

中華民國 第 50 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物（生命科學）科

第一名

040708

新油切戰士-柴油與機油分解之進一步探討

學校名稱：國立華僑實驗高級中學

作者： 高二 劉兆川 高二 蔡靜怡 高二 王乙如 高二 楊承融	指導老師： 黃愛純 許慧珊
---	-----------------------------

關鍵詞：油污分解菌、農業廢棄資材、生物復育

得獎感言



在這整年的時間裡，經歷過春、夏、秋、冬，從一開始生澀的模樣，到現在已經能精準熟悉的操作每一樣器材。回想整個過程，有時冷到手對酒精燈火都沒感覺，或是小心翼翼地測量綠豆細小的胚根，最可怕的就是陷入塗盤地獄，一旦污染就得重來。這些心酸又苦澀的點滴，一幕幕映在眼前，而所有的辛苦都已化為得獎的喜悅。

經過這一切，不會忘記所有幫助過我們的人，要不是愛純老師抽出大量的時間指導與陪伴我們，慧珊老師與學長姐的支持與啟發，譚天常老師的關心與督促，我們是不會有這份榮耀的，心中真是有說不盡的感激。探索和求知的路永無止境，我們會抱著虛心的態度繼續學習，也希望科學的精神、熱情永遠與我們同在！

摘要

本校學長從機油污染處土壤中分離得到一支具有分解機油能力之戈登氏菌(*Gordonia* sp.) (暫時命名為 A4)，它是一種具有降解難分解之碳氫化合物能力的土壤放線菌。經由 16S rDNA 序列分析發現 A4 與目前已知的戈登氏菌差異頗大，可能是一支新的本土戈登氏菌。大學實驗室的檢測報告也證實 A4 是一具有分解脂肪族和芳香族碳氫化合物的油污分解菌。本實驗中發現 A4 它能分解機油、柴油與沙拉油，具有耐鹽與耐酸鹼性，不受綠膿桿菌與紅城紅球菌所抑制，比紅城紅球菌分解機油與柴油的能力更為出色。此外，這三種油品都會影響綠豆胚根生長，且以柴油的傷害最嚴重。經 A4 處理過的油品，能降低對胚根生長的傷害，柴油的復育尤其顯著。另外，農業廢棄資材—花生殼能加速 A4 對機油的分解有助生物復育。

壹、 研究動機

環境污染，是生物復育上的難題之一，尤其是油污污染，不管在海上或是在土地上，都會使生長在此的生物發生死亡、畸形等無法挽回的後果。

高一學基礎生物細菌單元時，老師介紹到：早期解決海上油污污染的方法多是「搬運法」，即是將受污染處以人工方式刮除，再運至特定地點以「化學方式」清除，但此法的經濟效益不佳，又容易對環境產生二次傷害。於是現今多利用「生物復育技術」(Bioremediation)，將微生物製成生物製劑，即讓微生物扮演分解者的角色，讓油污降解成無害之物質，簡單又環保。但是這些生物製劑大部分購自國外，成本較高，更令人憂心的是，這些外來的菌種大量使用後將會造成本地微生物菌相的改變，進而影響生態平衡(林忠亮，2003)。若能使用本土的微生物製劑，既可以有效、快速地去掉這些碳氫化合物類的油污污染，使環境恢復原貌，又不影響本土環境生態，不失為既經濟又環保的良方。

本校學長自受機油污染的土壤中分離出了二支能分解機油的土壤菌。其中一支土壤菌(暫時命名為 A4)委託生物技術公司抽出細菌 DNA，利用其 16S rDNA 序列(如附件一)在 NCBI 資料庫中比對後，證實屬於戈登氏菌(*Gordonia* sp.) (鐘翊嘉等，2009)。由於學長描述 A4 對機油利用情形頗佳，所以我們經網路資料搜尋發現，*Gordonia* 菌屬是近年來才逐漸受到重視的一種土壤放線菌屬，此屬的放線菌具有代謝及生化合成之多樣性，在工業上或環境上的應用均極具潛力(沈佛亭，2006)。再者，我們由網路查閱相關資料時，發現台灣北部對 *Gordonia* 菌屬在油污分解相關的研究與報導不多。

由於我們並不清楚 A4 的詳細分類地位及是否被發表過？所以決定先在網路上收集資料與相關訊息。先前委託生物科技公司的定序分析報告顯示，A4 與在西班牙發現的 *Gordonia cholesterolivorans* (=DSM 45229) (Drzyzga et al., 2009) 和在韓國發現的 *Gordonia sihwensis*(= DSM 44576) (Kim et al., 2003) 的 16S rDNA 序列相似度皆為 98.0 % (附件二)，與台灣已發表的 7 種戈登氏菌(*Gordonia* sp.)不同(沈佛亭，2006)。為了確認分類地位，我們將 A4 送至國立中興大學實驗室作進一步的鑑定。在德國的 DSMZ 資料庫中，查知這兩支與 A4 親源關係最近的土壤菌皆無致病性 (risk = 1)，我們決定動手繼續認識 A4 這支菌。

貳、 研究目的

- 一、A4 (*Gordonia* sp.)菌種的活化、菌落形態觀察及分析。
- 二、利用分光光度計對 A4 菌在不同油品（機油、柴油及大豆沙拉油）中生長曲線測定。
- 三、經 A4 菌分解前、後的三種油品對綠豆胚根生長之影響。
- 四、A4 菌的耐鹽性測定。
- 五、A4 菌的耐酸鹼性測定。
- 六、A4 菌、綠膿桿菌與紅城紅球菌的交互作用測試。
- 七、比較不同油污分解菌對機油與柴油之分解情形。
- 八、在機油環境中，添加農業廢棄資材（蛋殼、花生殼、稻殼）對 A4 菌的生長能力與機油分解情形之比較。

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、微量吸管(pipetteman)

五、分光光度計

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、pH 測量儀

十一、接種環

十二、酒精燈

十三、L 型玻棒

十四、綠豆

十五、蛋殼

十六、花生殼

十七、稻殼

十八、棉花

十九、機油 (Esso 2T-Power)

二十、柴油（中油）

二十一、大豆沙拉油（台糖）

二十二、培養皿

二十三、微量離心管(1.5mL)

二十四、0.2 μm 過濾膜 (MILLEX-GV , Millipore, France)

二十五、2.5 mL 塑膠注射筒

二十六、1M NaOH 溶液

二十七、1M HCl 溶液

二十八、綠膿桿菌

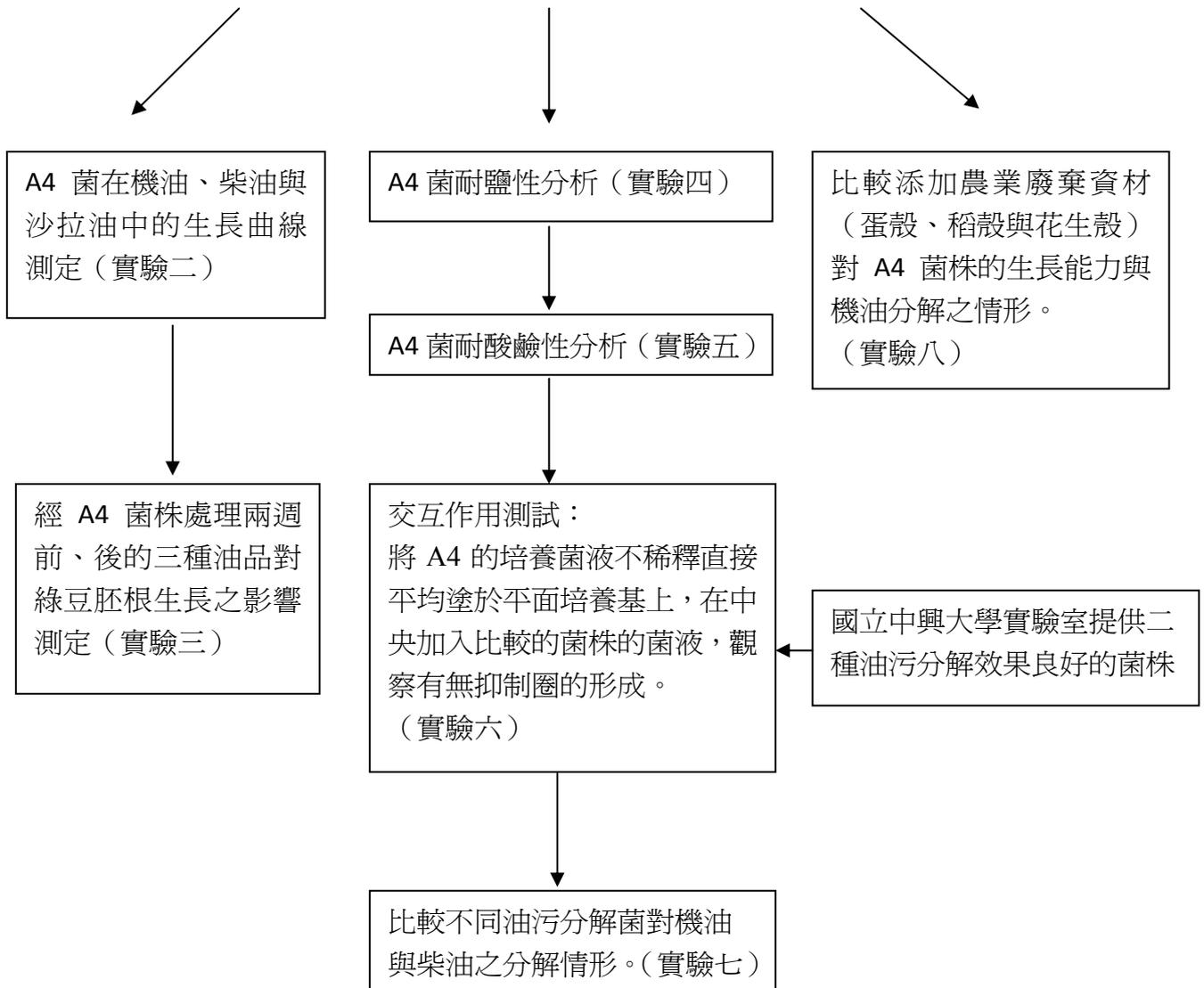
(*Pseudomonas aeruginosa* CCRC11633)

二十九、紅城紅球菌

(*Rhodococcus erythropolis* CC-BC11)

肆、 研究過程與方法

本校學長由受機油污染的土壤中篩選出一支機油分解菌 A4 戈登氏菌 (*Gordonia sp.*)。我們先將 A4 的培養菌液以四區畫法於平面培養基上活化，並以十倍連續稀釋法在平面培養基上塗盤觀察 A4 單一菌落的外觀。(實驗一)



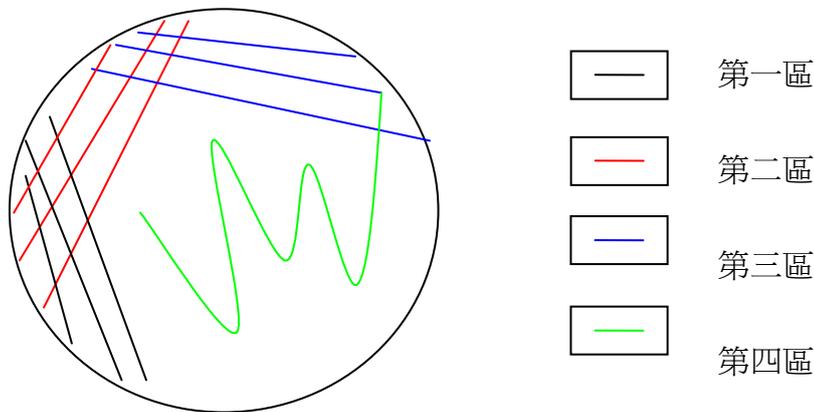
【實驗一、A4 菌種活化與菌落形態觀察】

由於菌種保存於冷凍庫中，我們要進行實驗時，得先確認凍管內的菌種確為 A4 單一純種，並加以活化方能進行各種試驗。

實驗步驟

- (一) 由冰箱冷凍庫取出本校學長所保存的 A4 菌凍管，取出 200 μ l 菌液，加入 5ml 的營養培養液中(LB broth)，置於恆溫震盪培養箱，以轉速 200 r.p.m，30 $^{\circ}$ C 培養約 48 小時再取出。
- (二) 利用接種環將 A4 菌培養液以四區劃法的方式劃至 LB 平面培養基（如圖），於 30 $^{\circ}$ C，培養 48 小時後觀察菌落外觀與形態，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>：四區劃法

