

# 中華民國第 60 屆中小學科學展覽會 作品說明書

---

國中組 生物科

第二名

030324

「柏」救地球-柴油分解菌的研究

學校名稱：花蓮縣慈濟大學附屬高級中學(附設國中)

作者：  國二 林彥均  國二 林佑珊  國二 洪增梅	指導老師：  林麗君  柯政宏
---	-----------------------------

關鍵詞：柴油分解菌、烏柏、高砂鉅鍬形蟲

## 摘要

本研究自烏柏樹下的土壤及高砂鉅锹形蟲幼蟲體內分離出 13 種微生物，其中 2 種可利用烏柏樹莖的養分生長，11 種可利用種子的養分生長，推測微生物與锹形蟲、烏柏樹存在密切關係。進一步研究發現，13 種微生物中有 3 種可分解柴油，其中 2 種為分離自土壤的不動桿菌屬細菌(*Acinetobacter sp.*)，1 種為分離自幼蟲腸道的芽孢桿菌屬細菌(*Bacillus sp.*)；菌株的 14 天柴油分解率粗估可達 48~55%；將經由菌株分解後的柴油乳化層撒在綠豆上觀察其生長情形，發現可降低柴油對綠豆造成的傷害。在耐受性實驗中顯示，此 3 菌株耐鹼性達 pH10，耐鹽性達 3~4% NaCl。由於菌種均來自花蓮本土，且具備處理海洋油污潛力，未來經過審慎評估應可實際運用，避免因使用外來菌種對環境造成的二次傷害。

## 壹、研究動機與文獻探討

國一自然課，老師在介紹第二冊第五章「生物與環境」的森林生態系時播放了 YOYO 台「好好玩自然」節目，其中一個單元談到了高砂鉅锹形蟲(*Prosopocoilus motschulskyii*)(圖 1)、渡邊氏長吻白蠟蟬(*Pyrops watanabei*)與烏柏樹(*Sapium sebiferum*)之間的關係，節目中提到如果要找這些昆蟲，可以先找到烏柏樹，可是為什麼昆蟲喜歡在烏柏樹附近呢？是喜歡吸食樹汁或是還有其他原因呢？我們在詢問老師及查詢資料後沒有得到詳細答案，因此在老師的鼓勵下，展開了我們的研究。

實驗室有學長從小就對高砂鉅锹形蟲有深入研究，進行過長期的飼養與觀察，他們發現了锹形蟲幼蟲腸道內具有黏質沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)，這個菌可以抑制環境中部份微生物生長。在自然第二冊第四章「形形色色的生物」中也介紹了原核生物的基本結構與多樣性，各式各樣的微生物影響著人們的生活。身為國中生的我們雖然常常聽到細菌或病毒，但是對於微生物領域卻感到很陌生，因此激起了想要一窺究竟的慾望。在查詢了科教館網站上的歷屆科展作品後，發現有科展作品在研究蟑螂體內對抗細菌的微生物，有人在研究麵包蟲體內可分解保麗龍的微生物，也有人在研究衣魚體內可分解纖維素的微生物，以成為製造生質酒精的工具之一。突然覺得微生物真是地球的寶藏，等著我們有更多的發現，因此高砂鉅锹形蟲體內或烏柏樹附近的微生物還有什麼有趣的關聯便成為了我們的研究目的。



圖 1.高砂鉅锹形蟲成蟲



圖 2.烏柏樹葉



圖 3.烏柏種子

我們自美崙山採集了烏柏樹的葉(圖 2)、莖、種子(圖 3)帶回實驗室進行研究，過程中發現烏柏樹的種子富含油脂，搗碎後摸起來很油，查詢資料後發現以前烏柏種子就曾被用來製造蠟燭、燃油、肥皂、機潤滑油或炒茶葉用油，烏柏種子每公頃的產油效率高達 4705-9073 公升(羅東自然教育中心，2011)，此外，烏柏也是用來製造生質柴油原料的重要研究對象(沈玉真，2015)，因此我們提出了假設-**銹形蟲體內或環境中的微生物若能利用烏柏種子養分生長，應亦具備了分解柴油能力。**

原油依據不同分離與煉製方法，可產生上千種石油化學產品，主要分類如表 1 所示；一般柴油碳數分佈約在 16~20 之間，化學組成主要含 64%烷烴、1~2%烯烴及 35%芳香烴；柴油可依用途可分為陸上用及海上用，主要為硫含量差異，超級柴油(車用柴油)的硫含量在 10ppm 以下，甲種漁船在 1.0%以下，海運柴油在 0.5%以下；而本研究使用的是購買自臺灣中油公司的超級柴油，其基本特性摘要如表 2(台灣中油，2019)。

表 1 原油分餾產品

油品名稱	沸點範圍(°F)	含碳原子數	油品名稱	沸點範圍(°F)	含碳原子數
燃料氣	0 以下	C1~C4	柴油	400~700	C16~C20
液化氣	0 以下	C3~C4	潤滑油	800~900	C28~C30
汽油	100~400	C4~C12	燃料油	650~900	C28~C70
煤油	325~525	C12~C16	柏油		C30 以上

表 2.超級柴油特性 (台灣中油，2019)

化學性質:烷烴類		
低硫柴油 (C16~C20): ≥ 99.0%	閃火點:>65°C	自燃溫度:約 177°C
外觀:無色至黃色液體	爆炸界線:1.3%~6.0%	密度:0.8(比重)
氣味:輕微石油味道	蒸氣壓:2mmHg(20°C)	溶解度:不溶於水
沸點範圍:163~357°C	蒸氣密度(Air=1):>1	pH 值:中性
危害警告:(1)可燃液體(2)懷疑致癌(3)可能造成呼吸道刺激或可能困倦或昏眩(4)如果吞食並進入呼吸道可能致命。		

在自然第二冊第六章「環境保護與生態平衡」章節中提到層出不窮的環境污染議題，例如 2010 年墨西哥灣漏油事件，導致大範圍的水質受到污染，不少魚類，鳥類，海洋生物、植物都患病或死亡，新聞中也時常報導油汙對環境傷害(圖 4)。而目前我們用於處理油汙的微生物菌種大多自國外引進，這樣的作法可能會造成另一種生態危機，引發外來種及入侵種議題(劉兆川，2010)。如果我們能在台灣篩選出可分解油汙的本土微生物，仔細研究評估使用的可能，或許便能為這片美麗的大地盡一分心力。

近期重大海洋油汙染事件			
時間	地點	船名、船籍	影響
2016年 2月5日	澎湖小白沙嶼	耘海輪(紐埃籍)	合計抽除138立方公尺殘油
2016年 3月10日	新北市石門海域	德翔台北(我國籍)	抽除366立方公尺殘油，並清除127公噸含油垃圾
2016年 9月15日	金門古崗海域	港泰台州(廈門籍)	合計清除6.98公噸含油垃圾
2017年 3月10日	綠島北部海域	偷排重油船隻正由環保署調查中	截至昨日清理含油汙垃圾約1123公斤

資料來源：環保署 製表：楊騰凱

圖 4.近期重大海洋油汙染事件(中時電子報，2017)

## 貳、研究目的

- 一、分離培養烏柏樹下的土壤微生物及高砂鉞形蟲腸道微生物，並利用烏柏樹的葉、莖、種子製作培養基，觀察微生物生長與養分利用關係。
- 二、利用以柴油為唯一碳源的 BH 鹽類培養基檢測微生物對柴油的分解能力。
- 三、研究柴油分解菌的耐鹽與耐酸鹼性，評估菌株的使用環境範圍。
- 四、透過綠豆生長實驗檢測經微生物分解後的柴油與柴油對綠豆生長的差異。
- 五、菌種觀察與鑑定。

## 參、主要研究設備及器材

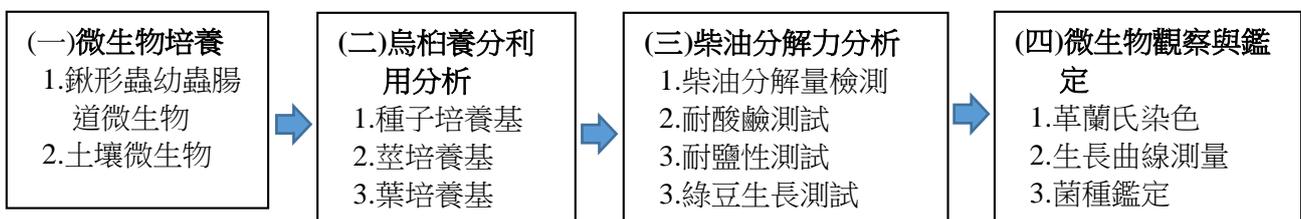
無菌操作台、滅菌釜、恆溫培養箱、烘箱、冰箱、離心機、震盪混合器、電子天平、微量滴管、分光光度計、顯微鏡、電子目鏡、果汁機、pH 計、石英管、接種環、三角玻棒、0.45 $\mu$ m 過濾膜、針筒、燒杯、血清瓶、秤量紙、藥杓、鋁箔紙、滅菌膠帶、9cm 培養皿、酒精燈、剪刀、載玻片、打火機、離心管、試管、鑷子、牙籤、試管架、相機、電腦、甲醇、乙醇、LB、agar、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、CaCl<sub>2</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、NaCl、NaOH、HCl、結晶紫染劑、番紅花染劑、碘液、鉞形蟲三齡幼蟲、烏柏葉、莖、種子、超級柴油。

恆溫震盪培養箱	無菌操作台	烘箱	分光光度計	震盪混合器
				
滅菌釜	複式顯微鏡	電子天平	離心機	微量滴管
				

圖 5.研究設備與器材

## 肆、研究過程與結果

### 一、研究架構



## 二、高砂鉅鍬形蟲三齡幼蟲的腸道微生物分離培養

(一)研究目的:每種微生物的營養需求不同，需使用不同培養基分離培養，我們使用常見的 LB(Lysogeny broth)平面培養基來分離培養高砂鉅鍬形蟲幼蟲腸道微生物。

(二)研究方法:

### 1.LB 平面培養基製作

(1)取 500ml 燒杯，加入 2.5g LB(含 tryptone、yeast extract、NaCl、維生素、微量元素、礦物質)，1.5g agar(洋菜膠粉末)，補過濾水至 100ml，均勻攪拌溶解；蓋上鋁箔紙，貼上滅菌膠帶，放入滅菌釜中滅菌(121°C，1.2atm，15 min)。

(2)略為冷卻後(約 55°C)，倒入無菌培養皿中，每個培養皿倒入約 15ml LB；培養基凝固後觀察 24 小時，無雜菌汙染即可使用。

### 2.高砂鉅鍬形蟲三齡幼蟲的腸道微生物分離培養

(1)將老師提供的高砂鉅鍬形蟲三齡幼蟲(圖 6)放在自行採集的烏柏樹下土壤中養殖，穩定生長二週後進行實驗。



圖 6.三齡幼蟲

(2)將幼蟲放入裝有 75%酒精的燒杯中，藉此麻醉幼蟲並清除體表微生物，約 5 分鐘後幼蟲靜止不動，將燒杯及蟲體放入無菌操作台中進行解剖。

(3)利用滅菌過的鑷子夾出蟲體，放置於無菌培養皿上，以無菌水沖洗殘留酒精，再以無菌棉棒擦乾水分後進行解剖，利用鑷子將蟲體固定，以滅菌過的剪刀自尾端直剖取出腸道(圖 7)，放置於 15ml 無菌離心管中。



圖 7.幼蟲腸道

(4)秤量重量後加入等量的無菌水(1.04 克)，以震盪混合器混合 1 分鐘，將離心管放入離心機中，離心 4000rpm，3 分鐘，吸取上清液序列稀釋成濃度  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  倍。

(5)利用微量滴管吸取  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  倍樣本各 100 $\mu$ l 至 LB 平面培養基上，以三角玻棒均勻塗抹，每個濃度各重複兩次。室溫培養 2 天，以肉眼觀察分辨培養皿中細菌，挑出不同外觀的菌落以畫線法純化菌種。

(三)研究結果:

1.利用 LB 平面培養基分離培養幼蟲腸道微生物結果如圖 8。

2.以肉眼分辨外觀後進行純化，結果如圖 9。我們將這六種微生物分別命名為 B1~B6。

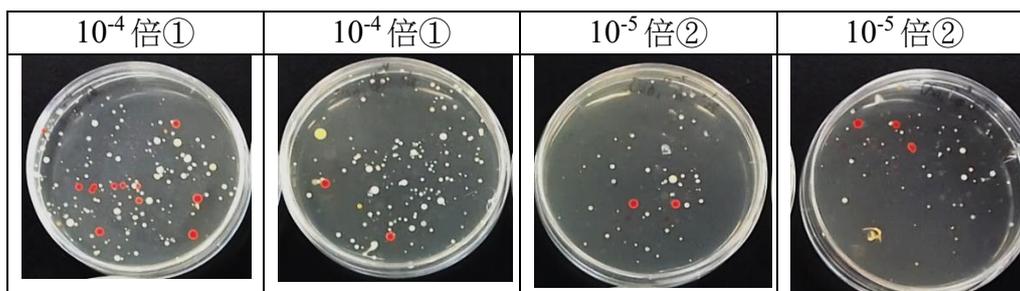


圖 8.幼蟲腸道微生物分離培養。

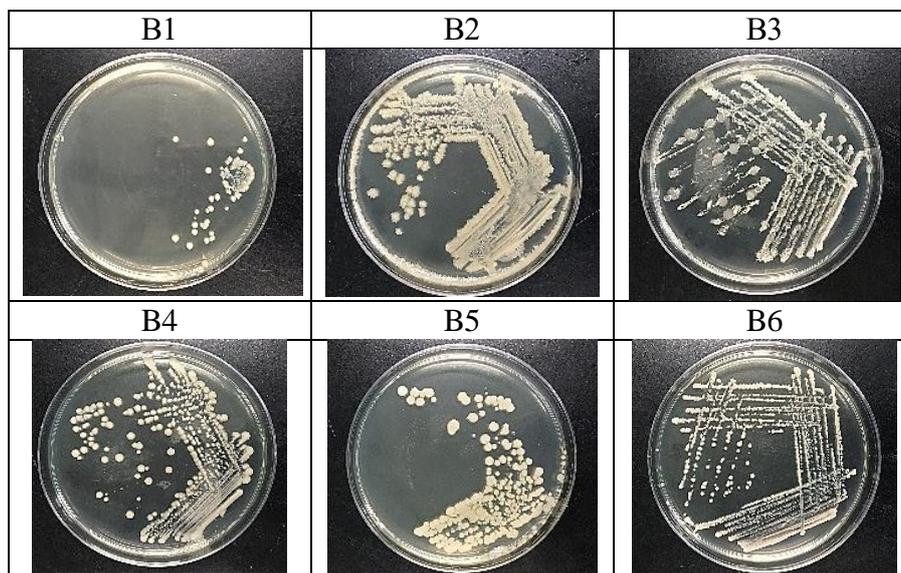


圖 9.幼蟲腸道微生物菌種純化

### 三、土壤微生物分離培養

(一)研究目的:利用 LB 平面培養基分離土壤微生物，用以研究生物間的關係。

(二)研究方法:

#### 1.土壤微生物分離培養

(1)利用滅菌過的鑷子夾取上述實驗中的烏柏樹下土壤樣本 1 克，放入 15ml 無菌離心管中，共採樣 2 次。

(2)加入無菌水 9ml，以震盪混合器震盪 1 分鐘，製成濃度 10<sup>-1</sup> 倍溶液，靜置 10 分鐘略為沉澱後，以微量滴管吸取 1ml 上清液加入 9ml 的無菌水稀釋成濃度 10<sup>-2</sup> 倍，依此法序列稀釋為原濃度 10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup> 倍。

(3)利用微量滴管吸取 10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup> 倍樣本各 100μl 至 LB 平面培養基上，以三角玻棒塗抹均勻，每個濃度各塗兩盤。室溫培養 2 天，以肉眼觀察並分辨培養皿中細菌，拍照記錄並予以命名。挑出不同外觀的菌落以畫線法純化菌種。

(三)研究結果:

1.利用 LB 平面培養基分離培養原生環境中的土壤微生物結果如圖 10。

2.以肉眼分辨菌落形狀及顏色等外觀後進行純化，結果如圖 11，我們將這七種微生物分別命名為 A1~A7。

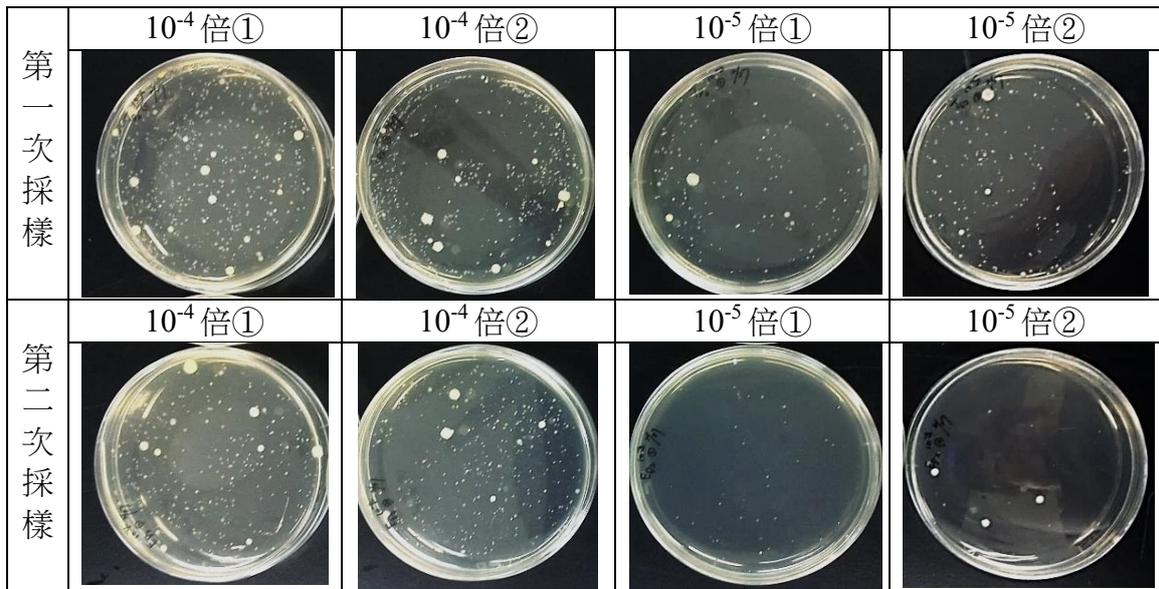


圖 10.土壤微生物分離培養。

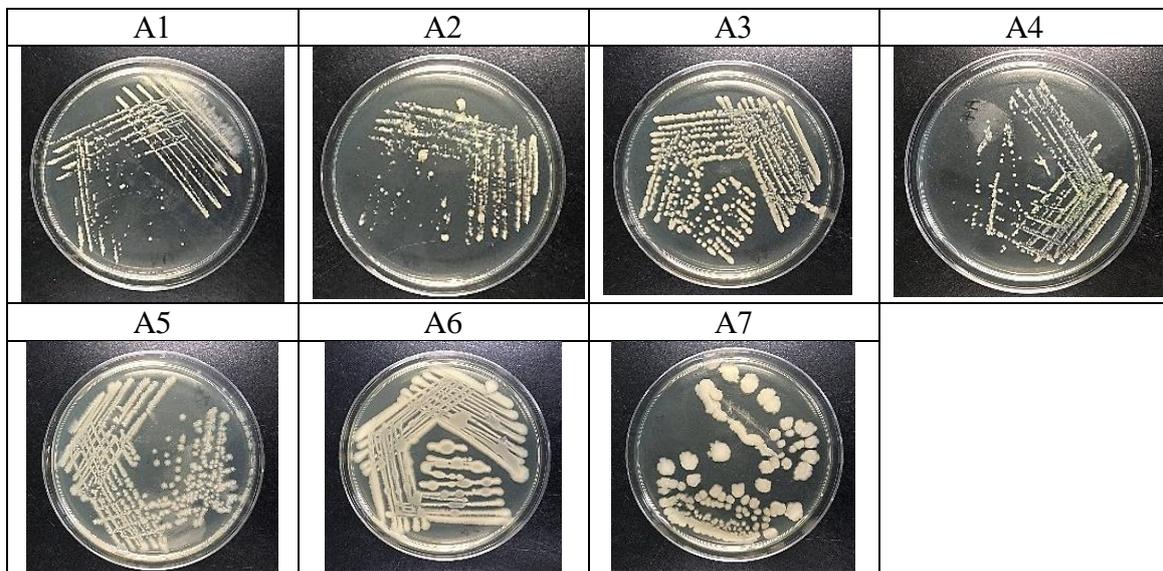


圖 11.土壤微生物菌種純化。

#### 四、烏桕養分利用分析

(一)研究目的:利用烏桕的種子、莖、葉萃取物製作培養基，作為微生物營養來源，瞭解自土壤中分離出的菌株 A1~A7 及自幼蟲腸道分離出的菌株 B1~B6 能否利用這些養分生長。

(二)研究方法:

1.烏桕平面培養基製作

- (1)將烏柏種子、莖、葉放入烘箱中烘乾(40°C，1 天)。
- (2)以電子天平稱取種子、莖、葉各 2 克放入小型果汁機中，加入少許水，打碎後以雙層紗布過濾汁液。
- (3)將過濾後的汁液倒入 500ml 燒杯中，加入 1.5g agar，補水至 100ml，攪拌均勻。
- (4)蓋上鋁箔紙，貼上滅菌膠帶，放入滅菌釜中滅菌；略為冷卻後，倒入無菌培養皿中，凝固後備用。

## 2.畫菌

- (1)將培養基分成 8 區。
- (2)以接種環挑選自土壤中分離出的菌株 A1~A7 及自幼蟲腸道分離出的菌株 B1~B6 畫到培養基上，每種培養基各畫兩盤，室溫培養兩天後觀察菌落生長情形。

### (三)研究結果:

- 1.利用葉片做成的培養基沒有凝固，因此無法畫菌。利用莖製作的培養基只有 A2 和 B6 有微量生長，顯示 A2 和 B6 可能可以利用烏柏莖中的養分生長。
- 2.利用種子製作的培養基非常油膩，除了 B2 及 B3 外，其餘菌落皆可生長(圖 12，表 3)。推測 A1~A7、B1、B4~B6 這 11 個微生物可以分解利用烏柏種子萃取物的養分。

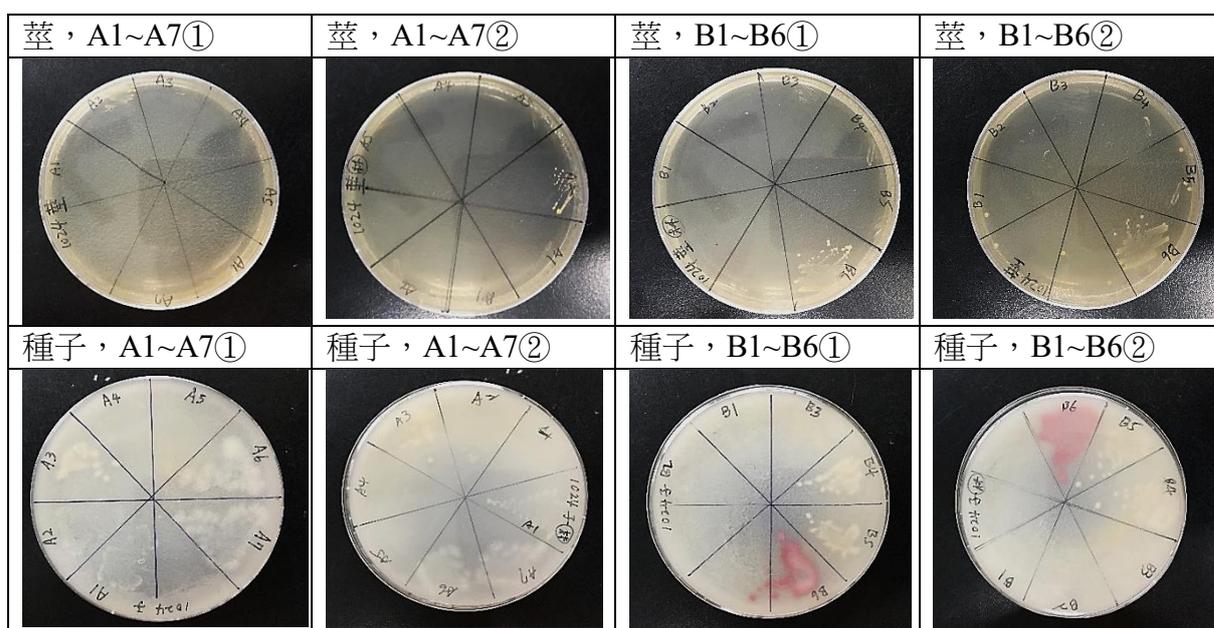


圖 12.微生物在烏柏的莖及種子平面培養基的生長情形。

表 3.微生物在烏柏的莖及種子平面培養基的生長情形。(V:有生長)

菌株 培養基	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	B1	B2	B3	B4	B5	B6
烏柏莖平面		V											V
烏柏種子平面	V	V	V	V	V	V	V	V			V	V	V

## 五、柴油-BH 平面培養基的生長測試

(一)研究目的:大部分微生物無法在缺乏營養的培養基中生長，但是如果微生物能利用柴油作為養分來源，分解柴油，即可在柴油-BH 平面培養基中形成菌落(劉兆川等，2010)。因此我們製作以柴油為唯一碳源的 BH(Bushnell- Hass)鹽類培養基，用以篩選可分解柴油微生物。

(二) 研究方法:

### 1.BH 平面培養基及柴油-BH 平面培養基製作

(1)取 500ml 燒杯，加入少許過濾水，0.02g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ，0.002g  $CaCl_2$ ，0.1g  $KH_2PO_4$ ，0.1g  $K_2HPO_4$ ，0.1 g  $NH_4NO_3$ ，1.5g Agar，2ml 超級柴油，補水至 100ml，攪拌均勻；對照組則不添加柴油，其餘相同。

(2)蓋上鋁箔紙，貼上滅菌膠帶，放入滅菌釜中滅菌；略為冷卻後，倒入無菌培養皿中，凝固後備用。

### 2.畫菌

(1)將培養基分成 8 區。

(2)以接種環挑選 A1~A7、B1~B6 菌株畫到培養基上，室溫培養兩天後觀察生長情形。

(三) 研究結果:

1.大部分菌株在不含碳源的 BH 鹽類培養基中生長不佳，除 A3、B5 外，僅 A2、B4、B6 有少量生長。

2.在以柴油為碳源的 BH 鹽類培養基中 A2、A4、B4、B5 皆可生長，且生長情形較不含柴油組佳(圖 13，表 4)，因此推測 A2、A4、B4、B5 可利用分解柴油，提供生長所需。

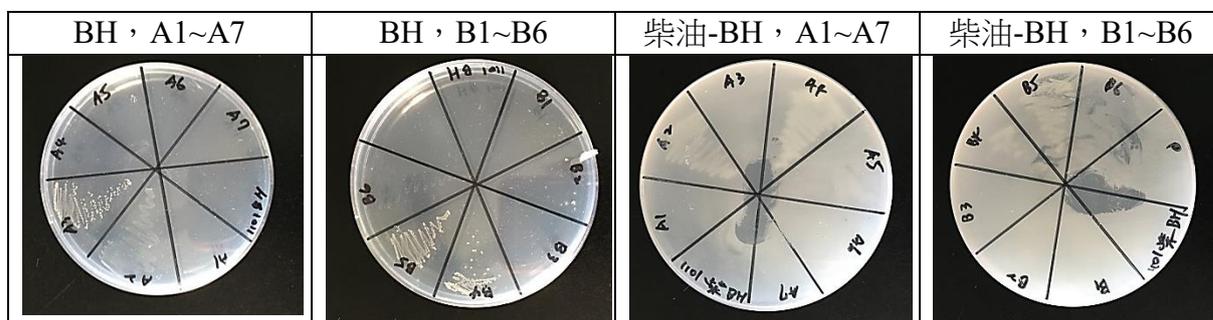


圖 13.BH 平面培養基及柴油-BH 平面培養基的生長情形。

表 4.BH 平面培養基及柴油-BH 平面培養基的生長情形。(V:有生長)

菌株 培養基	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	B1	B2	B3	B4	B5	B6
BH 平面		少	V								少	V	少
柴油 BH 平面		V		V							V	V	

## 六、柴油分解力初步分析

(一)研究目的: 製作柴油-BH 培養基過程中發現柴油易漂浮在上層, 導致分布不均, 因此我們改採液體培養, 並以 0.45 $\mu$ m 過濾膜去除柴油中大部分微生物, 觀察 A2、A4、B4、B5 四個菌株對柴油的分解力。

(二)研究方法:

### 1.LB 液體培養與菌種活化

(1)LB 培養液製作:取 500ml 燒杯, 加入 2.5g LB, 補過濾水至 100ml, 攪拌均勻。蓋上鋁箔紙, 貼上滅菌膠帶, 放入滅菌釜中滅菌, 冷卻後備用。

(2)在 15ml 無菌離心管中加入 5ml LB 培養液, 以接種環挑選單一菌落, 接種至 LB 培養液中, 室溫培養 2 天。

### 2.柴油分解力篩檢

(1)製作 BH 培養液:取 2000ml 燒杯, 加入 0.2g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.02g CaCl<sub>2</sub>, 1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 補水至 1000ml, 攪拌均勻, 分裝至血清瓶中, 貼上滅菌膠帶, 放入滅菌釜中滅菌, 冷卻後備用。

(2)在無菌操作台內, 讓柴油通過 0.45 $\mu$ m 過濾膜除菌。

(3)在 50ml 無菌離心管中加入 10ml BH 培養液, 500 $\mu$ l 柴油(5%), 300 $\mu$ l 菌液(3%)。對照組不加柴油, 室溫培養一週後觀察油品是否出現乳化層。

(三)研究結果:

1.一週後發現 A2、A4、B4 在有柴油時下層溶液呈現白色混濁, 顯示有微生物生長情形, 而柴油層具白色乳化現象, 柴油呈現被分解狀態。因此推論柴油不僅不會傷害此三株菌, 反而能利用柴油養分生長。

2.B5 菌株沒有明顯乳化層, 因此暫時捨棄 B5 菌株的後續研究(圖 14)。

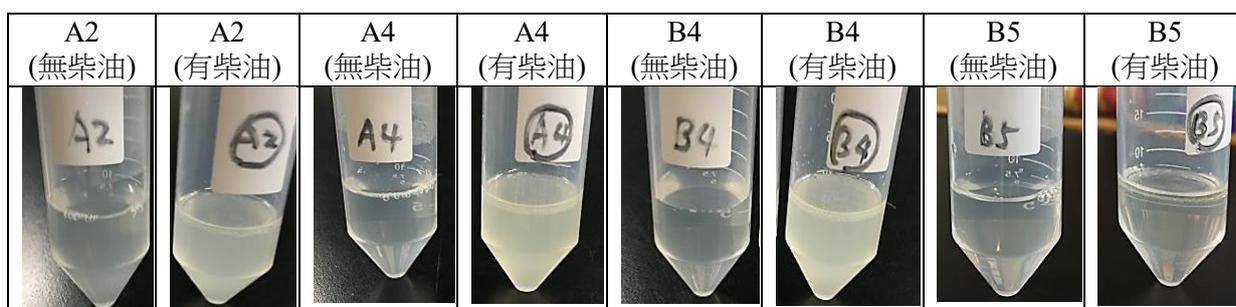


圖 14.A2、A4、B4、B5 菌的柴油分解力分析

## 七、A2、A4、B4 菌株的耐酸鹼性測試

(一)研究目的: 將 A2、A4、B4 三種菌株分別放入 pH 值為 4、7、10 的柴油-BH 培養液中

測定其耐酸鹼性。

(二)研究方法:

- 1.LB 液體培養與菌種活化:在 100ml 血清瓶中加入 30ml LB 培養液，以接種環挑選 A2、A4、B4 三種菌株單一菌落，接種至 LB 培養液中，以 30°C，120rpm 恆溫培養 16~24 小時。以分光光度計測量菌液吸光值(A<sub>600</sub>)，調整 A2、A4、B4 三菌液 A<sub>600</sub> 皆為 0.6。
- 2.不同酸鹼度的柴油 BH 培養液製作與耐酸鹼測試
  - (1)配置 1M NaOH 及 1M HCl。
  - (2)取三個 500ml 燒杯，加入 300ml BH 培養液，並以 NaOH 及 HCl 調整 pH 值為 4、7、10。蓋上鋁箔紙，貼上滅菌膠帶，放入滅菌釜中滅菌，冷卻後備用。
  - (3)在無菌操作台內，讓柴油通過 0.45μm 過濾膜除菌。
  - (4)在 50ml 無菌離心管中加入 20ml 不同酸鹼度的 BH 培養液，1000μl 柴油(5%)，600μl 菌液(3%)。對照組不加柴油。每個條件各重複做二管，完成後放入恆溫震盪培養箱培養(30°C，120rpm)。
  - (5)每天觀察油品是否出現乳化層，並以分光光度計測量吸光值(A<sub>600</sub>)，測量時以 BH 培養液作為空白試劑。

(三)研究結果:

- 1.A2、A4、B4 的生長在酸鹼值 pH7 >pH10 >pH4。
- 2.pH7 時，A2、A4、B4 在無柴油環境中仍可生長，但時間愈長，吸光值愈低，在有柴油環境下 A2、A4、B4 生長情形更為良好，在扣除不含柴油組數值後，B4 及 A4 在第 14 天時吸光值可達 0.8，A2 為 0.69。(圖 15~21，表 5~7)

時間 (天)	A2, pH4 (無柴油)	A2, pH4 (有柴油)	A2, pH7 (無柴油)	A2, pH7 (有柴油)	A2, pH10 (無柴油)	A2, pH10 (有柴油)
第 7 天						
第 14 天						

圖 15.A2 菌在不同酸鹼值的生長情形(節錄，詳見實驗記錄本)

表 5.A2 菌在不同酸鹼值的 A600(表格中為二次實驗的平均數值)

	A2 pH4 (無柴油)	A2 pH4 (有柴油)	A2 PH4 (有-無)	A2 pH7 (無柴油)	A2 pH7 (有柴油)	A2 pH7 (有-無)	A2 pH10 (無柴油)	A2 pH10 (有柴油)	A2 pH10 (有-無)
第 1 天	0.07	0.05	-0.02	0.35	0.45	0.10	0.06	0.22	0.16
第 2 天	0.06	0.08	0.01	0.30	0.53	0.24	0.03	0.33	0.30
第 3 天	0.02	0.03	0.01	0.30	0.73	0.44	0.05	0.28	0.22
第 4 天	0.04	0.09	0.06	0.25	0.75	0.49	0.03	0.37	0.34
第 5 天	0.03	0.10	0.07	0.30	0.75	0.45	0.04	0.29	0.25
第 6 天	0.01	0.04	0.02	0.29	0.65	0.37	0.02	0.31	0.30
第 7 天	0.04	0.05	0.01	0.29	0.70	0.41	0.01	0.22	0.21
第 14 天	0.02	0.04	0.02	0.24	0.93	0.69	0.01	0.24	0.24

