

國立臺灣大學工學院化學工程學研究所

碩士論文

Department of Chemical Engineering

College of Engineering

National Taiwan University

Master Thesis

利用 *Rhodococcus erythropolis* NTU-1 細胞聚集現象

移除正十六烷

*Rhodococcus erythropolis* NTU-1 Bioflocules for

*n*-Hexadecane Removal



謝惠敏 撰

Hui-Min Hsieh

指導教授：劉懷勝 博士

Advisor: Hwai-Shen Liu, Ph.D.

中華民國 一 百 年 七 月

July, 2011

## 致謝

時光匆匆流逝，碩士生涯不知不覺也到達了尾聲。一路走來，我受到許多人的支持與鼓勵。這兩年來首先要感謝的是我的指導教授 劉懷勝老師，您讓我們不斷的去想問題及解決問題，並適時的指點迷津，不時的鼓勵我們。您的教學方式及處事態度都值得我們學習，未來的生活中我會謹記您給我的建議及啟發的。

感謝工研醋 許駿發博士、台科大 李振綱博士及 王孟菊博士在百忙之中擔任我的口試委員，給了我許多寶貴的建議，使本論文能夠更加精進。

接下來要感謝的是實驗室的伙伴們。感謝文興學長平常生活中的經驗分享，在我口試前也提醒了我許多該注意的地方。感謝志文學長在實驗及生活上的提點，不僅教了我許多實驗上的技巧也提出了許多有趣的想法供我參考。感謝勻錡學姐在我實驗後期的幫忙，使我的論文更加有說服力。此外，我要感謝玗紳、緯農、榕庭、煒泰、易修及翔瑜學長，謝謝你們在研究上及生活上給予我的幫助及建議。

感謝一同奮鬥的祐安及詞伊，這兩年不管是在課業上或生活態度上我都從你們身上學到很多，還記得之前一起在實驗區做實驗時，雖然很辛苦，但是我們都互相加油，那段日子也成為了我碩士生涯中難忘的回憶。感謝舒婷熱心的幫忙，在我口試前也分享了許多經驗及該注意的細節。感謝有趣的學弟們鎬綱、政勛及鈺傑，希望接下來你們的實驗都能順順利利。

我還要感謝一起從中央進入台大就讀的朋友們，瑋菱、佩吟、怡怡、彥廷、映萱及明哲，謝謝你們這兩年的陪伴，不時的聽我抱怨，為我鼓勵。

最後我要感謝我的家人們，謝謝你們一直支持我，給我依靠，讓我有大步向前的動力，對你們的感謝是不可言喻的。很慶幸我的生活中有你們，未來我也會為了你們繼續努力的。

要感謝的人還有很多，在此謹以此論文獻給所有我需要感謝的你們！

謝惠敏，2011 年 7 月

## 中文摘要

本研究目的主要在於探討如何提升及應用 *R. erythropolis* NTU-1 的細胞聚集現象，使長鏈烷類在短時間內能大量移除。

研究結果發現，在培養錐形瓶中加入篩網可幫助迴旋式培養下 NTU-1 與正十六烷的接觸機會及形式，因而 NTU-1 在 44 小時內即能形成結塊，配合物理撈除的方式可將 2000 ppmv 正十六烷移除掉 95% 以上。

利用冷凍乾燥的方式來保存以 NB 培養的 NTU-1 細胞，實驗結果發現使用麥芽糖溶液作為冷凍乾燥保護劑，並存放於  $-20^{\circ}\text{C}$  的環境下，乾燥的 NTU-1 在經過 30 天存放後仍具有很高的存活率且其生理特性並不會受到影響。同樣利用冷凍乾燥的方式來乾燥以正十六烷培養而得的 NTU-1 細菌結塊，然而實驗結果顯示乾燥後的 NTU-1 結塊活性很低，無法再降解烷類，但其再形成結塊包覆烷類的能力並不會受到影響，1~2 小時內即能再次形成聚集體，第 12 小時以物理撈除的方式可移除 80~90% 濃度為 2000 ppmv 的正十六烷。

接著以烘乾的方式取代成本高及費時的冷凍乾燥法來乾燥 NTU-1 結塊。實驗中選擇烘乾溫度為  $80^{\circ}\text{C}$ ，其乾燥所需時間約 15 小時且乾燥後的 NTU-1 結塊具有良好形成聚集包覆烷類的效果。這個部分換算出利用 1g/L 的 NTU-1 結塊密度來處理 10000 ppmv 的正十六烷較佳。另外，若以兩段式添加乾燥 NTU-1 結塊的方法，可使正十六烷的移除效率在 12 小時內由 90% 提升至將近 100%。

乾燥後 NTU-1 結塊再形成聚集將烷類包覆的原因與其細胞表面疏水性及完整性有關，此兩項特性需同時存在，乾燥 NTU-1 結塊才能貼附烷類且以堆疊的方式形成大顆粒結塊。

由此可知，將 NTU-1 結塊冷凍乾燥或烘乾後保存，利用乾燥 NTU-1 結塊的高度包覆烷類能力，配合物理撈除的方式，使烷類能在 12 小時內大量移除，此項成果無疑的為將來石油污染物移除提供了一個相當具競爭性及發展性的方法。

## Abstract

*Rhodococcus erythropolis* NTU-1 is a strain which can not only degrade hydrocarbons but also traps alkanes in bioflocs during bioremediation process. In this study, we focused on how to accelerate bioflocs formation and to apply NTU-1 bioflocs for *n*-hexadecane (*n*-C16) removal.

Results showed that sieves in Erlenmeyer flasks increased the *n*-C16 agitation efficiency under orbital shaking and assisted NTU-1 to utilize *n*-C16. NTU-1 formed bioflocs and trapped most residual *n*-C16 within 44 hr. At this time, more than 95% *n*-C16 was removed.

NTU-1 cells (cultured by Nutrient Broth) by freeze-drying preserved most viability with maltose as the protectant. However, freeze-dried NTU-1 bioflocs (cultured by *n*-C16) resulted in low cell viability. Dried NTU-1 bioflocs did not degrade *n*-C16 but they still re-formed bioflocs and re-trapped most of *n*-C16. With these freeze-dried bioflocs, *n*-C16 removal efficiency achieved 80 ~ 90% within 12 hr.

Heat-dried bioflocs were further evaluated because of its simplicity in comparison with freeze-drying method. It proved a good method and we found 1g/L dried cell vs. 10000 ppmv *n*-C16 was an optimal ratio. Moreover, with two-step addition of dried NTU-1 bioflocs, near 100% of *n*-C16 was removed in 12 hr.

The mechanism of re-forming bioflocs was found to relate to the cell hydrophobicity and integrity. With these two characteristics, dried NTU-1 bioflocs adhered to *n*-C16, and *n*-C16 worked as the linker to form cell pellets in a short time. These dried bioflocs provided a feasible and potential method for remediation of hydrocarbon pollutants.

# 目錄

致謝 .....	I
中文摘要 .....	II
Abstract .....	III
目錄 .....	IV
圖目錄 .....	VII
表目錄 .....	XIV
照片目錄 .....	XV
第一章 緒論 .....	1
1.1 前言 .....	1
1.2 研究目的及論文綱要 .....	2
第二章 文獻回顧 .....	3
2.1 石油碳氫化合物簡介及其對環境和人類之影響 .....	3
2.2 處理石油碳氫化合物污染之方法 .....	5
2.3 生物處理石油碳氫化合物 .....	9
2.3.1 生物復育簡介 .....	9
2.3.2 微生物攝取碳氫化合物之模式 .....	14
2.3.3 微生物分解碳氫化合物之方式 .....	20
2.4 微生物降解碳氫化合物之代謝途徑 .....	23
2.4.1 直鏈烷之氧化機制 .....	23
2.4.2 支鏈烷之氧化機制 .....	26
2.4.3 烯烴類及環烷類之氧化機制 .....	31
2.5 實驗菌株 <i>Rhodococcus erythropolis</i> 之介紹 .....	34
2.5.1 <i>Rhodococcus</i> 菌屬簡介 .....	34
2.5.2 <i>Rhodococcus erythropolis</i> 之特性及應用 .....	37
2.6 微生物之細胞聚集現象 .....	42
2.7 微生物乾燥技術及應用 .....	45
2.7.1 冷凍乾燥 (Freeze-drying) .....	45
2.7.1.1 冷凍乾燥對菌株的影響 .....	46
2.7.1.2 冷凍乾燥時保護劑的添加 .....	48
2.7.1.3 冷凍乾燥後菌株貯存之安定性 .....	51
2.7.2 烘乾之原理及應用 .....	52

<b>第三章 實驗材料與方法 .....</b>	<b>53</b>
<b>3.1 實驗菌株 .....</b>	<b>53</b>
<b>3.2 培養基組成與配製 .....</b>	<b>55</b>
3.2.1 液態礦物培養基 .....	55
3.2.2 菌株保存培養基 .....	58
3.2.3 菌株活化培養基 .....	59
3.2.4 計數平板培養基 .....	59
<b>3.3 實驗方法 .....</b>	<b>60</b>
3.3.1 菌株的活化及生長曲線 .....	60
3.3.2 礦物培養基菌液製作 .....	61
3.3.3 正十六烷之生物降解與生物復育實驗 .....	62
3.3.4 以 NB 培養的 NTU-1 進行冷凍乾燥及其存活率測試 .....	65
3.3.5 以正十六烷培養的 NTU-1 細菌結塊進行冷凍乾燥 .....	67
3.3.6 烘乾以正十六烷培養的 NTU-1 細菌結塊 .....	68
3.3.7 乾燥後 NTU-1 細菌結塊對於正十六烷的包覆與移除 .....	69
3.3.8 不同條件乾燥下 NTU-1 細菌結塊之細胞表面疏水性測定 .....	70
<b>3.4 實驗藥品與器材 .....</b>	<b>71</b>
3.4.1 實驗藥品 .....	71
3.4.2 實驗儀器 .....	72
<b>第四章 實驗結果與討論 .....</b>	<b>73</b>
<b>4.1 不同搖晃培養對於 NTU-1 生物降解及包覆正十六烷能力的影響及改進方法 .....</b>	<b>74</b>
4.1.1 比較往復式及迴旋式培養下 NUT-1 對正十六烷生物復育的效果 .....	74
4.1.2 迴旋式培養下錐形瓶中加入篩網時正十六烷生物復育的效果 .....	81
4.1.2.1 篩網孔徑大小為 10 mesh .....	81
4.1.2.2 篩網孔徑大小為 20 mesh .....	89
4.1.2.3 不同孔徑大小但相同折角 (45 度) 篩網之比較 .....	95
4.1.3 討論 .....	98
<b>4.2 以 NB 培養的 NTU-1 冷凍乾燥後細胞存活率及降解包覆能力探討 .....</b>	<b>101</b>
4.2.1 利用 NB 培養的 NTU-1 經過冷凍乾燥後之存活率探討 .....	101
4.2.2 以 NB 培養的 NTU-1 經過冷凍乾燥後對於正十六烷降解及包覆能力探討 .....	109
4.2.3 討論 .....	113
<b>4.3 利用正十六烷培養的 NTU-1 細菌結塊冷凍乾燥後其存活率及降解包覆能力探討 .....</b>	<b>114</b>
4.3.1 NTU-1 細菌結塊降解及包覆正十六烷的能力 (未經冷凍乾燥) .....	114
4.3.2 NTU-1 細菌結塊在冷凍乾燥後降解及包覆正十六烷的能力 .....	120

4.3.3 超音波震碎 NTU-1 結塊並進行冷凍乾燥後之應用 .....	144
4.3.4 討論 .....	146
<b>4.4 利用正十六烷培養的 NTU-1 細菌結塊經烘乾後再聚集包覆烷類之能力探討 .....</b>	<b>149</b>
4.4.1 烘乾 NTU-1 結塊時溫度與時間的選擇 .....	149
4.4.2 不同條件乾燥下 NTU-1 結塊表面疏水性測定 .....	156
4.4.3 烘乾後的 NTU-1 結塊存放溫度與時間之探討 .....	159
4.4.4 烘乾後 NTU-1 結塊於培養過程 12 小時的細胞聚集情形 .....	162
4.4.5 以不同量之乾燥 NTU-1 結塊處理 2000 ppmv 正十六烷 .....	166
4.4.6 以固定量之乾燥 NTU-1 結塊處理不同濃度的正十六烷 .....	171
4.4.7 提高乾燥 NTU-1 結塊移除正十六烷效率的方法 .....	177
4.4.8 乾燥 NTU-1 結塊再形成聚集體包覆正十六烷之機制 .....	181
4.4.9 討論 .....	184
<b>第五章 結論 .....</b>	<b>187</b>
<b>參考文獻 .....</b>	<b>190</b>
<b>附錄 1 NB 培養的 NTU-1 及正十六烷培養的 NTU-1 結塊經冷凍乾燥後的結合應用 .....</b>	<b>201</b>
<b>附錄 2 不同條件乾燥後 NTU-1 結塊之細胞粒徑大小 .....</b>	<b>207</b>



## 圖目錄

### 第二章

圖 2.3.2-1 原油中常見的碳氫化合物化學結構分類 (Alloway and Ayres 1998)。	14
圖 2.3.2-2 微生物細胞攝取有生物界面活性劑附著的碳氫化合物示意圖 (Ratledge 1988)。	18
圖 2.3.2-3 菌株 <i>Pseudomonas sp.</i> 分泌界面活性劑後攝取碳氫化合物示意圖	18
圖 2.3.3-1 好氧性微生物降解碳氫化合物的主要流程 (Fritsche and Hofrichter 2000)。	21
圖 2.3.3-2 長碳鏈烷類的好氧及厭氧性降解途徑 (點狀線的箭頭是指推測的代謝路徑) (Wentzel <i>et al.</i> 2007)。	22
圖 2.4.1-1 微生物代謝分解直鏈烷之途徑 (圖中 1 為 <i>n</i> -alkane 單氧化酶、2 為醇脫氫酶、3 為醛脫氫酶) (Britton 1984)。	25
圖 2.4.2-1 菌株 <i>Brevibacterium erythrogens</i> 降解異十九烷的途徑 (Pirnik <i>et al.</i> 1974)。	27
圖 2.4.2-2 異十九烷可能的降解途徑。圖中的標記 (R) 及 (M) 分別代表 <i>R. ruber</i> SBUG 82 及 <i>M. neoaurum</i> SBUG 109 氧化過程中檢測出的產物 ( $\longrightarrow$ means novel metabolic route; $-\cdots\rightarrow$ means major metabolic route of $\beta$ -oxidation) (Nhi-Cong <i>et al.</i> 2009)。	29
圖 2.4.2-3 異十九烷次末端氧化過程中以 2, 6, 10, 14-tetramethyl-pentadecan-3-one 作為中間產物，利用 ketone monooxygenase 進行的兩種不同單末端氧化反應。Pathway IIIA 為 <i>R. ruber</i> SBUG 82 及 <i>M. neoaurum</i> SBUG 109 的反應途徑 (Nhi-Cong <i>et al.</i> 2009)。Pathway IIIB 為 Rontani 等人提出的海洋混合菌株分解異十九烷途徑 (Rontani <i>et al.</i> 1986)。	30
圖 2.4.3-1 烯烴類生物降解可能的代謝途徑 (張蘭英等 2007)。	31
圖 2.4.3-2 環己烷的代謝途徑 (Fritsche and Hofrichter 2000)。	32
圖 2.4.3-3 不產孢放線菌 (non-sporulating actinomycetes) 降解利用不同碳氫化合物之途徑及經過 $\beta$ -oxidation 後合成細胞生長所需相關物質 (Alvarez 2003)。	33
圖 2.5.1-1 不同氧化酶促使 <i>Rhodococcus</i> 菌屬引發不同化學反應並能生長及降解掉大範圍的有機污染物。(A) 環氧化 (eg. cytochrome P450 enzymes)、(B) 順式雙羥基化反應 (e.g. by dioxygenase)、(C) 對二級烷基的羥基化、(D) 對一級烷基的羥基化 (e.g. alkane monooxygenase)、(E) 磺化氧化作用 (sulfoxidation of sulfide to sulfoxide)、(F) 磺化氧化作用 (sulfoxidation of sulfoxide to sulfone) (Larkin <i>et al.</i> 2005)。	37
圖 2.7.1.1-1 微生物冷凍乾燥的步驟示意圖 (Morgan <i>et al.</i> 2006)。	47

### 第三章

圖 3.3.1-1 NTU-1 菌株在 Nutrient Broth (NB) 營養液中的生長曲線。.....	60
圖 3.3.3-1 正十六烷在氣相層析儀中之校正曲線.....	64

### 第四章

圖 4.1.1-1 培養條件 30°C、100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷時，不同搖晃培養方式下的培養基酸鹼值變化。.....	77
圖 4.1.1-2 培養條件 30°C、100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷時，不同搖晃培養方式下之細胞生長曲線。.....	78
圖 4.1.1-3 培養條件 30°C、100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷時，不同搖晃培養方式下的正十六烷生物降解曲線。.....	78
圖 4.1.1-4 培養條件 30°C、100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷時，不同旋轉培養方式下之生物降解量及包覆量。(A) 往復式；(B) 迴旋式。.....	79
圖 4.1.2.1-1 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，錐形瓶中加入不同折角之 10 mesh 篩網之培養基酸鹼值的變化。.....	84
圖 4.1.2.1-2 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，錐形瓶加入不同折角之 10 mesh 篩網時細胞生長曲線。.....	85
圖 4.1.2.1-3 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，錐形瓶中加入不同折角之 10 mesh 篩網，正十六烷生物降解量。.....	85
圖 4.1.2.1-4 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，於錐形瓶中加入 10 mesh 不同折角篩網之正十六烷生物降解量及包覆量比較。(A) 沒有加入篩網；(B) 篩網折角為 180 度；(C) 篩網折角為 90 度；(D) 篩網折角為 45 度。.....	86
圖 4.1.2.2-1 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，於錐形瓶中加入 20 mesh 篩網不同折角時之培養基酸鹼值變化。.....	91
圖 4.1.2.2-2 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，於錐形瓶中加入 20 mesh 篩網不同折角時之細胞生長曲線。.....	91
圖 4.1.2.2-3 培養條件 30°C、迴旋式搖晃 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，錐形瓶中加入 20 mesh 篩網時之正十六烷生物降解量。.....	92
圖 4.1.2.2-4 培養條件 30°C、100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，錐形瓶中加入 20 mesh 篩網之生物降解量及包覆量比較。(A) 沒	

有加入篩網；(B) 篩網折角為 180 度；(C) 篩網折角為 90 度；(D) 篩網折角為 45 度。.....	92
圖 4.1.2.3-1 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，於錐形瓶中加入折角 45 度不同孔徑大小篩網之培養基酸鹼值變化。.....	96
圖 4.1.2.3-2 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，於錐形瓶中加入折角 45 度不同孔徑大小篩網之細胞生長曲線。.....	96
圖 4.1.2.3-3 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，於錐形瓶中加入折角 45 度不同孔徑大小篩網之正十六烷生物降解量。.....	97
圖 4.1.2.3-4 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，於錐形瓶中加入折角 45 度、6 mesh 篩網之正十六烷生物降解量及包覆量比較。.....	97
圖 4.2.1-1 不同保護劑下，以 NB 培養的 NTU-1 在 -20°C 冷凍 24 小時後的存活率。.....	103
圖 4.2.1-2 不同保護劑下，以 NB 培養的 NTU-1 經過冷凍乾燥後馬上進行復水的細胞存活率。.....	104
圖 4.2.1-3 以 NB 培養的 NTU-1，添加不同保護劑並在冷凍乾燥後存放於不同溫度下 0，10 及 30 天後的存活率。(A) -20°C、(B) 4°C、(C) 30°C。...	106
圖 4.2.1-4 以 NB 培養的 NTU-1，添加保護劑 1% 或 10% 麥芽糖溶液並在冷凍乾燥後存放於不同溫度下 0，10 及 30 天後的存活率 (A) -20°C、(B) 4°C、(C) 30°C。.....	108
圖 4.2.2-1 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，培養基中加入以保護劑 1% 麥芽糖冷凍乾燥後的 NTU-1，處理 2000 ppmv 正十六烷時之酸鹼值變化。.....	111
圖 4.2.2-2 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，培養基中加入以保護劑 1% 麥芽糖冷凍乾燥後的 NTU-1，處理 2000 ppmv 正十六烷時之細胞密度變化趨勢。.....	111
圖 4.2.2-3 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，培養基中加入以保護劑 1% 麥芽糖冷凍乾燥後的 NTU-1，處理 2000 ppmv 正十六烷時之正十六烷生物降解量。.....	112
圖 4.2.2-4 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，培養基中加入以保護劑 1% 麥芽糖冷凍乾燥後的 NTU-1，處理 2000 ppmv 正十六烷時之正十六烷生物降解量及包覆量比較。.....	112
圖 4.3.1-1 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 形成細菌結塊後重新更換 MSM 培養基及添加 2000 ppmv 正十六烷，不同時間下培養基中酸鹼值的變化。(更換 MSM 時間：第 72、102 小時)。...	118

