

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

Azotobacter vinelandii 對 tetracyanonicklate (TCN)
分解能力之探討

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC91-2314-B-039-035-

執行期間：91年08月01日至92年07月31日

執行單位：中國醫藥大學微生物學科

計畫主持人：陳師慶

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 92 年 10 月 31 日

摘要

Azotobacter vinelandii ATCC 13705 (*A. vinelandii*) 是一株革蘭氏陰性好氧固氮菌，在本研究中，*A. vinelandii* 被培養在 1、10 及 20 mM 三種不同濃度之四氰化鎳 (Tetracyanonickelate, 簡稱 TCN) 溶液中，以評估 TCN 對此菌的影響情形。研究結果顯示菌株含 1 mM TCN 在對數生長期 (19 小時) 時，其 TCN 降解率最大，比生長率最高，固氮酵素活性較高，氧呼吸率亦偏高，此現象與 nitrogenase 的呼吸保護作用符合。另外，本研究亦發現當含有其他氮源時，將造成菌株對 TCN 降解的抑制。如在 1 mM TCN 中添加 1、5 及 10 mM 銨離子時，TCN 降解率為 28 % (24 小時); 添加 5 及 10 mM 亞硝酸根離子時，TCN 降解率為 16 % (24 小時)。此外，在靜止細胞 (resting cells) 中降解 1 mM TCN 時，其降解率為 6 % (16 小時); 當加入 8 % 葡萄糖時則可加速 TCN 被降解的速率 (8 小時為 43 %)。此研究成果使我們對 *A. vinelandii* 分解四氰化鎳之機制有更深入的瞭解，以期日後能夠將實驗參數條件應用於含氰化物廢水的實廠處理。

關鍵詞: *Azotobacter vinelandii*; TCN; 生物分解

英文摘要

In this study, *Azotobacter vinelandii* ATCC13705 (*A. vinelandii*), which is a free-living, nitrogen-fixing, gram-negative, and aerobic rod bacterium, was need to evaluate its ability to biodegrade tetracyanonickelate (TCN) under different conditions. Results show that *A. vinelandii* was able to biodegrade various concentrations of TCN (1, 10, and 20 mM) under aerobic conditions. Higher degradation rate of TCN, higher nitrogenase activity, higher oxygen consumption, and higher specific growth rates were also observed at log growth period. Results suggest that the hypothesis of respiratory protection of nitrogenase is supported. Moreover, the addition of ammonia (1, 5, and 10 mM) would cause the decrease of TCN degradation rate (28%) during a 24-hr incubation period. Inhibition of TCN degradation (degradation rate : 16% for 24 hrs) was observed when nitrite (5 and 10 mM) was added into the growth medium. Furthermore, the addition of 8% of glucose would significantly enhance the TCN degradation by the resting cells (degradation rate : 43% for 8 hrs) . Results from this study provide us insight into the characteristics and mechanisms of TCN conversion by *A. vinelandii*.

關鍵詞: *Azotobacter vinelandii*; TCN; biodegradation

Introduction

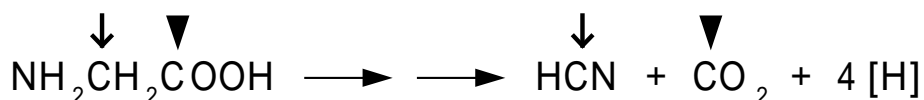
很多金屬表面處理廠通常為了增加金屬表面的光澤與美觀，常常會在電鍍製程中加入氰化物 (如氰化鈉、氰化鉀) (經濟部工業局, 1986)。因此，其製程廢

水中常會含有或高或低的氰化物。而廢水中所含氰化物可分兩大類：複合氰化物和單體氰化物。複合氰化物經水解或光解，可分解為 CN⁻和 HCN 兩種單體氰化物型態。在酸性狀態下，對形成 HCN 較有利；反之若在鹼性狀態下，對形成 CN⁻較有利。兩種單體氰化物中，就毒性而言，HCN 遠高於 CN⁻，因此，廢水中含有氰化物時，則需將廢水 pH 維持在鹼性狀態，切忌與酸混合，以防產生具有強烈毒性的 HCN。

