

專題研究題目 柴油降解潛勢菌株對環境耐受性之研究



專題學生：陳雄政. 賴易揚. 鄭逸閔. 謝昇峰. 許政勳

一、摘要

本研究藉由濱海地區受油品污染場址篩選出之柴油降解潛勢菌株，進行溫度、pH及鹽度等環境因子的耐受性試驗探討此等菌株對環境的耐受範圍。未來或許可依其適合生長之環境條件，將菌株運用於類似環境的油品污染場址，進行生物復育或提供施作場址選擇菌種時的參考。

菌株對溫度的耐受性試驗結果顯示，菌株1-3菌株3-4於20℃、35℃及50℃溫度測試下，兩菌株於20℃、35℃下之生長狀況沒有明顯的差異，但皆無法存活在50℃的溫度下。兩菌株在20℃及35℃環境下，分別進行pH耐受性試驗，結果顯示皆能存活於pH5~9之間的環境，但兩菌株於pH9，培養兩天後的總菌落數較培養前少，代表兩菌株雖可於pH9的環境存活，但生長受到抑制。海水、蒸餾水、海水及50%海水的環境，對兩菌株之生長未產生抑制或影響。

二、前言

土壤污染物依處理原理可分為生物、物理/化學、熱處理及整治技術聯用序列。過去本專題指導老師所指導的專題，已利用淡水區域受油品污染土壤中分離純化後的微生物，進行受油品污染土壤的現地生物復育。前兩年並成功地從濱海地區受油品污染場址的土壤及地下水中，篩選出具柴油降解潛勢的菌株。

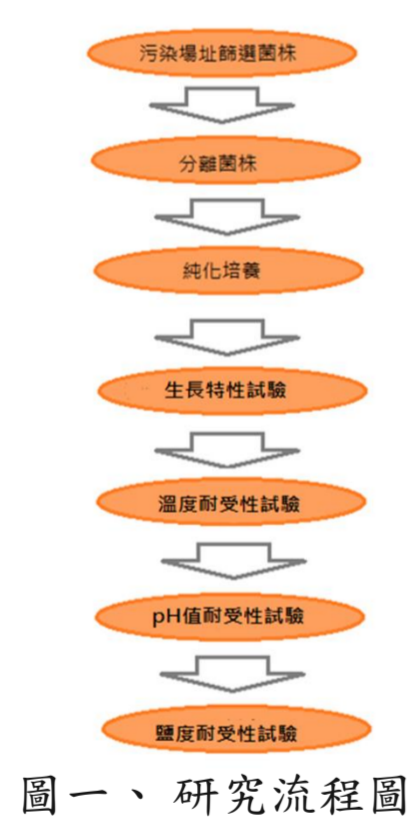
由於濱海地區土壤及淺層地下水鹽分高，能存活於此環境下的微生物勢必已適應此高鹽分環境。但受油品污染之場址多半分布於淡水區域，因此本研究欲藉濱海地區受油品污染場址篩選出之柴油降解潛勢菌株之環境因子耐受試驗，探討此等菌株對環境的耐受範圍。未來或許可依其適合生長之環境條件，將菌株運用於類似環境的油品污染場址，進行生物復育或提供施作場址選擇菌種時的參考。

溫度、pH、鹽度為影響微生物的生長是極為重要的因素，而每種微生物對環境的耐受溫度有所不同，本研究將探討由濱海地區污染場址中篩選具有柴油降解潛勢的海水菌株，對於溫度、pH值、鹽度等三個環境因子的耐受程度。研究工作項目包括：

1. 探討柴油降解潛勢菌株1-3、3-4，於海水及淡水中之生長狀況。
2. 探討柴油降解潛勢菌株1-3、3-4，於海水及淡水中，在不同pH的條件下之生長狀況。
3. 探討柴油降解潛勢菌株1-3、3-4，於海水及淡水中，在不同溫度下之生長狀況。
4. 探討柴油降解潛勢菌株1-3、3-4，於海水及淡水中，在不同鹽度的條件下之生長狀況。
5. 尋找柴油降解潛勢菌株1-3、3-4之環境耐受範圍。

三、研究方法

本研究是針對溫度、pH、鹽度等環境因子進行菌株之耐受性試驗，暫時不考慮重金屬、UV等因子，研究流程如圖一所示。首先，從濱海地區的污染場址採樣，分離菌株後篩選出具有柴油降解潛勢之菌株，進行純化培養。再經序列稀釋後，固定間隔時間測定總菌數，繪製生長曲線，以了解菌株之生長特性。後續的耐受試驗，菌株培養時間以其生長至穩定時所需之時間進行試驗，首先進行菌株之溫度環境耐受試驗。由於高溫菌生長條件為45℃~70℃、中溫菌為20℃~45℃、低溫菌為20℃以下，本試驗設定在自然環境中的平均年水溫20℃、中溫35℃及高溫50℃進行培養，以判斷菌株對溫度的耐受性。接著進行pH值耐受試驗，設定pH值為嗜酸菌、中性菌、嗜鹼菌範圍內的pH5、pH7及pH9，並於耐受溫度下進行試驗，以獲得菌株可存活的pH條件。最後以海水狀態(3.5‰)、半海水狀態、蒸餾水三種鹽度溶液配製培養液，讓菌株於耐受的溫度及pH值下培養，以獲得菌株可存活的鹽度條件。



