

生物界面活性功能菌株之初探

專題學生：蔡昀騰、張靖柔、賴任軒、王柏揚、余浚成



一、摘要

80年代隨著台灣經濟的快速發展，人們對生活品質的要求愈來愈高，舉凡交通、紡織品、及盛裝食品的容器等各類民生用品的使用量也逐年攀升。而這些民生用品多是以化石原料為材料，石油礦產成為最重要的工業原料及生產原料。但在製造、輸送及儲存石油的過程中，因為人為疏忽而對自然環境造成污染的事件時有耳聞，其中土壤及地下水為污染物最直接的受害者。

在土壤及地下水整治技術中，生物復育技術運用環境的自然機制將污染物降解或轉化成較低毒性的型態，藉此降低污染物濃度及毒性或去除，相較於化學復育技術及物理復育技術，對土壤環境的傷害較低且具經濟性。在技術方面若能掌握微生物效能及環境影響因子，可藉此提升整治效果，縮短整治期程。

本研究由濱海地區受油品污染場址的土壤中，分離、純化出23株菌種，模擬海城環境進行富集培養，從中篩選出THS-1、THS-3、THG-2、TL10-1、TL11-1、TL12-3及TL14-3等7株具生物界面活性特性的菌株，乳花指數E₂₄皆高於40%，介於40至65%之間。經革蘭氏染色及外觀型態觀察，初步判定為革蘭氏陽性的桿狀菌。

7株具乳花能力的菌株在乳花油品的特性上，TL11-1及TL14-3兩菌株屬快速型油品乳花菌，其餘5株雖在第一天E₂₄表現優異，但須至第三天產生的界面活性物質才能形成穩定且緻密的乳花界面。未來在油品污染場址，可整合運用此類具乳花能力菌株的乳花能力及特性，使用生物放大的方式，增加能提升油污物溶解度的微生物數量，藉此提高生物處理效率。

關鍵字:生物復育技術、濱海地區、受油品污染場址、生物界面活性、乳花指數

二、前言

臺灣公民營加油站約2,546個，每個加油站又多有數個地下儲油槽，加上軍方及公民營工廠之儲油槽，估計地下儲油槽高達6,500個。(經濟部能源委員會統計資料，2006)而加油站經常緊鄰住宅，偶有因輸油管線破裂或老舊因素，發生油品外洩導致土壤污染事件。

對於環境較善的生物復育法，因為具經濟性且符合自然界的運作機制，對土壤及環境危害較低，在處理土壤污染上逐漸受到重視。針對將微生物運用於降解環境中總石油氫化合物已有相當多的學者進行探討與研究，由過去的研究中得知，部分微生物能以石油污染物作為唯一碳源及能源以自身生長所需，但因分佈於污染場址中的石油污染物不易為微生物觸及，導致無法掌握利用微生物進行整治工作之時效性，因此如果能提升石油污染物的生物可及性，則將有利於後續運用生物整治技術的復育成效。

本研究自濱海地區的油品污染場址土壤中，分離並純化出菌株，由所有菌株中篩選出油品乳花能力較強的菌株，針對具備油品乳花能力的菌株進行革蘭氏染色鑑定。未來可進一步將此生物界面活性功能菌株整合運用於受油品污染場址，藉以將土壤中油品由土壤孔隙中乳花、釋出，達到提升整治效率的目的。

本研究目的包括:

1. 由濱海受油品污染場址中分離純化出地菌株。
2. 完成各菌株之保存、續代及放大培養。
3. 檢測各菌株之油品乳花能力，篩選出具原油乳花能力之菌株。
4. 革蘭氏染色鑑定菌種。

三、研究方法

本實驗由位於濱海地區受油品污染場址中的土壤中，分離純化出菌株，接著模擬海城環境，從所有菌株中篩選出具有乳花能力的菌株，並進一步研究各菌株之乳花特性，結果可提供未來於現地添加菌種(微生物)進行污染整治時的參考依據。

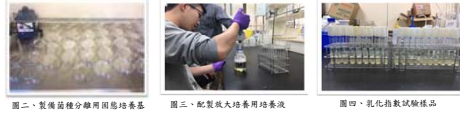
研究流程如圖一。實驗步驟如下:

1. 以海水配製培養液及培養基，進行菌種之分離與純化。
2. 由乳花指數試驗篩選具油品乳花能力的菌株。
3. 藉批式試驗了解各菌株的油品乳花特性。
4. 以型態觀察、初步鑑定形狀、大小，區分G(+)或G(-)。

