

## 遺傳工程微生物在廢水處理上的應用

黃冠良\* 曾玲玲\*

### 一、前 言

遺傳工程 (genetic engineering) 是現代生物科技的一個分支，是1970年代才興起的一門尖端科技，主要係利用分子生物學 (molecular biology) 現有的知識及技術，將一段特定的基因 (gene) 經適當的剪接後，殖入寄主細胞 (host cell) 的遺傳物質中，使經改良後的細胞 (包括微生物及動植物細胞) 能表現出某種特定的遺傳性狀。遺傳工程是目前全世界最熱門的現代科技之一，為了能早日瞭解生命之謎，各行各業的精英紛紛投入其中，然而儘管投入了無數的人力及經費，遺傳工程至今仍停留在嘗試錯誤的階段，其間雖亦曾有過成功的例子 (如 B-型肝炎遺傳工程疫苗的誕生)，然而由於人類對遺傳的知識仍極為有限，因此離揭開生命之謎仍有一段遙遠的距離，不過作者相信以人類的聰明和智慧，必將有成功的一天。

### 二、生物技術之應用

也許有人會懷疑，現代生物科技與日常生活是否有關係，事實上現代生物科技就像機電業或石化業一樣，早已步入每個家庭中。以每天都要吃的味精而言，其實就是麴酸釀酵的產物，而醫藥上常用的各類抗生素藥品如青黴素、鏈黴素等，大部份也是微生物釀酵的產物，就連各大工廠的廢水處理設備，也都是生物科技的應用，只是我們未曾瞭解罷了。以都市廢水和工業廢水處理最常用的活性污泥系統 (activated sludge) 而言，從規劃設計到汙泥的馴養及系統的操作，實際上也都是生物科技的一部份，尤其是針對特殊性質的廢水，更需要某些特定的微生物，其中更涉及某些具特殊分解能力微生物 (如酚分解菌及 BTX-分解菌等) 的篩選、培養及使用，這也就是所謂的生物製劑。近年來各種廢水生物處理系統的發展已極為成熟，生物製劑的開發及應用也日益普遍，然而面對各種成份複雜的工業廢水，傳統的篩選方法往往無法滿足工業廢水處理對特殊微生物的需求，因此如何利用遺傳工程的方法，有計劃的將某些特定的遺傳性狀引進現有的菌種中，使其在廢水處理系統中發揮更大的功效，更成為現代生物科技的另一主要研究方向。

\*中國石油股份有限公司煉製研究所化學工程師

目前將生物技術應用在廢水處理的研究在國內外都極為普遍，主要的方向包括開發新式的廢水處理系統、開發水質監測的相關生物感測器(biosensor)及方法、固定化微生物在廢水處理上的應用、特殊分解能力微生物的篩選、以及遺傳工程改良微生物在廢水處理上的應用等，其中以歐美日等先進國家的研究規模最為龐大，國內則亦有部份學術研究單位從事相關的研究，不過由於各方面的限制，有關遺傳工程改良微生物的開發則尚無任何的成果。因此本文除介紹一些生物科技的基本概念外，亦將探討遺傳工程在廢水處理上的應用，希望能藉此文拋磚引玉，使臺灣也能成為此方面研究的重鎮。

### 三、廢水處理之應用

生物技術之所以會日益受到重視，主要原因在於化學工業及其他製造業的普遍發達所致。一般而言，自然界本身就具有相當強的自淨功能，只要不超過其負荷，自然生態及環境都能維持在一個平衡狀態，這也就是工業革命之前並無明顯的生態保育及環境污染的最主要原因。隨著工商業發達和人口的日益集中，人為污染物的質與量都已超過自然界的淨化能力，為了使污染物質在排放到外界之前，就能經過適當的處理，以減輕自然界的負擔，不得不藉助於各式各樣的廢棄物處理設備，其中尤以各類型的廢水處理設備最為常見，也的確發揮了極大的功能。近年來由於合成化學的進步，各種工業廢水中常含有一些結構穩定且具生物毒性(xenobiotic)的物質如鹵化物(halomatic compounds)、芳香族化合物(aromatic compounds)及一些聚合物(polymers)等，這些物質並不是一般的微生物所能分解的，必須藉助於某些具特殊分解能力的微生物方能奏效，然而這些微生物在自然情況下並不存在，即使存在，其數目及生長速率也較一般性的微生物為低，在複雜的廢水處理系統中並無法取得優勢，更無法有效的表現其分解能力，因此如何篩選及培養這些微生物一直是工業廢水處理的一個主要目標，而近年來遺傳工程的快速發展便提供了一個頗為可行的方向。