通常氰化物為含有劇毒性之高活性化學物，會抑制以金屬離子為活性中心的酵素活性，如 hemoprotein 等，特別是位於有氧呼吸電子傳遞鏈上的胞色素氧化酵素 (Knowles, 1976)，當氰化物進入人體後，會使此酵素失活，因而導致窒息而死。對人體而言，致死量為 200~300 mg (Michael and Roberts, 1982)，因此我國現行放流水標準中，氰化物最大限值為 1.0 mg/L，美國同樣也是 1.0 mg/L，但美國所管制的只有「可被氯氧化的氰化物」，而我國所管制的是「總氰化物」。

氰化物能抑制細胞內的許多酵素活性，而其在自然界中的來源除了人為工業污染外，許多植物及微生物也會分泌氰化物到生態環境中 (Knowles, 1976)，因此往往可由植物根部土壤篩選出對氰化物具有耐受力並可利用其當作氮源的微生物 (Mizushima and Arima, 1960; Arima and Oka, 1965; Skowronski and Strobel, 1969; Knowles, 1976; Harris and Knowles, 1983a; White *et al.*, 1988; Silva-Avalos *et al.*, 1990) 而具有氰化物合成能力的植物，包含樹薯 (Cassava)、亞麻 (Flax)、高粱 (Sorghum)、紫花苜蓿 (Alfalfa)、桃樹 (Peaches)、杏仁 (Almonds) 及多種豆科植物 (Beans) 等農作類植物。這些植物通常由根部分泌氰化物到土壤中，其合成氰化物途徑為先將氨基酸 (Glycine) 合成 Cyanogenic glycoside，之後再將 Cyanogenic glycoside 分解產生氰化物。

除了上述植物之外，尚有許多原核生物 (如 *Chromobacterium violaceum*、*Pseudomonas fluorescens*、*Pseudomonas aeruginosa* 等) 也會合成、分泌氰化物，因此氰化物存在於自然界是一種普遍的現象。但其合成途徑與植物不同，是經由氨基酸直接反應，反應式如下 (Knowles, 1976; Knowles and Brunch, 1986)：



自然界中存在許多具有可分解氰化物能力的微生物，而此能力是利用菌種本身所擁有的酵素。不同種類的微生物會有不同類型的酵素，而各酵素對於氰化物分解反應機制亦不相同。

本實驗探討 *A. vinelandii* 是否利用固氮酵素來降解 TCN，同時並檢測是否還有其他的氰化物分解酵素。

3. Materials and Methods

實驗菌種

Azotobacter vinelandii ATCC 13705 購自食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心。

培養基

液體培養基為不含氮源之 Burk 培養基 (nitrogen-free Burk's medium), 其成分如下: CaCl_2 , 0.64 mM; K_2HPO_4 , 3.7 mM; MgSO_4 , 0.81 mM; Na_2MoO_4 , 0.004 mM; KH_2PO_4 , 1.2 mM; FeSO_4 , 0.01 mM; NaCl , 1.3 mM, 並再以 0.1 N HCl 調其 pH 為 7.0 (Wong, 1993)。Glucose 經高溫高壓 (120 , AS-1080L 型) 滅菌後再加入前述之培養基中, 其最終濃度為 0.8%。

四氰化鎳 (TCN) 濃度標準曲線之製備

TCN 濃度之測定係採用紫外光光譜分析法, 已知 TCN 在波長 267 nm 處有最高吸收光譜, 因此利用分光光度計 (HITACHI, U 2000 型) 對已知一系列 TCN 濃度之溶液於波長 267 nm 附近進行波長掃描, 即可得一與各 TCN 濃度相對之吸光值標準曲線 (Rollinson *et al.*, 1987; Silva-Avalos *et al.*, 1990)。

鉍離子濃度之測定

利用分析鉍離子濃度的變化, 以檢測氰化物分解產物中是否有鉍離子的存在。在 eppendorf 中加入 400 μL 樣品及 200 μL 的 Sodium phenate (取 0.312 M 之 NaOH 溶液 100 mL, 加入 2.5 g 之 phenol 配製而成) 200 μL Sodium nitroprusside (0.01%) 200 μL Sodium hypochlorite (6%), 加蓋混合均勻, 置於室溫反應 30 分鐘, 再以分光光度計 (HITACHI, U 2000 型) 測量波長 630 nm 之吸光值 (Fawcett and Scott, 1960; Rollinson *et al.*, 1987)。