- (三)菌種活化與確定無污染後，進行 A4 起始菌液製備。首先以接種環挑一顆 A4 的菌落，接種於 5 ml 的營養培養液中，於 200 r.p.m，30 $^{\circ}$ C 中培養 48 小時取出。
- (四)將 A4 起始菌液以十倍連續稀釋法，取 100 μ l 菌液加入 LB 平面培養基，以 L 型玻棒平均塗盤方便觀察 A4 單一菌落的外觀，並以分光光度計測量 A4 起始菌液在波長 600 nm 下的生長濁度(O.D，Optical density)，以吸光值 A_{600} 表示。

【實驗二、在不同油品為唯一碳源下，A4 菌的生長曲線測定】

為了瞭解 A4 菌除了會利用機油之外，是否會分解海洋上污染率頗高的柴油與日常生活使用的沙拉油，我們利用分光光度計於波長 600 nm 下測量菌液 O.D 值 (A_{600})，以瞭解 A4 菌分別在不同油品為唯一碳源的 BH 鹽類培養液中之生長潛力。為了減低對實驗的干擾，我們先在無菌操作台內將三種油品通過 0.2 μ m 過濾膜，去除可能在原本油品中所含有的微生物。

- 【程序】**
- 1、取起始菌液 240 μ l 加入分別含有 180 μ l (3%,v/v)機油、柴油和沙拉油之 6 ml BH 鹽類培養液中，均勻混合，於 30 $^{\circ}$ C、200 r.p.m 震盪培養四週。每週紀錄 O.D 值，由三重複試驗中取一平均值。

- 2、繪製以時間（週）對細菌濁度 O.D 值(A_{600})之生長曲線。
- 3、生長至第二週時，以十倍連續稀釋法並利用震盪器混合均勻，取 100 μ l 菌液加入平面 LB 固體培養基中，均勻塗抹後置於 30 $^{\circ}$ C 恆溫培養，48 小時後觀察活菌菌落生長情形。

【實驗三、經 A4 菌分解前、後的三種油品對綠豆胚根生長之影響】

我們將經 A4 菌處理兩週前、後的各種油品直接淋於剛長出胚根的綠豆上，藉由觀察綠豆的外表形態及胚根的發育情形來比較柴油、機油及沙拉油的傷害與經 A4 菌處理過後的各種油品是否能減輕對綠豆生長的傷害。

【程序】 1、將綠豆浸泡一夜，長出胚根約 0.1 公分左右。

2、取七個培養皿，置入適量棉花。

3、培養皿中分別放入 20 顆已萌發的綠豆，並加入不同處理的蒸餾水與油品：

(1)加入 5.5mL 蒸餾水（對照組）

(2)加入 5mL 蒸餾水及 0.5 mL 柴油的混合液

(3)加入 5mL 蒸餾水及 0.5 mL 機油的混合液

(4)加入 5mL 蒸餾水及 0.5 mL 沙拉油的混合液

(5)加入 5mL 蒸餾水及 0.5 mL 已分解柴油的混合液

(6)加入 5mL 蒸餾水及 0.5 mL 已分解機油的混合液

(7)加入 5mL 蒸餾水及 0.5 mL 已分解沙拉油的混合液

4、置於室溫下，每天測量胚根的生長長度，並每天加入不同處理的蒸餾水與油品，連續觀察四天。

【實驗四、A4 菌的耐鹽性試驗】

一般油污常發生於海域或高鹽之環境中，所以若要種植菌株來進行生物復育，菌株必須具有耐鹽性。(林大成，2005)。一般的海水鹽度約在 3.0~4.0%(w/v)，而有許多工業廢水之鹽度大於 3.5%(w/v)。因此本實驗採用三種鹽度 3.0%、4.0%及 5.0%NaCl(w/v)作為菌株耐鹽性試驗，並選用 1%柴油（海上漏油事件常見油污）為唯一碳源。

【程序】 1、以 BH 鹽類培養液為溶液，利用重量百分率計算配製三種濃度 3.0%、4.0%及 5.0%NaCl(w/v)。

2、取經 0.2 μ m 濾膜過濾之柴油 60 μ l (1%,v/v)，分別加至不同 NaCl 濃度之 BH 鹽類培養液 6 ml 中，做為以柴油為唯一碳源之定義培養基。

3、取 240 μ l 起始菌液加入定義培養基，以 30 $^{\circ}$ C、200 r.p.m，恆溫震盪培養三天。

4、以十倍連續稀釋法並利用震盪器混合均勻，取 100 μ l 菌液加入平面 LB 固體培養基中，均勻塗抹後置於 30 $^{\circ}$ C 恆溫培養，三日後觀察菌落生長情形。

【實驗五、A4 菌的耐酸鹼性試驗】

工業污染環境中酸鹼無常，瞭解 A4 菌在酸鹼環境下的生長情形，可增加生物復育上之應用性，故測定菌株之耐酸鹼性，實驗步驟如下：

- 【程序】** 1、以 1M HCl 與 1M NaOH 溶液調整 BH 鹽類培養液 pH 值為 pH4、pH7 及 pH10 分別進行試驗。
- 2、取經 0.2 μm 濾膜過濾之柴油 60 μl (1%,v/v)，分別加至經調控 pH 之 BH 鹽類培養液 6 ml 中，做為以柴油為唯一碳源之定義培養基。
- 3、取 240 μl 起始菌液加入定義培養基，以 30°C、200 r.p.m，恆溫震盪培養三天。
- 4、以十倍連續稀釋法並利用震盪器混合均勻，取 100 μl 菌液加入平面 LB 固體培養基中，均勻塗抹後置於 30°C 恆溫培養，三日後觀察菌落生長情形。

【實驗六、A4 菌與油污分解菌間的交互作用觀察】

每一種油污分解菌的分解物質之強項通常不太一樣，若能將油污分解菌混合使用，通常可將油污更快的清除。我們在網路上查詢資料時發現綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是一支土壤中油污分解能力優良的菌種，且分布範圍廣泛。紅城紅球菌(*Rhodococcus erythropolis*)與 *Gordonia* 菌屬的親源關係頗為接近，在國立中興大學土壤環境科學系楊秋忠教授所建立的「油中浮起菌」技術中，就選用烷源戈登氏菌(*Gordonia alkanivorans*)與紅城紅球菌混合株，來進行水上油污的降解(林大成，2005)。此紅城紅球菌株(*Rhodococcus erythropolis* CC-BC11)原由楊秋忠教授團隊篩選出來，經實驗測試可以使用苯、甲苯、萘與鄰苯二酚(Catechol)等環狀化合物作為唯一碳源(何櫻寧，2008)，很適合用於油類污染的生物復育，我們寫信至國立中興大學請求協助，並給予我們這兩支菌作為此交互作用的比較材料。

- 【程序】** 1、取 100 μl 未稀釋之 A4 起始菌液加入 LB 平面培養基，以 L 型玻棒均勻塗於 LB 平面培養基上。
- 2、剪下一小塊圓形的濾紙，放入塗滿 A4 菌液的 LB 平面培養基中央。分別加入 10 μl 未稀釋的綠膿桿菌或是紅城紅球菌培養液至濾紙上，以 30°C 培養三天，觀察 A4 分別與這兩種菌交互作用的情形。

【實驗七、比較不同的油污分解菌對機油與柴油分解之情形】

紅城紅球菌已知能分解柴油與機油(林大成，2005)，A4 與紅城紅球菌分解油品的能力究竟有何差別？

- 【程序】** 1、利用分光光度計將 A4 與紅城紅球菌起始菌液 O.D 值 (A_{600}) 皆調整至 0.8。
- 2、取 A4 起始菌液 240 μl 、紅城紅球菌起始菌液 240 μl 與混合菌株 240 μl (A4 菌 120 μl + 紅城紅球菌 120 μl) 加入含有 180 μl (3%,v/v) 機油與柴油之 6 ml BH 鹽類培養液中，均勻混合後，於 30°C、200 r.p.m 震盪培養二週。每週紀錄 O.D 值，由三重複試驗中取一平均值。
- 3、繪製不同菌株以時間(週)對細菌濁度 O.D 值(A_{600})之生長曲線。

【實驗八、在機油為唯一碳源下，添加農業廢棄物資材對 A4 生長與機油分解之影響】

為了瞭解生活中隨手丟棄的農業廢棄物，是否可幫助油污的吸附，讓漏油事件出現時，能減緩油污的擴大與蔓延，並且利用本身的多孔隙物理構造，成為提供微生物附著生長之處

(又稱為天然擔體)(林忠亮, 2003)。我們收集了蛋殼、稻殼與花生殼等日常生活中隨意丟棄且具有多孔隙特性的天然廢棄物, 想知道他們是否可以幫助 A4 菌加速分解油污。

實驗步驟

(一)準備三種農業廢棄資材：

- 【程序】** 1、將乾燥的蛋殼敲碎, 選取長、寬約 0.5 公分的蛋殼秤重 0.1 g, 裝入一試管中, 高溫高壓蒸氣滅菌。
- 2、將乾燥的稻殼剪半, 取之秤重 0.05 g, 裝入一試管中, 高溫高壓蒸氣滅菌。
- 3、將乾燥的花生殼剪成長、寬約 0.5 公分, 取之秤重 0.05 g, 裝入一試管中, 高溫高壓蒸氣滅菌。

(二)取 A4 起始菌液 240 μ l 加入含 180 μ l (3%,v/v)機油之 6 ml BH 鹽類培養液中, 在每一試管中加入一種天然廢棄物, 均勻混合後, 於 30°C、200 r.p.m 震盪培養三週。每週取樣一次測吸光度 O.D 值(A_{600}), 三次重複取平均值紀錄。

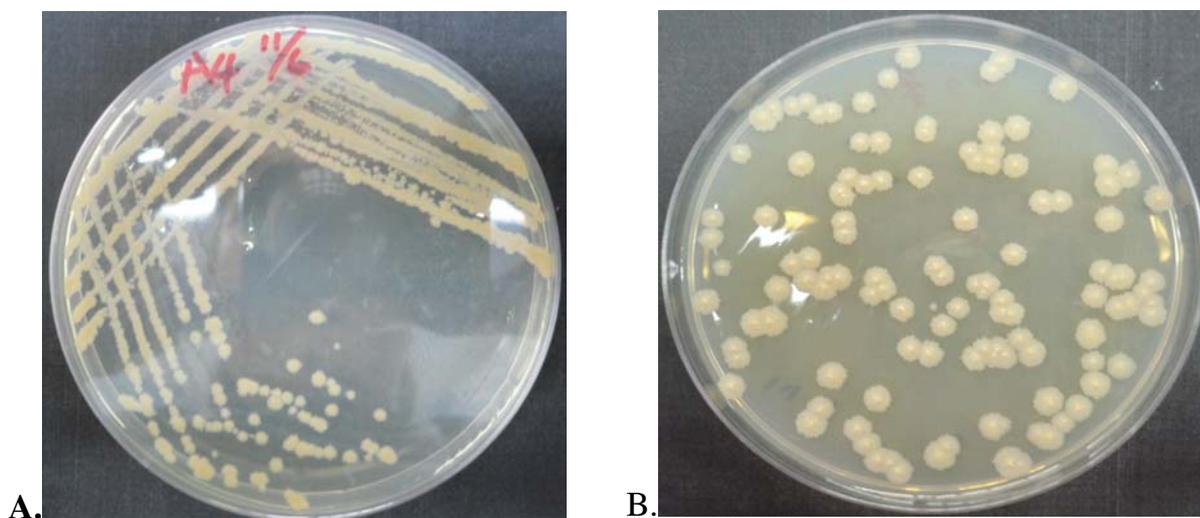
* 註：實驗組的 O.D 值是以各組不含菌的對照組（含機油、含廢棄物，不含菌）來作為 blank 歸零所測得。

