

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 87-2611-B-002A-003

執行期限：86年8月1日至87年7月31日

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

本研究採集淡水河河口的挖仔尾、竹圍及關渡三地皆由紅樹科之水筆仔(*Kandelia candel* Druce)所形成之紅樹林純林其下之沈積物，進行其脫氮活性和脫氮細菌的計數、分離與鑑定之探討。採得之沈積物，利用乙炔阻斷法(acetylene blockage technique)，配合硝酸鹽或有機物之添加，及培養鹽度和溫度之改變，以檢測這些因子對其脫氮活性表現之影響。沈積物在硝酸鹽及葡萄糖同時添加之培養條件下，方能測得氧化亞氮(N_2O)生成；分別添加硝酸鹽、葡萄糖或兩者皆未添加時，則無脫氮活性表現。在不同鹽度，並同時添加硝酸鹽和葡萄糖培養，各處之沈積物皆有脫氮活性表現。以 35 和 40 培養，三處沈積物皆有氧化亞氮產生，而在 20、25 和 30 等較低溫度，則僅有竹圍和關渡之部份沈積物分別在 25 和 30 能測得脫氮活性。由以上結果推論，紅樹林沉積物的現場脫氮活性表現可能易受限於有機物或硝酸鹽之供給不足，鹽度應非沈積物脫氮活性之限制因子；而在夏季以外之時間，溫度可能成為沈積物脫氮活性之限制因子。沈積物中脫氮細菌菌數估算利用最可能數計數(most-probable-number counts, 略稱 MPN counts)法，配合含有 Polypepton Bacto-yeast extract 硝酸鹽及其它必須無機化合物的液體培養基，所估得菌數多介於 10^4 至 10^5 cells/g wet wt.間。從各 MPN 培養系列中共純化出二十九株具有運動能力之脫氮細菌，根據其革蘭氏反應、外型、發酵能力、運動性和對氯化鈉之需求等特性初步鑑定，其中二十六株具氯化鈉需求的革蘭氏陰性桿菌應為 *Alteromonas*、*Pseudomonas* 或 *Deleya*。其餘三株則不具氯化鈉需求，包括二株屬於 *Pseudomonas* 的革蘭氏陰性

桿菌及一株屬於 *Bacillus* 的革蘭氏陽性桿菌。

關鍵詞：脫氮細菌、紅樹林沈積物、水筆仔

Abstract

This work investigated denitrifying bacteria and their denitrifying activity in the sediment from forests of the mangrove *Kandelia candel* in the Tansui Estuary. The samples were collected from Watsuwe, Chuwei and Kuantu. Effects of nitrate, glucose, NaCl and temperature on the denitrifying (N_2O -producing) activity of the sediment samples were determined by the acetylene blockage technique. Nitrous oxide (N_2O) was never detectable unless the samples were supplemented with both nitrate and glucose. The levels of such potential denitrifying activity did not greatly differ in NaCl concentrations ranging from 0 to 3.5%. All the samples supplemented with both nitrate and glucose exhibited detectable activity within 12h incubation at 35 or 40 . However, activity was not detected from any of those incubated at 20 , and those incubated at 25 or 30 exhibited nil or relative low levels of activity. Insufficiency of both nitrate and organic matter would be apt to restrict the magnitude of in situ denitrification in the sediment of the mangrove forests. Salinity is probably not a limiting factor for the activity, whereas low temperature in the seasons other than summer would be a main factor limiting the expression of denitrifying activity. Denitrifying bacteria distributed in the mangrove forest sediment were enumerated by the most-probable-number (MPN) method

in liquid broth. The counting values ranged from 10^4 to 10^5 cells/g wet wt.. Twenty-nine rods-shaped, denitrifying bacteria isolated from the sediment samples were divided into three group according to the tests of Gram reactions、fermentation、motility and salt requirement. Twenty-six salt-requiring Gram-negative strains were identified as members of the group *Alteromonas-Pseudomonas-Deleya*. The other three strains that did not require salt for growth were identified as species of either *Pseudomonas* (two strains) or *Bacillus* (one strain).

