

中華民國 第 49 屆中小學科學展覽會

作品說明書

高中組 生物（生命科學）科

040717

甩掉地球的油污 -- 機油汙染之復育

學校名稱：國立華僑實驗高級中學

作者： 高二 劉俐君 高二 鍾翊嘉 高二 江雨軒 高二 張哲齊	指導老師： 許慧珊 黃愛純
---	-----------------------------

關鍵詞：機油分解菌、天然去污劑、生物復育

摘要

機油一直是環境中常見且難以解決的污染問題之一。爲了尋找是否有方法能加快清除機油污染，我們搜集數種坊間傳說具有去油污能力的天然物，先將其浸泡於機油中作前處理，再加入自機油污染處分離出具分解機油能力之土壤菌(分別爲 *Gordonia* spp.及 *Ochrobactrum* spp.)，藉由測量菌液的 O.D 值以推測機油分解菌分解機油的效率。實驗結果顯示，經黃豆渣處理的機油，能使機油分解菌在相同時間內大量繁殖，提高機油分解的速率。另外，我們將分解後的機油淋在剛萌芽的綠豆上，與未經分解的機油比較，發現分解後的機油能降低對綠豆的毒性。因此我們認爲在生物復育的過程中，可以先將黃豆渣灑於機油污染處，再加入機油分解菌，以縮短復育的時間並提高分解效率。

壹、 研究動機

從小住在台北郊區，住家附近有許多修車廠及機車行，地上常有刷也刷不乾淨的機油髒污，且生長在機油污染處的植物常呈現枯黃、發育不良的現象，讓人非常束手無策且無奈。直到高一學基礎生物細菌單元時，老師介紹細菌可應用於生物復育，處理許多棘手的環境污染問題，這讓我們聯想到以細菌來分解機油的可行性。經網路查閱相關資料，發現細菌雖然可以分解多環芳香族碳氫化合物(PAH)、DDT、壬基苯酚等特殊物質，但多需經長時間才能見到成效。因此我們想知道是否能以坊間傳說具有分解油污效能的物質先將機油作前處理，以加速細菌分解機油的能力，故我們搜集了生活中常見的天然廢棄物來做以下的實驗。

貳、 研究目的

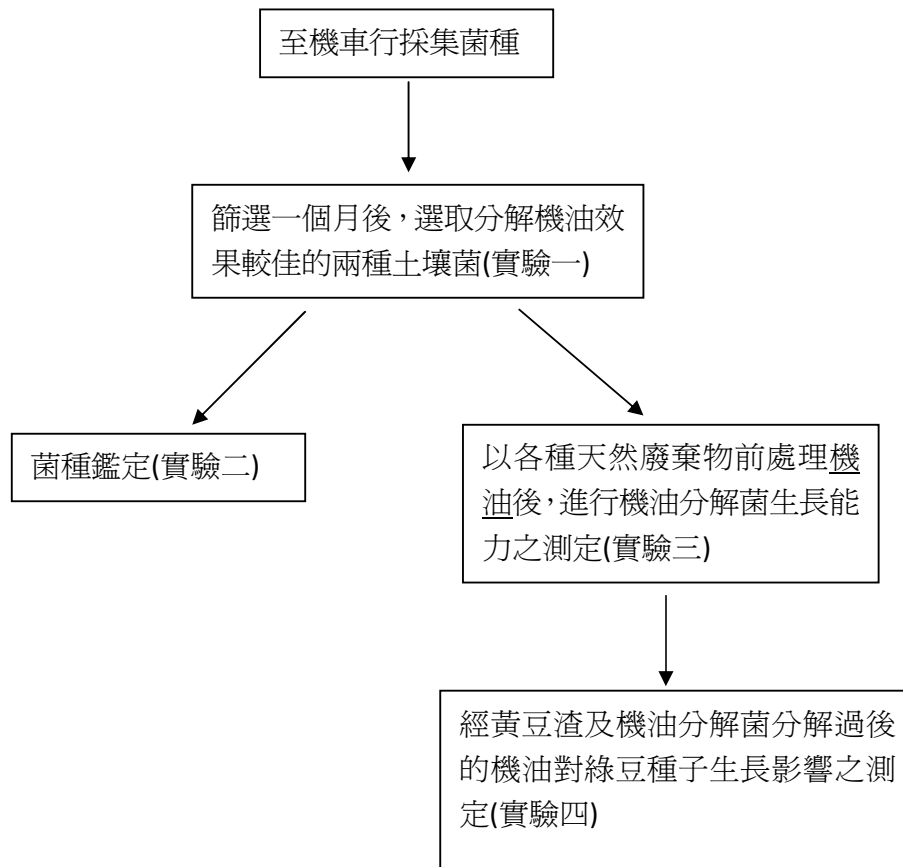
- 一、自土壤中分離出具有分解機油能力的微生物
- 二、生化測試與分子生物鑑定分離出的土壤菌可能的菌屬
- 三、以咖啡渣、黃豆渣、洗米水、苦茶粉、茶葉渣處理機油後，進行機油分解菌的分解能力測定
- 四、經機油分解菌分解後的機油對綠豆生長影響之測定

參、 研究設備及器材

- 一、含蓋試管
- 二、BH(Bushnell-Hass)培養液
每公升中含：

MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2g
CaCl ₂	0.02g
KH ₂ PO ₄	1.0g
K ₂ HPO ₄	1.0g
NH ₄ NO ₃	1.0g
- 三、LB 培養液、培養基
- 四、澱粉培養基
- 五、過氧化氫水溶液（3.0%）
- 六、無菌操作台
- 七、高溫高壓滅菌器
- 八、迴旋式震盪培養箱
- 九、錐形瓶
- 十、蒸餾水
- 十一、接種環
- 十二、酒精燈
- 十三、機油(Esso 2T-Power)
- 十四、甘油
- 十五、冷凍管
- 十六、格蘭氏碘液、沙紅、結晶紫、
脫色劑
- 十七、離心機
- 十八、離心管(15mL)
- 十九、顯微鏡
- 二十、分光光度計
- 二十一、70%藥用酒精
- 二十二、咖啡渣、洗米水、黃豆渣、
苦茶粉、茶葉渣
- 二十三、微量吸管(pipement)

