

柴油分解菌與營養鹽對柴油分解關係之研究

方俊傑、簡錦樹

國立成功大學地球科學研究所

摘要

本研究以中油廢水處理廠一級污水，分離出柴油分解菌株，於石英砂中分解柴油污染物，在各種不同的營養鹽 $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ 及 $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 生長90天的環境下試驗其分解效率與細菌生長量。以分解效率而言，油分解菌若無營養鹽時分解率最低為12.5%，僅有氮營養鹽時油分解率達到26.0%，若同時以N:P=10:1為營養鹽其分解率可達到33.4%，另外，以Bushnell-Haas培養基當營養鹽分解率最高可達37.8%。因此，當有氮營養鹽時柴油分解效率可提高一倍以上。若再加入磷之營養鹽時，油分解效率約為無營養鹽分解之三倍。油分解菌若無營養鹽時，第90天油分解菌生長量僅為 6×10^6 CFU/g，以氮營養鹽時油分解菌生長量為 5.9×10^7 CFU/g。以N:P=10:1為營養鹽時分解菌生長量為 2.2×10^8 CFU/g。以Bushnell-Haas培養基當營養鹽油分解生長量最高可達 3.5×10^8 CFU/g。因此，氮與磷之營養鹽對柴油菌分解柴油關係影響非常重大。

將柴油分解菌株與以分離及純化，經16S rDNA基因序列分析比對為*Pseudomonas Acepahlitica*。

前言

石油及其相關產品的使用已成為民生必需品的地步，交通工具使用的汽油、柴油等及石油提煉出來的化學原料如人造纖維、塑膠與民生使用的天然氣、瓦斯等，石化產品之使用儼然一切工業的基礎。但隨之而來石油系列物質污染亦日益嚴重，其主要來源來自地表或地表下的儲槽或管線因腐蝕產生洩漏事件，當這些污染物進入生物體後，經過代謝過程可能危害人體健康。

利用微生物降解法來進行土壤或地下水的石油污染整治工作近年來獲得極大的重視，因為此種方法操作簡單、且能有效處理大量污染場址的污染物。但是微生物降解碳氫化合物的過程非常複雜，所以如果能瞭解的微生物在土壤中降解碳氫化合物的行為、影響因素等，將對環境污染之整治如土壤復育或地下水整治等工作有極大的助益。

試驗方法

本研究以中油廢水處理廠一級污水，分離出柴油分解菌株，於石英砂中分解柴油污染物，在各種不同的營養鹽 $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ 及 $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ 生長 90 天的環境下試驗其分解效率與細菌生長量。

菌種培養、柴油分解試驗：

以 Bushnell-Haas 培養基加入柴油，並加入少量中油廢水處理廠一級污水菌液，於 30°C 耗氧環境下進行柴油分解菌種培養。在準備多隻玻璃管分別置入 8g 小於 2mm 之石英砂並分別加入① $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ ② $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ 及 $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ ③ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 及 $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ ④Bushnell-Haas 培養基及 80mg 之柴油於 30°C 耗氧環境下進行柴油分解試驗。每隔 15 天取樣分析，以塗抹髮測量細菌生長量與以 G.C 分析土壤中柴油濃度計算分解效率(分析方法為 NIEA S286)。本實驗共進行 90 天，於第 60 天時再加一次相同量之營養鹽於石英砂玻璃管。

菌種分離及鑑定：

菌種之 DNA 萃取及 PCR(聚合酶連鎖反應)之 16SrDNA 基因放大：

將純化之單一菌種以液態培養基大量培養後，以 DNA 萃取試劑及 PCR(聚合酶連鎖反應)，複製細菌之 16SrDNA 基因片段，用以基因定序。本研究使用 PCR 的藥品為每管總體積 50ul 下混合 PCR 反應溶液，起始溫度為 94°C 執行 5 分鐘，之後將雙股 DNA 分開形成單股的變性(denaturation)，溫度為 94°C 執行 1 分鐘，黏合(annealing)溫度為 55°C 執行 1 分鐘 30 秒，延長(extention)溫度為 72°C 執行 2 分鐘，重複以上變性、黏合、延長作用共 30 個循環，最後以 72°C 執行 10 分鐘穩定 PCR 產物，才以膠電泳確定 PCR 產物。將 PCR 產物以 DNA 定序儀定序，並以 BioEdit 軟體，利用兩股序列包含重覆片段之特性，判斷連接成一段完整序列，最後至 NCBI 網站比對此序列以鑑定菌種。

