

2017 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 070005

參展科別 微生物學

作品名稱 除油利器，天然的最好

--環境中具降解油污能力之微生物研究

得獎獎項 大會獎：三等獎

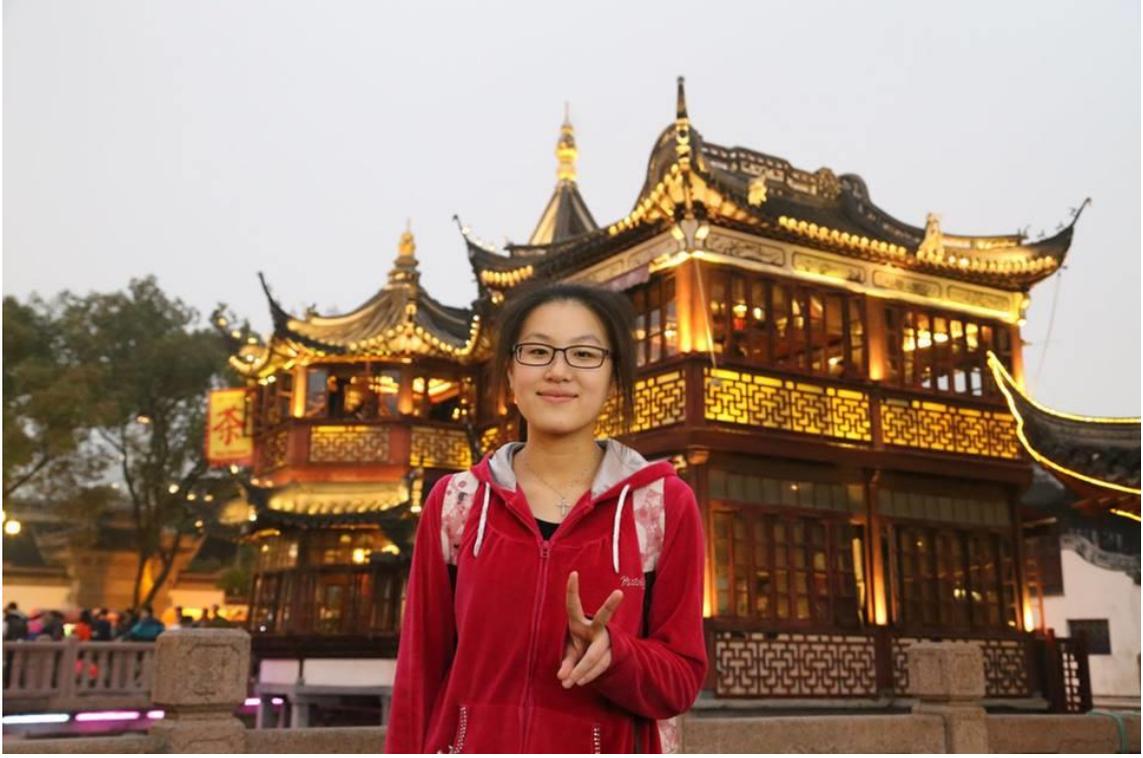
就讀學校 臺北市立麗山高級中學

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、油污

作者簡介



我是林筠倩，目前就讀台北市立麗山高級中學，有一次看到一篇關於美國墨西哥灣油井外露的新聞，科學家在那附近發現一種可以分解油汙的菌種，因而對這些厲害的微生物產生興趣。而我就想在我們生活的環境中是不是也有這種可以分解油汙的細菌？所以在高中時選擇生物專題來進行研究。在研究中，每當遇到問題時，我不是直接去問他人，而是自己先找文獻資料，看能否自行解決，這讓我學到獨力解決問題的能力，很高興可以利用國際科展來分享我的成果。

摘要

目前研究的嗜油菌主要是分解石油(碳氫化合物),不過從生活中所排出的油(三酸甘油酯),也是一大污染源。本研究目的為篩選可分解三酸甘油酯之微生物,並探討其特性及降解油污的能力。從有油污的環境分離出三種對於日常生活中的油污具降解效果的菌株,利用 16S ribosomal RNA gene 進行菌種分析鑑定為 *Ralstonia sp.* TFD41、*Pseudomonas putida* strain II-B、*Sphingomonas sp.* NC110。*Ralstonia sp.* TFD41 較佳的生長環境為 30°C、pH8, 偏鹼, 革蘭氏陰性菌; *Pseudomonas putida* strain II-B 較佳的生長環境為 30°C、pH6-10, 偏鹼, 革蘭氏陰性菌; *Sphingomonas sp.* NC110 最佳生長環境為 30°C、pH4-8, 偏酸, 革蘭氏陰性菌。而菌種在炸時越長的油中生長情形越差。而在家庭污水中的生長菌數最多的為 *Sphingomonas sp.* NC110M。放入 1000ppm 油的培養基中, 以 *Sphingomonas sp.* NC110 的降解油污的能力為最佳、*Ralstonia sp.* TFD41 的降解速度最快。在家庭污水中 *Ralstonia sp.* TFD41 + *Pseudomonas putida* strain II-B 的生長狀況最穩定。未來預期能培養嗜油菌, 將其放回環境中, 降解環境中的油污, 以減少油污對於環境的污染, 還給生物乾淨的生活環境。

Abstract

In this experiment, I found three species of bacteria which could break out oil. They were *Ralstonia sp.* TFD41, *Pseudomonas putida* strain II-B, *Sphingomonas sp.* NC110. Among them, *Ralstonia sp.* TFD41 grew well in pH=8, 30°C, Gram(-). *Pseudomonas putida* strain II-B grew well in pH=6-10, 30°C, Gram(-). *Sphingomonas sp.* NC110 grew well in pH=7, 30°C, Gram(-). When I put three species of bacteria 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 break out oil. *Ralstonia sp.* TFD41 had the best rate to break out oil. Then I mixed them in 1000 ppm oil culture medium. I found *Ralstonia sp.* TFD41 plus *Pseudomonas putida* strain II-B plus *Sphingomonas sp.* NC110 growing together didn't have synergistic effect, but *Ralstonia sp.* TFD41 plus *Pseudomonas putida* strain II-B grew the best. In the future, we will put them in somewhere which has oil.

前言

一、研究動機

油汙染是現今會遇到的汙染問題之一，而其中家庭所產生的油汙，會隨著廢水排入水溝中，此時就容易造成水溝堵塞，像是：台北環保局從水溝中取出來的油塊，有些大小跟紅肉西瓜一樣大(如右圖所示)，此時如果又遭逢大雨，就可能會導致排水不良而淹水。(網路資料一)



當油汙若沒有處理直接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威脅，因油汙會浮在水面上擋住空氣，導致許多魚蝦會因為無法呼吸而死亡，而台北市環保局統計分析：一公升食用油若直接排放到河中，是需要二十萬倍的水來稀釋，才可以恢復到原先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汙的菌——嗜油菌。我就想說既然嗜油菌能降解海上原油的油汙，那是不是在大自然的環境中也會有能降解其他非石油類油汙的微生物，如果尋找到的話是否也可使環境中的油汙被其降解，以降低油汙對環境的影響。

二、研究目的

油污染是現今的主要汙染之一。本實驗希望藉由從生活環境中篩出具有分解油汙能力的菌種，鑑定出其分類地位，進一步分析其最佳生長或分解油汙的環境需求，希望未來能放入水溝、土壤、河川中，使菌種進行油汙降解，降低油汙對環境的傷害。

三、研究假說

1. 有油汙的環境可找到具分解油汙能力的嗜油菌
2. 嗜油菌種類可能不只一種，其生活條件及活性應該有所差異
 - (1) 不同油品中嗜油菌生長應有差異
 - (2) 不同溫度下嗜油菌生長應有差異
 - (3) 不同酸鹼值下嗜油菌生長應有差異
 - (4) 不同的炸時導致嗜油菌生長應有差異
3. 嗜油菌的分解油汙能力應該具有加乘效應，即加入越多的菌種，其分解油汙的狀況越好。

研究方法和過程

本實驗架構可分為四大部分，如圖一至圖四所示，以下針對各部分進行說明

第一部分：尋找具嗜油能力的菌種

(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）。

(二)分離菌種

1. 河水樣本

- (1) 取河水 $50\ \mu\ell$
- (2) 塗盤 (LA 培養基)
- (3) 放入 30°C 的恆溫箱中培養

2. 汙泥樣本

- (1) 取汙泥 0.5g + 蒸餾水 $700\ \mu\ell$
- (2) 使用振盪器搖晃 24 小時
- (3) 取上層液 $10\ \mu\ell$
- (4) 塗盤 (LA 培養基)
- (5) 放入 30°C 的恆溫箱中培養

3. 泥土樣本

- (1) 取泥土 0.5g + 蒸餾水 $700\ \mu\ell$
- (2) 使用振盪器搖晃 24 小時
- (3) 取上層液 $10\ \mu\ell$ + 水 $90\ \mu\ell$ 稀釋
- (4) 塗盤 (LA 培養基)
- (5) 放入 30°C 的恆溫箱中培養

第二部分：確定菌種的分類地位

本實驗中若未標示油種，油種即為「得意的一天健康十穀頂級調和油」

(一)測試

1. 製作 MSM 培養基(表二)

2. 將 MSM 製成固態培養基

20 $\mu\ell$ 油 + 30 $\mu\ell$ Tween 20 + 200ml MSM + 3g Agar

3. 取原先生長在 LB 培養基上的菌，在 MSM 油培養基上畫線

4. 放入 30°C 的恆溫箱中培養

(二)繼代培養

(三)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. 抽取已知具有嗜油能力的菌種 DNA

(1) 將繼代培養成功的菌種離心 (轉速 13500RPM, 5min)

(2) 去上層液後加入 200 $\mu\ell$ Extraction Solution + 20 $\mu\ell$

proteinase K solution

(3) 56°C 水浴 1 小時

(4) 加入 2 $\mu\ell$ RNase solution 放在室溫當中 5 分鐘

(5) 加入 200 $\mu\ell$ Binding solution 放在 70°C 的加熱板上加熱 10 分鐘

(6) 加入 200 $\mu\ell$ 99%酒精

(7) 轉移到管柱，離心，去下層液

(8) 加入 300 $\mu\ell$ Binding solution，離心，去下層液

(9) 加入 700 $\mu\ell$ Wash solution，離心，去下層液

(10)加入 700 $\mu\ell$ Wash solution，離心，去下層液

- (11) 高速離心後留下管柱
- (12) 加入 20 $\mu\ell$ Elution solution (60°C)
- (13) 靜置 10 分鐘後，離心
2. 膠體電泳，確定是否抽到菌的 DNA
 - (1) 膠：1%--0.2g Agarose + 20 ml 1*TAE
 - (2) 30 分鐘，100V
 - (3) 1 $\mu\ell$ DNA + 染劑
3. 16S rRNA 基因序列隻聚合酶連鎖反應
4. 膠體電泳，確定 PCR 是否有成功
5. 回收電泳膠體之 DNA
6. 送基隆米克斯實驗室進行 16S ribosomal RNA gene 序列分析比對
以確定菌種

