

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

非法棄置場址有機污染土壤之處理及生物毒性評估(2) 重金屬對環境分解菌及對多環芳香烴生物分解與毒性評估

計畫編號：NSC90-2211-E-040-001-

執行期限：90年08月01日至91年07月31日

主持人：張時獻 中山醫學大學公共衛生學系

一、中文摘要

非法棄置場址常同時受重金屬與有機污染物，重金屬對有機分解菌之抑制為此種土壤選擇復育之重要依據，本研究以平板稀釋數菌法評估鎘及鋅離子對有機污染物分解菌生長在不同稀釋液，pH值情況下影響。不同稀釋液之使用會造成鎘離子對 phenanthrene 抑制敏感性相異，其中二段水為稀釋液最敏感，依序為 0.89% NaCl 及 1/40 倍無機鹽溶液。與 Geochem-PC 計算鎘離子分佈型態比較，在二段水中鎘離子皆以自由形態存在，在 0.89% NaCl 時大多以錯化物存在，鎘離子對分解菌之抑制與其自由形態濃度有關。生物泥漿法結果顯示土壤鎘濃度 125mg/kg 以上才會造成 fluoranthrene 生物降解，其原因推論為土壤重金屬吸附與土壤溶液使鎘離子有效濃度降低原因，Ames test 發現土壤以 TA100+S9 測試時，在較低土壤鎘離子濃度在時 ($Cd < 125mg/kg$) 隨致突變性變化情形與化學分析結果趨勢相近。當有機萃取液進行 Microtox test 測試則顯示無任何急毒性。

關鍵詞：非法棄置場，fluoranthene bioslurry，Ames test，Microtox test，heavy metal

Abstract

Illegal dumping sites often were contaminated with the mixture of heavy metal and organic pollutants. The inhibition of heavy metals on biodegradation should be investigated before select proper remediation techniques. In this study, Plate-Dilution Frequency Technique was used to investigate the influence of zinc

and cadmium ion on the growth of fluoranthene, diesel, DPB degrading bacteria under different diluent composition and pH. The results showed that when distilled water was used as diluent, fluoranthene degrading degraders were sensitive to cadmium concentration, followed by 0.89% NaCl solution, and 1/40 minimal media. The calculated results of Geochem-PC indicated that most cadmium presented as free phase in distilled water diluent and presented in complex phase when 0.89% NaCl diluent. The results of bioslurry treatment indicated that the inhibition of fluoranthene biodegradation occurred at the cadmium concentration above 125mg/kg. This was consistent with the results obtained by Ames test (TA100+S9). The Microtox test showed that the organic solvent extractant of treated soil had no acute toxicity.

一、前言

國內非法棄置場址土壤常同時受有機物及重金屬污染，危害人體健康及生態環境。

故土壤復育為目前迫切課題。重金屬存在會造成生物毒性及抑制生物分解，造成有機污染物之長期存在，土壤重金屬對細菌之抑制濃度、生物分解效果及生物毒性變化之研究，可提供土壤復育技術選擇之重要依據。

二、研究方法及目的

本研究共分三部分進行，(1)以平板稀

釋數菌法評估重金屬(鎘、鋅)濃度對環境重要有機物(PAH、柴油、DBP)分解菌影響，並鎘對 fluoranthene 分解菌之影響實驗，探討不同稀釋溶液組成(無機鹽溶液，0.89%NaCl, Distilled deionized water)及 pH (4.5, 6.5)，此平板稀釋數菌法結果之影響，為探討重金屬之存在化學形態之生物毒性，應用土壤溶液化學平衡軟體，計算重金屬化學分布與數菌結果進行比較。(2)以生物泥漿法評估土壤重金屬濃度對 fluoranthene 生物分解影響 (3)應用 Microtox test 及 Ames test (TA98, TA100 with and without S9) 二種 bioassay 評估以上處理程序之土壤急毒性及致突變性變化情形。

此計畫之執行可了解土壤水溶液重金屬濃度對環境重要分解菌之抑制情形，生物泥漿法之處理可了解不同土壤重金屬存在時，fluoranthene 之生物降解情形，生物毒性之變化亦可了解生物分解後之土壤除了目標污染物之去除外，土壤生物毒性是否亦同時減少。