圖 4.3.1-2 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 形成細菌結塊後重新更換 MSM 培養基及添加 2000 ppmv 正十六烷，不同時間下培養基中細胞密度的變化。(更換 MSM 時間：第 72、102 小時)。	119
圖 4.3.1-3 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 形成細菌結塊後重新更換 MSM 培養基及添加 2000 ppmv 正十六烷，不同時間下培養基中正十六烷分布的變化。(更換 MSM 時間：第 72、102 小時)。	119
圖 4.3.2-1 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊 (以 10%麥芽糖或 10%甘露糖醇為保護劑)，處理 2000 ppmv 正十六烷時之酸鹼值變化。	124
圖 4.3.2-2 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊 (以 10%麥芽糖或 10%甘露糖醇為保護劑)，處理 2000 ppmv 正十六烷時之細胞密度分布及變化趨勢。	124
圖 4.3.2-3 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，(A) 以 10%麥芽糖、(B) 10%甘露糖醇為保護劑，處理 2000 ppmv 正十六烷時之正十六烷初始量及反應中殘餘在培養基及被包覆量的分布圖。	128
圖 4.3.2-4 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊 (以 10%麥芽糖或 10%甘露糖醇為保護劑)，處理 2000 ppmv 正十六烷時之正十六烷總移除百分比。	128
圖 4.3.2-5 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，細胞密度的變化及分布。(A) 10%麥芽糖為添加劑，不同保存條件：0 天及 -20°C 下 10 天；(B) 10%甘露糖醇及 10%乳糖為添加劑，存放在 -20°C 下 10 天。	134
圖 4.3.2-6 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，正十六烷初始量及反應中殘餘在培養基及被包覆量的分布圖。(A) 10%麥芽糖為添加劑，不同保存條件：0 天及 -20°C 下 10 天；(B) 10%甘露糖醇及 10%乳糖為添加劑，存放在 -20°C 下 10 天。	135
圖 4.3.2-7 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，正十六烷總移除百分比。	135
圖 4.3.2-8 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷時之細胞密度的變化及分布。(A) 10%麥芽糖為添加劑，不同保存條件：0	

天及 $-20^{\circ}\text{C}$ 下 10 天；(B) 10%甘露糖醇及 10%乳糖為添加劑，相同保存條件： $-20^{\circ}\text{C}$ 下 10 天。.....	139
圖 4.3.2-9 培養條件 $30^{\circ}\text{C}$ 、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷時，正十六烷初始量及反應中殘餘在培養基及被包覆量的分布圖。(A) 10%麥芽糖為添加劑，不同保存條件：0 天及 $-20^{\circ}\text{C}$ 下 10 天；(B) 10%甘露糖醇及 10%乳糖為添加劑，相同保存條件： $-20^{\circ}\text{C}$ 下 10 天。.....	140
圖 4.3.2-10 培養條件 $30^{\circ}\text{C}$ 、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入以不同添加劑冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷時之正十六烷總移除百分比。.....	140
圖 4.3.2-11 培養條件 $30^{\circ}\text{C}$ 、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，存放於 $30^{\circ}\text{C}$ 下 30 天，處理 2000 ppmv 正十六烷時之細胞密度的變化及分布。.....	142
圖 4.3.2-12 培養條件 $30^{\circ}\text{C}$ 、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，存放於 $30^{\circ}\text{C}$ 下 30 天，處理 2000 ppmv 正十六烷時，正十六烷初始量及反應中殘餘在培養基及被包覆量的分布圖。.....	143
圖 4.3.2-13 培養條件 $30^{\circ}\text{C}$ 、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，存放於 $30^{\circ}\text{C}$ 下 30 天，處理 2000 ppmv 正十六烷時之正十六烷總移除百分比。.....	143
圖 4.4.1-1 培養條件 $30^{\circ}\text{C}$ 、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，培養基中加入不同烘乾條件乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 12 小時之細胞密度分布。.....	154
圖 4.4.1-2 培養條件 $30^{\circ}\text{C}$ 、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，培養基中加入不同烘乾條件乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 0、12 小時正十六烷殘餘在培養基及包覆量的分布圖。.....	155
圖 4.4.1-3 培養條件 $30^{\circ}\text{C}$ 、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，培養基中加入不同烘乾條件乾燥後的的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 12 小時之正十六烷總移除百分比。.....	155
圖 4.4.2-1 不同乾燥條件下 NTU-1 細胞表面疏水性測定 .....	158
圖 4.4.3-1 培養條件 $30^{\circ}\text{C}$ 、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入烘乾後不同存放條件下的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 12 小時的 NTU-1 細胞密度之分布。.....	160
圖 4.4.3-2 培養條件 $30^{\circ}\text{C}$ 、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入烘乾後不同存放條件下的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 12 小時正十六烷殘餘在培養基及包覆量的分布圖。.....	161
圖 4.4.3-3 培養條件 $30^{\circ}\text{C}$ 、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入烘乾後不同存放條件下的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，	

第 12 小時之正十六烷總移除百分比。.....	161
圖 4.4.4-1 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入烘乾後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷時，隨著時間培養基酸鹼值的變化。.....	164
圖 4.4.4-2 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入烘乾後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷時，隨著時間 NTU-1 細胞密度之分布。.....	165
圖 4.4.4-3 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入烘乾後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷時，隨著時間正十六烷殘餘在培養基及包覆量的分布圖。.....	165
圖 4.4.4-4 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入烘乾後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷時，隨著時間正十六烷總移除百分比之變化圖。.....	166
圖 4.4.5-1 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入不同初始重量烘乾後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷第 12 小時 NTU-1 細胞密度之分布。.....	169
圖 4.4.5-2 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入不同初始重量烘乾後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 12 小時正十六烷殘餘在培養基及包覆量的分布圖。.....	170
圖 4.4.5-3 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入不同初始重量烘乾後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 12 小時正十六烷總移除百分比。.....	170
圖 4.4.6-1 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入相同初始重量烘乾後的 NTU-1 結塊，處理不同濃度正十六烷，第 12 小時 NTU-1 細胞密度之分布。.....	175
圖 4.4.6-2 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入相同初始重量烘乾後的 NTU-1 結塊，處理不同濃度正十六烷，第 12 小時正十六烷殘餘在培養基及包覆量的分布圖。.....	176
圖 4.4.6-3 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入相同初始重量烘乾後的 NTU-1 結塊，處理不同濃度正十六烷，第 12 小時正十六烷總移除百分比。.....	176
圖 4.4.7-1 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，兩段式添加 0.03 g 乾燥 NTU-1 結塊 (第 0 小時及第 6 小時)，處理 2000 ppmv 正十六烷，不同時間點下 NTU-1 細胞密度之分布。.....	179
圖 4.4.7-2 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，兩段式添加 0.03 g 乾燥 NTU-1 結塊 (第 0 小時及第 6 小時)，處理 2000 ppmv 正十六烷，不同時間點殘餘在培養基中正十六烷的濃度分布。.....	180
圖 4.4.7-3 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，兩段式添加	

0.03 g 乾燥 NTU-1 結塊 (第 0 小時及第 6 小時)，處理 2000 ppmv 正十六烷，不同時間點下正十六烷的移除效率百分比。.....	180
圖 4.4.8-1 乾燥後 NTU-1 結塊表面完整時，細胞貼附正十六烷形成大顆粒結塊示意圖。.....	183
圖 4.4.8-2 乾燥後 NTU-1 結塊表面不完整時 (細胞碎片)，細胞貼附正十六烷示意圖。.....	183
圖 4.4.8-3 NTU-1 結塊經過冷凍乾燥或以 60 及 80℃ 的條件烘乾後，細胞貼附正十六烷再形成聚集體之示意圖。.....	184

## 附錄

附圖 1-1 培養條件 30℃、100 rpm、初始 pH 值 6.8，培養基中加入以不同保護劑冷凍乾燥後的 NTU-1 及不同添加劑冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷第 24 小時之培養基酸鹼值變化。.....	205
附圖 1-2 培養條件 30℃、100 rpm、初始 pH 值 6.8，培養基中加入以不同保護劑冷凍乾燥後的 NTU-1 及不同添加劑冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷第 24 小時之細胞密度分布。.....	205
附圖 1-3 培養條件 30℃、100 rpm、初始 pH 值 6.8，培養基中加入以不同保護劑冷凍乾燥後的 NTU-1 及不同添加劑冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷。第 24 小時正十六烷初始量及殘餘在培養基及包覆量的分布圖。.....	206
附圖 1-4 培養條件 30℃、100 rpm、初始 pH 值 6.8，培養基中加入以不同保護劑冷凍乾燥後的 NTU-1 及不同添加劑冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 24 小時之正十六烷總移除百分比。.....	206
附圖 2-1 不同烘乾溫度下，NTU-1 細胞粒徑大小分布 .....	208
附圖 2-2 以 120℃ 烘乾的 NTU-1 結塊在去離子水中所測得的細胞粒徑大小相對於訊號強度之分布圖。.....	209
附圖 2-3 冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊在去離子水中所測得之細胞粒徑大小相對於訊號強度之分布圖。.....	210
附圖 2-4 先利用超音波將 NTU-1 結塊震碎再進行冷凍乾燥的 NTU-1 在去離子水中所測得之細胞粒徑大小相對於訊號強度之分布圖。.....	210

## 表目錄

### 第二章

表 2.2-1 地下水污染之各種物理化學處理及生物處理程序之簡介與比較 (Van Stempvoort and Biggar 2008)。	7
表 2.2-2 復育方法適用性與否的影響因素 (Vik <i>et al.</i> 2001)。	8
表 2.3.1-1 自然界中能利用石油碳氫化合物之好氧性微生物分類 (Van Beilen <i>et al.</i> 2003)。	10
表 2.3.1-2 實際應用的現地生物復育法 (Korda <i>et al.</i> 1997)。	12
表 2.3.1-2 (續)。	13
表 2.3.2-1 各種碳氫化合物在水中的溶解度 (Eastcott <i>et al.</i> 1988)。	15
表 2.3.2-2 各種微生物產生的生物界面活性劑分類 (Al-Araji <i>et al.</i> 2007)。	19
表 2.5.1-1 1994~2001 年中 <i>Rhodococcus</i> 菌屬分類的變動 (華及郭 2003)。	35
表 2.5.2-1 微生物降解碳氫化合物時之酵素分類 (Van Beilen and Funhoff 2007)。	38
表 2.5.2-2 <i>Rhodococcus</i> 菌屬細胞合成的醣脂質類型 (Lang and Philp 1998)。	41
表 2.7.1.2-1 使微生物在冷凍乾燥及貯存的過程中仍可維持高存活率的保護劑選擇 (LAB: lactic acid bacteria) (Carvalho <i>et al.</i> 2004)。	49

### 第三章

表 3.2.1-1 液態礦物培養基組成表	57
表 3.2.1-2 Trace Salt Solution 組成表	57
表 3.2.2-1 菌株保存培養基組成表	58

## 照片目錄

### 第三章

照片 3.1-1 顯微鏡下的 <i>Rhodococcus erythropolis</i> NTU-1 .....	54
--	----

### 第四章

照片 4.1.1-1 培養條件 30℃、往復式搖晃培養，轉速 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，不同時間點 NTU-1 細胞的聚集現象。(A) 第 44 小時；(B) 第 68 小時。 .....	80
照片 4.1.1-2 培養條件 30℃、迴旋式搖晃培養，轉速 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，不同時間點 NTU-1 細胞的聚集現象。(A) 第 44 小時；(B) 第 68 小時。 .....	80
照片 4.1.2.1-1 10 mesh 篩網不同折角置放於 250 mL 反應錐形瓶中。(A) 180°；(B) 90°；(C) 45°。 .....	81
照片 4.1.2.1-2 培養條件 30℃、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，於錐形瓶中加入 10 mesh 篩網不同折角，實驗至第 68 小時的細菌結塊形態。(A) 沒有加入篩網 (俯視)；(B) 篩網折角為 180 度 (俯視)；(C) 篩網折角為 90 度 (側視)；(D) 篩網折角為 45 度 (俯視)。 .....	88
照片 4.1.2.2-1 20 mesh 篩網不同折角置放於反應錐形瓶中。(A) 180°；(B) 90°；(C) 45°。 .....	89
照片 4.1.2.2-2 迴旋式培養下 20 mesh 篩網不同折角實驗至第 68 小時的細菌結塊形態。(A) 沒有加入篩網 (俯視)；(B) 篩網折角為 180 度 (俯視)；(C) 篩網折角為 90 度 (側視)；(D) 篩網折角為 45 度 (俯視)。 .....	94
照片 4.1.2.3-1 6 mesh 篩網 45 度折角置放於反應錐形瓶中。 .....	95
照片 4.1.2.3-2 實驗條件 6 mesh 篩網 45 度折角在第 68 小時後細菌結塊圖 (開口左，俯視)。 .....	98
照片 4.1.2.4-1 以脂溶性染料 Sudan I (C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O) 將無色正十六烷染成橘色，加入含有 10 mesh 折角 180 度篩網的錐形瓶中，觀察不同時間 NTU-1 與正十六烷在錐形瓶中的分布情形。(A) 第 0 小時；(B) 第 24 小時；(C) 第 48 小時；(D) 第 72 小時。 .....	99
照片 4.2.2-1 以 1%麥芽糖為保護劑不同條件下的菌落形態。(A) 初始 NTU-1 菌落形態；(B) 冷凍乾燥的 NTU-1 進行復水後的菌落形態。 .....	109
照片 4.3.1-1 NTU-1 細菌結塊在重新更換培養基及添加 2000 ppmv 正十六烷後，不同時間下，細胞結塊的情形。(A) 反應經過 72 小時後，移除培養基；(B) 第 77 小時；(C) 第 102 小時；(D) 第 146 小時。 .....	116

照片 4.3.2-1 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷時之 NTU-1 細菌結塊形態圖。(A) 10%麥芽糖為保護劑；(B) 10%甘露糖醇為保護劑；(C) 10%麥芽糖組反應第 12 小時細菌結塊圖；(D) 10%甘露糖醇組反應第 12 小時細菌結塊圖。.....	127
照片 4.3.2-2 NTU-1 細菌結塊加入去離子水冷凍後，真空乾燥 2 天後所呈現的溼黏狀態 (冷凍乾燥失敗)。.....	129
照片 4.3.2-3 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 12 小時之 NTU-1 細菌結塊形態圖。(A) 10%麥芽糖添加劑，存放 0 天；(B) 10%麥芽糖添加劑，於 -20℃ 存放 10 天；(C) 10%甘露糖醇添加劑，於 -20℃ 存放 10 天；(D) 10%乳糖添加劑，於 -20℃ 存放 10 天。....	133
照片 4.3.2-4 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 12 小時之 NTU-1 細菌結塊形態圖。(A) 10%麥芽糖添加劑，存放 0 天；(B) 10%麥芽糖添加劑，於 -20℃ 存放 10；(C) 10%甘露糖醇添加劑，於 -20℃ 存放 10 天；(D) 10%乳糖添加劑，於 -20℃ 存放 10 天。.....	138
照片 4.3.3-1 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 碎片 (經超音波震碎)，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 24 小時之 NTU-1 細胞形態圖。.....	145
照片 4.3.5-1 冷凍乾燥前，以不同碳源培養 NTU-1 產生不同形態的 NTU-1 加入保護劑 (添加劑) 後 NTU-1 的分布情形。(A) 以 NB 培養後的 NTU-1 均勻分散在保護劑的情形；(B) 以正十六烷培養後的 NTU-1 結塊懸浮在添加劑表面的情形。.....	148
照片 4.4.1-1 烘乾過程中，NTU-1 結塊不同乾燥程度之差別。(A) 未乾燥完全；(B) 完全乾燥。.....	151
照片 4.4.1-2 不同溫度烘乾後 NTU-1 結塊乾燥的情形，依左而右分別為 80℃、120℃ 及 160℃。.....	151
照片 4.4.1-3 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入不同溫度烘乾後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 12 小時 NTU-1 再形成結塊的情形。(A) 60℃；(B) 80℃；(C) 100℃；(D) 120℃；(E) 160℃。.....	152
照片 4.4.4-1 培養條件 30℃、100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入烘乾後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷時，隨著時間 NTU-1 細胞結塊變化的情形。(A) 2 小時；(B) 4 小時；(C) 6 小時；(D) 9 小時；(E) 12 小時。.....	164
照片 4.4.5-1 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，培養基中加入不同初始重量烘乾後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷第 12	

小時 NTU-1 細胞結塊的形態。 .....	169
照片 4.4.6-1 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入相同初始重量烘乾後的 NTU-1 結塊，處理不同濃度正十六烷，第 12 小時 NTU-1 細胞結塊的形態。 .....	173
照片 4.4.7-1 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，兩段式添加 0.03 g 乾燥 NTU-1 結塊 (第 0 小時及第 6 小時)，處理 2000 ppmv 正十六烷，不同時間點下的細胞結塊情形。(A) 第 6 小時；(B) 第 12 小時。 .....	179

## 附錄

附錄照片 1-1 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入乾燥後的 NTU-1 (以 NB 培養) 及 NTU-1 結塊 (以正十六烷培養)，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 20 及 24 小時之 NTU-1 生長及結塊形態圖。 .....	203
---	-----



# 第一章 緒論

## 1.1 前言

石油碳氫化合物廣泛的為人們所利用，與人類的食衣住行皆脫離不了關係。然而隨著應用範圍越廣，對人類環境造成的污染也日益嚴重。石油的污染主要來自於油田開採、煉製、運送及使用過程中不慎外漏或是排放到自然環境。2010年3月美國發生的墨西哥灣漏油事件更是震驚全球，約2億加侖的原油流入墨西哥灣，造成海洋及沿岸生態環境嚴重影響，勘稱是美國遭遇過的最嚴重的一場環境災難。除了對自然生態造成的污染可能需很長時間才能復原以外，其對於人體的影響也是不容忽視的。石油污染物一旦進入人體，可能會影響體內的新陳代謝、免疫系統、生殖系統甚至產生癌症等可怕的疾病。

為了降低石油碳氫化合物對環境及人類造成影響，各國環保單位對於石化工業的發展皆採取高標準的規範，以防止其不當外洩或污染。處理石油碳氫化合物污染的方法也越來越多，一般傳統上常利用物理法及化學法來處理石油污染物，然而這兩種方法常有使用上的限制，如易造成環境二次污染、處理上較麻煩且成本昂貴。

因此利用生物復育 (bioremediation) 法來處理石油碳氫化合物逐漸被重視，生物復育是指利用微生物特有的生理機制來進行石油碳氫化合物污染的代謝及降解，使這些污染物轉變為分子結構較簡單、毒性較低的物質 (Madsen 1991)。而微生物在自然界的種類眾多，故能處理種類複雜的污染物，且微生物還有取得上較容易、使用上較簡單、成本低及不會二次污染環境...等優點。

## 1.2 研究目的及論文綱要

本研究所使用的 *R. erythropolis* NTU-1 為一株可降解碳數  $C_6 \sim C_{32}$  烷類的菌株 (張緯農 2009)。其中，在降解長碳鏈烷類時，NTU-1 能形成特殊的聚集現象將碳氫化合物包覆於結塊顆粒內，因而我們能在較短時間內配合生物降解及物理撈除的方法將碳氫化合物污染移除。延續之前實驗室人員的研究，本論文的目的在於探討如何加速 NTU-1 的細胞聚集現象，並將其應用在碳氫化合物的移除上，使石油碳氫化合物在短時間內即能達到良好的移除效果。接下來論文章節的編排及內容大致說明如下：

- ◆ 第二章：介紹石油污染復育的相關研究基礎背景及發展，並針對微生物攝取代謝碳氫化合物的方法途徑及菌株的特性...等相關的文獻作個回顧。
- ◆ 第三章：列出實驗中所使用之材料、儀器、實驗流程及配製方法。
- ◆ 第四章：呈現研究的成果並進行討論。內容包含：不同搖晃培養對於 NTU-1 生物降解及包覆正十六烷能力的影響及改進方法。測試以 NB 培養的 NTU-1 經過冷凍乾燥以後，細胞的存活率及降解包覆能力是否受到影響。了解以 NB 培養的 NTU-1 經冷凍乾燥的存活率及降解能力以後，接著利用正十六烷培養的 NTU-1 細菌結塊進行冷凍乾燥，並同樣探討凍乾後的存活率及降解包覆能力。最後利用烘乾的方式來取代冷凍乾燥，測試烘乾後的 NTU-1 結塊對於正十六烷的包覆移除效果為何。
- ◆ 第五章：將論文內容作個總結

