

## 卅三、環境污染物質對水棲生物之影響

近 藤 雅 臣

日本大阪大學藥學部

### 1. 前 言

最近，全球性之環境污染問題在國際上曾被討論，同時對其預防措施亦積極被探討。其中關於環境或是環境設施之論題，從來皆以人類為中心。但是人類與環境並非對立，人類是地球生態系之一員，地球生物是相互平衡共存的，環境科學係以生態學為基礎原動力而得以發展。其中在環境生態學上，對環境淨化上扮演主要作用者為生態系分解者微生物，其研究空間很廣，今後有得發展。其中探討水棲微生物之生態及其環境污染物質對水棲微生物之影響等問題，最有效的方法為以化學物質為指標而進行之研究。另以對化學污染物質分解性有無或其他判定方法探討微生物地域差異性，以及過程中微生物相之變化等研究課題，均亦有待去探討。另一方面，隨著基因遺傳學的發展，對於重組基因之漏出而影響環境，及其在開放系之安全利用等問題探討均有待研究之進展。以下是這方面有關之研究部分成果。

### 2. 水污染和細菌相

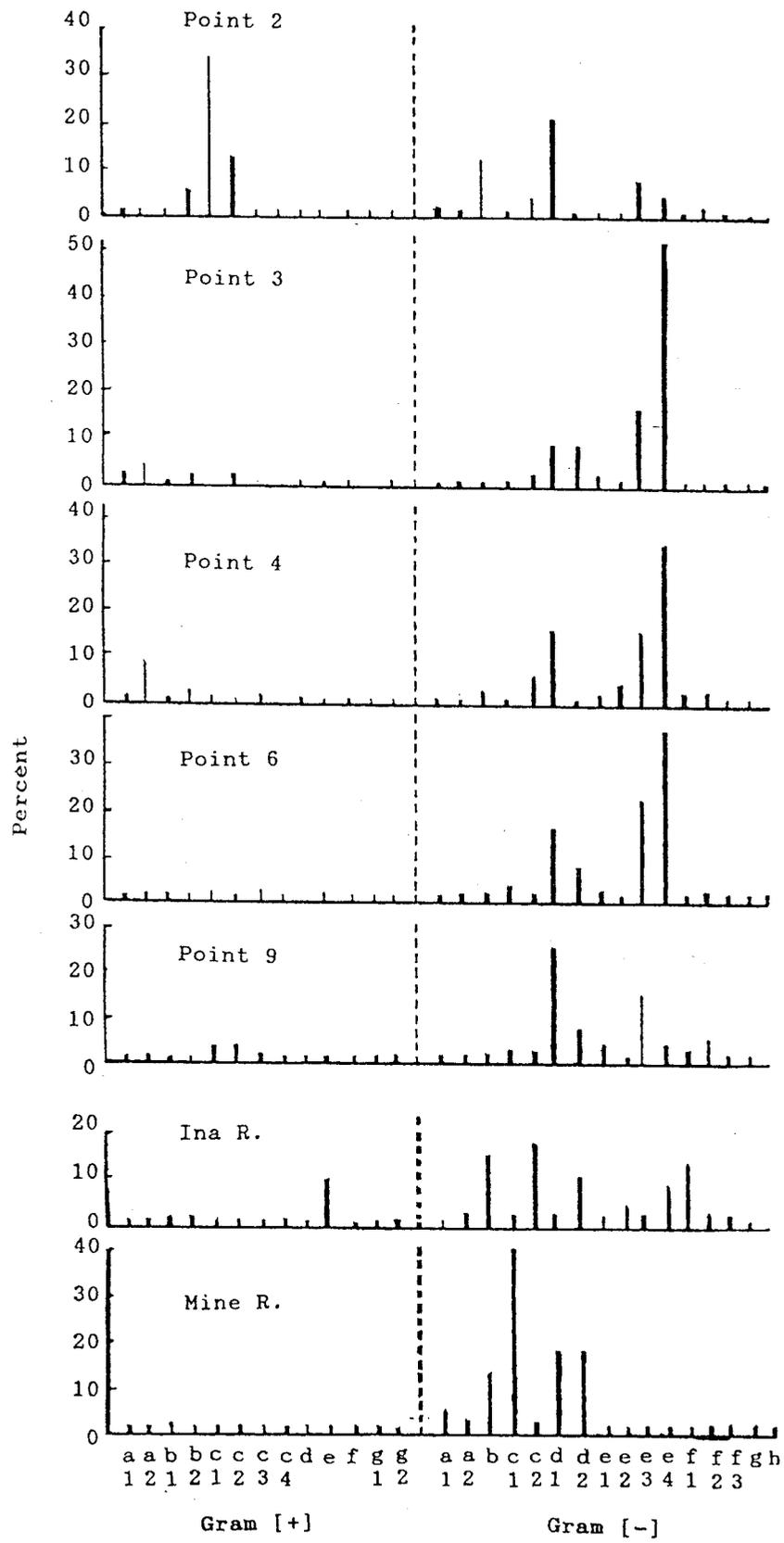
針對日本本州 6 河川和斐濟之河川，以 BOD 為指標，區分為污染和非污染水域，再依 Conan 法加以分類棲息該河川之微生物相，其結果如圖一所示。由圖一得知污染和非污染水域中、革蘭陰性 G(-) 菌所占比例較多，但污染水域之菌種較非污染水域者為多，同時革蘭陽性菌 G(+) 在污染水域可被檢出，其細菌相隨污染度而呈複雜化。另由 Ina 河川水系之上、中、下流之三地點採取試水，分別以 0.5 和 0.05% 營養寒天培養基培養，其細菌數如表一所示，得知細菌數隨總有機態氮 (TOC) 之增大而增加，另外 0.5 和 0.05% 營養寒天培養基所得之細菌數，對直接法所測者之比例，非污染水域為 1/100，污染水域為 1/10。此乃因貧營養細菌數無法以一般細菌數測定法測定之故。因此對於檢討水棲細菌之生態時，同時須表示佔重要部分之貧營養細菌有關之分類法。

