

2017 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 070008
參展科別 微生物學
作品名稱 迪化汙水處理廠降解雌激素之菌種純化
得獎獎項 大會獎：二等獎

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

關鍵字 雌激素、迪化汙水處理廠

作者簡介



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

摘要

雌激素為一種固醇類的環境賀爾蒙，若水生動物長時間暴露於低濃度的雌激素中，即會導致其生理及行為異常。我們企圖從迪化汙水處理廠中分離純化出能有效降解雌激素之菌株，希冀了解這些菌株的生理特性與降解雌激素的能力。首先在活性汙泥中加入高濃度雌二醇 (1mM)，以增進雌激素降解菌在菌群中的比例，接著利用十倍序列稀釋進行菌株純化。培養期間以薄層層析檢測雌激素降解活性。隨後以固態培養基培養法取得單一菌落，並進行聚合酶連鎖反應及核酸定序。之後我們亦將純化出之菌株進行其他固醇降解測定。目前純化出一株 *Novosphingobium* 屬的變形菌，其為一新的菌種，確實能降解雌二醇及其他固醇，包含雌酮、雄烯二酮、膽酸、孕酮和睪酮。然而，其並不能降解乙炔雌二醇。該菌株具有修復受汙染環境及製備雌激素相關藥品之應用潛力。

Abstract

The occurrence of estrogens in surface water worldwide is of great concern as these compounds have been classified as group I carcinogens by the World Health Organization. Moreover, estrogens are environmental hormones; long-term exposure to these compounds, even at sub-nanogram-per-liter concentrations, may adversely affect physiology and behaviors of aquatic organisms. Thus far, only a few estrogen-degrading bacteria have been described. In the present study, we attempted to isolate and characterize the estrogen-degrading microorganisms from the activated sludge of the Dihua Sewage Treatment Plant, hoping to realize both the ability in degrading estrogens and the physiological characteristics of these microorganisms. To increase populations of estrogen-degrading microorganisms in the microbial community, estradiol (1 mM) was added to the activated sludge samples. The samples were then diluted through a 10-fold serial dilution (10^{-1} ~ 10^{-11}). Thin-layer chromatography was applied to monitor the consumption of estradiol and the production of the degradation metabolites. The sludge samples were also spread on agar plates containing 2 mM estradiol. The resulting colonies were picked up for PCR amplification, and the amplified 16S rRNA gene of individual colonies was sequenced. The substrate utilization pattern of the bacterial isolate was also investigated. Consequently, we isolated and characterized a new species of *Novosphingobium* which is an alphaproteobacterium capable of degrading estrogens (estradiol and estrone) as well as other steroids, including androst-4-en-3,17-dione, cholic acid, progesterone, and testosterone. However, its growth with ethynylestradiol, a popular synthetic estrogen, was not observed. This bacterium has the potential applications in bioremediation of steroid-contaminated ecosystems as well as the biotechnological production of estrogenic drugs.

