
利用飢餓壓力促進金黃色葡萄球菌 吸附鎳金屬的能力

陳昱豪 王依宸 蔡玉薰 陳逸萱 顏荻 房樹生*

國立臺南家齊女子高級中學

我們利用環境壓力來促使細菌產生壓力反應，並觀察其是否會影響細菌在重金屬溶液中的生長狀況、蛋白質濃度與重金屬吸附能力的影響。我們使用了熱休克、低濃度重金屬前處理、碳源飢餓前處理三種環境壓力，實驗結果顯示，熱休克對於金黃色葡萄球菌與大腸桿菌在硫酸鎳溶液中的生長狀況與蛋白質濃度並無顯著影響；而低濃度重金屬前處理與碳源飢餓前處理，則可顯著地回復硫酸鎳所造成的蛋白質濃度下降與生長抑制現象；由原子光譜吸收儀（AAs）的結果得知，經過低濃度重金屬與碳源飢餓前處理的細菌其重金屬吸附效果較為提升，其中又以碳源飢餓前處理的效果最為顯著，碳源飢餓在 $250 \mu\text{M}$ 的濃度下可提升重金屬吸附率 7%， $100 \mu\text{M}$ 的濃度下則可提升至 23%。除利用 AAs 來偵測液體重金屬濃度外，我們利用碳源飢餓前處理過與無前處理的金黃色葡萄球菌與較高濃度重金屬溶液先行共培養後，再取其上清液與正常金黃色葡萄球菌菌株共培養，從我們的結果可發現，經過細菌共培養後的液體，其重金屬濃度下降且較有利生物生長，且碳源飢餓共培養可促進此效果。

壹、研究動機

除了少數的致病細菌，多數的細菌對人類是無害甚至有益的。近年來有相當多的文獻指出某些細菌具有一定程度的吸附重金屬的能力，如光合細菌(*Rhodobacter capsulatus*)、球形芽孢桿菌(*Bacillus sphaericus*)、綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)等。

隨著工業革命的開始，雖然便利了人們的生活，但其引發的污染卻漸漸破壞地球的環境，尤其是重金屬的污染更是日益惡化。重金屬會透過飲食、呼吸或是直接接觸的路徑進入人體，但是重金屬不像其他的毒素可以在肝臟分解代謝，排出體外。相對的，它極易積存在大腦、腎臟等器官，漸進式的損壞身體正常功能。

重金屬進入人體後，由於電性的關係，大部分會與我們體內的蛋白質、核酸結合。蛋白質在生物體內的作用主要是進行酵素反應，當這些酵素和重金屬結合時，就會導致酵素的活性消失或減弱。另一方面，當重金屬和核酸結合，便會導致核酸的結構發生變化，使得基因突變，影響細胞遺傳，產生畸胎或癌症。如何減少環境中重金屬的污染是目前世界各國政府及環保團體努力的課題，而部分細菌的吸

* 為本文通訊作者

附重金屬能力更是漸漸被重視而加以研究。

微生物在壓力環境中會產生一些應對的反應，稱之壓力反應 (stress response)，目前已知大部分的壓力反應都是促進細胞存活 (pro-survival) 的反應，而亦有許多研究使用了各種不同的環境壓力來觀察壓力反應對細胞的影響；根據我們過去的研究指出，重金屬溶液對於細菌是一種環境壓力，而是否該壓力致使細菌產生壓力反應而促使其具有吸附重金屬的能力仍屬未知，亦或是先使其產生壓力反應，便能促進其吸附重金屬的能力亦尚待驗證。

我們過去的研究顯示，金黃色葡萄球菌與綠膿桿菌具有吸附鎳與錳重金屬的能力；而為了更進一步確認此現象，並設法促進其吸附重金屬的能力，我們以熱休克、低濃度重金屬與碳源飢餓等環境壓力作為前處理，使金黃色葡萄球菌與大腸桿菌產生壓力反應，以測試該壓力反應是否會影響細菌在重金屬溶液中的生長狀況、吸附重金屬的能力以及蛋白質濃度。

貳、文獻探討

近年來重金屬污染是最主要的環境污染之一，農業及工業的污染是其主要肇因，就像一場戰爭一樣，重金屬污染對環境、公共衛生以及經濟造成全面性的重大影響。重金屬污染中，常見的有錳、銅、鋅、鐵、鎘、鉛、鋁、鎳等，而這些重金屬污染又常是不可分解且永續存在的，目

前常用於分離液體中重金屬的方式有：化學沈澱法、化學氧化還原法、離子交換法、過濾法、電子化學處理、反轉滲透等方式，但多流於昂貴或不夠有效率，所以環境工程學家以及學者目前仍致力於低成本且有效移除重金屬的方式。

生物材料在重金屬吸附的應用在近幾年被大幅研究，生物材料具有速度快、吸附能力佳、低成本及材料易取得等優點，但仍具有易飽和等缺點。目前常用的生物材料包括藻類、植物及微生物，而其中又以細菌的效益最大，因為細菌體積小，總和面積大，相對的吸收能力也較其他生物材料來的高。已經陸續有文獻指出，螢光假單胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 對鈷，土壤微生物 *Streptomyces noursei* 對鉻、銅、鉛、鋅、鎘，以及芽孢桿菌屬中的 *Bacillus firmus* 對鉛、銅、鋅等重金屬具有吸收能力。

細菌能夠吸附重金屬取決於構造上的特性，細菌具有細胞壁，而細菌的細胞壁含有豐富的多醣類及醣蛋白，如葡聚糖 (glucans)、基丁質 (chitin)、甘露聚醣 (mannans) 以及磷酸甘露聚醣 (phosphomannans)，而這些帶正電聚合物扮演了吸附重金屬的重要角色，可以藉由靜電引力與許多金屬離子 (如： Cu^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Cd^{2+}) 相結合，進一步降低液體中重金屬的含量。

在 2004 年八月的報導中，有一則這麼提到：「大甲鎮永信段芋田受污染，台中縣環保局經從 55 丘段，取樣品化驗後，有

6 區確實受到鎳污染。」國際癌症研究中心(IARC)致癌性分類中：金屬鎳是屬於 2B，可能會致癌；而鎳化合物是屬於第一類，有致癌性。美國 EPA 也認定鎳的粉塵與 Ni_3S_2 具有致癌性。當不幸誤飲鎳污染的水，或透析用水被污染引起二價鎳中毒，其症狀為噁心、嘔吐、頭痛、心悸、虛弱、呼吸急促、咳嗽等會持續 1-2 天。慢性中毒則會呈現過敏性皮膚炎、慢性呼吸道疾病、免疫機能異常等症狀，甚至癌症都有可能發生。