三、實驗材料與方法 土壤準備及化學藥品

土壤為取自校園土壤，於 103°C 烘乾，過 20 號篩，並經三次高壓滅菌後備用，土壤 pH 值為 7.6，有機物含量為 2.3%。經篩分析為 silt sand，其組成為黏土:壤土:砂土 = 8:82.4:9.4。

Phenanthrene (Sigma company) 為 HPLC 級(purity > 96%)，Noble Agar 購自 DIFCO 公司，CdCl₂·2.5 H₂O 及 NaCl 為 OSAKA 產品，其餘無機鹽溶液配置所用之化學物皆為試藥級以上。

菌種之準備

Phenanthrene 分解菌由中興大學環工所實驗室取得，並以 chemostat 方法維持，水

力停留時間 2 天，以溶於無機鹽溶液(成份如下)之 10 mg /L phenanthrene 基質進流。從 chemostat 中取出 0.1ml 菌種另行批式培養 1 天後，進行洗菌(12000rpm，5 分鐘)，將上層液移除，置入二段水(distilled and deionized water)、無機鹽或 0.89 % NaCl 溶液，以 shaker 將菌液打散備用。

無機鹽溶液(minimal medium)及 Phenanthrene agar 準備

配製無機鹽：將 1g(NH₄)₂SO₄，5g KH₂PO₄，0.1g MgSO₄·7H₂O，0.005g FeSO₄ 溶解至 1L 蒸餾水中，加入 1ml 微量金屬溶液，調整 pH=7.0(Bauchop and Elsdén, 1960)。配製微量金屬溶液：將 10.75 g MgO，2.0g CaCO₃，4.5g FeSO₄·7H₂O，1.44g ZnSO₄·7H₂O，1.12g MnSO₄·4H₂O，0.25g CuSO₄·5H₂O，0.28g CoSO₄·7H₂O，0.06g H₃BO₃，51.3ml HCl(conc.) 溶解至 1L 二次水。

以 1L 無機鹽溶液添加 23g 高純度 Noble agar，經高溫高壓滅菌(121°C，15psi)後，放入培養皿(petri-dish)，凝固後以 0.8ml 溶於 acetone 之 phenanthrene 溶液(100mg /L)，鋪於培養基表面，等 acetone 揮發後備用。

平板稀釋數菌法 (Plate dilution frequency method)

平板稀釋數菌法[4]則部分修改自 Harris and Sommers (1968)程序，將重金屬溶液及 phenanthrene 菌液以 1:1 配置，並調整不同 pH 值，植種於培養皿上，於不同培養時間進行數菌。溶液重金屬化學分佈型態計算則以 Geochem 軟體進行(Parker et al., 1995)。

Fluoranthene 生物泥漿法降解實驗

以 50ml vial 中放入 5g 土壤，並先添加鎘離子溶液後烘乾，使土壤鎘離子達設定濃

度後，以溶於丙酮之 fluoranthrene 溶液均勻加至土壤，土壤最終 fluoranthrene 濃度為 10mg/kg，放置於黑暗七天進行預吸附。實驗開始加入 1ml 經洗菌之 fluoranthene 分解菌 (10^6 cfu/ml)，及 11ml 之無機鹽溶液，置於 TCLP 上下旋轉振盪器，於第 0 及 24 天進行冷凍乾燥，以加入 15 ml 有機溶劑 (DCM:hexane=1:1) 超音波萃取三次，經淨化置換為 acetonitrile 以 HPLC 分析 fluoranthene。萃取液部分則置換成 DMSO 進行 Microtox test 及 Ames Test。

致突變性及急毒性

致突變性試驗以 Ames Test 進行 (Maron and Ames, 1983) TA98 及 TA100 二種菌在有無添加 S9 兩種情況每經以三重覆進行，並進行正負控制組。急毒性實驗則以 Microtox test (Microbics, 1992) 進行，Microtox test 使用海洋發光菌 *Vibrio fischeri* 偵測毒性物質對其之發光強度，超音波萃取有機物經置換成 DMSO 後以 distilled water 稀釋 100 倍後以 Microtox Model 500 偵測 EC50。