第三部分：嗜油菌的特性分析

(一)不同油品的差異：使用以下十種油品（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)、豬油)進行相關油品測試嗜油菌的活性，並測量菌種在植物與動物油中生長是否有差異，豬油事先使用濾紙過濾掉雜質後，再進行測量。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 $5.4 \mu\text{l}$ 油 + $8.1 \mu\text{l}$ Tween20 + 200 mlMSM，3 ml/1 管
2. 滅菌，接菌（接種具有嗜油能力的菌種）
3. 放入 30°C 的恆溫箱中振盪培養 4 天
4. 測 OD_{600} 值

(二)不同溫度下的差異：

1. 調配液態培養基 $18 \mu\text{l}$ 油 + $27 \mu\text{l}$ Tween20 + 90 mlMSM，各 3 瓶
2. 滅菌，接菌（接種在油品種類中表現最佳的菌種）
3. 分別放入 30°C 、 37°C 、 42°C 的恆溫箱中振盪培養
4. 測 OD_{600} 值

(三)不同酸鹼值下的差異：

1. 調配 LB 的液態培養基
2. 利用 NaOH 和 HCl，將培養基的酸鹼值調為 pH2、4、6、7、8、10、12
3. 滅菌，接菌（接種具有嗜油能力的菌種）
4. 放入 30°C 的恆溫箱中振盪培養
5. 測 OD_{600} 值

(四)菌種在炸前油與炸後油的生長情形比較

1. 至臺北市內湖區的炸雞店取得炸前、炸後油 1(油種為美食家好炸油，屬於棕梠油)。炸後油分別從兩家不同的炸雞店取得，以炸時長短命名為炸後油 1(時間短)、炸後油 2(時間長)。
2. 將炸後油 1、炸後油 2 用濾紙過濾去除雜質。
3. 製作 1000ppm MSM 油液態培養基，滅菌
 $50\text{ml MSM} + 50\mu\ell \text{油} + 90\mu\ell \text{Tween20} *4 \text{管}$
4. 將具嗜油能力的菌種接入培養基中
5. 放入 30°C 的恆溫箱中振盪培養
6. 測量 OD₆₀₀ 值，以便於統計菌數

(五)革蘭氏染色

1. 將具有嗜油能力的菌種每種分別製成一片抹片
2. 以 crystal violet 染色一分鐘，染色後以自來水輕緩地將多餘染劑洗去
3. 以 Gram's iodine 染色一分鐘，染色後以自來水輕緩地將多餘染劑洗去
4. 滴數滴退染劑(95% ethyl alcohol)，直到洗出液不再有藍色出現為止，立刻以自來水輕緩地將酒精洗去
5. 以 safranin 染色一分鐘，染色後以自來水輕緩地將多餘染劑洗去
6. 一擦手紙將多餘的水分吸乾
7. 放置於顯微鏡下觀察，若呈藍紫色則為革蘭氏陽性菌，若橙紅色則為陰性菌。

第四部分：菌種應用情形

(一)純菌培養—汙水

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. 將具嗜油能力的菌種接入進流水中，測量 OD₆₀₀ 值

(二)純菌培養—培養基

1. 製作 1000ppm MSM 油液態培養基
 - (1) 160ml MSM + 160 μ l 油 + 285 μ l Tween20
 - (2) 分裝成 3 瓶，滅菌
 - (3) 將具嗜油能力的菌種接入培養基中
2. 使用全波長掃描 1000ppm MSM 油培養基，尋找出現高峰的波長當作油污降解時的標準
3. 測量 OD₆₀₀ 值，以便於統計菌數
4. 測量 1000ppm 油高峰 OD 值，以便於統計剩餘油的含量

(三)混菌培養—汙水

1. 將具嗜油能力的菌種每兩種菌混合、三種菌混合，接入汙水中
2. 測量 OD₆₀₀ 值

(四)混菌培養—培養基

1. 製作 1000ppm MSM 油液態培養基，滅菌
$$100\text{ml MSM} + 100\ \mu\text{l 油} + 180\ \mu\text{l Tween20} *4\ \text{瓶}$$
2. 將具嗜油能力的菌種每兩種菌混合接菌、三種菌混合接菌
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

研究結果與討論

一、研究結果

第一部分：尋找具嗜油能力的菌種

初步採樣及篩選菌種結果如圖十至圖十三所示，在旁邊有小吃攤的泥土 1 中，篩出三種菌種；在採樣地點淡水河下游篩選出一種菌種，而在旁邊有小吃攤的泥土 2 和旁邊有菜市場的排水溝汙泥中，沒有篩出任何菌。顯示嗜油菌並不一定可存活於油污的環境中。

第二部分：確定菌種

在泥土樣本中篩出三種不同的菌種，河水樣本中出到一種菌種，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，發現三號菌無法存活於 MSM 油 plate，表示無法分解油汙進行生長，故可知四種菌中僅有三種菌種能倚靠油為生(表三)，之後進行 DNA 萃取、PCR、電泳，實驗結果如圖十九至圖二十一所示，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、圖二十八，但經與已知資料比對後發現 *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、圖二十九。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、三十。

第三部分：嗜油菌的特性

(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，實驗結果如圖三十一所示，可知嗜油菌在十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、大豆油；*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。而針對三菌種做出比對，可以發現 *Sphingomonas sp.* NC110 在所有十種油當中成長情形都較佳於 *Ralstonia sp.* TFD41、*Pseudomonas putida* strain II-B。因此後續溫度實驗以 *Sphingomonas sp.* NC110 來進行測量。

而從圖三十一中可以發現 *Ralstonia sp.* TFD41 在動物油，也就是豬油中生長情形差，四天後即死亡。*Sphingomonas sp.* NC110 在豬油中成長情形還是較佳於 *Ralstonia sp.* TFD41、*Pseudomonas putida* strain II-B。

(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。結果如圖三十二所示，*Sphingomonas sp.* NC110 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。

(三)不同酸鹼值的差異

實驗酸鹼值選擇為 pH2、4、6、7、8、10、12，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。結果如圖三十三至圖三十五所示，*Ralstonia sp.* TFD41 較佳的生長酸鹼值為 pH8，偏鹼；*Pseudomonas putida* strain II-B 較佳的生長酸鹼值為 pH6-10，偏鹼；*Sphingomonas sp.* NC110 較佳的生長酸鹼值為 pH4-8，偏酸。

(四)菌種在炸前油與炸後油的生長情形比較

實驗結果由圖四十六可知，*Ralstonia sp.* TFD41 在炸前、炸後油 1 中生長

情形皆差，*Sphingomonas sp.* NC110 的在炸前、炸後油 1 中生長情形皆較佳於 *Ralstonia sp.* TFD41、*Pseudomonas putida* strain II-B 在炸前、炸後油 1 中的生長情形。並且由圖四十六中可見，菌種在炸前油中的生長情形接較差於炸後油。

實驗結果由圖四十七可知，*Ralstonia sp.* TFD41 在炸後油 1、炸後油 2 中生長情形皆差，*Sphingomonas sp.* NC110 的在炸後油 1、炸後油 2 中生長情形皆較佳於 *Ralstonia sp.* TFD41、*Pseudomonas putida* strain II-B 在炸後油 1、炸後油 2 中的生長情形。但從圖四十七中又可看見，菌種在炸後油 1(炸時短)中的生長情形較佳於炸後油 2(炸時長)。

(五)革蘭氏染色

在顯微鏡下觀察後如圖四十三至圖四十五可知，*Ralstonia sp.* TFD41 為革蘭氏陰性菌；*Pseudomonas putida* strain II-B 革蘭氏陰性菌；*Sphingomonas sp.* NC110 革蘭氏陰性菌。

第四部分：菌種應用情形

(一)菌種在汙水中的生長情形

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

實驗結果如圖三十六所示，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 在汙水中的菌數最多；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。

2. 混菌培養

實驗結果如圖三十七所示，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。

(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，結果如圖三十八，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。

1. 純菌培養

實驗結果如圖三十九所示，*Ralstonia sp.* TFD41 降解油的速度最快，約在 7 天時降解完 100ppm 的油。從圖四十中可以發現 *Sphingomonas sp.* NC110 的生長情形最為良好，*Ralstonia sp.* TFD41 次之，*Pseudomonas putida* strain II-B 較差。

2. 混菌培養

實驗結果如圖四十一所示，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，實驗結果如圖四十二，*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。

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不同嗜油菌種對油種是有所偏好的，*Ralstonia sp.* TFD41、*Pseudomonas putida* strain II-B、*Sphingomonas sp.* NC110 三種菌偏好的油種不同，但是三種菌種在黑芝麻油或香油中，生長的情形皆較良好，之後經過資料收證，發現了香油是以白芝麻壓榨而成的油，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。動物油與植物油的比較後可發現，*Ralstonia sp.* TFD41 在豬油中生長極差，推測可能其無法順利分解動物油的脂肪，*Pseudomonas putida* strain II-B、*Sphingomonas sp.* NC110 在豬油中的生長情形也是十種不同油中最差的，故之後可接續研究，在動物油中是否有什麼物質會影響到菌種的生長。

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在適宜 *Sphingomonas sp.* NC110 生長的酸鹼值範圍之中，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三種菌的偏好是有差異的，但是幾乎都還是有在

中性附近，沒有出現極端偏酸或偏鹼。

從菌種在炸前油與炸後油中的生長情形，可推測當油被炸過，其內可能會殘留一些食物為例，導致菌種在炸後油內的生長情形佳於在炸前油內的生長情形。而從菌種在炸後油 1 與炸後油 2 中的生長情形，又可推測當油被炸得越久，油可能變質的越厲害，因而導致菌種的生長情形越差。

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汙的情形皆會受到干擾，導致效能變差，所以在選擇菌種做油汙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。