甲醯胺 (Formamide) 濃度之測定

利用分析甲醯胺濃度的變化, 以檢測氰化物分解產物中是否有甲醯胺的存在。在 eppendorf 中分別加入 0.2 mL 樣品、0.2 mL 3.5 N 之 NaOH、0.2 mL 之 2.3 M Hydroxylamine hydrochloride, 置於 60 水浴槽中 10 分鐘, 再於室溫下加入 0.2 mL 之 4 N HCl 及 0.2 mL 之 1.23 M FeCl_3 , 靜置 5 分鐘後, 以分光光度計 (HITACHI, U 2000 型) 測量波長 540 nm 之吸光值 (Kunz *et al.*, 1992)。

甲酸 (Formate) 濃度之測定

利用分析甲酸濃度的變化, 以檢測氰化物分解產物中是否有甲酸的存在。在 eppendorf 中分別加入 0.02 mL NAD solution (0.05 M $^-$ -NAD) 0.16 mL 樣品 0.80 mL phosphate buffer (50 mM, pH 7.0), 以分光光度計 (HITACHI, U 2000 型) 測量波長 340 nm 之吸光值 E_1 , 之後再加入 0.02 mL formate dehydrogenase (20 U / mL), 混合均勻後靜置 2 ~ 4 分鐘, 再以分光光度計 (Hitachi U 2000) 測量波長 340 nm 之吸光值 (Hopner and Knappe, 1974)。

結果與討論

圖一顯示，當細菌處於遲滯期（0~19小時）時，四氰化鎳並無明顯降解的現象，而隨著菌量的增加，在第19小時（對數生長期）可發現四氰化鎳濃度亦隨之下降，直到93小時後將20 mM四氰化鎳降解至12.6 mM。推測此菌可利用TCN作為氮源以供生長。相關文獻(Harris and Knowles, 1983b; Ingvorsen *et al.*, 1991; Kunz *et al.*, 1992; Barclay *et al.*, 1998b; Kwon *et al.*, 2002)指出氰化物具有相當多的酵素降解途徑，而且不同酵素會產生不同的降解產物及降解途徑。目前已證實氰化物被降解後，所產生的產物包含甲醯胺、甲酸、氨、二氧化碳和甲烷等，但並不是每一株菌降解氰化物都會產生以上所述的產物，因為每株菌本身所具有的酵素皆不同，就會有不同的產物產生。依據Kunz等人(1992)的研究，*P. fluorescens* NCIMB11764在降解氰化物後可檢測到甲醯胺(formamide)和甲酸(formate);另外1998年Watanabe等人的研究中也指出*P. stutzeri* Ak61降解氰化物後會產生甲酸。同時也已知甲醯胺和甲酸是由cyanide hydratase和cyanidase降解氰化物所產生的，因此若可檢測到甲醯胺和甲酸，則cyanide hydratase和cyanidase就極有可能為其氰化物降解酵素。而甲烷和氨則是固氮酵素降解氰化物之產物(Li *et al.*, 1982; Kao *et al.*, 2003)。故本實驗測定四氰化鎳被菌種降解後之產物，以間接推測何種酵素可能參與降解作用。Figure 2為靜止細胞(resting cells)分解10 mM四氰化鎳過程中，檢測是否有甲醯胺的生成。在10小時內四氰化鎳由原濃度10.5 mM降解至7.6 mM，而甲醯胺濃度並未隨四氰化鎳濃度降低而增加(每隔2小時檢測一次TCN及甲醯胺濃度)。雖然甲醯胺在TCN降解過程中，無法測得其存在，但亦不能排除其為TCN降解後之可能性產物。另外甲酸(formate)為cyanidase降解TCN之產物(Watanabe *et al.*, 1998; Barclay *et al.*, 1998b; Kwon *et al.*, 2002)，本實驗亦未測得甲酸之產生(data not shown)。此外，發現此菌株並不會利用甲酸(data not shown)。因此可推測*A. vinelandii*極有可能不具有cyanidase，因為當四氰化鎳被降解時，並未測得甲酸的存在。由以上結果可排除cyanidase參與TCN降解之可能性。