### 3. 以形態特性為手段所開發之細菌數測定法

當評價化學物質對水棲細菌之影響時，須注意包含對前述貧營養細菌等多種菌種之影響。以階段式稀釋分離培養基之濃度加以測定細菌數，雖知以目視直接計數法所測之細菌為低，但單此種測定法並不够充分。因此仍重組如圖二所示之裝置，以 Acridine orange 將細菌染色後，置於螢光顯微鏡下，啟動畫像處理裝置，自動的將細菌形態加以分離，其分離所得細菌之各特徵如圖三所示，各特徵值再以電腦解析，其結果如表二所示。依據此種方法，觀察圖四所示水系中三地點試水之細菌相，即非污染水域點 Jakiue，家庭排廢水混入點 Segawa 和工廠排水流入點 Kawazubashi，經畫像解析之結果如表三、四所示，可知清淨的河川，小球菌所佔的比例較大。

### 4. 以化學物質之微生物分解性為指標而進行之河川評估

對探討河川水域之地域特異性或是污染程度的方法中，調查對特定化學物質有無其分解菌存在為一項被考慮的手段。關於化學物質之生物分解性試驗法，目前已有許多試驗法被提案，日本亦以 Miti



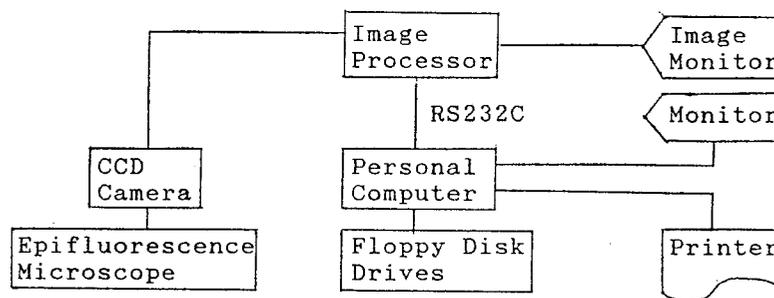
圖一 河川中之微生物相

Table 1. Number of bacteria and TOC in river water

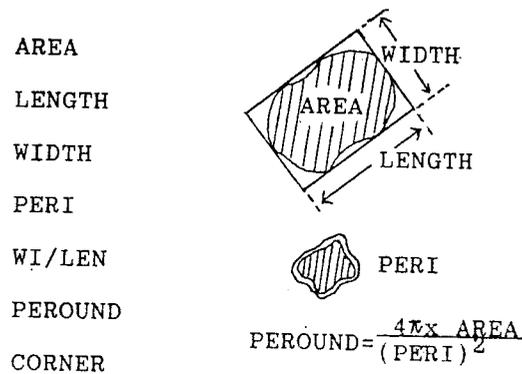
	Sampling point		
	Takiue	Segawa	Kuwazubashi
TOC* (ppm)	2.3	2.3	6.4
0.5 medium (CFU/ml)	$3.1 \times 10^3$	$3.7 \times 10^4$	$4.5 \times 10^5$
0.05 medium (CFU/ml)	$5.8 \times 10^3$	$6.7 \times 10^4$	$8.4 \times 10^5$
TOC** (cells/ml)	$1.9 \times 10^5$	$4.1 \times 10^5$	$2.6 \times 10^5$

\* TOC: Total organic carbon.

\*\* TDC: Total direct count.



圖二 畫像解析裝置



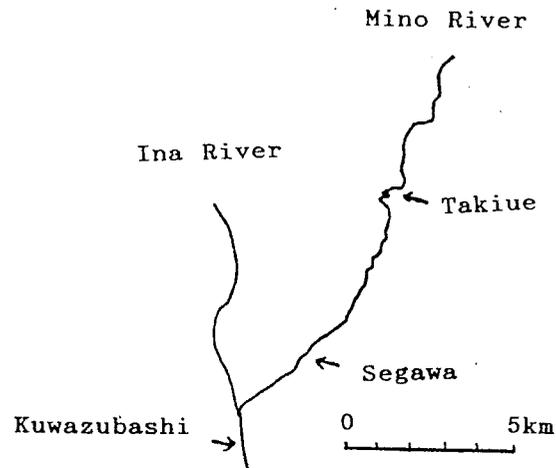
圖三 微生物之形態特徵指標

Table 2. Feature parameters of *P. fluorescens* and *E. coli*

Feature parameters	<i>P. fluorescens</i> *	<i>E. coli</i> **
AREA ( $\mu\text{m}^2$ )	$2.83 \pm 1.79$	$1.80 \pm 1.06$
LENGTH ( $\mu\text{m}$ )	$2.75 \pm 1.16$	$1.80 \pm 0.86$
WIDTH ( $\mu\text{m}$ )	$1.04 \pm 0.45$	$0.96 \pm 0.31$
PERI ( $\mu\text{m}$ )	$7.66 \pm 3.18$	$5.57 \pm 2.06$
WI/LEM	$0.33 \pm 0.14$	$0.55 \pm 0.16$
PEROUND	$0.58 \pm 0.10$	$0.69 \pm 0.09$
CORNER	$1.49 \pm 0.94$	$0.92 \pm 1.03$

\* Number of cases: 115.

\*\* Number of cases: 112.



