

中華民國第四十八屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物(生命科學)科

040703

去「污」存「淨」－土壤菌抗銅離子機制之探討

學校名稱：國立新竹女子高級中學

作者： 高二 洪寧 高二 許嘉珍	指導老師： 陳季瑄
------------------------	--------------

關鍵詞： 處理銅離子、Bacillus、含螢光胜肽

研究摘要

有的細菌能將金屬離子吸附在表面，或將之轉為其他物質。故可以利用細菌去除環境污染及降低危害。

以設計的篩菌流程，並利用螢光胜肽偵測菌液中銅離子是否減少，本實驗成功地從銅污染地中篩出能處理銅離子的細菌。

當銅離子濃度由 0.1mM 增至 10mM 時，細菌生長量逐漸減少，甚至停止繁殖。對於處理銅離子能力而言，有的菌株在 0.1mM 時，處理效果不佳，卻在極端高濃度下，有較強的處理能力。另一菌株在 0.1mM、1mM 環境下處理效果較好，然而在 10mM 時，處理能力不佳。

經由傳統細菌鑑定與 16s rRNA 的交互比對，篩出的菌種可能為 *Bacillus fusiformis*、*Bacillus sphaericus* 或 *Bacillus Macroides*。希望能模式化實驗步驟及方法，未來擴及至找尋能處理汞、鉛、鉻等污染的細菌。

壹、研究動機

課堂上老師提到香山綠牡蠣事件，我們查了有關銅污染的資料，綠牡蠣的照片讓我們深知銅污染對大自然及生物的危害是多麼的深。因此，希望能找出降低銅污染的方法。根據文獻資料，發現以植物處理銅汙染的方法很多，但是很少人以生活中無所不在的細菌來復育苦受殘害的大地，於是，展開了以下的研究。

貳、研究目的

- 一、尋找能處理銅離子污染的細菌。
- 二、探討在不同銅離子濃度下細菌的生長情形。
- 三、以傳統菌種鑑定配合 RAPD、16s rRNA 的方式鑑定細菌可能的種類。
- 四、了解細菌利用銅離子的初步方式。

參、研究設備及器材

PCR 反應器	一台	電腦	二台
震盪培養箱	二台	實驗室必備實驗用品	註1
電泳槽	一台	NB 液體培養基	數升 註2
4°C恆溫冰箱	一個	NA 固態培養基	數升 註3
分光光度計	一台	葡萄糖液體培養基	數升 註4

註1 實驗室必備實驗用品：酒精燈、手套、酒精、接種環、玻璃三角棒、96孔盤等用品。

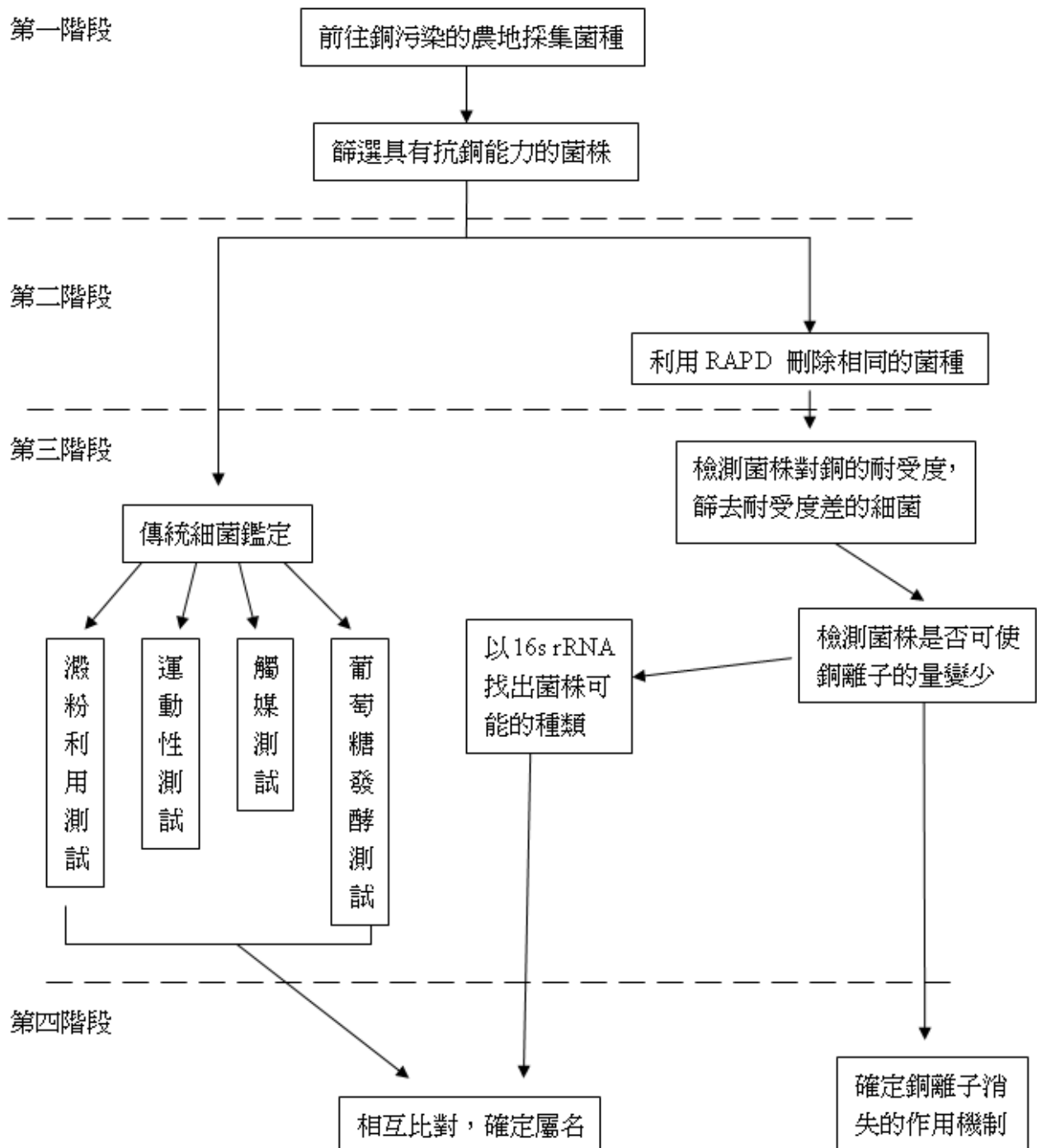
註2 NB：牛肉萃取液 5g，蛋白凍 10g，氯化鈉 2g，d.d. H₂O 950ml，1N 氫氧化鈉調至 pH7.0 再加水至 1 公升。

註3 NA：NB 再加上 1.5% 的 agar。

運動性實驗中的 NA：agar 改為 0.8%，使細菌可以在裡面運動。

註4 葡萄糖培養基：葡萄糖 2g，蛋白凍 10g，牛肉萃取液 3g，氯化鈉 5g，溴瑞香草藍 0.04g，d.d. H₂O 1000ml。

肆、 實驗流程



說明:

第一階段：縮小篩菌範圍，找出菌株。

第二階段：利用 RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) 將相同的菌種刪去，以免浪費資源。

第三階段：利用傳統細菌鑑定法及 16s rRNA 法鑑定細菌，互相對照結果。另一方面配置不同濃度的銅離子溶液，篩選可以抗銅的菌株，並且偵測銅離子是否消失。

第四階段：比對細菌屬名，並查相關資料。模式化實驗步驟及方法，確定銅離子消失的作用機制。

伍、 研究方法與結果

一、採集生長於銅污染環境的菌株

從《土壤及地下水污染整治網》上得知受銅污染的農地，位於新竹市水源段溪洲路（圖一）。在同一塊田中隨機找兩個地點，編為 A 與 B。採集的土壤（圖二）置於培養皿中，加入 300 μ l 蒸餾水，靜置三天。

註：當天天氣晴朗，兩地溫度皆為 28 $^{\circ}$ C，挖土深度皆為 10cm。



圖一：採集地點，一旁有肥料工廠



圖二：挖土情形

二、培養、篩選細菌

(一) 將土壤懸浮液塗佈於含 streptomycin 的 NA 培養基，在 37 $^{\circ}$ C 恆溫箱中培養。16 小時後將 A 盤（同採集地點編號、圖三）長出的 12 個菌落、B 盤（圖四）長出的 10 個菌落依序編號。選用 streptomycin 可縮小篩菌範圍，亦可採用不同的抗生素做實驗。



圖三：A 盤

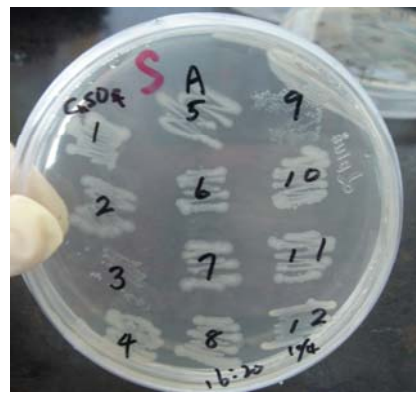


圖四：B 地

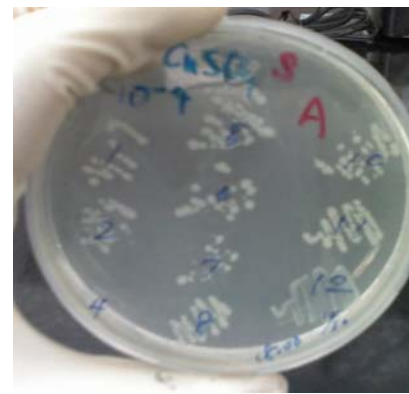
(二) 將已編號的細菌分別接種至塗有 0.1mM 銅離子及不含銅離子的培養基上。隔天，再將長出的細菌劃至更高濃度銅離子的培養基中。