## 第二章 文獻回顧

本研究的目的是在於探討生物復育對於石油碳氫化合物污染移除的應用，故在這一章節中將介紹相關研究的基礎背景及發展。首先會對各種石油碳氫化合物的移除方法作個簡介與比較。接下來探討生物復育的應用，針對微生物攝取及代謝碳氫化合物的方法、途徑還有相關的文獻回顧，並對本實驗中所使用的菌株 *Rhodococcus erythropolis* 的特性及相關研究作個簡介。此外，我們也會探討文獻中微生物聚集現象發生的原因和冷凍乾燥及烘乾對於微生物造成的影響及其相關應用。

### 2.1 石油碳氫化合物簡介及其對環境和人類之影響

石油 (petroleum) 是存在於地底下易燃的一種黏稠、深褐色液體，由一連串複雜、分子量不一的碳氫化合物及其他元素如硫、氮、氧、微量金屬所組成。石油碳氫化合物一般以三種形態存在，含三個碳以下的碳氫化合物如甲烷、乙烷、丙烷以氣態存在，又稱天然氣；液態石油則為含碳量介於 4~30 之間的碳氫化合物；含高碳量的固態石油又以石臘及瀝青為主 (黃武良 1999)。若以石油碳氫化合物的分子結構來分類，又可將其分成烷烴、烯烴、環烷烴、芳香烴及瀝青稀...等，其組成隨著不同油田的開採而有不同的分佈。

十九世紀的石油工業發展緩慢，到了二十世紀初內燃機的發明開始產生轉變，至今石油仍是最重要的內燃機燃料。而石油工業逐的漸蓬勃發展，與人類的生計緊密的結合，舉凡人類的食衣住行、娛樂...等皆與石油脫離不了關係，例如石化原料產品、化學肥料、人造纖維、合成樹脂及塑料產品...等。

石油帶給人們便利的生活，但也因為不當且過度的利用，造成對環境嚴重的污染。石油對環境產生的污染主要是來自於油田開採、煉製、運送及使用的過程中進入土壤、水體或空氣中而造成 (Allard and Neilson 1997, Atlas and Bartha 1992)。儘管目前世界各國的環保意識高漲，對於石油相關開發、工廠的廢水及廢氣排放，都有嚴格的管制，然而還是會有無法控制、預期外的意外發生。以下舉出近三年來發生的石油污染事件：2009 年 8 月，澳洲西艾特拉斯 (West Atlas) 鑽井平台發生大規模的漏油事故，造成 120 至 900 萬加侖的石油洩漏，總面積超過 6000 平方公里。美國最嚴重漏油事件則發生在 2010 年 4 月，英國石油公司在美國墨西哥灣租用的鑽井平台“深水地平線”發生爆炸，造成 1500 米深海的原油洩漏，約 2 億加侖原油流入墨西哥灣，嚴重破壞沿岸和海洋生態環境 (Camilli *et al.* 2010)。另外，2010 年 7 月中國大連新港石油管道爆炸，估計有 6 萬至 9 萬噸原油流入了海洋。這些嚴重的漏油事件造成的污染不僅會影響岸上和海洋生物的生態系統，並會進入空氣和土壤，需要相當長的時間才能復原。

有鑑於石油污染日益嚴重，造成人類和動物的傷害也不可輕乎。石油燃燒產生的硫氧化物會嚴重污染大氣且引發人類呼吸道疾病；石油污染土壤後，會導致石油烴的某些成分在糧食中累積，並通過食物鏈危害人類健康；當石油流入水體中其可能會黏附在魚類、藻類上造成海洋生物死亡，使水產品品質下降、降低水體的利用價值。這些石油污染若進入人體中，會影響體內的新陳代謝、免疫系統、生殖系統甚至產生致命的疾病。因而人們除了積極的開發無污染能源外，也努力的尋找有效處理石油碳氫化合物污染的方法，目的就是希望維護環境及人們的健康，使人類能夠永續生存。

## 2.2 處理石油碳氫化合物污染之方法

自然界中，石油碳氫化合物造成的污染主要發生在土壤、海洋或地下水，若污染濃度較低時，大自然通常具有自淨能力，能透過大氣、水流的擴散，或是光分解、氧化及微生物的分解作用...等等的物理、化學或生物方法，將污染物轉化為無害物，使環境中污染濃度降低並回復到原始的狀態 (Golwer 1983)。然而，如果這些石油污染物濃度過高，超過自然界能負荷的限度時，則會造成環境永久性的污染。因此，以人工移除石油碳氫化合物的方法漸漸產生且變得重要。

人工復育石油碳氫化合物的方法有很多，若依其處理機制來分大約可分為三種，物理處理法、化學處理法及生物處理法。以下將為這三種方法作個簡介。

### (1) 物理處理：

傳統的物理處理法只是使污染物在氣態、液態及固態相三相間轉換，故難以將污染物徹底移除。其適用於處理簡單的污染物，耗時較短，主要是藉由高溫或是電能來破壞污染物的結構，然而其需要大量熱能或電能，使成本也相對較高。另外，若是對毒性物質以氣化的方式來處理，易形成氣態污染物進入大氣中，造成空氣的污染，故物理處理法不適用於毒性高的污染物。常見的物理處理法如：熱處理、熱脫附、焚化、清洗土壤、揮發、固化/安定化、氣提、吸附、結晶、密度分離、沈降、過濾、透析/電透析、逆滲透...等。

### (2) 化學處理：

利用化學反應將污染物的毒性降低或是將污染物轉變成無害的物質，適用於須立即處理或是迅速降低污染物毒性的情況。然而污染物大多為混合物，故難以找到能同時處理多元污染物的化學藥劑，使處理上較麻煩且成本高。且在進行化

學反應過程中，轉化率很難達到 100%，易造成原來污染物的殘留，反應中可能也會產生其他有毒性的副產物。常見的化學處理法有：化學反應、酸鹼中和、化學催化、氧化還原、化學萃取、溶劑萃取、蒸氣萃取、化學沈澱...等。

### (3) 生物處理：

主要是利用微生物分解轉化污染物，將污染物予以礦化或轉化成危害性較低的其他物質 (Korda *et al.* 1997, Vidali 2001)。近年來生物處理法逐漸取代物理、化學處理法成為最常見的石油污染復育法，主要是因為微生物種類眾多，可處理不同分子結構的碳氫化合物，較不會產生其他有害物質，使用起來較安全，成本也較其他兩種方法來得低。然而由於微生物培養時間相對較長，所以有耗時的缺點。表 2.2-1 為處理地下水碳氫化合物污染時，各種物理、化學處理及生物復育技術的簡介及比較 (Van Stempvoort and Biggar 2008)。更詳細的生物處理法將在 2.3 節介紹。



表 2.2-1 地下水污染之各種物理化學處理及生物處理程序之簡介與比較 (Van Stempvoort and Biggar 2008)。

Ex situ and in situ physical/chemical and biological remediation approaches for groundwater			
Ex situ groundwater treatment		In situ groundwater treatment	
Technique	Definition	Technique	Definition
Physical/chemical processes		Physical/chemical processes	
Air stripping	Volatile organics are partitioned from extracted ground water by increasing the surface area of the contaminated water exposed to air. Aeration methods include packed towers, diffused aeration, tray aeration, and spray aeration. <sup>a</sup>	Treatment walls/ passive reactive barriers	Barriers allow the passage of water while causing the degradation or removal of contaminants. <sup>a</sup>
Carbon adsorption	Removal of hydrophobic organic contaminants from aqueous phase to carbon by physical and chemical forces. <sup>b</sup>	Air sparging	The injection of air below the water table in order to induce volatilization of contaminants into the unsaturated zone, which can be removed by soil vapor extraction. <sup>b</sup>
Phase filtration/ separation	Use of filter membranes and/or conventional oil-water separator technology to remove nonaqueous phase/emulsions of hydrocarbons from water.	Steam sparging/ flushing	Steam is forced into an aquifer through injection wells to vaporize volatile and semivolatile contaminants, which are removed by vacuum extraction in the unsaturated zone and then treated. <sup>c</sup>
		Chemical oxidation	Bringing chemical oxidants (various materials) into contact with subsurface contaminants to remediate the contamination. <sup>d</sup>
		Hydrofracturing enhancement	Injection of pressurized water through wells to crack low permeability and over-consolidated sediments; cracks are filled with porous media that serve as substrates for bioremediation or to improve pumping efficiency. <sup>a</sup>
Biological processes <sup>e</sup>			
Constructed wetlands	Use of natural geochemical and biological processes inherent in an artificial wetland ecosystem to accumulate and remove contaminants from influent waters. <sup>a</sup>	Intrinsic bioremediation	Unmanipulated, unstimulated, non-enhanced biological remediation of an environment; i.e. natural attenuation. <sup>f</sup>
Bioreactors	A contained vessel in which biological treatment takes place. <sup>f</sup>	Biosparging	The injection of air or specific gases below the water table to enhance bacterial activity for remediation. <sup>c</sup>
		Phytoremediation	The use of natural plants to remove contaminants through bioaccumulation or through enhancing biodegradation. <sup>b</sup>
		Bioslurping	Combines vacuum removal of petroleum hydrocarbon free product with in situ bioventing. Designed for removal of free-floating LNAPL on the water table as well as residual product in the vadose zone. <sup>b</sup>
		Biofilter (groundwater)	Refers to treatment of groundwater via passage through a biologically active area in the subsurface. <sup>f</sup>

<sup>a</sup> Van Deuren et al., 2002.  
<sup>b</sup> Riser-Roberts, 1998.  
<sup>c</sup> USEPA, 2004b.  
<sup>d</sup> USEPA, 2004a.  
<sup>e</sup> Most of the biological techniques except intrinsic bioremediation include biostimulation, and some bioaugmentation, as defined in the text.  
<sup>f</sup> Hazen, 1997.

由於每個污染的場址通常會有不同的範圍大小、特性及限制，所以很多時候會採取混合技術來處理，結合每種方法的長處使復育的效果達到最好。此外，我們除了了解不同人工復育石油碳氫化合物的方法以外，如何選擇適當的方法來處理不同情況的污染源也是值得注意的地方，許多因子都是在選擇合適的復育方法時需考量的。以下列出幾個重要的影響因子 (Vik *et al.* 2001, Ram *et al.* 1993)：

- (1) 污染物及污染場址的特性
- (2) 復育工作的驅動因素及目的
- (3) 風險管理及環境的永續發展
- (4) 投資者的看法及成本效益
- (5) 技術上的適用性及可行性

以上幾個影響因子中，最主要考量的還是技術上的適用性及可行性，因為不同的復育技術在不同污染地區的執行成果也會有所差異。且近年來許多復育的技術逐漸的被發展出來，如何確認所選擇的復育技術是否合適則是需要經過有系統及實驗證明的評估程序，表 2.2-2 則列出幾個對於復育方法適用性的一般考量因素 (Vik *et al.* 2001)。

表 2.2-2 復育方法適用性與否的影響因素 (Vik *et al.* 2001)。

RISK MANAGEMENT APPLICATION	CONTAMINANTS / MATERIAL TREATED	REMEDIAL APPROACH	PROCESS LOCATION
<ul style="list-style-type: none"> <li>source reduction</li> <li>pathway interruption</li> <li>protection of receptors</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>contaminant(s)</li> <li>concentration range</li> <li>source and age</li> <li>bulk / materials-handling characteristics</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>removal</li> <li>containment</li> <li>rehabilitation</li> <li>biological treatment</li> <li>chemical treatment</li> <li>physical treatment</li> <li>solidification / stabilisation</li> <li>thermal treatment</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>in situ</i></li> <li><i>ex situ</i></li> <li>on site</li> <li>off site</li> <li>in-vessel</li> </ul>
STRATEGY	IMPLEMENTATION		OUTCOME
<ul style="list-style-type: none"> <li>integration / combined approaches</li> <li>active / passive measures</li> <li>long term / low input</li> <li>carrier (for <i>in situ</i> techniques, i.e. air or water)</li> <li>institutional measures</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>process planning</li> <li>site management</li> <li>verification</li> <li>monitoring</li> <li>neighbourhood impacts</li> <li>aftercare</li> <li>flexibility</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>destruction of contaminants</li> <li>removal of contaminants (elsewhere)</li> <li>stabilisation of contaminants</li> <li>containment</li> </ul>

## 2.3 生物處理石油碳氫化合物

### 2.3.1 生物復育簡介

生物處理法在 2.2 節中有稍稍作了簡介，這一節中我們將詳細的介紹生物處理法中的優缺點、微生物的種類、特性，及常現生物處理的方法。生物復育 (bioremediation) 指的是利用微生物來進行有機污染物的代謝分解，使這些有機污染物轉變為分子結構較簡單、毒性較低的物質 (Madsen 1991)。

生物復育逐漸取代傳統的物理及化學處理法的原因，主要因為生物復育法有以下幾個優點 (Van Stempvoort and Biggar 2008)：

- (1) 相較於物理化學處理法來說，微生物培養容易，成本較低。
- (2) 生物復育法使用上來說較安全且對環境影響較少。
- (3) 微生物種類眾多，能處理各種石油碳氫化合物。

雖然自然界中微生物種類繁多，並不是每種微生物皆具有分解有機污染物的特性。不過隨著生物科技的進步，微生物復育法已被大量研究及開發，利用生物復育法來處理石油污染物的成功例子也越來越多，這些能分解石油污染物的微生物以細菌、放線菌、酵母菌、真菌或藻類為主，表 2.3-1 為一些能夠利用石油碳氫化合物之好氧性微生物 (Van Beilen *et al.* 2003)。而一項成功的微生物復育通常都需具備以下條件 (Bouwer and Zehnder 1993)：

- (1) 能分解污染物，使其失去毒性或使濃度降低。
- (2) 能將污染物濃縮，並配合物理法或化學法將污染物完全移除。
- (3) 可處理不同種類之混合污染物。
- (4) 不會破壞環境平衡或對人體造成傷害。
- (5) 具有好的再現性且易於培養、價格低廉。

表 2.3.1-1 自然界中能利用石油碳氫化合物之好氧性微生物分類 (Van Beilen *et al.* 2003)。

Microorganisms that aerobically degrade aliphatic hydrocarbons			
Bacteria	Yeasts	Fungi	Algae
<i>Achromobacter</i>	<i>Candida</i> (+)	<i>Aspergillus</i>	<i>Prototheca</i>
<i>Acinetobacter</i> (+)	<i>Cryptococcus</i>	<i>Cladosporium</i>	
<i>Alcanivorax</i> (+)	<i>Debaryomyces</i> (+)	<i>Corollasporium</i>	
<i>Alcaligenes</i>	<i>Hansenula</i>	<i>Cunninghamella</i>	
<i>Bacillus</i>	<i>Pichia</i>	<i>Dendryphiella</i>	
<i>Brevibacterium</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>Fusarium</i>	
<i>Burkholderia</i> (+)	<i>Saccharomyces</i>	<i>Gliocladium</i>	
<i>Corynebacterium</i>	<i>Sporobolomyces</i>	<i>Lulworthia</i>	
<i>Flavobacterium</i>	<i>Torulopsis</i>	<i>Penicillium</i>	
<i>Mycobacterium</i> (+)	<i>Trichosporon</i>	<i>Varicospora</i>	
<i>Nocardia</i>	<i>Yarrowia</i> (+)	<i>Verticillium</i>	
<i>Pseudomonas</i> (+)			
<i>Rhodococcus</i> (+)			
<i>Sphingomonas</i>			
<i>Streptomyces</i>			

Information mainly from [7, 18]. A (+) indicates that information on the genetics of alkane degradation is available for strains belonging to the genus.

在實際應用上，生物復育技術又可分成兩大類：現地 (in situ) 生物復育及離場 (ex situ) 生物復育。接下來為這兩類技術作個簡單的說明及比較。

#### (1) 現地生物復育：

在受污染的區域直接進行生物復育。處理污染土壤、地下水或海洋時，不需先將土壤或水質取出移到其他地方再進行生物復育。一般工程化的生物復育技術，主要會採行下列幾種方式：添加微生物、添加營養鹽、添加電子提供者，如甲烷

及丙烷等有機物來進行共代謝作用、添加電子接受者，例如加入氧氣或過氧化氫以進行好氧分解（盧至人 2002）。表 2.3.1-2 為一些常見實際應用的現地生物復育法（Korda *et al.* 1997）。

現地生物復育法主要的優點為工程上難度不高、符合自然環境特性、可分解被吸附的污染物、地表設施較少、設備易護得、相對來說較經濟...等（盧至人 2002）。然而可能會遭遇到的問題有場址的限制、自然界的因素如天候、植入的菌株是否經實驗證明其表現會比原始存在於污染區的菌株來得好、是否需要多種類的菌株才能完全處理這些污染物、處理時間過長及當污染物移除後，這些菌株將如何處理（Bartha and Atlas 1977, Boopathy 2000）。

## (2) 離場生物復育：

離場生物復育技術是指在污染源擴散前，挖出污染土壤或抽出污染的水體，帶離所在地做處理（Riser-Roberts 1998）。依照不同微生物和污染物的交互作用會有不同的反應器設計，又可分為污泥相的生物復育及固相的生物復育。污泥相的生物復育主要用來處理以黏粒為主的土壤。而固相生物復育又可分成地耕法、生物堆土法和堆肥法。現地與離場生物復育法的比較可參照 2.2 節中的表 2.2-1。

離場生物復育法的優點為處理較快速、易控制反應的條件且能處理多種污染物及土壤種類。而其缺點主要為搬運污染物及反應器或其他設備的支出造成投資成本較高。

表 2.3.1-2 實際應用的現地生物復育法 (Korda *et al.* 1997)。

Table 3 In situ treatments					
Treatment	Description	Applicable to	Advantages	Constraints	Reference
Bioaugmentation	Bioaugmentation involves the addition of oxygen, water and mineral nutrients (usually combinations of nitrogen, phosphorus, and trace metals)	Groundwater, soils	Acceleration by as much as 100-fold of the reproduction of organisms already present at the site	Nutrient application requires concurrent ecological monitoring studies. Although dilution, tidal mixing etc. should minimize the potential for adverse ecological effects, certain components of the fertilizer could be toxic to some species. In addition, algal blooms could occur as a result of the sudden availability of nitrogen and phosphorus	Orzech <i>et al.</i> 1991; U.S. EPA 1989
Bioventing	This remediation technique combines conventional advective soil venting with biodegradation. The soil-venting phase of the process takes advantage of the highly volatile nature of the components present in the hydrocarbon mixture. In the biodegradation phase, the less volatile high-molecular-mass hydrocarbon compounds are broken down and the more volatile organics removed during conventional venting	Soils	Addresses full range of petroleum hydrocarbons. Is among the most effective methods of supplying indigenous microorganisms with enough oxygen to support degradation of hydrocarbon contaminants	A shallow water table prevents diffusion of gases and makes application of bioventing less feasible. Furthermore, the solid matrix must allow for sufficient air movement	Van Eyk 1994; Reisinger <i>et al.</i> 1994
Bioaugmentation	This method involves the direct application of microorganisms originating from (a) the remediation site (b) an off-site vendor (c) genetic engineering. The microorganisms have been cultured and adapted, while their degrading ability can be enhanced for specific contaminants and site conditions	Groundwater, soils	One of the most effective bioremediation techniques	The possibility of adverse ecological effects from the introduction of off-site or genetically engineered microorganisms should be examined and minimized	Orzech <i>et al.</i> 1991; Leavitt and Brown 1994
Surfactants	Synthetic or biogenic substances are used to increase the aqueous solubility of solid hydrocarbons, and emulsify liquid hydrocarbons	Solid and liquid aliphatic and aromatic hydrocarbons (including hydrophobic organic compounds)	Enhancement of contaminant accessibility to microorganisms, nutrients, and possibly oxygen. Improvement of the bioremediation efficiency	Surfactant use is still controversial. Synthetic surfactants may adversely affect the permeability of the microbial cell membrane, thus reducing or eliminating the biodegradative potential of indigenous microorganisms. Surfactant injection must be carefully controlled to be ecologically acceptable and to offer more economical and physical advantages than disadvantages	Ducieux <i>et al.</i> 1994; Churchill <i>et al.</i> 1995

表 2.3.1-2 (續)