結果與討論

油分解菌若無營養鹽時油分解最慢，第60天分解率10.2%而第90天油分解率僅為12.5%。若僅有氮營養鹽時油分解率稍快，第60天分解率17.6%，第60天再添加1次相同營養鹽時於第90天油分解率達到26.0%。同時以N:P=10:1為營養鹽時分解率速度較快第60天分解率21.4%，經再添加1次相同營養鹽時油分解率第90天達到33.4%。以Bushnell-Haas培養基當營養鹽油分解最快，第60天分解率25.3%而第90天油分解率最高可達37.8%(如表三)。

油分解菌若無營養鹽時油分解菌生長最慢，第60天分解菌生長量為 7×10^6 CFU/g而第90天油分解菌生長量減少為 6×10^6 CFU/g。若僅有氮營養鹽時第60天分解菌生長量為 2.5×10^7 CFU/g第90天油分解菌生長量為 5.9×10^7 CFU/g。同時以N:P=10:1為營養鹽時第60天分解菌生長量為 8.2×10^7 CFU/g第90天為 2.2×10^8 CFU/g。以Bushnell-Haas培養基當營養鹽第60天分解菌生長量 1.4×10^8 CFU/g第90天油分解生長量最高可達 3.5×10^8 CFU/g(如表二)。

參考書目

- Omry Koren, Vishnia Knezevic, Eliora Z. Ron, and Eugene Rosenberg, Petroleum Pollution Bioremediation Using Water-Insoluble Uric Acid as the Nitrogen Source, Applied And Environmental Microbiology, **69**, 6337 - 6339, 2003
- Lyleg Whyte, Luc Bourbonnie`Re, and Charles W. Greer*, Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by Psychrotrophic *Pseudomonas* Strains Possessing Both Alkane (alk) and Naphthalene (nah) Catabolic Pathways, Applied And Environmental Microbiology, **63**, 3719-3723, 1997
- R. Margesin, D.Labbe´, F. Schinner, C.W.Greer, and L. G. Whyte ,Characterization of Hydrocarbon-Degrading Microbial Populations in Contaminated and Pristine Alpine Soils, Applied And Environmental Microbiology, **69**, 3085 - 3092, 2003

表一 Bushnell-Haas 培養基配置(1L 配置方法)

藥品名稱	重量
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2g
CaCl ₂	0.02g
KH ₂ PO ₄	1.0g
K ₂ HPO ₄	1.0g
NH ₄ NO ₃	1.0g

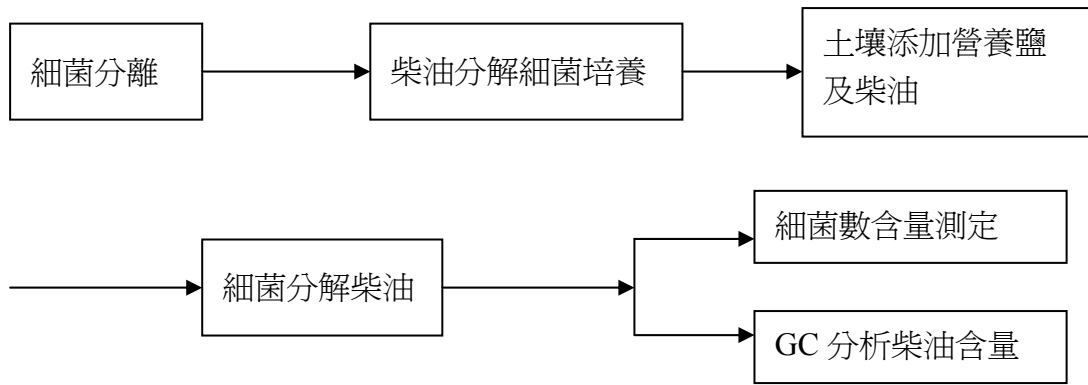
(表二)柴油分解生長的菌落數(CFU×10⁶/g)

營養鹽 \ 天	0	15	30	45	60	75	90
Control(不加營養鹽)	1	1	2	4	7	7	6
NH ₄ NO ₃	1	8	10	22	25	61	59
NH ₄ NO ₃ + (NH ₄)H ₂ PO ₄	1	23	31	76	82	200	220
(NH ₄)SO ₄ + (NH ₄)H ₂ PO ₄	1	25	31	80	93	220	230
B-H medium	1	29	42	119	140	320	350