遺傳工程微生物(genetically engineered microorganisms,GEMs)的特點在於能有計劃的將特定的基因殖入寄主細胞中，使該微生物能具備人類所要求的遺傳性狀，進而執行某些特定的功能。然而生命個體內的生化反應是環環相扣的，欲分解某一類特殊結構的化合物，往往需要數種酵素的共同作用，因此僅將負責編碼(coding)某一酵素的基因導入微生物體內，亦只能完成一連串分解過程中的一個步驟。此外經過遺傳工程改良後的微生物是否具有高的分解能力，此一人為引入的優良性狀是否能代代相傳，又此一微生物是否能在複雜的廢水處理系統中佔優勢，目前仍是遺傳工程微生物在廢水處理應用上的瓶頸。在此作者擬以日本大阪大學環境工程研究所富田(Fujita, M.)教授等人於近年內的研究為例，介紹遺傳工程微生物在廢水處理應用上的最新發展。

## 四、遺傳工程應用實例

富田教授的研究主要針對水楊酸(salicylic acid)、苯甲酸(benzoic acid)、鄰苯二酚(catechol)及酚(phenol)等較難分解的化合物。一般而言，具有苯環的化合物都具有生物毒性，且較難被微生物所利用，除非微生物體內具有分解這些物質的酵素。圖1為這些化合物的分解途徑，其中水楊酸必須經由水楊酸氧化酶(salicylate oxidase)的催化才能轉變為鄰苯二酚，此酵素係由 nahG 基因所編碼，而下一步驟則由鄰苯二酚-2,3-氧化酶(catechol-2,3-oxygenase) 將鄰苯二酚轉變為 2-hydroxy muconic semi-aldehyde(2-HMS)，此種酵素則由 pheB 基因所編碼，而酚的分解則由酚氧化酶(phenol oxidase)催化形成鄰苯二酚。