個實驗單元進行之操作實況如圖二至圖四。



圖一、研究流程



圖二、製備菌種分離用培養基 圖三、配製放大培養用培養液 圖四、乳花指數試驗樣品

四、結果與討論

1. 油污污染場址土壤理化情形

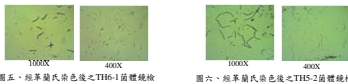
本研究之菌種分離自兩個受油污污染場址的土壤，各場址土壤之導電度檢測結果如表1。由檢驗結果得知，三種污染土之導電度介於300 μS/cm到600 μS/cm之間，相較於空白土壤之導電度，數值高出10倍以上，由此可確認三種污染土確實受到一定程度的海水滲透影響。

土壤樣品名稱	導電度(μS/cm)
空白土壤	35.4
空白污染土	501.5
高濃度TPH污染土	528.0
低濃度TPH污染土	383.5

2. 菌種分離純化結果

本實驗菌種係來源於土壤中之油污含量高低不同，分別於TH及TL標號下進行編號。TH為分離自總石油氫化合物(TPH)含量為12,000 mg/kg之油污污染土，TL則來自2,000 mg/kg之油污污染土。經劃線法分離菌種，初步分離出THS、THG、TH9、TL10、TL11、TL12及TL14共七株菌種。但經鏡檢觀察到仍為雜菌，故經再次劃線分離。經第二次培養與劃線分離後，共得到THS-1、THS-2、THS-3、THG-1、THG-2、TH9-1、TH9-2、TH9-3、TH9-4、TL10-1、TL10-2、TL11-1、TL11-2、TL12-1、TL12-2、TL12-3、TL12-4、TL12-5、TL14-1、TL14-2、TL14-3、TL14-4、TL14-5等23株菌種。

菌種經革蘭氏染色，試鏡以光學顯微鏡1000倍觀察其形狀及大小，經鏡檢觀察，判斷已為單一菌種，選擇部分菌株之鏡檢觀察影像如圖五及圖六。經革蘭氏染色之菌體皆呈現紫色，顯示皆屬革蘭氏陽性(G+)菌。



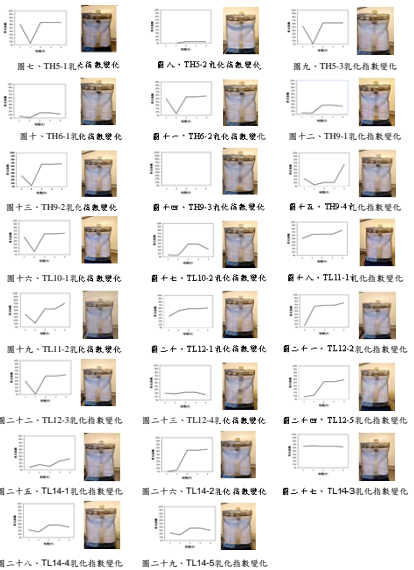
圖五、經革蘭氏染色後之TH16-1菌體鏡檢影像 圖六、經革蘭氏染色後之TH15-2菌體鏡檢影像

3. 菌種乳花指數試驗結果

為了解本研究所分離出之菌種是否具有乳花油品的能力，以生物界面活性劑特性試驗中的乳花指數試驗，由乳花指數E₂₄試驗結果進行各菌株之油品乳花能力強弱的判斷。乳花指數E₂₄試驗，菌液與柴油以4:6的體積比例進行試驗，初始未震盪時，液體總高度皆在6.5 cm左右，菌液(水層)高度多為2.8 cm，柴油(油層)高度為3.7 cm。依公式(3-1)計算，乳花指數E₂₄達60%時，柴油已完全被乳化，因此本研究以乳花指數E₂₄40%為標準，以此標準篩選出具有乳花油能力的菌株。

$$\text{乳花指數} E_{24}(\%) = \frac{\text{乳化層高度}(\text{cm})}{\text{總液體高度}(\text{cm})} \times 100\% \quad (3-1)$$

觀察紀錄實驗過程中各菌株乳花試驗之每日液體總高度、乳化層高度及油層高度，計算得到的各菌株之乳花指數，整理如圖七至圖二十九。



本研究所分離純化出的23株菌種，經過乳花指數試驗後，以乳花指數E₂₄須達40%的標準，篩選出THS-1、THS-3、THG-2、TL10-1、TL11-1、TL12-3及TL14-3等共7株菌種，具備界面活性劑的特性。