肆、 研究過程與方法



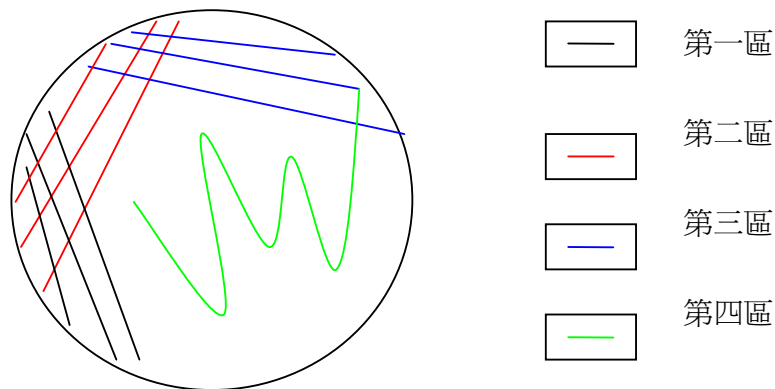
【實驗一、菌種純化】

我們在樹林後火車站附近機車行的機油桶下方挖取表層土壤作為材料，將土壤置於錐形瓶中並加入鹽類培養液(BH medium)，於恆溫震盪培養箱中，以轉速 150 r.p.m，30°C 培養約 2 週，期間每隔 3~4 天將培養液接種至平板培養基上，最後純化的菌種又分別接至試管並加入機油及鹽類培養液，以此篩選出分解機油效果較好的兩種土壤菌作主要研究對象。

實驗步驟

(一) 利用接種環將土壤培養液以四區劃法的方式劃至平板培養基(如圖一)，於 30°C，培養 24 小時後觀察菌落外觀與形態，再挑取不同菌落，以相同方法劃至平板培養基上，以確認菌種是否為純種。

- 【程序】**
- 1、將接種環燒紅，待涼後沾菌液於平板培養基上畫 3~4 條直線(第一區)
 - 2、接種環再燒紅，待涼後將平板培養基轉 90 度畫 3~4 條直線(第二區)
 - 3、重復步驟 1 及 2，畫出第三區
 - 4、此時不必再燒紅接種環，將平板培養基轉 90 度後，直接自第三區以鋸齒型畫出第四區



<圖一> 四區劃法

(二) 菌種純化完成後，進行菌種保存。首先將純化的菌落分別接種於營養培養液中(LB broth)，於 150 r.p.m，30°C 中培養 24 小時。再取凍管，加入 850 μ L 菌液與 150 μ L 已滅過菌的甘油混合均勻後，置於冰箱冷凍庫內保存。

【實驗二、菌種鑑定】

在實驗一中我們分離出對機油利用效果較佳的二種土壤菌，分別暫定名稱爲 A4 及 A6。爲了瞭解這些菌種在分類上的位階，我們以傳統的測試生化反應來進行菌種鑑定，以生化反應結果、菌落外形及細菌外觀等特徵比對『Bergey's Manual of Systematic Bacteriology』，以鑑定出 A4 及 A6 可能的屬名。

此外，爲了更進一步確認菌種，我們將 A4 及 A6 送至「明欣生物科技公司」進行 16s rRNA 的基因序列分析，來確認我們分離出的菌種。

實驗步驟

(一) 格蘭氏染色：

【原理】 此方法是利用染色方式來區別出細菌細胞壁的差異。格蘭氏陽性菌(Gram positive)的細胞壁外含大量的肽聚糖，脂質含量較少，使結晶紫染劑經酒精脫水後顏色不易移除而保留紫色；格蘭氏陰性菌(Gram negative)的細胞壁外側含大量的脂質，易被酒精溶解使結晶紫染劑不易保留，因此經番紅染色後即形成紅色。

【試劑】 結晶紫染劑、格蘭氏碘液、番紅、95%酒精

【程序】 1、滴一滴蒸餾水於載玻片上

2、以牙籤取一點菌落塗抹於蒸餾水中，待乾後再以酒精燈加熱固定

3、以結晶紫染色約 40 秒

4、以蒸餾水沖洗，再乾後加入格蘭氏碘液，作用約 40 秒

5、以蒸餾水沖去格蘭氏碘液，待乾後再逐滴滴下 95%酒精，直到結晶紫自塗抹處移除

6、以蒸餾水輕洗去酒精，待乾後以番紅染色約 40 秒

7、再以蒸餾水沖洗，待乾後即可在顯微鏡下觀察

(二) 澱粉水解酶測定(starch hydrolysis)

【原理】 澱粉是葡萄糖所構成的分枝聚合物，此巨分子可藉由澱粉水解酶(amyase)的作用將其分解爲糊精，再經由其他酵素分解爲麥芽糖、葡萄糖。實驗中使用澱粉平板培養基作測試，在培養一段時間後，以碘液檢測澱粉的存在，若滴入培養基時呈紫黑色，則表示澱粉存在(即菌落不產生澱粉酵素)，爲陰性反應；反之，若在微生物生長的周圍有一透明區出現(clear zone)，則

表示澱粉不存在(即菌落產生澱粉酵素)，為陽性反應。

- 【材料】** 1、澱粉培養基：正常 LB 培養基加上 1.0%的水解澱粉
2、碘液

- 【程序】** 1、以接種環取菌液塗抹於澱粉培養基，於 30°C 培養 48 小時
2、滴入大量碘液觀察結果

(三) 觸酶測試(Catalase test)

【原理】 大多數的好氧菌(aerobics)及兼性菌在行有氧呼吸的過程中會產生過氧化氫(H₂O₂)，而過氧化氫的累積將導致微生物的死亡，因此有些細菌會產生觸酶(catalase)將過氧化氫分解為水及氧氣。實驗中加入過氧化氫，若菌落能產生觸酶，其周圍立刻可見大量氣泡(氧氣)產生，此即為陽性反應；反之，若不能產生觸酶，則無氣泡生成，即為陰性反應。

【材料】 雙氧水(H₂O₂ 3%)