圖五：B4 與 B7 生長不良



圖六：A3 與 A9 生長不良



圖七：A4 不長

結果：多次實驗後，將 A 盤菌：A3、A4、A9 及 B 盤菌：B4、B7 刪除，得 14 株細菌。

三、菌種鑑定

方法一：傳統細菌鑑定

根據細菌分類表，依澱粉利用、觸媒、運動性及葡萄糖利用測試進行分類鑑定。

(一)澱粉利用測試

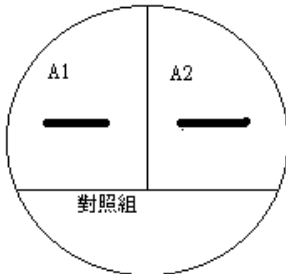
1. 實驗原理與設計：

碘液遇澱粉呈藍黑色，若菌株會利用澱粉，則無澱粉和碘液作用，培養基不會呈藍黑色。由於唾液會分解澱粉，故可用來作為對照組。

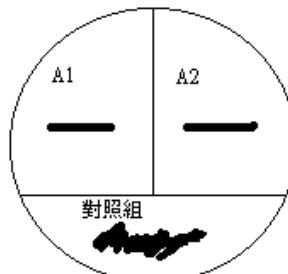
2. 材料：含 1% 水溶性澱粉的 NB 培養基

3. 實驗方法：

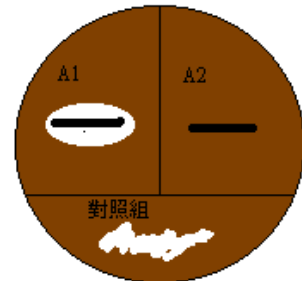
將每盤澱粉培養基分成 3 區，以接種環沾取菌液後，在其中兩區分別劃不同的細菌（圖八），培養 20 小時後，塗抹唾液於未種菌的區域，作為對照組（圖九）。待 5 分鐘後，滴碘液於盤上，若是菌落旁有一圈透明圈，代表此菌株會利用澱粉，反之則不會利用澱粉（圖十）。



圖八：種菌並編號



圖九：20 小時後塗抹唾液於對照組



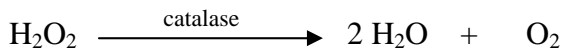
圖十：5 分鐘後滴碘液於培養基上（塗色區代表藍黑色）

結果：僅 A12 菌落旁呈透明圈，顯示其可利用澱粉。

(二)觸媒 (catalase) 測試

1. 實驗設計與原理：

部分菌株有觸媒，可將 H_2O_2 分解為 H_2O 與 O_2 ，方程式如下：



而文獻指出，只有好氧菌與兼性菌才有此酵素，因此可檢測氧氣來判定菌株是否有觸媒。

2. 材料：3% 的 H_2O_2

3. 方法：將 3% 的 H_2O_2 直接滴於菌落上，觀察是否有氣泡產生。

結果：

編號 次數	A										B				
	1	2	5	6	7	8	10	11	12	1	2	3	5	6	
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

結果討論：

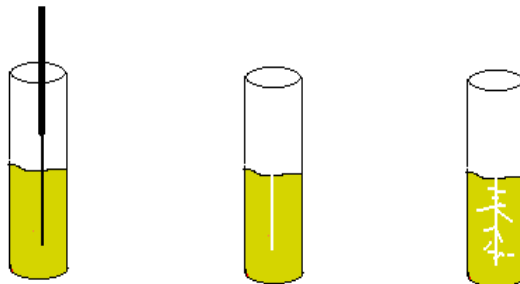
所有的菌株皆會產生氧氣，可能為好氧菌或兼性厭氧菌，但其中 A12 產氣速度較慢且氣泡較小，因此可以更加確定它與其他菌不同。

(三)運動性 (mobility) 測試

1. 實驗原理與設計：

細菌在 0.8% agar 的 NA 培養，若生長如樹枝狀般散開 (圖十三)，則證明細菌有運動性；相反地，若細菌缺乏運動性便只能看到一條線 (圖十二)。

2. 方法：以接種針沾取菌液，垂直插入 NA 中再垂直抽出 (圖十一)。16-18 小時後，觀察細菌分布情形。



結果： 圖十一：種菌 圖十二：不具有運動性 圖十三：具有運動性

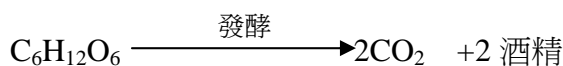
編號	A										B				
	1	2	5	6	7	8	10	11	12	1	2	3	5	6	
運動性	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

結果討論：所有的菌株皆缺乏運動性。

(四)葡萄糖利用測試

1. 實驗原理與設計：

利用溴瑞香草藍在酸性環境下由藍色變黃色的特性，來觀察葡萄糖是否被發酵。方程式如下：



2. 材料：葡萄糖液體培養基

3. 方法：取 25ml 液體培養基置於發酵管，再滴入 50μl 的菌液

結果：

結果 \ 編號	A										B				
	1	2	5	6	7	8	10	11	12	1	2	3	5	6	
-	√	√	√	√	√	√	√	√	√		√	√	√	√	√
o									√						
f															

結果討論：所有的細菌皆不能以葡萄糖作為呼吸受質，僅 A12 可利用葡萄糖行發酵。

總結：除了 A12 以外，所有細菌可能的菌屬範圍縮小到 *Micrococcus*、*Arthrobacter*、*Bacillus*、*Alcaligenes*；A12 可能菌屬範圍縮小到 *Pseudomonas*、*Neisseria*。

gram reaction (young culture)	+	+	+	-	-	-
shape	Coccus (clusters)	irreg. rod	rod	rod	rod	coccus (pairs)
endospores	-	-	+	-	-	-
oxidase reaction	+	-	+ or -	+	+	+
Glucose O/F Medium				-	O	O
<i>Micrococcus</i>	v					
<i>Arthrobacter</i>		v				
<i>Bacillus</i>			v			
<i>Alcaligenes</i>				v		
<i>Pseudomonas</i>					v	
<i>Neisseria</i>						v

圖十四：比對出來可能的菌屬名

方法二：Random Amplified of Polymorphic DNA (RAPD)

(一)實驗原理：

利用 Polymerase chain reaction (PCR) 的技術，以較短的引子 5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3' 在 DNA 上任意配對進行 DNA 放大。因為不同種生物所放大出的核酸會有所差異，藉此可以判斷這 14 株細菌的種類相對關係，並刪除相同的細菌。

(二)實驗方法

1. 取細菌到離心管中
2. 加入各種 PCR 需要的成分

成分	體積	最終濃度
1. d.d.H2O	16.6μl	
2. SDS (10%)	3μl	1%
3. Buffer (10x)	3μl	1x
4. d. NTP (10mM)	0.6μl	200μM
5. M13 (10μM)	6μl	2μM
6. Colony		
7. <i>Taq</i> (1U/μl) (DNA polymerase)	0.8μl	0.027 U/μl
Total	30μl	

3. 將離心管放入 PCR 機器中，控制 PCR 條件。
 - (1)預熱變性(denaturation)：95°C, 3min
 - (2)變性：92°C, 1min
 - (3)黏合(annealing)：50°C, 1min
 - (4)延長(extensation)：72°C, 1min
 - (5)重複步驟 2~4，共 32cycle
 - (6)補齊：72°C, 5min

(7)冷卻：4°C, forever

4. 鑄膠

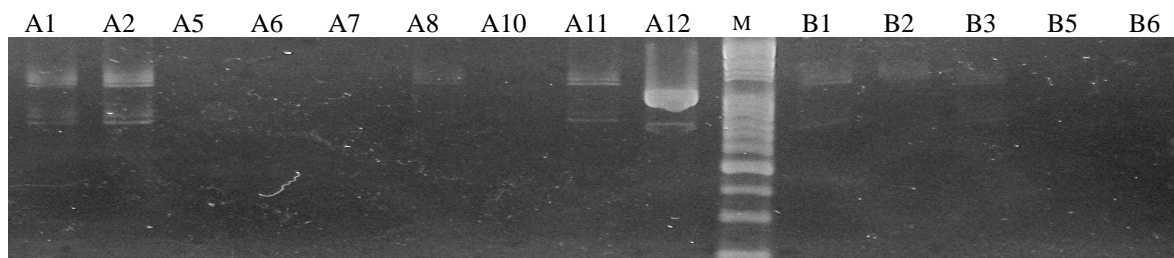
(1)2% agarose 0.4g

(2)TBE(0.5x) 20ml

5. 將膠片放置含 TBE(0.5x)電泳槽

6. 跑電泳，電壓 100V

結果：



圖十五：最長條為 marker，根據片段樣子可知 A1、A2、A8、A11、B1、B2、B3 為同一種或相似度極高的細菌。

結果討論：A1、A2、A8、A11、B1、B2、B3 為同一種或相似度極高的細菌，而 A12 和其他細菌皆不同。其於未跑出結果的細菌不能確定是否為同一種，所以取 A1、A2(兩隻相同的細菌)、A5、A6、A7、A10、A12、B5、B6 來進行後續實驗。

