

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：NSC92-2313-B-002-084-

執行期間：92年08月01日至93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：邱秀慧、林育德、范嵐楓、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 93 年 9 月 21 日

一、中文摘要

本研究從第一年所獲三十四株汞耐受性細菌中，挑出十三株，進行了以 16S rDNA 序列比對為基礎之親緣分析。結果顯示，十三分離株最近緣種分布於 *Alteromonas*、*Bacillus*、*Hyphomonas*、*Pseudoalteromonas* 和 *Pseudomonas* 等五屬。以原子吸光儀 (AAS) 檢測這些分離株汞還原活性發現，其中以屬於 *Pseudomonas* 者，具有最大活性。十三分離株中，只有屬於 *Alteromonas* 之惟一株，未被檢出具有抗汞基因 *mer A*。其餘十二株與 *Pseudomonas putida* Elb5 相較，除了有 *mer A* 基因序列之差異，抗汞基因系列之排列位置亦有所不同。獲得分離株抗汞基因轉殖之大腸桿菌株，其抗汞能力明顯增強。分離株抗汞基因均存在於染色體，而非存在於質體。

Abstract

Thirteen strains out of the thirty-four mercury-resistant isolates obtained in the first year were selected for the present study. A 16S rDNA-based phylogeny showed that they included species distributed in the genera *Alteromonas*, *Bacillus*, *Hyphomonas*, *Pseudoalteromonas* and *Pseudomonas*. The strains belonging to *Pseudomonas* expressed the greatest Hg^{2+} -reducing activity as measured by AAS. *MerA* genes were detected from all the strains except the one that was identified to be an *Alteromonas* sp. The twelve strains that were detected to have *merA* genes differed from the known mercury-resistant bacteria in their *merA* gene sequences and in their *mer* gene series. Their *mer* gene series were located in chromosomes rather than in plasmids.

Cloning of an *E. coli* strain with these genes significantly enhanced the mercury resistance of the strain.

二、緣由與目的

二價汞 (Hg^{2+}) 對人體具神經劇毒，是一種高穩定性重金屬離子。工廠污水排放，是造成此種重金屬離子水污染的一大來源。Summers and Silver (1) 發現，有些細菌為了移除這類毒性物質，可以產生汞還原酶或有機汞分解酶，藉此有效地將高毒性含汞化合物還原為毒性較低的汞金屬。有報告指出，具汞抗性細菌之抗汞能力基因存在於質體 (2, 3)。另有報告指出，可以利用微生物生物復育法 (bioremediation) 移除受污染水域之含汞 (4, 5)。Barkay *et al.* (6) 發現，有些分離自淡水湖泊和河口的汞耐受性細菌，如培養於 Hg^{2+} 濃度為數 μM 之環境，可以每小時 1-10% 之速度，將 Hg^{2+} 還原成 Hg^0 。這些細菌可利用 plasmid-encoded enzymatic pathway，將 Hg^{2+} 轉換為 Hg^0 。已知汞還原酶控制基因系列 (*mer* gene series) 包括：R、T、P、A、B 和 D；另有未知的 C、F 和 E 等相關基因 (7, 8, 9)。

本研究從第一年篩選分離出之三十四株汞耐受性菌株中挑出十三株、進行了如下探討：(1) 分離株 16S rDNA 之定序；(2) 分離株與已知菌種親緣關係之分析；(3) 分離株汞移除效率之測定；(4) 分離株汞還原酶 (mercury reductase) 基因種類之分析；(5) 分離株汞耐受能力基因是否存在於質體之分析；(7) 將分離株所含抗汞基因轉殖至 *E. coli* 後，檢測轉殖菌株是否獲得汞耐受能力。

三、結果

汞耐受性分離株 16S rDNA 序列分析比對十三株汞耐受性分離株與已知細菌 16S rDNA 序列相似度之結果，發現與它們最相似之菌種分布於五個菌屬，包括：一株與 *Alteromonas marina*

最相似(相似度, 95.5%)、一株與 *Bacillus aquaemaris* 最相似(相似度, 98.5%)、一株與 *Hyphomonas jannaschiana* 最相似(相似度, 99.3%)、二株與 *Pseudoalteromonas atlantica* 最相似(相似度, 91.4-94.0%)、四株與 *Pseudomonas aeruginosa* 最相似(相似度, 98.0-99.5%)、一株與 *Pseudomonas citronellolis* 最相似(相似度, 99.5%)、一株與 *Pseudomonas putida* 最相似(相似度, 99.0%)、二株與 *Pseudomonas stutzeri* 最相似(相似度, 99.0-99.5%)。