- 【程序】** 1、以接種環取菌液塗抹於平板培養基，於 30°C 培養 48 小時
2、將 3%雙氧水直接加在菌落上，觀察有無氣泡(氧氣)產生

(四) 16S rRNA 基因序列分析

【原理】 16S rRNA 是一種在原核細胞、葉綠體及粒線體中與蛋白質結合，形成核糖體的 RNA。幾乎所有的細菌皆有 16S rRNA 的基因，且其功能及序列不易隨時間過往而改變，因此 16S rRNA 基因序列是最常被應用在細菌演化及分類學的研究上。

【程序】 1、分別萃取出 A4 及 A6 的 DNA

2、加入引子，以 PCR 的技術放大 16S rRNA 的基因片段

* 註：引子分別為 16s-F1: AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG

16s-R1: GGC TAC CTT GTT ACG ACT T

3、利用 DNA 自動定序儀分析出 A4 及 A6 的 16S rRNA 基因序列

4、與資料庫比對，推測出最有可能的菌屬

【實驗三、機油分解菌對不同天然物處理後的機油利用情形測定】

爲了瞭解生活中的天然廢棄物，是否能加速機油分解菌生長，我們收集了黃豆渣、洗米水、咖啡渣、茶葉渣、苦茶粉等民間流傳具去油污能力等物質，滅菌後與機油混合三天，再將機油分離出來做爲實驗材料來源。

- 【程序】
- 1、取黃豆渣、洗米水、咖啡渣、茶葉渣、苦茶粉各 2 克，分別置於離心管中
 - 2、加入 10mL 機油，充分混合均勻後，置於 30°C 恆溫培養箱中 3 天
 - 3、將處理過後的機油倒入無菌的離心管備用
 - 4、取滅過菌的 BH 培養液(5mL)，加入經不同前處理的機油 300 μ L，再加入 200 μ L 菌液，置於 30°C 恆溫培養箱中培養 1~4 週後，以分光光度計於波長 600nm 下測量菌液的 O.D 值。

【實驗四、經機油分解菌處理過後的機油對綠豆影響之觀察】

機油曝露於自然環境中，會對污染處的生物有害。我們將機油淋於綠豆上，藉由觀察綠豆的外表形態及根的發育情形來推測，經機油分解菌處理過後的機油是否能減少機油對生物的傷害。

- 【程序】
- 1、將綠豆浸泡一夜，使種皮裂開，長出胚根
 - 2、取三個培養皿，置入適量棉花，噴水使其濕潤
 - 3、培養皿中分別放入 15 顆已萌發的綠豆，並加入不同液體：
 - I、加入 5mL 蒸餾水
 - II、加入 5mL 蒸餾水及 500 μ L 機油
 - III、加入 5mL 蒸餾水及 500 μ L 以 A4 及黃豆處理過後的機油
 - 4、置於室溫下，每天測量根的生長長度，並加入蒸餾水及機油。

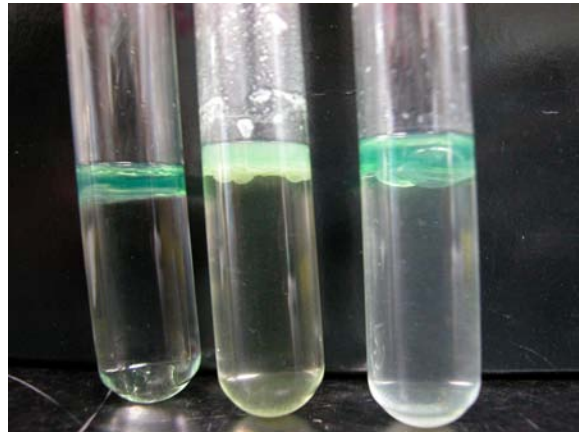
伍、研究結果

【實驗一、機油分解菌的選殖】

我們自樹林後火車站附近的機車行挖取被機油污染的土壤作菌種純化，在這個實驗中，我們以傳統的四區劃法分離菌落，待觀察菌落的外觀、顏色、形態後再選擇不同菌落加以純化，並將純化的菌種培養於以機油為唯一碳源的鹽類培養液中，選取具分解機油能力的細菌(如圖二)。圖中白綠色為乳化後的機油，下方則為培養細菌的鹽類溶液，當鹽類溶液呈現較混濁的狀況或是機油乳化效果明顯時，代表細菌的生長狀況較佳，利用機油的效果較好。在經過約四週的篩選後，我們選取分解機油效果較明顯且生長狀況較佳的兩株菌，分別命名為 A4 及 A6，並以此二株菌作為接下來實驗的主要研究對象。



(A)



(B)

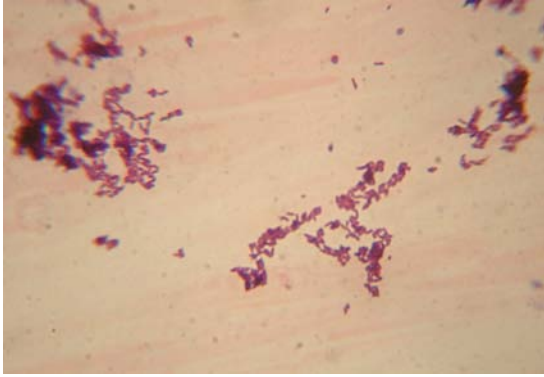
<圖二> 使用機油為唯一碳源的培養液進行土壤菌篩選。

(A)土壤菌篩選； (B)在機油為唯一碳源的培養基中，A4、A6 分解利用機油的生長情形。由左至右分別為對照組、A4 菌液及 A6 菌液

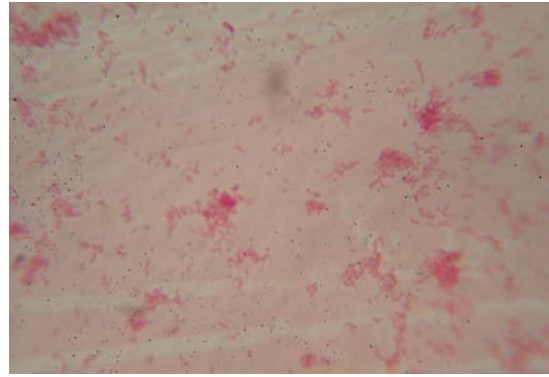
【實驗二、機油分解菌的鑑定】

為了瞭解 A4 及 A6 的分類位階，我們藉由觀察細菌的來源環境、外型與各種生化測定將兩種土壤菌做初步分類。首先我們將 A4 及 A6 以格蘭氏染色法染色，並利用光學顯微鏡放大 1000 倍觀察其顏色及外形。A4 經染色後呈現紫色(為格蘭氏陽性)，細胞為規則排列的短桿狀桿菌。A6 呈現紅色(為格蘭氏陰性)，細胞為不規則排列的短桿