圖一、研究流程圖

四、結果與討論

1. 柴油降解潛勢菌株之生長特性

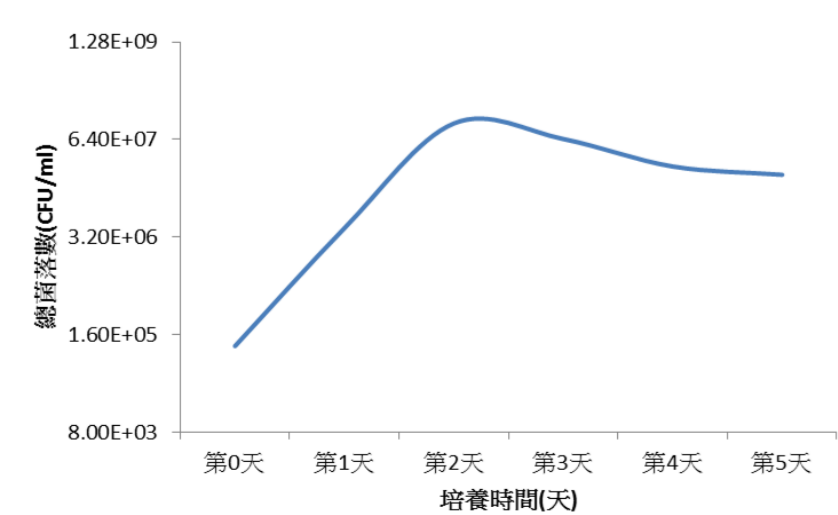
將菌株1-3及菌株3-4在海水配製的LB培養液和蒸餾水配製的LB培養液中，以35℃培養五天之總菌落數檢測結果，整理如表一至表二及圖二至圖五。

表一、菌株1-3於5天培養期中之總菌落數變化

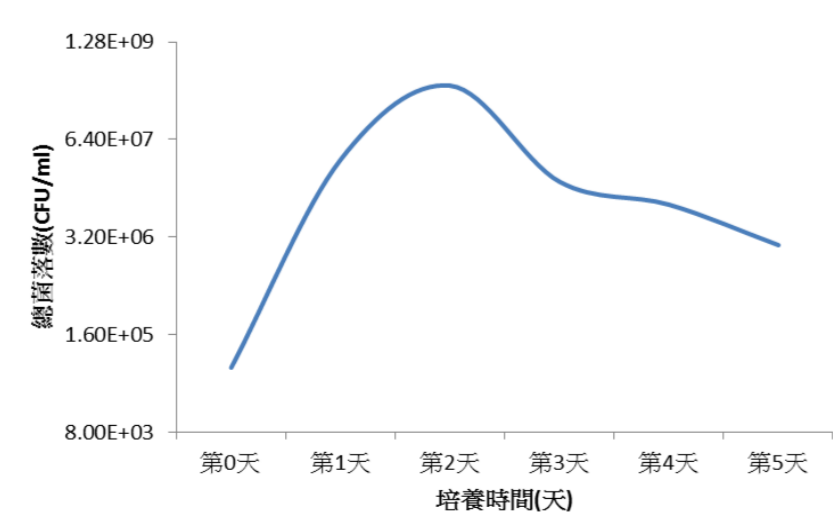
培養基質	培養時間	第0天	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
海水		5.50x10 ⁹	3.45x10 ⁹	3.35x10 ⁹	1.75x10 ⁹	8.65x10 ⁸	2.50x10 ⁸
淡水		1.13x10 ⁹	4.20x10 ⁸	1.05x10 ⁹	5.50x10 ⁸	2.80x10 ⁸	2.17x10 ⁸