結論與應用

一、結論

1. 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。
2. *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含有芝麻的油。
3. *Ralstonia sp.* TFD41、*Pseudomonas putida* strain II-B、*Sphingomonas sp.* NC110 在動物油中的生長情形皆較差於植物油。
4. 油種測試實驗當中以 *Sphingomonas sp.* NC110 的生長情形最為良好。
5. *Sphingomonas sp.* NC110 較佳的生長環境為 30°C，較佳的生長酸鹼值為 pH4-8，偏酸，為革蘭氏陰性菌。
6. *Ralstonia sp.* TFD41 較佳的生長酸鹼值為 pH8，偏鹼，為革蘭氏陰性菌。
7. *Pseudomonas putida* strain II-B 較佳的生長酸鹼值為 pH6-10，偏鹼，為革蘭氏陰性菌。
8. 當還沒炸過的油與炸過後的油比較，可以發現菌種數目為：沒炸過的油 < 炸過後的油
9. 當炸過後的油比較，可以發現菌種數目為：炸時短的油 > 炸時長的油
10. 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。*Pseudomonas putida* strain II-B 的生長速度最快；*Ralstonia sp.* TFD41 的生長速度最慢。
11. MSM 油培養基在波長 202nm 時，會出現最高值。在三種菌當中降解油速度最快的菌種為 *Ralstonia sp.* TFD41。
12. 在家庭汙水中 *Ralstonia sp.* TFD41 + *Pseudomonas putida* strain II-B 的生長狀況最穩定
13. 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。

14. *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)嗜油菌可以放在汗水處理廠中，使其降解汗水中的油污，減少之後排放的汗水中油的含量。
- (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。

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?fpage=cp&xItem=76156443&ctNode=13420&mp=100008>

網路資料二：水汙染防治 <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 najor
oilfields in Northern China: Implications for actions for active
petroleum-degrading capacity 、 Journal of Microbiology 、 vol.53 NO.6 、
p.371-378

附錄

表一、實驗器材

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

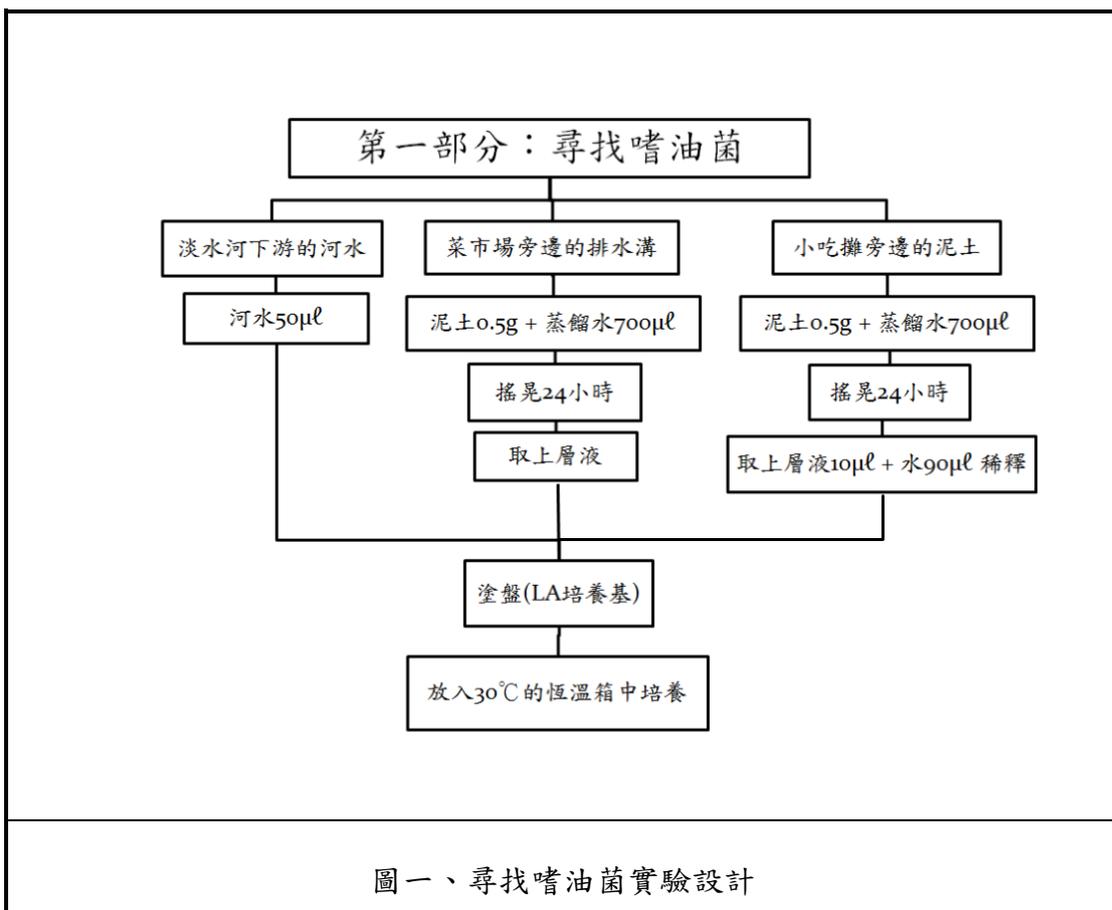
表二、MSM 培養基(1L)

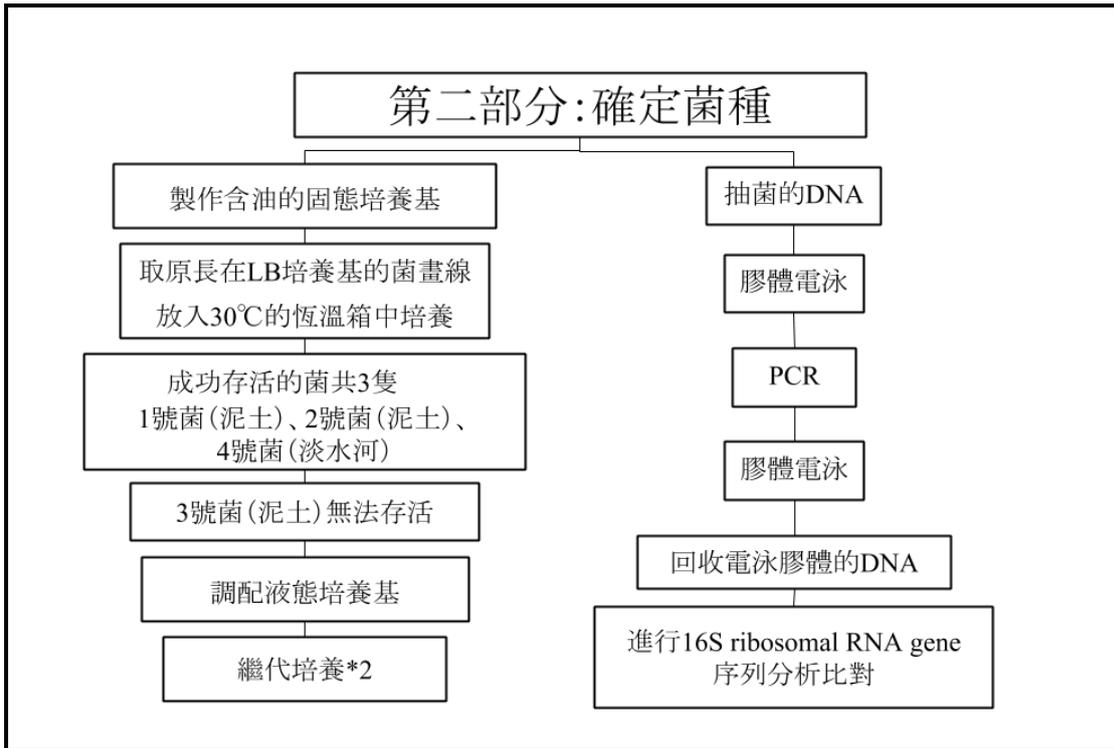
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1000	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5
NH_2CONH_2	1000	$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10
KH_2PO_4	1000	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10
NaCl	100	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.5
CaCl_2	40	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	40 (mg)

表三

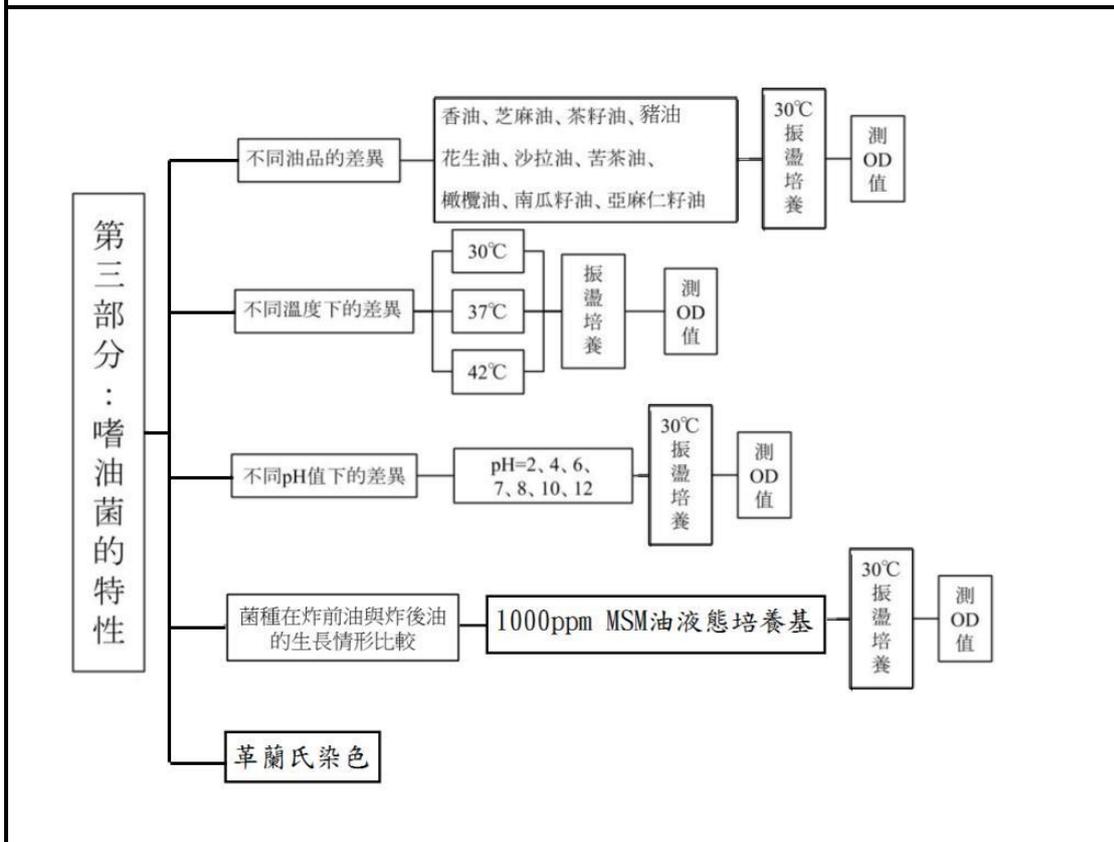
取樣地點 菌種	小吃攤旁 泥土 1	小吃攤旁 泥土 2	菜市場 旁泥土	淡水河 下游河水
菌種 1	○	X	X	X
菌種 2	○	X	X	X
菌種 3	○	X	X	X
菌種 4	X	X	X	○

