

## 己內醯胺脫氮菌之分離、脫氮情形與生理特性

王俊欽<sup>1</sup> 李季眉<sup>2</sup>

<sup>1</sup>弘光科技大學環境工程系

台中縣沙鹿鎮中棲路 34 號

<sup>2</sup>國立中興大學環境工程學系

台中市國光路 250 號

### 摘 要

己內醯胺為工業上常用之化學物質，若未妥善處理此類廢水即將其排入天然水體中，對整個水體生態及人類生活品質有很大之衝擊與傷害。本研究嘗試從丙烯腈-苯乙烯-丁二烯 (acrylonitrile-butadiene-styrene, ABS) 樹脂製造廠與聚丙烯腈 (polyacrylonitrile, PAN) 人造纖維製造廠中，分離及篩選出能利用己內醯胺脫氮之菌株，且瞭解實廠污泥及篩選所得的菌株以人工合成廢水中己內醯胺脫氮的情形。並使用分子生物技術，獲得己內醯胺脫氮菌的 16S rDNA 序列，配合網站搜尋到其他脫氮菌的 16S rDNA 序列，將不同菌株之序列加以比對後，希望得知己內醯胺脫氮菌與其他脫氮菌間的親緣關係。實驗結果顯示：不論 ABS 混合族群或 PAN 混合族群皆可利用 1538.5 mg/l 以下之己內醯胺進行脫氮，且適量之電子接受者是必要的。菌株 *Paracoccus versutus* MDC-3 與 *Paracoccus versutus* TDC-2 分別來自 ABS 樹脂製造廠與 PAN 人造纖維製造廠，該二株菌皆可利用 1445.8 mg/l 以下之己內醯胺脫氮，為使己內醯胺完全去除，適量之硝酸鹽氮是必要的。菌株 *P. versutus* MDC-3、*P. versutus* TDC-2 與 *Hyphomicrobium* sp. HM (甲醇脫氮菌)、*Methylosinus puelana* (甲烷脫氮菌)、*Magnetospirillum* sp. CC-26 (酚脫氮菌) 之親緣關係較近，而與其他脫氮菌之關係較遠。

**關鍵詞：**生物分解，己內醯胺，脫氮，*Paracoccus versutus*

## Isolation, Denitrification and Physiological Characterization of $\epsilon$ -Caprolactam Denitrifying Bacteria

CHUN-CHIN WANG<sup>1</sup> and CHI-MEI LEE<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Environmental Engineering, Hungkuang University

No. 34, Chung-Chie Rd., Shalu, Taichung County

<sup>2</sup>Department of Environmental Engineering, National Chung Hsing University

No. 250, Kuo-Kuang Rd., Taichung

### ABSTRACT

The chemical compound  $\epsilon$ -caprolactam is widely used in industry. Due to its carcinogenicity and toxicity, discharge of this chemical compound into natural water and soil systems may lead to an

adverse environmental impact on water quality, thus endangering public health and welfare. This study attempted to isolate and identify the denitrifying bacteria from an acrylonitrile-butadiene-styrene (ABS) resin-manufactured wastewater treatment system and a polyacrylonitrile (PAN) fiber-manufactured wastewater treatment system. These bacteria can utilize  $\epsilon$ -caprolactam for denitrification. Another aim of this study was to understand the function of isolated pure strains and mixed bacteria cultures in treating  $\epsilon$ -caprolactam from synthetic wastewater. Finally, phylogenetic trees were generated to understand the relationships between bacteria which can utilize  $\epsilon$ -caprolactam for denitrification by methods based on the 16S rDNA gene sequence. The results indicated that both ABS and PAN mixed bacteria cultures can utilize  $\epsilon$ -caprolactam up to 1538.5 mg/l for denitrification from synthetic wastewater. Moreover, a sufficient supply of a nitrate electron acceptor was necessary for the complete removal of  $\epsilon$ -caprolactam. *Paracoccus versutus* MDC-3 and *Paracoccus versutus* TDC-2 strains were isolated from the ABS resin-manufactured wastewater treatment system and the PAN fiber-manufactured wastewater treatment system, respectively. Both strains were able to utilize  $\epsilon$ -caprolactam up to 1445.8 mg/l for denitrification, a sufficient supply of nitrate being necessary for the complete removal of  $\epsilon$ -caprolactam. The strains *P. versutus* MDC-3, *P. versutus* TDC-2, *Hyphomicrobium* sp. HM (methanol denitrifying bacteria), *Methylosinus pucelana* (methane denitrifying bacteria) and *Magentospirillum* sp. CC-26 (phenol denitrifying bacteria) had intimate relationships on the basis of the phylogenetic trees.

**Key Words:** biodegradation,  $\epsilon$ -caprolactam, denitrification, *Paracoccus versutus*

## 一、前言

己內醯胺 ( $\epsilon$ -caprolactam) 主要作為尼龍 6 (合成纖維) 的單體, 亦作為軟片、塗料、油漆溶劑、聚尿素之強化劑及胺基酸、二氨基己酸之合成等用途 [2], 長期暴露於己內醯胺下會導致皮膚炎、發燒及身體疼痛 [15]。而已內醯胺製造廠所產生之廢水除己內醯胺外, 亦含有羧酸、含氧酸 (oxyacids)、環己酯 (cyclohexyl esters) 等, 由於對人類具有毒性, 且高的 COD 值會破壞生態, 所以需經審慎處理後才可放流。

微生物之脫氮作用可視為以硝酸鹽氮進行厭氧呼吸 [11], 且很多基質可作為脫氮作用所需之碳源。此外, 由於菌株利用難分解物質為電子供給者將硝酸鹽氮去除, 對污染物質去除、支出費用減少及環境保護皆有貢獻。故本研究嘗試從丙烯腈-苯乙烯-丁二烯 (acrylonitrile-butadiene-styrene, ABS) 樹脂製造廠第四廢水處理廠脫氮槽與聚丙烯腈 (polyacrylonitrile, PAN) 人造纖維製造廠廢水處理廠曝氣槽中, 分離及篩選出能以己內醯胺為基質進行脫氮之菌株, 且瞭解實廠污泥及篩選所得的菌株以人工合成廢水中己內醯胺為基質進行脫氮的情形。並使用分子生物技術, 獲得己內醯胺脫氮菌的 16S rDNA 序列, 配合 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 網站資料庫搜尋得到其