表二、菌株3-4於5天培養期中之總菌落數變化

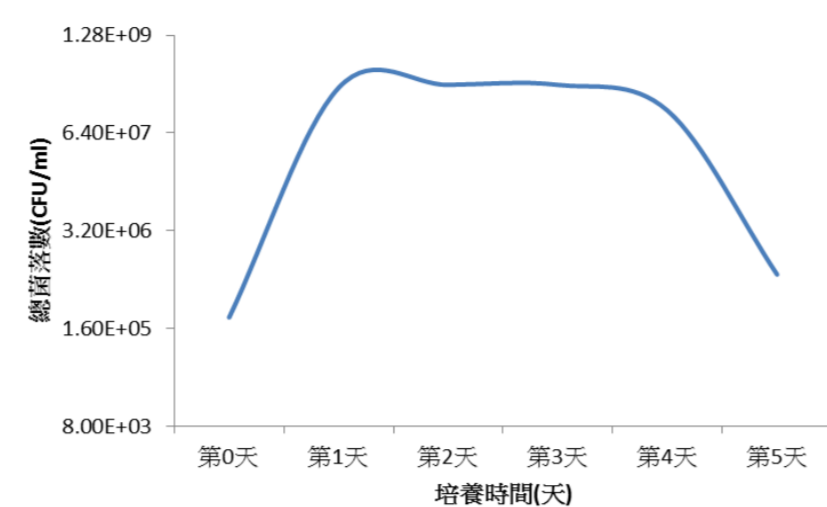
培養基質	培養時間	第0天	第1天	第2天	第3天	第4天	第5天
海水		2.53x10 ⁹	2.56x10 ⁹	2.85x10 ⁹	2.45x10 ⁹	1.69x10 ⁹	2.29x10 ⁹
淡水		2.25x10 ⁹	2.58x10 ⁹	2.80x10 ⁹	2.80x10 ⁹	1.28x10 ⁹	8.35x10 ⁸



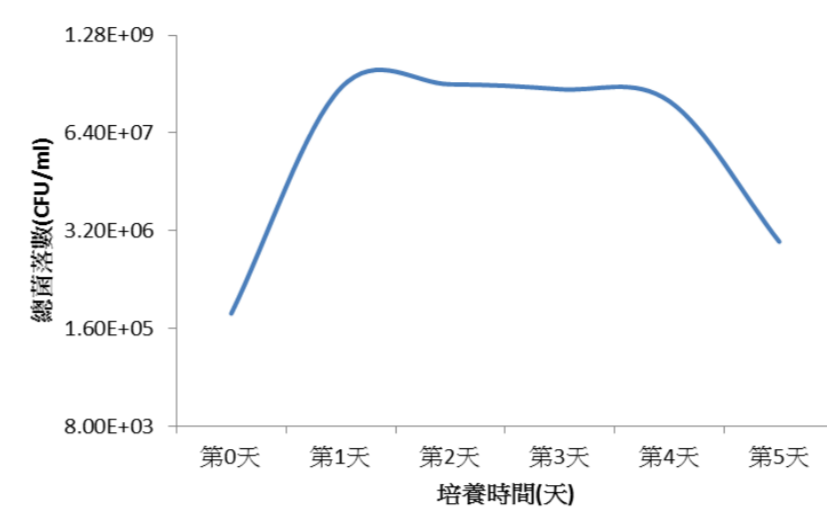
圖二、菌株1-3在蒸餾水配製的LB培養液中培養五天之生長曲線



圖三、菌株1-3在海水配製的LB培養液中培養五天之生長曲線



圖四、菌株3-4在蒸餾水配製的LB培養液中以35℃培養五天之生長曲線



圖五、菌株3-4在海水配製的LB培養液中以35℃培養五天之生長曲線

2. 柴油降解潛勢菌株之溫度耐受性

篩選自濱海地區之柴油降解潛勢菌株1-3及3-4於海水LB培養液中，置於20℃、35℃、50℃培養兩天後，分析各菌液之總菌落數(CFU/ml)，結果彙整至表三及表四、及圖六至圖七。從表三中可以看出，菌株1-3在海水中培養，以35℃時生長狀況最好，菌落數從1.46x10⁹成長至3.5x10⁹(CFU/ml)，其實於20℃下培養也成長至2.82x10⁹(CFU/ml)。兩個培養溫度對菌株1-3的成長並沒有產生明顯的影響，其中在50℃培養下，沒有生菌數，因此可以判斷出菌株1-3無法生存於50℃的環境下。故可以判斷菌株1-3屬中溫生物。

菌株3-4在海水中培養，以20℃生長狀況最好，菌落數從2.10x10⁹成長至5.65x10⁹(CFU/ml)，其實於35℃下培養也成長至5.50x10⁹(CFU/ml)。對菌株3-4在兩個不同溫度下的成長並沒有明顯的差異，其中在50℃培養下，沒有生菌數，因此可以判斷出菌株3-4無法生存於50℃的環境下。故可以判斷菌株3-4亦屬中溫生物。

