

臺灣二〇〇七年國際科學展覽會

科 別：微生物學

作 品 名 稱：小小細菌立大功-油類生物復育模式的探討

得 獎 獎 項：佳作

學校 / 作者：國立臺灣師範大學附屬高級中學 邱嵩華
國立臺灣師範大學附屬高級中學 詹榮文

目錄

作者介紹.....	3
中文摘要.....	4
英文摘要.....	5
一、研究動機.....	6
二、研究目的.....	8
三、研究設備與器材.....	8
四、研究過程與方法.....	9
五、研究結果.....	15
六、討論.....	23
七、結論.....	25
八、參考文獻.....	26

作者介紹



邱嵩華(右) 目前就讀於國立台灣師範大學附屬高級中學數理實驗班，從小對科學、音樂、歷史接甚感興趣。高中利用實驗班特有的專題研究課程，從事細菌學研究，藉由一步步地觀察細菌的代謝，深刻體會到了大自然的奧秘。在專題研究的過程中，我們的指導教授-國立台灣師範大學的李銘亮教授，幫我們奠定了微生物基礎實驗的操作技術，並教導我們細菌學實驗的推理邏輯，使我們得已在堅固的基礎下，以自己的想法引入實驗，並得出結論。而我們在師大附中的指導老師-謝慧齡老師，則在每次科展比賽前不辭辛勞地為我們更正海報內容、訓練口頭報告技巧。十分感謝曾經幫助過我們的人，沒有他們的協助，絕對沒有我們研究報告的產生。

詹榮文(左) 目前就讀於國立台灣師範大學附屬高級中學數理實驗班，專題研究課程選擇加入生物專研，利用每週三小時、午休時間、一整個暑假進行研究，終於有點成果出現。雖然一路走來，荊棘遍地，但豐碩的成果令人忘卻走來的辛苦。感謝李銘亮教授、謝慧齡老師的指導。

中文摘要

20 世紀初，石油的量產造就了人類文明前所未有的繁榮，然而由於運送、廢棄處理等因素，使得油類污染成爲環境保護的重大議題。本實驗中，我們的研究主題爲在受油污染的土壤中純化並鑑定出可分解油類之土壤菌和綠膿桿菌對可分解油類之土壤菌與這群土壤菌彼此之間的交互關係，藉此了解它們間的互動對環境生物復育的影響。我們由受油類污染的行道樹土壤中分離了約 12 種的土壤菌，其中我們得到 3 種對油類分解效果效果極佳的非綠膿桿菌(暫時命名爲 P7A、P7C、P7D)。經過菌種鑑定發現 P7A、P7C、P7D 均爲格蘭氏陽性菌。爲了解這群可分解油類之土壤菌間的互動關係，我們針對分解效果最佳的 P7A、P7C、P7D 作爲研究對象，將菌落接種至含有鹽類與機油的液體培養基中震盪培養，並每隔一定時間測量其 O.D 值。結果發現 P7A、P7C、P7D 間的互動會導致其在以機油爲單一碳源的培養液中之生長速度的改變，因此在行環境生物復育時須注意土壤菌間交互關係對其分解污染物速率的影響。此外我們由受油類污染的行道樹土壤中亦分離出了一些綠膿桿菌，因文獻指出，綠膿桿菌所分泌的綠膿素降低受油污染土壤中土壤微生物相的多樣性；因此，我們將由行道樹土壤中純化出的綠膿桿菌 T3 與可分解油類 P7A、P7C、P7D 進行交互作用觀察，發現 T3 會侵占 P7A、P7C、P7D 的既有菌落區，而平板培養基亦可清楚看出和 T3 交接的 P7A、P7C、P7D 菌落區寬度有明顯降低，因此我們認爲 T3 可抑制或殺死 P7A、P7C、P7D，可得知綠膿桿菌會對可分解油類之土壤菌產生抑制或競爭關係。

Abstract

In early 20th century, the exploitation of petroleum transformed human civilization into a tremendously prosper stage. Because of the transportation and disposition of petroleum, the oil pollution has become a important issue in environmental protection. Besides, *Chloropseudomonas spp.* which can survive in many different environments and decompose lots of organic compounds. In this study, we want to find the bacteria which can utilize oil from machine oil-contaminated soil, investigating the interaction relations between *Chloropseudomonas spp.* and these oil-degrading soil bacteria. First, we classified these oil-degrading bacteria by the book called “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology.” We find three species of oil-degrading bacteria (P7A、P7C、P7D) which are all grams-positive bacillus, possibly belonged to *Aureobactreium*、*Curtobacterium*、*Cellulomonas*、*Oerskovia*、*Brochothrix*、*Caryophanon*. Second, in the study of the relationship between *Chloropseudomonas spp.* and the oil-degrading soil bacteria, we found that *Chloropseudomonas spp.* can considerably inhabit the growth of oil-degrading bacteria. Besides, there are also a great variety of interaction between three species of the oil-degrading bacteria. According to the result, the interaction might considerably affect the efficiency of oil bioremediation. Due to our analysis, we suggest that it is necessary to pay more attention to the interaction between bacteria when undertaking oil bioremediation.

一、研究動機

高一在學基礎生物的時候，課本中曾提到人類污染物對生態環境的影響，而在高二的生命科學相關於微生物的章節中則提及，有些細菌可藉由特殊代謝過程來分解某些特殊物質，如 DDT(dichloro-diphenyl-trichloroethane)、多環芳香族碳氫化合物(PAH)、鄰苯二甲酸酯(phthalate ester)、壬基苯酚(nonylphenol)等。藉由微生物的特殊代謝路徑以破壞污染物之化學結構，進而恢復受污染的環境，這就是生物復育技術(Bioremediation)的核心理念。工業革命之後，人類成爲影響地球環境的第一殺手，大量的污染以不同的模式持續且過度地摧殘著地球脆弱的生態系。近年來，油污對海洋、海岸生態系所造成的生態破壞逐漸成爲大眾注意的焦點，台灣南部墾丁的希臘籍貨輪阿瑪斯號漏油事件就是一個很好的例子。在早期，解決這種狀況的處理方式多爲「搬運法」，即將受污染的土壤、海水以人工方式刮除，然後運至指定場所並以化學方式清除，但是這個方式的成本偏高，經濟效益不高。因此現在的主流方式爲以生態系的力量配合人工培育來處理污染的「生物復育技術」。生物復育技術是一種利用微生物扮演分解者的角色，來分解毒物或破壞污染物原有的化學結構，把它們轉變爲無毒產物的處理方式。生物復育不只可以用於分解油污，還可以分解一些因工業生產或家庭使用後而累積於環境中的物質。近年來生物復育在環保議題上所具有的重要性日益顯著，美國環境保護局已將生物復育技術作爲污染整治的選擇模式之一，而國內的生物復育技術亦開始起步，如國家科學委員會的《受有機物污染土壤之生物復育技術》計畫。民國 90 年元月 14 日的希臘籍貨輪阿瑪斯號擱淺發生後，政府處理的方式除了動用陸軍第八兵團的軍力，使用高壓水柱沖洗外，還使用了生物復育技術；之後國立中興大學土壤環境科系楊秋忠教授所領導的研究團隊，建立了在海面受油類污染可使用的「油中浮起菌技術」，此爲國內外受油類污染海洋之生物復育技術的一大成就。而當大家針對這些意外事件進行研究時，似乎忽略了一件事-我們所在的環境中也有大量的油類污染，這些污染是人們在不知不覺中由汽機車修理場、加

