

台灣二〇〇五年國際科學展覽會

科 別：環境科學

作品名稱：黏質色拉雷菌(*Serratia marcescens*)發光重組菌偵測環境中含
酚環之毒性化合物之研究

得獎獎項：大會獎第三名

學 校：臺北市立第一女子高級中學

作 者：許瑜真

評語與建議事項：

參展者對於研究之方法，儀器之使用和表達能力均屬上乘。選定菌種
來根據其發光效應來作為測試特定污染物之分析工具也具原創性。

作者簡介

許瑜真，現年 17 歲，就讀於臺北市立第一女子高級中學三年級。個性開朗，興趣多元，除愛好自然科學外，並參加學校樂隊，擔任薩克斯風手。高一時，因為對分子及微生物學有濃厚興趣，而於專研課程選修生物。自高二暑假開始，在國立臺灣大醫技系賴信志教授的實驗室接受指導，進行有關黏質色拉雷菌對於河川廢水的偵測研究，而得以參加本次的國際科展。



黏質色拉雷菌(*Serratia marcescens*)發光重組菌偵測環境中含酚環之毒性化合物之研究

A pair of bacterial two-component system RssB-RssA was cooperated into *Serratia marcescens* for toxicity phenolic compound detection. First step of this study, *E coli* was used to accept the plasmid and certified by fluorescent. Then transfer the system from *E coli* into *Serratia marcescens*. Finally, 7 kinds of chemical, included phenol, benzene, toluene, xylenes, 4-chlorotoluene, 2-nitrotoluene, and kerosene, were used to check the sensitivity of this gene modified *Serratia marcescens* line. The results showed that this gene modified *Serratia marcescens* line had good performances and responses to those chemicals.

本實驗是以一受到二元訊號傳遞系統調控的發光基因重組質體，送入黏質色拉雷菌中，並以製備好的菌株進行毒性化合物之測試。在實驗的第一階段，我們將重組質體送入大腸桿菌內，並以其發光的有無來判斷是否達到送入的目的，其後再以電泳法確認各基因片段是否正確。第二階段再以相同的方法將選殖好的重組發光質體送入黏質色拉雷菌。第三階段，以發光重組菌針對酚、苯、甲苯、二甲苯、4-氯甲苯、2-硝基甲苯及煤油進行發光測試。結果方面，我們發現黏質色拉雷菌發光重組菌對於這一系列的酚環類化合物的確具有相當高的敏感度。

壹、前言

一、研究動機

隨著科技發展，無論在工業或是環境保護領域，即時偵測及監控環境中生物抑制性物質的變化以即時調整因應的系統，逐漸受到各界重視。目前已有利用海洋發光細菌 *Vibrio fischeri* 之發光強度作為各種污染物質的監控指標，但無進一步生化機制探討，因此無法改進偵測系統。

在高一參觀實驗室時，得知有實驗室針對這個方面研究出一套生物環境監測系統。於是從暑假開始到實驗室進行以現有菌株測試毒性化合物的實驗，並得以在教授及學姐的指導下將重組質體送入菌株內，以改進其對毒物的敏感性。

二、研究目的

深入探討含酚環之相關毒性化合物對 *Serratia marcescens* 發光重組菌的影響，以增加此生物監控系統之專一性及敏感性。

三、研究問題

利用 *Serratia marcescens* 發光重組菌以偵測常見環境生物抑制性物質，如酚、苯、甲苯、二甲苯、4-氯甲苯、2-硝基甲苯及煤油。

貳、文獻探討

現有對於含酚環之毒性化合物的測試系統包括 GC 以及 HPLC，但是 GC 需要高濃度的苯才會有反應；HPLC 的測試則需要較長的時間，且這兩項系統皆頗為昂貴。針對台灣河川廢水的污染，我們希望可以發展出一套快速且具有高敏感度、簡單及隨時隨地可操作的偵測系統，而生物性的環境測試方法不啻為一個可行的選擇。

在 Bechor 的報告(Bechor *et al.*, 2002)中指出，近來細菌在基因上的易操縱性已被應用於生物檢測之應用領域，甚至已構築出對化學藥物的存在或濃度放出易偵測訊號的品種。這份報告同時也提到，分別以大腸桿菌的 *grpE* 基因和 *dnaK* 基因啟動子接合發光基因組的重組質體，已經被證實是一個對於許多潛在的污染物具有高敏感性的檢測器，這項實驗是以微生物來進行毒性測試的研究方向。而 Bechor 是使用大腸桿菌的 *fabA* 基因啟動子接合發光基因，本實驗則是使用 *fabG* 基因的啟動子接合 *luxCDABE* 基因組來作為一生物感應器(bioreporter)，期望其具有更佳的敏感性，可望在廢水檢測上得到較佳的檢測效果。

