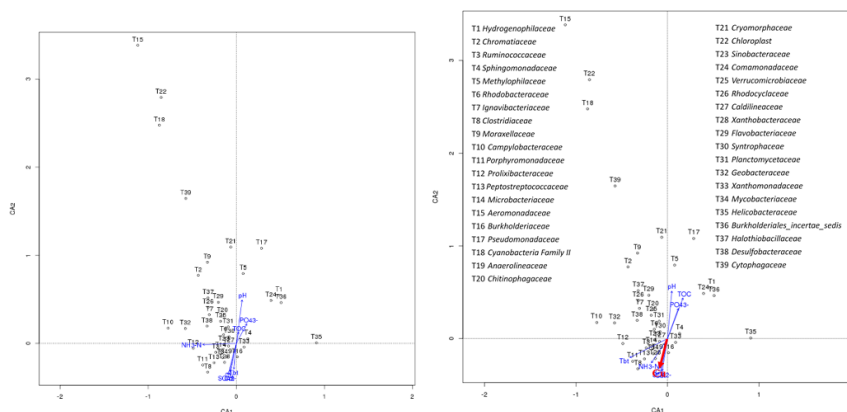


圖 2-2 實驗室連續流試驗中底泥樣品之組成菌群(以菌科分類為依據)受不同進流水條件(左)及出流(右)之水質影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果

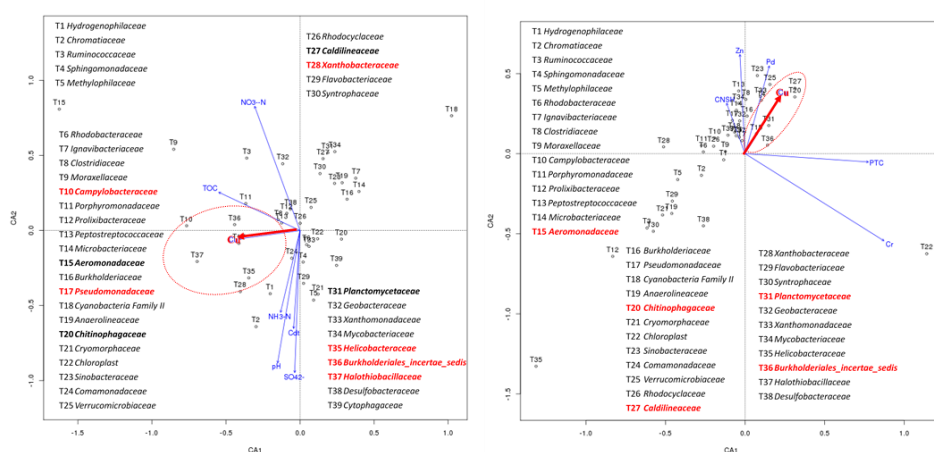


圖 2-3 溪水(左)溪中底泥(右)樣品之組成菌群(以菌科分類為依據)受不同底泥條件(如金屬銅)影響趨勢之典型關聯分析(canonical correspondence analysis, CCA)結果

對現地採樣及反應槽樣品定序結果進行分析比較後，發現受重金屬污染之溪水和底泥中之微生物有可能受金屬銅之影響而造成族群組成變化，然而，其它影響微生物族群之環境條件因子，經 CCA 典型關聯分析雖有金屬銅影響微生物族群組成的一些相關性，但影響性並不十分明顯。由於以樣點全體微生物族群分析無法與單一污染物取得相關性，因此選擇部分較相關之 OTUs 進行分析。*Thiobacillus*, *Methylobacter*, *Mycobacterium*, *Longilinea*, 以及 *Methylocystis* 此五屬的 OTUs 於實驗室

反應槽底泥 copy numbers 中有較明顯的增減，除 *Thiobacillus* 外，皆與甲烷代謝相關。經皮爾森相關係數與現地所量測之底泥及水樣銅濃度之相關性分析可得，現地樣品中，僅有 *Methylobacter* 和 *Methylocystis* 其與現地銅濃度有中度相關，適合作污染指標。另外，由所有環境樣品菌科與環境因子 CCA 分析，篩選出對應銅濃度最相關的菌科，共有 19 科。對照實驗室底泥反應槽序列分析中的菌科 copy numbers 所占總數之百分比依不同時間及進流銅濃度的變化，發現其中有五科在底泥反應槽對硫酸銅的添加與否有較明顯的變化。其中，Burkholderiaceae 在銅的添加初期相較於空白組，其所占比例升高；而其他 Hydrogenophilaceae, Methylophilaceae, Chitinophagaceae, 及 Flavobacteriaceae 等四菌科相較於空白組，在含有硫酸銅的進流後所占比例下降。此五科可能可篩選成為未來檢視受硫酸銅污染的底泥中數量消長的菌科。

2.3 第一年計畫結論

1. 現地採樣河川水質部分，19 個點位中有 11 個點其氨氮濃度為中度污染，TIN 濃度高者有集中於中游段趨勢；測得重金屬較高的濃度點位，集中落於許厝港一號橋點位(F7)。
2. 現地採樣工業放流水部分，皮革製品廠(F14)放流水之導電度、COD 及氨氮數值高，光電廠(F10)及精密工業廠(F13)的硼濃度偏高。
3. 現地底泥部分，碳氮硫氫重量百分比除了中壢區公園橋點位(F5)及大園區許厝港一號橋點位(F7)大於 10%外，其餘 CNSH 占總重量比例均小於 4%；各點位平均粒徑值差異大；部分點位金屬銅、鋅及鉛濃度偏高，此外，老街溪流域底泥重金屬銅、鋅、鋁濃度最高值，均落於大園工業區下游約 1 公里處之許厝港一號橋點位(F7)

4. 反應槽部分進出流測得的銅濃度未達到所添加的銅濃度，且有添加硫酸銅三組進流的濁度較未添加的高。最後出流的濁度減少可能是沉澱之硫酸銅經過反應槽後沉積於底泥。
5. 反應槽部分硫酸銅的添加使得出流無法有氨氮明顯減少的現象，這可能是由於硫酸銅抑制了硝化作用(Nitrification)。
6. 反應槽進流添加硫酸銅會使得底泥的銅濃度增加。底泥含銅量與進流濃度相關。底泥中有機質會影響銅於底泥中對生物的毒性，然而有機質含量的測定發現整體實驗其差異並不明顯，因此有機質的影響於本次實驗每組應無太大差異。
7. 以 CCA 典型關聯分析顯示金屬銅對微生物族群組成有一些影響之相關性，但整體而言並不十分明顯，因此，以全體族群分析可能較不適用於單一污染源。然而，Aeromonadaceae, Burkholderiales_incertae_sedis, Caldilineaceae, Chloroflexi, Firmicutes, Planctomycetaceae, Pseudomonodaceae, 及 Xanthobacteraceae 重複出現在現場溪中底泥、溪水、及工廠放流水具有高濃度金屬銅的樣品中，有機會成為銅污染之普遍性指標判斷菌群。
8. 由 CCA 典型關聯性分析中，所有樣品總和與銅濃度相關可篩選出 19 菌科，比對實驗室底泥反應槽中菌相變化，其中 5 科 Burkholderiaceae, Hydrogenophilaceae, Methylophilaceae, Chitinophagaceae, 及 Flavobacteriaceae 等與空白組相較變化較大，最有機會成為硫酸銅污染之指標菌科。
9. 以硫酸銅馴養底泥之反應槽菌相分析，得出 *Thiobacillus*, *Methylobacter*, *Mycobacterium*, *Longilinea*, 及 *Methylocystis* 等菌屬消長與反應槽銅添加相關，然而比較老街溪底泥樣品菌相、銅含量及水中銅濃度之相關性，僅有 *Methylobacter* 和 *Methylocystis* 其與現地銅濃度有中度相關。此仍需要後續增加不同現地樣品確認其消長做為指標判斷菌屬之可能性。

章節摘要：本章主要概述第一年計畫的方法與結果。

三、背景文獻回顧

環境中污染物的影響不僅僅侷限於單一的生物，透過食物鏈等循環，污染物會在各種不同階級的生物間轉換。較低階的生物吸收污染物後，再被較高階的生物攝食，進而使得污染物在各種階級的生物體內累積，使得環境中原先對高階生物沒有甚麼影響的污染物，其濃度透過不斷累積，直到對各階層生物造成不同的危害。

微生物做為污染物第一接觸的對象也是對污染物反應最為敏感的一個族群。微生物受到污染物刺激後會造成一些功能性基因上的改變，再藉由一些基因分析結果，可以得知特定污染物對特定基因段造成的影響，進而利用這個現象來鑑定河川受到污染的程度及種類。透過研究菌相的變化亦可作為指標，反應河川污染現象，監測環境中微生物有助於分析環境污染變化，並在第一時間做出分析及找到問題所在，在造成重大污染前先從根源解決問題。

3.1 河川水域底泥汙染下微生物活性及基因表現變化

Jie 等學者(Jie et al., 2016) 運用功能基因陣列(GeoChip 5.0) 來研究湘江中功能基因結構、組成、多樣化及微生物群落對三個地點的重金屬污染的代謝潛力。調查的三個目標地點底泥中金屬濃度，銅濃度為 392 至 570 mg/kg、砷濃度為 177 至 2480 mg / kg、鉻濃度為 61.1 至 88.5 mg/kg 及汞濃度為 1.6 至 24.3 mg/kg，這些金屬的存在和大量的抵抗性基因有關。在湘江之三個地點中的微生物發現共有 2 萬 5,595 個功能基因參與不同的生化過程。再經由基因重疊分析，發現具有較高重金屬污染的地方，明顯具有較豐富的抗金屬基因，包括具有硫還原力之基因(cueo、mer、metc、merb、teh b、terc)，及更高的微生物功能多樣性。推測是長期的污染使

微生物適應污染環境，並保持多樣性之機制，Mantel 試驗並顯示 S、Cu、Cd、Hg、Cr 的濃度與微生物群落之功能結構顯著相關。

另外 Kang 等學者(Kang et al., 2013)對 DePue 湖進行底泥的微生物族群與重金屬相關功能性基因進行研究。DePue 湖長期接受鄰近鋅冶煉廠的放流水污染長達八十多年，本篇研究中對湖中的五個不同污染濃度的點進行底泥採樣分析，其中底泥測得的最高鋅濃度高達 21383 mg/kg；而最低點位的底泥鋅濃度為 3104 mg/kg。根據研究結果顯示族群與功能性基因的多樣性受不同金屬污染濃度梯度的影響有限(最高濃度點位與最低濃度點位基因重複率達 85%)，但是個別功能性基因確實會受到金屬污染濃度的不同而影響，部分與金屬抗性有關的基因在濃度高的點位呈現較高豐富度，而在全部的點位中都測得高豐富度的兩種基因，一種是源自於野油菜黃單胞菌 (*Xanthomonas campestris*) 的抗汞性基因(gi 6689526)而另一種則是來自粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 的抗 Zn 和 Cd 抗性基因(gi 1749680)。在異化亞硫酸鹽還原酶(dsr)的部分，雖然各個樣點測得的 dsr 相對豐富度相似，但數據表明含有 dsr 的群體受底泥孔隙水中的金屬濃度影響很大，部分 SRB 與孔隙水中金屬濃度有著強烈的關聯，這些物種在微生物族群中扮演著減低金屬毒性與保持族群穩定的重要腳色，這些基因包括來自 *Desulfotomaculum putei* (Zn)、*Desulfovibrio longus* (Cu)、*Desulfobacterium oleovorans* (Cu) 和 *Desulfotomaculum kuznetsovii* (Cu) 的 dsrA 和/或 dsrB，*Desulfovibrio piger* (Pb, Cu) 和來自 *Desulfovibrio vulgaris* (Cu) 的細胞色素 c。儘管通常認為硫酸鹽還原菌在中營養或富營養化淡水系統中不具有重要的功能重要性，但此研究表明它們對於降低金屬毒性具有重要意義，因此可作長期金屬污染環境下，微生物族群中以形成金屬沈積物增加族群抗性和穩定性的重要貢獻者。

Yin 等學者(Yin et al., 2015) 為了探索微生物對重金屬污染(例如 Cr, Mn, Zn)

的反應，通過 16S rRNA 基因擴增子和功能基因微陣列的測序來研究底泥微生物群落的組成，結構和功能潛力。對 16S rRNA 序列的分析表明，在高污染樣本中 Firmicutes，Chloroflexi 和 Crenarchaeota 的相對豐度較高，而 Proteobacteria 和 Actinobacteria 的相對豐度較低。此外，根據測序數據的分子生態網絡分析(molecular ecological network analysis)，它們可能在高度污染的社區中相互作用。相應地，涉及金屬穩態的關鍵功能基因（例如，chrR，metC，merB），碳代謝和有機修復在高度污染的樣品中顯示出更高的豐度，表明污染區域中的細菌群落可調節其能量消耗和有機修復能力。該研究表明沉積的土著微生物群落可能改變其組成和結構以及功能優先(function priority)和相互作用網絡，以增加其對環境污染的適應性或抗性。

Du 等三人(Du et al., 2018)以連續批次培養試驗測試四種重金屬(Pb, Cr, Cd, 和 Cu)對日本三個河川(Kurisu River, Ijira River, 和 Gyaku River)的底泥微生物之影響，分別以細菌數量(HPC, heterotrophic bacteria)、細菌活性(對 glucose 葡萄糖的代謝速率)、及細菌族群結構等參數評估底泥中微生物對四種重金屬的反應(Du et al., 2018)，結果顯示銅(Cu)對細菌數量有相較明顯的影響，其次為鎘(Cd)，而鉛(Pb)及鉻(Cr)對 HPC 的數量影響較不顯著，含高濃度的銅(100 mg/L 和 1000 mg/L)的試驗組在經過約 6 天的連續批次培養後，HPC 的數量由 10^5 (CFU/mg-dry)明顯增加到 10^8 (CFU/mg-dry)，其中 Kurisu River 和 Ijira River 的底泥樣品之 HPC 數量增加較 Gyaku River 明顯。然而，以葡萄糖利用速率顯示細菌活性時，銅的實驗組有最明顯的減少(由 10^{-7} hr⁻¹/CFU/ml 減少為 10^{-10} hr⁻¹/CFU/ml)。而以 PCR-DGGE 分析微生物族群顯示部份微生物(如 *Sphingomonas* sp., *Novosphingobium* sp., 和 *Curvibacter* sp.等)經 30 天的連續批次培養後逐漸成為優勢菌群。此結果顯示以細菌數量做為評估河川受重金屬污染的指標會有偏差，必須輔以細菌的活性及微生物族群結構的變化，才有機會較明確的反映重金屬污染河川之狀況。

3.2 底泥土壤重金屬銅汙染與微生物基因表現變化

Lejon 等人在 2007 年的研究中(Lejon et al., 2007)，開發了分子指紋分析法(molecular fingerprinting assay)來評估 copA 基因的多樣性，copA 基因是參與細菌對銅的抗性的遺傳決定因素之一。copA DNA 指紋圖譜程序針對從物理化學特性和有機狀態(SOS)不同的土壤中直接提取的 DNA 進行了優化。對於每個研究的土壤，獲得了特定的 copA 遺傳結構，並且具有土壤物理化學特徵的肌腱分析揭示了 pH，土壤質地和土壤有機質質量的強烈影響。copA 基因的分子系統發育證實，特定的 copA 基因簇對每個 SOS 都是特異性的。這種方法表示 copA 基因多樣性對土壤樣品中銅添加物的短期反應很敏感，這表明群落適應優先受先天 copA 基因的多樣性控制，而不是受金屬生物利用度的控制。

而 Magalhães 等學者(Magalhães et al., 2011) 研究主要是專注在杜羅河口潮間帶底泥中因金屬銅濃度上升，而影響微生物脫硝途徑及不同脫氮菌族群的基因表現。結果顯示脫硝速度會因為銅濃度上升而有明顯的變化，根據觀察，當每克濕重底泥之銅濃度達到 60 μg 時，會有 85%的代謝途徑被抑制。此外，銅的增加會使一氧化氮以及二氧化氮累積、同時三氧化氮的利用被抑制。進一步利用 real-time PCR 可觀察出，既使在銅最低濃度時，與硝化及一氧化氮還原有關之 nirK、nirS 和 nosZ 基因的表現量也會大幅降低(79%至 81%)，同時，反轉錄 PCR 變性梯度電泳分析可看出 nirK、nirS 和 nosZ 的轉錄產物量，也會因為銅的濃度而減少。

在 2012 年 Altimira 等學者發表的論文中(Altimira et al., 2012)，他們採集了智利中部瓦爾帕萊索地區被高濃度銅汙染的農業用土壤和沒有被汙染的農業用土壤進行分析比較。結果發現，銅汙染土壤中銅耐受性培養細菌的數量明顯大於非汙染土壤，高出了 13~46 倍。也發現到僅在 Cu 汙染土壤的宏基因組 DNA 中發現多銅

氧化酶的 *copA* 基因，並在五種顯示出高耐銅性的細菌分離物中的其中四種的質體中檢測到 *copA* 基因。表明了移動遺傳因子參與了污染環境中銅遺傳決定因子的擴散，使 *copA* 基因在污染環境中廣泛傳播。

Besaury 等學者(Besaury et al., 2014)在 2016 年使用了塞納河口泥灘的沉積物來建立微觀系統，並藉由其銅濃度梯度來觀察銅耐受性基因 *cusA* 和 *copA* 的豐富度(abundance)和表達(expression)。結果發現無論 *cusA* 還是 *copA* 基因其隨著銅濃度的增加豐富度都會降低，同時 *cusA* 基因豐富度比起 *copA* 基因高達了十倍左右。在表達方面，只有 *copA* 基因在有氧和缺氧條件下其 RNA 表達是恆定的。而在觀察了兩種基因的分子系統發育(molecular phylogeny)後，發現了銅的增加使得 *copA* 和 *cusA* 基因序列的多樣性皆增加。

Chen 等人(Chen et al., 2018)則指出長期高濃度重金屬污染明顯的影響黃河底泥之微生物族群及其功能基因，根據宏基因定序、16S rRNA 基因定序、及 qPCR 定量的結果顯示，受重金屬污染的地區(DDG, Dongdagou River, 黃河的一條支流)的細菌量(bacterial biomass)及菌群的豐度(richness)都明顯低於上游未受污染的樣品(MQ, Maqu)，受重金屬污染和未受重金屬污染的兩個樣品之微生物族群是相當不一樣的，宏基因定序結果顯示 DDG 樣品中可發現許多核酸損壞修復(DNA damage repair)及抗重金屬(heavy-metal resistance)有關的功能基因，DDG 樣品中與重金屬相關的功能基因數量明顯高於 MQ 樣品；進一步根據 KEGG 資料庫的分析顯示 DDG 樣品含有許多酶或酵素(enzymes)是和重金屬抗性(resistance)或還原(reduction)相關的，其中 Proteobacteria 及 Bacteroidetes 菌屬含有較多與重金屬相關的功能基因，與銅相關的功能基因包括 Cu^{2+} -exporting ATPase、copper transport protein、copper resistance protein B、及 Copper homeostasis protein 等。此結果顯示長期高濃度重金屬污染的 DDG 樣品的微生物族群組成及重金屬相關的功能基因都明顯不同於未受污染樣品(MQ)，微生物適應重金屬污染而發展出氧化還原反應(redox reactions)及 DNA 修復

等機制，使微生物有機會承受重金屬污染的影響。

章節摘要：

以 3.1 河川水域底泥污染下微生物活性及基因表現變化、3.2 底泥土壤重金屬銅污染與微生物基因表現變化，這三項目進行文獻回顧。

四、研究方法與原理

4.1 現地採樣分析

老街溪全長 36.7 公里，起源於龍潭區，流經平鎮市區及中壢市區，後於大園區出海，流域面積大約 82 平方公里，中下游河段多生活污水及工廠排放廢水污染源。

4.1.1 採樣點位資訊

在 2018 年 5 月 26 日於老街溪 5 個點位進行水質與底泥採樣，共取得 5 個水樣與 5 個底泥樣本，詳細點位分佈如下圖。



圖 4-1 老街溪採樣點分布

本計畫第一年度於老街溪上至下游全河段進行大規模範圍採樣分析，分析結

果中得知，老街溪下游許厝港一號橋(Street5 點位)水中及底泥中銅與其他重金屬濃度偏高，又下游大園工業區部分工廠放流水中銅濃度偏高，有鑑於此，今年分析點位集中於老街溪下游，以直接接收工廠放流水匯入的 Street3 點位為中心，往上游及下游個採集 2 個點位，藉由較密集的點位選擇，以比較老街溪水質與底泥受工業區放流水(Street3)排入前後的影響。其中除了 Street1 外，其餘 4 點附近皆有觀察到老街溪沿岸設有民生或工業污水排放口。

表 4-1 老街溪 2018 年 5 月 26 日第一次採樣點資訊

樣本名	點位描述	行政區	採樣日期	採樣時間	緯度	經度	底泥樣本	污染排放口
Street1	工業區上游 2.6 公里處	大園區	20180526	10:58	25.05742	121.19899	有	無
Street2	中正橋	大園區	20180526	11:57	25.06382	121.19638	有	有
Street3	工業區放流口	大園區	20180526	14:16	25.07448	121.18695	有	有
Street4	工業區下游 0.7 公里處	大園區	20180526	15:51	25.07559	121.17996	有	有
Street5	許厝港一號橋	大園區	20180526	16:38	25.07739	121.17797	有	有



圖 3-1-2 Street1



圖 3-1-3 Street2



圖 3-1-4 Street3



圖 3-1-5 Street4



圖 3-1-6 Street5



圖 3-1-7 Street2 放流口



圖 3-1-8 Street3 放流口



圖 3-1-9 Street5 放流口

4.1.2 採樣分析項目

採樣對象分為河水水樣及河底底泥兩部分(如圖 4-2)，水樣及底泥分析方法詳列於 4.1.4 及 4.1.5。

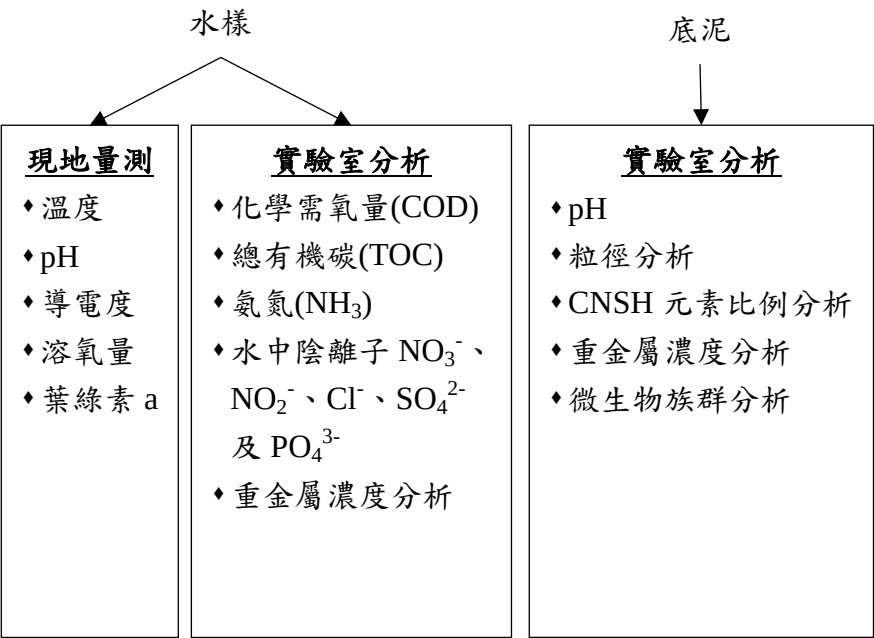


圖 4-2 採樣分析項目一覽

4.1.3 採樣方法

1. 水樣：使用塑膠水桶，以垂吊方式撈取水樣，微生物實驗之水樣經 20 μm 濾布粗濾後，收集於 2 L 寶特瓶，其餘收集於採樣玻璃瓶或塑膠 PP 瓶中，並視情況酸化處理後，再放入裝有冰塊的行動冰箱，當日回實驗室即保存於 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷藏待後續分析。
2. 底泥：直接下水，以不鏽鋼製採泥鏟，挖取底泥，並同時使用 2 mm 篩網過篩，並儲存於採樣袋後放入裝有冰塊的行動冰箱，回實驗室後保存於 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰櫃待後續分析。

4.1.4 水樣分析項目及方法

分析方法有現地量測，及實驗室分析兩部分，分析流程如圖 4-3。

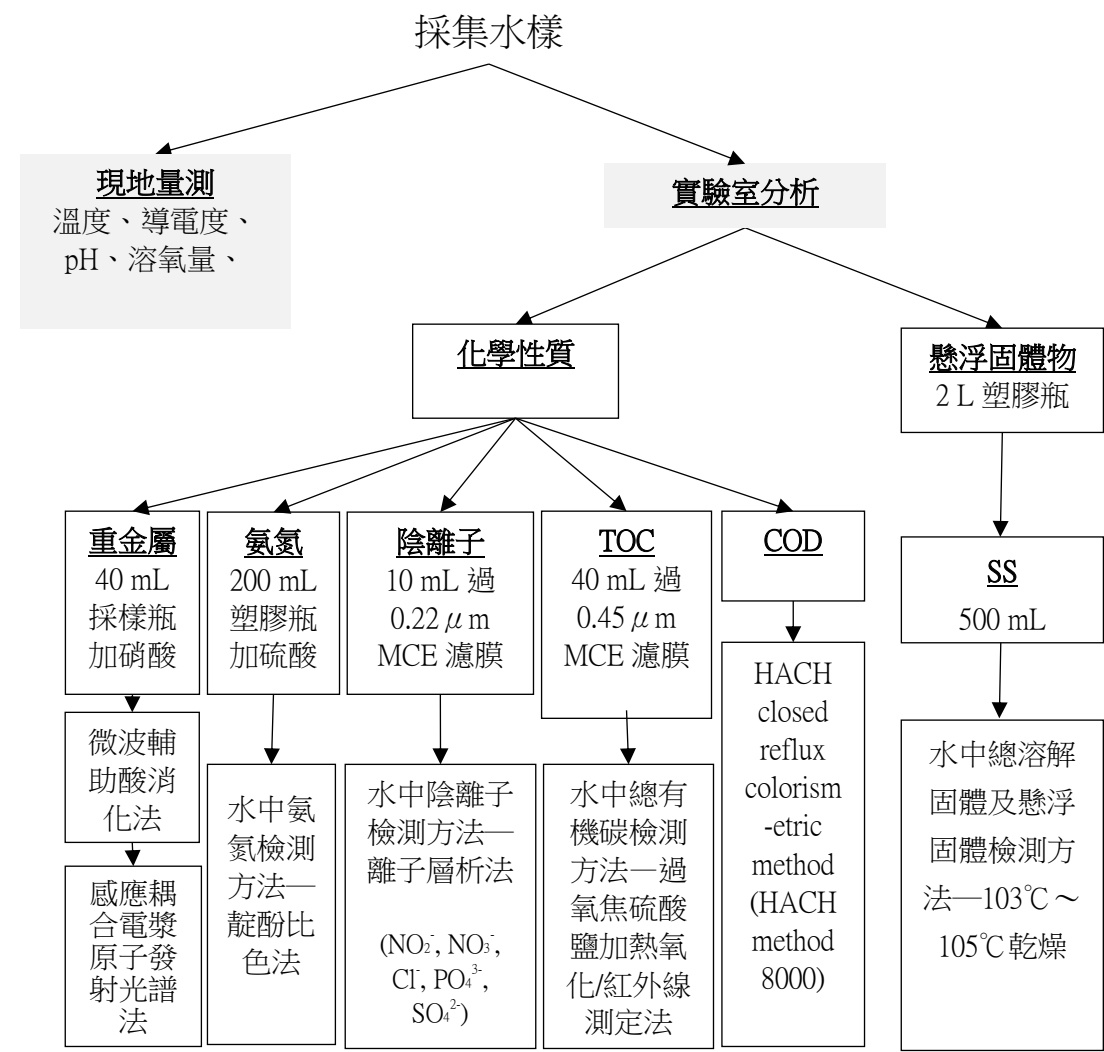


圖 4-3 採樣分析流程圖

河川水質現地量測

現地量測項目有溫度、pH、溶氧量、導電度、葉綠素 a 等數值，於現地取水避免晃動，於水桶中快速以攜帶式雙埠多參數主機 HACH HQ40D 測量參數，而葉綠素 a 則將水樣帶回實驗室後以 YSI-EXO 水質儀測量，偵測儀器資訊如下：

1. 溫度

以雙埠多參數主機 HACH HQ40D 之 pH 探針量測，量測範圍為 0 °C 至 50 °C。

2. pH

以雙埠多參數主機 HACH HQ40D 之 pH 探針量測，儀器額定可量測之範圍為 0.0 至 14.0，量測之準確性為 ± 0.002 。

3. 溶氧量

以雙埠多參數主機 HACH HQ40D 之 DO 探針量測，儀器額定可量測溶氧量範圍為 0.01 至 20.0 mg/L，量測溶氧量之準確性為 $\pm 1\%$ 。

4. 導電度

以雙埠多參數主機 HACH HQ40D 之導電度探針量測，量測導電度之準確性為 $\pm 0.5\%$ 。

5. 葉綠素 a

以多參數水質儀 YSI-EXO 量測，可量測之範圍為 0.07 to 400 $\mu\text{g/L}$ ，解析度 0.01 $\mu\text{g/L}$ 。

河川與水樣實驗分析

實驗室分析項目有化學需氧量(COD)、總有機碳濃度(TOC)、硝酸根離子(NO_3^-)、亞硝酸根離子(NO_2^-)、氯離子(Cl^-)、硫酸根離子(SO_4^{2-})、磷酸根離子(PO_4^{3-})、氨氮($\text{NH}_3\text{-N}$)及多種重金屬，分析方法如下：

1. 化學需氧量(COD)

使用 HACH closed reflux colorimetric method (HACH method 8000)，為經 μSEPA 核准認可之檢驗方法。COD 濃度代表消耗每公升水樣所需的耗氧量 (mg/L)，水樣經過濾後加入 HACH COD 含有重鉻酸鉀之消化劑試管內混合均勻，以 150 °C 加熱消化 2 小時，進行有機物之氧化反應，冷卻後以水質分析儀 HACH DR3900 進行分析，量測範圍為 3 至 150 mg/L (Low Range 試劑)。

2. 總有機碳濃度(TOC)

使用水中總有機碳檢測方法—過氧焦硫酸鹽加熱氧化/紅外線測定法(NIEA W532.52C)，配合 Aurora 1030W TOC Analyzer 儀器測定，樣本經 0.45 μm 濾紙過濾、稀釋及磷酸酸化前處理後上機分析，水樣先經過酸化，將無機碳轉換成二氧化碳吹氣排出，剩餘有機碳再加入過氧焦硫酸鹽溶液，氧化轉換為二氧化碳，以非分散式紅外線分析儀，量測水樣中總有機碳的濃度。

3. 硝酸根離子(NO_3^-)、亞硝酸根離子(NO_2^-)、氯離子(Cl^-)、硫酸根離子(SO_4^{2-})、磷酸根離子(PO_4^{3-})等陰離子

使用水中陰離子檢測方法—離子層析法(NIEA W415.53B)，水樣經 0.45 μm 濾紙過濾稀釋後上機，採用 Dionex ICS-1100 離子層析儀，以 9 mM 之碳酸鈉作為移動相溶液，水樣中之待測陰離子，隨移動相溶液流經陰離子層析管柱時，因與強鹼性陰離子交換樹脂間之親和力不同而被分離，陰子分離後經轉換再流經電導度偵測器，即可依其滯留時間及波峰面積推測陰離子種類及濃度，儀器量測範圍為 0.001-10 mg/L。

4. 氨氮($\text{NH}_3\text{-N}$)

使用水中氨氮檢測方法—靛酚比色法(NIEA W448.51B)，次氯酸鹽(Hypochlorite)及酚溶液會和水中氨氮及銨離子反應，生成深藍色之靛酚(Indophenol)，使用分光光度計於波長 640 nm 處進行比色分析，吸光度與氨氮濃度成正比，藉由檢量線吸光值回歸公式，計算氨氮濃度，再乘上稀釋倍數，即可求得水樣中氨氮之濃度。

5. 重金屬

先以水中元素萃取消化法—微波輔助酸消化法(NIEA W312.51C)，使用濃硝酸及濃鹽酸消化液，再配合微波加熱，進行水中金屬元素之萃取。含有金屬萃取物之消化液，再以水中金屬及微量元素檢測方法—感應耦合電漿原子發射光譜法(NIEA W311.53C)，以感應耦合電漿原子發射光譜儀(ICP)測量樣本金屬濃度。樣品先經霧化形成氣膠，再經由無線電波感應耦合電漿的加熱，

樣品所含元素會被激發射出的光譜線，經由光柵分光出各特定波長的發射譜線後，再由光檢器偵測。

6. 懸浮固體物

使用環檢所公告之水中總溶解固體及懸浮固體檢測方法—103°C~105°C 乾燥(NIEA W210.56A)。將 0.45 μm 玻璃纖維濾紙以 105°C 烘乾至恆重，將適量的水樣通過 0.45 μm 玻璃纖維濾紙後放入烘箱，以 105°C 烘乾一小時並稱重。利用過濾前後濾紙重量差回推水中懸浮固體物之濃度。

4.1.5 底泥分析項目及方法

底泥以 2 mm 篩網篩除大顆粒碎石雜物後，保存於-20 °C 冰櫃待後續分析，分析項目有 pH、碳氮硫氫重量百分比、重金屬濃度及粒徑分布等。

1. pH

使用土壤酸鹼值（pH 值）測定方法—電極法 (NIEA S410.62C)，將土壤樣品 20 g 與試劑水 20 mL 混合，攪拌 5 分鐘後靜置沉澱 1 小時，再吸取上清液離心，使用 Hach HQ40D 之 pH 電極測定樣品之酸鹼值。

2. 碳氮硫氫元素

使用碳、氫、硫、氧、氮元素含量檢測方法—元素分析儀法(NIEA M403.01B)，將風乾的底泥樣本磨碎過 1 mm 篩網後，於 105 °C 烘箱烘乾 2 小時，乾燥後樣本使用德國 Elementar vario EL cube 型儀器進行分析，樣品在高溫純氧環境下燃燒，將碳、氫、氮、硫等元素完全轉換成二氧化碳、水氣、氮氧化物及硫氧化物等混合氣體，再利用熱傳導偵測器（Thermal conductivity detector, TCD）檢測氮氣、二氧化碳、水氣及二氧化硫，換算即可求得樣品中氮、碳、氫、硫之重量百分比。

3. 重金屬

土壤中重金屬檢測方法—微波輔助王水消化法(NIEA S301.60B)，土壤樣

品以鹽酸和硝酸混合，配合微波加熱進行消化前處理，所得消化液稀釋至適當體積後，以感應耦合電漿原子發射光譜儀（ICP）進行分析。

4. 粒徑分布

使用雷射粒徑分析儀 CILAS 1090L 量測顆粒直徑與粒徑分佈。雷射粒徑分析儀使用光源為 830 nm 之紅光固體雷射，雷射光入射懸浮於分散相中之粒子，利用大粒子繞射角度小，小粒子繞射角度大之差異計算粒徑大小，可量測粒徑範圍為 0.04 ~500 μm 。

4.1.6 微生物

底泥樣本中微生物 DNA，本次 DNA 萃取方法將採用 QIAGEN DNeasy Power Soil Kit，萃取步驟如下：

- (1) 取 0.25 g 底泥樣本添加入 PowerBead Tubes 中，添加 60 μL 已預熱 60-70°C 之 Solution C1，以最大震盪速度震盪 10 分鐘，使樣本及溶液混合均勻。
- (2) 於室溫下以高轉速(10,000g)離心 30 秒，使大分子與小分子分離。
- (3) 把上清液移到新的 2 mL 之微量離心管中。添加 250 μL Solution C2，震盪 5 秒鐘使之充份混合，再冰浴 5 分鐘。
- (4) 室溫下再以高轉速(10,000g)離心 1 分鐘，吸取上清液到新的 2 mL 微量離心管中。
- (5) 添加 200 μL of Solution C3，震盪 5 秒鐘使之充份混合，再冰浴 5 分鐘。
- (6) 室溫下再以高轉速(10,000g)離心 1 分鐘，吸取上清液到新的 2 mL 微量離心管中。
- (7) 取 750 μL 上清液移到新的 2 mL 之微量離心管中。添加 1200 μL 事先搖晃均勻之 Solution C4，震盪 5 秒鐘使之充份混合。
- (8) 吸取 675 μL 包含沉澱物之混合溶液到已經裝置於 collection tube 的 spin column 中，離心 1 分鐘，使溶液穿過濾膜，直到樣品全過濾膜。

