

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

間甲酚降解菌的共代謝作用與生物降解促進劑之尋求

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：CNEV92-23

執行期間：92年1月1日至92年12月31日

計畫主持人：劉瑞美

共同主持人：陳世雄

計畫參與人員：洪睦雅、許菁珊

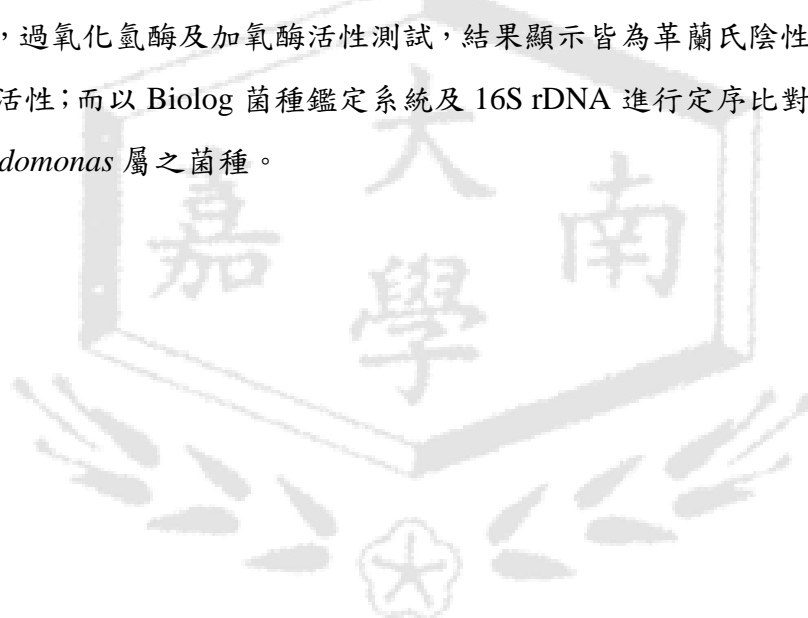
參與學生：王俊淇(碩士生)

執行單位：嘉南藥理科技大學環境資源管理系

中華民國九十二年十二月三十一日

摘要

甲酚為工業上常見的污染物質之一，對水域生態與環境平衡衝擊甚大，以生物降解方式因具較高之經濟效益，故可做為土壤甲酚污染整治的最佳選擇之一。本研究以批次培養的方式自加油站排水溝與欣岱公司的反應釜及廢水儲槽週遭收集的污泥或土壤篩選出耐高濃度之甲酚降解菌株，並以外加碳源、共代謝及抑制劑的添加之方式進行降解能力之探討，結果顯示對不同的菌株會產生促進效果的外加碳源不盡相同；而共代謝基質濃度過高時則對降解產生抑制作用。經萵苣種子生長測試及 Microtox 生物毒性測試降解完畢之代謝物，結果發現不但其毒性明顯降低，甚至對種子生長具有正向助益。另外對篩選出之純菌菌株進行革蘭氏染色，過氧化氫酶及加氧酶活性測試，結果顯示皆為革蘭氏陰性且皆具有此兩種酵素活性；而以 Biolog 菌種鑑定系統及 16S rDNA 進行定序比對的結果顯示皆為 *Pseudomonas* 屬之菌種。



一、研究源由及目標

甲酚 (cresol) 為工業上常見的污染物質之一，常應用於製作甲酚樹脂、消毒劑、殺草劑、界面活性劑、有機中間體等等，而工業上所指的甲酚，為鄰 (*o*-)、間 (*m*-)、對 (*p*-) 位三種甲酚異構體的混合物，其中又以間-甲酚所佔的比例為最高，表一為典型的工業用甲酚之成分，其可藉由吸入、食入、皮膚接觸等途徑造成急性的刺激與疼痛或慢性的不適，目前為行政院環保署所列管的毒性化學物質，甚至可能不慎而流入土壤或地下水中將造成間-甲酚污染，進而影響環境。

