

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

污染河口水中汞耐受性細菌之研究

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2313-B-002-327-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：國立臺灣大學海洋研究所

計畫主持人：謝文陽

計畫參與人員：謝文陽、林育德、邱秀慧、范嵐楓、周曉慧、黃于玲、李晃銘

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 1 日

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計畫編號: NSC 91-2313-B-002-327

執行期限: 91 年 8 月 1 日至 92 年 7 月 31

主持人: 謝文陽 執行機構及單位名稱: 台大海洋所

## 一、中文摘要

本研究自二仁溪、後勁溪、愛河和高屏溪採集河口水樣，進行其汞耐受性細菌的計數、分離與鑑定之探討。採得之河口水，利用含不同濃度二價汞離子的 PY 液體培養基培養，配合最可能計數 (most-probable-number counts, 略稱 MPN counts) 法，所估得菌數多介於  $10^4$ - $10^7$  cells/L 間。從各 MPN 培養系列中共純化出 34 株具汞耐受能力的菌株。根據革蘭氏反應、細胞外型、對氯化鈉的需求等表型特性之差異，可將這 34 株分離株分為九群，其中七群分別屬於 *Acinetobacter*、*Alteromonas*、*Bacillus*、*Hyphomonas*、*Lactobacillus*、*Pseudoalteromonas* 和 *Pseudomonas*；另外兩個尚未鑑定至屬的菌群，分別包含產生橙或黃色菌落的革蘭氏陽性需鹽性細菌及產生白色半透明或不透明菌落的革蘭氏陽性需鹽性細菌。

關鍵字：汞耐受性細菌

## Abstract

Mercury-tolerant bacteria distributed in estuarine water samples collected from Er-ren River, Hou-Jien River, Love River and Kao-ping River were enumerated by most-probable-number (MPN) counts. The counting values generally ranged from  $10^4$  to  $10^7$  cells/L. Thirty-four strains of mercury-tolerant bacteria were isolated from the MPN tubes. They were classified into nine groups according to the characterization tests, including Gram reaction, glucose fermentation, motility and NaCl requirement. Seven groups included strains that were identified as members of *Acinetobacter*, *Alteromonas*, *Bacillus*, *Hyphomonas*, *Lactobacillus*, *Pseudoalteromonas* and *Pseudomonas*, respectively. The other two groups included halophilic, Gram-positive strains that were not identified to the generic level; one group produced orange or yellow colonies on agar plates while colonies of the other group were white (opaque or translucent).

**Keywords** : mercury-tolerant bacteria

## 二、緣由與目的

含汞化合物被廣泛使用在農業用途的殺蟲劑、抗微生物劑、緩瀉劑、防腐劑、廢水處理、紙漿製造、電鍍工業、機械設備製造、作為觸

學工業。汞鹽和汞苯化合物對於微生物有很強抑制活性，常應用於作為殺菌劑、消毒劑或抑菌劑。據估計，汞在全世界每年的使用量約為 10 萬公噸，但是只有極少部分被循環利用，大部分都被排於到海洋中，是近年來頗受注意的海洋重金屬污染物質，但是尚未受到嚴格的管制。

在無氧環境中，離子態汞易被微生物甲基化形成甲基汞。甲基汞是親油性，具神經劇毒，其一旦在無氧沈積物中形成，透過生物鏈，在生物體累積濃度會比水中濃度高出一萬倍，因此造成魚的生長和生殖減緩。含汞化合物會阻抑細胞膜的流動和活性，干擾 DNA 的正常運作，抑制 RNA 的轉錄和轉譯功能，阻礙細胞分裂機制，及使某些蛋白質變性並抑制酵素活性。