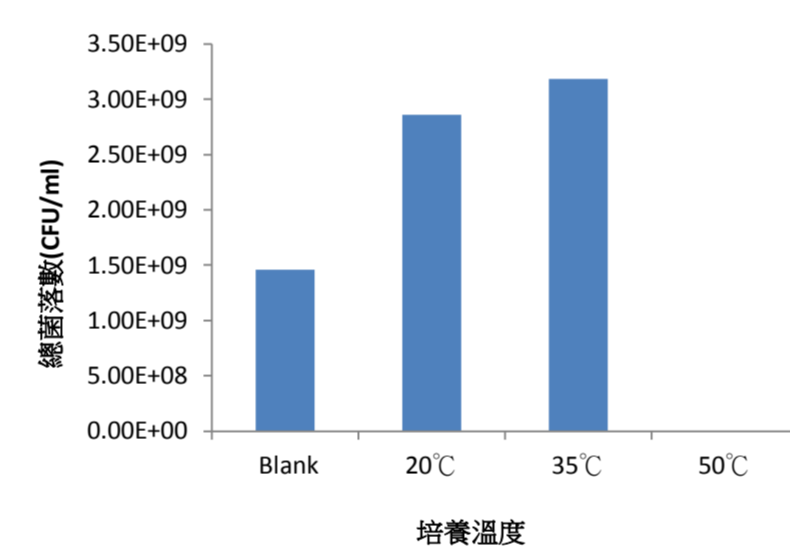
由菌株對溫度之耐受性試驗結果得知，兩株菌株無法存活在50℃的溫度，然而自然環境之溫度雖易受季節之影響，但微生物生長的環境，常溫一般多介於中溫菌20℃~45℃，因此後續試驗之溫度，本研究設定在20℃，以控制溫度對微生物生長之影響。

表三、菌株1-3及菌株3-4經不同溫度培養兩天後之總菌落數

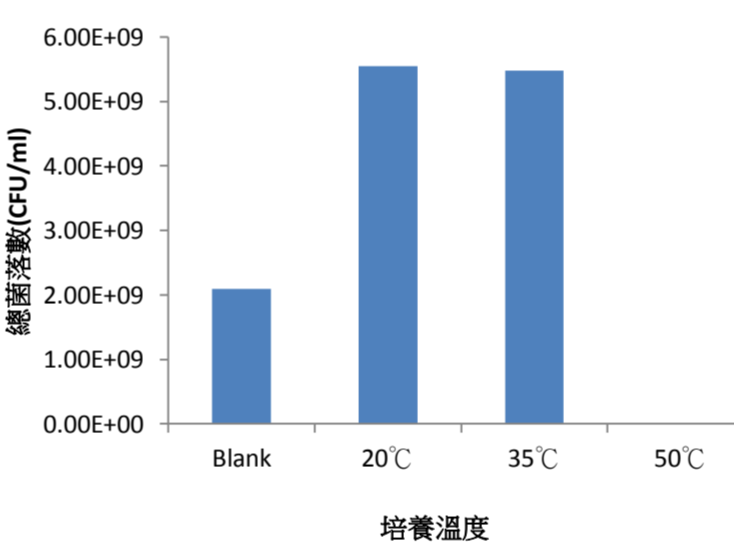
培養溫度	菌株1-3		菌株3-4	
	第0天	第2天	第0天	第2天
20℃	1.46x10 ⁹	2.82x10 ⁹	2.10x10 ⁹	2.90x10 ⁹
35℃	1.54x10 ⁹	3.50x10 ⁹	2.81x10 ⁹	2.87x10 ⁹
50℃	0	0	0	0

表四、菌株1-3及菌株3-4經不同pH培養兩天後之總菌落數

pH	菌株1-3		菌株3-4	
	第0天	第2天	第0天	第2天
pH5	1.54x10 ⁹	2.90x10 ⁹	1.62x10 ⁹	2.86x10 ⁹
pH7	1.54x10 ⁹	2.81x10 ⁹	1.62x10 ⁹	2.65x10 ⁹
pH9	1.54x10 ⁹	9.15x10 ⁸	1.62x10 ⁹	9.25x10 ⁸



圖六、菌株1-3在海水LB培養液於不同溫度下培養兩天之總菌落數變化



圖七、菌株3-4在海水LB培養液於不同溫度下培養兩天之總菌落數變化

3. 柴油降解潛勢菌株之pH耐受性

為了解兩菌株之pH值耐受性，於20℃下，將菌株接種到以海水配製調整pH至5、7、9的LB培養液中，以230 rpm培養兩天後，檢測菌液之種菌落數，結果如表五及圖八至圖九所示。

表五顯示出菌株1-3在pH5、pH7時生長狀況差異不大，分別由1.54x10⁹成長至2.9x10⁹及2.81x10⁹(CFU/ml)。而在pH9的環境中，菌落數些微的減少至9.15x10⁸，但仍然可以存活，由此判斷出菌株1-3能耐受pH值至9.0。