為找出生活中，可能具有金屬吸附能力的細菌，我們過去的研究已經證實，金黃色葡萄球菌確實具有吸附鎳金屬與錳金屬的能力。而為了更進一步此現象，並設法促進其吸附金屬的能力，我們利用了細菌的壓力反應來進行實驗。

根據過去的文獻指出，細菌在面臨特定環境壓力情況下，會產生相對應的反應來增加存活率，這種反應稱為壓力反應(stress response)，而大部分的壓力反應都是引導細胞走促活路徑(pro-survival pathway)，使細胞內促活蛋白質濃度或活性增加，進而保護細胞免於死亡。根據我們可能執行的環境壓力，我們依照文獻選定了熱休克的條件為 42°C 處理三十分鐘，在此條件下我們就認定細菌達熱休克程度；過去也有許多文獻指出，重金屬對於細胞而言亦是一種環境壓力，若先處理非致死濃度的低濃度重金屬，勢必亦會引發壓力反應；飢餓一直是各種研究常用的壓力反應，飢餓會使細胞增加胞內的促活

因子，啟動促活路徑，而提高存活率，而在此我們選定較易完成的碳源飢餓來作為測試，過去的文獻亦已經指出，在化學成分限定培養液(chemical defined medium, CDM)中，葡萄糖濃度由 1%降至 0.1%，培養八小時便可達到飢餓的程度。我們希望能根據這些文獻，在我們的系統中，進一步測試這些壓力反應是否會對細菌在重金屬溶液中的生長狀況、蛋白質濃度以及重金屬吸附率造成影響，以找出最具增加重金屬吸附率的前處理方式。

參、研究目的

- 一、 42°C 高溫前處理對細菌吸附重金屬能力的影響
- 二、低濃度($50\ \mu\text{M}$)重金屬溶液前處理對細菌吸附重金屬能力的影響
- 三、碳源飢餓(Starvation)對細菌吸附重金屬能力的影響
- 四、重金屬吸附能力促進之測試驗證

肆、研究設備與材料

- 一、生物材料：
大腸桿菌(*Escherichia coli*)、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)。
- 二、化學藥品：
硫酸鎳、硫酸鈉(NiSO_4 、 Na_2SO_4)、酒精。
- 三、恆溫器材：
恆溫培養箱
- 四、儀器設備：
電子天秤、加熱攪拌器、滅菌鍋、無

菌操作台、筆記型電腦、恆溫震盪培養箱、離心機(Sigma 6K15 成大生理所蔡少正老師實驗室提供)、火焰式原子吸收光譜儀(Atomic Absorption Spectrophotometer, AAs)(成功大學化工所黃耀輝教授實驗室提供並協助操作測量)。

五、其他器材：

光學目鏡、微量吸取器 (Pipettes, p20、p200、p1000)、微量吸取尖(Tips)、試管、有蓋試管、三角錐瓶、量筒、燒杯、種菌環、刮勺、玻璃漏斗、離心試管、玻棒、懸滴玻片、紙巾、拭鏡紙、石蠟膜 (Parafilm)、濾紙、鋁箔紙、蒸餾水、微離心管(Eppendorf)。

六、各種溶液：

1. 細菌培養液 [LB (Luria-Bertani) medium, NB (nutrient broth) medium]
2. Luria-Bertani agar plate (LB agar plate): 2.5%(w/v)LB powder、2%(w/v) agar、pH 7.0。
3. Nutrient broth (NB agar plate): 0.8% (w/v)、1.5%(w/v)agar、pH 7.0。
4. 碳源飢餓培養液 (chemical defined medium, CDM) : Peptone 1g/L, carboxymethyl cellulose(CMC) 10.0 g/L, (NH₄)₃SO₄ 1.4 g/L, Urea 0.3 g/L, K₂HPO₄ 2.0 g/L, CaCl₂ 0.34 g/L, MgSO₄ • 7 H₂O 0.3 g/L, FeSO₄ • 7 H₂O 5.0 mg/L, MnSO₄ • H₂O 1.6 mg/L, ZnSO₄ • 7 H₂O 1.4 mg/L,

CaCl₂ • 6 H₂O 2.0 mg/L。

5. 30%甘油。
6. 1M 金屬溶液(硫酸鎳、硫酸鈉)

伍、研究過程與方法

一、前處理

1. 熱休克(heat shock)前處理。
 - (1) 取出培養後的菌液，將吸光值稀釋至 0.1，並分裝 10 罐，每罐 50 ml。
 - (2) 取其中 5 罐菌液(實驗組)置入 42 °C 水浴槽 30 分鐘。
 - (3) 30 分鐘後取出實驗組，依序(0 μM, 100 μM, 150 μM, 200 μM, 250 μM)加入重金屬或硫酸鈉溶液。
2. 低濃度硫酸鎳前處理。
 - (1) 取 1 ml 菌液加入含 0 μM(對照組)、50 μM(實驗組)鎳金屬的培養液中，共培養 13 小時。
 - (2) 取出培養後的菌液，將吸光值稀釋至 0.1。
 - (3) 將吸光值 0.1 之菌液分別取 50ml 分裝至五瓶錐形瓶中，並分別加入 0 μM, 100 μM, 150 μM, 200 μM, 250 μM 的重金屬溶液或硫酸鈉溶液。
3. 碳源飢餓前處理。
 - (1) 取 O.D =0.5 之菌液 20 ml，以 3000rpm 離心 10min。
 - (2) 去上清液，加入無菌水清洗三次。
 - (3) 取沈澱加入 50 ml 的化學成分限

定培養液(CDM)之中，對金黃色葡萄球菌進行十三小時的飢餓前處理(實驗組葡萄糖濃度：0.1%；對照組葡萄糖濃度：1%)。

- (4) 取出培養後的菌液，將吸光值稀釋至 0.1。
- (5) 將吸光值 0.1 之菌液分別取 50ml 分裝至五瓶錐形瓶中，並分別加入 $0 \mu\text{M}$ ， $100 \mu\text{M}$ ， $150 \mu\text{M}$ ， $200 \mu\text{M}$ ， $250 \mu\text{M}$ 的重金屬溶液或硫酸鈉溶液。

二、各菌種與各金屬溶液共培養

1. 加入重金屬吸附液或硫酸鈉溶液後，置入 37°C 恆溫培養箱中培養，並分別於 0、5、8 小時後測量其吸光值，並取出 5 ml 菌液加入 5 ml 甘油保存於 4°C 。
2. 將各時間點所測得之吸光值及其相對之重金屬吸附液濃度繪圖。