方法三：16s rRNA

從銅離子檢測實驗，得到處理銅離子效果較好的細菌：A1、A5、A6、A7，進行以下的實驗。

(一)實驗原理：

16s rRNA 為細菌核糖體組成成分之一，對細胞極為重要，其含氮鹼基序列保存十分完整，藉由對 16s rRNA 解碼，並透過網路上 NCBI 的比對，來判斷生物演化上的相對關係，獲得準確的菌種資料。

(二)實驗方法：

1. 打破細菌：將細菌接種至 100 μ l dd H₂O 的離心管，並置於 100°C 水中煮 2.5min。
2. 以 13200rpm 離心 3min。
3. 取上清液 2 μ l，加入各種 PCR 需要的成分

成分	體積	最終濃度
1. dd H ₂ O	37.85 μ l	
2. Buffer (10x) ^{註1}	5 μ l	1x
3. d. NTP (40mM)	3.125 μ l	2.5 Mm
4. Primer Forward (10 μ M) ^{註2}	0.5 μ l	10 nM
5. Primer Reverse (10 μ M) ^{註3}	0.5 μ l	10 nM
6. 上清液(DNA)	2 μ l	
7. Taq 1U/ μ l (DNA polymerase)	1 μ l	0.02 U/ μ l
Total	50 μ l	

註 1：Buffer 成分為 1x 是 10mM Tris-HCL, 25°C 時 pH 8.8, 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl 和 0.1% Triton X-100。

註 2：Forward primer 為 5' -AGAGTTTGATCMTGGCTCAG- 3'

R : A or G

W: A or T

註 3：Reverse primer 為 5' -AAGGAGGTGWTCCARCC- 3'

M : A or C

這兩段序列分別位於 16s rDNA 的兩端，在細菌中具有高度的保留性，但是仍有少數的變化，因此這組 primer 除了具有一般的 A、T、G、C 外，還設計有 R、M、W 等不確定的部分。

4. 將離心管放入 PCR 機器中，控制 PCR 條件。

(1) 預熱變性(denaturation)：95°C, 3min

(2) 變性：95°C, 30sec

(3) 黏合(annealing)：55°C, 30sec

(4) 延長(extenesion)：72°C, 45sec

(5) 重複步驟 2~4，共 32 cycle

(6) 補齊：72°C, 10min

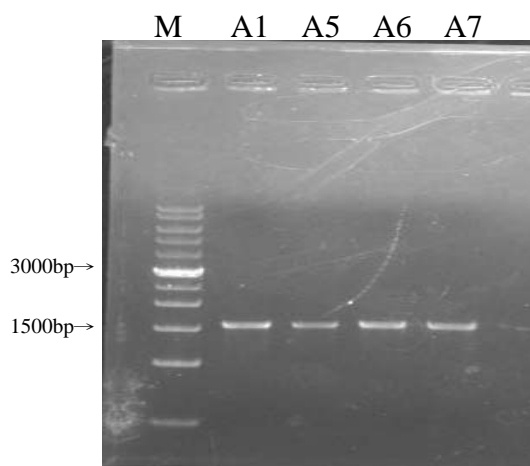
(7) 冷卻：4°C, forever

5. 鑄膠：同 RAPD

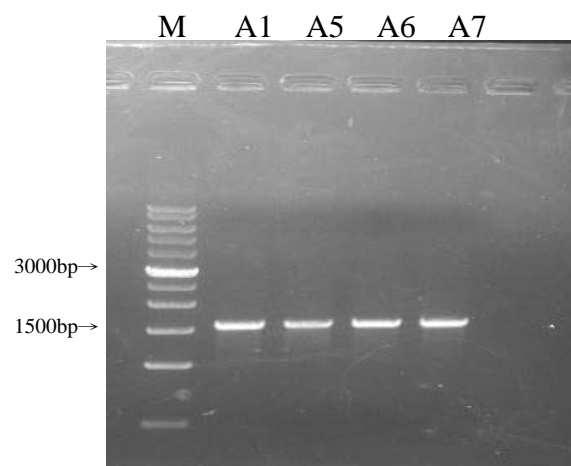
6. 將膠片放置含 TBE(0.5x) 電泳槽

7. 跑膠：確定 DNA 片段控制在 1500bp，電壓 120V，時間 35min

8. 純化：使用 Geneaid 公司 Gel/PCR DNA fragments extraction kit 純化。



圖十六



圖十七

圖十六、十七：M 代表 marker，左圖是純化前的電泳圖，右圖是純化後的電泳圖。兩張圖比較後可以確定純化結果很成功，因為右圖片段較亮、濃度較高。

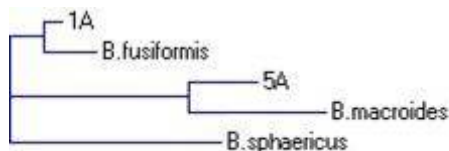
9. 送給明欣科技公司將 DNA 序列

10. 到 NCBI 網站<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>比對序列

序列比對結果：

比較定序結果，發現菌株 A5、A6、A7 為同一種細菌，經由 NCBI 比對可能為 *Bacillus fusiformis* 或 *Bacillus sphaericus*。而 A1 和他們相似，同為 *Bacillus* 屬，推測可能菌種為 *Bacillus fusiformis*、*Bacillus sphaericus* 或 *Bacillus macroides*。

	1A	5A
<i>B. fusiformis</i>	99.5%	98%
<i>B. macroides</i>	97.3%	99.0%
<i>B. sphaericus</i>	98.2%	96.4%



圖十八：細菌與標準菌株的 DNA 序列相似度

圖十九：根據圖十八建立的親緣關係圖

序列比較：

		Section 1									
		(1)	10	20	30	40	50	60	70	80	54
1A	(1)	ATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAGAAGGA	C	CTTGCTCCTT	T	GACGTTAGCGGC					
<i>B. fusiformis</i>	(1)	ATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAGAAGGAN	N	CTTGCTCCTT	T	GACGTTAGCGGC					
5A	(1)	ATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAGAAGGA	C	CTTGCTCCTT	T	GACGTTAGCGGC					
<i>B. macroides</i>	(1)	ATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAGAAGGA	C	CTTGCTCCTT	C	GACGTTAGCGGC					
<i>B. sphaericus</i>	(1)	ATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAGAAGGA	C	CTTGCTCCTT	-	GACGTTAGCGGC					
Consensus	(1)	ATACATGCAAGTCGAGCGAACAGAGAAGGAGCT	T	TGCTCCTT	T	TGACGTTAGCGGC					
		Section 2									
		(55)	60	70	80	90	100	110	120	108	
1A	(55)	GGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACC	T	TATAGTTTGGGATAACTC	C	GGG					
<i>B. fusiformis</i>	(55)	GGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACC	T	TATAGTTTGGGATAACTC	G	GGG					
5A	(55)	GGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACC	T	TATAGTTTGGGATAACTC	C	GGG					
<i>B. macroides</i>	(55)	GGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACC	C	TATAGTTTGGGATAACTC	C	GGG					
<i>B. sphaericus</i>	(54)	GGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACC	C	TATAGTTTGGGATAACTC	C	GGG					
Consensus	(55)	GGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTACC	T	TATAGTTTGGGATAACTC	C	GGG					
		Section 3									
		(109)	120	130	140	150	162				
1A	(109)	AAACCGGGGCTAATACCGAATAATCT	G	TTTCACCTCATGGTGA	AAAT	TGAAAG					
<i>B. fusiformis</i>	(109)	AAACCGGGGCTAATACCGAATAATCT	G	TTTCACCTCATGGTGA	AAAC	TGAAAG					
5A	(109)	AAACCGGGGCTAATACCGAATAATCT	A	TTTCACCTCATGGTGA	AAAT	TGAAAG					
<i>B. macroides</i>	(109)	AAACCGGGGCTAATACCGAATAATCT	C	TTTGTCTCATGGTGA	AAAG	TGAAAG					
<i>B. sphaericus</i>	(108)	AAACCGGGGCTAATACCGAATAATCT	T	TTGTCTCATGGTGA	CAAT	TGAAAG					
Consensus	(109)	AAACCGGGGCTAATACCGAATAATCT	T	TTTCACCTCATGGTGA	AAAT	TGAAAG					
		Section 4									
		(163)	170	180	190	200	216				
1A	(163)	ACGGTTTCGGCTGTCGCTATAG	GATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGA								
<i>B. fusiformis</i>	(163)	ACGGTTTCGGCTGTCGCTATAG	GATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGA								
5A	(163)	ACGGTTTCGGCTGTCGCTATAG	GATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGA								
<i>B. macroides</i>	(163)	ACGGTTTCGGCTGTCGCTATAG	GATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGA								
<i>B. sphaericus</i>	(162)	ACGGTTTCGGCTGTCGCTATAG	GATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGA								
Consensus	(163)	ACGGTTTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGA									
		Section 5									
		(217)	230	240	250	260	270				
1A	(217)	GGTAAACGGCTCACCAAGGCC	ACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC								
<i>B. fusiformis</i>	(217)	GGTAAACGGCTCACCAAGGCC	ACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC								
5A	(217)	GGTAAACGGCTCACCAAGGCC	ACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC								
<i>B. macroides</i>	(217)	GGTAAACGGCTCACCAAGGCC	ACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC								
<i>B. sphaericus</i>	(215)	GGTAAACGGCTCACCAAGGCC	ACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC								
Consensus	(217)	GGTAAACGGCTCACCAAGGCCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCC									
		Section 6									
		(271)	280	290	300	310	324				
1A	(271)	ACACTGGGACTGAGACACGGCC	CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC								
<i>B. fusiformis</i>	(271)	ACACTGGGACTGAGACACGGCC	CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC								
5A	(271)	ACACTGGGACTGAGACACGGCC	CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC								
<i>B. macroides</i>	(271)	ACACTGGGACTGAGACACGGCC	CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC								
<i>B. sphaericus</i>	(269)	ACACTGGGACTGAGACACGGCC	CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC								
Consensus	(271)	ACACTGGGACTGAGACACGGCC	CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC								