表4.4顯示出菌株3-4與菌株1-3之生長趨勢類似，在pH5、pH7時生長狀況差異不大，分別由1.62x10⁹成長至2.8x10⁹及2.65x10⁹(CFU/ml)。而在pH9的環境中，菌落數呈現些微的減少，降至9.25x10⁸(CFU/ml)，但仍然可以存活，顯示出菌株3-4亦能耐受pH值至9.0。

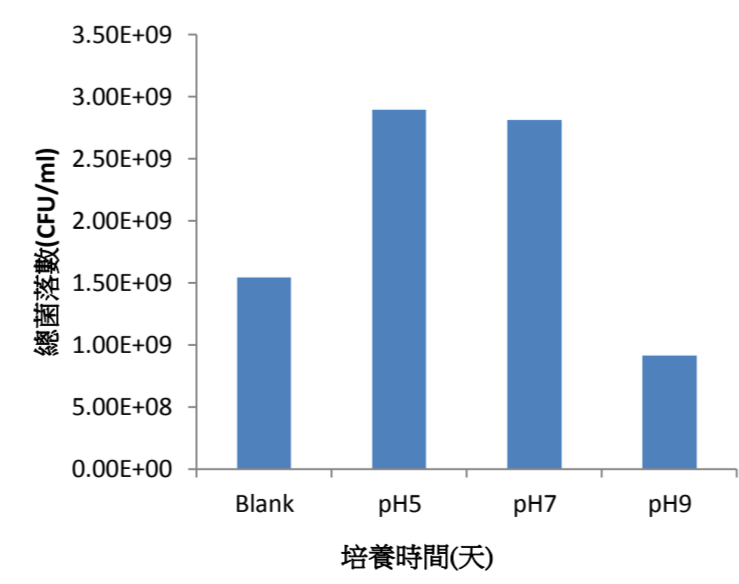
兩菌株在pH值的耐受性極類似，生長速率幾乎是一樣的，雖在pH9條件下未見增殖，但皆能存活於pH5~9之間的環境。

後續菌株之鹽度耐受性試驗設定在20℃下，pH5、7及9的環境下進行實驗。

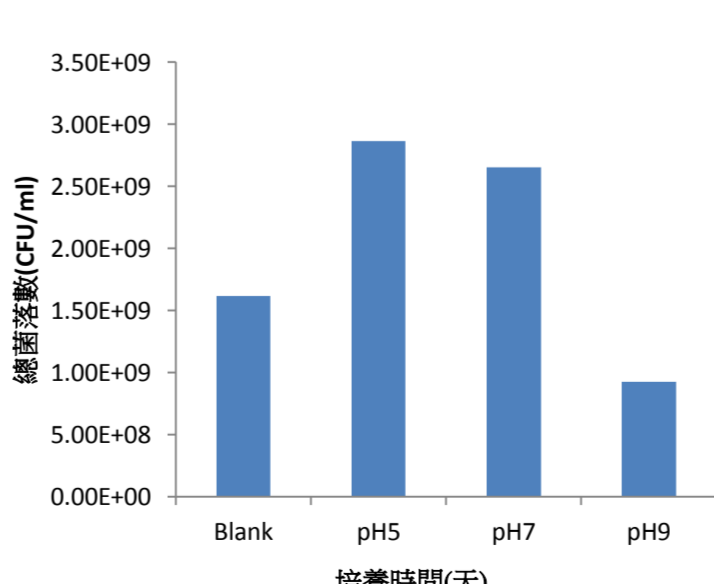
表五、菌株1-3及菌株3-4經不同鹽度培養兩天後之總菌落數

培養基質	菌株1-3			菌株3-4		
	pH5	pH7	pH9	pH5	pH7	pH9
蒸餾水LB培養液	3.95x10 ⁹	4.15x10 ⁹	3.25x10 ⁹	4.75x10 ⁹	2.85x10 ⁹	1.28x10 ⁹
海水/蒸餾水 1:1LB培養液	3.65x10 ⁹	3.85x10 ⁹	1.84x10 ⁹	4.30x10 ⁹	2.74x10 ⁹	1.16x10 ⁹
海水LB培養液	2.90x10 ⁹	2.81x10 ⁹	9.15x10 ⁸	2.86x10 ⁹	2.65x10 ⁹	9.25x10 ⁸

註:菌株1-3第0天之初始濃度為1.74x10⁹(CFU/ml)
菌株3-4第0天之初始濃度為4.70x10⁹(CFU/ml)