三、蛋白質濃度測定

1. 將保存於 4°C 之菌液取出，以 3000rpm 進行離心 5 分鐘，取出上清液另行保存，將沈澱留置離心管中。
2. 加入低張細胞分解緩衝液(Tris-HCl $50 \mu\text{M}$ ，NaCl $150 \mu\text{M}$ ，SDS 0.1%，NP-40 1%)至離心管，重複抽吸，將液體取至 1 ml 離心管中，靜置於冰上 10 分鐘。
3. 5000g 離心 5 分鐘。
4. 取上清液，以無菌水稀釋 10 倍。

5. 使用 SBC 蛋白質分析套組(Protein Assay Kit, Strong Biotech Corporation) 進行蛋白質濃度分析。

四、重金屬吸附能力促進之測試

1. 並取出 5 ml 菌液加入 5 ml 甘油保存於 4°C 。
2. 將方法三中取出之上清液，AAs 測定所含之重金屬濃度。

五、重金屬吸附能力促進之測試驗證

1. 調整菌液濃度至 O.D=0.5，取 10ml 離心，並以無菌水清洗 3 回。
2. 離心後取沈澱加入 200ml 碳源飢餓培養液，共培養 13hr。
3. 將碳源飢餓菌液調至 O.D=0.5，取 10ml 離心，加入 $250 \mu\text{M}$ 的 NiSO_4 溶液，共培養 8hr。
4. 取未前處理之菌液調至 O.D=0.5，取 10ml 離心，加入 $250 \mu\text{M}$ 的 NiSO_4 溶液，共培養 8hr。
5. 8hr 後，將上述之菌液(步驟 3、4) 離心，各取 90ml 冰存於錐形瓶中。
6. 取正常菌株各 10ml 離心，將菌加至步驟 5 上清液(共兩瓶)，另加入 $250 \mu\text{M}$ 的 NiSO_4 溶液共培養。
7. 於 0、2、5、6、8hr 測 O.D 並紀錄。

陸、實驗結果

- 一、高溫前處理對細菌吸附重金屬能力的影響：

(一) 高溫前處理對細菌與硫酸鎳共培養生長的影響

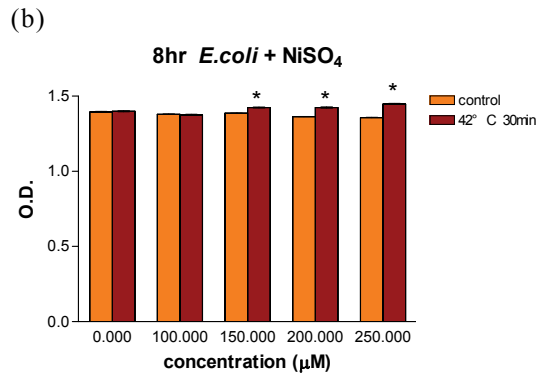
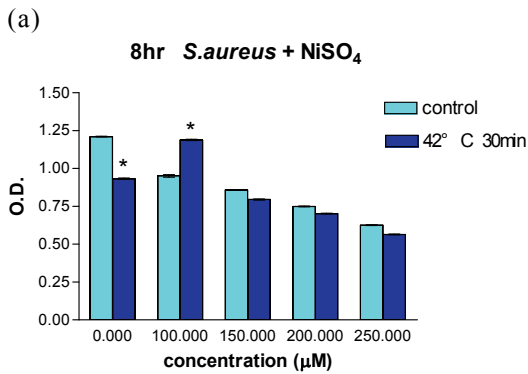
由圖一(a)可發現，未經高溫前處理的金黃色葡萄球菌其生長隨金屬濃度下降；而高溫前處理的金黃色葡萄球菌除在 100 μ M 的濃度外，整體生長也隨金屬濃度上升而下降，與未經高溫處理組並無明顯差異。

圖一(b)中可發現，硫酸鎳對大腸桿菌的生長並無顯著影響，而無論是否經

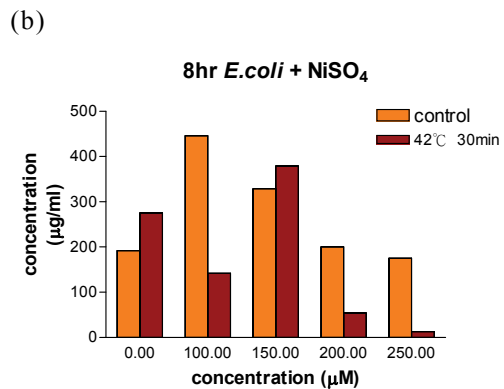
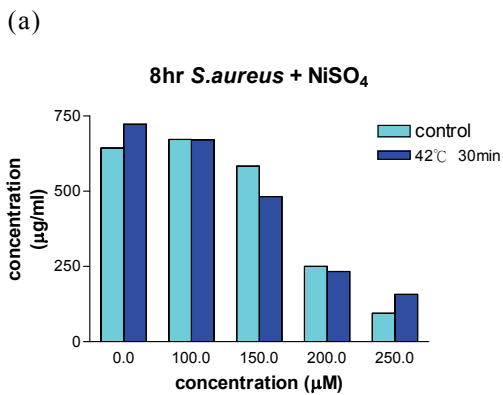
過高溫處理，其生長趨勢並無明顯差異。

(二) 高溫前處理對細菌與硫酸鎳共培養後蛋白質濃度的影響

圖二(a)可發現，高溫前處理組與對照組金黃色葡萄球菌的蛋白質濃度皆隨鎳金屬濃度的上升而下降，與圖一中的生長狀況趨勢一致。圖二(b)中，因取樣量太少，致使兩組皆無濃度相依的明顯趨勢。



圖一、熱休克前處理對金黃色葡萄球菌(a)及大腸桿菌(b)與重金屬共培養生長之影響。* $p < 0.05$ ，與對照組相比，以 t -test 進行統計。



圖二、熱休克前處理對金黃色葡萄球菌(a)及大腸桿菌(b)與硫酸鎳共培養後蛋白質濃度之影響。

(三) 高溫前處理對細菌吸附率的影響

由表一發現，金黃色葡萄球菌與鎳金屬共培養下後，培養液的上清液中，鎳離子確實減少；在 200 μ M 中，對照組的吸附率約達 25.6%，高於前處理組(21.6%)；250 μ M 則是經前處理組吸收率較高(19.2%)，高溫前處理對於金黃葡萄球菌對於鎳金屬的吸附力並無一致趨勢。