近年來，利用場址之微生物對污染物進行自然處理漸受重視，美國環保署及許多州均以自然生物處理法做為整治方法之選擇之一，與目前所使用之物理化學處理方法相較，自然生物處理法可省下大筆的整治費用，自然生物降解 (biodegradation) 法隨降解生物特性，可區分為好氧 (aerobic) 與厭氧 (anaerobic) 程序，在有氧降解過程中，微生物將氧氣當作最終電子接受者以進行生物降解之氧化還原反應，而厭氧過程中，微生物利用硝酸鹽、 Fe^{+3} 、硫酸鹽及二氧化碳當做最終電子接受者以進行生物降解之氧化還原反應，然場址條件與微生物間之競爭可決定污染物以何種方式進行降解作用。

環境中之異營性微生物 (heterotrophs) 在生長環境中，須提供有機碳以製造微生物生長之基質與能量來源，本研究以批次培養的方式自加油站排水溝與欣岱公司的反應釜及廢水儲槽週遭收集的污泥或土壤做為分離間-甲酚降解菌之來源，並提供除間甲酚外的其他有機物做為主要基質 (primary substances) 或電子接受者 (electron donors)，以加速污染物降解，提供之碳基質因考慮未來實際應用上對環境之衝擊，選以葡萄糖 (glucose)、胰化肌朮 (tryptone)、酵母萃取物 (yeast extract) 等常用於培養異營性微生物之有機碳，以及 TCA 循環中的中心代謝產物丙酮酸 (pyruvate) 和維他命 B_{12} (vitamin B_{12})，探討碳源之添加對菌種之間-甲酚生物降解作用之影響，以評估以外加碳源提升生物處理系統處理效率之可行性。

一般環境中所存在的污染物大多是以多種並存的方式存在，因此便針對與間-甲酚同時並存的同分異構物，鄰-及對-甲酚的降解情況進行探討；另外酚 (phenol) 亦為工業上經常與甲酚合併使用的化學物質，但其毒性較低，因此亦對酚所存在的情況下，微生物所進行的共代謝 (cometabolism) 作用進行效力評

估，探討混合基質間的交互作用。

降解完畢後所產生之代謝產物毒性是否降低，對於生物體是否會產生不良之影響，亦為生物復育 (bioremediation) 所必須加以評估的重點，針對此我們利用 Microtox 進行半致有效濃度 (effective concentration 50%, EC₅₀) 分析，並且以萵苣 (*Lactuca sativa*) 種子進行生物分析 (bioassay)，評估代謝產物對種子發芽率及胚根、胚莖發育的影響。

最後針對實驗有效菌株進行革蘭氏染色 (Gram stain)，過氧化氫酶 (catalase) 及加氧酶 (hydroxylase) 活性等基礎生理生化測試，並以 Biolog 菌種鑑定系統及 16S rDNA 進行定序 (sequencing) 比對，除了可幫助對菌種進行分類鑑定外，亦可對後續進行分子生物菌相追蹤的可行性作初步的探討。

二、結果與討論

以馴養之方式對各菌種分離源進行混合培養，濃度由 100mg L⁻¹ 至 1000 mg L⁻¹ 每次降解完畢後再提高 100 mg L⁻¹ 逐步適應，馴養結果顯示如表一，不同採樣地點菌株的耐受性不盡相同，加油站污泥可能會受到加油站成立之年份及加油站自身的管理作業，如：油品儲槽之維護或洗車廢水之排放有關；而工廠內的採樣位置對其耐受性亦有很大的影響，反應釜後面水溝 (M2) 有排放管線排放廢液至儲存桶，過程中廢液的滴落可能使的菌株在此馴化；雨天常使露天式的廢水儲存槽溢出，流至周圍的廢水池截流溝 (M4) 也是造成菌株馴化的因素。