Section 7

	(325)	325	330	340	350	360	378
1A (325)		TTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGGTGAGTGAAGAAGGATT					
B.fusiformis (325)		TTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGGTGAGTGAAGAAGGATT					
5A (325)		TTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGGTGAGTGAAGAAGGTTT					
B.macroides (325)		TTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGGTGAGTGAAGAAGTTT					
B.sphaericus (323)		TTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGGTGAGTGAAGAAGTTT					
Consensus (325)		TTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCCGGTGAGTGAAGAAGGATT					

Section 8

	(379)	379	390	400	410	420	432
1A (379)		TCGGTTCGTAAAACCTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACCTGGCTG					
B.fusiformis (379)		TCGGTTCGTAAAACCTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACCTGGCTG					
5A (379)		TCGGATTCGTAAAACCTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACCTGGCTG					
B.macroides (379)		TCGGATTCGTAAAACCTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACCTGGCTG					
B.sphaericus (377)		TCGGTTCGTAAAACCTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACCTGGCTG					
Consensus (379)		TCGGTTCGTAAAACCTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACCTGGCTG					

Section 9

	(433)	433	440	450	460	470	486
1A (433)		TACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCG					
B.fusiformis (433)		TACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCG					
5A (433)		TACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCG					
B.macroides (433)		TACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCG					
B.sphaericus (431)		TACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCG					
Consensus (433)		TACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCCG					

Section 10

	(487)	487	500	510	520	530	540
1A (487)		GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCG					
B.fusiformis (487)		GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCG					
5A (487)		GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCG					
B.macroides (487)		GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCG					
B.sphaericus (485)		GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCG					
Consensus (487)		GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCG					

Section 11

	(541)	541	550	560	570	580	594
1A (541)		AGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAAT					
B.fusiformis (541)		AGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAAT					
5A (541)		AGGCGGTCCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAAT					
B.macroides (541)		AGGCGGTCCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAAT					
B.sphaericus (539)		AGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAAT					
Consensus (541)		AGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAAT					

Section 12

	(595)	595	600	610	620	630	648
1A (595)		TGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGATAGTGGGAATCCAAGTGTAGCG					
B.fusiformis (595)		TGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGATAGTGGGAATCCAAGTGTAGCG					
5A (595)		TGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGATAGTGGGAATCCAAGTGTAGCG					
B.macroides (595)		TGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGATAGTGGGAATCCAAGTGTAGCG					
B.sphaericus (593)		TGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGATAGTGGGAATCCAAGTGTAGCG					
Consensus (595)		TGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGATAGTGGGAATCCAAGTGTAGCG					

Section 13

	(649)	649	660	670	680	690	702
1A (649)		GTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTC					
B.fusiformis (649)		GTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTC					
5A (649)		GTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTC					
B.macroides (649)		GTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTC					
B.sphaericus (647)		GTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTC					
Consensus (649)		GTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTC					

Section 14

	(703)	703	710	720	730	740	756
1A (703)		TGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT					
B.fusiformis (703)		TGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT					
5A (703)		TGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT					
B.macroides (703)		TGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT					
B.sphaericus (701)		TGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT					
Consensus (703)		TGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT					

Section 15

	(757)	757	770	787
1A (757)		GGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAA		
B.fusiformis (757)		GGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAA		
5A (757)		GGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAA		
B.macroides (757)		GGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAA		
B.sphaericus (755)		GGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAA		
Consensus (757)		GGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAA		

四、探討細菌在不同銅離子濃度下的生存狀況

篩出能抗銅離子的細菌後，將實驗二取得的 8 株細菌養在不同銅離子濃度的 NB 培養液中，以分光光度計判別細菌生長狀況。為了確定接種的菌量相同，先將各株菌種於 NB 中，再各取 600 μ l 的菌液測 OD 值，以測出結果中的最小值作為基準，稀釋其他的菌液，如此可使每株菌液的濃度相等，作為控制的變因。

(實驗一)：測細菌在不同銅離子濃度下的生長情形

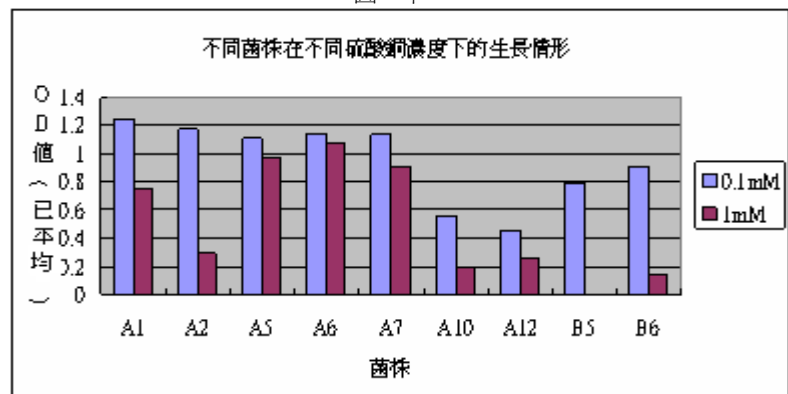
- 步驟：1. 配置銅離子濃度 0.1mM、1mM 的 NB 培養基各 16 管。
 2. 將每一株細菌各 50 μ l 種入相同濃度的培養基中，以 37°C 恆溫，100rpm 震盪培養 18 小時。
 3. 取 600 μ l 放入分光光度計中 (波長 595nm) 測量 OD 值。

結果：

濃度 菌株	0.1mM	1mM
A1-1	1.258	0.942
A1-2	1.179	0.571
A2-1	1.176	0.712
A2-2	1.183	0.560
A5-1	1.137	0.953
A5-2	1.089	1.012
A6-1	1.233	1.015
A6-2	1.08	1.143
A7-1	1.154	0.913
A7-2	1.136	1.034
A10-1	0.53	0.281
A10-2	0.571	0.119
A12-1	0.248	0.341
A12-2	0.667	0.185
B5-1	0.488	0.009
B5-2	0.512	0.01
B6-1	0.331	0.151
B6-2	0.289	0.133



圖二十



圖二十一

圖二十一：在 0.1mM 下，A10、A12 的生長狀況較差。但在 1mM 時，只有 A1、A5、A6、A7 的 OD 值大於 0.5，且 A5、A6、A7 的 OD 值近於 1。因此將此四株菌轉接種於更高的濃度中。

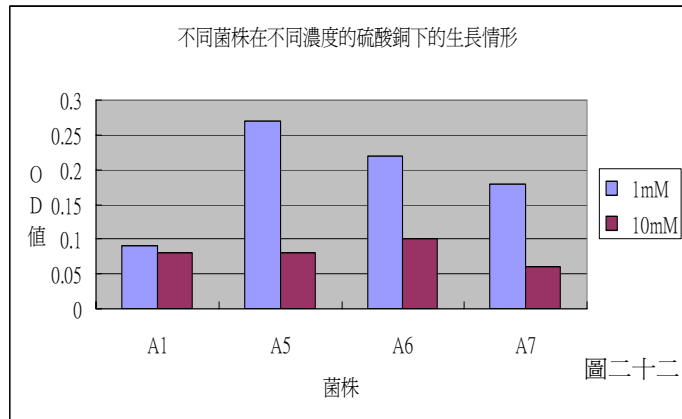
(實驗二)：檢測細菌在更高銅離子濃度 (10mM) 的生長狀況

- 步驟：1. 配置銅離子濃度 1mM、10mM 的 NB 培養基各 8 管。
 2. 將每一株細菌各 50 μ l 種入相同濃度的培養基中，以 37°C 恆溫，100rpm 震盪培養 18 小時。