- (9) 過濾液丟棄，添加 500 μ L 之 Solution C5 以高轉速(10,000g)離心 30 秒。把過濾液丟棄後再離心 1 分鐘。
- (10) spin column 移到新的 2 mL 之微量離心管中，添加 100 μ L 之 Solution C6 滴於 spin column 中心，以 10,000 g 離心 30 秒。
- (11) 下方溶液即為本次萃取之 DNA，保存在-20°C 待後續使用。

4.2 高通量定序

4.2.1 MiSeq 16S-rRNA 菌群

將底泥檢體利用 QIAGEN提供之 DNeasy PowerSoil Kit 試劑盒進行細菌脫氧核糖核酸(DNA)提取。經分離後，DNA 產量約為 100 至 200 ng 及濃度為 50 至 150 ng/ul 之間，接續進行 PCR 擴增，將 DNA 濃度調整至 50ng/ul，並使用與細菌 16S 核糖體核糖核酸基因(16S rRNA gene) V3-V4 序列互補的一對正反引子：

16S Amplicon PCR Forward Primer = 5'

TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

16S Amplicon PCR Reverse Primer = 5'

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTA

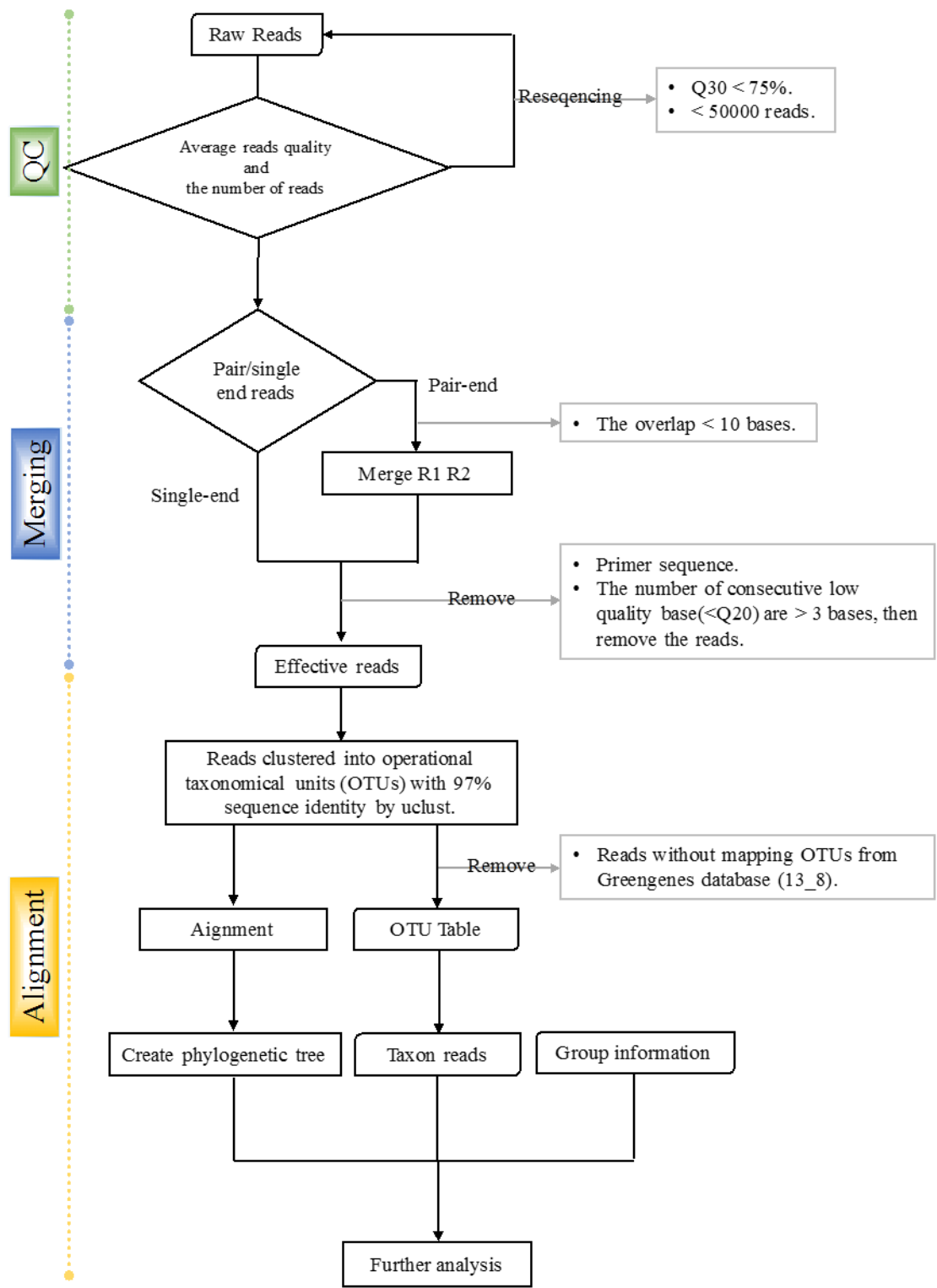
ATCC

利用聚合酶鏈鎖反應(PCR)放大出 V3-V4 片段，長度約 550bp，放大後產物使用 GeneHlow Gel / PCR 純化試劑盒純化(Geneaid)，由於放大後的序列尾端皆設計有 Illumina 突出轉接子(overhang adapters)，因此可以藉此突出轉轉接子序列(overhang adapters)，以 Illumina 提供之 Nextera XT Index 試劑盒，利用內含條碼 barcodes 與 Illumina 定序接頭序列(P5,P7)的正反引子將，上述純化過後的產物進一步以 PCR 反應放大並利用 AMPure XP 磁珠純化成約 630bp 大小的文庫(library)。

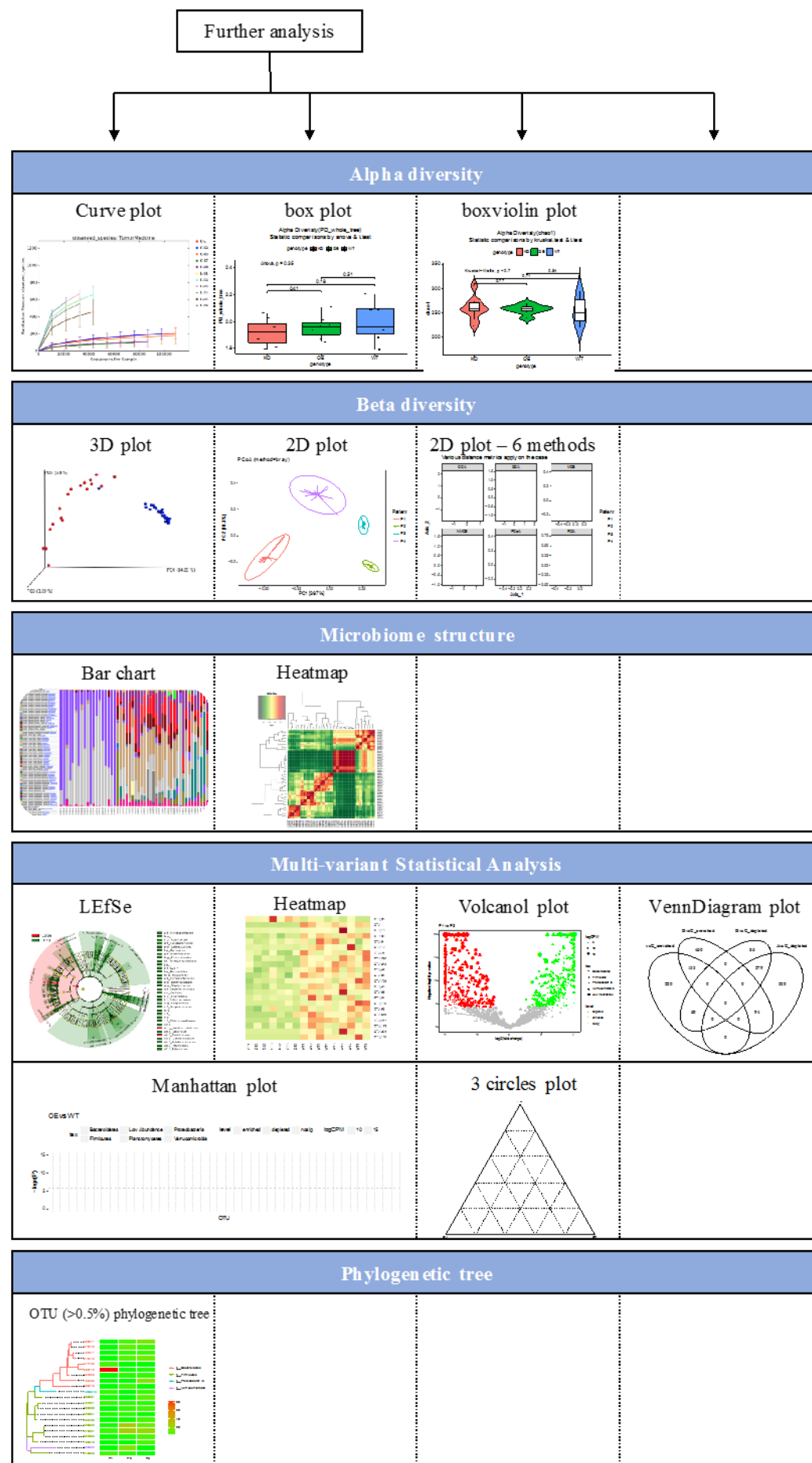
使用 Agilent bioanalyzer 2100 測量待測文庫之大小及使用螢光定量法(Qubit)測量待測文庫濃度，調整待測文庫濃度後，將樣本加入表面帶有互補轉接子序列的定序晶片上，並利用次世代定序儀(MiSeq)之橋式聚合酶鏈鎖反應(bridge amplification)將樣本擴增以放大螢光檢測的訊號，藉由定序過程中不同鹼基的螢光標記擁有不同的螢光顏色來辯認互補的鹼基對，經重覆進行螢光標記移除與偵測，即可偵測眾多環境菌種的基因序列 (雙邊定序長度 2*300bp)。

4.2.2 高通量定序及組裝

總體基因體學分析將進行下列六項步驟：(一) 以 FastQC 程式檢查定序原始資料中，每個樣本的 Q30 的比例應大於 75% (S A., 2010)。(二) 使用 PEAR 軟體將雙邊定序後的序列利用彼此重疊之區域進行合併，並去除重疊區域小於 10bp 的序列資料(Zhang et al., 2014)，並且將步驟一與步驟二通過品質測定與合併後的序列稱之為 assembled reads。(三) 去除上述 assembled reads 中連續 3 bp 品質小於 Q20 的序列供後續分析稱為 effective reads。(四) 以 UCLUST 軟體將相似度大於 97% 以上的序列合並為一個叢集(cluster)，並稱之為 operational taxonomical unit (OTU)(RC E., 2010)，接續使用 QIIME software package (version 1.9.1)軟體進行預設值分析(Caporaso et al., 2014)，並將序列與 GreenGenes 資料庫(release 13_8)(TZ1 et al., 2006)進行比對，比對完之序列者為 taxon reads。(五) 挑選出樣本 taxon reads 大於 50000。(六) 利用 R 軟體進行 The alpha diversity, beta diveristy, microbiome structure, multi-variant statistical analysis and Cooccurrence network analysis 繪圖，並以 Mann-Whitney-Wilcoxon Test 進行各組間的比較並計算出 p-value。



以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(2/2)



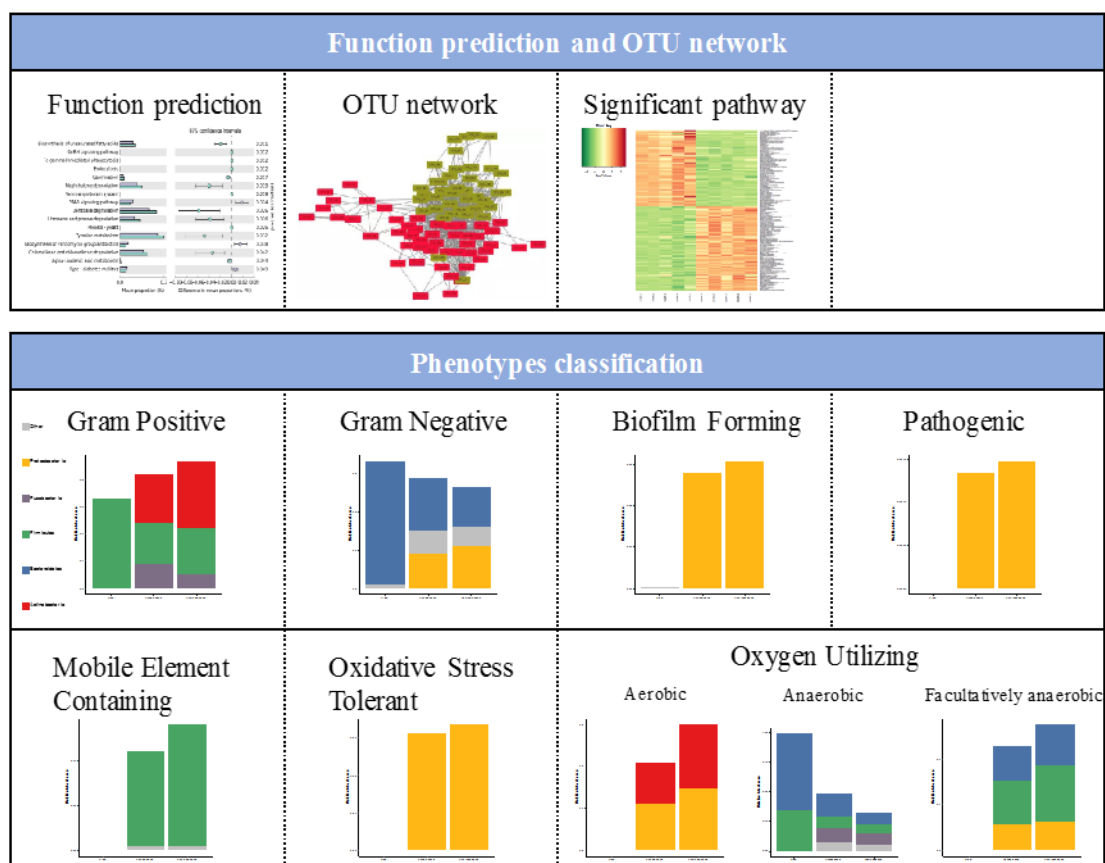


圖 4-4 高通量定序流程圖

4.2.3 PICRUSt 菌群代謝功能評估分析

PICRUSt全稱為“Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States”，可以通過16S rRNA基因序列，預測對應的細菌和古細菌的代謝功能譜。PICRUSt的原理基於已測細菌基因組的16S rRNA全長序列，推斷它們的共同祖先的基因功能譜，對Greengenes資料庫中其它未測物種的基因功能譜進行推斷，構建古細菌和細菌的基因功能預測譜，最後，將測序得到的菌群組成和資料庫進行對照，對菌群代謝功能進行預測評估(Langille et al., 2016)。

PICRUSt 的分析流程分為三步：首先對測序獲得的 16S rRNA 基因序列，進行封閉式參考 OTU 劃分（Closed-reference OTU picking），通過與 Greengenes 資料庫比對，尋找每一條測序序列的“參考序列最臨近鄰居”，並歸為參考 OTU；再來根據“參考序列最臨近鄰居”的 rRNA 基因數量，對獲得的 OTU 豐度矩陣進行校正；最後根據“參考序列最近鄰居”對應的 KEGG 等基因功能譜資料，換算預測菌群的整體代謝功能(圖 4-5)。

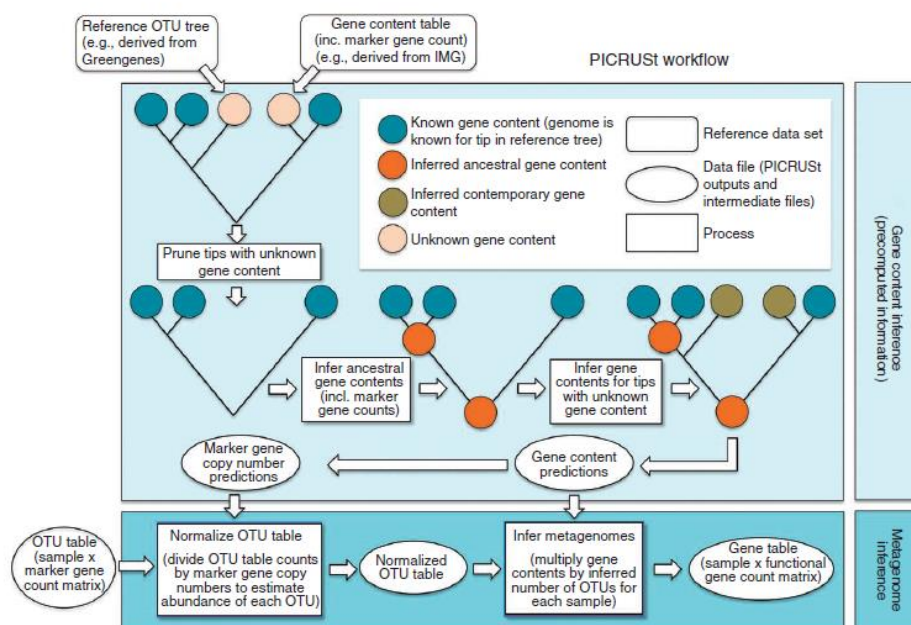


圖 4-5 PICRUSt 分析基本流程示意圖

4.2.4 Shotgun metagenomics 定序及分析

DNA Library 基因庫製備和定序 (shotgun sequencing)

利用螢光定量法 (Qubit) 將 DNA 調整總量 100 ng，以超音波振盪器 (Covaris M220) 將 DNA 樣本震碎後片段大小為 350bp 並純化此樣本，依循 Illumina 公司的定序試劑組 (TruSeq nano DNA-seq kit) 以終端酵素 (end-repair enzyme) 將片段化之後產生的黏性末端 (sticky) 序列補成平末端 (blunt)，利用單磷酸腺苷酵素將單磷酸腺苷 (adenosine) 合成至雙股序列的 3' 端，後續以接合酶接上定序用之專一性引子 (i5, i7)，完成後進行聚合酶鏈鎖反應，將已接上定序引子雙股序列放大並純化成為最終之 DNA 基因庫，定序部分使用 NextSeq500 定序平台 (Illumina Inc., CIC bioGUNE, Bilbao, Spain)，以雙尾定序法定序 cDNA 基因庫兩端各 150 個核苷酸。

總基因體學分析方法

(一) 序列品質控管

每個樣本的定序結果 FASTQ 檔以 Trimmomatic (version 0.36) (Bolger et al., 2014) 的 sliding window 模式方式進行品質確認，將定序品質過低的鹼基移除 (trimming)，其中 window size 為 4 bp，phred quality score cutoff = 20，修剪後定序長度仍需大於 80 bp。隨後以 FastQC (version 0.11.5) (Andrews and Simon, 2010) 及 MultiQC (version 0.9) (Ewels et al., 2016) 檢視修剪前後的單位鹼基定序品質 (per base sequence quality)、GC 含量、序列長度分佈等資訊。

(二) 計算菌種豐富度

經過修剪的序列 (cleaned reads) 以 MetaPhlAn2 (version 2.7.5) (Truong et al., 2015) 計算菌種豐富度 (taxonomic abundance)，若某菌種的相對含量低於 1% 則視為罕見菌種。根據序列相似度 (sequence similarity) 及菌種相對含量，以 GraPhlAn

(version 0.9.7) (Asnicar et al., 2015) 繪製演化樹 (cladogram) ，並以不同顏色區分各個分支 (clade) 。

(三) 基因預測、分群及豐富度

以 A5-miseq (version 20160825) (Coil et al., 2015) 對 cleaned reads 進行序列組裝 (sequence assembly) ，再使用 MetaGeneMark (version 3.38) (Zhu et al., 2010) 預測基因。預測出來的基因，以 CD-HIT (version 4.7) (Fu et al., 2012) 根據其序列相似度分群成基因集 (gene catalogs) ，再使用 eXpress (version 1.5.1) (Roberts and Pachter, 2013) 和 Bowtie (version 1.2.2) (Langmead et al., 2009) 將 cleaned reads 對預測出的基因進行二次序列比對 (remapping) ，並以 TPM (transcript per million) 標準化，計算每個基因集在樣本中的豐富度。

(四) 基因功能註解、豐富度及功能蛋白序列比對

各基因集內具代表性的基因，透過 eggNOG-mapper (version 1.0.3) (Huerta-Cepas et al., 2017) 取得其 GO (gene ontology) Slim (Ashburner et al., 2000) 和 KEGG (Kanehisa and Goto, 2000) 功能性註解 (functional annotation) ，並根據每個 GO term 下所有基因的 TPM 值計算 z score，z score 大於 1.96 或小於 -1.96 為具有顯著差異的 GO term。計算 Z score 所需的平均值和標準差是以 NCBI 資料庫中 100 個正常人腸道總基因體學檢體 (SRA045646 和 SRA050230) 之 GO term 為基準。分析結果中的每個 GO term 需在系統資料庫的 100 個檢體中至少含有三個不同 TPM 值，方可計算 z score 以比較其差異顯著性，若 TPM 值小於三個則於 z score 欄位顯示 “NA”。由於缺值可能導致 z score 的偽陽性，每個 GO term 的輸出結果中也標註了非 “NA” 的百分比 (non_NA_percentage) 供使用者參考。預測出來但不包含在現有 GO 或 KEGG 資料庫內的基因，以 HMMER hmmscan (version 3.1b2) (Eddy, 2011) 對 Pfam 資料庫 (version 31, Pfam-A.hmm) (Finn et al., 2016) 進行序列比對，推測其可能的蛋白質結構域 (protein domain) 。

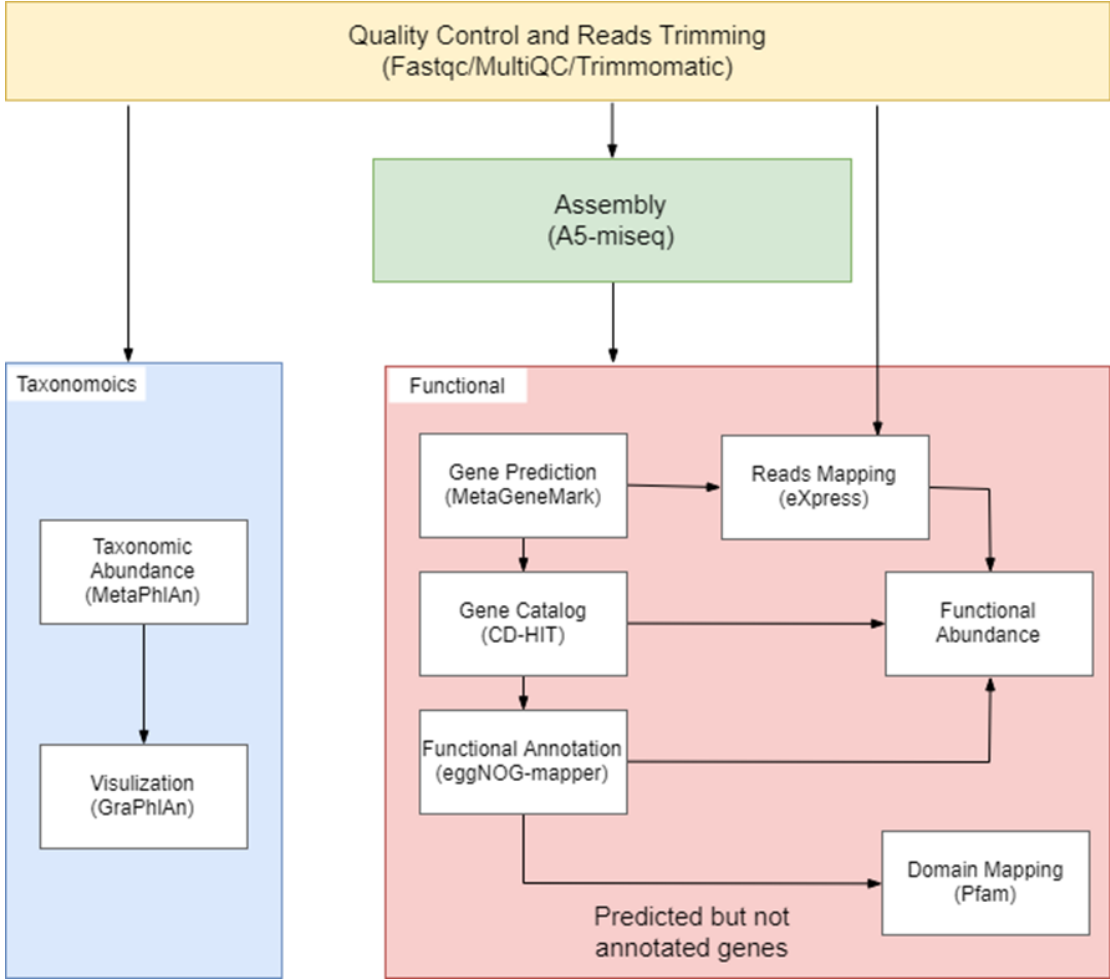


圖 4-6 總基因體學分析流程圖

4.3 實驗室純菌暴露硫酸銅批次實驗

4.3.1 純菌暴露硫酸銅批次實驗設置

本研究選定以單一菌株在實驗室內添加硫酸銅以批次培養，再分析其 RNA 表現。依第一年研究結果顯示，甲基氧化菌類(methylotrophs)在反應槽中受硫酸銅影響較顯著，因此選取 *Methylobacterium aquaticum* 此一菌屬進行培養。而培養液為 peptone yeast extract medium (1L 中含有 yeast extract 2.5g、peptone 2.5g、NaCl 2.5g) 滅菌後添加 1% methanol(事先以 0.22um 孔徑濾膜滅菌)。

把保存於-80°C 的菌液恢復至室溫後添加於含有培養液的離心管中，置於 28°C 培養箱並震盪來進行恢復，於 96 小時後添加至含有硫酸銅的培養液的離心管中進行培養批次實驗。劑量配置濃度以銅做為濃度單位分別添加硫酸銅成 3 ppm、10 ppm、50 ppm、100 ppm，並再培養一無添加硫酸銅的培養液做為空白組 blank，同樣置於 28°C 培養箱並震盪。此五組每 6 小時測定一次其 OD600 值來繪製其生長曲線。

4.3.2 核酸萃取及前處理

將 *Methylobacterium aquaticum* 培養至吸光值在 0.3~0.5 之間後，將菌液以離心方式取得菌體後，以去核酸水回溶倒入研鉢中，加入液態氮研磨後以 TRIZOL 萃取 RNA。得到的 RNA 利用 NanoDrop 偵測其濃度後再使用 Agilent RNA 6000 Nano kit 進行品質確認。

4.3.3 菌株功能性基因分析

(一)RNA Libaray 基因庫製備和定序 (transcriptome)

抽出 RNA 後使用 NanoDrop ND -1000 分光光度計 (Thermo Scientific) 與 Agilent 2100 生物分析儀 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) 來確認 RNA 濃度和品質。最佳的 RNA 品質應介於 A260/A280 = 1.8-2.0，RNA 完整度, RIN > 8.0，隨

後利用螢光定量法 Qubit 將 RNA 濃度調整為 200 ng/ul。利用 Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Illumina) 將細菌中的 rRNA 移除並純化完後，依循 Illumina 公司的定序試劑組 (TruSeq stranded RNA-seq) 所製定的程序製備 cDNA 基因庫 (cDNA Library)，實驗進行的方式為首先利用二價陽離子將 RNA 進行片段化，每個 RNA 片段大小約為 180-200 個核苷酸，隨後以反轉錄酶與隨機引子合成雙股之 cDNA，第二步驟於 cDNA 之 5' 與 3' 兩端以接合酶接上定序用之專一性引子 (i5, i7)，完成後進行聚合酶鏈鎖反應，將已接上定序引子的 cDNA 放大並純化成為最終之 cDNA 基因庫。定序部分使用 NextSeq500 定序平台 (Illumina Inc., CIC bioGUNE, Bilbao, Spain)，以雙尾定序法定序 cDNA 基因庫兩端各 150 個核苷酸。

(二)Metatranscriptome 高通量定序、組裝及分析

高通量定序

從微生物菌叢提取出 total RNA，而後續的 RNA enrichment 方式則是取決於欲定序的 RNA 種類(例如: mRNA，lncRNA，microRNA)而定。以 mRNA 為例，片斷化的 RNA 會進一步使用反轉錄酶或是 random primer 反轉錄成 cDNA，隨後進行建庫並上機 (建庫與上機方法同 MiSeq 16S-rRNA 方式) (Bikel et al., 2015)。

組裝及分析

Metatranscriptome 分析流程分成兩種策略(圖 4-7): (一) 將定序序列回貼參考基因組或是已知基因群；(二) 將定序序列進行無參考基因組組裝(de novo assembly) 找出新的 transcriptomes。透過第一種策略，藉由將 RNA 定序序列回貼至不同的參考基因組或是 pathways 資料庫(像是 KEGG)，可以在不同的 taxonomy 層級上，哪些 genes 在比較組別間相對表達量是上升或是下降，抑或是哪些 pathways 在比較組別間是相對被抑制或是活化。分析步驟如下: (一) 以 FastQC 程式檢查定序原始資料中，每個樣本的 Q30 的比例應大於 75% (S A., 2010)。(二) 以

trimmomatic 程式將定序原始資料中，品質較差的序列片段去除 (Bolge et al., 2014)。(三) 以 bowtie2 程式將定序原始資料回貼到參考基因組或是參考 pathway 資料庫 (Langmead and Salzberg, 2012)。(四) 以 htseq 程式量化定序序列在特定基因或是 pathway 的表達量 (Anders et al., 2015)。(五) 以 deseq2 R 套件進行差異表現分析 (Love et al., 2014)。而透過無參考基因組組裝分析策略，可以找到新穎的轉錄組訊息。分析步驟如下：(一) 以 Trinity 程式進行轉錄組組裝 (Henschel et al., 2012)。(二) 以 Transdecoder 程式進一步篩選組裝序列並預測 ORFs (open reading frames) (Haas and Papanicolaou, 2016)。(三) 以 Trinotate 程式將組裝後的轉錄組進行註解，搭配 Swiss-port 和 Pfam 兩個資料庫。資料視覺化呈現方式如圖二：(一) 以熱圖呈現表達量分布，或是箱形圖呈現 pathway 的多樣性(alpha diversity)。(二) Metatranscriptome 分析與菌項分布之關係，以熱圖或是網路圖呈現。

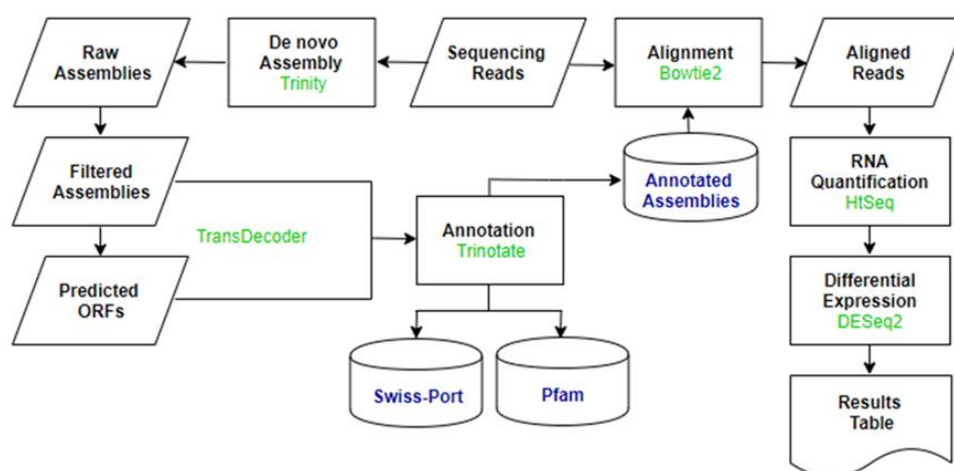


圖 4-7 Metatranscriptome 分析流程的兩大策略。(一)有參考基因組分析流程。(二)無參考基因組分析流程。

(參考 https://www.oceanridgebio.com/metatranscriptomics_bioinformatics)

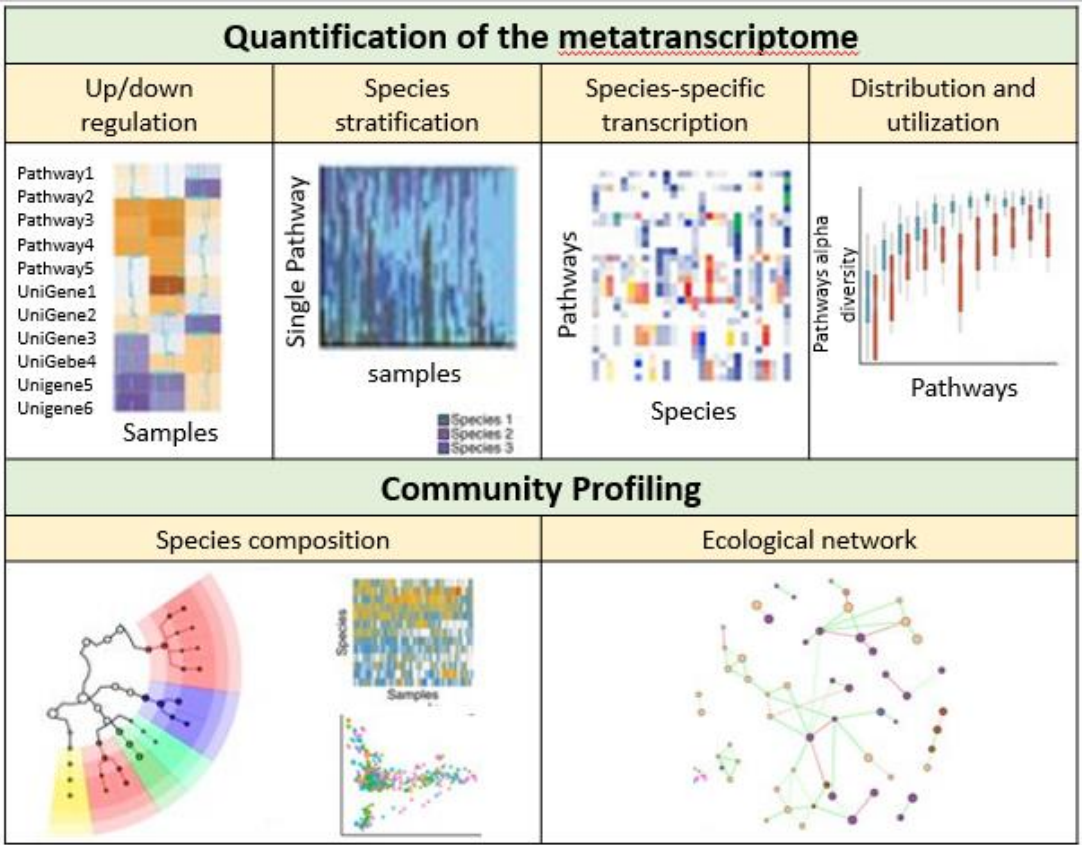


圖 4-8 Metatranscriptome 分析結果呈現示意圖。(一) Metatranscriptome 量化分析。(二) Metatranscriptome 分析與菌相分布之關係。(Abu-Ali et al., 2018)

章節摘要：

依據計畫之研究方法逐項進行執行方式說明，從現地採樣水樣與底泥之分析、高通量定序、純菌暴露實驗和結果之數據整理解析等分節予以說明。

五、結果與討論

5.1 現地採樣分析

5.1.1 河川水樣現地測量

表 5-1 河川水樣現地量測數值

樣品名	溫度(°C)	pH	溶氧量 (mg/L)	導電度 ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	葉綠素 a ($\mu\text{g}/\text{L}$)
Street1	32.4	6.04	7.19	677	19.03
Street2	32.8	6.72	7.69	637	17.38
Street3	33.0	6.42	6.22	5,570	7.40
Street4	31.0	6.34	5.23	3,220	23.03
Street5	31.8	6.40	6.33	2,770	14.19
平均值	32.2	6.38	6.53	2,575	16.21
標準差	0.8	0.24	0.95	2,048	5.86
最大值	33.0	6.72	7.69	5570	23.03
最小值	31.0	6.04	5.23	637	7.40

pH

圖 5-1 為 pH 分布，由左而右代表由上游至下游數據 pH 最大值為 6.72，測得於 Street2，最小值為 6.04，測得於 Street1，pH 平均值為 6.38。

