

嘉南藥理科技大學專題研究計畫成果報告

五氯酚降解菌於受污染土壤中菌數之簡易計數法

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：CNEV-91-20

執行期間：91 年 1 月 1 日至 91 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

執行單位：環境工程衛生系

中華民國 92 年 2 月 18 日

摘要

五氯酚是生物制菌劑並廣為木材加工業者所使用，而污染到土壤及地下水，以生物復育方式可處理土壤之五氯酚污染，復育成效則視降解菌之多寡而定，本研究利用自台灣南部的某廢棄木材加工場址收集受污染土壤，分離五氯酚降解菌，以低成本且較為簡易的最大可能數法(most probable number)進行五氯酚降解菌菌數之估算，利用五氯酚降解時產酸使培養基 pH 值下降值與五氯酚殘餘濃度作為菌種生長之判斷指標並與含五氯酚之平板計數(plate count)法相較，結果顯示結果顯示當培養基 pH 值下降 0.4 個單位時即可判斷為五氯酚降解菌生長之正反應，且此二測定法之測定結果具有極高之相關性

Abstract

Pentachlorophenol (PCP) is a biocide used around the world as a wood preservative, its widespread use has led to contamination of soil and groundwater. The success or failure of bioremediation depends on the presence or survival of PCP-degraders in the environment. In the study, the PCP-degraders were isolated from contaminated soils from a wood-preserving industrial site. The mineral salt medium containing PCP plate count and new most probable number (MPN) method for determination of PCP-degraders using the pH-drop. Even though the pH drop indicating PCP degradation was very small (<0.4), it could show the result obtained from the PCP concentration analysis. There was a high relationship between the results of all MPN counts and plate counts.

一、前言

五氯酚 (Pentachlorophenol, PCP) 乃是氯酚族中最具毒性的一種化合物，且為世界上廣泛使用的化學藥品之一，目前於國內「毒性化學物質管理法」的列管毒性物質，且被懷疑為環境荷爾蒙化學物質之一，對環境與人體健康有危害之虞(鄭等人, 2000)。早於 1936 年五氯酚即大量使用於木材之防腐用途上，也因而造成了許多的環境污染，由於 PCP 在環境中之低生物有效性(bioavailability)，造成其不易被分解的特性，使得 PCP 長期累積在環境中(包括累積在土壤中、底泥中及生物體內)，故針對受五氯酚污染土壤之整治更顯其重要性。

利用場址之微生物對污染物做自然處理已受到重視。美國環保局及許多州均以自然生物處理當作整治的選擇之一，和目前所使用的物化處理法相比，自然生物處理法可以省下大筆的整治費用(USEPA, 1998)。有時為加速生物分解的速率，可以使用現地加強方法整治，以提供生物分解之有利條件來加速處理速率。不論是自然或加強式的生物處理均可在極具經濟效益之前提下達到去除污染物(含氯或不含氯之有機物)之整治目的。Namkoong 等人(1989)以批次培養來進行土壤污染物降解試驗，以酚的起始濃度為 700 mg/kg dry soil，含水量為 12 %時，土壤微生物可迅速降解酚，氯酚化合物雖為生物難分解物質，但許多研究仍顯示，可經人為馴化，篩選出分解氯酚類化合物的菌種(Boyd 1995 et al., 1984, Dean-Ross, 1989, Dean-Ross and Rahimi, 1995, Frinklea and Fontenot, 1995)。例如：以水分含量調節土壤中的氧氣濃度；調整土壤 pH 值與適當地添加不同的營

養鹽等，可使土生性(indigenous)微生物族群進行對污染物的降解作用(Edgehill and Finn, 1983; Fan and Scow, 1993)。接種人工培養的菌種至土壤可達到降解酚類化合物之例子，成功者甚多，如：接種 *Rhodococcus chlorophenolicus*、*Arthrobacter* sp.與 *Flavobacterium* sp.可礦化或分解五氯酚(Edgehill and Finn, 1983; Goldstein *et al.*, 1985; Alexander, 1994)。亦有不少失敗例子，Song 等人(1990)於砂土、壤土與粘壤土進行油品之生物復育，發現砂土中的復育效果較差，而 Fan 與 Scow(1993)發現土壤含水量極低(2.5%與 5%)時，生物降解能力不佳，故生物復育之效果與土壤環境條件有極大的關係。