將耐受性佳的 M2 及 M4 兩地點進行菌株純化，一共篩選出 3 株效果優良的菌株，分別為 M2-1、M4-3 及 M4-5 加以進行生理生化和分子生物鑑定。經革蘭氏染色後以 1000 倍油鏡進行觀察的結果，顯示菌株皆為革蘭式陰性菌，外觀上皆為桿狀但 M4-3 和 M4-5 長度大約為 2~4μm，而 M2-1 則大約在 2~6μm。

酵素活性分析結果如表三。微生物於有氧呼吸過程中，會累積過氧化氫，對微生物造成毒害甚至死亡，但可藉由過氧化氫酶的產生將其迅速分解，過氧化氫酶呈陰性反應之好氧菌，可藉超過氧化物雙重催化酶 (superoxide dismutase) 分解更具毒性之超過氧化物，因此藉由此生化反應亦可對微生物進行初步鑑定。苯環類化合物因具有苯環結構而較難分解，若要將其在常溫常壓下分解必須仰賴酶的參與，aromatic ring hydroxylase 為代謝苯環的起始作用酶，是經由氧分子及 NADH 或 NADPH 提供電子於苯環上加入氫氧基，接著再由 aromatic ring-cleavage

dioxygenases 進行開環的動作，因此藉由偵測 NADH 或 NADPH 的消失可加以評估其分解污染物的能力。結果顯示在過氧化氫酶或加氧酶活性上皆呈現正反應。

圖 1 為純菌 DNA 進行聚合酶連鎖反應後，於變性梯度膠體電泳上所呈現的指紋圖譜；藉由高保守性序列引子 341GC 及 534r，針對變異區 V3 所複製出的 DNA 片段進行觀察，發現篩選自同一地點的 M4-3 及 M4-5 呈現相同圖譜，推斷之間的親源性可能相當接近，而 M2-1 可能有所差異。經由 Biolog 菌種鑑定系統及 16S rDNA 定序結果比對如表 3，推斷 3 株菌株皆為 *Pseudomonas* 屬之菌種，彼此間的親源關係相當接近，但在 DGGE 指紋圖譜上仍可看出其差異，然在 Biolog 比對之相似度較差，而 16S rDNA 定序結果相似度皆在 99%。

純化菌株單獨培養對間-甲酚的降解情形及生長曲線如圖 2，其中 M2-1 無論在降解或生長速率上皆遠大於 M4-3 及 M4-5，1000 mg L⁻¹ 的間-甲酚只須 3 天即可降解完畢，且 OD 值極高，而 M4-3 及 M4-5 呈現幾乎相同降解及生長模式，須 7 天才可降解完成，OD 值較低。

圖 3~6 則分別為外加葡萄糖、胰化肌朊、酵母萃取物、丙酮酸時對降解情況所產生的影響；比較各圖可知不同菌株所適合的促進碳源不盡相同，M4-3 及 M4-5 的降解模式極為接近，添加葡萄糖、胰化肌朊及酵母萃取物所產生的促進效果並不顯著，但添加丙酮酸則可使降解時間縮短 2 天，另外 M2-1 的降解速率仍然是最高的，添加葡萄糖、胰化肌朊、丙酮酸及維他命 B₁₂ 並無顯著促進效果，而在添加 0.1g L⁻¹ 酵母萃取物時可產生較佳的促進效果，但 0.2 g L⁻¹ 則效果較不顯著，由此可知適當的添加濃度亦為調控降解速率的重要關鍵。

當環境中存在酚時對間-甲酚降解所產生的混合基質效應如圖 8 及 9，雖然 M4-3 及 M4-5 在單獨存在間-甲酚的情況降解速率較 M2-1 為慢，但是當環境中存在酚時對其產生的影響亦較不明顯，降解間-甲酚速率大約延遲 1~2 天左右或不變；至於 M2-1 則有顯著之影響，250 mg L⁻¹ 的酚存在下雖然仍可順利降解，但間-甲酚的降解天數則增加為 6 天，當酚的濃度為 500 mg L⁻¹ 時則完全抑制菌株的降解作用。