圖八、菌株1-3在海水LB培養液中於不同pH值下培養2天之總菌落數



圖九、菌株3-4在海水LB培養液中於不同pH值下培養2天之總菌落數

4. 柴油降解潛勢菌株之鹽度耐受性

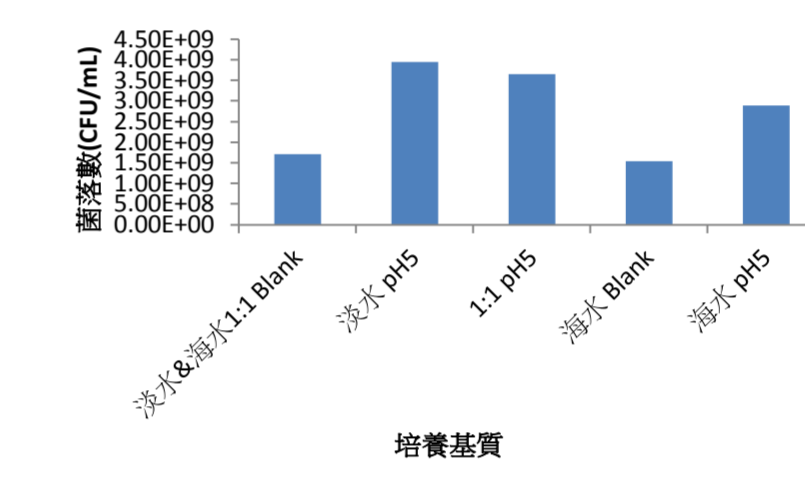
將菌株1-3及菌株3-4種植於以蒸餾水配製的LB培養液中，並分別先調整至pH5、7及9的LB培養液中，培養兩天後之總菌落數分析結果，整理如表六及圖十至圖十五所示。由圖十至圖十二觀察得到，菌株1-3生長於淡水配製的LB培養液，並控制pH7時，生長狀況最佳，總菌落數達4.15x10⁹(CFU/ml)。pH5與pH7相差并不大，為3.95x10⁹(CFU/ml)pH9達到3.25x10⁹(CFU/ml)有些微落後，但是整體來看差異並不明顯，故可以判斷出pH5~9對菌株1-3影響的不明顯。由圖十三至圖十五觀察得到，菌株3-4生長於淡水配製的LB培養液中並控制pH5時，生長狀況最佳達4.75x10⁹(CFU/ml)，pH7稍微減少至2.85x10⁹(CFU/ml)，pH9再降低至1.28x10⁹(CFU/ml)，但整體上，pH5~9對菌株3-4的影響亦不明顯。

將菌株1-3及菌株3-4種植於半海水配製，並分別先調整至pH5、7及9的LB培養液中，培養兩天後之總菌落數分析結果得到，菌株1-3生長於半海水配製的LB培養液，並控制pH7時，生長狀況最佳，達3.85x10⁹(CFU/ml)和pH5差異不大3.65x10⁹(CFU/ml)。菌株3-4生長於半海水配製的LB培養液，並控制於pH5時，生長狀況最佳，達4.3x10⁹(CFU/ml)，在pH7的時差異不大2.74x10⁹(CFU/ml)，在pH9有些微落後1.16x10⁹(CFU/ml)，與菌株1-3相類似，在pH5至pH9的環境下，皆能生長。

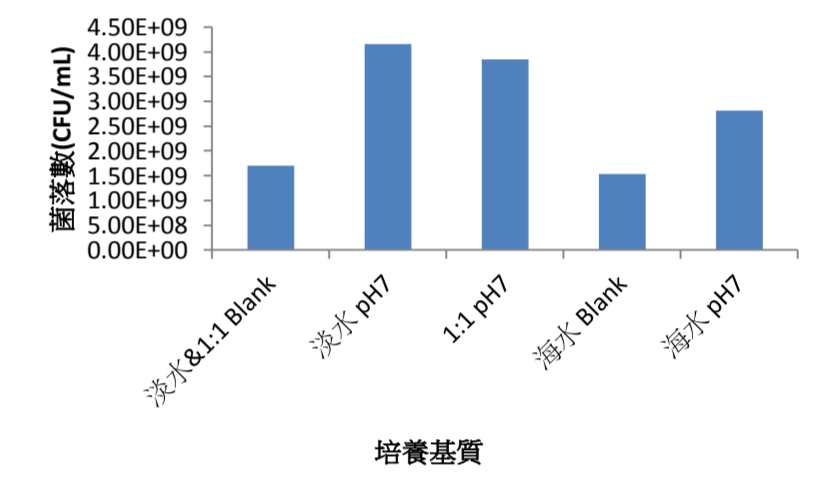
表六、菌株1-3及菌株3-4經不同鹽度培養兩天後之總菌落數

培養基質	菌株1-3			菌株3-4		
	pH5	pH7	pH9	pH5	pH7	pH9
蒸餾水LB培養液	3.95x10 ⁹	4.15x10 ⁹	3.25x10 ⁹	4.75x10 ⁹	2.85x10 ⁹	1.28x10 ⁹
海水/蒸餾水 1:1LB培養液	3.65x10 ⁹	3.85x10 ⁹	1.84x10 ⁹	4.30x10 ⁹	2.74x10 ⁹	1.16x10 ⁹
海水LB培養液	2.90x10 ⁹	2.81x10 ⁹	9.15x10 ⁸	2.86x10 ⁹	2.65x10 ⁹	9.25x10 ⁸