前言

一、研究動機及背景介紹

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

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

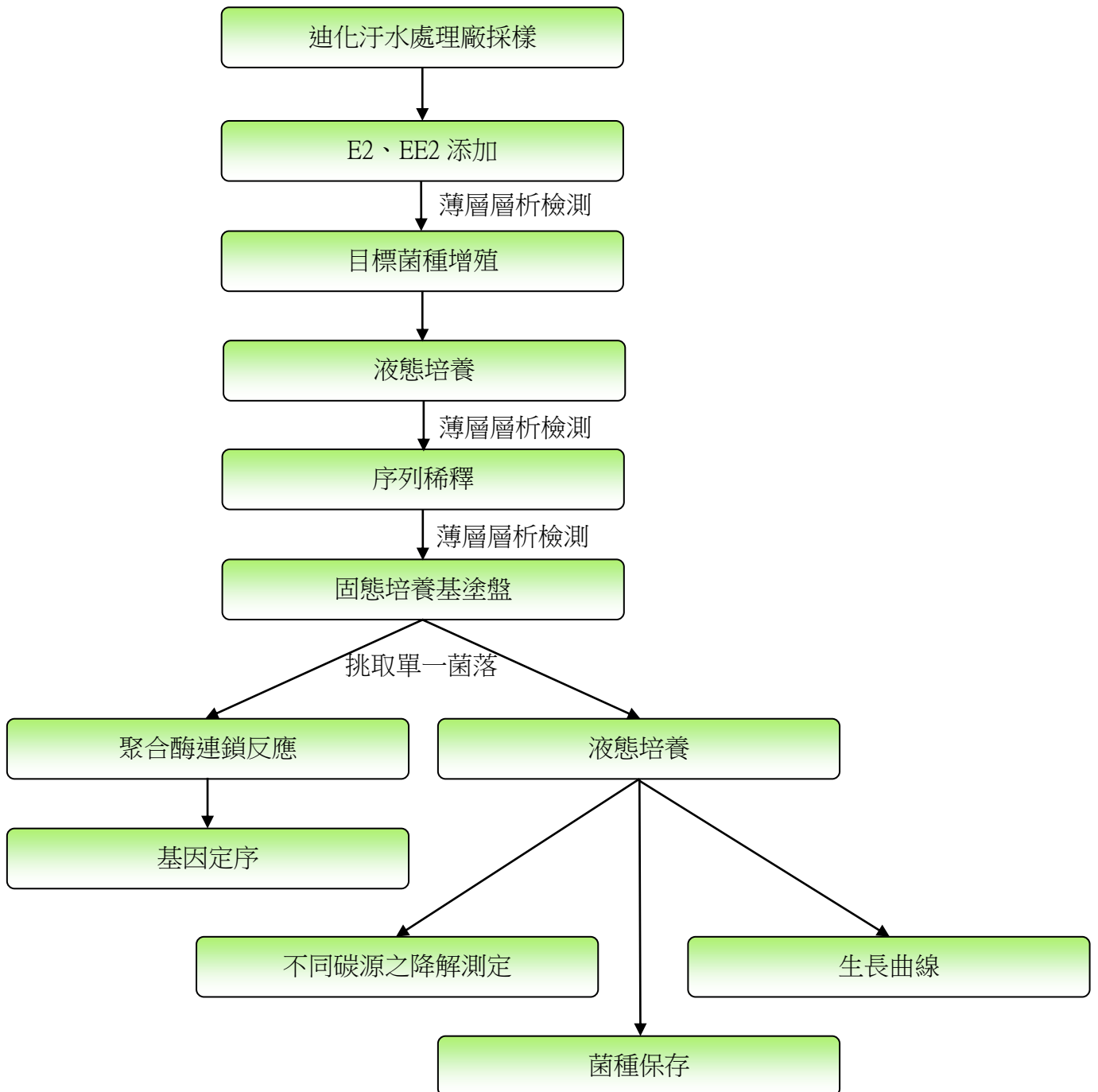
在本研究中，我們自迪化污水處理廠採集水樣，冀望分離純化出能有效降解 E2 及 EE2 之菌株，並期許未來能將研究成果實際應用於污水處理，改善此環境荷爾蒙造成的生態衝擊。

二、研究目的

- (一) 純化能降解 E2 之菌種並了解其生理特性
- (二) 純化能降解 EE2 之菌種並了解其生理特性

壹、 研究方法及過程

一、 研究流程



二、研究材料及設備

(一) 培養基

1. R2A
2. LB
3. basal medium

(二) 藥品

1. E1
2. E2
3. EE2
4. 雄烯二酮
5. 膽酸
6. 孕酮
7. 辜酮
8. 膽固醇
9. 二甲基亞砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO)
10. 乙酸乙酯 (ethyl acetate, EA)
11. 展層液 (二氯甲烷：乙酸乙酯：酒精 = 7：2：0.025)
12. 濃度 30% 硫酸溶液
13. PCR 引子: 細菌 16S rRNA 通用引子 27F、1492R
14. PCR 試劑: 2X SuperRed PCR Master mix
15. 雙縮脲試劑 A、B

(三) 器皿用具

1. 秤量匙、秤量紙
2. 錐形瓶、培養皿
3. 薄層層析鋁箔片
4. 離心管、PCR 管
5. 養菌管、凍菌管

6. 微量滴定盤 (96 well)
7. 微量吸取器、安全吸球

(四) 儀器設備

1. 電子秤
2. 無菌操作台
3. 震盪培養器
4. 離心機
5. 低溫冷凝濃縮機
6. 抽風櫃
7. 聚合酶連鎖反應儀 (PCR machine)
8. 酵素免疫分析儀