研究架構

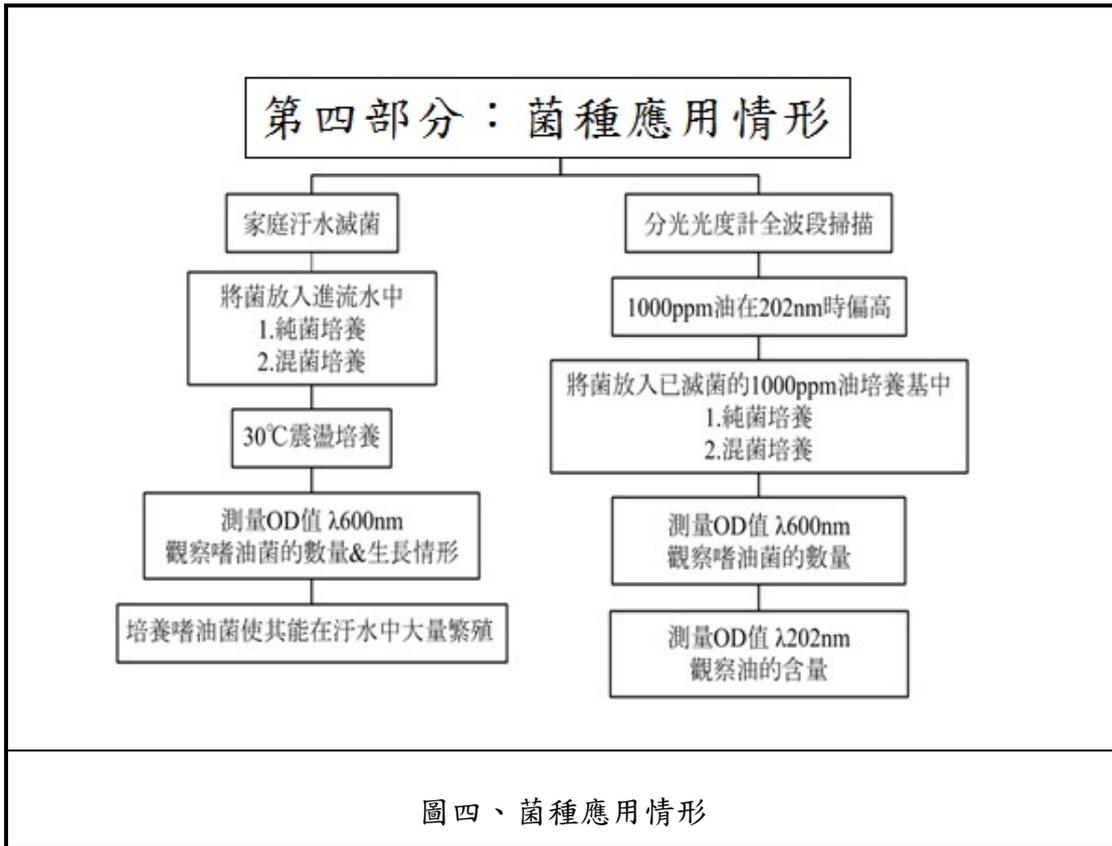




圖二、確定菌種



圖三、嗜油菌降解油污時可能的影響因素



圖五、河水樣本



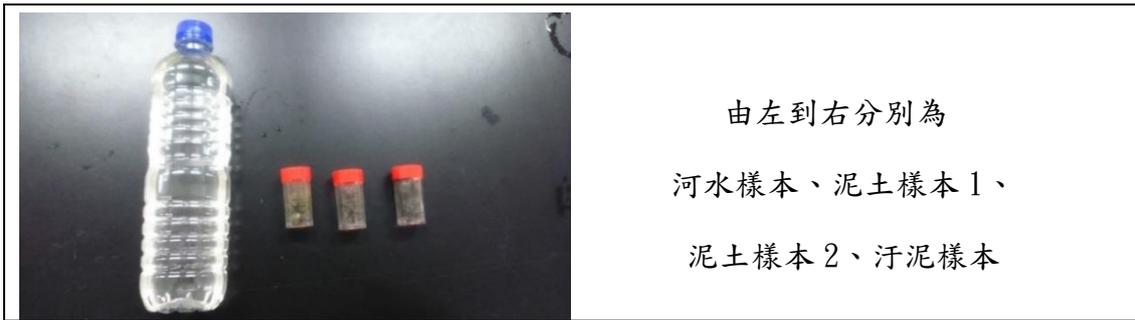
圖六、汙泥樣本



圖七、泥土樣本 1



圖八、泥土樣本 2



由左到右分別為
河水樣本、泥土樣本 1、
泥土樣本 2、汙泥樣本

圖九、河水與泥土的取樣樣本



圖十、旁邊有小吃攤的泥土 1，篩選出
菌種一



圖十一、旁邊有小吃攤的泥土 1，篩
選出菌種二



圖十二、旁邊有小吃攤的泥土 1，篩選
出菌種三



圖十三、淡水河下游篩選出的菌種四



圖十四、一號菌在油 plate 上的生長情形



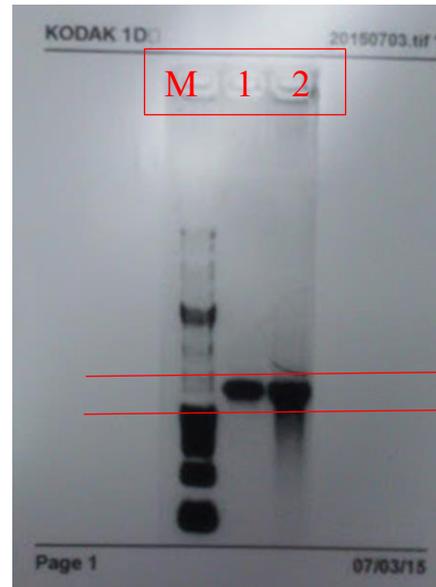
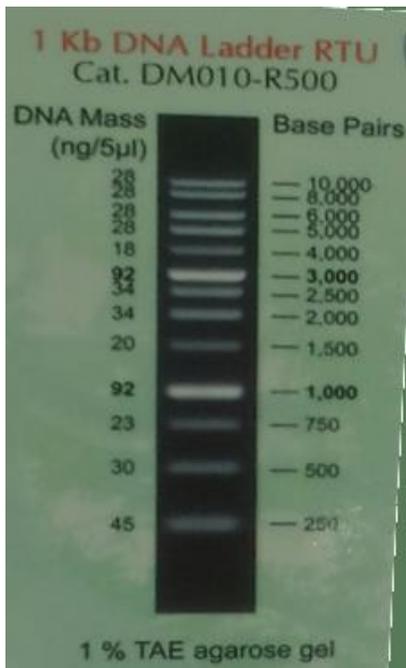
圖十五、二號菌在油 plate 上的生長情形



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

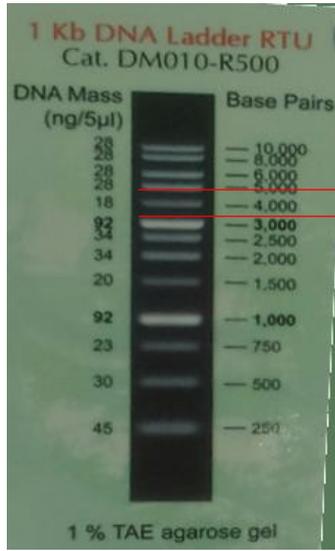


M : marker

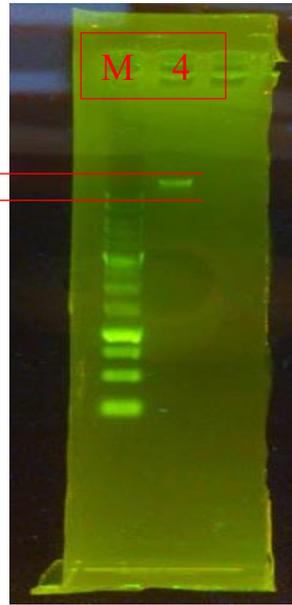
1 : *Ralstonia sp.* TFD41

2 : *Pseudomonas putida* strain II-B

圖十八、電泳跑膠標準



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
<input type="checkbox"/> Cupriavidus sp. THG-S20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1783	1783	99%	0.0	97%	KJ810592.1
<input type="checkbox"/> Cupriavidus sp. TBD162 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	1781	1781	99%	0.0	97%	LC005604.1
<input type="checkbox"/> Cupriavidus sp. liq32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1775	1775	99%	0.0	97%	JQ917979.1
<input type="checkbox"/> Cupriavidus sp. TFD33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1775	1775	99%	0.0	97%	EU827485.1
<input type="checkbox"/> Cupriavidus sp. liq33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1770	1770	99%	0.0	97%	JQ917980.1
<input type="checkbox"/> Ralstonia sp. TFD41 16S ribosomal RNA gene, complete sequence	1770	1770	99%	0.0	97%	AF067833.1
<input type="checkbox"/> Cupriavidus sp. liq34 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1764	1764	99%	0.0	97%	JQ917981.1
<input type="checkbox"/> Cupriavidus sp. W60 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1755	1755	98%	0.0	97%	KC853214.1
<input type="checkbox"/> Cupriavidus sp. cmc31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1753	1753	98%	0.0	97%	JQ918000.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone SINW1090_N11D0_16S_B	1725	1725	99%	0.0	97%	LN560776.1
<input type="checkbox"/> Ralstonia sp. c308 gene for 16S rRNA, partial sequence	1720	1720	99%	0.0	96%	AB167178.1
<input type="checkbox"/> Ralstonia sp. DPS1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1716	1716	99%	0.0	96%	HQ704414.1
<input type="checkbox"/> 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—*Ralstonia sp.*TFD41 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
<input type="checkbox"/> Pseudomonas putida strain II-B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1905	1905	99%	0.0	99%	EF219419.2
<input type="checkbox"/> Pseudomonas putida strain D1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1905	1905	99%	0.0	99%	EU878238.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas putida strain OW-16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1905	1905	99%	0.0	99%	DQ112328.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas plecoglossicida strain PNP-Y8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1903	1903	99%	0.0	99%	FJ539000.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas sp. FP2-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1903	1903	99%	0.0	99%	EU293341.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas putida strain SKP110 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1899	1899	99%	0.0	99%	KR422301.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas putida strain PYR1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1899	1899	99%	0.0	99%	KP192770.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas sp. C2-22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1899	1899	99%	0.0	99%	KP114213.1
<input type="checkbox"/> Pseudomonas sp. 3 MSSRF QS31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1899	1899	99%	0.0	99%	KP640641.1
<input type="checkbox"/> 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 *Pseudomonas putida* strain II-B 比對結果