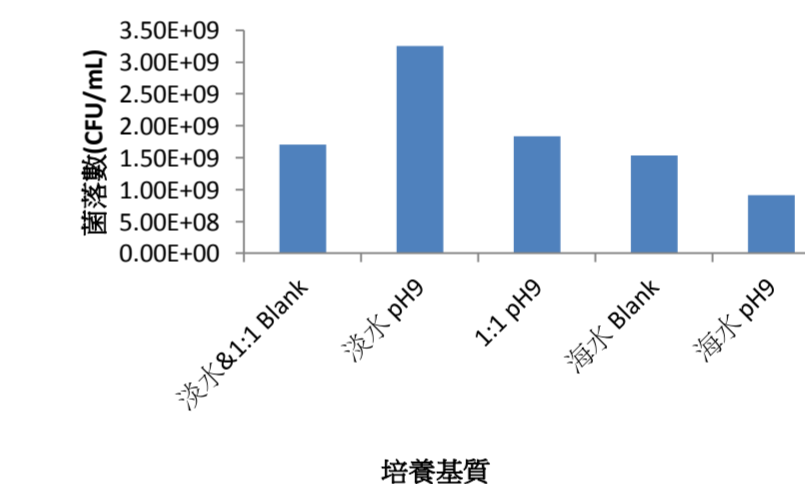
註:菌株1-3第0天之初始濃度為1.74x10⁹(CFU/ml)
菌株3-4第0天之初始濃度為4.70x10⁹(CFU/ml)



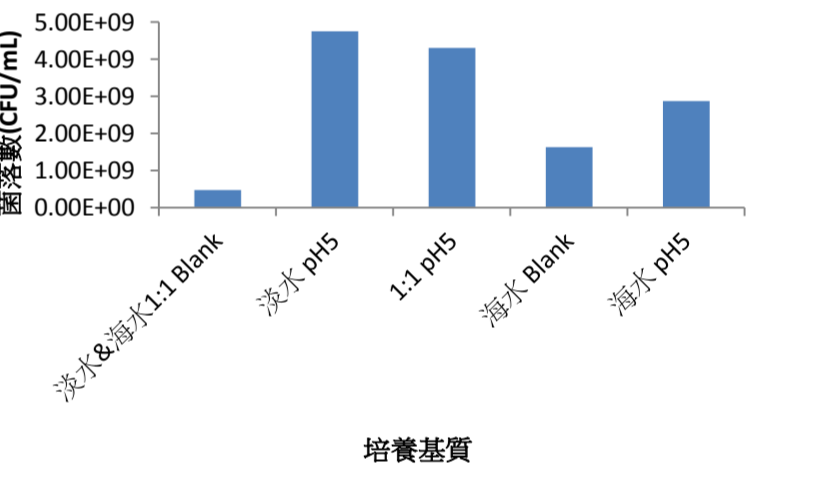
圖十、菌株1-3於不同鹽度下培養兩天之總菌落數(pH5)



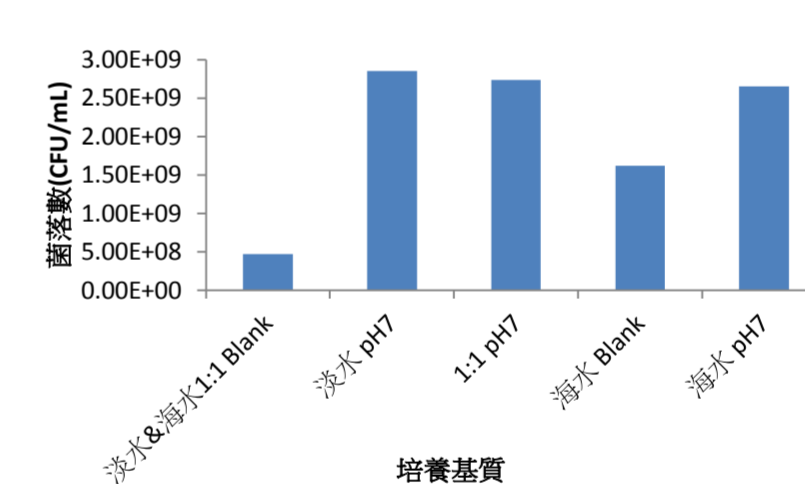
圖十一、菌株1-3於不同鹽度下培養兩天之總菌落數(pH7)