三、研究方法

(一) 迪化汙水處理廠採樣

迪化汙水處理廠 (圖 1) 是全國規模最大的二級汙水處理廠，其匯集來自家庭、畜牧、工業等來源之汙水，其中含有大量雌激素，故本研究至迪化汙水處理廠採集樣品 2 升，希望能從中純化出可降解雌激素之菌種。



圖 1

(二) 目標菌種增殖 (enrichment)

1. 固態培養基培養

將汙水樣本以營養豐富的 R2A、LB 固態培養基塗盤，冀得單一菌落。

2. 液態培養基培養

- (1) 將污水樣本直接接種至成分明確的基礎培養基(basal medium) (表 1)，加入 E2 或 EE2 作為唯一碳源。此可有效促進以 E2 或 EE2 維生之菌種的生長。
- (2) 於錐形瓶中，將 2mM E2 及 EE2 加至 95 毫升基礎培養基，並加入 5 毫升污水樣本。隨即以鋁箔封口，並進行震盪培養。
- (3) 進行數次轉殖，提高能降解雌激素之菌種比例。

表一

	成分	2L	1L	100mL
1	NH ₄ Cl(g)	4	2	0.2
2	Phosphate buffer (pH 7.4;ml)	50	25	2.5
	1M KH ₂ PO ₄	9.9	4.95	0.495
	1M K ₂ HPO ₄	40.1	20.05	2.005
3	ddH ₂ O(ml)	1850	925	92.5
4	Carbon source (2.5mM;g)			
Autoclave, Sonication for dissolving carbon source				
5	1M CaCl ₂ (ml)	1.4	0.7	0.07
6	1M MgSO ₄ (ml)	4	2	0.2
7	Trace mental mix(ml)	3	1.5	0.15
8	Vitamin mix(ml)	3	1.5	0.15
9	Selenite(ml)	3	1.5	0.15
10	菌液 (佔總體積 1/20;ml)	100	50	5

(三) 薄層層析

1. 純化過程中於固定時間點會抽取 0.5 毫升菌液以 0.5 毫升有機溶劑乙酸乙酯萃取，以震盪器進行 2 分鐘震盪充分萃取後，以 13500rpm 的速度置離心機離心 5 分鐘。
2. 取 0.4 毫升上清液至另一離心管後，重複步驟 1，再抽取 0.4 毫升上清液，並將共 0.8 毫升上清液之離心管放置低溫冷凝濃縮機抽乾 1 小時。
3. 將抽乾後的離心管加入 50 微升的乙酸乙酯回溶雌激素，取 10 微升進行點片後，浸泡展開液 12 分鐘，以波長 302nm 之紫外光照射並拍照記錄。以 30% 之硫酸溶液浸泡後，以 120°C 烤片顯色並拍照記錄，確認雌激素是否有減少，以推論其中有無能降解雌激素之菌種。

(四) 序列稀釋

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

(五) 固態培養基塗盤

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

(六) 聚合酶連鎖反應及基因定序

1. 配製預混料 (premix) (表二)

表二

項目	一管所需量
dd H ₂ O	9.6 微升
primer 27F	0.2 微升
primer 1492R	0.2 微升
2X Master mix	10 微升
colony	0 微升
Total	20 微升

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

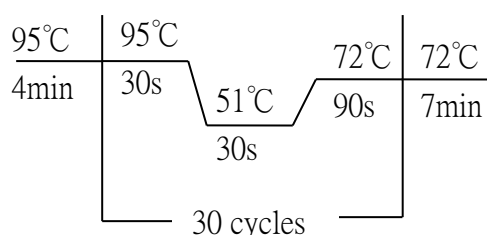


圖 2

3. 配製 2% 洋菜膠體 (agarose gel)，秤取 1 公克的洋菜膠加入 50 毫升 TAE buffer 中，秤重後加熱以幫助溶解，後以 dd H₂O 補充因加熱而喪失之水分。加入 DNA 染劑 SYBR 10000X 5 微升至洋菜膠混和均勻，並倒入 tank 中至尺梳尖端 1/3~1/2 處，並以箱子蓋著靜置 30 分鐘，避免在洋菜膠體凝固過程中染劑因照光而裂解。
4. 於電泳槽中倒入 TAE buffer 至防呆線，並放入洋菜膠，於 well 加入 3 微升標準品及 4 微升 PCR 產物進行洋菜膠體電泳分析，確認其為含有目標 16S rRNA 基因片段後進行定序。
5. 由定序結果的訊號判斷菌株的純度，並進一步以 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 之 Blastn 功能與資料庫菌種資料比對，推論該菌株的身分。