細菌的訊號感應及傳遞系統-二元系統(two-component)為細菌用以感受外界環境變化的訊息感受系統，其主要組成有兩部分，一為感受器(sensor)，另一為對應調節子(response regulator)。透過感應外界刺激，反應在細菌生理基因表現上，以調節細菌生理行為、適應環境。利用下游基因對於二元系統的感應，我們可以監控細菌對外界刺激的反應，進而反推毒性物質的強度。

本研究藉由對於 *S. marcescens* 二元系統之瞭解，首先剔除其感受器基因作為宿主細胞(CH-1 Δ A)，並以受二元系統調控之 *fabG* 基因，取其啟動子(promoter)片段接合冷光基因組 *luxCDABE*，再將此重組質體送入 CH-1 Δ A 菌體內，形成一生物感應菌株(biosensor strain)以作為偵測常見環境生物抑制性物質之測試。

參、實驗設計及研究方法

一、選殖重組發光質體-pfabG

1. 利用生物資訊學軟體，例如：NCBI 網站上的核酸資料庫，以基因庫中其他菌屬之 *fabG* 基因為底版設計引子(primer)，進行聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR) 以增殖此 DNA 片段。
2. 將增殖出的 DNA 片段以合適的限制酶酵素(restriction endonuclease)剪切後，再以 DNA 接合酶 (DNA ligase)銜接此 DNA 片段到 pBCSK 這個表現載體上，於 16 °C 下作用 16 小時。
3. 將上述接合後的產物利用轉化作用 (transformation)送入大腸桿菌(*E. coli* DH5 α)，轉化作用說明如下：本實驗是利用CaCl₂誘致的大腸桿菌(*E. coli* DH5 α)作為人工轉化的目的

(1)將之前所得到的重組質體加入CaCl₂誘致過的大腸桿菌DH5 α 細胞中(稱為勝

- 任細胞， competent cell)。
- (2)以 heat shock (於 42°C 下)的方式將上述接合好的基因重組質體送入大腸桿菌 DH5 α 中。
 - (3)加入 500 μ l 的 LB 培養液(配方見附件 1)，於 37 °C 培養 1 小時。
 - (4)之後將菌液塗在含有抗生素的培養基上，並將此塗好菌液的培養基放入 37°C 的培養箱中。
4. 挑選含正確重組質體之大腸桿菌菌株
- 從上述的培養基中所長出來的菌落(colonies)中，任意挑選數顆菌落，以 PCR 的方式確認所挑選的 clone 是否無誤。之後，從中挑選其中一顆正確者，並命名為 pBCSKG。
5. 選殖含有 pfabG-*luxCDABE* DNA 片段之重組發光質體
- (1)分別以限制酶酵素(restriction endonuclease) *Bam*HI 剪切 pBCSKG 質體(plasmid) 以及含有 *luxCDABE* 基因組的質體。
 - (2)利用 DNA 純化 kit 分別回收已被 *Bam* HI 剪切過的 pBCSKG 片段及 *luxCDABE* 基因組之片段。
 - (3)同樣，將此二個 DNA 片段以 DNA 接合酶 (DNA ligase)進行轉化作用。
 - (4)挑選含正確重組質體之大腸桿菌菌株
 - (4.1)從隔夜培養之培養基上長出來的菌落(colonies)中，任意挑選數顆菌至新鮮 LB 培養液，於 37°C 下培養至隔夜。
 - (4.2)將隔夜培養之菌液置於冷光儀中，初步篩選會發光的菌株(表示其菌體內可能含有 *luxCDABE* 基因組)。
 - (4.3)分別抽取這些發光菌株內的質體，並以限制酶酵素 *Bam*HI 剪切，確認此重組質體正確無誤，且將此重組發光質體命名為 pfabG。

二、製備毒性測試所需之發光菌株

1. 將上述所得到正確之重組發光質體(pfabG)以電孔法(electroporation)的方式將之送入 *Serratia marcescens* CH-1 Δ A 突變株的菌體內。
2. 同樣，以測光的方式初步篩選會發光的菌株(表示其菌體內可能含有 *luxCDABE* 基因組)。
3. 分別抽取這些發光菌株內的質體，並以限制酶酵素 *Bam*HI 剪切，確認此重組質體是否正確。此即為本次實驗之測試菌株(pfabG 質體在 *S. marcescens* CH-1 Δ A 突變株的菌體內)。