圖四 探水地點

Table 3. Comparison of the WI/LEN histograms of bacteria from river

Sampling point	WI/LEN	Percentage
Takiue	-0.50	41.0
	0.50-0.60	17.5
	0.60-0.70	14.4
	0.70-0.80	6.4
	0.80-0.90	10.2
	0.90-1.00	10.5
Segawa	-0.50	51.0
	0.50-0.60	22.1
	0.60-0.70	14.0
	0.70-0.80	5.0
	0.80-0.90	2.0
	0.90-1.00	5.9
Kuwazubashi	-0.50	51.5
	0.50-0.60	17.0
	0.60-0.70	17.0
	0.70-0.80	7.4
	0.80-0.90	4.0
	0.90-1.00	4.1

法為起始而完成頗多之試驗法。但是這些方法做為檢討河川水棲細菌之動向則未必合適。我們已使用的方法為以河川水為微生物來源，在含 0.1% peptone 和水中被檢驗物質之培養液中培養後，測定被檢驗物質之減少量。這種方法之好處為短時間即可判明結果，但因加入低濃度之有機營養源，因此很難說可反映河川之實際作用狀態。因而另開發了 TOC die-anay 法，即以河川水為微生物來源，並以人工河川水中被檢驗物質為唯一碳素源，在暗所中培養，經測定 TOC 之變化，這種方法如圖五、六所示。利用此種方法檢討對化學物質分解性之季節變化，例如以 Aniline 調查之結果如圖七所示，其最終分解率均為 70% 以上，屬於易分解性，Aniline 分解一半所需時間，以二月試水最長

Table 4. Comparison of the area histograms of bacteria from river

Sampling point	Area ( $\mu\text{m}^2$ )	Percentage
Takiue	-0.5	49.0
	0.5-1.0	19.2
	1.0-1.5	15.4
	1.5-2.0	7.1
	2.0-2.5	3.2
	2.5-3.0	1.9
	3.0-3.5	2.5
	3.5-4.0	0.6
	4.0-4.5	0.6
	4.5-5.0	0.0
Segawa	-0.5	30.1
	0.5-1.0	25.2
	1.0-1.5	21.2
	1.5-2.0	10.6
	2.0-2.5	4.6
	2.5-3.0	1.7
	3.0-3.5	2.0
	3.5-4.0	2.0
	4.0-4.5	0.7
	4.5-5.0	0.7
Kuwazubashi	-0.5	20.5
	0.5-1.0	21.5
	1.0-1.5	17.6
	1.5-2.0	13.8
	2.0-2.5	10.0
	2.5-3.0	6.1
	3.0-3.5	2.8
	3.5-4.0	1.5
	4.0-4.5	0.6
	4.5-5.0	1.3

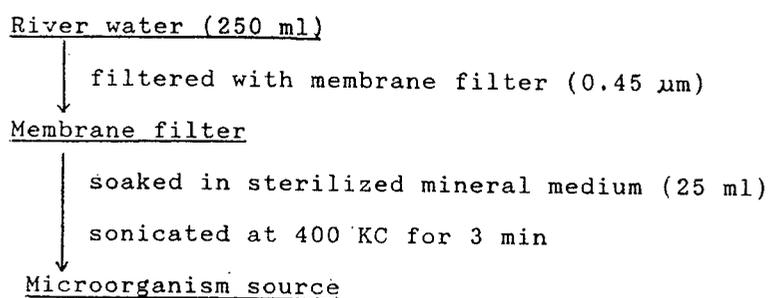


Fig. 5. Method for collection river bacteria.

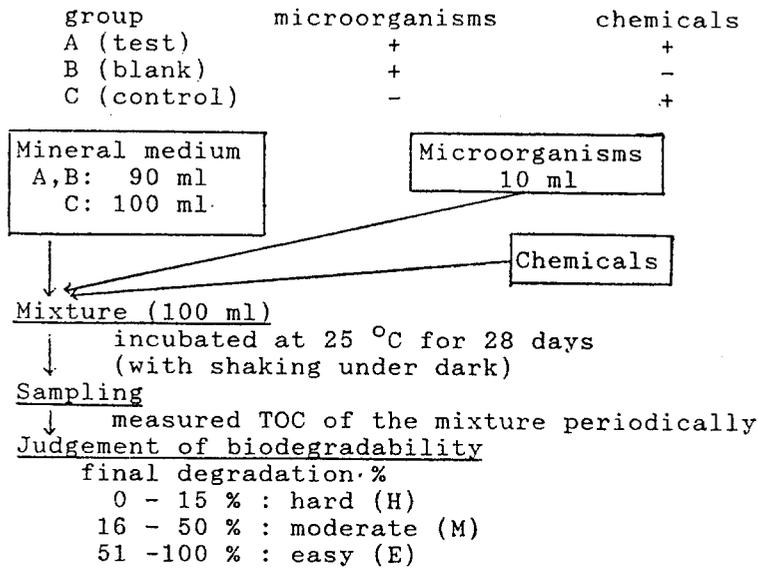


Fig. 6. Method for biodegradation test of chemicals.