分離株移除 Hg^{2+} 效率之檢析

十三株汞耐受性細菌皆可將培養基內二價汞還原為零價汞。經由原子吸光儀(AAS)檢測結果, 在 Hg^{2+} 含量高達 20mg/L 之培養基中, 與 *Bacillus*、*Hyphomonas*、*Pseudomonas* 三屬菌種最相似之分離株, 均仍展現超過 20 ng/min/culture 之汞還原速率, 然而它們的最大汞還原活性, 均出現在 Hg^{2+} 含量為 2 mg/L 之培養條件下, 其中並以 *Pseudomonas* 之汞還原速率最大。分離株 AL1 (*Alteromonas* sp.) 在 Hg^{2+} 含量為 2、5 和 10mg/L 之培養基中均具汞還原活性; 此株在這三種 Hg^{2+} 濃度下之汞還原活性依序為 15.6、3.0 和 2.0 ng/min/ 10^8 cells。分離株 PA1 (*Pseudoalteromonas* sp.) 在 Hg^{2+} 含量為 2 和 5 mg/L 之培養基中, 其汞還原活性分別為 3.8 和 3.1 ng/min/ 10^8 cells。分離株 BA1 (*Bacillus* sp.) 在 Hg^{2+} 含量為 2、5、10、15 和 20 mg/L 之培養基中, 其汞還原活性依序為 0.012、0.012、0.008、0.007 和 0.005 pg/min/ 10^8 cells。分離株 HYP1 (*Hyphomonas* sp.) 在 Hg^{2+} 含量為 2、5、10、15 和 20 mg/L 之培養基中, 其汞還原活性依序為 0.47、0.21、0.12、0.11 和 0.06 ng/min/ 10^8 cells。分離株 PS1 (*Pseudomonas* sp.) 在 Hg^{2+} 含量為 2、5、10、15 和 20 mg/L 二價汞之培養基中, 其汞還原活性依序為 181.3、

0.04、0.02、0.02 和 0.01 ng/min/ 10^8 cells; 在 Hg^{2+} 含量為 2 和 5mg/L 之培養基中, 此株細菌並可在 12 小時內, 將培養基所含 Hg^{2+} 完全還原為 Hg^0 。

汞耐受性細菌汞還原酶之檢析

分離株的汞還原酶 *merR*、T、P、A、B、D 和 E 之 PCR 及電泳膠體分析, 顯示它們均無 *merB* 基因。*merR*、A、D 和 E 四者之序列則分別定出 762、915、392 和 193 個鹼基; 它們與已知菌種 *merR*、A、D 和 E 之序列相似度依序為 92.6%、79.0-98.8%、95.5% 和 98.9%。*merT* 與 P 及 *merR* 與 A 具相鄰且收斂特性, 故 *merT* 與 P 的增幅與序列分析, 均和 *merR* 與 A 一起檢析得出。

分離株 AL1 具汞還原活性, 但不能被已知汞還原酶基因之引子增幅檢出。分離株 PA1 僅具 *merA*, 分離株 BA1、HYP1 和 PS1 三者則均具 *merA*、R、T、P 和 D。此四株 *merA* 之 PCR 增幅產物, 經過 *EcoR* I 之 RFLP 及序列分析, 發現其 *merA* 之酶切長度與序列並非與已知種完全相同。然而將之轉殖入大腸桿菌質體內, 仍使轉殖株汞耐受能力明顯增強, 可耐受達 5 mg/L 之 Hg^{2+} 。

分離株耐汞基因是否存於質體之檢測前述五株中, 僅 PA1 具 5 kb 質體, 惟 *merA* 基因之 PCR 增幅, 顯示此基因不存在於該質體內, 因此五株分離株之耐汞基因均應存在於染色體而非質體內。

四、討論

以 16S DNA 序列比對建構的親緣關係顯示, 分離株 AL1 應為 *Alteromonas* 屬新菌種, 因與其最相似菌種 *Alteromonas marina* 相較, 兩者序列相

似度僅為 95.5%。根據 Yi *et al.*(10)的研究指出, *Alteromonas marina* 不具鈉鹽需求, 能水解褐藻膠, 不能利用 L-lysine 或 L-ornithine 作為生長單一碳源。但 AL1 之生長有鈉鹽需求, 不水解藻膠, 但能利用 L-lysine 和 L-ornithine 作為生長單一碳源。分離株 PA1 與最近源菌種 *Pseudoalteromonas atlantica*, 除了 16S DNA 序列相似度僅有 94.0% 之外, 兩者之表型特性, 也顯有不同。因此, PA1 可能成為 *Pseudoalteromonas* 之新種。