他脫氮菌的 16S rDNA 序列, 將不同菌株之序列加以比對後, 希望得知己內醯胺脫氮菌與其他脫氮菌間是否具有密切的親緣關係。

## 二、實驗材料與方法

### (一) 菌種分離

本研究使用之污泥來自某 ABS 樹脂製造廠第四廢水處理廠脫氮槽與 PAN 人造纖維製造廠廢水處理廠曝氣槽, 並利用低限培養基 (minimal medium) [6] 進行己內醯胺脫氮菌之分離工作。其分離方法為 (1) 取 3 ml 污泥及約 30 ml 之低限培養基置於無菌 50 ml 具玻璃蓋之試藥瓶中。(2) 依組別不同添加不同濃度之己內醯胺並搖晃均勻, 再取低限培養基注滿試藥瓶, 使瓶中含氣泡並密閉, 於 30°C 培養 1-7 天, 觀察有無氣體產生及培養液是否呈現混濁。(3) 若培養液呈現混濁且有氣體產生, 則自同一污泥來源之試藥瓶中各取 3 ml 菌液注入另一個已滅菌之試藥瓶中, 然後重複上述步驟, 如此重複四次。(4) 自同一系列且四次均有產氣之試藥瓶中取出菌液混合後作稀釋系列, 再於酵母抽出物培養基 (YE medium) 上塗抹, 於 30°C 下培養以獲得單一菌落。

## (二) 菌種篩選

本實驗之目的在初步瞭解分離所得之脫氮菌株能否以己內醯胺為基質進行脫氮。篩選方法為(1)以無菌棉花棒移植培養皿上的純菌至含磷酸鹽緩衝液(phosphate buffer medium, PBM)之無菌燒杯中,並以單光束分光光度計(Beckman Du® 530)於波長 600 nm 下調整菌液吸光度值為 0.1-0.2。(2)於 120 ml 血清瓶中加入 40 ml 之上述含菌 PBM。(3)曝氫氣 3 分鐘(流量 5 ml/s)以維持瓶內低溶氧與低氮氣狀態。(4)以 Teflon/Silicon 之墊片加上鋁蓋予以密封後,利用注射器加入基質,使菌液中己內醯胺濃度為 688 mg/l。(5)於 30°C 恆溫下以 120 rpm 振盪培養 1-7 天,觀察培養液是否呈現混濁。(6)若菌液呈現混濁,則抽取瓶頂空間之氣體以氣相層析儀—熱傳導性偵測器(gas chromatography-thermal conductivity detector, GC-TCD)分析是否有氮氣產生,並將菌液以 0.22µm Millipore PVDF 濾膜過濾後,以高效率液相層析儀—紫外線偵測器(high performance liquid chromatography-ultraviolet, HPLC-UV)分析己內醯胺是否去除。(7)記錄有產氮氣及己內醯胺被去除之菌株,而這些菌株將於批次試驗中再行探討其對己內醯胺之利用情形及其脫氮能力。PBM 之成份(g/l) [10, 16] 為  $MgSO_4 \cdot 7H_2O : 0.2$ 、 $K_2HPO_4 : 1.0$ 、 $KH_2PO_4 : 1.0$ 、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O : 0.02$  及微量元素每升中添加 10 ml。微量元素成份(mg/l)為  $FeSO_4 \cdot 7H_2O : 300$ 、 $MgCl_2 \cdot 4H_2O : 180$ 、 $CoCl_2 \cdot 6H_2O : 106$ 、 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O : 34$ 、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O : 40$ 。

## (三) 菌種鑑定

將欲進行菌種鑑定之菌株的染色體 DNA 萃取純化出來,經瓊脂糖(agarose)凝膠電泳確認 DNA 已獲得後,以聚合酶鏈反應器(polymerase chain reaction, PCR)將樣品中之 16S rDNA 倍增放大,再以瓊脂糖凝膠電泳分析確認 PCR 產物後,將所需之 16S rDNA 由瓊脂糖凝膠中純化出來,經電泳再次確認為 16S rDNA 後進行定序,最後將得到的 16S rDNA 序列送至基因序列資料庫(NCBI 網站上之 BLAST 程式)進行比對,即可獲悉該菌株之菌名。

PCR 操作條件為(1) 94°C、5 分鐘,進行 hot start,(2) 94°C、1 分鐘,使模版 DNA 產生變性,(3) 55°C、1 分鐘,讓引發物與模版 DNA 煉合,(4) 72°C、2 分鐘,進行 DNA 延長作用。如此重複 30 個循環,再於 72°C 反應 10 分鐘,使 DNA 之合成能充分延長。所使用之引發物(primer)為 27f 與 1492r。27f 為 5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG

-3'。其中 M 為 (AC)。1492r 為 5'-TACGGYT ACCTTGTTACGACTT-3'。其中 Y 為 (CT) [1]。

## (四) 批次實驗—以己內醯胺為基質之脫氮批次實驗

ABS 樹脂製造廠第四廢水處理廠脫氮槽之污泥(ABS 混合族群)、PAN 人造纖維製造廠廢水處理廠曝氣槽的污泥(PAN 混合族群)與純種菌株先經預培養且待菌株生長至足夠數量後,以冷凍離心機(Hitachi 20PR-52 型)於 4°C、6000 rpm 下離心 14 min,倒去上澄液,以磷酸鹽緩衝液清洗菌體以去除可能殘留於菌體上之基質,再於相同條件下離心,然後收集下層濃縮菌體,待以 PBM 作稀釋後,以單光束分光光度計(BECKMAN DU® 530)在 600 nm 下調整菌液吸光度值至 0.1,以控制參與反應之菌量,接著分裝至 120 ml 血清瓶至滿,然後以 Teflon/Silicon 之墊片予以密封(瓶內不可有氣泡存在)後,利用排水集氣法將瓶內 80 ml 之菌液以氫氣置換出來,並依實驗設計加入不同濃度己內醯胺,最後於 30°C 恆溫下以 120 rpm 振盪培養,並定期採樣分析。

## (五) 分析方法

### 1. 氮氣

菌株於分解己內醯胺時會將己內醯胺( $CH_2(CH_2)_4NHCO$ )中之氮以氨氮( $NH_3$ )的形式釋放出來,故監測反應過程中氨氮濃度之變化有助於瞭解己內醯胺之分解程度。氨氮濃度之分析是採吡啶酚藍法(indophenol-blue) [7]。

### 2. 己內醯胺

己內醯胺是以高效率液相層析儀(HPLC, Hitachi, 日本)進行分析,偵測器為紫外線/可見光偵測器(UV-VIS detector L-7400, Hitachi, 日本)。操作條件如下:偵測器之波長設定為 210 nm,使用之層析管柱為 Merck Lichrospher 100RP-18 endcapped (5µm),移動相(mobile phase)組成為  $CH_3CN : H_2O = 3 : 7$  (v/v),流量為 0.6 ml/min。

### 3. 硝酸鹽氮、亞硝酸鹽氮

硝酸鹽氮及亞硝酸鹽氮是以高效率液相層析儀(HPLC, Hitachi, 日本)進行分析,偵測器為電導度偵測器(Conductivity detector L-7470, Hitachi, 日本)。操作條件如下:層析管柱為 Hamilton PRP-X100 (10µm),移動相組成為 4 mM p-Hydroxybenzoic acid+2.5% methanol, pH=8.5,流量為 2 ml/min。

### 4. 氮氣(nitrogen gas)

氮氣之分析係以氣相層析儀—熱傳導性偵測器

[(GC-TCD), Hewlett Packard (HP) 6890] 進行分析。操作條件如下：使用之層析管柱為不鏽鋼材質，型號為 Molecular sieve 5Å，長度為 3 m，爐溫 80°C，注射口溫度 150°C，偵測器溫度 200°C，攜帶氣體為氫氣，流量為 20 ml/min。

5. 酸鹼度值 (pH)、溶氧量 (DO)、菌株生長狀況 (optical density, O.D.)

