

行政院環境保護署

103 年度土壤及地下水污染整治基金補助研究模場試驗專案

利用細菌生物感測器快速篩測底泥及地下水現場污染物 期末報告

主 辦 單 位： 行政院環境保護署

計 畫 執 行 單 位：國立臺灣大學／生物環境系統工程學系

計 畫 主 持 人：廖秀娟 教授

計 畫 執 行 期 間：102年11月25日起至

103年11月24日

中 華 民 國 103 年 11 月 印製

土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案 計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

☒ 達成目標

☐ 未達成目標（請說明，以 100 字為限）

☐ 實驗失敗

☐ 因故實驗中斷

☐ 其他原因

說明：整體而言，本研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標>95%；唯其中“建立以硫氧化菌為基礎之廣效性毒性生物感測器”部分，因向“食品工業發展研究所”所購買之硫氧化菌，無法有效活化培養，以供毒性生物感測器測試，因此該實驗無法完成。

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文：☐已發表____篇；☒未發表之文稿 1 篇；☐撰寫中____篇；☐無

專利：☐已獲得____件；☐申請中____件；☐無

技轉：☐已技轉；☐洽談中；☐無

其他：（100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、經濟效益、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，500 字為限）

說明：本計畫的補助經費，提供至少 1 篇 SCI papers. 目前已將部分研究成果投稿於 *Environmental Pollution* (SCI, 2013 IF=3.902, 2013 IF ranking 22/215=10.2% in ENVIRONMENTAL SCIENCES; 5-Year IF=4.306, 5-Year IF ranking 24/215=11.2% in ENVIRONMENTAL SCIENCES)，目前狀態是 under review。

本研究計畫成功建構專一性生物感測器套組，可以有效偵測重金屬，在放流水標準、地下水汙染管制標準第二類之濃度下皆可有效作用，在多重金屬干擾下亦可有優良的辨識度。並且價錢便宜、培養方便，且偵測時間短(約 2 ~ 3 小時)，作為快速篩測環境重金屬之工具十分具有潛力。未來應用方向將可輔助化學方法，先篩選出具有潛在污染可能的樣點，如此可縮短污染檢測所耗費之時間與增加化學方法之效率，有利管理機關進行污染管制，亦可大幅降低成本。而其檢測結果亦具有生物有效性資訊，可供相關單位進行環境風險評估。在臺灣之環境污染檢測上，本研究計畫所成功研發之專一性生物感測器套組將可收事半功倍之效。

研究成果中文摘要

國內部份河川污染嚴重，然而底泥中毒性物質之污染程度與其對生態之影響，尚無法正確的評估，尤其是底泥中重金屬較易因環境擾動而釋出至水域環境與地下水，甚至直接或間接影響到生態系統及人類健康。因此，開發靈敏且降低成本之快速篩測方法是急需迫切之議題。鑑於此，本研究計畫目的為建構一系列專一性細菌生物感測器(biosensors)，用以快速篩測底泥及地下水現場之重金屬(砷、汞與鎘)。

本研究計畫已成功建構攜帶不同報告基因(report gene)之重金屬專一性細菌生物感測器，用以偵測重金屬砷、汞與鎘，其中所使用之報告基因包括綠色螢光蛋白(green fluorescent protein, *gfp*)、*lacZ* 及 *luxCDABE*。本研究利用基因工程技術，總計建構 7 個專一性的細菌生物感測器，其中包括：2 個針對砷檢測的 *lacZ* 及 *luxCDABE* 生物感測器；2 個針對鎘檢測的 *lacZ* 及 *luxCDABE* 生物感測器；3 個針對汞檢測的 *gfp*, *lacZ* 及 *luxCDABE* 生物感測器。加上之前本研究室建構的 2 個針對砷及鎘檢測的 *gfp* 生物感測器，總計使用 9 個砷、汞與鎘生物感測器分析檢測環境樣品。

研究結果顯示，以 *gfp* 與 *luxCDABE* 為報告基因之細菌生物感測器對於重金屬檢測有較低之檢測極限及較高之穩定性，可以在多重污染物環境中偵測特定重金屬。本研究計畫所建構之細菌生物感測器不僅培養方便並且可以快速篩測重金屬。再者，成本分析結果顯示細菌生物感測器之檢測成本相較於化學分析法較為便宜。

整體而言，本研究計畫證明細菌生物感測器可以適用於偵測受污染底泥與地下水樣品中重金屬之生物有效性(bioavailability)，此資訊將有助於更準確的風險評估，提供環保署及相關單位建立更有效的環境監測策略；雖然利用細菌生物感測器對於環境相關污染物檢測的實際應用性，仍須後續更深入的研究，本研究計畫研發之細菌生物感測器對於環境相關污染物樣品檢測具有運用的潛力。本研究計畫希冀所建構之細菌生物感測器，有助於建立管理政策與預警系統，以維護環境品質。

Abstract

Certain rivers in Taiwan are heavily polluted. However, the toxicity and ecological impact of pollutants in the sediment are difficult to accurately assess. In particular, heavy metals in the sediments might be released into the aquatic environment and groundwater directly or indirectly influencing ecosystem and human health. Therefore, there is urgent need to develop sensitive and inexpensive methods for rapidly detecting pollutants in the environments. Hence, the goal of this grant was to establish a set of specific bacterial biosensors to detect heavy metals (As, Hg and Cd) in the sediment and groundwater.

In the present study, heavy metals-specific bacterial biosensors carrying different reporter genes (*gfp*, *lacZ*, and *luxCDABE*) were successfully developed to measure As, Hg, and Cd, respectively. Using genetic engineered techniques, 7 bacterial biosensors have been constructed. This includes (1) two arsenic specific biosensor carrying *lacZ* and *luxCDABE*, respectively; (2) two cadmium specific biosensor carrying *lacZ* and *luxCDABE*, respectively; and (3) three mercury specific biosensor carrying *gfp*, *lacZ* and *luxCDABE*, respectively. By combining our previously developed arsenic and cadmium biosensors using *gfp* as reporter gene, there are 9 bacterial biosensors in total for further analysis of environmental samples.

Results from this project showed that *luxCDABE*-based and *gfp*-based biosensors were more-sensitive and stable to detect As, Hg, and Cd. In addition, the bacterial biosensors could be cultured easily and rapidly providing a cost-effective approach.

In summary, our results demonstrated that the bacterial biosensors are useful and applicable in determining the bioavailability of heavy metals in contaminated sediment and groundwater samples. This information is important for more accurate risk assessment in which the EPA and related agencies can employ effective and inexpensive environmental monitoring approaches to assess heavy metals contamination levels as well as serve as warning system against future heavy metals pollution.

一、前言

台灣自七十年代工業發展迅速，工廠廢水排放、廢棄物處理不當，造成河川、土壤及地下水不同程度的污染。國內目前已公告之污染項目中，土壤以重金屬污染最為普遍，地下水污染包括總酚、三氯乙烯、重金屬、氯鹽、BTEX(苯、甲苯、乙苯、二甲苯之合稱)等，這些污染物常經由生活飲用水或是農業灌溉用水，經由食物鏈，直接或間接的進入人體，造成健康危害。其中重金屬污染物由於存在型態多變、低濃度即可產生毒性效益、移動轉化廣泛、無法完全分解、及生物累積等特性，其對環境的持續危害和衝擊相較而言更為嚴重且更具潛在危機。若長期食用或飲用含有重金屬的食物與飲水，容易造成身體危害，如神經毒性、肝腎毒性、甚至癌症產生等。以往因重金屬所造成公害事件如，台塑汞污泥事件、二仁溪綠牡蠣事件(銅)、桃園縣基立化工痛痛病(鎘)等，讓人記憶猶新。因此，河川水體、底泥、與地下水重金屬污染物的監測與管理，一直是各國重要的環保議題，我國環境保護署也積極針對重金屬(鉛、鎘、汞、砷)等進行調查，並研擬相關管制策略以維護國人健康。

以國內污染最嚴重的河川之一，二仁溪沿岸(包括台南縣市、高雄縣)為例，2010 年公告，共有十筆土地土壤污染事件，並有擴及至地下水污染之虞，不僅應加速整治，更應積極調查地下水污染的影響範圍。再者，高雄居民近年發覺典寶溪出現大量魚屍，高雄市環保局目前將監測污染之目標放在以中、上游工廠眾多的典寶溪，並由於考量溪水流動，無法有效判定污染程度與區域，樣本採集也將由溪水樣品，擴大至河川底泥中重金屬污染的分析。因此，無論是地下水污染或是河川底泥污染的調查，皆須仰賴快速且正確的篩檢方法，及早確立污染的範圍與程度，作為環境風險管理的重要依據。

二、研究目的

無論是地下水污染或是河川底泥污染的調查，皆須仰賴快速且正確的檢測方法，及早確立污染的範圍與程度，作為有關單位對於環境風險管理的重要依據。因此，本計畫預計先以典寶溪、二仁溪為樣本收集重點，整合專一性與廣效性毒性細菌生物感測器快速篩測底泥及地下水現場污染物，以提供快速靈敏的檢測與精確的分析。

為達到此上述目的，本計畫的主要目標(specific aims)如下：

1. 完成底泥與地下水樣本收集，並以化學法分析其重金屬含量。
2. 建立廣效性毒性生物感測器之標準檢測方法。
3. 建構一系列重金屬專一性生物檢測器，完成其靈敏度與穩定度之探討。
4. 比較分析化學法及生物感測器的結果及成本。

三、文獻探討

3.1. 底泥污染檢測

底泥通常指黏土、泥沙、有機質及各種礦物的混合物，經過長時間物理、化學及生物等作用及水體傳輸沉積於水體底層之物質，包括河川、湖泊、灌溉渠道、水庫等之沉積物皆屬之。水體中，許多污染物終究會累積在底泥之中，因此，底泥在生態系中扮演非常重要的角色，一旦受持久性污染物污染，影響水生生物，易經由食物鏈進入人體及動植物體內，直接或間接的影響生態系統進而影響人類的健康。

污染物在底泥與水體之間的分布受到許多的因素影響，包括酸鹼度、氧化還原、底泥中有機碳的多寡或是底泥中礦物組成等，因此若單單以水質污染管制標準是無法有效管理底泥污染。台灣早年因工業迅速發展且環保法規未臻完整，河川重金屬污染嚴重，有毒重金屬進而蓄積於底泥當中，有鑑於此，行政院環境保護署於民國 97 年陸續完成 27 條中央及縣市河川底泥重金屬等污染物的調查，台灣河川底泥中重金屬約有 9 – 33%濃度高於美國國家海洋暨大氣總署(National Oceanic and Atmospheric Administration, NOAA)所公布之最大可能影響值，因此，於民國 101 年，新增底泥品質指標之分類管理及用途限制辦法(表 3.1)，作為底泥品質之監測、檢測、與調查時的依循。然而，底泥品質的評估著重於化學分析，對於底泥中污染物的釋出與生物有效性(bioavailability)的了解有限，並不足評估污染物對生物潛在的不利影響。因此，要了解污染底泥對於生物之效應，需要進行污染物釋出的即時監測和生物有效性的測試，建立以生態風險評估為基準之底泥品質指引。

表 3.1. 環保署重金屬底泥品質標準上下限值

重金屬	上限值 (mg/kg)	下限值 (mg/kg)
砷 (As)	33	11
鎘 (Cd)	2.49	0.65
鉻 (Cr)	233	76
銅 (Cu)	157	50
汞 (Hg)	0.87	0.23
鎳 (Ni)	80	24
鉛 (Pb)	161	48
鋅 (Zn)	384	140

3.2. 地下水污染檢測

地下水為貯存於地面以下透水、除水性能佳之地層，如岩石裂縫和土壤空隙中的水，按形態分為氣態水、吸著水、薄膜水、毛細管水、重力水、固態水等。由於含水層沒有造水的功能，含水層所帶有的地下水主要來自地表。且台灣降雨時與地的分配不均，地面水易受枯水期差異與儲水設備不足影響，故地下水為台灣枯水期時重要水資源。

地下水是非常珍貴又豐富的資源，不但水質、水溫、水量穩定，而且取用方便、費用低廉，因此早為先民所利用。依經濟部水利署民國 97 年的水利統計報告顯示(圖 3.1)，台灣地下水用量約佔整體可用水資源的利用量的三分之一，台灣地下水使用量約為 58.3 億噸，雖然現今並非以地下水作為主要的飲用水來源，但以地下水作為灌溉及養殖用水的來源仍是相當普遍的現象，土壤與地下水更是維繫生物環境的重要一環。

地下水重金屬來源，主要分為兩類，一類是地下含水層礦物原本就帶有較高的重金屬(如砷主要來自母岩或土壤母質)，另一部分則是因為長期受到地面上工業排放的廢水、農業上除草劑、非法傾倒工業廢棄物、土壤河川重金屬污染進而波及至地下水(像是二仁溪重金屬污染擴及沿岸地下水)等。近年來，地下水重金屬污染的事件報導仍然不斷，例如：民國 99 年，清水農地回填焚化爐底渣造成地下水鉛污染；2012 年 8 月環保局針對電鍍廠林立之台中大里區三十四口水井，進行水質採樣檢測，發現十五口井的水質，含重金屬鎳、鉻污染嚴重，居民無水可用；2013 年 6 月更發現屏東一處農地回填有毒電弧爐渣，農地重金屬含量均超標數十至數百倍，地下水品質堪慮。

由此可知，地下水重金屬的現地監測是目前民間與有關單位刻不容緩、急需處理的重點方向。地下水為一封閉水體，一旦污染，其管理與整治不易，更是不能輕忽。行政院環境保護署於民國 100 年訂定地下水污染管制標準，配合各類污染調查及污染源管制手段，以供各機關對於地下水品質之監測、檢測與調查的參考。今年 2 月，更劃入重金屬等物質為地下水污染監測重點。

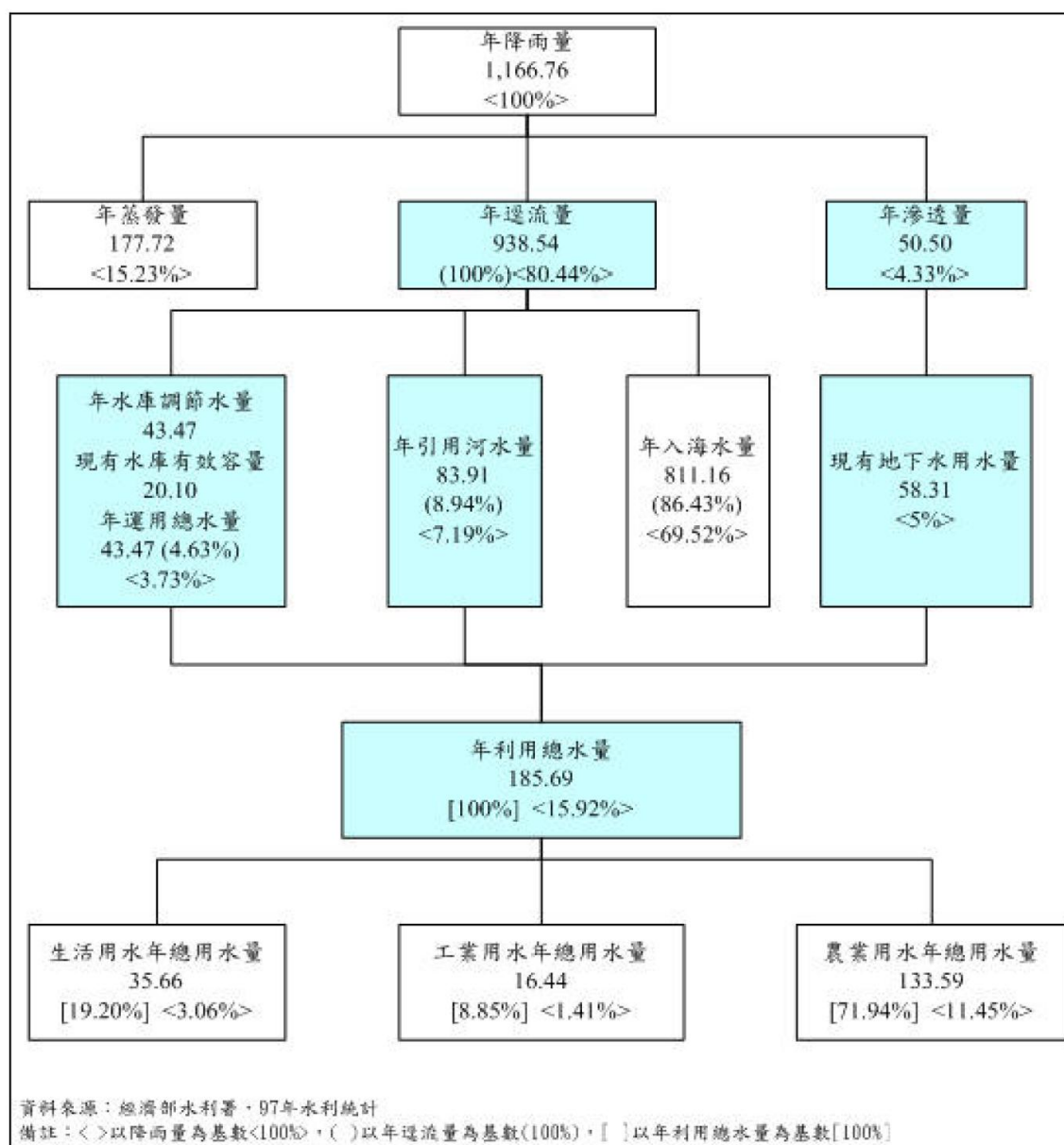


圖 3.1. 經濟部水利署民國九十七年的水利統計報告

3.3. 生物感測器(biosensors)

目前環境污染物的檢測方法分為理化性與生物性檢測。理化性的方法，如液相層析(LC)、氣相層析(GC)、感應耦合電漿原子發射光譜(ICP-AES)等，這些方法靈敏度與準確度都相當高，但設備昂貴、前處理費時且無法獲取生物毒性之相關訊息。而生物性檢測，以藻類、魚類、哺乳類等評估污染物的毒性，雖可獲得環境污染物對生物之綜合影響，然其具有成本高、耗時且方法複雜、無法立即監測、無法得知何種污染物等缺點。這兩種方法對於大規模即時檢測有其時、地與成本的限制。