銨離子為四氰化鎳被降解後之最終產物(Yanase *et al.*, 2000; Kwon *et al.*, 2002; Kao *et al.*, 2003)，Figure 3顯示四氰化鎳在靜止細胞(resting cells)情況下，其降解能力較為緩慢，但仍可測得銨離子的產生。在第14小時銨離子產量最高，為0.1 mM，之後銨離子生成曲線便呈現遞減趨勢，直到第24小時便檢測不到銨離子濃度；而四氰化鎳則由原濃度1.0 mM降解為0.8 mM。由此可推知四氰化鎳的降解會導致銨離子的生成，且在其它研究中亦有提及氰化物可被降解成銨離子以供細胞利用(White *et al.*, 1988; Fallon *et al.*, 1991; Kunz *et al.*, 1992; Watanabe *et al.*, 1998)。但在生長情況下卻無法測得銨離子的產量，此現象可能是因為銨離子迅速被利用掉，在Kunz等人(1992)之研究中*P. fluorescens* NCIMB 11764亦有相同情形，當氰化物濃度較低時(0.25~1 mM)並無法測得銨離子的濃度。

當培養基中缺乏葡萄糖時，其 TCN 降解情形十分緩慢，但加入葡萄糖卻可促進 resting cells 對四氰化鎳快速的降解，Figure 4 為降解過程中加入葡萄糖後，四氰化鎳快速被降解之情形。結果顯示，在 16 小時前未加入葡萄糖時，四氰化鎳降解速度較緩慢，由原濃度 1.0 mM 降到 0.9 mM，但在第 16 小時加入葡萄糖後，四氰化鎳便在 8 小時內快速降解至 0.5 mM。同時也檢測不到銨離子濃度。推測葡萄糖在此過程中是提供菌種碳源以利能分解 TCN，消耗能量所需。Kwon 等人 (2002) 的研究中就指出 *Cryptococcus humicolus* MCN2 有相同的現象，假如提供足夠的碳源 (例如，葡萄糖) 便能夠快速降解高濃度的金屬氰化物。