(三)以十倍連續稀釋法並利用震盪器混合均勻, 取 100 μ l 菌液加入平面 LB 固體培養基中, 均勻塗抹後置於 30°C 恆溫培養, 三日後觀察菌落生長情形。

伍、研究結果

【實驗一、A4 菌種活化與菌落形態觀察】

我們以傳統的四區劃法分離培養液內菌落, 在 LB 平面培養基上觀察菌落的外觀、顏色、形態確實為單一純種 (圖一 A)。以接種環取出一個菌落, 接種於營養培養液內大量培養, 作為 A4 實驗的起始菌液, 所測得之 O.D 值(A_{600})約為 1.0。以十倍連續稀釋法稀釋至 1×10^5 倍塗盤結果如圖一(B), 可見菌落外觀為米黃色、不規則粗糙狀、菌落中央尖高起似一小山。



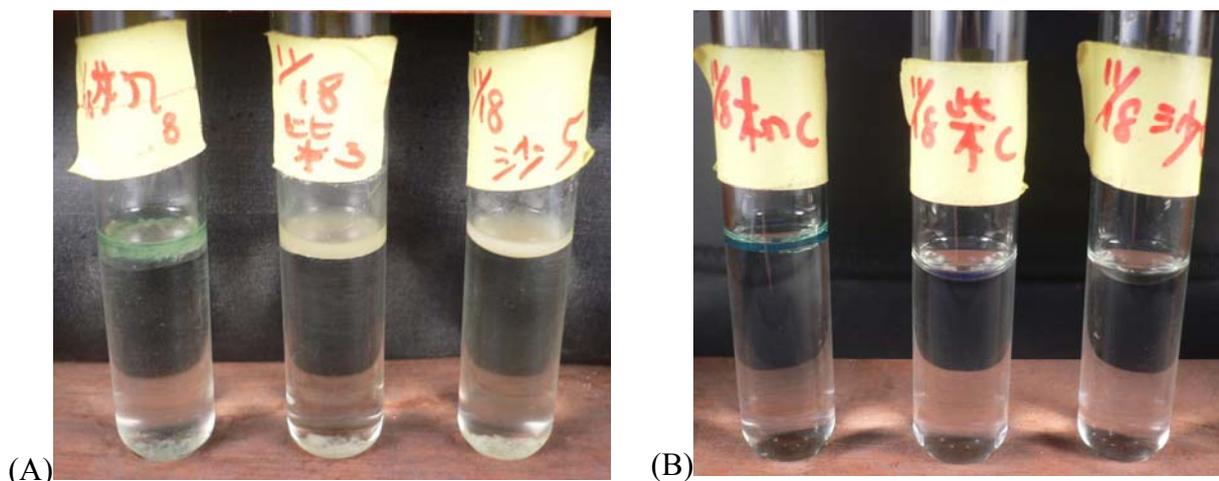
<圖一>：LB 平面培養基上 A4 菌落形態。(A)四區劃法分離單一菌落。

(B)A4 起始菌液在 LB 平面培養基上活菌生長狀況(1×10^5 稀釋塗盤, 正面觀)。

【實驗二、在不同油品為唯一碳源下，A4 菌的生長曲線測定】

由圖二(A)(B)可發現試管中原本藍綠色機油經 A4 處理後變為淡綠色，且有一圈明顯的乳化層；而柴油與沙拉油經 A4 處理後變成米黃色，也有明顯的乳化現象。

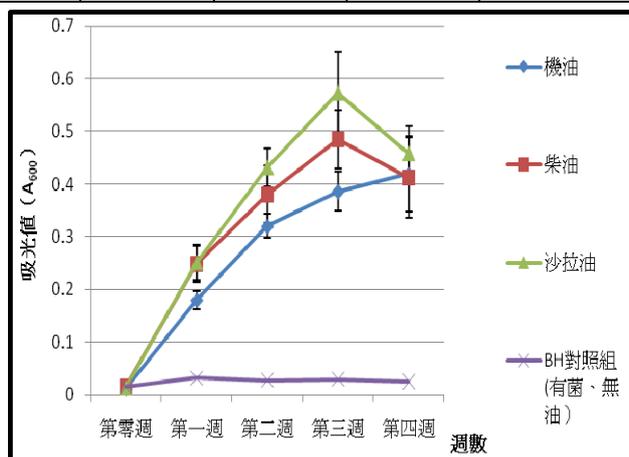
圖二(A)試管底部可看到有大量菌出現，輕微搖晃後，以分光光度計測得 O.D 值，三次重複取平均值如表一，作成折線圖如圖三。由圖三顯示 A4 在沙拉油與柴油環境中，在第三週有最高的 O.D 值；在機油環境中則是在第三、四週 O.D 值仍持續緩慢增加。對照組的 O.D 值(A_{600})一直很低，顯示此菌無碳源時生長不佳，有碳源的實驗組則菌液濃度大增。以十倍連續稀釋法塗盤結果如圖四，顯示 A4 在機油、柴油與沙拉油中生長二週時，A4 活菌生長狀況皆良好且塗盤結果也以沙拉油與柴油的數量較多，與表一與圖三相符合。



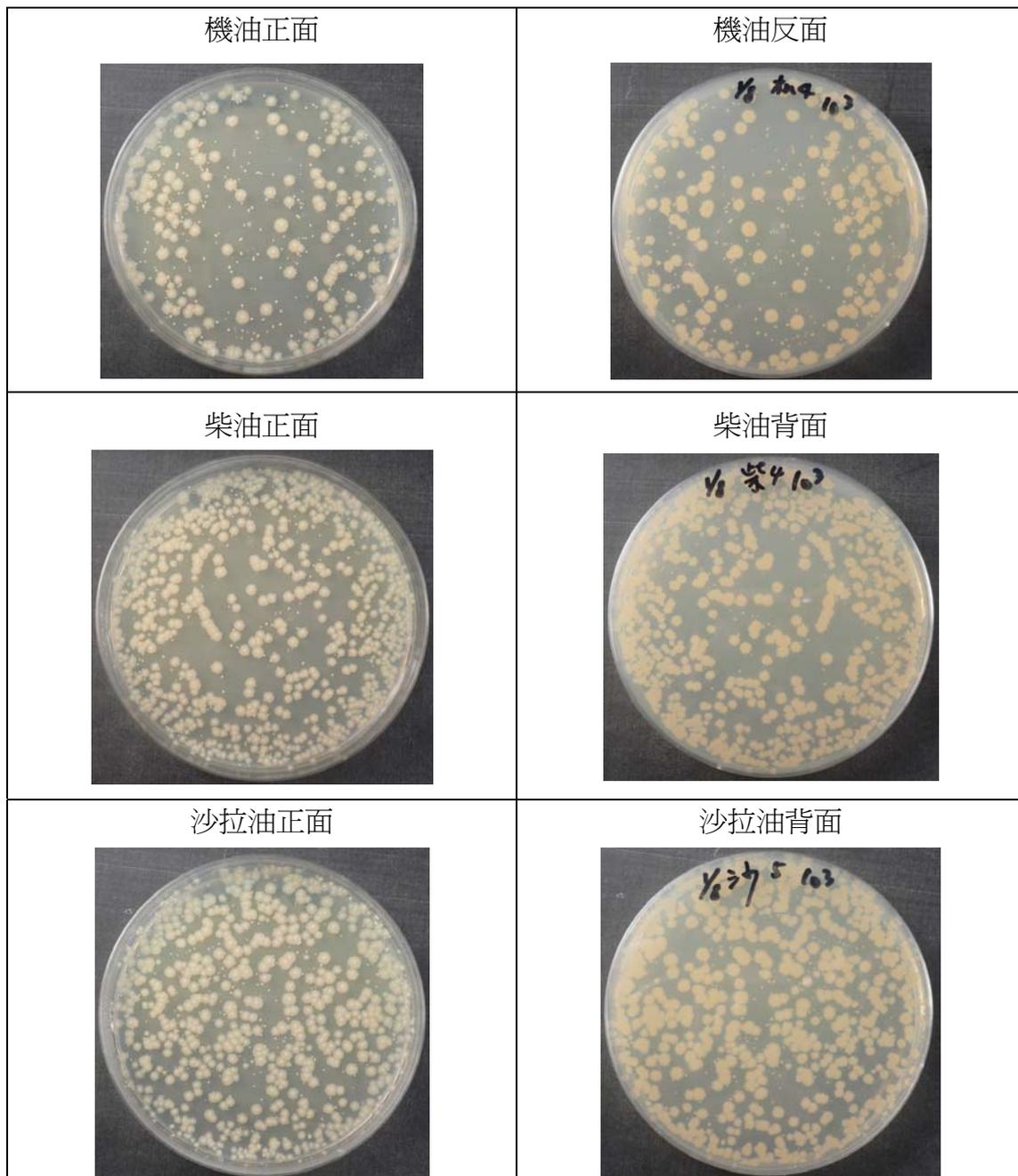
<圖二>：(A)實驗組：A4 在機油、柴油與沙拉油中的生長情形（含菌，培養二週時）。
(B)對照組：不含 A4 菌之機油、柴油與沙拉油。

<表一> A4 在分別以機油、柴油與沙拉油為唯一碳源下的 O.D 值(A_{600})

	機油 平均值	機油 標準差	柴油 平均值	柴油 標準差	沙拉油 平均值	沙拉油 標準差	BH (無油、有菌) 平均值	BH (無油、有菌) 標準差
第 0 週	0.012	0.0021	0.016	0.0010	0.014	0.0025	0.016	0.0028
第一週	0.180	0.0172	0.248	0.0278	0.251	0.0330	0.032	0.0021
第二週	0.320	0.0227	0.380	0.0277	0.431	0.0278	0.028	0.0062
第三週	0.386	0.0373	0.485	0.0834	0.572	0.0780	0.030	0.0026
第四週	0.419	0.0707	0.412	0.0760	0.458	0.0523	0.025	0.0036



<圖三>：A4 在各種油品為唯一碳源的 BH 鹽類培養液中之生長曲線。



<圖四>: A4 在各種油品為唯一碳源的 BH 鹽類培養液中第兩週的活菌生長情形。
(1×10^3 稀釋塗盤, 正、反面觀)

【實驗三、A4 菌處理過後的機油、柴油與沙拉油對綠豆胚根生長影響之觀察】

將 A4 分解前、後的三種油分別混合蒸餾水均勻地淋在剛長出胚根的綠豆上，觀察每天的生長情形(如圖五、六)及記錄胚根的長度(如表二)，並將數據轉為折線圖(圖七、八、九及十)與長條圖(圖十一)。