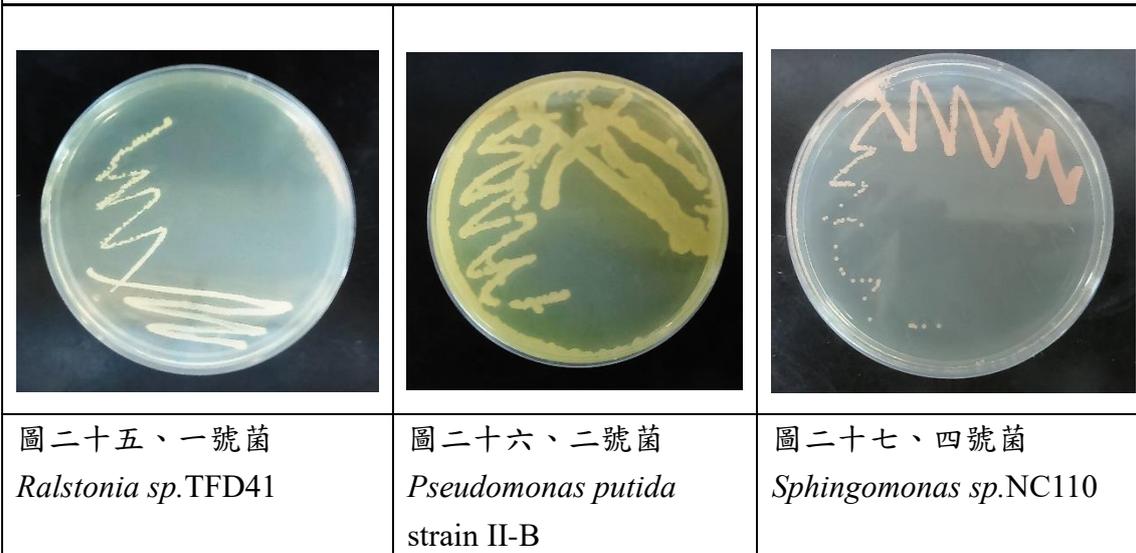
Sequences producing significant alignments:

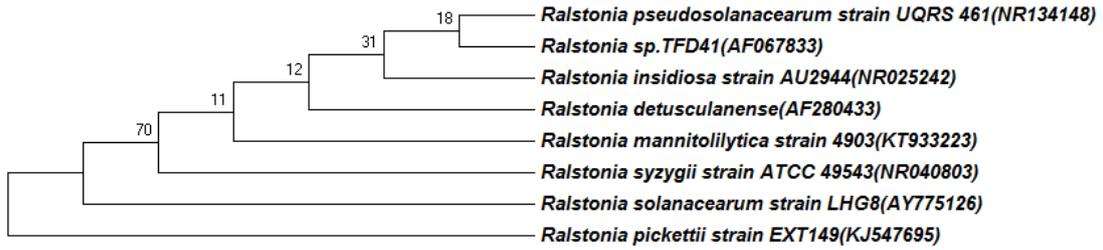
Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

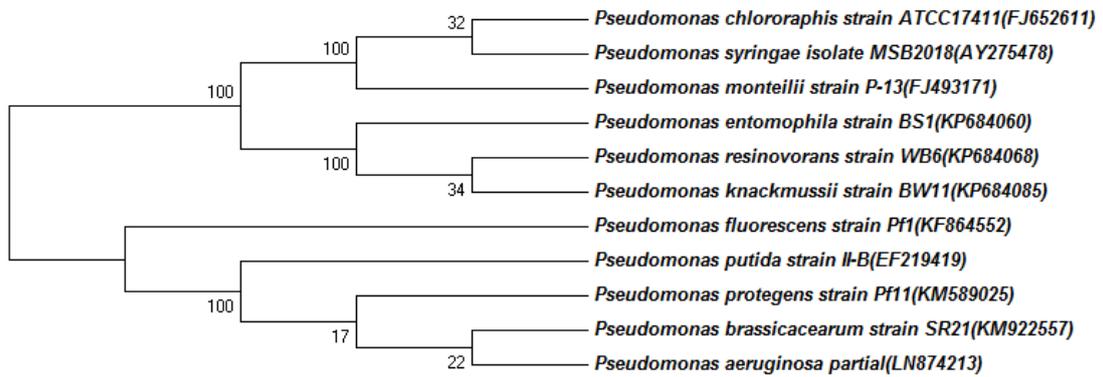
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Sphingomonas sp. NC110 partial 16S rRNA gene, isolate NC110	1236	1236	94%	0.0	98%	LN832008.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone C131 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	94%	0.0	98%	KJ817676.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone A172 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	94%	0.0	98%	KJ817514.1
<input type="checkbox"/> Sphingomonas sp. PMR03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	94%	0.0	98%	KF648890.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone UMTpAL14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	94%	0.0	98%	KJ754668.1
<input type="checkbox"/> Sphingomonas sp. G6_3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	94%	0.0	98%	KF294970.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone nck189f08c1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	94%	0.0	98%	KF094301.1
<input type="checkbox"/> Sphingomonas sp. LS-081 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	94%	0.0	98%	KJ584031.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone DolGs_A332 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	94%	0.0	98%	JQ194590.1
<input type="checkbox"/> Sphingomonas sp. 3_60 partial 16S rRNA gene, strain 3_60	1236	1236	95%	0.0	98%	HF954390.1
<input type="checkbox"/> Sphingomonas aquatilis strain S7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	95%	0.0	98%	KF542913.1
<input type="checkbox"/> Uncultured bacterium clone AB_02_33A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1236	1236	94%	0.0	98%	KC666174.1
<input type="checkbox"/> 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 *Sphingomonas sp.* NC110 比對結果