Table 3 (Contd.)					
Treatment	Description	Applicable to	Advantages	Constraints	Reference
Hydrogen peroxide	Hydrogen peroxide can be used as an efficient, alternative oxygen source to enhance in situ biodegradation	Biodegradation of aromatic compounds and volatile fatty acids. Subsurface applications	Provides oxygen at a rate up to two orders of magnitude faster than diffusers (systems to saturate injected water with air). The growth of aerobic bacteria in general and hydrocarbon-degrading bacteria in particular, as well as the breakdown of gasoline are significantly enhanced by the addition of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Although H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> has been used successfully in a number of cases, problems, including too rapid decomposition, gas blockage, and ineffectiveness, have been encountered elsewhere	Lu 1994a; Brown and Norris
Nitrate	Nitrate is used as an alternative electron acceptor, instead of aeration of the injected water or amendment with H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Subsurface applications	Nitrate is relatively inexpensive, highly soluble in water, does not adsorb to soil matrices, and does not decompose. Thus it can be readily distributed within an aquifer	Nitrate concentrations in groundwater typically are limited by regulatory standards to 46 mg/l. Another disadvantage is that nitrate is effective for fewer classes of compounds than oxygen. Nitrate-utilizing bacteria do not degrade aliphatic compounds. Benzene is not readily degraded under denitrifying conditions	Hutchins and Wilson 1994; Brown and Norris 1994b; Battermann et al. 1994
Fertilizer application (water-soluble or oleophilic)	Fertilizer application stimulates microbial metabolism by supplying the indigenous oil-degrading microorganisms with nutrients (N, P, K, etc.)	Soil, groundwater, sediments	Acceleration of the natural biodegradation process, especially in sites with low nutrient content	A toxicology assessment is required to evaluate the possibility of harmful biological effects of excessive nutrient application	Prince et al. 1994; Sveum et al. 1994

### 2.3.2 微生物攝取碳氫化合物之模式

雖然現今生物復育技術的技術越來越多且更加成熟，但微生物攝取石油碳氫化合物污染時仍面臨許多的挑戰，主要原因有以下三個 (Abdel-Megeed 2004)：

- (1) 石油污染物通常都是複雜的混合物。
- (2) 較低分子量的碳氫化合物因為溶劑效應 (solvent effects)，破壞微生物細胞膜的調結功能，對細胞膜具有相當的毒性。
- (3) 大部分的石油碳氫化合物在常溫下為液體或固體皆屬於難溶於水的物質。

圖 2.3.2-1 為原油中常見的碳氫化合物化學結構分類，其大致可分為三種類型：烷類 (直鏈或支鏈)、環烷類及芳香族類 (Alloway and Ayres 1998)。一些常見碳氫化合物污染物的溶解度如表 2.3.2-1 所示。由表可以看出脂肪族碳氫化合物的溶解度隨者分子量的增加而降低，更長鏈的脂肪族碳氫化合物 ( $C_{20} \sim C_{40}$ ) 則形成不溶性的固體，這些都會造成微生物攝取碳源的阻礙使降解效率偏低 (Eastcott *et al.* 1988, Whyte *et al.* 1999)。

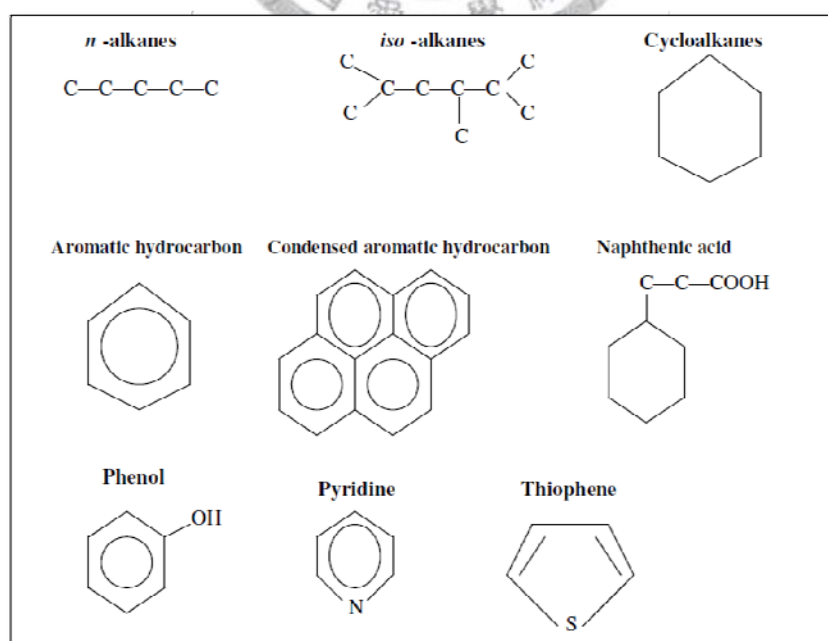


圖 2.3.2-1 原油中常見的碳氫化合物化學結構分類 (Alloway and Ayres 1998)。

表 2.3.2-1 各種碳氫化合物在水中的溶解度 (Eastcott *et al.* 1988)

Hydrocarbons	Class	Mol. wt. (g/mol.)	Solubility (mg/L) at 25°C
<b><i>n</i>-Pentane (C<sub>5</sub>H<sub>12</sub>)</b>	normal alkane	72.2	40.8
<b><i>n</i>-Hexane (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>)</b>	<i>n</i> -alkane	86.2	12.3
<b><i>n</i>-Octane (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>)</b>	<i>n</i> -alkane	114.2	0.682
<b><i>n</i>-Dodecane (C<sub>12</sub>H<sub>26</sub>)</b>	<i>n</i> -alkane	170.3	3.4×10 <sup>-3</sup>
<b><i>n</i>-Tetradecane (C<sub>14</sub>H<sub>30</sub>)</b>	<i>n</i> -alkane	198.4	6.55×10 <sup>-4</sup>
<b><i>n</i>-Hexadecane (C<sub>16</sub>H<sub>34</sub>)</b>	<i>n</i> -alkane	226.4	5.21×10 <sup>-5</sup>
<b><i>n</i>-Octadecane (C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>)</b>	<i>n</i> -alkane	254.4	4.05×10 <sup>-6</sup>
<b>Pristane (C<sub>19</sub>H<sub>40</sub>)</b>	branched-alkane	268	insoluble
<b><i>n</i>-Tetracosane (C<sub>24</sub>H<sub>50</sub>)</b>	<i>n</i> -alkane	338	insoluble
<b><i>n</i>-Dotriacontane (C<sub>32</sub>H<sub>66</sub>)</b>	<i>n</i> -alkane	450	insoluble
<b>Naphthalene</b>	2-ring aromatic	128.2	30.6
<b>Pyrene</b>	4-ring aromatic	202.3	0.135
<b>Chrysene</b>	4-ring aromatic	228.3	<0.01

儘管微生物在利用石油碳氫化合物時，可能會遇到上述三點的挑戰，但已有許多能利用溶解性低或具毒性碳氫化合物的微生物復育技術被研究出來，主要是因為這些微生物能夠以不同方式來攝取低溶解性的碳氫化合物，我們可將其歸類成以下三種模式。這些模式的重點在於低溶解性的碳氫化合物如何由外界傳送及累積到微生物的表面，接著進入到微生物內部而進行下一步代謝利用的動作 (Hommel 1990)。

(1) 微生物直接攝取溶於水中的碳氫化合物。

- (2) 微生物分泌界面活性劑使碳源乳化成微小油滴(油滴顆粒小於微生物細胞) 進而攝取利用。
- (3) 微生物直接接觸大油滴(油滴顆粒大於微生物細胞) 並利用降解。

第一種攝取模式中，主要發生在低分子量的碳氫化合物上。由於低分子量碳氫化合物的水溶性較高，能確保有一定的質傳速率能傳送到細胞表面讓微生物直接攝取 (Rojo 2009)。故此模式的降解代謝速率取決於碳氫化合物溶在水中的速率、濃度及微生物攝取的速率。生物復育發展初期，學者認為只有溶於水中的碳氫化合物能被細菌所利用 (Gibson 1984)。然而許多學者發現低溶解性碳氫化合物的降解速率比溶於水相中的碳氫化合物來得高，這樣的結果指出有其他的機制使微生物能順利攝取低溶解性的碳氫化合物 (Leahy and Colwell 1990)。

第二項機制中主要是與微生物釋放出的生物界面活性劑有關。大部分能降解石油碳氫化合物的菌株都被研究出其在不同環境下會釋放出生物界面活性劑 (biosurfactant)，將疏水性化合物乳化成微小油滴，增加微生物的接觸面積，使降解速率提高 (Desai and Banat 1997, Rosenberg and Ron 1999)。這個形成微小油滴的過程又能稱為假溶解 (pseudosolubilizaion)，意即形成微胞粒子 (micelles)。界面活性劑的分子包含親水區及疏水區，當濃度很低時，界面活性劑可完全溶於水中，隨著濃度上升則會聚集形成微胞粒子。微胞粒子能將疏水的碳氫化合物包覆，並以親水端將其帶入水相中。

圖 2.3.2-2 為碳氫化合物被生物界面活性劑附著後，微生物細胞攝取碳氫化合物的示意圖 (Ratledge 1988)。圖 2.3.2-3 則為菌株 *Pseudomonas sp.* 以碳氫化合物為培養碳源時，分泌出生物界面活性劑 (rhamnolipids)，與碳氫化合物形成微胞粒子而被微生物細胞攝取圖 (Fritsche and Hofrichter 2000)。此外，學者發現這

些生物界面活性劑還可能會鍵結在微生物表面上，提高微生物表面的疏水性 (Hua *et al.* 2003, Mulligan 2005)。

目前研究中指出，微生物在碳氫化合物環境下產生的生物界面活性劑主要有以下幾類 (Niescher *et al.* 2006)：醣脂類 (glycolipids)、脂肽類 (lipopeptides)、磷脂類 (phospholipids)、多醣脂類 (liposaccharides)、脂肪酸類 (fatty acids)、高分子界面活性劑 (polymeric surfactant) ...等。表 2.3.2-2 為各種微生物產生的生物界面活性劑分類 (Al-Araji *et al.* 2007)。

最後一種碳氫化合物的攝取方式，微生物能夠貼附於水相與固態或液態疏水性碳氫化合物的界面上，並將其攝取進入細胞內並加以利用 (Volkering *et al.* 1997)。這些微生物除了本身表面已經夠疏水外，有些微生物會為了促進與疏水性化合物的黏附性，在利用碳氫化合物時改變細胞膜表面的成分（脂質或脂肪酸）來提高細胞表面的疏水性 (Morgan and Watkinson 1994)，例如上述的第二種機制中，微生物會產生生物界面活性劑鍵結在細胞膜表面。

以上三種攝取機制說明了大多數微生物與碳氫化合物接觸攝取的過程，許多研究指出這三種機制常常同時存在，或是有兩個同時存在，若單獨只有某一種機制存在時，我們通常會添加界面活性劑來提高降解的效率。石油碳氫化合物污染中，大部分的成份為溶解性低的長碳鏈烷類，故微生物多採取第二種和（或）第三種機制來接觸攝取。

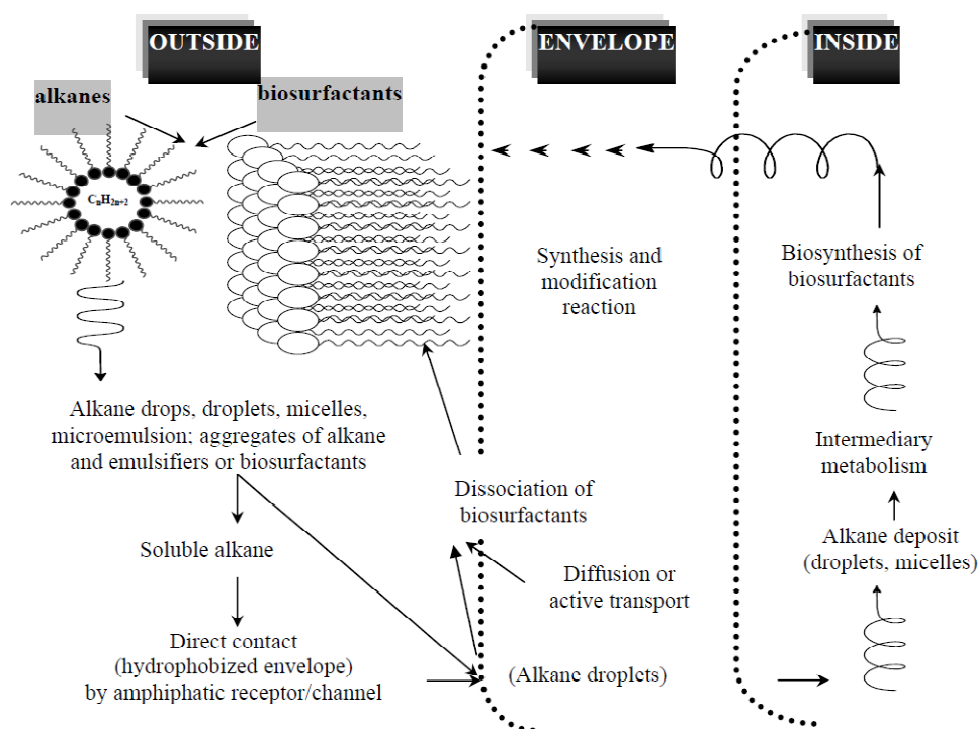


圖 2.3.2-2 微生物細胞攝取有生物界面活性劑附著的碳氫化合物示意圖 (Ratledge 1988)。

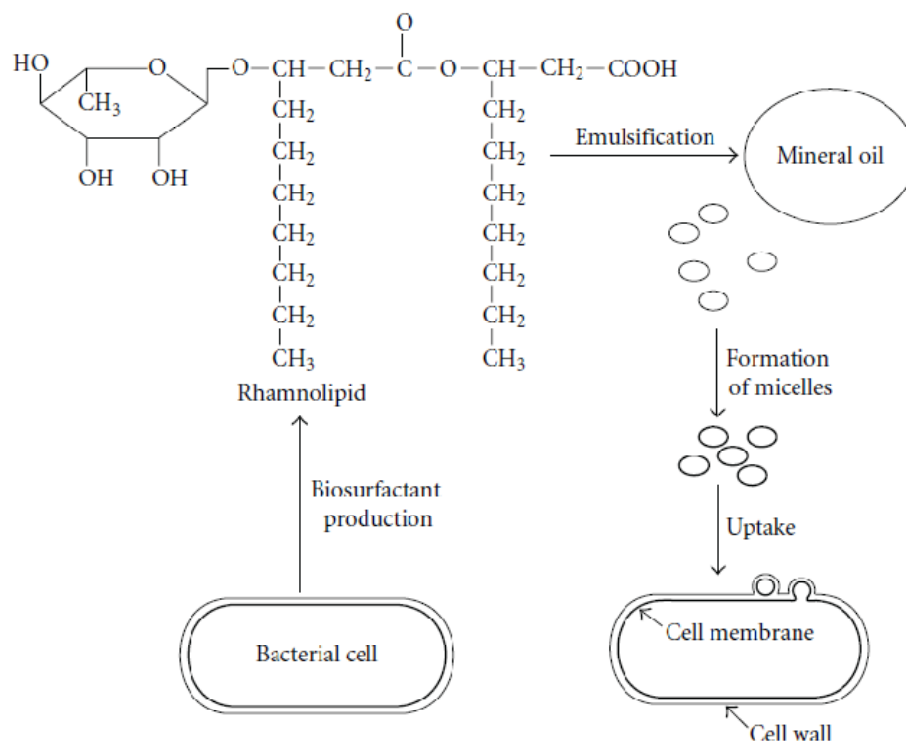


圖 2.3.2-3 菌株 *Pseudomonas sp.* 分泌界面活性劑後攝取碳氫化合物示意圖 (Fritsche and Hofrichter 2000)。

表 2.3.2-2 各種微生物產生的生物界面活性劑分類 (Al-Araji *et al.* 2007)。

Biosurfactant	Source	Biosurfactant	Source
<b>Glycolipids</b>		<b>Ornithine-lipid</b>	<i>Pseudomonas</i> sp.
Trehalolipids	<i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Nocardia erythropolis</i>		<i>Thiobacillus</i> sp.
Trehalose Dimycolates	<i>Mycobacterium</i> sp. <i>Nocardia</i> sp.		<i>Agrobacterium</i> sp.
Trehalose dicorynemycolates	<i>Arthrobacter</i> sp. <i>Corynebacterium</i> sp.	<b>Phospholipids</b>	<i>Gluconobacter</i> sp.
Rhamnolipids	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas</i> sp.		<i>Candida</i> sp.
Sophorolipids	<i>Torulopsis bombicola</i> <i>Torulopsis apicola</i> <i>Torulopsis petrophilum</i> <i>Torulopsis</i> sp.		<i>Corynebacterium</i> sp.
Cellbiolipids	<i>Ustilago zaeae</i> <i>Ustilago maydis</i>		<i>Micrococcus</i> sp.
Aminoacid-lipids	<i>Bacillus</i> sp.	<b>Fatty acids /Natural lipids</b>	<i>Thiobacillus</i> sp.
Lipopeptides and lipoprotein	<i>Streptomyces</i> sp. <i>Corynebacterium</i> sp. <i>Mycobacterium</i> sp.		<i>Acinetobacter</i> sp.
Peptide-lipid	<i>Bacillus licheniformis</i>		<i>Pseudomonas</i> sp.
Serrawettin	<i>Serratia marcescens</i>		<i>Micrococcus</i> sp.
Viscosin	<i>Pseudomonas fluorescens</i>		<i>Mycococcus</i> sp.
Surfactin	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Candida</i> sp.
Subtilisin	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Penicillium</i> sp.
Gramicidins	<i>Bacillus brevis</i>		<i>Aspergillus</i> sp.
Polymyxins	<i>Bacillus polymyxa</i>	<b>Polymeric surfactants</b>	
		Emulsan	<i>Arthrobacter calcoaceticus</i>
		Biodispersan	<i>Arthrobacter calcoaceticus</i>
		Mannan-lipid-protein	<i>Candida tropicalis</i>
		Liposan	<i>Candida lipolytica</i>
		Carbohydrate-protein-lipid	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Debaryomyces polymorphis</i>
		Protein PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		<b>Particulate biosurfactants</b>	
		Vesicles and fimbriae	
		Whole cells	<i>Arthrobacter calcoaceticus</i>

(Desai & Banat 1997, Karanth et al. 1999)

### 2.3.3 微生物分解碳氫化合物之方式

自然界中，能夠利用碳氫化合物的微生物種類眾多，也各自擁有獨特降解碳氫化合物的方式。這些微生物能夠把石油碳氫化合物當作主要碳源，經過上一節介紹的三種攝取方式將碳源傳送到細胞內並進行代謝降解。在降解過程中，藉由氧化還原反應的電子轉移來生成能量提供微生物合成蛋白質、脂質或建構新的細胞...等。接下來我們介紹微生物降解碳氫化合物時較常見的氧化還原方式—好氧性及厭氧性降解。

#### (1) 好氧性降解 (aerobic degradation)：

好氧性的細菌以氧分子作為最終電子接受者，利用氧化反應將碳氫化合物從非極性的基質轉化成脂肪酸並進行後續的代謝作用生成細胞生長所需的化合物及能量 (Wentzel *et al.* 2007)。圖 2.3.3-1 為好氧性微生物降解碳氫化合物的主要流程 (Fritsche and Hofrichter 2000)。文獻中也指出，在好氧的情況下，大部分碳氫化合物能以較快的速率被微生物完全降解 (Riser-Roberts 1998)。不同種類的碳氫化合物會有不同的代謝途徑，將於 2.4 節中詳細介紹。

#### (2) 厭氧性降解 (anaerobic degradation)：

與好氧性降解不同的是，厭氧性降解時電子接受者不是氧分子，而是一些無機物質如硫酸根、硝酸根、鐵離子、錳離子或二氧化碳...等。近年來，有許多關於利用硫酸鹽還原菌 (sulfate-reducing bacteria) (Rueter *et al.* 1994, So *et al.* 2003, Cravo-Laureau *et al.* 2005) 及反硝化細菌 (denitrifying bacteria) (Ehrenreich *et al.* 2000) 在無氧環境下進行長碳鏈烷類氧化反應的研究被報導出來。在這些微生物系統中，硫酸鹽及硝酸鹽作為最終電子接受者，其角色相當於好氧性分解中的氧分子。目前碳氫化合物無氧代謝的初始反應現今主要有兩種不同的機制被提出，

分別是延胡索酸鹽 (fumarate) 結合反應、羧化反應 (carboxylation) (Wentzel *et al.* 2007)。好氧性及厭氧性細菌降解長碳鏈碳氫化合物過程及比較如圖 2.3.3-2 所示。

一般來說，碳氫化合物的厭氧性分解速率較低，主要是因為厭氧菌的生長速率較好氧菌來得慢。例如，厭氧菌 Hxd3 及 Pnd3 在降解正十六烷時，細胞的倍增時間約為 9 天 (Aeckersberg *et al.* 1998)；厭氧菌 AK-01 降解正十六烷時在最佳化的培養條件下，細胞的倍增時間仍要 3 天左右 (So and Young 1999)。