狀桿菌(如圖三)。



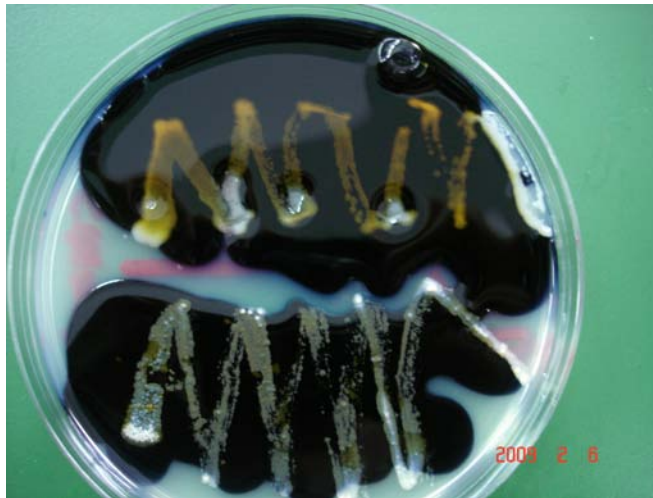
(A)



(B)

<圖三> 機油分解菌格蘭氏染色結果與外型觀察：(A)為 A4-LMs，1000X；(B)為 A6-LMs，1000X

接著我們將 A4 及 A6 培養於澱粉培養基上，兩天後於培養基中加入碘液以測試 A4 及 A6 是否具有分解澱粉的能力。結果發現 A4 及 A6 菌落周圍皆沒有透明區域出現(如圖四)，表示 A4 及 A6 皆不會產生澱粉水解酶。



<圖四> 澱粉水解酶測定。下方菌種為 A4，上方為 A6，二者菌落周圍皆無透明區域出現

在觸酶測試中，我們將菌種培養於 LB 培養基，兩天後於菌落上加入雙氧水，結果發現 A4 及 A6 菌落周圍皆有氣泡出現，表示 A4 及 A6 皆會產生觸酶可將過氧化氫分解成水與氧氣（如圖五）



<圖五> 觸酶測定。左方菌種為 A4，右方為 A6，加入雙氧水後，菌落周圍皆有氣泡出現。

經由觀察細菌的外形及生化測定，我們將結果整理為表一，並根據觀察結果比對《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》進行分類。據此我們推測 A4 的屬名可能為 *Brochothrix*、*Nocardia*；A6 的屬名可能為 *Pseudomonas*、*Flavobacterium*、*Bordetella*、*Brucella*(如表二)。

<表一> A4 及 A6 菌種鑑定表

待測菌種 \ 測試方法	菌落外觀	格蘭氏染色	細胞排列	細胞外觀	澱粉水解酶測定	觸酶測定
A4	米黃色，菌落呈不規則粗糙狀	紫色 (G+)	規則排列	桿菌	無透明區域 (-)	有氣泡產生 (+)
A6	橘黃色，菌落光滑具光澤	紅色 (G-)	不規則排列	桿菌	無透明區域 (-)	有氣泡產生 (+)

* 註：「G+」代表格蘭氏陽性菌，「G-」代表格蘭氏陰性菌；「+」代表有反應，「-」代表無反應

<表二> A4 及 A6 可能的屬名

菌種	可能的屬名
A4	<i>Brochothrix</i> 、 <i>Nocardia</i>
A6	<i>Pseudomonas</i> 、 <i>Flavobacterium</i> 、 <i>Bordetella</i> 、 <i>Brucella</i>

* 註：菌種可能的屬名是根據《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》中的分類進行推測。

A4 是根據 Section 14 及 17：G(+) Rods，Catalase(+)，the colonies are flatter with irregular edge and rough surface

A6 是根據 Section 4：G(-)Rods and cocci，Catalase(+)，Starch hydrolysis(-)，the colonies are circular, smooth and shiny with entire edges

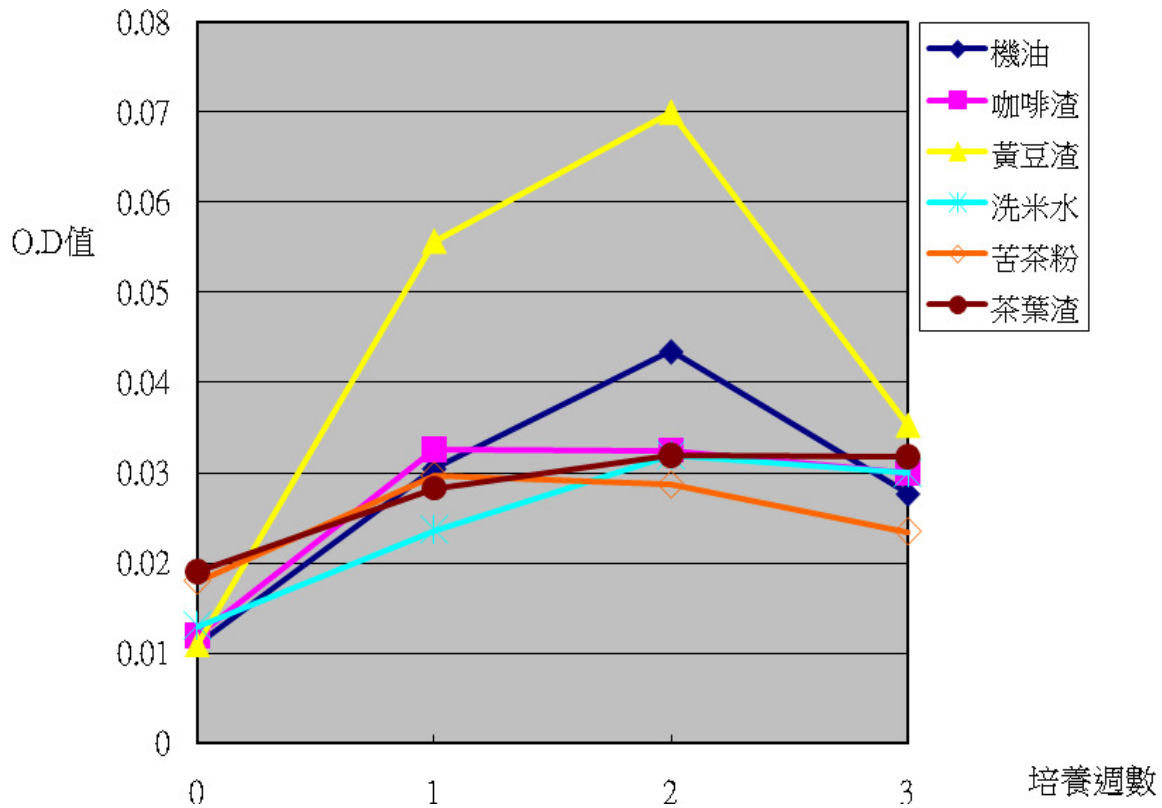
爲了更加確定分離出的土壤菌的分類地位，我們將菌種委託「明欣生物科技公司」進行 16S rRNA 的基因序列分析。經 PCR 擴增和定序，A4 得到長度約 1,401bp 的序列，A6 得到長度約 1,349bp 的序列(結果如附件一、二)，比對資料庫後 A4 最可能的菌屬爲 *Gordonia*，而 A6 最可能的菌屬則爲 *Ochrobactrum*。