Keywords : denitrifying bacteria、mangrove sediment、*Kandelia candel*

二、緣由與目的

硝酸鹽是一般陸地土壤和水生環境中含量頗豐的含氮化合物，許多植物和微生物可藉其作為氮源以合成本身所需要的核酸和蛋白質。硝酸鹽在細胞內被利用之前會先被還原成氨($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_3$)，此過程屬於同化型硝酸還原 (assimilatory nitrate reduction)(Atlas and Bartha, 1993)。有些微生物在氧供應量受限情況下能以硝酸鹽取代氧作為終端電子接受者，這是屬於異化型(或稱呼吸型)硝酸還原(dissimilatory nitrate reduction)(Gottshalk, 1986)，異化型硝酸還原通常在嫌氣條件下才能進行，脫氮(denitrification)作用為其中一種形式(Ford, 1993)，能將硝酸鹽或亞硝酸鹽還原成氧化亞氮(N_2O)或氮分子(N_2)等氣態含氮化合物(Knowles, 1982)。

脫氮之能引人興趣主要是因為：(1)其是造成農地施用氮肥流失的主要機制；(2)在家畜糞便之類含高氮有機污染物質的淨化處理方面，脫氮菌深具應用潛力；(3)脫氮過程中產生的氧化亞氮是破壞臭氧層的元兇之一；(4)脫氮過程為維持地球上氮循環平衡不可或缺的一環。自然界中除了少部分真菌能把硝酸鹽還原為氧化亞氮外(Shoun et al. 1992；Usuda et al., 1995)，已被發現具脫氮能力之生物皆屬細菌。已知脫氮細菌共有二十餘屬中之數十種

(Knowles, 1982)，它們絕大部分不具發酵糖類之能力；換言之，它們幾乎都如其他絕對好氣性細菌一般，無法在嫌氣性條件下行發酵增殖。本實驗室前些年曾經從墾丁沿岸海水和沈積物分離出上百株具好鹽性之脫氮菌，並從中篩檢出一些具發酵葡萄糖能力者。在這些具發酵葡萄糖能力的脫氮菌分離株中，吾人已經根據種種檢測結果推斷其中一株為一新種(Shieh & Liu 1996)。在前(85)年度計畫中吾人另從綠島海濱熱泉分離得最佳增殖溫度約為 50 之數株好熱性好鹽性脫氮細菌，值得一提的是這些脫氮菌分離株似乎只能在有氧下進行脫氮，此與現知之脫氮菌大不相同。

紅樹林生長在海陸交界之半淡鹹水或全鹹水之濕地，主要分佈在北緯25度至南緯25度之間，為熱帶或亞熱帶海岸樹種(薛, 1995)。其生長環境匯集河川及海洋所帶來的各種無機或有機營養物質，再加上紅樹林本身枯枝落葉的掉落與分解，可充分供給多種生物足夠的養分，形成完整的碎屑食物網，為具有高度生產力之生態系。從前曾經密生在台灣河口和沿岸的大片紅樹林，有不少已隨著大量開墾及污染而消失，幸好國內對於須善加保護目前僅存的紅樹林已有共識。有關紅樹林生態系之研究，自一九八〇年代以來，已經累積了不少有關動植物方面的研究成果，相對而言，此間微生物之相關研究資料仍極缺乏，紅樹林生態系中的脫氮菌據吾人所知，甚至還未有人進行過探討。本計畫擬以淡水河口紅樹林沈積物為對象，配合硝酸鹽和葡萄糖之添加，培養液鹽度和溫度之改變，以檢測此些因子對其脫氮活性表現之影響。並同時計數沈積物中脫氮菌菌數，分離且保存其中之脫氮細菌，最後則檢測各分離菌株之諸項外型、生理及生化特性，依此進行初步分群歸類。

三、結果

I. 各類樣品的脫氮活性

同時添加硝酸鉀和葡萄糖時，挖仔尾、竹圍和關渡等地之紅樹林沈積物，皆

有氧化亞氮 (N_2O)之生成(0.02~0.04 $\mu\text{mol } N_2O/\text{g wet wt. per h}$)。分別添加硝酸鉀和葡萄糖，或是兩者皆不添加時，則無脫氮活性之表現。

以 0、0.7、1.4、2.1、2.8 及 3.5% 等不同氯化鈉濃度，且同時添加硝酸鹽和葡萄糖之培養條件，在此三處之沈積物中，皆能測得脫氮活性之表現。關渡地區之沈積物，在氯化鈉濃度 0% 時測得最高之脫氮速率(0.12 $\mu\text{mol } N_2O/\text{g wet wt. per h}$)；挖仔尾地區之沈積物則在氯化鈉濃度 0 及 0.7% 時，測得最低脫氮活性(0.02 $\mu\text{mol } N_2O/\text{g wet wt. per h}$)。

不同溫度條件下，三地沈積物在 35 及 40 時，皆有脫氮活性表現(0.04~0.19 $\mu\text{mol } N_2O/\text{g wet wt. per h}$)；但在 20、25 和 30 時，只有竹圍及關渡兩地分別在 25 和 30 時可測得部份沈積物有氧化亞氮之生成(0.01 和 0.12 $\mu\text{mol } N_2O/\text{g wet wt. per h}$)。