因此，開發快速篩測並降低檢測成本的方法便成為環境污染物檢測的重點方向。近來，國內外學者已於實驗室開發生物感測器(以下簡稱 biosensor)用以偵測環境污染物。所謂的 biosensor 是一種利用生物的組成，來當做辨識或偵測的測量方法或系統；biosensor 主要包括兩大元素，分別為感應(sensing component)及訊號測量(transducing element)兩個部分。其可能作為感應之生物組成有以下之分類：巨分子(macromolecules)，包括酵素及抗體、脂質雙層(lipid bilayers)及脂質體(liposome)、整個細胞(whole cell)及整個器官或是組織等(Bousse, 1996; Daunert et al., 2000)。在考量經濟與實用性，利用細菌的整個細胞(whole cell)當作 biosensor，不但可以得到環境中毒性物質實際進入生物體的濃度(即 bioavailability)的資訊，瞭解其實際之毒性效應，另外還有許多優點，例如：細菌對於環境適應力佳，即使在惡劣的環境下依然能夠生存，並且會隨著時間而發展出降解其它分子之能力，而且經的起經由突變或重組 DNA 之技術所造成的基因修飾，另外從經濟的層面來看，細菌能夠自我複製所以其經濟效益高(D'Souza, 2001)。除此之外，利用細菌當作 biosensors 所偵測之敏感度及偵測極限都相當的高，因為是採用特定之阻抗調控基因，所以具有高度的專一性及毒性忍受度，所以能夠在環境中初始污染時便可以偵測，能夠達到預防的效果。

國外已有生物感測器之相關研究，包含偵測氧化壓力、基因毒性等之廣泛性(non-specific)生物感測器、偵測重金屬及酚類等之專一性(specific)生物感測器(Daunert et al., 2000; Hansen and Sørensen, 2001)、方便攜帶於現地使用的生物感測器(Gu et al., 2001; Stocker et al., 2003)、以及實際應用於即時監測的生物感測器研究(Jouanneau et al., 2012)。而國內相關研究主要以生醫應用居多，環境污染監測則較少。本實驗室之前已成功開發出可檢測砷、

鎘、及 BTEX 之生物感測器(Liao and Ou, 2005; Liao et al., 2006; Li et al., 2008)。

1. 廣效性毒性(非專一性)生物感測器

當廣效性的毒性細胞生物偵測器暴露於特定濃度的毒性物質時，便會偵測到其毒性進而產生訊號。雖然無法明確辨識出存在何種污染物，卻可作為得知環境中具有污染物存在的第一道防線。廣效的毒性生物偵測器，對於毒性物質的偵測，主要是針對外來環境因子的反應。當生物體暴露於高溫度、有毒化合物及有毒金屬的環境時，會誘導 stress response 基因的表達。例如：真核及原核生物中普遍存在的 heat shock 基因的表達，便是一種細胞對外來壓力的保護反應。這些外來壓力包括：高溫、有機物、重金屬、氧化劑及抗生素等。

近年來已有研究利用硫氧化菌 (sulfur-oxidizing bacteria, SOB) *Acidithiobacillus caldus* 來檢測水中的毒性物質(Hassan et al., 2010; Hassan et al., 2012; Van Ginkel et al., 2011)。其原理是硫氧化菌可在有氧的環境中，將元素硫(elemental sulfur)氧化成硫酸(sulfuric acid)，此反應會使導電度(EC)增加及使酸鹼值(pH)下降。當有毒性物質存在時，硫氧化菌的活性受到毒性抑制，進而導致 EC 下降及 pH 增加(Hassan et al., 2010; Hassan et al., 2012)。Hassan et al. (2010; 2012; 2013)利用硫氧化菌做了一連串的環境污染物偵測，對於內分泌干擾物質，如 bisphenol A、nonylphenol、estradiol 與 diethylstilbestrol，可偵測 50 到 200 $\mu\text{g/L}$ 不等(Van Ginkel et al., 2010)，至於呼吸抑制劑(KCN)其靈敏度為 100 – 1000 $\mu\text{g/L}$ ，而各種重金屬(鋅、汞、鎘、鉛、六價鉻)的偵測的靈敏度可達到 5 到 50 $\mu\text{g/L}$ 。

因此，硫氧化菌生物感應器的優點有：(1)儀器方便性：只需要利用簡單的導電度與酸鹼值的儀器便可偵測環境中的有毒污染物，(2)現場即時檢測：雖無法準確得知環境中存在何種污染物，但此偵測方法可快速的現場即時檢測有毒污染物的存在，(3)低成本及大量環境樣品檢測：因使用導電計與酸鹼計的價格便宜，環境樣品亦無須前處理，因此可以應用於大量環境樣品的檢測(Hassan et al., 2010; 2012; 2013)。

2. 專一性生物感測器

環境中的許多重金屬例如: nickel (Ni)、cobalt (Co)及 zinc (Zn)是微生物所需要之微量元素，相反的重金屬 cadmium (Cd)及 lead (Pb)則會對環境中的微生物產生毒性效應(Tauriainen et al., 1998)。因此環境中的細菌本身已經發展對抗這些重金屬及其衍生物之阻抗機制，其中包括有 Ag^+ 、 AsO_2^- 、 AsO_3^{4-} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 CrO_4^{2-} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Sb^{3+} 、 TeO_3^{2-} 、 TI^- 及 Zn^{2+} ，這些阻抗之基因大多分佈在細菌的質體當中(Silver, 1996)。對於這些阻抗基因的調控機制已有相當程度了解。因此，建構專一性生物感測器的原理是利用阻抗基因的 promoter 及其調控因子當作 sensing element，並利用基因重組的方式與特定之報告基因(reporter genes)融合，然後利用細菌的整個細胞當作 biosensor 來偵測環境中特定重金屬的存在及濃度。

目前廣泛使用的報告基因有：可產生綠色螢光蛋白(green fluorescent protein)的 *gfp*、可產生生物冷光(bioluminescent)的 *luxCDABE* 或 *luxFF*，以及可產生半乳糖苷酶(galactosidase)的 *lacZ* (Naylor, 1999)。這些報告基因各有其優缺點，因此若能合併使用，應能有互補之效果。如 *gfp* 雖易於偵測、不須添加額外受質，但卻有靈敏度較低、需要激發光照射等缺點；*luxCDABE* 之靈敏度高、反應時間快，但其發光強度衰減較快；*lacZ* 則可在厭氧環境中使用，靈敏度、穩定度高，但需要額外添加受質，呈色反應不易量化

本實驗室目前已成功開發出可檢測砷、鎘及 BTEX 以 *gfp* 為報告基因之生物感測器(Liao and Ou, 2005; Liao et al., 2006; Li et al., 2008)以及以 *luxCDABE* 為報告基因之 BTEX 生物感測器(Li et al., 2008)。本研究計畫預期開發另外兩種報告基因(*luxCDABE* 及 *lacZ*)之生物感測器，以建構出一套完整的專一性生物感測器系統用以快速篩測底泥及地下水現場的重金屬。

四、研究方法與過程

4.1. 研究流程架構

本計畫會先進行典寶溪與二仁溪之底泥及地下水採樣，除了採用分析化學法(ICP-MS 及 ICP-AES)分析環境樣本之重金屬濃度外，亦會建構細菌生物感測器，用以快速篩測底泥及地下水現場之重金屬，並探討其靈敏度與穩定度，整體計畫流程架構如圖 4.1 所示。最後會比較分析化學法及細菌生物感測器之結果及成本。本計畫工作進度規劃以甘特圖整理於表 4.1。

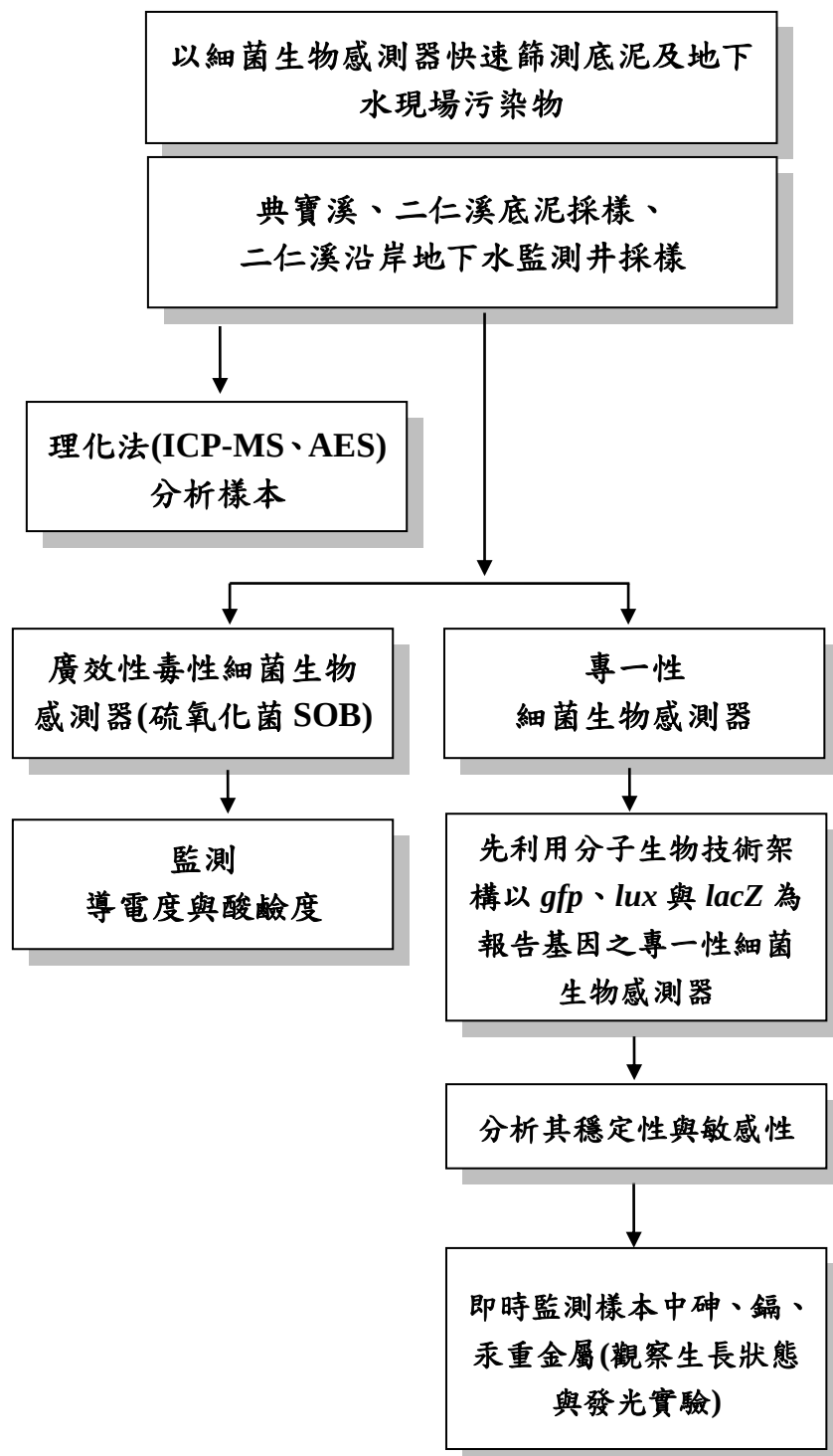


圖 4.1. 本研究實驗流程規劃架構

表 4.1. 本計畫工作進度甘特圖

工作項目	年月												備 註
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
資料收集	—	—	—	—	—	※	—	—	—	—	—	※	
底泥、河川水樣採集	—	—	—	※									
建構一系列重金屬專一性生物檢測器		—	—	—	—	※							
建立以硫氧化菌為基礎之廣效性毒性生物感測器							—	※					
地下水採樣								—	※				
利用 ICP-AES 與 ICP-MS 完成樣本重金屬之檢測									—	※			
利用專一性細菌生物感測器完成環境樣本之汞、鎘、砷之檢測									—	※			
分析底泥重金屬與生物有效性之相關性											※		
比較分析化學法及生物感測器的結果及成本												※	
資料統整、分析					—	※					—	※	
報告撰寫					—	※					—	※	
工作進度估計百分比(%) (累 積 數)	5	10	25	35	45	50	55	65	70	80	90	100	
預定查核點	期中		1. 底泥、河川水樣採集 2. 建構一系列重金屬專一性細菌生物感測器										
	期末		3. 利用 ICP-AES 與 ICP-MS 完成樣本重金屬之檢測 4. 建立以硫氧化菌為基礎之廣效性毒性生物感測器 5. 地下水採樣 6. 利用專一性細菌生物感測器完成環境樣本之汞、鎘、砷之檢測 7. 分析底泥重金屬與生物有效性之相關性 8. 比較分析化學法及生物感測器的結果及成本										
說明： 1、 工作項目請視專案性質及需要自行訂定。預定進度以粗線表示其起迄日期。 2、 「工作進度百分比」欄係為配合管考作業所需，累積百分比請視工作性質就以下因素擇一估計訂定：(1) 工作天數，(2) 經費之分配，(3) 工作量之比重，(4) 擬達成目標之具體數字。 3、 「預定查核點」，請在條形圖上標明※符號，並在「預定查核點」欄具體註明關鍵性工作要項。													

4.2. 底泥與河川採樣及分析

1. 採樣

(1) 典寶溪底泥：委託國立中山大學楊金鐘教授實驗室代為採樣

- 採樣日期：2014/01/27
- 採樣地點：聖興橋

(2) 二仁溪底泥：委託國立中興大學張書奇副教授實驗室代為採樣

- 採樣日期：2017/4/11，落潮時段
- 採樣地點：匯流處上游三爺溪西側(水深約 50 公分)、南楚橋上游北側(水深約 20 公分)
- 採樣座標：(22.921760, 120.192629)、(22.919610, 120.184982)

(3) 二仁溪流域地下水：委託台南市環保局代為採樣

- 採樣日期：2014/7/16
- 採樣地點：二仁溪流域之 8 口地下水監測井，位置圖與基本資料描述分別由圖 4.2 及表 4.2 所示

2. 分析

(1) 地下水樣品處理與分析

取回樣品先行測定 pH 值，並通過 0.22 μm 之濾膜，委託國立臺灣大學生農學院共儀中心與林業試驗所使用 ICP-MS 測定砷與汞，另使用 ICP-AES 測定鎘與其他元素。另外，為使生物感測器正常作用，在進行生物感測器相關試驗前，部分 pH 值較低之樣品已先以鹽酸滴定至中性，樣品皆保存於 4 °C。

(2) 底泥樣品處理與分析

秤取 10 g 底泥樣品，加入 90 g 去離子水混勻，以 200 rpm，於室溫下進行萃取。24 小時後將其離心，使固液分離，小心倒出上層液，並測定萃

取液 pH 值。萃取液送測前通過 0.22 μm 之濾膜，委託國立臺灣大學生農學院共儀中心與林業試驗所使用 ICP-MS 測定砷與汞，另使用 ICP-AES 測定鎘與其他元素，剩餘萃取液存放於 4 $^{\circ}\text{C}$ 。



圖 4.2. 二仁溪附近區域 8 口監測井分佈圖

表 4.2. 二仁溪流域 8 口監測井基本資料

井號	監測井名稱	地址或地號	井型式	SGM 系統	
			SGM 系統	E(X)	N(Y)
D00155	五行代天宮	臺南市南區同安段地段 88 之 1 地號	隱藏式 (人孔式)	166214	2535568
D00156	南楚橋 II	臺南市南區同安段地段 542 之 1 地號	隱藏式 (人孔式)	166975	2535903
D00157	南楚橋 I	臺南市南區南山段地段 275 地號	隱藏式 (人孔式)	166220	2535577
R00531	SRD (二仁溪)001	仁德區大甲段 0894-0001 地號	隱藏式 (人孔式)	168616	2535385
R00532	SRD (二仁溪)002	仁德區大甲段 0996-0002 地號	隱藏式 (人孔式)	169088	2535120
R00533	SRD (二仁溪)003	仁德區港墘段 0546-0004 地號	平台式	173454	2535581
R00534	SRD (二仁溪)004	仁德區大甲段 0291-0002 地號	平台式	169662	2536336
R00535	SRD (二仁溪)005	仁德區車路墘段 0813-0003 地號	隱藏式 (人孔式)	171361	2535531

4.3. 專一性生物感測器建構與設計

1. 菌種與質體(plasmid)

本研究使用之勝任細胞(competent cell)為 *E. coli* DH5 α (GIBCOBRC)。重金屬阻抗機制之調控基因序 *arsR*、*cadC* 及 *merR* 來自於質體 pI258 (Novick et al., 1979)。使用之載體(vector)依照不同的報告基因(*gfp*、*luxCDABE* 與 *lacZ*)分別為 pPROBE-NT'、pUCD615 與 pTZ110 (Miller et al., 2000; Rogowsky et al., 1987; Schweizer et al., 2001)。

2. 勝任細胞(competent cell)置備

挑選 *E. coli* DH5 α 單一菌落至 3 ml LB 培養基(luria-bertani broth medium)中，在溫度為 37 °C，培養箱轉速為 225 rpm 下培養 16 至 18 小時。後取 50 ml 的 LB 培養基與 500 μ l 之菌液混合，在溫度為 37 °C，培養箱轉速為 225 rpm 下培養至 OD₆₀₀ (optical density at 600 nm)到達 0.6。將菌液各分裝 25 ml 至聚丙烯試管中，置於冰上 10 分鐘使其降溫。將菌液以 2700 g 離心 10 分鐘，使培養基與菌液分離。再各加入 15 ml MgCl₂-CaCl₂ 溶液(80 mM MgCl₂; 20 mM CaCl₂)，將菌體回溶並混合均勻。將回溶後之菌液在 2700 g 條件下離心 10 分鐘，使培養基與菌液分離。再各加入 1 ml 0.1 M CaCl₂ 溶液，將菌體回溶並混合均勻，即完成勝任細胞置備。

3. 生物感測器質體建構

(1) 砷

利用本實驗室設計之引子(primers)(表 4.3)，進行聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction, PCR)，將質體 pI258 中 *arsR* 片段基因序列(含 promoter/operator)增幅，反應試劑濃度及作用條件如表 4.4。為使 *arsR* 片段基因序列(含 promoter/operator)轉型(transformation)至 *E. coli* DH5 α ，利用限制酶(restriction enzyme) *Bam*HI 及 *Eco*RI 分別針對此片段基因序列及載體(pPROBE-NT'、pUCD615 與 pTZ110)進行 double digestion，反應試劑濃度及作用條件如表 4.5。將 double digest 後片段基因序列與載體利用接合酶(ligase)進行接合反應，反應試劑濃度及作用條件如表 4.6。

表 4.3. 本研究所用之引子序列

目標基因		引子序列(5'-3')
<i>arsR</i>	Forward	CCG ***** TAAAATAACATAGACAATAATCT
	Reverse	CGC ***** CATCAACAGTCACCTGATT
<i>cadC</i>	Forward	CCG ***** GTGTATTTTTTTAATAAATTATTTTAC
	Reverse	CGC ***** TCAGACATTGACCTTCAC
<i>merR</i>	Forward	CCG ***** ATGACTTGACCGTGTACT
	Reverse	CGC ***** CCCCCATTTATTTATCAGGC

註：*****為限制酶切位(cutting site)