【實驗三、機油分解菌對不同天然物處理後的機油利用情形測定】

爲了瞭解是否有方法能使機油分解菌分解機油的效能提高，我們搜集了坊間傳說具有分解油污效果的天然物質，分別爲：咖啡渣、黃豆渣、洗米水、苦茶粉、茶葉渣。將這些天然物先加入機油浸泡三天後，將機油分離出來並加入 A4 及 A6 加以培養，測定其在 600nm 下的 O.D 值，藉此推測以天然物作先處理過的機油，是否能加速機油分解菌的生長。經培養數週後所測得的 O.D 值如表三及表四，並將數據轉爲折線圖(如圖六、圖七所示)。由表三及圖六可發現，A4 菌種在未經處理、經黃豆渣、茶葉渣處理後的機油內培養，至第二週時菌液的 O.D 值達到最高，第三週時菌液的 O.D 值則開始下降，且在各種不同處理的機油環境下，以黃豆渣處理過的機油培養 A4 可使細菌明顯增生，但以咖啡渣、洗米水、苦茶粉及茶葉渣處理過的機油培養則無此顯著效果。

<表三> A4 以不同天然物處理過的機油為碳源的菌液 O.D 值

機油 種類	培養 時間	對照組 (不加菌)	對照組 平均	對照組 標準差	菌液 O.D 值 平均值	標準差
未處理 的機油	1 週	0.015	0.0113	0.0029	0.0305	0.0060
	2 週	0.008			0.0435	0.0092
	3 週	0.011			0.0277	0.0066
咖啡渣 處理	1 週	0.010	0.0120	0.0016	0.0326	0.0099
	2 週	0.014			0.0325	0.0103
	3 週	0.012			0.0540	0.0174
黃豆渣 處理	1 週	0.010	0.0113	0.0026	0.0557	0.0111
	2 週	0.009			0.0700	0.0120
	3 週	0.015			0.0353	0.0118
洗米水 處理	1 週	0.014	0.0127	0.0026	0.0237	0.0087
	2 週	0.009			0.0320	0.0150
	3 週	0.015			0.0300	0.0082
苦茶粉 處理	1 週	0.020	0.0187	0.0009	0.0297	0.0027
	2 週	0.018			0.0287	0.0030
	3 週	0.018			0.0235	0.0040
茶葉渣 處理	1 週	0.020	0.0193	0.0009	0.0283	0.0018
	2 週	0.018			0.0320	0.0052
	3 週	0.020			0.0318	0.0103