四、結果與討論

以平板稀釋數菌法評估重金屬對分解菌生長抑制

本研究以平板稀釋數菌法評估鎘及鋅對 PAH, 柴油及 DPB 分解菌生長抑制情形，所用稀釋液為第三天數菌結果顯示，鎘及鋅濃度在 10mg/L 時即造成 PAH, 柴油及 DPB 分解菌生長抑制，六天數菌結果顯示，其菌落數快速生長，大部分皆超過 $10^{6.84}$ CFU/ml，由於本實驗所用之菌為自環境中培養之混合菌種，可因為其生長速率及對重金屬之敏感性不同而導致不同數菌結果，在此可發現快速生長菌對重金屬較為敏感，反之生長較慢菌則對重金屬之耐受性較強。

不同稀釋液及 pH 對數菌結果之影響

本研究以二段水、0.89% NaCl 及 1/40 倍無機鹽溶液為稀釋溶液，探討不同 pH 值及數菌時間對平板稀釋數菌法結果影響。在此為配合之後實驗，避免鎘離子完全與無機鹽結合形成沉澱或錯化合物，故採 1/40 倍 1/40 倍無機鹽溶液為稀釋液。

本實驗為同時進行，所使用菌液濃度相同，由表 1 可知不同溶液對菌生長速率有影響，二段水為稀釋液時，在第三天即有菌落出現，1/40 倍無機鹽溶液為稀釋液時則在第四天出現菌落，0.89% NaCl 為稀釋液時則最慢出現(第五天)。

用此三種稀釋液，分別調整成 pH=6, 4.5, 及 2 時進行數菌時，可發現低 pH 值 (pH=2) 中僅對二段水及 0.89% NaCl 稀釋液在初期有影響，因本實驗在第六天後分解菌密度皆大於 6.91×10^6 CFU/ml。其可能本實驗所用菌種為混合菌種，在初期低 pH 值溶液對快速生長分解菌有影響，惟在後期為不同菌增生，故皆可達成一定菌密度以上，惟在本實驗發現在數菌初期，以二段水及 0.89% NaCl 為稀釋液時，pH=4.5 情況其數菌密度反而高於 pH=6，其原因可能為 pH=4.5 稀釋液較易將培養基中營養鹽釋出，提供菌之生長分解菌成長。

重金屬對 fluoranthene 生物降解影響

本研究以生物泥漿法探討土壤鎘離子對 fluoranthene 生物降解影響，5g 土壤先添加 0 至 500mg/kg 之鎘離子濃度，後加入 20mg/kg fluoranthene 並預吸附 7 天後，加入無機鹽溶液 11ml 及經洗後之 fluoranthene 三次分解菌 1ml，圖 1 為植種菌後第 0 天及第 24 天分解情形，可知在土壤鎘離子濃度在 0 及 125mg/kg 明顯抑制，當土壤鎘離子

濃度在 250mg/kg 才會造成明顯抑制，其原因可能為土壤水溶液中鎘之有效濃度不高，故即使土壤鎘離子濃度高達 125mg/kg 時仍不會造成抑制作用，鎘之有效濃度不高之原因可能為土壤對鎘之吸附，及土壤溶液組成與鎘離子反應使其自由型態之鎘離子濃度降低。

為探究 fluoranthene 在生物降解過程中之生物毒性變化，以 Ames test 進行其致突變性變化情形。TA98 及 TA100 with S9 負控制 (DMSO) 為 128 及 358 revertant/ml, 正控制 (添加 BaP) 則分別為 225 及 812 revertants/ml。結果如圖 2，以第 0 天及 24 天土壤致突變性比較，雖然在第 24 天時，Cd=0 及 Cd=125 組之 fluoranthene 濃度有下降，但如以 TA98, TA100 with and without S9 情形進行比較時，可發現以 TA98 對其土壤致突變性偵測不敏感，但如以 TA100 進行偵測時，可發現相較於第 0 天控制組，第二十四天在無添加 S9 時，Cd=0 mg/kg 及 Cd=125mg/kg 兩組之致突變性下降，但若考慮其在統計上之變異區間(error bar)，則其變化較不明顯。若與化學分析結果比較可發現，在較低土壤鎘離子濃度在時 (Cd=0mg/kg, Cd=125mg/kg)，隨 fluoranthene 下降其致突變性可下降。