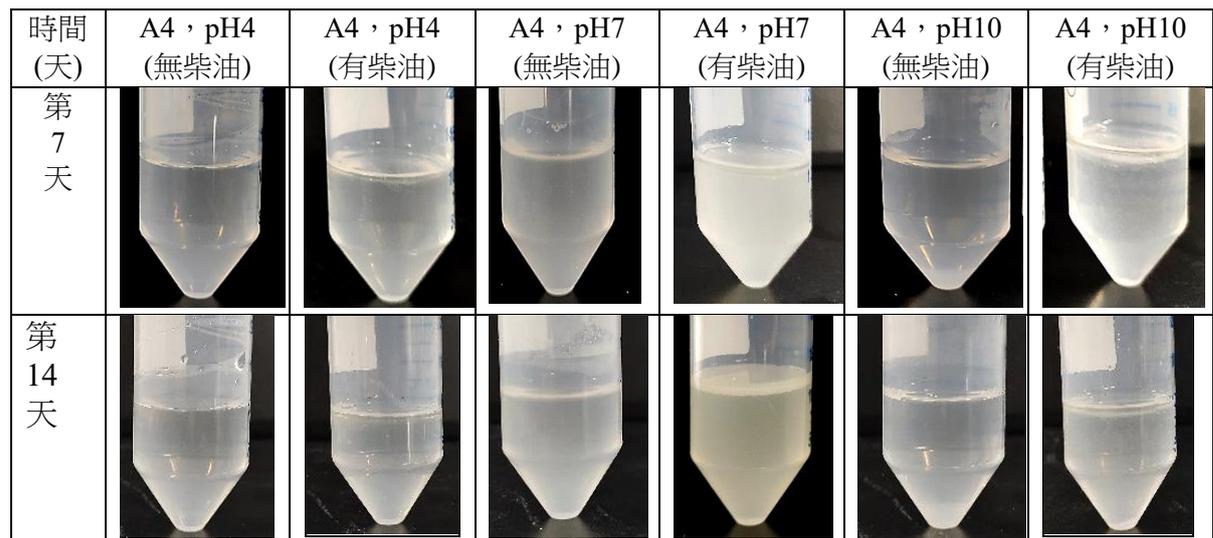


圖 16.A4 菌在不同酸鹼值的生長情形(節錄，詳見實驗記錄本)

表 6.A4 菌在不同酸鹼值的 A600(表格中為二次實驗的平均數值)

	A4 pH4 (無柴油)	A4 pH4 (有柴油)	A4 PH4 (有-無)	A4 pH7 (無柴油)	A4 pH7 (有柴油)	A4 pH7 (有-無)	A4 pH10 (無柴油)	A4 pH10 (有柴油)	A4 pH10 (有-無)
第 1 天	0.05	0.04	-0.02	0.31	0.53	0.22	0.06	0.13	0.07
第 2 天	0.00	0.05	0.05	0.36	0.64	0.28	0.05	0.28	0.23
第 3 天	0.03	0.08	0.05	0.36	0.66	0.31	0.03	0.31	0.28
第 4 天	0.02	0.08	0.06	0.36	0.78	0.42	0.03	0.29	0.26
第 5 天	0.02	0.05	0.03	0.33	0.85	0.52	0.04	0.21	0.17
第 6 天	0.00	0.04	0.04	0.32	0.91	0.59	0.02	0.36	0.33
第 7 天	0.04	0.19	0.15	0.36	0.98	0.62	0.06	0.30	0.25
第 14 天	0.02	0.04	0.02	0.22	1.01	0.80	0.02	0.29	0.27

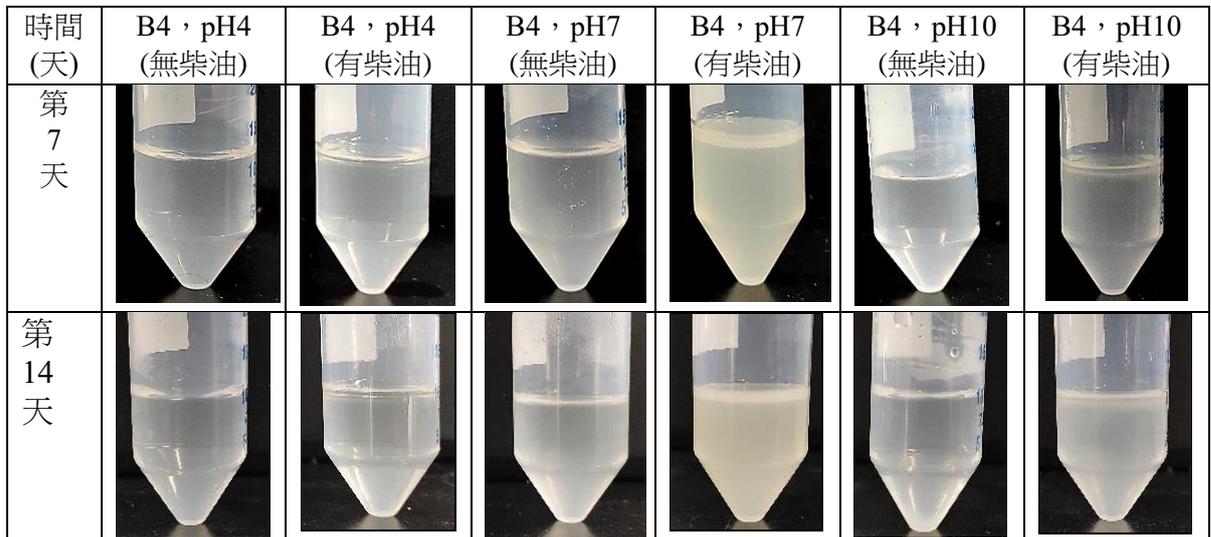


圖 17. B4 菌在不同酸鹼值的生長情形(節錄，詳見實驗記錄本)

表 7. B4 菌在不同酸鹼值的 A600(表格中為二次實驗的平均數值)

	B4 pH4 (無柴油)	B4 pH4 (有柴油)	B4 pH4 (有-無)	B4 pH7 (無柴油)	B4 pH7 (有柴油)	B4 pH7 (有-無)	B4 pH10 (無柴油)	B4 pH10 (有柴油)	B4 pH10 (有-無)
第 1 天	0.08	0.23	0.16	0.29	0.37	0.08	0.06	0.37	0.31
第 2 天	0.07	0.07	0.00	0.35	0.59	0.25	0.05	0.32	0.27
第 3 天	0.17	0.05	-0.12	0.30	0.72	0.42	0.04	0.39	0.35
第 4 天	0.05	0.09	0.05	0.31	0.81	0.50	0.03	0.38	0.34
第 5 天	0.03	0.13	0.10	0.30	0.90	0.60	0.05	0.41	0.36
第 6 天	0.03	0.06	0.03	0.28	0.85	0.57	0.05	0.36	0.31
第 7 天	0.05	0.09	0.04	0.24	1.00	0.76	0.04	0.33	0.29
第 14 天	0.02	0.04	0.01	0.18	0.97	0.80	0.03	0.31	0.28

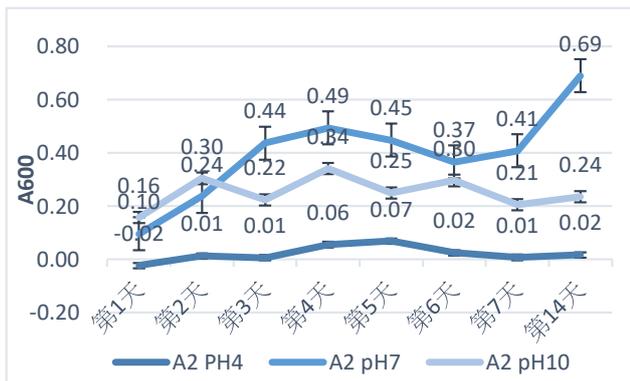


圖 18. 不同酸鹼度 A2 的柴油分解力

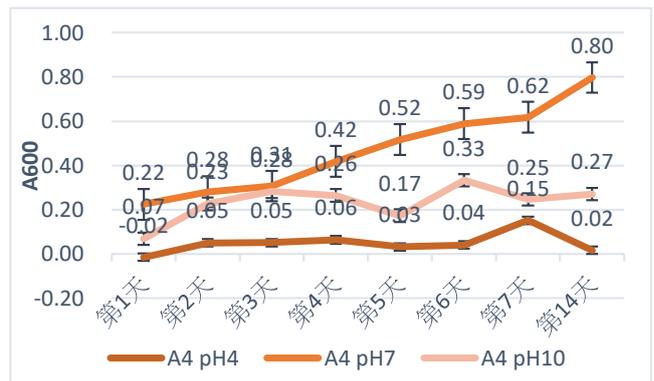


圖 19. 不同酸鹼度 A4 的柴油分解力



圖 20. 不同酸鹼度 B4 的柴油分解力

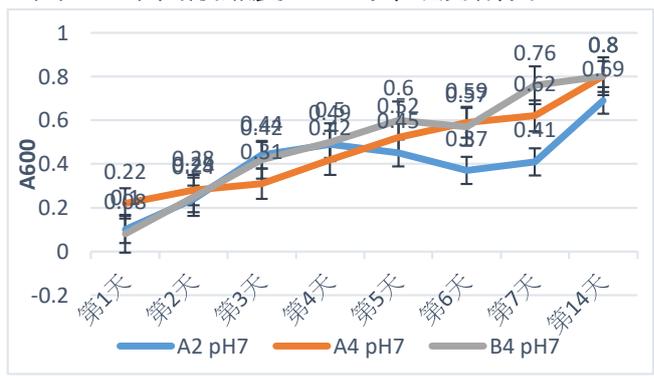


圖 21. 菌株在 pH 7 環境中柴油分解力比較

## 八、A2、A4、B4 菌株的耐鹽性試驗

(一)研究目的:油污常發生於海域或高鹽之環境中,所以若要以微生物來進行生物復育,菌株必須具有耐鹽性(林大成,2005)。一般的海水鹽度約在 3~4%,許多工業廢水鹽度亦大於 3.5%,因此我們將 A2、A4、B4 三種菌株放入含有 3%、4%及 5%NaCl 的柴油-BH 培養液中探討菌株的耐鹽性。

(二)研究方法:

- 1.取三個 500ml 燒杯,各加入 300ml BH 培養液(pH7), 5g NaCl (3%)、12g NaCl (4%)、15g NaCl (5%), 蓋上鋁箔紙,貼上滅菌膠帶,放入滅菌釜中滅菌,冷卻後備用。
- 2.在無菌操作台內,讓柴油通過 0.45 $\mu$ m 過濾膜除菌。
- 3.以分光光度計測量吸光值(A<sub>600</sub>),調整 A2、A4、B4 三菌液 A<sub>600</sub> 皆為 0.6。
- 4.在 50ml 無菌離心管中加入 20ml 不同鹽度的 BH 培養液,1000 $\mu$ l 柴油(5%),600 $\mu$ l 菌液(3%)。對照組不加柴油。每個條件各重複做二管,完成後放入恆溫震盪培養箱培養(30 $^{\circ}$ C, 120rpm)。
- 5.每天觀察油品是否出現乳化層,並以分光光度計測量吸光值(A<sub>600</sub>),測量時以 BH 培養液作為空白試劑。

(三)研究結果:

- 1.A2、A4、B4 菌在無柴油時亦可微量生長,其中 B4 菌一開始平均吸光值較高,之後逐日降低。
- 2.扣除對照組吸光值後,發現 A2、A4、B4 菌在 3%鹽度時仍具分解力,第 7 天時 B4(0.73) >A4(0.67)>A2(0.64),第 14 天時 B4(0.83)>A2(0.80) >A4(0.62)。
- 3.A4 菌在 4%鹽度時仍具分解力,吸光值可達 0.65(第 7 天、第 14 天),相較於 B4(第 7 天 0.22,第 14 天 0.25)和 A2(第 7 天 0.08,第 14 天 0.18)顯得較為耐鹽。
- 4.在 5%鹽度時 A2、A4、B4 菌分解能力均降低。(圖 22~28,表 8~10)
- 5.比較 3%NaCl 與不含鹽環境下的生長情形(上述實驗中的 pH7,不含 NaCl 條件),發現 B4 菌沒有明顯差異,A4 菌在 3%鹽度時生長情況下降,而 A2 菌反而上升,3 菌株在面對高鹽環境時表現機制不盡相同,原因待討論。

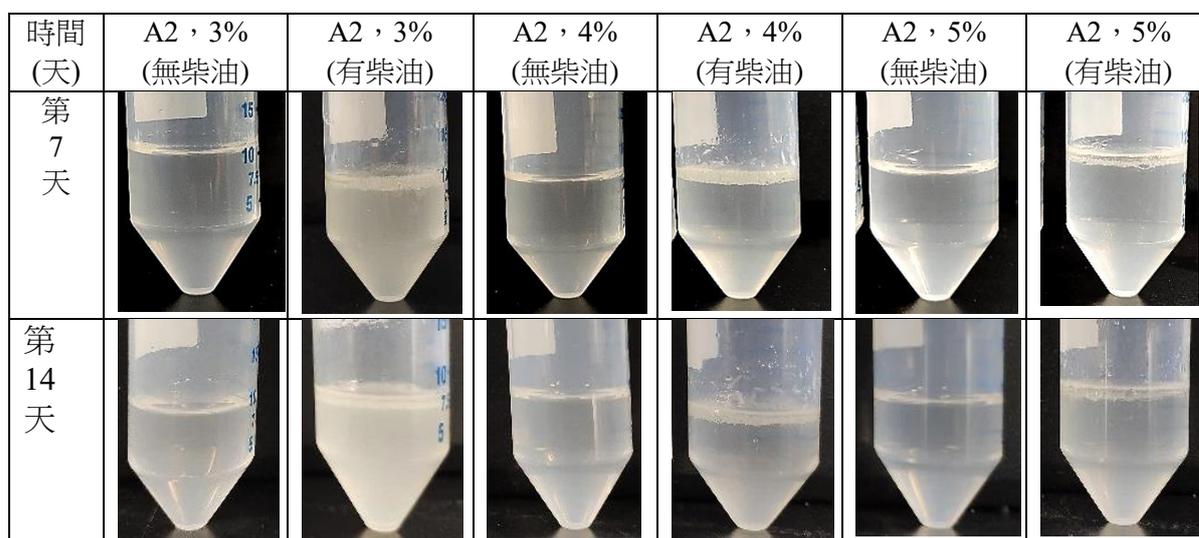


圖 22.A2 菌在不同鹽度的生長情形 (節錄，詳見實驗記錄本)

表 8 .A2 菌在不同鹽度的 A600(表格中為二次實驗的平均數值)

	A2, 3% (無柴油)	A2, 3% (有柴油)	A2, 3% (有-無)	A2, 4% (無柴油)	A2, 4% (有柴油)	A2, 4% (有-無)	A2, 5% (無柴油)	A2, 5% (有柴油)	A2, 5% (有-無)
第 1 天	0.16	0.20	0.04	0.12	0.09	-0.03	0.10	0.08	-0.02
第 2 天	0.12	0.24	0.12	0.08	0.09	0.01	0.05	0.08	0.02
第 3 天	0.10	0.22	0.12	0.05	0.25	0.20	0.03	0.10	0.07
第 4 天	0.12	0.40	0.28	0.07	0.19	0.13	0.05	0.12	0.07
第 5 天	0.10	0.47	0.37	0.06	0.21	0.15	0.06	0.11	0.04
第 6 天	0.06	0.69	0.62	0.05	0.13	0.08	0.07	0.05	-0.02
第 7 天	0.08	0.71	0.64	0.05	0.12	0.08	0.02	0.11	0.10
第 14 天	0.05	0.85	0.80	0.05	0.22	0.18	0.01	0.13	0.12

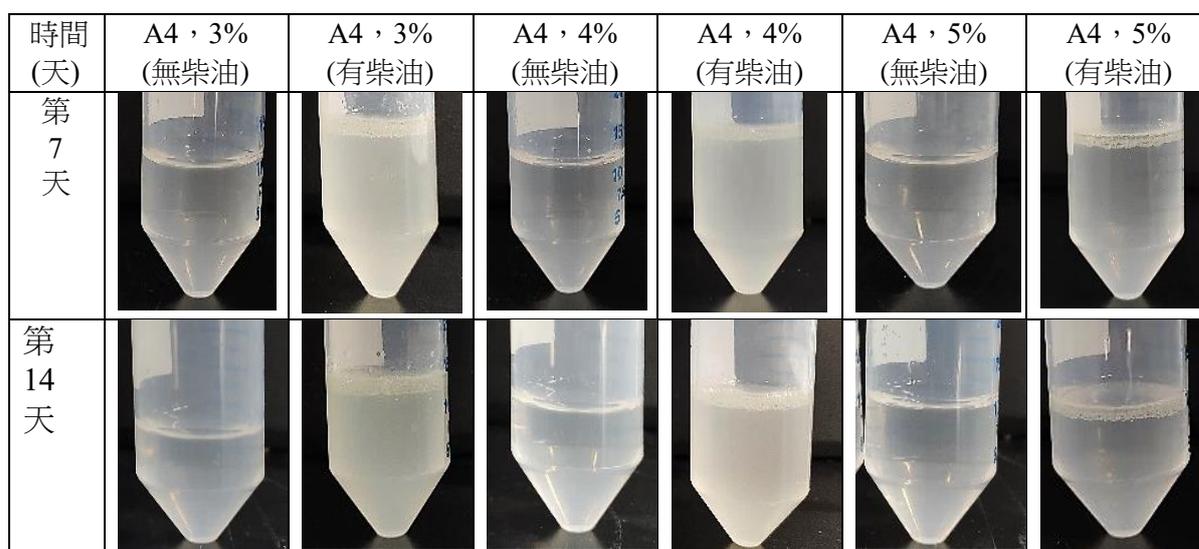


圖 23.A4 菌在不同鹽度的生長情形 (節錄，詳見實驗記錄本)

表 9.A4 菌在不同鹽度的 A600(表格中為二次實驗的平均數值)

