

2016 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 180009

參展科別 地球與環境科學科

作品名稱 大自然的油切高手

--嗜油菌對家庭污水的處理

得獎獎項 大會獎：四等獎

就讀學校 臺北市立麗山高級中學

指導教師 吳蕙芬、郭瓊華

作者姓名 林筠倩

關鍵字 嗜油菌、降解、家庭污水

作者簡介



我的名字是林筠倩，目前就讀麗山高中，在幾年前看到新聞說科學家們在墨西哥灣油井洩漏的海中發現了可以分解油的菌，因而對這些厲害的微生物產生興趣，所以在高二時選擇了生物專題來進行研究。平常喜歡看書、聽音樂。

摘要

臺灣家庭污水污染量占總水污染的 68.8%，而其中油污更是主要成份。本研究目的為篩選可分解家庭廢水中油污之微生物，並探討其降解油污的能力以及生長情形。本實驗從有油污的環境分離出三種對於家庭廢水中油污具有降解效果的菌株，經過 16S ribosomal RNA gene 菌種分析鑑定，得知其可能為 *Ralstonia* sp. TFD41、*Pseudomonas putida* strain II-B、*Sphingomonas* sp. NC110。研究三種嗜油菌的最佳的生長環境條件，發現 *Sphingomonas* sp. NC110 在所有不同種類的油當中成長情形都佳於另外兩種嗜油菌。而針對 *Sphingomonas* sp. NC110 進行相關的酸鹼值及溫度測試，發現最佳生長條件為 pH7 以及 30℃。進一步將嗜油菌放入污水中，發現 *Sphingomonas* sp. NC110 在污水中的生長菌數最多；*Ralstonia* sp. TFD41 的生長菌數最少，*Pseudomonas putida* strain II-B 的生長速度最快。將嗜油菌放入 100 ppm 油的培養基中，以 *Sphingomonas* sp. NC110 的降解油污的能力為最佳、*Ralstonia* sp. TFD41 的速度最快。在家庭污水中 *Ralstonia* sp. TFD41 + *Pseudomonas putida* strain II-B 的生長狀況最穩定，三種嗜油菌同時培養並沒有加乘效應。未來希望能培養嗜油菌，將其放入污水中，降解污水中的油，以減少油對於環境的污染。

Abstract

In this experiment, I found three species of bacteria which could degrade oil. They were *Ralstonia sp.* TFD41, *Pseudomonas putida* strain II-B, *Sphingomonas sp.* NC110. Among them, *Sphingomonas sp.* NC110 had the largest quality in 9 kinds of oil, and it grew well in pH=7, 30°C. When I put three species of bacterial in the domestic sewage separately, *Sphingomonas sp.* NC110 had the largest quantity. *Ralstonia sp.* TFD41 had the less quantity. Then I put three species of bacterial in 1000 ppm oil culture medium separately, *Sphingomonas sp.* NC110 had the best ability to degrade oil. *Ralstonia sp.* TFD41 had the best speed to degrade oil. Then I mixed them in 1000 ppm oil culture medium, I found they grew better than they grew in separately except *Pseudomonas putida* strain II-B plus *Sphingomonas sp.* NC110. When three bacterial grow together, they didn't have synergistic effect

壹、 前言

一、 研究動機

油汙染是現在會遇到的問題，家庭所產生的油污，隨著廢水一起排放到水溝中，此時就會造成水溝堵塞，例如：台北環保局從水溝中取出來的油塊，有些都跟大顆紅肉西瓜一樣大(如右圖所示)，此時如果又遭逢大雨就很可能會使雨水無法順利排出，而導致淹水。（網路資料一）



油污隨著家庭廢水一起流入河流中(如右圖所示)，就會對河中的生物產生毒害，讓許多魚蝦無法呼吸而死亡，而「台北市環保局統計分析」：一公升食用油若直接排放到河裡，就需要用二十萬倍的水來稀釋，才可以恢復到原來魚蝦可以正常生存的水質。（網路資料一）



在之前美國墨西哥灣 **Macondo252** 油井原油洩漏的新聞中，科學家們在那些洩漏的原油中發現了一種可以降解油污的菌--嗜油菌。我就想：既然嗜油菌能降解海上原油的油污，那是不是也能降解其他種油的油污？例如家庭廢水中的油污，使油汙染可以降低。

二、 研究目的

因目前家庭污水污染量占總水污染的 **68.8%**，而其中油污染更是主要成份之一。本實驗希望藉由從有油污的生活環境中篩到的嗜油菌，放入水溝、汙水處理廠、河川當中，使菌種進行油污降解，讓之後排放到海洋中的油污減少，降低對環境的汙染。（網路資料二）

貳、 研究方法或過程

一、 實驗器材：本實驗所需實驗器材及用途如下表所示

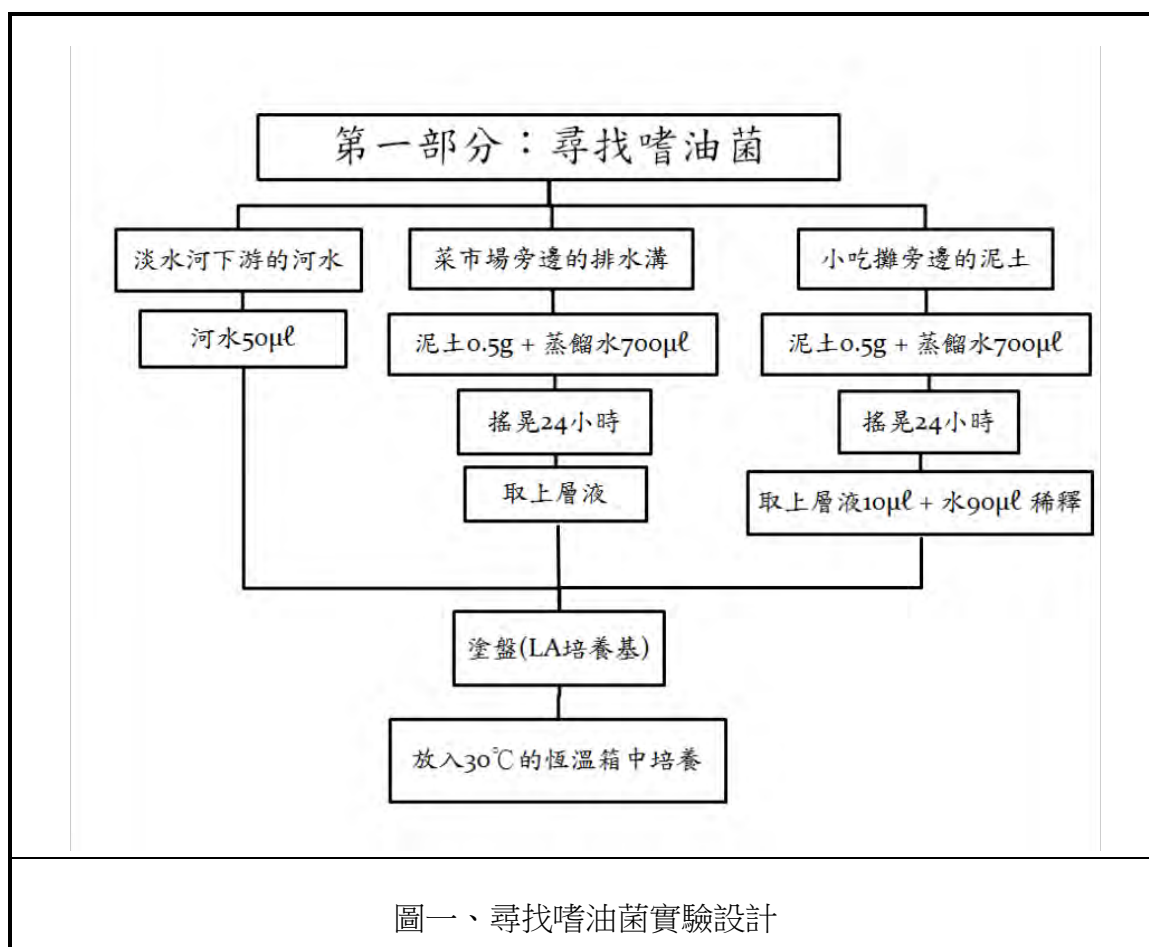
器材	用途	器材	用途
振盪恆溫培養箱	進行細菌培養	振盪器	分離水與土壤
分光光度計	測量菌生長狀態	電磁加熱攪拌機	攪拌藥品
電子天平	藥品秤重	滅菌箱	滅菌
加熱板	抽取菌種 DNA	冰箱	保存菌種
恆溫水槽	抽取菌種 DNA	離心機	抽取菌種 DNA
DNA 電泳槽	抽取菌種 DNA	酸鹼值測定器	測量酸鹼值
聚合酶連鎖反應儀	PCR	三角玻璃塗佈棒	塗菌
培養皿	培養細菌	漏斗	盛裝污水
酒精燈	殺菌	寶特瓶	盛裝污水