三、環境抑制性物質測試實驗

1. 將上述所獲得之實驗菌株(pfabG/CH-1 Δ A)養在 LB 培養液中，置於 30°C 作隔夜培養。
2. 將隔夜的菌液以 1:100 的比例添加到新鮮的 LB 培養液中。
3. 置於 30°C 的震盪培養箱養至 OD=0.1。
 - (1)測 OD 值：
 - (1.1)取 1ml 的 LB 培養液加入 A 比色管。

- (1.2)另取 1ml 的菌液加入 B 比色管。
- (1.3)先將 A 比色管置入比色器中歸零。
- (1.4)再放入 B 比色管測量菌的 OD 值。
- (2)將酚、苯、甲苯、二甲苯、4-氯甲苯、2-硝基甲苯(以上六種均為 Fluka Co. 產品)及煤油(購自中油)的原液分別以 R.O.水進行 15 個不同濃度梯度的系列稀釋。每一梯度稀釋兩倍。
- (3)分別於發光試管中添加 100 μ l 的菌液及 900 μ l 不同濃度之待測樣品。
- (4)以震盪器充分震盪混合後，置於 30°C 下作用 15 分鐘。
- (5)置於冷光儀(Luminometer Berthold Lumat LB9507)中測量菌的發光強度
 - (5.1)將試管排入機器中，每隔一個便放置一個空的試管(以免試管發出來的光互相干擾)。
 - (5.2)啟動程式，開始測光。
 - (5.3)將測出來的數據整理成表格。

肆、研究結果與討論

- 一、第一階段的實驗結果，選殖出來的重組發光質體 **pfabG** 的確可以在 *S. marcescens* 上有非常好的發光效果。初步篩檢的結果，正確的菌體可以發出冷光，如下圖 1。進行電泳的結果則如圖 2，在 5.8 及 4.2kb 的地方可以看到轉殖成功之 *E. coli* 及 *S. marcescens* 均具有發光基因組 *luxCDABE* (5.8kb)及載體 **pBCSKG** (4.5kb)，顯示達到有效轉移效果。

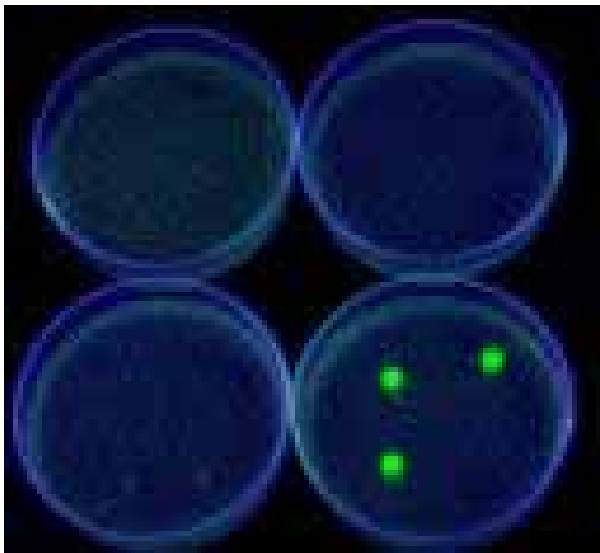


圖 1.

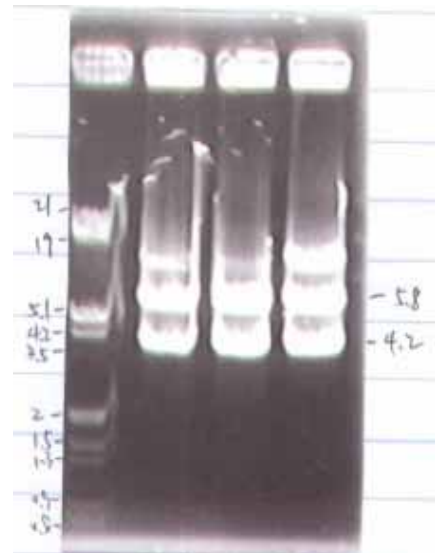


圖 2.