3. 取 600 μ l 放入分光光度計中 (波長 595nm)，測量 OD 值。

結果：

菌株 \ 濃度	1mM	10mM
A1-1	0.211	0.102
A1-2	0.147	0.066
A5-1	0.271	0.132
A5-2	0.159	0.047
A6-1	0.18	0.126
A6-2	0.539	0.077
A7-1	0.202	0.053
A7-2	0.12	0.071



圖二十二：10mM 中的 OD 值都很小，可見此濃度不適合細菌生長。

(實驗三)：測細菌生長量是否隨時間延長而增加

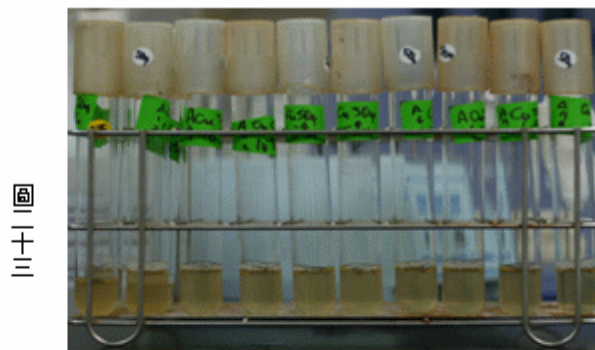
步驟：1. 配置銅離子濃度 0.1mM 的 NB 培養基 8 管。

2. 將每株細菌各 50 μ l 種入相同濃度的培養基中，以 37 $^{\circ}$ C 恆溫，100rpm 震盪培養 1 天、2 天、3 天。

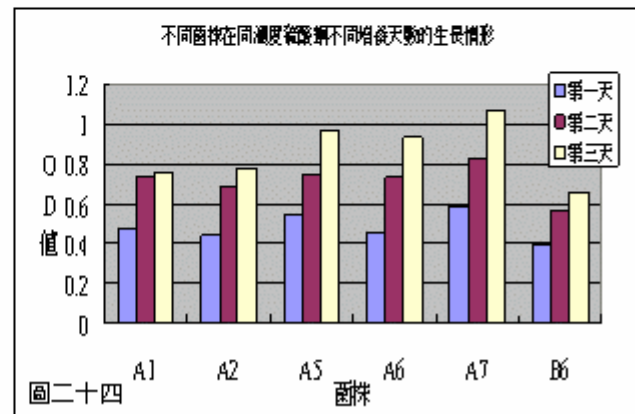
3. 取 600 μ l 放入分光光度計中 (波長 595nm)，測量 OD 值。

結果：

細菌編號	第一天	第二天	第三天
A1-1	0.528	0.728	0.767
A1-2	0.445	0.746	0.747
A2-1	0.452	0.696	0.77
A2-2	0.444	0.703	0.793
A5-1	0.526	0.762	0.98
A5-2	0.559	0.737	0.961
A6-1	0.462	0.74	0.908
A6-2	0.459	0.73	0.959
A7-1	0.62	0.807	1.049
A7-2	0.563	0.838	1.094
B6-1	0.398	0.571	0.691
B6-2	0.4	0.587	0.645



圖二十三



圖二十四

圖二十四：從圖表中可以看出天數愈多菌的數量也愈多

結果討論：在 0.1mM 的銅離子濃度下，隨著天數增加、細菌量也增加。

五、檢測銅離子是否消失

根據文獻，抗銅細菌可能將銅離子排在體外、形成內孢子或將其吸收入體內儲存或轉換成其他物質。本實驗想測定銅離子是否被細菌吸收？

(一) 實驗原理：

根據文獻，有多種方法可測定銅離子。本實驗選擇以螢光感測器方式測定，此方法製作較容易，使用較方便。其方式為將螢光物接在一段胜肽(peptide)上，以此和銅離子螯合，然後以螢光值的變化判斷銅離子是否減少；螢光值愈弱，代表銅離子螯合愈多。

(二) 胜肽的製作：

1. 配置 Solution A、B

Solution A：將 0.25g 胜肽溶於 100 μ l，100mM，pH 9.5 的 sodium bicarbonate buffer 中，充分混合 10 min 後靜置於 37°C 中。

Solution B：將 200mM dansyl 溶於丙酮，以超音波震盪器作用 1hr，靜置於 37°C。

2. 將 Solution A 和 Solution B 以 1:1 混合，靜置於 37°C 作用 4hr，再利用高速離心機以 13000 rpm 離心 10 min。
3. 離心後保留上清液。
4. 將上清液利用膠體過濾法 (G-25 管柱) 層析後使用。

(三) 實驗內容

實驗 A：確定修飾後的胜肽符合文獻中胜肽的表現

步驟：1. 配置不同銅離子濃度的溶液。

2. 各加入 10 μ l 的胜肽。

3. 測螢光值。

結果：

Peptide : 10 μ l		
濃度 (mM)	配方	螢光值
0.01	CuSO ₄ (1mM) 1 μ l NB 89 μ l	21.40
0.05	CuSO ₄ (1mM) 5 μ l NB 85 μ l	19.76
0.1	CuSO ₄ (1mM) 10 μ l NB 80 μ l	17.87
0.1	CuSO ₄ (10mM) 1 μ l NB 89 μ l	21.48
0.5	CuSO ₄ (10mM) 5 μ l NB 85 μ l	17.77
1	CuSO ₄ (10mM) 10 μ l NB 80 μ l	16.28
對照組	NB 90 μ l	22.96

結果討論：由結果可知螢光值隨銅離子濃度的升高而降低。然而，當銅離子和胜肽的濃度固定時，不同的 NB 量也會影響螢光值。同為 0.1mM 時，當 NB 量愈多，螢光值愈高。

實驗 B：確定隨著胜肽量增加，螢光值也會增加。

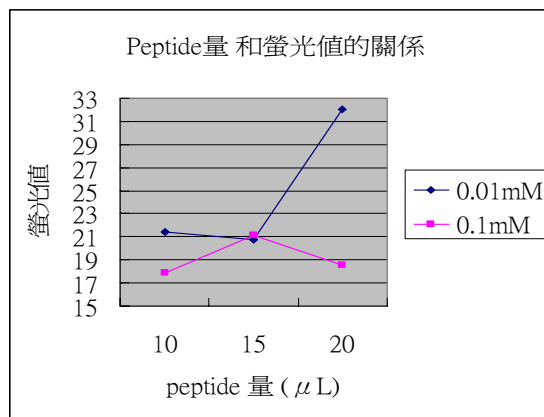
步驟：1.配置銅離子濃度 0.01mM 和 0.1mM。

2.改變胜肽的量。

3.測螢光值。

結果：

0.01mM			0.1mM		
Peptide 量	配方	螢光值	Peptide 量	配方	螢光值
10 μ l	CuSO ₄ (1mM) 1 μ l NB 89 μ l	21.40	10 μ l	CuSO ₄ (1mM) 10 μ l NB 80 μ l	17.87
15 μ l	CuSO ₄ (1mM) 1 μ l NB 84 μ l	20.71	15 μ l	CuSO ₄ (1mM) 10 μ l NB 75 μ l	21.10
20 μ l	CuSO ₄ (1mM) 1 μ l NB 79 μ l	32.00	20 μ l	CuSO ₄ (1mM) 10 μ l NB 70 μ l	18.53



圖二十五

圖二十五：理論上隨著胜肽量增加，在固定的銅離子濃度下，螢光值應該增加。然而，所得螢光值並未成正比關係。推測是因為 NB 也會和胜肽作用。

實驗 C：繪出銅離子濃度與螢光值的曲線圖

由實驗 B 已知 NB 會影響胜肽表現，因此固定 NB 的量，不足體積以和 NB 培養液 pH 值相同的生理食鹽水代替。

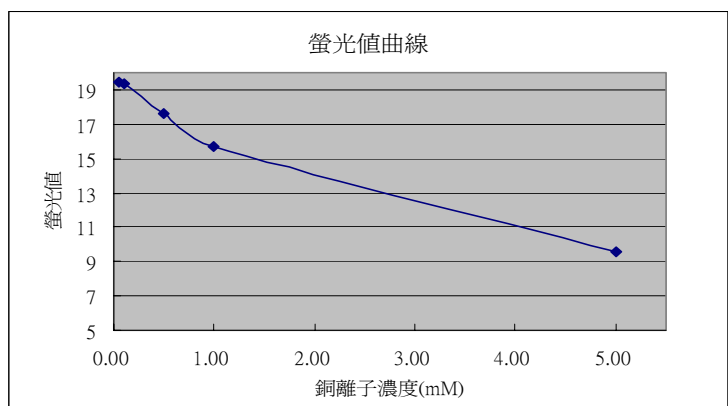
步驟：1. 配置不同銅離子濃度的溶液。

2. 各加入 10 μ l 胜肽。

3. 測螢光值。

結果：

NB : 80 μ l peptide : 10 μ l		
濃度 (mM)	配方	螢光值
0.05	CuSO ₄ (1mM) 5 μ l PBS 5 μ l	19.47
0.1	CuSO ₄ (1mM) 10 μ l	19.36
0.5	CuSO ₄ (10mM) 5 μ l PBS 5 μ l	17.60
1	CuSO ₄ (10mM) 10 μ l	15.68
5	CuSO ₄ (10mM) 5 μ l PBS 5 μ l	9.54