	A4, 3% (無柴油)	A4, 3% (有柴油)	A4, 3% (有-無)	A4, 4% (無柴油)	A4, 4% (有柴油)	A4, 4% (有-無)	A4, 5% (無柴油)	A4, 5% (有柴油)	A4, 5% (有-無)
第 1 天	0.07	0.26	0.19	0.06	0.12	0.06	0.05	0.08	0.03
第 2 天	0.12	0.59	0.48	0.07	0.37	0.31	0.04	0.09	0.05
第 3 天	0.13	0.76	0.63	0.05	0.69	0.64	0.07	0.12	0.06
第 4 天	0.12	0.76	0.64	0.08	0.59	0.51	0.05	0.15	0.09
第 5 天	0.11	0.70	0.60	0.04	0.65	0.61	0.06	0.05	-0.01
第 6 天	0.08	0.74	0.66	0.05	0.74	0.69	0.02	0.13	0.11
第 7 天	0.07	0.74	0.67	0.05	0.70	0.65	0.05	0.10	0.05
第 14 天	0.05	0.66	0.62	0.02	0.67	0.65	0.02	0.10	0.08

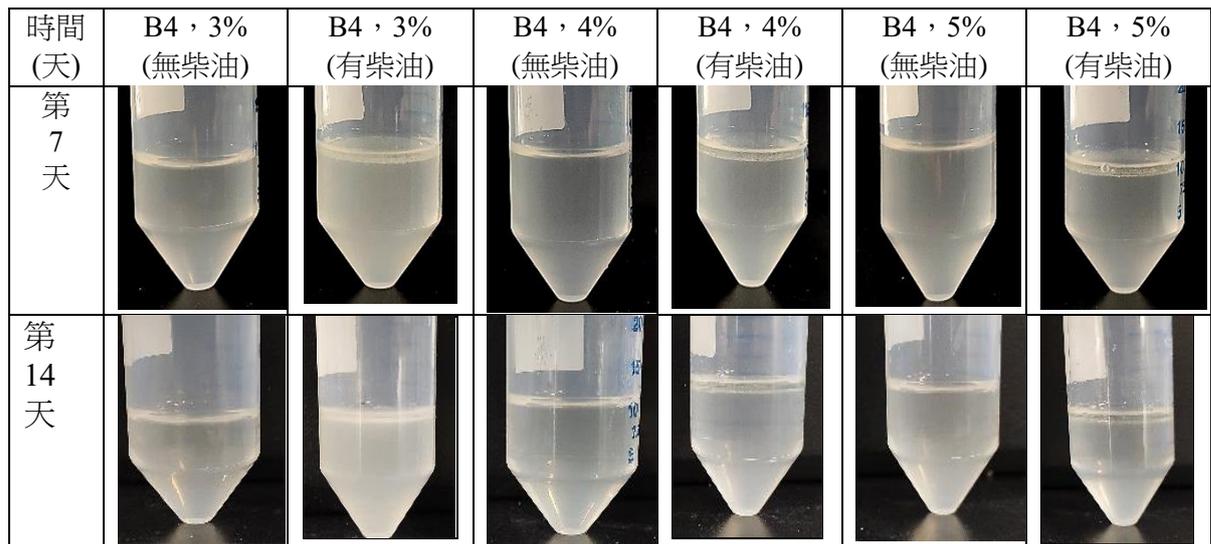


圖 24.B4 菌在不同鹽度的生長情形 (節錄，詳見實驗記錄本)

表 10.B4 菌在不同鹽度的 A600(表格中為二次實驗的平均數值)

	B4, 3% (無柴油)	B4, 3% (有柴油)	B4, 3% (有-無)	B4, 4% (無柴油)	B4, 4% (有柴油)	B4, 4% (有-無)	B4, 5% (無柴油)	B4, 5% (有柴油)	B4, 5% (有-無)
第 1 天	0.29	0.23	-0.07	0.25	0.22	-0.03	0.22	0.24	0.02
第 2 天	0.34	0.42	0.07	0.28	0.40	0.12	0.29	0.32	0.03
第 3 天	0.35	0.44	0.10	0.29	0.37	0.08	0.28	0.28	0.00
第 4 天	0.28	0.52	0.24	0.34	0.33	-0.01	0.33	0.29	-0.004
第 5 天	0.27	0.60	0.33	0.35	0.39	0.04	0.33	0.33	0.01
第 6 天	0.19	0.71	0.52	0.30	0.36	0.06	0.30	0.35	0.05
第 7 天	0.18	0.91	0.73	0.21	0.43	0.22	0.27	0.30	0.03
第 14 天	0.13	0.96	0.83	0.14	0.39	0.25	0.16	0.29	0.13

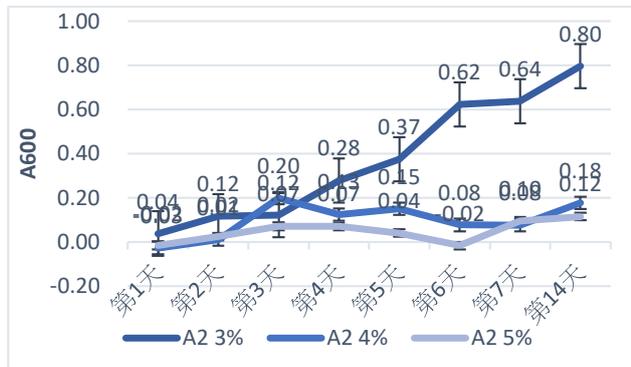


圖 25.不同鹽度 A2 的柴油分解力



圖 26.不同鹽度 A4 的柴油分解力

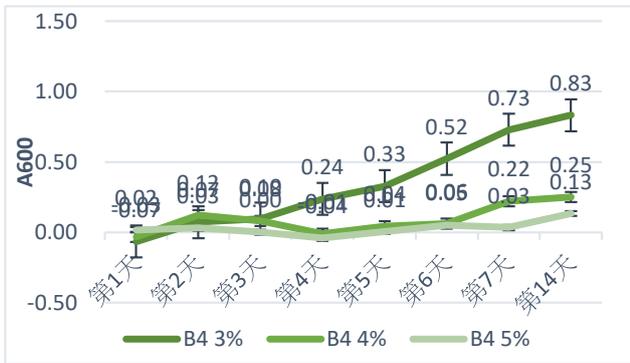


圖 27.不同鹽度 B4 的柴油分解力



圖 28.菌株在 3% NaCl 的柴油分解力比較

## 九、菌落觀察與稀釋塗菌

(一)研究目的:將下層菌液取出塗盤，確認菌種

(二)研究方法:

- 1.菌落觀察:挑選原始菌盤中的單一菌落畫在 LB 培養基上，30°C 恆溫培養 2 天，以手機照相放大功能 仔細觀察菌落外觀。
- 2.菌液取得:與前述方法(實驗七)相同，調整 BH 培養液 pH 值為 7.0，加入菌液、柴油等，分解 3 天後測量吸光值(A<sub>600</sub>)。
- 3.稀釋塗盤:以微量滴管吸取下層 1ml 菌液置於微量離心管中，再序列稀釋成濃度 10<sup>-1</sup>~10<sup>-6</sup>。利用微量滴管吸取 10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> 濃度樣本各 100 μl 至 LB 平面培養基上，以三角玻棒塗抹均勻，每個濃度各塗兩盤。30°C 恆溫培養 2 天，計算平均菌落數。

(三)研究結果:

- 1.A2 菌落為白色，略偏黃，圓形光滑，較厚。
- 2.A4 菌落為白色，較 A2 透明，圓形光滑，略扁平。
- 3.B4 菌落較雪白，邊緣較不規則，

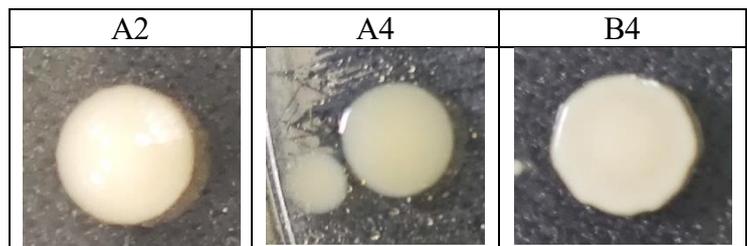


圖 29.菌落外觀(生長 2 天)

中央突起，似荷包蛋(圖 29)。

2.稀釋塗菌後菌落外觀與原菌落一致。

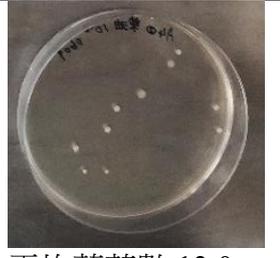
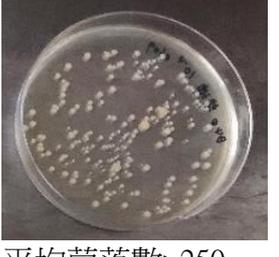
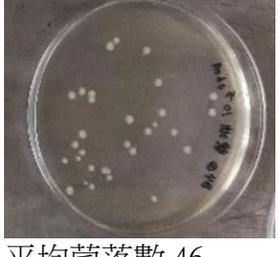
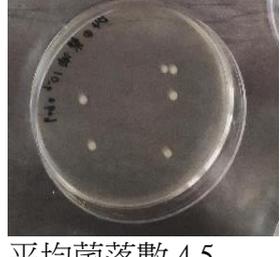
濃度 菌種	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
A2 ( $A_{600}=0.424$ )	 平均菌落數>250	 平均菌落數 39.5	 平均菌落數 10.0
A4 ( $A_{600}=0.463$ )	 平均菌落數>250	 平均菌落數 94.5	 平均菌落數 13.0
B4 ( $A_{600}=0.425$ )	 平均菌落數>250	 平均菌落數 46	 平均菌落數 4.5

圖 30.塗盤(節錄)

## 十、柴油分解量分析與乳化層觀察

(一)研究目的: 乳化層觀察與柴油量分解量分析

(二)研究方法:

1.乳化層取得:與前述方法相同，調整 BH 培養液 pH 值為 7.0，加入菌液、柴油等，分解 14 天後進行實驗(圖 31)。

2.乳化層觀察:吸取適量乳化層置於載玻片上，以複式顯微鏡觀察油脂，並以手機拍照。

3.實驗中加入了 1ml 柴油，因此我們以微量滴管吸取上層 1ml

液體進行觀察，在 1ml 液體中包含了油層、乳化層及水層，將液體放入 1.5ml 微量離心管中，靜置 5 分鐘後再以微量滴管分別吸取油層、乳化層及水層測量體積。

4.利用離心機高速離心 14000rpm，10 分鐘，再以微量滴管分別吸取油層、乳化層及水層

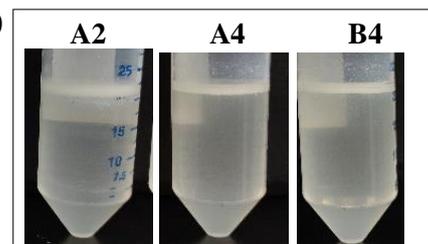


圖 31. 分解二週後的乳化層

測量體積。

(三)研究結果:

- 1.顯微鏡觀察結果如圖 32，圖中可見小油滴被包圍。
- 2.吸取上層 1ml 液體靜置 5 分鐘後觀察，發現 B4 乳化層最多(0.90ml)，A4 乳化層較少(0.55ml)，油層較多(0.25ml)，推測此三菌株分解柴油的程序可能不同(圖 33)。
- 3.以高速離心方式將乳化層中的油水分離，發現油層約占 0.45~0.52ml，柴油分解效率差不多，柴油分解量約為 48~55%，乳化層分布在中間，底層則可見細菌沉澱物(圖 33)。

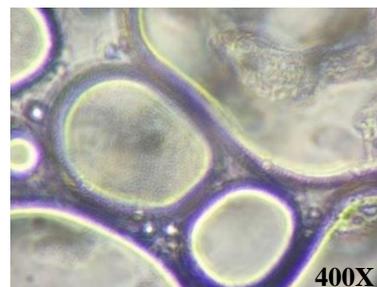


圖 32. 顯微鏡下的乳化層

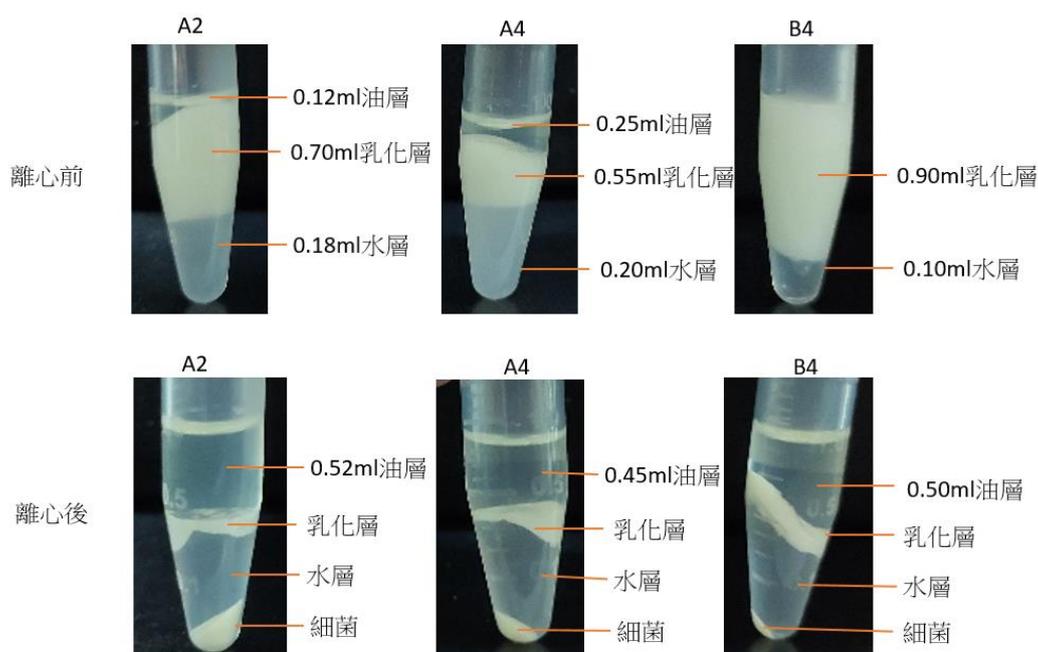


圖 33. 乳化層離心前後的比較

## 十一、柴油與乳化層對綠豆生長的影響

(一)研究目的:柴油對生物具有毒性，經常會影響生物生長造成傷害，我們第一部分先進行不同柴油量(0~0.5ml)對綠豆生長影響測試；第二部分再將經由 A2、A4、B4 菌處理過的柴油所形成的乳化層淋於剛長出胚根的綠豆上，觀察乳化層對綠豆生長的影響。

(二)研究方法:

1. 柴油量對綠豆生長影響:

- (1)將綠豆泡水一夜，使胚根長出約 0.1 公分，取六個培養皿，各加入 1 克棉花及 10 顆發芽的綠豆。

(2)實驗共分 6 組，第 1 組加入 8.5ml 無菌水，第 2 組加入 0.1ml 柴油和 8.4ml 無菌水，第 2 組加入 0.2ml 柴油和 8.3ml 無菌水，第 5 組加入 0.3ml 柴油和 8.2ml 無菌水，第 5 組加入 0.4ml 柴油和 8.1ml 無菌水，第 6 組加入 0.5ml 柴油和 8ml 無菌水。

(3)蓋上培養皿上蓋後室溫培養，每天加入 0.5ml 無菌水並觀察綠豆生長情形。

## 2.乳化層對綠豆生長影響:

(1)乳化層的取得:與前述方法相同，調整 BH 培養液 pH 值為 7.0，加入菌液、柴油等，待分解 14 天後吸取上層乳化層進行實驗(圖 34)。

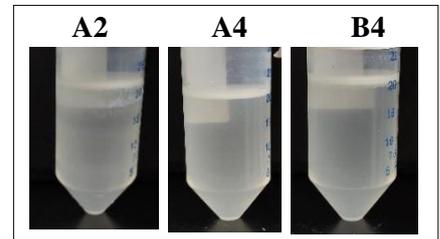


圖 34.分解二週後的乳化層

(2)將綠豆泡水一夜，使胚根長出約 0.1 公分，取六個培養皿，各加入 1 克棉花及 10 顆發芽的綠豆。

(3)實驗共分六組，第 1 組加入 8.5ml 無菌水，第 2 組加入 0.5ml 柴油和 8ml 無菌水，第 3 組加入 1.0ml 柴油和 7.5ml 無菌水，第 4 組加入 0.5ml A2 柴油乳化層和 8ml 無菌水，第 5 組加入 0.5ml A4 柴油乳化層和 8ml 無菌水，第 6 組加入 0.5ml B4 柴油乳化層和 8ml 無菌水。

(4)蓋上培養皿上蓋，以室溫培養，每天測量一次長度及並補充 0.5ml 無菌水。

## (三)研究結果:

1.無菌水組胚根較長且粗，略呈紫色，莖的發育與葉的發育良好，當柴油量愈高，綠豆生長情形愈差。0.5ml 及 1.0ml 柴油組則生長情形不佳，胚根較短且細，無支根發育，根呈黃白色，