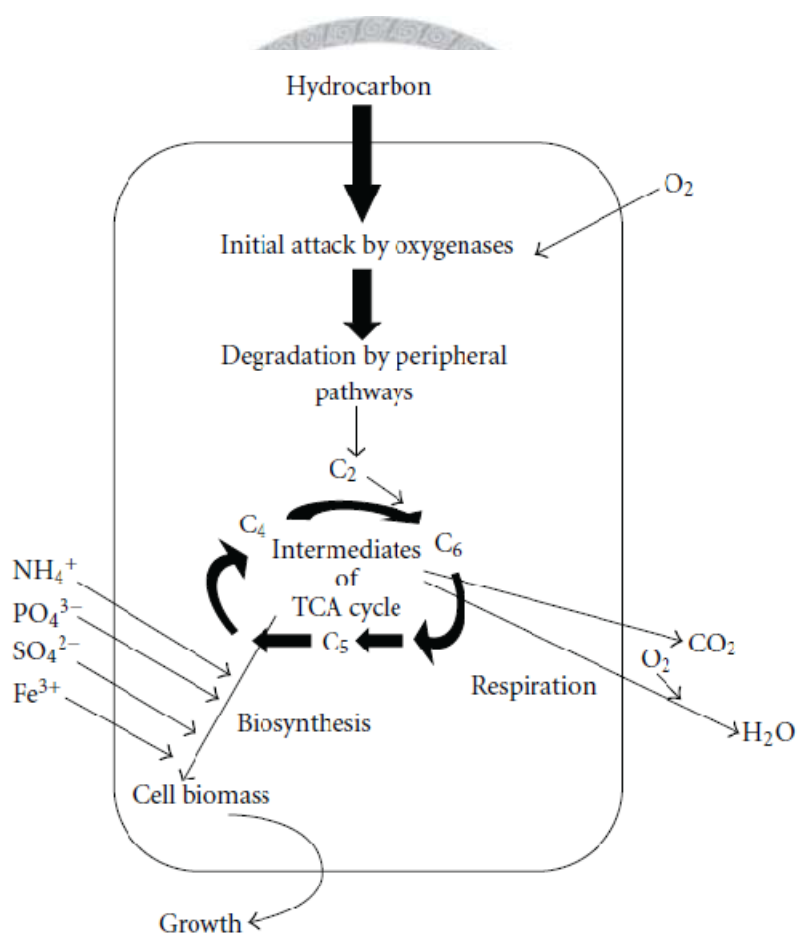


圖 2.3.3-1 好氧性微生物降解碳氫化合物的主要流程 (Fritzsche and Hofrichter 2000)。

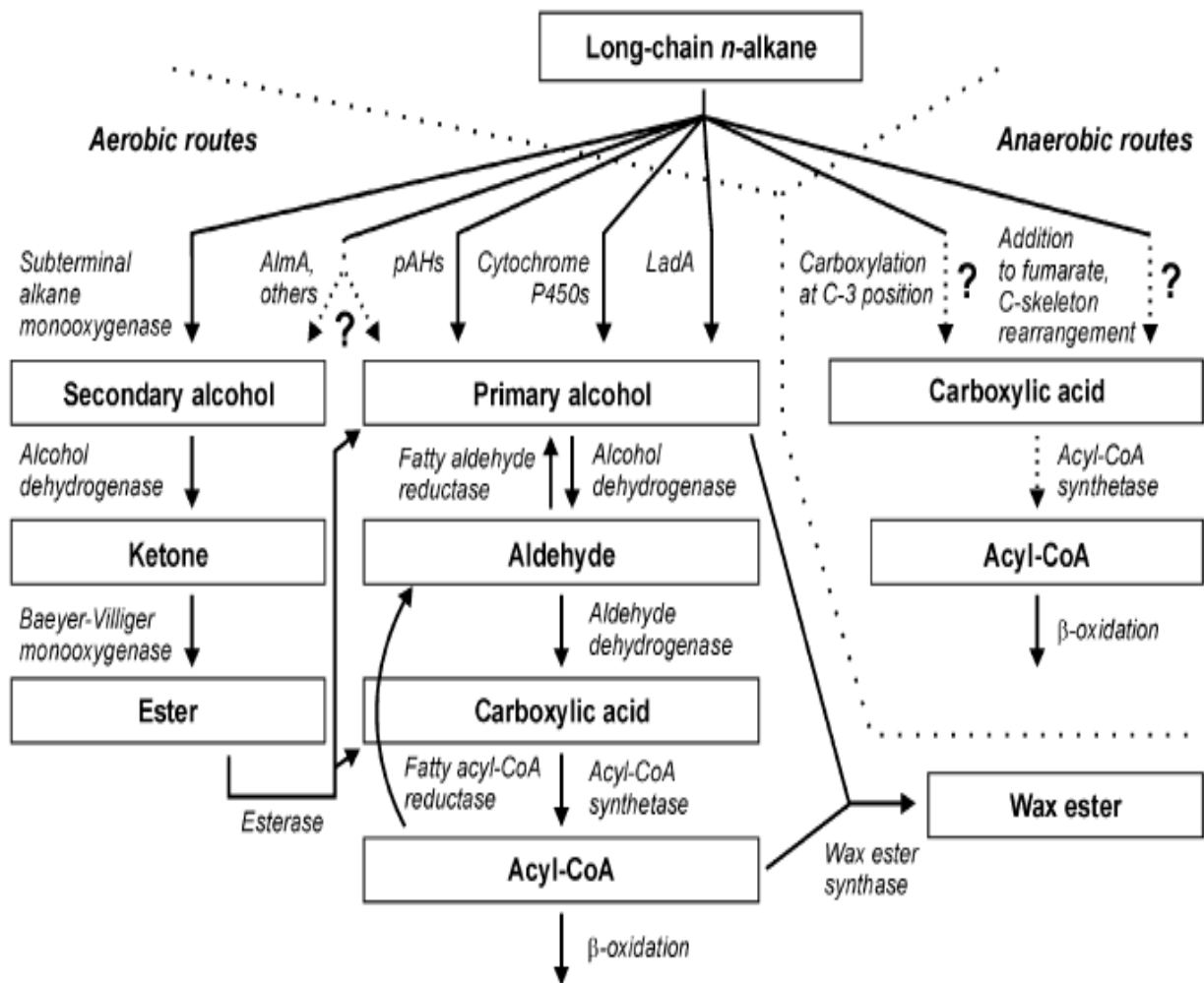


圖 2.3.3-2 長碳鏈烷類的好氧及厭氧性降解途徑 (點狀線的箭頭是指推測的代謝路徑) (Wentzel *et al.* 2007)。

## 2.4 微生物降解碳氫化合物之代謝途徑

微生物利用碳氫化合物時，其降解難易度通常與污染化合物的分子立體結構有很大的關係，結構越簡單的化合物越容易被分解；相同化學結構的化合物中，分子量較低的化合物比分子量高的化合物來得容易被微生物利用降解，但碳鏈長度差異在 5 個碳以內則不會有太大的差別 (Huesemann 1995)。石油碳氫化合物中，微生物利用降解的難易度排序大致如下：直鏈烷類 (normal alkanes) > 支鏈烷類 (branched alkanes) > 支鏈烯烴類 (branched alkenes) > 分子量較低的芳香族類 (small aromatics) > 環烷類 (cyclic alkanes) > 多環芳香族碳氫化合物 (PAHs) > 瀝青稀類 (asphaltenes) (Huesemann 1995, Ulrici 2000, Atlas and Bragg 2009)。

2.3.3 節中，我們知道了微生物利用碳氫化合物時，主要有好氧性及厭氧性兩種氧化還原方式。由於本研究中所使用的菌株 *Rhodococcus erythropolis* NTU-1 為好氧性細菌，故接下來我們主要介紹碳氫化合物的好氧性代謝途徑。

### 2.4.1 直鏈烷之氧化機制

直鏈烷類 (*n*-alkanes) 為原油 (crude oil) 污染物中最主要的成分之一 (Harayama *et al.* 1999)。其中，長碳鏈的直鏈烷類 ( $C_{10} \sim C_{24}$ ) 為微生物最常利用的基質，降解速率最快 (Bartha and Atlas 1977)；短鏈烷類 (碳數小於 9) 則對於多種微生物具毒性，會破壞微生物細胞膜的通透及調結功能，但其能以較快的速率從石油污染物中揮發移除 (Fritsche and Hofrichter 2000)。這一部分我們主要針對長碳鏈直鏈烷類的代謝途徑來作介紹，直鏈烷類的氧化途徑主要可分為三類：單末端氧化 (monoterminal oxidation)、雙末端氧化 (diterminal oxidation)、次末端氧化 (subterminal oxidation)，如圖 2.4.1-1 所示 (Gibson 1984)。

### (1) 單末端氧化 (monoterminal oxidation) :

單末端氧化為微生物代謝直鏈烷時最主要的途徑 (Fritsche and Hofrichter 2000)。直鏈烷氧化過程中，微生物釋放出單氧化酶，利用  $\text{NADH}_2$  作為電子提供者並結合氧分子作為電子接受者，攻擊直鏈烷末端的碳原子，進而形成一級醇類。接著再利用醇脫氫酶 (alcohol dehydrogenase) 將醇氧化成醛類，最後微生物釋放醛脫氫酶 (aldehyde dehydrogenase)，利用  $\text{NADH}_2$  再次結合氧分子，將醛氧化成長鏈脂肪酸 (fatty acid)。長鏈脂肪酸會結合 CoA 並進入  $\beta$ -oxidation 進而生成 acetyl-CoA (Watkinson and Morgan 1990, Van Hamme *et al.* 2003, Wentzel *et al.* 2007)，如圖 2.4.1-1。這些長鏈脂肪酸還有可能會與細胞膜上的脂質 (lipid) 結合，但主要還是會進入檸檬酸循環 (TCA cycle) (Fritsche and Hofrichter 2000)。

### (2) 雙末端氧化 (diterminal oxidation) :

直鏈烷氧化過程中，有些微生物除了分泌單氧化酶外，還會分泌出雙氧化酶，使烷類兩端的甲基同時被氧化 ( $\omega$ -oxidation) 成雙質子醇，經過一連串的氧化反應形成長鏈雙質子羧酸 (dicarboxylic acid)，最後進入  $\beta$ -oxidation，此代謝途徑也可視為單末端氧化過程中的副反應 (Watkinson and Morgan 1990, Coon 2005)，如圖 2.4.1-1 所示。

### (3) 次末端氧化 (subterminal oxidation) :

如圖 2.4.1-1 的右半邊圖所示。次末端氧化發生於烷類基質的鏈長至 C16 (Gibson 1984, Whyte *et al.* 1998, Binazadeh *et al.* 2009) 或短碳鏈烷類 (C3 ~ C6) 中 (Ashraf *et al.* 1994)。也可稱之為  $\alpha$ -oxidation，主要是氧化直鏈烷中  $\alpha$  位置的碳，首先形成二級醇類，接著將其氧化成酮類，最後形成一級醇及醋酸鹽。其中，一級醇氧化成為脂肪酸後進入  $\beta$ -oxidation，繼續反應成細胞所需的化合物，而醋酸則進入 TCA cycle 產生能量。一些微生物中，單末端及次末端氧化反應能夠同時存在 (Rojo 2009)。

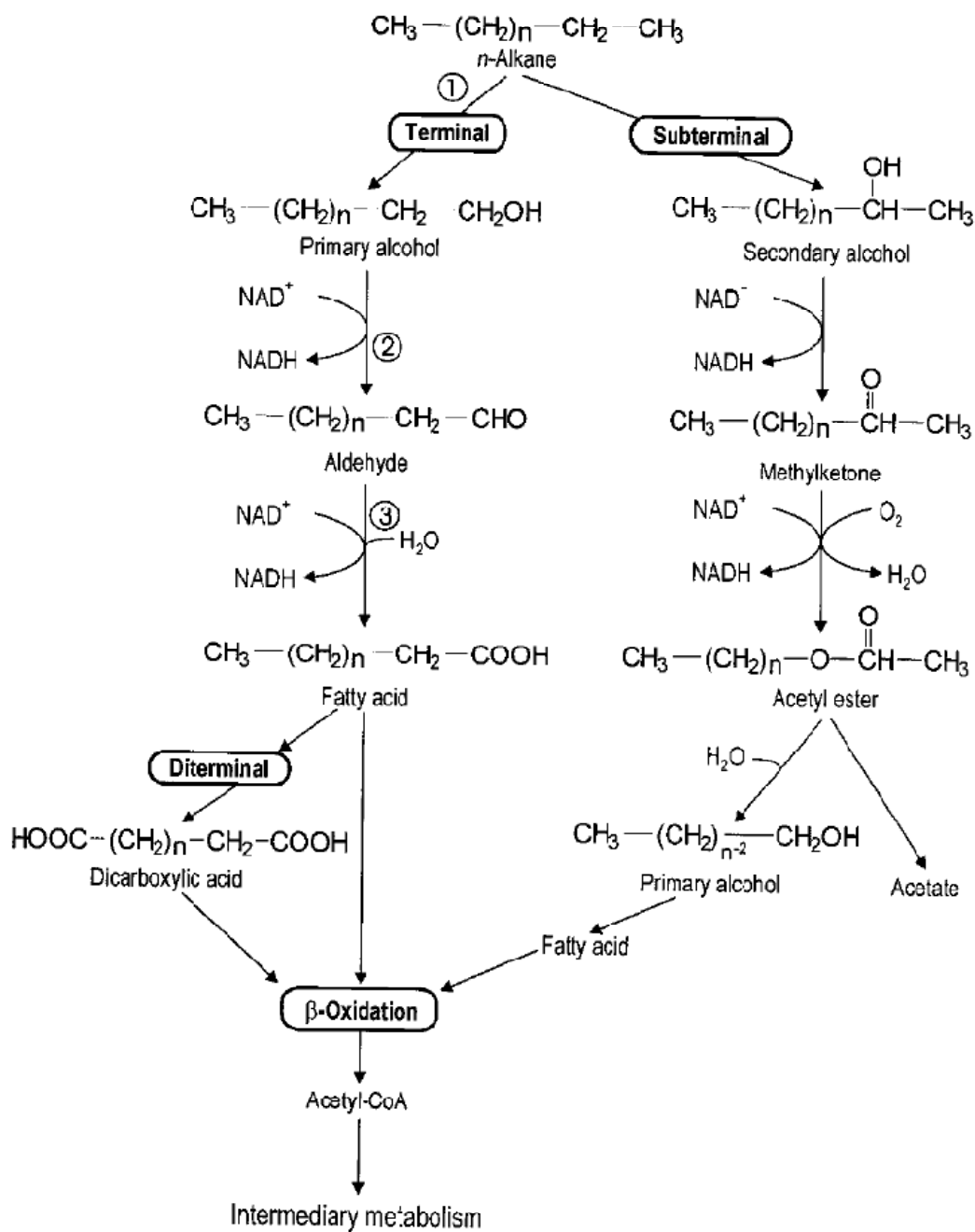


圖 2.4.1-1 微生物代謝分解直鏈烷之途徑 (圖中 1 為  $n$ -alkane 單氧化酶、2 為醇脫氫酶、3 為醛脫氫酶) (Britton 1984)。

## 2.4.2 支鏈烷之氧化機制

支鏈烷類 (branched alkanes) 相對於直鏈烷類較難以被微生物降解，且支鏈越多的烷類相較於結構較簡單的支鏈烷類更加頑抗 (recalcitrant)，特別是化合物中含 3 級或 4 級的碳原子結構，其空間障礙會影響氧化酶的作用，故具有降解支鏈烷能力的微生物相對較少 (Britton 1984)。

一般來說，異十九烷 (pristane or 2, 6, 10, 14-tetramethylpentadecane) 常被當作微生物降解支鏈烷類的指標，主要是因為其複雜的支鏈結構往往在原油或石油污染物的降解過程中呈現穩定的存在而不易被分解 (Morgan and Watkinson 1994)。然而具有降解異十九烷能力的微生物早在許多研究中已被證實，例如 *Brevibacterium sp.* (Pirnik *et al.* 1974)、*Corynebacterium sp.* (McKenna and Kallio 1971a) 及 *Rhodococcus sp.* (McKenna and Kallio 1971b, Fraaije *et al.* 2002)... 等。

圖 2.4.2-1 為 Pirnik 學者提出的利用菌株 *Brevibacterium erythrogens* 降解異十九烷的單末端氧化及雙末端氧化途徑 (Pirnik *et al.* 1974)。由於 3 級碳的阻礙，異十九烷首先會經由  $\alpha$ -oxidation 形成異十九酸 (pritanoic acid)，接著進行  $\beta$ -oxidation 形成 trimethyltridecanoic acid、trimethylundodecanoic acid 或是進形  $\omega$ -oxidation 形成 trimethyltridecandioic acid 後再進行  $\beta$ -oxidation，直到異十九烷被分成琥珀酸 (succinic acid) 並進入 TCA cycle 為止。

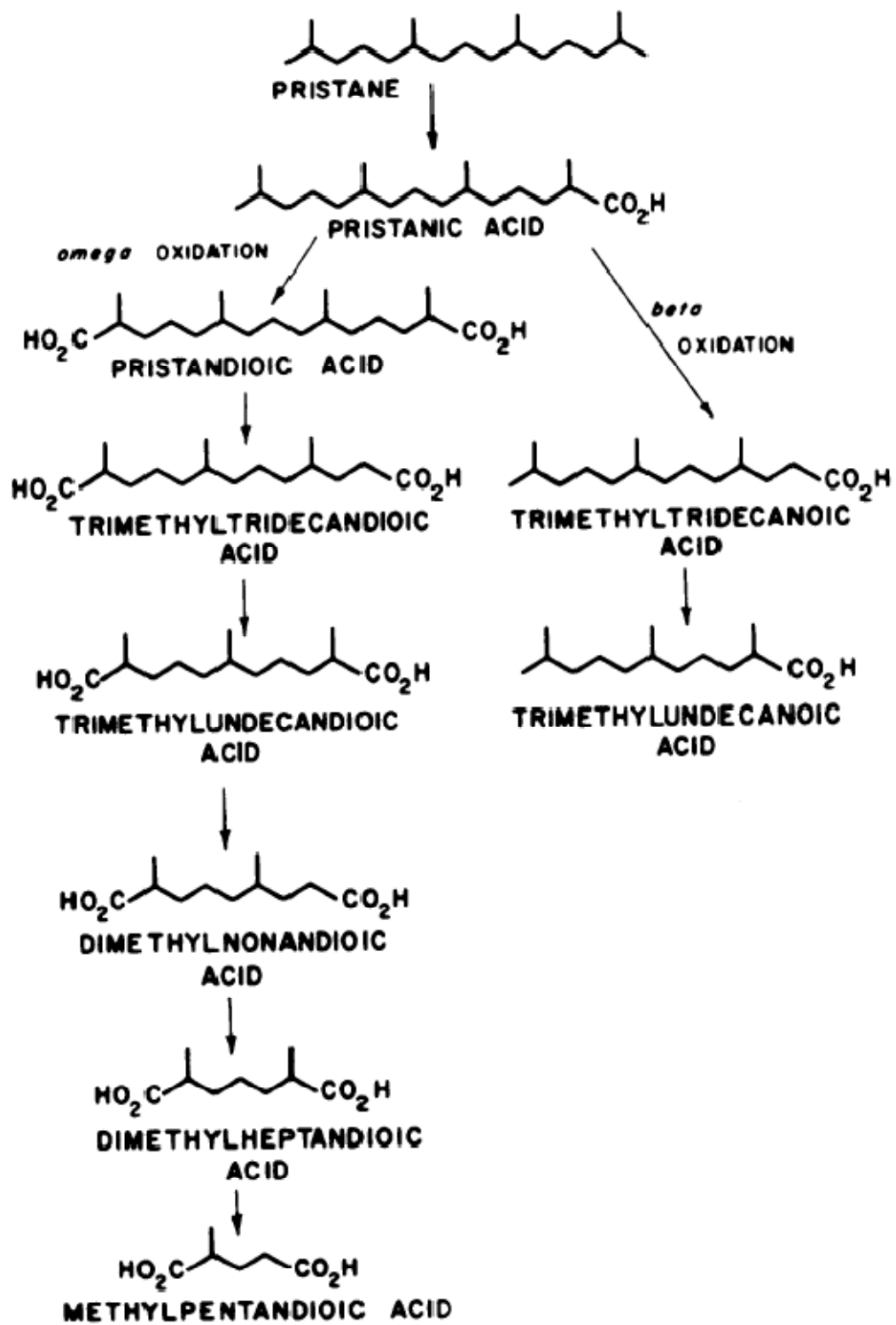


圖 2.4.2-1 菌株 *Brevibacterium erythrogens* 降解異十九烷的途徑 (Pirnik *et al.* 1974)。

大部分異十九烷的降解皆是利用單末端氧化及雙末端氧化途徑來進行。然而在 2009 年, Nhi-Cong 等學者利用 *Rhodococcus ruber* 及 *Mycobacterium neoaurum* 以異十九烷為單一培養碳源, 研究發現除了單、雙末端氧化途徑以外, *R. ruber* 及 *M. neoaurum* 菌株還會以次末端氧化 (subterminal oxidation) 途徑來降解異十九烷, 如圖 2.4.2-2 及圖 2.4.2-3 所示 (Nhi-Cong *et al.* 2009)。