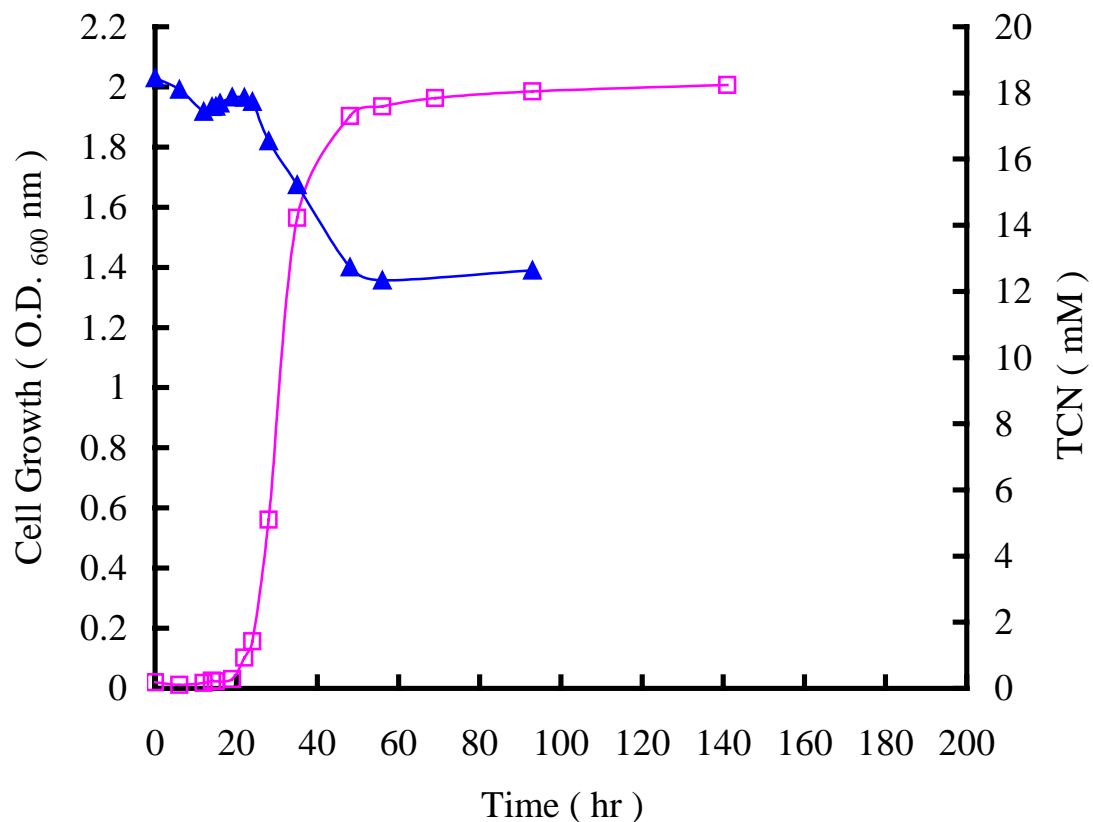


Fig. 1. The growth curve of *A. vinelandii* and TCN degradation in Burk's medium contained 20 mM TCN. () cells growth curve ; () consumption of 20 mM TCN.

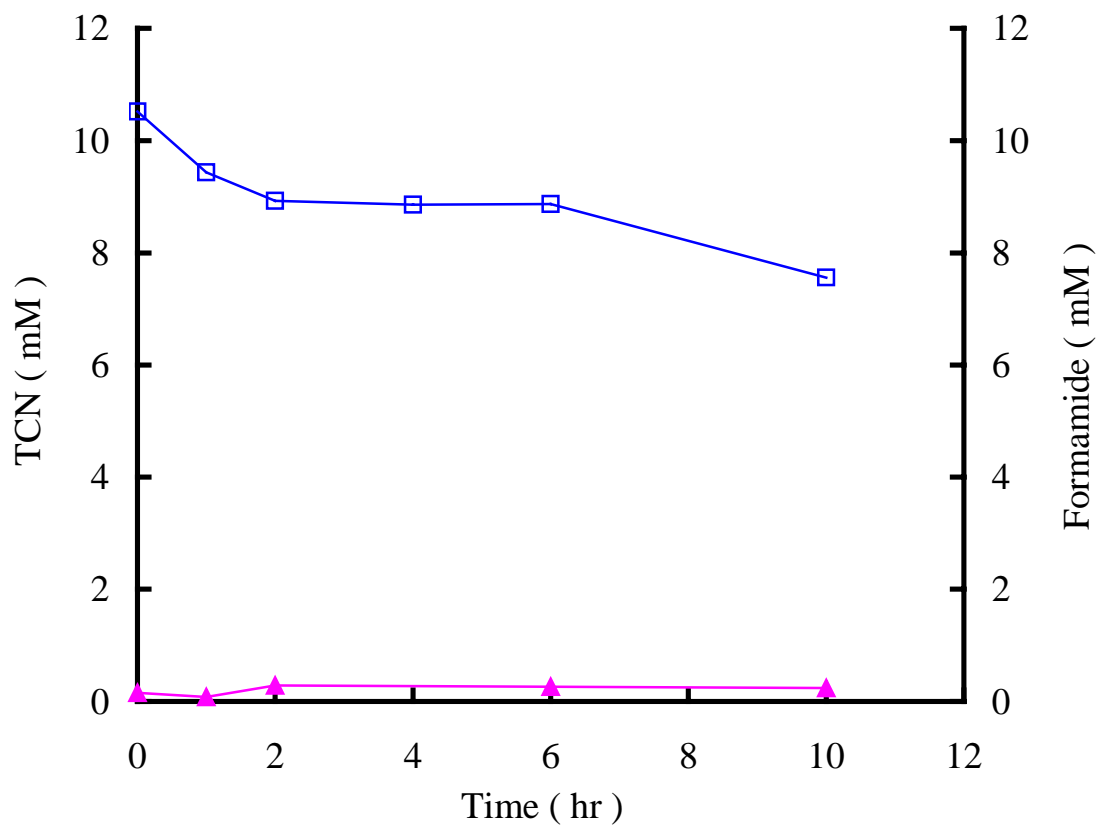


Fig. 2. The degradation of TCN and the formation of formamide by *A. vinelandii* resting cells (O.D.₆₀₀ nm = 1.00, cell mass = 0.5 mg / mL) in Burk's medium. () 10 mM TCN ; () formamide.