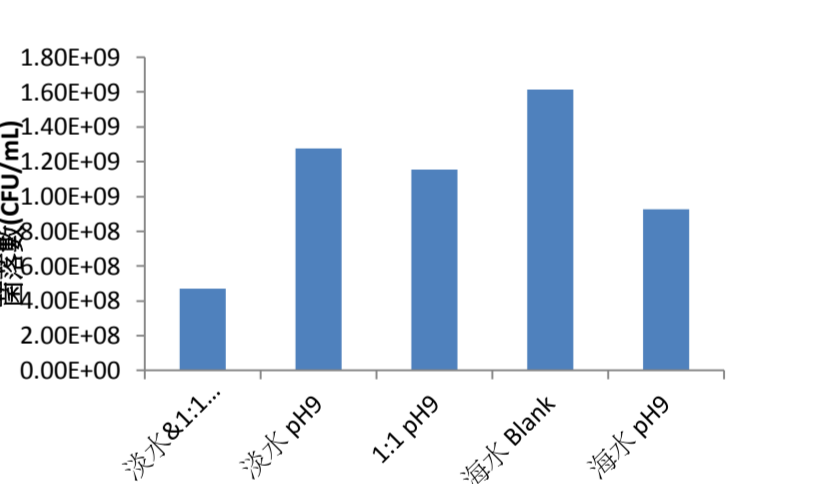
圖十二、菌株1-3於不同鹽度下培養兩天之總菌落數(pH9)



圖十三、菌株3-4於不同鹽度下培養兩天之總菌落數(pH5)



圖十四、菌株3-4於不同鹽度下培養兩天之總菌落數(pH7)



圖十五、菌株3-4於不同鹽度下培養兩天之總菌落數(pH9)

菌株1-3及菌株3-4種植於海水配製，分別先調整至pH5、7及9的LB培養液中，培養兩天後，菌株1-3生長於海水配製的LB培養液，並控制pH5時，生長狀況最佳，總菌落數達2.9x10⁹(CFU/ml)；pH7時與pH5時差異不大，總菌落數為2.81x10⁹(CFU/ml)。在pH9時，則有些微落後，總菌落數為9.15x10⁸(CFU/ml)。菌株3-4生長於海水配製的LB培養液，並控制於pH5時，生長狀況最佳，達2.86x10⁹(CFU/ml)，在pH7與pH5時菌株的生長狀況差異不大，總菌落數為2.65x10⁹(CFU/ml)。在pH9時，菌株生長些微落後至9.25x10⁸(CFU/ml)。再次證實，pH5~9對兩菌株的生長影響亦不明顯。

從表六中可以看到菌株1-3於蒸餾水LB培養液生長狀況最佳達4.15x10⁹(CFU/ml)，在半海水的LB培養液有些落後達3.85x10⁹(CFU/ml)，海水LB培養液再稍微減少至2.81x10⁹(CFU/ml)。菌株3-4於蒸餾水LB培養液生長狀況最佳達2.85x10⁹(CFU/ml)，而半海水的LB培養液，對菌株生長影響不大，總菌落數為2.74x10⁹(CFU/ml)，以海水LB培養液培養時，總菌落數成長再稍微減少至2.65x10⁹(CFU/ml)。且菌株3-4於培養兩天後，在各個pH環境下的培養液皆能有近一個次方(10¹)的增長，生長速率較菌株1-3快。綜合整理以上的結果，兩株柴油降解潛勢菌株於同樣的pH環境下，在兩天內，鹽度幾乎對其生長未產生抑制或影響，反而是兩菌株在pH9的環境下顯示出較慢的生長速率。

五、結論

1. 菌株1-3及3-4，可以於培養第1天達對數生長期，菌株1-3自培養第1天至第3天為生長穩定期，第3天後即進入衰減期。菌株3-4培養第1天至第4天為生長穩定期，第4天以後即進入衰減期。兩菌株在海水和淡水中的生長特性較沒有明顯差異，但在海水中之生長速率較蒸餾水快。
2. 兩株菌株能存活於20℃至35℃之間，但無法存活在50℃的溫度。
3. 兩菌株在pH值的耐受性極類似，在相同溫度環境下之生長速率幾乎是一樣的，在pH9的環境下顯示出較慢的生長速率，但皆能存活於pH5~9之間的環境。
4. 兩株柴油降解潛勢菌株於同樣的pH環境下，在兩天內，海水、半海水及淡水幾乎對其生長未產生抑制或影響。但菌株3-4在各個pH環境下的培養液培養兩天後皆能有近一個次方(10¹)的增長，與菌株1-3相比較，顯示出較快的生長速率。