監測 pH 值變化所用之 pH meter 為 RADIOMETER COPENHAGEN 廠牌之 PHM82 standard pH meter，而電極之型號為 pHC2005。監測溶氧變化所用之 DO meter 為 Wissenschaftlich Technische Werkstätten (WTW) 廠牌之 Microprocessor oximeter，型號為 OXI-96。此外監測吸光度值之變化來代表菌株的生長狀況，本研究是以單光束分光光度計 (Beckman Du® 530) 於波長 600 nm 下監測菌株之吸光度值變化，其菌株生長狀況以 O.D.<sub>600</sub> 表示。

#### (六) 己內醯胺脫氮菌與其他脫氮菌之親緣關係

將己內醯胺脫氮菌之 16S rDNA 與利用 NCBI 網站搜尋系統或 SDSC Biology Workbench 網站中之 Ndjinn Multiple Database Search 搜尋系統，搜尋獲得利用其他基質 (非己內醯胺) 進行脫氮之菌株的 16S rDNA 序列作組合後，利用 SDSC Biology Workbench 網站中之 CLUSTAL TREE-Phylogenetic Analysis with Clustal W 作出類源樹 (演化樹，Phylogenetic tree)，經由類源樹初步瞭解己內醯胺脫氮菌與其他脫氮菌間是否具有密切的親緣關係。

### 三、結果與討論

#### (一) 己內醯胺脫氮菌之分離、篩選及鑑定

以己內醯胺為基質之脫氮菌的分離結果總共得到 9 株菌，其中編號 MDC-1~MDC-3 的 3 株菌是來自 ABS 樹脂製造廠第四廢水處理廠脫氮槽中，而另 6 株菌 TDC-1~TDC-6 是由 PAN 人造纖維製造廠廢水處理廠曝氣槽中分離得到。

經初步測試菌株 MDC-3、TDC-2、TDC-4、TDC-5 及 TDC-6 可以己內醯胺為基質進行脫氮作用。菌株 MDC-3 與 TDC-2 之 16S rDNA 序列經 NCBI 網站之基因序列資料庫比對後，菌名皆為 *Paracoccus versutus*。雖菌株 MDC-3 與 TDC-2 鑑定出之菌名相同，但其 16S rDNA 序列中之鹽基仍不完全相同，且來自不同之反應槽，故將菌株 MDC-3 稱為 *P. versutus* MDC-3，菌株 TDC-2 稱為 *P. versutus* TDC-2。

#### (二) 混合族群以己內醯胺為基質之脫氮情形

1. ABS 樹脂製造廠第四廢水處理廠脫氮槽之污泥 (以下簡稱 ABS 混合族群)

圖 1 為 ABS 混合族群於低溶氧狀況下對人工合成廢水中 880.2 mg/l 己內醯胺與 1200.7 mg/l 硝酸鹽氮之去除情形。己內醯胺於 22.7 小時及 34.4 小時分別被降解 182.4 mg/l 與 496 mg/l，至 44.3 小時還剩餘 214.1 mg/l。硝酸鹽氮於 22.7 小時及 34.4 小時分別被去除 369.1 mg/l 與 1085.3 mg/l，至 44.3 小時去除完畢。亞硝酸鹽氮隨硝酸鹽氮及本身被去除而變化，於 44.3 小時累積濃度為 0 mg/l。混合族群 O.D.<sub>600</sub> 值隨基質利用而上昇及本身行內呼吸作用而下降，於 45.3 小時為 0.964。pH 值則隨己內醯胺被降解、硝酸鹽氮被還原生成氮氣而上升至 45.2 小時達 9.03。溶氧量 (DO 值) 維持在低值以利脫氮進行。氮氣則隨硝酸鹽氮、亞硝酸鹽氮被還原而增加，至 44.3 小時累積 190 μmol。為避免混合族群因硝酸鹽氮缺乏而無法繼續降解己內醯胺，故於 45.2 小時添加 739.6 mg/l 硝酸鹽氮。再添加之硝酸鹽氮於 83.9 小時還剩下 252.3 mg/l，而已內醯胺則於 83.9 小時去除殆盡。混合族群 O.D.<sub>600</sub> 值、pH 值、亞硝酸鹽氮、氮氣濃度於 85 小時分別為 0.756、8.91、57.6 mg/l 與 374.8 μmol。

圖 2 為 ABS 混合族群於低溶氧狀況下對人工合成廢水中 1630.7 mg/l 己內醯胺與 1176.7 mg/l 硝酸鹽氮之去除情形。己內醯胺於 22.8 小時及 35.1 小時分別被用掉 138.1 mg/l 與 602.7 mg/l，至 44.6 小時還殘留 958.7 mg/l。硝酸鹽氮於 22.8 小時及 35.1 小時分別被去除 311.3 mg/l 與 1174.9 mg/l，至 44.6 小時偵測不到。亞硝酸鹽氮之變化與前述相似，至 44.6 小時累積濃度為 24.7 mg/l。混合族群 O.D.<sub>600</sub> 值、pH 值、