急毒性測試為，土壤樣本以有機溶劑萃取後置換成 DMSO，後再以水稀釋成 1/100 倍，以 Microtox test 進行偵測結果顯示，所有土壤中其皆無達到 EC50 值，其可能原因為 fluoranthene 雖具致突變性，惟急毒性較低，且以 1/100DMSO 強度進行偵測，會減低其萃取液濃度，且有機萃取時僅萃取出有機物忽略鎘離子造成之毒性。

結論

非法棄置場址常同時受重金屬與有機

污染物，重金屬對有機分解菌之抑制為此種土壤選擇復育之重要依據，本研究首先以平板稀釋數菌法針對鎘及鋅離子對環境重要有機污染物分解菌生長進行探討，發現由重金屬對生長快速之分解菌比較敏感，在培養時間超過 6 天時，混合菌之生長菌落增加快速，重金屬濃度對生長菌之影響較無明顯差異。

以不同稀釋液(二段水，0.89%NaCl，1/40 倍無機鹽)及不同 pH 值，以平板稀釋數菌法評估鎘離子對 phenanthrene 混合分解菌生長影響，配合 Geochem-PC 軟體計算鎘離子化學型態濃度分佈。不同稀釋液會對菌落出現時間不同，其中以二段水出現最快依序為 1/40 倍無機鹽及 0.89%NaCl。不同稀釋液之使用會造成鎘離子對 phenanthrene 抑制敏感性相異，其中二段水為稀釋液最敏感，依序為 0.89%NaCl 及 1/40 倍無機鹽溶液。與 Geochem-PC 計算結果比較，在二段水中鎘離子皆以自由形態存在，在 0.89%NaCl 時大多以錯化物存在，鎘離子對分解菌之抑制與其自由形態濃度有關，但推估 1/40 倍無機鹽溶液自由形態鎘離子濃度與在其他二種稀釋液結果抑制情形不同。

生物泥漿法探討土壤鎘金屬濃度，發現在土壤鎘濃度 125mg/kg 以上才會造成 fluoranthene 生物降解，其原因推論為土壤重金屬吸附與土壤溶液使鎘離子有效濃度降低原因，Ames test 發現土壤以 TA100+S9 測試時，在較低土壤鎘離子濃度在時 (Cd=0mg/kg, Cd=125mg/kg)，隨 fluoranthene 下降其致突變性可下降，其與化學分析結果趨勢相近。

參考文獻

Alexander M (1995) How Toxic Are Toxic Chemicals in Soil? Environmental Science and Technology, vol. 29,

- no.11:pp.2713-2717
- Bierkens J, Klein G, Corbisier P,
Vandenheuvel R, Verschaeve L,
Weltens R, Schoeters G (1998)
Comparative Sensitivity of 20
Bioassays for Soil Quality,
Chemosphere, vol. 37, no. 14-15:pp.
2935-2947
- Brooks LR, Hughes TJ, Claxton LD, Austern
B, Brenner R, and Kremer F (1998)
Bioassay-Directed Fractionation and
Chemical Identification of Mutagens in
Bioremediated Soils. Environmental
Health Perspectives, vol. 106,
supplement 6:pp. 1435-1440
- Chang SH (1998)Bioremediation of PAHs in
Landfarm Soil with Surfactants and
Inoculation. Ph.D. dissertation,
University of Southern California.
- Geerdink MJ et al (1996) Microbial
Decontamination of Polluted Soil in
Slurry Process, Journal of
Environmental Engineering, vol.122, no.
11, pp. 975
- Maron D.M., Ames, B.N. (1983) Revised
methods for the Salmonella
mutagenicity test. Mutation Research
310, 173-215.
- Microbics (1992) Microtox procedures
manual. Microbics Corporation,
Carlsbad
- Pignatello and Xing BS (1996) Mechanisms
of Slow Sorption of Organic-Chemicals
to Natural Particles. Environmental
Science and Technology, vol. 31, no.
1:pp. 1-11
- Stringfellow WT and Aitken MD (1995)
Competitive Metabolism of naphthalene,
methylnaphthalenes and Fluorene by
Phenanthrene-Degrading
Pseudomonads. Applied and
Environmental Microbiology, vol.
61:pp. 375-362