(七) 菌種保存

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

(八) E2、EE2 共代謝探討

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

(九) 不同碳源之降解測定

1. 以其他固醇類作為碳源，測定純化之菌株能力

雌酮 (estrone, E1)

雌二醇 (estradiol, E2)

雄烯二酮 (androst-4-en-3,17-dione, AD)

膽酸 (cholic acid)

孕酮 (progesterone)

睪酮 (testosterone)

膽固醇 (cholesterol)

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

(十) 生長曲線

1. 測定純化之菌株生長曲線以利後續實驗之安排。
2. 於 -80°C 冰箱拿出純菌之菌種保存以 R2A 液態培養進行活化，菌液：培養基以 1：50 轉殖至 1mM E2、200 毫升 basal medium 中，並進行震盪培養。
3. 早中晚於固定時間點抽取 1 毫升菌液至離心管中，共 10 個時間點。
4. 以蛋白質定量法 (BCA) 測定菌量之變化

(1) 將抽點樣品置離心機中以 4500rpm 離心 5 分鐘，並將上清液抽離，留下菌塊。

- (2) 加入 50 微升 dd H₂O，並震盪使菌塊懸浮，置於液態氮中使其冰凍，後放置 30°C 溫水解凍，利用溫差進行破菌重複 4 次後，再以 13500 rpm 離心 5 分鐘。
- (3) 以牛血清白蛋白 2 毫克／毫升 作為標準品，各取 0 微升、1 微升、2 微升、4 微升、6 微升、8 微升、10 微升的標準品及 15 微升的樣品以二重複加入至微量滴定盤。
- (4) 將雙縮脲試劑 A、B 以 50：1 比例混和，並取 100 微升至微量滴定盤中，靜置 37°C 反應 10 分鐘。
- (5) 以酵素免疫分析儀測試 562nm 吸光值，並以數據作圖。

貳、 研究結果與討論

一、 研究結果

(一) 純化中菌種降解雌激素能力分析結果

圖 3 為目標菌種增殖、繼代第三代菌液 (命名為 E2-3) 經萃取後以薄層層析的結果，可看到加入 E2 的菌液中，E2 隨著時間減少，而 E1 隨著時間增加，可推知菌種將 E2 轉換成 E1。而 EE2 則毫無減少跡象，並無被降解。