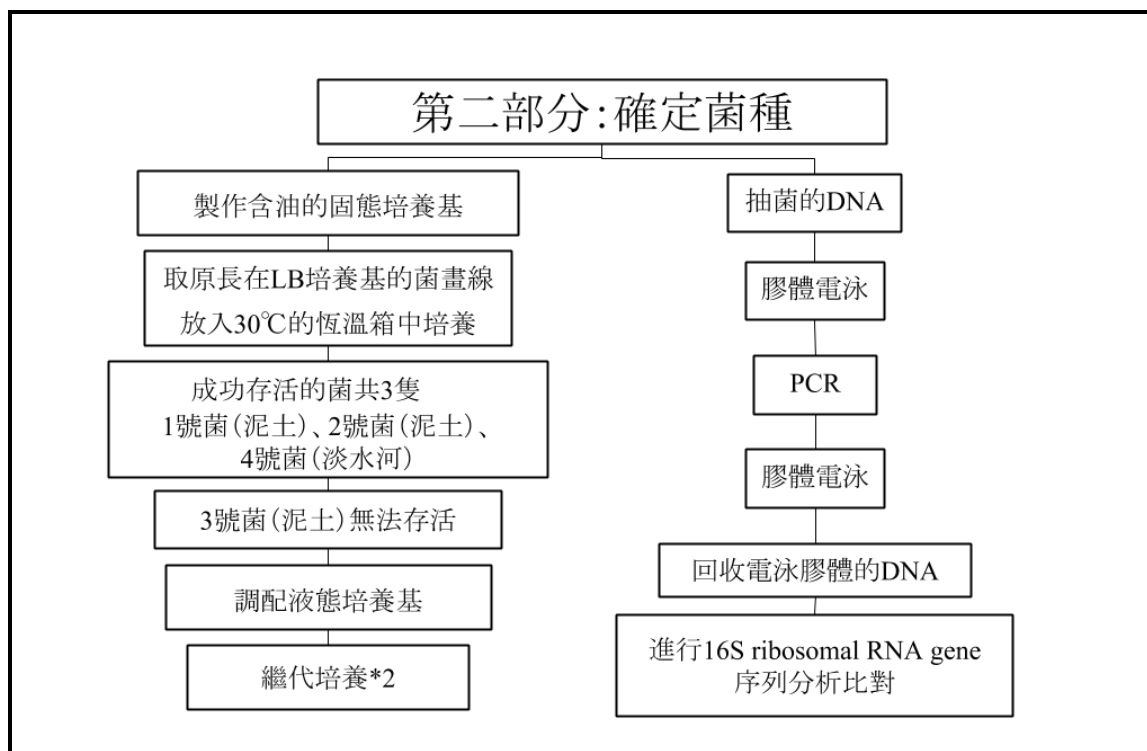
二、 實驗藥品：本實驗所需實驗藥品及用途如下表所示

器材	用途	器材	用途
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	MSM 培養基	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	MSM 培養基
NH_2CONH_2	MSM 培養基	$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	MSM 培養基
KH_2PO_4	MSM 培養基	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	MSM 培養基
NaCl	MSM 培養基	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	MSM 培養基
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	MSM 培養基	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	MSM 培養基
CaCl_2	MSM 培養基	Tween 20	混勻水與油
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	MSM 培養基	Agar	製作固態培養基
NaOH	製造鹼性環境	HCl	製造酸性環境

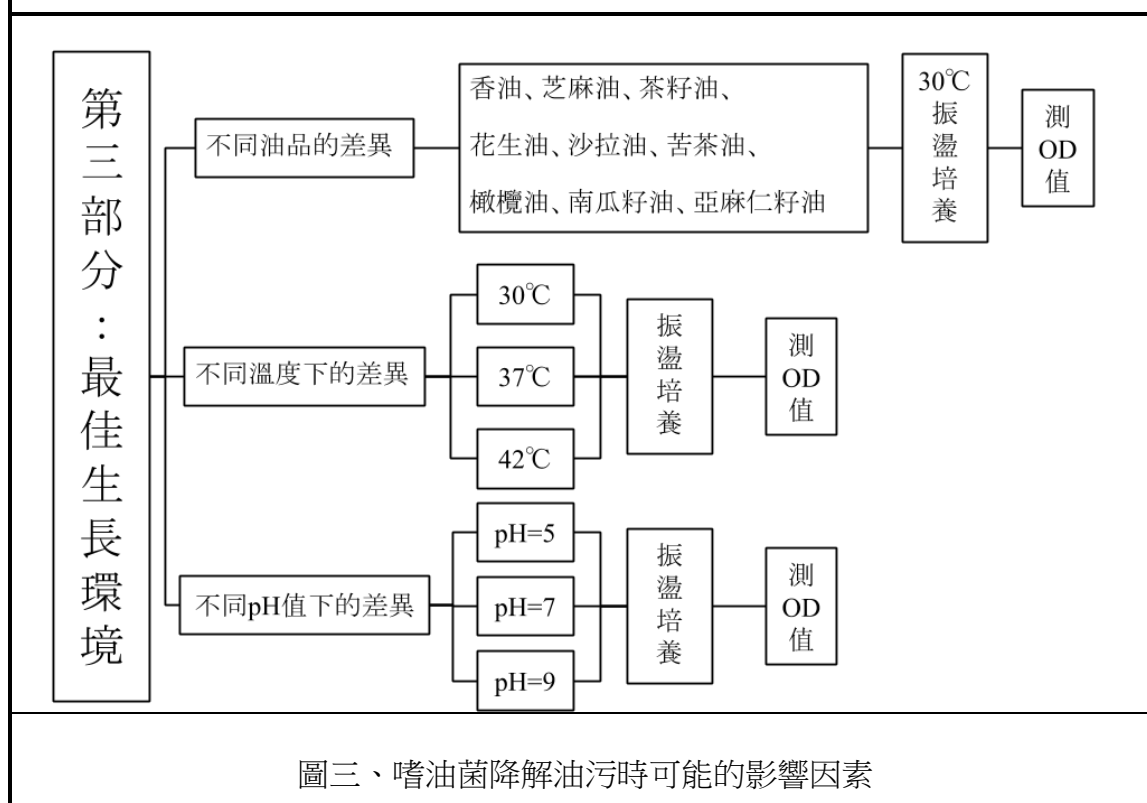
三、 研究架構

本實驗架構可分為四大部分，第一部分為初步尋找嗜油菌，實驗設計如圖一所示；第二部分為分離、鑑定菌種，實驗設計如圖二所示；第三部分為瞭解嗜油菌降解油污時可能的影響因素，實驗設計如圖三所示；第四部分為實際應用嗜油菌進行污水處理，實驗設計如圖四所示。

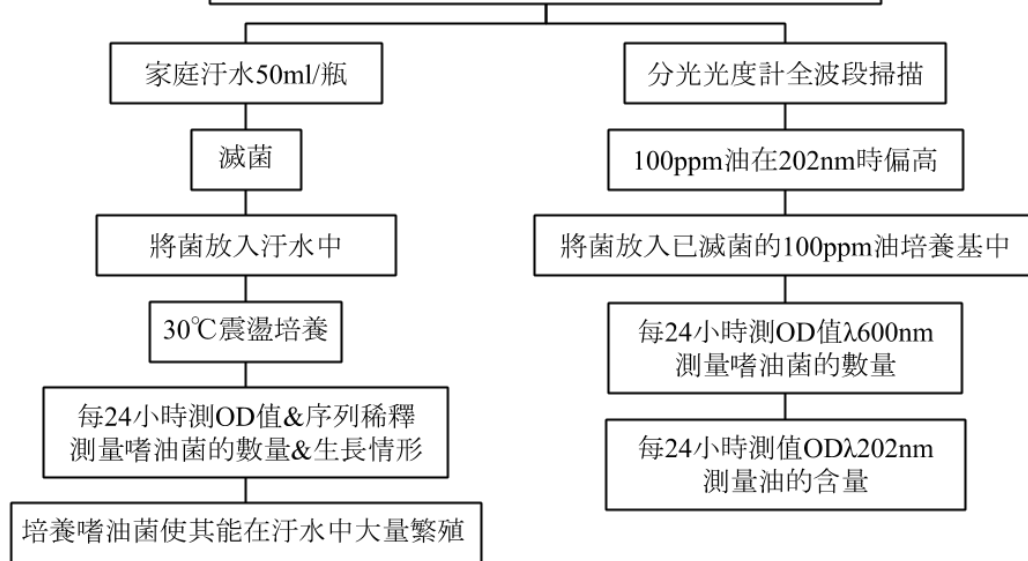




圖二、確定菌種



第四部分：實際處理污水的應用



圖四、實際使用嗜油菌進行污水處理

四、 研究流程

第一部分：尋找嗜油菌

(一) 取樣地點

1. 淡水河下游的河水（如圖五所示）。
2. 旁邊有菜市場的排水溝汙泥（如圖六所示）。
3. 旁邊有小吃攤的泥土（如圖七、圖八所示）。



圖五：淡水河下游的取樣地點



圖六、旁邊有菜市場的排水溝汙泥取樣地點



圖七、旁邊有小吃攤的泥土取樣地點



圖八、旁邊有小吃攤的泥土取樣地點



圖九、河水與泥土的取樣樣本

由左到右分別為
河水樣本、泥土樣本*2、汙泥樣本

(二) 分離菌種

1. 淡水河河水樣本

- (1) 取河水 50 μ l
- (2) 塗盤 (LA 培養基)
- (3) 放入 30°C 的恆溫箱中培養

2. 泥土樣本部分：

- (1) 取泥土 0.5g + 蒸餾水 700 μ l
- (2) 搖晃 24 小時
- (3) 取上層液 50 μ l
- (4) 塗盤 (LA 培養基)
- (5) 放入 30°C 的恆溫箱中培養
- (6) 因為長出來的菌太密，所以取原上層液 10 μ l + 水 90 μ l 稀釋
- (7) 塗盤 (LA 培養基)
- (8) 放入 30°C 的恆溫箱中培養

3. 水溝旁的汙泥樣本部分：

- (1) 取水溝旁的土 0.5g + 蒸餾水 700 μ l
- (2) 搖晃 24 小時
- (3) 取上層液 10 μ l
- (4) 塗盤 (LA 培養基)
- (5) 放入 30°C 的恆溫箱中培養

第二部分：確定菌種

本實驗中未標油種時為「得意的一天健康十穀頂級調和油」

(一) 測試

1. 製作 MSM 培養基 1ℓ
2. 製作固態培養基

20μℓ 油 + 30 μℓ Tween 20 + 200ml MSM + 3g Agar

3. 取原長在 LA 培養基的菌畫線
4. 放入 30℃ 的恆溫箱中培養
5. 成功存活的菌共 4 隻

[1 號菌（泥土）、2 號菌（泥土）、3 號菌（泥土）、4 號菌（淡水河）]

6. 調配液態培養基

50ppm = 3μℓ 油 + 5μℓ Tween 20 + 60ml MSM 培養基

100ppm = 6μℓ 油 + 8μℓ Tween 20 + 60ml MSM 培養基

150ppm = 9μℓ 油 + 11μℓ Tween 20 + 60ml MSM 培養基

200ppm = 12μℓ 油 + 14μℓ Tween 20 + 60ml MSM 培養基

(1) 每種 ppm 各分裝成 20 管，每管 3ℓ

(2) 滅菌

(3) 繼代培養（兩次）

- i. 準備菌種—可在有加油 plate 生長的菌
- ii. 噴灑酒精殺菌，放入無菌操作台
- iii. 使用竹籤沾菌
- iv. 放入液態培養基中
- v. 放入 30℃ 的恆溫箱中振盪培養