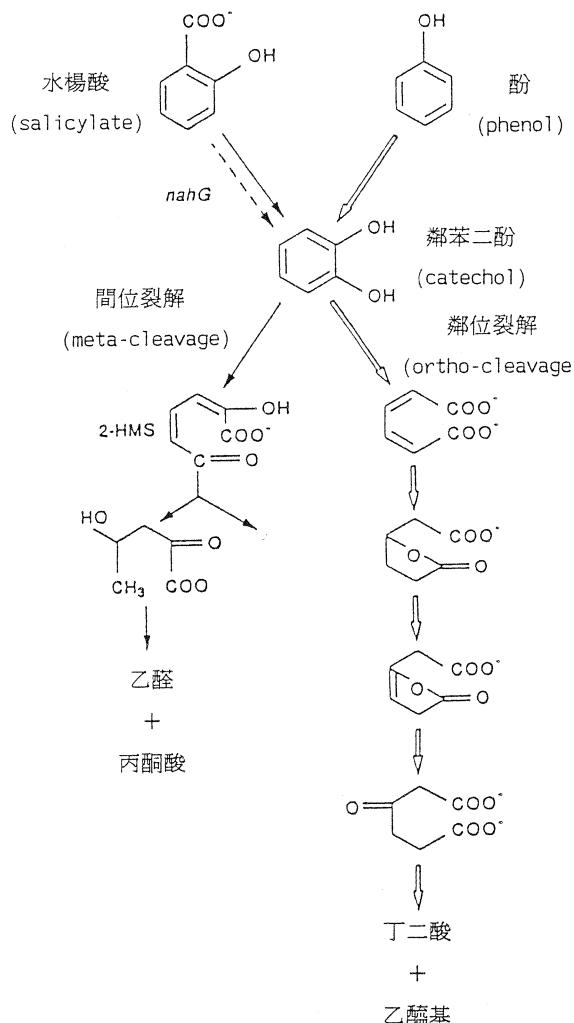


圖 1 水楊酸及酚的氧化裂解途徑

富田教授嘗試將這些基因以不同的載體(vector)殖入不同寄主細胞中，所使用的菌種及質體如表 1 所示。其中菌種包括含有 NAH 基因之質體的偽單胞桿菌 (*Pseudomonas putida*) PpG1064(NAH)，不含 NAH 基因之質體的 *P. putida*(PpG1064)、從活性污泥中分離之具酚分解能力的 *P. putida* BH、經紫外線誘發突變後失去酚分解能力的變異株 *P. putida* BH-1、由活性污泥中分離之具膠羽形成能力(floc forming)的 *P. lemoignei* 及大腸桿菌 (*Escherichia coli*)，所使用的質體則包括 NAH、pUC19、pKT230、pBH100、pBH400 及 pHF400 等。富田教授將前述之 nahG 基因及 pheB 基因殖入不同的質體，再將各種質體以接合(conjugation)或轉形(transformation)方式導入不同的寄主細胞中，然後測試不同組合的各種遺傳工程微生物的分解活性(degradation activity)、遺傳穩定性(genetic stability)及生態穩定性(ecological stability)等，結果發現部份經遺傳工程改良的微生物的確能表現出較高的分解能力。由表 2 之結果中可以看出野生菌株 *P. putida* BH 必須在 phenol 或 benzoate 存在的情況下才能誘導出鄰苯二酚-2,3-氧化酶的活性，此種現象表示野生菌株 *P. putida* BH 的染色體中已具有編碼鄰苯二酚-2,3-氧化酶的基因，且此一基因的表現可能受到某種類似操作子(operon)系統的控制，在正常的情形下並不能表現鄰苯二酚-2,3-氧化酶的活性，只有當所生長的環境中含有 phenol/benzoate 等物質，方能誘導出鄰苯二酚-2,3-氧化酶的基因表現，而經遺傳工程殖入 pheB 基因的菌株則不需 phenol 或 benzoate 的存在即能表現出鄰苯二酚-2,3-氧化酶的活性，顯示遺傳工程的確發揮了功效。

表 2 中尚可看出在 *E. coli* C600 及質體 pBH100 的組合中，鄰苯二酚-2,3-氧化酶的活性可以提高 8.5 倍，在 *E. coli* JM103 及質體 pBH100 的組合中，分解能力亦提高 2.3 倍，而在質體 pBH500 和不同菌株的組合中鄰苯二酚-2,3-氧化酶的活性則較無明顯增加，其主要原因為重組質體 pBH100 係以具有高拷貝數及高表現能力(high copy number and high expression)的質體 pUC19 為載體，因此能產生較多的酵素及表現較高的分解活性，而重組質體 pBH500 則以較低拷貝數目的質體 pKT230 為載體，因此其分解活性較低，可見質體拷貝數對基因的表現能力有極大的影響。

## 五、實際應用之改進

由於細胞對外來的遺傳物質(質體或基因)具有與動物體內免疫系統類似的排斥作用，即經過許多世代的繁殖後，一個外來的遺傳物質有逐漸喪失的傾向，此外這些外來基因的表現常需要環境壓力(selective pressure)的存在，即環境中必須有這些毒性物質的存在才能誘導此外來基因的表現。然而一般廢水處理廠進流水的質與量變化都極大，很難經常保持一定的濃度，因此外來的性狀常無法穩定的存在重組微生物體中，亦即重組微生物經過數代的繁殖後，失去重組質體的菌株在整個廢水處理系統中會逐漸成為優勢菌種，也會逐漸喪失分解特殊污染物質的能力，所以重組質體的遺傳穩定性一直是遺傳工程微生物應用在廢水處理上的一個亟待克服的問題。如何選擇最佳的組合，使遺傳

工程微生物在表現其分解活性時，亦能維持其遺傳穩定性，便成為此方面研究的重點。於是富田教授將各種重組微生物經一系列的繼代培養，然後觀察微生物的分解活性及體內重組質體失去的情形。圖2顯示重組質體 pBH500 在四種不同菌株中經繼代培養後的穩定性，可以看出質體的穩定性依序為BH-1>PpG1064>KT2440>C600，其中BH-1經過三百代之後，80%以上都還保留外來質體 pBH500，然而由表2中卻可看出，BH-1的分解能力卻遠較C600與PpG1064為低，且其分解能力依序為C600>PpG1064>BH-1>KT2440，兩相比較之下顯示只有 *P. putida* PpG1064 較合乎需求，即具有較高的分解能力和較高的遺傳穩定性。