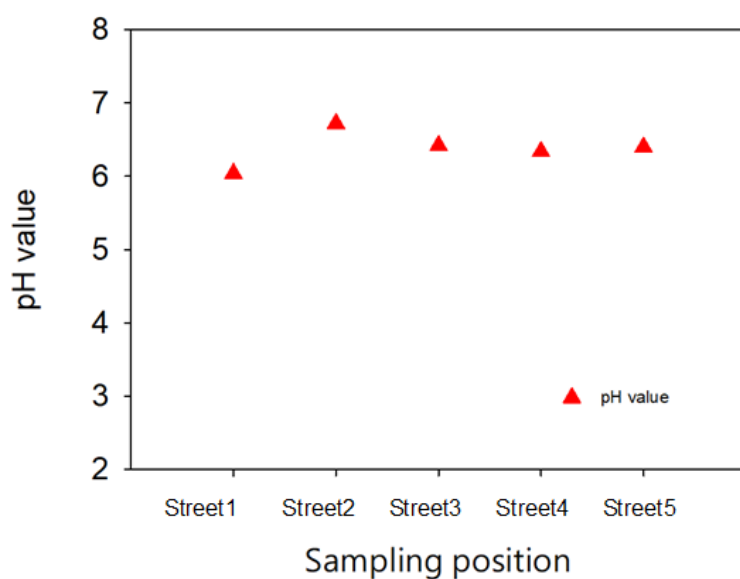


圖 5-1 河川水樣酸鹼度分布

溫度及溶氧

圖 5-2 為溫度及溶氧分布，溫度最大值為 33.0°C，最小值為 31.0°C，溫度平均值為 32.20 ± 0.81 ；溶氧最大值為 7.69 mg/L 測得於 Street2，最小值為 5.23 mg/L，測得於 Street4。

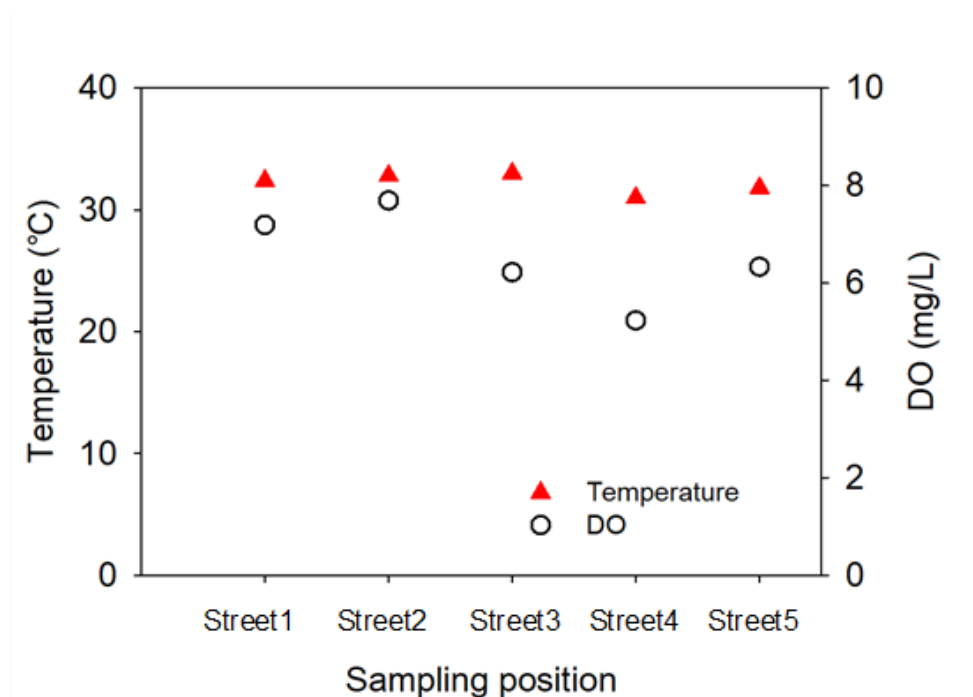


圖 5-2 河川水樣溫度及溶氧分布

導電度

圖 5-3 為導電度分布，導電度最大值為 5,570 mg/L，測得於 Street3，最小值

為 637 mg/L，測得於 Street2，下游導電度高於上游。

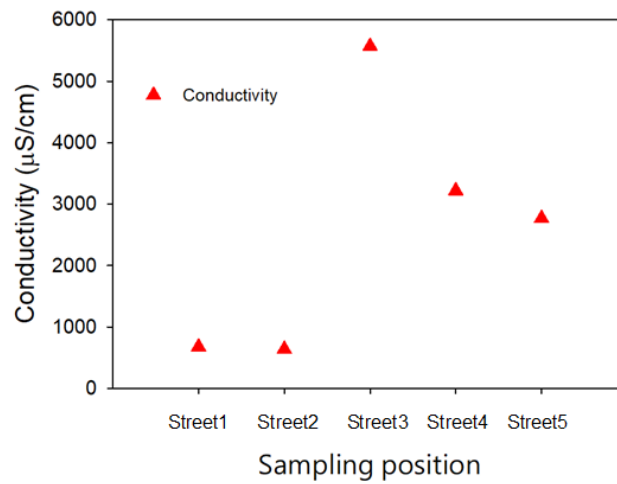


圖 5-3 河川水樣導電度分布

葉綠素 a

圖 5-4 為葉綠素 a 分布，測得數值最大值為 23.03 mg/L，測得於 Street4，最小值為 7.040 mg/L，測得於 Street3。

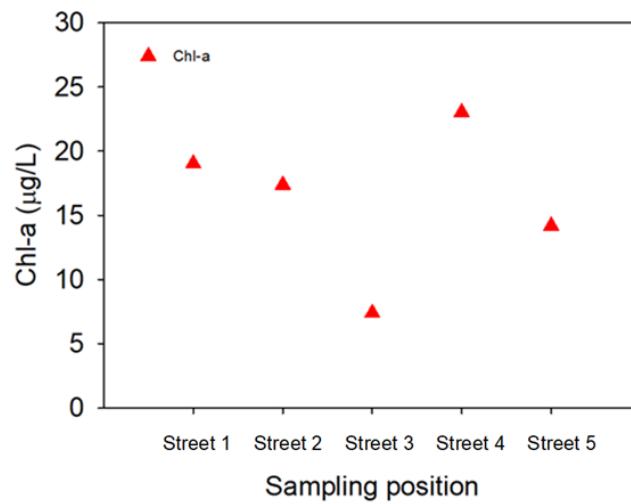


圖 5-4 河川水樣葉綠素 a 分布

5.1.2 河川水樣實驗室分析

實驗室分析項目有懸浮固體(SS)、總有機碳濃度(TOC)、化學需氧量(COD)、氨氮(NH₃-N)、硝酸氮(NO₃⁻-N)、亞硝酸氮(NO₂⁻-N)、氯離子(Cl⁻)、磷酸根離子(PO₄³⁻)、硫酸根離子(SO₄²⁻)及多種金屬離子，下表 4-2 為河川水樣實驗碳元素、氮元素及陰離子分析數值。

表 5-2 河川水樣實驗分析數值 (單位：mg/L)

樣本名	SS	TOC	COD	NH ₃ -N	NO ₃ ⁻ -N	NO ₂ ⁻ -N	Cl ⁻	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻
Street1	7.33	88.07	39	0.869	10.30	< 0.001	59.61	< 0.001	151.07
Street2	9.87	66.37	27	0.196	12.91	< 0.001	55.10	< 0.001	131.17
Street3	7.89	116.75	107	9.424	76.31	< 0.001	1026.74	< 0.001	1667.35
Street4	7.59	112.99	57	2.106	60.52	< 0.001	397.97	< 0.001	1112.50
Street5	9.48	98.98	50	1.737	70.07	< 0.001	396.54	< 0.001	985.51
平均值	8.43	110.63	56	2.866	46.02		387.19		809.52
標準差	1.04	4.20	31	3.741	31.93		395.86		661.88
最小值	9.87	66.37	27	0.196	10.30		55.10		131.17
最大值	7.33	16.75	107	9.424	76.31		1026.74		1667.35

總有機碳(TOC)及化學需氧量(COD)

河川水樣中 TOC 及 COD 分布如圖 5-5 主坐標軸為 TOC 數值，最大值為 16.75 mg/L，最小值為 6.37 mg/L；副座標軸為 COD 數值，COD 最大值為 107 mg/L，最小值為 27 mg/L，TOC 及 COD 趨勢一致。最濃度最高點均位於 Street3，最低濃度點則位於 Street2。

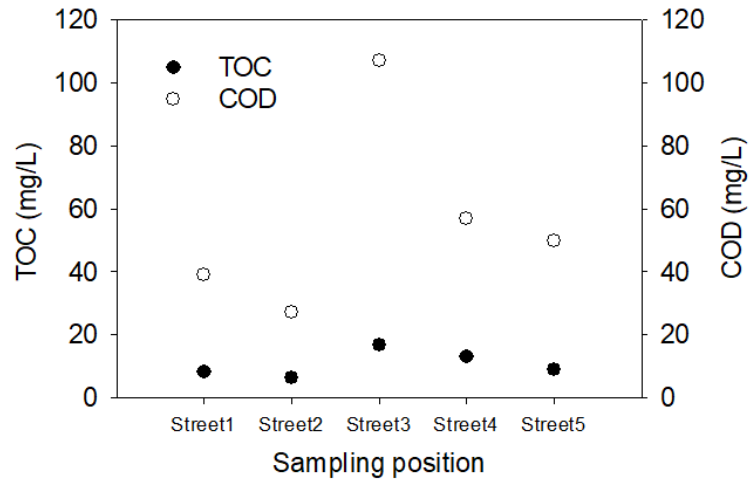


圖 5-5 河川水樣中 TOC 及 COD 分布

總無機氮 (Total Inorganic Nitrogen, TIN)

總無機氮為氨氮、硝酸氮及亞硝酸氮之總和。圖 5-6 為總無機氮分布，總無機氮最大值 85.73 mg/L，測得於工廠排水正下方之 Street3 點位，最小值低於 11.17 mg/L，測得於 Street1 點位。以河川污染指數評估，採樣點氨氮濃度介於 0 至 9.5 mg/L，Street3 之氨氮項目為重度污染水體(氨氮濃度大於 3 mg/L)，Street2、Street3 之氨氮污染分類為中度污染(氨氮濃度介於 1~2.9 mg/L)，Street1 之氨氮濃度屬輕度污染(氨氮濃度介於 0.5~0.99 mg/L)，Street2 氨氮濃度則屬於未受污染(氨氮濃度小於 0.5 mg/L)，而所有點位皆呈硝酸氮濃度大於氨氮濃度。

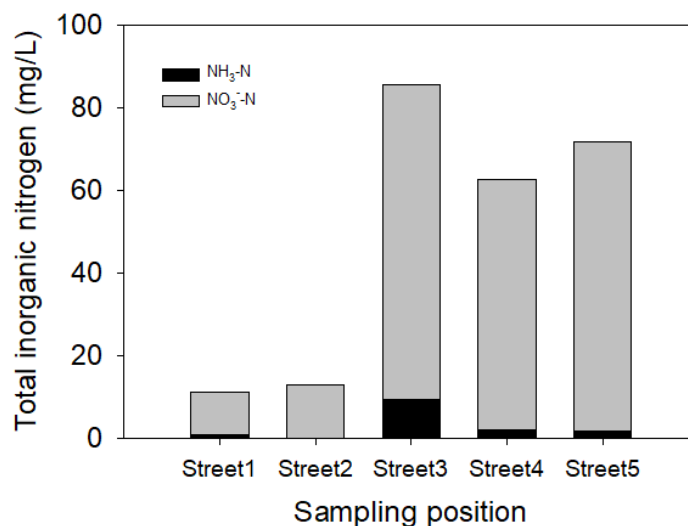


圖 5-6 河川水樣中 TIN 分布

硫酸根離子(SO_4^{2-})、氯離子(Cl^-)及磷酸根離子(PO_4^{3-})

河川水樣中陰離子分布如圖 5-7，硫酸根離子最大值為 1667.35 mg/L，最小值小於 0.001 mg/L，氯離子最大值為 1026.74 mg/L，最小值為 55.10 mg/L，硫酸根離子及氯離子越接近工廠排放口濃度越高，且排放口下游點為高於排放口上游點位，磷酸根離子皆未測得。

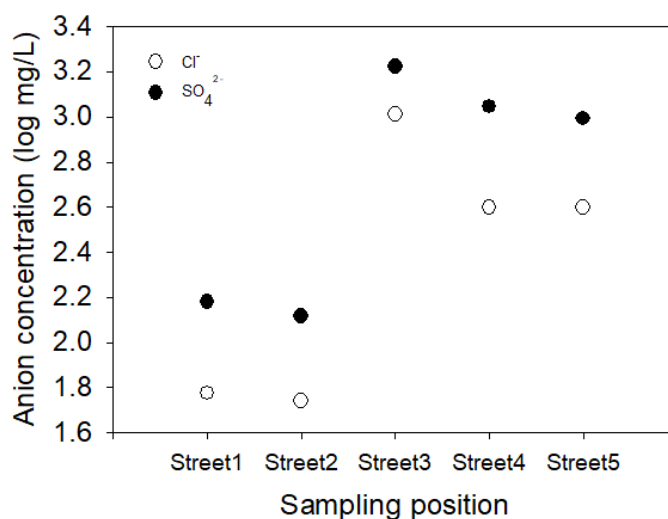


圖 5-7 河川水樣中陰離子分布

懸浮固體物(SS)

河川水樣中懸浮固體物濃度分布如圖 5-8，測得濃度最高點在 Street2 為 9.87 mg/L，最低點在 Street1 為 7.33 mg/L，各點間差異小；以河川污染指標來看，SS 部分皆屬於未受污染(濃度小於 20.0 mg/L)。

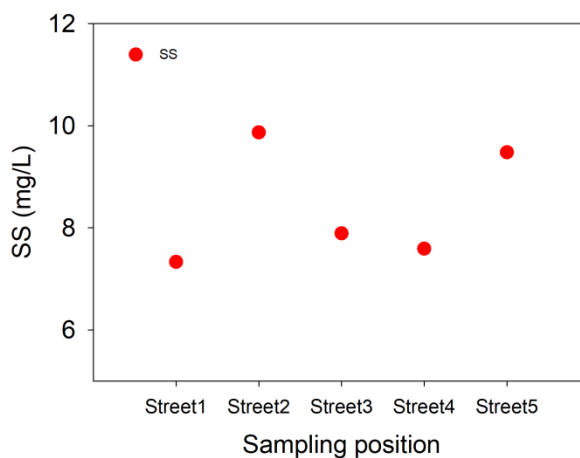


圖 5-8 水中懸浮固體物濃度分布

河川水樣重金屬

以 ICP 儀器偵測重金屬在河川中濃度(詳如表 5.3)，其中銀(Ag)、鎘(Cd)、鈷(Co)、鉻(Cr)及鋇(Ba)等 5 種重金屬濃度均小於偵測極限無法測得，各金屬濃度最高值多出現於 Street1 採樣點，測得水中之鋁(Al)、鐵(Fe)、硼(B)、鎳(Ga)、銦(In)、鉛(Pb)濃度為 5 個採樣點中之最高值。

照環保署全國水質資訊網公布老街溪中正橋(同 Street2)及許厝港一號橋(同 Street5)測站之測值，與本計畫採樣時間點最相近之 2018 年 4 月監測數值，針對水中的銅濃度分析比較，本次採樣僅工廠放流口下方的 Street3 點位測得銅濃度 0.054 mg/L，其餘測點銅濃度均小於偵測極限無法測得；對照環保署全國水質資訊網之監測數值，中正橋(同 Street2)之銅濃度為 0.008 mg/L，而許厝港一號橋(同 Street5)之銅濃度則為 0.076 mg/L，本團隊本次採樣測得結果偏低。

表 5-3 河川水樣重金屬濃度 (單位：mg/L)

樣本名	銀(Ag)	鎘(Cd)	鈷(Co)	鉻(Cr)	鋁(Al)	銦(Sr)	錳(Mn)	鐵(Fe)
Street1	ND	ND	ND	ND	0.214	ND	0.024	0.319
Street2	ND	ND	ND	ND	0.076	ND	0.025	0.129
Street3	ND	ND	ND	ND	0.034	0.013	0.062	0.079
Street4	ND	ND	ND	ND	0.055	0.017	0.028	0.138
Street5	ND	ND	ND	ND	0.014	0.014	0.056	0.128
平均數	-	-	-	-	0.078	0.013	0.039	0.159
標準差	-	-	-	-	0.070	0.003	0.017	0.083
最小值	-	-	-	-	0.014	ND	0.024	0.079
最大值	-	-	-	-	0.214	0.017	0.062	0.319
基準值	0.05	0.01	-	-	-	-	0.05	-

註：基準值參照「地面水體分類及水質標準」；測值加底框者為個別金屬最高濃度出現點位。

續表 5-3 河川水樣重金屬濃度 (單位：mg/L)

樣本名	硼(B)	鋇(Ba)	銅(Cu)	鎳(Ga)	銦(In)	鉛(Pd)	鋅(Zn)
Street1	0.203	ND	ND	0.049	0.045	0.016	0.017
Street2	0.102	ND	ND	0.022	0.018	0.016	ND
Street3	0.130	ND	0.054	0.019	ND	0.01	ND
Street4	0.108	ND	ND	0.020	0.014	ND	ND
Street5	0.079	ND	ND	0.017	ND	0.012	0.190
平均數	0.124	-	0.015	0.026	0.022	0.012	0.044

標準差	0.042	-	0.020	0.012	0.014	0.003	0.073
最小值	0.079	-	ND	0.017	ND	ND	ND
最大值	0.203	-	0.054	0.049	0.045	0.016	0.19
基準值	-	-	0.03	-	-	0.1	0.5

註：基準值參照「地面水體分類及水質標準」；測值加底框者為個別金屬最高濃度出現點位。

表 5-4 水中重金屬未測得項目之 MDL

	銀(Ag)	鎘(Cd)	鈷(Co)	鉻(Cr)	銦(Sr)
MDL (mg/L)	0.0025	0.0056	0.0033	0.0043	0.0028
	鋇(Ba)	銅(Cu)	銦(In)	鉛(Pd)	鋅(Zn)
MDL (mg/L)	0.0111	0.0047	0.0086	0.0088	0.0054

5.1.3 河川底泥物理化學性質

pH

底泥 pH 及導電度分布如表 5-4 及圖 5-9，將底泥樣品 20 g 與試劑水 20 mL 混合後，經沉澱離心後，沉澱一小時之上清液，以電極法測 pH。底泥 pH 介於 6.28 至 7.15 間。

表 5-5 底泥 pH 分布

樣品名	pH 值
Street1	6.28
Street2	6.50
Street3	6.85
Street4	7.15
Street5	6.74

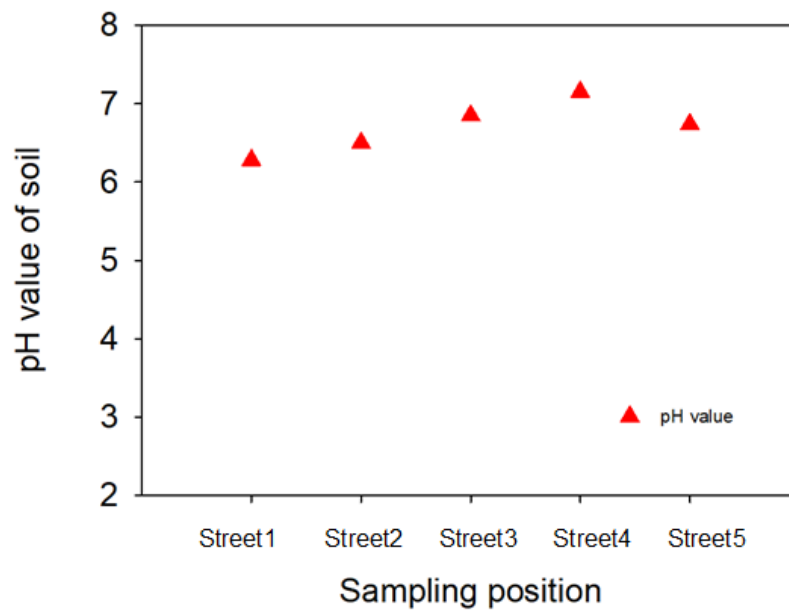


圖 5-9 底泥 pH 分布

元素分析

底泥經元素分析儀測得碳、氮、硫及氫之重量百分比，結果如表 5-5 及圖 5-10，碳、氮、硫及氫元素可提供微生物生長所需能源，百分比總和高者，可能含有較多微生物，碳氮硫氫重量百分比總和由 7.3265%至 9.8735 %，最高者落於 Street2，其次為 Street5。

表 5-6 底泥 CNSH 元素重量百分比

樣本名	Weight (mg)	C %	N %	S %	H %	tTotal CNSH 百分比 (%)
Street1	7.3265	0.7305	0.1610	18.4770	4.0545	23.4230
Street2	9.8735	0.2035	0.0830	0.1540	0.2355	0.6760
Street3	7.8900	1.4520	0.2030	0.3650	0.4625	2.4825
Street4	7.5855	8.5910	0.9810	1.0625	1.5200	12.1545

Street5	9.4760	0.1950	0.0720	0.0510	0.1905	0.5085
平均值	8.4303	2.2344	0.3000	4.0219	1.2926	7.8489
標準差	1.1619	3.5904	0.3846	8.0903	1.6356	9.9401
最小值	7.3265	0.1950	0.0720	0.0510	0.1905	0.5085
最大值	9.8735	8.5910	0.9810	18.4770	4.0545	23.4230

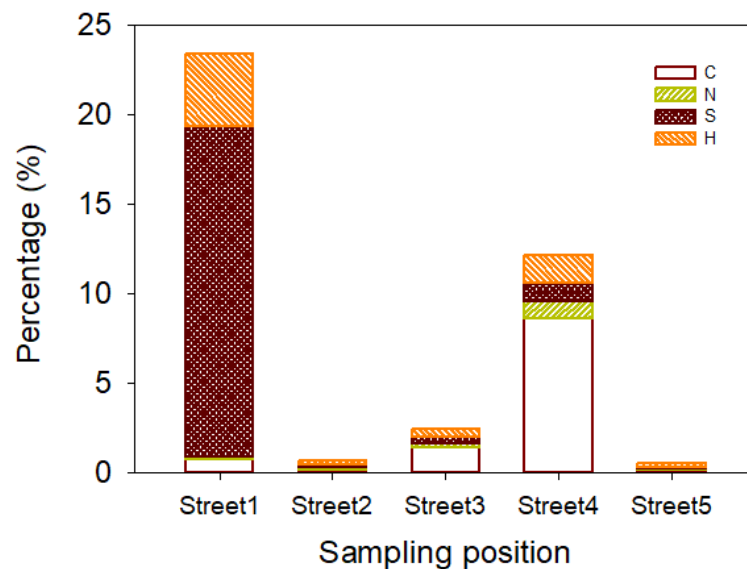


圖 5-10 底泥 CNSH 元素組成

粒徑分布

將採樣底泥以雷射粒徑分析儀分析粒徑，底泥粒徑分布統計如表 5-6。小粒徑比表面積大，提供較多空間予微生物生長，平均粒徑最大者測 Street2，平均粒徑最小者測得 Street5。

表 5-7 底泥粒徑分布表

樣本名	體積累計百分比粒徑 (μm)			平均值(μm)
	<10%	<50%	<90%	
Street1	54.52	204.87	369.74	208.11
Street2	16.69	242.46	435.92	236.37
Street3	3.09	12.57	27.65	14.20
Street4	5.81	21.21	60.88	28.05
Street5	1.70	7.29	23.93	10.44
平均值	16.36	97.68	183.62	99.43
標準差	22.13	115.88	201.98	112.74
最小值	1.70	7.29	23.93	10.44

最大值	54.52	242.46	435.92	236.37
-----	-------	--------	--------	--------

底泥重金屬

底泥經微波消化後以 ICP 儀器測量消化液中重金屬濃度，結果如表 5-7。本計畫分析目標中之鋅、鉛及銅等 10 種重金屬之濃度最高點位，集中於採樣點 Street4，而放流口正下方 Street3 點位為鋁、鐵、硼及銻最高濃度之所在，且多種金屬次高濃度出現之點位。

針對底泥中的銅濃度分析比較，蒐集環保署 2008-2009 年河川整體調查計畫及本計畫前年度 2 次採樣(2017 年 5 月及 10 月)數據分析結果，2008-2009 年結果顯示，下游底泥銅濃度範圍為 485 至 2490 mg/kg，最高濃度測得於許厝港一號橋(同 Street 5 點位)；2017 年本團隊測量結果，下游銅濃度為 138 至 573 mg/kg，最高濃度測得於許厝港一號橋(同 Street 5 點位)。本次分析測得銅濃度範圍為 9.300 至 1002 mg/kg，最高濃度測得於許厝港一號橋上游約 0.5 公里處的 Street 4 點位，工業放流口下游 Street 3 及 Street 4 點位底泥的銅濃度明顯高於上游 Street 1 及 Street 2 點位。惟許厝港一號橋(Street 5)點位銅濃度僅 9.3 mg/kg 較為異常，推測可能因採樣點附近正進行大規模的河川工程施工，使得底泥組成改變，導致銅濃度測值劇烈變化。

表 5-8 底泥重金屬含量(單位：mg/kg)

樣本名	銀 (Ag)	鎘 (Cd)	鈷 (Co)	鉻 (Cr)	鋁 (Al)	銦 (Sr)	錳 (Mn)	鐵 (Fe)
Street1	ND	ND	71.4	78.6	2.89E+04	11.9	134.5	2.13E+04
Street2	ND	ND	59.9	70.0	2.31E+04	16.7	139.7	1.74E+04
Street3	ND	ND	119.0	247.2	5.47E+04	33.4	551.4	3.9E+04
Street4	ND	ND	140.0	415.4	5.23E+04	57.1	574.8	3.17E+04
Street5	ND	ND	76.6	78.5	3.13E+04	14.6	142.6	1.75E+04
平均數	-	-	93.4	177.9	3.81E+04	26.7	308.6	2.54E+04
標準差	-	-	30.7	136.1	1.29E+04	16.9	207.9	8.55E+03
最小值	ND	ND	59.9	70.0	2.31E+04	11.9	134.5	1.74E+04
最大值	ND	ND	140.0	415.4	5.47E+04	57.1	574.8	3.89E+04
上限值		2.49		233				
下限值		0.65		76.0				

註：標有 ND 值者為消化液測得之金屬濃度小於 0.01 mg/L；測值加底框者為個別金屬最高濃度出現點位；底泥重金屬項目銀(Ag)與鎘(Cd)之 MDL 分別為 20.1 mg/kg 與 44.8 mg/kg。

續表 5-8 底泥重金屬含量(單位：mg/kg)

樣本名	硼(B)	鋇(Ba)	銅(Cu)	鎳(Ga)	銦(In)	鉛(Pd)	鋅(Zn)
Street1	183.6	128.0	83.1	362.5	259.6	<u>240.4</u>	114.4
Street2	167.5	112.8	47.3	365.1	145.9	<u>207.9</u>	35.8
Street3	<u>193.7</u>	249.4	<u>326.9</u>	366.2	<u>282.3</u>	<u>225.2</u>	<u>699.5</u>
Street4	183.5	<u>299.0</u>	<u>1002.0</u>	<u>386.5</u>	250.6	<u>291.8</u>	<u>823.7</u>
Street5	148.2	128.2	9.3	352.5	240.6	<u>192.9</u>	281.2
平均數	175.3	183.5	293.7	366.6	235.8	308.6	390.9
標準差	15.9	75.9	371.2	11.1	47.0	34.0	315.3
最小值	148.2	112.8	9.3	352.5	145.9	192.9	35.8
最大值	183.6	249.4	1002.0	386.5	282.3	291.8	823.7
上限值			2157			1161	1384
下限值			50.0			248.0	2140

註：標有 ND 值者為消化液測得之金屬濃度小於 0.01 mg/L；測值加底框者為個別金屬最高濃度出現點位。

5.2 純菌暴露硫酸銅批次實驗

5.2.1 批次實驗生長曲線

圖 5-11 為測定 OD 值 600 之結果，從此測定出的生長曲線可以得知此菌屬之 mid-log phase 約在 20 到 40 小時之間，故之後萃取 RNA 將在培養至約 22 小時後進行。另外從生長曲線中可以看出，銅濃度劑量添加至 100 ppm 的培養液其 OD 值不論何時測幾乎皆為 0，表示銅濃度過高使得 *Methylobacterium aquaticum* 無法在培養液中生長。而銅濃度 50 ppm 的培養液也和空白組曲線上有落差代表硫酸銅對其生長造成影響。至於添加劑量 3 ppm 及 10 ppm 的實驗組則和空白組在生長曲線上無明顯的差異。以此生長曲線結果為基準，後續對空白組、3 ppm、10 ppm 及 50 ppm 這四組進行 RNA 萃取。

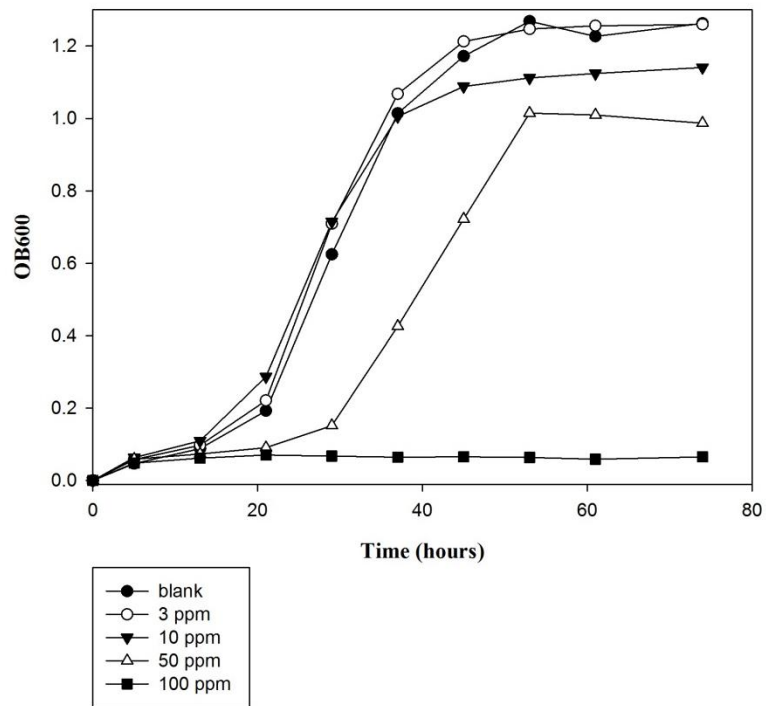


圖 5-11 純菌暴露硫酸銅批次實驗生長曲線測定結果

5.2.2 RNA 抽取品質分析

將抽取出的 RNA 利用 Agilent RNA 6000 Nano kit 以微流體電泳分析儀 (Bioanalyzer2100) 進行分析之後，發現四組細菌 RNA 的樣本完整度高，適合進行後續的定序作業(圖 5-12)。

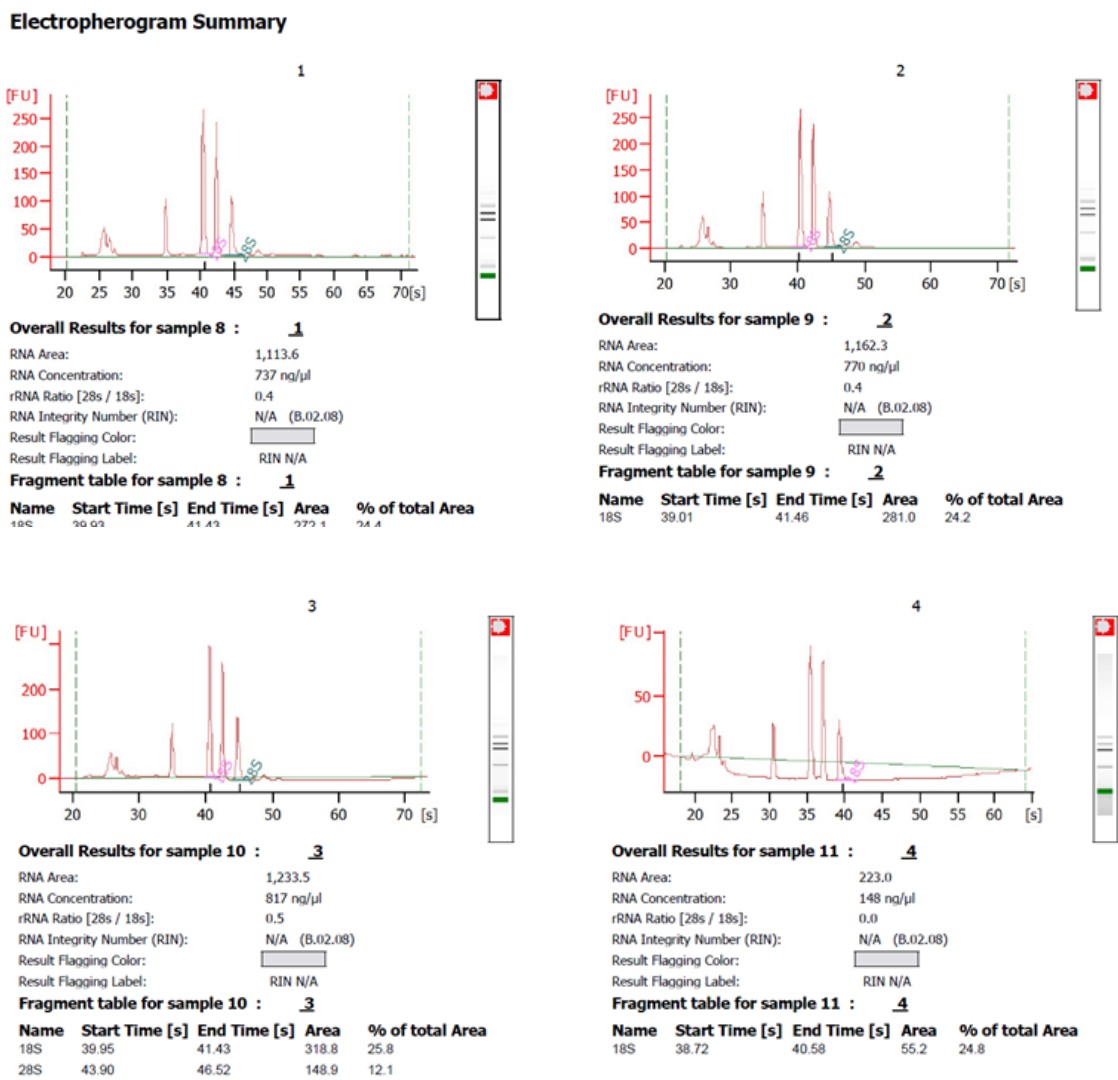


圖 5-12 純菌暴露硫酸銅批次實驗萃取 RNA 微流體電泳分析儀結果

5.3 河川底泥基因體分析

5.3.1 河川底泥菌群分析

定序結果基本資料

次世代定序結果在獲得質量過濾(quality-filtering)和非嵌合(non-chimera)數據時，使用 mothur (Schloss et al.,2009)將每個 OTU 分配給可能的分類類別。OTU 是指操作分類單元(Operational Taxonomic Unit)，是將序列相近之序列(如>98%相似度)歸類為一個 OTU 的一種菌種分類方式，被習慣用於微生物物鑑定之分類。在這裡使用 SILVA 1322-5 OTU 集合，Ref NR 99 進行細菌 OTU 分類學分配。street1 至 street5 這五個現地樣品中，所定序出的 OTU 數量在 street1 樣品約有 14000 個(圖 5-13)，而 street2 至 street4 樣品則約有 10000 個，到了 street5 樣品則下降到 7000 個。樣品族群中的 OTUs 有一些程度的重疊性同時出現在兩種以上的樣品族群(圖 5-14)，有 185 種 OTUs 皆於五個樣品中被定序出。

理想情況下，相同操作分類單位 (OTU) 中的序列來自同一組，稱為假設分類單位。接著藉由使用來自 SILVA 數據庫 (SILVA 版本 132) 的代表性序列，QIIME 能夠在分類學上對 OTU 進行分類。並使用 KRONA v2.7(Ondov et al.,2011)直觀地顯示物種註釋的分析結果。**Street 1~5 樣品分別表示老街溪採樣點 1 至 5，以下所有圖表標示皆然。**street1 樣品中註釋出的 OTUs 中 97%皆為 bacteria，只有 3%為 archaea(圖 5-15)；而 street2 樣品中註釋出的 OTUs 中 99%皆為 bacteria，只有 1%為 archaea(圖 5-16)；street3 樣品中註釋出的 OTUs 中 97%皆為 bacteria，只有 3%為 archaea；而 street4 及 street5 樣品 archaea 所註釋出 OTUs 比例更少，分別只有 0.8%及 0.2%(圖 5-17、圖 5-18)。