(四) 對照組實驗：與硫酸鈉共培養

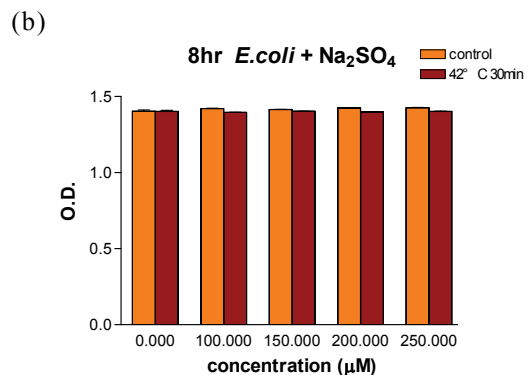
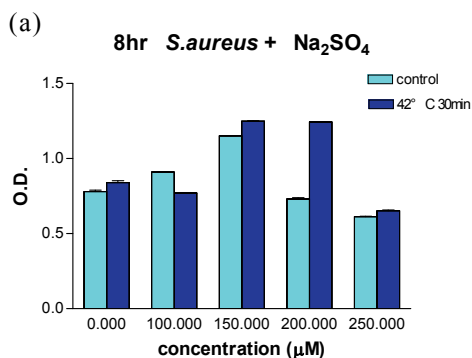
我們另外使用了硫酸鈉來作為硫酸

鎳的對照組。由圖三可知，硫酸鈉濃度對於細菌的生長而言並無趨勢上的差異，而熱休克處理亦不影響細菌的生長狀況；由此可知，硫酸鎳對細菌生長所造成的影響確實是來自於金屬濃度的改變，而非操作誤差及人為因素。由於熱休克前處理對金黃色葡萄球菌及大腸桿菌於硫酸鈉共培養之蛋白質取樣量的較少，致使蛋白質濃度無法偵測，於後續實驗已改善。

表一、高溫前處理對金黃色葡萄球菌吸附鎳重金屬的影響。

吸收率：(理論金屬濃度－測得濃度)／理論金屬濃度×100%

| time | treatment | standard Ni ²⁺ conc. (ppm) | Ni ²⁺ conc. (ppm) | 吸收率(%) |
|------|---|---------------------------------------|------------------------------|-------------|
| 8hr | 200 μ M Ni ²⁺ control | 11.83 | 8.796 | 25.64666103 |
| | 200 μ M Ni ²⁺ Heat-shocked | 11.83 | 9.274 | 21.60608622 |
| | 250 μ M Ni ²⁺ control | 14.78 | 12.82 | 13.26116373 |
| | 250 μ M Ni ²⁺ Heat-shocked | 14.78 | 11.94 | 19.21515562 |



圖三、熱休克前處理對金黃色葡萄球菌(a)及大腸桿菌(b)與硫酸鈉共培養生長之影響。

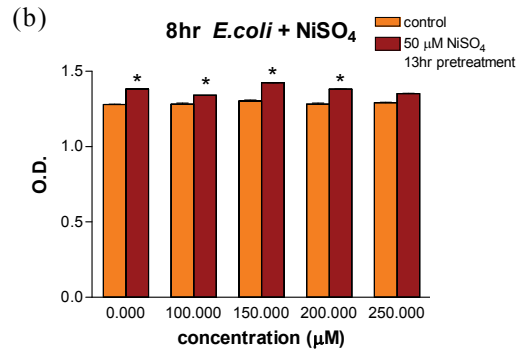
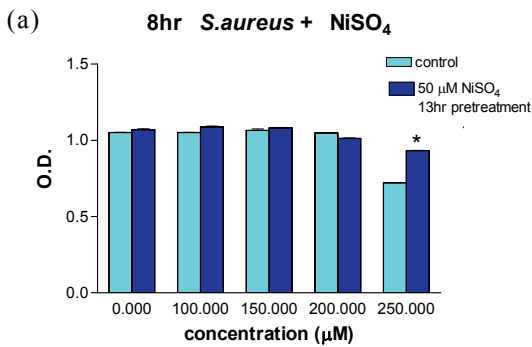
二、低濃度重金屬溶液前處理對細菌吸附重金屬能力的影響：

(一) 低濃度重金屬溶液前處理對細菌與硫酸鎳共培養生長的影響

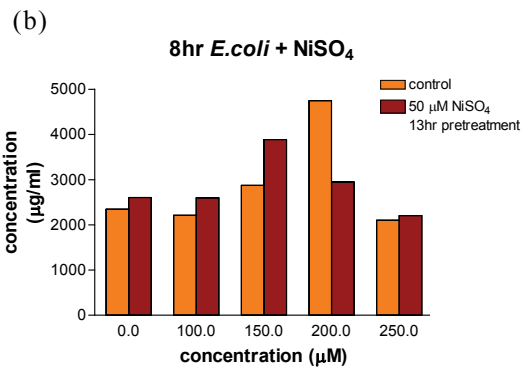
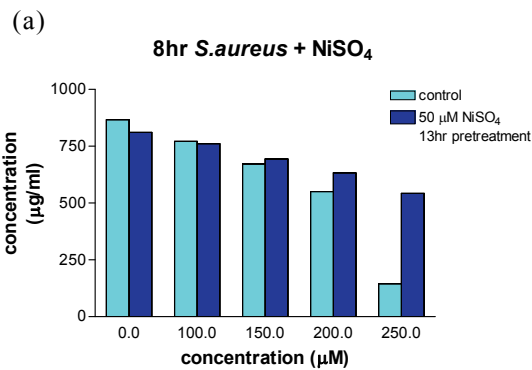
對金黃葡萄球菌而言，在低濃度重金屬處理下比未前處理生長的好，且在 250 μM 下可看出差異。而大腸桿菌亦是如此，低濃度重金屬前處理過的組別明顯生長得較好，但鎳金屬濃度的提高並未對大腸桿菌造成生長上的影響。

(二) 低濃度重金屬溶液前處理對細菌與硫酸鎳共培養後蛋白質濃度的影響

圖五(a)中，金黃色葡萄球菌的蛋白質濃度隨金屬濃度升高而降低，與生長趨勢一致，但低濃度前處理可回復此狀況，在 250 μM 的濃度最為明顯。而由(b)圖可知，大腸桿菌除在 200 μM 的濃度下，低濃度前處理蛋白質濃度皆比未前處理高，但金屬濃度亦並未影響大腸桿菌的蛋白質濃度。