二、測光結果

在待測菌液中加入已知濃度的污染物，結果如下：

1. 隨酚添加濃度的提高，發光值也下降，在 27.08mg/L(原液稀釋(1/2)⁸) 以上有顯著的抑制效果，如圖 3。

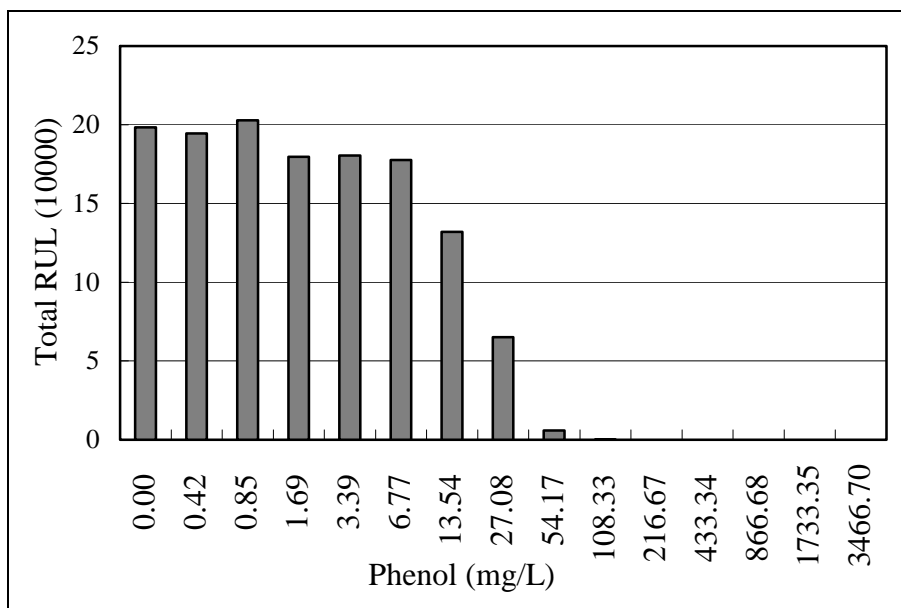


圖 3. *Serratia marcescens* pfabG/CH-1 Δ A 對酚 (Phenol) 的測試結果

2. 隨苯添加濃度的提高，發光值也下降，在 15693.75mg/L(原液稀釋(1/2)⁵) 以上有顯著的抑制效果，如圖 4。

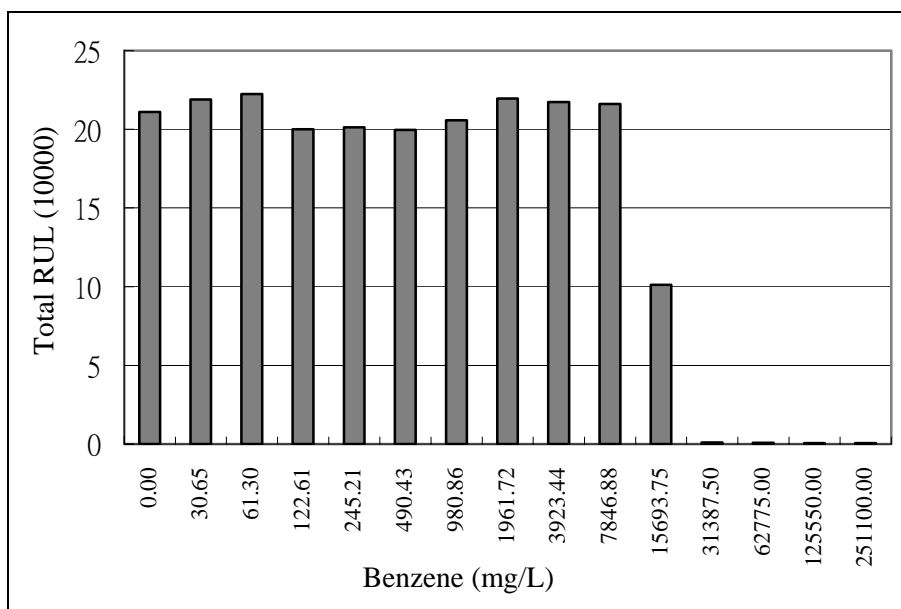


圖 4. *Serratia marcescens* pfabG/CH-1 Δ A 對苯 (Benzene) 的測試結果

3. 隨甲苯添加濃度的提高，發光值也下降，在 4196.88mg/L(原液稀釋(1/2)⁷) 以上有顯著的抑制效果，如圖 5。

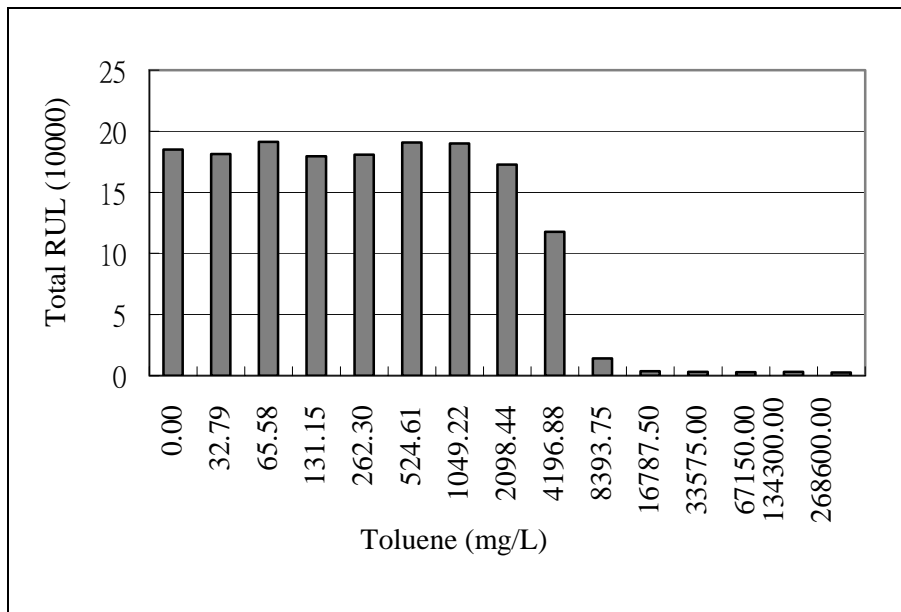