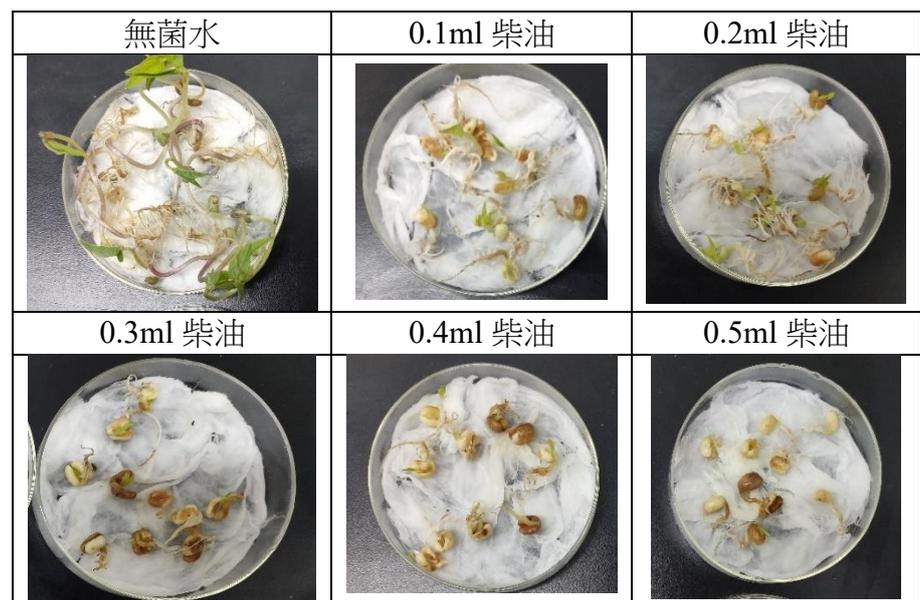


圖 35.柴油含量對綠豆生長的影響(節錄第 12 天狀況)

較為軟爛，沒有長出莖和葉，最後子葉潰爛，可見柴油對植物的傷害很大(圖 35、36)。

2.經 A2、A4、B4 菌液分解過的柴油可降低柴油對綠豆造成的傷害，乳化層組胚根較柴油組長，支根發展較好，死亡率也較低，但生長情形仍比不上無菌水組，對照第一部分實驗 (圖 35)，綠豆生長情形似乎與 0.2~0.3ml 柴油傷害相似(圖 35~37，表 11)。

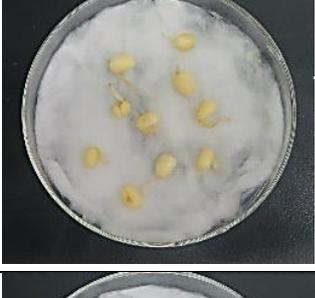
	第 4 天	第 8 天	第 12 天
第 1 組 (無菌水)			
第 2 組 (0.5ml 柴油)			
第 3 組 (1.0ml 柴油)			
第 4 組 (A2 乳化層)			
第 5 組 (A4 乳化層)			
第 6 組 (B4 乳化層)			

圖 36.乳化層對綠豆生長的影響(節錄 4、8、12 天生長狀況)

表 11. 乳化層對綠豆胚根生長長度的影響(10 顆綠豆的平均數值。單位:公分)

時間(天)	第 1 組 (無菌水)	第 2 組 (0.5ml 柴油)	第 3 組 (1.0ml 柴油)	第 4 組 (A2 乳化層)	第 5 組 (A4 乳化層)	第 6 組 (B4 乳化層)
1	1.03	0.53	0.49	0.48	0.51	0.52
2	1.54	0.73	0.65	0.67	0.84	0.76
3	2.41	0.9	0.90	0.92	1.20	1.05
4	3.15	0.97	0.93	1.19	1.37	1.26
5	3.84	1.20	1.18	1.40	1.62	1.51
6	3.89	1.35	1.41	1.70	1.80	1.87
7	4.11	1.29	1.53	1.94	1.71	2.16
8	4.82	1.46	1.45	1.83	1.82	2.20
9	5.43	1.73	1.60	2.15	1.83	2.64
10	6.55	1.27	1.80	2.00	1.95	2.40
11	8.10	1.82	1.80	2.06	1.96	2.29
12	8.86	2.16	1.80	2.63	2.65	2.77

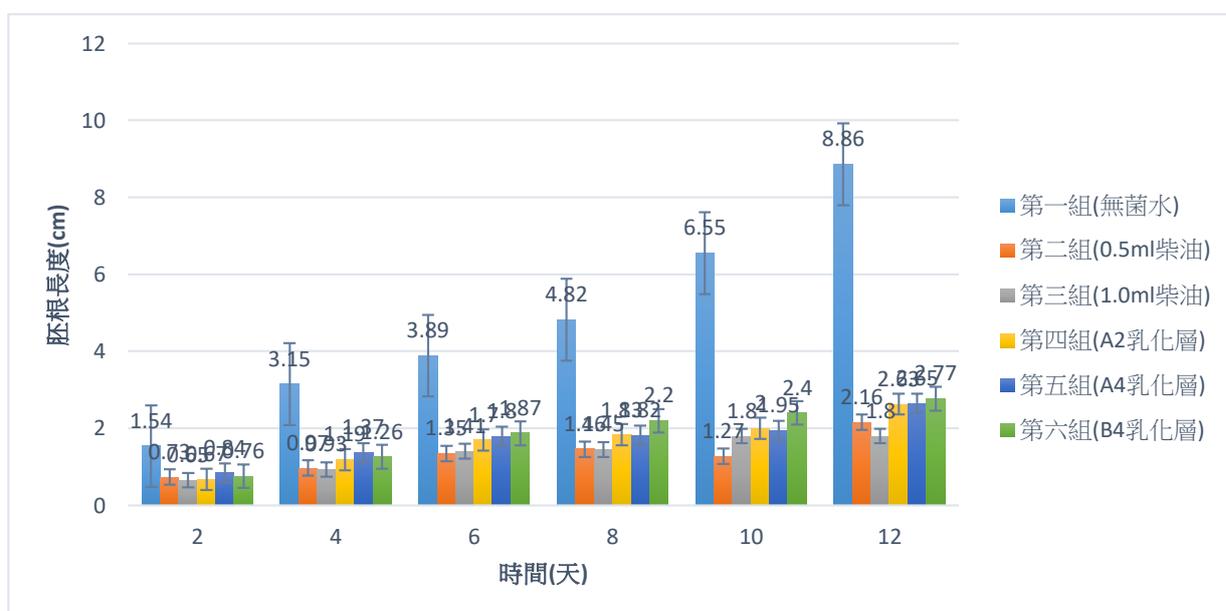


圖 37. 乳化層對綠豆胚根生長的影響

## 十二、革蘭氏染色與顯微鏡觀察

(一)研究目的:利用革蘭氏染色法觀察 A2、A4、B4 菌並分辨其特徵。

(二)研究方法:

- 1.以接種環沾取培養 2 天的菌落，均勻塗抹在載玻片上，靜置桌上風乾。將載玻片上塗有細菌的一面向上，在酒精燈的火焰上輕輕通過 3~4 次，將細菌固定載玻片上。
- 2.滴入結晶紫染液，染色 1 分鐘後，將載玻片傾斜 45 度，以清水清除多餘的染料後，再用吸水紙吸乾水分。
- 3.滴入革蘭氏碘液，染色 1 分鐘後，以清水小心沖洗多餘染料後，再用吸水紙吸乾水分。

4.將載玻片傾斜 45 度，以 95%酒精滴洗，直到沒有染料滲出為止，再以清水沖洗。

5.吸乾水分後，滴入番紅花染液，染色 1 分鐘。以清水小心沖洗以清除多餘染料，吸乾水分。以顯微鏡觀察並以電子目鏡拍照紀錄，利用 DinoCapture 2.0 軟體測量長度。

(三)研究結果:

1.A2 偏粉紅色，應為 G(-)，呈球形，寬約 0.785 $\mu\text{m}$ 。

2.A4 與 A2 相似，但顏色較偏紅，亦為 G(-)，球形，約 0.937 $\mu\text{m}$ 。

3.B4 顏色偏紫，G(+)，呈長桿狀，寬約 1.727 $\mu\text{m}$ 。(圖 38)。

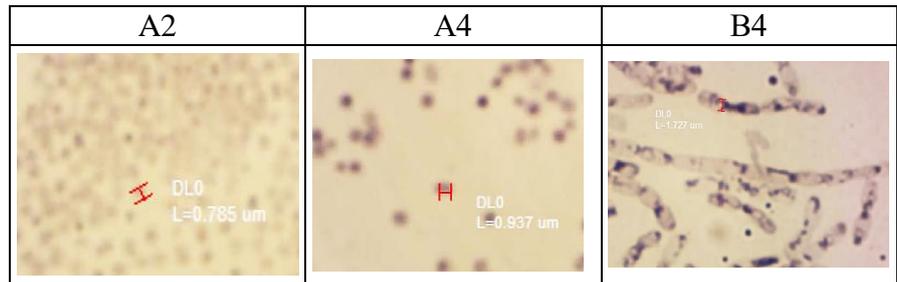


圖 38. A2、A4、B4 菌觀察(1000X)

### 十三、微生物生長曲線測量

(一)研究目的:以 LB 培養液觀察 A2、A4、B4 生長情形，並畫出生長曲線。

(二)研究方法:

1.以接種環挑選 A2、A4、B4 菌盤的單一菌落接種至 20ml LB 培養液中，以 30 $^{\circ}\text{C}$ ，120 rpm 恆溫培養 16~24 小時。

2.以分光光度計測量吸光值( $A_{600}$ )，調整 A2、A4、B4 三菌液濃度皆為 0.1。

3.取 9 個血清瓶，每個加入 50ml LB，以微量滴管各加入 0.5ml 菌液(1%)，以 30 $^{\circ}\text{C}$ ，120rpm 恆溫震盪培養。

4.每小時取出各菌液 1.5ml，以 LB 為空白試劑測量吸光值( $A_{600}$ )。

(三)研究結果:菌株約在 8 小時後生長趨緩，A2 與 A4 曲線相似(圖 39，表 12)。

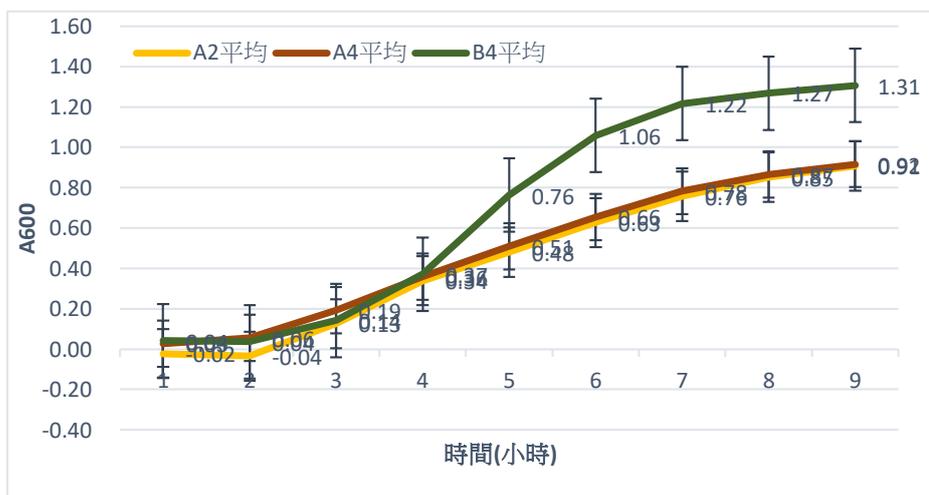


圖 39. A2、A4、B4 菌生長曲線

表 12. A2、A4、B4 生長曲線測量(A600)

時間 (小時)	A2				A4				B4			
	第 1 管	第 2 管	第 3 管	平均	第 1 管	第 2 管	第 3 管	平均	第 1 管	第 2 管	第 3 管	平均
1	0.024	-0.038	-0.053	-0.02	0.011	0.042	0.029	0.03	0.038	0.031	0.056	0.04
2	-0.033	-0.036	-0.036	-0.04	0.057	0.062	0.048	0.06	0.031	0.035	0.042	0.04
3	0.13	0.126	0.122	0.13	0.192	0.202	0.185	0.19	0.108	0.158	0.16	0.14
4	0.363	0.347	0.306	0.34	0.357	0.366	0.351	0.36	0.341	0.328	0.444	0.37
5	0.512	0.493	0.436	0.48	0.513	0.515	0.5	0.51	0.668	0.671	0.951	0.76
6	0.677	0.638	0.566	0.63	0.659	0.653	0.653	0.66	0.962	1.278	0.936	1.06
7	0.813	0.775	0.684	0.76	0.788	0.775	0.784	0.78	1.165	1.091	1.395	1.22
8	0.918	0.876	0.761	0.85	0.876	0.856	0.867	0.87	1.219	1.111	1.476	1.27
9	0.973	0.936	0.813	0.91	0.927	0.899	0.924	0.92	1.238	1.166	1.514	1.31

#### 十四、菌種鑑定

(一)研究目的: 進行菌種鑑定，確認 A2、A4、B4 菌株的種類。

(二)研究方法:

- 1.將純化後的 A2、A4、B4 菌盤寄送至生技公司，利用 16s rRNA 及 18s rRNA 上特定片段進行 DNA 萃取、PCR 及定序，最後將定序結果送至 NCBI 網站上比對可能菌種。

(三)研究結果:

- 1.菌種鑑定後資料顯示，A2、A4 為變形菌門(*Proteobacteria*)不動桿菌屬(*Acinetobacter*) 細菌，B4 為厚壁菌門(*Firmicutes*)芽孢桿菌屬(*Bacillus*) 的細菌(圖 40、表 13~15)。
- 2.在請教過慈濟大學陳俊堯教授後，教授表示 A2 同時與 *Acinetobacter oleivorans DR1* 及 *Acinetobacter pittii F11-01* 相似度都很高，A4 則與 *Acinetobacter calcoaceticus NBRC13006* 及 *Acinetobacter vivianii strain NIPH2168* 相似度高，B4 雖然可能是 *Bacillus megaterium*，但是因為鑑定結果並非標準菌株或菌種中心鑑定過的菌株，因此還需要再看相似度低一點的序列才能做結論。

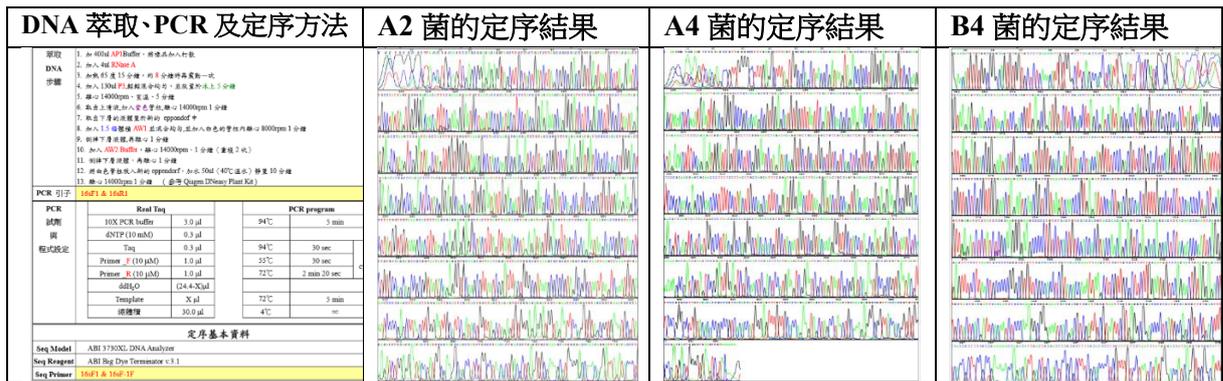


圖 40 菌種鑑定

表 13.A2 菌的 NCBI 比對結果

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Acinetobacter sp. strain K-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2652	2652	100%	0.0	100.00%	<a href="#">KY907005.1</a>
Acinetobacter sp. JN8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2652	2652	100%	0.0	100.00%	<a href="#">JN605359.1</a>
Uncultured Acinetobacter sp. clone B24h90 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2652	2652	100%	0.0	100.00%	<a href="#">KF680977.1</a>
Uncultured Acinetobacter sp. clone B24h63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2652	2652	100%	0.0	100.00%	<a href="#">KF680976.1</a>
Uncultured Acinetobacter sp. clone B24h28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2652	2652	100%	0.0	100.00%	<a href="#">KF680975.1</a>
Acinetobacter oleivorans strain DR1 16S ribosomal RNA, partial sequence	2652	2652	100%	0.0	100.00%	<a href="#">NR_102814.1</a>
Acinetobacter oleivorans DR1, complete genome	2652	15869	100%	0.0	100.00%	<a href="#">CP002080.1</a>
Acinetobacter sp. 2EBS15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2652	2652	100%	0.0	100.00%	<a href="#">FJ984619.1</a>
Acinetobacter sp. 2EBS13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2652	2652	100%	0.0	100.00%	<a href="#">FJ984618.1</a>
Acinetobacter pittii strain FI1-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2647	2647	100%	0.0	99.93%	<a href="#">MK396586.1</a>

表 14.A4 菌的 NCBI 比對結果

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Bacterium strain PAH12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2632	2632	100%	0.0	99.72%	<a href="#">MF278995.1</a>
Acinetobacter calcoaceticus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 13006	2614	2614	99%	0.0	99.58%	<a href="#">AB680365.1</a>
Uncultured bacterium clone S3C11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2604	2604	100%	0.0	99.38%	<a href="#">JQ074220.1</a>
Acinetobacter calcoaceticus strain HIW3200905 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2603	2603	99%	0.0	99.37%	<a href="#">MG011543.1</a>
Acinetobacter sp. AP-24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2595	2595	99%	0.0	99.51%	<a href="#">KJ584607.1</a>
Uncultured bacterium clone BMT-gut-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2586	2586	99%	0.0	99.30%	<a href="#">KF598767.1</a>
Acinetobacter sp. RD_MAAMIA_24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2582	2582	100%	0.0	99.10%	<a href="#">KU597524.1</a>
Acinetobacter vivianii strain NIPH 2168 16S ribosomal RNA, partial sequence	2582	2582	100%	0.0	99.10%	<a href="#">NR_148847.1</a>
Acinetobacter sp. SS-192 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	2571	2571	100%	0.0	98.96%	<a href="#">AB602910.1</a>
Acinetobacter courvalinii strain ANC 3623 16S ribosomal RNA, partial sequence	2566	2566	100%	0.0	98.89%	<a href="#">NR_148843.1</a>