表 4.4. PCR 反應試劑濃度及作用條件

反應試劑濃度		
項目	最終濃度	
PCR Buffer (500 mM KCl ， 100 mM Tris-Cl ， 0.1% Triton X-100)	1X	
dNTPs (dATP ， dTTP ， dCTP ， dGTP)	200 μM	
Primer (Forward)	0.5μM	
Primer (Reverse)	0.5μM	
Template DNA (pI258)	(1μL)	
Taq DNA polymerase	2.5 units	
作用條件(共跑三十回合)		
溫度	時間	附註
94 °C	3 分鐘	第一回合
94 °C (Denature Temperature)	0.5 分鐘	每一回合
53~55 °C (Annealing Temperature)	0.5 分鐘	每一回合
72 °C (Elongation Temperature)	0.5 分鐘	每一回合
72 °C	7 分鐘	最後回合

表 4.5. 限制酶反應試劑濃度及作用條件

反應試劑濃度	
項目	最終濃度
<i>Eco</i> RI Buffer (500 mM NaCl , 1M Tris-Cl , 100 mM MgCl ₂ , 0.25% Triton X-100)	1X
BSA Buffer (200 mM KPO ₄ , 500 mM NaCl , 1 mM EDTA , 5% glycerol)	1X
<i>Bam</i> HI endonuclease	10 U
<i>Eco</i> RI endonuclease	10 U
Template DNA (<i>arsR</i> , <i>cadC</i> , <i>merR</i> , vectors)	(30 µL)
作用條件	
溫度	時間
37 °C	2 小時

表 4.6. 接合酶反應試劑濃度及作用條件

反應試劑濃度	
項目	最終濃度
T4 DNA Ligase Buffer (500 mM Tris-Cl , 100 mM MgCl ₂ , 100 mM DTT , 10 mM ATP , 250 µg BSA)	1X
T4 DNA Ligase	400 U
Vector (pPROBE-NT' , pUCD615 , pTZ110)	(3 µL)
Insert DNA (<i>arsR</i> , <i>cadC</i> , <i>merR</i>)	(5 µL)
作用條件	
溫度	時間
16 °C	12 小時

(2) 鎘

利用本實驗室設計之引子(表 4.3)，進行 PCR 將質體 pI258 中 *cadC* 之 promoter/operator 增幅，反應試劑濃度及作用條件如表 4.4。為使 *cadC* 之 promoter/operator 轉型至 *E. coli* DH5 α ，利用 *Bam*HI 及 *Eco*RI 分別針對此片段基因序列及 pPROBE-NT'、pUCD615 與 pTZ110 進行 double digestion，反應試劑濃度及作用條件如表 4.5。將 double digest 後片段基因序列與載體利用接合酶進行接合反應，反應試劑濃度及作用條件如表 4.6。

(3) 汞

利用本實驗室設計之引子(表 4.3)，進行 PCR 將質體 pI258 中 *merR* 之 promoter/operator 增幅，反應試劑濃度及作用條件如表 4.4。為使 *merR* 之 promoter/operator 轉型至 *E. coli* DH5 α ，利用限制酶 *Bam*HI 及 *Eco*RI 分別針對此片段基因序列及 pPROBE-NT'、pUCD615 與 pTZ110 進行 double digestion，反應試劑濃度及作用條件如表 4.5。將 double digest 後片段基因序列與載體利用接合酶進行接合反應，反應試劑濃度及作用條件如表 4.6。

4. 質體轉型(plasmid transformation)

取 200 μ l 之勝任細胞，加入欲轉入之質體，置於冰上 30 分鐘。放入 42 $^{\circ}$ C 的水浴槽中 90 秒後，即迅速將其移置冰上 2 分鐘。再加入 800 μ l 的 LB 培養基到試管中，放置於 37 $^{\circ}$ C 下培養 1 小時。取適量的菌液置於含有特定抗生素之 LB 瓊脂培養基(agar plate)上並塗抹均勻，再放入 37 $^{\circ}$ C 培養箱中培養 16 – 18 小時即可看見菌落生成。

5. 專一性生物感測器培養與保存

將建構完成之質體轉型至經氯化鈣處理之 *E. coli* DH5 α ，將轉型後之專一性生物感測器，在溫度為 37 $^{\circ}$ C，培養箱轉速為 225 rpm 下培養於含有 100 μ g/ml ampicillin 或 50 μ g/ml kanamycin 之 LB 培養基中，待其生長飽和後取出 0.7 ml 菌液與 0.3 ml 甘油混和，儲存於-80 $^{\circ}$ C，待後續研究之進一步探討。

6. 專一性生物感測器 *lacZ* 基因呈色強度測試

將隔夜培養之菌液以 LB 培養基稀釋 100 倍，在溫度為 37 °C，培養箱轉速為 225 rpm 下培養至 OD₆₀₀ 到達 0.3。分裝菌液至 96 孔盤並與不同重金屬濃度及 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) 共培養 3-24 小時後，利用目測法及光度計法(OD₅₉₅)判斷呈色差異性，以推求不同重金屬濃度所對應之呈色強度。

7. 專一性生物感測器 *gfp* 與 *luxCDABE* 基因劑量與反應關係測試

(1) *gfp* 基因

將隔夜培養之菌液以 LB 培養基稀釋 100 倍，在溫度為 37 °C，培養箱轉速為 225 rpm 下培養至 OD₆₀₀ 到達 0.6。分裝菌液至 96 孔盤並與不同濃度之重金屬共培養。共培養 2 小時後，利用分光光度計及螢光光度計(激發波長：490 nm；發射波長：510 nm)測量其 OD₆₀₀ 與 RFU (relative fluorescence units)，以推求單位菌數下不同重金屬濃度所對應之單位螢光強度(specific fluorescence intensity, $SFI = RFU/OD_{600}$)，再與控制組(未添加重金屬)所對應之 SFI 做比較，計算出誘導比(induction ratio, $IR = SFI_i/SFI_0$)，其中 SFI_i 為不同重金屬濃度所對應之 SFI， SFI_0 為未添加重金屬所對應之 SFI。

(2) *luxCDABE* 基因

將隔夜培養之菌液以 LB 培養基稀釋 100 倍，在溫度為 37 °C，培養箱轉速為 225 rpm 下培養至 OD₆₀₀ 到達 0.6。分裝菌液至 96 孔盤並與不同濃度之重金屬共培養。共培養 2 小時後，利用分光光度計及冷光光度計測其 OD₆₀₀ 與 RLU，以推求單位菌數下不同重金屬濃度所對應之 SLI，再與控制組所對應之 SLI 做比較以計算出 IR。

8. 專一性生物感測器 *gfp* 與 *luxCDABE* 基因時間與反應關係測試

(1) *gfp* 基因

將隔夜培養之菌液以 LB 培養基稀釋 100 倍，在溫度為 37 °C，培養箱轉速為 225 rpm 下培養至 OD₆₀₀ 到達 0.6。分裝菌液至 96 孔盤並與不同濃度

之重金屬(砷、鎘、汞)共培養。每間隔 1 小時用分光光度計及冷光光度計測其 OD₆₀₀ 與 RLU，以推求不同時間點所對應之 SLI，再與控制組所對應之 SFI 做比較以計算出 IR。

(2) *luxCDABE* 基因

將隔夜培養之菌液以 LB 培養基稀釋 20 倍，在溫度為 37°C，培養箱轉速為 225 rpm 下培養至 OD₆₀₀ 到達 0.6。分裝菌液至 96 孔盤，並與特定濃度重金屬共培養，每間隔 1 小時利用分光光度計及冷光光度計測其 OD₆₀₀ 與 RLU，以推求不同時間點所對應之 SLI，再與控制組所對應之 SFI 做比較以計算出 IR。

9. 專一性生物感測器 *gfp* 與 *luxCDABE* 基因於環境樣品測試

(1) *gfp* 基因

將隔夜培養之菌液以 LB 培養基稀釋 100 倍，在溫度為 37 °C，培養箱轉速為 225 rpm 下培養至 OD₆₀₀ 到達 0.6。分裝菌液至 96 孔盤並與等體積之環境樣品共培養。共培養 3 小時後，利用分光光度計及螢光光度計測量其 OD₆₀₀ 與 RFU 以推求單位菌數下不同重金屬濃度所對應之 SFI，再與控制組(在此為加入二次水代替環境樣品)所對應之 SFI 做比較以計算出 IR。最後再帶入用已知濃度重金屬所畫出誘導比與濃度關係的檢量線方程式，推估出環境樣品的重金屬濃度，並與化學分析方法的測值進行比較。

(2) *luxCDABE* 基因

將隔夜培養之菌液以 LB 培養基稀釋 20 倍，在溫度為 37°C，培養箱轉速為 225 rpm 下培養至 OD₆₀₀ 到達 0.6，依照環境樣品與菌液比 1:1 方式加入 96 孔盤中，共培養 2 小時後，利用分光光度計及冷光光度計測其 OD₆₀₀ 與 RLU，以推求環境樣品中的重金屬濃度所對應之 SLI，再與控制組所對應之 SLI 做比較以計算出 IR。最後再帶入用已知濃度重金屬所畫出誘導比與濃度關係的檢量線方程式，推估出環境樣品的重金屬濃度，並與化學分析方法的測值進行比較。

10. 專一性 *luxCDABE* 與 *gfp* 基因生物感測器於環境樣品外加重金屬測試

經化學分析法的結果顯示(表 5.1)，採樣回來的地下水與底泥樣品水萃取液中的重金屬(砷、鎘、汞)含量都非常低，為了要測試專一性生物感測器應用於含有多重重金屬污染環境樣品之可行性，因此在地下水以及底泥樣品中額外添加多重重金屬，包括砷 500 $\mu\text{g/L}$ (6.67 μM)、汞 20 $\mu\text{g/L}$ (0.1 μM)以及鎘 50 $\mu\text{g/L}$ (0.45 μM)。添加的濃度乃參考非水源區的地下水污染管制標準。接著將隔夜培養之飽和菌液以 LB 培養基稀釋 20 倍，在溫度為 37 $^{\circ}\text{C}$ ，培養箱轉速為 225 rpm 下培養至 OD₆₀₀ 到達 0.6，依照環境樣品與菌液比 1:1 方式加入 96 孔盤中，共培養 2 小時後，利用分光光度計及冷光光度計測其 OD₆₀₀ 與 RLU，以推求環境樣品中的重金屬濃度所對應之 SFI/SLI，在和未添加重金屬之純水組做比較，計算出誘導比，最後帶入用已知濃度重金屬所畫出誘導比與濃度關係之檢量線方程式，推估出添加的重金屬濃度，並與實際值做比較。

4.4. 廣效性毒性生物感測器檢測

1. 硫氧化菌培養

本研究所使擁之硫氧化菌株來源為向新竹食品工業研究所購買 *Acidithiobacillus caldus* (DSM 8584 ; ATCC 51756)，取得冷凍乾燥之菌株粉末，加入 *Thiobacillus caldus* medium (表 4.7) 200 μ l 的到冷凍小管回溶菌粉，取 100 μ l 菌液加到 3 ml 液態培養基進行液態培養，在取剩下的 100 μ l 菌液塗到固體培養基盤上進行固態培養，在好氧環境、溫度 45 °C 的條件下，培養 5 天。

表 4.7. 硫氧化菌培養基配置條件

Thiobacillus caldus medium ^a			
Solution A		Solution B	
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.0 g	FeCl ₃ ·6H ₂ O	11.0 mg
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0.5 g	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.5 mg
KCl	0.1 g	H ₃ BO ₃	2.0 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g	MnSO ₄ ·H ₂ O	2.0 mg
Ca(NO ₃) ₂	0.01 g	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.8 mg
Distilled water	1.0 L	CoCl ₂ ·7H ₂ O	0.6 mg
		ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.9 mg
		Distilled water	10.0 ml
Solution A: 1.0 L			
Solution B: 10.0 ml			
Sulfur powder: 5.0 g			
Sterilized 5.0 g sulfur powder with 105 °C, 10min twice for each 2 days. Mix solution A, B and sulfur powder together.			

^a 新竹食品工業研究所提供

五、結果與討論

5.1. 底泥及地下水採樣

本計畫所委託之 8 口地下水監測井與 9 處底泥採樣點，其重金屬以化學法(ICP-MS, ICP-AES)分析結果如表 5.1 所示。分析結果發現，同一地點之採樣樣品在不同 pH 值之下，所分析之重金屬濃度並無顯著差異性。8 口地下水井之砷、汞及鎘平均濃度分別為 12.78 (1.17 – 47.37)、1.04 (0.39 – 2.85)及 20.42 (19 – 22) $\mu\text{g/L}$ ，其中砷與鎘之平均濃度有超出飲用水法規標準 10 及 5 $\mu\text{g/L}$ ，汞僅有一井(R00531)超出飲用水法規標準 2 $\mu\text{g/L}$ 。此外，三種重金屬以鎘污染最為嚴重，所有採樣之水井鎘濃度全高於法規標準，約高出 8.17 倍。在底泥分析結果方面，發現砷與汞底泥樣品在低 pH 下所測得之濃度較高，然而鎘不論在低或高 pH 所測得之濃度皆無顯著差異。底泥中砷、汞與鎘平均濃度分別為 3.23 (1.24 – 7.27)、0.64 (0.37 – 1.27)及 20.33 (19 – 24) $\mu\text{g/L}$ 。

表 5.1. 化學分析法檢測典寶溪及二仁溪地下水與底泥之砷、汞與鎘含量

Sample site	pH	Heavy metal (µg/L)		
		As	Hg	Cd
Ground water				
R00531	2.36	14.51*	2.85*	21*
R00532	2.41	47.37*	1.63	19*
R00533	7.84	4.61	1.06	22*
R00533	3	5.13	1.14	21*
R00534	2.67	1.35	0.78	22*
R00535	7.52	1.17	0.57	22*
R00535	3	1.52	0.53	20*
D00155	6.08	8.81	0.48	20*
D00155	3	8.55	0.51	20*
D00156	5.8	18.69*	0.39	19*
D00156	3	19.32*	1.51	20*
D00157	3.02	22.35*	1.03	19*
Average (SD)		12.78 (13.21)*	1.04 (0.70)	20.42 (1.16)*
Sediment				
典寶溪	3	1.45	1.16	19
匯流處上游三爺				24
溪西側	3	7.27	1.27	
南荳橋上游北側	3	2.98	0.57	21
典寶溪	5	1.27	0.62	20
匯流處上游三爺				20
溪西側	5	3.81	0.49	
南荳橋上游北側	5	2.68	0.44	19
典寶溪	7	1.24	0.47	19
匯流處上游三爺				21
溪西側	7	4.46	0.40	
南荳橋上游北側	7	3.87	0.37	20
Average (SD)		3.23 (1.93)	0.64 (0.33)	20.33 (1.58)

* 重金屬濃度超出飲用水標準(砷：10 µg/L，汞：2 µg/L，鎘：5 µg/L)

5.2. 專一性生物感測器質體建構

1. 砷

先前本研究已完成針對砷之生物感測器的 *gfp* 基因部分(Liao and Ou, 2005)，本研究目前已接續完成 *luxCDABE* 基因與 *lacZ* 基因部分之質體建構。本研究所用之重組質體，採用 *arsR* 之 promoter/operator，與帶有 *luxCDABE* 基因及 Amp^r (ampicillin resistance) 之質體 pUCD615，帶有 *lacZ* 基因及 Amp^r 之質體 pTZ110 之組合。

arsR 之 promoter/operator 來自菌種 *Staphylococcus aureus* (NCTC 50581) 中之質體 pI258。首先取得飽和之 *Staphylococcus aureus* 菌液中所含的 pI258 質體(mini-prep)，再以 PCR 技術進行 *arsR* 之 promoter/operator 增幅，後將 PCR 產物以 *Bam*HI 與 *Eco*RI 進行 double digest 處理，完成後將兩者進行接合，建構完成之質體如圖 5.1 所示。

為使質體在菌體中順利發揮作用，將接合後之質體轉型至不含質體之 *E. coli* DH5 α 培養於含 ampicillin 之培養基，轉殖成功之細胞會帶有 ampicillin 抗性，能順利通過篩選生長，若質體未成功進入則細菌無法生長。為再次驗證菌體中所帶之質體上確實接入 *arsR* 之 promoter/operator，挑選菌落作為模板直接進行 PCR，反應試劑濃度、引子與反應條件皆與從 pI258 中增幅 *arsR* 之 promoter/operator 時相同。結果顯示，在約 400 bp 處有明顯的 DNA fragment (*arsR* 含 promoter/operator 長度約 380 bp)，證實菌體中所帶之質體上確實接入 *arsR* 片段基因序列(含 promoter/operator) (圖 5.2 與圖 5.3)，後續實驗皆以確認接入 *arsR* 之 promoter/operator 菌落做為測試對象。

2. 鎘

先前之研究已完成針對鎘之生物感測器的 *gfp* 基因部分(Liao et al., 2006)，故本研究目前已接續完成 *luxCDABE* 基因與 *lacZ* 基因部分之質體建構。本研究所用之重組質體，採用 *cadC* 之 promoter/operator 與帶有 *luxCDABE* 基因及 Amp^r 之質體 pUCD615，帶有 *lacZ* 基因及 Amp^r 之質體 pTZ110 組合。

cadC 之 promoter/operator 來自 *Staphylococcus aureus* 中之質體 pI258。首先取得飽和之 *Staphylococcus aureus* 菌液中所含之 pI258 mini-prep，再以 PCR