圖 5. *Serratia marcescens* pfabG/CH-1 Δ A 對甲苯(Toluene) 的測試結果

4. 隨二甲苯添加濃度的提高，發光值也下降，在 4525.00mg/L(原液稀釋(1/2)⁶) 以上有顯著的抑制效果，如圖 6。

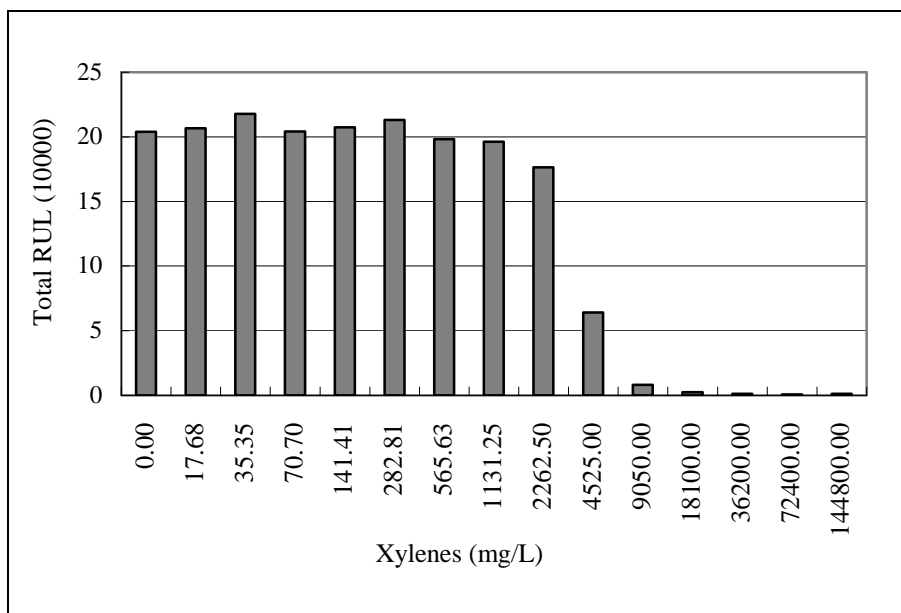


圖 6. *Serratia marcescens* pfabG/CH-1 Δ A 對二甲苯(Xylene) 的測試結果

5. 隨 4-氯甲苯添加濃度的提高，發光值也下降，在 696.48mg/L(原液稀釋(1/2)⁹) 以上有顯著的抑制效果，如圖 7。

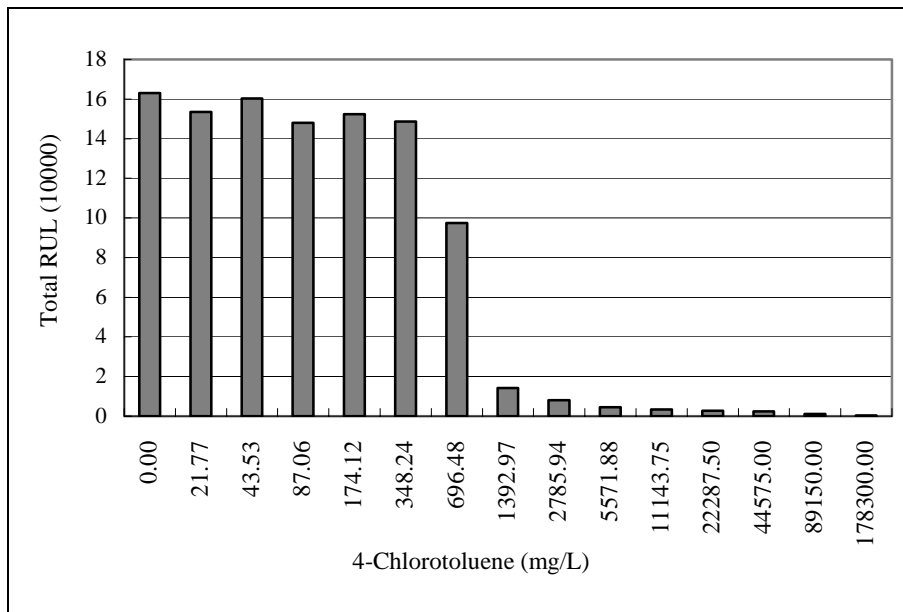


圖 7. *Serratia marcescens* pfabG/CH-1 Δ A 對 4-氯甲苯(4-Chlorotoluene) 的測試結果