圖二十六

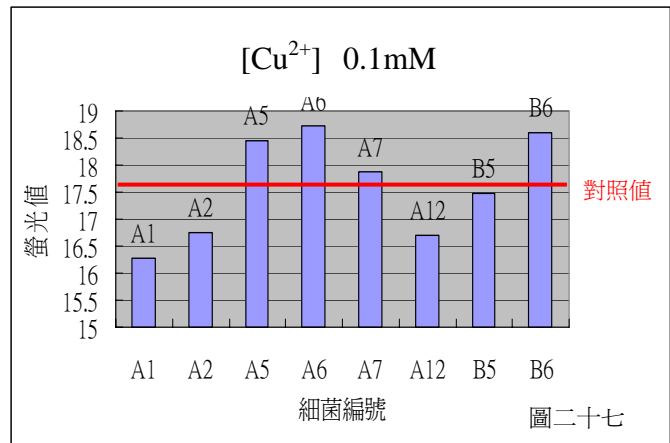
圖二十六：將部份體積改為 PBS 後，胜肽與銅離子濃度呈線性關係，不受 NB 的影響，可以確定螢光值的改變是因為銅離子濃度改變。

實驗 D：根據實驗三測的 OD 值，可知在 0.1mM 時，除了 A12，其餘的細菌都長得不錯。但是在 1mM 時，只有 A1、A5、A6、A7 能持續在較高的濃度下生長。所以針對 0.1mM，測試了所有的菌液，而 1mM，只選擇了 A1、A5、A6、A7。

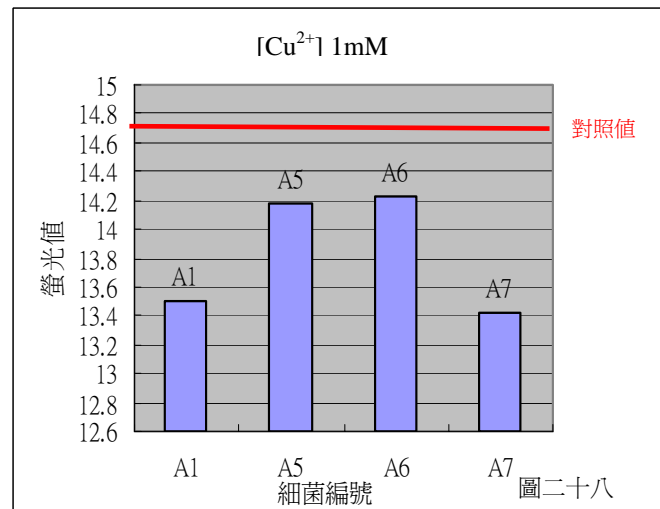
- 步驟：1. 取離心管將其編號，各加入 80 μ l 的菌液、10 μ l 的 PBS 和 10 μ l 的胜肽。
 2. 混合均勻後，離心 5min，6000rpm。
 3. 取上清液 80 μ l 置入 96 孔盤，測螢光值。

結果：

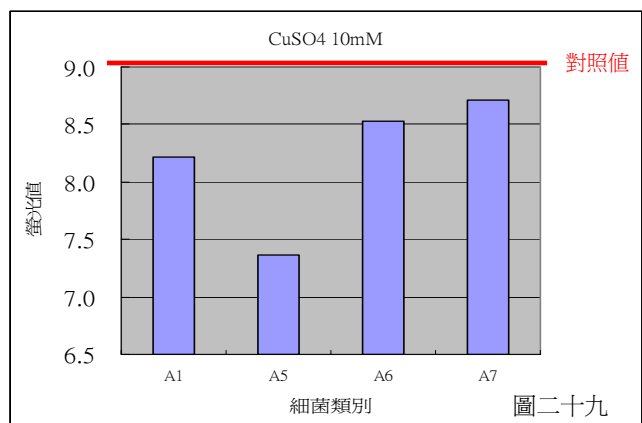
0.1mM			
	1	2	平均
A1	16.25	16.30	16.27
A2	16.48	17.04	16.76
A5	18.81	18.08	18.44
A6	18.48	18.96	18.72
A7	17.75	18.00	17.87
A12	17.15	16.26	16.70
B5	17.83	17.14	17.48
B6	17.93	19.25	18.59
對照組	17.75	17.47	17.61



1mM			
	1	2	平均
A1	11.51	15.52	13.51
A5	14.15	14.20	14.18
A6	14.41	14.04	14.22
A7	14.24	12.61	13.42
對照組	14.64	14.88	14.76



10mM			
	1	2	平均
A1	8.55	7.90	8.22
A5	7.85	6.88	7.37
A6	8.64	8.41	8.52
A7	8.23	9.21	8.72
對照組	9.37	8.64	9.01



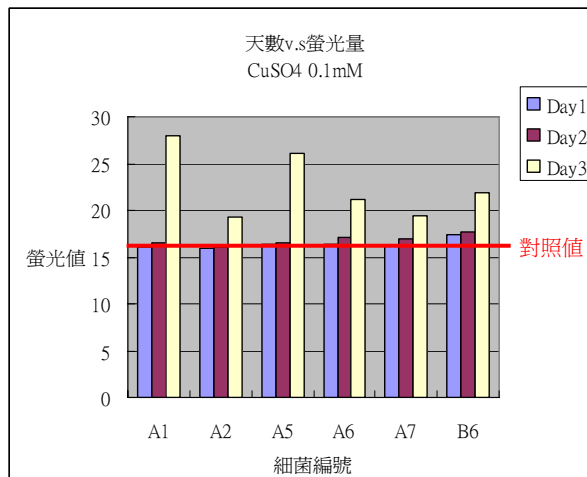
實驗 E：雖然在實驗 D 中，只有 A5、A6、A7、B6 菌液中的銅離子減少，但是其他細菌可能只是對銅離子的反應較慢，所以測量培養不同天數後螢光值改變量。

1. 配置 0.1mM 的銅離子溶液，並將細菌種入之。
2. 取離心管將其編號，先各加入 80 μ l 的菌液、10 μ l 的 PBS 和 10 μ l 的胜肽。
3. 混合均勻後，離心 5min，6000rpm。
4. 取上清液 80 μ l 置入 96 孔盤，測螢光值。
5. 第二天和第三天皆重複步驟 2~5。

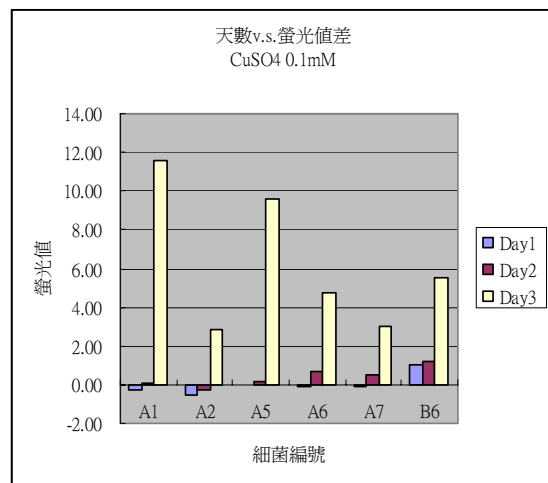
結果：

	Day1			Day2			Day3		
	1	2	平均	1	2	平均	1	2	平均
A1	16.23	15.96	16.1	16.54	16.43	16.49	30.32	25.58	28
A2	15.81	15.92	15.87	15.95	16.35	16.15	18.93	19.55	19.24
A5	16.22	16.63	16.43	17	16.17	16.59	25.53	26.53	26.03
A6	16.24	16.44	16.34	17.11	17.1	17.11	21.12	21.21	21.17
A7	16.33	16.26	16.3	17.05	16.8	16.93	18.76	20.02	19.39
B6	17.62	17.15	17.39	17.42	17.79	17.61	22.11	21.66	21.89

(對照值：16.4)



圖三十



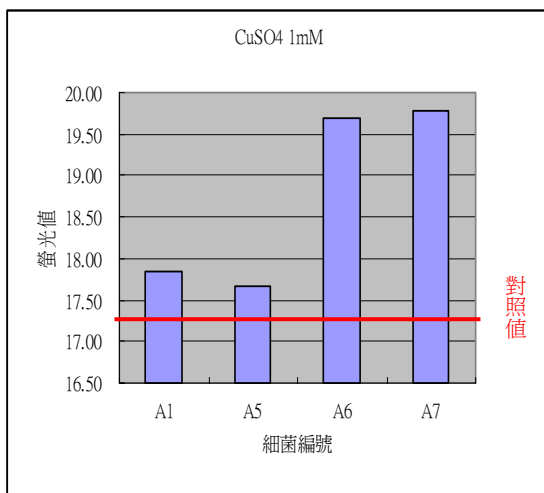
圖三十一

實驗 F：改變胜肽加入的順序，排除細菌體所含蛋白質對胜肽的影響

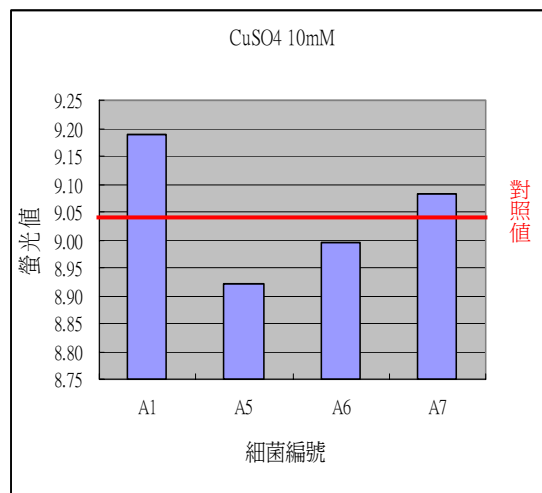
1. 取離心管編號，各加入 80 μ l 的菌液、10 μ l 的 PBS。
2. 混合均勻後，離心 5min，6000rpm。
3. 取上清液 80 μ l 置入 96 孔盤。
4. 各加入 10 μ l 的胜肽。
5. 測螢光值。