表1 富田教授實驗中所使用之菌種及質體

菌株或質體	表現型或基因型*	菌株來源或參考文獻
<i>E. coli</i>		
JM103	thi hsdR	Messing et al.(1981)
C600	thr leu thi hsdR hsdM	Appleyard(1954)
<i>P. putida</i>		
BH	Phe Ben	Isolated from activated sludge.
BH-1	Phe Ben	This study. Derived from BH
KT2440	Ben hsdR	Bagdasarian et al.(1981)
PpG1064	Phe Ben trp	Dunn and Gunsalus(1973)
<i>P. lemoignei</i>		
551	floc-forming	Isolated from activated sludge. Hashimoto et al.(1989)
Plasmid		
NAH	Nah Sal self-transmissible	Dunn and Gunsalus(1973)
pUC19	Ap lac/p high-copy-number	Vieira et al.(1982)
pKT230	Sm Km broad host range	Bagdasarian et al.(1973)
pBH100	Ap catechol-2,3-oxygenase	Cloning of pheB from the chromosome of BH in pUC19. Fujita et al.(1991)
pBH500	Sm Km catechol-2,3-oxygenase	This study. HindIII-BamHI fragment of pBH100(5.65 kb) containing pheB in pKT230
pHF400	Sm Km salicylate oxidase	HindIII fragment of NAH(3.1kb) containing nahG in pKT230. Fujita et al.(1989)

thi, 硫胺酸(thiamine); thi, 蘇胺酸(threonine); leu, 白胺酸(leucine); trp, 色胺酸(tryptophan); Phe, 酚(phenol); Ben, 苯甲酸鹽(benzoate); Nah, 奈(naphthalene); Sal, 水楊酸鹽(salicylate); Ap, 安比西林(ampicillin); Sm, 鏈黴素(streptomycin); Km, 康黴素(kanamycin); hsdR, 寄主專一性限制(host-specific restriction); hsdM, 寄主專一性修飾(host-specific modification); lac/p, 乳糖起動子(lac promotor);

表 2 重組菌株中鄰苯二酚-2,3-氧化酶之活性

質體	寄主菌株	生長基質*	鄰苯二酚-2,3-氧化活性**
pBH100 (pUC19-pheB)	<i>P. putida</i> BH	L+phenol	100.4
	<i>P. putida</i> BH	L+benzoate	8.9
	<i>E. coli</i> JM103	L	233.7
	<i>E. coli</i> C600	L	854.6
	<i>E. coli</i> C600	L	73.0
	<i>P. putida</i> PpG1064	L	60.8
pBH500 (pKT230-pheB)	<i>P. putida</i> BH-1	L	25.1
	<i>P. putida</i> KT2440	L	23.9

\*培養基含 1% Bacto-peptone, 0.5% Bacto-yeast extract and 0.5% NaCl. Phenol 及 benzoate 添加量均為 500 mg/l.

\*\*酵素活性以"單位/毫克蛋白質"表示.