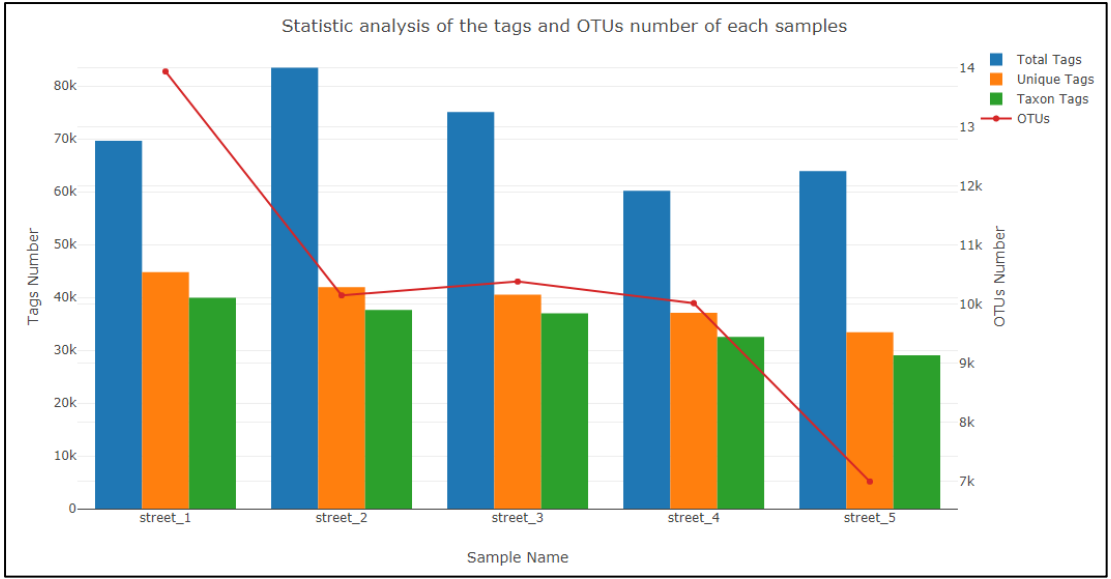


圖 5-13 現地樣品中 tags 及 OTU 數量圖
Street 1~5 樣品分別表示老街溪採樣點 1 至 5，以下所有圖表標示皆然。

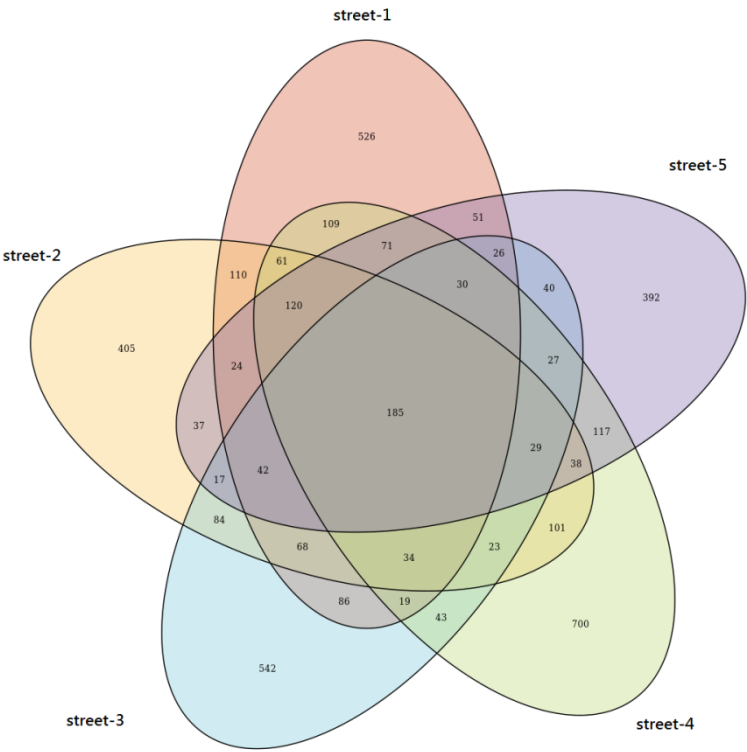


圖 5-14 OTU 分佈維恩圖

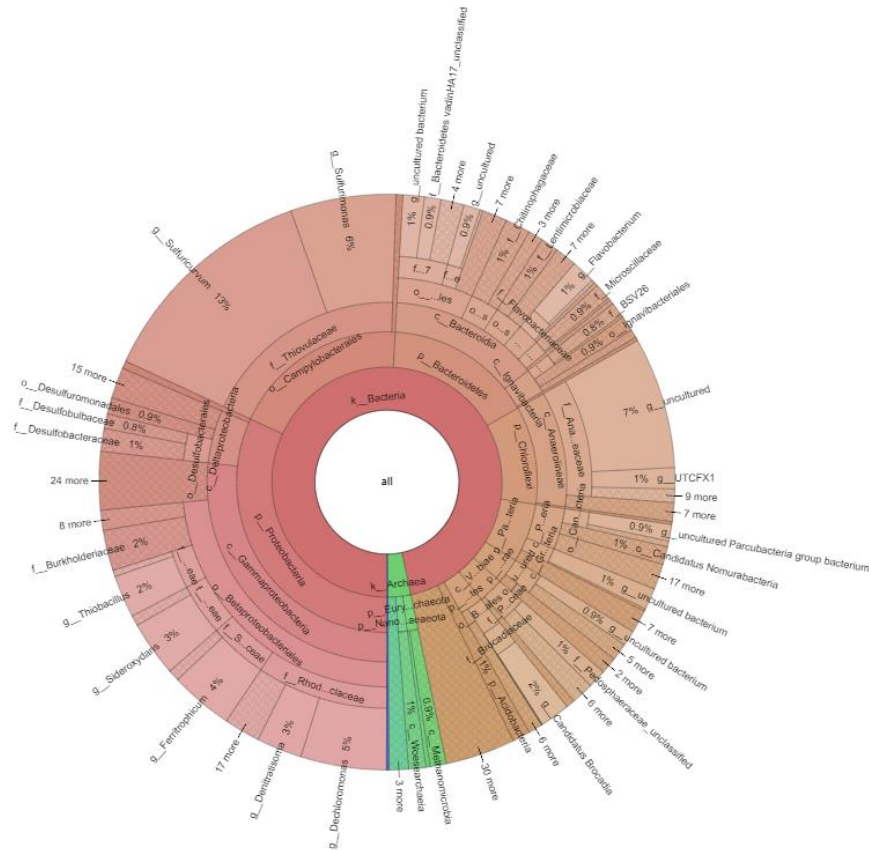


圖 5-15 street1 樣品物種註釋階層比例圖

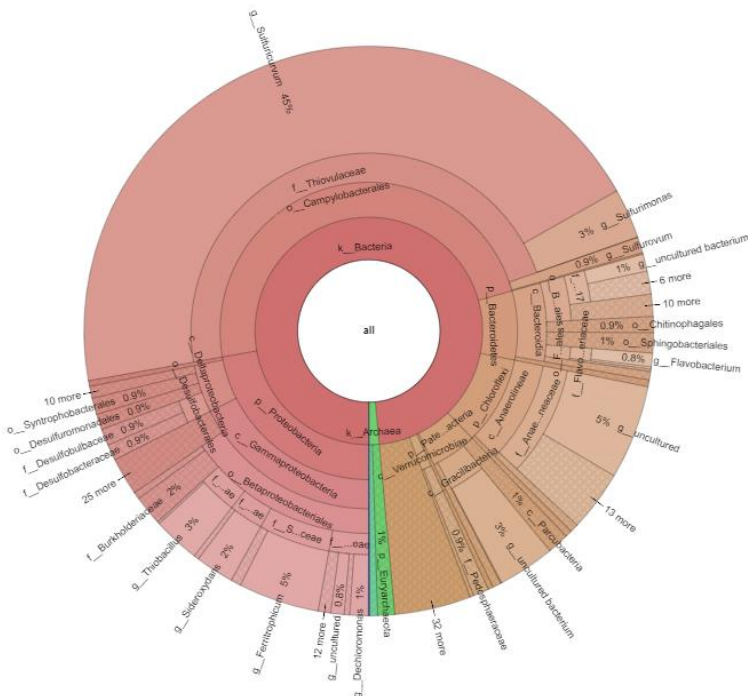


圖 5-16 street2 樣品物種註釋階層比例圖

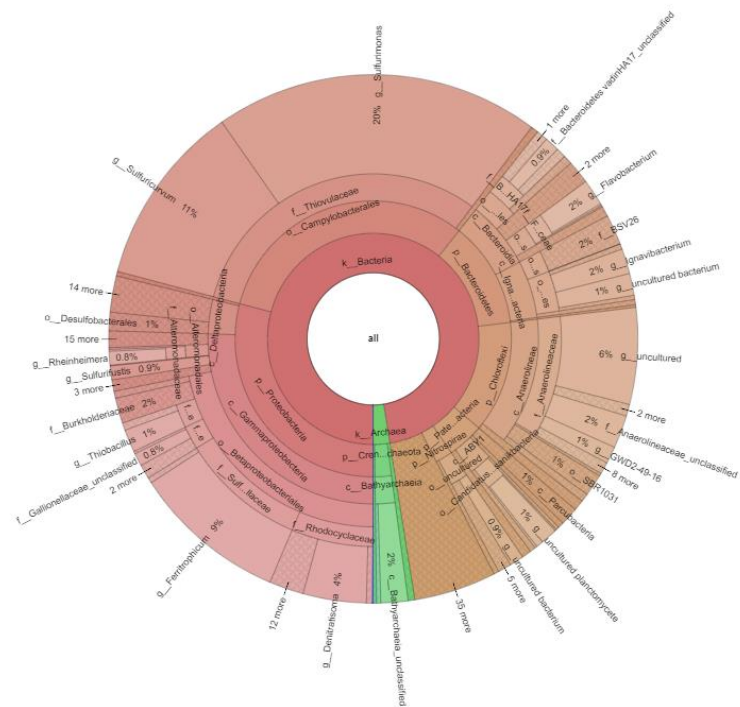


圖 5-17 street3 樣品物種註釋階層比例圖

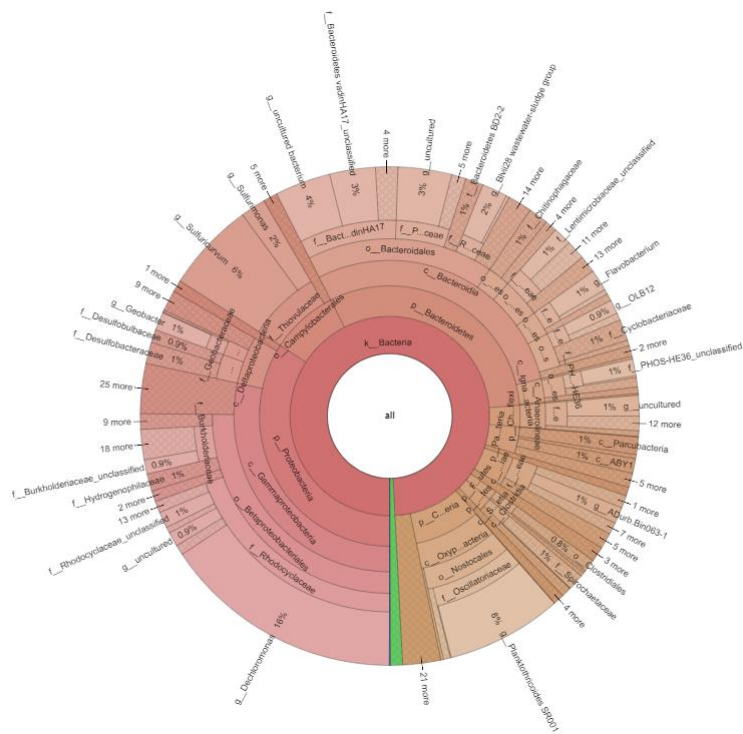


圖 5-18 street4 樣品物種註釋階層比例圖

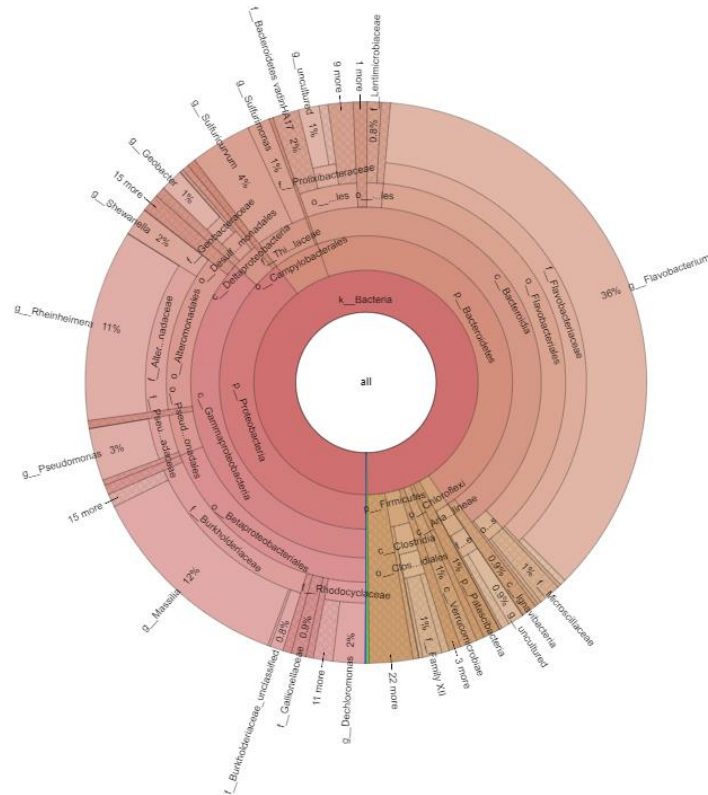


圖 5-19 street5 樣品物種註釋階層比例圖

現地樣本微生物族群分析

經次世代定序得到各現地底泥樣品的 OTUs 表，將各別 OTUs 之代表序列進行菌種鑑定，並以 excel 統計各樣品中所含之菌門(phylum)之 OTUs 數量，在取總和為 100%，最後得到各樣品中微生物族群組成。現地樣品的菌門(family)組成比例如圖 5-20 所示，各現地底泥樣品未辨別出的菌屬(unidentified)約占 9%至 25 % 之間。而 street3 樣本採樣點為選定放流口前之底泥，street1 及 street2 樣本採樣點在選定放流口上游，而 street4 及 street5 樣本採樣點則在選定放流口下游。從各樣品的菌門組成比例圖來看，放流口下游 street4 的底泥微生物組成和 street1 至 street3 的組成有所差異，而 street5 的微生物組成則是和其上游四採樣點的微生物組成有明顯的不同。

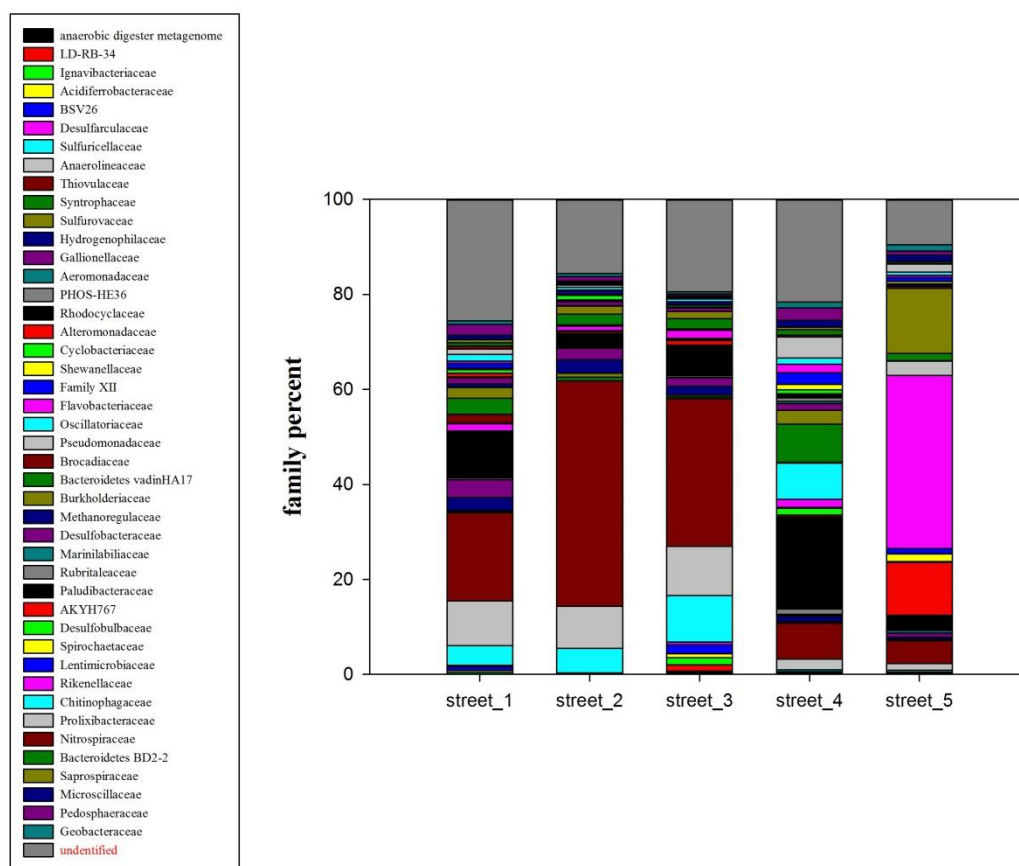


圖 5-20 現地底泥定序結果菌門(family)組成比例圖

其後以各個採樣點所辨別出的菌門比例對各個採樣點進行了 UPGMA 集群分析(圖 5-21)，當採樣點被歸類在同一組時表示其微生物組成越接近，不同組之間其距離越遠(Height 值越高)，即表示微生物組成形態相似度越低。從分析結果來看，street2 及 street3 的微生物組成最為接近，而最上游採樣點 street1 與 street2、street3 雖接近但為不同組可能和現場觀測到：除了 street1 外，其餘 4 點附近皆有觀察到老街溪沿岸設有民生或工業污水排放口有所關係。而下游兩採樣點則和 street1 至 street3 組別之 Height 值有一定落差，表示 street4 及 street5 採樣點底泥微生物組成和上游及選定放流口差異甚大。

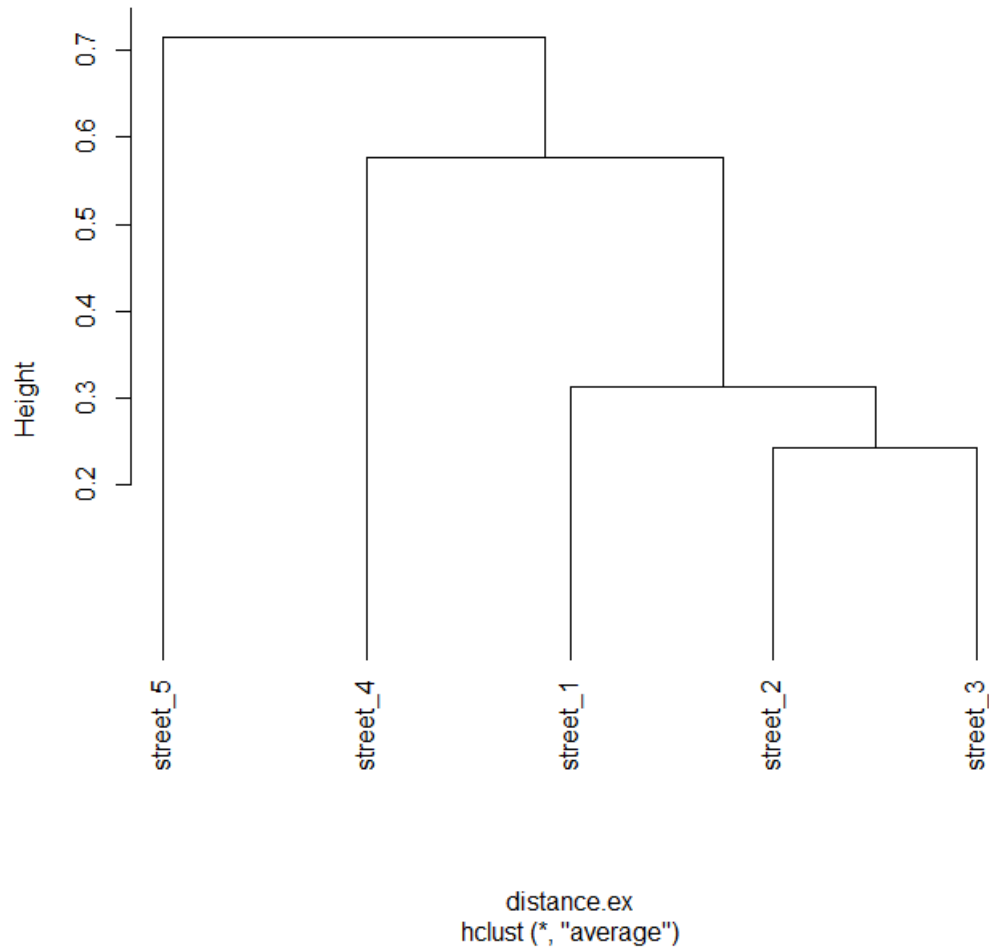


圖 5-21 採樣點 UPGMA 集群分析圖

接著同樣以各個採樣點所辨別出的菌門比例對各個採樣點進行 PCoA 主座標分析，PCoA (principal coordinates analysis) 是一種研究資料相似性或差異性的視覺化方法，通過一系列的特徵值和特徵向量進行排序後，選擇主要排在前幾位的特徵值，沒有改變樣品點之間的相互位置關係，找到距離矩陣中最主要的座標。通過 PCoA 可以觀察個體或群體間的差異。其結果和 UPGMA 相似(圖 5-22)，street2 及 street3 採樣點的底泥微生物組成最為接近，而 street1 與這兩組較為接近，而下游兩採樣點和這三組距離較遠表示放流口下游的底泥菌群組成相較於上游及放流口有不小的差異在。

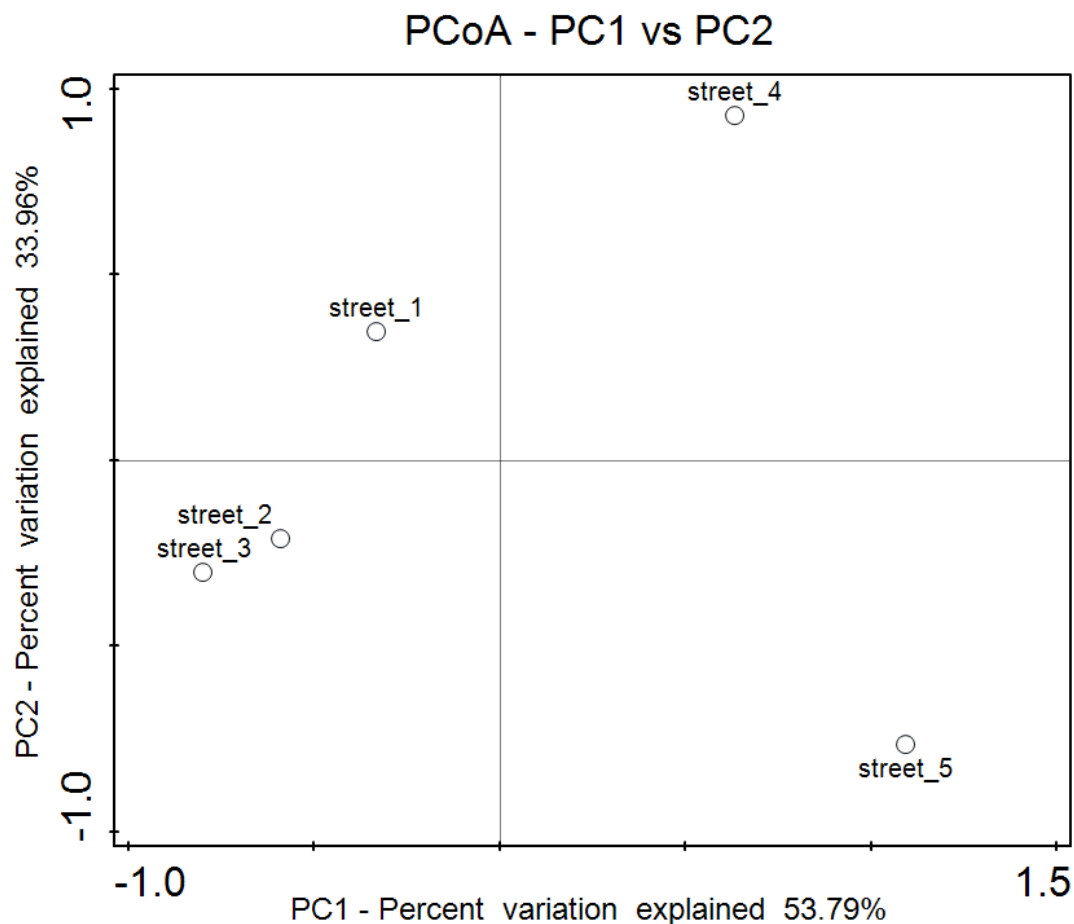


圖 5-22 採樣點 PCoA 主座標分析圖

圖 5-23 為各個採樣點所辨別出的菌門之熱圖(heat map)，熱圖分析結果顯示出下游 street4 採樣點及 street5 採樣點分別有不少菌門異於其他採樣點有明顯增加的趨勢在，而此下游兩個採樣點皆有明顯增加趨勢在的菌門有兩個，分別為 Microscillaceae 及 Geobacteraceae。而在受到工業區放流口(street 3)影響趨勢較高的菌門則為 Hydrogenophilaceae 及 Gallionellaceae。此中，Hydrogenophilaceae 菌門與第一年結果相符，在工業區放流口後豐度迅速減少，未來可能成為主要辨識菌群。

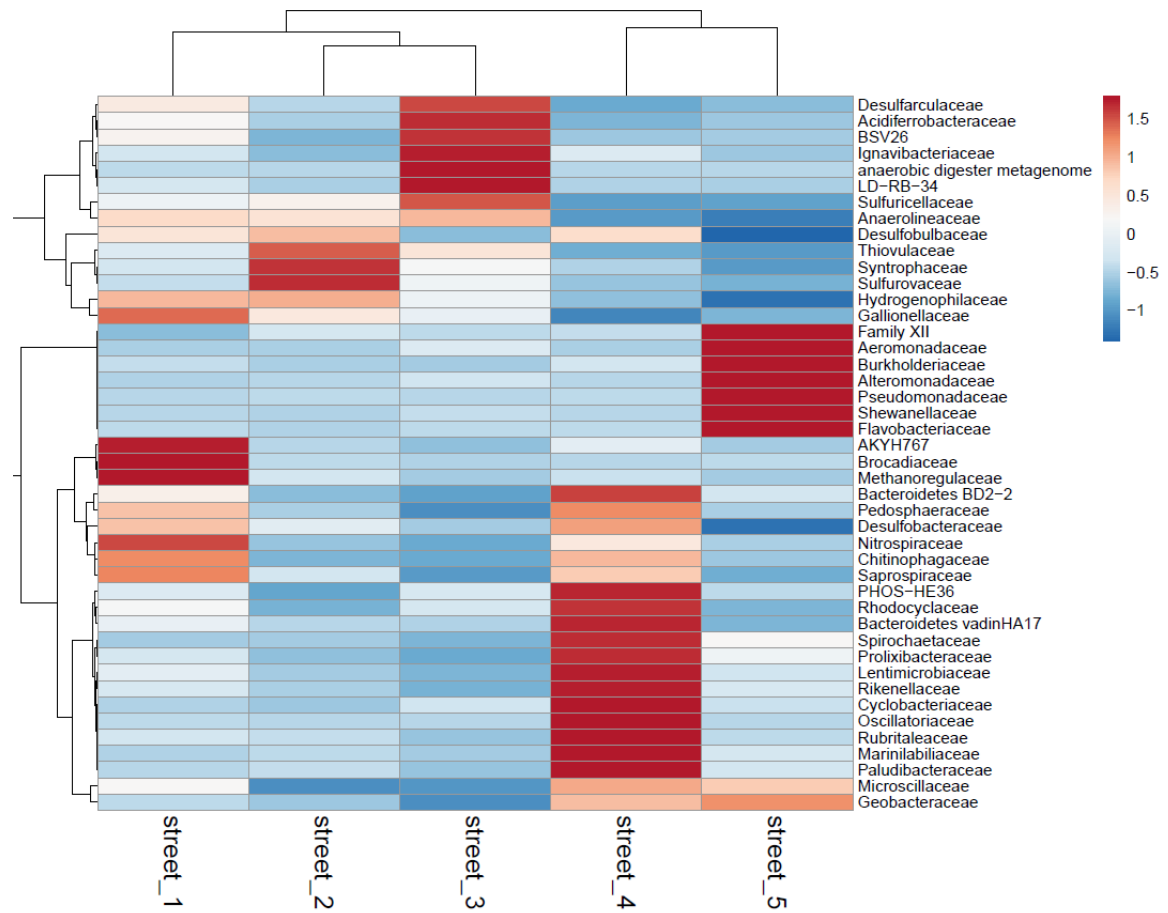


圖 5-23 採樣點底泥菌門組成熱圖

5.3.2 PICRUSt 微生物功能性基因表現評估分析

利用次世代定序得到的菌群組成，根據 PICRUSt 評估老街溪包含選定放流口上游至下游五個採樣點其整體代謝功能相關基因數量的差異性，PICRUSt 預估的表現基因及豐度列於附錄三。圖 5-24 顯示基因表量豐度占總基因豐度 0.1% 以上的基因種類數目，可見大部分在現地的基因為與生理代謝相關。

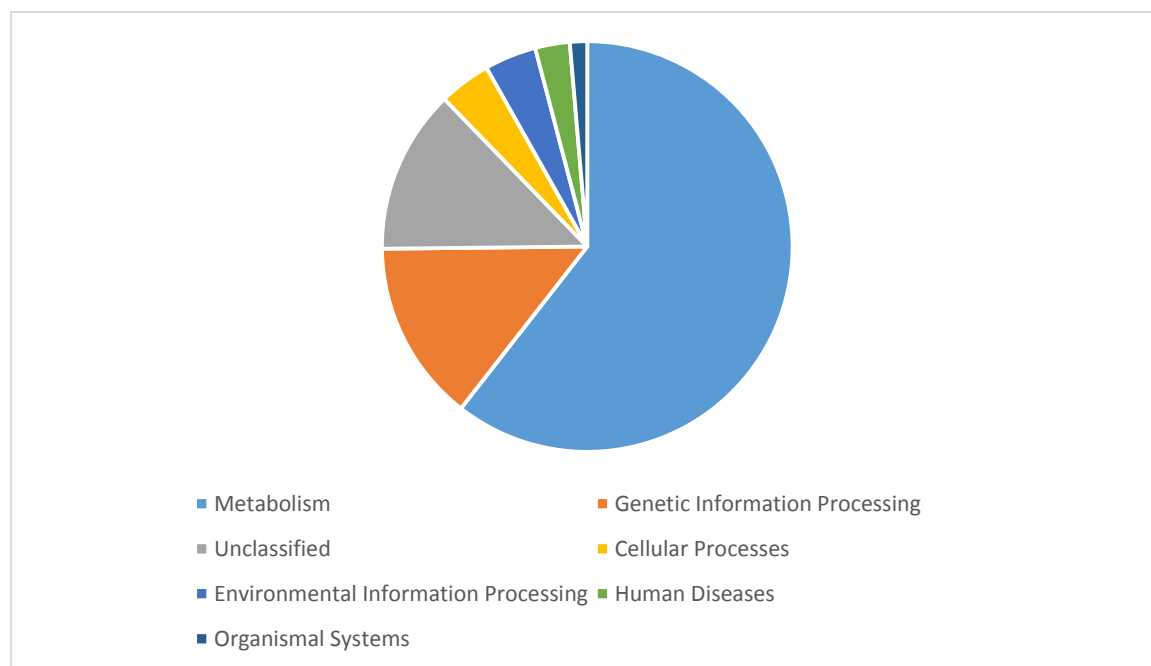


圖 5-24 利用 PICRUSt 評估底泥不同功能的基因種類數量

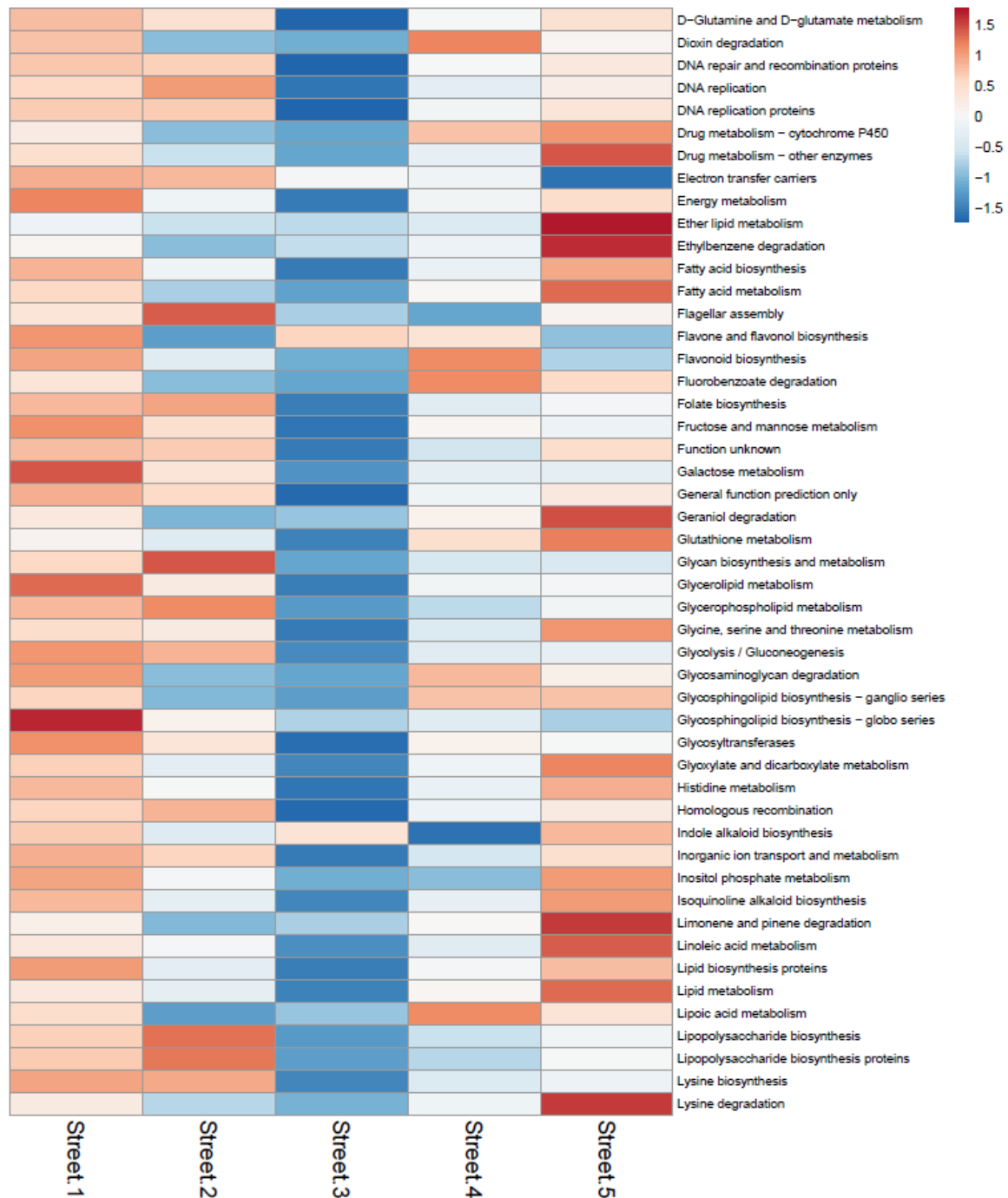
將各種基因之豐度利用熱圖(heat map)分析了 PICRUSt 得到的預測基因功能豐度(圖 5-25 a-d)，從熱圖的分析結果發現整體代謝功能來說，最上游的 street1 採樣點其預測代謝相關基因豐度在五個樣品中偏高，可能是由於其採樣點附近皆沒有民生或工業污水排放口的關係。而與之相反選定放流口採樣點 street3 的基因預測代謝相關基因豐度在五個樣品中整體偏低。

之後根據整體預測基因功能豐度熱圖結果找出了上游採樣兩點至下游採樣三點(包含選定放流口採樣點在內)，豐度呈現下降趨勢的預測基因功能，共有 44 種預測基因功能其相關基因數量隨著上游至下游有降低的趨勢。而這 44 種預測基因功能熱圖如圖 5-26 所示。而之後以 street1 為基準，對這 44 種預測基因功能在各個採樣點其相關基因數量以趨勢圖進行分析，並且根據其預測基因功能進行分類，共分類出細胞生化反應(Cellular Processes)、遺傳信息處理(Genetic