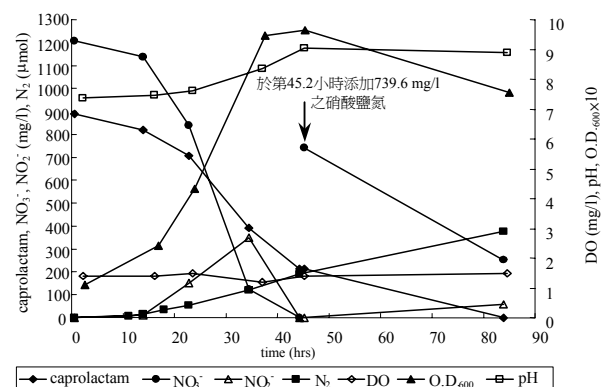


圖 1. ABS 混合族群去除 880.2 mg/l 己內醯胺及 1200.7 mg/l 硝酸鹽氮之情形

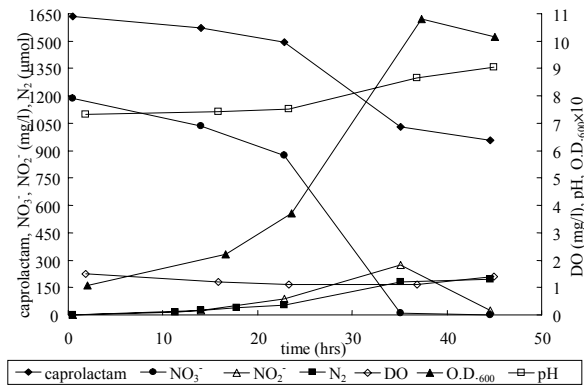


圖 2. ABS 混合族群去除 1630.7 mg/l 己內醯胺及 1176.7 mg/l 硝酸鹽氮之情形

氮氣濃度變化與前述相似，於 45.1 小時分別為 1.017、9.06 與 195.2 $\mu$ mol。實驗終止 44.6 小時，氮氣累積量小於理論生成量，故推測血清瓶中應有其他氣體如一氧化氮、氧化亞氮的累積。

2. PAN 人造纖維製造廠廢水處理廠曝氣槽的污泥（以下簡稱 PAN 混合族群）

PAN 混合族群於低溶氧狀況下對人工合成廢水中 784.3 mg/l 己內醯胺與 1504.6 mg/l 硝酸鹽氮之去除情形如圖 3 所示。己內醯胺於 83.6 小時及 116.8 小時分別被用掉 246.9 mg/l 與 406.9 mg/l，至 137.1 小時還殘留 334.2 mg/l。硝酸鹽氮於 83.6 小時及 116.8 小時分別被去除 313.3 mg/l 與 884.3 mg/l，至 137.1 小時還殘留 495 mg/l。實驗終止 137.1 小時還殘留己內醯胺與硝酸鹽氮之原因可能為反應時間不足，只要實驗時間足夠，己內醯胺或硝酸鹽氮其中之一應會被去除殆盡。亞硝酸鹽氮隨硝酸鹽氮及本身被去除而變化，於實驗終止累積 67.1 mg/l。PAN 混合族群生長之遲滯期約為 14.8 小時，爾後混合族群 O.D.<sub>600</sub> 值隨反應進行而上升至 137.9 小時達最大值 0.315。pH 值隨己內醯胺被去除、硝酸鹽氮、亞硝酸鹽氮被還原而上升至 137.7 小時達 8.87。溶氧量（DO 值）維持在低值以利脫氮進行。氧化亞氮於硝酸鹽氮被大量還原時出現，至實驗終止共累積 239.7 $\mu$ mol。氮氣則隨氧化亞氮被還原而增加，至 137.1 小時只累積 45.1 $\mu$ mol，顯示 PAN 混合族群產生之氧化亞氮還原酵素量不足或者活性不高，故不能將氧化亞氮完全還原生成氮氣。

圖 4 為 PAN 混合族群於低溶氧狀況下對人工合成廢水中 1538.5 mg/l 己內醯胺與 1475.6 mg/l 硝酸鹽氮之去除情

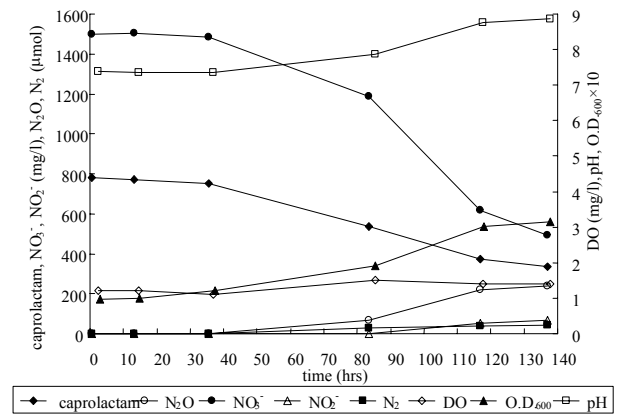


圖 3. PAN 混合族群去除 784.3 mg/l 己內醯胺及 1504.6 mg/l 硝酸鹽氮之情形

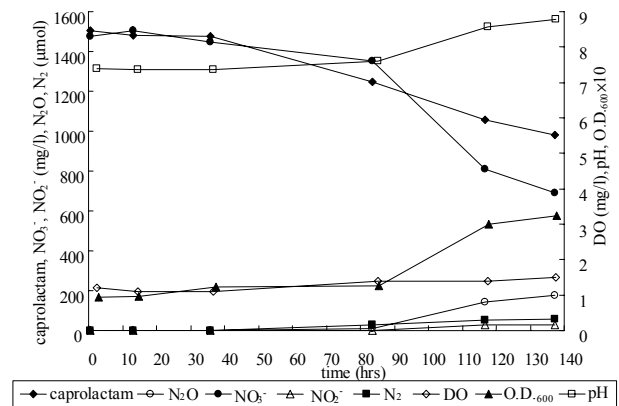


圖 4. PAN 混合族群去除 1538.5 mg/l 己內醯胺及 1475.6 mg/l 硝酸鹽氮之情形

形。己內醯胺於 83.5 小時及 116.8 小時分別被降解 257.2 mg/l 與 450.1 mg/l，至 137.2 小時還剩餘 981.8 mg/l。硝酸鹽氮於 83.5 小時及 116.8 小時分別被去除 125.1 mg/l 與 666.1 mg/l，至 137.2 小時還剩餘 690.6 mg/l。實驗終止還殘留己內醯胺與硝酸鹽氮之原因應仍為反應時間不足。亞硝酸鹽氮於實驗終止累積 27.1 mg/l。PAN 混合族群之遲滯期為 14.7 小時，爾後混合族群 O.D.<sub>600</sub> 值隨反應進行而上升至 137.8 小時達 0.323。pH 值、氧化亞氮與氮氣於反應終止（137.8 小時）分別為 8.79、176.1 $\mu$ mol 與 55.5 $\mu$ mol。

### 3. 討論

為進一步瞭解 ABS 混合族群與 PAN 混合族群以不同濃度己內醯胺為基質進行脫氮之菌株生長情形，故將圖 1-4 中之實驗結果經計算彙集成表 1。由表中可知，ABS 混合族群對己內醯胺去除速率與 ABS 混合族群之比生長速率，於不

表 1. 混合族群以己內醯胺進行脫氮之生長與基質利用情形的比較

菌株名稱	項目	己內醯胺 濃度(mg/l)*	
		880.2 (784.3)	1630.7 (1538.5)
ABS 混合族群	己內醯胺去除速率(mg/l/hr)	20.7	20.9
	比生長速率(hr <sup>-1</sup> )	0.065	0.077
	己內醯胺/硝酸鹽氮(mg/l/mg/l)	0.56	0.59
PAN 混合族群	己內醯胺去除速率(mg/l/hr)	4.3	5.0
	比生長速率(hr <sup>-1</sup> )	0.011	0.010
	己內醯胺/硝酸鹽氮(mg/l/mg/l)	0.49	0.70