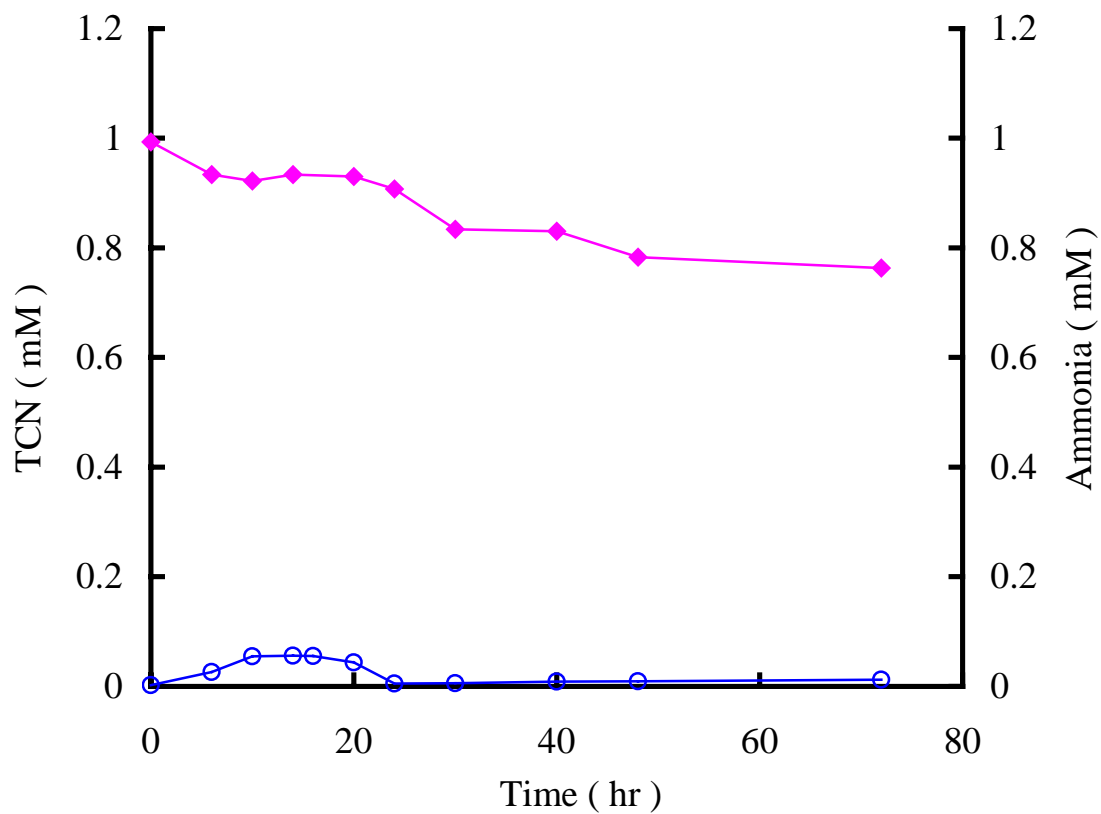


Fig. 3. The degradation of 1mM TCN and production of ammonia by *A. vinelandii* resting cells in Burk's medium. () 1 mM TCN ; () amounts of ammonia.