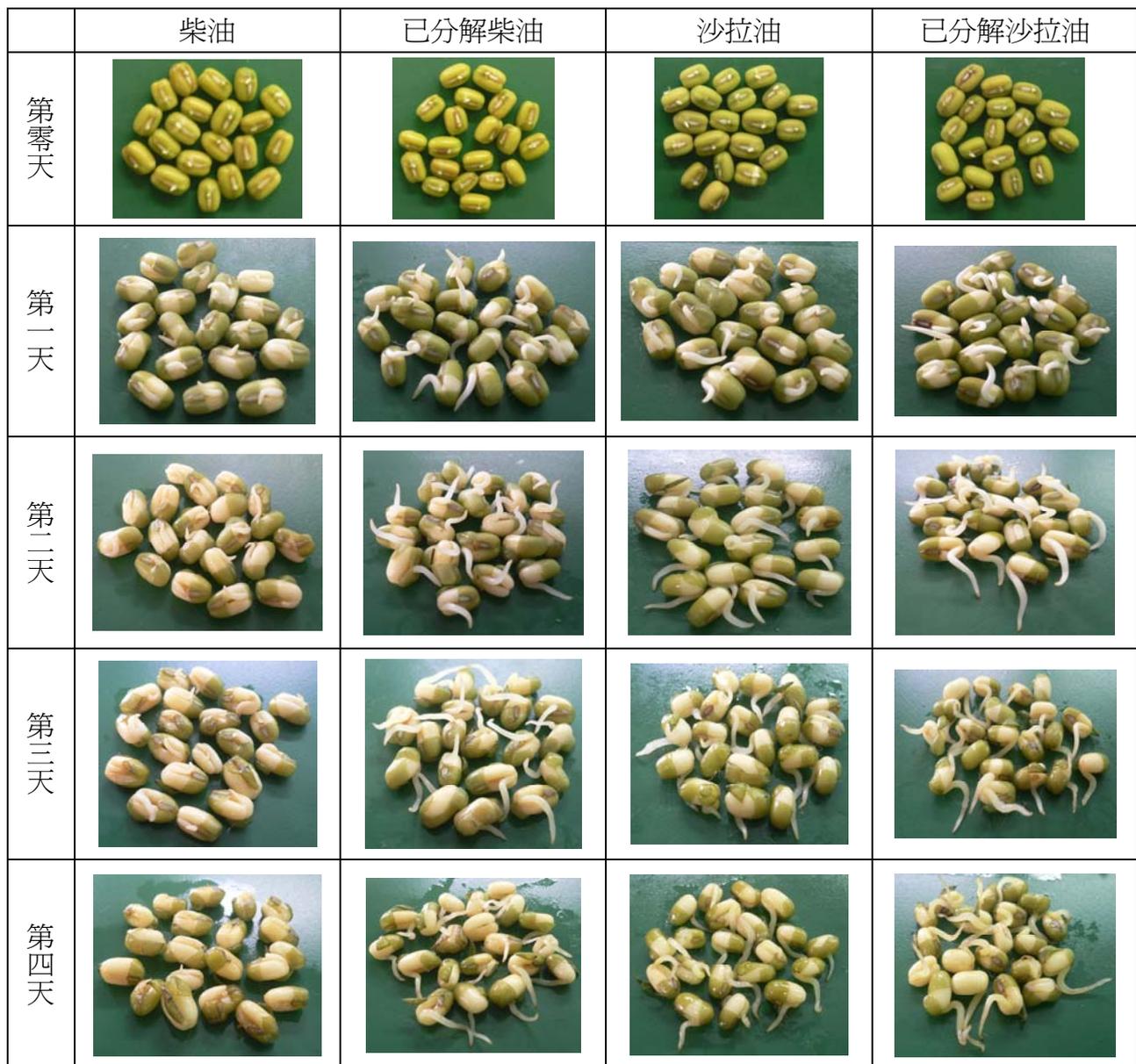
由圖五可發現，在蒸餾水(對照組)環境中，胚根長度與直徑最長且粗大，第三天長出明顯的根毛，第四天綠豆種子胚根呈現淡紫色。在機油環境中，胚根的生長長度自第一天開始就較短、較細，且培養過程中並無明顯的根毛。A4 分解的機油環境中，胚根的長度與直徑較機油環境中的胚根長與粗，但仍不如對照組，第三天可觀察到有根毛的出現，但較不明顯。

	機油	A4 分解的機油	水 (對照組)
第零天			
第一天			
第二天			
第三天			
第四天			

圖五、綠豆在機油、經 A4 分解後的機油與水的環境中，生長四天情形。

在柴油環境中，綠豆生長情形很差，整體呈現黃褐色，傷害非常明顯（圖六）。胚根的長度自第一天開始就非常短且細，一直到第四天胚根幾乎不見生長。在 A4 分解的柴油環境中，胚根較長、狀態較健康，但相較對照組仍較細且看不到根毛。

在沙拉油環境中，在第一天時相對於對照組，可看出胚根明顯較短；在第三天時長出明顯的根毛，這是在機油與柴油中的綠豆所沒有的。在 A4 分解的沙拉油環境中，第一、二天胚根長度明顯較生長於沙拉油中的綠豆長，第三天長出明顯的根毛，根的直徑相較於對照組仍顯的較細。由表二、圖七及圖十一可看出，不論哪一種油都會造成綠豆胚根生長的傷害，即便是可食用的大豆沙拉油與經 A4 處理後的各種油品，都無法如對照組（水）一般的健康。但是綠豆生長在經 A4 分解的各種油品環境中，比起未經處理的油品環境，健康狀態仍皆有改善（圖八、九、十），且以柴油改善的幅度最為顯著（圖十一）。

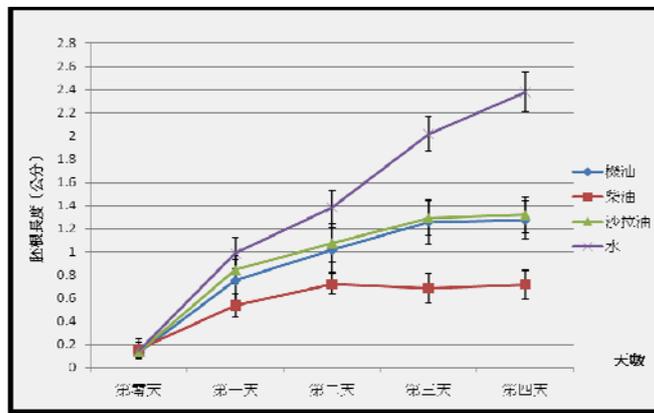


圖六、綠豆在柴油、沙拉油與經 A4 分解兩週後的柴油及沙拉油環境中，生長四天的情形。

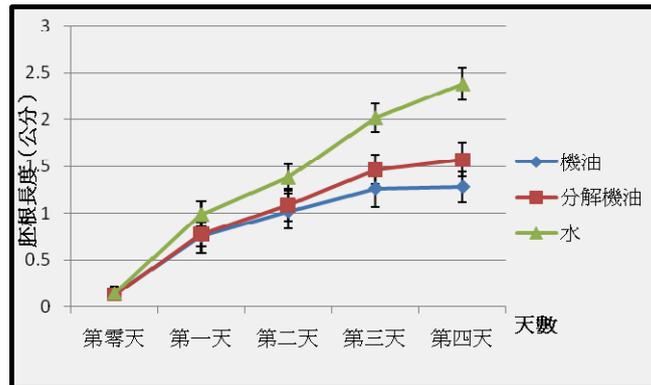
<表二> 綠豆在蒸餾水（對照組）、未經處理的油品（機油、柴油、沙拉油）與經 A4 分解兩週之油品（機油、柴油、沙拉油）環境下之胚根生長平均值(cm)。

	第0天	第0天 標準差	第1天	第1天 標準差	第2天	第2天 標準差	第3天	第3天 標準差	第4天	第4天 標準差
蒸餾水 (對照組)	0.15	0.0707	0.989	0.1348	1.382	0.1437	2.017	0.1506	2.379	0.1712
機油	0.133	0.05	0.753	0.1767	1.0176	0.1879	1.018	0.1882	1.277	0.1641
經 A4 分解 的機油	0.131	0.048	0.771	0.1326	1.087	0.1685	1.087	0.1571	1.569	0.1815
柴油	0.16	0.0843	0.538	0.1053	0.724	0.0903	0.688	0.1269	0.718	0.1237
經 A4 分解 的柴油	0.136	0.0745	0.763	0.1801	1.122	0.0943	1.317	0.1467	1.544	0.1617
沙拉油	0.14	0.0516	0.845	0.1191	1.077	0.1665	1.294	0.1482	1.318	0.1515
經 A4 分解 的沙拉油	0.118	0.0405	0.928	0.0136	1.376	0.1678	1.523	0.1833	1.585	0.1864