最後針對代謝產物所作之 Microtox 毒性測試結果如表 4，由 EC₅₀ 值可知於無機鹽培養基本身並無毒性，而間-甲酚具有相當強之急毒性，在稀釋 10 倍過後 EC₅₀ 仍然很低，表示仍具有相當之毒性；但在經分解過後毒性有明顯下降趨勢，證明菌株本身除了能順利分解間-甲酚之外，亦不會產生更具毒性的代謝產物。

表 1. 各分離源對間甲酚馴養之最高濃度

Number	<i>m</i> -cresol conc.(mg L ⁻¹)
5	900
6	700
11	900
12	900
15	800
M1	100
M2	1000
M3	700
M4	1000
M5	800

編號 5.6.11.12.15 為不同加油站排水溝污泥；M1~M5 為欣岱公司所採之樣本

M1：廢水收集站水溝污泥 M2：反應釜後面水溝污泥

M3：廢水池地面土壤 M4：廢水池截流溝污泥

M5：生活廢水沉澱池

表 2. 試驗菌株之 Catalase 及 Hydroxylases 活性分析

Strain \ Enzyme	Catalase	Hydroxylases
M4-3	+	0.086127 U
M4-5	+	1.453841 U
M2-1	+	0.108479 U

表 3. Biolog 菌種鑑定系統及 16S rDNA 定序結果之交叉比對

Strain \ Method	Biolog	16S rDNA Sequencing
M4-3	<i>Pseudomonas maculicola</i> (39%)	<i>Pseudomonas putida</i> (99%)
M4-5	<i>Pseudomonas viridilivida</i> (41%)	<i>Pseudomonas monteiii</i> (99%)
M2-1	<i>Pseudomonas putida</i> biotype A (89%)	<i>Pseudomonas monteiii</i> (99%)