結果：

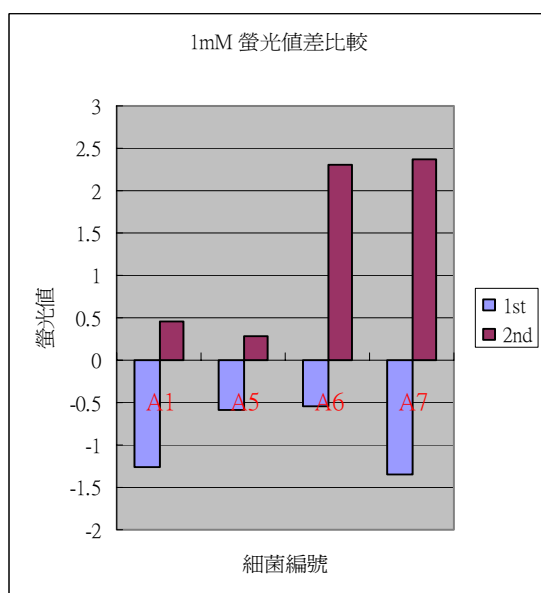
	1mM			10mM		
	1	2	平均值	1	2	平均值
A1	18.45	17.24	17.85	9.00	9.38	9.19
A5	17.90	17.44	17.67	8.87	8.98	8.92
A6	20.48	18.90	19.69	9.06	8.93	9.00
A7	21.16	18.38	19.77	8.11	10.05	9.08
對照祖	16.46	18.31	17.39	16.46	18.31	9.04



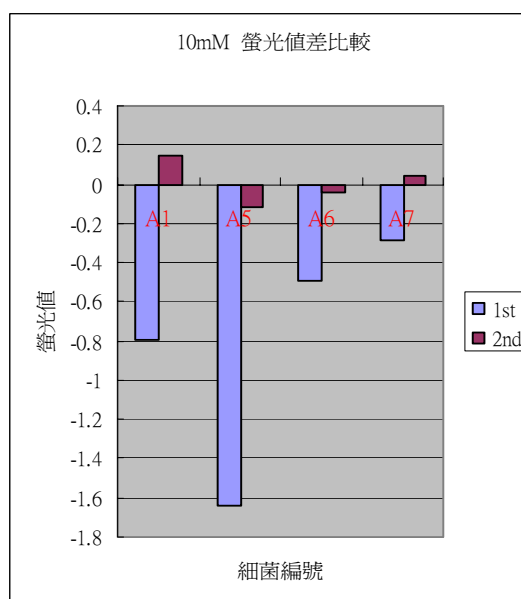
圖三十二：1mM 環境下，螢光值皆高於對照值，可見菌株都會利用銅離子。



圖三十三：相較於在 1mM 的環境下，A1 吸收銅離子的效果反而較 A7 好。

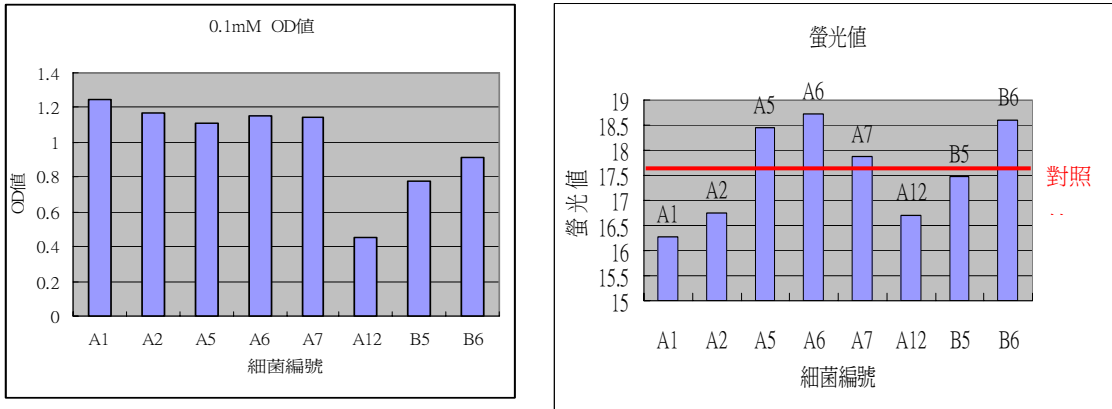


圖三十四：在 1mM 下，第二次實驗中都高於對照值。

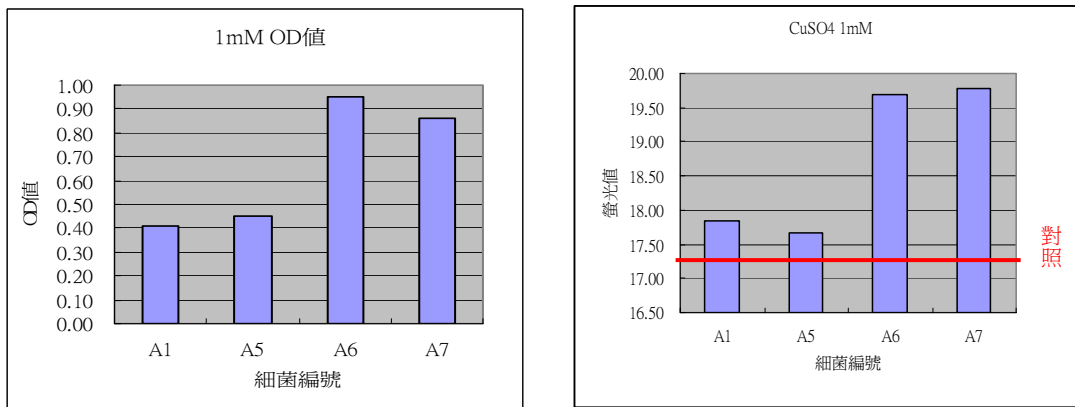


圖三十五：在 10mM 下，第二次實驗菌液和對照值的差減少許多。

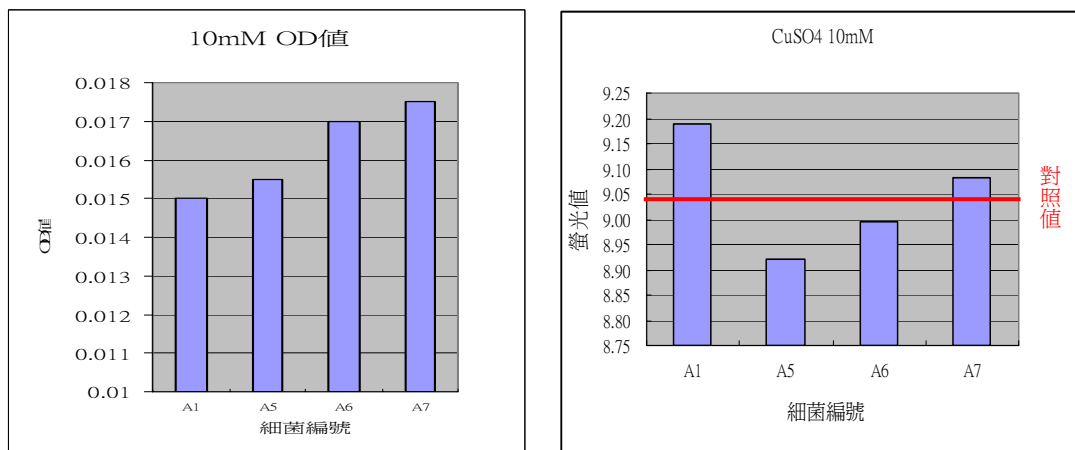
OD 值與螢光值的比較：



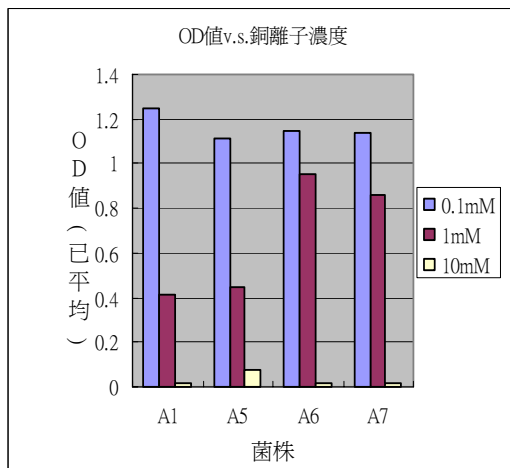
圖三十六：在 1mM 的濃度下，A1、A2 生長較好，但去除銅離子能力不及 A5、A6、A7、B6。