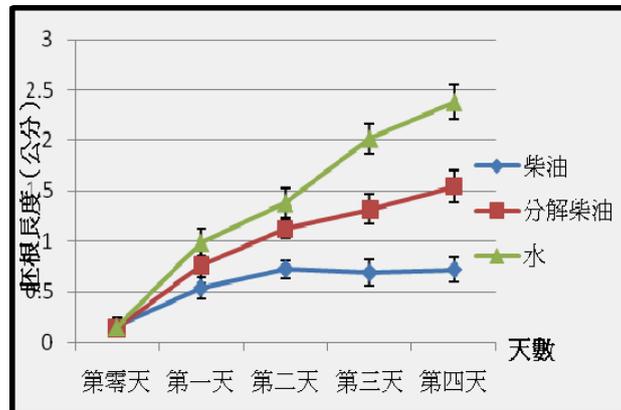
* 註：每組綠豆樣本數為 20 顆



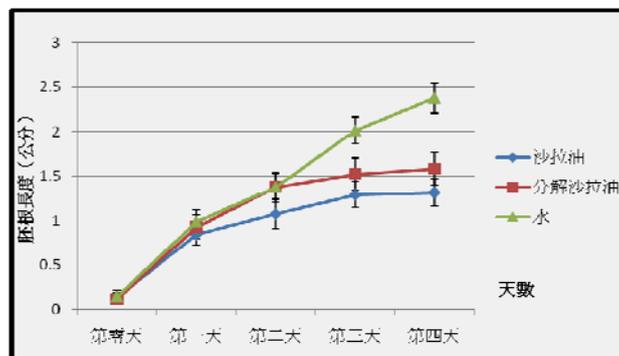
圖七：綠豆在水及不同油品（未經 A4 處理）環境下胚根生長平均長度變化圖。



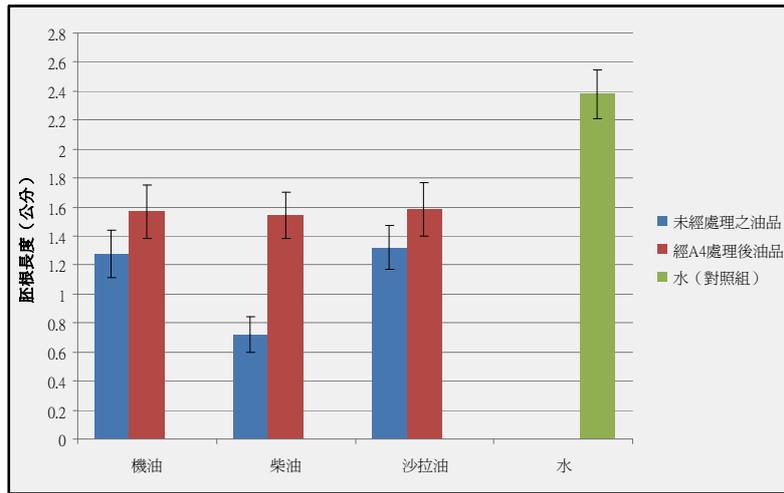
圖八：綠豆在機油與經 A4 分解兩週後的機油環境下胚根生長平均長度變化圖。



圖九：綠豆在柴油與經 A4 分解兩週後的柴油環境下胚根生長平均長度變化圖。



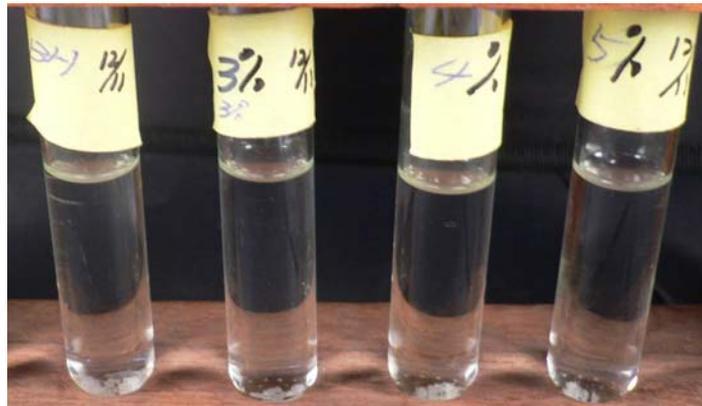
圖十：綠豆在沙拉油與經 A4 分解兩週後的沙拉油環境下胚根生長平均長度



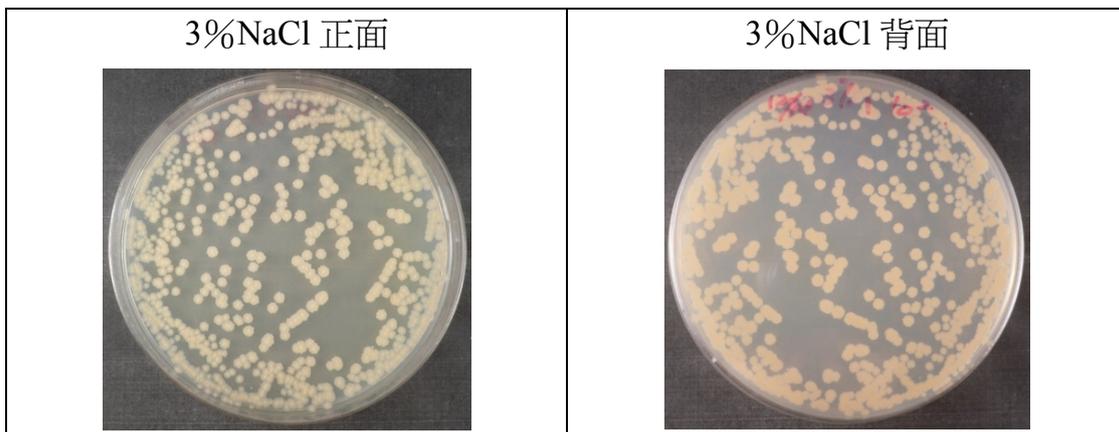
圖十一：綠豆在 A4 分解前後的三種油品環境下第四天之胚根生長平均長度變化圖。

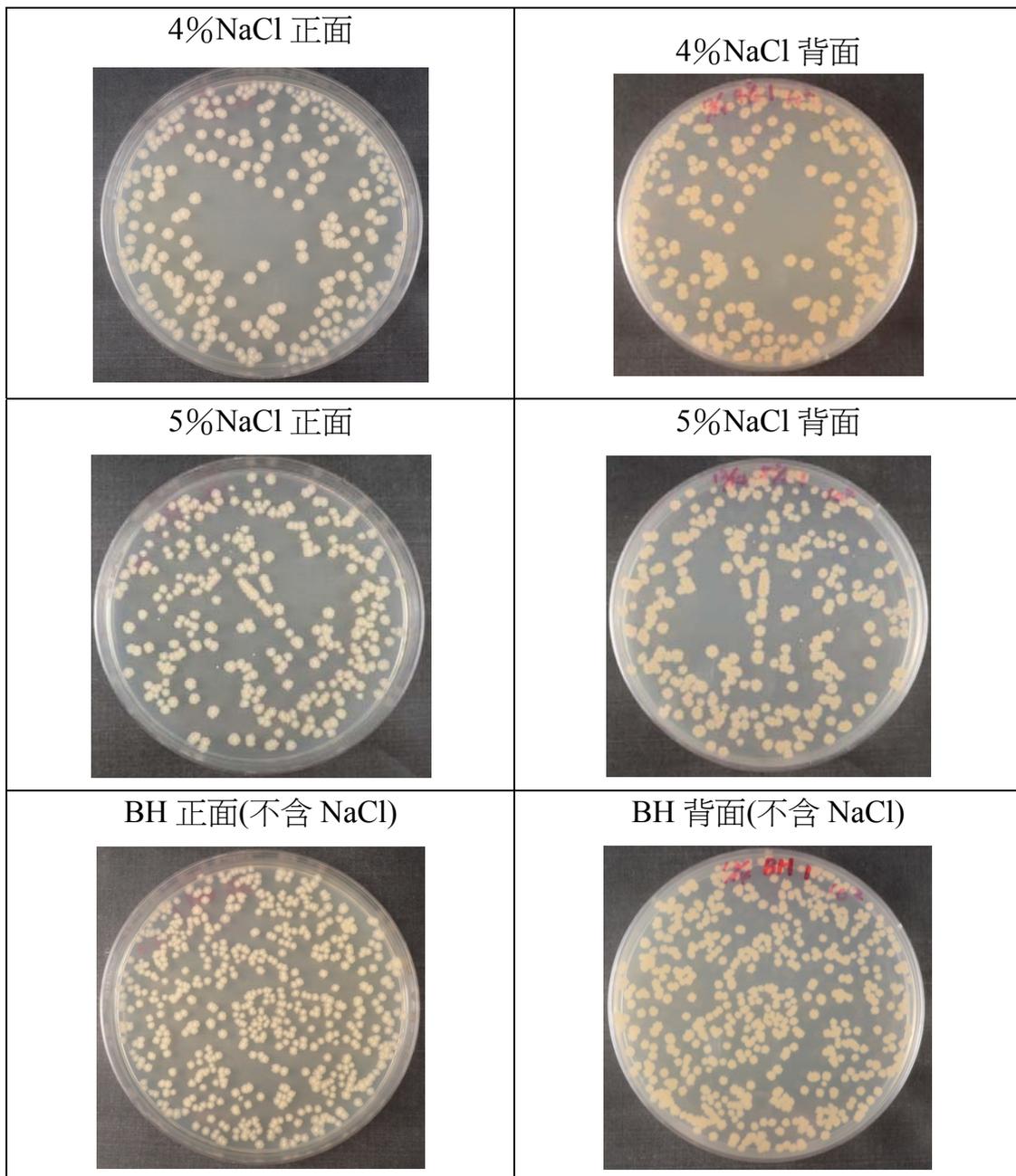
【實驗四、A4 菌的耐鹽性試驗】

圖十二顯示 A4 菌株分別在三種鹽度 3.0%、4.0% 及 5.0% NaCl(w/v)，以 1%(v/v) 柴油為唯一碳源，30°C、200 r.p.m 恆溫震盪培養三天，皆可生長（試管底部有菌的出現）。而在平面培養基塗盤結果如圖十三，顯示在不同鹽度下 A4 生長良好，可適用於高鹽環境之污染整治。



圖十二、A4 在不同鹽度的 BH 鹽類培養液中之生長情形：由左到右分別為 BH 鹽類培養液（不含 NaCl）、BH 鹽類培養液（3%NaCl）、BH 鹽類培養液（4%NaCl）及 BH 鹽類培養液（5%NaCl）。

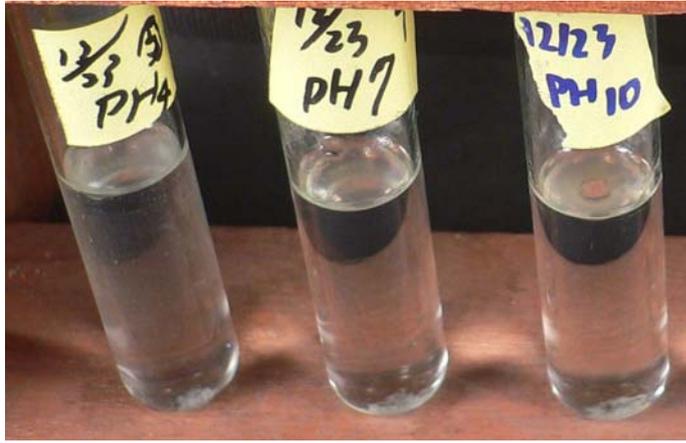




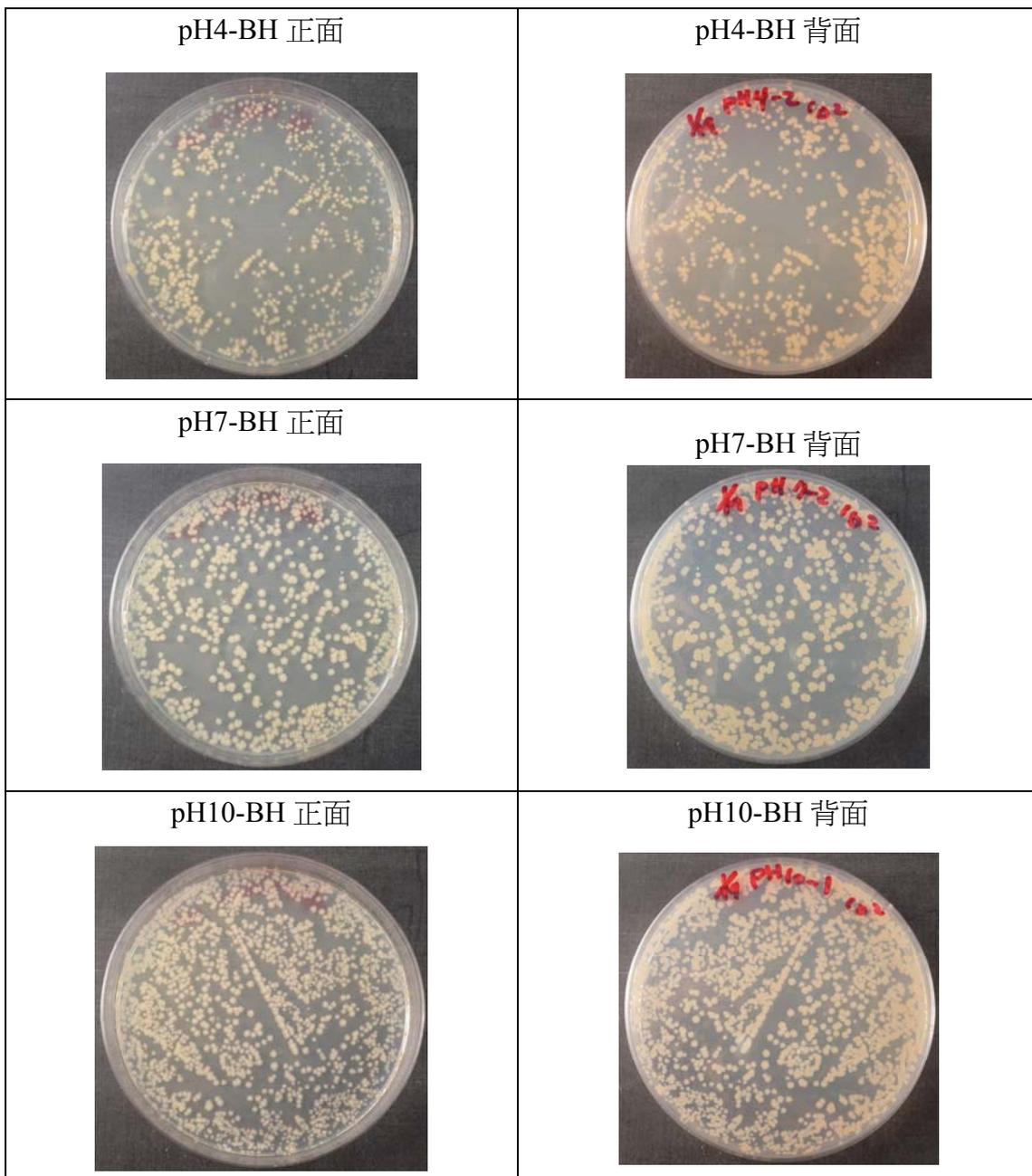
圖十三、耐鹽性試驗各種鹽度實驗組與對照組(不含 NaCl)在 LB 平面培養基上生長情況。

【實驗五、A4 菌的耐酸鹼性試驗】

圖十四顯示 A4 菌株在分別在 pH4、pH7 及 pH10 的 BH 鹽類培養液中，以 1%(v/v) 柴油為唯一碳源，30℃、200 r.p.m 恆溫震盪培養三天，皆可生長（試管底部有菌的出現），具有寬廣的 pH 生長範圍。而在 LB 平面培養基塗盤結果如圖十五，顯示 A4 菌株生長良好，將有利於生物復育之應用。



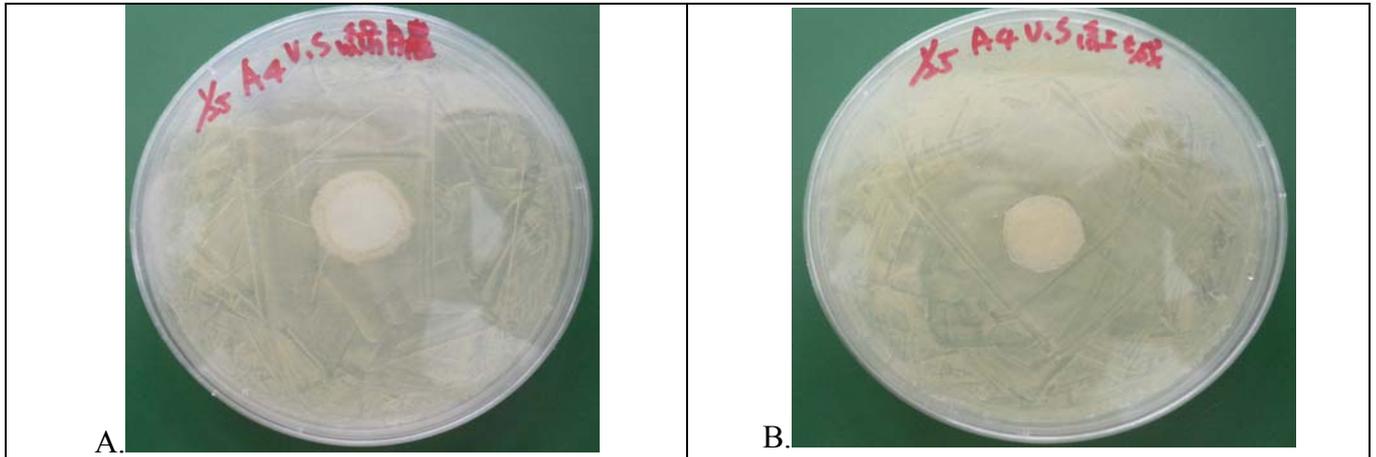
圖十四、A4 在不同 pH 值的 BH 鹽類培養液中之生長情形：由左到右分別為 pH4、pH7 及 pH10。