\*() 中數值為 PAN 混合族群實驗時採用之己內醯胺濃度

同己內醯胺濃度下差異不大。當己內醯胺濃度小於 1630.7 mg/l 時，ABS 混合族群利用 1mg/l 之硝酸鹽氮可去除 0.56-0.59 mg/l 之己內醯胺。而 PAN 混合族群對己內醯胺去除速率與 PAN 混合族群之比生長速率，於不同己內醯胺濃度下差異亦不大，不過數值皆不高，顯示 PAN 混合族群雖可以己內醯胺為基質進行脫氮但速度緩慢，且利用己內醯胺或其中間產物生長之狀態不理想。當己內醯胺濃度小於 1538.5 mg/l 時，PAN 混合族群利用 1mg/l 之硝酸鹽氮可去除 0.49-0.70 mg/l 之己內醯胺。

由圖 1-4 與表 1 中可知，不論 ABS 混合族群或 PAN 混合族群皆可利用己內醯胺為基質進行脫氮，且適量之電子接受者與反應時間充足是必要的，如此才不致使無機鹽溶液中殘留己內醯胺或硝酸鹽氮、亞硝酸鹽氮，亦不會造成氧化亞氮的累積。雖然二者皆可利用己內醯胺產氣，但由於來源不同故表現上仍有差異。ABS 混合族群以己內醯胺為基質進行脫氮時，其去除己內醯胺所需之時間較 PAN 混合族群少，亦即己內醯胺去除速率較快。比生長速率方面，同一己內醯胺濃度下，ABS 混合族群生長情形優於 PAN 混合族群。造成兩者差異之可能原因為原先 ABS 混合族群與 PAN 混合族群中菌落組成不同，經己內醯胺馴養後將其差異擴大所致。

### (三) 己內醯胺脫氮菌以己內醯胺為基質之脫氮情形

#### 1. *P. versutus* MDC-3

菌株 *P. versutus* MDC-3 於低溶氧狀況下，對人工合成廢水中 784.3 mg/l 己內醯胺及 1805.5 mg/l 硝酸鹽氮的去除情形如圖 5 所示。784.3 mg/l 之己內醯胺於 66.5 小時被去除 650.9 mg/l，至 87.7 小時去除殆盡。硝酸鹽氮隨反應進行被去除，於 37.2 小時、47.3 小時及 66.5 小時分別用掉 60.9mg/l、

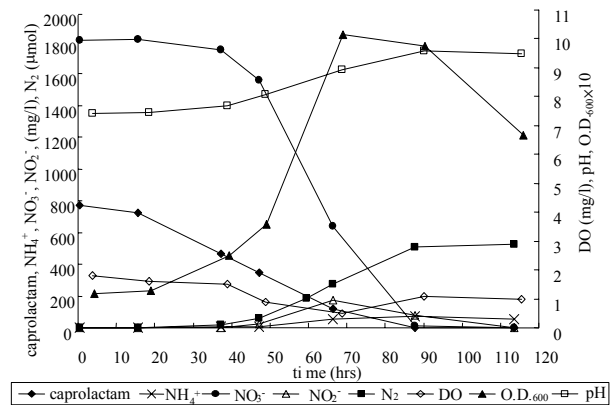


圖 5. *P. versutus* MDC-3 去除 784.3 mg/l 己內醯胺及 1805.5 mg/l 硝酸鹽氮之情形

247.9 mg/l 與 1168.6 mg/l，至 113.6 小時去除完全。亞硝酸鹽氮於硝酸鹽氮去除速率大於亞硝酸鹽氮降解速率時出現，爾後因硝酸鹽氮缺乏而亞硝酸鹽氮繼續被利用而降至 0 mg/l。己內醯胺已去除殆盡但仍有電子接受者—硝酸鹽氮、亞硝酸鹽氮繼續被降解之可能原因為菌株 *P. versutus* MDC-3 持續將己內醯胺之中間產物礦化成二氧化碳。菌株 O.D.<sub>600</sub> 值隨基質被利用而上昇，於 69 小時達最大值 1.016，爾後因菌株 *P. versutus* MDC-3 行內呼吸作用故隨反應進行而遞減。pH 值隨脫氮進行而上昇，於監測時間終止為 9.50。氨氮隨己內醯胺被降解而緩慢上昇，於 113.6 小時達 55.3 mg/l，不過氨氮增加量小於理論生成量 [1 mol 己內醯胺 (CH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCO) 若生成 1 mol 氨氮，784.3 mg/l 之己內醯胺應產生 124.9 mg/l NH<sub>4</sub><sup>+</sup>]，推測其原因為 (1) 減少之量用於合成細胞生物質量；(2) 己內醯胺部份礦化成二氧化碳，但其餘仍處於中間產物胺基酸等狀態。氮氣隨硝酸鹽氮、亞硝酸鹽氮被去除與基質被利用而產生，於實驗結束 113.6 小時累積 525.8 μmol。

圖 6 為菌株 *P. versutus* MDC-3 對人工合成廢水中 1538.5 mg/l 己內醯胺及 1770.8 mg/l 硝酸鹽氮的去除情形。己內醯胺於 47.6 小時被用掉 120.6 mg/l，至 88 小時還剩餘 777.4 mg/l。硝酸鹽氮於 37.5 小時、47.6 小時及 66.9 小時分別被去除 79.5 mg/l、191 mg/l 與 600.6 mg/l，至 88 小時去除完畢。亞硝酸鹽氮於 88 小時殘留 177.3 mg/l。菌株 O.D.<sub>600</sub> 值隨基質被利用而上昇，於 90.3 小時達 1.129。pH 值與氨氮分別隨脫氮進行與己內醯胺被降解而上昇，於監測時間終止分別為 9.31 與 76 mg/l。氮氣於實驗結束 88 小時累積 450.6 μmol。