二價汞在有氧環境中，可以被微生物還原為毒性較低的零價汞。面對海洋汞污染問題，利用微生物代謝有毒性的二價汞成為毒性較低的零價汞有其可行性。

本計畫以污染性河口水域中之汞耐受性細菌為對象，進行了這類細菌的計數、分離及保存，並檢測了各分離株之諸項外型、生理、及生化特性，依此進行初步分群歸類。

### 三、結果

#### A. 河口中汞耐受性細菌密度

河口地區各測站共分離出 34 株對象菌，以 MPN 法估算各測站之汞耐受性細菌密度，其中以二仁溪河口水所含之菌數最高。耐受 0.01mM 二價汞的細菌細胞密度，多為  $10^6$ - $10^7$  cells/L，約占總異營性細菌的千分之一；耐受 0.1mM 二價汞之菌數則介於  $10^4$ - $10^6$  cells/L。

#### B. 菌株的生長特性與初步分群

34 株汞耐受性細菌皆為好氣性桿菌，其中有 17 株之生長需有鈉離子的存在。它們在培養基上形成白色半透明、白色不透明、橙色和黃色四種類型菌落；這四類分離株所占比例依序為 35.3% (12/34)、47.1% (16/34)、5.9% (2/34) 和 11.8% (4/34)。這些分離株依其形態、生理和生化的測試結果，可進一步區分為九群，其中七群分別屬於 *Acinetobacter* (一株)、*Alteromonas* (一株)、*Hyphomonas* (一株)、*Bacillus* (六株)、*Lactobacillus* (一株)、*Pseudoalteromonas* (二株) 和 *Pseudomonas* (八株) 等屬，另外尚未鑑定至屬的兩個菌群，包括產生橙或黃色菌落的革蘭氏陽性需鹽性細菌 (四株) 及產生白色半透明或不透明菌落的革蘭氏陽性需鹽性細菌 (十株)。

#### C. 汞耐受能力

34 株汞耐受性細菌分離株皆可在含 0.01mM 二價汞的 PY 液體培養基中生長，其中有 5 菌株未經馴化處理 (induced treatment) 即可在含 0.1mM 二價汞的 PY 液體培養基中生長。惟經馴化處理後，另有 6 株分離株亦可生長於含 0.1mM 二價汞的 PY 液體培養基。

#### 四、討論

利用 MPN 法計數與分離汞耐受性細菌時發現，能在含 0.01mM 二價汞離子之液體培養基中生長的細菌，若以其在平板培養基上形成的菌落顏色區分，可以分為白色、黃色和橙色等三菌群。惟能在含 0.1mM 二價汞離子液體培養基 (0.1mM) 生長的細菌，其在平板培養基上形成的菌落顏色均為白色。其中被鑑定為屬於 *Alteromonas*、*Bacillus*、*Lactobacillus*、*Hyphomonas* 等屬的汞耐受性細菌分離株，經過馴化處理後，皆可耐受高達 0.1mM 濃度之二價汞離子；以往鮮見有能耐受如此高濃度二價汞離子的細菌分離株 (Chang & Law, 1997; von Canstein *et al.*, 1999; Wagner-Döbler *et al.*, 2000)。

生長實驗發現，在接種至含 0.01mM 或 0.1mM 二價汞離子之 GM 培養基後，所有分離株均經需 8~10 小時以上遲滯期，方能出現明顯生長。這可能是分離株細胞在分裂生長前，須先將攝入的汞離子還原為零價汞，以減低高濃度汞離子的毒害效應。

比較前培養有或無經過 0.01mM 汞離子的馴化處理發現，未經馴化處理的控制組與經馴化處理的實驗組，兩者在含 0.1mM 汞離子培養基中之生長遲滯期，前者比後者長 2~3 小時。此結果顯示，經馴化處理的細胞，比未經馴化處理的細胞，能較快地適應含高濃度汞離子之環境。馴化處理的前培養過程，亦可誘發若干原只能生長於含較低濃度汞離子培養基之菌株，變成能適應於較高濃度汞離子之環境。

#### 五、計畫成果自評

(A) 執行本計畫已完成:

1. 河口中汞耐受性細菌菌數之調查。
2. 分離出 34 株對象菌，全數進行繼代保存。
3. 針對 34 株分離株，測知其：(1)最適生長條件；(2)發酵葡萄糖能力；(3)汞耐受能力；(4)耐受的汞離子濃度，可因馴化處理而提高。

(B) 參與本計畫的工作人員已習得細菌的培養、計數、純化、分離、保存和鑑定等種種技術。

#### 六、參考文獻

- Batrakov, S. G., Nikitin, D. I. and Pitryuk, I. A. (1996). Lipid composition of the gram-negative, budding, seawater bacterium *Hyphomonas jannaschiana* lacking in phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1303, 39-46.
- Bowman, J. P., McCammon, S. A., Brown, M. V., Nichols, D. S. and McMeekin, T. A. (1997). Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3068-3078.
- Chang, E. Y., Coon, S. L., Walch, M. and Weiner, R. M. (1996). Effects of *Hyphomonas*

- PM-1 biofilms on the toxicity of copper and zinc to *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica* larval set. J. Shellfish. Res. 15, 589-595.
- Chang, J. S. and Law, W. S. (1998) Development of microbial mercury detoxification processes using mercury-hyperresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. Biotechnol. Bioeng. 57, 462-470.
- Baumann, P., Furniss, A. L. & Lee, J. V. (1984). Genus I *Hyphomonas* 1984, 71<sup>VP</sup>. In *Bergey's Manual Systematic Bacteriology*, vol. 3, pp. 1904-1907. Edited by R. L. Moore, R. M. Weiner & Gebrers. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Iohara, K., Iiyama, R., Nakamura, K., Silver, S., Sakai, M., Takeshita, M. and Furukawa, K. (2001) The mer operon of a mercury-resistant *Pseudoalteromonas haloplanktis* strain isolated from Minamata Bay, Japan. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56, 736-741.
- Ji, G., Salzberg, S. P. and Silver, S. (1989). Cell-free mercury volatilization activity from three marine *Caulobacter* strains. Appl. Environ. Microbiol. 55, 523-525.
- Rasmussen, L.D. and Sørensen, S.J. (1998). The effect of longterm exposure to mercury on the bacterial community in marine sediment. Current Microbiology 36, 291-297.
- VON Canstein, H., Li, Y., Timmis, K. N., Deckwer, W.-D., and Wagner-Döbler, I. (1999) Removal of mercury from chlorekali electrolysis wastewater by a mercury-resistant *Pseudomonas putida* strain. Appl. Environ. Microbiol. 65, 5279-5284.
- VON Canstein, H., Li, Y., Lernhäuser, J., Haase, E., Felske, A., Deckwer, W.-D. and Wagner-Döbler, I. (2002) Spatially oscillating activity and microbial succession of mercury-reducing biofilms in a technical-scale bioremediation system. Appl. Environ. Microbiol. 68, 1938-1946.
- Wagner-Döbler, I., von Canstein, H., Li, Y., Timmis, K.N. & Deckwer, W. (2000). Removal of mercury from chemical wastewater by microorganisms in technical scale. Environ. Sci. Technol. 34, 4628-4634.
- Weiner, R. M., Melick, M., O'Neil, K. and Quintero, E. (2000). *Hyphomonas adhaerens* sp.nov., *Hyphomonas johnsonii* sp. nov. and *Hyphomonas resenberg* sp. nov., marine budding and prosthecate bacteria. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50, 459-469.
- Fesefeldt, A., Kloos, K., Bothe, H., Lemmer, H. and Gliesche, C.G. (1998). Distribution of denitrification and nitrogen fixation genes in *Hyphomicrobium* spp. and other budding bacteria. Can. J. Microbiol. 44, 181-186.
- Zerfas, P. M., Kessel, M., Quintero, E. J. and Weiner, R. M. (1997). Fine-structure evidence for cell membrane partitioning of the nucleoid and cytoplasm during bud formation in *Hyphomonas* species. J. Bacteriol. 179, 148-156.