II. 沈積物中脫氮細菌密度

不論好氣或嫌氣組，林下或裸灘地，以 MPN 法所得三地之脫氮細菌菌數介於 $1.1 \times 10^4 \sim 5.5 \times 10^5 \text{ cells/g wet wt.}$ 之間，但挖仔尾地區之脫氮細菌菌數較低($2 \times 10^3 \sim 7.5 \times 10^4 \text{ cells/g wet wt.}$)，尤其在嫌氣培養下，裸灘地菌數平均只有 $6.25 \times 10^3 \text{ cells/g wet wt.}$ 。

III. 脫氮菌之分離、純化與特性

利用含有 Durham tube 之 PYN broth medium 與 PY agar plate，共分離出二十九株脫氮細菌，分別自挖仔尾得到十一株，竹圍得到十二株，及關渡分得七株脫氮細菌。根據其革蘭氏反應、外型、發酵能力、運動性和對鈉鹽需求等特性初步鑑定，其中二十六株具鈉鹽需求的革蘭氏陰性桿菌應為 *Alteromonas*、*Pseudomonas* 或 *Deleya*。其餘三株則不具鈉鹽需求，包括二株屬於 *Pseudomonas* 的革蘭氏陰性桿菌及一株屬於 *Bacillus* 的革蘭氏陽性桿菌。

四、討論

同時添加硝酸鹽和葡萄糖時，方能自

沈積物中測得脫氮活性表現，顯現紅樹林沈積物之現場脫氮活性可能易受限於硝酸鹽和有機物之供給不足。沈積物中硝酸鹽有三個來源：藉擴散作用由水體進入沈積物；經由硝化作用產生以及透過地下水傳送(Seitzinger, 1988)。此紅樹林位在淡水河出海口，許多含多量氮之懸浮物質可能經由河水攜帶至此，Chiu 等人(1996)分析此處沈積物中硝酸鹽含量最高為 2.54 mg/kg soil，亦較他處，如澳洲北部之紅樹林為高。但脫氮活性表現仍不易測得，或仍有其他因子，如硝酸鹽在沈積物中擴散移動能力，影響現場脫氮作用之表現。沈積物中有機物則多透過間接方式影響脫氮作用。高量之有機質會刺激另一種異化型硝酸還原作用—硝酸/氨呼吸作用(nitrate/ammonia respiration)之進行，與脫氮作用同時競爭硝酸鹽。有機質在礦化作用(mineralization)時，氧氣之消耗更會改變沈積物中氧氣分佈，進而影響脫氮作用速率(Seitzinger, 1988)。

除了硝酸鹽和有機物之外，溫度亦為影響脫氮作用之因子(Seitzinger, 1988)。溫度增高能提高作用速率。但溫度提高時，相關作用，如硝化作用，氧氣之消耗等亦相對改變，使得在沈積物中溫度此因子不易單獨考慮。沈積物在不同溫度下之脫氮活性表現，35 和 40 時各地之沈積物皆可測得活性；在 20、25 和 30 等較低溫度時卻僅有部份區域樣品有氧化亞氮生成。而添加硝酸鹽和葡萄糖，不同鹽度等實驗中皆以 30 時培養，確可測得活性表現。所以除了添加硝酸鹽及有機物，高於 30 之溫度或亦有助於沈積物穩定表現脫氮活性。此區域紅樹林位於河海交界帶，夏季低潮時期，底泥直接曝露在空氣中，土溫可升高至 30 以上，其他季節則無法達到此高溫，推測在夏季以外之時間，溫度可能成為沈積物脫氮活性之限制因子。

利用 MPN 法估算沈積物中脫氮細菌菌數，約在 $10^4 \sim 10^5 \text{ cells/g wet wt.}$ 之間；其間培養試管中 Durham tube 亦可收集大量氣泡，可見沈積物中確實含有相當數量之脫氮細菌，且具有活性。但經過一系列分離