油站等地進入環境當中的。因此我們想探討受油類污染之土壤中細菌對生物復育的影響，以期了解這些土壤菌在細菌學上的分類、以及是否可利用這些菌種間的交互關係提高其生長速度等問題，提供國內環境保護相關研究、應用之參考。

在眾多的土壤菌中，綠膿桿菌常被用來作為分解塑膠、人造物質、芳香族化合物(Aromatic compound)之污染；綠膿桿菌會分泌兩種水溶性色素，一種是綠膿素(pyocyanin)，其為藍綠色的吩嗪類化合物，無螢光性，具有抗菌作用；另一種為螢光素，呈綠色。其中綠膿素在 19 世紀末被純化出，發現具有抗菌作用時曾一度被醫學界認為是尋找以久的「神奇子彈」(具有殺菌功能而不會傷害人體)，但日後卻發現它對人體的組織傷害極強，因此不再作為藥物使用，而其對醫藥衛生的影響逐漸轉移至院內感染、醫藥污染等負面層次。根據相關文獻報告指出，綠膿桿菌可以分解一些有機污染物，且對環境的適應能力極佳，在受石油等有機物污染之土壤中十分常見。〈美國應用與環境微生物期刊〉在 2004 年一篇報告(R.Sean Norman et.al.,2004)中針對 pyocyanin(由 *Pseudomonas aeruginosa* 所分泌)對受石油污染土壤的微生物多樣性有負面影響。對於綠膿桿菌，我們所好奇的是，綠膿桿菌的存在與其他微生物之間的交互關係對油類生物復育技術的影響。因此，我們希望可以在台灣本地的含芳香族土壤(如樟樹土)和含酯類土壤(如受油污染土壤)中，取得綠膿桿菌和土壤菌的互動關係的資料，以了解其對油類生物復育的影響。