圖 2.4.2-2 中的 pathway I 為單末端氧化路徑, 此途徑和前面提到的菌株 *B. erythrogenes*、*Corynebacterium sp.* 及 *Rhodococcus sp.* 代謝異十九烷的路徑相同。圖 2.4.2-2 中的 pathway II 則是雙末端氧化路徑。異十九烷的單、雙末端氧化途徑已在前面作了簡介。

Nhi-Cong 等學者在進行異十九烷的中間產物分析時, 發現有不同於單、雙末端氧化的中間產物存在, 故推測有第三種降解路徑, 即次末端氧化。如圖 2.4.2-2 的 pathway III 及圖 2.4.2-3 中所示。

Rontani 等學者則認為, 次末端氧化的過程中會形成 isopropanol 及 4, 8, 12-trimethyltridecanoic acid (圖 2.4.2-3 中的 pathway IIIB), 而此 acid 會經由單末端氧化繼續降解 (pathway I) (Rontani *et al.* 1986)。

Nhi-Cong 等人提出次末端氧化反應首先攻擊第 3 個碳原子並形成一級醇 2, 6, 10, 14-tetramethylpentadecan-3-one 及 2-methylpropanoate, 此一級醇又會繼續氧化成 3, 7, 11-trimethyldodecanoate (圖 2.4.2-3 中的 pathway IIIA)。且經由中間產物的成份分析, 更加證實了異十九烷的次末端氧化代謝途徑。3, 7, 11-trimethyldodecanoate 接著氧化成 2,6,10-trimethyldodecandioate, 進入  $\beta$ -oxidation 後成形 3, 7-dimethyldecandioate 及 2-methylbutandioate。

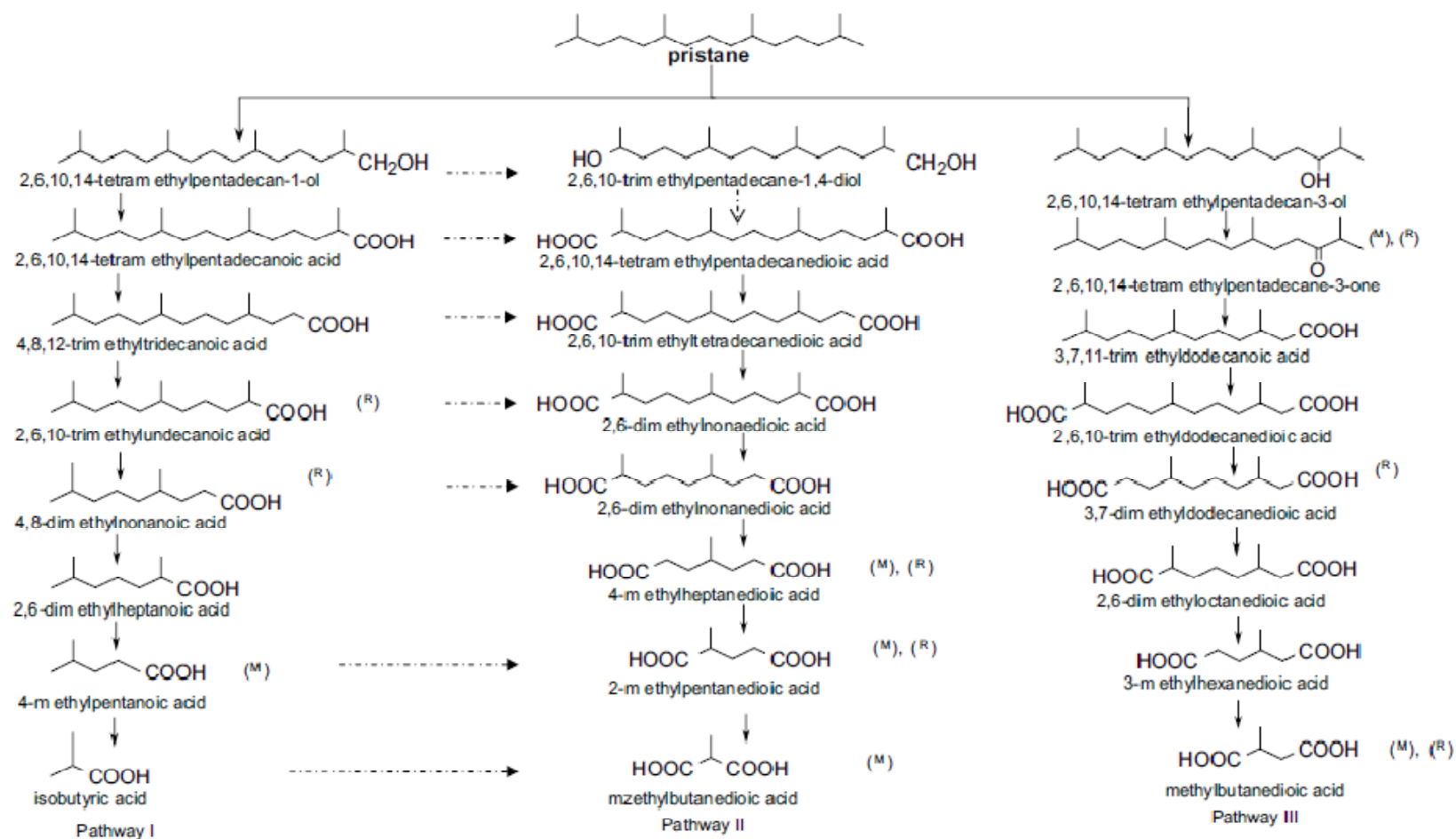


圖 2.4.2-2 異十九烷可能的降解途徑。圖中的標記 (R) 及 (M) 分別代表 *R. ruber* SBUG 82 及 *M. neoaurum* SBUG 109 氧化過程中檢測出的產物 (  $\longrightarrow$  means novel metabolic route;  $\dashrightarrow$  means major metabolic route of  $\beta$ -oxidation) (Nhi-Cong *et al.* 2009)。

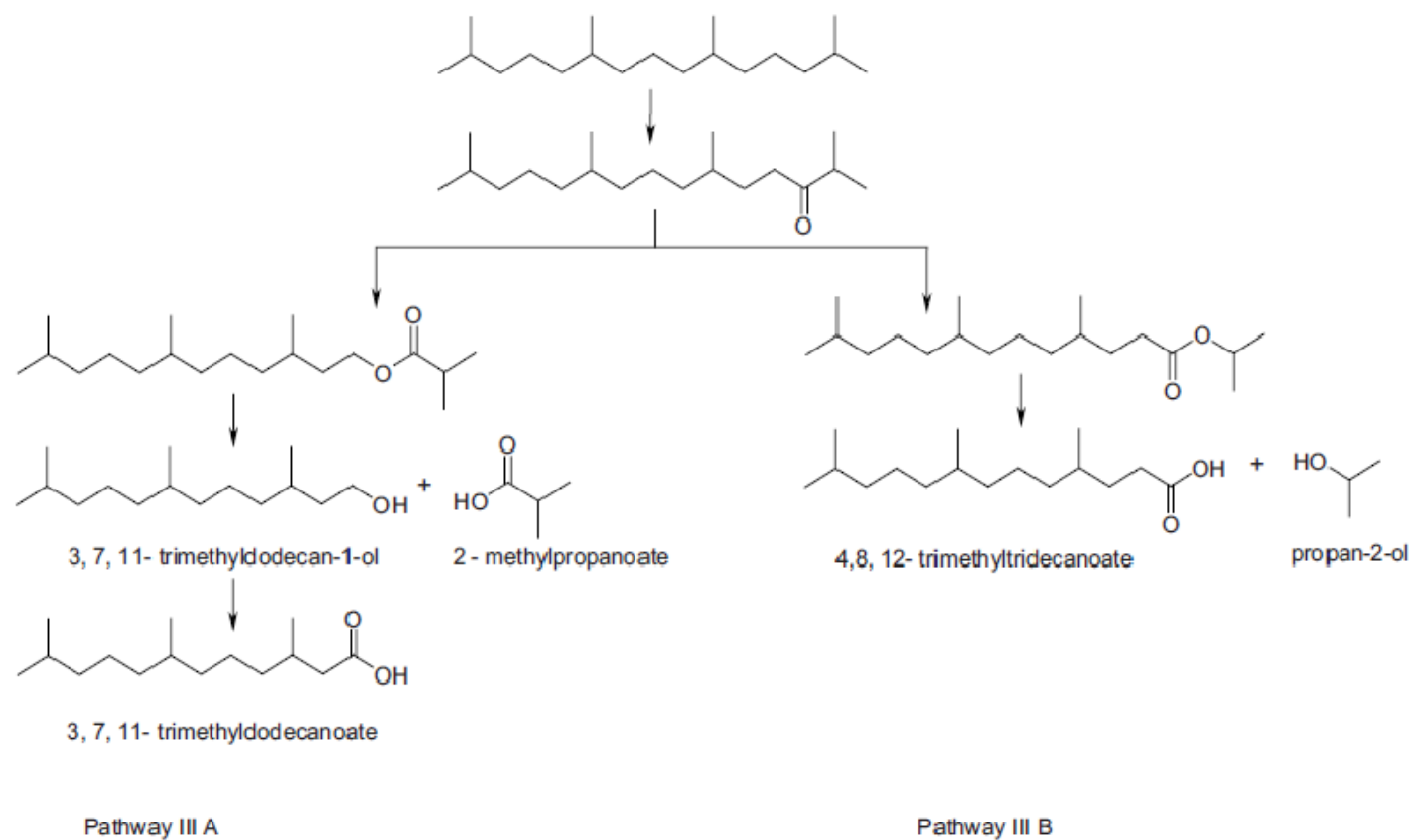


圖 2.4.2-3 異十九烷次末端氧化過程中以 2, 6, 10, 14-tetramethyl-pentadecan-3-one 作為中間產物，利用 ketone monooxygenase 進行的兩種不同單末端氧化反應。Pathway IIIA 為 *R. ruber* SBUG 82 及 *M. neoaurum* SBUG 109 的反應途徑 (Nhi-Cong *et al.* 2009)。Pathway IIIB 為 Rontani 等人提出的海洋混合菌株分解異十九烷途徑 (Rontani *et al.* 1986)。

### 2.4.3 烯烴類及環烷類之氧化機制

烯烴類 (alkenes) 及環烷類 (cyclic alkanes) 佔石油碳氫化合物污染源中較少的部分，故這一小節中，我們為烯烴類及環烷類的氧化機制作個簡單的介紹。

烯烴類的代謝途徑如圖 2.4.3-1 所示，微生物降解烯烴類時，起始氧化的途徑有幾種可能，微生物可以攻擊甲基端，也可攻擊雙鍵 (Watkinson and Morgan 1990)。若雙鍵在中間部位時，烯烴的降解可能會依照烷類的降解方式進行。而如果雙鍵在 1, 2 碳的位置，則可能會有以下三種途徑：(1) 與水行加成反應，形成醇類、(2) 受單氧化酶作用生成一環氧化合物，接著再氧化形成二元醇、(3) 在碳氫化合物飽和末端先發生氧化反應 (張蘭英等 2007)。

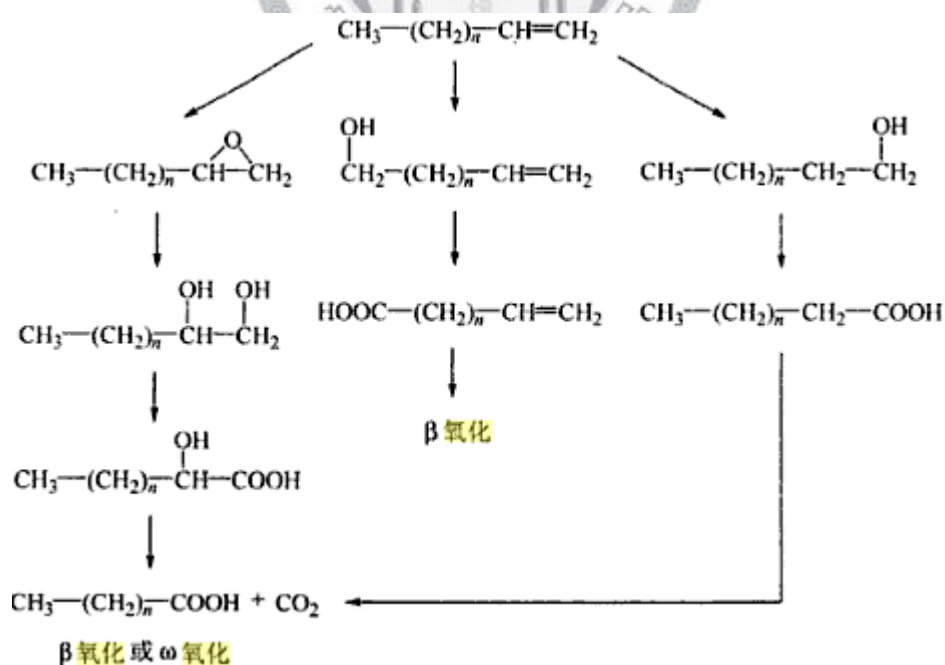


圖 2.4.3-1 烯烴類生物降解可能的代謝途徑 (張蘭英等 2007)。

環烷類因其結構的關係，微生物難以利用。只有少數的微生物能夠單獨降解環己烷，大部分則是利用多種微生物的共同代謝作用 (co-metabolism) 下，使環己烷類被分解成二氧化碳及水分子 (張蘭英等 2007)。若環烷類上有其他烷煙支鏈或羧基的話，可促進降解的情形 (Morgan and Watkinson 1994)，但如果支鏈為氯原子的話，則其會變得更加難以利用降解。一般環己烷的代謝途徑如圖 2.4.3-2 所示，環己烷的降解代謝經歷了環己醇、環己酮、和  $\epsilon$ -己酸內酯後，開環形成羧基羧酸並進入  $\beta$ -oxidation 代謝循環 (張蘭英等 2007)。

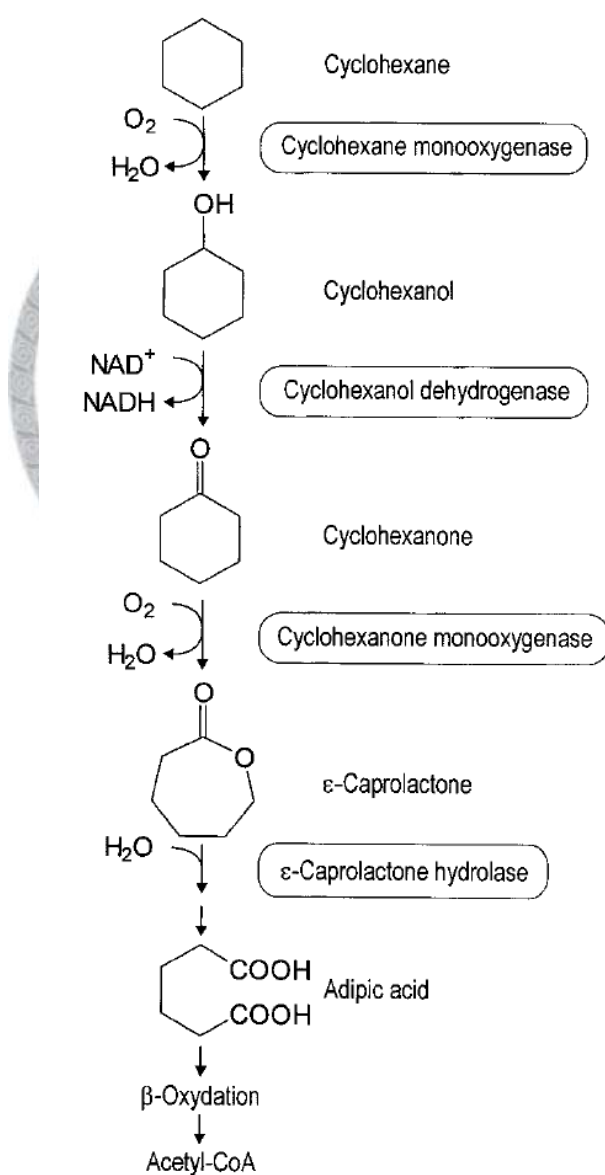


圖 2.4.3-2 環己烷的代謝途徑 (Fritsche and Hofrichter 2000)。

圖 2.4.3-3 為學者 Alvarez 在 2003 年整理的有關不產孢放線菌 (non-sporulating actinomycetes bacteria) 降解各種碳氫化合物時的代謝路徑，並描述了其形成中間物進入  $\beta$ -oxidation 之後的各種可能應用。這些微生物在利用不同形態的碳氫化合物如直鏈烷、支鏈烷或環烷類...等之後，所生成的中間產物會進入  $\beta$ -oxidation，最終將這些物質轉變為以下幾種細胞生長所需的物質：

- (1) 生長所需能量 (energy)。
- (2) 影響細胞表面親疏水性的 mycolic acids。
- (3) 建構細胞膜所需的磷脂質 (phospholipids)。
- (4) 儲存能量的三醯甘油脂 (triacylglycerols)。
- (5) 其他脂質 (lipids)。

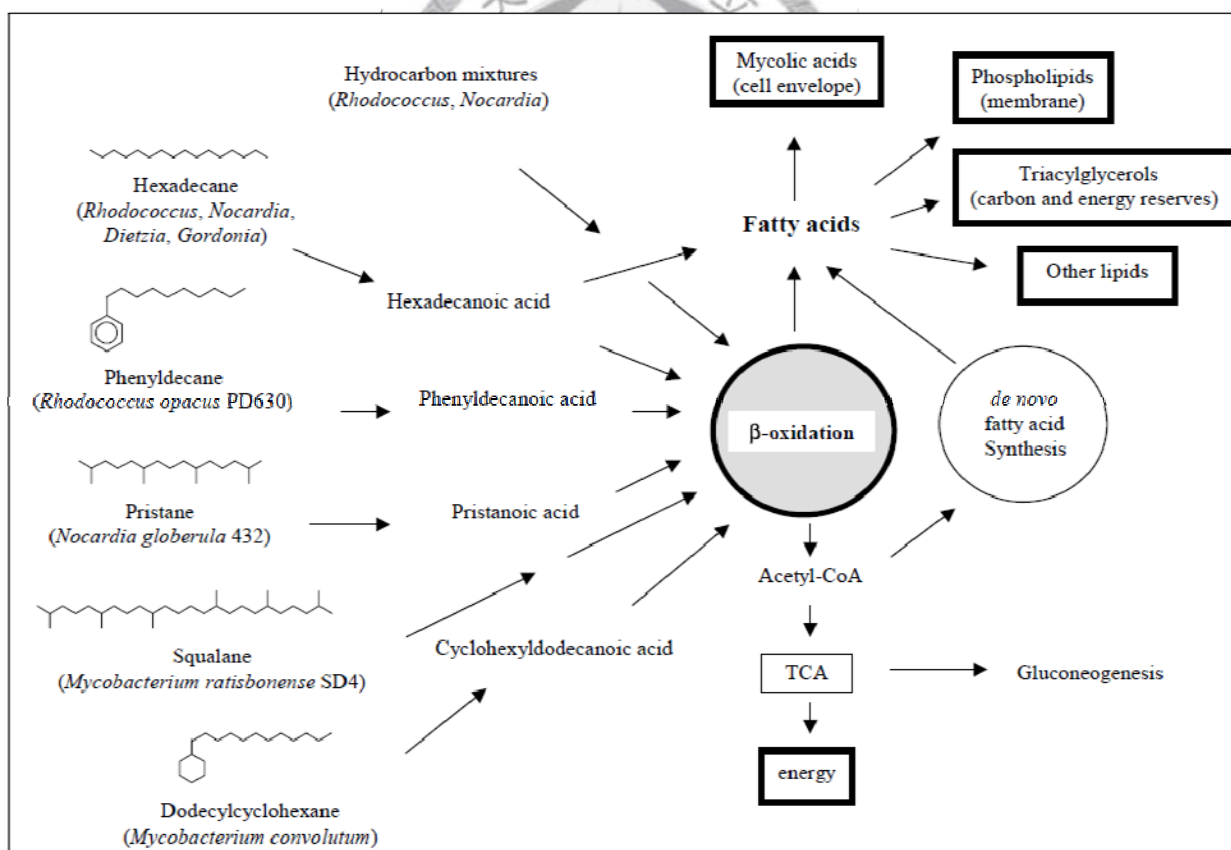


圖 2.4.3-3 不產孢放線菌 (non-sporulating actinomycetes) 降解利用不同碳氫化合物之途徑及經過  $\beta$ -oxidation 後合成細胞生長所需相關物質 (Alvarez 2003)。