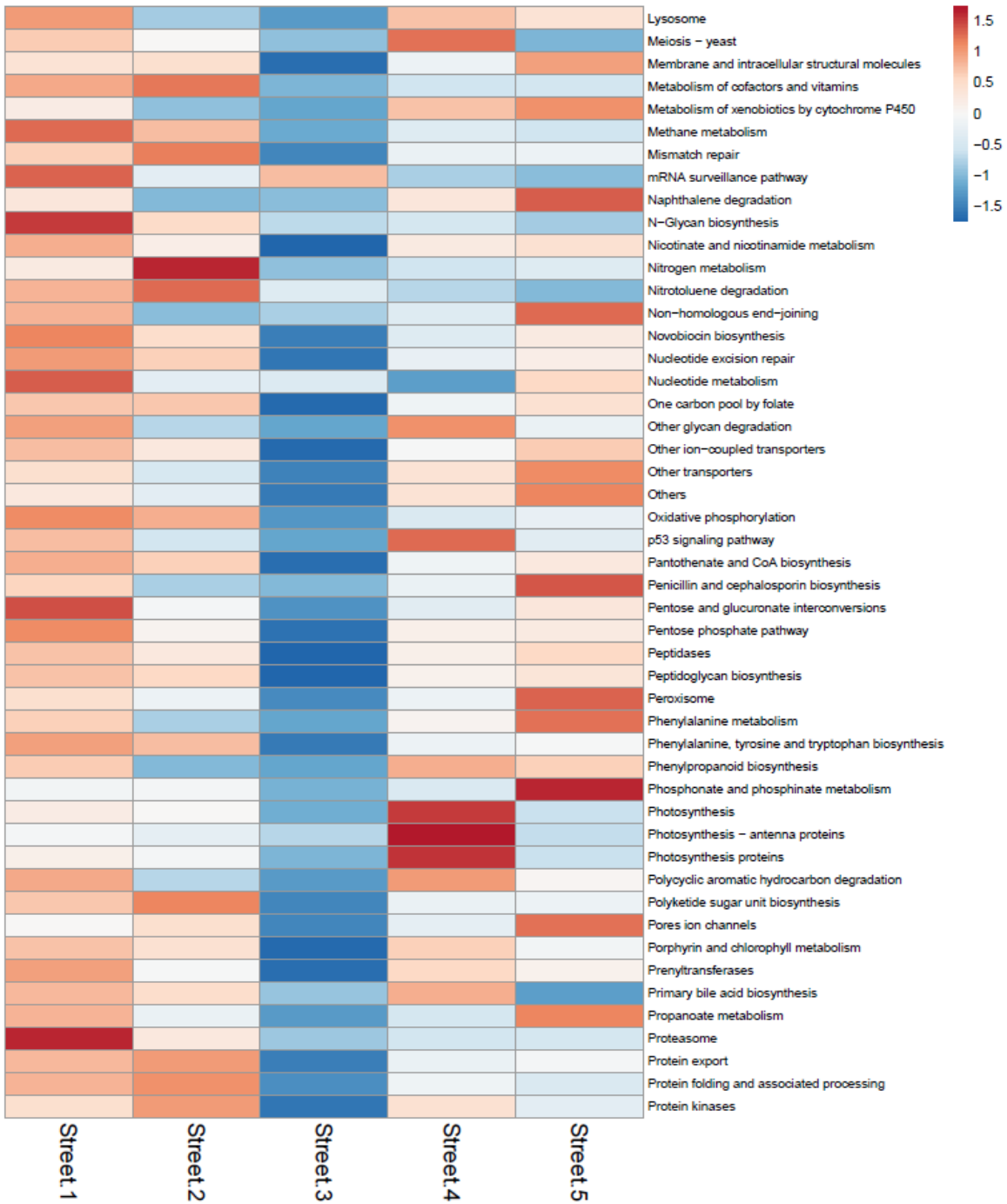
Information Processing) 及代謝(Metabolism)這三種 (圖 5-27 至 5-29), 從趨勢變化來看上游至下游相關基因數量呈現下降的趨勢, 其中這 44 種預測基因功能大半部分皆和代謝功能有關係, 次要則屬於細胞生化反應及遺傳信息處理, 這些預測基因功能表現的相關基因數量之變化表示排放口的汙染排放可能會主要導致底泥微生物族群的代謝變化、影響微生物細胞生長甚至導致遺傳表現的變化。



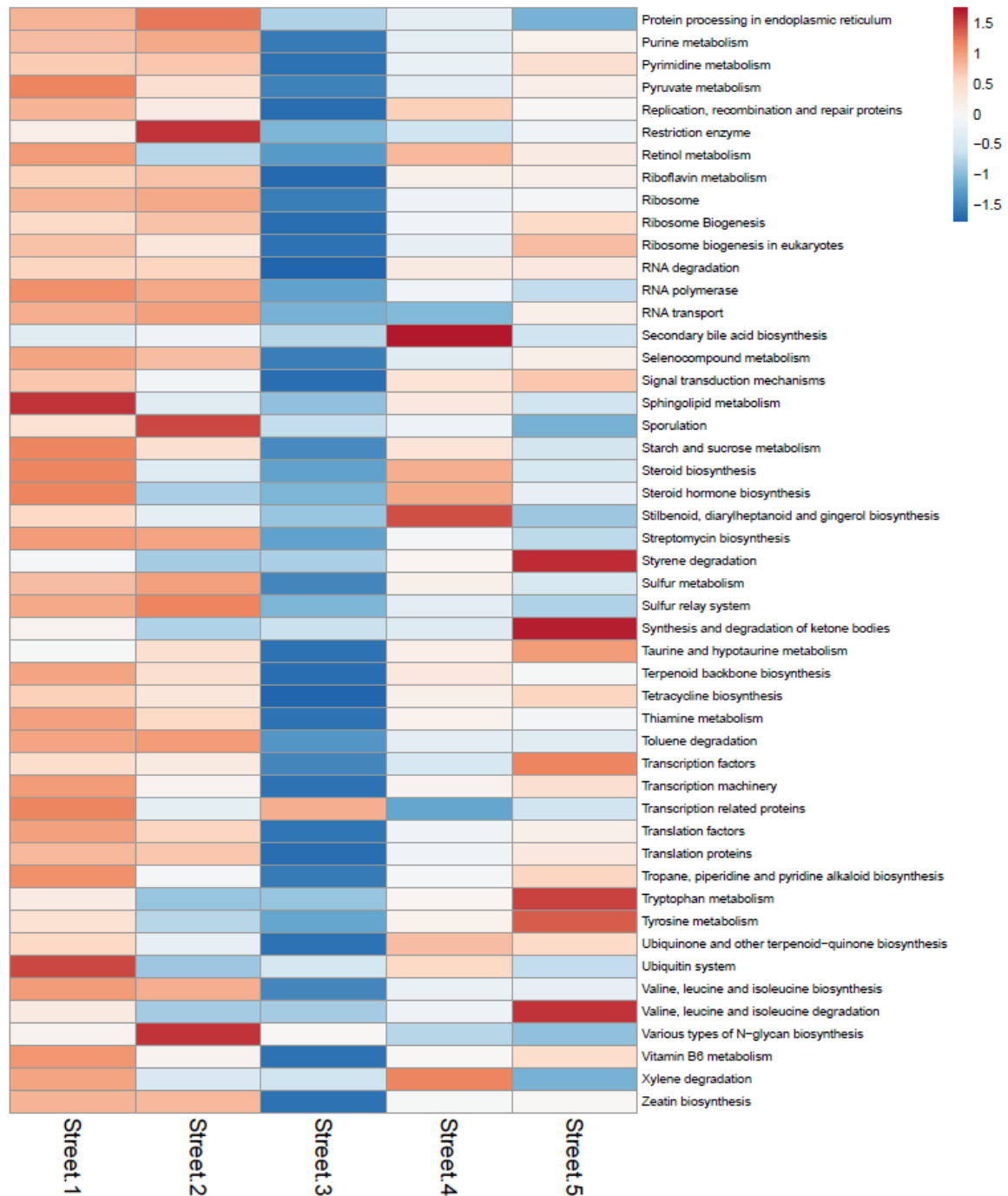
a. PICRUSt 預測基因功能豐度熱圖(1/4)



b. PICRUST 預測基因功能豐度熱圖(2/4)



c. PICRUSt 預測基因功能豐度熱圖(3/4)



d. PICRUSt 預測基因功能豐度熱圖(4/4)
圖 5-25 PICRUSt 預測基因功能豐度熱圖(a-d)

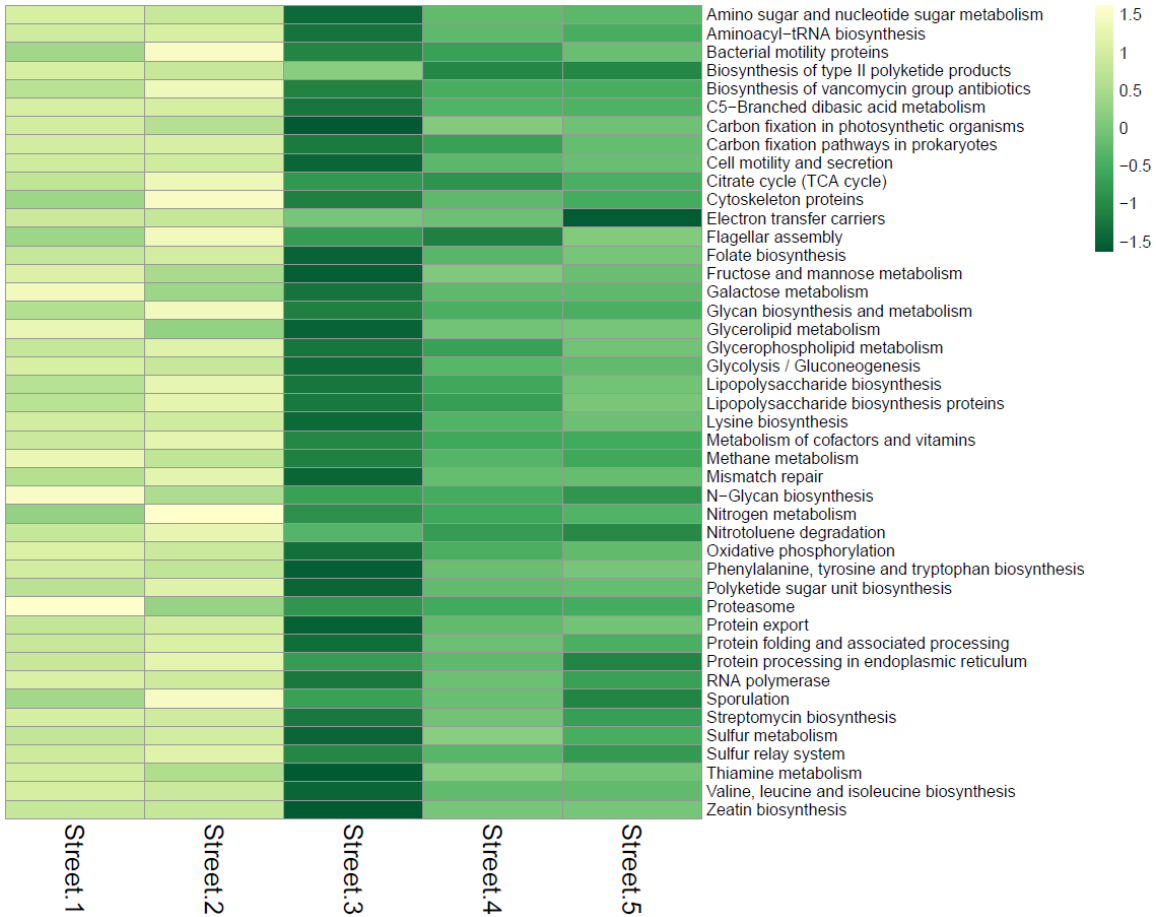


圖 5-26 選定 44 種預測基因功能豐度熱圖

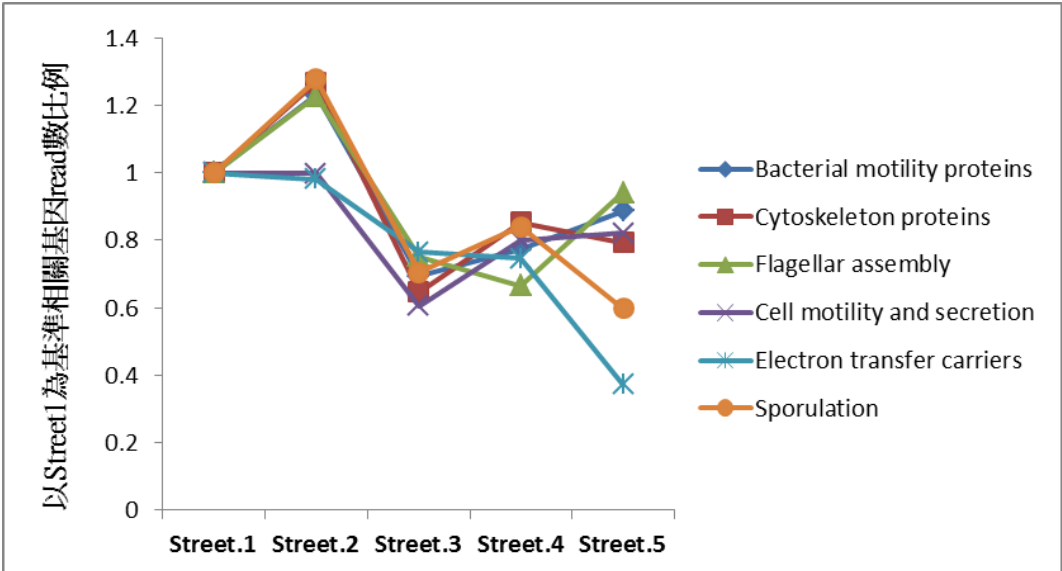


圖 5-27 street1 為基準選定與細胞生化反應(Cellular Processes)預測基因功能相關基因數量趨勢圖

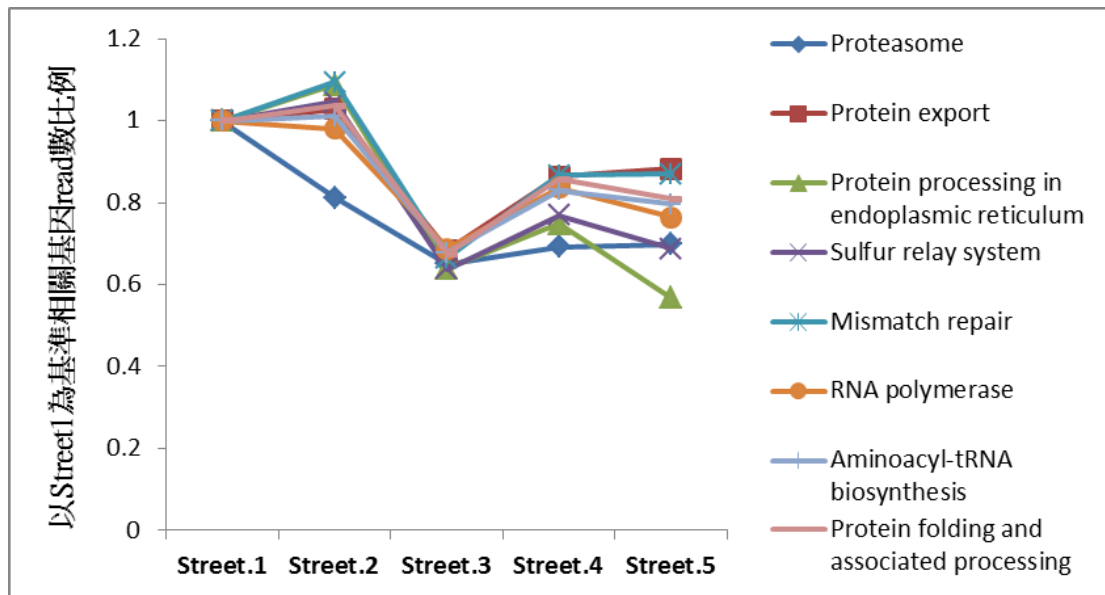


圖 5-28 street1 為基準選定與遺傳信息處理(Genetic Information Processing)預測基因功能相關基因數量趨勢圖

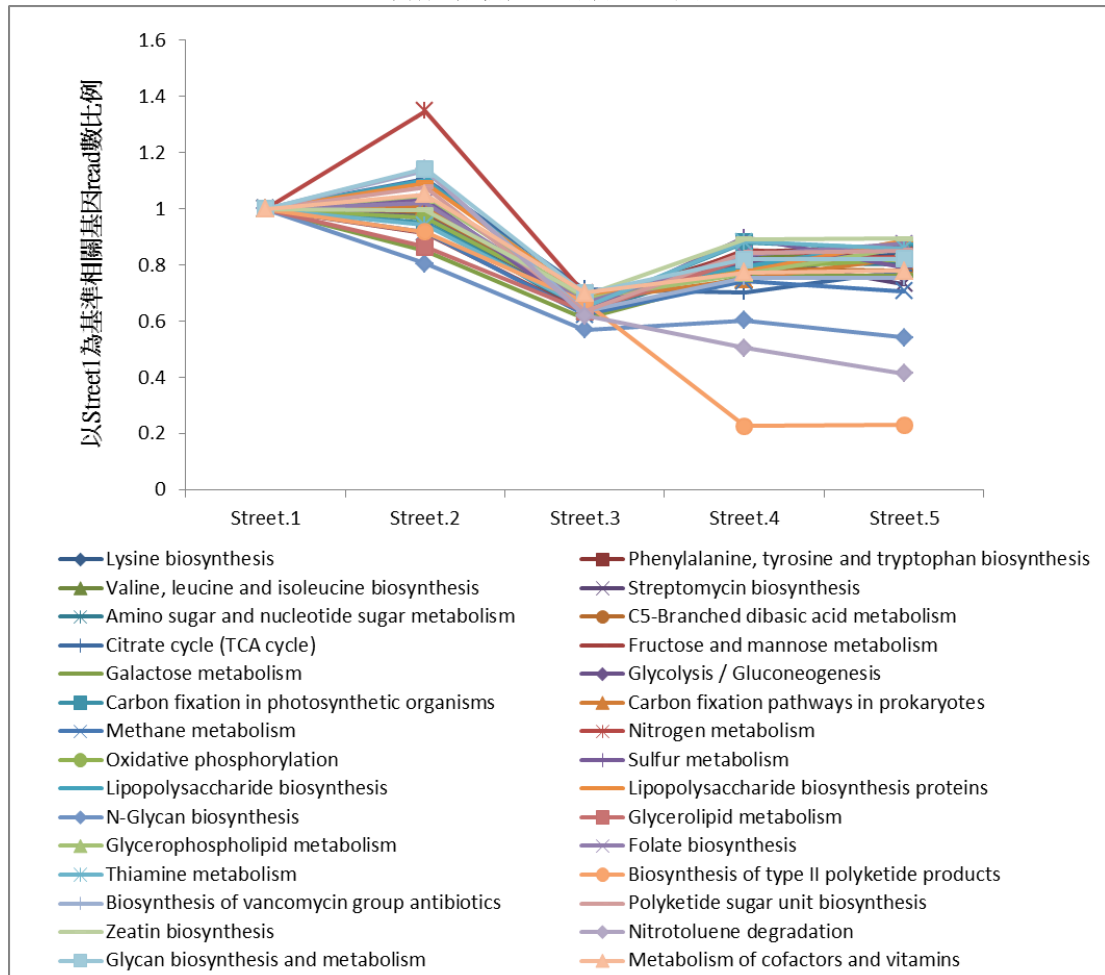


圖 5-29 street1 為基準選定與代謝(Metabolism)預測基因功能相關基因數量趨勢圖

5.3.3 放流口對底泥 PICRUSt 微生物預測基因表現影響

上一節以熱圖分析整體 PICRUSt 預測代謝功能相關基因數量的差異性時，發

現 street1 樣本其預測代謝相關基因豐度在五個樣品中偏高，而與之相反選定放流口採樣點 street3 的基因預測代謝相關基因豐度在五個樣品中整體較低。這可能是由於 street1 採樣點在最上游較不受汙染而 street3 採樣點在放流口的關係。因此再針對 street1 和 street3 採樣點預測代謝功能相關基因進行進一步分析，計算 street1 和 street3 預測基因功能相關基因數量的差異。計算結果其中有 20 種預測基因功能 street1 上游和 street3 放流口的相關基因數量差了 50% 以上，這 20 種的預測基因熱圖如圖 5-30 所示，而以 street1 為基準，對這 20 種預測基因功能在各個採樣點其相關基因數量趨勢圖如圖 5-31 所示。此 20 種預測基因功能相關基因數量從上游採樣點 street1 至放流口採樣點 street3 大幅下降，然而在更下游的採樣點 street4 及 street5 則沒有明顯的趨勢。

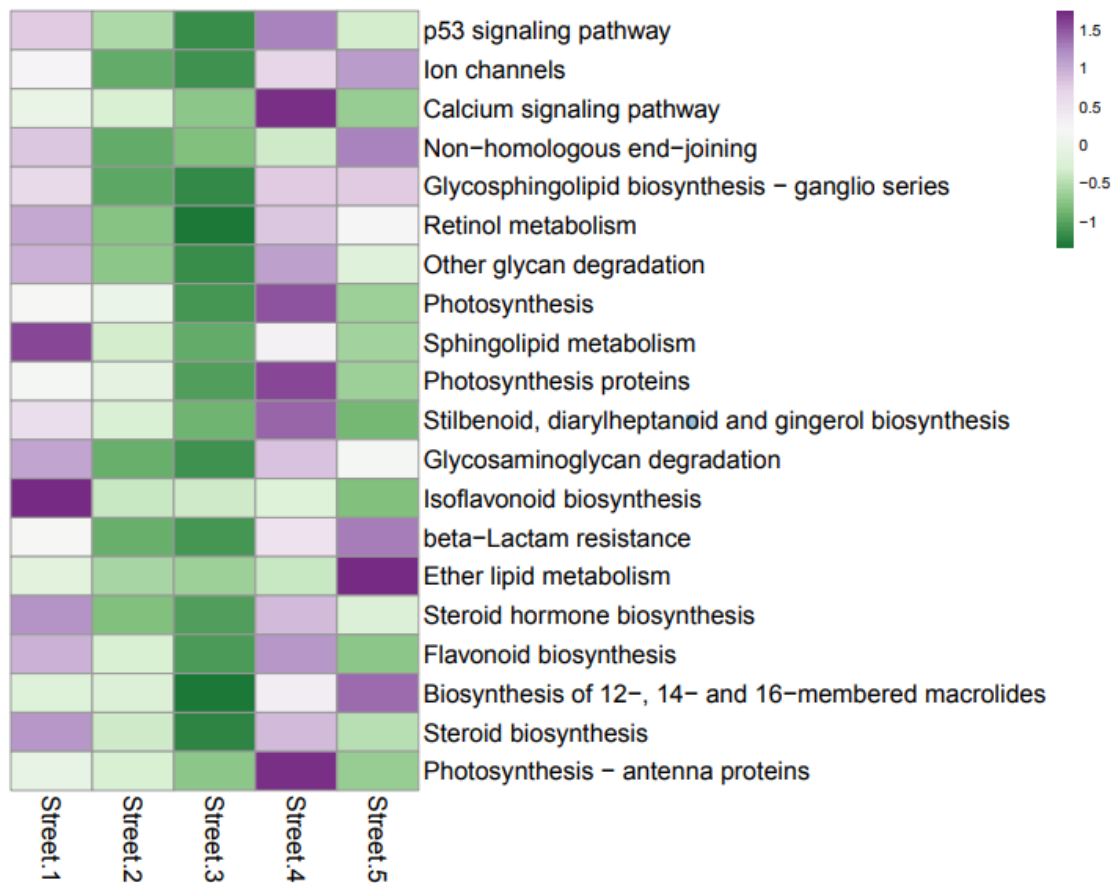


圖 5-30 選定 20 種預測基因功能豐度熱圖

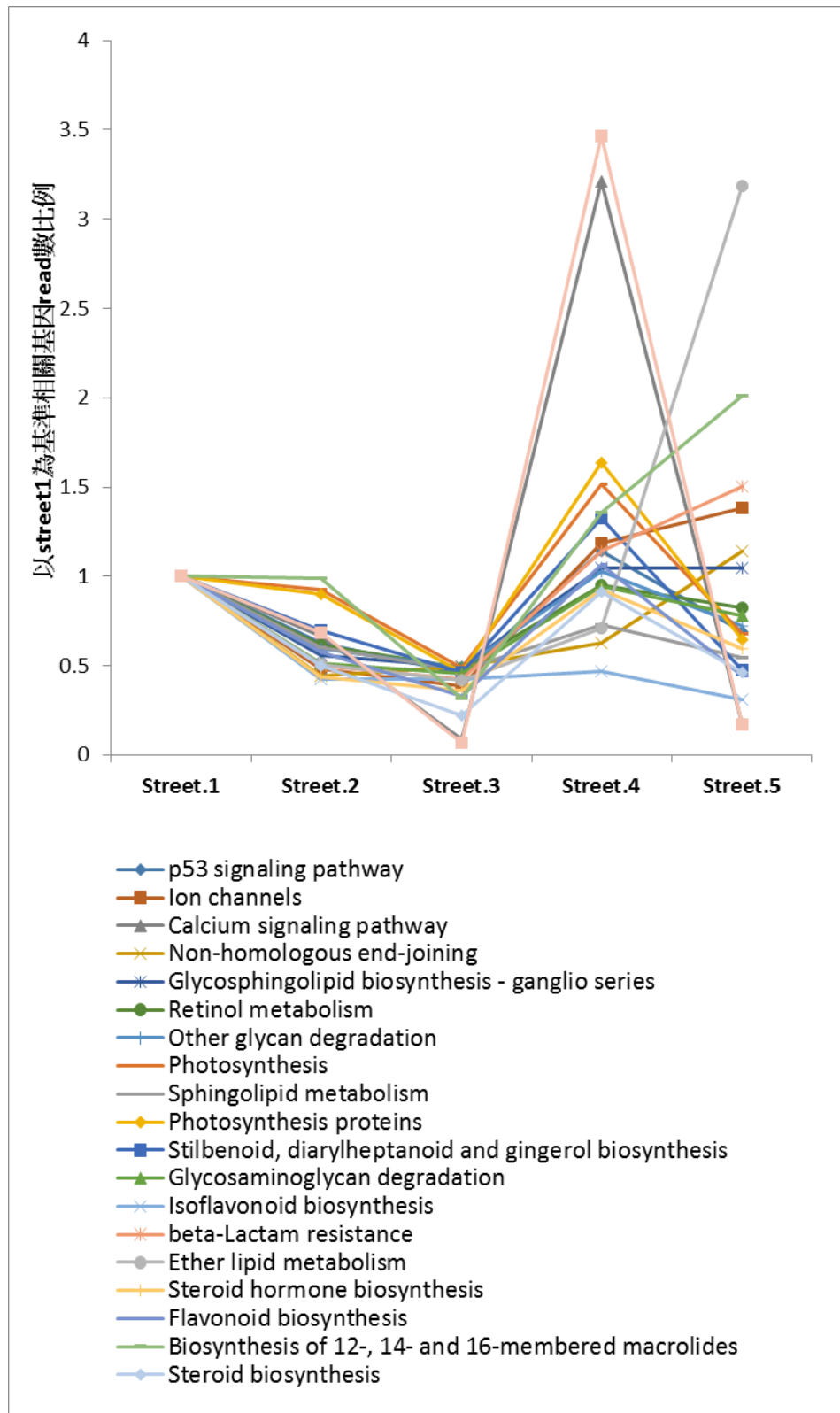
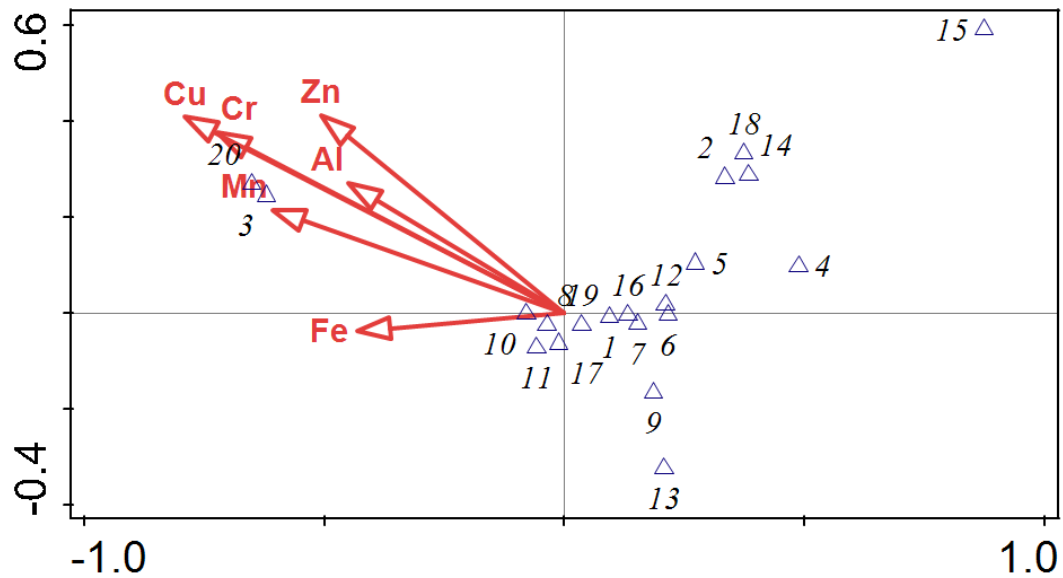


圖 5-31 street1 為基準選定 20 種預測基因功能相關基因數量趨勢圖

由此篩選出之 20 種受放流口影響較巨之基因在底泥中之豐度，與採樣點之重金屬濃度相關性分析於圖 5-32 顯示。由圖可知編號 3 與 20 分別為 Calcium signal

pathway 與 Photosynthesis - antenna proteins 對於銅、鉻、錳的濃度相關性非常高。
這兩種的功能基因可能可作為未來篩選的標的基因。



編碼	基因
1	p53 signaling pathway
2	Ion channels
3	Calcium signaling pathway
4	Non-homologous end-joining
5	Glycosphingolipid biosynthesis - ganglio series
6	Retinol metabolism
7	Other glycan degradation
8	Photosynthesis
9	Sphingolipid metabolism
10	Photosynthesis proteins
11	Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis
12	Glycosaminoglycan degradation
13	Isoflavonoid biosynthesis
14	beta-Lactam resistance
15	Ether lipid metabolism
16	Steroid hormone biosynthesis
17	Flavonoid biosynthesis
18	Biosynthesis of 12-, 14- and 16-membered macrolides
19	Steroid biosynthesis
20	Photosynthesis - antenna proteins

圖 5-32 篩選出 20 種底泥基因與重金屬濃度之關聯性分析

5.3.4 Shotgun metagenomics 總體基因學分析結果

細菌總 DNA 抽取結果

抽出的細菌總 DNA 後，利用瓊脂糖凝膠電泳確認所抽出的細菌 DNA 完整度，經檢視電泳結果發現五組細菌總 DNA 完整度高，降解程度低，其片段大小大於 10Kb 以上，可進行後續定序分析(圖 5-33)。

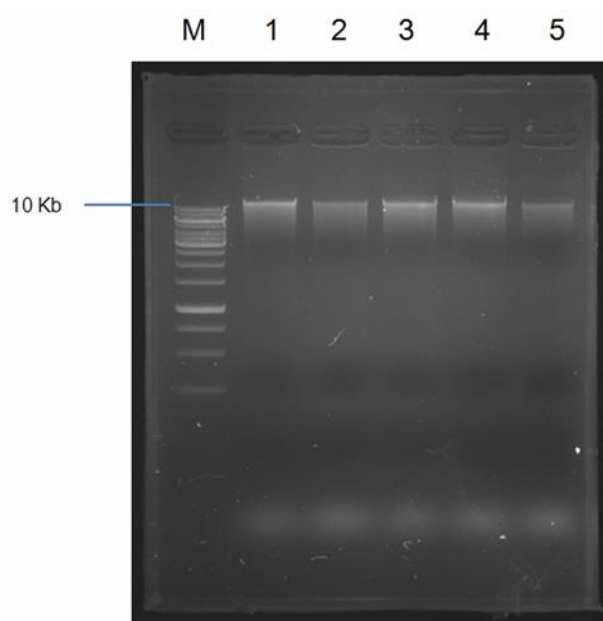


圖 5-33 細菌總 DNA 電泳結果圖

總基因體學分析結果

本實驗共五個樣本，從上游至下游為之 street1~ street5。以 street1 為例，以 Trimmomatic 修剪前的 Read 1 和 Read 2 各有 15,253,067 條序列，修剪後各剩下 9,251,746 條 (60.65%)，GC 比皆為 58% (圖 5-34)，從圖可看出序列尾端 (120 bp~150 bp) 的品質分數於修剪後顯著提升。圖 5-35 為演化樹圖，演化樹由內往外為界 (kingdom)、門 (phylum)、綱 (class)、目 (order)、科 (family)、屬 (genus)、種 (species)，部分種之下還有分不同的 assembly accession。演化樹中不同顏色的色塊代表不同綱 (class)，對應到左側的圓形註解。最外圍的英文註解為科 (family)，往內一層為屬 (genus)，再往內一層為種 (species) A~T，菌種名標註於左側。節點 (node) 越大，表示該分類的豐富度越高。

Taxonomy 分析結果中，street1 樣本有 99.26% 屬於細菌界 (Bacteria)，0.54% 屬於古細菌 (Archaea)，0.18% 屬於病毒 (Virus)。變形桿菌門 (Proteobacteria) 佔總

量的 92.32%，為豐富度 (abundance) 最高的菌門，其中的 Hydrogenophilaceae 科佔 52.76%，包含豐富度最高的優勢菌種：*Thiobacillus denitrificans* (10.92%)。豐富度第二和第三高的菌種為 *Thiomonas unclassified* (10.45%) 和 *Thauera unclassified* (4.64%)。*Unclassified* 表示該細菌無法被分類至 MetaPhlAn2 資料庫中任何已知的菌種。總計有 12 個菌種豐富度大於 1%。

使用 MetaGeneMark 共預測出 59,620 個基因集，以 eggNOG-mapper 比對 Gene Ontology 資料庫後，在 Biological process、molecular function 和 cellular component 分別有 2,853、1,669 和 375 個 GO term。其中，Z score 具有顯著差異 (大於 1.96 或小於 -1.96)、non_NA_percentage 為 100% 且 TPM 值排名最高的 GO term description 包含 cytoplasm (GO:0005737, TPM: 100111.8)、membrane part (GO:0044425, TPM: 26841.0)、catalytic activity (GO:0003824, TPM: 150816.5)、transferase activity (GO:0016740, TPM: 50497.2)、biological process (GO:0008150, TPM: 222013.1) 等。

使用 HMMER hmmscan 對 Pfam 資料庫進行序列比對，共找出 1,041 個蛋白質結構域，HMMER hmmscan 輸出欄位說明可參考 HMMER 使用手冊 (<http://eddylab.org/software/hmmer3/3.1b2/Userguide.pdf>)。