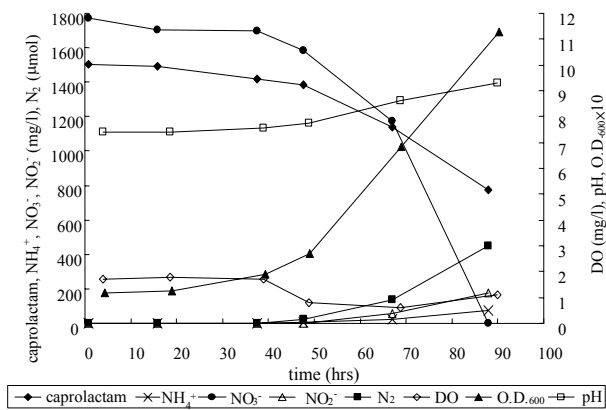


圖 6. *P. versutus* MDC-3 去除 1538.5 mg/l 己內醯胺及 1770.8 mg/l 硝酸鹽氮之情形

## 2. *P. versutus* TDC-2

圖 7 為菌株 *P. versutus* TDC-2 於低溶氧狀況下，對人工合成廢水中 784.3 mg/l 己內醯胺及 1203.7 mg/l 硝酸鹽氮的去除情形。己內醯胺於 32.4 小時開始被去除，分別於 69.9 小時與 95.9 小時被用掉 67.5 mg/l 與 264.5 mg/l，至 137.6 小時還剩餘 124.5 mg/l。硝酸鹽氮於 47.4 小時開始被去除，於 69.9 小時及 95.9 小時分別降解 71.7 mg/l 與 436.5 mg/l，至 137.6 小時已去除完畢。己內醯胺於 137.6 小時仍殘留之原因為無機鹽溶液中電子接受者已用盡所致。亞硝酸鹽氮於實驗過程中皆未監測到，可知硝酸鹽氮被降解成亞硝酸鹽氮後快速被還原成氧化亞氮或氮氣。菌株生長之遲滯期為 33.7 小時，爾後菌株 O.D.<sub>600</sub> 值隨基質被利用而上昇，於 139 小時達最大值 0.904。pH 值隨脫氮進行而上昇，於監測時間終止為 9.29。氨氮變化與前述相似，於實驗結束 137.6 小時達 96.2 mg/l。氧化亞氮與氮氣於 137.6 小時分別累積 272 µmol 與 96.4 µmol。

菌株 *P. versutus* TDC-2 對人工合成廢水中 1445.8 mg/l 己內醯胺及 1183.4 mg/l 硝酸鹽氮的去除情形如圖 8 所示。1445.8 mg/l 之己內醯胺於 47.8 小時開始被菌株 *P. versutus* TDC-2 去除，分別於 138.1 小時與 218.5 小時被降解 134.5 mg/l 與 532.7 mg/l，至 238.9 小時還殘留 802.4 mg/l。硝酸鹽氮於 47.8 小時開始被去除，於 138.1 小時及 218.5 小時分別被用掉 159.9 mg/l 與 937 mg/l，至 238.9 小時去除完畢。菌株生長遲滯期為 33.7 小時。菌株 O.D.<sub>600</sub> 值、pH 值、氨氮、氧化亞氮及氮氣變化與前述相似，於實驗結束 238.9 小時分別為 0.867、9.15、109 mg/l、220.9 µmol 與 147.2 µmol。

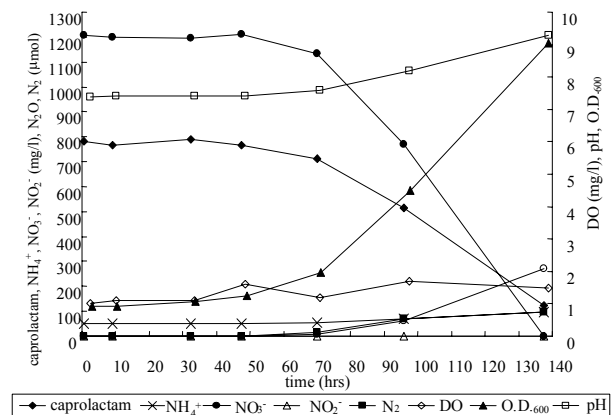


圖 7. *P. versutus* TDC-2 去除 784.3 mg/l 己內醯胺及 1203.7 mg/l 硝酸鹽氮之情形

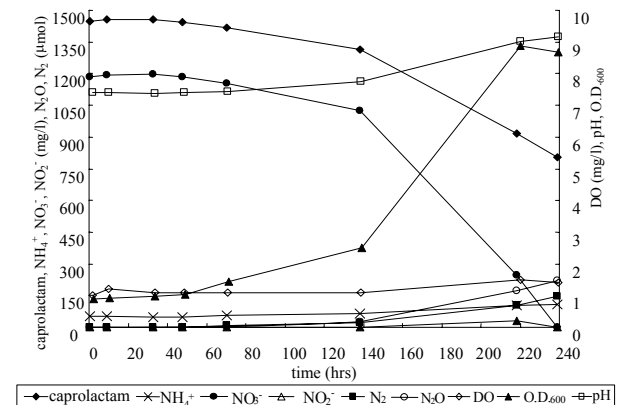


圖 8. *P. versutus* TDC-2 去除 1445.8 mg/l 己內醯胺及 1183.4 mg/l 硝酸鹽氮之情形

## 3. 討論

為進一步瞭解菌株 *P. versutus* MDC-3 與 *P. versutus* TDC-2 以不同濃度己內醯胺為基質進行脫氮之菌株生長情形，故將圖 5-8 中之實驗結果經計算彙集成表 2。由表中可知，菌株 *P. versutus* MDC-3 對己內醯胺去除速率與菌株 *P. versutus* MDC-3 之比生長速率，於不同己內醯胺濃度下差異不大。當己內醯胺濃度小於 1538.5 mg/l 時，菌株 *P. versutus* MDC-3 利用 1mg/l 之硝酸鹽氮可去除 0.43-0.47 mg/l 之己內醯胺。而菌株 *P. versutus* TDC-2 去除己內醯胺之速率並不快，且隨己內醯胺濃度增加而降低，顯示降解己內醯胺之酵素活性會受己內醯胺濃度影響。此外，當己內醯胺濃度小於 784.3 mg/l 時，菌株 *P. versutus* TDC-2 之比生長速率維持在 0.022 hr<sup>-1</sup>，但己內醯胺濃度高至 1445.8 mg/l 時，菌株 *P. versutus* TDC-2 之比生長速率降至 0.012 hr<sup>-1</sup>，顯示菌株生長

表 2. 純種菌株以己內醯胺進行脫氮之生長與基質利用情形的比較

菌株名稱	項目	己內醯胺濃度(mg/l)*	
		784.3 (784.3)	1538.5 (1445.8)
<i>P. versutus</i> MDC-3	己內醯胺去除速率(mg/l/hr)	11.8	13.0
	比生長速率(hr <sup>-1</sup> )	0.041	0.034
	己內醯胺/硝酸鹽氮(mg/l/mg/l)	0.43	0.47
<i>P. versutus</i> TDC-2	己內醯胺去除速率(mg/l/hr)	8.8	5.0
	比生長速率(hr <sup>-1</sup> )	0.022	0.012
	己內醯胺/硝酸鹽氮(mg/l/mg/l)	0.54	0.54