圖十五、耐酸鹼性試驗在 LB 平面培養基上的生長情況。

【實驗六、A4 菌與油污分解菌間的交互作用觀察】

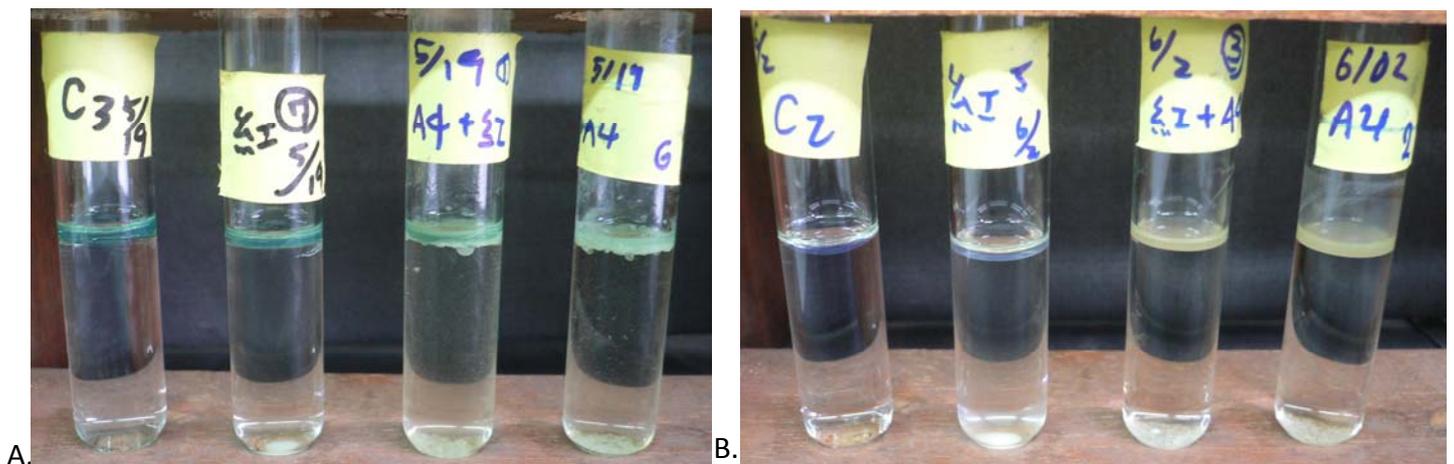
爲了瞭解綠膿桿菌與紅城紅球菌是否會抑制 A4 的生長，我們在 LB 平面培養基上塗滿 A4，在中央的濾紙上加入綠膿桿菌或者紅城紅球菌的菌液，經過三天培養，結果如圖十六。左邊的 A 圖可見中央不規則毛邊的是綠膿桿菌，它與 A4 並無抑制圈出現，二者皆生長良好。右邊的 B 圖是紅城紅球菌與 A4，也無抑制圈出現。顯示在 LB 培養基上綠膿桿菌與紅城紅球菌可能都不會分泌物質抑制 A4 的生長。



圖十六、(A)A4 與綠膿桿菌在 LB 平面培養基上的交互作用。
(B)A4 與紅城紅球菌在 LB 平面培養基上的交互作用。

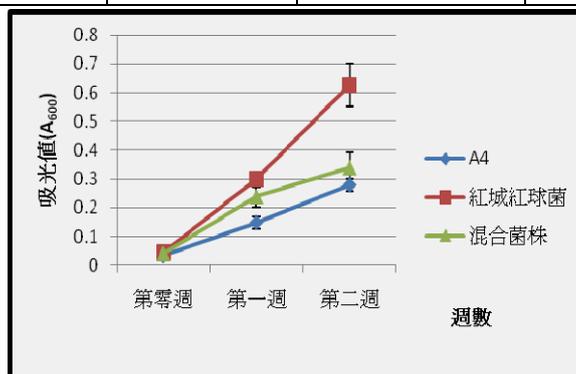
【實驗七、比較不同的油污分解菌對機油與柴油分解之情形】

圖十七(A)(B)顯示實驗組試管的底部皆有許多菌出現，且 A4 分解機油與柴油的情形比紅城紅球菌明顯更好；機油顏色變成淺綠色，且乳化形成許多小油滴；柴油環境中，五天即可看到變成乳白色。紅城紅球菌分解情形只比對照組的機油與柴油稍混濁一些，混合菌株分解油污的情形則介在 A4 與紅城紅球菌之間。圖十七(A)、十八可知紅城紅球菌在機油中生長速度較快，菌液濃度高，但分解機油的效果卻並不如生長曲線較緩慢、菌液濃度也較低的 A4。



圖十七(A)添加不同油污分解菌對機油分解的情形（培養兩週）：左起對照組（不含菌）、紅城紅球菌、混合菌株、A4 菌。
(B)添加不同油污分解菌對柴油分解的情形（培養五天）：左起對照組（不含菌）、紅城紅球菌、混合菌株、A4 菌。

機油	A4 菌 平均值	A4 菌 標準差	紅城紅球菌 平均值	紅城紅球菌 標準差	混合菌株 平均值	混合菌株 標準差
第 0 週	0.035	0.0047	0.045	0.0026	0.041	0.0037
第一週	0.149	0.0221	0.3	0.027	0.239	0.0371
第二週	0.279	0.0217	0.627	0.0737	0.339	0.053

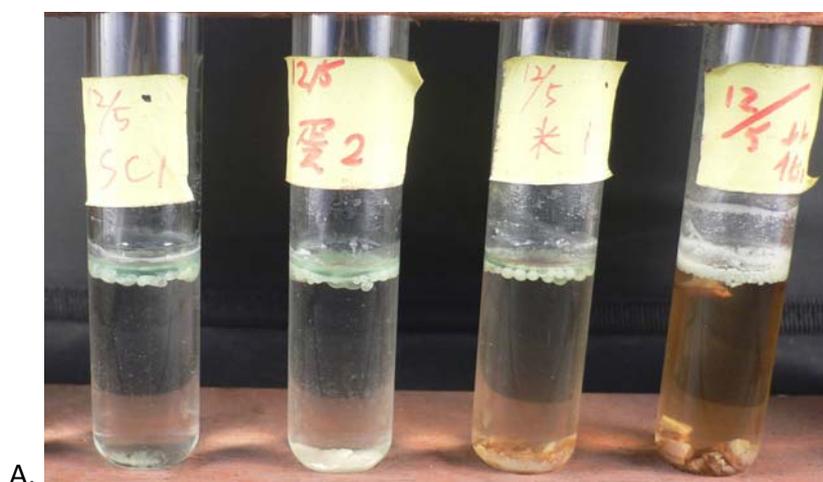


圖十八：不同油污分解菌在機油為唯一碳源的 BH 鹽類培養液中之生長曲線。

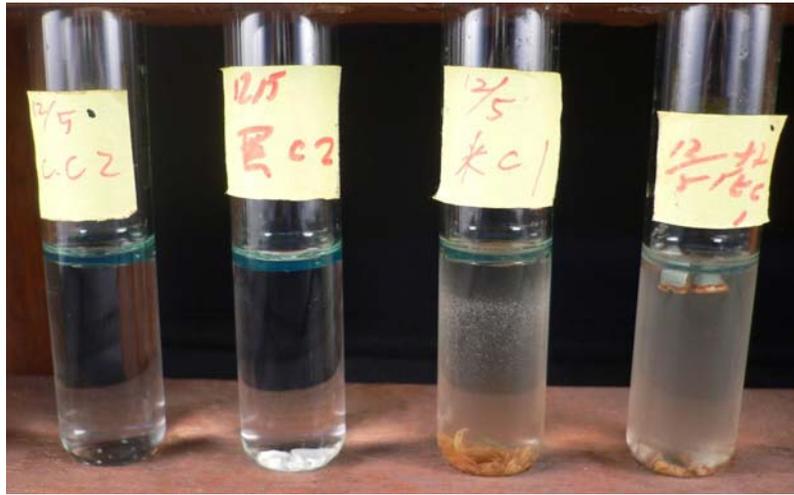
【實驗八、在機油為唯一碳源下，添加農業廢棄資材對 A4 生長與機油分解之影響】

圖十九(B)對照組顯示單純只有蛋殼、稻殼與花生殼農業廢棄資材與機油的環境中，以花生殼的吸油效果最好，機油明顯變少，而蛋殼組的試管內機油幾乎沒有減少，可見蛋殼對機油的吸附則幾乎沒有幫助。圖十九(A)實驗組顯示有添加 A4 菌株則機油皆有出現明顯的乳化現象，原本的一層機油被乳化成一顆顆的乳白色油滴；其中花生殼組幾乎完全看不到藍綠色機油，機油乳化的顆粒也最為細小，機油分解效果最為明顯。我們在各試管底部皆可觀察到有大量的菌出現，以震盪器均勻混合後，待各管油品上浮與農業廢棄物沈降穩定後，再以分光光度計測得 O.D 值，三次重複取平均值如表四及圖二十。

在表四與圖二十顯示相對於 SC 對照組（不含農業廢棄物），有添加稻殼與花生殼可明顯增加 A4 菌液的生長濁度 O.D 值(A600)，而稻殼又比花生殼對 A4 的生長更有助益；蛋殼與 SC 對照組（不含農業廢棄物）的 O.D 值(A600)相當，顯示蛋殼對 A4 生長與機油分解之幫助不大。我們利用震盪器將試管內的菌液均勻混合後，吸取一部份菌液以十倍連續稀釋法來塗盤如圖二十一，結果顯示 A4 菌生長情形良好，且稻殼與花生殼的塗盤結果菌落數目皆明顯高於 SC 對照組（含機油、含菌及不含廢棄物），與所測得的 O.D 值（圖二十）結果相符合。



A.



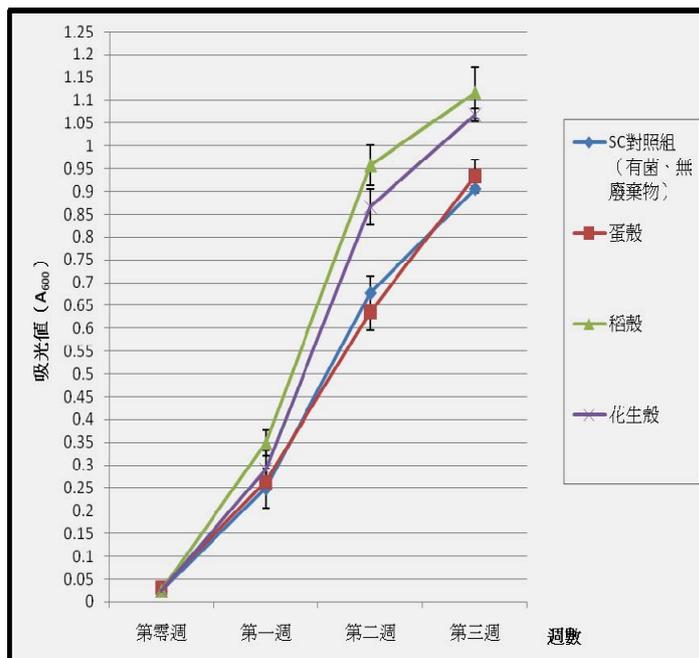
B.