(二) 鑑定菌種：利用萃取出細菌 DNA 與 genbank 中的已知菌種進行 16S ribosomal RNA gene 比對，以鑑定菌種為何

1. 抽菌的 DNA

- (1) 將原繼代培養成功的菌 [1 號菌、2 號菌、4 號菌] 離心
(轉速 13500RPM，5min)
- (2) 去上層液後加入 200 μ l Extraction Solution + 20 μ l proteinase K solution
- (3) 56 $^{\circ}$ C 水浴 1 小時
- (4) 加入 2 μ l RNase solution 放在室溫當中 5 分鐘
- (5) 加入 200 μ l Binding solution 放在 70 $^{\circ}$ C 的加熱板上 10 分鐘
- (6) 加入 200 μ l 99%酒精
- (7) 轉移到管柱
- (8) 離心，去下層液
- (9) 加入 300 μ l Binding solution
- (10) 離心，去下層液
- (11) 加入 700 μ l Wash solution
- (12) 離心，去下層液
- (13) 加入 700 μ l Wash solution
- (14) 離心，去下層液
- (15) 高速離心後留下管柱
- (16) 加入 20 μ l Elution solution (60 $^{\circ}$ C)
- (17) 靜置 10 分鐘後，離心

2. 膠體電泳，確定是否有抽到菌的 DNA

- (1) 膠：1%--0.2g Agarose + 20 ml 1*TAE
- (2) 30 分鐘，100V
- (3) 1 μ l DNA + 染劑

3. 16S rRNA 基因序列雙聚合酶連鎖反應

4. 膠體電泳，確定 PCR 是否有成功
5. 回收電泳膠體之 DNA
6. 送專業實驗室進行 16S ribosomal RNA gene 序列分析比對以確定菌種

第三部分：尋找嗜油菌在繁殖時的最佳生長環境

(一) 不同油品的差異：使用以下 9 種油品（福壽芝麻油、元福茶籽油、源順花生油、大成大豆沙拉油、綠色生活苦茶油、長青特級小磨香油、Bio LEIN ÖL(亞麻仁籽油)、Bio Pumpkin Seed Oil(南瓜籽油)、CIRIO Extra Virgin Olive Oil（橄欖油））進行相關油品測試嗜油菌的活性，之後選定表現較佳的嗜油菌來進行酸鹼值及溫度的測試，

1. 調配液態培養基 5.4 μ l 油 + 8.1 μ l Tween20 + 200 ml MSM，3 ml/1 管
2. 滅菌
3. 接菌
4. 放入 30°C 的恆溫箱中振盪培養 4 天
5. 測 OD₆₀₀ 值

(二) 不同溫度下的差異：

1. 調配液態培養基 18 μ l 油 + 27 μ l Tween20 + 90 ml MSM，各 3 瓶
2. 滅菌
3. 接菌（接種在油品種類中表現最佳的菌種）
4. 分別放入 30°C、37°C、42°C 的恆溫箱中振盪培養
5. 測 OD₆₀₀ 值

(三) 不同 pH 值下的差異

1. 調配液態培養基 6 μ l 油 + 9 μ l Tween20 + 30 ml MSM，各 3 瓶
2. 利用 NaOH 和 HCl，將液態培養基調配成 pH5、7、9 的培養基
3. 滅菌
4. 接菌（接種在油品種類中表現最佳的菌種）
5. 放入 30°C 的恆溫箱中振盪培養
6. 測 OD₆₀₀ 值

第四部分：實際處理污水的應用

(一) 純菌培養

1. 前往迪化汙水處理廠，取得進流家庭汙水一公升
2. 過濾雜質
3. 將汙水滅菌，以防受到其他菌種干擾
4. 將菌種放入進流水中，測量 OD₆₀₀ 值
5. 製作 1000ppm 油的液態培養基
 - (1) 160ml MSM + 160μl 油 + 285μl Tween20
 - (2) 分裝成 3 瓶
 - (3) 滅菌
 - (4) 接菌--單一菌種
6. 使用全波長掃描 1000ppm 油的培養基，尋找出現高峰的波長當作油污降解時的標準
7. 測量 OD₆₀₀ 值，以便於統計菌數
8. 測量 1000ppm 油高峰 OD 值，以便於統計油的含量
9. 重覆步驟 4.、7.、8.，以便作圖分析

(二) 混菌培養

1. 將菌種放入進流水中，測量 OD₆₀₀ 值
2. 製作 1000ppm 油的液態培養基
 - (1) 100ml MSM + 100μl 油 + 180μl Tween20 *4 瓶
 - (2) 滅菌
 - (3) 接菌--每兩種菌種混合一瓶，三種菌種混合一瓶
3. 測量 OD₆₀₀ 值，以便於統計菌數
4. 測量 1000ppm 油高峰 OD 值，以便於統計油的含量
5. 重覆步驟 1.、3.、4.，以便作圖分析

(三) 培養嗜油菌使其能在汙水中大量繁殖。

參、 研究結果與討論

一、 研究結果

第一部分：尋找嗜油菌

初步採樣及篩選嗜油菌結果如圖十至圖十四所示，在旁邊有小吃攤的泥土中，篩出三隻泥土菌種，在採樣地點淡水河下游篩選出菌種四，而在旁邊有菜市場的排水溝汙泥，沒有篩出任何菌。



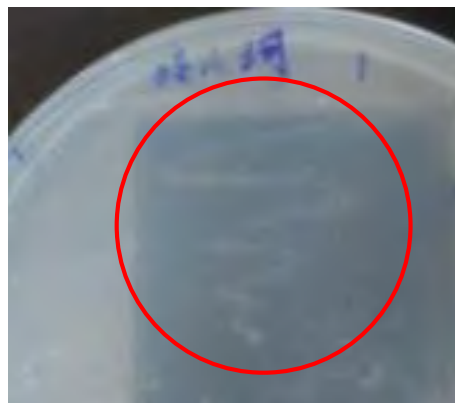
圖十、旁邊有小吃攤的泥土篩選出菌種一



圖十一、旁邊有小吃攤的泥土篩選出菌種二



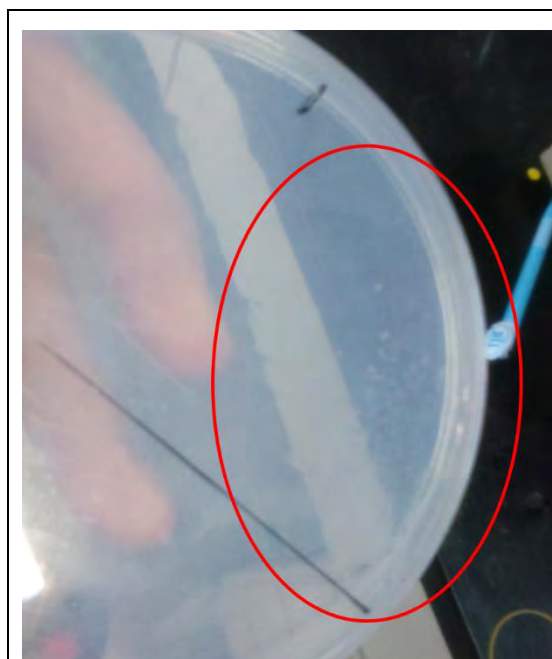
圖十二、旁邊有小吃攤的泥土篩選出菌種三



圖十三、淡水河下游篩選出的菌種四

第二部分：確定菌種

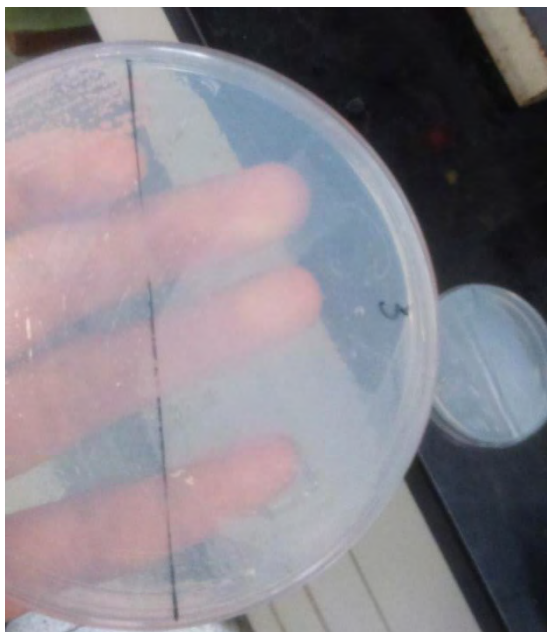
在泥土樣本中篩到三種不同的菌種，河水樣本中篩到一種菌種，將其分別編號為一、二、三、四號菌。結果如圖十四至圖十七所示，後發現泥土中的三號菌雖然可以在 LB plate 上生長，但在油 plate 中卻無法存活，故可知所篩到的菌種中僅有三種菌種能倚靠油為生，之後進行 DNA 萃取、PCR、電泳，實驗結果如圖十九、二十一所示，回收可分析之 DNA 樣本，進行 16S ribosomal RNA gene 比對，結果如圖二十二至圖二十四所示，泥土樣本中之未知菌種一可能的菌種有兩種，其一為 *Cupriavidus sp. lig33*，其二為 *Ralstonia sp. TFD41*，如圖二十五，但經資料考證後發現 *Cupriavidus sp. lig33* 不具有嗜油的能力，故排除之。泥土樣本中之未知菌種二可能的菌種為 *Pseudomonas putida strain II-B*，如圖二十六。河水樣本中之未知菌種四可能的菌種為 *Sphingomonas sp. NC110*，如圖二十七。