分離株 AL1 和 PA1 都只在低 Hg^{2+} 濃度下, 才能表現汞還原活性, 但汞還原活性仍都超過 $2.0 \text{ ng/min}/10^8 \text{ cells}$ 。另外三株分離株 BA1、HYP1 和 PS1, 三者皆可在 Hg^{2+} 濃度 (20 mg/L) 下, 進行汞還原作用, 且每分鐘最低汞還原總量大於 20 ng 。

本研究從 *Alteromonas*、*Hyphomonas* 和 *Pseudoalteromonas* 三屬菌株, 檢測出汞還原活性; 以前從來沒有從這些菌屬菌株檢出汞還原活性的報告。

Pseudomonas 屬細菌, 已知含有不少高效能汞還原細菌, 例如 *Pseudomonas putida* 及 *Pseudomonas aeruginosa*, 皆已被應用為工業廢水及河口水之污染防治用菌, 其中 *Pseudomonas putida* Elb5 的染色體及質體基因序列已陸續由許多學者解開, 成為許多相關研究重要參考菌株(9, 10, 11)。本計畫分離出之汞耐受性菌株, 其汞還原基因序列及排列, 與 *Pseudomonas putida* Elb5 並不完全相同。然而轉殖實驗顯示, AL1、PA1、BA1 和 HYP1 四株分離株確實都具有汞還原酶基因。

轉殖技術是近年來廣被應用的一種分子生物科技, 可以將未知基因經由大

腸桿菌或其他已知菌種表現之。已有學者成功地將汞還原酶控制基因轉殖至 *Deinococcus radiodurans*, 使此菌同時具有放射性元素抗性及 Hg^{2+} 還原的功能, 因而使該轉殖菌株更具應用價值(12)。本研究已成功地將分離株汞還原酶控制基因轉殖至大腸桿菌中, 使轉殖對象菌增加抗汞特性。同時也藉此完成此基因序列分析。

五、計畫成果自評

(A) 執行本計畫已完成:

1. 完成各分離株 16S rDNA 之定序和親緣比對。
2. 測知分離株在不同培養基中的汞移除效率。
3. 檢知分離株在不同培養條件下的汞還原酶種類及活性。
4. 測知分離株中具質體者, 及所具質體大小。
5. 萃取、純化分離株所含抗汞基因。
6. 轉殖分離株所含耐汞基因。
7. 確認轉殖株的耐汞能力增強。

(B) 參與本計畫的工作人員已習得細菌培養、DNA 萃取與純化、PCR、電泳膠體分析、基因轉殖、二價汞之移除與效能分析等技術。

六、參考文獻

1. Summers, A.O. & S. Silver. (1978). *Ann. Rev. Microbiol.*, **32**, 637-672.
2. Summers, A.O. (1986). *Annu. Rev. Microbiol.*, **40**, 607-634.
3. Osborn, M., K.D. Bruce, P. Strike & D.A. Ritchie. (1997). *FEMS*

- Microbiol. Rev.*, **19**, 239-262.
4. Dey, S., & D.S. Patke. (2000) . *J. Environ. Biol.*, **21**, 47-54.
 5. Silver, S. (1994) . *Research of Microbiology*. **145**, 61-67.
 6. Barkay, T. (1987) . *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2725-2732.
 7. VON Canstein, H., Li, Y., Lernhäuser, J., Haase, E., Felske, A., Deckwer, W.-D. and Wagner-Döbler, I. (2002). *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1938-1946.
 8. Wagner-Döbler, I., von Canstein, H., Li, Y., Timmis, K.N. & Deckwer, W. (2000). **34**, 4628-4634.
 9. Barkay, T., Miller, S. M. & Summers, A. O. (2003). *FEMS Microbiol Rev* **27**, 355-384.
 10. Yi, H., Bae, K.S. & Chun, J. (2004). *Int J Sys Evol Microb* **54**, 571-576.
 11. Wagner-Döbler, I., von Canstein, H., Li, Y., Timmis, K.N. & Deckwer, W. (2000a). *Environ Sci Technol* **34**, 4628-4634.
 12. Wagner-Döbler, I., Lunsdorf, H., Lubbehusen, T., von Canstein, H.F. & Li, Y. (2000b). *Appl Environ Microbiol* **66**, 4559-4563.
 13. Wagner-Döbler. (2002). Recent advances in marine biotechnology volume 8 Bioremediation. p.189-201. Edited by Fingerman, M. & Nagabhushanam, R. department of ecology and evolutionary biology Tulane University, New Orleans, Louisiana, USA. Science Publishers, Inc.