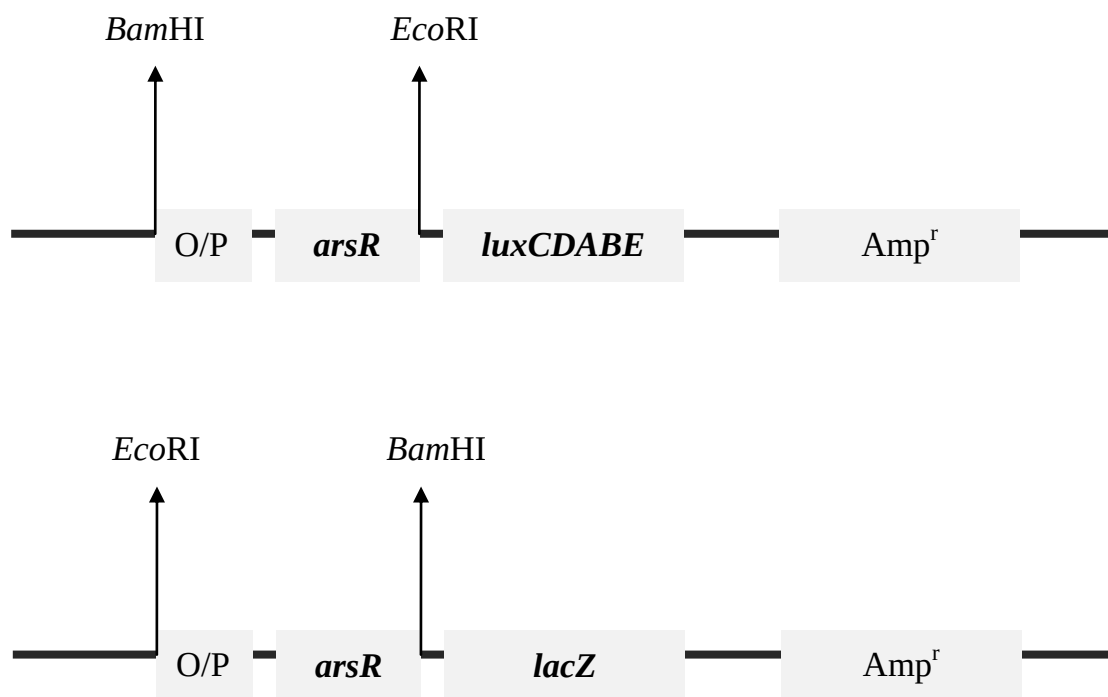


圖 5.1. 針對砷之生物感測器 *luxCDABE*、*lacZ* 部分質體架構圖

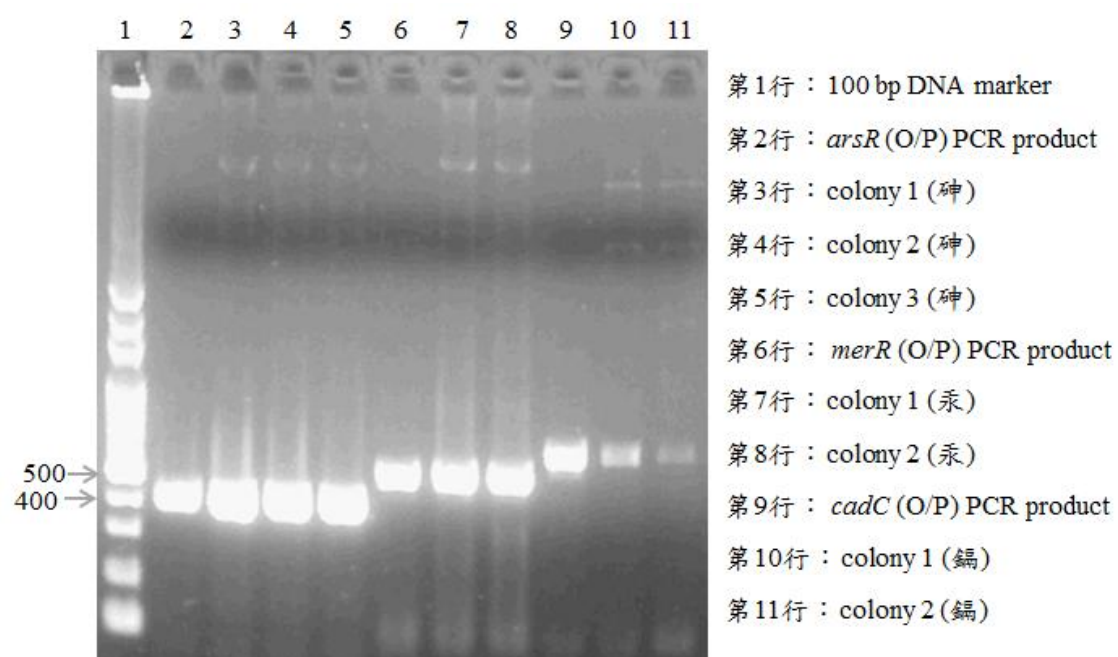


圖 5.2. 生物感測器(*luxCDABE* 基因部分)菌落 PCR 產物電泳圖

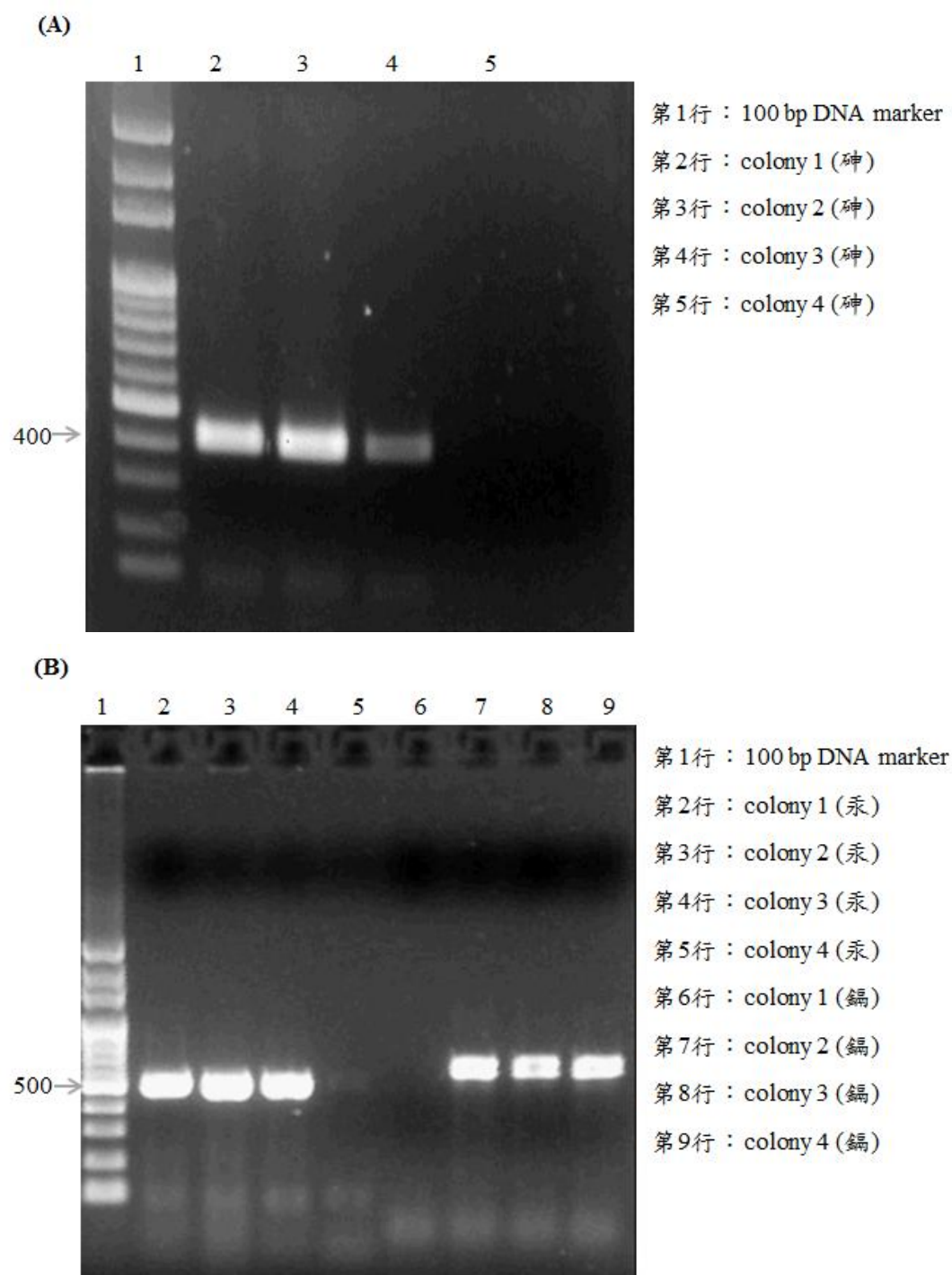


圖 5.3. 生物感測器(*lacZ* 基因部分)菌落 PCR 產物電泳圖

技術進行 *cadC* 之 promoter/operator 增幅，後將 PCR 產物以 *Bam*HI 與 *Eco*RI 進行 double digest 處理，完成後將兩者進行接合，建構完成之質體如圖 5.4。

為使質體在菌體中順利發揮作用，將接合後之質體轉型至不含質體之 *E. coli* DH5 α ，培養於含 ampicillin 之培養基，轉殖成功之細胞會帶有 ampicillin 抗性，能順利通過篩選生長，若質體未成功進入則細菌無法生長。為再次驗證菌體中所帶之質體上確實接入 *cadC* 之 promoter/operator，挑選菌落作為模板直接進行 PCR，反應試劑濃度、引子與反應條件皆與從 pI258 中增幅 *cadC* 之 promoter/operator 時相同。結果顯示，在約 500~600 bp 處有明顯的 DNA fragment (*cadC* 含 promoter/operator 長度約 572 bp)，證實菌體中所帶之質體上確實接入 *cadC* 之 promoter/operator (圖 5.2 與圖 5.3)，後續實驗皆以確認接入 *cadC* 之 promoter/operator 菌落做為測試對象。

3. 承

本研究已完成 *gfp* 基因、*luxCDABE* 基因與 *lacZ* 基因部分之質體建構。本研究所用之重組質體，採用 *merR* 之 promoter/operator，與帶有 *gfp* 基因及 Km^r (kanamycin resistance) 之質體 pPROBE-NT^r，帶有 *luxCDABE* 基因及 Amp^r 之質體 pUCD615、帶有 *lacZ* 基因及 Amp^r 之質體 pTZ110 組合。*merR* 之 promoter/operator 來自 *Staphylococcus aureus* 中之質體 pI258。首先取得飽和之 *Staphylococcus aureus* 菌液中所含的 pI258 mini-prep，再以 PCR 技術進行 *merR* 之 promoter/operator 增幅，後將 PCR 產物以 *Bam*HI 與 *Eco*RI 進行 double digest 處理，完成後將兩者進行接合，建構完成之質體如圖 5.5。

為使質體在菌體中順利發揮作用，將接合後之質體轉型至不含質體之勝任細胞 *E. coli* DH5 α ，培養於含 ampicillin 之培養基，轉殖成功之細胞會帶有 ampicillin 抗性，能順利通過篩選生長，若質體未成功進入則細菌無法生長。為再次驗證菌體中所帶之質體上確實接入 *merR* 之 promoter/operator，挑選菌落作為模板直接進行 PCR，反應試劑濃度、引子與反應條件皆與從 pI258 中增幅 *merR* 之 promoter/operator 時相同。結果顯示，在約 500 bp 處有明顯的 DNA fragment (*merR* 含 promoter/operator 長度約 475 bp)，證實菌體中所帶之質體上確實接入 *merR* 之 promoter/operator (圖 5.2、圖 5.3 與圖 5.6)，後續實驗皆以確認接入 *merR* 之 promoter/operator 菌落做為測試對象。

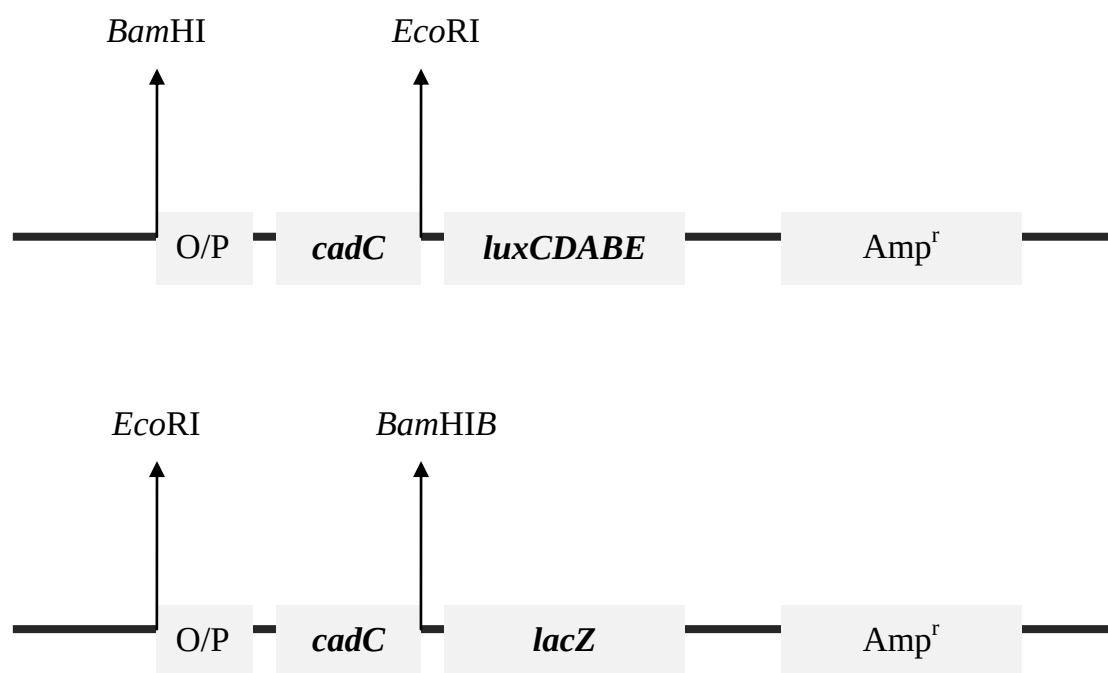


圖 5.4. 針對鎘之生物感測器 *luxCDABE* 與 *lacZ* 部分質體架構圖

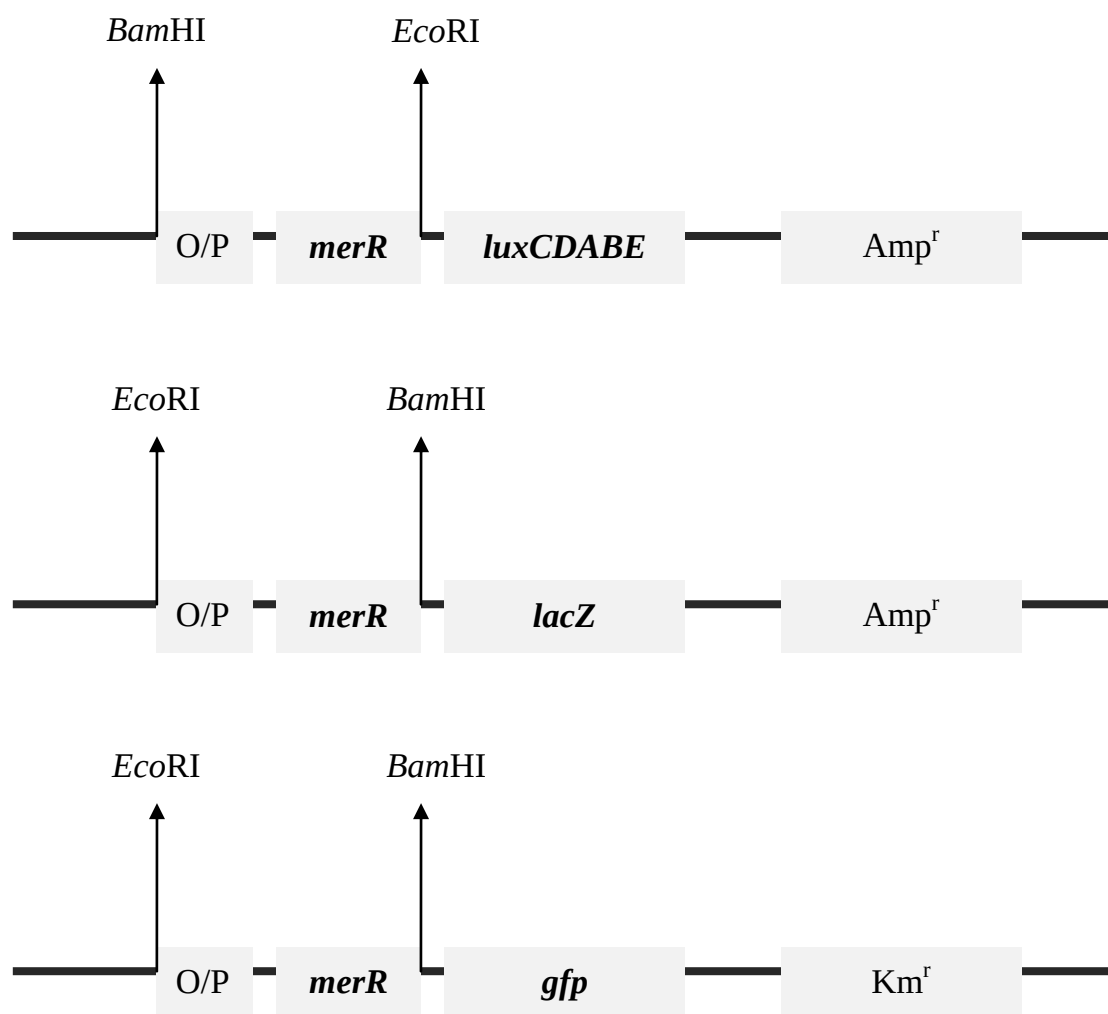


圖 5.5. 針對汞之生物感測器 *luxCDABE*、*lacZ* 與 *gfp* 部分質體架構圖

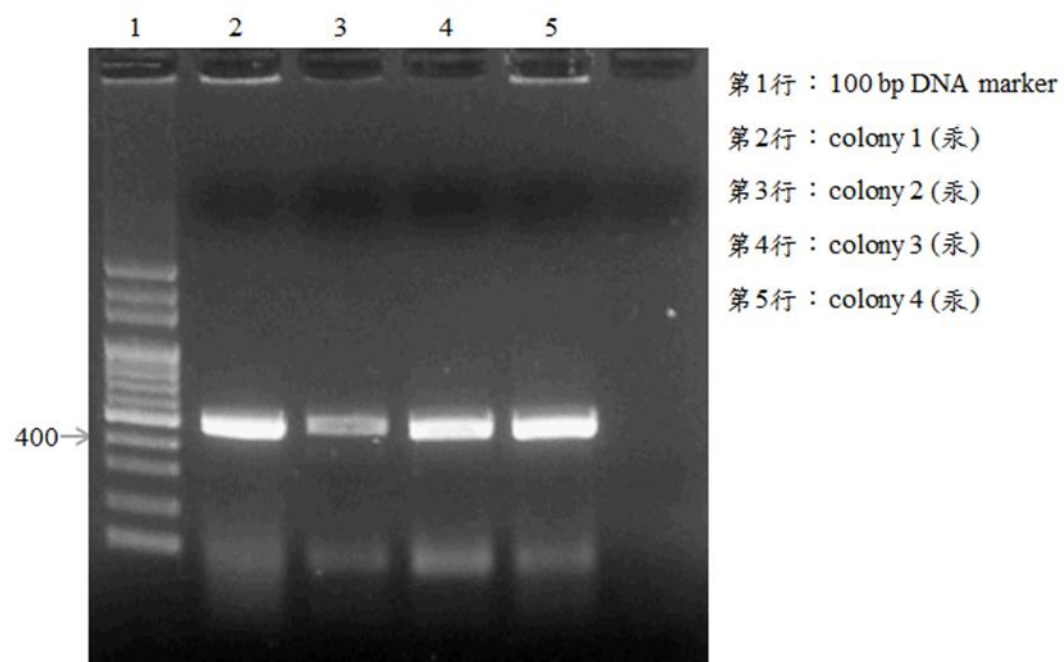


圖 5.6. 生物感測器(*gfp* 基因部分)菌落 PCR 產物電泳圖

5.3. 專一性生物感測器劑量與反應關係

1. 砷

完成質體建構並且轉型進勝任細胞，確認 *arsR* 之 promoter/operator 接入菌體後，以不同濃度三價砷(NaAsO_2)測量劑量與反應關係(圖 5.7)。Liao and Ou (2005)指出以 *gfp* 作為報告基因之生物感測器，最大誘導比約在 10 μM ，和本計畫期中階段所完成之 *luxCDABE* 基因部分相同。同時，*luxCDABE* 基因部分之生物感測器亦有誘導比較高的特性，和先前比較不同報告基因差異(*gfp* 與 *luxCDABE*)之研究結果相同(Li et al., 2008)。