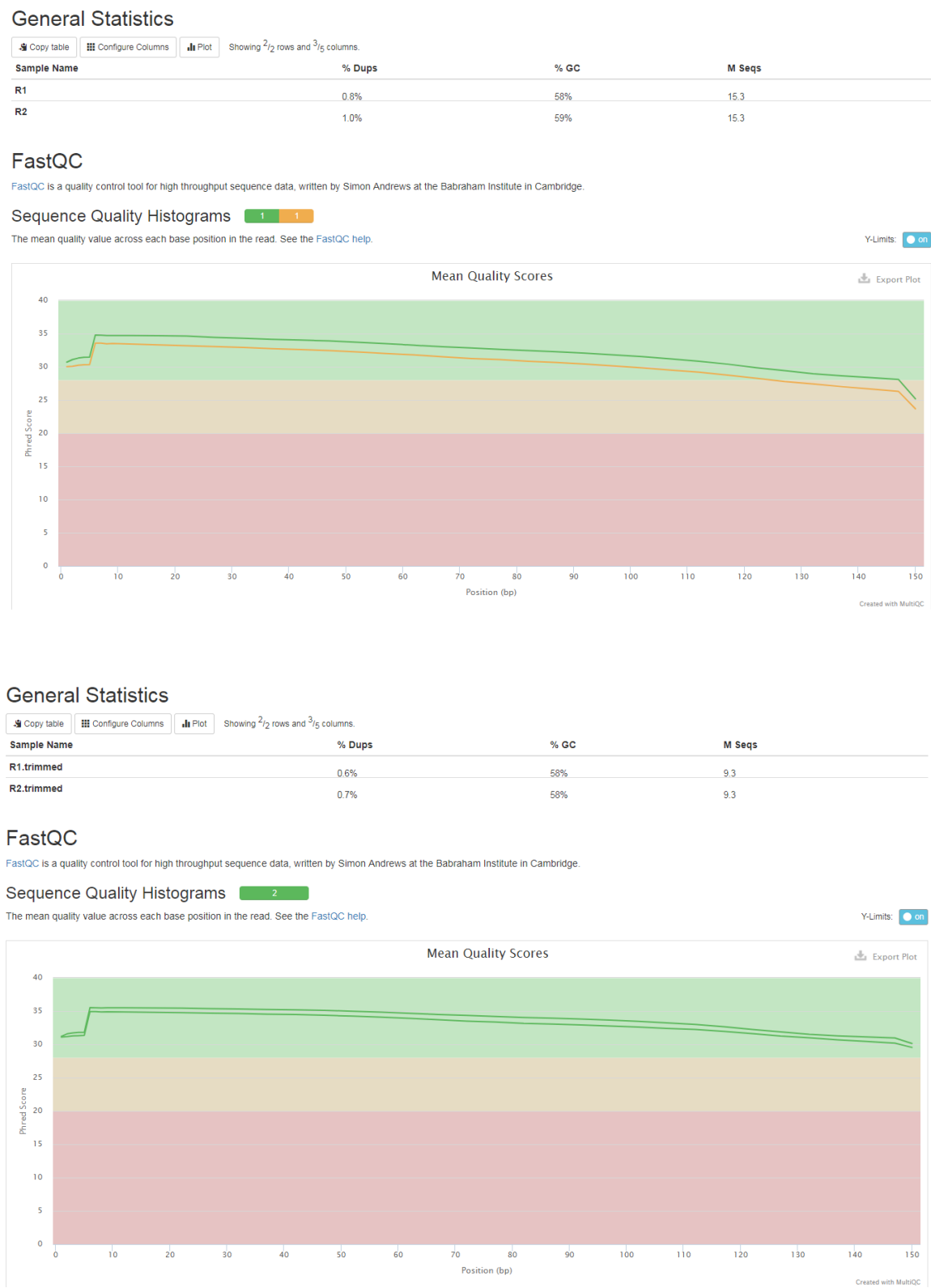


圖 5-34 street1 樣本 FASTQ 修剪前 (上) 和修剪後 (下) 的 MultiQC 輸出結果

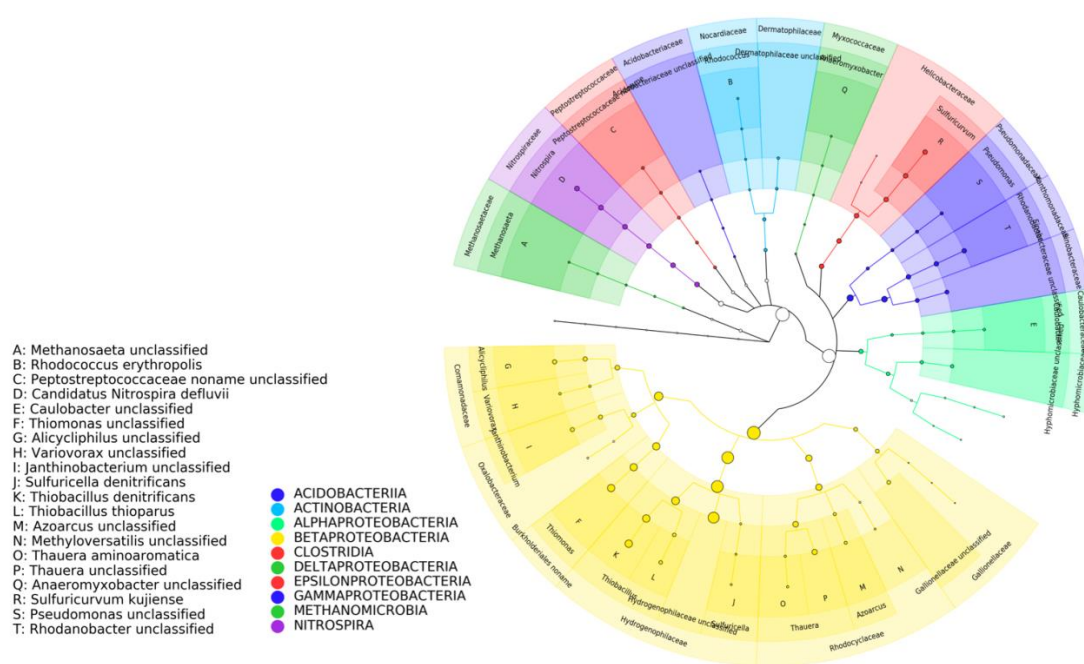


圖 5-35 street1 樣本以 GraPhlAn 繪製之菌種演化樹 (cladogram)

高通量宏基因定序結果與重金屬相關性分析

目前針對底泥樣品 street1 所進行的高通量宏基因定序結果，利用基因功能分類 GO (Gene Ontology) 的資料庫進行基因的屬性比對分析，結果顯示約有 100 多個基因與金屬和重金屬代謝、傳輸、分解、儲存等有關(表 5-9、表 5-10)，並且分屬於分子功能型(molecular function)和生物途徑型(biological process)的兩項基因分類群中，屬於生物途徑相關的基因中，分別比對到與鐵(Fe)、銅(Cu)、鋅(Zn)、及鎘(Cd)等重金屬有關聯的相關基因，主要包括與金屬傳輸相關的部份(如 ion transport 和 transmembrane 等)。其中與銅有關的基因(多達 11 種)包括與銅離子毒性去除(detoxification of copper ion)、與銅離子干擾影響(Stress response to copper ion)、和與銅離子細胞反應(cellular response to copper ion)有關的基因等，另外則為與銅離子傳輸有關的基因(如 copper ion transport、copper ion export、copper ion import、及 copper ion transmembrane transport 等)。此外，也有比對到與砷(As)和汞(Hg)等毒性重金屬相關的基因，例如，response to arsenic-containing substance 和 response to methylmercury 等。其餘還有一部份與鉀、鈣、鎂等金屬離子相關的基因，其功能

也多與 transport 及 transmembrane 有關為主。

屬於分子功能(molecular function)相關的基因中，分別與鐵(Fe)、鋅(Zn)、銅(Cu)、及錳(Mn)等重金屬有關聯，其中多與氧化還原酶(oxidoreductase)、去氫酶(dehydrogenase)、及 transmembrane transporter activity 等有關之基因。其中與銅有關的基因(有 3 種)包括與銅離子結合(copper ion binding)、血紅素-銅終端氧化酶活性(heme-copper terminal oxidase activity)、及銅離子穿透膜轉運蛋白活性(copper ion transmembrane transporter activity)等有關的分子功能屬性基因。上述結果顯示 street1 樣品中的微生物確實含有一些與重金屬反應及轉運相關之功能基因或生物途徑基因，當相關微生物面臨存在環境中的重金屬誘導表現後，方可有機會存活在含有重金屬污染的土壤、水體、或底泥環境中。

表 5-9 樣品 street1 高通量宏基因定序結果與重金屬相關生物途徑(Biological process)的基因

(重)金屬	比對到屬於 biological process 群組之相關基因
鐵(Fe) Iron	1. iron ion transport 2. response to iron(III) ion 3. intracellular sequestering of iron ion 4. ferrous iron transport 5. cellular iron ion homeostasis 6. iron ion transmembrane transport 7. iron assimilation 8. chemotaxis in host environment 9. movement in environment of other organism involved in symbiotic interaction 10. cellular response to iron ion starvation 11. iron coordination entity transport 12. response to iron ion 13. iron-sulfur cluster assembly 14. iron ion homeostasis 15. movement in host environment 16. iron assimilation by chelation and transport 17. chemotaxis in environment of other organism involved in symbiotic interaction 18. iron chelate transport 19. iron ion transmembrane transport 20. iron assimilation by reduction and transport
銅(Cu) Copper	1. copper ion transport 2. response to copper ion 3. copper ion export 4. cellular copper ion homeostasis 5. detoxification of copper ion 6. stress response to copper ion 7. copper ion import 8. cellular response to copper ion 9. plasma membrane copper ion transport 10. copper ion transmembrane transport

11. copper ion homeostasis

鋅(Zn) Zinc	1. zinc ion transmembrane transport 2. detoxification of zinc ion 3. zinc ion transport 4. response to zinc ion 5. cellular response to zinc ion 6. zinc ion import across plasma membrane 7. cellular response to zinc ion starvation
鈉(Na) sodium	1. regulation of sodium ion transport 2. sodium ion transmembrane transport 3. positive regulation of sodium ion transport 4. regulation of sodium ion transmembrane transport 5. regulation of sodium ion transmembrane transporter activit 6. positive regulation of sodium ion transmembrane transporter activity 7. sodium ion transport
鎘(Cd) Cadmium	1. cellular response to cadmium ion 2. cadmium ion transmembrane transport 3. stress response to cadmium ion 4. response to cadmium ion 5. detoxification of cadmium ion 6. cadmium ion transport
鉀 (K) Potassium	1. regulation of potassium ion transport 2. potassium ion transmembrane transport 3. potassium ion transport 4. cellular potassium ion transport
銀(Ag) Silver	1. response to silver ion 2. silver ion transport 3. cellular response to silver ion
鉛(Pd) Lead	1. cellular response to lead ion 2. lead ion transport 3. response to lead ion
錳(Mn) Manganese	1. manganese ion transmembrane transport 2. manganese ion transport
鎳(Ni) Nickel	1. nickel cation transport 2. nickel cation transmembrane transport
鎂(Mg) Magnesium	1. magnesium ion transport 2. cellular response to magnesium starvation
鈣(Ca) calcium	1. positive regulation of calcium ion transport 2. regulation of calcium ion transport
砷(As) Arsenic	1. response to arsenic-containing substance
汞(Hg) Mercury	1. response to methylmercury
鈷(Co) Cobalt	1. cobalt ion transport

表 5-10 樣品 street1 高通量宏基因定序結果與重金屬相關之分子功能
(molecular function)基因

(重)金屬	比對到屬於 molecular function 群組之相關基因
鐵(Fe) Iron	1. 4 iron, 4 sulfur cluster binding 2. 3 iron, 4 sulfur cluster binding 3. oxidoreductase activity, acting on hydrogen as donor, iron-sulfur protein as acceptor 4. oxidoreductase activity, acting on iron-sulfur proteins as donors, NAD or NADP as acceptor 5. iron chelate transmembrane transporter activity 6. 2 iron, 2 sulfur cluster binding 7. iron ion transmembrane transporter activity 8. iron-sulfur cluster binding 9. alcohol dehydrogenase activity, iron-dependent 10. ferrous iron binding 11. iron chaperone activity 12. iron-responsive element binding 13. oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, iron-sulfur protein as acceptor 14. oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, reduced iron-sulfur protein as one donor, and incorporation of one atom of oxygen 15. iron ion binding 16. oxidoreductase activity, acting on CH or CH₂ groups, with an iron-sulfur protein as acceptor 17. oxidoreductase activity, acting on iron-sulfur proteins as donors
鋅(Zn) Zinc	1. alcohol dehydrogenase activity, zinc-dependent 2. zinc D-Ala-D-Ala carboxypeptidase activity 3. zinc ion transmembrane transporter activity 4. zinc ion binding 5. zinc-exporting ATPase activity
銅(Cu) Copper	1. copper ion binding 2. heme-copper terminal oxidase activity 3. copper ion transmembrane transporter activity
錳(Mn) Manganese	1. manganese ion binding 2. manganese ion transmembrane transporter activity
鎳(Ni) Nickel	1. nickel cation transmembrane transporter activity 2. nickel cation binding
砷(As) Arsenic	1. oxidoreductase activity, acting on phosphorus or arsenic in donors, disulfide as acceptor 2. oxidoreductase activity, acting on phosphorus or arsenic in donors
鎘(Cd) Cadmium	1. cadmium-exporting ATPase activity 2. cadmium ion transmembrane transporter activity
鎂(Mg) Magnesium	1. magnesium ion transmembrane transporter activity 2. magnesium ion binding
鈷(Co) Cobalt	1. cobalt ion binding 2. cobalt ion transmembrane transporter activity
銀(Ag) Silver	1. silver ion transmembrane transporter activity
鉛(Pd) Lead	1. lead ion transmembrane transporter activity
鋰(Li) lithium	1. lithium ion binding

而針對底泥樣品從 Street1 到 Street5 進行的高通量宏基因定序結果，利用基因功能分類 GO (Gene Ontology)的資料庫進行分子功能型(Molecular function)和生物途徑型(Biological process)的兩項基因分類群中的比對分析(如下表 5-11 至 5-15)，結果發現從 Street1 到 Street5 皆含有鐵(Fe)、銅(Cu)、鋅(Zn)、及鎘(Cd)等重金屬相關的基因，以及其它鹼金屬(鈉及鉀)相關基因，基，其中生物途徑(biological process)相關基因種類約為分子功能(molecular function)之基因種類數量的兩倍左右，上游樣品 Street1 與金屬或重金屬相關基因比例與數量均略少於其它下游/放流口(Street-2~5)之數值，下游樣品 Street2 有較高與金屬或重金屬生物途徑(biological process) 相關基因種類比例與數量(1.66%及 1.24%)，下游樣品 Street5 有較高與金屬或重金屬分子功能(molecular function)相關基因種類比例與數量(3.49%及 2.05%)。

然而，5 個樣品比對到個別與重金屬相關基因種類的差異並不十分明顯，多數重金屬相關基因在 5 個樣品中皆有出現，Biological process 的部分多與 transportation、homeostasis、response 的基因有關，其中五個樣品當中只有 Street2 有發現 response to iron(II) ion 的基因，其他皆是 response to iron(III) ion；Molecular function 方面，大多則是 Binding、Activity(oxidoreductase、chaperone、transmembrane transporter activity)等相關的基因，此外在下游 Street4 與 Street5 的區域，多發現銅、鋅、鎘與 ATPase activity(transporting or exporting)，可以將溶質或溶質從膜的一側轉移到另一側 $[ATP + H_2O + Cu_2 + (in) \rightarrow ADP + \text{磷酸鹽} + Cu_2 + (out)]$ ，顯示出當長時間受到重金屬污染時，河川中的微生物會對重金屬反應，產生功能基因的轉變進而適應變化的環境，另外還有一些毒性重金屬砷(As)和汞(Hg)相關的功能基因。5 個樣品中與重金屬相關的基因種類、數量、及比例相對差異性並不大，研究之初原預期樣品 Street2 到 Street5 等下游地區的樣品應較 Street1 上游(背景值)含有豐富及高的重金屬相關的基因，但只發現少數不同的差異，說明此河川上下游地區長時間受到重金屬污染的程度可能非常相似。

該河段在本次採樣區放流口上游處似乎在過去(或目前)也承受其它重金屬污染源，上游 Street1 樣品所測得之重金屬相關的基因種類、數量、及比例因而與下游樣品(Street2-5)的差異性不十分明顯，僅有少部分與重金屬相關的基因種類僅在下游樣品(Street2-5)中發現，而未在 Street-1 樣品中測得。此外，也顯示底泥樣品受重金屬污染而有長時間之累積現象，進而誘發與重金屬相關的基因的優勢化，此結果較不易利用河水水質之重金屬濃度顯示相對應之底泥重金屬累積污染狀況。

表 5-11 樣品 Street1~5 高通量宏基因定序結果與金屬(含重金屬)或重金屬相關生物途徑(Biological process)及分子功能(molecular function)基因總數量比較

	Amount of biological process genes	Amount/% of genes related to metals	Amount/% of genes related to heavy metals
Street1	5467	67 (1.23%)	53 (0.97%)
Street2	5466	91 (1.66%)	68 (1.24%)
Street3	5535	87 (1.57%)	66 (1.19%)
Street4	5420	80 (1.48%)	59 (1.09%)
Street5	6052	84 (1.39%)	62 (1.02%)
	Amount of molecular function genes	Amount of genes related to metals	Amount of genes related to heavy metals
Street1	2410	74 (3.07%)	42 (1.74%)
Street2	2400	76 (3.17%)	46 (1.92%)
Street3	2410	75 (3.11%)	45 (1.87%)
Street4	2341	77 (3.29%)	46 (1.96%)
Street5	2434	85 (3.49%)	50 (2.05%)

表 5-12 樣品 Street1~5 高通量宏基因定序結果與金屬鐵(Fe, iron)相關生物途徑(Biological process)及分子功能(molecular function)基因整理。

(重)金屬	biological process genes	Street1	Street2	Street3	Street4	Street5
鐵(Fe) Iron	1. ferrous iron transport	●	●	●	●	●
	2. iron assimilation by reduction and transport	●	●	●	-	●
	3. iron assimilation by chelation and transport	●	●	●	-	●
	4. response to iron ion	●	●	●	●	●
	5. iron ion homeostasis	●	●	●	●	●
	6. regulation of translational initiation by iron	-	●	-	-	-
	7. cellular response to iron ion	-	●	●	-	-
	8. ferrous iron import	-	●	●	●	-
	9. cellular iron ion homeostasis	●	●	●	●	●
	10. response to iron(II) ion	-	●	-	-	-
	11. iron-sulfur cluster assembly	●	●	●	●	●
	12. intracellular sequestering of iron ion	●	●	●	●	●
	13. cellular response to iron ion starvation	●	●	●	●	●
	14. iron ion import	●	●	●	●	-
	15. iron ion transmembrane transport	●	●	●	●	●
	16. iron coordination entity transport	●	●	●	●	●
	17. ferric iron transport	-	●	-	●	●
	18. iron chelate transport	●	●	●	●	●
	19. response to iron(III) ion	●	●	●	●	●
	20. iron assimilation	●	●	●	●	●

molecular function genes	Street1	Street2	Street3	Street4	Street5
1. oxidoreductase activity, acting on a sulfur group of donors, iron-sulfur protein as acceptor	-	●	●	●	●
2. 2 iron, 2 sulfur cluster binding	●	●	●	●	●
3. oxidoreductase activity, acting on iron-sulfur proteins as donors	●	●	●	●	●
4. oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, reduced iron-sulfur protein as one donor, and incorporation of one atom of oxygen	●	●	●	●	●
5. ferrous iron binding	●	●	●	●	●
6. ferrous iron transmembrane transporter activity	-	●	●	●	●
7. iron ion binding	●	●	●	●	●
8. iron-sulfur cluster binding	●	●	●	●	●
9. iron-responsive element binding	●	●	●	●	●
10. ferric iron binding	●	●	●	●	●
11. oxidoreductase activity, acting on hydrogen as donor, iron-sulfur protein as acceptor	●	●	●	●	●
12. 4 iron, 4 sulfur cluster binding	●	●	●	●	●
13. oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, iron-sulfur protein as acceptor	●	●	●	●	●
14. iron chelate transmembrane transporter activity	●	●	●	●	●
15. oxidoreductase activity, acting on CH or CH ₂ groups, with an iron-sulfur protein as acceptor	●	●	●	●	●
16. iron chaperone activity	●	●	●	●	●
17. alcohol dehydrogenase activity, iron-dependent	●	●	●	●	●
18. iron ion transmembrane transporter activity	●	●	●	●	●
19. oxidoreductase activity, acting on iron-sulfur proteins as donors, NAD or NADP as acceptor	●	●	●	●	●
20. 3 iron, 4 sulfur cluster binding	●	●	●	●	●

Ps. **Bold items refer to difference between up-stream sample Street1 and other down-stream samples Street2-5.** Grey colored items refer to the genes found in all 5 samples.

●代表此基因在其他樣本和 Street1 有差異，●代表此基因在五個樣本皆有出現，-代表此基因載此樣本中沒有出現。

表 5-13 樣品 Street1~5 高通量宏基因定序結果與重金屬銅(Cu, copper)及鋅(Zn, zinc)相關生物途徑(Biological process)及分子功能(molecular function)基因整理

(重)金屬	biological process genes	Street1	Street2	Street3	Street4	Street5
銅(Cu) Copper	1.copper ion transport	●	●	●	●	●
	2.response to copper ion	●	●	●	●	●
	3.copper ion export	●	●	●	●	●
	4.cellular copper ion homeostasis	●	●	●	●	●
	5.detoxification of copper ion	●	●	●	●	●
	6.stress response to copper ion	●	●	●	●	●
	7.copper ion import	●	●	●	●	●
	8.cellular response to copper ion	●	●	●	●	●
	9.plasma membrane copper ion transport	●	●	●	●	●
	10.copper ion transmembrane transport	●	●	●	●	●
	11.copper ion homeostasis	●	●	●	●	●
	molecular function genes	Street1	Street2	Street3	Street4	Street5
	1. copper chaperone activity	●	●	●	-	●
	2. copper ion binding	●	●	●	●	●
	3. copper ion sensor activity	-	-	-	●	●
	4. copper ion transmembrane transporter activity	●	●	●	●	●
	5. copper-exporting ATPase activity	-	-	-	●	●
	6. copper-transporting ATPase activity	-	-	-	●	●
	7. heme-copper terminal oxidase activity	●	●	●	●	●
鋅(Zn) Zinc	1.cellular response to zinc ion	●	●	●	-	●
	2. cellular response to zinc ion starvation	●	●	●	●	●
	3. cellular zinc ion homeostasis	-	●	●	-	●
	4. detoxification of zinc ion	●	●	●	●	●
	5. response to zinc ion	●	●	●	●	●
	6. zinc ion homeostasis	-	●	●	●	●
	7. zinc ion import across plasma membrane	●	●	●	-	●
	8. zinc ion transmembrane transport	●	●	●	●	●
	9. zinc ion transport	●	●	●	●	●
	molecular function genes	Street1	Street2	Street3	Street4	Street5
	1. alcohol dehydrogenase activity, zinc-dependent	●	●	●	●	●
	2. zinc D-Ala-D-Ala carboxypeptidase activity	●	●	●	●	●
	3. zinc efflux active transmembrane transporter activity	●	●	●	-	●
	4. zinc efflux transmembrane transporter activity	●	●	●	-	●
	5. zinc ion binding	●	●	●	●	●
	6. zinc ion transmembrane transporter activity	●	●	●	●	●
	7. zinc-exporting ATPase activity	●	●	●	●	●
	8. zinc-transporting ATPase activity	-	-	-	-	●

表 5-14 樣品 Street1~5 高通量宏基因定序結果分別與重金屬鎘(Cd, cadmium)、
錳(Mn, manganese)、及鉛(Pd, lead)相關生物途徑(Biological process)及分子功能
(molecular function)基因整理。

(重)金屬	biological process genes	Street1	Street2	Street3	Street4	Street5
鎘(Cd) Cadmium	1.cadmium ion homeostasis	-	●	●	-	●
	2. cadmium ion transmembrane transport	●	●	●	●	●
	3. cadmium ion transport	●	●	●	●	●
	4. cellular cadmium ion homeostasis	●	●	●	●	●
	5. cellular response to cadmium ion	●	●	●	●	●
	6. detoxification of cadmium ion	●	●	●	●	●
	7. response to cadmium ion	●	●	●	●	●
	8. stress response to cadmium ion	●	●	●	●	●
	molecular function genes	Street1	Street2	Street3	Street4	Street5
	1. cadmium ion binding	●	●	●	●	●
	2. cadmium ion transmembrane transporter activity	●	●	●	●	●
	3. cadmium-exporting ATPase activity	●	●	●	●	●
	4. cadmium-transporting ATPase activity	-	-	-	-	●
(重)金屬	biological process genes	Street1	Street2	Street3	Street4	Street5
錳(Mn) Manganese	1.cellular manganese ion homeostasis	-	-	-	●	-
	2.cellular response to manganese ion	-	-	-	●	-
	3.manganese ion homeostasis	-	-	-	●	-
	4. manganese ion transmembrane transport	●	●	●	●	●
	5. manganese ion transport	●	●	●	●	●
	6. response to manganese ion	-	●	●	●	●
	molecular function genes	Street1	Street2	Street3	Street4	Street5
	1. manganese ion binding	●	●	●	●	●
	2. manganese ion transmembrane transporter activity	●	●	●	●	●
(重)金屬	biological process genes	Street1	Street2	Street3	Street4	Street5
鉛(Pd) Lead	1.cellular response to lead ion	●	●	●	-	●
	2. lead ion transport	●	●	●	●	●
	3. response to lead ion	●	●	●	-	●
	molecular function genes	Street1	Street2	Street3	Street4	Street5
	1.lead ion transmembrane transporter activity	●	●	●	●	●

表 5-15 樣品 Street1~5 高通量宏基因定序結果分別與重金屬銀(Ag, silver)、鎳(Ni, Nickel)、砷(As, arsenic)、鈷(Co, cobalt)及汞(Hg, mercury)相關生物途徑(Biological process)及分子功能(molecular function)基因整理

(重)金屬	biological process genes	Street1	Street2	Street3	Street4	Street5
銀(Ag) Silver	1. cellular response to silver ion	●	●	●	●	●
	2. response to silver ion	●	●	●	●	●
	3. silver ion transport	●	●	●	●	●
	molecular function genes	Street1	Street2	Street3	Street4	Street5
	1. silver ion transmembrane transporter activity	●	●	●	●	●
鎳(Ni) Nickel	biological process genes	Street1	Street2	Street3	Street4	Street5
	1. nickel cation transmembrane transport	●	●	●	●	●
	2. nickel cation transport	●	●	●	●	●
	3. response to nickel cation	-	-	-	●	●
	molecular function genes	Street1	Street2	Street3	Street4	Street5
	1. nickel cation binding	●	●	●	●	●
砷(As) Arsenic	2. nickel cation transmembrane transporter activity	●	●	●	●	●
	biological process genes	Street1	Street2	Street3	Street4	Street5
	1. cellular response to arsenic-containing substance	-	●	●	●	●
	2. response to arsenic-containing substance	●	●	●	●	●
	molecular function genes	Street1	Street2	Street3	Street4	Street5
	1. oxidoreductase activity, acting on phosphorus or arsenic in donors	●	●	●	●	●
鈷(Co) Cobalt	2. oxidoreductase activity, acting on phosphorus or arsenic in donors, disulfide as acceptor	●	●	●	●	●
	biological process genes	Street1	Street2	Street3	Street4	Street5
	1. cobalt ion transport	●	●	●	●	●
	2. response to cobalt ion	-	●	●	-	-
	molecular function genes	Street1	Street2	Street3	Street4	Street5
	1. cobalt ion binding	●	●	●	●	●
汞(Hg) Mercury	2. cobalt ion transmembrane transporter activity	●	●	●	●	●
	3. sirohydrochlorin cobaltochelataase activity	●	●	●	●	-
	biological process genes	MS1	MS2	MS3	MS4	MS5
	1. cellular response to mercury ion	-	●	●	●	●
	2. response to mercury ion	-	●	●	●	●
	3. response to methylmercury	●	●	●	●	●

章節摘要：

依據計畫之實驗結果分述於本章之各節中，5.1 現地採樣分析結果；5.2 純菌暴露硫酸銅批次實驗分析結果；5.3 河川底泥基因體分析結果。

六、結論

6.1 老街溪水質及底泥檢測

本次採樣的 5 個點位中，大部分的水質檢測數值趨勢表現一致，在導電度、TOC、COD 或是氨氮與水中陰離子濃度等分析項目中，工業放流口下游點位(Street3、Street4、Street5)其濃度值均明顯高於放流口上游的點位(Street1 及 Street2)，而水中銅濃度最高值測得於放流口下方的 Street3 點位，顯示工廠放流水影響河川水質。

底泥分析項目中，碳氮硫氫比例落在 23.4 %到 0.5%不等，除了採樣點 Street1 與 Street4 外其餘 3 點皆在 3%以下；Street2 點為底泥平均粒徑最大，Street5 點為平均底泥粒徑最小；銅濃度部分，銅濃度最高點位在 Street4 其濃度為 1002 mg/kg 工業放流口下游 Street3 及 Street4 點位底泥中銅濃度明顯高於上游 Street1 及 Street2 點位。惟許厝港一號橋(Street5)點位銅濃度僅 9.300 mg/kg 較為異常，推測可能因採樣點附近正進行大規模的河川工程施工，使得底泥組成改變，導致銅濃度測值劇烈變化。

6.2 以 PICRUSt 預測功能性基因表現

經 16S-rRNA amplicon sequencing 得到現地樣品的微生物組成比例，再利用 UPGMA 集群分析進一步發現 street2 及 street3 的微生物組成最為接近，而最上游採樣點 street1 與 street2、street3 雖接近但為不同組可能和現場觀測到：除了 street1 外，其餘 4 點附近皆有觀察到老街溪沿岸設有民生或工業污水排放口有所關係。而 street4 及 street5 採樣點底泥微生物組成和上游及選定放流口差異甚大。再使用 PCoA 主座標分析其結果和 UPGMA 相似，street2 及 street3 採樣點的底泥微生物組成最為接近，而 street1 與這兩組較為接近，而下游兩採樣點和這三組距離較遠

表示放流口下游的底泥菌群組成相較於上游及放流口有不小的差異在，可能和放流口污染物的排放及下游工程干擾有關。

若以 street1 最上游作為基準，許多菌門由上至下游具明顯豐度差異。以熱圖分析結果顯示出下游有不少菌門異於其他採樣點有明顯增加的趨勢，明顯增加趨勢的菌門有兩個，分別為 Microscillaceae 及 Geobacteraceae。在受到工業區放流口 (street 3) 影響趨勢較高的菌門則為 Hydrogenophilaceae 及 Gallionellaceae。此中，Hydrogenophilaceae 菌門與第一年結果相符，在工業區放流口後豐度迅速減少，未來可能成為主要辨識菌群。

再根據 PICRUSt 發現整體基因預測代謝功能來說，最上游的 street1 採樣點其預測代謝相關基因豐度在五個樣品中偏高，可能同樣是由於其採樣點附近皆沒有民生或工業污水排放口的關係。而與之相反選定放流口採樣點 street3 的基因預測代謝相關基因豐度在五個樣品中整體偏低。之後找出了 44 種預測基因功能其相關基因數量隨著上游至下游有降低的趨勢。大半部分皆和代謝功能有關係，次要則屬於細胞生化反應及遺傳信息處理，這些預測基因功能表現的相關基因數量之變化表示排放口的汙染排放可能會主要導致底泥微生物族群的代謝變化、影響微生物細胞生長甚至導致遺傳表現的變化。其中有 20 種表現基因受放流口影響最鉅，此 20 種當中，Calcium signal pathway 與 Photosynthesis - antenna proteins 兩種基因豐度與重金屬銅、鉻、錳的濃度相關性非常高。這兩種的功能基因可能可作為未來篩選的標的基因。

6.3 河川底泥總基因體分析

針對底泥樣品 street1 所進行的高通量宏基因定序(illumina shot gun sequencing)結果，約有 100 多個基因與金屬和重金屬代謝、傳輸、分解、儲存等有關，並且分屬於分子功能型(molecular function)和生物途徑型(biological process)的兩項基因分類群中，屬於生物途徑相關的基因中，分別比對到與鐵重金屬有關聯的相關基

因，主要包括與金屬傳輸相關的部份(如 ion transport 和 transmembrane 等)。其中與銅有關的基因多達 11 種。此外，也有比對到與砷(As)和汞(Hg)等毒性重金屬相關的基因，以及與鉀、鈣、鎂等金屬離子相關的基因。屬於分子功能(molecular function)相關的基因中，也與重金屬有關聯，多與氧化還原酶(oxidoreductase)、去氫酶(dehydrogenase)、及 transmembrane transporter activity 相關。上述結果顯示 street1 樣品中的微生物確實含有一些與重金屬反應及轉運相關之功能基因或生物途徑基因，當相關微生物面臨存在環境中的重金屬誘導表現後，方可有機會存活在含有重金屬污染的土壤、水體、或底泥環境中。

而比較 5 個底泥樣品後發現上游樣品 Street1 與金屬或重金屬相關基因比例與數量均略少於其它下游/放流口之數值。5 個樣品比對到個別與重金屬相關基因種類的差異較小，多數重金屬相關基因在 5 個樣品中皆有出現。僅有少數基因在下游樣品豐度較高。下游 Street4 與 Street5 的區域，多發現銅、鋅、鎘與 ATPase activity (transporting or exporting)，可以將溶質從膜的一側轉移到另一側[$\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} + \text{Cu}^{2+}(\text{in}) \rightarrow \text{ADP} + \text{磷酸鹽} + \text{Cu}^{2+}(\text{out})$]，顯示出當長時間受到重金屬汙染時，河川中的微生物會對重金屬反應，產生功能基因的轉變進而適應變化的環境。

章節摘要：

本章節針對本計畫所有工作成果以 6.1 老街溪現地採樣、6.2 硫酸銅對功能性基因影響（純菌暴露硫酸銅批次實驗）、6.3 疏河川底泥基因體分析這四項目進行工作成果匯整並歸納結論。

七、建議事項

1. 水質底泥品質等環境數據及微生物群落組成等，均不斷隨著時間改變。建議未來持續蒐集環境數據及微生物等相關資訊，以增加分析結果精確性。
2. 實驗結果發現選定放流口上下游採樣點與微生物族群之間的關係差異，並篩選出未來可成為指標之菌群及基因群。本計畫研究結果可供後續河川污染進行微生物鑑識進行比較參考。

章節摘要：本章節針對本計畫提出立即可行建議及中長期建議。

1. 實驗結果發現選定放流口上下游採樣點與微生物族群之間的關係。本計畫研究結果可供後續河川污染進行微生物鑑識進行比較參考。
2. 水質底泥品質等環境數據及微生物群落組成等，均不斷隨著時間改變。建議未來持續蒐集環境數據及微生物等相關資訊，以增加分析

結果精確性。

參考文獻

- Abu-Ali GS, Mehta RS, Lloyd-Price J, Mallick H, Branck T, Ivey KL, Drew DA, DuLong C, Rimm E, Izard J. and Chan AT(2018). "Metatranscriptome of human faecal microbial communities in a cohort of adult men." *Nature Microbiology* volume 3:356 – 366
- Altimira FC, Yáñez G, Bravo M, González LA, Rojas and M Seeger (2012). "Characterization of copper-resistant bacteria and bacterial communities from copper-polluted agricultural soils of central Chile." *BMC Microbiology* 12(1): 193.
- Anders S, Pyl PT and Huber W.(2015). "HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data." *Bioinformatics* 31(2):166-9.
- Andrews and Simon. (2010). "FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. "
- Ashburner M, Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. (2000). "Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium." *Nat Genet*, 25(1): p. 25-9.
- Asnicar F, Asnicar F, Weingart G, Tickle TL, Huttenhower C, Segata N. et al. (2015). "Compact graphical representation of phylogenetic data and metadata with GraPhlAn." *PeerJ*, 3: p. e1029.
- Benjamini Y. and Y Hochberg (1995). "Controlling the False Discovery Rate - a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing." *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Methodological* 57(1): p. 289-300.
- Besaury L, B Pawlak and L Quillet (2014). "Expression of copper-resistance genes in microbial communities under copper stress and oxic/anoxic conditions." *Environmental Science and Pollution Research* 23(5): 4013-4023.
- Bikel S, Valdez-Lara A, Cornejo-Granados F, Rico K, Canizales-Quinteros S, Soberon X, Del Pozo-Yauner L and Ochoa-Leyva A.(2015). "Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: towards a systems-level understanding of human microbiome." *Comput Struct Biotechnol J* 13:390-401.
- Bolger AM, Lohse M and Usadel B.(2014). "Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data." *Bioinformatics* 30(15):2114-20.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK.(2010). "QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data." *Nature Methods*. 7:335-336.