圖十九、(A)機油中添加各種農業廢棄物對 A4 的生長影響（培養兩週情形）：左起為不含廢棄物的 SC 對照組（含機油及菌）及分別含蛋殼、稻殼與花生殼的實驗組。

(B)不同農業廢棄物對機油的吸附情況：左起為不含廢棄物的 CC 對照組（含機油、無菌）及分別含蛋殼、稻殼與花生殼。

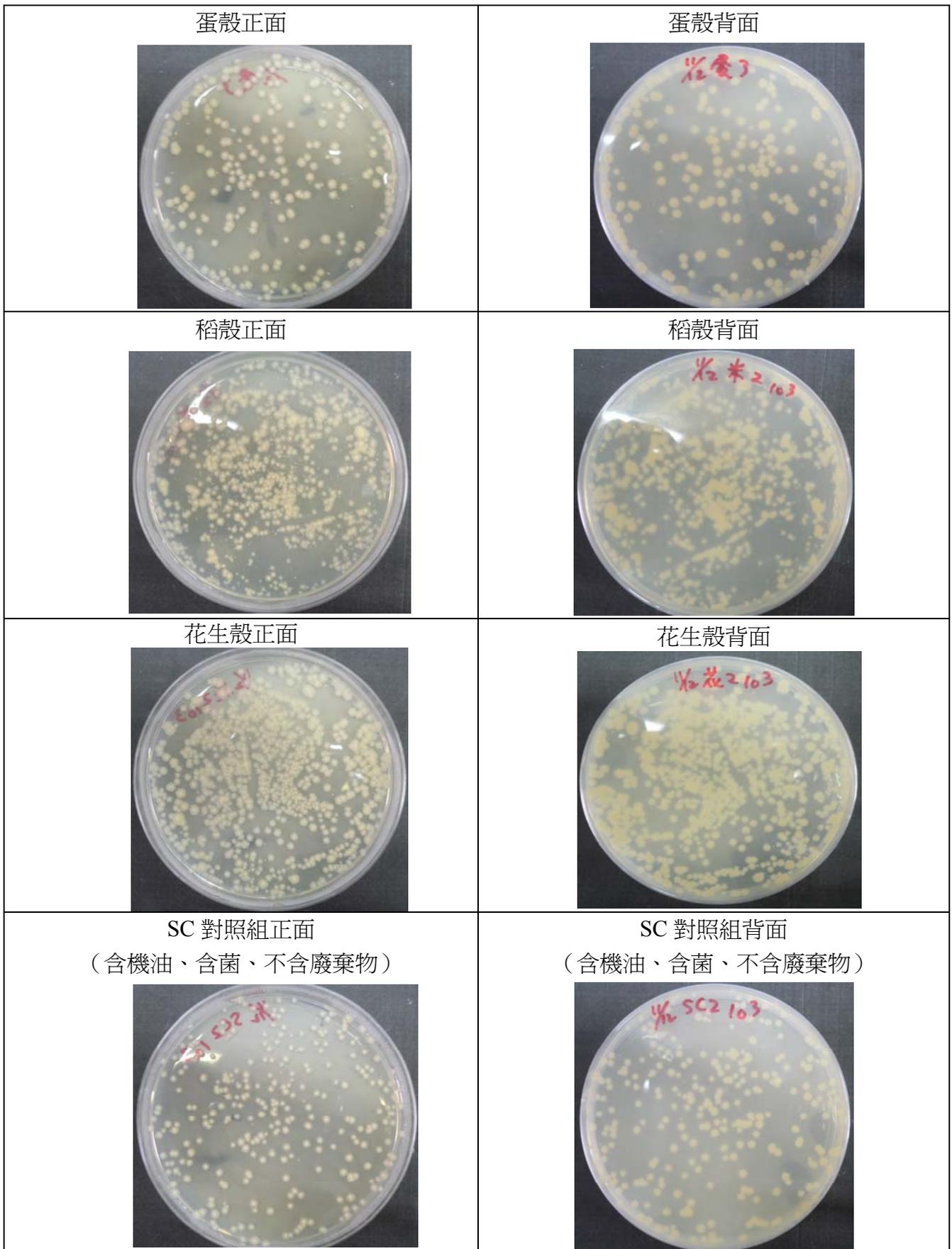
<表四> 在機油中添加各種農業廢棄物的 A4 菌液 O.D 值 (A_{600})

	SC 平均值	SC 標準差	蛋殼 平均值	蛋殼 標準差	稻殼 平均值	稻殼 標準差	花生殼 平均值	花生殼 標準差
第 0 週	0.025	0.001	0.031	0.0026	0.024	0.0060	0.025	0.0015
第一週	0.249	0.044	0.263	0.0134	0.348	0.0286	0.290	0.0413
第二週	0.678	0.0361	0.636	0.0040	0.958	0.0442	0.866	0.0399
第三週	0.906	0.0057	0.933	0.0366	1.117	0.0561	1.068	0.0148



圖二十、A4 在添加農業廢棄物的機油中之生長曲線。

* 註：實驗組各管乃是分別以添加各種廢棄物的對照組（不加菌）來作為 blank 所測得的 O.D 吸光值(A_{600})。



圖二十一、機油中添加各種農業廢棄物對 A4 生長的影響：含菌的實驗組與不含廢棄物的 SC 對照組，培養兩週後之生長情形。

陸、討論

【實驗一、A4 菌種活化、菌落形態觀察及特性分析】

Gordonia 菌屬之放射菌屬於高 G+C 鹼基百分比的好氣性革蘭氏陽性菌，在顯微鏡檢下呈短桿狀排列。菌落形態呈現不規則粗糙狀或光滑黏稠，菌落顏色包括白色、黃色、橘紅色或粉紅色。*Gordonia* 菌屬在分類地位上歸類為 Actinomycetales 目、Corynebacterineae 亞目、Gordoniaceae 科內。目前已知 *Gordonia* 菌屬內之菌種共 25 種，目前已自台灣分離 7 菌種。此屬之微生物普遍存在於自然界中，如污水處理池、工業廢水與被污染的土壤中，許多菌株能以石化燃料油如柴油與引擎潤滑油作為碳源，而且可分解環境中較頑強、不易被細菌所分解的污染物。由於已知的 *Gordonia* 菌種數目 25 種，遠低於 *Gordonia* 鄰近的放射線菌屬，故篩選與開發環境中的菌種顯的格外重要（沈佛亭，2006）。

由 LB 平面培養基塗盤的觀察可見 A4 菌落形態呈現不規則粗糙狀，菌落顏色為米黃色（圖一）。在 NCBI 資料庫中，由最常被細菌菌種分類學家用於判斷親源關係之依據的 16S rDNA 序列分析來看，與西班牙科學家發現的 *Gordonia cholesterolivorans* (Drzyzga et al., 2009) 和韓國發現的 *Gordonia sihwensis* (Kim et al., 2003) 的相似度皆為 98.0 %（數據由生物科技公司定序後在資料庫中比對所得，附件二），與自台灣分離之 7 種 *Gordonia* 菌種不同（沈佛亭，2006）。西班牙與韓國的這兩支菌都是從廢水處理器中分離得到的，而 A4 則是從樹林機車店外受油污污染的土壤中分離得到的，檢體來源有所差異。

由於在高 G+C 百分比的革蘭氏陽性放線菌菌種間，存在著較高的 16S rDNA 序列保留性，可發現 *Gordonia* 同屬不同菌種卻含有相當高的 16S rDNA 序列相似度(>99%)（沈佛亭，2006），例如：*Gordonia cholesterolivorans* 與 *Gordonia sihwensis* 的相似度為 99.8% (Drzyzga et al., 2009)，卻分別為二支菌種。而 A4 與已發表的 *Gordonia* 菌種相似度為 98%，這數值會誤以為相似度很高，但在 *Gordonia* 不同菌種間已經算是頗大的差異了，所以我們推測 A4 很可能是一支 *Gordonia* 屬的新菌種。不過近年來除了 16S rDNA 序列又加上其他基因或生理生化數據來探討不同菌屬、菌種或菌株間親源分類研究（沈佛亭，2006），所以我們仍需其他的基因序列或生理生化分析數據（各種酵素或細胞壁的成分等）才能進一步確認 A4 的分類地位。

我們委託國立中興大學實驗室對 A4 所做的分子檢測已經知道 A4 具有 alkane monooxygenase 和 catechol 1,2-dioxygenase 兩個基因的存在（附件三、附件四與附件五），分別可以參與脂肪族（烷類）和芳香族（鄰苯二酚）碳氫化合物的降解。其中芳香族開環酵素基因(catechol 1,2-dioxygenase gene)更是石油污染場址生物降解之研究指標，例如：油污分解菌—紅城紅球菌便具有此基因（何櫻寧，2008），所以 A4 的確是一具有油污降解能力的細菌。總之，A4 這支菌不屬於目前台灣所分離出的 7 種 *Gordonia* 菌種，我們推測 A4 可能是一新的本土放射菌 *Gordonia* 菌種，值得進一步追蹤研究與鑑定。

【實驗二、在不同油品為唯一碳源下，A4 菌的生長曲線測定】

我們將 A4 培養在分別以 3%(v/v)機油、柴油與沙拉油為唯一碳源的 BH 鹽類培養液內，A4 皆能利用這些油品且生長良好，其中以沙拉油與柴油的 A4 菌液在第三週生長濁度(O.D 值)最高，若不提供油類碳源則生長不佳（圖三）。可能是因為大豆沙拉油成分較為單純，以多元不飽和脂肪酸與單元不飽和脂肪酸碳氫鏈為主較易分解，所以 A4 利用情形良好。未來台灣若能製成便宜好用的微生物製劑，或許在夜市油炸攤或廚房食用油污染嚴重的水溝等，除了以化學方式去污之外，生物製劑來進行油污的去除也是一種減少環境傷害的方式。

柴油一般作為引擎動力燃料或石化工業上游的原料，使用量相當大，污染量也相對較大。許多研究顯示碳數為 6~20 的碳氫化合物（柴油碳數為 10~20）是最容易被微生物分解的（阮若屈、廖振傑，2001），所以由 A4 菌液生長濃度(O.D 值可達 0.5)來看確 A4 利用柴油的情形良好，且柴油由於揮發性較低，不容易用氣舉法（即利用抽氣將油氣取出）將柴油吸出污染處，微生物處理是唯一可行之法（阮若屈、廖振傑，2001），所以 A4 是一本土值得繼續研究追蹤的新柴油分解菌。

機油多數人俗稱黑油，最主要功能就是潤滑，有汽機油用、工業用、齒輪油等，而廢棄機油時常就被人們隨意傾倒排水溝與河川造成污染。機油的主要成分為基礎油，加入添加劑而成，提升其抗高溫抗氧化抗磨損的性能。基礎油又可分為礦物油、半合成油、合成油（<http://www.formil.com.tw/know.htm>）。我們的 A4 菌當初是在機油的環境被篩選出來的，而我們所使用的機油(Esso 2T-Power)是屬於以礦物油為基礎油的平價機車潤滑油（150 元/瓶）；而礦物油(Mineral Oil)是原油分餾後段重質的成分（殘餘油），成分較為複雜（碳數>28）（洪清添，2005），黏滯度與沸點也較柴油與沙拉油高許多。或許因為如此，A4 菌分解機油的速度相對於沙拉油與柴油慢，生長濁度(O.D 值)上升較緩。

【實驗三、A4 處理過後的機油、柴油與沙拉油對綠豆胚根生長影響之觀察】

在綠豆胚根實驗中，我們發現不管是添加哪一種油，與對照組（水）相比較之下，即便是可食用的沙拉油都會對綠豆的生長產生影響。可能是種子萌發時需要進行大量有氧呼吸獲得能量，而油品包覆在綠豆外會影響細胞對氧氣的獲取，所以不管是哪一種油污，影響種子萌發的情形都是很明顯的（圖七）。

傷害性最大的是柴油，由於柴油添加劑如苯、甲苯、二甲苯（BTEX）等成分，具有毒性對人體健康構成嚴重威脅（林大成，2005），所以我們觀察到添加柴油的綠豆幾乎完全不生長，綠豆整體更呈現黃褐色萎縮的重傷害，甚至連我們在吸取柴油作實驗時聞到油氣都會不舒服。令人開心的是，我們觀察到經 A4 分解過後的柴油已經能有效地減輕對綠豆的傷害，到第四天胚根生長的長度相當於分解沙拉油的綠豆生長狀態（圖十一），表示 A4 用於柴油的復育上有明顯效果。可惜的是，我們也觀察到唯有柴油與分解柴油組的綠豆是看不到根毛生長的，可能是我們的分解柴油仍未分解完全，或者分解後的柴油內仍存著一些有傷害性的物質。