圖十四、一號菌在油 plate 上的生長情形



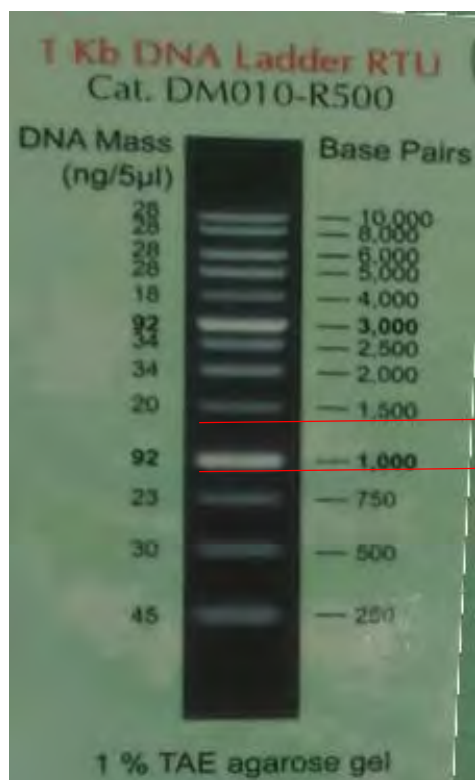
圖十五、二號菌在油 plate 上的生長情形



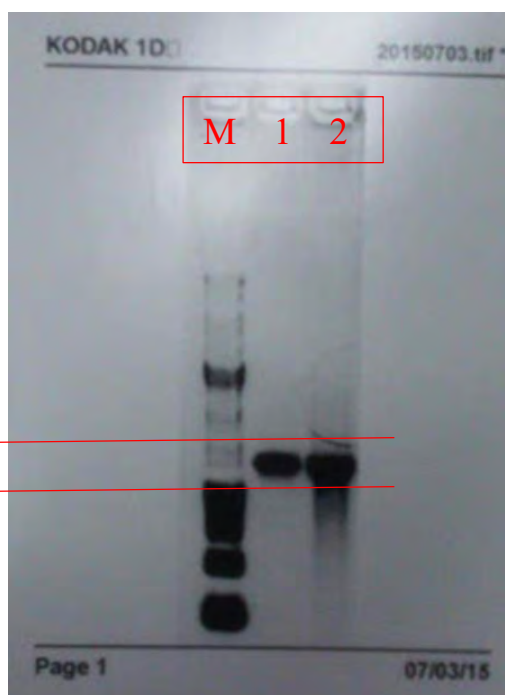
圖十六、三號菌在油 plate 上的生長情形



圖十七、四號菌在油 plate 上的生長情形

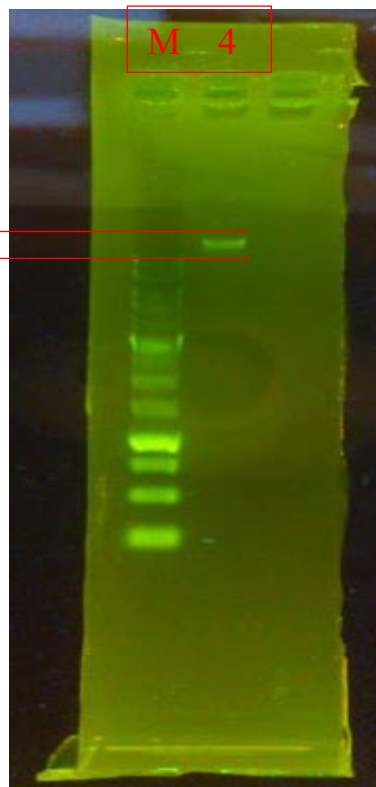
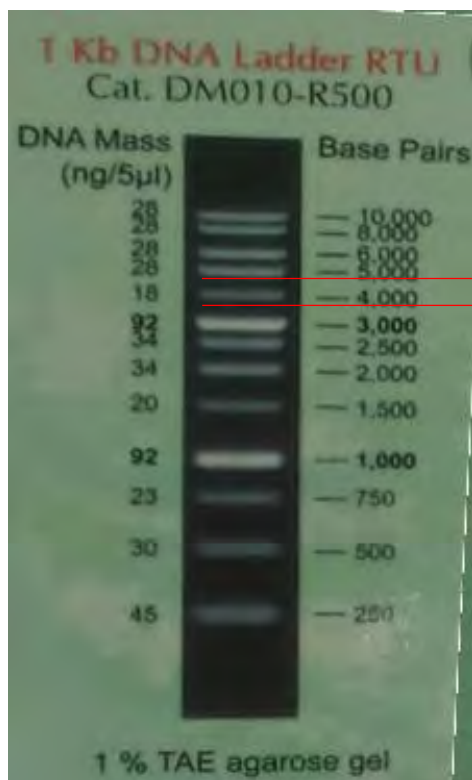


圖十八、電泳跑膠標準



M : marker
1 : *Ralstonia* sp.TFD41
2 : *Pseudomonas putida* strain II-B

圖十九、菌種 DNA 萃取結果



M : marker

4 : *Sphingomonas sp.* NC110

圖二十、電泳跑膠標準

圖二十一、菌種 DNA 萃取結果

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident Accession
☐	Cupriavidus sp. THG-S20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1783	1783	99%	0.0	97% KJ810592.1
☐	Cupriavidus sp. TBD162 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	1781	1781	99%	0.0	97% LC005604.1
☐	Cupriavidus sp. liq32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1775	1775	99%	0.0	97% JQ917979.1
☐	Cupriavidus sp. TFD33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1775	1775	99%	0.0	97% EU827485.1
☐	Cupriavidus sp. liq33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1770	1770	99%	0.0	97% JQ917980.1
☐	Ralstonia sp. TFD41 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1770	1770	99%	0.0	97% AF067833.1
☐	Cupriavidus sp. liq34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1764	1764	99%	0.0	97% JQ917981.1
☐	Cupriavidus sp. W60 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1755	1755	98%	0.0	97% KC853214.1
☐	Cupriavidus sp. cmc31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1753	1753	98%	0.0	97% JQ918000.1
☐	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone SINW1090 N11D0 16S_B	1725	1725	99%	0.0	97% LN560776.1
☐	Ralstonia sp. c308 gene for 16S rRNA, partial sequence	1720	1720	99%	0.0	96% AB167178.1
☐	Ralstonia sp. DPS1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1716	1716	99%	0.0	96% HQ704414.1
☐	Ralstonia sp. ECPB06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1714	1714	99%	0.0	96% JQ304796.1

圖二十二、泥土樣本中之菌種一比對結果

Sequences producing significant alignments:						
Select: All None Selected:0						
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident Accession
☐	Pseudomonas putida strain II-B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1905	1905	99%	0.0	99% EF219419.2
☐	Pseudomonas putida strain D1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1905	1905	99%	0.0	99% EU878238.1
☐	Pseudomonas putida strain OW-16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1905	1905	99%	0.0	99% DQ112328.1
☐	Pseudomonas plecoglossicida strain PNP-Y8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1903	1903	99%	0.0	99% FJ539000.1
☐	Pseudomonas sp. FP2-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1903	1903	99%	0.0	99% EU293341.1
☐	Pseudomonas putida strain SKP10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1899	1899	99%	0.0	99% KR422301.1
☐	Pseudomonas putida strain PYR1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1899	1899	99%	0.0	99% KP192770.1
☐	Pseudomonas sp. C2-22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1899	1899	99%	0.0	99% KP114213.1
☐	Pseudomonas sp. 3 MSSRF QS31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1899	1899	99%	0.0	99% KP640641.1
☐	Pseudomonas sp. 2 MSSRF QS24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1899	1899	99%	0.0	99% KP640640.1

圖二十三、泥土樣本中之菌種二比對結果

Sequences producing significant alignments:						
Select: All None Selected:0						
Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results						
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident Accession
☐	Sphingomonas sp. NC110 partial 16S rRNA gene, isolate NC110	1236	1236	94%	0.0	98% LN832008.1
☐	Uncultured bacterium clone C131 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	94%	0.0	98% KJ817676.1
☐	Uncultured bacterium clone A172 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	94%	0.0	98% KJ817514.1
☐	Sphingomonas sp. PMR03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	94%	0.0	98% KF648890.1
☐	Uncultured bacterium clone UMTpAL14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	94%	0.0	98% KJ754668.1
☐	Sphingomonas sp. G6_3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	94%	0.0	98% KF294970.1
☐	Uncultured bacterium clone nck189d8c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	94%	0.0	98% KF094301.1
☐	Sphingomonas sp. LS-081 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	94%	0.0	98% KJ584031.1
☐	Uncultured bacterium clone DoIGs_A332 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	94%	0.0	98% JQ194590.1
☐	Sphingomonas sp. 3_60 partial 16S rRNA gene, strain 3_60	1236	1236	95%	0.0	98% HF954390.1
☐	Sphingomonas aquatilis strain S7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	95%	0.0	98% KF542913.1
☐	Uncultured bacterium clone AB_02_33A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	94%	0.0	98% KC666174.1
☐	Uncultured bacterium clone AB_02_77 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	94%	0.0	98% KC666100.1

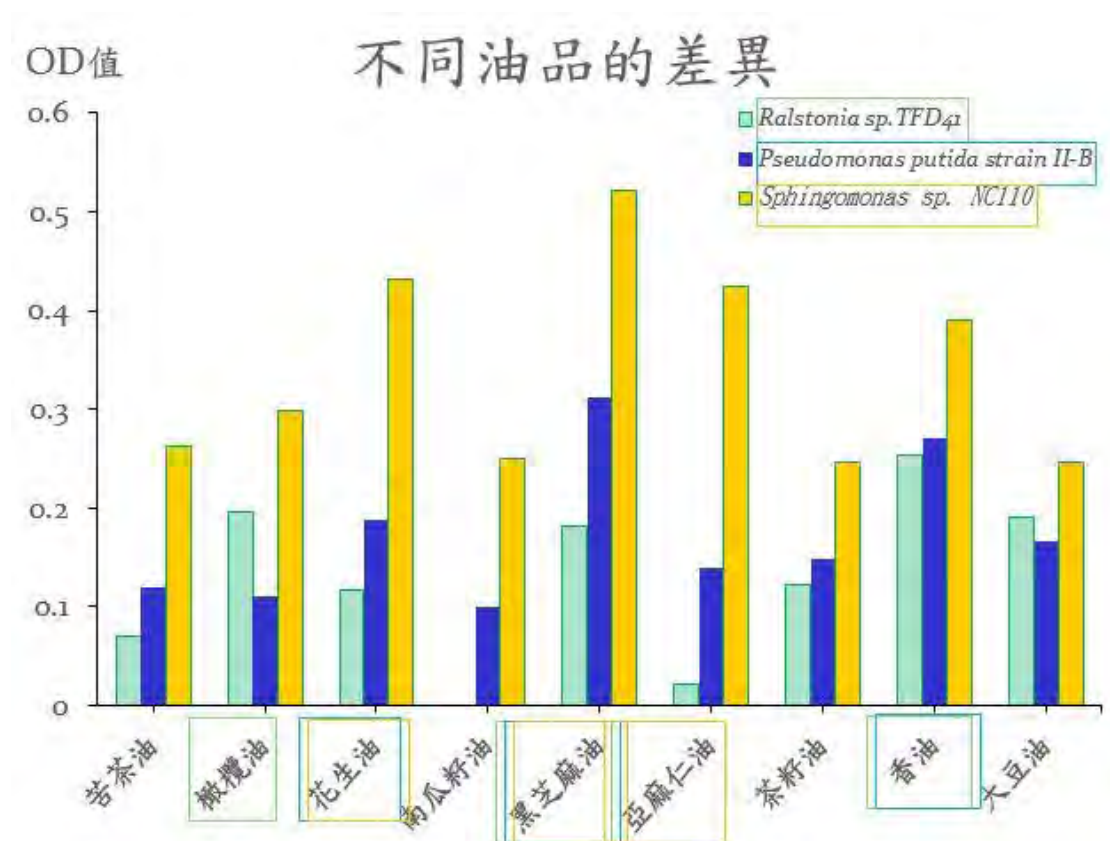
圖二十四、河水樣本中之菌種四比對結果

		
圖二十五、 <i>Ralstonia sp. TFD41</i>	圖二十六、 <i>Pseudomonas putida</i> strain II-B	圖二十七、 <i>Sphingomonas sp.</i> NC110