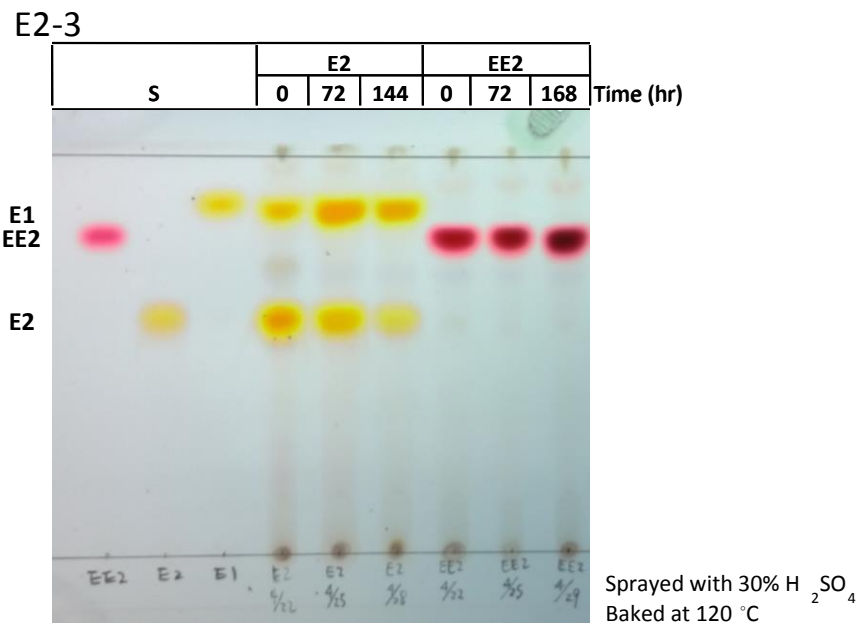


圖 3

(二) 單一菌落菌種鑑定結果

將繼代第三代、具有降解 E2 活性的菌液經連續稀釋後，取不同稀釋倍率菌液進行固態培養基培養。培養結果自 10⁻⁷ 稀釋液成功獲得單一菌落，且菌落周圍有明顯降解 E2 後所產生之澄清環，證實此菌落確實有降解 E2 能力 (圖 4)。針對此菌落進行 colony PCR 增幅 16S rRNA 基因片段後，定序分析。定序結果之部分訊號如圖 5，序列訊號單一無雜訊，顯示該菌落確實為單一菌種。將該序列經 NCBI Blatsn 比對分析後，確認為 *Novosphingobium* 屬的細菌，命名為 *Novosphingobium* sp. E2-3-7。

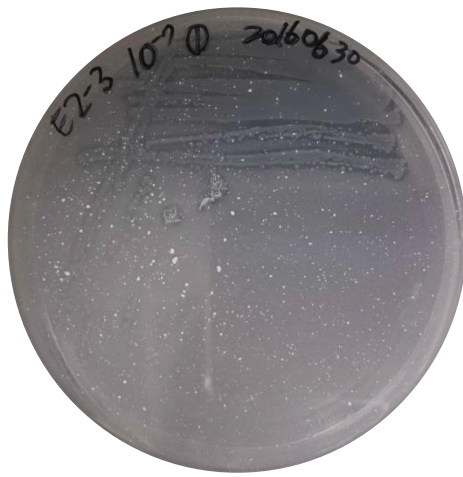


圖 4

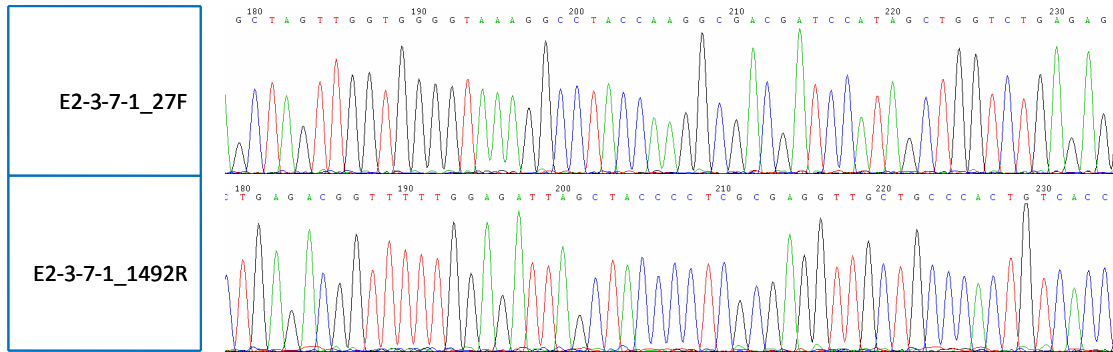


圖 5

(三) 純菌株降解 E2、EE2 分析結果

圖 6 為本研究所純化出之菌種 *Novosphingobium* sp. E2-3-7 的薄層層析結果。如圖所示，可明顯看到 E2 及其轉化之 E1 均被完全降解。然而 EE2 仍然無明顯降解跡象。我們同時也進行共代謝分析，比較單獨添加 E2 組與同時添加 E2+EE2 組，經相同天數培養後，E2 存在並不能誘使菌株 E2-3-7 降解 EE2，反而影響其降解 E2 效率。