表 15.B4 菌的 NCBI 比對結果

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Bacillus megaterium strain CD12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2542	2542	100%	0.0	99.93%	<a href="#">MK618596.1</a>
Bacillus megaterium strain snnu 14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2542	2542	100%	0.0	99.93%	<a href="#">MK087747.1</a>
Bacillus megaterium strain 0329 Y-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2542	2542	100%	0.0	99.93%	<a href="#">MH472619.1</a>
Bacillus megaterium strain HTI 18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2542	2542	100%	0.0	99.93%	<a href="#">MK521072.1</a>
Bacillus megaterium strain HTI 16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2542	2542	100%	0.0	99.93%	<a href="#">MK521052.1</a>
Bacillus sp. (in: Bacteria) strain a113161 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2542	2542	100%	0.0	99.93%	<a href="#">MK280702.1</a>
Bacillus sp. (in: Bacteria) strain NPJ1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2542	2542	100%	0.0	99.93%	<a href="#">MH884054.1</a>
Bacillus sp. (in: Bacteria) strain QS16-25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2542	2542	100%	0.0	99.93%	<a href="#">MH769452.1</a>
Bacillus sp. (in: Bacteria) strain XA15-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2542	2542	100%	0.0	99.93%	<a href="#">MH769038.1</a>
Bacterium strain UBDBM05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2542	2542	100%	0.0	99.93%	<a href="#">MK101081.1</a>

## 伍、討論

### 一、微生物分離培養

微生物的養分需求差異性很大，培養不同微生物也需利用不同分離方式。而本研究利用一般常見的 LB 培養基自烏柏樹下的土壤分離純化出 7 個菌株，分別命名為 A1~A7，自高砂鉅鍬形蟲三齡幼蟲腸道分離純化出 6 個菌株，分別命名為 B1~B6。

### 二、烏柏養分利用分析

將分離出來的菌株塗佈在烏柏莖萃取物的培養基中發現，有 2 個菌株可利用烏柏莖的養分生長，分別為分離自土壤的 A2 菌及分離自幼蟲腸道的 B6，我們嘗試利用甲基纖維素培養基與剛果紅檢驗菌株的纖維素分解能力，目前尚未發現有分解的跡象，是否利用莖內其他養分生長則尚待研究(圖 41)。

在烏柏種子萃取物培養基中則有 11 株菌可生長，分別為分離自土壤的 A1~A7 與分離自幼蟲腸道的 B1、B4~B6。烏柏種子富含蛋白質、醣類、

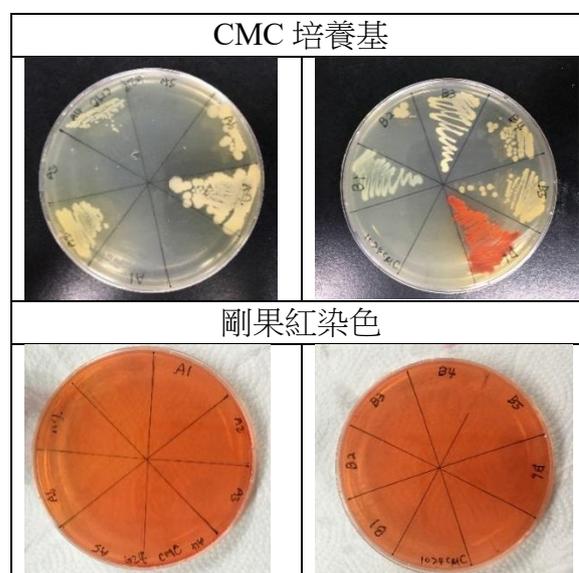


圖 41.纖維素分解測試

脂質、維生素...等養分，因此推論烏柏種子的養份有助於土壤微生物及幼蟲腸道微生物生長，也許這是烏柏樹能吸引生物聚集的原因之一。

我們曾經將被菌液分解過的柴油乳化層與下層菌液震盪混合後進行綠豆生長實驗，發現綠豆生長情形明顯比柴油組好，而且 A4 與 B4 組的生長情形更超過無菌水組(圖 42)，推測這些柴油被分解後形成的養分可以促進植物生長，暗示了微生物與植物也許有互利共生的關係存在。由於烏柏種子發芽不易，除了富含蠟質的白色假種皮外，還有堅硬的黑色種皮，種子發芽率不高，時間也較長，經過幾次嘗試後未能取得足夠的發芽烏柏種子進行實驗，尚待未來繼續研究，以釐清確認我們分離出來的微生物是否有利於烏柏樹的生長。

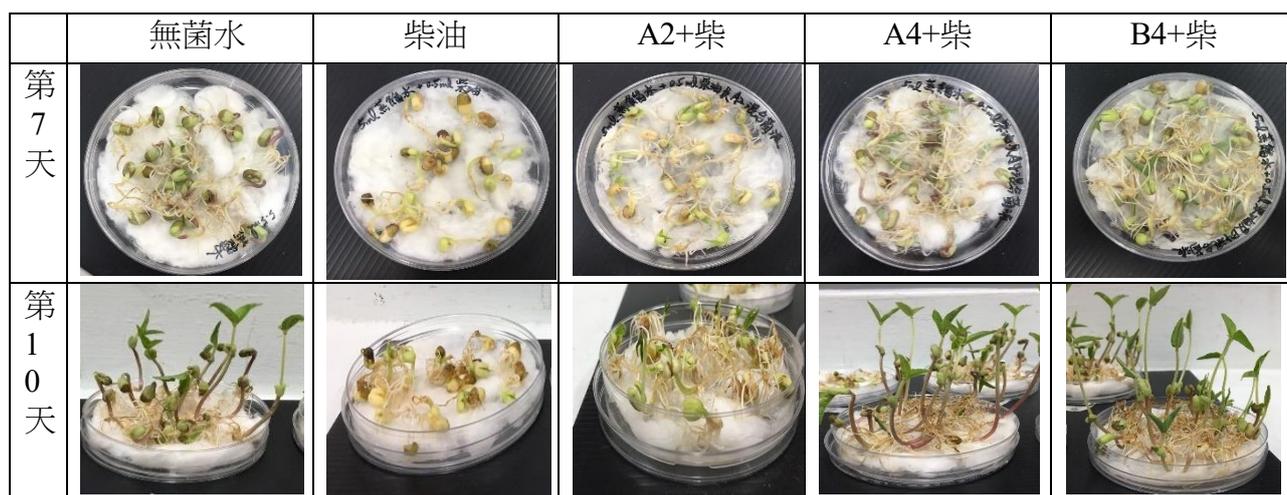


圖 42.乳化層混合菌液的綠豆生長測試(節錄，詳見實驗記錄本)

### 三、柴油分解力分析

一般微生物不易在不含養分的 BH 鹽類培養基中生長，本研究透過以柴油為唯一碳源的 BH 鹽類培養基，篩選具備分解柴油能力的微生物。柴油的主要成分為烷烴、烯烴及芳香烴，烴為含碳有機物，微生物會先在表面吸附柴油污染物，透過逐步氧化，生成醇、醛和脂肪酸，脂肪酸經氧化作用形成乙醯輔酶 A，乙醯輔酶 A 再進行檸檬酸循環(TCA cycle)及電子傳遞鏈產生能量、二氧化碳和水(圖 43)，因此具備柴油分解力的微生物可藉此機制利用柴油養分生長。

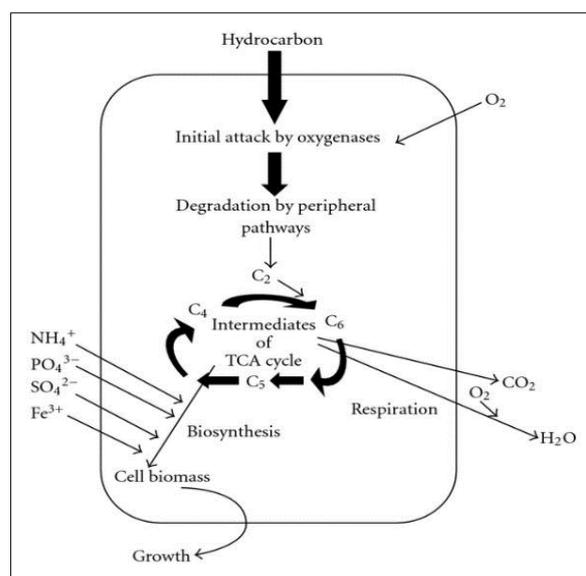


圖 43.微生物代謝烴之途徑(倪佩君，2001)

本研究共篩選出 3 株柴油分解能力較好的微生物，分別為來自烏柏樹下土壤的 A2、A4 及來自高砂鉅鍬形蟲三齡幼蟲腸道的 B4(表 13)，此三菌株在不含柴油時仍能微量生長，含有柴油時則能加快生長，並使培養液中的柴油層呈現白色乳化現象，因此得知在烏柏樹下的土壤及高砂鉅鍬形蟲幼蟲體內都存在可分解柴油的微生物。

以高速離心方式將乳化層中的油與水分離，初步推估 14 天的柴油分解率可達 48~55%。將分解 14 天的柴油乳化層取出進行綠豆生長的實驗，與無菌水組比較下柴油組對綠豆生長較為不利，不僅胚根較短，支根也不明顯，種子容易潰爛死亡，而經過 A2、A4、B4 菌株處理過的柴油，則可降低對綠豆生長造成產生的傷害。

在耐酸鹼性測試中顯示，A2、A4、B4 在中性環境分解柴油的效果最好，pH10 尚具分解能力，但 3 菌株皆較不耐酸性。在耐鹽度測試中，3 菌株則皆能在 3% NaCl 中生長，A4 在 4%NaCl 中仍能維持生長，因此推測 3 菌株能運用於土壤，亦能用於對抗海洋油汙汙染(表 13)。

此外，我們將 3 菌株進行了紙錠擴散法，研究是否彼此是否會互相抑制，結果並沒有出現抑菌圈(圖 44)，然而混合菌液的  $A_{600}$  也並不會因為混合而提升(圖 45)，代表此三菌株可以混合使用，但效果不會因此加強。

在 50 屆科展作品「新油切戰士-柴油與機油分解之進一步探討」(劉兆川，2010) 中針對一支戈登氏菌屬(*Gordonia*)細菌進行過研究，以培養 48 小時的菌液(3%)在柴油量 3%狀態下進行觀察，二週後菌液吸光值為 0.38，添加農業廢棄資材(蛋殼、稻穀、花生殼) 後則可提高分解效果，實驗中以塗盤方式檢測在不同鹽鹼條件下細菌耐受性，無吸光值可供比較，然而

表 13.三株柴油分解菌的比較

	A2	A4	B4
來源	土壤	土壤	腸道
菌種	不動桿菌	不動桿菌	芽孢桿菌
烏柏莖培養基	少	無	無
烏柏種子培養基	可	可	可
BH 平面	少	無	少
柴油 BH 平面	可	可	可
柴油 BH 液體(pH4)	0.02	0.02	0.01
柴油 BH 液體(pH7)	0.69	0.80	0.80
柴油 BH 液體(pH10)	0.24	0.27	0.28
柴油 BH 液體(3% NaCl)	0.80	0.62	0.83
柴油 BH 液體(4% NaCl)	0.18	0.65	0.25
柴油 BH 液體(5% NaCl)	0.12	0.08	0.13
1ml 柴油殘餘量	0.52ml	0.45ml	0.50ml
綠豆胚根生長	2.63cm	2.65cm	2.77cm
LB 生長 9 小時 $A_{600}$	0.91	0.92	1.31

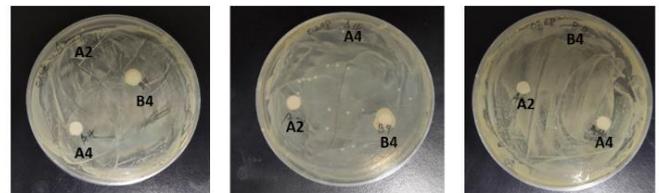


圖 44.抑菌測試

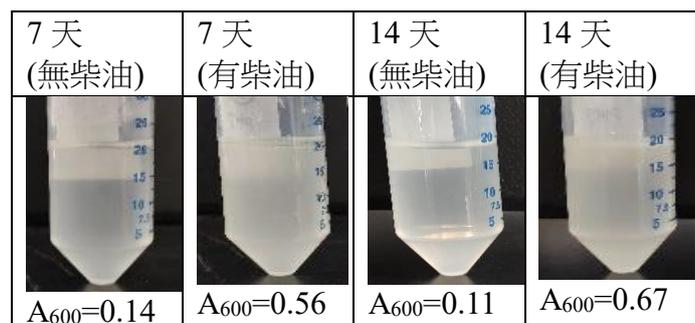


圖 45.混合菌液生長測試(二次實驗平均)

從實驗結果照片看來，我們的菌液較混濁，白色乳化層也較明顯，在不需提供固化材料下吸光值已達 0.80，雖然尚待詳細驗證，但我們大膽推測本研究的菌株分解柴油的速度可能比戈登菌更快速。

#### 四、菌種鑑定與分析

在目前的研究中，常見的柴油降解微生物主要有細菌、放射菌、黴菌、酵母和藻類等，共 70 餘屬 200 多種，通常細菌的降解能力較強，每一種細菌的特性不同，能降解的物質與環境也不同，有些柴油降解菌能在 0°C 左右繁殖，有些則能在高於 50°C 左右生長，耐鹽鹼能力更是修復環境的關鍵，目前發現芽孢桿菌屬、不動桿菌、葡萄球菌屬、蒼白桿菌屬、迪次菌屬、棒狀桿菌屬均可在高鹽鹼環境下降解柴油。此外藉由固化材料，將細菌吸附在海藻酸鈣殼聚糖多孔複合物、棉花纖維上亦能增加降解效果(劉玉華，2016)。

菌種鑑定結果顯示，我們分離出的菌株中有 2 株為變形菌門不動桿菌屬的細菌(來自土壤的 A2、A4)，1 株為厚壁菌門芽孢桿菌屬的細菌(來自幼蟲腸道的 B4)。查詢資料後發現 A2 有可能為 *Acinetobacter oleivorans* DR1，這是一株由韓國大學農業站自稻田土壤裡分離出來的菌株，能利用脂芳烴和柴油生長，研究指出在培養基中添加氯化鈉，菌株會產生胞外多醣 (Exopoly Saccharides, EPS)，胞外多醣是一種細菌在生長代謝過程中分泌到細胞壁外的醣類化合物，可協助微生物適應環境，使菌株對柴油毒性產生保護作用(NCBI，2010)。雖然菌種還需要再進一步利用其他基因片段定序確認，但是在我們的研究中顯示，A4、B4 在許多條件下分解柴油的能力較 A2 菌佳，例如:A4 及 B4 菌在中性環境分解力較 A2 菌好，柴油殘餘量較低，綠豆生長情形較好；A4 菌在 4% NaCl 中分解力較佳；B4 菌生長較快速等(表 13)，因此推論本研究分離出來的菌株極具發展潛力，值得再深入研究探討。

### 陸、未來研究建議

- 一、持續研究分離出來的微生物對於生物生長的影響，探討生物間的關係。
- 二、確認細菌種類，研究降解柴油途徑，探討如何縮短柴油分解時間，進一步評估在環境中使用的可能性。
- 三、利用其他油品作研究，評估分解其他油品的能力及應用範圍。

### 柒、結論

- 一、烏柏種子養分可提供高砂鉅鍬形蟲幼蟲腸道微生物及土壤微生物生長，對於這些生物喜

歡在烏桕樹下生活提供了一個可能的解釋。

二、本研究成功分離出 3 株可分解柴油的微生物，其中 2 株為不動桿菌，1 株為芽孢桿菌。菌種皆分離自台灣花蓮的本土，極具應用潛力。

三、3 菌株 14 天的柴油分解率粗估可達 48~55%，且經過菌株分解後的柴油可降低柴油對綠豆生長傷害。

四、在耐受性實驗中顯示，菌株在 3~4% NaCl，pH10 尚能分解柴油，形成乳化層，推估可應用於土壤或海洋油污污染。

## 捌、參考資料

羅東自然教育中心 (2011 年 1 月 18 日)。烏桕紅了。取自 [http://luodong-nec.blogspot.com/2011/01/blog-post\\_18.html](http://luodong-nec.blogspot.com/2011/01/blog-post_18.html)。

中時電子報(2017 年 3 月 13 日)。取自 <https://www.chinatimes.com/newspapers/20170313000305-260114?chdtv>

沈玉真(2016)。國產烏桕種子由組成及其皮油作為原料調配化妝品之研究。宜蘭大學農業森林暨自然資源研究所碩士論文。

台灣中油股份有限公司(2019 年 12 月 20 日)。安全資料表。<https://web.cpc.com.tw/division/mb>

劉兆川等(2010)。第五十屆中小學科學展覽作品「新油切戰士-柴油與機油分解之進一步探討」。

林大成(2005)。柴油分解菌之生物降解與浮起特性。中興大學環境工程研究所博士論文。

劉玉華等(2016)。不動桿菌屬(*Acinetobacter*)細菌降解石油烴的研究進展。微生物學通報。

倪佩君(2001)。柴油污染土壤之代謝研究。崑山科技大學環境工程系學生專題報告。

National Center for Biotechnology information(2010)。Complete Genome Sequence of the Diesel-Degrading *Acinetobacter* sp. Strain DR1。取自 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2937415/>

# 玖、附錄(實驗進行情形)

使用電子天平	分裝 BH 培養液	配置 LB 培養基	使用滅菌釜
標示培養基	劃菌	序列稀釋	塗菌
過濾柴油	種菌	使用分光光度計	清洗比色管
吸取乳化層	測量綠豆胚根	解剖顯微鏡觀察	複式顯微鏡觀察

## 實驗記錄

2019.9.14

一、日期: 9/14

二、目的: 製作 LB 平面培養基

三、方法:

1. 取 500ml 燒杯, 加入少許過濾水, 加入 2.5g LB, 1.5g agar, 補水至 100ml, 攪拌均勻。
2. 蓋上鋁箔紙, 貼上滅菌膠帶, 放入滅菌釜中滅菌。
3. LB 略為冷卻後, 倒入無菌培養皿中, 每個約 15ml。
4. 凝固後放入冰箱, 倒置保存備用。

四、結果討論:

24小時後 LB 平面培養基與 LB 培養液混濁, 說明有污染。

五、心得:

這是我第一次製作 LB 培養基, 有很多事情是學習的, 希望將來能從這些實驗中獲得有關細菌的一切, 我會再努力向心力來完成這個實驗。

補充:

1. LB 含有 4 種不同的培養基, 這些細菌性?

是生物實驗中最常用的培養基, 它含有胰蛋白胨、酵母萃取粉、氯化鈉、維生素等營養成分, 可幫助大腸桿菌、金黃色葡萄球菌等細菌。

補充: 1. 為何使用 0.05µm filter 可除菌? 若菌體大小不一, 是否有效?