第三部分：嗜油菌在繁殖時的最佳生長環境

(一) 不同油品的差異

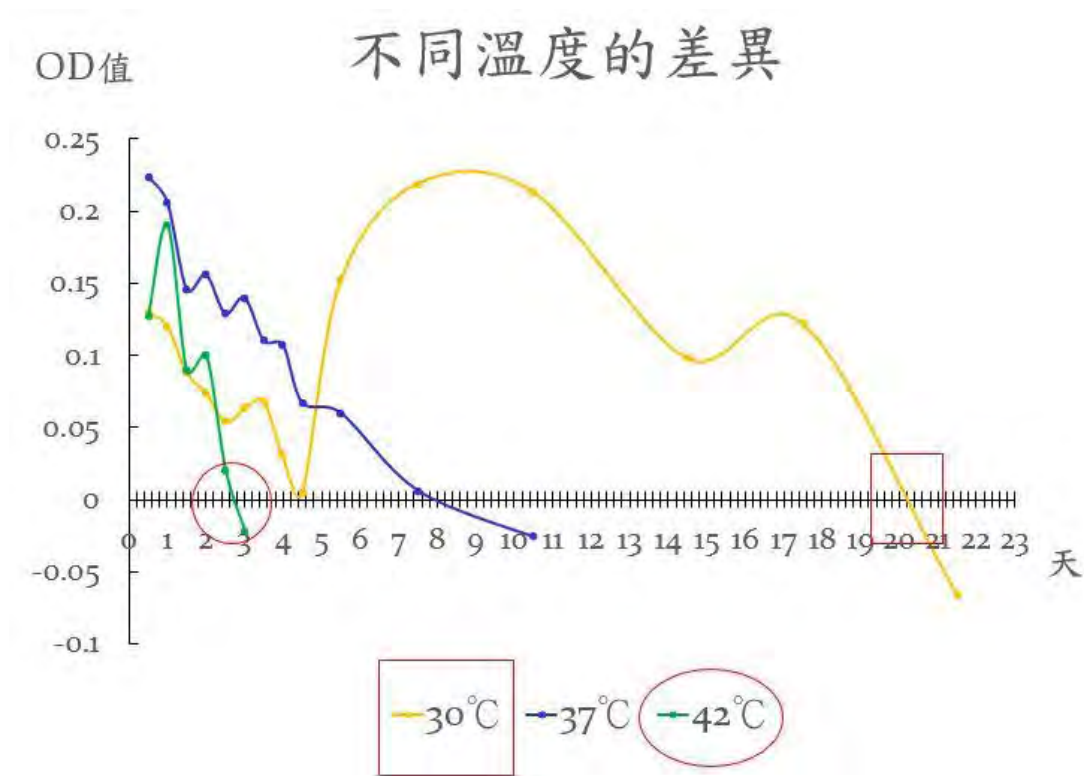
當細菌生長速度愈快時，會造成水樣中懸浮菌濃度變高而導致透光率下降升高 OD₆₀₀ 值，實驗結果如圖二十八所示，可知嗜油菌在九種不同種類的油當中，降解油的能力不盡相同，*Ralstonia sp.*TFD41 較為偏好的油依序為香油、橄欖油、黑芝麻油；*Pseudomonas putida strain II-B* 較為偏好的油依序為黑芝麻油、香油、花生油；*Sphingomonas sp.* NC110 較為偏好的油依序為黑芝麻油、花生油、亞麻仁油，而其中三種油皆較為偏好的油種為黑芝麻油和香油。而針對 3 菌種做出比對，可以發現 *Sphingomonas sp.* NC110 在所有九種油當中成長情形都較佳於 *Ralstonia sp.*TFD41、*Pseudomonas putida strain II-B*。因此後續溫度及酸鹼值實驗皆以 *Sphingomonas sp.* NC110 來進行測量。



圖二十八、在不同種類的油當中生長四天後各種菌的 OD₆₀₀ 值

(二) 不同溫度的差異

實驗選擇溫度為 30°C、37°C、42°C，測量 OD₆₀₀ 值時因著是測量與 sample 的透光值比較，使用的 sample 為單純的 MSM 培養基，所以當 OD₆₀₀ 值為負數時，表示測量物中的菌數下降到低於 sample，代表菌種死亡、測量結束。結果如圖二十九所示，*Sphingomonas* sp. NC11 在 42°C 時生長時間最短，時間約為 2.5 天；菌種在 37°C 時生長時間大約為 8 天；菌種在 30°C 時生長時間最長，大約為 21 天。

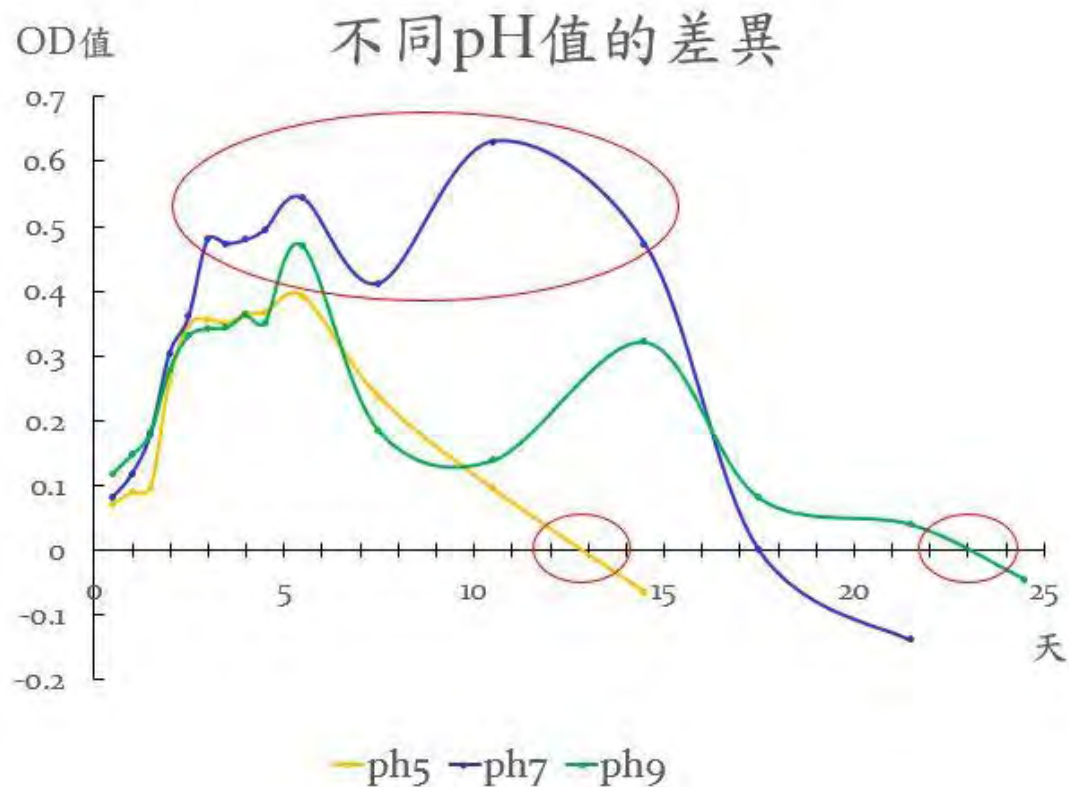


圖二十九、不同溫度環境下的 OD₆₀₀ 值

(三) 不同酸鹼值的差異

實驗酸鹼值選擇為 pH5、pH7、pH9，測量 OD₆₀₀ 值，當 OD₆₀₀ 值為負數時，表示測量物中的菌數下降到低於 sample，代表菌種死亡、測量結束。結果如圖三十所示，

Sphingomonas sp. NC110 在 pH9 時生長時間最長，為 23 天；pH7 時生長數目最多，時間為 18 天；pH5 時生長時間最短，為 13 天。