圖四、低濃度硫酸鎳前處理對金黃色葡萄球菌(a)及大腸桿菌(b)與硫酸鎳共培養生長之影響。* $p < 0.05$ ，與對照組相比，以 t -test 進行統計。



圖五、低濃度硫酸鎳前處理對金黃色葡萄球菌(a)及大腸桿菌(b)與硫酸鎳共培養後蛋白質濃度之影響。

(三) 低濃度重金屬溶液前處理對細菌吸附率的影響

從表二中可知，經過低濃度前處理金黃色葡萄球菌的共培養上清液，其金屬濃度顯著較未經處理的對照組低，表示低濃度重金屬前處理確實能增加細菌對鎳金屬的吸附力，在 250 μM 濃度鎳金屬下吸附率可增加 4%，而在 100 μM 濃度下甚至可達 23%。可與圖四與圖五的趨勢相呼應，低濃度前處理可回復鎳金屬所抑制的生長狀況與蛋白質濃度。

(四) 對照組實驗：與硫酸鈉共培養

我們同樣使用了硫酸鈉來作為硫酸鎳的對照組。由圖六與圖七可知，硫酸鈉濃度對於細菌的生長及蛋白質濃度而言並無趨勢上的差異，而低濃度硫酸鎳

的前處理亦不影響細菌的生長狀況；由此可知，硫酸鎳對細菌生長所造成的影響確實是來自於金屬濃度的改變，而非操作誤差及人為因素。

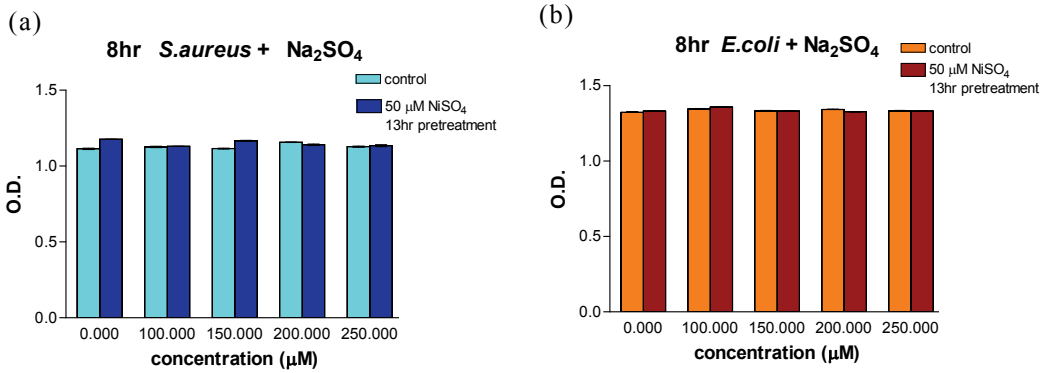
三、碳源飢餓(Starvation)對細菌吸附重金屬能力的影響：

(一) 碳源飢餓前處理對細菌與硫酸鎳共培養生長的影響

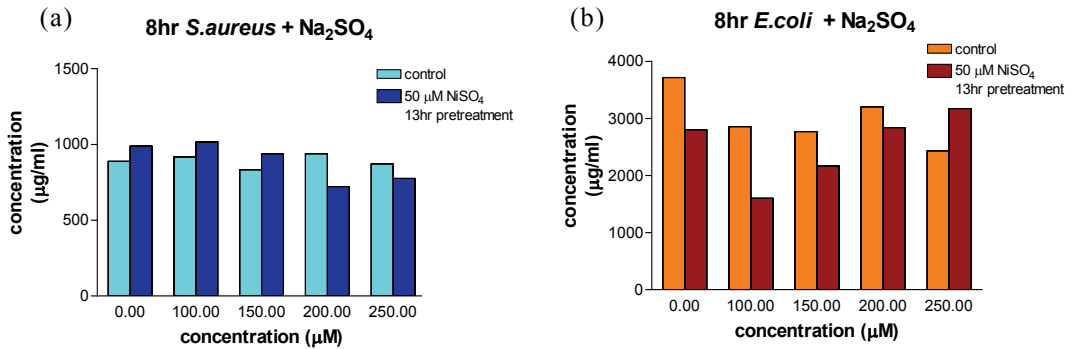
圖八(a)中可發現，未前處理組受到重金屬的影響，其生長趨勢隨著重金屬的濃度呈現梯度下降；而飢餓壓力可顯著地回復重金屬所造成的生長抑制現象，且效果較低濃度重金屬前處理明顯。而圖八(b)中，有無飢餓壓力前處理對於大腸桿菌的生長趨勢而言，並沒有明顯差異。

表二、低濃度重金屬 (50 μM NiSO_4) 前處理對金黃色葡萄球菌吸附鎳重金屬的影響。
吸收率：(理論金屬濃度 - 測得濃度) / 理論金屬濃度 $\times 100\%$

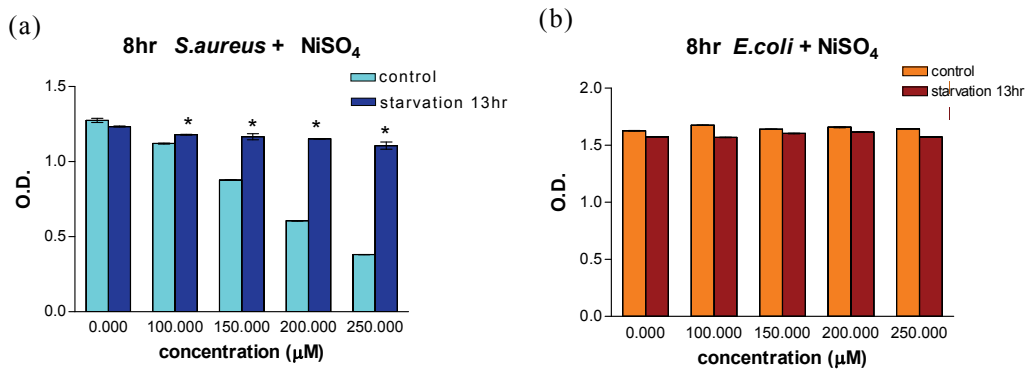
| time | treatment | standard Ni^{2+} conc. (ppm) | Ni^{2+} conc. (ppm) | 吸收率(%) |
|------|--|--|---------------------------------|-------------|
| 8hr | 0 μM Ni^{2+} | 0 | 0 | ----- |
| | 100 μM Ni^{2+} control | 5.915 | 4.945 | 16.39898563 |
| | 100 μM Ni^{2+} pre-treatment | 5.915 | 3.556 | 39.8816568 |
| | 150 μM Ni^{2+} control | 8.873 | 6.52 | 26.51865209 |
| | 150 μM Ni^{2+} pre-treatment | 8.873 | 5.528 | 37.69863631 |
| | 200 μM Ni^{2+} control | 11.83 | 7.768 | 34.3364328 |
| | 200 μM Ni^{2+} pre-treatment | 11.83 | 7.062 | 40.30431107 |
| | 250 μM Ni^{2+} control | 14.78 | 8.768 | 40.67658999 |
| | 250 μM Ni^{2+} pre-treatment | 14.78 | 8.139 | 44.932341 |