Ans: 細菌細胞大小約為 1.5 - 5.0µm, 所以使用 0.45µm filter 可除菌。

2. 可與大腸桿菌進行「高倍可溶性有機物清除液」?

Ans: 大腸桿菌是革蘭氏陰性菌, 具有外層細胞壁, 且含有大量脂質和蛋白質, 因此清除液應含有表面活性劑, 如 SDS, 以破壞細胞壁, 使菌體破裂。此外, 還應加入蛋白酶, 以分解菌體中的蛋白質, 使其更易於清除。最後, 加入酒精, 以殺滅殘留的細菌, 並防止其再次生長。

3. 測量綠豆胚根:

4. 顯微鏡觀察:

實驗數據表:

管號	OD <sub>600</sub>	OD <sub>600</sub> / 管號
D1	0.05	0.05
D2	0.025	0.025
D3	0.0125	0.0125
D4	0.00625	0.00625
D5	0.003125	0.003125
D6	0.0015625	0.0015625
D7	0.00078125	0.00078125
D8	0.000390625	0.000390625
D9	0.0001953125	0.0001953125
D10	0.00009765625	0.00009765625

光密度與菌濃度的關係:

光密度與菌濃度的關係:

## 【評語】 030324

本研究原意是探討烏柏樹下土壤及高砂鉅鍬形蟲的幼蟲體內微生物之間的交互作用，但是學生將分離的微生物用來測量是否能夠分解柴油，結果意外的找到三株具有柴油分解能力的菌株，並且這些微生物在有柴油的情況下能夠快速生長。本研究構思結合生活中的觀察與對環境保護的應用，研究成果未來具有高度應用潛力。

優點：雖然在研究數據中高砂鉅鍬形蟲與烏柏樹互利共生的證據並不強，但是學生成功在土壤中分離了幾株具有柴油分離能力的菌株，並且利用簡單但是相對有效的方式測量菌株對於柴油的分解能力及生長情形，最後也將菌株送至生技公司進行菌種的鑑定，整體實驗設計完整，實驗記錄也很清楚，是一個好的發現。

建議：

1. 研究內容有實用性；屬初期結果，能否支持結論有待進一步確認。
2. 有效菌種可考慮申請專利，保護智慧財產權
3. 柴油分解的效率除了離心觀察及綠豆發芽試驗之外，建議尋找其他可以精準定量的化學分析方法。
4. 如果可以進一步比對已發表的柴油分解菌種之間的分解能力優劣，才知道自己分離出來的菌種跟已知菌種比起來哪一個比較有效率。

## 摘要

本研究自烏桕樹下的土壤及高砂鉅鍬形蟲體內分離出13種微生物，其中2種可利用烏桕樹莖的養分生長，11種可利用種子的養分生長，推測微生物與鍬形蟲、烏桕樹存在密切關係。進一步研究發現，有3種微生物可分解柴油，其中2株為不動桿菌屬細菌(*Acinetobacter sp.*)，1株為芽孢桿菌屬細菌(*Bacillus sp.*)，14天的柴油分解率粗估可達48~55%；將經由菌株處理過的柴油乳化層撒在綠豆上觀察其生長情形，發現的確可降低柴油對綠豆造成的傷害。在耐受性測試中顯示，此3菌株耐鹼性達pH10，耐鹽性達3~4% NaCl。本研究分離出3菌株均來自花蓮本土，具備處理海洋油污潛力，未來經過審慎評估應可實際運用，避免因使用外來菌種對環境造成的二次傷害。

## 壹、研究動機

在電視節目「好好玩自然」中曾經提到，如果要找高砂鉅鍬形蟲或渡邊氏長吻白蠟蟬可以先找到烏桕樹，可是為什麼這些昆蟲喜歡棲息在特定的樹種上呢？為了尋找答案，於是展開了探究。

我們利用LB培養基分離培養了鍬形蟲幼蟲腸道微生物及土壤微生物，並採集了烏桕樹的葉、莖、種子製作培養基，過程中發現烏桕樹的種子富含油脂，搗碎後摸起來很油，查詢資料後發現烏桕種子曾被用來製造蠟燭、燃油、肥皂、機潤滑油或炒茶葉用油，此外，烏桕種子也是用來製造生質柴油原料的重要研究對象(沈玉真, 2015)，因此我們提出了假設，鍬形蟲體內或環境中的微生物若能利用烏桕種子養分生長，應亦具備了分解柴油能力。

在國一自然第六章「環境保護與生態平衡」章節中提到層出不窮的環境污染議題，例如2010年墨西哥灣漏油事件，導致大範圍的水質受到污染，不少魚類，鳥類，海洋生物、植物都患病或死亡，新聞中也時常報導油汙對環境的傷害。而目前我們用於處理油汙的微生物菌種大多自國外引進，這樣的作法可能會造成另一種生態危機，引發外來種及入侵種議題(劉兆川, 2010)。如果我們能在台灣篩選出可分解油汙的本土微生物，仔細研究評估使用的可能，或許便為這片美麗的大地盡一分心力。

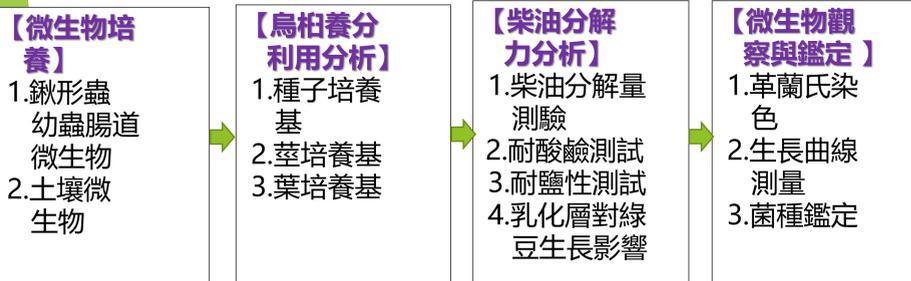
## 貳、研究目的

- 一、分離培養烏桕樹下的土壤微生物及高砂鉅鍬形蟲腸道微生物，並利用烏桕樹的葉、莖、種子製作培養基，觀察微生物生長與養分利用關係。
- 二、利用以柴油為唯一碳源的BH鹽類培養基檢測微生物對柴油的分解能力。
- 三、研究柴油分解菌的耐鹽與耐酸鹼性，評估菌株的使用環境範圍。
- 四、透過綠豆生長實驗檢測經微生物分解後的柴油與柴油對綠豆生長的差異。
- 五、菌種觀察與鑑定。

## 參、主要研究設備及器材

無菌操作台、滅菌釜、恆溫培養箱、烘箱、冰箱、離心機、震盪混合器、電子天平、微量吸管、分光光度計、顯微鏡、電子目鏡、果汁機、pH計、石英管、接種環、三角玻棒、0.45μm過濾膜、針筒、燒杯、血清瓶、秤量紙、藥杓、鋁箔紙、滅菌膠帶、9cm培養皿、酒精燈、小剪刀、載玻片、打火機、離心管、試管、鑷子、牙籤、試管架、相機、電腦、甲醇、乙醇、LB、agar、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、CaCl<sub>2</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、NaCl、NaOH、HCl、結晶紫染劑、番紅花染劑、碘液、高砂鉅鍬形蟲三齡幼蟲、烏桕葉、莖、種子、超級柴油

## 肆、研究流程



## 伍、研究過程與結果

### 一、鍬形蟲幼蟲腸道微生物分離培養

(一)方法:製作LB平面培養基→三齡幼蟲培養→解剖幼蟲，取出腸道→稀釋劃菌→純化菌種。

(二)結果:分離純化出B1~B6菌株(圖1)。



圖1 幼蟲腸道微生物分離培養

### 二、土壤微生物分離培養

(一)方法:製作LB平面培養基→取烏桕樹下土壤→稀釋劃菌→純化菌種。

(二)結果:分離純化出A1~A7菌株(圖2)。



圖2 土壤微生物分離培養

### 三、烏桕平面培養基的生長測試

(一)方法:採集烏桕的種子、莖、葉→磨碎過濾汁液，製作培養基→劃菌(A1~A7、B1~B6)。

(二)結果:莖培養基中A2、B6可生長。種子培養基中A1~A7、B1、B4~B6可生長(圖3、表1)。

→種子養分與微生物生長息息相關。

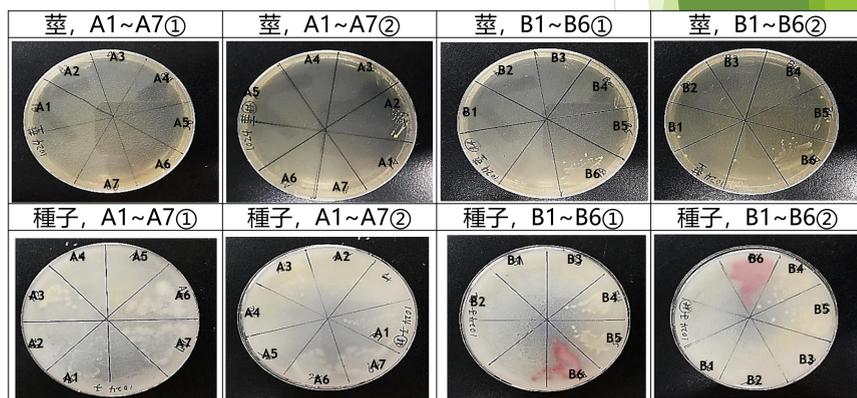


圖3 微生物在烏桕培養基中生長情形

表1 微生物在烏桕培養基中生長情形(V:有生長)

菌株	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	B1	B2	B3	B4	B5	B6
培養基													
烏桕莖平面		V											V
烏桕種子平面	V	V	V	V	V	V	V	V			V	V	V

### 四、柴油-BH平面培養基生長測試

(一)方法:製作BH及柴油-BH平面培養基→劃菌。

(二)結果:A2、A3、B4~B6可在BH培養基生長。A2、A4、B4、B5可在柴油-BH培養基生長(圖4、表1)→A2、A4、B4、B5可能具備分解柴油能力。

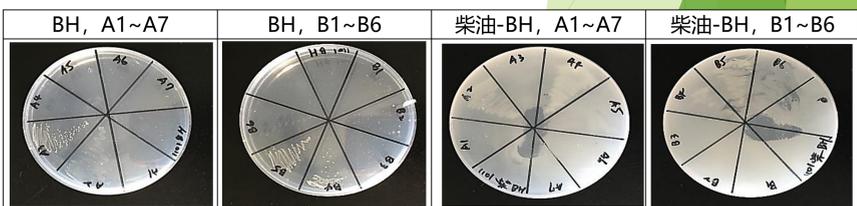


圖4 BH及柴油-BH平面培養基生長情形

表2 微生物在柴油-BH平面培養基生長情形(V:有生長)

菌株	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	B1	B2	B3	B4	B5	B6
培養基													
BH平面		少	V								少	V	少
柴油BH平面		V		V							V	V	

### 五、柴油分解力初步分析

(一)方法:製作BH及柴油-BH培養液→種菌→測量A<sub>600</sub>。

(二)結果:含A2、A4、B4的柴油-BH培養液中，呈現白色混濁狀，柴油層呈現白色乳化現象，B5較不明顯(圖5)。→A2、A4、B4分解柴油能力較佳。

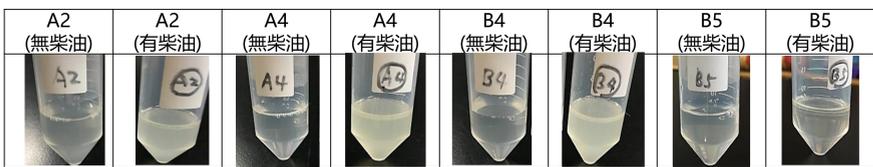


圖5 柴油分解力分析

## 六、A2、A4、B4菌株的耐酸鹼試驗

- (一)方法:製作pH4、7、10的柴油-BH培養液→加入A2、A4、B4菌液( $A_{600}=0.6$ )→恆溫震盪培養(30°C, 120rpm), 每日測量 $A_{600}$ 。
- (二)結果:pH4時, 三種菌株生長不佳;pH7及pH10時, 3種菌株皆能生長;pH7時, B4及A4(0.8)>A2(0.69)。(圖6~10)→**菌株耐鹼性佳。**

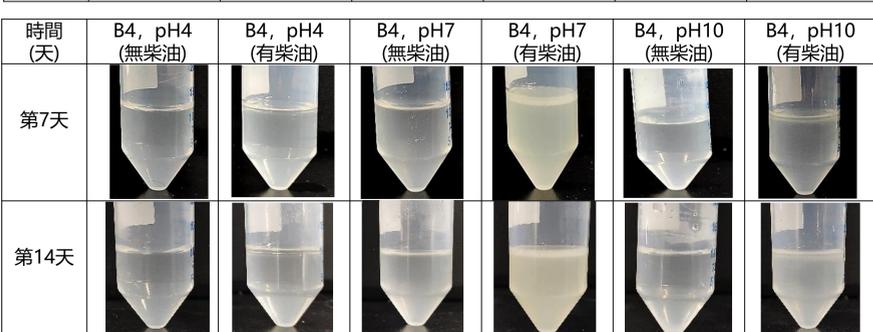
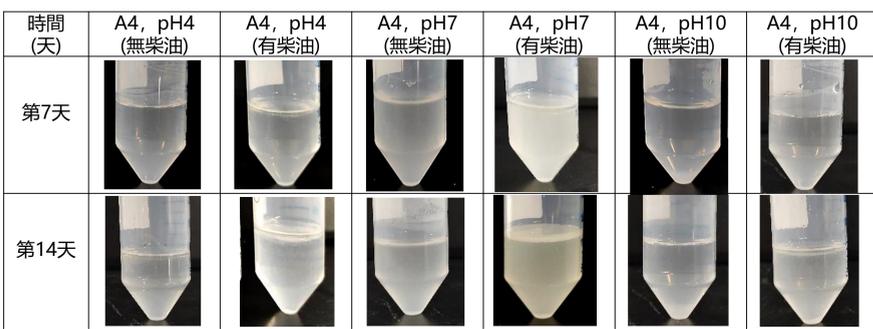
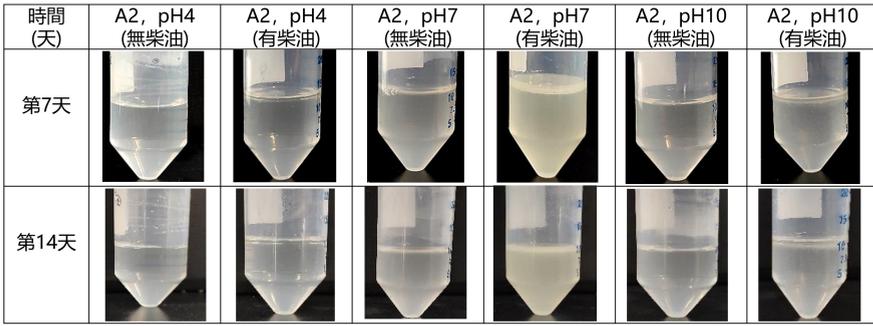


圖6 三菌株耐酸鹼分析

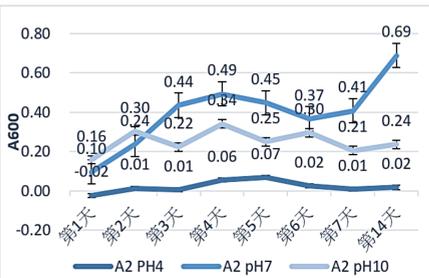


圖7 A2耐酸鹼性分析

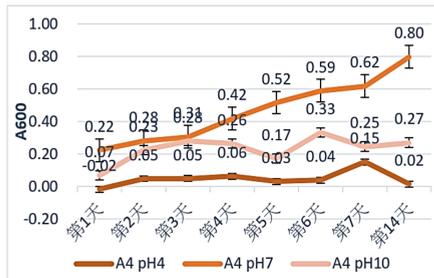


圖8 A4耐酸鹼性分析

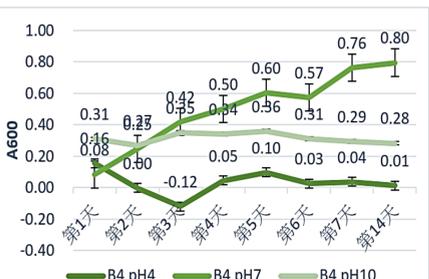


圖9 B4耐酸鹼性分析

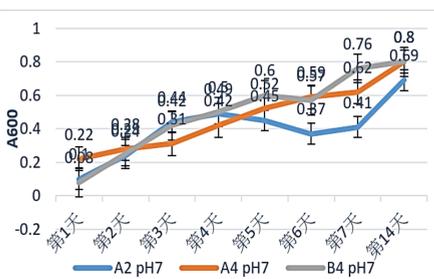


圖10 三菌株在pH7環境中的柴油分解力比較

## 七、A2、A4、B4菌株的耐鹽性試驗

- (一)方法:製作3%、4%及5%NaCl的柴油-BH培養液→加入A2、A4、B4菌液( $A_{600}=0.6$ )→恆溫震盪培養(30°C, 120rpm), 每日測量 $A_{600}$ 。
- (二)結果:3~4% NaCl中仍可生長(圖11~15)→**耐鹽性佳。**