- Chen Y, Jiang Y, Huang H, Mou L, Ru J, Zhao J, Xiao S. (2018). "Long-term and high-concentration heavy-metal contamination strongly influences the Microbiome and functional genes in Yellow River sediments." *Science of the Total Environment* 637-638: 1400-1412.
- Coil D, G Jospin, and AE Darling. (2015). "A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data." *Bioinformatics* 31(4): p. 587-9.
- Du H, Harata N, Li F. (2018). "Responses of riverbed sediment bacteria to heavy metals: Integrated evaluation based on bacterial density, activity and community structure under well-controlled sequencing batch incubation conditions." *Water Research* 130: 115-126.
- Eddy SR. (2011). "Accelerated Profile HMM Searches." *PLoS computational biology* 7(10): p. e1002195-e1002195.
- Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Käller M, Notes A.(2016). "MultiQC :summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report." *Bioinformatics (Oxford, England)* 32(19): p. 3047-3048.
- Finn RD, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Mistry J, Mitchell AL, Potter SC, Punta M, Qureshi M, Sangrador-Vegas A, Salazar GA, Tate J, Bateman A. (2016). "The Pfam protein families database: towards a more sustainable future." *Nucleic Acids Research* 44(D1): p. D279-D285.
- Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, Li W.(2012). "CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data." *Bioinformatics* 28(23): p. 3150-2.
- Henschel R, Lieber M, Wu LS, Nista PM, Haas BJ and LeDuc RD.(2012). "Trinity RNA-Seq Assembler Performance Optimization." *ACM* 45:1-8.
- Huerta-Cepas J, Forslund K, Coelho LP, Szklarczyk D, Jensen LJ, von Mering C, Bork P.(2017). "Fast Genome-Wide Functional Annotation through Orthology Assignment by eggNOG-Mapper." *Mol Biol Evol* 34(8): p. 2115-2122.
- Jie S, M Li, M Gan, J Zhu, H Yin and X Liu (2016). "Microbial functional genes enriched in the Xiangjiang River sediments with heavy metal contamination." *BMC Microbiol* 16(1): 179.
- Kanehisa M and S. (2000). "Goto, KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes." *Nucleic Acids Res* 28(1): p. 27-30.
- Kang S, Van Nostrand J D, Gough H L, He Z, Hazen TC, Stahl D A, & Zhou J. (2013). "Functional gene array – based analysis of microbial communities in heavy metals-contaminated lake sediments." *FEMS microbiology ecology*, 86(2), 200-214.
- Langille MGI, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, a Reyes J, Clemente JC, Burkepille DE, Vega Thurber RL, Knight R, Beiko RG and Huttenhower C.(2013)."Predictive functional profiling of microbial communities using 16S

- rRNA marker gene sequences." *Nature Biotechnology* volume 31, pages 814 – 821.
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. (2009). "Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome." *Genome Biol* 10(3): p. R25.
- Langmead B. and Salzberg SL. (2012). "Fast gapped-read alignment with Bowtie 2." *Nat Methods* 9(4):357-9.
- Lejon DPH, Nowak V, Bouko S, Pascault N, Mougél C, Martins JM, Ranjard L. (2007). "Fingerprinting and diversity of bacterial copA genes in response to soil types, soil organic status and copper contamination." *FEMS Microbiol Ecol* 61, 424 – 437.
- Love MI, Huber W and Anders S.(2014). "Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2." *Genome Biol.* 15(12):550.
- Magalhaes CM, A Machado, P Matos and AA Bordalo (2011). "Impact of copper on the diversity, abundance and transcription of nitrite and nitrous oxide reductase genes in an urban European estuary." *FEMS Microbiol Ecol* 77(2): 274-284.
- Ondov BD, Bergman NH and Phillippy AM. (2011). " Interactive metagenomic visualization in a Web browser." *BMC Bioinformatics* 12.
- RC E. (2010). "Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST." *Bioinformatics.* 26:2460-2461.
- Roberts A and L Pachter.(2013). "Streaming fragment assignment for real-time analysis of sequencing experiments. " *Nature methods* 10(1): p. 71-73.
- S A. (2010). "FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. " Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Schloss PD, Schloss, Sarah L, Westcott, Thomas Ryabin, Justine R. Hall, Martin Hartmann, Emily B. Hollister, Ryan A. Lesniewski, Brian B. Oakley, Donovan H. Parks, Courtney J. Robinson, Jason W. Sahl, Blaz Stres, Gerhard G. Thallinger, David J. Van Horn, Carolyn F. Weber. (2009). "Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities." *Applied and Environmental Microbiology* 75, 7537 – 7541.
- Truong DT, Franzosa EA, Tickle TL, Scholz M, Weingart G, Pasolli E, Tett A, Huttenhower C, Segata N. (2015). "MetaPhlAn2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling. " *Nature Methods* 12: p. 902.
- TZ1 D, P H, N L, M R, EL B, K K, et al. (2006). "Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB." *Appl Environ Microbiol.* 72:5069-5072.
- Wood DE. and SL Salzberg.(2014). "Kraken ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. " *Genome Biology* 15(3): p. R46.

- Yang YX, Wang M, Yin YL, Onac E, Zhou GF, Peng S, Xia XJ, Shi K, Yu JQ and Zhou YH.(2015) "RNA-seq analysis reveals the role of red light in resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 in tomato plants." BMC Genomics 16: p. 120.
- Yin H, Niu J, Ren Y, Cong J, Zhang X, Fan F, Xiao Y , Zhang X, Deng J, Xie M, He Z, Zhou J, Liang Y & Liu X.(2015) "An integrated insight into the response of sedimentary microbial communities to heavy metal contamination." Sci. Rep. 5, 14266.
- Zhang J, Kobert K, Flouri T, Stamatakis A. (2014) "PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR." Bioinformatics. 30:614-620.
- Zhu W, A Lomsadze and M Borodovsky, (2010). "Ab initio gene identification in metagenomic sequences. " Nucleic Acids Res, 38(12): p. e132.

章節摘要：報告所參考及引註之書籍、期刊及各項資料。

附錄

附錄一 第一次工作報告會議意見及廠商回覆表

行政院環境保護署環境檢驗所委託研究計畫「以菌群分布作為鑑識污

染源技術建立(2/2)」第一次工作會議報告廠商回覆意見表

討論意見	廠商意見回復 (國立臺灣大學)
1. 報告內容中對於菌株(BCRC17746)活化培養含銅培養基分析總轉錄體比較基因差異等方法,請執行單位儘量詳述說明。	1. 遵照辦理。
2. 檢測完成之菌相原始資料庫與污染源鑑識之正負相關性、趨勢影響鑑別圖譜及總體基因體之功能預測等分析方法,請執行單位協助辦理技術轉移。	2. 遵照辦理。
3. 污染源之採樣時間與地點由執行單位依第一年之檢驗數據分析選擇老街溪重點污染區域,或以觀音工業區的排放水體富林溪為主等,請執行單位盡速評估後,由本所提供行政協助。	3. 遵照辦理。

以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(2/2)

附錄二 期中審查會議委員意見及廠商回覆意見表

行政院環境保護署環境檢驗所委託研究計畫「以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(2/2)」期中審查會議廠商回覆意見表

委員意見	廠商意見回覆 (國立臺灣大學)
(一)吳俊宗委員 1. 購買自國外之 <i>Methylobacterium</i> 菌株是否於底泥中存在，國內之菌種和購買之菌種不一定完全一樣，建議能用國內之菌種作比較。 2. 培養 <i>Methylobacterium</i> 時建議以逐漸提高添加濃度，使菌種逐漸適應，進而使抗銅基因表現更明顯。 3. 所選之功能基因其功能為何？是否有專一性？ 4. 底泥中含有之重金屬對抗銅基因之表現是否有影響？ 5. 功能性抗銅基因是否有表現，能否從檢測中予以區別？	1. 感謝委員提點，由於計畫時間因素因此選用購買純菌的方式進行實驗，未來建議如有較長時間的計畫進行可採用現地底泥篩菌出適合菌種進行實驗。 2. 感謝委員提點，的確逐漸提高添加濃度能使菌種逐漸適應而使抗銅基因表現更明顯，因計畫時程有限，所以以低濃度至高濃度分別培養，雖誘發結果可能較濃度梯度低，但可提供部分資訊。 3. 目前將以生長所需代謝基因及抗銅基因為主要檢測對象。本研究主要針對硫酸銅刺激產生的差異，未來需要更多研究進一步研析基因表現差異之專一性。 4. 底泥中抗銅基因在文獻中已有報導，會受銅污染影響。因此本研究主要目標為銅污染造成之 transcriptome 差異。 5. 由於選用菌株及培養條件不一定會誘發抗銅基因，因此不一定能從 transcriptome 中發現。
(二)李俊福委員 1. 請補充第一年執行計畫執行摘要與評選意見回覆。 2. 第四頁設定有誤應為 107 年。 3. 4.1 節建議依第二頁所列之標題分類彙整文獻。 4. 第三章採樣請檢附相關照片。	1. 感謝委員指正，已將第一年計畫概要新增於章節中，並將期初工作意見彙整於附錄中。 2. 感謝委員指正，已進行修正。 3. 感謝委員指正，已進行修正。 4. 感謝委員指正，已進行修正。

5. M5 底泥是否具代表性？是否重採樣？ 6. 僅水樣 50ppm 出現影響，是否影響判讀功能性基因之差異？	5. M5 採樣時已選擇接近河川中心的地點進行底泥挖採，當地同時進行大規模工程施工，所以推估底泥採樣很有可能受到工程影響，如果該點位重新進行採樣目前評估還是會受工程影響，而 M4 點位仍可代表河川於工業區下游之影響表現。M5 下游會太接近海口，樣本容易受到鹽分的影響，而 M5 與 M4 只相距約 400 m，目前尚未發現適合進行採樣但又未受工程影響之放流口下游點位，故無規劃再次進行採樣。 6. 謝謝委員意見。50ppm 為造成菌種生長曲線差異，而低劑量雖然生長曲線沒有造成差異，但 RNA 表現可能和空白組有所差異，之後定序結果出來會再進行分析。
(三)柳家瑞委員 1. 符合計畫進度。 2. 底泥及水重金屬分析"ND"請列 MDL(P40,P44)。 3. 執行成效表，請更詳細並最好量化：包含純菌暴露硫酸銅萃取 RNA 送定序，是那幾組或五組全送。 4. 水樣分析及微生物族群分析(P13)，但後之敘述未列此項，請確認。 5. 文獻搜集底泥微生物受重金屬污染與基因表現分析相關，但微生物基因表現受影響因素是否還有其他？請說明。	1. 感謝委員肯定。 2. 感謝委員指正，已補充於報告中。 3. 感謝委員指正，已補充修正。 4. 感謝委員指正，此項目在修改時有所遺漏，已進行修正。 5. 謝謝委員意見，由於大部分文獻研究基因表現分析通常只以選定單一基因進行誘發暴露分析，因此通常只能明確說出會受到特定污染物影響而影響基因表現，但較難說出是否會受到其他因素影響。

6. 純菌暴露使用不同濃度，單位是 Cu 或硫酸銅，請說明。	6. 感謝委員指正，是以 Cu 為濃度單位，已在報告中補充說明。。
(四)王世冠委員 1. 以 PICRUST 作為基因型變化預測之工具，其理論基礎及基本假設或通用性限制，在報告中或文獻回顧都未提及，建議補充說明 2. 以 <i>Methylobacterium aquaticum</i> 受 CuSO₄ 污染物之總轉錄體學功能性變化，評估污染源鑑識技術之了解性，是否需要選擇有硫酸銅污染之底泥樣品來驗證？尤其是觸發基因變化之硫酸銅濃度高達 100ppm，一般底泥是否有類似之暴露濃度？(老街溪水樣銅測值均偏低)	1. 感謝委員指正，會在期末報告時將 PICRUST 進行詳細說明。 2. 謝謝委員意見。由於老街溪歷年調查結果銅污染為大宗，因此選定銅做為計畫之選定污染物質，50 ppm 及 100 ppm 為造成菌種生長曲線差異，而低劑量雖然生長曲線沒有造成差異，但 RNA 表現可能和空白組有所差異，之後定序結果出來會再進行分析。
(五)楊喜男委員 1. 底泥重金屬含量建議以統計分析去拚訂五處採樣樣品是否有異常，而非以最高濃度出現點之方式表示。 2. 底泥粒徑平均值有差異，除對重金屬含量有影響外，對微生物菌相改變是否也有影響？ 3. 本計畫內實驗室測試只進行純菌暴露硫酸銅批次實驗，但野外底泥樣品除銅有差異外，鉻及鋅也有異常，未來如何去解析其餘金屬之影響？ 4. Page12 表 3-1 中污染排放口之相關資料只標示有或明	1. 謝謝委員指教，這五個採樣點為因應本次研究目的而特別選擇出來，用意是分析老街溪受工業區放流水上、下游之影響，目前尚無環保署歷年統計資料可供統計比較分析是否異常。 2. 謝謝委員建議，微生物菌相變化之原因是本計畫的研究重點，是否受底泥粒徑平均值影響一節，將待定序結果公布後一併分析。 3. 以現行技術尚未能夠解序底泥內混和菌群之 transcriptome，因此若要分別其他重金屬的影響，建議未來研究可以朝向特定重金屬抗性基因定量，或待定序 de novo assembly 技術較普及後以多環境變量分析 mRNA 變化。 4. 感謝委員建議，已進行修正。

以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(2/2)

5. 建議本年度為第二年計畫，建議如可能也將第一年計畫結果納入。	5. 感謝委員意見，已將第一年結果摘要列入章節中。
----------------------------------	---------------------------

附錄三 期末審查會議委員意見及廠商回覆意見表

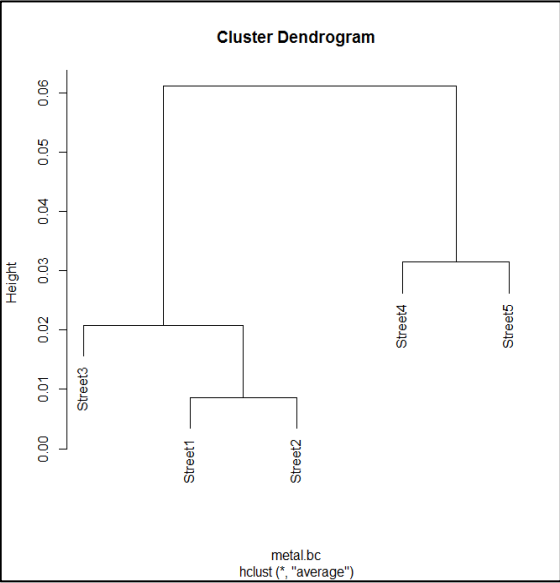
行政院環境保護署環境檢驗所委託研究計畫「以菌群分布作為鑑識污
染源技術建立(2/2)」期末審查會議廠商回覆意見表

委員意見	廠商意見回覆 (國立臺灣大學)
(一)吳俊宗委員 1. 本計畫為第二年，建議在摘要中能綜合二年間之具體成果，作一總結論，並提出具體建議事項，條列之。 2. 文獻格式有些不一致，請再核對修正之。 3. 報告中用 street、M，建議予以統一。 4. P.73-75 宜分別有圖說，只有 P.76 之說明不足 5. 水質分析結果中，M3-M5 具有高導電度，是金屬汙染或鹽度較高造成？請補充說明是否會影響結果 6. P.56-57、P. 65-66 宜調整版面。 7. 從功能性基因之結果看，似乎與離子傳輸及代謝之外，是否與細胞之耐抗性機能有關，建議多做分析	1. 感謝委員意見，已進行補正。 2. 感謝委員指正，已進行修正。 3. 感謝委員指正，已進行修正。 4. 感謝委員指正，已進行補充說明。 5. 感謝委員意見，以河川重金屬濃度來看，M3 點前後重金屬濃度並無明顯差異，但 M3 到 M5 點位氯離子、硫酸鹽、硝酸鹽濃度明顯高於上游兩個點位，推測這點才是造成導電度上升的主要原因。 6. 感謝委員指正，已進行修正。 7. 感謝委員意見，宏基因定序結果之序列比對以基因功能分類 GO (Gene Ontology)分析方法進行，其分類由第一階層的細胞成份(cellular component)、生物途徑(biological process)、及分子功能(molecular function)等三大類別開始，逐步細分至更明確的功能(如 GO Tree View 中的第 10-12 類別階層)。本次 GO 分析結果呈現以第 5-6 階層之功能類別為主，如 response to copper ion 或 cellular response to copper ion 等，然而抗性(resistance)機能的字詞並未被 GO 分析系統用於重金屬離子方面，而以壓力反應(stress response)表示，與細胞反應(cellular response)在同一分類階層，相關銅離子壓力反應(stress response to copper ion)的基因在老街溪 Street 1-5 樣品中皆有發現，並以整理於表中。

8. 底泥元素分析中 M1 樣本之 S、H 含量很高，請多作說明。	8. 感謝委員意見，依元素分析結果來看，在 M1 底泥 H、S 組成比例相較於其他點位有所差異，但參考其他水文與底泥數據，M1 點位並未有受到明顯污染的現象，推測其組成差異非屬污染所致，若要做出確切的解釋可能需要長期的數據來做判斷。
(二) 李俊福委員 1. 基本摘要內容請補述具體執行成果。 2. 報告大綱(鋼) 3. 針對 1.重金屬污染底泥中菌群分布的差異 2.篩選主要差異菌群建立與污染物相關性 3.以現地樣品驗證作為污染鑑識可行性等議題，研究難以達成預期目標之困難處，具體陳述。 4. 純菌暴露實驗為購買或自行純化馴養之菌種？ 5. P.45 Ref 應於第三章非第二章，P.93 亦有誤 6. 純菌暴露硫酸銅是否已進行後續定序作業？ 7. M3 採樣點銅濃度最高但底泥卻以 M4 最高(差 3 倍)中間是否有其他污染源？	1. 感謝委員指正，已進行補正。 2. 感謝委員指正，已進行修正。 3. 3.感謝委員意見，此兩年計畫目標對於菌群差異與現地樣品之可行性評估之目標皆已達成。由於此發展之技術分析及統計需時較長，比較現地樣品雖已獲得可用於污染鑑識之高度相關菌群及基因，但分析時間較長，現今主要應用方向可為 forensic analysis 為主，直接應用於現地即時監測可能受到分析時間限制。 4. 感謝委員意見，依第一年研究結果顯示，甲基氧化菌類(methylotrophs)在反應槽中受硫酸銅影響較顯著，因此購買 <i>Methylobacterium aquaticum</i> 此一菌屬進行培養。 5. 感謝委員指正，已進行修正。 6. 感謝委員意見，純菌暴露硫酸銅試驗已進行後續定序作業，最快預估一月能得到結果進行分析。 7. 感謝委員意見，M3 底泥採樣點為工業區放流口中央河段，且該點位河水流速相較於其他河段明顯湍急許多，推測河川中銅污染在較下游河段才開始淤積，而 M3 與 M4 點位僅相差約 700 公尺，故 M4 底泥銅濃度高於 M3 應屬合理。M3 與 M4 兩點間是否有其他污染以當時開車到定點採樣無法確認(兩點間河川旁空地多應為私有地)。

8. 菌群分析(菌門)為 street3 較接近 1 和 2 而非 4 ? 9. 兩種功能性基因之專一性如何 ?	8. 感謝委員意見，菌門分析結果顯示的確 street3 較接近於 street2 而非 street4，然而這是整體菌門分析的結果，而此 UPGMA 分析主要依據族群比例，不見得與環境污染相關。可能與環境現況相關。因此本計畫主要從菌群比例中以統計篩選部分受到排放的污染物影響導致所占比例大幅增減的微生物，尤其是 Hydrogenophilaceae 及 Gallionellaceae 受到放流口影響較高，而 Hydrogenophilaceae 菌門與第一年結果相符，在工業區放流口後豐度迅速減少，未來可能成為主要辨識菌群。 9. 感謝委員意見，此提問在環檢所提供之公文(環檢五字第 1070007915 號)中未列舉。並不十分了解「兩種功能性基因」所指為何？嘗試回覆如下：有關功能基因所表現之蛋白質功能專一性分析，曾有相關研究建議利用 GO 基因功能分析中 Tree View 的祖先(ancestor)後代(offspring)結點(node)所在處的祖先層數量(number of ancestors)、後代數量(number of offspring)、或基因功能比例(GOproportion)等計算表示專一性(Louie et al., 2010)。如果是針對生物途徑(biological process)和分子功能(molecular function)，由於後代數量及基因功能比例在最上層的節點處都相關高，因此專一性較不高，然而分析到第 6-7 階層，與銅離子相關的 cellular response 和 stress response to copper ion 基因在老街溪樣品中皆有發現，且進一步細步分類只有數種功能，如與 RNA 轉錄酶啟動子調控相關之功能(regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to copper ion)，此時專一性相對較高。
(三)柳家瑞委員 1. 預期目標及執行成效表 1-2 並未列目標項目對應的成效內容說明，請補正。	1. 感謝委員指正，已根據契約內容進行補正。

2. 現場採樣均為 5/26 執行，物化分析難反應是否長期受到金屬汙染，是否可引用環保署資訊網長期測值，用來對應老街溪微生物反應加以研析	2. 感謝委員意見，由於採樣點位與環保署紀錄不盡相同，未來可能有機會對照地理資訊並模擬水量參考研析。
3. 菌群及基因體學研究結果未加以討論其意義及後續方向(P.66 及 P.81)	3. 感謝委員意見，菌群的未來方向已於 p.66 說明，未來可將汙染區和非汙染區間的差異菌群做為辨識有無汙染存在的指標。基因預測結果的討論在 p.98 有提到。
4. 第五章結果與討論並未與蒐集的文獻做討論、比較。	4. 感謝委員意見，由於數據過於龐大因此目前呈現的是初步的分析結果，未來進一步深入分析會將試著與文獻進行比對。
5. 建議事項的理由及建議請更具體敘述。	5. 感謝委員指正，以進行補正。
6. 底泥採樣點名稱前後不一致，請統一。	6. 感謝委員指正，以進行修正。
(四) 黃王瑰委員	
1. 數據表示時需考量有效位數	1. 感謝委員指正，已進行修正。
2. 是否可以嘗試進行採樣點重金屬親緣關係樹狀圖與報告中與金屬相關性較高的菌種之親緣關係樹狀圖，二圖是否能相互呼應	2. 感謝委員意見，不同採樣點底泥重金屬組成之關係圖如下，上游 Street1 和 Street2 最相近，而下游 Street4 和 Street5 關係離上游及放流口高度差最多，和微生物菌門分析相似處為採樣點 1-3 較接近，而 4-5 可能為重金屬於下游沉澱至底泥，因此 4、5 樣點彼此較接近。

	
(五)楊喜男委員 1. 建議事項請改為條列式，主辦及協辦機關請刪除。 2. 建議附錄中增加報告中專有名詞，如 OTUs 之解釋。 3. 測站 M5 大園許厝港一號橋為感潮河段，鹽度是否對於 PICRUSt 表現基因造成影響 4. 報告請補充簡報 shotgun 菌群定序結果分類分析及基因表現豐度之分析 5. 結果與討論 5.1 蒐集文獻已於第三章背景文獻回顧說明，請刪除 5.1	1. 感謝委員指正，已進行修正。 2. 感謝委員意見，已將專有名詞解釋補充於內文之中，而 OTUs 的解釋補充於 P.59。 3. 感謝委員意見，鹽度在本次實驗中並未予以研究分析，或許的確可能造成了影響，但因為感潮河段僅有一點位樣品，較無法由現有結果評估。未來有機會可利用其他感潮河段底泥樣品族群比較是否有差異。 4. 感謝委員指正，已將 shotgun 菌群定序結果分類分析及基因表現豐度之分析補充於修正稿中。 5. 感謝委員指正，已進行修正。

附錄四 科技計畫成果效益事實報告表

107 年度科技計畫成果效益事實報告表

壹、計畫基本資料

領域別：_____

計畫主持人 童心欣、于昌平、郭獻文、蔡孟勳計畫名稱『以菌群分布作為鑑識污染源技術建立』

審議編號_____

計畫期程 107 年 03 月至 107 年 12 月全程經費 壹佰玖拾萬元 年度經費 億 千元執行機構 國立台灣大學環境工程學研究所

貳、計畫目的與預期成效

1. 蒐集國內外針對污染源鑑識、微生物總基因體學功能性基因及污染物與微生物生態變化之文獻資料。
2. 延續第一年之菌群分布結果，分析污染物所造成微生物功能性基因變化，並評估可利用於污染源鑑識之主要功能性基因。
3. 選取一主要污染河川，並於可能之污染源排放口上、下游區段採取底泥樣品，分別以菌群及功能性基因分析污染造成之變化結果，評估標的菌株及功能性基因作為污染源鑑識之可能性。

參、計畫目的主要內容

1. 蒐集國內外針對污染源鑑識、微生物總基因體學功能性基因及污染物與微生物生態變化之文獻資料。
 - (1) 蒐集重金屬污染之底泥環境中，微生物族群總基因體學與污染相關文獻。
 - (2) 蒐集重金屬暴露後，微生物功能性基因表現變化等相關文獻。
2. 延續第一年之菌群分布結果，以總轉錄體學方法分析污染物所造成微生物功

能性基因變化，並評估可利用於污染源鑑識之主要功能性基因。

(1)在實驗室以硫酸銅添加批次培養微生物，取其 RNA 並以總轉錄體學分析方法研析受硫酸銅影響之功能性基因

3. 選取一主要污染河川，並於可能之污染源排放口上、下游區段採取底泥樣品，分別以菌群及功能性基因分析污染造成之變化結果，評估標的菌株及功能性基因作為污染源鑑識之可能性。

(1)比對排放口上、下游之菌群差異。

(2)比對排放口上、下游之微生物基因體差異，並評估以此差異作為作為污染鑑識之可能性。

肆、計畫經費與人力

計畫名稱	執行情形	總人力(人年)	研究員級	副研究員級	助理研究員級	助理
以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(2/2)	原訂	4	2	2	0	1
	實際	4	2	2	0	3
	差異	0	0	0	0	原定專任研究助理改研究生兼任研究助理

伍、計畫已獲得知主要成就與成果(out put)

1. 老街溪工業區放流口之底泥菌群組成與上、下游差異大。經比較豐富度差異，並比對第一年成果，得到 Hydrogenophilaceae 對於工業區放流較敏感，未來可再深度評估其於不同地區之適用性。

2. 基因表現評估發現 Calcium signal pathway 與 Photosynthesis - antenna

proteins 兩種基因豐度與重金屬銅、鉻、錳的濃度相關性非常高，未來也可朝向此兩基因研發指標。

陸、評估計畫主要成就及成果之價值與貢獻(out come)

1. 學術成就(科學基礎研究)(權重 30%)

提出以菌相消長方式及表現基因豐度變化鑑識重金屬暴露的概念，並以次世代定序結果統計分析篩選出適當指標菌群及功能基因。

2. 技術創新(科技整合創新)(權重 30%)

利用次世代定序於污染源追蹤。

3. 經濟效益(產業經濟發展)(權重 0 %)

4. 社會影響(民生社會發展、環境安全永續)(權重 20%)

此研究可對於未來發展鑑識、污染源追蹤等科技幫助，追蹤不法排放及維護環境正義。

5. 非研究類成就(人才培育、法規制度、國際合作、推動輔導)(權重 20%)

此研究培育三位碩士研究生。

6. 其它效益(科技管理政策及其它)(權重 __%)

柒、與相關計畫之配合

此計畫為先導型研究，目前尚無其他相關計畫配合

捌、後續工作構想及重點

1. 未來將以此計畫所篩選出的菌群及表現基因，研析其在不同現地條件下驗證方法。

2. 可持續收集河川水樣、底泥微生物相資料，以利未來生態系評估。

玖、檢討會與建議

1. 建議未來持續蒐集環境數據及微生物等相關資訊，以增加分析結果精確性。建議彙整全國河川底泥、土壤相關資訊，以建立完善的微生物生態及環境污染物資料庫。
2. 因次世代定序分析整理須長時間進行，建議未來此類研究項目時程可以不受年度限制，以較長時間進行。可得到更深度的分析結果

填表人：_____ 連絡電話：_____ 傳真：_____

附錄五 科技計畫成果效益自評表

107 年度科技計畫成果效益自評表

壹、計畫基本資料

領域別：_____

計畫主持人 童心欣、于昌平、郭獻文、蔡孟勳計畫名稱『以菌群分布作為鑑識污染源技術建立』

審議編號_____

計畫期程 107 年 03 月 至 107 年 12 月全程經費 壹佰玖拾萬元 年度經費 億 千元執行機構 國立台灣大學環境工程學研究所

貳、計畫目標與執行內容是否符合(如有差異，請說明)

計畫目標與內容相符

參、計畫已獲得知主要成就與成果

1. 由菌群分析可得知 Microscillaceae、Geobacteraceae、Hydrogenophilaceae、Gallionellaceae 等菌門在工業區放流口上、下游變化較大，其中 Hydrogenophilaceae 與第一年模擬反應槽研究相符，未來可最為主要辨識潛力菌群。
2. 由 PICRUSt 模擬分析顯示，Calcium signal pathway 與 Photosynthesis - antenna proteins 兩種基因豐度與重金屬銅、鉻、錳的濃度相關性非常高，此兩表現基因也有可能成為污染鑑識標的。
3. 由總基因體分析得知與主要與重金屬相關之基因眾多，但在工業區排放口上、下游主要差異為 ATPase activity (transporting or exporting) 基因。

肆、計畫主要成就與成果之價值與貢獻度(out put)

延續第一年提出以菌相消長方式鑑識重金屬暴露的概念，並以次世代定序結果統計分析篩選出適當指標菌群。並以功能性基因分析獲得主要變化基因，未來此計畫結果可應用於發展鑑識方法、污染源追蹤等科技。

伍、評估計畫主要成就及成果之價值與貢獻(out come)

此計畫主要貢獻在於獲得遭受工業區排放影響之功能性基因變化，未來有機會以此類功能型基因變化作為污染源辨識方法。

陸、與相關計畫之配合程度

此計畫為先導型研究，目前尚無其他相關計畫配合

柒、計畫經費的適足性與人力運用的適善性

計畫人力配置及經費皆適宜。

捌、後續工作構想及重點之妥適性

1. 未來可持續蒐集環境數據及微生物等相關資訊，以增加分析結果精確性。
2. 實驗結果發現選定放流口上下游採樣點與微生物族群之間的關係差異，並篩選出未來可成為指標之菌群及基因群。未來可依此方向於不同地點及不同污染進行現地驗證，並檢視其作為鑑識指標之適地性。

玖、檢討會與建議

1. 建議未來持續蒐集環境數據及微生物等相關資訊，以增加分析結果精確性。建議彙整全國河川底泥、土壤相關資訊，以建立完善的微生物生態及環境污染物資料庫。

2. 由於總基因體分析目前序列組裝及統計部分曠日廢時，建議未來應用方向為特殊環境法醫事件，短期內較不適用於現地即時監測。

計畫主持人簽名：_____

填表人：_____ 連絡電話：_____

.....
主管部會評估意見：

主管簽名：_____

以菌群分布作為鑑識污染源技術建立(2/2)

附錄六 以 PICRUS_t 評估底泥中功能性基因在各樣品中之豐度

#Level_1	Level_2	Level_3	Observation Ids	Street.1	Street.2	Street.3	Street.4	Street.5
Cellular Processes	Cell Communication	Adherens junction	Adherens junction	6	1	1	1	2
Cellular Processes	Cell Growth and Death	Apoptosis	Apoptosis	1870	1409	964	2197	3608
Cellular Processes	Cell Motility	Bacterial chemotaxis	Bacterial chemotaxis	432918	648629	304395	310687	373506
Cellular Processes	Cell Motility	Bacterial motility proteins	Bacterial motility proteins	1022941	1259288	709089	791822	907247
Cellular Processes	Cell Growth and Death	Cell cycle	Cell cycle	878	454	939	134	72
Cellular Processes	Cell Growth and Death	Cell cycle - Caulobacter	Cell cycle - Caulobacter	248063	284698	159130	215009	213887
Cellular Processes	Cell Growth and Death	Cell cycle - yeast	Cell cycle - yeast	0	0	0	0	0
Cellular Processes	Cell Motility	Cytoskeleton proteins	Cytoskeleton proteins	128987	163554	83551	110166	102405
Cellular Processes	Transport and Catabolism	Endocytosis	Endocytosis	16	9	10	16	34
Cellular Processes	Cell Motility	Flagellar assembly	Flagellar assembly	390533	479256	293882	259713	368027
Cellular Processes	Cell Communication	Focal adhesion	Focal adhesion	18	11	15	21	29
Cellular Processes	Transport and Catabolism	Lysosome	Lysosome	25694	13340	10457	23954	21529
Cellular Processes	Cell Growth and Death	Meiosis - yeast	Meiosis - yeast	23285	19337	13647	26877	12854
Cellular Processes	Cell Growth and Death	Oocyte meiosis	Oocyte meiosis	0	0	0	1	0
Cellular Processes	Cell Growth and Death	p53 signaling pathway	p53 signaling pathway	2225	1394	1014	2538	1540
Cellular Processes	Transport and Catabolism	Peroxisome	Peroxisome	111818	97995	71200	98433	130294
Cellular Processes	Transport and Catabolism	Phagosome	Phagosome	334	206	65	107	21
Cellular Processes	Cell Motility	Regulation of actin cytoskeleton	Regulation of actin cytoskeleton	6	1	1	1	2
Cellular Processes	Cell Communication	Tight junction	Tight junction	6	1	1	1	2
Environmental Information Processin	Membrane Transport	ABC transporters	ABC transporters	1320660	1242014	849723	1084773	1173836
Environmental Information Processin	Membrane Transport	Bacterial secretion system	Bacterial secretion system	360704	448221	254964	293591	410736
Environmental Information Processin	Signaling Molecules and Interaction	Bacterial toxins	Bacterial toxins	31117	26449	18733	23468	30368
Environmental Information Processin	Signal Transduction	Calcium signaling pathway	Calcium signaling pathway	1014	672	90	3253	175
Environmental Information Processin	Signaling Molecules and Interaction	CAM ligands	CAM ligands	12	10	14	20	27
Environmental Information Processin	Signaling Molecules and Interaction	Cellular antigens	Cellular antigens	26642	23428	16209	30858	49830
Environmental Information Processin	Signaling Molecules and Interaction	Cytokine receptors	Cytokine receptors	0	0	0	0	0
Environmental Information Processin	Signaling Molecules and Interaction	Cytokine-cytokine receptor interaction	Cytokine-cytokine receptor intera	0	0	0	0	0
Environmental Information Processin	Signaling Molecules and Interaction	ECM-receptor interaction	ECM-receptor interaction	12	10	14	20	27
Environmental Information Processin	Signal Transduction	ErbB signaling pathway	ErbB signaling pathway	0	0	0	1	0
Environmental Information Processin	Signaling Molecules and Interaction	G protein-coupled receptors	G protein-coupled receptors	2	3	1	15	6
Environmental Information Processin	Signaling Molecules and Interaction	Glycan bindng proteins	Glycan bindng proteins	35	9	17	34	24
Environmental Information Processin	Signaling Molecules and Interaction	GTP-binding proteins	GTP-binding proteins	0	0	0	0	0
Environmental Information Processin	Signal Transduction	Hedgehog signaling pathway	Hedgehog signaling pathway	0	0	0	0	0
Environmental Information Processin	Signaling Molecules and Interaction	Ion channels	Ion channels	5777	2765	2233	6843	7993
Environmental Information Processin	Signal Transduction	MAPK signaling pathway	MAPK signaling pathway	0	0	0	0	0

Environmental Information Processing	Signal Transduction	MAPK signaling pathway - yeast	MAPK signaling pathway - yeast	14032	8236	8284	16515	14549
Environmental Information Processing	Signal Transduction	mTOR signaling pathway	mTOR signaling pathway	878	454	939	134	72
Environmental Information Processing	Signaling Molecules and Interaction	Neuroactive ligand-receptor interaction	Neuroactive ligand-receptor interaction	1	0	1	1	2
Environmental Information Processing	Signal Transduction	Notch signaling pathway	Notch signaling pathway	40	30	9	41	14
Environmental Information Processing	Signal Transduction	Phosphatidylinositol signaling system	Phosphatidylinositol signaling system	59094	58360	39602	52387	43137
Environmental Information Processing	Membrane Transport	Phosphotransferase system (PTS)	Phosphotransferase system (PTS)	23927	16098	16504	21859	29541
Environmental Information Processing	Membrane Transport	Secretion system	Secretion system	844714	905408	566072	711427	918884
Environmental Information Processing	Signal Transduction	TGF-beta signaling pathway	TGF-beta signaling pathway	0	0	0	0	0
Environmental Information Processing	Membrane Transport	Transporters	Transporters	2176041	1967511	1373374	1739634	1899947
Environmental Information Processing	Signal Transduction	Two-component system	Two-component system	1127210	1263878	733926	956534	1012993
Environmental Information Processing	Signal Transduction	VEGF signaling pathway	VEGF signaling pathway	3	3	1	3	4
Environmental Information Processing	Signal Transduction	Wnt signaling pathway	Wnt signaling pathway	40	30	9	42	14
Genetic Information Processing	Translation	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	526779	532280	357258	437052	419658
Genetic Information Processing	Transcription	Basal transcription factors	Basal transcription factors	4563	2284	4097	1233	3003
Genetic Information Processing	Replication and Repair	Base excision repair	Base excision repair	186606	177436	120367	159919	173692
Genetic Information Processing	Folding, Sorting and Degradation	Chaperones and folding catalysts	Chaperones and folding catalysts	504238	490810	323402	453969	458190
Genetic Information Processing	Replication and Repair	Chromosome	Chromosome	609570	609954	393850	579822	613795
Genetic Information Processing	Replication and Repair	DNA repair and recombination proteins	DNA repair and recombination proteins	1154196	1145106	749008	1031068	1084086
Genetic Information Processing	Replication and Repair	DNA replication	DNA replication	269054	286912	183450	234429	253974
Genetic Information Processing	Replication and Repair	DNA replication proteins	DNA replication proteins	449589	451305	298188	402447	430041
Genetic Information Processing	Replication and Repair	Homologous recombination	Homologous recombination	367065	379592	242166	324964	347740
Genetic Information Processing	Replication and Repair	Mismatch repair	Mismatch repair	335535	366836	223119	290725	291799
Genetic Information Processing	Translation	mRNA surveillance pathway	mRNA surveillance pathway	3159	1179	2473	591	407
Genetic Information Processing	Replication and Repair	Non-homologous end-joining	Non-homologous end-joining	13912	6204	6879	8747	15901
Genetic Information Processing	Replication and Repair	Nucleotide excision repair	Nucleotide excision repair	158432	150209	104261	132473	140779
Genetic Information Processing	Folding, Sorting and Degradation	Proteasome	Proteasome	23638	19209	15388	16361	16511
Genetic Information Processing	Folding, Sorting and Degradation	Protein export	Protein export	266648	274197	182187	230029	235398
Genetic Information Processing	Folding, Sorting and Degradation	Protein processing in endoplasmic reticulum	Protein processing in endoplasmic reticulum	60748	66082	38843	45460	34470
Genetic Information Processing	Translation	Ribosome	Ribosome	960815	966378	653950	830487	842078
Genetic Information Processing	Translation	Ribosome Biogenesis	Ribosome Biogenesis	560900	576373	378287	504796	560923
Genetic Information Processing	Translation	Ribosome biogenesis in eukaryotes	Ribosome biogenesis in eukaryotes	24270	22801	16270	20991	24332
Genetic Information Processing	Folding, Sorting and Degradation	RNA degradation	RNA degradation	219011	219206	139715	207255	208306
Genetic Information Processing	Transcription	RNA polymerase	RNA polymerase	73259	71821	50357	61254	55928
Genetic Information Processing	Translation	RNA transport	RNA transport	72276	73643	50377	51393	64669
Genetic Information Processing	Transcription	Spliceosome	Spliceosome	220	40	794	346	108
Genetic Information Processing	Folding, Sorting and Degradation	Sulfur relay system	Sulfur relay system	207824	217285	132493	159749	142880