6. 隨 2-硝基甲苯添加濃度的提高，發光值也下降，在 3026.56mg/L(原液稀釋(1/2)⁷) 以上有顯著的抑制效果，如圖 8。

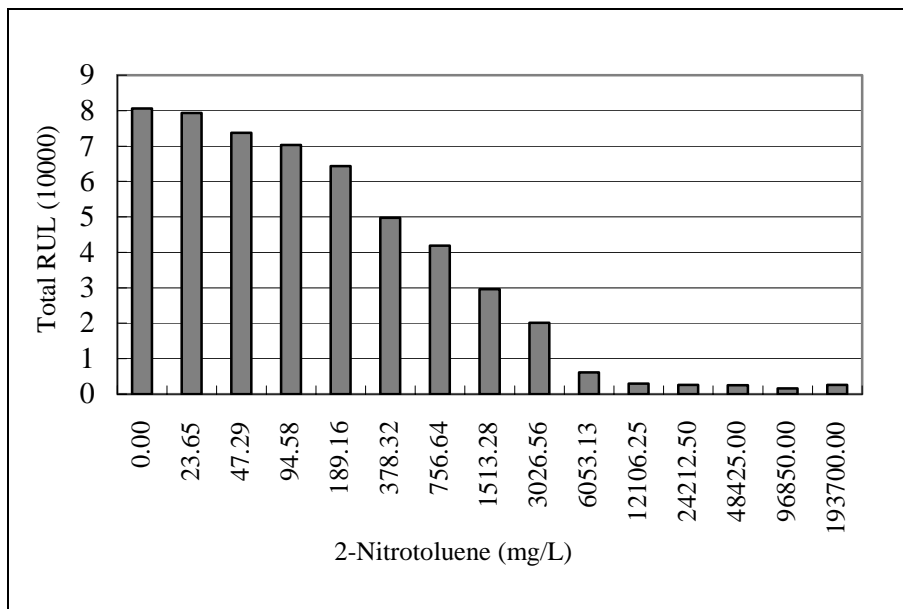


圖 8. *Serratia marcescens* pfabG/CH-1 Δ A 對 2-硝基甲苯(2-Nitrotoluene) 的測試結果

7. 高濃度苯 + 甲苯有抑制的效果，但低濃度時反而會促進發光，如圖 9。

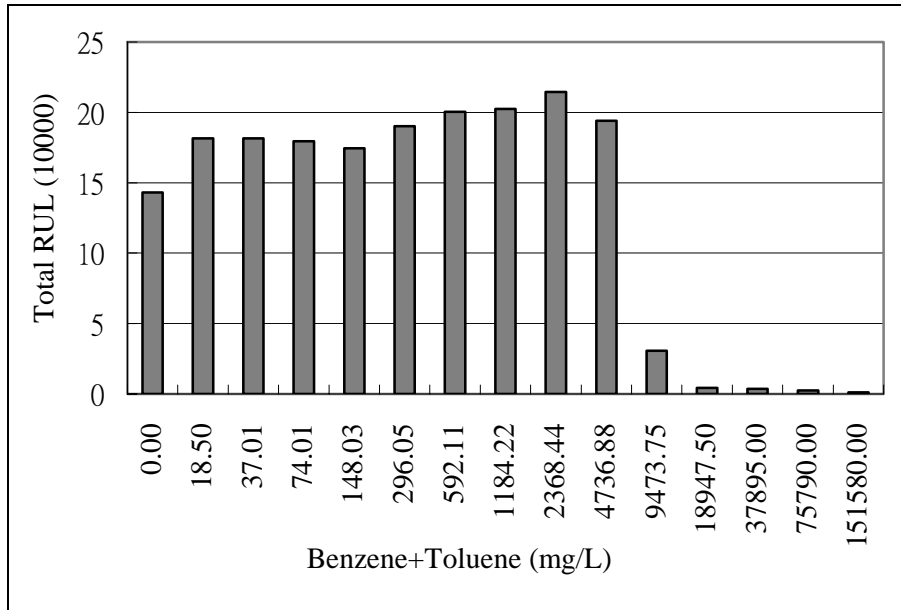


圖 9. *Serratia marcescens* pfabG/CH-1 Δ A 對 Benzene + Toluene 的測試結果

8. 在待測菌液中加入已知濃度煤油，有促進發光的效果，如圖 10。

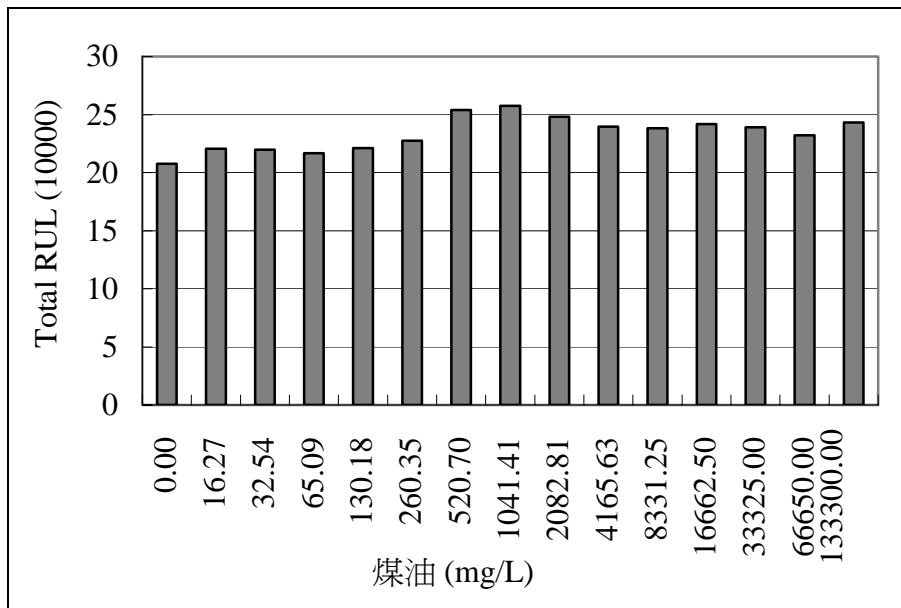


圖 10. *Serratia marcescens* pfabG/CH-1 Δ A 對煤油的測試結果

9. 6種含酚環化學物質對*Serratia marcescens*發光反應值與其標準差如下表1。酚在稀釋(1/2)⁹、苯在稀釋(1/2)⁶、4-氯甲苯在稀釋(1/2)¹⁰、其餘三種在稀釋(1/2)⁷後達到飽和，無顯著差異。

藥品	稀釋倍率				
	1/2	(1/2) ²	(1/2) ³	(1/2) ⁴	(1/2) ⁵
1.酚	0.009±0	0.008±0	0.008±0	0.005±0	0.007±0
2.苯	0.060±0	0.053±0	0.081±0	0.100±0	10.1±5.0
3.甲苯	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.4±0.0
4.二甲苯	0.12±0	0.08±0	0.1±0.2	0.2±0.2	0.8±5.6
5.4-氯甲苯	0.036±0	0.1±0.1	0.2±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1
6.2-硝基甲苯	0.3±0.1	0.2±0.2	0.2±0.3	0.3±0.3	0.3±1.1