圖三十、不同酸鹼值下的 OD₆₀₀ 值

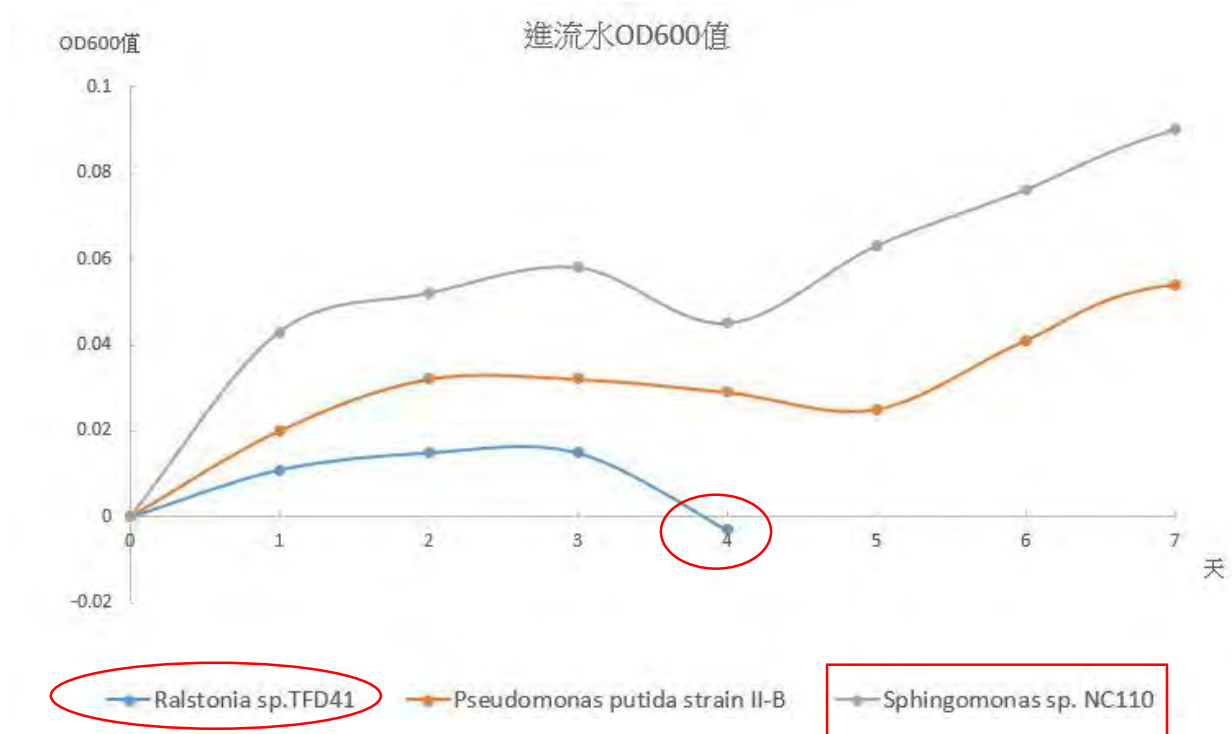
第四部分：實際處理污水的應用

(一) 菌種在污水中的生長情形

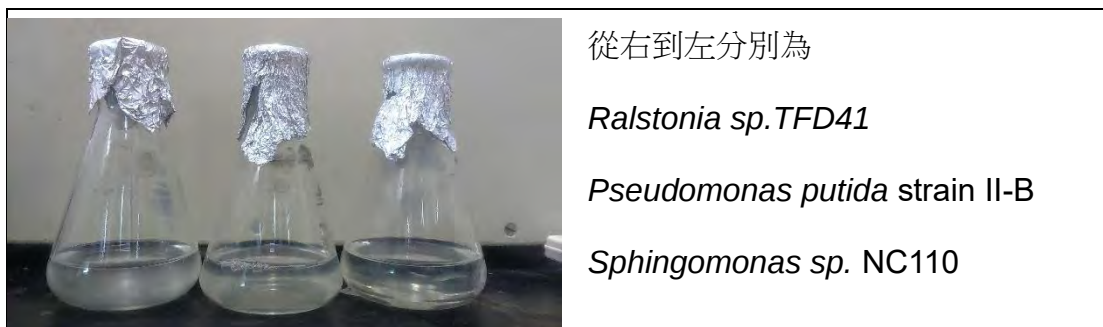
當細菌生長愈多時，會造成水樣中懸浮菌濃度變高而導致透光率下降，OD₆₀₀ 值升高。

1. 純菌培養

實驗結果如圖三十一到三十五所示，實驗選擇之菌種 *Ralstonia sp.TFD41*、*Pseudomonas putida strain II-B*、*Sphingomonas sp. NC110*，測量 OD₆₀₀ 值。*Ralstonia sp.TFD41* 的生長時間最短，在接菌後 4 天就死亡；*Sphingomonas sp. NC110* 的生長情形最好，OD₆₀₀ 的數值皆為三者中最高，也就是說 *Sphingomonas sp. NC110* 在污水中的菌數最多；從序列稀釋當中可以看出 *Pseudomonas putida strain II-B* 的生長速度為三種菌當中最快，在序列稀釋後 12 小時即可以清楚的在 LB plate 上觀察到 *Pseudomonas putida strain II-B* 的菌落。



圖三十一、菌種在污水中的生長情形



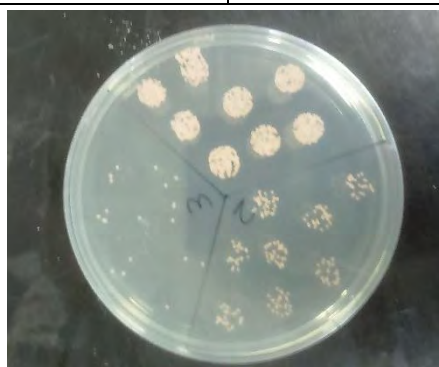
圖三十二、菌種在汙水中的生長情形



圖三十三、*Ralstonia sp. TFD41* 在序列稀釋 72 小時後可以清楚的在 LB plate 上觀察到菌落



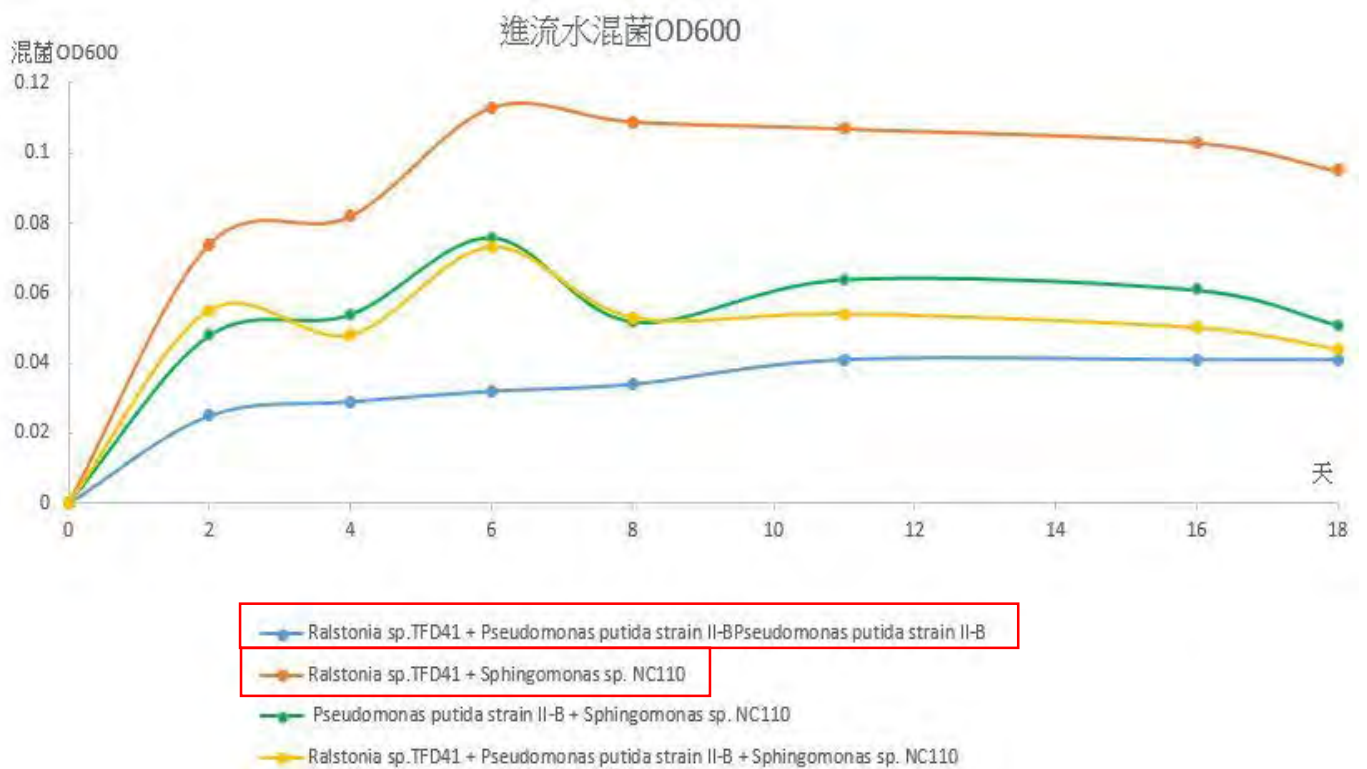
圖三十四、*Pseudomonas putida* strain II-B 在序列稀釋 12 小時後可以清楚的在 LB plate 上觀察到菌落



圖三十五、*Sphingomonas sp. NC110* 在序列稀釋 48 小時後可以清楚的在 LB plate 上觀察到菌落

2. 混菌培養

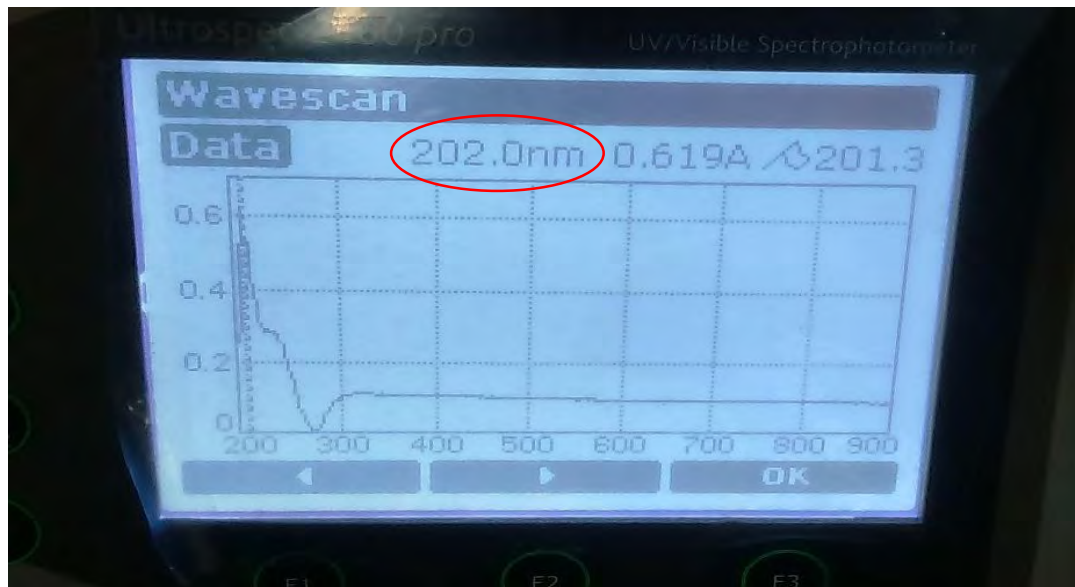
實驗結果如圖三十六所示，實驗選擇之菌種搭配為 *Ralstonia sp.TFD41* + *Pseudomonas putida strain II-B*、*Ralstonia sp.TFD41* + *Sphingomonas sp. NC110*、*Pseudomonas putida strain II-B* + *Sphingomonas sp. NC110*、*Ralstonia sp.TFD41* + *Pseudomonas putida strain II-B* + *Sphingomonas sp. NC110*，測量 OD₆₀₀ 值。*Ralstonia sp.TFD41* + *Sphingomonas sp. NC110* 的生長情形最為良好，OD₆₀₀ 值明顯的比其他三組來的高；而 *Ralstonia sp.TFD41* + *Pseudomonas putida strain II-B* 則是看的出其生長狀況平穩，沒有太大的波動。