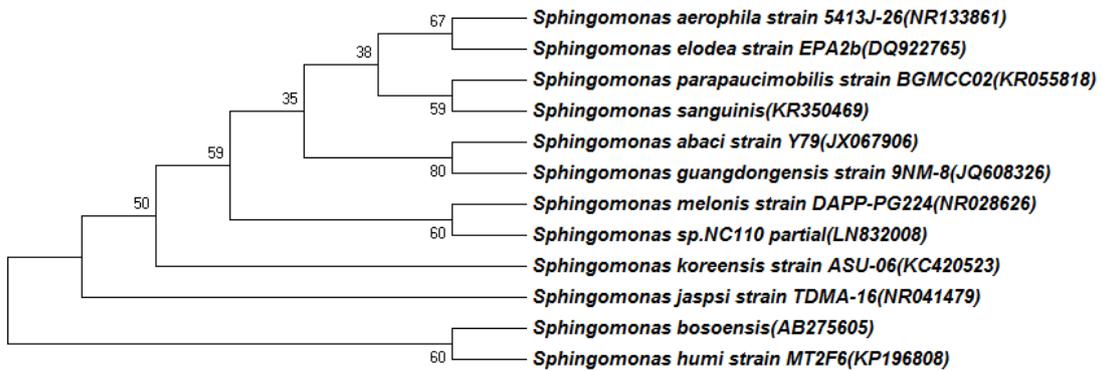




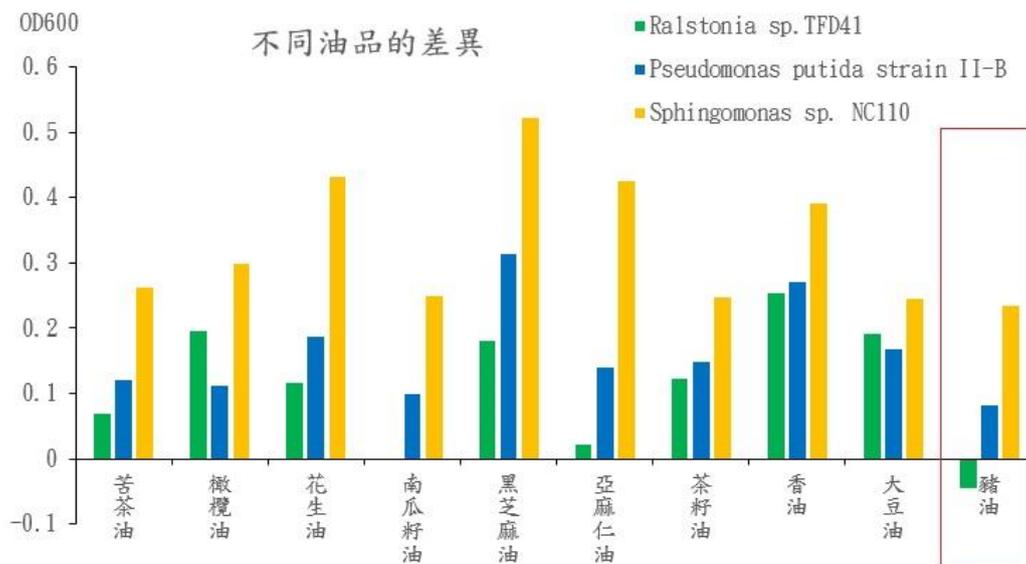
圖二十八、一號菌 *Ralstonia sp.* TFD41 的樹狀圖



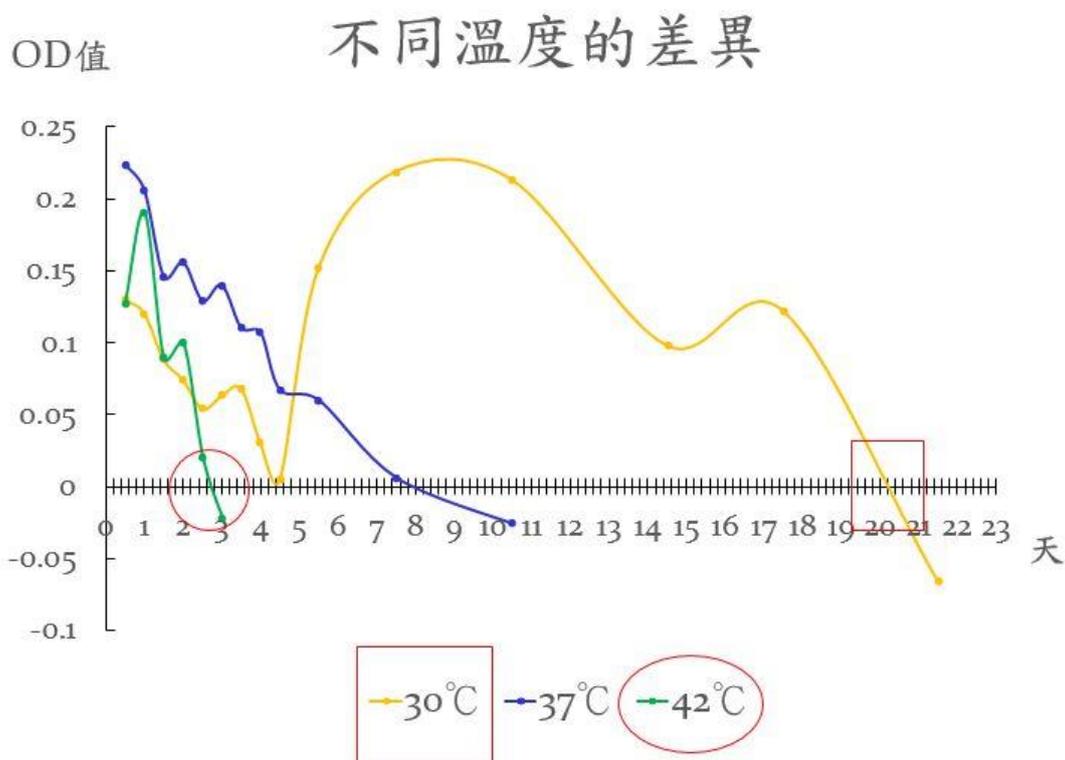
圖二十九、二號菌 *Pseudomonas putida* strain II-B 的樹狀圖



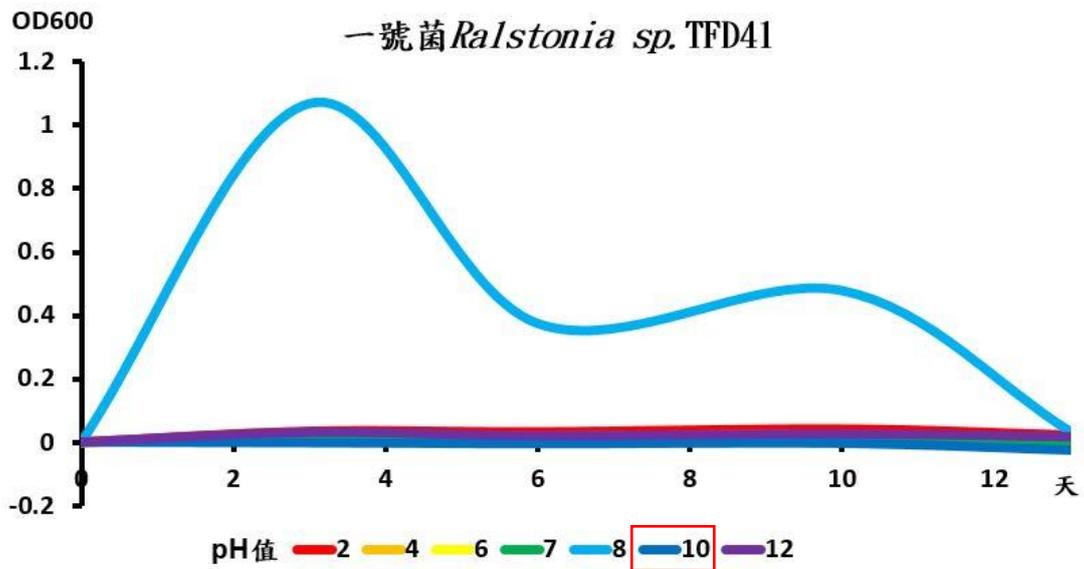
圖三十、四號菌 *Sphingomonas sp.* NC110 的樹狀圖



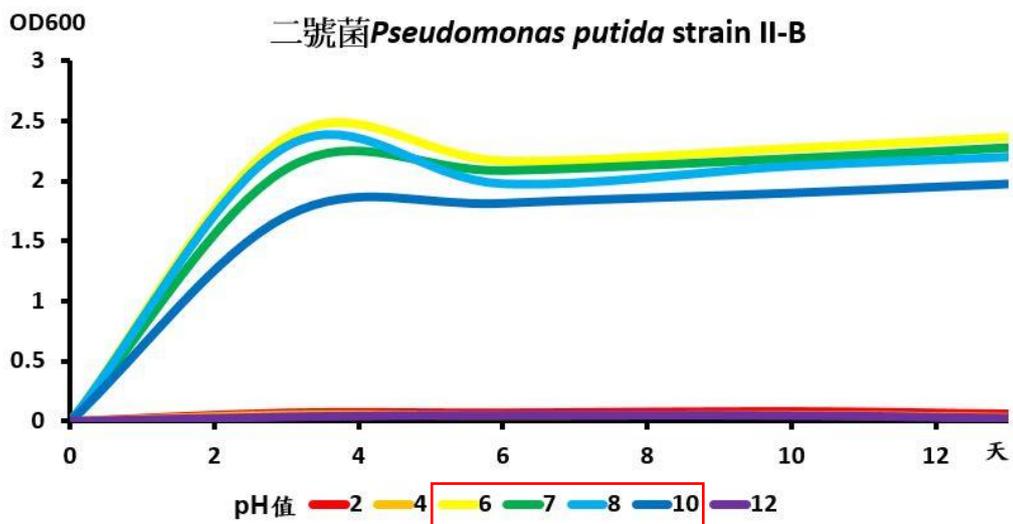
圖三十一、在不同種類的油當中生長四天後各種菌的 OD₆₀₀ 值



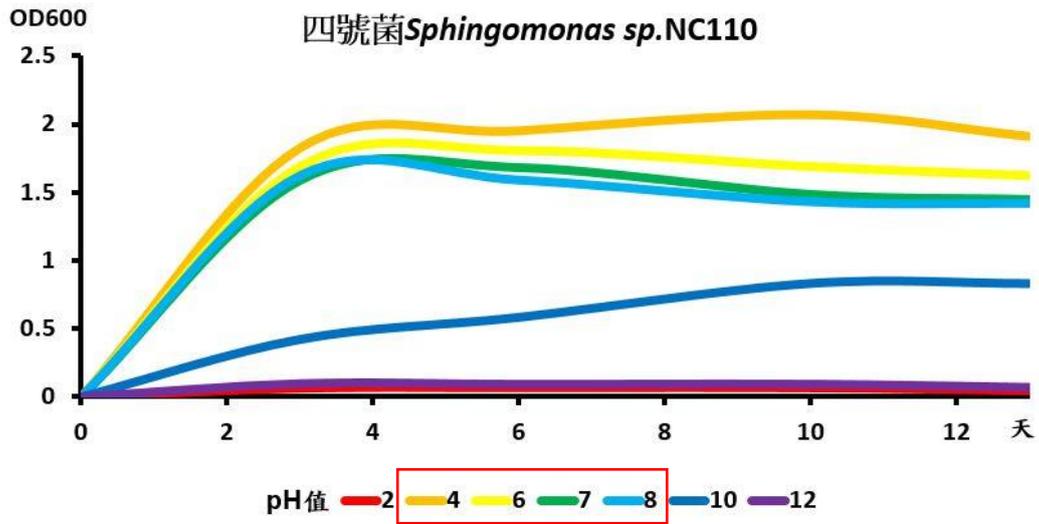
圖三十二、不同溫度環境中菌種的 OD₆₀₀ 值



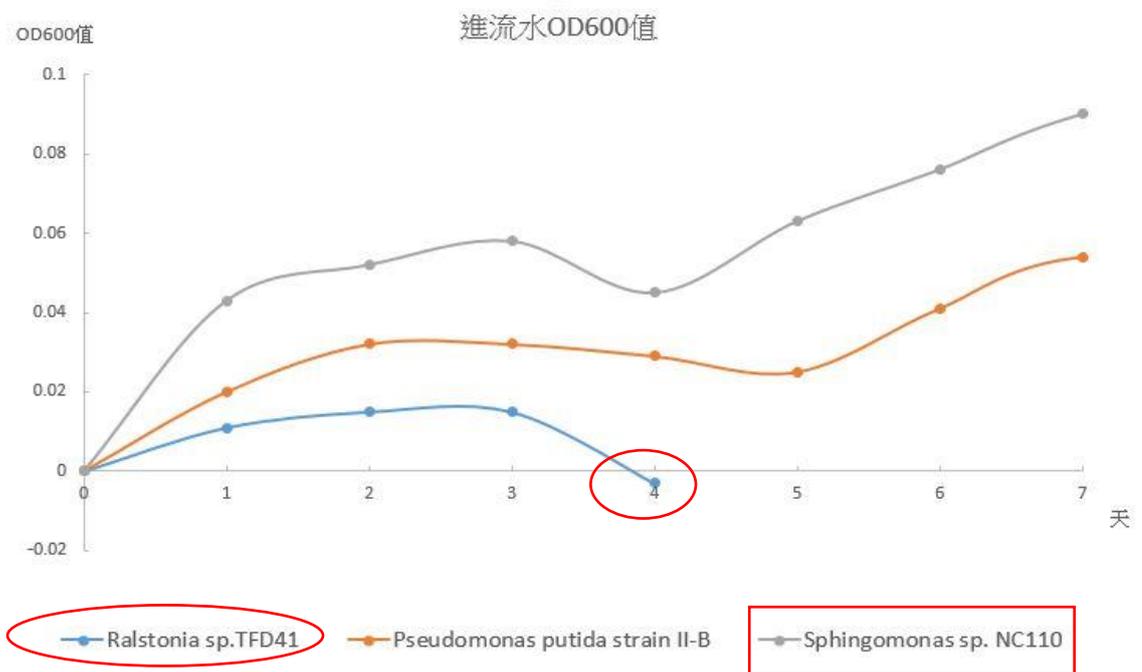
圖三十三、不同酸鹼值中一號菌 *Ralstonia sp.* TFD41 的 OD₆₀₀ 值