\*()中數值為菌株 *P. versutus* TDC-2 實驗時採用之己內醯胺濃度

會受己內醯胺濃度影響。當己內醯胺濃度小於 1445.8 mg/l 時，1 mg/l 硝酸鹽氮約可去除 0.54 mg/l 的己內醯胺。

菌株 *P. versutus* MDC-3 與 ABS 混合族群相較之下，ABS 混合族群以己內醯胺進行脫氮之速率與利用己內醯胺生長之情形均優於菌株 *P. versutus* MDC-3 (表 1-2)。而菌株 *P. versutus* TDC-2 與 PAN 混合族群相較之下，當己內醯胺濃度小於 784.3 mg/l 時，菌株 *P. versutus* TDC-2 對己內醯胺之去除速率優於 PAN 混合族群，且菌株 *P. versutus* TDC-2 之生長情形較 PAN 混合族群好。不過當己內醯胺濃度高至 1445.8 mg/l 時，兩者之比生長速率與對己內醯胺之去除速率相似 (表 1-2)。

菌株 *P. versutus* MDC-3 與 *P. versutus* TDC-2 雖皆可以己內醯胺為基質進行脫氮，但菌株 *P. versutus* MDC-3 利用己內醯胺脫氮之能力較菌株 *P. versutus* TDC-2 強，且較不受己內醯胺濃度變化影響。雖然此二株菌經 16S rDNA 序列菌種鑑定皆為 *Paracoccus versutus*，但由於此二株菌來源不同 (菌株 *P. versutus* MDC-3 與 *P. versutus* TDC-2 分別來自 ABS 樹脂製造廠第四廢水處理廠脫氮槽與 PAN 人造纖維製造廠廢水處理廠曝氣槽)，故菌株 *P. versutus* MDC-3 與 *P. versutus* TDC-2 各經 ABS 樹脂製程廢水與 PAN 人造纖維製造廢水長期馴養後，以己內醯胺脫氮之能力便不同。不過整體而言，只要有適量之電子接受者且反應時間夠長，此二株菌皆可利用硝酸鹽氮去除 1445.8 mg/l 以下之己內醯胺。

#### (四) 己內醯胺脫氮菌與其他脫氮菌之親緣關係

表 3 為利用 NCBI 網站搜尋系統或 SDSC Biology Workbench 網站中之 Njinn Multiple Database Search 搜尋系統，搜尋得到以其他物質 (非己內醯胺) 為基質進行脫氮之菌株的基本資料。圖 9 為實驗菌株、鑑定所得菌株與其他脫氮菌之類源樹分析圖。

表 3. 利用其他物質 (非己內醯胺) 進行脫氮之菌株基本資料

菌名	碳源	族群或種類	參考文獻
A	含鹵苯甲酸	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Rhodocyclales; Rhodocyclaceae; Thauera.	[14]
B	酚	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodospirillales; Rhodospirillaceae; Magnetospirillum.	[13]
C	嘧啶	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Rhodocyclales; Rhodocyclaceae; Azoarcus.	[12]
D	間二甲苯	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Rhodocyclales; Rhodocyclaceae; Azoarcus.	[9]
E	丙二酸二甲酯	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Oxalobacteraceae; Herbaspirillum.	[8]
F	聚己內酯	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae; Comamonas.	[5]
G	聚己內酯	Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Comamonadaceae; Acidovorax.	[5]
H	醋酸鹽	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Xanthomonadales; Xanthomonadaceae; Stenotrophomonas.	[3]
I	甲醇	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Hyphomicrobiaceae; Hyphomicrobium.	[3]
J	甲烷	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Methylocystaceae; Methylosinus.	[4]

A: *Thauera chlorobenzoica* strain 3BB1; B: *Magnetospirillum* sp. CC-26; C: *Azoarcus* sp. pF6; D: *Azoarcus* sp. T; E: *Herbaspirillum* sp. G8A1; F: *Comamonas* sp. 153S; G: *Acidovorax* sp. PD-10; H: *Stenotrophomonas* sp. BO; I: *Hyphomicrobium* sp. HM; J: *Methylosinus pucelana*

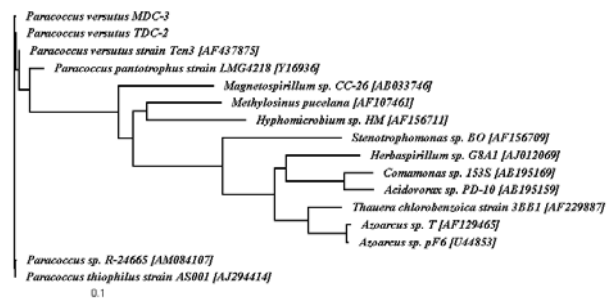


圖 9. 實驗菌株、鑑定所得菌株與其他脫氮菌的類源樹分析圖

物質為基質之脫氮菌的類源樹分析圖。各菌株之親緣相對距離如表 4 所示。從圖 9 及表 4 中可觀察到，己內醯胺脫氮菌 *P. versutus* MDC-3、*P. versutus* TDC-2 與甲醇脫氮菌、



表 4. 實驗菌株、鑑定所得菌株與其他脫氮菌株之親緣相對距離

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)
(1)	—	0.012	0.009	0.032	0.020	0.010	0.120	0.115	0.129	0.228	0.211	0.216	0.209	0.200	0.208	0.185
(2)	0.012	—	0.001	0.001	0.001	0.001	0.117	0.132	0.145	0.224	0.228	0.206	0.205	0.204	0.197	0.203
(3)	0.009	0.001	—	0.000	0.000	0.000	0.119	0.120	0.132	0.220	0.224	0.203	0.198	0.197	0.194	0.196
(4)	0.032	0.001	0.000	—	0.000	0.001	0.115	0.119	0.130	0.215	0.215	0.203	0.196	0.193	0.193	0.195
(5)	0.020	0.001	0.000	0.000	—	0.001	0.115	0.119	0.130	0.211	0.214	0.201	0.192	0.192	0.189	0.193
(6)	0.010	0.001	0.000	0.001	0.001	—	0.116	0.119	0.132	0.214	0.218	0.200	0.193	0.192	0.189	0.194
(7)	0.120	0.117	0.119	0.115	0.115	0.116	—	0.118	0.154	0.187	0.188	0.190	0.184	0.185	0.179	0.176
(8)	0.115	0.132	0.120	0.119	0.119	0.119	0.118	—	0.102	0.187	0.191	0.197	0.186	0.185	0.186	0.179
(9)	0.129	0.145	0.132	0.130	0.130	0.132	0.154	0.102	—	0.187	0.190	0.186	0.191	0.192	0.189	0.190
(10)	0.228	0.224	0.220	0.215	0.211	0.214	0.187	0.187	0.187	—	0.034	0.097	0.107	0.104	0.096	0.161
(11)	0.211	0.228	0.224	0.215	0.214	0.218	0.188	0.191	0.190	0.034	—	0.093	0.103	0.103	0.095	0.166
(12)	0.216	0.206	0.203	0.203	0.201	0.200	0.190	0.197	0.186	0.097	0.093	—	0.097	0.095	0.089	0.155
(13)	0.209	0.205	0.198	0.196	0.192	0.193	0.184	0.186	0.191	0.107	0.103	0.097	—	0.003	0.046	0.146
(14)	0.200	0.204	0.197	0.193	0.192	0.192	0.185	0.185	0.192	0.104	0.103	0.095	0.003	—	0.042	0.149
(15)	0.208	0.197	0.194	0.193	0.189	0.189	0.179	0.186	0.189	0.096	0.095	0.089	0.046	0.042	—	0.130
(16)	0.185	0.203	0.196	0.195	0.193	0.194	0.176	0.179	0.190	0.161	0.166	0.155	0.146	0.149	0.130	—