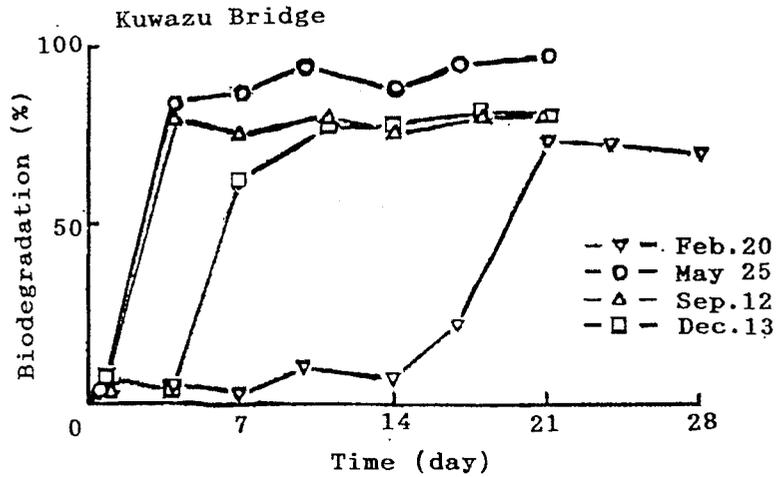


Fig. 7. Seasonal variation of aniline biodegradation in Ina River.

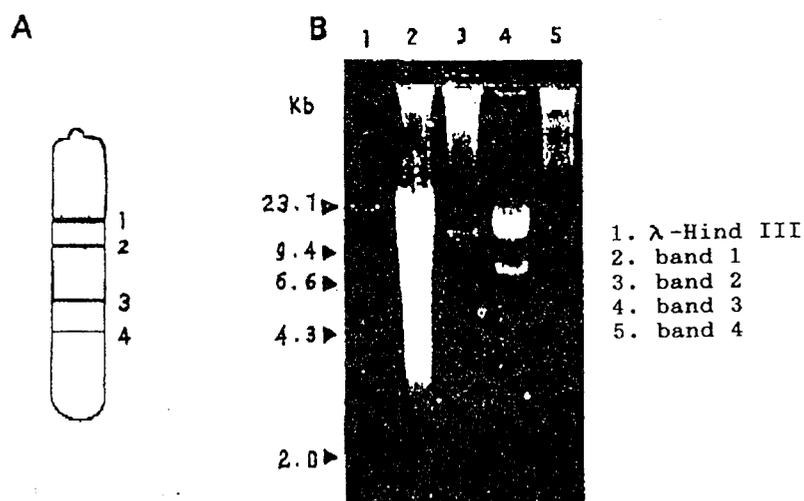
，五月和九月者較短，十二月者亦較長，可見呈現顯著之季節性變動。至於使用其它的化學物質亦是同樣結果。另外，由化學物質分解之曲線較由最終分解率更能獲知水中微生物之種類變化。同時亦可推測該河川受該化學物質之污染經驗度和現況。