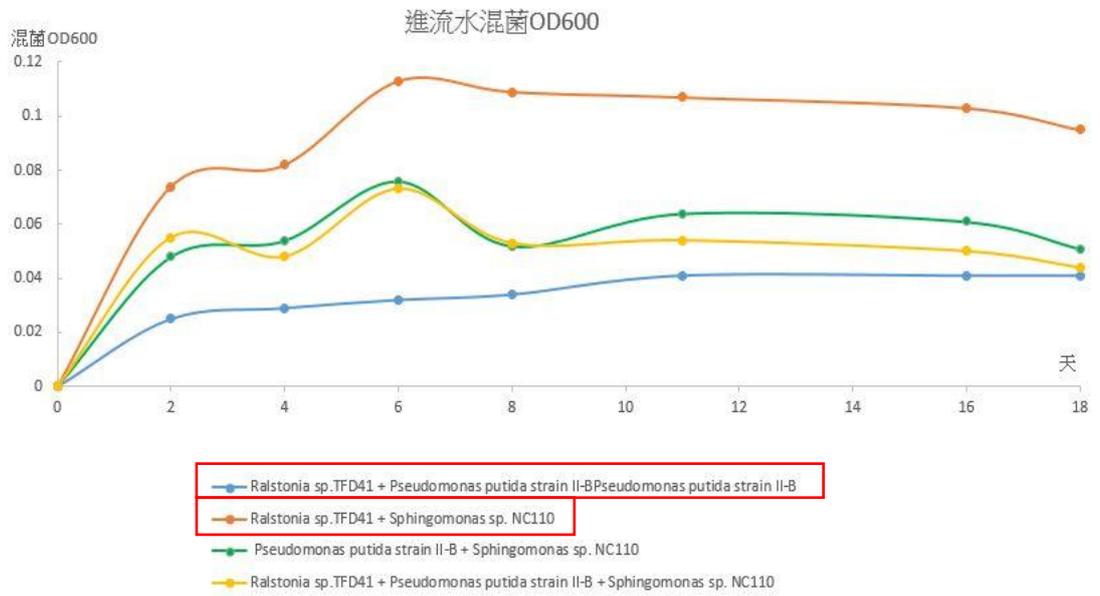
圖三十四、不同酸鹼值中二號菌 *Pseudomonas putida* strain II-B 的 OD₆₀₀ 值



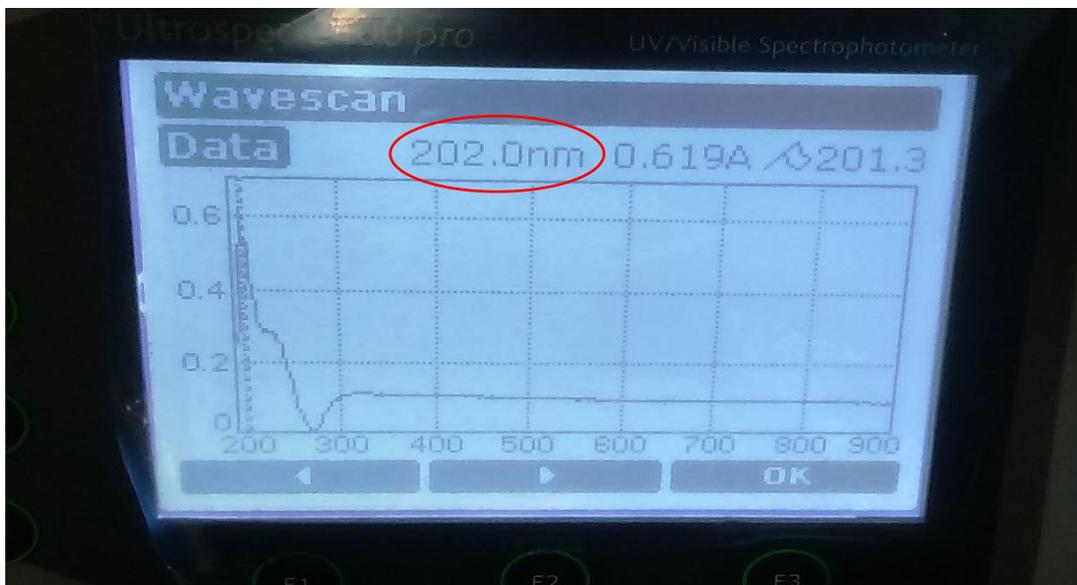
圖三十五、不同酸鹼值中四號菌 *Sphingomonas sp.* NC110 的 OD₆₀₀ 值