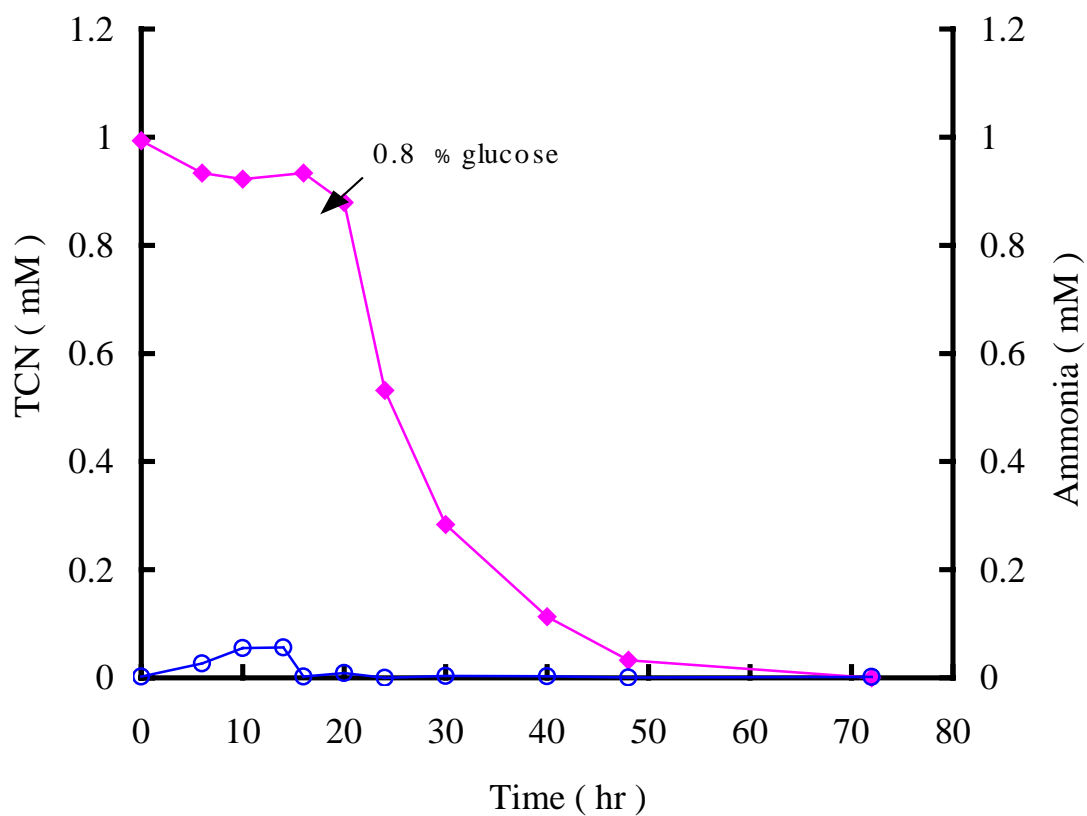


Fig. 4. The degradation of 1mM TCN and production of ammonia by *A. vinelandii* resting cells in Burk's medium with the addition of 0.8% glucose into 16 hours cultures. () 1 mM TCN ; () amounts of ammonia.

Reference

Arima, K., and Oka, T. (1965) Cyanide resistance in *Achromobacter*. I. Induced formation of *cytochrome a* and role in cyanide-resistant respiration. *Journal of Bacteriology* 90 : 734-743.

Burris, R. H. and Wilson, P. W. (1946) Ammonia as an intermediate in nitrogen fixation by *Azotobacter*. *Journal of Bacteriology* 9 : 505-512.

Chena, S. C., and Liu, J. K. (1999) The respiratory responses to cyanide of a cyanide-resistant *Klebsiella oxytoca* bacterial strain. *FEMS Microbiology Letters* 175 : 37-43.

Fawcett, J. K., and Scott, J. E. (1960) A rapid and precise method for the determination of urea. *Journal of Clinical Pathology* 13 : 156-160.

Haddock, B. A., and Jones, C. W. (1977) Bacterial respiration. *Bacteriological Reviews* 41 : 47-99.

Harris, R. E., and Knowles, C. J.(1983a)The conversion of cyanide to ammonia by extracts of a strain of *Pseudomonas fluorescens* that utilizes cyanide as a source of nitrogen of growth. *FEMS Microbiology Letters* 20 : 337-341.

Hopner, Y., and Knappe, J. (1974) Formate : determination with formate dehydrogenase. *Methods of Enzymatic Analysis* 3 : 1551-1555.

Jones, R., Woodley, P., and Robson, R. (1984) Cloning and organization of some genes for nitrogen fixation from *Azotobacter chroococcum* and their expression in *Klebsiella pneumoniae*. *Molecular & General Genetics* 197 : 318-327.

Klugkist, J., and Haaker, H.(1984)Inhibition of nitrogenase activity by ammonium chloride in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* 157 : 148-151.

Knowles, C. J. (1976) Microorganisms and cyanide. *Bacteriological Reviews* 40 : 652-680.

Knowles, C. J., and Bunch, A. W. (1986) Microbial cyanide metabolism. *Advances in Microbial Physiology* 27 : 73-111.