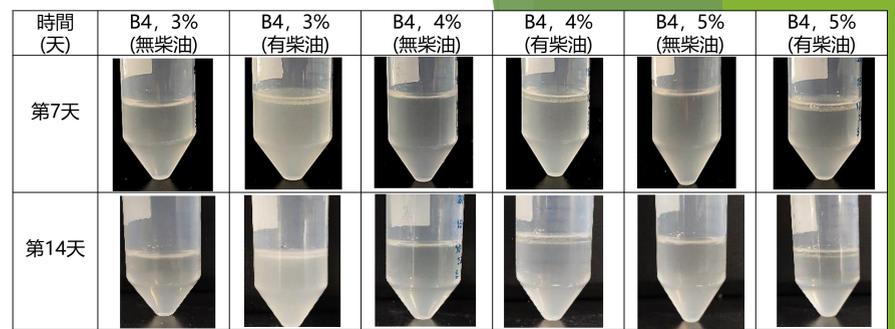
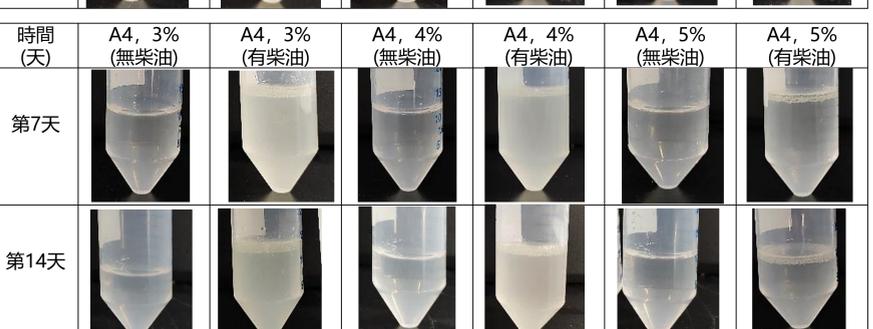
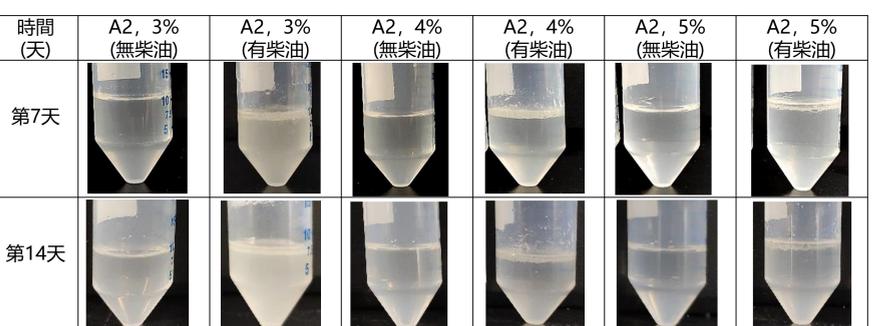


圖11 耐鹽性分析



圖12 A2耐鹽性分析



圖13 A4耐鹽性分析



圖14 B4耐鹽性分析

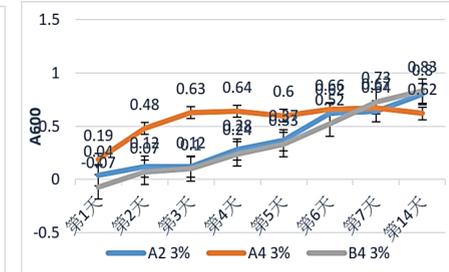


圖15 三菌株在3%NaCl環境中柴油分解力比較

## 八、乳化層觀察與柴油分解量分析

- (一)方法:1.吸取分解14天的柴油乳化層, 放在載玻片上, 進行顯微鏡觀察。2.吸取上層1ml柴油乳化層, 離心(14000rpm, 5分鐘)後測量柴油殘餘量。
- (二)結果:1.顯微鏡可見許多小油滴被包圍。2.離心後油層約占0.45~0.52ml, 乳化層分布在中間, 底層則可見細菌沉澱物(圖16~17)。**→分解率約48~55%。**

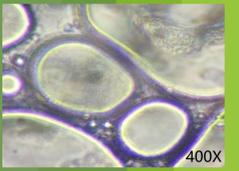


圖16 顯微鏡下的乳化層觀察

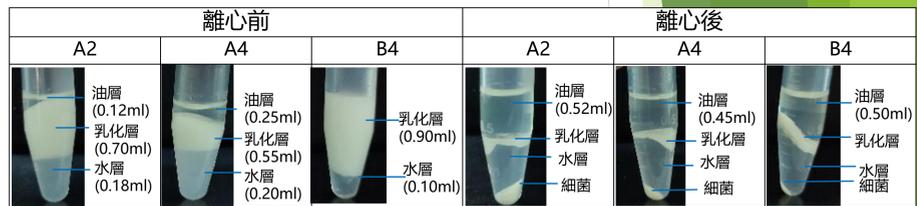


圖17 柴油分解量分析

## 九、柴油與乳化層對綠豆生長的影響

- (一)方法:綠豆泡水一天→在無菌培養皿中加入等量棉花、無菌水、10顆綠豆, 再分別加入0.1~1ml柴油, 0.5ml 分解14天的A2、A4、B4柴油乳化層→室溫培養, 每日測量長度。
- (二)結果:無菌水組胚根較長且粗, 略呈紫色, 莖的發育與葉的發育良好, 當柴油量愈高, 綠豆生長情狀愈差。乳化層組則介於兩者之間, 胚根較柴油組長, 支根發展較好, 死亡率也較低(圖18~20)。**→菌液可分解柴油, 降低柴油對綠豆的傷害。**

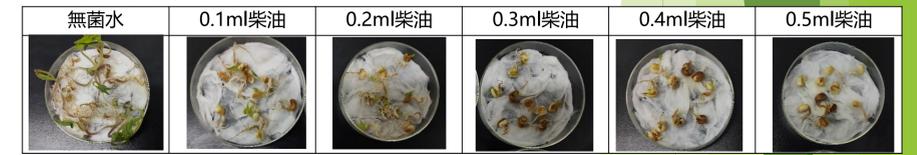


圖18 柴油含量對綠豆生長的影響(第12天)

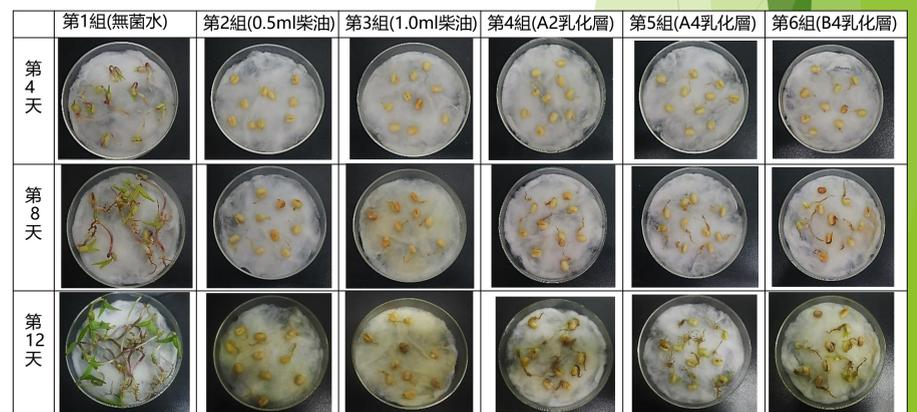


圖19 乳化層對綠豆生長的影響



圖20 乳化層對綠豆生長的影響

## 十、菌落觀察及革蘭氏染色

(一)方法:1.觀察菌落外觀。2.將細菌進行革蘭氏染色後再以顯微鏡放大1000倍觀察,利用電子目鏡軟體(DinoCapture 2.0)測量細菌大小。

(二)結果:菌落外觀及革蘭氏染色結果如圖21。

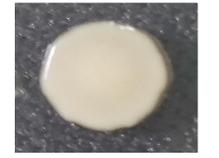
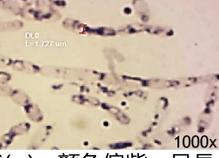
	A2	A4	B4
菌落	 白色,略黃,圓滑,較厚	 白色,略透明,圓滑,略扁	 白色,邊緣不規則,中央突起,似荷包蛋
革蘭氏染色	 G(-),偏粉紅,呈球形,約0.785微米	 G(-),顏色偏紅,呈球形,約0.937微米	 G(+),顏色偏紫,呈長桿狀,寬約1.727微米

圖21 菌落及細菌的顯微鏡觀察

## 十一、細菌生長曲線測量

(一)方法:在血清瓶中加入 50ml LB, 0.5ml A2、A4、B4 菌液( $A_{600} = 0.1$ ),以 30°C, 120rpm 恆溫震盪培養,每小時取出菌液各 1.5 ml 測量  $A_{600}$ 。

(二)結果:菌株約在8小時後生長趨緩, A2與A4曲線相似(圖22)。

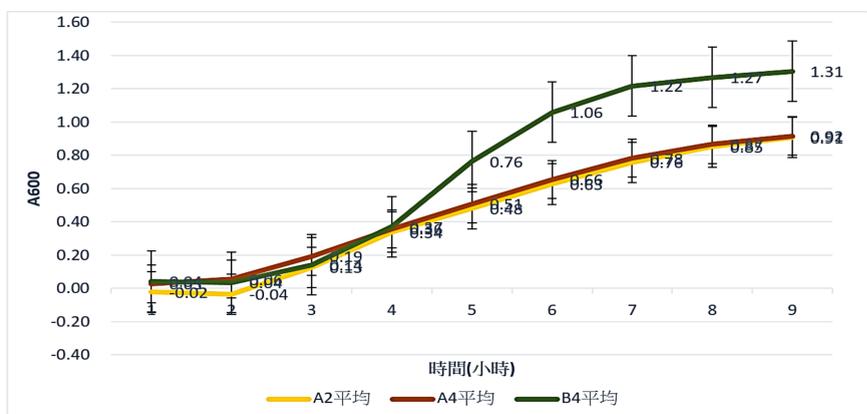


圖22 細菌生長曲線測量

## 十二、菌種鑑定

(一)方法:將A2、A4、B4菌盤送至生技公司進行菌種鑑定→NCBI網站比對。

(二)結果:A2、A4為變形菌門不動桿菌屬細菌(*Acinetobacter*)。B4為厚壁菌門芽孢桿菌屬細菌(*Bacillus*)。

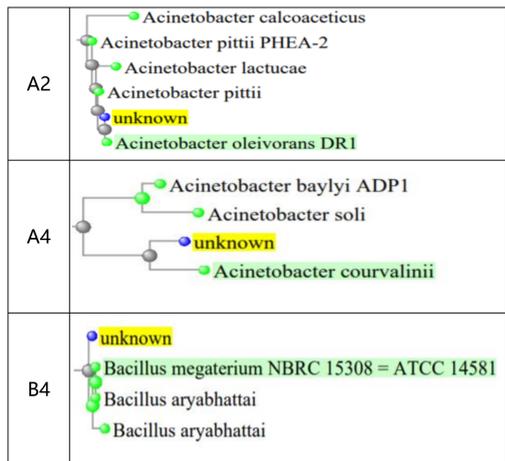


圖23 NCBI distance tree

## 陸、討論

### 一、微生物分離培養

微生物的營養需求差異性很大,培養不同微生物也需利用不同分離方式。本研究利用一般常見的LB培養基自烏桕樹下的土壤分離純化出7個菌株,自高砂鉅鍬形蟲三齡幼蟲腸道分離純化出6個菌株。

### 二、烏桕養分利用分析

將分離出來的菌株塗佈在烏桕莖萃取物的培養基中發現,有2個菌株可利用烏桕莖的養分生長,分別為分離自土壤的A2菌及分離自幼蟲腸道的B6。

在烏桕種子萃取物培養基中則有11株菌可生長,分別為分離自土壤的A1~A7與分離自幼蟲腸道的B1、B4~B6。烏桕種子富含蛋白質、醣類、脂質、維生素...等養分,因此推論烏桕種子的養份有助於土壤微生物及幼蟲腸道微生物生長,也許這是烏桕樹能吸引生物聚集的原因之一。

### 三、柴油分解力分析

本研究透過以柴油為唯一碳源的BH鹽類培養基,篩選出3株柴油分解力較好的微生物(表3),即A2、A4及B4,此三菌株在不含柴油時仍能微量生長,含有柴油時則能加快生長,並使培養液中的柴油層呈現白色乳化現象。

以高速離心方式將乳化層中的油與水分離,初步推估14天的柴油分解率可達48~55%。

將分解14天的乳化層取出進行綠豆生長的實驗,發現經過A2、A4、B4菌株處理過的柴油,可降低柴油對綠豆生長造成的傷害。

表3 三株柴油分解菌的比較

	A2	A4	B4
來源	土壤	土壤	腸道
菌種	不動桿菌	不動桿菌	芽孢桿菌
烏桕莖培養基	少	無	無
烏桕種子培養基	可	可	可
BH平面	少	無	少
柴油BH平面	可	可	可
柴油BH液體(pH4)	0.02	0.02	0.01
柴油BH液體(pH7)	0.69	0.80	0.80
柴油BH液體(pH10)	0.24	0.27	0.28
柴油BH液體(3% NaCl)	0.80	0.62	0.83
柴油BH液體(4% NaCl)	0.18	0.65	0.25
柴油BH液體(5% NaCl)	0.12	0.08	0.13
1ml柴油殘餘量	0.52ml	0.45ml	0.50ml
綠豆胚根長度(12天)	2.63cm	2.65cm	2.77cm
LB中生長9小時 $A_{600}$	0.91	0.92	1.31

在耐酸鹼性測試中顯示, A2、A4、B4在中性環境分解柴油的效果最好, pH10尚具分解能力,但較不耐酸性。在耐鹽度測試中,3菌株則皆能在3% NaCl中生長, A4在4% NaCl中仍能維持生長,因此推測3菌株能運用於土壤,亦能用於對抗海洋油污污染。

相較於其他類似研究,我們分離出來的菌株對於柴油的分解能力似乎更為快速(劉兆川, 2010)。

## 四、菌種鑑定與分析

柴油的主要成分為烷烴、烯烴及芳香烴,微生物分解烴的途徑主要如圖24所示。根據目前研究顯示,常見的柴油降解微生物有細菌、放射菌、黴菌、酵母和藻類等,共70餘屬200多種,通常細菌的降解能力較強,每一種細菌的特性不

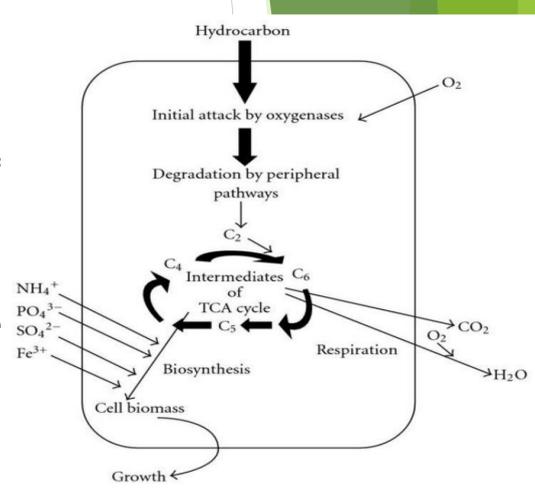


圖24 微生物代謝烴之途徑(倪佩君, 2001)

同,能降解的物質與環境也不同。

本研究菌種鑑定結果顯示,我們分離出的菌株中有2株為變形菌門不動桿菌屬的細菌(來自土壤的A2、A4),1株為厚壁菌門芽孢桿菌屬的細菌(來自幼蟲腸道的B4)。與A2菌最接近的為*Acinetobacter oleivorans* DR1,這是一株由韓國大學農業站自稻田土壤裡分離出來的菌株,能利用柴油或芳香烴生長,研究指出在培養基中添加氯化鈉,菌株能產生胞外多醣(Exopolysaccharides, EPS),使菌株對柴油毒性產生保護作用(NCBI, 2010)。在我們的研究中發現, A4、B4在許多條件下分解柴油的能力較A2菌佳,因此極具發展潛力,值得再深入研究探討(表3)。

## 柒、未來研究建議

- 一、持續研究分離出來的微生物對於生物生長的影響,探討生物間的關係。
- 二、確認細菌種類,研究降解柴油途徑,探討如何縮短柴油分解時間,進一步評估在環境中使用的可能性。
- 三、利用其他油品作研究,評估分解其他油品的能力及應用範圍。

## 捌、結論

- 一、烏桕種子養分可提供高砂鉅鍬形蟲幼蟲腸道微生物及土壤微生物生長,對於這些生物喜歡在烏桕樹下生活提供了一個可能的解釋。
- 二、本研究成功分離出3株可分解柴油的微生物,其中2株為不動桿菌,1株為芽孢桿菌。菌種皆分離自台灣花蓮本土,極具應用潛力。
- 三、3菌株14天的柴油分解率粗估可達48~55%,且經過菌株分解後的柴油可降低柴油對綠豆生長傷害。
- 四、在耐受性實驗中顯示,菌株在3~4% NaCl, pH7~10尚能分解柴油,推估可應用於土壤或海洋油污污染。

## 玖、參考文獻(略)