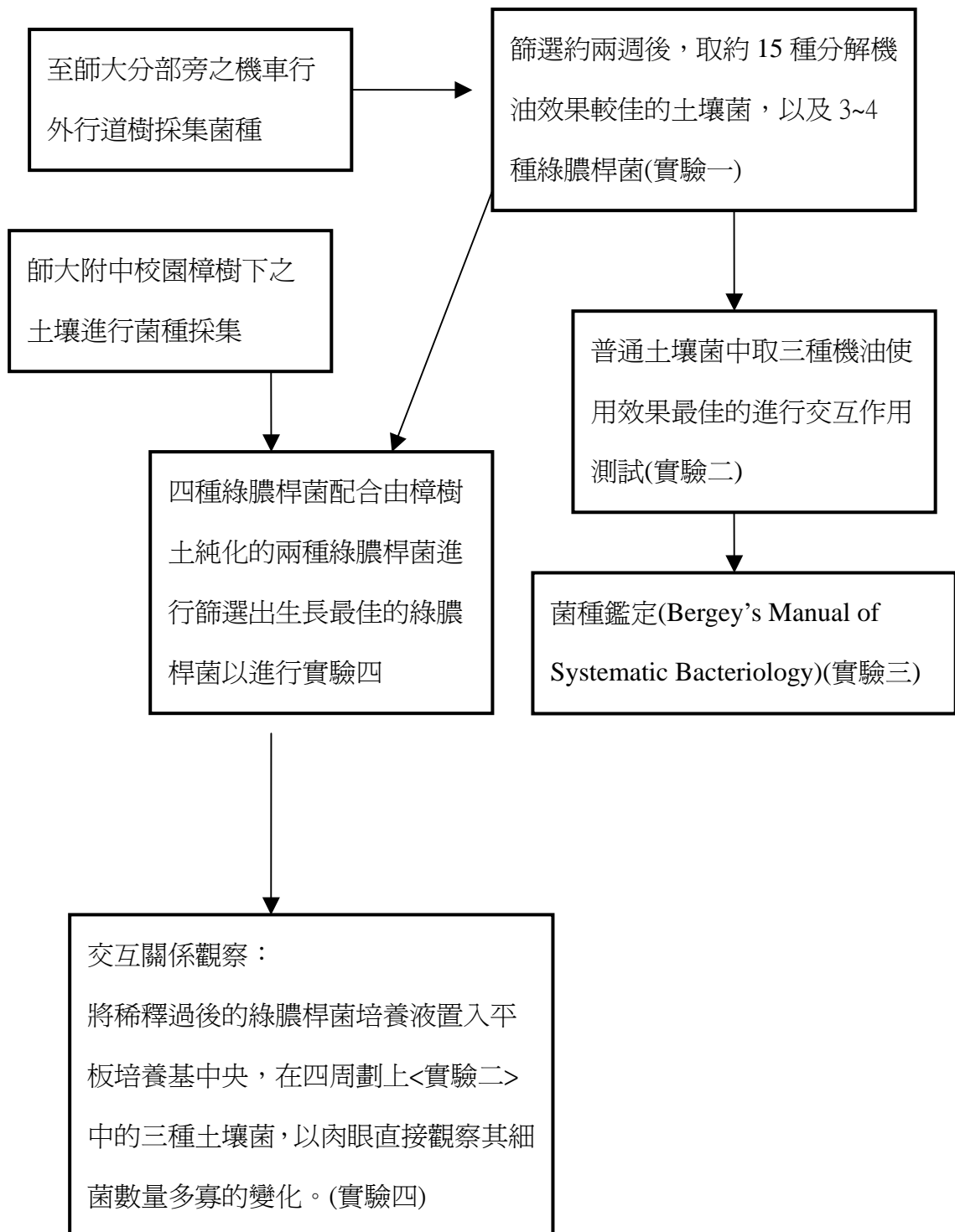
二、研究目的

- 一、純化出對機油分解效果佳的非綠膿桿菌之土壤菌 3~4 種，並以傳統菌種鑑定方式鑑定出其可能的屬名(Genus)。
- 二、使用分光光度計對機油分解效果佳的非綠膿桿菌之土壤菌的數量變化，以了解這些土壤菌間的交互關係。
- 三、由含芳香烴(aromatic compound)和酯類(ester)的土壤中純化出綠膿桿菌後，使用平板培養基觀察其與可分解機油的土壤菌間的交互關係。

三、研究設備及器材

- | | |
|------------------------|------------------|
| 一、離心機 | 十五、分光光度計 |
| 二、培養基(ND) | 十六、70%藥用酒精 |
| 三、機油(Esso 4T-Power) | 十七、接種環 |
| 四、可拋式針筒(Tzrumo 10c.c.) | 十八、酒精燈 |
| 五、細菌過濾器 | 十九、過氧化氫水溶液(3.0%) |
| 六、臘膜 | |
| 七、迴旋式震盪培養箱 | |
| 八、微量抽取器 | |
| 九、菌種保存砂礫 | |
| 十、格蘭氏碘液、沙黃、結晶紫 | |
| 十一、含蓋試管 | |
| 十二、錐形瓶 | |
| 十三、無菌操作台 | |
| 十四、高溫高壓滅菌器 | |

四、研究過程與方法

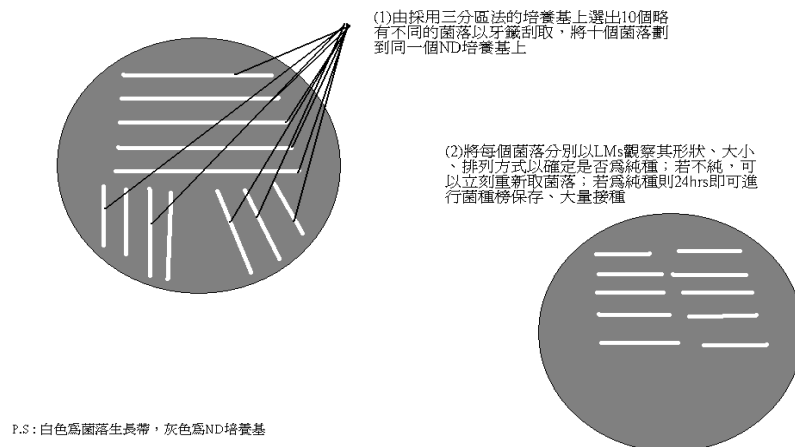


【實驗一、含機油土壤中的土壤菌之菌種純化】

我們以師大分部外的機油行旁之行道樹的表層 3 cm 土壤作為材料來源，將土壤置於錐形瓶中，並加入鹽類，持續震盪培養(150 r.p.m, 30.0°C)約 2 個禮拜，期間每隔 2~3 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、鹽類，以此篩選出分解機油效果最好的 3~4 種土壤菌作主要研究對象。

實驗步驟

- (一)將土壤懸浮液劃至平板培養基，24 hrs 後取約十個菌落，劃到同一個平板培養基上，同時將該菌落置於載玻片上以光學顯微鏡(LMs)配合 violet 染色，放大 1000 倍以菌體大小、菌體排列、顏色深淺等方式判斷是否為純種，若非純種則需再取菌落重新純化。(如圖一)
 - (二)一旦確定為純種，則 24 hrs 後將菌落畫至單一平板培養基上，大量的菌落生長可以更進一步的確定是否為純種。
 - (三)菌種純化完成後，我們會做菌種保存以確保以後可以重複實驗。我們先將菌落混入含有甘油和砂粒的小型塑膠管中，10 mins 後將甘油抽掉，再冰入冰庫即可保存 1~2 年。
- 當我們純化出這些可分解油類的土壤菌後，我們將其加入僅含鹽類與機油的培養液中，以篩選出機油分解效果較佳的 3~4 種土壤菌。



<圖一>菌種純化法

【實驗二、非綠膿桿菌之土壤菌的菌種鑑定】

在<實驗一>中我們由師大分部外機車行的行道樹土壤中分離出對機油利用效果最佳的三種土壤菌，分別暫定名稱爲 P7A、P7C、P7D。爲了更了解這些菌種在分類上的位階，我們將進行菌種鑑定。在菌種鑑定時，分類上同屬內的各物種之鑑定往往需要分析遺傳物質或是蛋白之反應，而這些技術與器材我們不易得到；因此，我們預計以傳統的測試生化反應之菌種鑑定模式，以生化反應結果、細菌來源環境、細菌細胞特徵等比對《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》的標準模式，以鑑定出 P7A、P7C、P7D 的屬名。

實驗步驟

(一)格蘭氏染色：

【原理】 此染色法是以發明人-丹麥醫生格蘭(Christian Grams)來命名，利用細菌細胞壁的差異進行分類。格蘭氏陽性菌(Grams positive)的細胞壁外有大量的肽聚醣可以捕捉結晶紫(violet)染料，在使用酒精褪色後加入沙黃仍呈紫色；格蘭氏陰性菌(Grams negative)的肽聚醣位於原生質膜和外膜間，含量較少，使得結晶紫容易在浸潤後失去，而被沙黃染成紅色。

【試劑】 結晶紫染料(violet) 格蘭氏碘液(Grams iodine) 沙黃 95%酒精

【程序】 1、滴一滴蒸餾水在載玻片上

2、以牙籤取一點菌落劃開於蒸餾水中，以酒精燈加熱固定

3、以結晶紫染色一分鐘

4、以水沖掉結晶紫，拓乾後加入格蘭氏碘液，使之作用一分鐘

5、用 95%酒精沖去格蘭氏碘液約 20 秒,並以水將酒精沖去

6、以沙黃染色一分鐘

7、置於顯微鏡下觀察

(二)觸酶(catalase)測試：

【原理】大多數的好氧菌(aerobics)和兼性菌(facultative)在利用氧氣過程中會產生過氧化氫(H_2O_2)，而過氧化氫對細菌酵素系統有害，因此有些細菌會產生觸酶以便將過氧化氫轉變成氧氣與水。藉由觸酶測試，亦可間接讓我們判別菌種為好氣菌(aerobes)或是厭氣菌(anaerobes)。