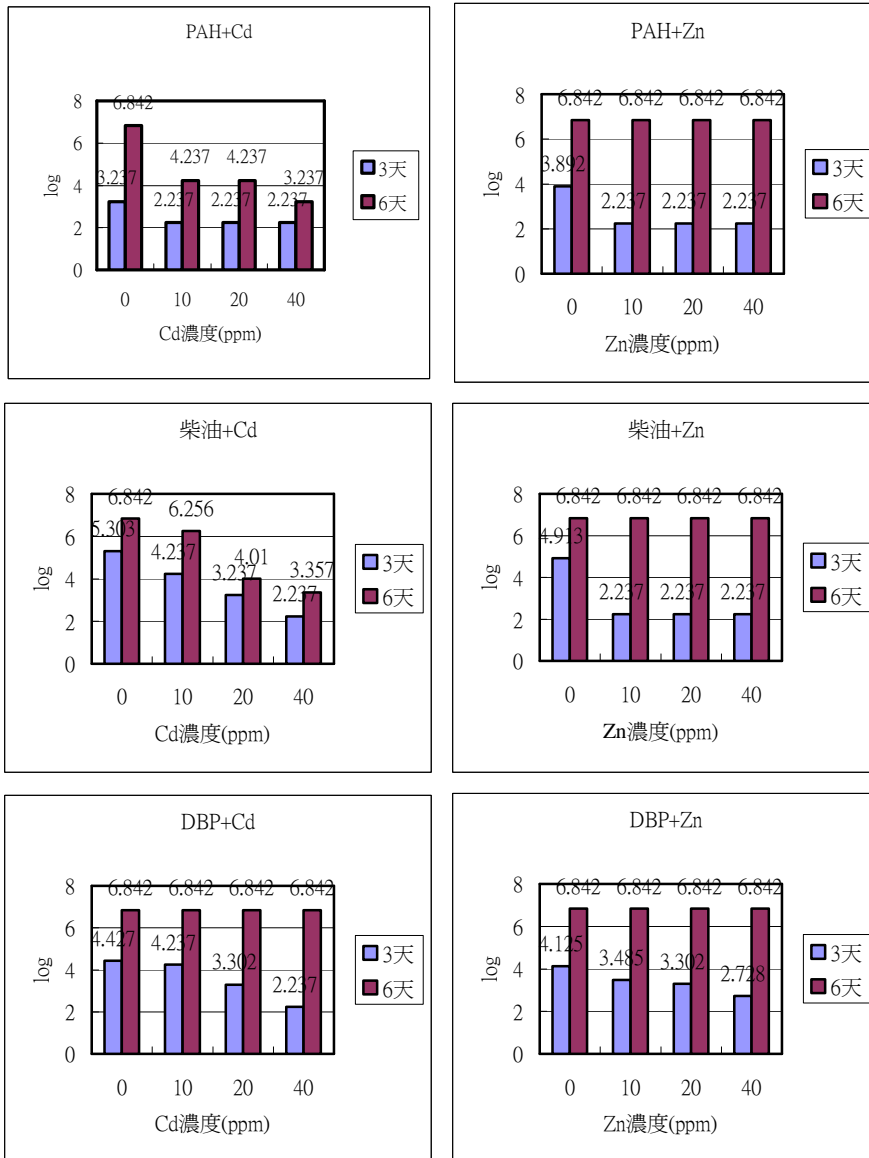


圖 1 不同濃度 Cd, Zn 對 fluoranthene, 柴油, DPB 菌生長抑制情形

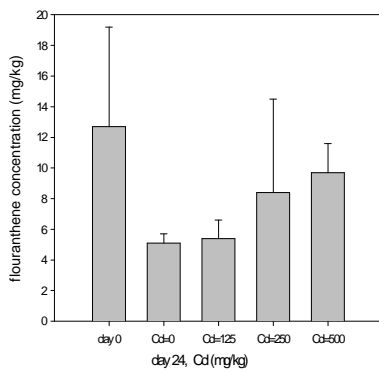


圖 2 生物泥漿法處理法不同 Cd 濃度對 fluoranthene 生物降解影響情形

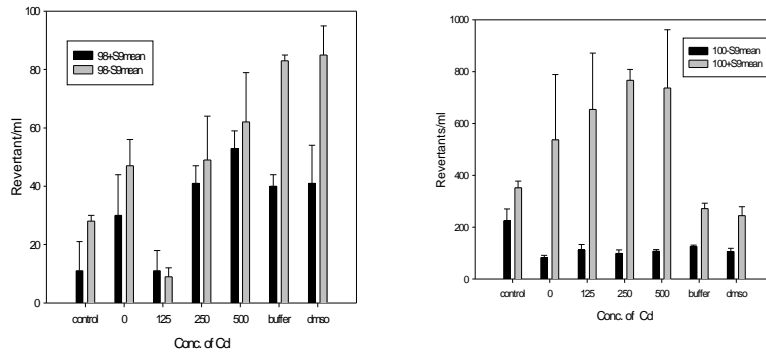


Figure 2 土壤 fluoranthene 在不同鎘離子濃度時，其土壤致突變性(TA98, TA100 with and without S9) 變化情形

表 1 不同稀釋液及 pH 值下 Cd 對 fluoranthene 生長抑制情形

	(mg/L)	第三天	第四天	第五天	第六天
二段水 pH=6.0	0	6.91×10^5	6.91×10^6	$>6.91 \times 10^6$	$>6.91 \times 10^6$
	10	0	3.02×10^1	$>6.91 \times 10^6$	$>6.91 \times 10^6$
	20	0	2.18×10^1	$>6.91 \times 10^6$	$>6.91 \times 10^6$
	50	0	0	4.26×10^2	$>6.91 \times 10^6$
	100	0	0	0	0
二段水 pH=4.5	0	6.91×10^6	$>6.91 \times 10^6$	$>6.91 \times 10^6$	$>6.91 \times 10^6$
	10	3.39×10^6	$>6.91 \times 10^6$	$>6.91 \times 10^6$	$>6.91 \times 10^6$
	20	1.20×10^6	$>6.91 \times 10^6$	$>6.91 \times 10^6$	$>6.91 \times 10^6$
	50	4.17×10^1	1.17×10^2	$>6.91 \times 10^6$	$>6.91 \times 10^6$
	100	0	4.17×10^1	$>6.91 \times 10^6$	$>6.91 \times 10^6$
0.89% NaCl pH=6	0	0	0	4.37×10^5	$>6.91 \times 10^6$
	10	0	0	1.74×10^5	$>6.91 \times 10^6$
	20	0	0	3.09×10^4	$>6.91 \times 10^6$