圖六、低濃度硫酸鎳前處理對金黃色葡萄球菌(a)及大腸桿菌(b)與硫酸鈉共培養生長之影響。



圖七、低濃度硫酸鎳前處理對金黃色葡萄球菌(a)及大腸桿菌(b)與硫酸鈉共培養後蛋白質濃度之影響。



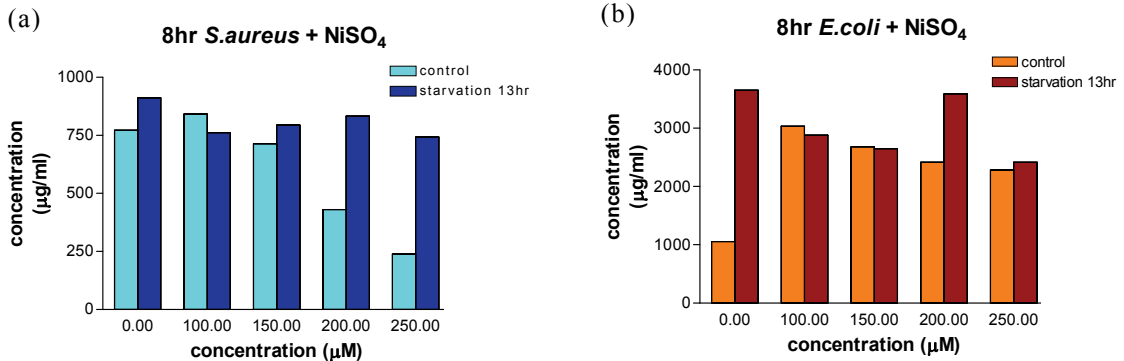
圖八、碳源飢餓壓力前處理對金黃色葡萄球菌(a)及大腸桿菌(b)與硫酸鎳共培養生長之影響。* $p < 0.05$ ，與對照組相比，以 *t*-test 進行統計。

(二) 碳源飢餓前處理對細菌與硫酸鎳共培養後蛋白質濃度的影響

圖九(a)可知，與生長曲線相同，對照組蛋白質濃度隨重金屬濃度升高而下降，而碳源飢餓壓力前處理具有明顯回復的效果。從圖九(b)中可看出，大腸桿菌的蛋白質濃度較無顯著趨勢，亦無法與生長狀況呼應，顯示大腸桿菌對於鎳金屬的反應較無一致性。

(三) 碳源飢餓前處理對細菌吸附率的影響

表三顯示，經過碳源飢餓前處理金黃色葡萄球菌的共培養上清液，其金屬濃度顯著較未經處理的對照組低，表示低濃度重金屬前處理確實能增加細菌對鎳金屬的吸附力，在 250 μM 濃度鎳金屬下吸附率可增加 7%。此現象同樣可與圖八與圖九的趨勢相呼應，低濃度前處理可回復鎳金屬所抑制的生長狀況與蛋白質濃度。



圖九、碳源飢餓壓力前處理對金黃色葡萄球菌(a)及大腸桿菌(b)與硫酸鎳共培養後蛋白質濃度之影響。

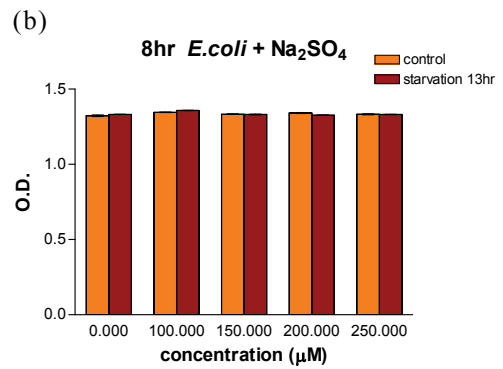
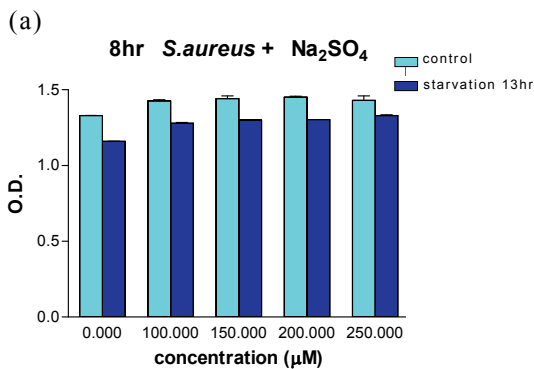
表三、碳源飢餓前處理對金黃色葡萄球菌吸附鎳重金屬的影響。
吸收率：(理論金屬濃度-測得濃度)/理論金屬濃度 × 100%

| time | treatment | standard Ni ²⁺ conc. (ppm) | Ni ²⁺ conc. (ppm) | 吸收率(%) |
|------|-----------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|-------------|
| 8hr | 0 μM Ni ²⁺ | 0 | 0 | ----- |
| | 10 μM Ni ²⁺ control | 5.915 | | ----- |
| | 10 μM Ni ²⁺ starvation | 5.915 | 4.118 | 30.38038884 |
| | 15 μM Ni ²⁺ control | 8.873 | 5.401 | 39.12994478 |
| | 15 μM Ni ²⁺ starvation | 8.873 | 4.818 | 45.70043954 |
| | 20 μM Ni ²⁺ control | 11.83 | 6.765 | 42.81487743 |
| | 20 μM Ni ²⁺ starvation | 11.83 | 5.581 | 52.82333052 |
| | 25 μM Ni ²⁺ control | 14.78 | 7.593 | 48.62652233 |
| | 25 μM Ni ²⁺ starvation | 14.78 | 6.561 | 55.60893099 |