## 2.5 實驗菌株 *Rhodococcus erythropolis* 之介紹

本研究所使用的菌株最早是由實驗室人員 (盧曉鳳 2000) 從中油桃園廠採集之生物污泥槽廢水，經過馴養、篩選及純化後得到的一混合菌株，命名為 TN-4 混合菌株。藉由食品工業研究所進行 16SrDNA 序列分析及鑑定後，顯示 TN-4 中所含的三種菌株分別為 *Bacillus fusiformis*、*Ochrobacterum sp.* 及 *Rhodococcus erythropolis*。

根據本實驗室過往的研究發現 (張緯農 2003)，TN-4 混合菌株中的 *Bacillus fusiformis*、*Ochrobacterum sp.* 對於碳氫化合物並無分解能力，無法以長鏈烷類為唯一碳源的條件下生長，而 *Rhodococcus erythropolis* 則對於長鏈烷類有很好的降解及包覆能力，因而知道 TN-4 混合菌株中主導分解及包覆長鏈烷類的菌株為 *Rhodococcus erythropolis*，本實驗室將其命名為 *Rhodococcus erythropolis* NTU-1 (簡稱 NTU-1)。本研究中所使用的菌株為 NTU-1，故接下來將為菌株 *Rhodococcus erythropolis* 作個簡單的介紹。

### 2.5.1 *Rhodococcus* 菌屬簡介

*Rhodococcus* 菌屬最早是在 1891 年由 Zopf 所建立，但因為其在演化分類上一直有疑慮，所以在很長一段時間內曾被取消。到了 1977 年 Goodfellow 學者對於一些菌株的表型、化學及遺傳學的研究得到了一群相似但不同於 *Nocardia*、*Corynebacterium* 及 *Mycobacterium* 的菌株，並提出將 *Rhodococcus* 菌屬恢復 (Goodfellow 1987, 華及郭 2003)。

由於分子生物學及遺傳學越來越成熟，許多屬於*Rhodococcus*的菌株逐漸被分離出來。另外，透過DNA分子雜交、16SrDNA序列分析...等分類方法，許多原本歸類為*Nocardia*的菌屬重新被歸類到*Rhodococcus*菌屬中，也有許多的*Rhodococcus*菌屬重新被劃分到*Nocardia*的菌屬。還有一些與*Rhodococcus*生理特徵相近的菌屬常被錯誤的分類，這些菌屬包括：*Acinetobacter*、*Corynebacterium*、*Gordonia*、*Nocardia*、*Skermania*、*Tsukamurella*...等 (Goodfellow *et al.* 1998, Gurtler *et al.* 2004)。表2.5-1則為1994年 ~ 2001年中*Rhodococcus*菌屬分類的變動 (華及郭 2003)。

目前*Rhodococcus*菌屬則包含了以下14個菌種：*R. coprophilus*、*R. equi*、*R. fascians*、*R. erythropolis*、*R. globerulus*、*R. rhodnii*、*R. marinonascens*、*R. opacus*、*R. percolatus*、*R. rhodochrous*、*R. ruber*、*R. zopfii*、*R. pyridinivorans*及 *R. koreensis* (Bell *et al.* 1998, 華及郭 2003)。

表 2.5.1-1 1994 ~ 2001 年中 *Rhodococcus* 菌屬分類的變動 (華及郭 2003)。

原分类地位和命名	重新分类后命名
<i>Nocardioides simplex</i> ATCC13260 ATCC19565 ATCC19566	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
<i>Rhodococcus obuensis</i>	<i>Gordonia sputi</i>
<i>Rhodococcus sputi</i> <sup>[6]</sup>	
<i>Rhodococcus terrae</i>	<i>Gordonia terrae</i>
<i>Rhodococcus rubropertinctus</i>	<i>Gordonia rubropertinctus</i>
<i>Rhodococcus bronchialis</i>	<i>Gordonia bronchialis</i>
<i>Rhodococcus aichiensis</i>	<i>Gordonia aichiensis</i> comb. nov.
<i>Rhodococcus chubuensis</i>	<i>Gordonia chubuensis</i>
<i>Rhodococcus maris</i> <sup>[7]</sup>	<i>Dietzia maris</i> comb. nov.
<i>Rhodococcus chlorophenolicus</i>	<i>Mycobacterium chlorophenolicum</i>
<i>Rhodococcus auranticus</i>	<i>Tsukamurella auranticus</i>

*Rhodococcus* 為好氧、無鞭毛、不具運動性且不形成分生孢子或內孢子的諾卡氏型放線菌 (nocardioform actinomycetes)，其屬於革蘭氏陽性菌，細胞大小約為 2~3  $\mu\text{m}$ ，通常呈現球狀或是桿狀 (Goodfellow 1989, Finnerty 1992)。

*Rhodococcus* 菌屬的細胞壁約有 40% 是由 mycolic acid 所組成，mycolic acid 指的是高分子量、含有  $\alpha$ -支鏈、 $\beta$ -羥基脂肪酸的化合物，其總碳鏈長度約為 34~64 個碳原子。因而 *Rhodococcus* 菌屬的細胞表面常呈現疏水性且其具有較能抵抗化學性傷害及能抵禦脫水的特性 (Collins *et al.* 1982, Bell *et al.* 1998)。

*Rhodococcus* 菌屬能分布於多種環境中，不論是在土壤、岩石、地下水、海底沈積物、動物的糞便、昆蟲內臟或是動植物的致病菌中皆能發現 *Rhodococcus* 菌屬的存在 (Finnerty 1992)。90 年代以後，*Rhodococcus* 菌屬逐漸受到重視，主要是因為其除了對環境有高度的容忍性外，還具有多樣性的代謝機制，能分解、轉化多種有機化合物，包含一些分子結構複雜、頑抗、毒性高的化合物 (Larkin *et al.* 2005)，因此在生物復育的領域中，佔有很重要的地位。

另外，*Rhodococcus* 菌屬能合成多種有用途的化合物如界面活性劑 (surfactants)、凝聚劑 (flocculants)、氨基化合物 (amide) 及高分子 (polymers) 等，因而廣泛的被利用在藥學、農化、食品...等工業上 (Bell *et al.* 1998)。

上面提到 *Rhodococcus* 菌屬能轉化多種有機化合物、具有多樣代謝機制，主要是因為 *Rhodococcus* 菌屬中含有多種類型的酵素如單氧化酶及雙氧化酶，使其能夠生長及降解掉大範圍的有機污染物。Larkin 等學者將這些氧化酶所引起的反應整理如下：環氧化 (epoxidation)、順式雙羥基化反應 (cis-dihydroxylation)、羥基化 (hydroxylation)、磺化氧化作用 (sulfoxidation) (Larkin *et al.* 2005)，如圖 2.5.1-1 所示。

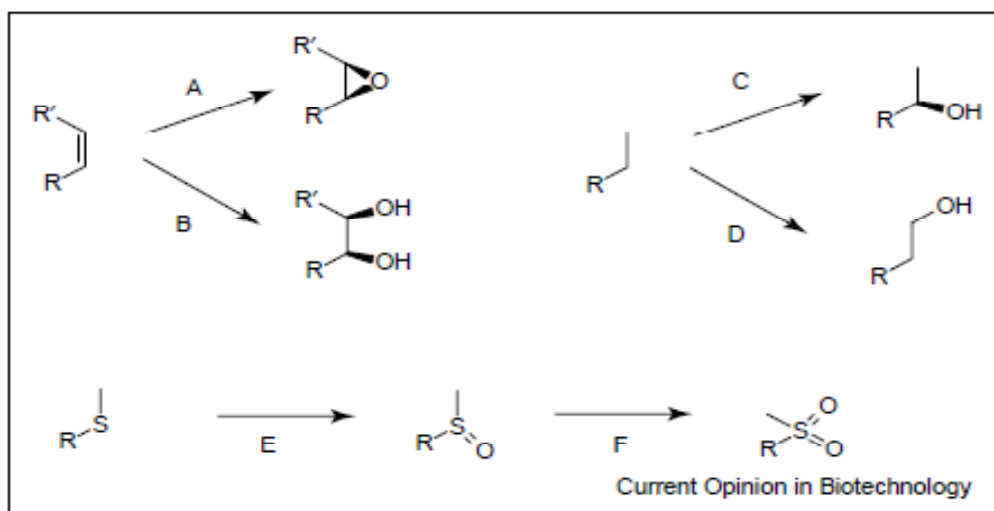


圖 2.5.1-1 不同氧化酶促使 *Rhodococcus* 菌屬引發不同化學反應並能生長及降解掉大範圍的有機污染物。(A) 環氧化 (eg. cytochrome P450 enzymes)、(B) 順式雙羥基化反應 (e.g. by dioxygenase)、(C) 對二級烷基的羥基化、(D) 對一級烷基的羥基化 (e.g. alkane monooxygenase)、(E) 磺化氧化作用 (sulfoxidation of sulfide to sulfoxide)、(F) 磺化氧化作用 (sulfoxidation of sulfoxide to sulfone) (Larkin *et al.* 2005)。

## 2.5.2 *Rhodococcus erythropolis* 之特性及應用

2.5.1 節中我們知道了 *Rhodococcus* 菌屬對於多種有機污染物具有生物降解的能力，主要是因為其細胞表面常呈現疏水性，或是在培養過程中能分泌界面活性劑 (surfactants)、絮凝劑 (flocculants) 使碳源的接觸利用變得更容易。另外，*Rhodococcus* 菌屬也能分泌出多種酵素來進行各種代謝反應。這一節中我們將對本研究所使用的菌株 *Rhodococcus erythropolis* 的降解能力及應用作介紹。

許多對於 *R. erythropolis* 菌株的研究都指出其對於碳氫化合物的降解有很好的效果，在此無法一一詳述，故列出以下幾個例子。Peng 等學者篩選出一株能降解油類的菌株 *R. erythropolis* 3C-9，其能降解範圍  $C_5 \sim C_{36}$  的直鏈烷類，並在降解過程中產生鏈長  $C_9 \sim C_{22}$  的脂肪酸與 2 種醣脂作為界面活性劑 (Peng *et al.*

2007)。 *R. erythropolis* DCL14 能降解碳鏈長  $C_5 \sim C_{16}$  的碳氫化合物，並能在九個月內將燃油中的直鏈烷、異烷類、環烷類及芳香族化合物完全降解掉 (Carvalho and Fonseca 2005a)。Huang 等學者分離出的菌株 *R. erythropolis* T7-2 能乳化並降解碳鏈  $C_{12} \sim C_{36}$  的直鏈烷類；以人工海水為培養基，溫度為  $15^\circ\text{C}$ ，在最佳化的營養條件下，7 天內約能降解掉 75% 的 1%(w/v) 柴油 (Huang *et al.* 2008)。

文獻中指出 *R. erythropolis* 細胞擁有多種的酵素因而能進行多種生物性轉化及降解作用，這些酵素能催化進行以下的反應：氧化 (oxidation)、去氫化 (dehydrogenation)、環氧化 (epoxidation)、水解 (hydrolysis)、羥基化 (hydroxylation)、去鹵化 (dehalogenation) 以及去硫化 (desulfurisation) ... 等反應，因而 *R. erythropolis* 常被利用於各種不同的生物技術研究上。表 2.5.2-1 為一些微生物氧化碳氫化合物時的酵素分類 (Van Beilen and Funhoff 2007)。由此表可知 *Rhodococcus* 菌屬分泌出的氧化酵素主要有 alkB-related alkane hydroxylases 及 Bacterial P450 oxygenase systems 這兩種類型。而本實驗中使用菌株 *R. erythropolis* NTU-1 所分泌之氧化酵素主要為 alkB 的類型 (Sayavedra Soto *et al.* 2006)。

表 2.5.2-1 微生物降解碳氫化合物時之酵素分類 (Van Beilen and Funhoff 2007)。

Enzyme class	Composition and cofactors	Substrate range	Presence shown in	Reference for GenBank entries
Soluble methane monooxygenase (sMMO)	$\alpha_2\beta_2\gamma_2$ hydroxylase; dinuclear iron reductase, [2Fe-2S], FAD, NADH regulatory subunit	$C_1-C_8$ (halogenated)-alkanes, alkenes, cycloalkanes	<i>Methylococcus</i> , <i>Methylosinus</i> , <i>Methylocystis</i> , <i>Methylomonas</i> , <i>Methylocella</i>	McDonald <i>et al.</i> (2006)
Particulate methane monooxygenase (pMMO)	$\alpha_3\beta_3\gamma_3$ hydroxylase trimer composed of PmoA, PmoB, PmoC; mononuclear copper and dinuclear copper in PmoB	$C_1-C_5$ (halogenated)-alkanes, alkenes	<i>Methylococcus</i> , <i>Methylosinus</i> , <i>Methylocystis</i> , <i>Methylobacter</i> , <i>Methylomonas</i> , <i>Methylomicrobium</i> , etc.	McDonald <i>et al.</i> (2006)
AlkB-related alkane hydroxylases	Membrane hydroxylase; dinuclear iron rubredoxin; mononuclear iron rubredoxin reductase, FAD, NADH	$C_5-C_{16}$ alkanes, fatty acids, alkylbenzenes, cycloalkanes, etc.	<i>Acinetobacter</i> , <i>Alcanivorax</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Rhodococcus</i> , etc.	van Beilen <i>et al.</i> (2003b)
Eukaryotic P450 (CYP52, Class II)	Microsomal oxygenase; P450 heme reductase; FAD, FMN, NADPH	$C_{10}-C_{16}$ alkanes, fatty acids	<i>Candida maltosa</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i>	Iida <i>et al.</i> (2000)
Bacterial P450 oxygenase systems (CYP153, class I)	P450 oxygenase; P450 heme ferredoxin; iron-sulfur ferredoxin reductase, FAD, NADH	$C_3-C_{16}$ alkanes, (cyclo)-alkanes, alkylbenzenes, etc.	<i>Acinetobacter</i> , <i>Alcanivorax</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Sphingomonas</i> , etc.	van Beilen <i>et al.</i> (2006)
Dioxygenase	Homodimer; copper, FAD	$C_{10}-C_{30}$ alkanes	<i>Acinetobacter</i> sp. M-1	Maeng <i>et al.</i> (1996)

除了對特定基質化合物具降解能力以外，對於環境毒性的忍受力也是一個影響微生物表現的重要因素。基質的濃度、細胞的適應能力（細胞形態的改變、細胞聚集或分離）及細胞膜上成份的改變皆能決定微生物對於環境毒性的忍受力 (Carvalho and Fonseca 2005b)。

de Carvalho 等學者測試了不同菌株對於水溶性及非水溶性溶劑的毒性忍受力，實驗發現 *R. erythropolis* 對於溶劑有相當的耐受性，在水溶性溶劑乙醇或丁醇下，*R. erythropolis* 可以忍受的濃度高達 50%(v/v)；在非水溶劑下，*R. erythropolis* 可以忍受十二烷及甲苯的濃度達 5%(v/v)，由此可證實 *R. erythropolis* 在非傳統的反應系統中其生物催化作用的發展是有潛力的 (Carvalho and Fonseca 2004)。

此外，還有研究指出 *R. erythropolis* 會改變細胞膜上脂肪酸的含量以維持細胞膜的通透性，並能對抗化合物對細胞產生的毒性 (Heipieper *et al.* 1994)。以 *R. erythropolis* DCL14 為例，在測試各種不同碳源時，發現細胞膜上磷脂質的脂肪酸 (fatty acids) 飽和程度會隨著碳源濃度提高而增加，但是當碳源為短鏈的醇類如甲醇、乙醇時，碳源濃度的提高，脂肪酸的飽和程度則會下降 (Carvalho *et al.* 2005)。其他影響細胞膜脂肪酸飽合程度的因素還有環境溫度及酸鹼值...等 (Whyte *et al.* 1999, Peng *et al.* 2007)。

另外幾點讓 *R. erythropolis* 菌株對於石油碳氫化合物具有高度降解能力的原因包括了其細胞表面的疏水性及在其利用碳氫化合物為碳源時所釋放的生物界面活性劑 (biosurfactants) 及生物絮凝劑 (biofloculants)。

文獻指出，mycolic acid 在 *R. erythropolis* 細胞壁的組成上約佔有 40%，因而 *R. erythropolis* 顯得相當疏水且能夠輕易的貼附在油-水的界面上 (Neu 1996)。本實驗中所使用的菌株 *R. erythropolis* NTU-1，經過其對正十六烷的 MATH

(microbial adhesion to hydrocarbons) 細胞吸附實驗，NTU-1 細胞的吸附百分比在第 3 小時後即能達到 70%以上，到了第 24 小時約可達 80%左右，這樣的結果顯示細胞表面具有相當的疏水性 (劉志文 2007)。

表 2.5.2-2 為 *Rhodococcus* 菌屬細胞合成的醣脂質類型，其功能為形成細胞外層的脂質層以增強其表面疏水性，或是釋放至細胞外作為界面活性劑及絮凝劑 (Lang and Philp 1998)，這些皆能提升 *Rhodococcus* 菌屬利用碳氫化合物的效率。研究指出，*R. erythropolis* 產生的生物界面活性劑比其他合成的界面活性劑來得有效，且有不具毒性、生物可分解等特點，故在工業上有一定的用途 (Finnerty 1994)。

*R. erythropolis* 釋放的生物界面活性劑對碳氫化合物的降解有以下的幫助：

- (1) 界面活性劑與細胞鍵結 (如 mycolic acid)，使細胞較易貼附在油相及水相之間的疏水性的碳源表面 (Neu 1996)。
- (2) 幫助降低水相-油相的表面張力，使疏水性碳源較容易進入細胞內 (Fiechter 1992)。
- (3) 細胞外的界面活性劑能幫助疏水性碳源的分散至水中，使細胞接觸碳源的機會提高、面積增大 (Finnerty 1994)。

*R. erythropolis* 亦能產生絮凝物質，對許多懸浮物產生絮凝作用，這些絮凝劑由多肽和脂類所聚集而成，包括含 mycolic acid 的醣脂，有助於廢水或廢物處理中懸浮物的清除 (Finnerty 1992, Kurane *et al.* 1994)。由此可知，細胞壁組成重要成分的 mycolic acid，其功能不是有維持細胞表面疏水性外，還有界面活性劑及絮凝劑的效果，使化合物的降解效率大幅提升 (Lee *et al.* 2006)。

表 2.5.2-2 *Rhodococcus* 菌屬細胞合成的醣脂質類型 (Lang and Philp 1998)。

Organism	Product	Surface tension <sup>1</sup> (mN m <sup>-1</sup> )	Interfacial tension (mN m <sup>-1</sup> )	cmc (mg l <sup>-1</sup> )	Reference
' <i>R. aurantiacus</i> ' 80001	Whole broth	28	0.35 <sup>2</sup>	n.d.	Ramsay et al. 1983
<i>R. erythropolis</i> DSM 43215	Trehalose-dicorynomycolates	36	17 <sup>2</sup>	4	Kim et al. 1990
<i>R. erythropolis</i> DSM 43215	Trehalose-monocorynomycolates	32	14 <sup>2</sup>	4	Kim et al. 1990
<i>R. erythropolis</i> DSM 43215	Trehalose-2,2',3,4-tetraester	26	<1 <sup>2</sup>	15	Kim et al. 1990
<i>R. erythropolis</i> SD-74	Succinoyl trehalose lipids (Na salt)	26	8 <sup>3</sup>	200	Ishigami et al. 1987
' <i>R. rubropertinctus</i> ' 60003	Whole broth	31	2.0 <sup>2</sup>	n.d.	Ramsay et al. 1983
' <i>R. terrae</i> ' 70006	Whole broth	30	3.0 <sup>2</sup>	n.d.	Ramsay et al. 1983
<i>Rhodococcus</i> strain 51T7	Cell free supernatant	30	n.d.	n.d.	Espuny et al. 1996
<i>Rhodococcus</i> strain H13-A	Octaacyl-trehalose	n.d.	0.02 <sup>4</sup>	1.5	Singer & Finnerty, 1990

<sup>1</sup>water, <sup>2</sup>water/*n*-hexadecane, <sup>3</sup>water/kerosene, <sup>4</sup>water/*n*-decane