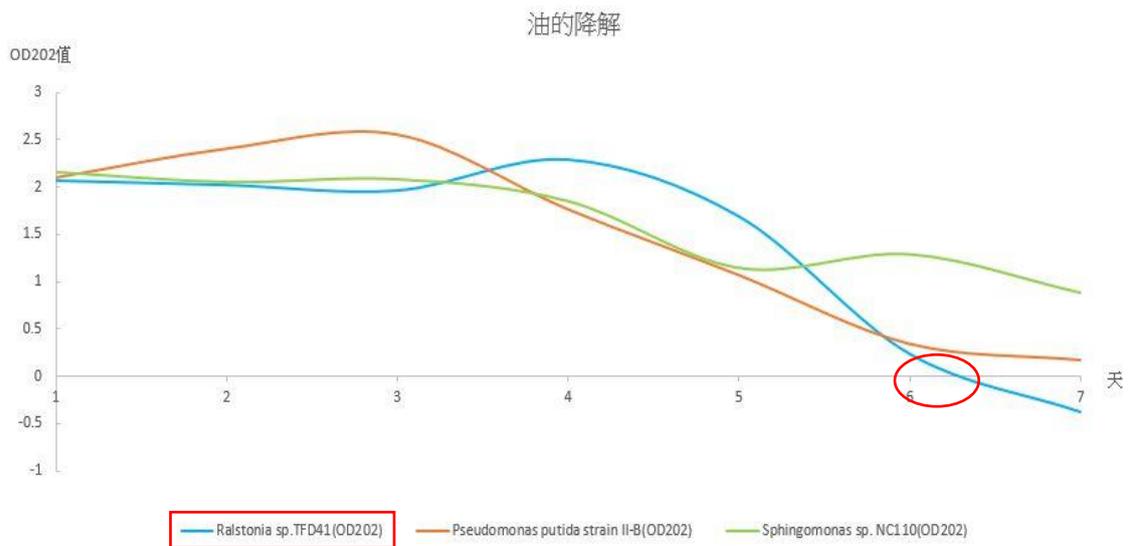
圖三十六、菌種在汙水中的生長情形



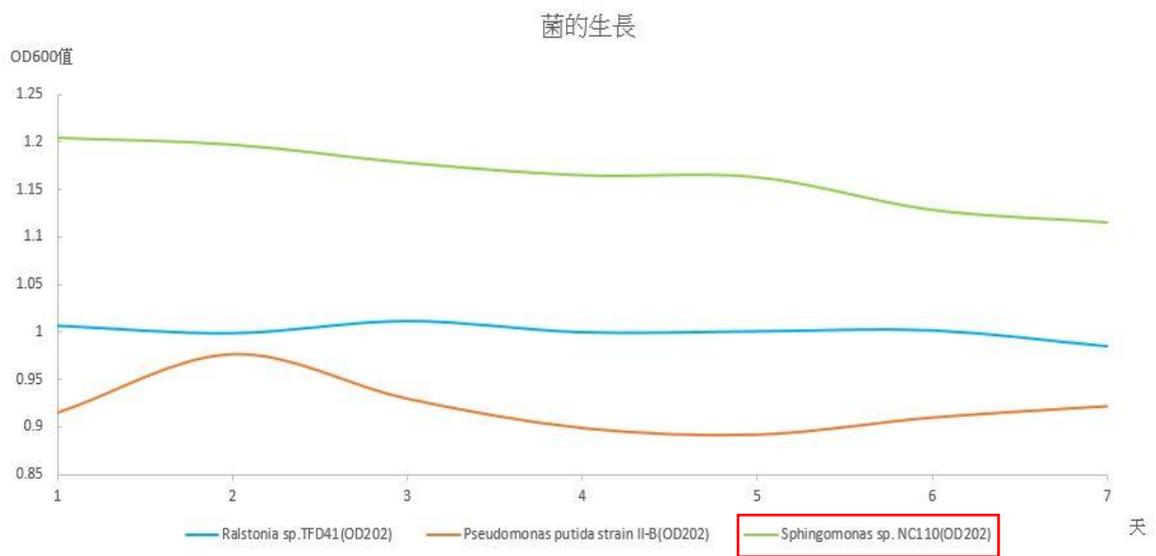
圖三十七、混菌後在汙水中的生長情形



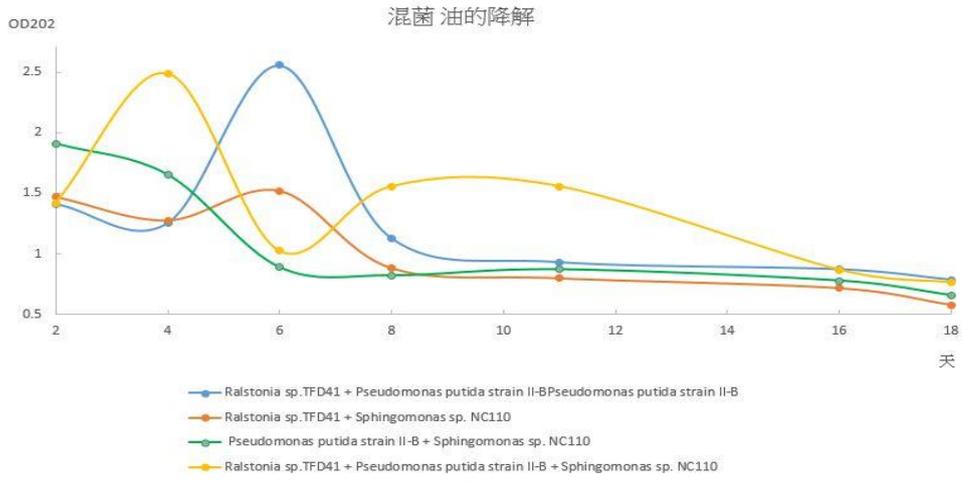
圖三十八、MSM 油的全波段掃描結果



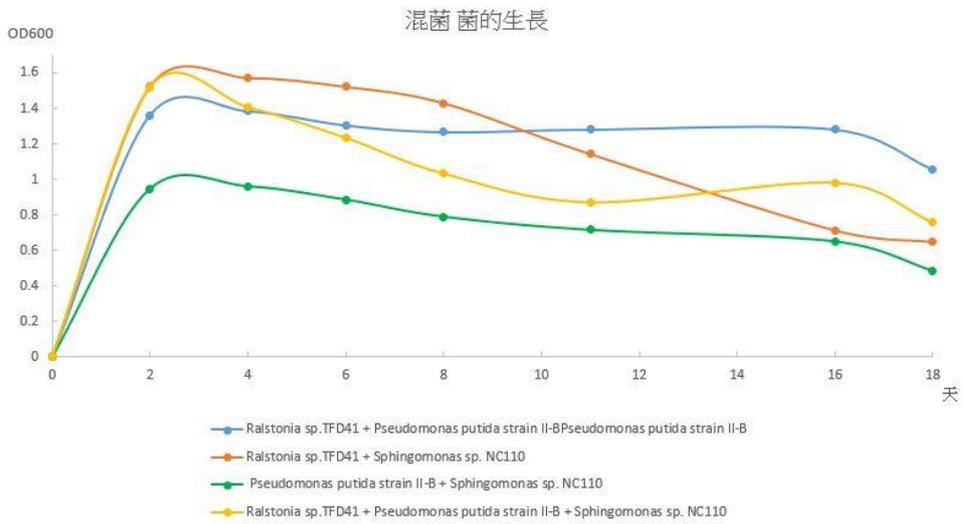
圖三十九、油的降解情形



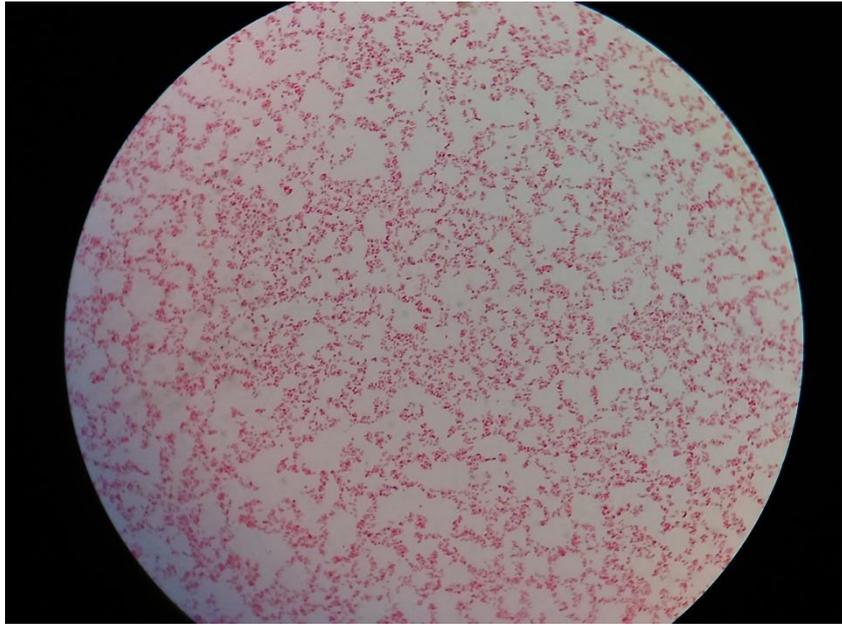
圖四十、菌種生長情形



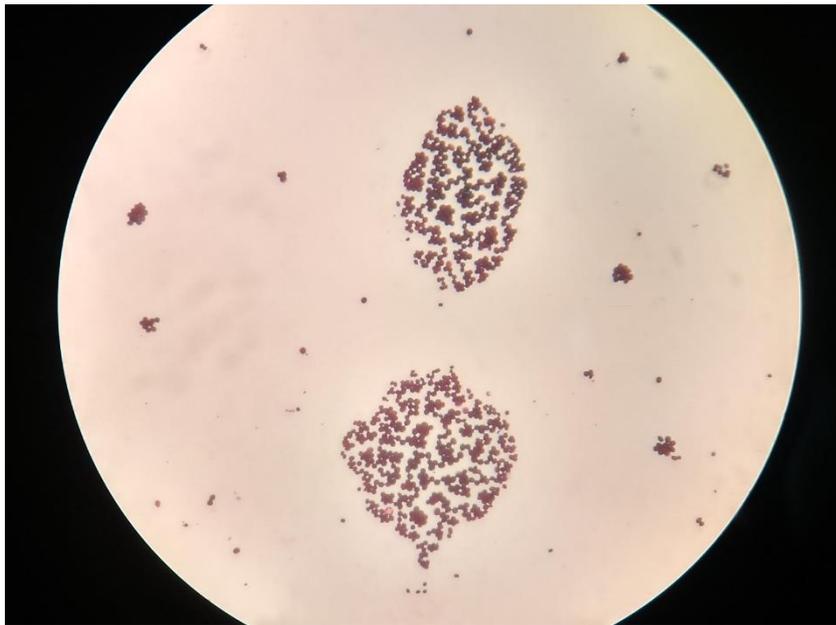
圖四十一、菌種生長情形



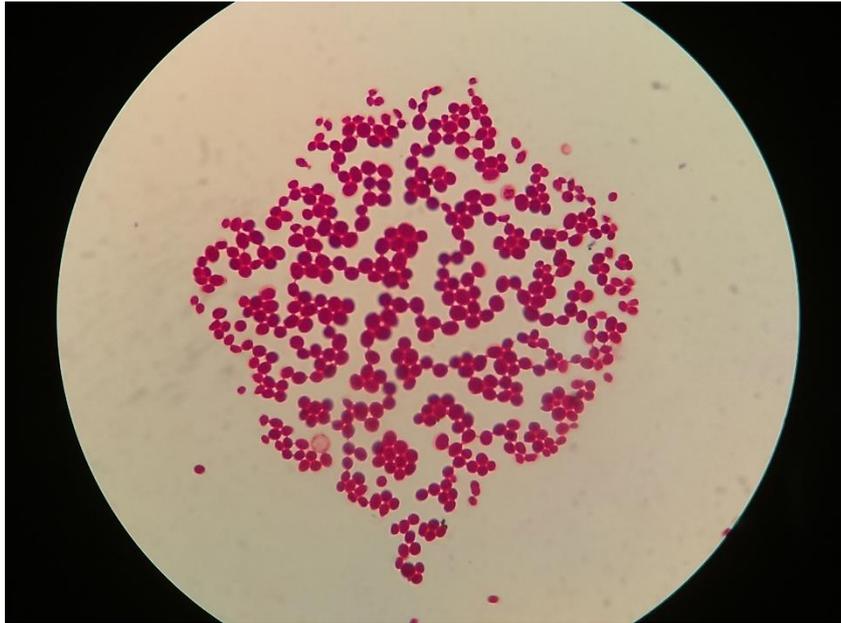
圖四十二、油的降解情形



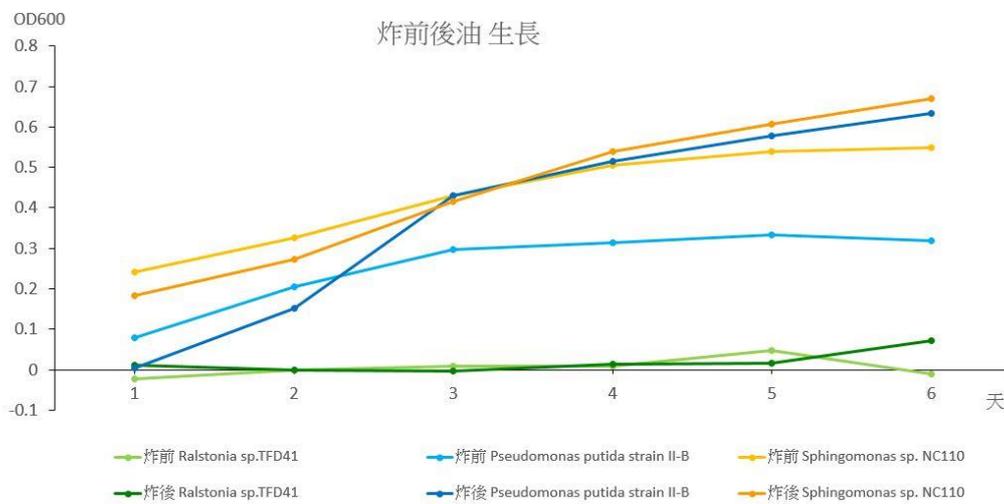
圖四十三、一號菌 *Ralstonia* sp.TFD41 的革蘭氏染色結果



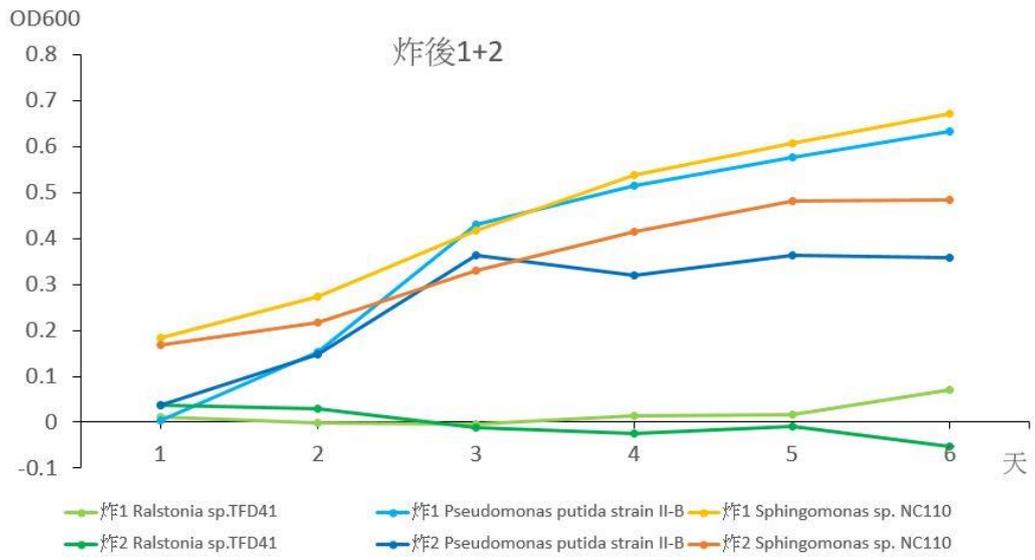
圖四十四、*Pseudomonas putida* strain II-B 的革蘭氏染色結果



圖四十五、*Sphingomonas sp.*NC110 的革蘭氏染色結果



圖四十六、炸前油與炸後油 1 的生長情形



圖四十七、炸後油 1 與炸後油 2 的生長情形

【評語】 070005

1. 本科展主題主旨在於篩選可分解油汙之微生物，並探討其特性及降解油汙的能力。
2. 研究結果篩選出三株菌種皆為革蘭氏陰性菌，且同時一起培養時，菌種生長與降解油汙會受到干擾。建議可使 GC（氣態色層分析儀）探討個別菌株除油的結果。
3. 單一作者獨立完成整個作品，對於實驗工作辛苦的付出，值得嘉許。