E2-3-7

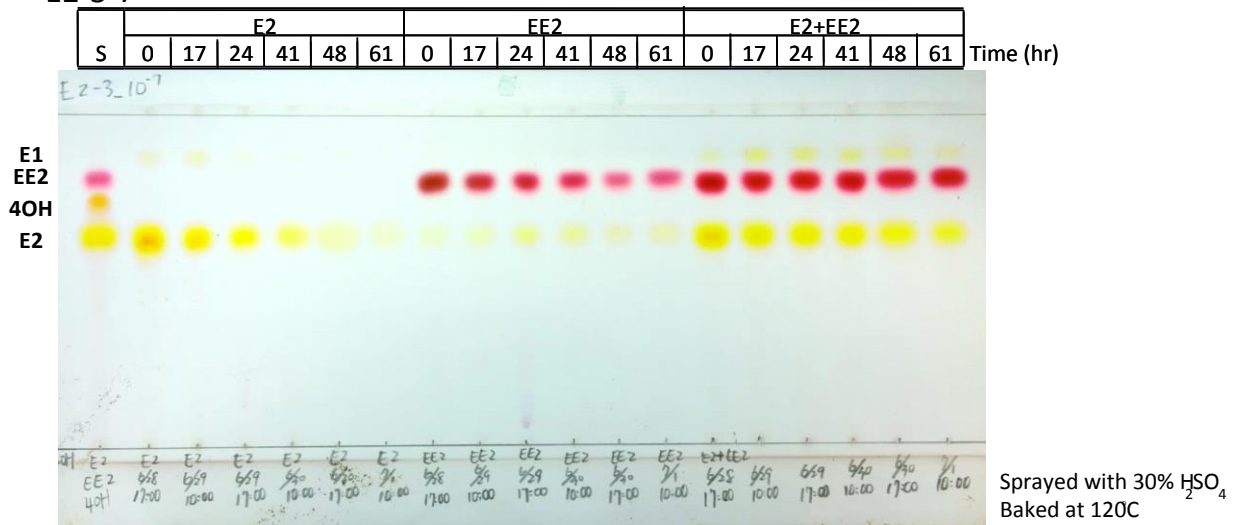


圖 6

(四) 純菌降解不同碳源之分析結果

圖 7 為本研究所純化出之菌種 *Novosphingobium* sp. E2-3-7 以不同固醇類為碳源的薄層層析結果。明顯看到，除膽固醇無明顯降解跡象外，E1、E2、AD、膽酸、孕酮及睪酮至第 21 天時皆完全被降解，可得知此菌株有強大的降解能力。