【試劑】雙氧水(H_2O_2 3%)

【程序】1、取出在攝氏 $30.0^{\circ}C$ 培養 24 小時含有待測菌種的平板培養基
2、將 3%雙氧水直接加在菌落上，觀察有無氣泡(氧氣)的產生

(三)澱粉水解酵素測定(Starch hydrolysis)：

【原理】澱粉屬於多醣類，由澱粉糖(葡萄糖分子以直鏈結構連接)、膠澱粉(含有磷酸根的支鏈)所組成；分解澱粉的酵素稱為[澱粉酶]或[澱粉水解酶]，其可將澱粉分解為麥芽糖、糊精、葡萄糖的小分子，而不會使碘液呈藍色。

【試劑】1、澱粉培養基-正常 ND 培養基加上 1.0%的水解澱粉
2、碘液

【程序】1、取出在攝氏 $30.0^{\circ}C$ 培養 24 小時含有待測菌種的平板培養基
2、滴入大量碘液觀察是否出現藍色

【實驗三、機油分解效率高之土壤菌的交互作用關係測定】

在〈實驗一〉中我們由師大分部外機車行的行道樹土壤中分離出對機油利用效果最佳的三種土壤菌-P7A、P7C、P7D，在培養過程中我們發現菌種間似乎有著某種的互動關係，我們認為或許可以藉由菌種間的合作與競爭關係來提高生物復育的速度，因此我們希望藉由光度計測量細菌生長狀況來了解這些互動關係。

實驗步驟

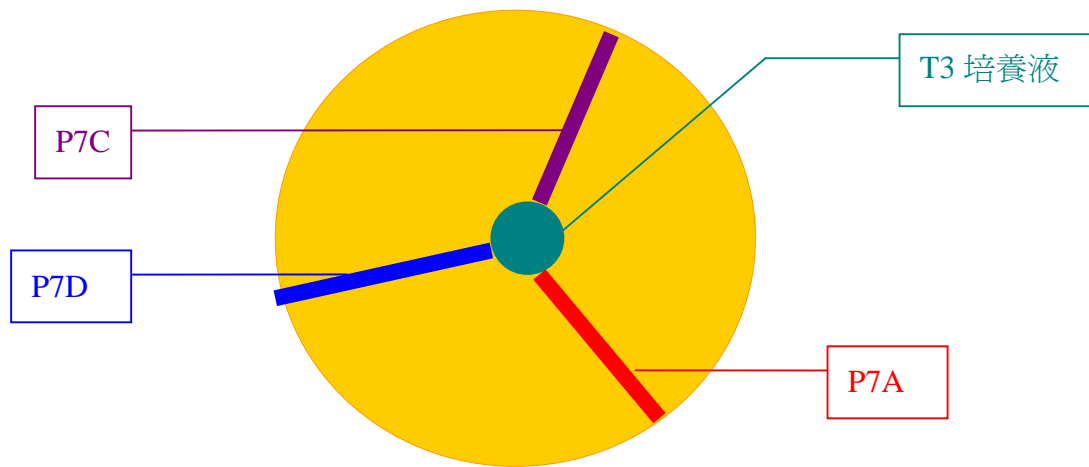
將 P7A、P7C、P7D 接種到鹽類+機油的液體培養液中，以 30.0°C/150 r.p.m 震盪培養 192 小時，每 48 小時將培養液以微量滴管抽取 1.00 ml 置入光度計，在 613 nm 光波長下測定其 O.D.值，以了解待測菌種的數量比較。

【實驗四、綠膿桿菌和可分解機油土壤菌間的交互關係觀察】

在查閱相關文獻時，我們發現綠膿桿菌常被提出可分解一些污染物質，而根據美國 2004 年「Applied and Environment Microbiology」一篇報告(R.Sean Norman et.al.,2004)中針對綠膿素(由 *Pseudomonas aeruginosa* 所分泌)對受石油污染土壤的微生物多樣性有負面影響。因此我們希望可以了解綠膿桿菌和可分解機油之土壤菌間的交互關係。因為綠膿桿菌的分泌物會影響 O.D.值的測定，使 O.D.值無法準確地反映細菌數量。因此我們選擇以 P7A、P7C、P7D 和 T3(由師大分部機車行外行道樹土壤中篩選出的綠膿桿菌)作交互關係觀察。我們將 P7A、P7C、P7D、T3 菌落直接塗佈於平板培養基上(如圖二所示)，以觀察 T3 對 P7A、P7C、P7D 是否有促進或抑制其生長的狀況，並藉此了解綠膿桿菌對可分解機油土壤菌的影響。

實驗步驟

將 P7A、P7C、P7D、T3 培養 24 小時後，將稀釋後的 T3 培養液 0.6 c.c 置於培養基中央凹陷處，將 P7A、P7C、P7D 的培養液分別劃到四周，並注意不使 T3 的培養液流到平面上以免污染，之後藉由觀察菌落生長的狀況了解其中的交互關係。



<圖二>交互關係觀察實驗示意圖

五、研究結果

【實驗一、含機油土壤中的土壤菌之菌種純化】

在這個實驗當中，我們所使用的為不同於傳統方式的菌種純化法。傳統上在檢驗菌落時，每個菌落用一個培養基，於 24 小時後再以肉眼觀察菌落排列、顏色、形狀等以了解是否為純種。而我們所使用的方法(如圖三)，是在一個培養基上畫上 10 個菌落，再以顯微鏡藉由細菌的排列、形狀等判斷是否為純種。此方式較傳統方式更快速且可以進行大量混合菌種的篩選。