研究酚分解菌的文獻甚多，然五氯酚降解菌實際應用於受 PCP 污染的土壤復育成效，受土壤性質影響甚鉅，如：有機質含量、土壤 pH 值、水份含量與通氣性等環境因子等，均會影響復育效率。本研究擬利用五氯酚降解時產酸使培養基 pH 值下降值與五氯酚殘餘濃度作為菌種生長之判斷指標並與含平板計數(plate count)法相較，以做為接種五氯酚降解菌於受污染土壤時之菌數追蹤，嘗試找出代表菌種生長之合理 pH 值下降值以利於判斷與追蹤降解菌於不同土壤中的存活情形，以做為未來五氯酚降解菌應用於台灣受 PCP 污染土壤生物復育工作之可行性參考。

二、材料與方法

1. 五氯酚分解菌之分離與培養

本研究採批次式(batch)水溶液懸浮振盪，來進行五氯酚分解菌之集殖培養(enrichment culture)，以有效地篩選出五氯酚分解菌。

(1).分離源

分別收集受污染土壤或污泥等做為五氯酚分解菌的分離源。

(2).菌種之培養與分離

於玻璃三角錐中，將 1 克土壤或污泥加至 100 mL 之合成基礎培養基(defined mineral salts medium)。並添加五氯酚為單一碳源基質，使培養基之五氯酚濃度為 20 mg L⁻¹，於 30°C、150 rpm 下振盪培養 30 天。

2.測定項目

(1).細菌數分析--以含五氯酚平板培養基測定降解菌菌數。

(2).PCP 分析—參考環保署環檢所之標準方法(NIEA R501.20C)分析五氯酚，以氣相層析附裝電子捕捉偵測器(Gas chromatography/electron capture detector; GC/ECD)檢測之。分析 PCP 除以 GC 分析外，在 PCP 為較高濃度(>1ppm)時，在 O.D_{320nm} 有一吸收光譜而推算出 PCP 之濃度。

(3).培養基 pH 值

於菌液吸光度值量測完畢後，再以 pH meter 量測其 pH 值。

三、結果與討論

1.微生物生長情形

為了解菌株之生長狀況，分析培養期間之 OD_{660nm} 值變化，結果顯示以五氯酚為唯一碳源時，當培養至第 5 天，培養基之 OD_{660nm} 值均可升高至 0.3 以上，顯示微生物生長良好。

2.五氯酚降解情形

以五氯酚為唯一碳源於培養至 5 天時，菌株對五氯酚之降解率在 99 % 以上，顯示分離之菌株，對未來受五氯酚污染土壤復育上具有應用之潛力。

3. 菌數分析

將菌液接種於 15mL 之玻璃試管中，混以 9mL 之無菌含 20 mgL^{-1} PCP 之基礎培養基中(稀釋倍數為 10^{-2} 至 10^{-6})，每一稀釋度 4 重複，其中 1 支貯存於 -20°C 下，以做為每一稀釋度之起始 pH 值，其他 3 支於 30°C 下培養 7 天後，測定 pH 值。以培養基 pH 下降值做為判斷菌株生長與否之指標。按不同稀釋度所得之觀察結果，查對最大或然數(most probable number, MPN)表，求出土樣中之菌數與其 95% 之可信賴限度因子。結果示於表 1。