4. 菌種的油品乳花特性

歸納本研究所分離純化出的23株菌種的乳花能力試驗結果，將23株菌種於試驗期間表現出的乳花特性分為三類型，分類後菌種的乳花指數變化整理如圖三十至圖三十三。

(1) 快速產生界面活性物質之油品乳花菌

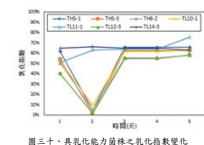
圖三十是THS-1、THS-3、THG-2、TL10-1、TL11-1、TL12-3及TL14-3等7株具乳花能力菌種於試驗期間的乳花指數變化圖。第一天E₂₄皆大於40%，但第二天乳花指數下降至小於40%，但在第三天乳花指數則又回升至大於40%甚至持續上升至第五天。表示菌株具有極高的界面活性，讓油與水間產生親和力，降低了界面張力，使柴油油散成許多微粒，分散於水(菌液)中形成乳花狀溶液。但在油-水兩相之間所形成的乳花層厚度不足，導致再次震盪後，第二天乳花指數大幅下降，造成此現象的原因可能為菌種所分泌的界面活性物質的濃度不足以保持界面張力所形成的乳花層的穩定性所致。但隨試驗繼續，產生的界面活性物質與油充分反應才能表現出界面活性劑的性能。

(2) 不具備乳花能力之菌種

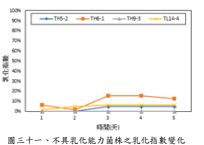
THS-2、THG-1、TH9-3、TL14-4等4株菌種自始至終乳花指數未超過20%，明顯不具備乳花能力菌種。圖三十一為此三株菌於試驗期間的乳花指數變化趨勢圖。而TH9-1、TH10-2、TH12-4、TL14-1、TL14-5等5株菌，可產生界面活性物質但乳花能力不足之菌種，試驗期間乳花指數可超過20%但未達40%。圖三十二為此5株菌於試驗期間的乳花指數變化趨勢圖。

(3) 不具備油品乳花能力但可緩慢而持續地產生界面活性物質之菌種

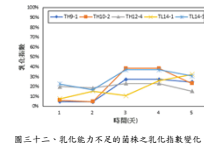
圖三十三是5株菌無法在培養一天後達到本研究設定之乳花能力標準的菌種於試驗期間的乳花指數變化圖，與快速產生界面活性物質之7株油品乳花菌最大的差別在於，TH9-2、TL11-2、TL12-2、TL12-5、TL14-2等5株菌的E₂₄不似7株具乳花能力菌種，於第一天E₂₄即達到40%的標準，但最遲在第三天方能表現出優異的界面活性劑的性能。原因也許是此等菌種需要較長的時間，產生的界面活性物質才能與油充分反應；亦或此類菌種須先適應高油分的环境後才能產生足夠的界面活性物質，這兩種可能原因皆須再進一步證實。



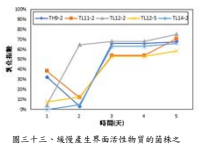
圖三十、具乳花能力菌種之乳花指數變化



圖三十一、不具備乳花能力菌種之乳花指數變化



圖三十二、乳花能力不足的菌株之乳花指數變化



圖三十三、緩慢產生界面活性物質的菌株之乳花指數變化

五、結論與建議

結論

1. 由濱海地區受油品污染場址的土壤中，成功分離、純化出23株菌種。
2. 以乳花指數E₂₄40%為標準，從分離出的菌種中篩選出THS-1、THS-3、THG-2、TL10-1、TL11-1、TL12-3及TL14-3等7株，具備界面活性劑特性的菌株。
3. 經革蘭氏染色鑑定，本研究於油污污染場址土壤中分離純化出之菌種，皆為(G+)陽性，型態為桿菌。
4. 分離純化出之部分菌種雖然乳花指數E₂₄未能達到標準40%，但在第三天皆能表現出優異的界面活性劑的性能。原因也許是此等菌種需要較長的時間，產生的界面活性物質才能與油充分反應；亦或此類菌種須先適應高油分的环境後才能產生足夠的界面活性物質，這兩種可能原因皆須再進一步證實。

建議

1. 菌種鑑定初步僅以革蘭氏染色判定，未來可更精準地進行菌株DNA之萃取、聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)以基因定序進行BLAST資料庫比對，鑑定微生物至屬級學名。
2. 本研究於室溫(15°C-37°C)下進行乳花試驗，未來可置於恆溫培養箱中進行溫度控制，以將環境因子的影響降至最低。
3. 為確保油層與水層於乳花試驗時能完全乳化，本研究採用試管震盪器控制200rpm持續1分鐘，操作時使用之震盪器宜固定，以維持攪拌動力之一致化。