藥品	稀釋倍率				
	(1/2) ⁶	(1/2) ⁷	(1/2) ⁸	(1/2) ⁹	(1/2) ¹⁰
1.酚	0.012±0	6.0±1.1	6.5±3.1	13.2±5.5	17.8±2.1
2.苯	21.6±0.5	21.7±1.7	22.0±1.1	20.6±1.4	20.0±2.5
3.甲苯	1.4±2.5	11.8±2.6	17.3±5.3	19.0±5.8	19.1±5.7
4.二甲苯	4.4±22.2	17.6±36.1	19.6±41.2	19.8±39.1	21.3±37.3
5.4-氯甲苯	0.4±0.1	0.8±0.0	1.4±0.1	9.8±4.8	14.9±2.7
6.2-硝基甲苯	0.6±2.0	2.0±4.6	3.0±7.3	4.2±8.4	5.0±8.2

藥品	稀釋倍率				
	(1/2) ¹¹	(1/2) ¹²	(1/2) ¹³	(1/2) ¹⁴	(1/2) ¹⁵
1.酚	18.0±1.9	18.0±1.7	20.3±1.6	19.4±1.3	19.8±1.2
2.苯	20.1±1.0	20.0±1.1	22.2±0.6	21.9±0.7	21.1±0.4
3.甲苯	18.1±5.1	17.9±5.9	19.1±6.4	18.1±5.7	18.5±6.1
4.二甲苯	20.7±36.8	20.4±34.4	21.8±28.6	20.7±27.8	20.4±31.4
5.4-氯甲苯	15.2±0.0	14.8±0.9	16.0±0.1	15.4±0.4	16.3±0.6
6.2-硝基甲苯	6.4±7.4	7.0±7.6	7.4±8.5	7.9±7.8	8.1±8.1

表 1.六種含酚環化學物質對 *Serratia marcescens* 發光反應值與其標準差

伍、結論與應用

以往的水污染偵測方法大多費時且昂貴，且多在分析水中的成分，前處理過程及維護非常的麻煩，並不適合拿來用作廢水毒性的迅速篩檢之用。在生物檢定上，雖然許多廢水處理廠會養一池魚來作為氯氣濃度是否過高的指標，但事實上我們並未完全可立即

知道水中污物的成分對生物體的影響。然而微生物的反應則相當直截且迅速，應是未來應用的重點。如果進一步將微生物對特定污染物的反應系統商品化，更能提供使用者隨時進行監控，以達到全面污染監控的目標。

在這些前提下，爲了發展出最適合特定毒性測定的系統，我們使用黏質色拉雷氏菌 (*Serratia marcescens* pfabG/CH-1 Δ A) 作爲指標物。利用其可以發光的特性，讓我們可以在很短的時間內測出污水的毒性高低。

台灣的自來水標準酚類爲 0.001mg/L 以下，而人體中毒量爲體重的 20 – 200 mg/Kg，致死量爲體重的 0.5 – 1.0 g/Kg。與本實驗的結果(約 14mg/L 即可明顯表現) 相比，仍無法作爲自來水檢驗用，但已可用在中到重度污染檢測上。如在敏感度上再加以改進，相信可望運用在實際的河川水質管制上。

陸、參考文獻

- 一、Bechor Ofra, Dana R. Smulski, Tina K. Van Dyk, et al. 2002, Recombinant microorganisms as environmental biosensors: pollutants detection by *Escherichia coli* bearing *fabA'*::*lux* fusions. *J Biotechnol*; 94(1):125-32.
- 二、Stiner Lawrence and Larry J. Halverson. 2002, Development and characterization of a green fluorescent protein-based bacterial biosensor for bioavailable toluene and related compounds. *Appl Environ Microbiol*; 68(4):1962-71.
- 三、Willardson Barry M., Jon F. Wilkins, Timothy A. Rand, et al. 1998, Development and testing of a bacterial biosensor for toluene-based environmental contaminants. *Appl Environ Microbio*; 64(3):1006-12.

附件一

壹、LB 培養液(含有 1% 胺基酸)

5 X M9 鹽 (配法如下二)

1M 硫酸鎂

20% 葡萄糖 (glucose)

1M 氯化鈣

胺基酸(casamino acid)

貳、5 X M9 鹽

磷酸鈉 (無水) 33.9 g

磷酸二氫鉀 7.5 g

氯化鈉 1.25 g

氯化銨 2.5 g

加入 2 次水至 500 ml