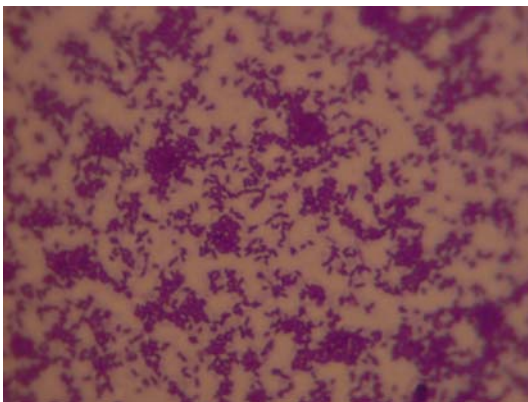
<圖三>以平板培養基大量篩選混合菌種的方式

在經過約兩週的篩選後，我們從行道樹土壤中得到了約十五種的機油分解效果較佳的菌種，其中有些為綠膿桿菌；另有 12 種為非綠膿桿菌之土壤菌。在菌種純化完成後，我們使用以機油為唯一碳源的培養液進行土壤菌篩選(如圖四)；圖四中黃色部分為乳化後的機油，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時，代表細菌的生長狀況較佳，即表示其利用機油的效果較好。由圖四中可看出各菌種對機油利用的差異導致生長狀況的不同，如由左數起的第一管明顯地較第五管混濁，因此可得知前者的機油分解效果較佳。由此方式我們發現 P7A、P7C、P7D 三種非綠膿桿菌的機油分解效果最好，所以我們將 P7A、P7C、P7D 作為接下來實驗的主要研究對象。

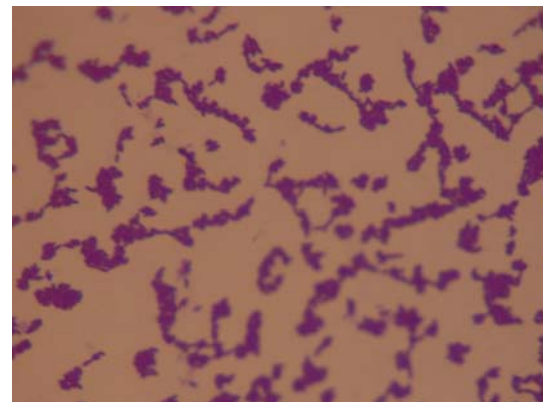
接著我們以光學顯微鏡 1000 倍的放大下觀察 P7A、P7C、P7D；如圖五，P7A 為細胞排列不規則(irregular)的桿菌，長度約 0.8 微米。如圖六，P7C 為細胞排列規則(regular)的桿菌，長度約 1.0 微米。如圖七，P7D 則為細胞排列不規則(irregular)的桿菌，長度約 0.7 微米。



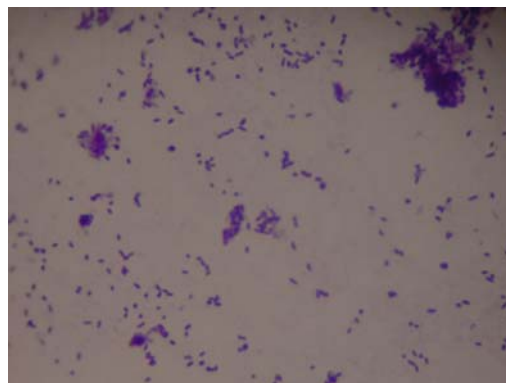
<圖四>使用以機油為唯一碳源的培養液進行土壤菌篩選。
(黃色部分為乳化後的機油，下方則為培養細菌的鹽類溶液)



<圖五>P7A-LMs，1000X，violet 染色



<圖六>P7C-LMs，1000X，violet 染色

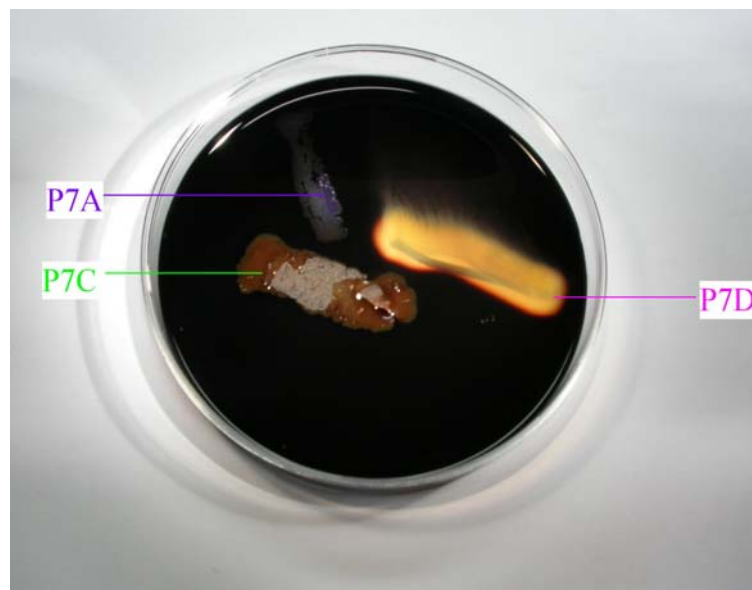


<圖七>P7D-LMs，1000X，violet 染色

※註:觀察 P7D 所使用的光學顯微鏡和 P7A、P7C 不同，因此呈現效果有些差異。

【實驗二、非綠膿桿菌之土壤菌的菌種鑑定】

我們藉由細菌的外型、來源環境與各式測定方法以鑑定 P7A、P7C、P7D 在分類上的位階。由<表一>可知，此三種土壤菌均為格蘭氏陽性桿菌；而此三種土壤菌均具有觸酶可將過氧化氫分解成水與氧氣。此外，在澱粉酶的測試中，我們發現僅 P7D 的菌落周圍有透明區域的出現(如圖八)，表示 P7A、P7C、P7D 中僅 P7D 具有澱粉水解酶可分解澱粉。



<圖八>澱粉水解酵素測定-P7A、P7C 周圍澱粉未被分解，而 P7D 周圍則可看到透明帶-表示澱粉已被酵素分解。

《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》這套書是以細菌的外型、生化反應、來源環境的因素作為分類上的依據。所以，我們根據多項測試的結果比對《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》進行分類(如表一所示)。據此我們推測 P7A 的屬名可能為 *Aureobactrium*、*Curtobacterium*、*Cellulomonas*、*Oerskovia*；P7C 的屬名可能為 *Brochothrix*、*Caryophanon*；P7D 的屬名可能為 *Aureobactrium*、*Curtobacterium*、*Cellulomonas*、*Oerskovia*。(如表二所示)