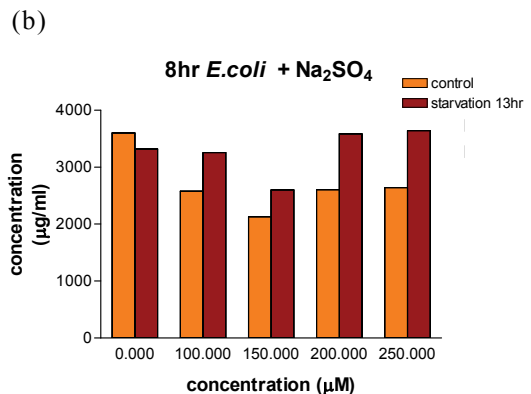
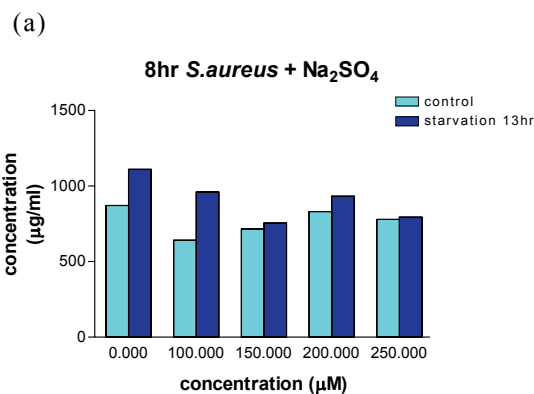
(四) 對照組實驗：與硫酸鈉共培養

我們仍然使用硫酸鈉來作為硫酸鎳的對照組。圖十顯示，硫酸鈉濃度對於細菌的生長而言並無趨勢上的差異，除圖十(a)中，碳源飢餓前處理有部分抑制生長的作用外，趨勢上碳源飢餓前處理並不影響細菌的生長狀況。

同樣的現象亦在共培養後的蛋白質濃度可見，硫酸鈉濃度對於細菌的蛋白質濃度並無趨勢上的影響。但由圖十一可見，在沒有重金屬壓力的環境下，碳源飢餓後的細菌，其蛋白質濃度普遍都較對照組高，顯示碳源飢餓可能會誘發部分蛋白質的產生。



圖十、碳源飢餓壓力前處理對金黃色葡萄球菌(a)及大腸桿菌(b)與硫酸鈉共培養生長之影響。



圖十一、碳源飢餓壓力前處理對金黃色葡萄球菌(a)及大腸桿菌(b)與硫酸鈉共培養後蛋白質濃度之影響。

四、重金屬吸附能力促進之測試驗證：

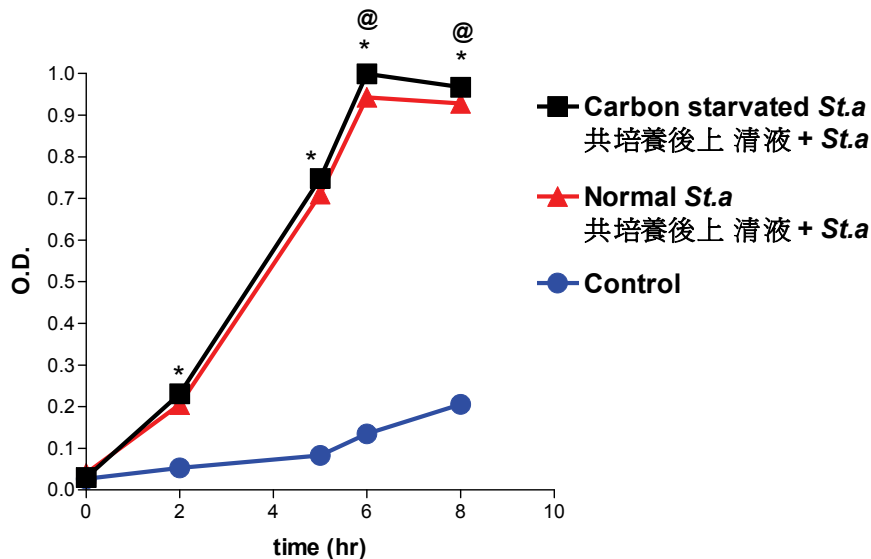
我們過去的實驗已證實金黃色葡萄球菌可吸附鎳金屬，且根據上述實驗已知碳源飢餓較能促進金黃色葡萄球菌在高濃度（ $250 \mu\text{M}$ ）鎳金屬的吸附能力；故經過碳源飢餓前處理後的細菌其吸附能力應會較為提升，若與之共培養，重金屬液體的重金屬濃度應較與未前處理細菌共培養的組別低；且依此方式可驗證 AAs 所顯示的數據，並以較為簡便的方式證明細菌吸附重金屬能力與前處理的影響。

圖十二顯示，金黃色葡萄球菌在經過飢餓前處理金黃色葡萄球菌共培養一天後的重金屬溶液，其生長狀況(圖十二，方形

線段)較與在正常菌株共培養一天後的重金屬溶液(圖十二，三角形線段)中稍佳；且兩者皆比在完全未經過細菌共培養金屬溶液(圖十二，圓形線段)中的金黃色葡萄球菌，其生長狀況顯著改善。

柒、討論

一、從圖一與圖二可發現，我們根據文獻所使用的高溫前處理條件（ 42°C 30min），在我們的系統之下無法有效回復硫酸鎳所造成的生長抑制現象。從表一亦可知，熱休克反應的促活機制無法有效促進金黃色葡萄球菌吸附重金屬的能力，可能因而無法回復細菌的生長。



圖十二、以金黃色葡萄球菌生長狀況驗證吸附能力的增加。* $p < 0.05$ ，與對照組相比，以 t-test 進行統計；@ $p < 0.05$ ，與對照組相比，以 t-test 進行統計。

二、從圖一、圖四以及圖八皆可發現，此一濃度範圍之硫酸鎳並不能對大腸桿菌造成影響，根據我們過去的研究，大腸桿菌對硫酸鎳的耐受度可達 $1000 \mu\text{M}$ ，且無重金屬吸附能力。故在我們所設計的實驗中，硫酸鈉是重金屬溶液硫酸鎳的對照溶液，而大腸桿菌是一無重金屬吸附能力的對照細菌。

三、由表三可知，金黃色葡萄球菌經熱休克處理後，其吸附鎳金屬的百分比在 $200 \mu\text{M}$ 的濃度之下下降了 4%，而於 $250 \mu\text{M}$ 的濃度下卻上升 6%，無一致趨勢，且從生長趨勢與蛋白質濃度來看，亦無明顯助益，故我們推測，此一條件的熱休克反應無法促進金黃色葡萄球菌的生長狀況與吸附重金屬能力。