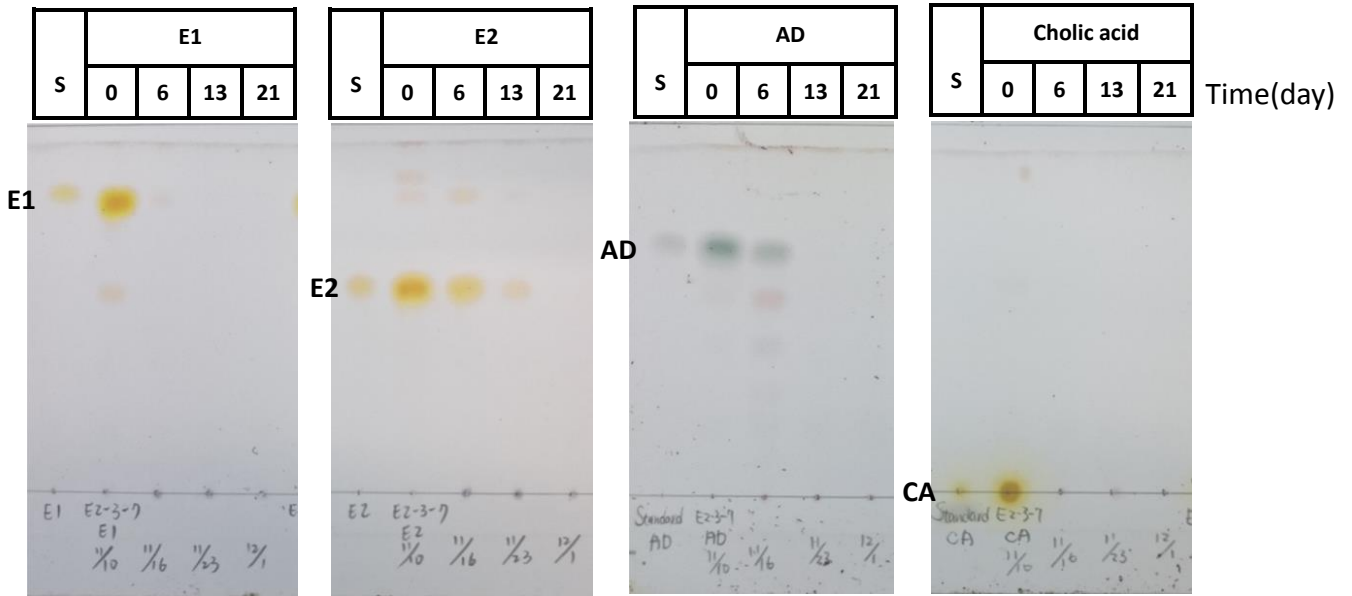


圖 7-1

圖 7-2

圖 7-3

圖 7-4

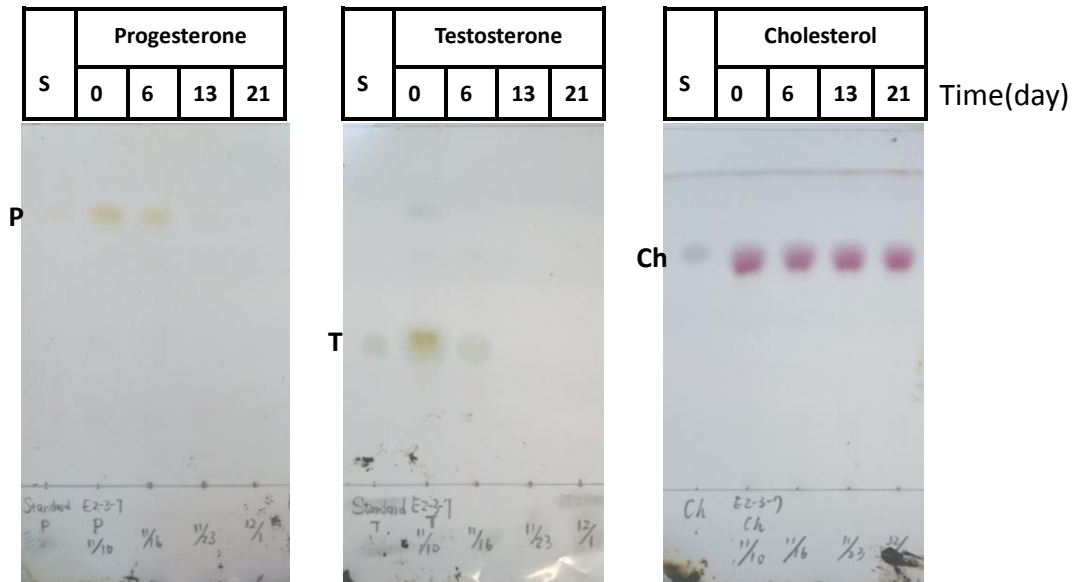


圖 7-5

圖 7-6

圖 7-7

二、 討論

此研究一開始從迪化汙水處理廠取回之樣品分成兩部分，一部分直接使用營養豐富的固態培養基進行培養，另一部分則使用成分明確之液態培養基進行目標菌種增殖。由於營養豐富的固態培養基含多種碳源，多數菌種並不會優先選擇降解雌激素以獲取碳源，故無法篩選出能降解雌激素的菌種。

使用成分明確的液態培養基進行繼代培養，令 E2、EE2 為唯一碳源，則無法降解之菌種會因缺乏碳源而死亡，而能降解 E2、EE2 之菌種比例會隨著繼代次數提升。

根據文獻，與本研究所純化出之 *Novosphingobium* sp. E2-3-7 同屬菌株 *Novosphingobium tardagens*，確實具有降解 E2 之能力 (Fujii *et al.*, 2003)。

本研究發現，自污水處理廠取回的樣本，不論是未純化的混雜菌種（如菌液 E2-3）或是已純化之單一菌種 *Novosphingobium* sp. E2-3-7，皆無法有效降解人工合成的 EE2（圖 3 及圖 6）。推測其原因除了 EE2 為近代才出現之人造化合物，致使環境菌種難以辨認外，另一原因應該在於結構上之特殊性。如圖 8 所示，A 為 E2 的結構式，B 為 EE2 的結構式，因為 EE2 的 17 位碳上比 E2 多了一個乙炔叁鍵，使得其被環境微生物辨識並降解的可能性大幅降低。由共代謝的實驗結果發現 EE2 存在會影響原本能有效降解 E2 的菌株降解 E2 的能力。此有趣現象值得進一步研究探討。