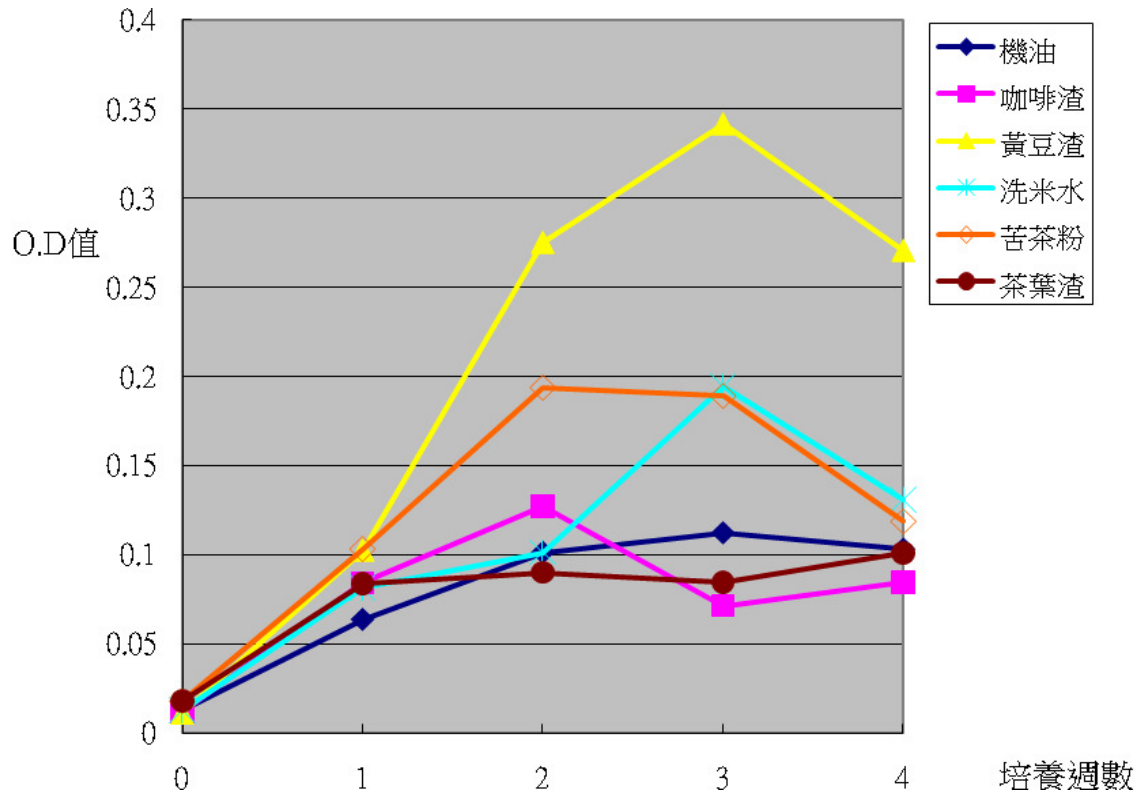


<圖六> A4 以不同天然物處理過的機油為碳源之菌液 O.D 值變化

由表四及圖七則可發現，A6 菌種在未經處理、經黃豆渣、洗米水及苦茶粉處理後的機油內培養，至第三週時菌液的 O.D 值達到最高，第四週時菌液的 O.D 值則開始下降，與未經處理過的機油相比，A6 培養在以黃豆渣、洗米水及苦茶粉處理過的機油環境下，皆能使細菌繁殖得較快速，其中也是以黃豆渣處理過的機油效果最顯著。

<表四>、A6 以不同天然物處理過的機油為碳源的菌液 O.D 值

機油 種類	培養 時間	對照組 (不加菌)	對照組 平均	對照組 標準差	菌液 O.D 值 平均值	標準差
未處理 的機油	1 週	0.015	0.0115	0.0025	0.0637	0.0070
	2 週	0.008			0.1015	0.0241
	3 週	0.011			0.1125	0.0101
	4 週	0.012			0.1033	0.0222
咖啡渣 處理	1 週	0.010	0.0133	0.0016	0.0843	0.0101
	2 週	0.014			0.1273	0.0234
	3 週	0.012			0.0715	0.0085
	4 週	0.017			0.0845	0.0105
黃豆渣 處理	1 週	0.010	0.0108	0.0026	0.1027	0.0156
	2 週	0.009			0.2755	0.0115
	3 週	0.015			0.3420	0.0200
	4 週	0.009			0.2710	0.0235
洗米水 處理	1 週	0.014	0.0128	0.0026	0.0813	0.0045
	2 週	0.009			0.1013	0.0086
	3 週	0.015			0.1945	0.0265
	4 週	0.013			0.1310	0.0090
苦茶粉 處理	1 週	0.020	0.0168	0.0034	0.1033	0.0061
	2 週	0.018			0.1940	0.0556
	3 週	0.018			0.1893	0.0118
	4 週	0.011			0.1188	0.0267
茶葉渣 處理	1 週	0.020	0.0170	0.0041	0.0833	0.0120
	2 週	0.018			0.0898	0.0210
	3 週	0.020			0.0840	0.0188
	4 週	0.010			0.1007	0.0124



<圖七> A6 以不同天然物處理過的機油為碳源之菌液 O.D 值變化

【實驗四、機油分解菌處理過後的機油對綠豆生長影響之觀察】

爲了瞭解被分解後的機油是否能減輕油污對生物的傷害，我們以綠豆爲研究材料，將機油混合蒸餾水均勻地淋在剛長出胚根的綠豆上，每天觀察綠豆的生長情形(如圖八)，測量記錄胚根的長度(如表五)，並將數據轉爲折線圖(如圖九)。由圖八可發現，綠豆生長在蒸餾水環境中，胚根的長度與直徑最粗大，第一天已長出根毛，第三天已有初生葉長出。在機油環境中，胚根的生長長度自第一天開始就較短、較瘦小，第三天胚根的末端已開始發黃，至第四天則有萎縮的現象，且培養過程中並無明顯的根毛及初生葉長出。在經黃豆渣及 A4 分解的機油環境中，綠豆胚根的長度與直徑略小於對照組，初生葉於第五天長出。由表五及圖九可看出，綠豆生長在經黃豆渣及 A4 分解的機油環境中，綠豆胚根的長度與生長在機油環境的綠豆相比，綠豆的生長與健康狀態皆有明顯的改善。

蒸餾水(對照組)