<表一> P7A、P7C、P7D 菌種鑑定總表

測試方法 待測菌種	格蘭氏染色	觸酶測試	澱粉水解酵素 測定	細菌細胞 排列	細菌細胞 外觀
P7A	紫色(G+)	有氣泡(+)	無透明區域(-)	irregular	桿菌
P7C	紫色(G+)	有氣泡(+)	無透明區域(-)	regular	桿菌
P7D	紫色(G+)	有氣泡(+)	有透明區域(+)	irregular	桿菌

※註:「G+」代表格蘭氏陽性菌,「+」代表有反應,「-」則代表無反應

<表二> P7A、P7C、P7D 可能的屬名

P7A	<i>Aureobactreium</i> <i>Curtobacterium</i> <i>Cellulomonas</i> <i>Oerskovia</i>
P7C	<i>Brochothrix</i> <i>Caryophanon</i>
P7D	<i>Aureobactreium</i> <i>Curtobacterium</i> <i>Cellulomonas</i> <i>Oerskovia</i>

※註:P7A、P7D 是根據《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》中的

「Section 15-irregular, non-sporing, Grams-positive Rods」; 而 P7C 則是根據

「Section 14-regular, non-sporing, Grams-positive Rods」。

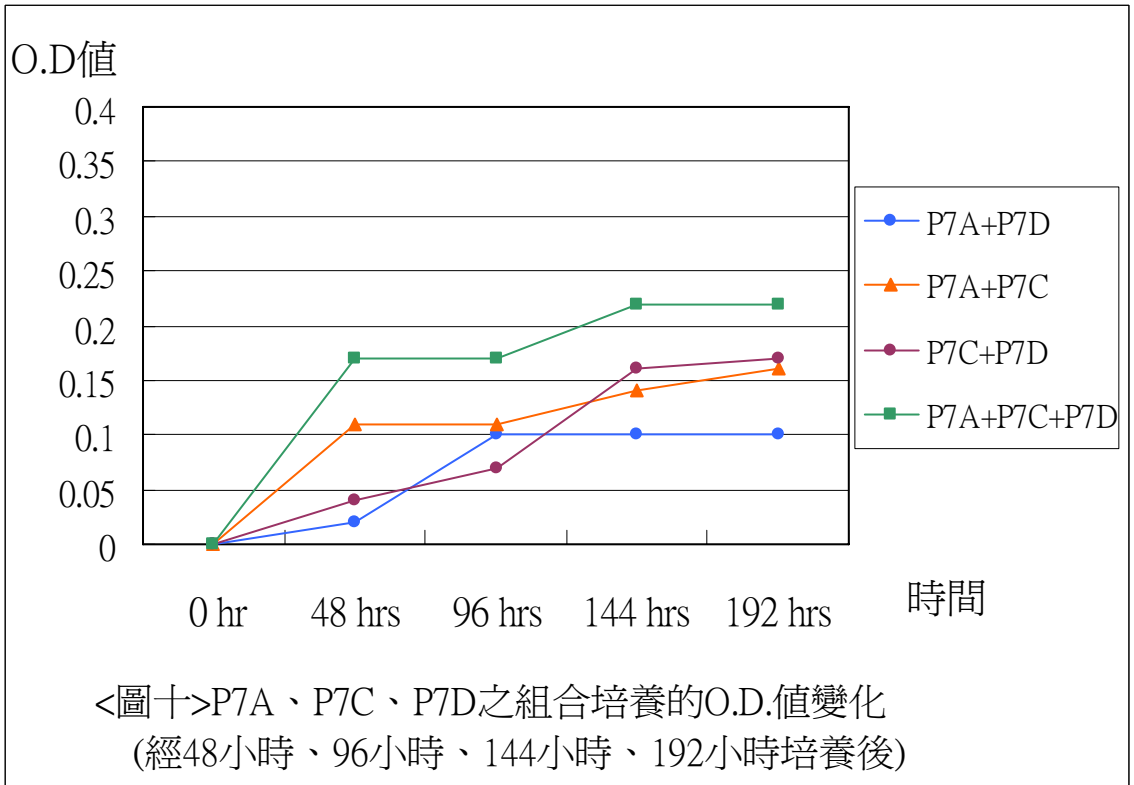
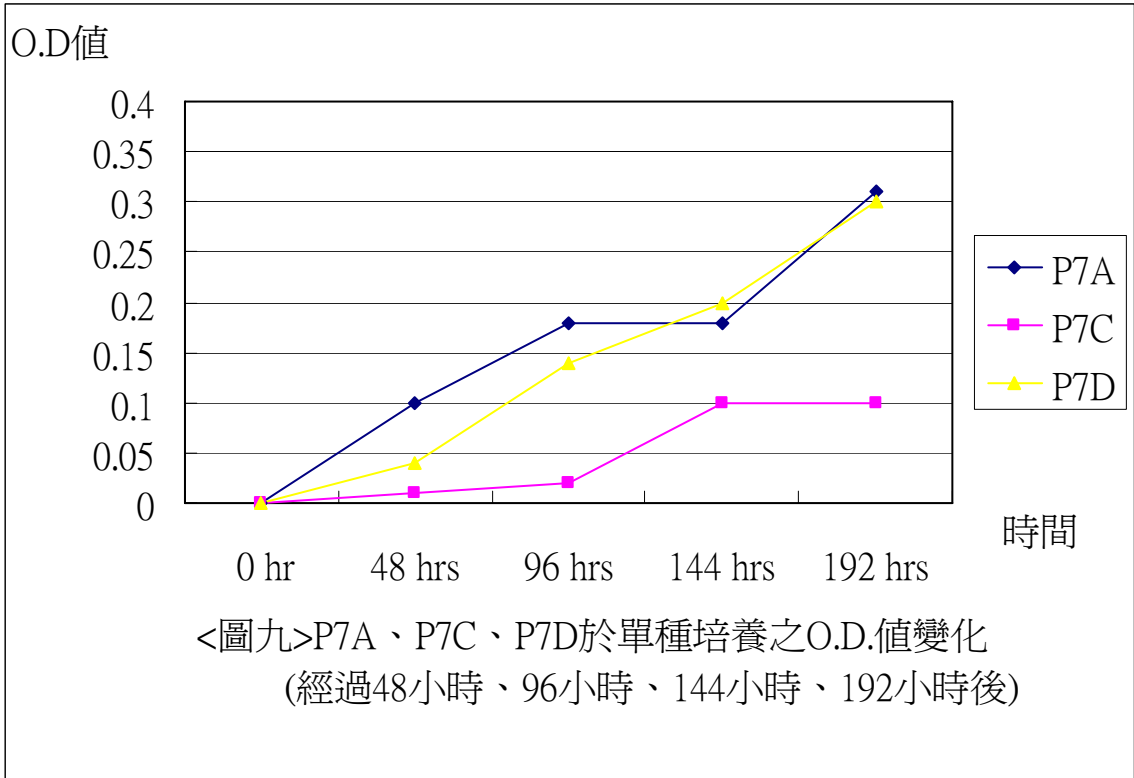
【實驗三、機油分解效率高之土壤菌的交互作用關係測定】