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

另外生長曲線部分，因菌株生長狀況不佳，推測其原因，應為氣溫過低，致使菌株未能快速繁殖，因此未取得有效數據進行繪圖。

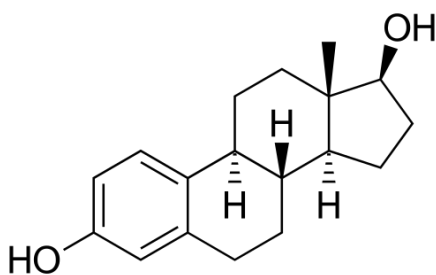


圖 8-A

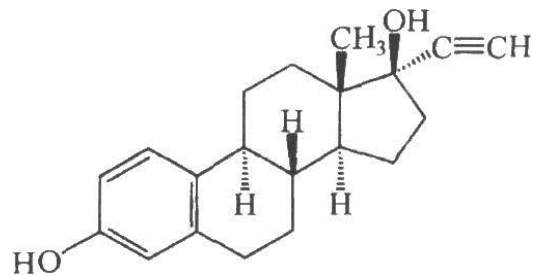


圖 8-B

參、 結論與未來展望

- 一、本研究確實純化出一株具有降解雌激素 E2 能力的新菌株，命名為 *Novosphingobium* sp. E2-3-7。
- 二、本研究沒有分離純化出能有效降解 EE2 的菌株，推測污水處理廠中具有該能力的菌株比例必相當稀少。
- 三、本研究純化之菌株 *Novosphingobium* sp. E2-3-7 可降解 E1、E2、雄烯二酮、膽酸、孕酮及甾酮，但無法降解膽固醇。
- 四、未來將再次嘗試製作菌株之生長曲線。
- 五、未來將持續純化不同菌株，並嘗試在不同濃度的雌激素下觀察菌株的生長及降解情形，也會更進一步探討雌激素的降解途徑。
- 六、本研究純化之菌株具有修復受汙染環境及製備雌激素相關藥品之應用潛力，未來將持續深入探究其發展的可能性。

肆、 参考文献

- 一、 Fujii K, Satomi M, Morita N, Motomura T, Tanaka T, Kikuchi S. (2003). *Novosphingobium tardaugens* sp. nov., an oestradiol-degrading bacterium isolated from activated sludge of a sewage treatment plant in Tokyo. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 47-52.
- 二、 Ghayee HK, Auchus RJ. (2007). Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis. *Rev Endocr Metab Disord* **8**: 289-300.
- 三、 Iwanowicz LR, Blazer VS, Guy CP, Pinkney AE, Mullican JE, Alvarez DA. (2009). Reproductive health of bass in the Potamac, U. S. A., drainage: Part 1: Exploring the effects of proximity to wastewater treatment plant discharge. *Environ Toxicol Chem* **28**: 1072-1083.
- 四、 Jobling S, Williams R, Johnson A, Taylor A, Gross-Sorokin M, Nolan M *et al.* (2006). Predicted exposures to steroid estrogens in U.K. rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. *Environ Health Perspect* **114**: 32-39.
- 五、 Lambert MR, Giller GS, Barber LB, Fitzgerald KC, Skelly DK. (2015). Suburbanization, estrogen contamination, and sex ratio in wild amphibian populations. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**: 11881-11886.
- 六、 Massart F, Parrino R, Seppia P, Federico G, Saggese G. (2006). How do environmental estrogen disruptors induce precocious puberty. *Minerva Pediatr* **58**: 247-254.
- 七、 Mechoulam R, Brueggemeier R, Denlinger D. (1984). Estrogens in insects. *Cell Mol Life Sci* **40**: 942-944.
- 八、 Palme R, Fischer P, Schildorfer H, Ismail MN. (1996). Excretion of infused ¹⁴C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. *Anim Reprod Sci* **43**: 43-63.
- 九、 Sumpter JP. (1998). Xenoendocrine disrupters--environmental impacts. *Toxicol Lett* **102-103**: 337-342.
- 十、 Tarrant AM, Blomquist CH, Lima PH, Atkinson MJ, Atkinson S. (2003). Metabolism of estrogens and androgens by scleractinian corals. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **136**: 473-485.
- 十一、 Ryan KJ. (1982). Biochemistry of aromatase: significance to female reproductive physiology. *Cancer Res* **42**: 3342s-3344s.

【評語】 070008

1. 本研究從迪化街汙水處理廠集水樣品中不離出菌株
Novosphingobium sp. E2-3-7 有降解雌二醇的能力，同時也可降解多種固醇的分子，本研究有應用價值，值得鼓勵。
2. 人造環境荷爾蒙在生態的影響上越來越嚴重，作者應去測試所分離的菌株會不會代謝人造環境荷爾蒙。
3. *Novosphingobium* sp. E2-3-7 與 *Novosphingobium tardaugens* 16s rRNA 差異度與序列比對應該用一張圖呈現。