圖三十六、混菌後在汙水中的生長情形

(二) 油的降解情形

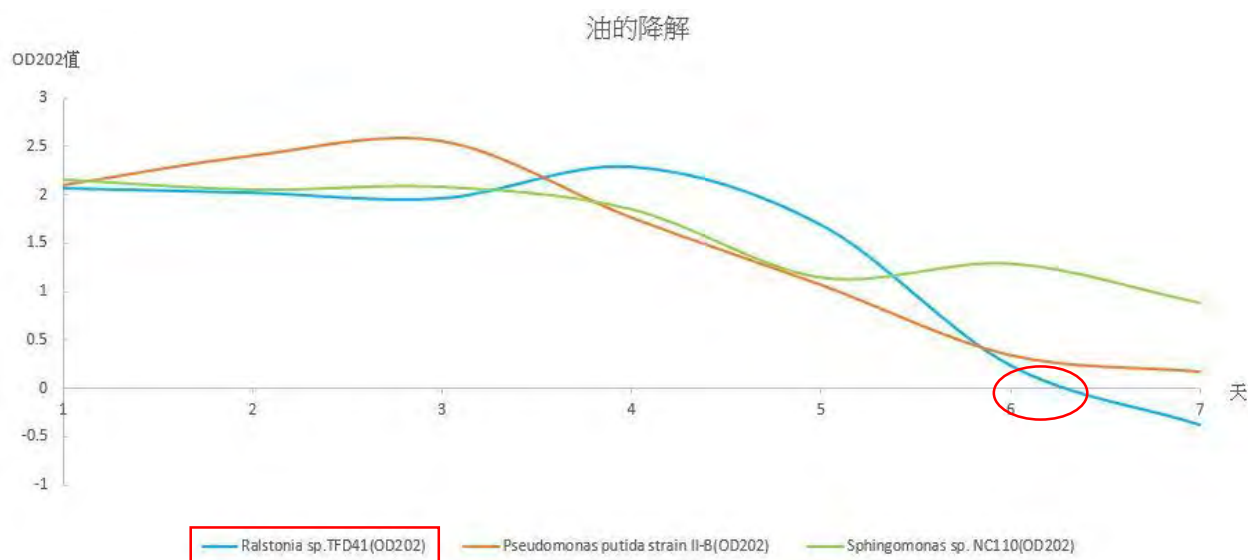
油在全波段掃描時發現了在波長為 202nm 時會出現最高值，結果如圖三十七，所以用 OD₂₀₂ 當作油被降解時的標準，此時就可以知道油的含量是否有下降，也就是 OD₂₀₂ 減少，而當 OD₂₀₂ 為負值時為油以被降解完成。



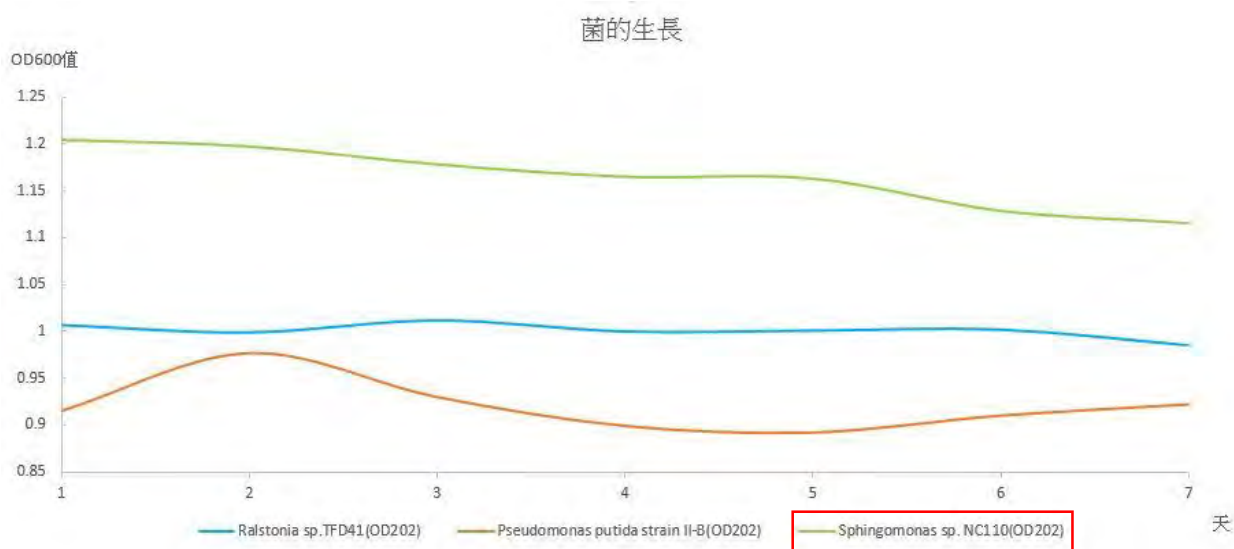
圖三十七、油的全波段掃描結果

1. 純菌培養

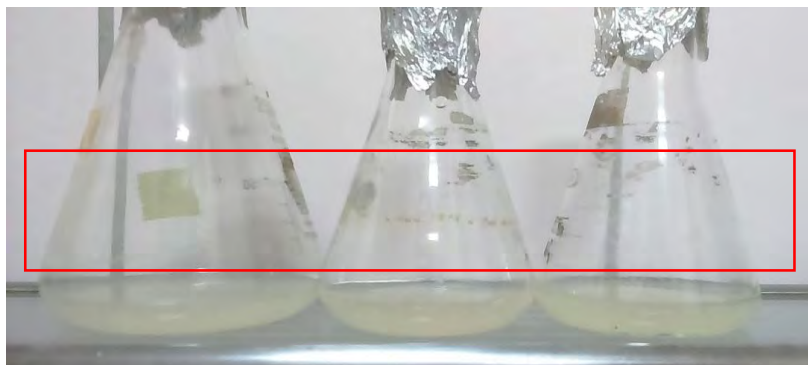
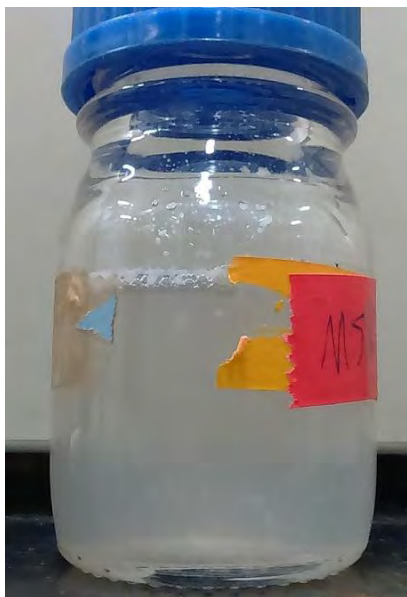
實驗結果如圖三十八所示，*Ralstonia sp.TFD41* 降解油的速度最快，約在 7 天時降解完 100ppm 的油。從圖三十九中可以發現 *Sphingomonas sp. NC110* 的生長情形最為良好，*Ralstonia sp.TFD41* 次之，*Pseudomonas putida strain II-B* 較差。圖四十、四十一中可以觀察到接過菌後的培養基明顯的比沒接菌的培養基顏色深。



圖三十八、油的降解情形



圖三十九、菌種生長情形



圖四十、1000ppm 油培養基
未接菌

圖四十一、菌種在 1000ppm 油培養基中的生長情形，從右
到左分別為 *Ralstonia sp.TFD41*、*Pseudomonas putida*
strain II-B、*Sphingomonas sp.* NC110



圖四十四、混菌後在汙水中的生長情形

從左到右分別為

Ralstonia sp.TFD41 + *Pseudomonas putida* strain II-B

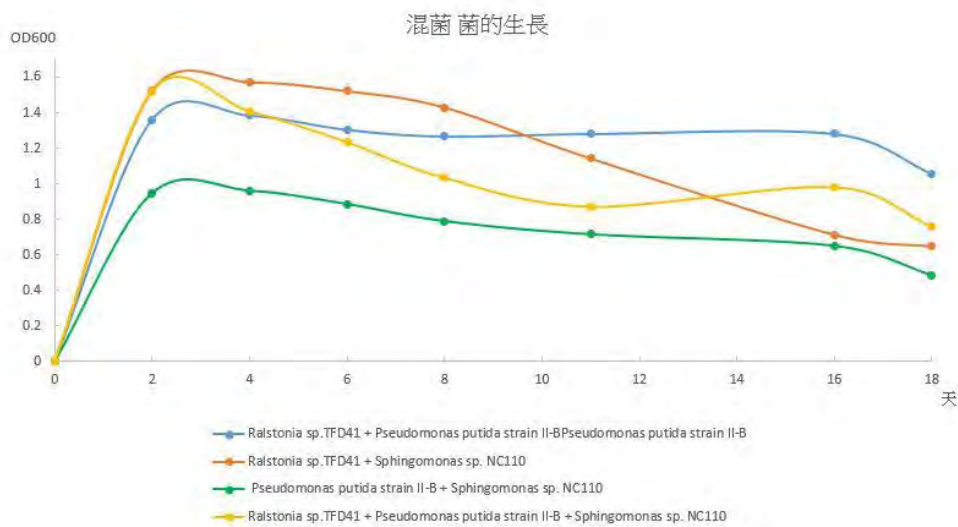
Ralstonia sp.TFD41 + *Sphingomonas sp.* NC110