(1) *P. pantotrophus* strain LMG 4218。 (2) *P. Versutus* MDC-3。 (3) *P. versutus* TDC-2。 (4) *P. sp.* R-24665。 (5) *P. thiophilus* strain AS001。 (6) *P. versutus* strain Tcn3。 (7) *M. sp.* CC-26。 (8) *M. pucelana*。 (9) *H. sp.* HM。 (10) *C. sp.* 153S。 (11) *A. sp.* PD-10。 (12) *H. sp.* G8A1。 (13) *A. sp.* T。 (14) *A. sp.* pF6。 (15) *T. chlorobenzoica* strain 3BB1。 (16) *S. sp.* BO。

甲烷脫氮菌、酚脫氮菌之親緣關係較近（相對距離約為 0.117-0.145），而與其他脫氮菌之關係較遠（相對距離  $\geq 0.194$ ）。

#### 四、結論

1. 不論 ABS 混合族群或 PAN 混合族群皆可利用 1538.5 mg/l 以下之己內醯胺進行脫氮，但 ABS 混合族群以己內醯胺進行脫氮之速率與利用己內醯胺生長之情形均優於 PAN 混合族群。
2. 菌株 *P. versutus* MDC-3 與 *P. versutus* TDC-2 皆可以 1445.8 mg/l 以下之己內醯胺進行脫氮，但菌株 *P. versutus* MDC-3 利用己內醯胺脫氮之能力較菌株 *P. versutus* TDC-2 強，且較不受己內醯胺濃度變化影響。
3. ABS 混合族群以己內醯胺進行脫氮之速率與利用己內醯胺生長之情形均優於菌株 *P. versutus* MDC-3。而菌株 *P. versutus* TDC-2 對己內醯胺之去除速率與利用己內醯胺生長之情形，於己內醯胺濃度小於 784.3 mg/l 時，均優於 PAN 混合族群，但當己內醯胺濃度高至 1445.8 mg/l 時，兩者之比生長速率與對己內醯胺之去除速率相似。
4. 己內醯胺脫氮菌 *P. versutus* MDC-3、*P. versutus* TDC-2 與甲醇脫氮菌、甲烷脫氮菌、酚脫氮菌之親緣關係較近，而與其他脫氮菌之關係較遠。

#### 參考文獻

1. 邱偉鈞（民 89），耐冷菌 *Pseudomonas sp.* P90 產生之金屬結合性蛋白質分解酶的基因選殖、純化與特性分析，國立中興大學植物學研究所碩士論文。
2. 黃榮茂、王禹文、林聖富、楊得仁（民 76），化學化工百科辭典，曉園出版社，台北。
3. Costa, C., C. Dijkema, M. Friedrich, P. Garcia- Encina, F. Fernandez-Polanco and A. J. Stams (2000) Denitrification with methane as electron donor in oxygen-limited bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(6), 754-762.
4. Costa, C., M. Vecherskaya, C. Dijkema and A. J. Stams (2001) The effect of oxygen on methanol oxidation by an obligate methanotrophic bacterium studied by in vivo <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 26(1-2), 9-14.
5. Horiba, Y., S. T. Khan and A. Hiraishi (2005) Characterization of the microbial community and culturable denitrifying bacteria in a solid-phase-denitrification process using poly (epsilon-caprolactone) as the carbon and energy source. *Microbes Environ*, 20, 25-33.
6. Jeter, R. M. and J. L. Ingraham (1981) The denitrifying prokaryotes. In: *The Prokaryotes*, 1, 913-925. M. P. Starr

- Ed. Springer-Verlag, New York, NY.
7. Keeney, D. R. and D. W. Nelson (1982) Indophenol-blue method. In: *Methods of Soil Analysis Part2, Chemical and Mmicrobiological Properties*. 2nd Ed., 674-676. A. L. Page, R. H. Miller and D. R. Keeney Eds. American Society of Agronomy, New York, NY.
  8. Kniemeyer, O., C. Probian, R. R. Mora and J. Harder (1999) Anaerobic mineralization of quaternary carbon atoms: isolation of denitrifying bacteria on dimethylmalonate. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3319-3324.
  9. Krieger, C. J., H. R. Beller, M. Reinhard and A. M. Spormann (1999) Initial reactions in anaerobic oxidation of m-xylene by the denitrifying bacterium *Azoarcus* sp. strain T. *Journal of Bacteriology*, 181(20), 6403-6410.
  10. Nawaz, M. S., W. Franklin, W. L. Campbell, T. M. Heinze and C. E. Cerniglia (1991) Metabolism of acrylonitrile by *Klebsiella pneumoniae*. *Archives of Microbiology*, 156, 231-238.
  11. Nozawa, T. and Y. Maruyama (1988) Denitrification by a soil bacterium with phthalate and other aromatic compounds as substrates. *Journal of Bacteriology*, 170(6), 2501-2505.
  12. Rhee, S. K., G. M. Lee, J. H. Yoon, Y. H. Park, H. S. Bae and S. T. Lee (1997) Anaerobic and aerobic degradation of pyridine by a newly isolated denitrifying bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), 2578-2585.
  13. Shinoda, Y., Y. Sakai, M. Ue, A. Hiraishi and N. Kato (2000) Isolation and characterization of a new denitrifying *spirillum* capable of anaerobic degradation of phenol. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1286-1291.
  14. Song, B., N. J. Palleroni and M. M. Haggblom (2000) Isolation and characterization of diverse halobenzoate-degrading denitrifying bacteria from soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3446-3453.
  15. Tuma, S. N., F. Orson, F. V. Fossella and W. Waidhofer (1981) Seizures and dermatitis after exposure to caprolactam. *Archives of Internal Medicine*, 141, 1544-1545.
  16. White, J. M., D. D. Jones, D. Huang and J. J. Gauthier (1988) Conversion of cyanide to formate and ammonia by a pseudomonad obtained from industrial wastewater. *Journal of Industrial Microbiology*, 3, 263-272.

收件：95.04.30 修正：95.06.02 接受：95.08.04