而在 *lacZ* 基因部分，本計畫在期中報告時發現最大呈色差異點在 6.67 μM (圖 5.8A)，接近 *gfp* 與 *luxCDABE* 基因之結果。同時，6.67 μM 亦為環保署所定砷之放流水標準(500 $\mu\text{g/L}$)。而不論何種報告基因在高劑量砷下皆有訊號衰減的狀況，推測是由於細胞毒性所導致。接著本計畫將砷濃度提高至 5000 $\mu\text{g/L}$ ，發現約 50 $\mu\text{g/L}$ 就開始出現呈色差異，最大呈色差異點在 500 $\mu\text{g/L}$ (6.67 μM)，而在 5000 $\mu\text{g/L}$ 的濃度下會有呈色明顯減弱的現象(data not shown)，推測是由於細胞毒性所導致(圖 5.8B)。

2. 鎘

完成質體建構並且轉型進勝任細胞，確認 *cadC* 之 promoter/operator 接入菌體後，以不同濃度鎘(CdCl_2)測量劑量與反應關係(圖 5.9)。和先前之研究結果(Liao et al., 2006)比較，以 *gfp* 作為報告基因的生物感測器，和本計畫期中階段所完成之 *luxCDABE* 基因部分，其劑量反應關係大致類似。同時，*luxCDABE* 基因部分之生物感測器具有誘導比較高的特性，和先前比較不同報告基因差異(*gfp* 與 *luxCDABE*)之研究結果相同(Li et al., 2008)。

在 *lacZ* 基因部分，在期中報告時可以看出 0.27 μM (環保署所定鎘之放流水標準)與 0 μM 有明顯之呈色差異(圖 5.10A)。然而在後續培養，即使進行相同之實驗步驟，卻發現其背景值過高，導致無法辨別呈色差異的情況(圖 5.10B)，如此狀況也有被其他相關文獻所提及(Stocker et al., 2003; Wackwitz et al., 2008)。可能的解決方法為額外進行基因工程修飾，增加調控蛋白結合點位(regulatory protein binding site)，或是核糖體結合點位

(ribosome binding site) (Stocker et al., 2003; Wackwitz et al., 2008)。但礙於經費與時間之不足，目前計畫無法進行以上解決方法。

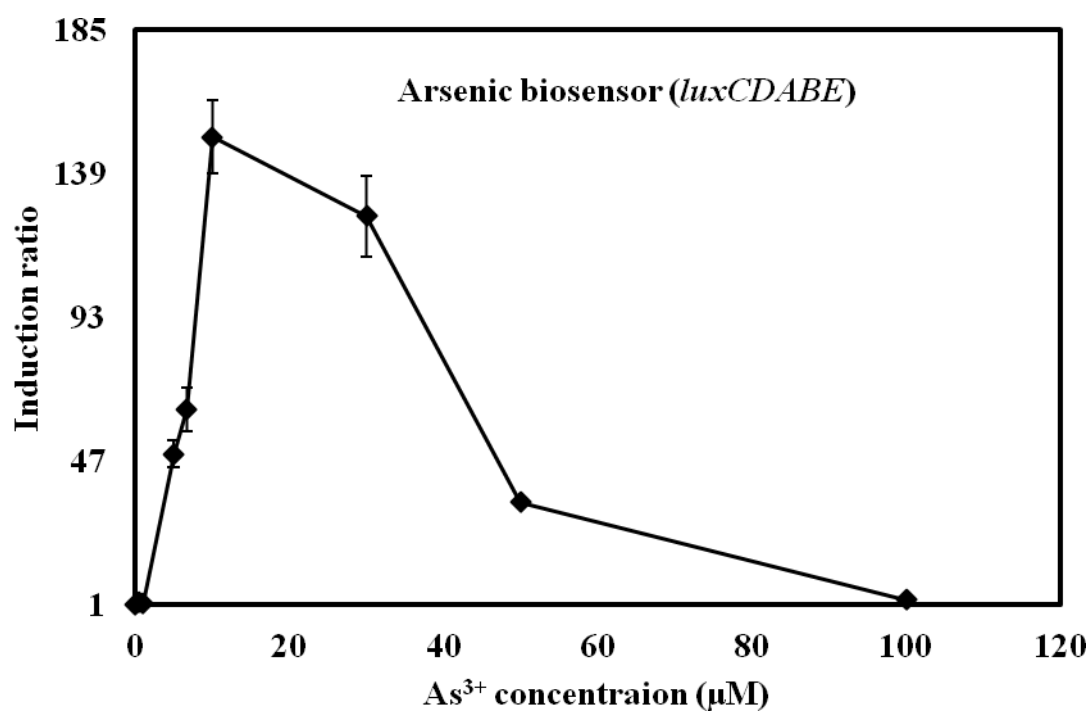
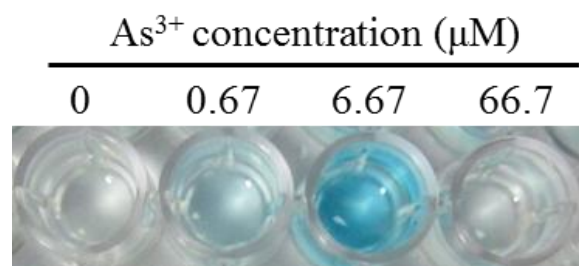


圖 5.7. 針對砷 *luxCDABE* 基因生物感測器之劑量與反應關係

(A)



(B)

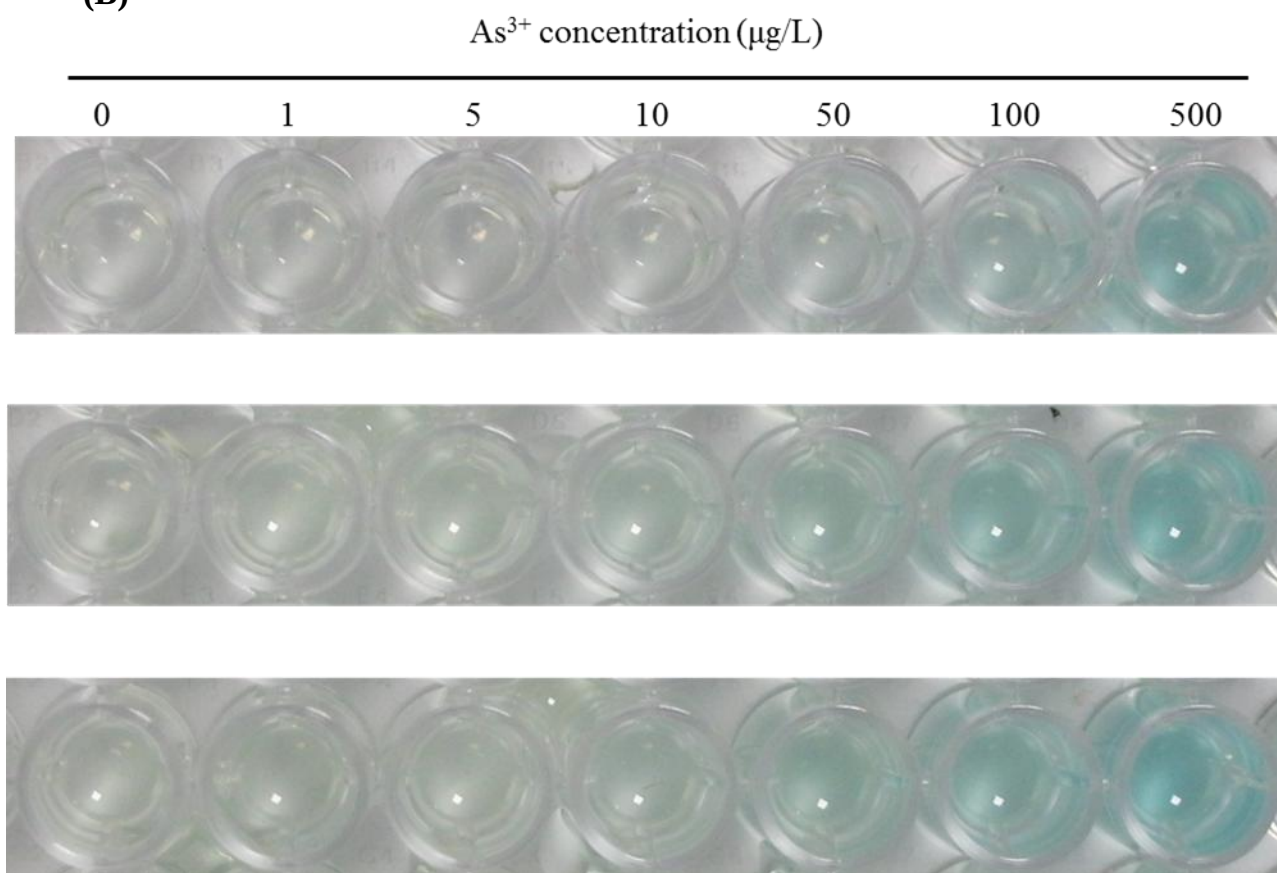


圖 5.8. 針對砷 *lacZ* 基因生物感測器於(A)期中報告與(B)期末報告所完成之劑量與反應關係

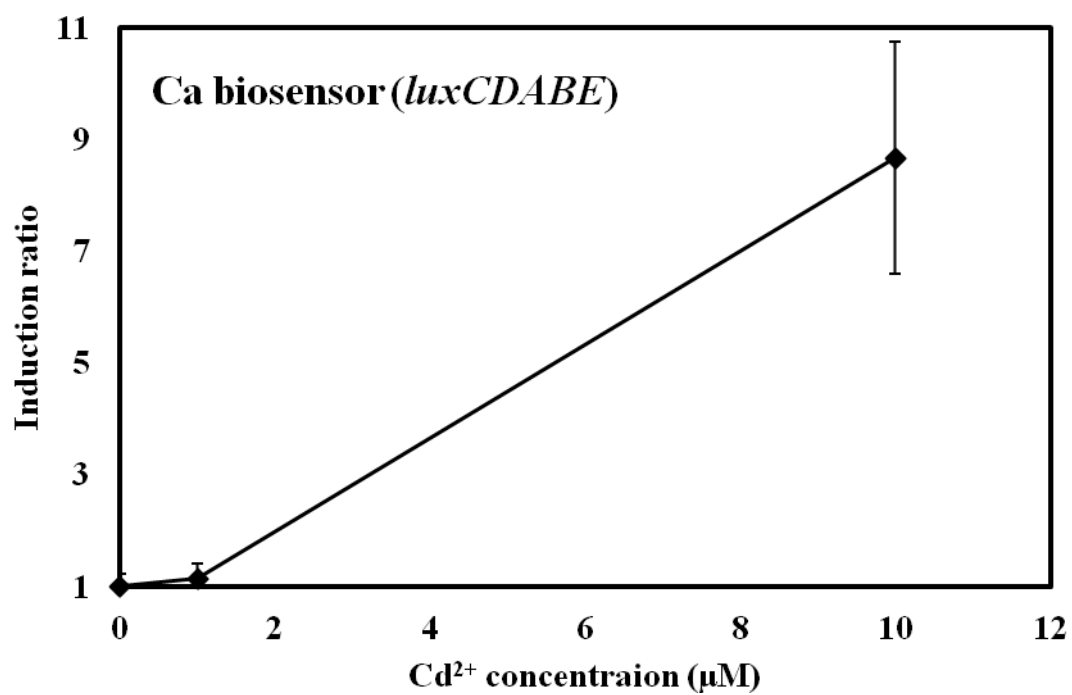
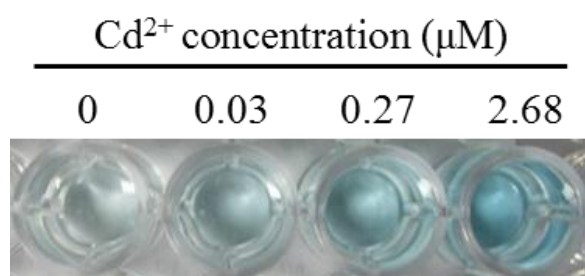


圖 5.9. 針對鎘 *luxCDABE* 基因生物感測器之劑量與反應關係

(A)



(B)

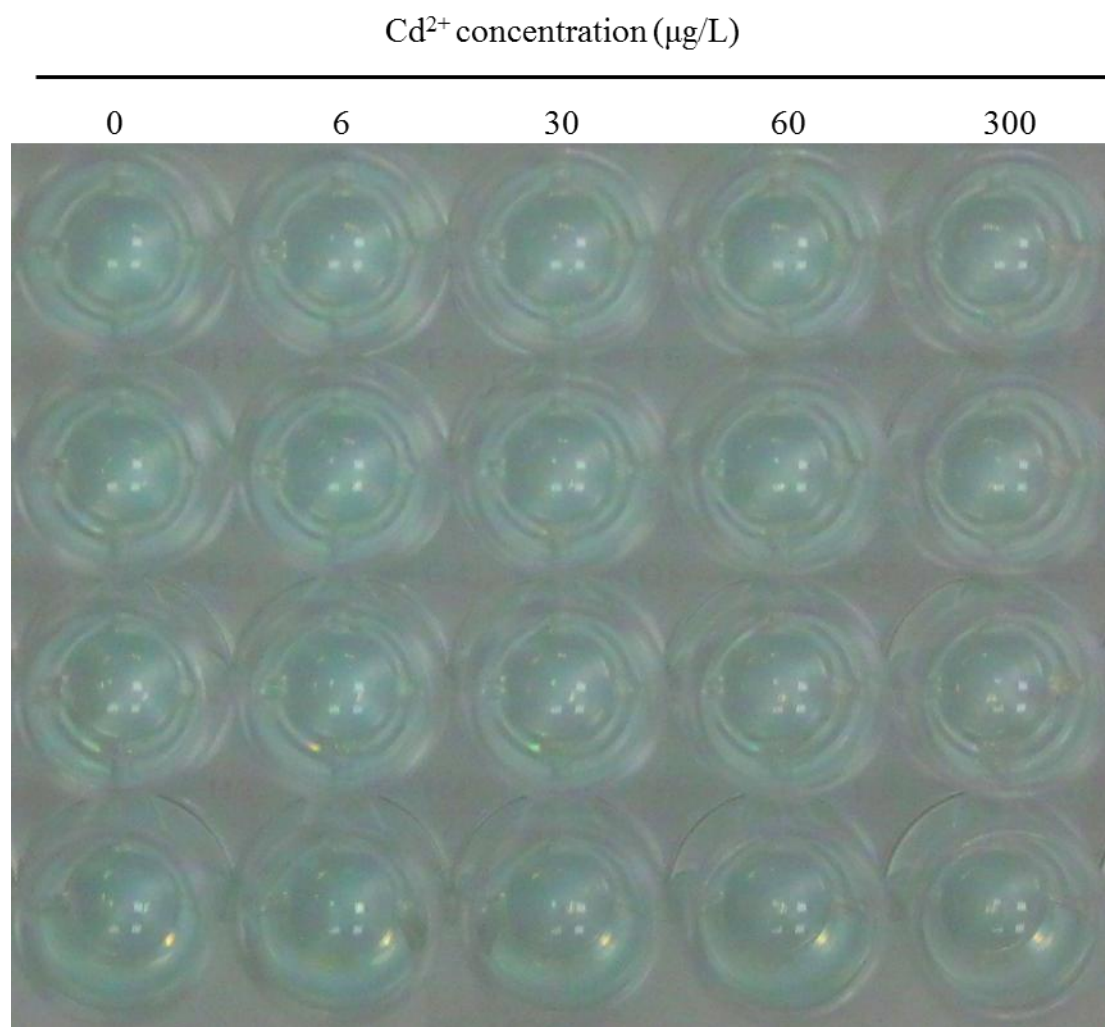


圖 5.10. 針對鎘 *lacZ* 基因生物感測器於(A)期中報告與(B)期末報告所完成之劑量與反應關係

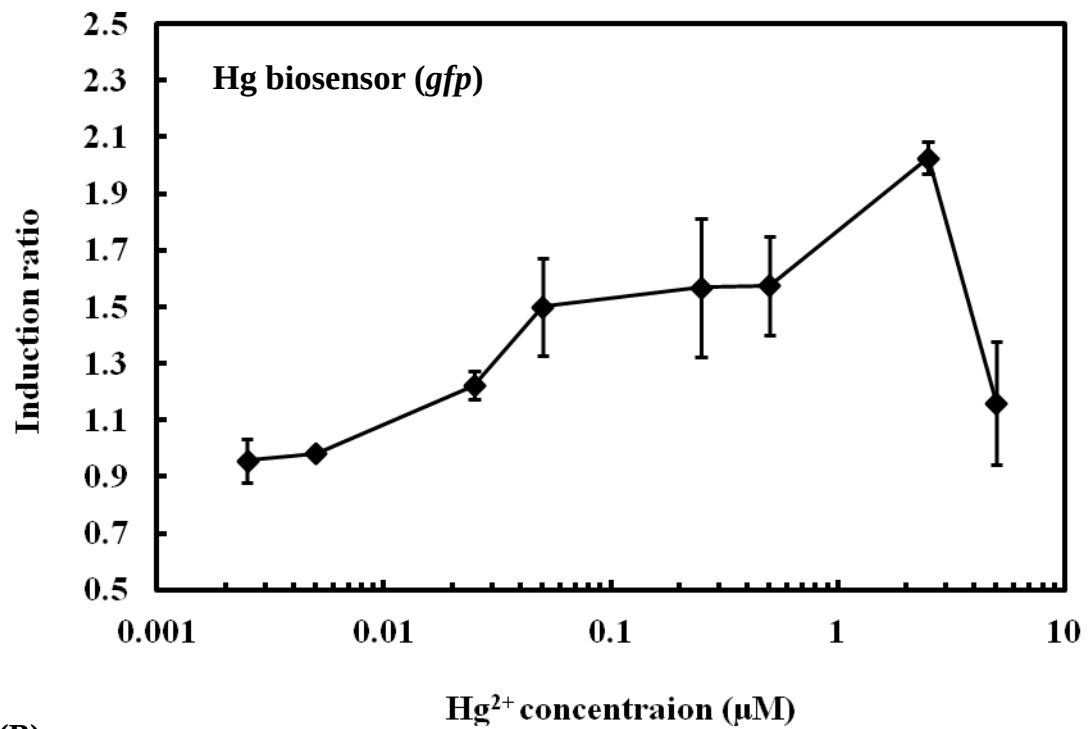
3. 汞

完成質體建構並且轉型進勝任細胞，確認 *merR* 之 promoter/operator 接入菌體後，以不同濃度汞(HgCl_2)測量劑量與反應關係(圖 5.11)。約 0.025 μM 有統計上的顯著上升($p < 0.05$)，而 0.025 μM 為環保署所定總汞之放流水標準(5 $\mu\text{g/L}$)。2.5 μM 為最大誘導比，其 IR 可達 2.03 ± 0.06 (平均值 $\pm$ 標準差)。而 5 μM 之二價汞即造成螢光誘導比大幅下降，推測是由於細胞毒性所導致。整體趨勢在 0.025 μM 至 2.5 μM 間呈現螢光強度誘導比隨二價汞劑量而上升(圖 5.11A)。