爲了解我們所分離出的三種機油分解效率最佳的土壤菌(P7A、P7C、P7D)之間的交互作用，我們分別單獨或混合培養此三種土壤菌，測定其在 613nm 光波長下經 48 小時、96 小時、144 小時、192 小時的 O.D.值(如表三所示)。並將表三資料轉爲折線圖如圖九、圖十所示。

<表三>P7A、P7C、P7D 經單獨或混合培養於 613nm 光波長下於 48 小時、96 小時、144 小時、192 小時之 O.D.值。

培養時間 培養菌種	0 hr	48 hrs	96 hrs	144 hrs	192 hrs
P7A	0	0.1	0.18	0.18	0.31
P7C	0	0.01	0.02	0.1	0.1
P7D	0	0.04	0.14	0.2	0.3
P7A+P7D	0	0.02	0.1	0.1	0.1
P7A+P7C	0	0.11	0.11	0.14	0.16
P7C+P7D	0	0.04	0.07	0.16	0.17
P7A+P7C+P7D	0	0.17	0.17	0.22	0.22

※註:本實驗以細菌之菌落數作爲定量的依據。我們將 P7A、P7C、P7D 劃在平板培養基上，在攝氏 30.0 度培養 24 小時後將相同數目的菌落加至二次水中，以分光光度計測量其 O.D.值。經過測量，我們發現 P7A、P7C、P7D 之 O.D.值差異不大。因此在單種培養時，我們加入 6 個菌落；在雙種組合培養時，我們每種加入 3 個菌落；在三種組合培養時，我們每種加入 2 個菌落。



我們以 O.D.值的多少反映出細菌的數量，並以單獨及混合培養後的 O.D.值判斷 P7A、P7C、P7D 間的交互關係。如表四，可知當 P7A、P7C 單獨培養時，其 O.D 值均較 P7A 與 P7C 組合培養時為高，代表組合培養後其生長狀況較差(在選擇數據時，為避免受到細菌生長平衡期的干擾，故選擇前 96 小時的 O.D.值為依據)。經由此判斷方式，可知:




- (一)P7A—P7C 組合培養後，生長狀況較 P7A 單獨培養時差，而較 P7C 單獨培養時佳
- (二) P7A—P7D 組合培養後，生長狀況較 P7A 單獨培養時差，亦較 P7C 單獨培養時差
- (三) P7C—P7D 組合培養後，生長狀況均較 P7C、P7D 單獨培養時差
- (四) P7A—P7C 與 P7D 組合培養後，生長狀況較 P7A 單獨培養時差，而較 P7C 與 P7D 組合培養時佳
- (五) P7C—P7A 與 P7D 組合培養後，生長狀況均較 P7C 和 P7A 與 P7D 組合培養時佳
- (六)P7D—P7A 與 P7C 組合培養後，生長狀況較 P7D 單獨培養時差，而較 P7A 與 P7C 組合培養時佳。

<表四>P7A、P7C、P7D 三種分解效率高之土壤菌間的交互關係

培養狀況	48 小時後 O.D 值	96 小時後 O.D 值	搭配生長狀況
(1)P7A 單獨培養	0.1	0.18	較(1)差 較(2)好
(2)P7C 單獨培養	0.01	0.02	
P7A 與 P7C 組合培養	0.11	0.11	
(1)P7A 單獨培養	0.1	0.18	較(1)差 較(2)差
(2)P7D 單獨培養	0.04	0.14	
P7A 與 P7D 組合培養	0.02	0.1	
(1)P7C 單獨培養	0.01	0.02	較(1)差 較(2)差
(2)P7D 單獨培養	0.04	0.14	
P7C 與 P7D 組合培養	0.04	0.07	
(1)P7A 單獨培養	0.1	0.18	較(1)差 較(2)好
(2)P7C 與 P7D 組合培養	0.04	0.07	
P7A、P7C、P7D 組合培養	0.17	0.17	
(1)P7C 單獨培養	0.01	0.02	較(1)好 較(2)好
(2)P7A 與 P7D 組合培養	0.02	0.1	
P7A、P7C、P7D 組合培養	0.17	0.17	
(1)P7D 單獨培養	0.04	0.14	較(1)差 較(2)好
(2)P7A 與 P7C 組合培養	0.11	0.11	
P7A、P7C、P7D 組合培養	0.17	0.17	

【實驗四、綠膿桿菌和可分解機油土壤菌間的交互關係觀察】

爲了解綠膿桿菌是否會促進或抑制可分解機油土壤菌的生長，我們在平板培養基上將 P7A、P7C、P7D 及 T3 塗佈如圖十二所示。由圖十二可看出，在 T3 和 P7A、P7C、P7D 的交界區可發現 P7A、P7C、P7D 菌落寬度有些微的減少(以 P7A 最爲明顯)。而藉由 24 小時和 48 小時的變化可看出 T3 的生長區會逐漸取代 P7A、P7C、P7D 的既有生長區，因爲在相同面積的培養基上只能長一定數量的細菌，因此可推論 T3 藉由其分泌物抑制或殺死 P7A、P7C、P7D。由此顯示綠膿桿菌對可分解油類之土壤菌可能產生抑制關係。