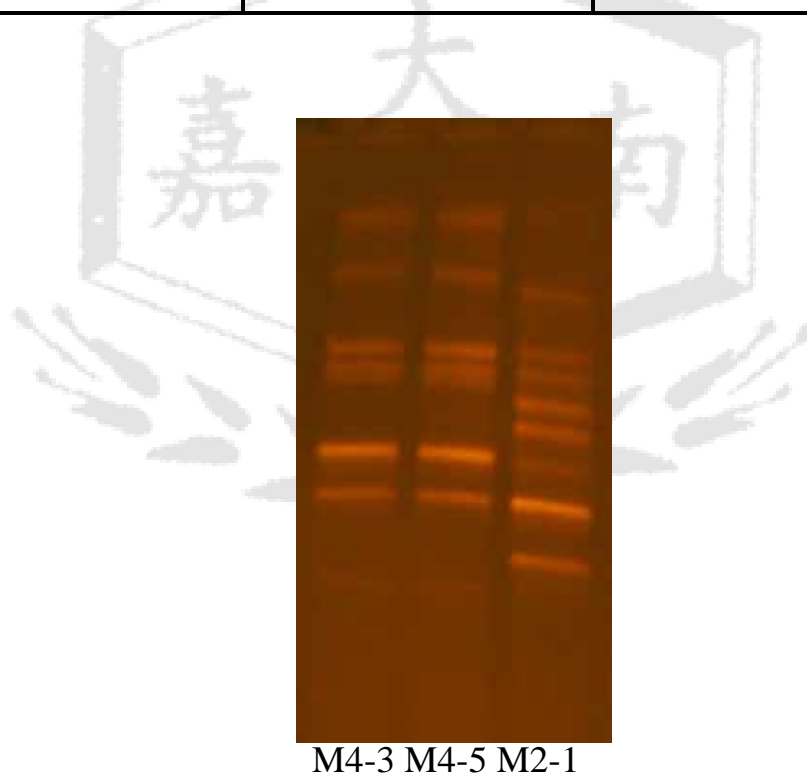


圖 2. 試驗菌株之 DGGE 指紋圖譜

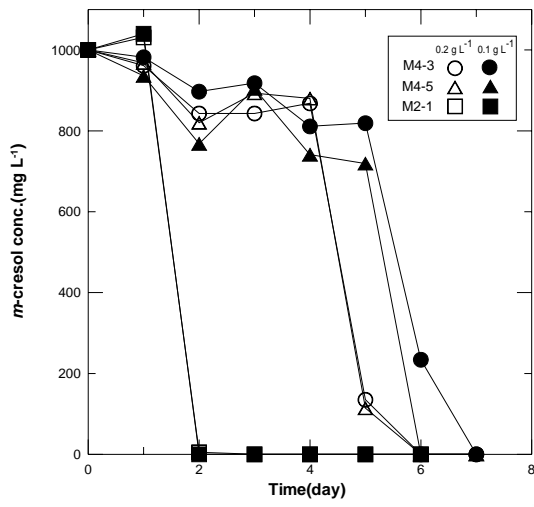


圖 3. 外加葡萄糖對間-甲酚降解之影響

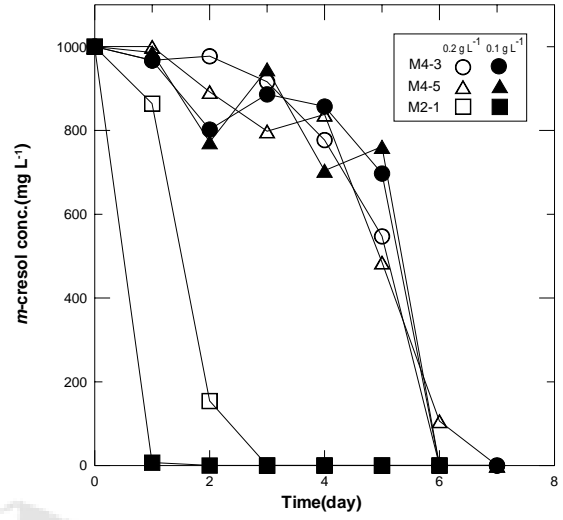


圖 4. 外加胱化肌腺對間-甲酚降解之影響

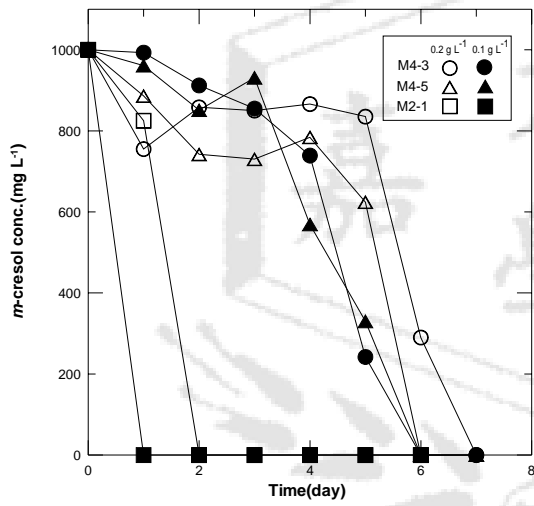


圖 5. 外加酵母萃取物對間-甲酚降解之影響

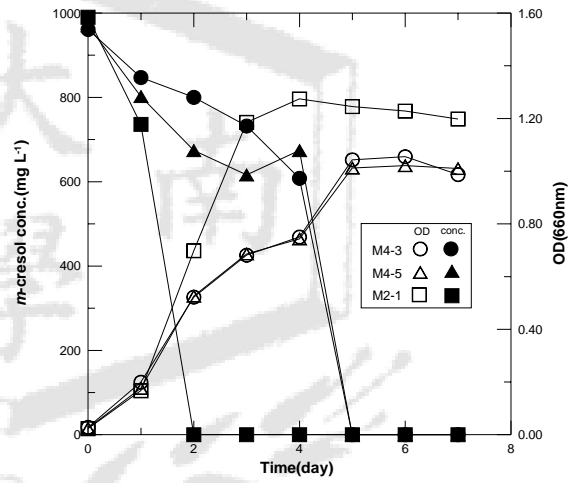


圖 6. 外加丙酮酸對間-甲酚降解之情之影響