利用五氯酚降解時產酸使培養基 pH 值下降(pH drop)值與五氯酚殘餘濃度作為菌種生長之判斷指標並與含五氯酚平板培養基計數法相較，結果顯示當培養基 pH 值下降 0.2 個單位時即可判斷為五氯酚降解菌生長之正反應，且此二測定法之測定結果具有極高之相關性(Table 1)，利用每一試管之 PCP 殘餘濃度可判斷菌株是否良好生長於該試管中，即使 pH 值下降之幅度極小(約在 0.4 以內)，仍可藉由此微幅之下降來判斷反應之正負。顯示應用 MPN 法估算接種五氯酚降解菌於受污染土壤時之菌數追蹤，將有利於判斷與追蹤降解菌於土壤中的存活情形，降解菌應用於受污染的土壤復育成效，受土壤性質影響，如：有機質含量、土壤 pH 值、氧化還原狀態、水份含量與通氣性等環境因子等，而降解菌於土壤中的存活與否與菌數之消長均會影響復育效率，許多土壤微生物因吸附於土壤顆粒上，而造成分離與測數土壤微生物的困難，利用選擇性培養基(selective medium)、土壤中萃取出之生質量(biomass)、免疫螢光分析(immunofluorescence)、DNA/DNA 雜合(DNA/DNA hybridization)與聚合酵素連鎖反應(Polymerase chain reaction)等分析技術可測定土壤微生物的數量，然以上所述之方法需要特定之藥品與技術並較為耗時，應用最大可能數(most-probable number, MPN)法的簡易與低成本特性可發展出估算土壤中某特定菌種之計數方法。進而作為未來生物復育時成效評估之依據。

參考文獻

1. 鄭顯榮、陳志銘、黃明輝。2000。內分泌干擾物質(環境荷爾蒙)及持久性有機物之環保管制情形。pp.12-29。第一屆環境荷爾蒙與持久性有機污染物研討會。行政院環境保護署。台北。
2. Alexander, M. 1994. Inoculation. Pp.226-247. In M. Alexander (ed.) Biodegradation and Bioremediation. Academic Press. USA.
3. Boyd, S.A. and D.R. Shelton. 1984. Anaerobic biodegradation of chlorophenols in fresh and acclimated sludge. Appl. Environ. Microbiol. 47:272-277. Namkoong, W. R.C. Loegr, J.F. Malina, and Jr. Effect of mixture and acclimation on removal of phenolic compounds in soil. J. WPCF. 61:242-250.
4. Dean-Ross, D. 1989. Bacterial abundance and activity in hazardous waste-contaminated soil. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 43:511-517.
5. Dean-Ross, D. and M. Rahimi. 1995. Toxicity of phenolic compounds to sediment bacteria. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 55:245-250.
6. Edgehill, R.U. and R.K. Finn. 1983. Microbial treatment of soil to remove

- pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1122-1125.
7. Fan, S. and K.M. Scow. Biodegradation of trichloroethylene and toluene by indigenous microbial populations in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1911-1918.
 8. Frinklea, H.C. and M.F. Fontenot. 1995. Accelerated bioremediation of triazine contaminated soils—a practical case study. pp.217-232. *In* H.D. Skipper and R.F. Turco (eds.) *Bioremediation : Science and Applications*. SSSA Spec. Publ. 43. ASA, CSSA and SSSA, Mafison WI. USA
 9. Goldstein, R.M., L.M. Mallory, and M. Alexander. 1985. Reasons for the possible failure to enhance biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:977-983.
 10. Song, H.G, X. Wang, and R. Rartha. 1990. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:652-656.

Table 1. Results for the MPN count by pH, PCP concentration and plate counts as positive testing

Dilution	Replication	pH	PCP (mg L ⁻¹)	Positive/negative	CFU on PCP-plate (0.1 mL)
10 ⁻²	1	7.01	< 0.1	+	14
	2	6.92	< 0.1	+	21
	3	7.03	< 0.1	+	9
10 ⁻³	1	6.97	< 0.1	+	1
	2	7.01	< 0.1	+	2
	3	7.00	< 0.1	+	1
10 ⁻⁴	1	7.28	17	—	0
	2	7.01	< 0.1	+	0
	3	7.16	16.8	—	0
10 ⁻⁵	1	7.25	17.2	—	0
	2	7.24	17.1	—	0
	3	7.23	16.7	—	0
10 ⁻⁶	1	7.32	16.9	—	0
	2	7.35	16.8	—	0
	3	7.27	16.1	—	0
Control	1	7.35	17.2	—	0
	2	7.36	17.6	—	0
	3	7.28	17.1	—	0
MPN index		3-2-0	3-3-2		
Result (MPN or CFU/100mL)		93*10 ⁴	110*10 ⁴		140*10 ⁴