未經處理的機油

黃豆渣及 A4 分解後的機油

第零天



第一天



第二天



第三天



第四天



第五天

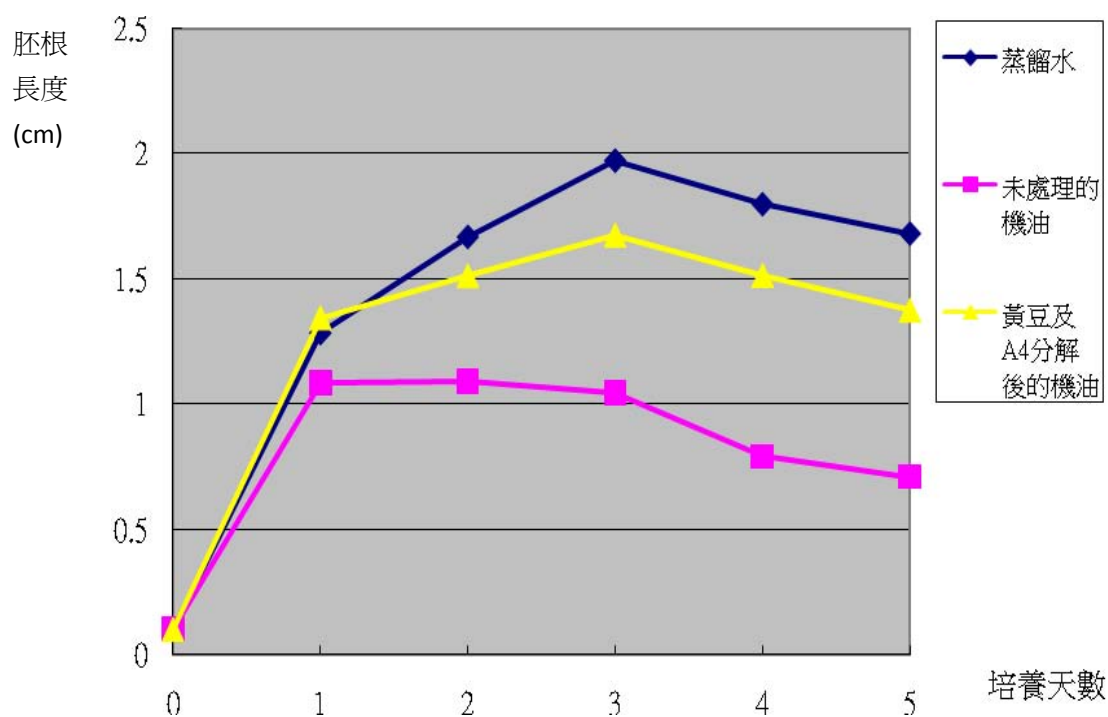


<圖八>綠豆在蒸餾水(對照組)、機油、經黃豆及 A4 分解後的機油環境中，第零天至第五天的生長情形

<表五> 綠豆在蒸餾水(對照組)、機油、經黃豆及 A4 分解後的機油環境下之胚根生長平均值

	第一天	第二天	第三天	第四天	第五天
蒸餾水 (對照組)	1.2833	1.6667	1.9714	1.7974	1.6820
未經處理 的機油	1.0875	1.0929	1.0462	0.7917	0.7112
經黃豆渣及 A4 分解後的機油	1.3455	1.5125	1.6750	1.5143	1.3756

* 註：每組綠豆樣本數為 20 顆



<圖九> 綠豆生長在不同環境下的胚根生長平均長度變化圖

陸、討論

【一、機油分解菌的分離與鑑定】

我們自被機油污染的土壤中分離出多種菌種，並挑選在以機油為唯一碳源的鹽類培養液中生長較良好或乳化機油較明顯的兩株菌，分別命名為 A4 及 A6。我們以傳統生化測試及觀察菌落特徵推測 A4 可能的菌屬為 *Brochothrix*、*Nocardia*，A6 可能的菌屬為 *Pseudomonas*、*Flavobacterium*、*Bordetella*、*Brucella*；但經由 16s rRNA 基因定序後卻認為 A4 菌種應為戈登氏菌屬(*Gordonia*)，A6 菌種應為蒼白桿菌屬(*Ochrobactrum*)。上網查閱資料後發現戈登氏菌屬(*Gordonia*)過去分類多歸為 *Rhodococcus* 及 *Nocardia* (Olivier et al., 2000)，而蒼白桿菌屬(*Ochrobactrum*)過去則多歸類於 *Achromobacter* 及 *Brucella* (Yu et al. 2007)。此外，戈登氏菌屬(*Gordonia* sp.) 已被發現可在油污土壤中穩定存在，且具有分解脂肪族碳氫化合物或芳香族碳氫化合物之能力 (沈佛亭, 2006)。而蒼白桿菌屬(*Ochrobactrum* sp.)過去研究多著重於其對人體的致病力，近年來發現除了可在醫院、水源、糞便等處發現它的蹤跡，在被原油污染的土壤也能分離到它，且它也具有分解石油的能力 (Diana et al., 2005)。由此可印證，我們分離到的這兩株菌確實具有分解機油的能力。

在培養純化機油分解菌的過程中，我們發現在相同的培養時間與環境下，加入 A4 菌種的試管內，機油有明顯的乳化現象；加入 A6 菌種的試管內，機油乳化的效果較不明顯，但菌液混濁度卻較高(如圖二)，這可能是 A4 菌種中分解機油的酵素活性較 A6 強，分解效率較高；另外 A6 為蒼白桿菌屬(*Ochrobactrum* sp.)，此屬中某些細菌在只含有氮源的鹽類培養基中也能生長(Bergey's manual,)，而我們的鹽類培養基中含有 NH_4NO_3 ，可能因此使 A6 菌種生長得較快，培養液也較混濁。

【二、天然物處理後的機油對機油分解菌的影響】

為了瞭解是否有方法能使機油分解菌分解機油的效能提高，我們搜集了坊間傳說具有分解油污效果的天然去污劑，將這些天然物浸泡於機油內三天後，再將機油分離出來作為 A4 及 A6 的碳源，並測量菌液 O.D 值以瞭解菌種的生長情形。由表三及圖六可發現，A4 菌種在未經處理、經黃豆渣、茶葉渣處理後的機油內培養，至第二週時菌液的 O.D 值達到最高，第三週時菌液的 O.D 值則開始下降；由表四及圖七則可發現，A6 菌種在未經處理、經黃豆渣、洗米水、苦茶粉處理後的機油內培養，至第三週時

菌液的 O.D 值達到最高，第四週時菌液的 O.D 值則開始下降，這可能是因為細菌生長於密閉環境，累積太多代謝廢物且養分不夠所造成。另外，與未經處理的機油相比，以黃豆渣處理過的機油為碳源下，A4 與 A6 菌液的 O.D 值均有顯著增加，其中 A4 在培養的三週內分別增加 0.826、0.609 及 0.274 倍；而 A6 在培養的四週內則分別增加 0.612、1.714、2.043 及 1.623 倍。由過去研究發現，將某些分解油污的細菌培養於額外添加氮源的培養液中，可提高細菌的生長及分解油污效率（方俊傑，2007），因此我們推測黃豆渣中含大量蛋白質，當其浸泡於機油時，蛋白質溶於機油中，使得培養於其內的細菌獲得額外的氮源，因此生長得較快速，分解機油的效能也較高。

【三、經機油分解菌處理過後的機油對綠豆之影響】

由先前實驗得知經黃豆渣浸泡後的機油可加速機油分解菌的生長及分解機油的效率，為了瞭解被分解後的機油對植物的影響，我們以綠豆為研究材料，將機油混合蒸餾水均勻地淋在剛長出胚根的綠豆上，觀察記錄綠豆的生長情形。由圖八及圖九可看出，生長在未經處理的機油環境中，綠豆胚根的長度較短、較細小，且有明顯萎縮枯黃的現象，由此可知，機油對綠豆具有毒性，會抑制綠豆的生長；但經黃豆渣及 A4 分解後的機油環境中，綠豆無論是胚根的長度與直徑，生長抑制的情形皆有明顯的改善。因此我們推測，以 A4 菌種處理機油，不僅能加速機油的分解，也能改善機油對植物的傷害。