四、低濃度重金屬前處理與碳源飢餓前處理(圖四、圖五、圖八、圖九)，可顯著回復硫酸鎳造成的金黃色葡萄球菌生長抑制與蛋白質濃度下降，相較於熱休克而言，效果更為顯著並具一致性；尤其是碳源飢餓前處理對於金黃葡萄球菌生長狀況與蛋白質濃度的回復，效果相當明顯。且從表二與表三可知，與低濃度重金屬前處理與碳源飢餓前處理金黃葡萄球菌共培養後的重金屬溶液其重金屬濃度顯著較低，表示前處理可促進金黃色葡萄球菌吸附重金屬的能力，繼而降降低培養液中的重金屬濃度，回復細菌

的生長能力。

五、從過去的文獻可知，壓力反應會增加細胞促活保護性蛋白的濃度，或是提高其活性，進而提升細胞的存活率；故在我們的實驗設計中，我們欲觀察壓力反應後，細菌的蛋白質濃度是否會有變化。從蛋白質濃度的數據來看，低濃度重金屬前處理與飢餓壓力前處理都能回復重金屬造成的蛋白質濃度下降；而從沒有加入重金屬的組別與加入硫酸鈉的組別來看(圖五、七、九、十一)，低濃度重金屬前處理與飢餓壓力前處理普遍能有效提高其蛋白質的濃度，表示我們的前處理確實能提升細菌內的蛋白質濃度。若進一步進行二維電泳(2-D electrophoresis)，應可針對濃度改變的蛋白質進行分析。

六、碳源飢餓是以調整葡萄糖濃度作為飢餓條件，造成能量缺失而產生壓力反應。除碳源飢餓外，還有其他元素的飢餓條件，包括組成核酸的磷、組成蛋白質的硫等，都可測試其飢餓是否會與碳源飢餓相同，造成細菌重金屬吸附力的提升。

七、碳源飢餓在 $250 \mu\text{M}$ 的濃度下所提升的重金屬吸附能力是 7%，而此一促進程度與圖十二相互呼應(圖十二，方形線段與三角形線段)。此增加程度不如低濃度重金屬($100 \mu\text{M}$)共培養時高(23%)，可能是吸附率已接近飽和，其增加幅度有限。

八、除利用 AAs 來偵測液體重金屬濃度外，我們利用碳源飢餓前處理過與無前處理的金黃色葡萄球菌與較高濃度重金屬溶液(250 μ M)先行共培養後，再取其上清液與正常金黃色葡萄球菌菌株共培養。結果發現(圖十二)，金黃色葡萄球菌在經細菌共培養過的重金屬溶液，其生長狀況顯著較在無細菌共培養過的重金屬溶液佳，且又以與碳源飢餓前處理過的組別最好。從我們的結果可直接證實，經過細菌共培養後的液體，其重金屬濃度下降且較有利生物生長，且碳源飢餓共培養可促進此效果。

九、從我們的結果可知，金黃色葡萄球菌具有吸附鎳重金屬的能力，且經過飢餓壓力前處理，能有效增加其吸附率；若能進一步研究出更多具有重金屬吸附能力的菌種，並以前處理使之提升吸附能力，將之塗佈於液珠(Coating Beads)上，應用於工業廢水處理的過程，將重金屬溶液中的金屬離子固體化，勢必能降低重金屬污水對環境造成的污染。

捌、結論

- 一、熱休克前處理無法促進金黃色葡萄球菌對鎳的重金屬吸附能力。
- 二、低濃度重金屬與碳源飢餓前處理可促進金黃色葡萄球菌對鎳的重金屬吸附能力。低濃度重金屬前處理，於 100 μ M 硫酸鎳濃度下可促進金黃色

葡萄球菌 23% 的鎳金屬吸附能力；而碳源飢餓前處理於 250 μ M 的硫酸鎳濃度下可促進金黃色葡萄球菌 7% 的鎳金屬吸附能力。

- 三、經金黃色葡萄球菌共培養過的高濃度硫酸鎳(250 μ M)溶液，相較無共培養之硫酸鎳溶液更適於生物生存，且經碳源飢餓前處理後效果更佳。

參考文獻

- Ahluwalia S.S. and Goyal D., Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresour Technol*, 98, 2243-2257 (2007).
- Feng Y., Yu Y., Wang Y. and Lin X., Biosorption and bioreduction of trivalent aurum by photosynthetic bacteria *Rhodobacter capsulatus*. *Curr Microbiol*, 55, 402-408 (2007).
- Tuzen M., Uluozlu O.D., Usta C. and Soylak M., Biosorption of copper(II), lead(II), iron(III) and cobalt(II) on *Bacillus sphaericus*-loaded Diaion SP-850 resin. *Anal Chim Acta*, 581, 241-246 (2007).
- Ansari M.I. and Malik A., Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. *Bioresour Technol*, 98, 3149-3153 (2007).
- Arthur C. Guyton M.D., John E. Hall P. and 林佑穗、袁宗凡編譯, *新編蓋統醫用生理學*. (2002).
- Clements M.O., Watson S.P. and Foster S.J., Characterization of the major superoxide dismutase of *Staphylococcus aureus* and its role in starvation survival, stress resistance, and pathogenicity. *Journal of bacteriology*, 181, 3898-3903 (1999).
- Watson S.P., Clements M.O. and Foster S.J., Characterization of the starvation-

- survival response of *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 180, 1750-1758 (1998).
- McMahon M.A., Xu J., Moore J.E., Blair I.S. and McDowell D.A., Environmental stress and antibiotic resistance in food-related pathogens. *Applied and environmental microbiology*, 73, 211-217 (2007).
- Anderson K.L., Roberts C., Disz T., Vonstein V., Hwang K., Overbeek R., Olson P.D., Projan S.J. and Dunman P.M., Characterization of the *Staphylococcus aureus* heat shock, cold shock, stringent, and SOS responses and their effects on log-phase mRNA turnover. *Journal of bacteriology*, 188, 6739-6756 (2006).
- 陳昱豪、鄭儀、林榆婕、李竹昀、洪巧芸、王依宸、蔡玉薰、房樹生，綠膿桿菌與金黃葡萄球菌吸附重金屬能力的探討。 *科學教育月刊*, 315, 40-50 (2008).
- Andres Y., Thouand G., Boualam M. and Mergeay M., Factors influencing the biosorption of gadolinium by micro-organisms and its mobilisation from sand. *Appl Microbiol Biotechnol*, 54, 262-267 (2000).
- 陳明，中縣／大甲芋田土質化驗出爐 6 區確實受到鎳污染 東森新聞網，中縣／大甲 (2004/08/09 23:08)。