在 *luxCDABE* 基因部分可以看出最大誘導比約在 30 μM 。而 *gfp* 基因部分由於濃度區間選擇較少，無法看出最大誘導比，但結果仍與 *luxCDABE* 基因部分低濃度段類似。而在 *lacZ* 基因部分，可以看出 25 nM 與 0 nM 有明顯之呈色差異，而 25 nM 為環保署所定總汞之放流水標準(5 $\mu\text{g/L}$) (圖 5.11B)。

在 *lacZ* 基因部分，期中報告時可以看出 25 nM 與 0 nM 有明顯之呈色差異(圖 5.12A)，而 25 nM 為環保署所定總汞之放流水標準(5 $\mu\text{g/L}$)。但 *lacZ* 基因部分在 250 nM 即有呈色情形衰減的狀況(圖 5.12A)，推測是由於細胞毒性所導致。然而在後續培養，進行相同的實驗步驟時，發現與鎘之 *lacZ* 基因生物生物感測器有相同瓶頸，同樣發現背景值過高，導致無法辨別呈色差異的情況(圖 5.12B)。解決方法與鎘之 *lacZ* 基因生物生物感測器相同，但礙於經費與時間之不足，目前計畫無法進行以上解決方法。

(A)



(B)

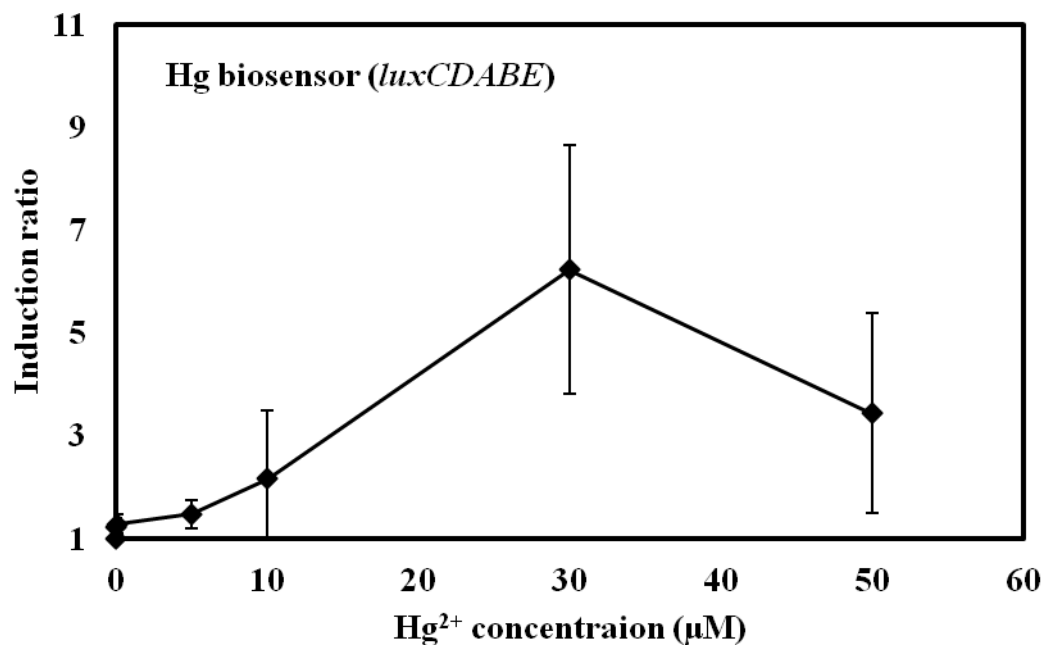
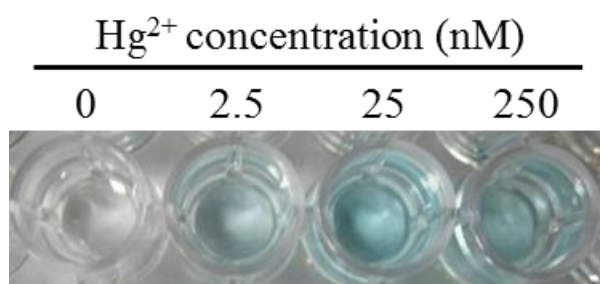


圖 5.11. 針對汞(A) *gfp* 與(B) *luxCDABE* 基因生物感測器之劑量與反應關係

(A)



(B)

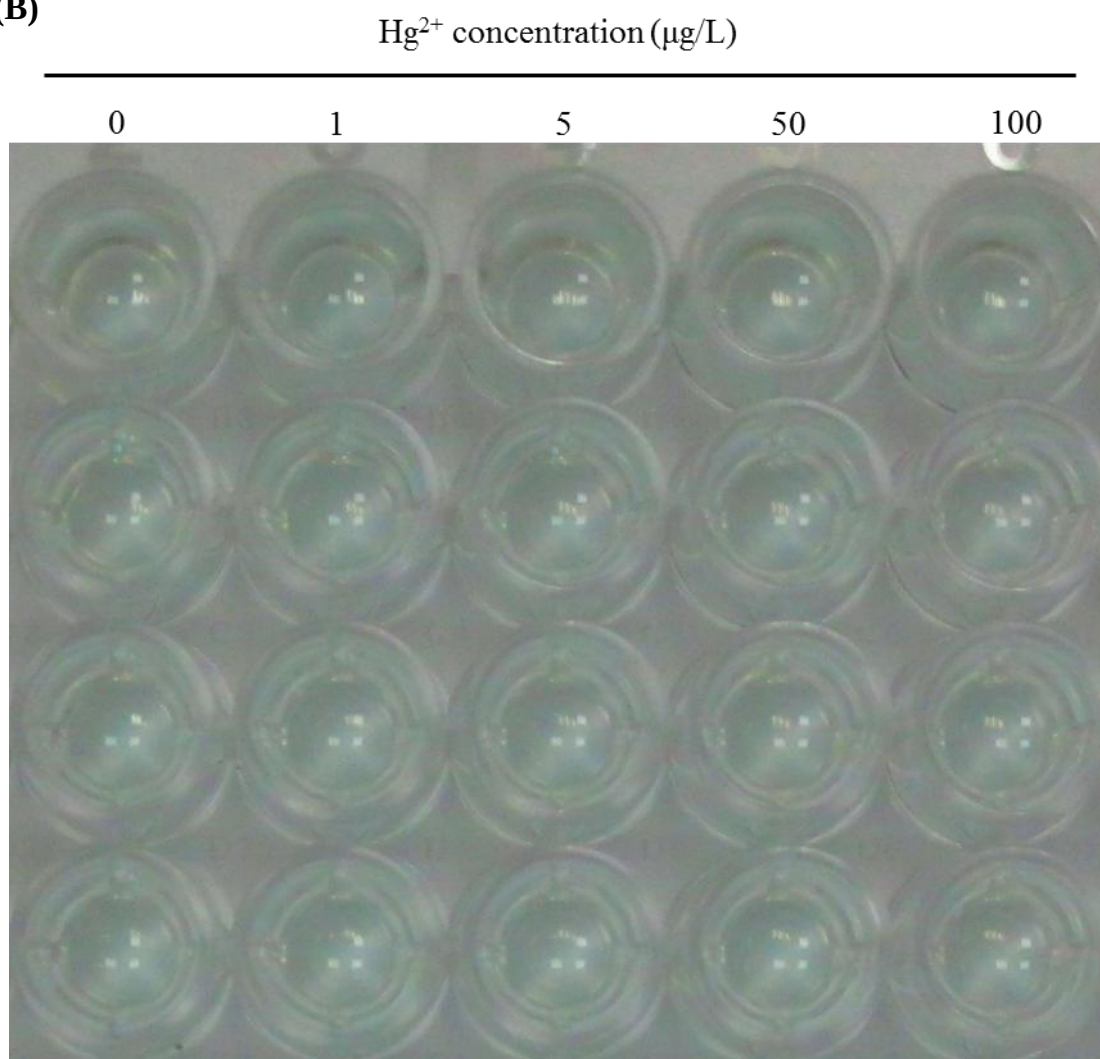


圖 5.12. 針對汞 *lacZ* 基因生物感測器於(A)期中報告與(B)期末報告所完成之劑量與反應關係

5.4. 專一性生物感測器時間與反應關係

利用砷濃度 $6.67\ \mu\text{M}$ 、鎘濃度 $250\ \mu\text{M}$ 與汞濃度 $5\ \mu\text{M}$ 來誘導 *luxCDABE* 基因生物感測器，在不同時間點下測得誘導比如圖 5.13 所示。研究結果發現，砷、鎘與汞 *luxCDABE* 基因生物感測器在前 3 小時下之誘導比持續上升，在第 3 小時達到最大值，其後則產生顯著的下降。前人研究也顯示出相似的結果(Li et al., 2008)，造成這原因這主要是因 *luxCDABE* 為報告基因之生化特性(Hakkila et al., 2002; Dollard and Billard, 2003)。

此外，本計畫另以汞濃度 $0.25\ \mu\text{M}$ 來誘導 *gfp* 基因生物感測器，以測量時間與反應關係(圖 5.14)。第 1 小時尚無法看出明顯差異，而到第 2 小時可測量出明顯較高螢光強度誘導比。在前 3 小時之二價汞共培養下，誘導比呈直線上升。與 1 小時相比，3 小時共培養之誘導比增加量達 0.4，而第 4 小時開始強度增加趨緩，與先前研究之 *gfp* 基因生物感測器的結果相符(Liao and Ou, 2005; Liao et al., 2006)。由於 *gfp* 基因產生之綠色螢光蛋白具有高穩定度的特性，在長時間的培養下飽和並不會大幅降低其螢光強度。

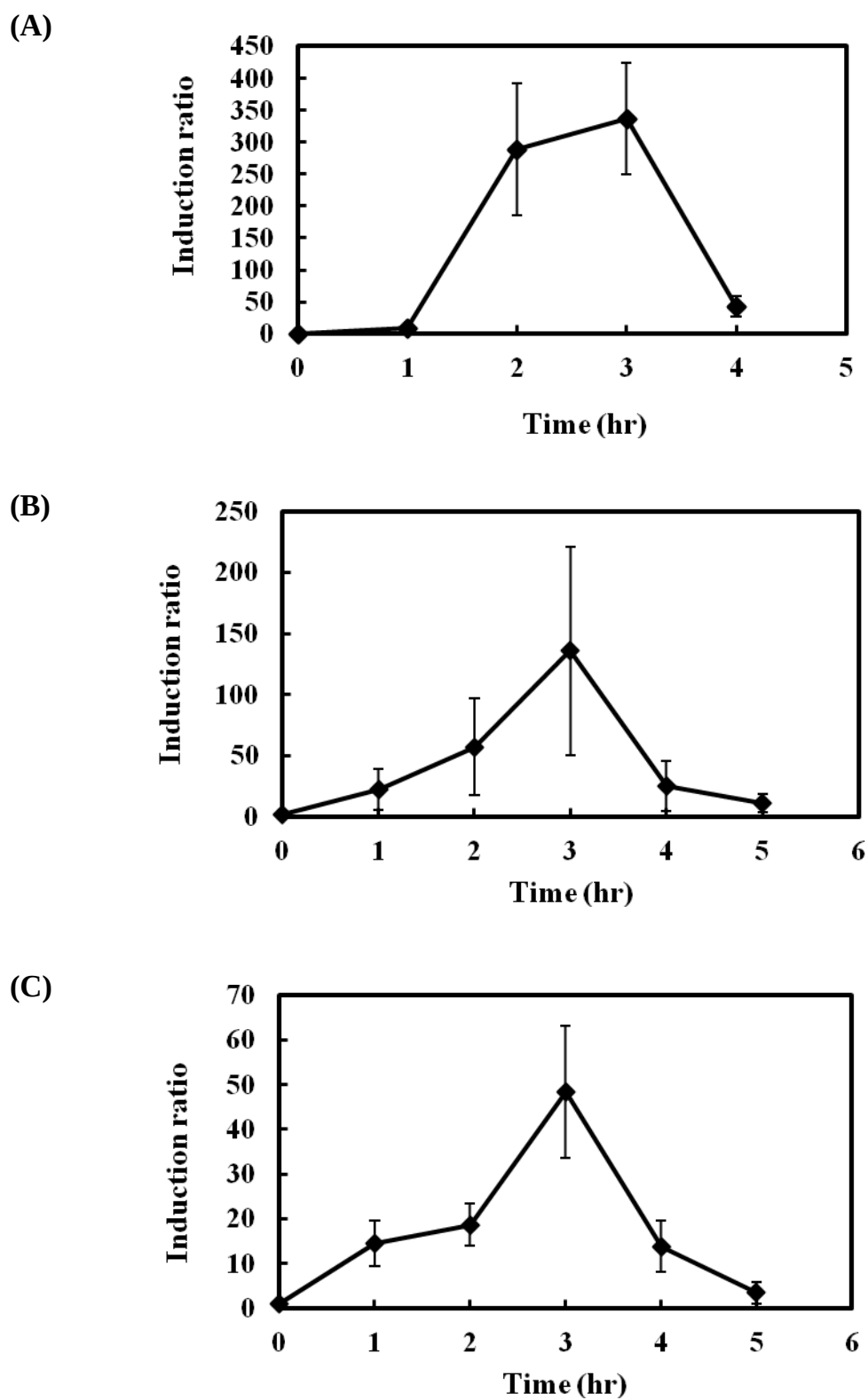


圖 5.13. (A)砷、(B)鎘與(C)汞誘導 *luxCDABE* 基因生物感測器之時間與反應關係

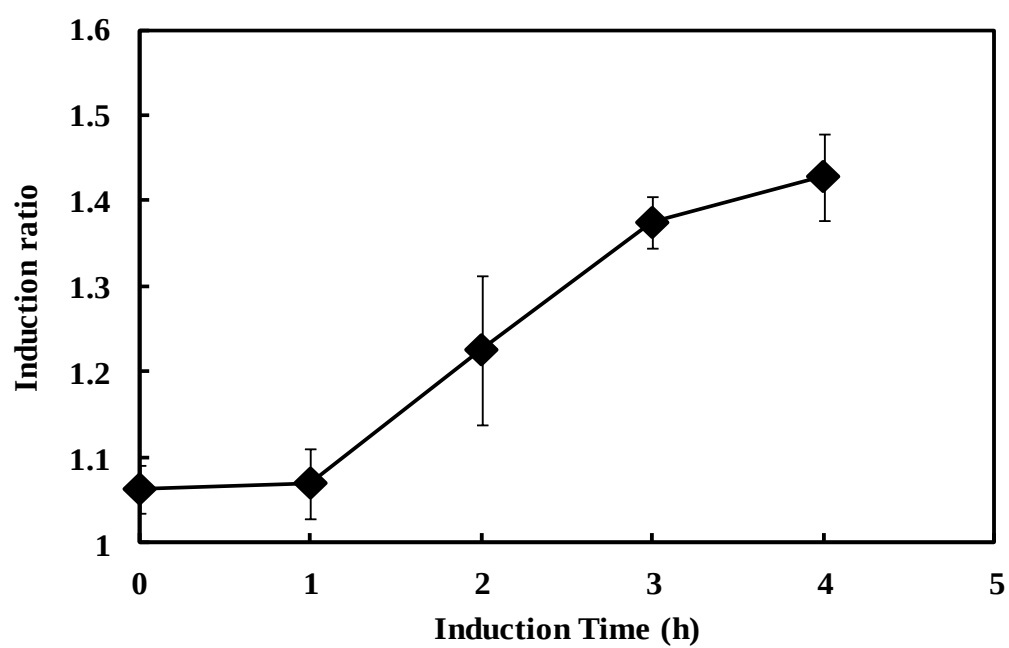


圖 5.14. 針對汞 *gfp* 基因生物感測器之時間與反應關係

5.5. 專一性生物感測器於環境樣品測試與化學分析方法測定之比較

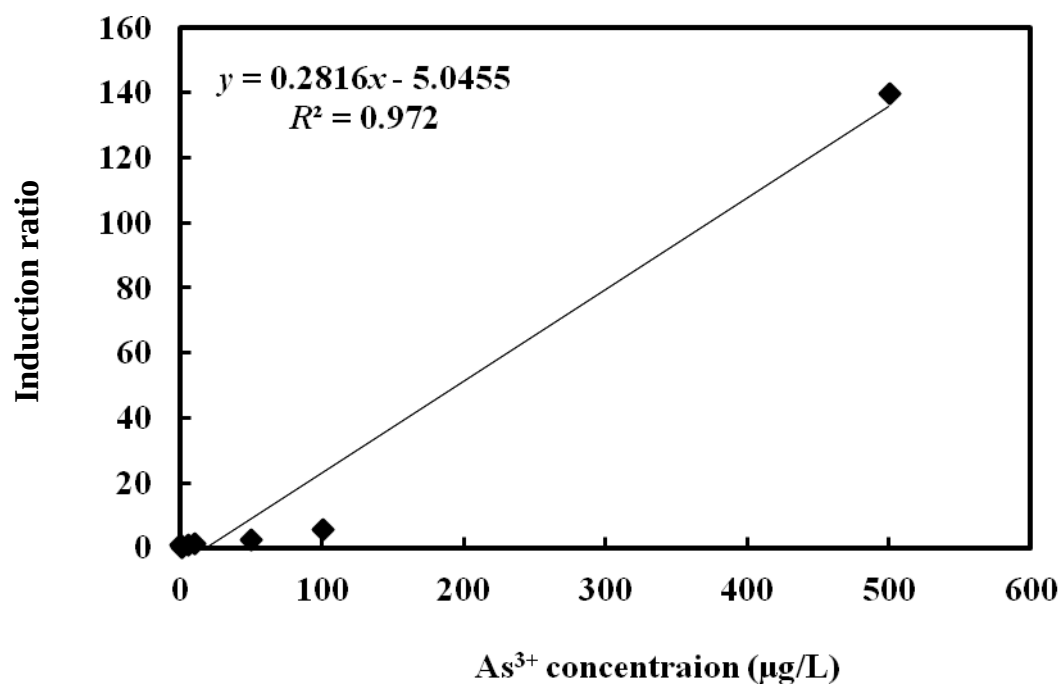
1. 砷

為測試生物感測器在檢測環境樣品時之靈敏度及穩定度，將環境樣品與生物感測器菌液混合共培養的方式，培養 3 小時後測定與推估誘導比，再與化學分析方法(ICP-MS 與 ICP-AES)檢測地下水與底泥萃取液中之數據進行比較。每次試驗會同時繪製檢量線，從檢量線可確認本次試驗生物感測器之反應關係是否正常。