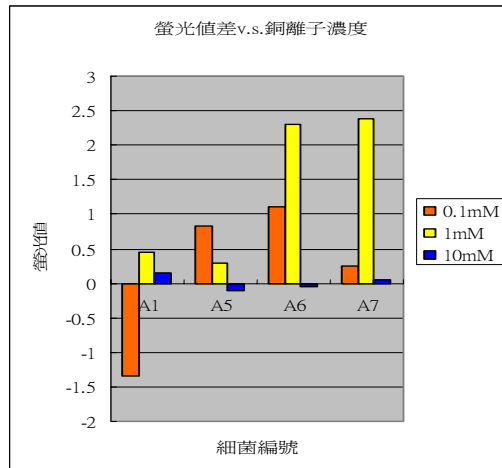
圖三十七：在 1mM 的銅離子環境下，A5、A6、A7 的螢光值和其成長狀況有密切的關係。雖然 A1 的生長狀況不如 A5，但其吸收銅離子的狀況較好。



圖三十八：10mM 下，A1 的生長狀況不是最好，但處理銅離子效果最好。



圖三十九：細菌在 10mM 的環境下幾乎不能生存。



圖四十：在 1mM 的環境下，螢光值皆大於對照值，而在 10mM 的狀況下，螢光值差甚小或甚至為負數。

總結：

1. 胜肽隨著銅離子濃度增加，螢光值減少；隨著胜肽量增加，螢光值增加。
2. 生長於 0.1mM 銅離子濃度下，A5、A6、A7、B6 的螢光值大於對照值，代表銅離子的含量減少。
3. 排除細菌體內所含蛋白質對胜肽的影響，在 1mM 時，螢光值皆高於對照值，可見 A1、A5、A6、A7 都會利用銅離子；在 10mM 時，A5 及 A6 的螢光值低於對照值，而 A1 和 A7 高於對照值。根據圖三十一、圖三十二，相較於在 1mM 的環境下，A1 吸收銅離子的效果較 A7 好。
4. 隨著天數的增加，即使處理銅離子效果差的菌株，第三天銅離子的含量也減少。

陸、討論

一、實驗設計：液體培養基與固體培養基的差異

平板培養基無法控制細菌和銅離子的接觸面積，也無法確定接種的細菌量及判定細菌生長狀況。因此，改用液體培養基來模擬細菌所生存的銅離子環境。

實驗後發現，能在平板培養基生長的細菌，在相同濃度的液體培養基中卻無法生長，可見液體培養基能有效篩菌。同時，可以以測量 OD 值的方式，算出細菌在銅離子環境中的生存狀況。因此，後續實驗中以 OD 值做為判定細菌在銅離子環境下生長的標準。

二、針對各實驗的討論

(一)傳統細菌鑑定

所選擇的四個方法皆是操作簡單且材料取得方便的實驗。經由和細菌分類表比對後，縮小了菌屬範圍。

(二)16s rRNA

由 16s rRNA 的實驗結果，得到兩株細菌皆為 *Bacillus* 屬。其中 *Bacillus sphaericus* 已有研究證實該菌能將銅離子聚集在自身的細胞壁上。推測此兩株菌也以此方法處

理銅離子。

(三)不同銅離子濃度下細菌的生長狀況

1. 在 0.1mM 環境中，隨著天數增加，菌量也增加。由此可證明細菌並非轉化成內孢子來度過不利的環境，而是能在此濃度下生長。
2. 隨著銅離子濃度增加，菌量減少。當濃度為 10mM 時，細菌幾乎不會生長，由此可知 10mM 對細菌而言已無法生長。

(四)檢測銅離子

1. 螢光值的變化如預期隨濃度的升高而降低。然而，胜肽除了和銅離子螯合，也會和 NB 培養液作用，影響螢光值曲線。將溶劑由水改為和 NB 培養液 pH 值相同的生理食鹽水，減少 NB 的影響，得到圖二十六的螢光值曲線。
2. 由實驗 E 可知，細菌吸收銅離子需要一段時間。圖三十的數據說明，即使第一、二天吸收銅離子效果差的菌株，在第三天螢光值皆大幅增加。尤其是 A1 菌株，一、二天所測得的螢光值非常接近對照值，但第三天卻與對照值差 11.6。
3. 實驗 F 中，改變胜肽加入的順序，可以避免胜肽和細菌體中流出的蛋白質、酵素或其他物質接觸，排除其對螢光值的影響。
4. 由圖三十四可知，在 1mM 下，螢光值皆低於對照值，在改進實驗中所測得的螢光值卻全高於對照值。可見在 1mM 的環境下銅離子確實消失了。
5. 從圖三十五中，在 10mM 下，原本菌液螢光值低於對照值甚多，但在改進實驗後，測得的數值仍有兩株略低於對照值。推測細菌處在銅離子環境，會將其吸入體內，或附著於細胞壁上。然而，在高濃度的銅離子環境下，已超過菌株的負荷量，所以它們會將過多的銅離子排出體外。同時，菌體也可能會釋放物質保護自己，而這些物質若和胜肽作用，也會使螢光值降低。

(五) OD 值和螢光值的比較

1. 從圖三十七中可知，生長狀況好的細菌，去除銅離子的能力並不一定是最好的。
2. 由圖三十九和圖四時相互比較，可知細菌在不同濃度的銅離子環境下，會有不同的表現。根據圖三十九，A5、A6、A7 皆在 0.1mM、1mM 有較好的表現。和其生存狀況比較(圖四十)，推測是因為 10mM 銅離子已超過細菌負荷濃度，細菌不再將銅離子吸附或吸入體內，而是轉變成內孢子保護自己。A1 則是在 0.1mM 時，螢光值低於對照值，在 1mM 及 10mM 時，螢光值皆高於對照值。可能是 A1 需要在較極端環境下，才會勉強自己處理銅離子。

三、實驗改進

(一) 篩選細菌的方式

以表面塗有銅離子的培養基來篩選細菌，會因為銅離子分布不均勻，或者因水分的蒸發而造成濃度改變，使細菌的生長環境並非如原先設定。可改於配置時就加入銅

離子的培養基，排除離子分布不均勻的問題。

(二) 測銅離子耐受度

應在 1mM 與 10mM 間，多測量幾種濃度，才能更精確找出細菌對銅離子的耐受濃度，及細菌處理銅離子效果最好的濃度。

柒、實驗結論

- 一、所設計的篩菌流程可以找到能處理銅離子的細菌。
- 二、螢光胜肽可偵測菌液中的銅離子是否減少。
- 三、液體培養基比平板培養基更適合篩菌。
- 四、篩出的細菌在 0.1mM 下皆不會變成內孢子，仍有繁殖能力。隨著銅離子濃度由 0.1mM 增加到 10mM，細菌生長量會逐漸減少，甚至停止繁殖。
- 五、篩選出的細菌可能是 *Bacillus fusiformis*、*Bacillus sphaericus*、*Bacillus Macroides*，而他們能使銅離子減少。其中有的菌株在 0.1mM，對銅離子處理效果不佳，卻在極端銅離子環境下，具有較強處理銅離子的能力。另一菌株在 0.1mM、1mM 的環境下有較好的表現，然而於 10mM 的銅離子濃度下，處理銅離子的效果不佳。

捌、未來展望

螢光胜肽雖可偵測菌液中銅離子，但 NB 培養液會干擾結果。希望能除去這些障礙，設計出只和銅離子作用，不受其他物質影響的胜肽。

經由 16s rRNA，確定找到的細菌可能為 *Bacillus fusiformis*、*Bacillus sphaericus* 或 *Bacillus macroides*。已有文獻證實 *Bacillus sphaericus* 會處理銅離子，*Bacillus* 屬中其他細菌也有這種能力。希望未來研究可以擴及至找尋能處理汞、鉛、鉻等污染的細菌。

實驗中尚未探討銅離子減少的作用機制，希望找到能將銅離子轉換成金屬銅的細菌，這樣不只能有效去除銅離子，解決環境污染問題，還可以將銅離子由污染物變成工業價值高的金屬銅。

玖、參考資料

1. 土壤及地下水污染整治網 <http://sgw.epa.gov.tw/public/>
2. 微生物學實驗 (2001)。國立編譯館。藝軒圖書出版社。
3. Antonio Carlos Augusto da Costa*; Flavia Pereira Duta. (2001) "Bioaccumulation of Copper, Zinc, Cadmium and Lead by *Bacillus sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis*" Brazilian Journal of Microbiology 32:1-5 ISSN 1517-8382
4. NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
5. Zheng et al. (2002) "A dansylated peptide for the selective detection of copper ions". *Chem Commun* 2350-2351

【評語】 040703

1. 能善用生物科技於研究中，並妥將研究結果以清楚具條理的圖表呈現。
2. 對銅離子的追蹤可再延續，將使研究更加完整。
3. 對於實驗材料中受銅離子濃度影響之細胞內酵素或基因可深入探討。