### 5. Aniline 分解菌之分解能解析

我們已從河川水分離出數十株之 Aniline 分解菌，其中針對 *Alealigenes* 1~8 株之分解能進行探討。如表五所示，1~8 株經在 4°C 培育、SDS 和 Acridine orange 處理後，Aniline 分解能欠損株大約皆有 5% 之發生率。上述三種處理法都是去除細菌細胞內質體 (plasmid) 的方法，同時未經處理的對照組，亦無變異菌株出現，可見 1~8 菌株之 Aniline 分解能係存在於質體上。接著以分離巨大質體之 Hansen-Olsen 改良法由 1~8 菌株單離質體，粗質體經超遠心分離得到 4 個帶 (band)，每個帶以針筒取出，以 *E. coli* 制限酵素切斷如圖七一B 所示，在電泳圖上有 11 個帶，推想都是 1~8 菌株的質體。另由泳動圖型可推斷其質體之大小約為 40 kb。其次，以 Acridine

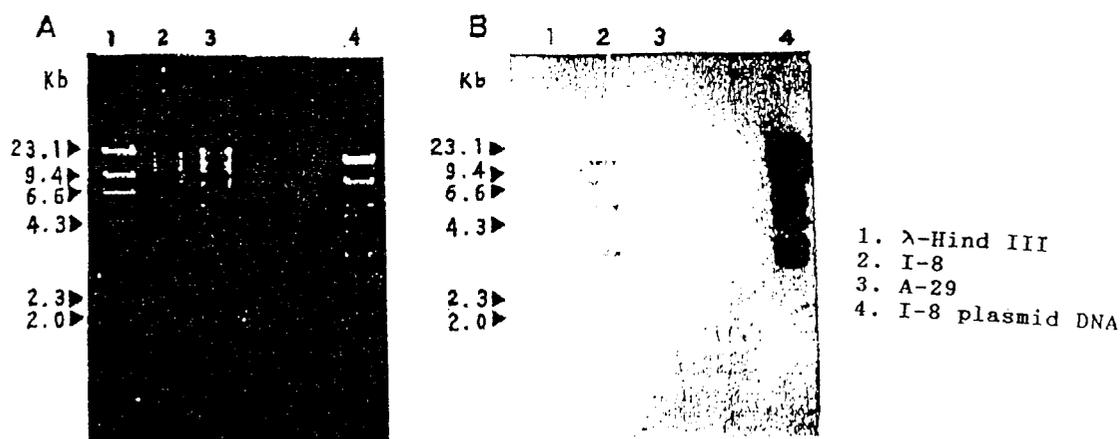
Table 5. Segregation of aniline utilizability from I-8

Treatment	Proportion of mutant (%)
Incubation at 4°C	4
SDS	4
Acridine orange	9
None	<1



(A) DAN bands after ultracentrifugation.  
 (B) *E. coli* restriction endonuclease digests of band 1 to 4.

Fig. 8. Agarose gel electrophoresis of I-8 plasmid DNA.



(A) Agarose gel electrophoresis      (B) Autoradiogram

Fig. 9 Southern blot analysis of total DNA from I-8 and A-29.

orange 處理 1~8 菌株後得到一株 A-29 之分解能欠損株，經解析得知無質體存在，推想係經 Acridine orange 處理後，質體即被脫落所致。爲了確認上述推論，將 1~8 菌株之質體以 Southern hybridization 進行鎖住，其結果如圖九所示，1~8 菌株之 total DNA 和質體的底片均呈現類似 1~8 菌株之質體帶，但 A-29 菌株則確認並無質體帶存在。另外細菌染色體 (chromosome) 之間並無雜交 (Hybridization)，所以 1~8 菌株之質體和染色體並不相同。由上述結果似乎可以預知，1~8 菌株的質體由外部傳達進來之可能性甚高。其他 Aniline 分解細菌亦進行相同的檢討，得知均保有與 1~8 菌株相同的 DNA，這些細菌之 Aniline 分解能，亦被推測是質體傳達的結果，但其傳達方式則尚不清楚。最近，有報告指出水棲噬菌體 (Phage) 具有 Aniline 分解能之質體，此噬菌體質體之傳達，推測由在菌體個體表面上之增殖所引起的傳達可能性，較噬菌體浮游在水中所引起者爲高。因此對於界面上有關微生物相動態的探討，有待今後之努力。(黃登福譯)