	200	0	0	2.63×10^3	$>6.91 \times 10^6$
	400	0	0	4.27×10^2	$>6.91 \times 10^6$
	600	0	0	0	$>6.91 \times 10^6$
0.89% NaCl pH=4.5	0	0	0	6.91×10^6	$>6.91 \times 10^6$
	10	0	0	4.27×10^4	$>6.91 \times 10^6$
	20	0	0	2.29×10^4	$>6.91 \times 10^6$
	200	0	0	3.09×10^2	$>6.91 \times 10^6$
	400	0	0	1.74×10^2	$>6.91 \times 10^6$
	600	0	0	2.19×10^1	$>6.91 \times 10^6$
1/40 倍無機鹽 pH=6	0	0	1.32×10^8	$>6.91 \times 10^6$	$>6.91 \times 10^6$

	20	0	3.09×10^7	$>6.91 \times 10^6$	$>6.91 \times 10^6$
	40	0	1.74×10^7	$>6.91 \times 10^6$	$>6.91 \times 10^6$
	200	0	5.75×10^4	$>6.91 \times 10^6$	$>6.91 \times 10^6$
	400	0	3.09×10^4	$>6.91 \times 10^6$	$>6.91 \times 10^6$
	600	0	3.63×10^3	$>6.91 \times 10^6$	$>6.91 \times 10^6$
<hr/>					
1/40 倍無機鹽 pH=4.50		0	3.16×10^7	$>6.91 \times 10^6$	$>6.91 \times 10^6$
	20	0	5.01×10^4	$>6.91 \times 10^6$	$>6.91 \times 10^6$
	40	0	2.00×10^4	$>6.91 \times 10^6$	$>6.91 \times 10^6$
	200	0	2.75×10^3	$>6.91 \times 10^6$	$>6.91 \times 10^6$
	400	0	3.63×10^2	$>6.91 \times 10^6$	$>6.91 \times 10^6$
	600	0	2.19×10^1	$>6.91 \times 10^6$	$>6.91 \times 10^6$