Pseudomonas putida strain II-B + *Sphingomonas sp.* NC110

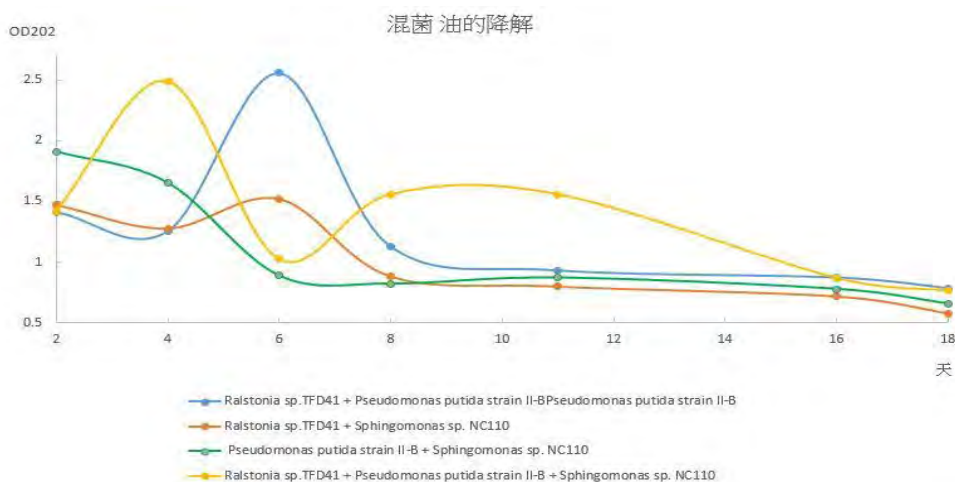
Ralstonia sp.TFD41 + *Pseudomonas putida* strain II-B + *Sphingomonas sp.* NC110

2. 混菌培養

實驗結果如圖四十二所示，混合菌中以 *Ralstonia sp.TFD41* + *Pseudomonas putida strain II-B* 的生長情形較為穩定且良好；*Pseudomonas putida strain II-B* + *Sphingomonas sp. NC110* 的生長情形則為四組中最差的。而在降解油的情形中，實驗結果如圖四十三，*Pseudomonas putida strain II-B* + *Sphingomonas sp. NC110* 的降解情形最為穩定且良好，其次為 *Ralstonia sp.TFD41* + *Sphingomonas sp. NC110*，而較為不良者為 *Ralstonia sp.TFD41* + *Pseudomonas putida strain II-B* + *Sphingomonas sp. NC110*。從圖四十四中，可以觀察到 *Ralstonia sp.TFD41* + *Sphingomonas sp. NC110* 的顏色偏紅。



圖四十二、油的降解情形



圖四十三、菌種生長情形

二、 討論

根據一開始的取樣地點淡水河下游的河水、旁邊有小吃攤的泥土、旁邊有菜市場的排水溝汙泥和墨西哥灣油田等地點，在河水、泥土和海洋中，皆有找到會嗜油的菌種，所以推測在環境當中，本來就會存在一些會嗜油的微生物，就像是目前在實驗中所找到一號菌 *Ralstonia sp.* TFD41、二號菌 *Pseudomonas putida strain II-B*、四號菌 *Sphingomonas sp.* NC110。但不同嗜油菌應該具有不同的特性，因此進行後續的油品種類、酸鹼值、溫度相關實驗。

在多種油品種類的實驗裡可以發現嗜油菌對油種是有偏好的，*Ralstonia sp.* TFD41、*Pseudomonas putida strain II-B*、*Sphingomonas sp.* NC110 三種菌偏好的油種不同，但是菌種在黑芝麻油和香油中，生長的情形皆較良好，之後經過資料收證後，發現了香油其實是使用白芝麻壓榨而成的白芝麻油，以後可以接續研究芝麻中所擁有的什麼成分，可以讓嗜油菌生長良好，以便之後培育菌種時使用。

在溫度的實驗裡其中的液態培養基的酸鹼值在一開始為中性 pH 7.4，由酸鹼值實驗裡發現為較適宜 *Sphingomonas sp.* NC110 生長的酸鹼值，但是在分別放入 30°C、37°C、42°C 裡面後，卻發現菌種在 42°C 時快速死亡，生長情形也沒有太大的高峰，所以猜測菌種在高溫的環境中生長時因著酵素被破壞，導致生長情形會變差，甚至死亡，之後有機會可以考慮將溫度下調，看看菌種在 30°C 以下的生長狀況，是否生長情形會更佳，還是哪種溫度以下也會發生和在高溫時碰到的問題一樣，生長情形會變差，快速死亡。

在酸鹼值實驗裡發現其實在 pH5、pH7、pH9 當中菌種的生長情形皆不錯，可能是因為 pH5、pH7、pH9 的培養環境皆為 30°C，而 30°C 在 30°C、37°C、42°C 裡面又為生長狀況最佳的溫度。但根據實驗裡發現 pH5、pH9 的生長情形相似，只是可能因為 pH5 比 pH9 更早用完營養源，導致表現出 pH5 的 OD 值比 pH9 的 OD 值更早呈現負數，菌種死亡。顯示酸鹼值不同的環境對嗜油菌的影響可能沒有嗜油菌在不同溫度的環境中影響明顯。

嗜油菌在汙水中生長和 1000ppm 油的實驗中，使用了純菌種 *Ralstonia sp.* TFD41、

Pseudomonas putida strain II-B、*Sphingomonas* sp. NC110 三種，之後嘗試將菌種混合後再做測量，像是 *Ralstonia* sp. TFD41 加上 *Pseudomonas putida* strain II-B、*Ralstonia* sp. TFD41 加上 *Sphingomonas* sp. NC110、*Pseudomonas putida* strain II-B 加上 *Sphingomonas* sp. NC110、*Ralstonia* sp. TFD41 加上 *Pseudomonas putida* strain II-B 加上 *Sphingomonas* sp. NC110 來進行實驗，觀察混菌種的生長情況後，發現原先所認為加越多種菌，應該降解情形會更為良好，但是結果卻出乎意料，*Ralstonia* sp. TFD41 + *Sphingomonas* sp. NC110 的生長情形反而是最為良好的，而三種菌養在同一個培養基以後，菌種的生長情形與降解油污的情形皆會受到干擾，導致效能變差，所以在選擇菌種做油污降解時可以選擇使用 *Ralstonia* sp. TFD41 + *Sphingomonas* sp. NC110 的混合菌，此兩種菌的混合可使其生長與降解效率大於其單獨使用時。

肆、 結論與應用

一、 結論

- (一) 目前已篩選出三種具有分解油污的能力的菌種，分別為 *Ralstonia sp.* TFD41、*Pseudomonas putida strain II-B*、*Sphingomonas sp.* NC110。
- (二) *Ralstonia sp.* TFD41、*Pseudomonas putida strain II-B*、*Sphingomonas sp.* NC110 分別有自己所偏好的油種，而三種菌皆較為偏好的油種為黑芝麻油和香油（白芝麻油）。
- (三) 在九種油當中 *Sphingomonas sp.* NC110 的生長情形最為良好。
- (四) *Sphingomonas sp.* NC110 較佳的生長環境為 30℃，pH7。
- (五) 在汙水當中 *Sphingomonas sp.* NC110 的生長數目最多；*Ralstonia sp.* TFD41 的生長數目最少。
- (六) *Pseudomonas putida strain II-B* 的生長速度最快；*Ralstonia sp.* TFD41 的生長速度最慢。
- (七) 油在波長 202nm 時，會出現最高值。
- (八) 在三種菌當中降解油速度最快的菌種為 *Ralstonia sp.* TFD41。
- (九) 在家庭汙水中 *Ralstonia sp.* TFD41 + *Pseudomonas putida strain II-B* 的生長狀況最穩定
- (十) 三種菌 *Ralstonia sp.* TFD41、*Pseudomonas putida strain II-B*、*Sphingomonas sp.* NC110 同時一起做培養時效率不彰。
- (十一) *Ralstonia sp.* TFD41 + *Sphingomonas sp.* NC110 的生長、降解情形的平均效率較佳於其他三種混合菌。

二、 應用

- (一) 嗜油菌在未來可以放入水溝當中，使得水溝在大雨時不會因為油塊的堵塞而發生淹水。
- (二) 嗜油菌可以放在汙水處理廠中，使其降解汙水中的油污，減少之後排放的汙水中油的含量。
- (三) 嗜油菌可以放入河流或海洋中，以自然的方式降解浮於水面上的油污，減少環境中的油污汙染，還給生物一個乾淨的生活環境。

伍、 參考文獻

王玉如，2003，油廠廢水淨化資源利用，國立新竹師範學院 數理研究所碩士論文 p.8-p.11、p.18、p.22-p.25、p.102-p.108

簡錦樹、侯幸怡、朱怡靜、劉家全、劉建宏，2005.08.01-2006.10.31，嗜油菌對於石油碳氫化合物之降解及嗜油菌酵素純化與特性化，成功大學 地球科學系，行政院國家科學委員會專題研究計畫

簡錦樹、馬柔堤、何曼妮、王欣薇、侯幸怡、劉建宏，2007.08.01-2008.07.31，嗜油菌對碳氫化合物降解之機制及運用，成功大學 地球科學系，行政院國家科學委員會補助專題研究計畫

簡錦樹、侯幸怡、劉建宏、馬柔堤，2008.08.01-2009.10.31，嗜油菌對碳氫化合物降解之機制及運用 II，成功大學 地球科學系，行政院國家科學委員會專題研究計畫

簡錦樹，2009.08.01-2010.10.31，嗜油菌對碳氫化合物降解之機制及運用 III，成功大學地球科學系，行政院國家科學委員會專題研究計畫

劉家銘，2005，沙拉油分解菌之分離與特性研究，國立中興大學 土壤環境科學系碩士論文 p.8-p.13、p.16-p.24、p.68-p.69

網路資料一：“油切”一下！廚房減污三撇步，廢油回收不亂倒

<http://bola.gov.taipei/fp.asp?fpape=cp&xltem=76156443&ctNode=13420&mp=100008>

網路資料二：水污染防治 <http://www.ey.gov.tw/cp.aspx?n=69C1DDC0E5096D08>

Ohenhen E.Regina、Ikolo F.Emuobonuvie、Uzeh E.Roseline，2006，Growth Responses of Bacterial Isolates on Various Concentrations of Crude Oil，The Journal of American Science，2(2)，p.13-p.16

Weimin sun、Yiran Dong、Pin Gao、Meiyan Fu、Kaiwen Ta、and Jiwei Li，2015，

Microbial Communities inhabiting oil-contaminated soils from two major oilfields in Northern China: Implications for actions for active petroleum-degrading capacity ,
Journal of Microbiology , vol.53 NO.6 , p.371-378

【評語】 180009

本研究採集不同地點之廢污水及泥土進行分離，篩出嗜油菌，嘗試以不同油品與菌株進行反應與降解，台灣的小吃與攤販極多，也容易造成污水下水道中油汙污染的情形，本研究針對時事問題加以解決，值得鼓勵！