<p>培養 24 小時後</p> <p>由右圖可見 P7A 在靠近中央圓圈處菌落寬度明顯減少，而 P7C、P7D 亦有較不明顯的減少。</p>	
<p>培養 48 小時後 (反面)</p> <p>由右圖可見 P7A 的菌落明顯比上圖少，而 P7D 靠近培養基邊緣可見些微的空洞存在，可能是受 T3 的影響所致。</p>	
<p>培養 48 小時後 (正面)</p> <p>由正面可看到出 P7A 菌落有些微的不平坦，而 P7D 的圓圈狀凹陷亦清楚可見，亦可能是受 T3 分泌物影響所致。</p>	

<圖十二>於 30.0°C 培養 24 小時及 48 小時後各待測菌種的生長狀況(中央圓圈凹陷處加入 0.6 ml 的 T3 綠膿桿菌培養液，其中 a、c、d 分別代表 P7A、P7C、P7D。)

六、討論

在實驗二：非綠膿桿菌之土壤菌的菌種鑑定中，我們使用的傳統化學定性鑑定可能不比 DNA 定序法來得準確，而且因為實驗設備不足之考量只能作到「屬 (genus)」的分類位階，且在面對新菌種時可能會無法判斷；但由我們的結果可清楚的看出，我們所純化出對機油分解效果較佳的三種土壤菌均為格蘭氏陽性菌。不同於一般認為在分解油污、有機物污染上較佳的假單胞菌屬(*Pseudomonas spp.*)-其為格蘭氏陰性菌。由此可見土壤微生物相具有驚人的多樣性，在不同的環境中相似的生態地位會由不同的細菌來扮演。

而在實驗三：機油分解效率高之土壤菌的交互作用關係測定中，一般使用 O.D.值來觀察同一種細胞的數量變化，而我們使用此模式可能會因為細菌大小、細胞間差異等導致 O.D 值變化可能無法很精確地反映搭配培養後細菌數量的比較，但是 P7A、P7C、P7D 的平均細胞長度分別 0.8 微米、1.0 微米、0.7 微米；而經過 24 小時培養的菌落之 O.D.值亦十分接近。因此 O.D.值仍可相當程度地反應細菌生長數量的差異。由結果發現單種培養和混合培養的細菌生長數量有一定的差距，如 P7A、P7D 的單獨培養 O.D 值均遠高於 P7A 和 P7C 的組合培養、P7A 和 P7D 的組合培養、P7C 和 P7D 的組合培養達兩倍左右，而 P7C 和 P7A+P7D 的生長狀況則較差，O.D 最高只到 0.1 因此，將來若我們要以這三種菌行油類分解時，應避免使用 P7C，或是讓 P7A、P7D 同時存在受污染環境中，以免因其間交互作用影響到細菌生長狀況。而本實驗存在一項無法去除的誤差，就是我們無法以過濾滅菌、高溫高壓滅菌處理機油，導致機油中可能存在少部分的可利用機油細菌。為除去此一變因，我們便使用同一瓶機油，且加入量相等的機油，作為本實驗中共同的背景因素。因此我們下可將 O.D 值的變化視為 P7A、P7C、P7D 的交互關係反映。



<圖十七>P7A 在機油+鹽類培養液中培養 192 小時後劃至 ND medium 上，可看到一些不明的細菌生長，極可能為機油本身所含的可利用機油細菌。

在實驗四:綠膿桿菌和可分解機油土壤菌間的交互關係觀察中，我們可發現 P7A、P7C、P7D 會被 T3 抑制或殺死，可見綠膿桿菌或許可以利用其分泌物所含的綠膿素和外毒素 A 抑制土壤微生物；而我們發現 24hrs 後培養基中央的 T3 培養液已不見，可能是被蒸發而附著於培養皿蓋子上，或許有少部分會流到培養基表面影響結果，但由圖十二可清楚的看到 P7A、P7C、P7D 均有不規則的排列，可見 T3 可以影響 P7A、P7C、P7D 的生長。

七、結論

- (一) 我們由師大分部外機車行行道樹土壤中純化出機油分解效果較佳的三種土壤菌均為格蘭氏陽性菌，和一般所認為在油污、有機物分解上較佳，屬於格蘭氏陰性菌的假單胞菌屬(*Pseudomonas spp.*)不同。由此可見土壤微生物項所具有驚人的多樣性，在不同的環境中相似的生態地位會由不同的細菌來扮演。
- (二) 我們發現土壤菌間的交互關係對其生長有相當的影響，而目前生物復育技術存在的問題之一即是微生物生長緩慢，這和所使用的復育微生物與環境本身所存在微生物間的交互關係有相當程度的關聯性。因此將來在行生物復育技術時，須留意交互關係對微生物生長的影響，以期達到最佳分解效果。
- (三) 我們發現綠膿桿菌會抑制或殺死可分解機油的土壤菌；但綠膿桿菌也常被提出可作為油污分解的一項選擇，因此將來在行油類生物復育時須注意綠膿桿菌的含量比例，以期達到最佳分解效果。
- (四) 我們在含芳香烴(aromatic compound)、酯類(ester)的土壤中均純化出為數不少的綠膿桿菌，可見其可分解的污染物種類頗為廣泛，在生物復育上是不可或缺的重要功臣。

八、參考文獻

- ◆Bergey's Manual of Systematic Bacteriology。Volume 2。
- ◆David P.Clark 著,朱雲瑋等編譯。2004。快快樂樂學分生。
第一版。藝軒圖書文具股份有限公司。
- ◆R.Sean Normal 等。2004。America Applied and Environmental Microbiology。
《Effect of Pyocyanin on a Crude-Oil-Degrading Microbial Community》。
- ◆王進琦。2001。基礎微生物學 第三版。藝軒圖書文具股份有限公司。
G.J Tortora , B.R.Funke,C.L.Case 著 , 鍾楊聰等編譯。2002。
- ◆石濤。2001。環境微生物 第五版。鼎茂圖書出版有限公司。
- ◆油中菌浮起技術。國立中興大學土壤環境科系 楊秋忠教授。
- ◆國家科學委員會，國家型研究計畫。受有機物污染土壤之生物復育技術。
- ◆張碧芬等著。2004。微生物學的世界。第一版。天下遠見出版股份有限公司。
- ◆蔡文城。2000。微生物學 第三版。藝軒圖書文具股份有限公司。
- ◆蘇遠志。1999。應用微生物學。國立編譯館。

評語

- 一、 能利用並觀察環境中之微生物及其生長模式。
- 二、 能設計實驗探討細菌之交互作用。
- 三、 建議加入更精密的分子檢測方法。