令我們意外的是，機油的傷害並不如我們想像的嚴重，只比沙拉油嚴重一些，無怪乎國內外相當多的研究都是著重在柴油的生物復育工作。或許是我們這個牌子(Esso 2T-Power)的基礎油以礦物油為主。礦物油因為延展性、穩定性佳與致敏性低所以常用於化妝品與乳液的添加，本身毒性很低，與柴油相較之下傷害較輕微。

【實驗四與五、A4 菌的耐鹽性與耐酸鹼性試驗】

台灣海域常有許多油輪與貨輪頻繁進出，偶有海上事故造成燃料油與機油外洩，一旦污染物流入水體或污染岸邊，都將造成生態浩劫。若要在海域或高度鹽度之環境進行生物復育，則菌種需具有耐鹽性。一般海水鹽度約在 3.0~4.0 % (w/v)，而海鹽又以 NaCl 為主，所以本實驗採取三種鹽度 3.0%、4.0%及 5.0% (w/v) NaCl 作為菌株耐鹽試驗。由圖十二、十三顯示 A4 菌株具有相當耐鹽效果，可適用於高鹽環境污染整治，能提高生物復育效果。

由圖十四與十五顯示 A4 菌株在 pH4、pH7 及 pH10 皆生長良好，具有耐酸鹼性，有寬廣的 pH 生長範圍。由於工業上的油污常伴隨出現在酸鹼無常的環境，而這 A4 菌株將有利於生物復育之應用

【實驗六、A4 菌與油污分解菌間的交互作用觀察】

土壤中含有許多降解碳氫化合物的菌株，少有特定單一菌株可將複雜的污染物完全降解成功，有些難分解的碳氫化合物，則需要數種菌種通力合作才能完全分解（阮若屈、廖振傑，2001）。綠膿桿菌在環境中分佈廣泛，也是醫院常見的伺機性感染菌，風險性較高（risk=2，引述自 DSMZ 資料庫）。目前許多研究著重在純化它所分泌的生物性介面活性劑上(周建良，2005)，而非直接以綠膿桿菌處理油污。由於交互作用實驗結果沒有出現抑制圈，將來 A4 用於環境中生物復育時，將不會受環境中的綠膿桿菌所抑制，提升 A4 的利用價值。

A4 與紅城紅球菌的交互作用實驗中我們並無見到抑制圈出現，表示可能在 LB 平面培養基上二者不會分泌物質相互抑制（圖十六 B）。由於紅城紅球菌與 *Gordonia* 菌屬的親源關係接近（沈佛亭，2006），且無致病性的疑慮(risk=1，引述自 DSMZ 資料庫)，或許除了烷源戈登氏菌(*Gordonia alkanivorans*)與紅城紅球菌製成混合菌株之外，A4 與紅城紅球菌也是一種可以考慮的組合。

【實驗七、比較不同的油污分解菌對機油與柴油之分解情形】

我們一直很想知道 A4 菌比起其他的油污分解菌分解油污的效果有何差異？圖十七(A)(B)與圖十八可知 A4、紅城紅球菌與混合菌株皆能利用機油柴油且生長良好，印證實驗六所做出的交互作用結果，這兩種菌的確能混合生長。在生長速度方面，紅城紅球菌的生長較快，但對機油分解的情形卻不如 A4，A4 菌數濃度雖不如紅城紅球菌高，但油切的效果卻毫不遜色。在柴油環境中，培養五天，即可看出 A4 利用的情形比紅城紅球菌更好。這個實驗讓我們對 A4 在油污分解能力上刮目相看，因為根據文獻資料顯示紅城紅球菌(*Rhodococcus erythropolis* CC-BC11)早先由中興大學楊秋忠教授團隊證實可有效分解柴油與機油，而我們在此實驗看到 A4 在機油與柴油的分解上比紅城紅球菌效果更佳。

【實驗八、在機油為唯一碳源下，添加農業廢棄資材對 A4 生長與機油分解之影響】

我們收集的蛋殼、稻殼與花生殼都具有多孔隙的特性，是農業上的廢棄物，只要善加利用都是資源，被稱為「農業廢棄物資材」。例如：稻殼經過炭化形成多孔性的活性碳，可用於生活中的除臭與過濾等（倪理豐，2003）；花生殼的網狀結構明顯，網孔多且大，對鎘、鎳、鉛及鋅離子等重金屬有良好的吸附效果（梁致遠、林鴻淇，1999），或是炭化農業廢棄物來吸附水中重金屬以花生殼的吸附量最大（劉黔蘭等，2003），倘若能善加利用這些廢棄物，不僅可以減少污染，又可開創新的價值。

在實驗中我們選取機油作為唯一碳源，是因為藍綠色的機油較容易觀察到油污吸附在廢棄物上與油污減少的情形；我們也將所有的廢棄物處理小片段，藉以提高廢棄物的吸油表面積。或許是因為花生殼的高纖維組成與網狀結構較輕，再加上我們將花生殼剪成小片段更容易浮在油面上，在未加入 A4 菌的對照組中，我們觀察到浮在液面上的花生殼吸滿了藍綠色的機油，使得液面機油比原來少一半，吸油能力最佳圖十九(B)；加入 A4 菌株二週後，花生殼組液面上幾乎不見藍綠色機油，機油減少與分解的情形最為顯著。

稻殼，俗稱粗糠，吸油的能力不明顯，稻殼與花生殼的添加皆對 A4 的生長有明顯的幫助（圖二十）。稻殼與花生殼富含纖維質，為堆肥中常出現的資材，主要為提供碳源（倪理豐，1998）。再加上或許是我們的稻殼材料中仍殘留著些許的米糠，它含有許多高度的營養成分（如胺基酸）是熱門的飼料與肥料（倪理豐，2003），所以「養菌」的效果最好。而蛋殼具有孔隙，成分大部分是碳酸鈣，由於密度較高，所以將蛋殼加入試管後，蛋殼容易下沉，不太會浮在油面上，對吸附油污助益不大。由於蛋殼本身養分不高，對 A4 的生長濁度(O.D 值)幫助不大，與不含廢棄物的 SC 對照組相當（圖二十）。

花生殼吸附油污效果佳，且本身就具有乳化油品的特性（杜平蕙，1994）、成本低且對 A4 菌生長也有幫助。或許未來也能將 A4 等油污分解菌大量培養後，再加入花生殼為天然的擔體（讓微生物附著），製成天然固狀微生物製劑應用於油污的生物復育上（林忠亮，2003），這也是讓農業廢棄資材再活用，既經濟、環保又不影響本土生態的好方法。

柒、結論

- 一、我們利用 A4 菌的 16S rDNA 序列在 NCBI 資料庫中分析得知，A4 與在西班牙發現的 *Gordonia cholesterolivorans* 和在韓國發現的 *Gordonia sihwensis* 的相似度皆為 98.0 % (附件二)。A4 與台灣已分離出的 7 支 *Gordonia* 菌不同，與已發表的戈登氏菌差異頗大。A4 是一支台灣未曾報導過的 *Gordonia* 菌種，很可能為一 *Gordonia* 新菌種，仍待進一步確認。我們委託中興大學實驗室作的檢測報告顯示，A4 的確具有分解脂肪族（烷類）和芳香族（鄰苯二酚）碳氫化合物的基因存在，其分別為 *alkane monooxygenase* 和 *catechol 1,2-dioxygenase* 兩個基因（附件三、四及五），後者基因更是石油污染場址生物降解之研究指標，顯示 A4 菌具有分解碳氫化合物的能力。
- 二、A4 能在機油、柴油與沙拉油為唯一碳源的 BH 鹽類培養液中生存良好。A4 對柴油與沙拉油的利用情形又較機油佳。此外，三種油品都會對綠豆胚根生長產生傷害，其中以柴油的傷害最大。A4 分解後油品皆能減輕對胚根的傷害，其中以柴油的復育最為顯著，這顯示 A4 應用於柴油的生物復育上是具有可行性的。
- 三、A4 具有耐鹽性與耐酸鹼性，可應用在各種環境的生物復育上。
- 四、在 LB 平面培養基上，A4 不會受到綠膿桿菌所抑制，可提高 A4 在生物復育上的利用價值。由於 A4 不會受到紅城紅球菌所抑制，未來可考慮以混合株方式加速油污分解。此外，我們也發現 A4 比油污分解菌—紅城紅球菌分解機油與柴油的效果更佳。
- 五、農業廢棄資材—花生殼添加在機油環境中，對機油的吸附最為顯著；添加 A4 菌後，A4 的菌量能顯著增加並使機油的分解狀態更佳。未來除了進一步研究 A4 菌的生理生化特性之外，可考慮利用本土的油污分解菌，將花生殼製成固態天然擔體（細菌吸附於天然物上），在油污污染發生時，灑上花生殼擔體，既可吸附油污防止油污蔓延，又可利用固定於花生殼上的本土油污分解菌分解油污，既經濟、環保又兼顧本土生態的平衡。

捌、參考文獻與資料

1. 鐘翊嘉等。2009。第四十九屆中小學科學展覽作品「甩掉地球的油污—機油污染之復育」。
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。
3. 林大成。2005。柴油分解菌之生物降解與浮起特性。國立中興大學環境工程研究所博士論文。
4. 何櫻寧。2008。以芳香烴開環酵素基因爲石油污染場址生物降解指標之研究。國立中興大學生命科學系所碩士論文。
5. 周建良。2005。醣脂類生物界面活性劑 rhamnolipid 發酵基質最適化及生產策略之研究。國立成功大學化學工程學系碩士論文。
6. 林忠亮等。2003。微生物製劑應用在碳氫化合物類污染物之處理。石油季刊。第39卷第4期 p.37~43。
7. 阮若屈、廖振傑。2001。柴油的微生物分解。化工技術。第九卷第二期 p.228-242。
8. 倪理豐。2003。水稻廢棄資材之利用。花蓮區農業專訊。第四十三期 p.21-24。
9. 倪理豐。1998。農場堆肥製作方法。花蓮區農業專訊。第二十六期 p.21-22
10. 杜平惠等。1994。花生殼粉之抗氧化及功能特性。技術學刊。第九卷第一期：p97-101。
11. 梁致遠、林鴻淇。1999。以農產廢棄物清除水中鎘、鎳、鉛及鋅的研究。中國農業化學會誌。37:3 p.412-419。
12. 劉黔蘭等。2003。炭化農業廢棄物吸附水中重金屬之研究。土壤與環境。6卷3期 p.165-174。
13. 洪清添。2005。汽、柴油之特性介紹。標準與檢驗雜誌。No.79 p.1-10。
14. Drzyzga, O., Navarro J.M., Fernandez de las Heras, L., Garcia Fernandez, E., and Perera, J. 2009. *Gordonia cholesterolivorans* sp. nov., a cholesterol-degrading actinomycete isolated from sewage sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* ; 59:1011-1015.
15. Kim KK, Lee CS, Kroppenstedt RM, Stackebrandt E, Lee ST. 2003. *Gordonia sihwensis* sp. nov., a novel nitrate-reducing bacterium isolated from a wastewater-treatment bioreactor. *Int. J Syst Evol Microbiol* : 53:1427-1433.
16. Matthias Arenskötter, Daniel Bröker, and Alexander Steinbüchel. 2004. Biology of the Metabolically Diverse Genus *Gordonia*. *Appl Environ Microbiol*:70(6):3195-3204.
17. 機油常識。 <http://www.formil.com.tw/know.htm>

【評語】 040708

本研究最大優點為其實用價值，針對 A4 土壤菌，有系列性探討，尤其針對其耐鹽耐酸鹼性試驗，對 A4 作為油污降解物質之可行性具說服力。可改進地方包括統計處理後之結果為更佳呈現方式，以及 alkane monooxygenase 和 catechol 1,2-dioxygenase 與油污降解之關係討論。