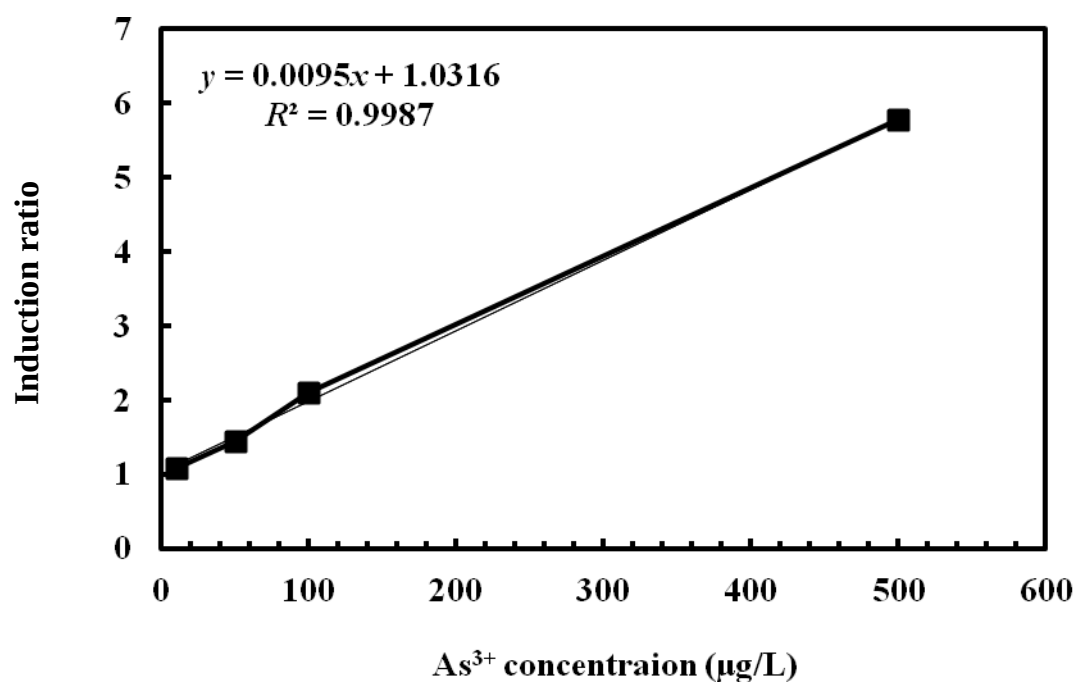
利用砷之 *luxCDABE* 基因生物感測器繪出檢量線為 $y = 0.2816x - 5.0455$ ($R^2 = 0.9721$) (圖 5.15A)，且在砷 $0.67 \mu\text{M}$ 以上之濃度下能達到統計上顯著差異($p < 0.05$)，而 $0.67 \mu\text{M}$ ($50 \mu\text{g/L}$)為第一類地下水污染管制標準值。針對化學分析方法與專一性生物感測器檢測法來比較，生物感測器檢測出的結果比化學法還要高出許多(表 5.2)，在前人研究中亦有發現相同結果(Liao et al., 2006)，主要是由於化學分析法雖然能準確定量出重金屬濃度，但卻沒辦法像生物感測器一樣能真正反映出生物有效性所導致的。此外亦有可能是因為環境樣品中砷濃度已經低於砷之 *luxCDABE* 基因生物感測器的偵測極限($50 \mu\text{g/L}$)，因此無法真實反應出濃度關係。

另外在砷之 *gfp* 基因生物感測器方面，從檢量線可確認本次試驗菌液螢光反應關係正常，其在 $10 - 500 \mu\text{g/L}$ ($0.13 - 6.67 \mu\text{M}$)之間有良好的線性關係 ($R^2 = 0.9987$)， $10 \mu\text{g/L}$ ($0.13 \mu\text{M}$)為統計上顯著差異($p < 0.05$)之最低濃度點，即最低偵測濃度(圖 5.15B)，而 $10 \mu\text{g/L}$ 低於第一類地下水污染管制標準值($50 \mu\text{g/L}$)。使用砷之 *gfp* 基因生物感測器檢測環境樣品，本計畫發現僅地下水 R00531、R00532、R00533 測出約 $20 - 30 \mu\text{g/L}$ ，其餘皆為無法測出(表 5.3)。由於本次試驗方法為環境樣品與菌液混合共培養，故環境樣品原濃度會被稀釋，導致無法檢出之結果。R00532 之生物感測器測值與 ICP-MS 測值差異並不大，代表此點位砷含量之生物有效性和實際含量差異亦不大(表 5.3)。另外 R00531、R00533 點位之生物感測器測值明顯較 ICP-MS 測值高，可能代表此兩點位砷含量的生物有效性較高。

(A)



(B)

圖 5.15. 使用砷(A) *luxCDABE* 與(B) *gfp* 基因檢測環境樣品之檢量線

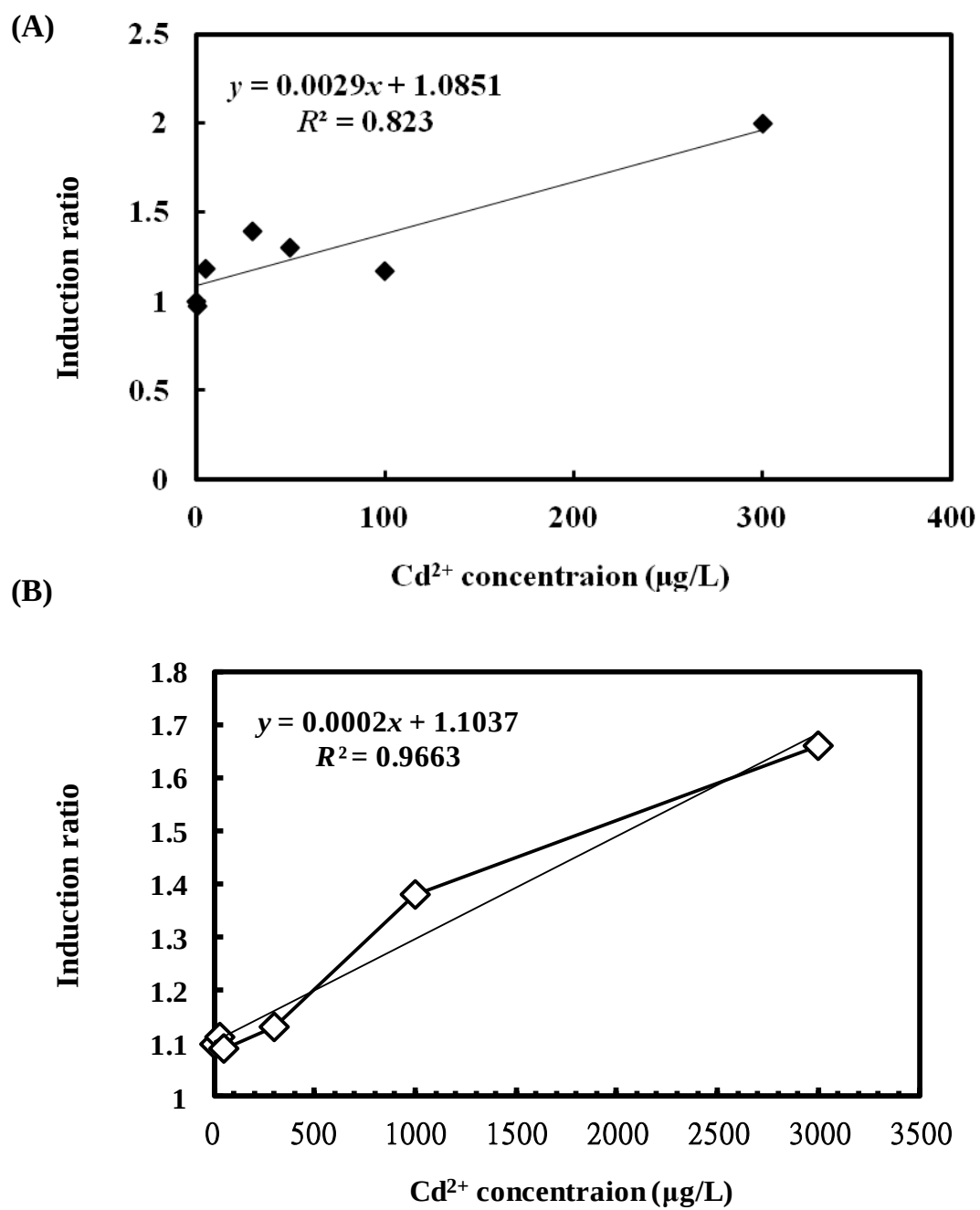


圖 5.16. 使用鎘(A) *luxCDABE* 與(B) *gfp* 基因檢測環境樣品之檢量線

表 5.2. 利用 *luxCDABE* 基因之生物感測器檢測地下水與底泥水萃取液

	As ³⁺	Cd ²⁺	Hg ²⁺
地下水樣品			
R00531	47.14±2.92	N.D. ^a	2.01±1.57
R00532	49.04±5.87	N.D.	1.36±1.06
R00533	47.77±3.06	N.D.	0.40±0.12
R00534	45.50±1.09	N.D.	2.14±1.82
R00535	46.04±2.97	N.D.	1.34±1.31
D00155	46.43±2.83	N.D.	1.67±0.48
D00156	49.27±2.97	N.D.	3.91±0.47
D00157	45.23±0.65	N.D.	1.61±0.88
底泥水萃取液			
典寶溪	46.76±4.07	N.D.	0.67±2.00
二仁溪三爺宮溪交匯處	46.62±2.18	N.D.	1.32±0.61
二仁溪南楚橋	45.10±2.99	N.D.	0.87±0.61

^a N.D.: not detectable (< 30 µg/L)

2. 鎘

利用鎘之 *luxCDABE* 基因生物感測器繪出檢量線為 $y = 0.0029x + 1.0851$ ($R^2 = 0.8237$) (圖 5.16A)，且在鎘 0.267 μM 以上之濃度下能達到統計上顯著差異($p < 0.05$)，而 0.267 μM (30 $\mu\text{g/L}$)低於第二類地下水污染管制標準值(0.446 μM)(50 $\mu\text{g/L}$)。與化學方法做比較，生物感測器皆無法測得環境樣品中的鎘(表 5.2)，其主要原因為由於經由 ICP-AES 所測之環境樣品中的鎘濃度在 19–22 $\mu\text{g/L}$ 之間，已經低於 *luxCDABE* 的偵測極限(30 $\mu\text{g/L}$)，雖然鎘生物感測器沒辦法像化學方法精確檢測出低濃度重金屬鎘，但它能分辨出環保署所定之放流水標準 0.267 μM (30 $\mu\text{g/L}$)，可以用於初步需要快速、大量篩選受鎘污染地區，以輔助化學分析法的不足。

在鎘之 *gfp* 基因生物感測器方面(圖 5.16B)，從檢量線可確認本次試驗菌液螢光反應關係正常，其在高濃度範圍(300–3000 $\mu\text{g/L}$)之間有良好線性關係($R^2 = 0.9663$)，低濃度範圍(5–50 $\mu\text{g/L}$)則因誘導比較低，數據波動較大，線性關係不明顯，和先前研究結果類似(Liao et al., 2006)。30 $\mu\text{g/L}$ (0.267 μM)為統計上的顯著差異($p < 0.05$)之最低濃度點，即最低偵測濃度，而此濃度低於第二類地下水污染管制標準值(50 $\mu\text{g/L}$)。環境樣品共分為九個地下水樣品與三個底泥萃取液樣品，以針對鎘之生物感測器(*gfp* 基因)檢測皆為無法測出(<30 $\mu\text{g/L}$) (表 5.3)，和 ICP-AES 檢測之數據相符。

3. 汞

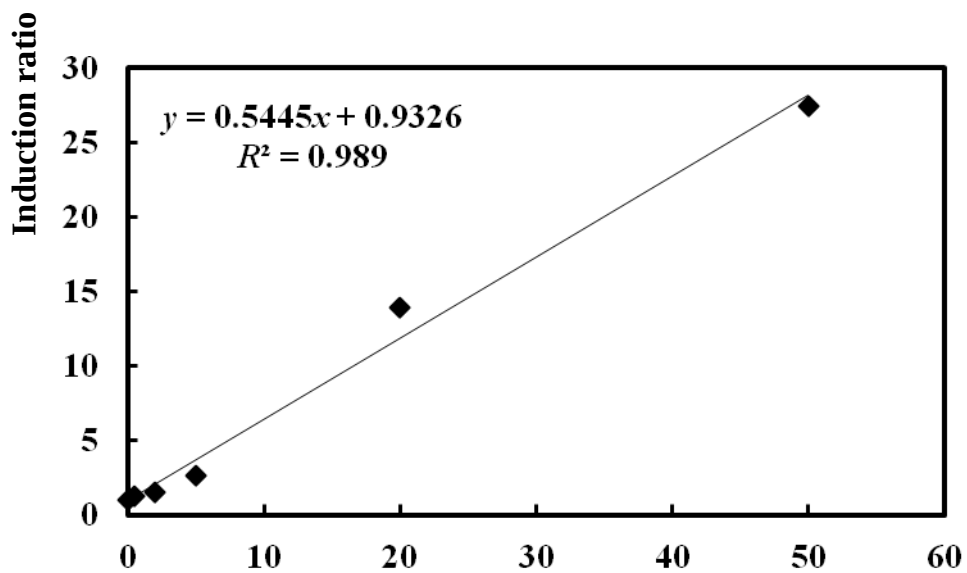
利用汞之 *luxCDABE* 基因生物感測器繪出檢量線為 $y = 0.5445x + 0.9326$ ($R^2 = 0.9892$) (圖 5.17A)，且在汞 0.01 μM (20 $\mu\text{g/L}$)以上之濃度下能達到統計上顯著差異($p < 0.05$)，而此濃度(20 $\mu\text{g/L}$)為第一類地下水污染管制標準值。與化學方法比較，生物感測器檢測出之結果與化學法結果相近(表 5.2)。Li et al. (2008)指出 *luxCDABE* 具有短時間快速反應以及相對高靈敏度等優點，可以用於初步需要快速、大量的篩選受汞污染地區，以輔助化學分析法的不足。

再者，汞之 *gfp* 基因生物感測器所繪之檢量線為 $y = 0.000x + 1.098$ ($R^2 = 0.950$) (圖 5.17B)。從檢量線可確認本次試驗菌液螢光反應關係正常，在 5–500 $\mu\text{g/L}$ (0.025–2.5 μM)之間有良好線性關係，5 $\mu\text{g/L}$ (0.025 μM)為統計上顯著差異($p < 0.05$)之最低濃度點，即最低偵測濃度，而 5 $\mu\text{g/L}$ 低於第二類地下水污染管制標準值(20 $\mu\text{g/L}$)。以汞之 *gfp* 基因生物感測器檢測環境樣

品，結果皆為無法測出($< 5\mu\text{g/L}$) (表 5.3)，和 ICP-MS 檢測之數據相符。

針對環境樣品的檢測，生物感測測定值和化學分析法檢測所得結果有部分的差異。在砷方面，生物感測器測值略高於化學分析法；在鎘方面，由於濃度過低，生物感測器皆為無法檢出；在汞方面，luxCDABE 生物感測器測值和化學分析法相近，而 GFP 生物感測器則因低於檢測極限無法檢出。造成生物感測器測值較高的原因可能為樣品中重金屬型態之生物可獲性較高、其他相似離子(如銻、鉛)干擾等。在其應用上的限制方面，生物感測器會受樣品環境因素干擾，例如 pH 值、其他毒性物質影響而降低活性，另外亦會受到樣品中其他離子之干擾，導致測值不穩。

(A)



(B)

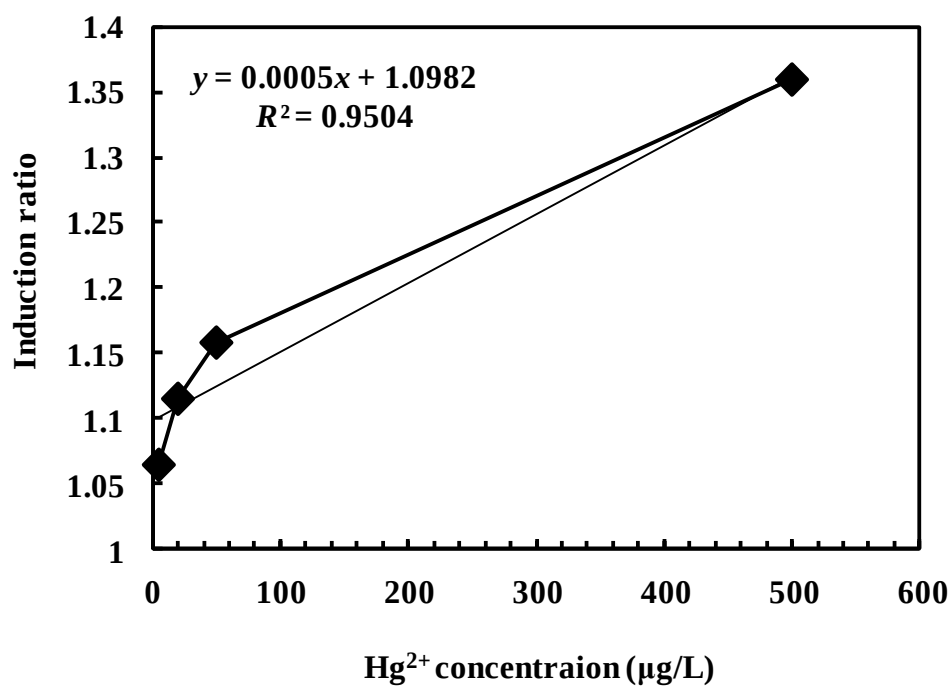


圖 5.17. 使用汞(A) *luxCDABE* 與(B) *gfp* 基因檢測環境樣品之檢量線

表 5.3. 利用 *gfp* 基因之生物感測器檢測地下水與底泥萃取液

	As ³⁺	Cd ²⁺	Hg ²⁺
地下水樣品			
R00531	23.08±2.15	N.D. ^a	N.D
R00532	26.81±8.85	N.D	N.D
R00533	28.99±1.21	N.D	N.D
R00534	N.D	N.D	N.D
R00535	N.D	N.D	N.D
D00155	N.D	N.D.	N.D
D00156	N.D	N.D.	N.D
D00157	N.D	N.D.	N.D
底泥萃取液			
典寶溪	N.D	N.D.	N.D
二仁溪三爺宮溪交匯處	N.D	N.D.	N.D
二仁溪南楚橋	N.D	N.D	N.D