Genetic Information Processing	Transcription	Transcription factors	Transcription factors	524005	501951	335303	431176	590903
Genetic Information Processing	Transcription	Transcription machinery	Transcription machinery	394053	339061	241306	338363	361803
Genetic Information Processing	Translation	Translation factors	Translation factors	229116	217957	151432	196104	203805
Genetic Information Processing	Folding, Sorting and Degradation	Ubiquitin system	Ubiquitin system	9394	4006	4847	7280	4453
Human Diseases	Infectious Diseases	African trypanosomiasis	African trypanosomiasis	5542	3563	2730	4258	13918
Human Diseases	Neurodegenerative Diseases	Alzheimer's disease	Alzheimer's disease	53158	69306	40153	42499	55327
Human Diseases	Infectious Diseases	Amoebiasis	Amoebiasis	7236	4677	3916	6507	6871
Human Diseases	Neurodegenerative Diseases	Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	Amyotrophic lateral sclerosis (AL	9735	6438	5659	9329	19761
Human Diseases	Cardiovascular Diseases	Arrhythmogenic right ventricular card	Arrhythmogenic right ventricular	6	1	1	1	2
Human Diseases	Infectious Diseases	Bacterial invasion of epithelial cells	Bacterial invasion of epithelial ce	1316	847	173	3507	291
Human Diseases	Cancers	Bladder cancer	Bladder cancer	1011	601	577	843	4206
Human Diseases	Infectious Diseases	Chagas disease (American trypanosom	Chagas disease (American trypan	4798	3273	2536	4105	11001
Human Diseases	Cancers	Chronic myeloid leukemia	Chronic myeloid leukemia	40	30	9	41	14
Human Diseases	Cancers	Colorectal cancer	Colorectal cancer	1519	1126	791	1776	1140
Human Diseases	Cardiovascular Diseases	Dilated cardiomyopathy (DCM)	Dilated cardiomyopathy (DCM)	6	1	1	1	2
Human Diseases	Infectious Diseases	Epithelial cell signaling in Helicobacte	Epithelial cell signaling in Helico	23255	21657	15157	23784	26839
Human Diseases	Cancers	Glioma	Glioma	0	0	0	1	0
Human Diseases	Infectious Diseases	Hepatitis C	Hepatitis C	878	454	939	134	72
Human Diseases	Neurodegenerative Diseases	Huntington's disease	Huntington's disease	54948	69831	39619	41295	48975
Human Diseases	Cardiovascular Diseases	Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)	Hypertrophic cardiomyopathy (H	342	163	166	252	321
Human Diseases	Infectious Diseases	Influenza A	Influenza A	2404	1581	1732	1912	1216
Human Diseases	Infectious Diseases	Leishmaniasis	Leishmaniasis	3	3	1	3	4
Human Diseases	Infectious Diseases	Measles	Measles	878	454	939	134	72
Human Diseases	Cancers	Pancreatic cancer	Pancreatic cancer	0	0	0	0	0
Human Diseases	Neurodegenerative Diseases	Parkinson's disease	Parkinson's disease	27267	38796	21901	19110	21255
Human Diseases	Infectious Diseases	Pathogenic Escherichia coli infection	Pathogenic Escherichia coli infec	6	1	1	1	2
Human Diseases	Cancers	Pathways in cancer	Pathways in cancer	29490	33348	20916	28285	26067
Human Diseases	Infectious Diseases	Pertussis	Pertussis	25685	46402	17977	19669	26700
Human Diseases	Immune System Diseases	Primary immunodeficiency	Primary immunodeficiency	15577	16999	10032	14653	22154
Human Diseases	Neurodegenerative Diseases	Prion diseases	Prion diseases	2521	1697	1765	1793	6194
Human Diseases	Cancers	Prostate cancer	Prostate cancer	15078	16780	10397	14347	14906
Human Diseases	Cancers	Renal cell carcinoma	Renal cell carcinoma	12839	15400	9704	12098	9976
Human Diseases	Immune System Diseases	Rheumatoid arthritis	Rheumatoid arthritis	0	0	0	0	0
Human Diseases	Infectious Diseases	Shigellosis	Shigellosis	6	1	1	1	2
Human Diseases	Cancers	Small cell lung cancer	Small cell lung cancer	1534	1138	806	1799	1171
Human Diseases	Infectious Diseases	Staphylococcus aureus infection	Staphylococcus aureus infection	576	320	231	575	821

Human Diseases	Immune System Diseases	Systemic lupus erythematosus	Systemic lupus erythematosus	163	106	56	268	371
Human Diseases	Infectious Diseases	Toxoplasmosis	Toxoplasmosis	1519	1126	791	1776	1143
Human Diseases	Infectious Diseases	Tuberculosis	Tuberculosis	85170	71455	47709	80634	63176
Human Diseases	Metabolic Diseases	Type I diabetes mellitus	Type I diabetes mellitus	24587	21745	13849	20720	20227
Human Diseases	Metabolic Diseases	Type II diabetes mellitus	Type II diabetes mellitus	22429	21375	12779	20643	21851
Human Diseases	Infectious Diseases	Vibrio cholerae infection	Vibrio cholerae infection	783	655	315	276	310
Human Diseases	Infectious Diseases	Vibrio cholerae pathogenic cycle	Vibrio cholerae pathogenic cycle	55243	59172	34305	51105	53785
Human Diseases	Cardiovascular Diseases	Viral myocarditis	Viral myocarditis	1525	1127	792	1777	1142
Metabolism	Xenobiotics Biodegradation and Metabolism	1,1,1-Trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane	1,1,1-Trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane	751	521	393	724	418
Metabolism	Amino Acid Metabolism	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	439761	422641	288934	374279	414807
Metabolism	Lipid Metabolism	alpha-Linolenic acid metabolism	alpha-Linolenic acid metabolism	17412	18024	11932	13445	19592
Metabolism	Amino Acid Metabolism	Amino acid related enzymes	Amino acid related enzymes	659767	648109	444912	559278	615707
Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	546433	529557	345749	442373	438779
Metabolism	Xenobiotics Biodegradation and Metabolism	Aminobenzoate degradation	Aminobenzoate degradation	110789	65867	69328	103680	132747
Metabolism	Lipid Metabolism	Arachidonic acid metabolism	Arachidonic acid metabolism	23415	21208	13972	27842	40842
Metabolism	Amino Acid Metabolism	Arginine and proline metabolism	Arginine and proline metabolism	555555	520420	361558	493704	527473
Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Ascorbate and aldarate metabolism	Ascorbate and aldarate metabolism	51738	44723	29462	45177	64790
Metabolism	Xenobiotics Biodegradation and Metabolism	Atrazine degradation	Atrazine degradation	28577	25623	16858	24105	25683
Metabolism	Xenobiotics Biodegradation and Metabolism	Benzoate degradation	Benzoate degradation	142711	86785	97854	135522	191666
Metabolism	Metabolism of Other Amino Acids	beta-Alanine metabolism	beta-Alanine metabolism	138211	104155	90473	126573	164147
Metabolism	Biosynthesis of Other Secondary Metabolites	beta-Lactam resistance	beta-Lactam resistance	11665	5810	4933	13322	17506
Metabolism	Biosynthesis of Other Secondary Metabolites	Betalain biosynthesis	Betalain biosynthesis	2696	1993	2492	1146	2984
Metabolism	Metabolism of Terpenoids and Polyketides	Biosynthesis of 12-, 14- and 16-membered macrolides	Biosynthesis of 12-, 14- and 16-membered macrolides	115	114	36	156	231
Metabolism	Metabolism of Terpenoids and Polyketides	Biosynthesis of ansamycins	Biosynthesis of ansamycins	34105	33704	23930	25625	32791
Metabolism	Metabolism of Terpenoids and Polyketides	Biosynthesis of siderophore group nonribosomal peptides	Biosynthesis of siderophore group nonribosomal peptides	15690	17288	10921	15061	20673
Metabolism	Metabolism of Terpenoids and Polyketides	Biosynthesis of type II polyketide backbones	Biosynthesis of type II polyketide backbones	0	3	0	0	3
Metabolism	Metabolism of Terpenoids and Polyketides	Biosynthesis of type II polyketide products	Biosynthesis of type II polyketide products	3900	3583	2609	888	907
Metabolism	Lipid Metabolism	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	103897	63831	62079	86687	106860
Metabolism	Metabolism of Terpenoids and Polyketides	Biosynthesis of vancomycin group antibiotics	Biosynthesis of vancomycin group antibiotics	38663	43927	24536	29231	29250
Metabolism	Metabolism of Cofactors and Vitamins	Biotin metabolism	Biotin metabolism	89690	102111	62454	79355	91559
Metabolism	Xenobiotics Biodegradation and Metabolism	Bisphenol degradation	Bisphenol degradation	31730	25829	18018	27203	35022
Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Butanoate metabolism	Butanoate metabolism	387596	333323	253707	309405	404752
Metabolism	Biosynthesis of Other Secondary Metabolites	Butirosin and neomycin biosynthesis	Butirosin and neomycin biosynthesis	24979	22984	16602	21382	11750
Metabolism	Carbohydrate Metabolism	C5-Branched dibasic acid metabolism	C5-Branched dibasic acid metabolism	162183	160996	106902	127809	126703
Metabolism	Biosynthesis of Other Secondary Metabolites	Caffeine metabolism	Caffeine metabolism	132	93	102	265	186
Metabolism	Xenobiotics Biodegradation and Metabolism	Caprolactam degradation	Caprolactam degradation	53102	30230	31364	47400	63869

Metabolism	Energy Metabolism	Carbon fixation in photosynthetic orga	Carbon fixation in photosynthetic	278061	264487	181194	245439	238424
Metabolism	Energy Metabolism	Carbon fixation pathways in prokaryot	Carbon fixation pathways in prok	615588	621874	415538	462258	509142
Metabolism	Metabolism of Terpenoids and Polyk	Carotenoid biosynthesis	Carotenoid biosynthesis	30784	20544	19482	40572	28711
Metabolism	Xenobiotics Biodegradation and Met	Chloroalkane and chloroalkene degrad	Chloroalkane and chloroalkene de	96570	85766	51280	86839	93786
Metabolism	Xenobiotics Biodegradation and Met	Chlorocyclohexane and chlorobenzene	Chlorocyclohexane and chlorober	27670	16243	17114	33045	22246
Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Citrate cycle (TCA cycle)	Citrate cycle (TCA cycle)	480037	530920	343017	337809	374168
Metabolism	Biosynthesis of Other Secondary Me	Clavulanic acid biosynthesis	Clavulanic acid biosynthesis	2	6	2	2	2
Metabolism	Metabolism of Other Amino Acids	Cyanoamino acid metabolism	Cyanoamino acid metabolism	80002	71794	49895	82120	92977
Metabolism	Amino Acid Metabolism	Cysteine and methionine metabolism	Cysteine and methionine metabol	399254	390419	261123	351720	371309
Metabolism	Enzyme Families	Cytochrome P450	Cytochrome P450	31	26	17	41	55
Metabolism	Metabolism of Other Amino Acids	D-Alanine metabolism	D-Alanine metabolism	40487	38235	29181	35904	38815
Metabolism	Metabolism of Other Amino Acids	D-Arginine and D-ornithine metabolis	D-Arginine and D-ornithine meta	4564	2579	3530	4440	2302
Metabolism	Metabolism of Other Amino Acids	D-Glutamine and D-glutamate metabo	D-Glutamine and D-glutamate me	62500	59495	40786	55691	59612
Metabolism	Xenobiotics Biodegradation and Met	Dioxin degradation	Dioxin degradation	21989	13423	12644	24082	18379
Metabolism	Xenobiotics Biodegradation and Met	Drug metabolism - cytochrome P450	Drug metabolism - cytochrome P	49071	29945	26756	57734	62734
Metabolism	Xenobiotics Biodegradation and Met	Drug metabolism - other enzymes	Drug metabolism - other enzymes	89783	69033	58432	76381	107639
Metabolism	Lipid Metabolism	Ether lipid metabolism	Ether lipid metabolism	2967	1494	1241	2112	9445
Metabolism	Xenobiotics Biodegradation and Met	Ethylbenzene degradation	Ethylbenzene degradation	23800	13904	17017	21657	39160
Metabolism	Lipid Metabolism	Fatty acid biosynthesis	Fatty acid biosynthesis	262762	223845	166214	221695	266352
Metabolism	Lipid Metabolism	Fatty acid elongation in mitochondria	Fatty acid elongation in mitochon	53	23	9	120	26
Metabolism	Lipid Metabolism	Fatty acid metabolism	Fatty acid metabolism	217067	153840	134395	192322	251445
Metabolism	Biosynthesis of Other Secondary Me	Flavone and flavonol biosynthesis	Flavone and flavonol biosynthesis	1431	432	1241	1149	581
Metabolism	Biosynthesis of Other Secondary Me	Flavonoid biosynthesis	Flavonoid biosynthesis	10099	5854	3298	10731	4499
Metabolism	Xenobiotics Biodegradation and Met	Fluorobenzoate degradation	Fluorobenzoate degradation	12491	7754	7007	15337	13114
Metabolism	Metabolism of Cofactors and Vitami	Folate biosynthesis	Folate biosynthesis	240220	245516	160105	201112	210474
Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Fructose and mannose metabolism	Fructose and mannose metabolism	274126	250316	172965	234685	226415
Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Galactose metabolism	Galactose metabolism	184315	156796	112682	140299	140644
Metabolism	Metabolism of Terpenoids and Polyk	Geraniol degradation	Geraniol degradation	80426	45674	49134	75561	110002
Metabolism	Metabolism of Other Amino Acids	Glutathione metabolism	Glutathione metabolism	147453	132218	94593	159936	184929
Metabolism	Lipid Metabolism	Glycerolipid metabolism	Glycerolipid metabolism	152081	131540	96588	124698	125362
Metabolism	Lipid Metabolism	Glycerophospholipid metabolism	Glycerophospholipid metabolism	264098	276975	179558	203661	228090
Metabolism	Amino Acid Metabolism	Glycine, serine and threonine metabol	Glycine, serine and threonine met	394492	377386	256823	333796	432508
Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Glycolysis / Gluconeogenesis	Glycolysis / Gluconeogenesis	537070	522754	359510	436675	445482
Metabolism	Glycan Biosynthesis and Metabolism	Glycosaminoglycan biosynthesis - cho	Glycosaminoglycan biosynthesis -	0	0	0	0	0
Metabolism	Glycan Biosynthesis and Metabolism	Glycosaminoglycan degradation	Glycosaminoglycan degradation	14049	7187	6411	13299	10953
Metabolism	Glycan Biosynthesis and Metabolism	Glycosphingolipid biosynthesis - gang	Glycosphingolipid biosynthesis -	8872	4925	4369	9260	9274

Metabolism	Glycan Biosynthesis and Metabolism	Glycosphingolipid biosynthesis - glob	Glycosphingolipid biosynthesis -	27436	19715	15300	17272	14997
Metabolism	Glycan Biosynthesis and Metabolism	Glycosphingolipid biosynthesis - lacto	Glycosphingolipid biosynthesis -	50	43	35	59	2124
Metabolism	Glycan Biosynthesis and Metabolism	Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-and	Glycosylphosphatidylinositol(GPI	21	11	8	34	14
Metabolism	Glycan Biosynthesis and Metabolism	Glycosyltransferases	Glycosyltransferases	200695	179000	120411	172229	168470
Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Glyoxylate and dicarboxylate metabol	Glyoxylate and dicarboxylate met	299029	252441	196275	260912	324415
Metabolism	Amino Acid Metabolism	Histidine metabolism	Histidine metabolism	280684	248954	187491	241673	282646
Metabolism	Biosynthesis of Other Secondary Me	Indole alkaloid biosynthesis	Indole alkaloid biosynthesis	2684	1979	2485	1135	2769
Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Inositol phosphate metabolism	Inositol phosphate metabolism	77622	65696	53276	54982	78756
Metabolism	Biosynthesis of Other Secondary Me	Isoflavonoid biosynthesis	Isoflavonoid biosynthesis	197	83	84	92	61
Metabolism	Biosynthesis of Other Secondary Me	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	32286	26472	20263	26668	33357
Metabolism	Metabolism of Terpenoids and Polyk	Limonene and pinene degradation	Limonene and pinene degradation	87164	49084	55883	82421	133336
Metabolism	Lipid Metabolism	Linoleic acid metabolism	Linoleic acid metabolism	22157	19998	11740	18272	28887
Metabolism	Lipid Metabolism	Lipid biosynthesis proteins	Lipid biosynthesis proteins	365406	295044	231523	308043	353202
Metabolism	Metabolism of Cofactors and Vitami	Lipoic acid metabolism	Lipoic acid metabolism	32026	18179	20949	36783	31006
Metabolism	Glycan Biosynthesis and Metabolism	Lipopolysaccharide biosynthesis	Lipopolysaccharide biosynthesis	248015	273337	170433	197757	219118
Metabolism	Glycan Biosynthesis and Metabolism	Lipopolysaccharide biosynthesis prote	Lipopolysaccharide biosynthesis p	310577	339256	214473	240905	276093
Metabolism	Amino Acid Metabolism	Lysine biosynthesis	Lysine biosynthesis	315525	314198	207243	254528	265503
Metabolism	Amino Acid Metabolism	Lysine degradation	Lysine degradation	139422	104723	92169	125350	186054
Metabolism	Xenobiotics Biodegradation and Met	Metabolism of xenobiotics by cytochr	Metabolism of xenobiotics by cyt	46611	28912	25396	54506	59861
Metabolism	Energy Metabolism	Methane metabolism	Methane metabolism	604681	554134	378028	449305	428211
Metabolism	Xenobiotics Biodegradation and Met	Naphthalene degradation	Naphthalene degradation	64677	38033	38674	64851	85898
Metabolism	Glycan Biosynthesis and Metabolism	N-Glycan biosynthesis	N-Glycan biosynthesis	36890	29753	21078	22290	19991
Metabolism	Metabolism of Cofactors and Vitami	Nicotinate and nicotinamide metabolis	Nicotinate and nicotinamide meta	183490	167086	121368	168876	172996
Metabolism	Energy Metabolism	Nitrogen metabolism	Nitrogen metabolism	476064	642019	333269	374929	397285
Metabolism	Xenobiotics Biodegradation and Met	Nitrotoluene degradation	Nitrotoluene degradation	99631	113723	61858	50312	41414
Metabolism	Biosynthesis of Other Secondary Me	Novobiocin biosynthesis	Novobiocin biosynthesis	69454	63552	45126	55652	61250
Metabolism	Metabolism of Cofactors and Vitami	One carbon pool by folate	One carbon pool by folate	242042	242416	162097	215004	233142
Metabolism	Glycan Biosynthesis and Metabolism	Other glycan degradation	Other glycan degradation	46057	27338	22433	47270	33230
Metabolism	Glycan Biosynthesis and Metabolism	Other types of O-glycan biosynthesis	Other types of O-glycan biosynth	0	0	0	0	0
Metabolism	Energy Metabolism	Oxidative phosphorylation	Oxidative phosphorylation	802413	779320	541183	633601	659171
Metabolism	Metabolism of Cofactors and Vitami	Pantothenate and CoA biosynthesis	Pantothenate and CoA biosynthes	275657	266893	179299	238271	253990
Metabolism	Biosynthesis of Other Secondary Me	Penicillin and cephalosporin biosynthe	Penicillin and cephalosporin biosy	26401	16553	15034	20772	32159
Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Pentose and glucuronate interconversio	Pentose and glucuronate intercony	160757	125098	94656	118871	134039
Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Pentose phosphate pathway	Pentose phosphate pathway	317270	273783	203792	276940	281250
Metabolism	Enzyme Families	Peptidases	Peptidases	732589	682202	463994	670418	714720
Metabolism	Glycan Biosynthesis and Metabolism	Peptidoglycan biosynthesis	Peptidoglycan biosynthesis	305645	298753	200806	278925	289968

Metabolism	Amino Acid Metabolism	Phenylalanine metabolism	Phenylalanine metabolism	137128	95774	84814	121403	156259
Metabolism	Amino Acid Metabolism	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan	378076	366224	251726	320841	327583
Metabolism	Biosynthesis of Other Secondary Metabolites	Phenylpropanoid biosynthesis	Phenylpropanoid biosynthesis	40599	24706	23304	42677	40244
Metabolism	Metabolism of Other Amino Acids	Phosphonate and phosphinate metabolism	Phosphonate and phosphinate metabolism	20833	21102	13796	18144	33265
Metabolism	Energy Metabolism	Photosynthesis	Photosynthesis	208321	193199	101403	315955	140760
Metabolism	Energy Metabolism	Photosynthesis - antenna proteins	Photosynthesis - antenna proteins	15783	10817	1098	54683	2690
Metabolism	Energy Metabolism	Photosynthesis proteins	Photosynthesis proteins	231779	207948	107486	379586	149610
Metabolism	Xenobiotics Biodegradation and Metabolism	Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation	Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation	47269	35640	31783	48071	40998
Metabolism	Metabolism of Terpenoids and Polyketides	Polyketide sugar unit biosynthesis	Polyketide sugar unit biosynthesis	102937	110952	65461	87031	87693
Metabolism	Metabolism of Cofactors and Vitamins	Porphyrin and chlorophyll metabolism	Porphyrin and chlorophyll metabolism	489757	464728	297861	482617	425076
Metabolism	Metabolism of Terpenoids and Polyketides	Prenyltransferases	Prenyltransferases	169707	147592	111679	160650	150948
Metabolism	Lipid Metabolism	Primary bile acid biosynthesis	Primary bile acid biosynthesis	3736	3465	2246	3803	1931
Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Propanoate metabolism	Propanoate metabolism	366182	309367	251326	292989	381895
Metabolism	Enzyme Families	Protein kinases	Protein kinases	206310	227399	128096	205595	177114
Metabolism	Nucleotide Metabolism	Purine metabolism	Purine metabolism	995690	1017248	675354	851965	904259
Metabolism	Nucleotide Metabolism	Pyrimidine metabolism	Pyrimidine metabolism	695451	700674	467206	608428	676662
Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Pyruvate metabolism	Pyruvate metabolism	546145	499770	364248	445437	480335
Metabolism	Metabolism of Cofactors and Vitamins	Retinol metabolism	Retinol metabolism	29154	17860	14291	27802	24016
Metabolism	Metabolism of Cofactors and Vitamins	Riboflavin metabolism	Riboflavin metabolism	129352	131547	86113	120740	121452
Metabolism	Lipid Metabolism	Secondary bile acid biosynthesis	Secondary bile acid biosynthesis	671	827	371	2278	482
Metabolism	Metabolism of Other Amino Acids	Selenocompound metabolism	Selenocompound metabolism	180602	176687	124066	151430	162738
Metabolism	Metabolism of Terpenoids and Polyketides	Sesquiterpenoid biosynthesis	Sesquiterpenoid biosynthesis	1	0	1	0	4
Metabolism	Lipid Metabolism	Sphingolipid metabolism	Sphingolipid metabolism	54523	32864	26029	39830	29867
Metabolism	Carbohydrate Metabolism	Starch and sucrose metabolism	Starch and sucrose metabolism	273092	243461	164479	240306	200853
Metabolism	Lipid Metabolism	Steroid biosynthesis	Steroid biosynthesis	7260	3634	1622	6629	3368
Metabolism	Lipid Metabolism	Steroid hormone biosynthesis	Steroid hormone biosynthesis	13620	5941	4920	12628	8079
Metabolism	Biosynthesis of Other Secondary Metabolites	Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis	Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis	7095	4931	3278	9394	3366
Metabolism	Biosynthesis of Other Secondary Metabolites	Streptomycin biosynthesis	Streptomycin biosynthesis	172043	170673	112064	143486	126251
Metabolism	Xenobiotics Biodegradation and Metabolism	Styrene degradation	Styrene degradation	23822	14809	14947	24894	43645
Metabolism	Energy Metabolism	Sulfur metabolism	Sulfur metabolism	165632	171485	104956	148676	131075
Metabolism	Lipid Metabolism	Synthesis and degradation of ketone bodies	Synthesis and degradation of ketone bodies	39966	24239	26670	31542	71449
Metabolism	Metabolism of Other Amino Acids	Taurine and hypotaurine metabolism	Taurine and hypotaurine metabolism	47360	51924	31334	49240	57596
Metabolism	Metabolism of Terpenoids and Polyketides	Terpenoid backbone biosynthesis	Terpenoid backbone biosynthesis	242090	226140	161066	221022	211193
Metabolism	Metabolism of Terpenoids and Polyketides	Tetracycline biosynthesis	Tetracycline biosynthesis	74906	71581	49137	69494	74558
Metabolism	Metabolism of Cofactors and Vitamins	Thiamine metabolism	Thiamine metabolism	188274	177392	122260	166426	161853
Metabolism	Xenobiotics Biodegradation and Metabolism	Toluene degradation	Toluene degradation	89005	89988	61988	74077	73742

Metabolism	Biosynthesis of Other Secondary Me	Tropane, piperidine and pyridine alkal	Tropane, piperidine and pyridine	61190	51269	38115	51245	57116
Metabolism	Amino Acid Metabolism	Tryptophan metabolism	Tryptophan metabolism	172389	109977	109520	162746	245021
Metabolism	Amino Acid Metabolism	Tyrosine metabolism	Tyrosine metabolism	161343	118736	102018	149882	195033
Metabolism	Metabolism of Cofactors and Vitami	Ubiquinone and other terpenoid-quinol	Ubiquinone and other terpenoid-quinol	181466	157555	116134	188374	181284
Metabolism	Amino Acid Metabolism	Valine, leucine and isoleucine biosynt	Valine, leucine and isoleucine biosynt	369509	362325	244339	307565	306305
Metabolism	Amino Acid Metabolism	Valine, leucine and isoleucine degradat	Valine, leucine and isoleucine degradat	259187	170171	169441	225476	366472
Metabolism	Glycan Biosynthesis and Metabolism	Various types of N-glycan biosynthesi	Various types of N-glycan biosynthesi	4944	10695	4748	1885	1105
Metabolism	Metabolism of Cofactors and Vitami	Vitamin B6 metabolism	Vitamin B6 metabolism	81813	71471	53478	70662	76123
Metabolism	Xenobiotics Biodegradation and Met	Xylene degradation	Xylene degradation	19495	12310	11594	20708	8979
Metabolism	Metabolism of Terpenoids and Polyk	Zeatin biosynthesis	Zeatin biosynthesis	18122	18075	12522	16178	16200
Organismal Systems	Endocrine System	Adipocytokine signaling pathway	Adipocytokine signaling pathway	38273	31055	24175	33183	36006
Organismal Systems	Excretory System	Aldosterone-regulated sodium reabsor	Aldosterone-regulated sodium reabsor	189	176	94	120	203
Organismal Systems	Immune System	Antigen processing and presentation	Antigen processing and presentation	15077	16780	10397	14347	14906
Organismal Systems	Digestive System	Bile secretion	Bile secretion	3197	2338	2360	911	788
Organismal Systems	Digestive System	Carbohydrate digestion and absorption	Carbohydrate digestion and absor	1955	1434	618	2951	6592
Organismal Systems	Circulatory System	Cardiac muscle contraction	Cardiac muscle contraction	25916	37838	21199	17431	20309
Organismal Systems	Nervous System	Cholinergic synapse	Cholinergic synapse	0	0	0	1	0
Organismal Systems	Environmental Adaptation	Circadian rhythm - plant	Circadian rhythm - plant	2597	740	568	1537	1715
Organismal Systems	Immune System	Complement and coagulation cascades	Complement and coagulation cascades	0	0	0	0	0
Organismal Systems	Immune System	Cytosolic DNA-sensing pathway	Cytosolic DNA-sensing pathway	0	1	0	0	0
Organismal Systems	Excretory System	Endocrine and other factor-regulated c	Endocrine and other factor-regula	189	176	94	120	203
Organismal Systems	Digestive System	Fat digestion and absorption	Fat digestion and absorption	0	0	0	0	0
Organismal Systems	Immune System	Fc epsilon RI signaling pathway	Fc epsilon RI signaling pathway	0	0	0	0	0
Organismal Systems	Immune System	Fc gamma R-mediated phagocytosis	Fc gamma R-mediated phagocyto	16	9	10	16	34
Organismal Systems	Digestive System	Gastric acid secretion	Gastric acid secretion	189	176	94	121	203
Organismal Systems	Nervous System	Glutamatergic synapse	Glutamatergic synapse	32599	26855	20993	30706	34022
Organismal Systems	Endocrine System	GnRH signaling pathway	GnRH signaling pathway	16	9	10	17	34
Organismal Systems	Immune System	Hematopoietic cell lineage	Hematopoietic cell lineage	3	5	2	6	4
Organismal Systems	Endocrine System	Insulin signaling pathway	Insulin signaling pathway	43187	42050	25823	44695	28111
Organismal Systems	Immune System	Leukocyte transendothelial migration	Leukocyte transendothelial migra	6	1	1	1	2
Organismal Systems	Nervous System	Long-term depression	Long-term depression	0	0	0	0	0
Organismal Systems	Nervous System	Long-term potentiation	Long-term potentiation	0	0	0	1	0
Organismal Systems	Endocrine System	Melanogenesis	Melanogenesis	12	10	5	10	212
Organismal Systems	Digestive System	Mineral absorption	Mineral absorption	8432	4915	4572	14715	10571
Organismal Systems	Nervous System	Neurotrophin signaling pathway	Neurotrophin signaling pathway	0	0	0	1	0
Organismal Systems	Immune System	NOD-like receptor signaling pathway	NOD-like receptor signaling path	15100	16803	10421	14379	14988

Organismal Systems	Sensory System	Olfactory transduction	Olfactory transduction	0	0	0	1	0
Organismal Systems	Digestive System	Pancreatic secretion	Pancreatic secretion	190	176	95	121	205
Organismal Systems	Sensory System	Phototransduction	Phototransduction	0	0	0	0	0
Organismal Systems	Sensory System	Phototransduction - fly	Phototransduction - fly	6	1	1	2	2
Organismal Systems	Environmental Adaptation	Plant-pathogen interaction	Plant-pathogen interaction	72045	78931	47606	52825	61342
Organismal Systems	Endocrine System	PPAR signaling pathway	PPAR signaling pathway	69272	50649	42603	61684	65523
Organismal Systems	Endocrine System	Progesterone-mediated oocyte maturat	Progesterone-mediated oocyte ma	15077	16780	10397	14347	14906
Organismal Systems	Digestive System	Protein digestion and absorption	Protein digestion and absorption	5020	2517	2797	7099	15504
Organismal Systems	Excretory System	Proximal tubule bicarbonate reclamati	Proximal tubule bicarbonate recla	18848	11670	11806	14705	17709
Organismal Systems	Endocrine System	Renin-angiotensin system	Renin-angiotensin system	875	359	272	519	3009
Organismal Systems	Immune System	RIG-I-like receptor signaling pathway	RIG-I-like receptor signaling path	2032	1827	1352	522	446
Organismal Systems	Digestive System	Salivary secretion	Salivary secretion	189	176	94	120	203
Organismal Systems	Circulatory System	Vascular smooth muscle contraction	Vascular smooth muscle contracti	0	0	0	0	0
Organismal Systems	Excretory System	Vasopressin-regulated water reabsorpt	Vasopressin-regulated water reabs	2064	1909	1345	576	574
Unclassified	Metabolism	Amino acid metabolism	Amino acid metabolism	105996	74107	60221	97369	100219
Unclassified	Metabolism	Biosynthesis and biodegradation of sec	Biosynthesis and biodegradation o	30920	39582	21536	23112	32901
Unclassified	Metabolism	Carbohydrate metabolism	Carbohydrate metabolism	55782	60031	31410	54165	25128
Unclassified	Cellular Processes and Signaling	Cell division	Cell division	35079	29017	21830	34080	39173
Unclassified	Cellular Processes and Signaling	Cell motility and secretion	Cell motility and secretion	156310	156149	94619	124771	128448
Unclassified	Cellular Processes and Signaling	Electron transfer carriers	Electron transfer carriers	16198	15896	12394	12078	6020
Unclassified	Metabolism	Energy metabolism	Energy metabolism	425438	354646	274734	355079	387945
Unclassified	Poorly Characterized	Function unknown	Function unknown	802011	790356	536633	648611	770792
Unclassified	Poorly Characterized	General function prediction only	General function prediction only	1747022	1665404	1123591	1500257	1601516
Unclassified	Cellular Processes and Signaling	Germination	Germination	221	314	217	506	689
Unclassified	Metabolism	Glycan biosynthesis and metabolism	Glycan biosynthesis and metaboli	41196	47119	28823	33834	33864
Unclassified	Cellular Processes and Signaling	Inorganic ion transport and metabolism	Inorganic ion transport and metab	166998	159848	103911	130794	156280
Unclassified	Metabolism	Lipid metabolism	Lipid metabolism	54428	46700	30139	50967	67989
Unclassified	Cellular Processes and Signaling	Membrane and intracellular structural	Membrane and intracellular struct	346565	351196	229659	316231	380976
Unclassified	Metabolism	Metabolism of cofactors and vitamins	Metabolism of cofactors and vitar	97723	102839	68638	75590	76157
Unclassified	Metabolism	Nucleotide metabolism	Nucleotide metabolism	16186	11653	11408	9155	14039
Unclassified	Cellular Processes and Signaling	Other ion-coupled transporters	Other ion-coupled transporters	451804	418985	287626	398710	445580
Unclassified	Cellular Processes and Signaling	Other transporters	Other transporters	104685	85895	65573	103144	117613
Unclassified	Metabolism	Others	Others	446133	388202	264615	455111	529074
Unclassified	Cellular Processes and Signaling	Pores ion channels	Pores ion channels	274640	304556	171082	255955	362171
Unclassified	Genetic Information Processing	Protein folding and associated process	Protein folding and associated pro	450878	467303	304370	386084	364644
Unclassified	Genetic Information Processing	Replication, recombination and repair	Replication, recombination and re	355866	323273	225217	345912	312843

Unclassified	Genetic Information Processing	Restriction enzyme	Restriction enzyme	88579	120836	60001	70613	80794
Unclassified	Cellular Processes and Signaling	Signal transduction mechanisms	Signal transduction mechanisms	222689	194808	141290	211908	222022
Unclassified	Cellular Processes and Signaling	Sporulation	Sporulation	26518	33911	18699	22283	15868
Unclassified	Genetic Information Processing	Transcription related proteins	Transcription related proteins	5807	3063	5299	1314	2435
Unclassified	Genetic Information Processing	Translation proteins	Translation proteins	412049	406186	279137	360995	383943

統一編號：EPA154106005

*「本報告係受託單位或計畫主持人個人意見，僅供本所施政之參考，不代表本所立場」。

*「本報告之著作財產權屬行政院環境保護署環境檢驗所所有，非經行政院環境環保署環境檢驗所同意，任何人均不得重製、仿製或其他之侵害」。