Knowles, C. J.(1988)Cyanide utilization and degradation by microorganisms. *CIBA Foundation Symposium* 140 : 3-15.

KoKormondy, E. J. (1996) *Concepts of Ecology*. Fourth edition : 128-140.

Krol, A. J. M., Hontelez, J. G. J., Roozendall, B., and Kammen, A. van.(1982)On the operon structure of the nitrogenase genes of *Rhizobium leguminosarum* and *Azotobacter vinelandii*. *Nucleic Acids Research* 10 : 4147-4157.

Kunz, D. A., Nagappan, O., Silva-avalos, J., and Delong, G. T.(1992)Utilization of cyanide as a nitrogenous substrate by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764 : evidence for multiple pathways of metabolic conversion. *Applied and Environmental Microbiology* 58 : 2022-2029.

Kunz, D. A., Wang, C. S., and Chen, J. L. (1994) Alternative routes of enzymic cyanide metabolism in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. *Microbiology* 140 : 1705-1712.

Liu, J. K., Liu, C. H., and Lin, C. S. (1997) The role of nitrogenase in a cyanide-degrading *Klebsiella oxytoca* strain. *Proceedings of the National Science Council B, ROC* 21 : 37-42.

Lucinski, R., Polcyn, W., and Ratajczak, L. (2002) Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium legumes*. *Acta Biochimica Polonica* 49 : 537-546.

Manhart, J. R., and Wong, P. P. (1979) Nitrate reductase activities of *Rhizobia* and the correlation between nitrate reduction and nitrogen fixation. *Canadian Journal of Microbiology* 25 : 1169-1174.

Michael, I. G., and Roberts, J. R. (1982) Cyanide poisonings. *Emergency Medicine* : 112-113.

Mizushima, S., and Arima, K. (1960) Mechanism of cyanide resistance in *Achromobacter*. I. Adaptive formation of cyanide resistant respiratory system in growing cells. *The Journal of Biochemistry* 47 : 351-360.

Nester, E. W., Roberts, C. E., and Nester, M. T.(1995)Metabolism : The generation of energy and synthesis of small molecules. *Microbiology. Wm. C. Brown Communications, Inc.*

Perry, J. J., and Staley, J. T.(1997)*Microbiology : Dynamics & Diversity* : 442-444.

Schmitz, R. A., Klopprogge, K., and Grabbe, R. (2002) Regulation of nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae* and *Azotobacter vinelandii* : *NifL*, transducing two environmental signals to the *nif* transcriptional activator *NifA*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 4 : 235-242.

Silva-Avalos, J., Richmond, M. G., Nagappan, O., and Kunz, D. A. (1990) Degradation of the metal-cyano complex tetracyanonicklate () by cyanide-utilizing bacterial isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 56 : 3364-3670.

Skowronski, B., and Strobel, G. A.(1969)Cyanide trsistance and cyanide utilization by a strain of *Bacillus pumilus*. *Canadian Journal of Microbiology* 15 : 93-98.

Vaughn, S. A., and Burgess, B. K. (1989) Nitrite, a new substrate for nitrogenase. *Biochemistry* 28 : 419-424.

Watanabe, A., Yano, K., Ikebukuro, K., and Karube, I. (1998)Cyanide hydrolysis in a cyanide-degrading bacterium, *Pseudomonas stutzeri* AK61, by cyanidase. *Microbiology* 144 : 1677-1682.

Way, J. L.(1983)Mechanism of cyanide intoxication and its antagonism :introduction. *Fundamental and Applied Toxicology : Official Journal of the Society of Toxicology* 3 : 369.

White, J. M., Jones, D. D., Huang, D., and Gauthier, J. J. (1988) Conversion of cyanide to formate and ammonia by a pseudomonad obtained from industrial wastewater. *Journal of Industrial Microbiology* 3 : 263-272.

Wong, T. Y. (1993) Effects of calcium on sugar transport in *Azotobacter vinelandii*. *Applied and Environmental Microbiology* 59 : 89-92.

Yates, M. G. (1970) Control of respiration and nitrogen fixation by oxygen and adenine nucleotide in N₂-grown *Azotibacter chroocoececa*. *Journal of General Microbiology* 60 : 393-401.