^a N.D.: not detectable (<10 µg/L for As³⁺; <30 µg/L for Cd²⁺; <5 µg/L for Hg²⁺)

5.6. 專一性生物感測器檢測混合多重金屬環境樣品

為更深入探討多重金屬離子對針對汞之生物感測器之影響，本計畫利用 R00533 以及 R00535 兩個地區之地下水樣品，模擬工廠排放含有混合重金屬之廢水，額外添加砷 500 $\mu\text{g/L}$ (6.67 μM)、汞 20 $\mu\text{g/L}$ (0.1 μM)以及鎘 50 $\mu\text{g/L}$ (0.45 μM)於地下水樣品中，再將其與生物感測器菌液混合共培養的方式，培養 3 小時。

1. 砷

結果顯示，以砷之 *luxCDABE* 基因生物感測器檢測混合重金屬水樣，其可以檢測出兩個地下水樣品外加之砷濃度分別為 $424 \pm 179 \mu\text{g/L}$ 及 $525 \pm 157 \mu\text{g/L}$ ；以砷之 *gfp* 基因則可以檢測出砷濃度分別為 $426 \pm 98 \mu\text{g/L}$ 及 $418 \pm 93 \mu\text{g/L}$ (表 5.4)，其皆與本計畫外加砷濃度相近。砷之生物感測器不論是 *luxCDABE* 或是 *gfp* 都可以在環境樣品背景值與多重重金屬離子干擾下有效辨識三價砷，未來應用於多重汙染環境十分具有潛力。

2. 汞

在汞之 *luxCDABE* 基因生物感測器方面，其可以檢測出兩個地下水樣品外加的汞濃度分別為 $18 \pm 11 \mu\text{g/L}$ 及 $6 \pm 3 \mu\text{g/L}$ (表 5.4)，亦與本計畫外加汞濃度相近；而在汞之 *gfp* 基因生物感測器，皆無法檢測出樣品中汞濃度，因此，表示汞之生物感測器在 *luxCDABE* 基因方面具有較佳的辨識能力，可以在環境樣品背景值與多重重金屬離子干擾下有效辨識二價汞；而在 *gfp* 基因方面，無法檢測出二價汞，可能受到其他重金屬離子之毒性影響。綜合而言，本計畫所建構之生物感測器具有快速篩選現地樣品是否有汙染之潛力。

表 5.4. 使用砷與汞之生物感測器檢測環境樣品混合多重金屬

Reporter Gene	R00533 ^a	R00535 ^a	H ₂ O ^a
As			
<i>luxCDABE</i>	424 ± 179	525 ± 157	467 ± 171
<i>gfp</i>	426 ± 98	418 ± 93	529 ± 22
Hg			
<i>luxCDABE</i>	18 ± 11	6 ± 3	8 ± 1
<i>gfp</i>	N.D. ^b	N.D.	N.D.

^a Spiking 500 µg/L As³⁺, 50 µg/L Cd²⁺, 20 µg/L Hg²⁺

^b N.D.: not detectable

5.7. 硫氧化菌生物感測器之探討

本計畫用於建構硫氧化菌生物感測器，菌株 *Acidithiobacillus caldus* (DSM 8584；ATCC 51756) 是向新竹食品工業研究所購買的硫氧化菌，取得冷凍乾燥菌株，經過五天的培養後，發現其菌量無法達到預期，經與食工所相關研究人員討論後，仍是無法大量培養達到建構硫氧化菌生物感測器之要求。

在前人研究所建構之硫氧化菌生物感測器，亦遇到培養條件困難，而未成功使用單一菌落來建構出硫氧化菌生物感測器，取而代之使用活性污泥做為硫氧化菌種來源(Hassan et al., 2010; Hassan et al., 2012)。然存在許多缺點，其中包含：(1)活性污泥為混合菌落，每次菌數、菌群都不一樣與(2)活性污泥中存在許多有機、無機污染物，可能影響硫氧化菌的生長與反應，易造成實驗變異性大，難以呈現穩定之結果。因此，本執行單位已在下年度計畫中，提出從台灣富含硫礦之地區採樣，自行篩選容易大量培養且能適應台灣環境之本土性之硫氧化菌用於檢測環境污染物之應用。

5.8. 生物感測器與化學分析方法之成本分析與比較

根據成本分析(表 5.5)可知委託外面化學分析法利用 ICP-AES 或 ICP-MS 一個樣品約需花費新台幣 1000-1500 元，然而生物感測法一個樣品只約需新台幣 13-123 元，其中考慮實驗室中有螢光或冷光光度計等儀器設備的話，還可以再降低此成本花費至每一個樣品約新台幣 13 元，若是再算上人力成本因素，假設政府機構欲委託本單位利用生物感測器來大量進行環境樣品之檢測，將可大量降低花費。由此可知，生物感測法比化學分析法便宜非常多，此外，除了儀器使用與維修費外，化學分析法還需要花額外樣品前處理的費用與時間，而生物感測法則不需要，因此化學分析法不僅耗時又需花費大量的金錢，然而在面對大量需要檢測的環境樣品下，政府單位若必須盡快得知結果，化學分析法則無法有效率的提供結果，因此，可以先利用花費較低，較快速的生物感測器來輔助化學分析法的不足，先進行初步篩選，挑出有疑慮的樣品，再利用化學分析法進行準確的定量，如此一來，不僅能快速的得知結果，又能省下龐大的經費。

表 5.5. 生物感測法與化學分析法之成本分析

生物感測法	元/樣品(估計)	化學分析法	元/樣品 ^d
LB 培養基	0.5		
培養盤	6		
抗生素	0.5		
96 孔盤	4		
玻璃試管	2		
螢光光度計設置費 ^a	80		
人力需求 ^b	30		
Total	13 ^c - 123	Total	1000 - 1500

生物感測法：

LB 培養基價格為 5000 元/仟克

培養盤價格為 6 元/個

抗生素價格為 460 元/克

96 孔盤價格為 200 元/個

玻璃試管價格為 70 元/支

^a 螢光光度計購置一台約 800,000 元，以一天檢測 100 個樣品，共檢測 400 天估算^b 依國科會學士級專任助理薪資與實驗經驗估算^c 下限值不含螢光光度計設置費與人力需求**化學分析法：**^d ICP-MS 檢測費用參考：國立臺灣大學生物資源暨農學院收費標準(表 5.6) 及國立台灣海洋大學 水產養殖學系水產品檢驗中心收費標準(表 5.7)

表 5.6. 國立臺灣大學生物資源暨農學院感應耦合電漿質譜儀(ICP-MS)收費標準

每一樣品中測定的元素數目	收費標準(新台幣元)
定性及半定量分析	1000
1-3 元素	1000
4-6 元素	1,500
7-10 元素	2,500
11-20 元素	4,500
21-30 元素	9,000
> 31 元素	15,000

表 5.7. 國立台灣海洋大學感應耦合電漿質譜儀(ICP-MS)收費標準

重金屬分析項目			
分析項目	分析儀器	檢體種類	價格(元)
重金屬元素	ICP/MS	水樣	單項檢測收費 1500，同一件檢體每多測一元素加收 450
		生物	單項檢測收費 2000，同一件檢體每多測一元素加收 500
重金屬掃描	ICP/MS	水樣	6000
		生物	8000

5.9. 結論與建議

1. 結論

本研究計畫已成功建構攜帶不同報告基因(report gene)之重金屬專一性細菌生物感測器，用以偵測重金屬砷、汞與鎘，其中所使用之報告基因包括綠色螢光蛋白(green fluorescent protein, *gfp*)、*lacZ* 及 *luxCDABE*。本研究利用基因工程技術，總計建構 7 個專一性的細菌生物感測器，其中包括：2 個針對砷檢測的 *lacZ* 及 *luxCDABE* 生物感測器；2 個針對鎘檢測的 *lacZ* 及 *luxCDABE* 生物感測器；3 個針對汞檢測的 *gfp*, *lacZ* 及 *luxCDABE* 生物感測器。加上之前本研究室建構的 2 個針對砷及鎘檢測的 *gfp* 生物感測器，總計使用 9 個砷、汞與鎘生物感測器分析檢測環境樣品。

- (1) 在砷方面，*lacZ*、*luxCDABE*、*gfp* 基因皆能在放流水標準、地下水污染管制標準第二類之濃度下有效作用，並且 *luxCDABE*、*gfp* 基因在環境樣品的砷測定上亦有良好的效果，在多重金屬干擾下亦可有優良的辨識度。
- (2) 在鎘方面，*luxCDABE*、*gfp* 基因皆能在放流水標準、地下水污染管制標準第二類之濃度下有效作用，並且 *luxCDABE*、*gfp* 基因在環境樣品的鎘測定上亦有良好的效果。
- (3) 在汞方面，*luxCDABE*、*gfp* 基因皆能在放流水標準、地下水污染管制標準第二類之濃度下有效作用，並且 *luxCDABE*、*gfp* 基因在環境樣品的汞測定上亦有良好的效果，而其中 *luxCDABE* 基因在多重金屬干擾下亦可有優良的辨識度。
- (4) 本研究計畫成功建構專一性生物感測器套組，可以有效偵測重金屬砷、鎘、汞，且具有價錢便宜、培養方便與偵測時間短(約 2–3 小時)之優點，因此，專一性毒性物質檢測器套組具有十足潛力應用於快速篩測污染物並且得以降低檢測成本，且能提供生物有效性之資訊，作為有關單位對於毒性物質及重金屬環境污染的有效管理。
- (5) 在廣效性生物感測器方面，本計畫向新竹食品工業研究所購買之硫氧化菌，由於不可抗力之因素，其培養無法達到預期，無法成功建構廣效性生物感測器。因此，本執行單位已在下年度計劃中，提出從台灣現地採樣，自行篩選容易大量培養且能適應台灣環境之本土性之硫氧化菌用於

檢測環境污染物。

- (6) 本研究計畫在期中實驗成果不僅完成底泥與河川水之採樣與送測，並且完成專一性生物感測器之設計與建構，包含以 *gfp*、*lacZ*、*luxCDABE* 為顯示訊號之細菌生物感測器，並以砷、鎘、汞為專一性標的。在期末實驗成果則接續完成地下水之採樣與送測，並且進一步完成專一性生物感測器之劑量與反應關係、時間與反應關係，確立其基本培養條件與性質，並建立完整之檢測方法。再以環境樣品之檢測驗證與討論專一性生物感測器之效能。

2. 建議

未來建議應用方向為作為一初級篩選之工具，篩選出具有實際污染可能之場址，以輔助化學方法。如此不僅可縮短污染檢測所耗費之時間，亦可提升化學方法之使用效率，有利有關單位進行污染管制。另一方面，專一性生物感測器所提供之生物有效性資訊亦可供相關單位及研究團隊進行環境風險評估。研究結果顯示，不同報告基因之專一性生物感測器有不同的靈敏度及穩定度，因此應用於環境樣品檢測時，建議同時使用不同報告基因之專一性生物感測器，以增加檢測的準確度。本研究只建構砷、鎘、汞為專一性標的的生物感測器，然而環境中存在更多潛在的其他污染物，有待後續的研究。

六、參考文獻

- Bousse L. 1996. Whole cell biosensors. *Sensors and Actuators* 34: 270 – 275.
- D’Souza SF. 2001. Microbial biosensors. *Biosensors & Bioelectronics* 16: 337 – 353.
- Daunert S, Barrett G, Feliciano JS, Shetty RS, Shrestha S, Smith-Spencer W. 2000. Genetically engineered whole-cell sensing systems: coupling biological recognition with reporter genes. *Chemical Reviews* 100: 2705 – 2738.
- Dollard MA, Billard P. 2003. Whole-cell bacterial sensors for the monitoring of phosphate bioavailability. *Journal of Microbiological Methods* 55: 221 – 229.
- Gu MB, Choi SH, Kim SW. 2001. Some observations in freeze-drying of recombinant bioluminescent *Escherichia coli* for toxicity monitoring. *Journal of Biotechnology*: 88: 95 – 105.
- Hakkila K, Maksimow M, Karp M, Virta M. 2002. Reporter genes *lucFF*, *luxCDABE*, *gfp*, and *dsred* have different characteristics in whole-cell bacterial sensors. *Analytical Biochemistry* 30: 235–242.
- Hansen LH, Sørensen SJ. 2001. The use of whole-cell biosensors to detect and quantify compounds or conditions affecting biological systems. *Microbial Ecology* 42: 483 – 494.
- Hassan SH, Van Ginkel SW, Kim SM, Yoon SH, Joo JH, Shin BS, Jeon BH, Bae W, Oh SE. 2010. Isolation and characterization of *Acidithiobacillus caldus* from a sulfur-oxidizing bacterial biosensor and its role in detection of toxic chemicals. *Journal of Microbiological Methods* 82: 151 – 155.
- Hassan SH, Van Ginkel SW, Oh SE. 2012. Detection of Cr^{6+} by the sulfur oxidizing bacteria biosensor: effect of different physical factors. *Environmental Science & Technology* 46: 7844 – 7848.
- Hassan SH, Van Ginkel SW, Oh SE. 2013. Effect of organics and alkalinity on

- the sulfur oxidizing bacteria (SOB) biosensor. *Chemosphere* 90: 965 – 970.
- Jouanneau S, Durand MJ, Thouand G. 2012. Online detection of metals in environmental samples: comparing two concepts of bioluminescent bacterial biosensors. *Environmental Science & Technology* 46: 11979 – 11987.
- Li YF, Li FY, Ho CL, Liao VH. 2008. Construction and comparison of fluorescence and bioluminescence bacterial biosensors for the detection of bioavailable toluene and related compounds. *Environmental Pollution* 152 : 123 – 129.
- Liao VH, Chien, MT, Tseng YY, Ou KL. 2006. Assessment of heavy metal bioavailability in contaminated sediments and soils using green fluorescent protein-based bacterial biosensors. *Environmental Pollution* 142: 17 – 23.
- Liao VH, Ou KL. 2005. Development and testing of a green fluorescent protein-based bacterial biosensor for measuring bioavailable arsenic in contaminated groundwater samples. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24: 1624 – 1631.
- Miller WG, Leveau JH, Lindow SE. 2000. Improved gfp and inaZ broad-host-range promoter-probe vectors. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 1243 – 1250.
- Naylor LH. 1999. Reporter gene technology: the future looks bright. *Biochemical Pharmacology* 58: 749 – 757.
- Novick RP, Murphy E, Gryczan TJ, Raron E, Edelman I. 1979. Pencillinase plasmids in *Staphylococcus aureus*: restriction-deletion maps. *Plasmids* 2: 109 – 129.
- Rogowsky PM, Close TJ, Chimera JA, Shaw JJ, Kado CI. 1987. Regulation of the vir genes of *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiC58. *Journal of Bacteriology* 169: 5101 – 5112.
- Schweizer HP, Chuanchuen R. 2001. A small broad-host-range lacZ operon fusion vector with low background activity. *BioTechniques* 31: 1258 –

1262.

- Silver S. 1996. Bacterial resistance to toxic metal ions-a review. *Gene* 179: 9 – 19.
- Stocker J, Balluch D, Gsell M, Harms H, Feliciano J, Daunert S, Malik KA, van der Meer JR. 2003. Development of a set of simple bacterial biosensors for quantitative and rapid measurements of arsenite and arsenate in potable water. *Environmental Science & Technology*: 37: 4743 – 4750.
- Stocker J, Balluch D, Gsell M, Harms H, Feliciano J, Daunert S, Malik KA, van der Meer JR. 2003. Development of a set of simple bacterial biosensors for quantitative and rapid measurements of arsenite and arsenate in potable water. *Environmental Science & Technology* 37: 4743 – 4750.
- Tauriainen S, Karp M, Chang W, Virta M. 1998. Luminescent bacterial sensors for cadmium and lead. *Biosensors & Bioelectronics* 13: 931 – 938.
- Van Ginkel SW, Hassan SH, Oh SE. 2010. Detecting endocrine disrupting compounds in water using sulfur-oxidizing bacteria. *Chemosphere* 81: 294 – 297.
- Van Ginkel SW, Hassan SH, Ok YS, Yang JE, Kim YS, Oh SE. 2011. Detecting oxidized contaminants in water using sulfur-oxidizing bacteria. *Environmental Science & Technology* 45: 3739 – 3745.
- Wackwitz A, Harms H, Chatzinotas A, Breuer U, Vogne C, Van Der Meer JR. 2008. Internal arsenite bioassay calibration using multiple bioreporter cell lines. *Microbial Biotechnology* 1: 149 – 157.

土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案 計畫成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

☒ 達成目標

☐ 未達成目標（請說明，以 100 字為限）

☐ 實驗失敗

☐ 因故實驗中斷

☐ 其他原因

說明：整體而言，本研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標>95%；唯其中“建立以硫氧化菌為基礎之廣效性毒性生物感測器”部分，因向“食品工業發展研究所”所購買之硫氧化菌，無法有效活化培養，以供毒性生物感測器測試，因此該實驗無法完成。

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文：☐已發表____篇；☒未發表之文稿 1 篇；☐撰寫中____篇；☐無

專利：☐已獲得____件；☐申請中____件；☐無

技轉：☐已技轉；☐洽談中；☐無

其他：（100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、經濟效益、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，500 字為限）

說明：本計畫的補助經費，提供至少 1 篇 SCI papers. 目前已將部分研究成果投稿於 *Environmental Pollution* (SCI, 2013 IF=3.902, 2013 IF ranking 22/215=10.2% in ENVIRONMENTAL SCIENCES; 5-Year IF=4.306, 5-Year IF ranking 24/215=11.2% in ENVIRONMENTAL SCIENCES)，目前狀態是 under review。

本研究計畫成功建構專一性生物感測器套組，可以有效偵測重金屬，在放流水標準、地下水污染管制標準第二類之濃度下皆可有效作用，在多重金屬干擾下亦可有優良的辨識度。並且價錢便宜、培養方便，且偵測時間短(約 2 ~ 3 小時)，作為快速篩測環境重金屬之工具十分具有潛力。未來應用方向將可輔助化學方法，先篩選出具有潛在污染可能的樣點，如此可縮短污染檢測所耗費之時間與增加化學方法之效率，有利管理機關進行污染管制，亦可大幅降低成本。而其檢測結果亦具有生物有效性資訊，可供相關單位進行環境風險評估。在臺灣之環境污染檢測上，本研究計畫所成功研發之專一性生物感測器套組將可收事半功倍之效。