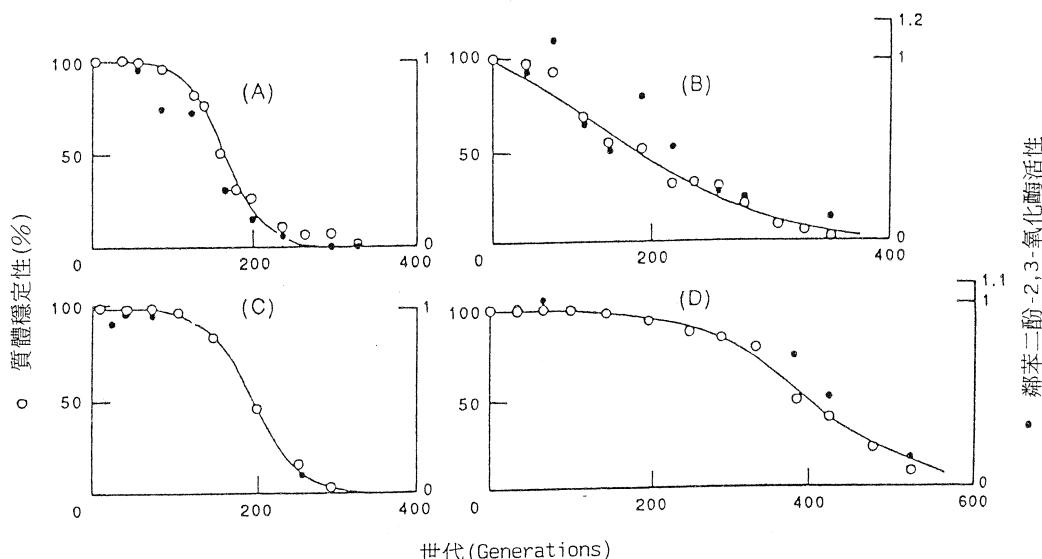


圖 2 四種不同菌種中質體 pBH500 的穩定性及鄰苯二酚-2,3-氧化 (Catechol-2,3-oxygenase) 活性  
 1. *E. coli* C600      3. *P. putida* KT2440  
 2. *P. putida* PpG1064      4. *P. putida* BH-1

除了高分解能力和高遺傳穩定性外，微生物在廢水處理系統中的適應能力也很重要。一些研究報告指出，在無毒性物質存在的環境下，固定化(immobilization)有助於外來質體在重組微生物中的穩定性，亦有助於維持重組微生物在活性污泥系統中的穩定性，然而卻必須付出相當高的固定化成本，這在大規模的活性污泥系統中是極不可行的。因此富田教授自活性污泥中篩選了一株具有膠羽形成能力的菌株 *P. lemoignei* 551 作為 NAH 質體的接受細胞，將含有 NAH 質體的菌株 *P. putida* PpG1064(NAH) 以接合方式轉移至 *P. lemoignei* 551，得到了重組菌株 *P. putida* 551(NAH')，然後再測試水楊酸分解能力及膠羽形成能力，結果證實重組菌株 *P. lemoignei* 551(NAH') 的確能表現此二性狀（參見表 3），儘管重組菌株的分解能力較原來為低，卻可因膠羽形成能力而提高其在活性污泥系統中的滯留時間，相對的也就提高了對毒性物質的分解能力。

表 3 重組菌株之水楊酸分解能力及膠羽形成能力

菌 株	水楊酸去除率(%)* (salicylate removal)	膠羽形成指數(%)** (I.F.)
接受株(recipient) <i>P. lemoignei</i> 551	0	97.5
授予株 (donor) <i>P. putida</i> PpG1064(NAH)	99.0	0
接合株(conjugant) <i>P. lemoignei</i> 551(NAH')	33.4	97.7

\*菌株培養在 CGY+水楊酸鹽培養基中(0.5% Bacto-casitone, 0.5% glycerol, 0.1% Bacto-yeast and 400 mg/l salicylate)

\*\*膠羽形成指數(Index of flocculation, I.F.) =  $100 - (\text{OD}_{\text{sup}} / \text{OD}_{\text{total}}) \times 100$

$\text{OD}_{\text{sup}}$ ：培養基靜置30分鐘後上清液之 $\text{OD}_{600}$

$\text{OD}_{\text{total}}$ ：培養基均質化後之 $\text{OD}_{600}$

## 六、結語

富田教授的研究雖然尚未完全成功，但已為遺傳工程微生物在廢水處理的應用上提供了許多訊息，並且證實遺傳工程微生物應用在廢水處理上的可行性。作者認為遺傳工程在廢水處理上的應用是將來必然的一個方向，儘管現階段人類對遺傳的奧秘所知仍有限，對遺傳工程這門尖端科技也還未能到達駕馭自如的境界，此外許多人對於生物製劑和遺傳工程微生物的使用也都還存有疑慮，其安全性及可行性也都有待進一步評估，目前大部份的國家也都尚未核准生物製劑和遺傳工程微生物直接施用在廢水處理上，這些

都是將來發展時必然遭遇的阻礙，不過遺傳工程在廢水處理上的應用仍不失為一個值得探討的方向。作者衷心的期待這項尖端的科技在未來日益複雜的廢水處理工作上能發揮其功效，以協助人類解決日益嚴重的水污染問題。

本文摘譯自Fujita. M., Ike, M. and Hashimoto, S., Feasibility of Wastewater Treatment Using Genetically Engineered Microorganisms. Water Res. 25:979-984, 1991.