純化後，仍能篩選保有產生氣泡(脫氮活性)之分離株數量並不大。利用此類固體培養基，許多細菌種類往往無法在其表面形成菌落(colony)，估算所得細菌之 CFU 值(colony-forming unit)也多低於以 MPN 法所得之細菌菌數(Bianchi and Giuliano, 1996; Zweifel and Hagström, 1995)。所以即使以液體培養基培養顯示沈積物中含有脫氮細菌，仍可能因此無法在接續純化步驟分離得到脫氮細菌。再者，所形成肉眼可見之菌落，可能以其他非脫氮菌類為優勢菌落，如此進行分離步驟，可能更易造成所分得之脫氮菌數目偏低之現象。此外，僅利用 Durham tube 有無收集到氣泡而判定脫氮菌存在與否，對產生少量氣體之脫氮菌，可能無法藉此進行篩選，所測得之菌數往往較低於現場樣品中實際脫氮菌數。如欲提高脫氮菌之辨識率，或能於培養時預先於試管內注入乙炔氣體，經一段時間後，抽取試管頂部之氣體，並以氣相層析儀分析，以確定是否有氧化亞氮之生成。

分離脫氮菌株過程中，皆使用氯化鈉濃度為 1.5% 之培養基，只有具鈉鹽需求或耐鹽性之細菌種類能藉此分離。最後所得分離株約 90%(二十六株)屬於需鹽型菌株，並確實能產生氧化亞氮。但以不同氯化鈉濃度培養沈積物，所得之脫氮活性來看，其間仍有不具鈉鹽需求之陸源性脫氮微生物存在，可能藉雨水或河川而沖刷至此海陸交界處，而此類脫氮微生物可能對篩選時較高之鹽度(1.5%)耐受力較差，所以只能分得少量此類菌株。此二十六株具鈉鹽需求之脫氮菌，初步鑑定屬於 *Alteromonas*、*Pseudomonas* 或 *Deleya* 三個菌屬，尚需配合其他菌株特性，如 G+C 含量、16s rDNA 序列或其他生化特性，以進行更詳細之鑑定。而目前所知此些種類之海洋細菌具有脫氮能力者並不多，其中或有新種存在，仍待進一步研究。

五、計畫成果自評

(A)執行本計畫已完成：

- 1.挖仔尾、竹圍和關渡三處紅樹林沼澤區

沈積物脫氮活性之大小、差異和時節變化。

- 2.氧有無對於沈積物脫氮活性之影響。
- 3.硝酸鹽和葡萄糖添加對於沈積物脫氮活性之影響。
- 4.三處採樣測站沈積物中脫氮細菌之生菌數。
- 5.脫氮菌分離株的各種形態、生理和生化特性。
- 6.脫氮菌分離株的菌屬別(根據 5.之結果)。

(B)參與本計畫的工作人員已習得天然樣本及細菌株脫氮活性的測定法，並熟悉細菌的培養、計數、純化、分離、保存和鑑定等種種技術。

六、參考文獻

- Atlas, R. M., and Bartha, R.. 1993. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. Third edition. Benjamin and Cummings Publishing Company, Inc., Redwood City.
- Bianchi, A., and Giuliano, L.. 1996. Enumeration of viable bacteria in the marine pelagic environment. *Applied and Environmental Microbiology* 62:174-177.
- Chiu, C. Y., Lee, S. C., Juang, H. T., Hur, M. T., and Hwang, Y. H.. 1996. Nitrogen nutritional status and fate of applied N in mangrove soils. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 37:191-196.
- Ford, T. E.. 1993. *Aquatic Microbiology: an ecological approach*. Blackwell Scientific Publications, Inc..
- Gottshalk, G.. 1986. *Bacterial metabolism*. Second edition. Springer-Verlag New York Inc..
- Knowles, R.. 1982. Denitrification. *Microbiological Reviews* 46: 43-70.
- Seitzinger, S. P.. 1988. Denitrification in freshwater and coastal marine ecosystems: ecological and geochemical significance. *Limnology and Oceanography* 33:702-724.
- Shieh, W. Y., and Liu, C. M.. 1996.

- Denitrification by a novel halophilic fermentative bacterium. *Canadian Journal of Microbiology* 42:507-514.
- Shoun, H., Kim, D. H., Uchiyama, H., and Sugiyama, J.. 1992. Denitrification by the fungi. *FEMS Microbiology Letters* 84:277-282.
- Usuda, K., Toritsuka, N., Matsuo, Y., Kim, D. H., and Shoun, H.. 1995. Denitrification by the fungus *Cylindrocarpon tonkinense* : anaerobic cell growth and two isozyme forms of cytochrome P-450nor. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 883-889.
- Zweifel, U. L., and Hagström, Å.. 1995. Total counts of marine bacteria include a large fraction of non-nucleoid-containing bacteria(Ghosts). *Applied and Environmental Microbiology* 61:2180-2185.
- 薛美莉 1995. 消失中的濕地森林—記台灣的紅樹林。 台灣省特有生物保育研究中心。