柒、結論

- 一、我們自樹林後火車站附近機車行的土壤分離純化出具分解機油能力的菌株，分別為 *Gordonia* spp.及 *Ochrobactrum* spp.。這兩株菌過去研究不多，近幾年發現它們皆能在油污環境中生長，且具有分解油污的能力。由我們實驗結果發現，在相同的培養環境與時間，*Gordonia* spp.分解機油的效果較 *Ochrobactrum* spp.顯著。
- 二、微生物生長緩慢一直是生物復育技術中存在的問題之一，我們發現若先以黃豆渣對機油進行前處理後，可使機油分解菌大量繁殖，進而加速機油分解的速率。
- 三、機油污染後會對環境與生物造成極大的傷害，我們將被 *Gordonia* spp.分解後的機油均勻地淋在剛萌芽的綠豆上，發現可明顯的降低機油對綠豆的毒性，因此以 *Gordonia* spp.應用於生物復育上是具有可行性的。
- 四、根據本實驗結果，我們認為未來在進行油類污染的生物復育時，可先在污染處灑上黃豆渣，之後再噴灑機油分解菌，以加快生物復育的成效，減少污染對環境與生物的傷害。

捌、參考文獻與資料

1. 方俊傑，簡錦樹。2007。柴油分解菌與營養鹽對柴油分解關係之研究。國立成功大學地球科學研究所碩博士論文。
2. 沈佛亭。2006。 *Gordonia* 菌屬放線菌之分子偵測、分類及鑑定。國立中興大學土壤環境科學系博士論文。 p.208。
3. 彭成立。2008。臨床實驗室利用16S rRNA基因定序來鑑定細菌的優點、缺點與可能誤判的陷阱。醫檢會刊。 p.3。
4. Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology. Volume 1~4.
5. Diana Sara Leal-Klevezas, Octavio Martínez-de-la-Vega, Ector Jaime Ramírez-Barba, Björn Osterman, Juan Pablo Martínez-Soriano, and June Simpson. 2005. Genotyping of *Ochrobactrum* spp. by AFLP Analysis. Journal of Bacteriology. Vol. 187, No. 7. p. 2537-2539.
6. Olivier Lesens, Yves Hansmann, Philippe Riegel, Rémy Heller, Mohamed Benaissa-Djellouli, Martin Martinot, Hélène Petit, Daniel Christmann. 2000. Bacteremia and Endocarditis Caused by a *Gordonia* Species in a Patient with a Central Venous Catheter. EMERGING INFECTIOUS DISEASES Vol. 6, No. 4.
7. Yu Mi Wi, Kyung-mok Sohn, Ji-young Rhee, Won Sup Oh, Kyong Ran Peck, Nam Young Lee, Jae-Hoon Song. 2007. Spontaneous Bacterial Peritonitis due to *Ochrobactrum anthropi* : A Case Report. *J Korean Med Sci* ; 22: 377-9

<附件一>、A4 的 16s rRNA 基因序列定序結果

TCTAGGATGCGTAACGAGCAATGGCCCCGCTTCGCTGGGTCACTACGAGTGGCGAA
CGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACT
GGGTCTAATACCGGATAGGACCACTGATTGCATGGTTGGTGGTGGAAAGCTTTTGCG
GTTTCAGGATGGGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGG
CGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACAG
GCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCT
GATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCGCTA
GGGACGAAGCGTAAGTGACGGTACCTGGAGAAGAAGCACCGGCCAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGA
GCTCGTAGGCGGTTTGTTCGCGTCGTCTGTGAAATTCTGCAACTCAATTGCAGGCGTG
CAGGCGATACGGGCAGACTTGAGTACTACAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGC
GGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGTA
GTAAGTACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGT
AGTCCACGCCGTAAACGGTGGGTACTAGGTGTGGGGCTCATTTCACGAGTTCGGTGC
CGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCA
AAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAA
CGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATACACCAGAAAGCCGTAGAGATACGGCCCC
CCTTTGTGGTTGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTTCGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATG
TTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCCTGTATTGCCAGCGGGTTATGC
CGGGGACTTGCAGGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC
AAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCGCGTACAGA
GGGCTGCGAGACCGTGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCGCGTCTCAGTTCGGATT
GGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAGCAAC
GCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCCCGTCACGTCATGAAAGTC
GGTATATCAGCGAAGCCGGGGGCCATAAACTGGTGAGAGCAGCAGGT

<附件二>、A6 的 16s rRNA 基因序列定序結果

*GTCGAATGATCGAGCGCGTAGCAATACGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGG
AATCTACCCATCACTAGGGAATAACTCAGGGAACTTGTGCTAATACCCTATACGACC
GAGAGGTGAAAGATTTATCGGTGATGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTG
GGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCA
CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG
GACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGG
TTGTAAAGCTCTTTCACCGGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGAAGAAGCCCCGGC
TAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGATTAC
TGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGGCTAATAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTC
AACCCCGGAACTGCCTTTGATACTGTTAGTCTTGAGTATGGAAGAGGTGAGTGGAAAT
CCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCCG
CTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGTTAGCCGTTGGGGAGTTTACTCTT
CGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAA
AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
AGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGATCGCGGTTAGTGGAGACAC
TTTCCTTCAGTTCGGCTGGATCGGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTG
TCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAG
CATTCAAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGG
ATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGGGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTG
GTGACAGTGGGCAGCGAGCACGCGAGTGTGAGCTAATCTCCAAAAGCCATCTCAGTT
CGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATC
AGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCCTCACACCATG
GGAGTTGGTTTAACCGTAAGGCAGCGTGTGCTCAACGCGACGA*

【評語】 040717

- 1、本計畫自機油污染處分離具分離機油之菌，實驗結果由土壤分離得土壤菌，Gordonia 及 Ochrobactrum 在黃豆渣處理下可分解機油。
- 2、建議經分離菌體，可以具分離機油更高之效率，即在黃豆渣不存在下，可以完全分解機油之菌種。