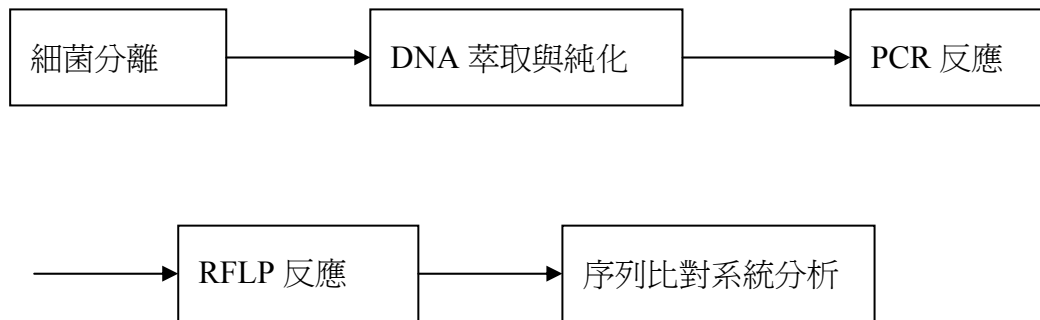
(表三)柴油分解百分比(%)

營養鹽 \ 天	0	15	30	45	60	75	90
Control (不加營養鹽)	0	4.2	6.7	8.4	10.2	11.3	12.7
NH ₄ NO ₃	0	8.1	12.3	14.7	17.6	24.1	26.0
NH ₄ NO ₃ + (NH ₄)H ₂ PO ₄	0	10.4	14.4	16.8	21.4	28.0	33.4
(NH ₄)SO ₄ + (NH ₄)H ₂ PO ₄	0	8.8	13.2	15.8	20.3	26.7	32.1
B-H medium	0	11.5	15.6	20.1	25.3	33.0	37.8

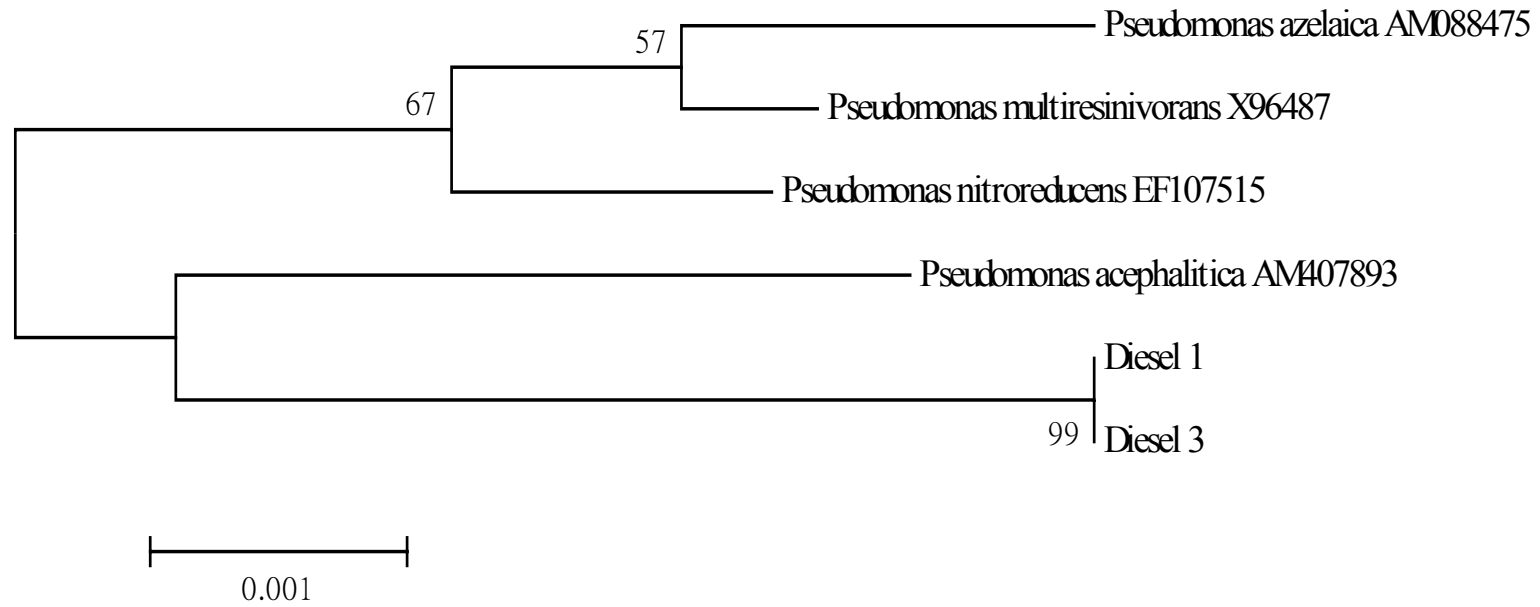
試驗方法與流程



圖一 柴油分解試驗流程



圖二 柴油分解細菌分離鑑定流程



圖三 柴油分解菌種比對之親緣關係樹(0.001 表示 substitutions per nucleotide position)