根據本實驗室過往的研究指出，*R. erythropolis* NTU-1 利用正十六烷為碳源時，培養基的表面張力至第 70 小時會從 70mN/m 降至 60mN/m 左右，顯示有生物界面活性劑的釋放，但釋放到培養基中的量可能不多。另外一項測試，利用異十九烷及正十六烷為 NTU-1 碳源的培養過程中，NTU-1 表面的脂肪酸會明顯增加。因此我們可以知道，*R. erythropolis* NTU-1 所產生的界面活性劑主要為細胞表面累積的脂肪酸，其能使細胞接觸烷類變得更加容易，也使細胞整體疏水性加強，推測這也是為什麼培養至約 40 小時以後，NTU-1 細胞會形成結塊將長鏈烷類包覆，因而能配合物理撈除的方法，使 1000~3000 ppmv 正十六烷的移除效果在約 40 小時即能達到 95%以上 (張緯農 2009)。

此外，研究指出 NTU-1 能存在於不同鹽濃度下的環境。當培養基中氯化鈉濃度為 1.2%及 2.4%時，NTU-1 能在 56 小時內移除掉 80~90%濃度為 2000 ppmv 的正十六烷。若以海水為培養基，50%的 2000 ppmv 正十六烷能在 140 小時內移除 (Liu et al. 2009)，此項研究成果顯示 NTU-1 對於海洋石油污染生物復育的應用是有其競爭力的。

## 2.6 微生物之細胞聚集現象

Calleja 將細胞聚集 (cell aggregation) 現象定義為“在生理條件下，細胞集聚在一起形成一相當穩定且連續的多細胞菌團”(Calleja 1984)。自然界中，許多微生物會傾向於貼附到界面上或是聚集在一起，這些微生物在某些情況下會維持分散的狀態；在其他情況下，則會形成聚集體 (Busch and Stumm 1968)。一些本身具聚集能力的細菌有：*Kluyvera cryocrescens* (Kakii *et al.* 1990)、*Pseudomonas sp* (Tago and Aida 1977)、*Flavobacterium sp* (Tezuka 1969)...等。

微生物聚集現象的發生受到很多因素的影響，包含了複雜的物理、化學及生物因子，其中碳源種類、溫度、疏水性作用力、凡得瓦力、靜電作用力、微生物生長階段...等常被拿來討論 (Bossier and Verstraete 1996, Malik *et al.* 2003)。而微生物形成聚集體的目的主要是為了更有效率的攝取營養物、作為防禦機制抵抗毒性物質的進入、或是對抗環境壓力以維持生理機能...等 (Logan and Hunt 1988, Chang and Su 2003, Sannasi *et al.* 2009)。現今微生物聚集現象常被應用於廢水處理、生物薄膜...等方面。而微生物聚集現象的形成對於石油碳氫化合物的生物復育有以下 2 點優點：(1) 促進微生物接觸及降解污染物，(2) 被包覆的碳氫化合物能以物理方式來移除並作下一步的處理 (Sayavedra Soto *et al.* 2006)。

本研究中所使用的菌株 *Rhodococcus erythropolis* NTU-1，其所屬菌屬 *Rhodococcus* 在很多研究中皆顯示其具有聚集的能力。Iwabuchi 等學者測試 53 株不同名稱的 *Rhodococcus* 菌種發現，包含 *R. erythropolis* 在內的 34 個菌株會在培養過程中發生細胞聚集現象，形成結塊並沉到培養基底部 (Iwabuchi *et al.* 2003)。

由 2.5.2 節中，我們知道 *R. erythropolis* 菌株的細胞表面含有 40% 的 mycolic acids，所以表面能呈現高度的疏水性，而疏水性質會隨著碳源種類、細胞生長階段...等因素影響。文獻中也指出，細胞的疏水性是主導微生物貼附現象的原因之一 (Olofsson *et al.* 1998)。另外，*R. erythropolis* 菌株在利用低水溶性的碳氮化合物作為碳源時，往往會分泌生物界面活性劑，其成份大多為醣脂類或脂肪酸，若這些物質存在於細胞表面，可使細胞表面的疏水性增強，若釋放到培養基中則能降低油-水之間的表面張力，使碳源的攝取更加容易 (Lang and Philp 1998)。

文獻中也提到，*R. erythropolis* 能分泌出生物絮凝劑，對許多懸浮物能產生絮凝作用 (flocculation)。Takeda 等學者利用從自然界分離出的 *R. erythropolis* S-1 菌株，在以葡萄糖為碳源的條件下能產生蛋白質類的絮凝劑 NOC-1，NOC-1 具有強而廣泛的絮凝活性，且有應用範圍廣、不會造成二次污染、生產成本相也相對於人工合成的絮凝劑低...等優點 (Takeda *et al.* 1991)。其他能生產絮凝劑的菌株還有 *Paecilomyces* (Takagi and Kadowaki 1985)、*Klebsiella pneumonia* (Nakata and Kurane 1999)、*Citrobacter* (Fujita *et al.* 2000)、*Bacillus mucilaginosus* (Deng *et al.* 2003)...等。

由以上資料可知，*Rhodococcus* 菌屬細胞表面除了原本具有脂質、mycolic acid 以外，在以碳氮化合物培養的過程中還會累積脂肪酸或是醣脂質於細胞表面，或是釋放出這些界面活性劑及生物絮凝劑於環境中，使其表面更加具疏水性且更能與疏水性碳氮化合物接觸，故 *Rhodococcus* 菌屬在利用碳氮化合物時，細胞常會有聚集現象的產生 (Bouchez-Naitali *et al.* 2001)。例如表面為疏水性的菌株 *R. erythropolis* S+14He，其在利用正十六烷的過程中，細胞會聚集形成結塊並懸浮在培養基的表面上 (Kim *et al.* 2002)。

除了細胞表面的疏水性是形成聚集現象的原因之一，細胞表面電荷對於微生

物的聚集現象也有很大的影響。因為溶液中懸浮粒子的穩定性、吸附力與凝聚力等現象都可能與其表面電荷有關，因而細胞表面電位 (zeta-potential) 的測量常被應用於膠體、生物、高分子...等研究中。在微生物利用碳氫化合物的系統中，可以將細胞與疏水性碳氫化合物視為微小的帶電粒子，並觀察兩者在不同條件下的靜電作用力，影響靜電作用力的因素可能有 pH 值、離子強度、溫度、細胞密度、油滴大小及細胞特性...等 (Wiacek 2007)。例如，Sannasi 等人篩選出一株混合菌株，其能在以酵母萃取物等營養源培養下，產生 exopolymers 或 biopolymers，使細胞表面帶有羧基、胺基、氫氧基、磷酸基及硫酸鹽...，表面呈負電，故可以吸附多種帶正電的重金屬 (Cd (II)、Cr (VI)、Cu (II)、Ni (II)、Pb (II)) 形成聚集體，並可達到移除廢水中重金屬的目的 (Sannasi *et al.* 2009)。

本實驗室過去曾測量 *R. erythropolis* NTU-1 及正十六烷在不同培養基 pH 值時，表面電位的變化。實驗發現 NTU-1 pH 由 7 降到 2 時，細胞表面的電位會由 -27 mV 上升至 -4 mV 左右，而正十六烷隨著 pH 值由 7 降至 2 時，表面電位會從 -30 mV 升到 10 mV 左右 (梁茂實 2007, Liu and Liu 2010)。這個結果代表著不同 pH 值所造成的離子強度變化會影響 NTU-1 及正十六烷表面的帶電量，而若表面帶電量絕對值變小的話，油滴與細胞之間的吸附作用會越明顯，有利於油滴與細胞間的接觸 (Gong *et al.* 2003, Ly *et al.* 2006)。文獻指出，當細胞表面電位值降低或是疏水性增加時，微生物對於碳氫化合物有較高的吸附能力並較易形成細胞聚集現象 (Bowen *et al.* 2001, Hua *et al.* 2003)。舉例來說，Malik 等學者篩選出的 *A. johnsoni* S35 菌株，其表面具有相常高的疏水性 (85%對 p-xylene) 及低表面電位 (絕對值約 5.6 mV) 因而對於許多不形成聚集的菌株有很好的共聚集效果 (Malik *et al.* 2003)。

## 2.7 微生物乾燥技術及應用

許多微生物抗乾燥脫水的能力很強，因此將微生物乾燥脫水，目的是希望能夠保存菌株，使其在長時間的貯藏後仍具有相當的活性 (Berny and Hennebert 1991)。本節中，我們將討論將微生物乾燥的技術及應用。在此介紹兩種本研究中所使用的乾燥方法：冷凍乾燥及烘乾。這兩種方法各有其優缺點及適用性，因此我們需考量每一種微生物特性及應用性來選擇最適合的乾燥方法。

### 2.7.1 冷凍乾燥 (Freeze-drying)

冷凍乾燥的原理是指將含有大量水分的物質預先置於低溫下冷凍成固體，接著在真空的環境下使冰直接昇華除去水分而達到乾燥的目的。冷凍乾燥技術除了應用在微生物的保存以外，其他在化學、食品工業、製藥工業或科學研究上都有很大用途。而其中對於含有生物活性的物質及生物藥品的應用最為普遍。

一般來說，人們使用冷凍乾燥技術的原因，主要是因為其具有以下幾點優點：

- (1) 因為是在低溫下進行，所以適合用於一些對熱特別敏感的物質，例如蛋白質、微生物，使其不易因為溫度過高而失去活性。
- (2) 低溫乾燥時，物質中揮發性成分的損失小，很適合用於一些化學產品、藥品及食品的乾燥。
- (3) 冷凍乾燥後物質的體積不變，保持原來結構，不會有濃縮的現象產生，且產品疏鬆多孔，易於溶解而回復到原來的狀態。
- (4) 真空下進行，故氧氣少，使易氧化物質得到保護。
- (5) 能將 95~99% 的水分移除，使乾燥後的產品能夠長期保存、不易變質。

然而冷凍乾燥也有以下幾點缺點：

- (1) 冷凍乾燥過程中所需時間較長，且需消耗大量的能量。
- (2) 冷凍或乾燥過程中，可能會破壞生物體細胞膜及敏感蛋白質結構。
- (3) 成本較高故適用於高單價、高品質的產品。
- (4) 貯存過程中，若沒有慎選保存的容器及存放環境，會造成產品容易吸濕、氧化、脆裂或變質的現象產生。

接下來我們主要將介紹微生物的冷凍乾燥應用，探討冷凍乾燥對微生物的傷害、保護劑的添加及凍乾後貯存的安定性。

#### 2.7.1.1 冷凍乾燥對菌株的影響

一般微生物冷凍乾燥的步驟如圖 2.7.1.1-1 所示。冷凍乾燥的過程對微生物產生的影響可分成兩個部分，即冷凍傷害及乾燥傷害 (Souzu 1999)。冷凍過程中，細胞內會有冰晶 (ice crystals) 形成且會使細胞質中殘餘部分濃度增大，引起細胞內 pH 值及離子強度改變，提高有害化學反應的產生，使蛋白質產生變性及細胞膜遭受破壞 (Bozoglu *et al.* 1987, 徐致遠等 2006)。另外，微生物冷凍的速率會與細胞存活率有關，若冷凍速率緩慢時，產生冰晶較大，易使細胞膜破裂，造成細胞死亡；快速冷凍產生的冰晶較小，故對細胞的傷害也較少。然而大的冰晶較容易升華，小冰晶則不容易，故選擇一個適當的冷凍速率也是一個需考量的因素。還有文獻指出，微生物的耐凍性與細胞膜上關鍵蛋白質性質有關，且與細胞膜上脂肪酸組成有關，高含量的不飽和脂肪酸的抗凍性較佳 (Gilliland and Speck 1969, Goldberg and Eschar 1977)。

乾燥對於微生物的傷害則是由於乾燥過程中，微生物細胞表面失水過快，易破壞水分子保護層，影響細胞上親水性的大分子，造成細胞生物活性的損害，也會產生自由基使脂質或蛋白質發生氧化反應 (Selmer Olsen *et al.* 1999)。另外，革蘭氏陽性菌 (如 *Brevibacterium flavum*、*Corynebacterium acetoacidophilum*...等) 乾燥後的存活率較革蘭氏陰性菌 (如 *Saccharomyces cerevisiae*) 來得高，主要與其細胞表面結構有關 (Rudge 1991, Pembrey *et al.* 1999)。

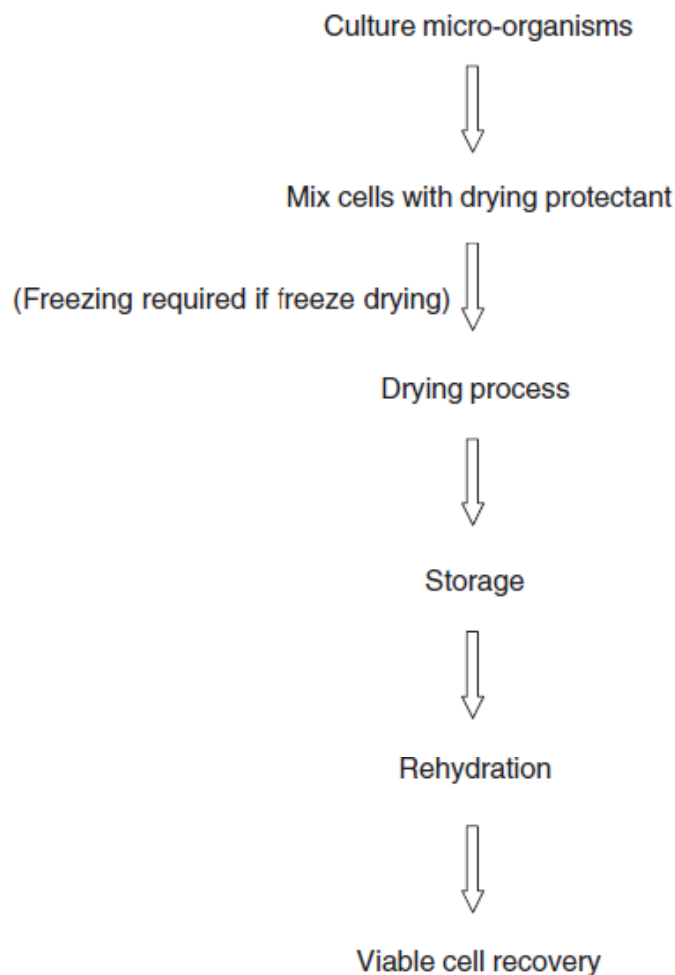


圖 2.7.1.1-1 微生物冷凍乾燥的步驟示意圖 (Morgan *et al.* 2006)。

### 2.7.1.2 冷凍乾燥時保護劑的添加

由上一小節我們知道冷凍及乾燥的步驟對於微生物可能會造成傷害，而其他影響冷凍乾燥後細胞存活率的因素還有微生物生長條件 (Palmfeldt and Hahn-Hagerdal 2000)、初始菌體濃度 (Bozoglu *et al.* 1987)、保護劑種類 (De Valdez *et al.* 1983)、復水條件 (Sinha *et al.* 1982)。其中以保護劑的種類對於微生物冷凍乾燥後的存活率影響最為顯著 (Zhao and Zhang 2005)。

許多微生物若只加入去離子水或緩衝溶液並進行冷凍乾燥，存活率大多不高，例如 *Lactobacillus brevis* 及 *Oenococcus oeni* 加入磷酸鹽緩衝溶液後進行冷凍乾燥後的存活率只有 8.7%及 7.2%，若加入 10%海藻糖為保護劑時，存活率可提高到 56.8%及 40.2%(Zhao and Zhang 2005)。因此，保護劑的添加對於微生物冷凍乾燥後存活率多寡扮演著重要的角色。保護劑的種類很多，而保護的效果也會隨著菌株的不同而有所差異 (De Valdez *et al.* 1983)。一般來說，一個好的保護劑必須有以下的特點：提供微生物在低溫冷凍及乾燥時良好的保護、無毒性、容易乾燥、凍乾後容易溶解、貯存時能維持其穩定性。表 2.7.1.2-1 為一些保護劑的選擇使微生物在冷凍乾燥及貯存的過程中能維持高存活率。

表 2.7.1.2-1 使微生物在冷凍乾燥及貯存的過程中仍可維持高存活率的保護劑選擇 (LAB: lactic acid bacteria) (Carvalho *et al.* 2004)。

Protective agents added to the drying medium that improve viability (or activity) of bacteria during drying (and subsequent storage)					
Species	Drying process	Phase of the process analysed	Drying medium	Protective compound(s)	Reference
<i>Candida sake</i>	Freeze-drying	After freeze-drying	H <sub>2</sub> O	Galactose <sup>a</sup> Raffinose <sup>a</sup> Glutamate <sup>a</sup>	(Abadias <i>et al.</i> , 2001a)
			Skim-milk	Lactose <sup>a</sup> Adonitol <sup>b</sup>	
LAB	Freeze-drying	During freeze-drying and storage	Skim-milk	Sorbitol <sup>c</sup> Monosodium glutamate <sup>c</sup>	(Carvalho <i>et al.</i> , 2003c)
LAB	Freeze-drying	After freeze-drying	H <sub>2</sub> O	Skim-milk <sup>d</sup> Trehalose <sup>b</sup>	(Castro <i>et al.</i> , 1997)
<i>Pantoea agglomerans</i>	Freeze-drying	After freeze-drying	H <sub>2</sub> O	Trehalose <sup>b</sup> Sucrose <sup>a</sup>	(Costa <i>et al.</i> , 2000)
LAB	Freeze-drying	After freeze-drying	Skim-milk	Adonitol <sup>e</sup>	(Font de Valdez <i>et al.</i> , 1983)
LAB	Air-drying	After air-drying	H <sub>2</sub> O	Sorbitol <sup>f</sup>	(Linders <i>et al.</i> , 1997a)
<i>E. coli</i> <i>B. thuringiensis</i>	Freeze-drying	After freeze-drying	H <sub>2</sub> O	Trehalose <sup>g</sup> Sucrose <sup>g</sup>	(Leslie <i>et al.</i> , 1995)

Note: Concentration of the protective compound — <sup>a</sup>10% (w/v); <sup>b</sup>5% (w/v); <sup>c</sup>1% (w/v); <sup>d</sup>11% (w/v); <sup>e</sup>2 M; <sup>f</sup>0.3 g g<sup>-1</sup> fresh cell pellet; <sup>g</sup>100 mM.

接下來將針對常見保護劑的種類及保護機制作個介紹：

#### (1) 糖類：

糖類又可分為單糖 (如葡萄糖、果糖)、雙糖 (如蔗糖、乳糖、麥芽糖、海藻糖) 及多糖類 (如聚乙二醇、麥芽糊精)。其中又以雙糖類的蔗糖及海藻糖對大部分菌株保護的效果最好 (Rudolph and Crowe 1985, Leslie *et al.* 1995, Morgan *et al.* 2006)。目前糖類的保護機制主要可分為以下兩種假說。

- ◆ 水替代假說：由於糖類表面含有大量氫氧基 (—OH)，在凍乾過程中糖類的氫氧基可與細胞膜上蛋白質中的極性基團形成氫鍵，進而代替蛋白質極性基團周圍的水分子，使蛋白質表面形成一層水化膜，可避免氫鍵連接位置曝露於環境中，穩定蛋白質的結構和功能，因而不會在冷凍及乾燥失水的情況下變性 (Leslie *et al.* 1995, 徐致遠等 2006)。此外，糖類的氫氧基也能與水分

子結合，避免細胞內外冰晶的產生 (Burke 1986)。

- ◆ 玻璃態假說：含足夠濃度的糖溶液在乾燥過程中，糖類不會形成結晶，而會形成玻璃態的糖-水混合物。此狀態下，物質兼有固體及流體的行為，黏度高，且分子擴散係數低，因而具有黏性的保護劑會包圍在蛋白質分子周圍，形成一種結構上與冰相似的碳水化合物玻璃體，可維持蛋白質的三級結構，進而達到保護作用。研究指出，單糖、雙糖、多氫氧基化合物及結構蛋白質皆能有玻璃化行為，只是玻璃轉化溫度各不相同 (Israeli *et al.* 1993)。

## (2) 多元醇：

包含甘露糖醇、山梨醇、木糖醇...等。多元醇表面具有 5 個以上的氫氧基，能與微生物表面的自由基作聯結，也可與膜上蛋白質形成氫鍵取代水，維持蛋白質的穩定性 (Morange 1970, Hanafusa 1985)。Efiuvwevwere 等學者的研究發現乳酸菌的冷凍乾燥中以甘露糖醇為保護劑的存活率較高 (Efiuvwevwere *et al.* 1999)。Carvalho 等學者則發現，山梨醇能冷凍乾燥過程中提供 *L. plantarum* 及 *L. rhamnosus* 很好的保護 (Carvalho *et al.* 2002)。

## (3) 胺基酸及蛋白質：

谷氨酸、胱氨酸、半胱氨酸、天門冬氨酸及酵母萃取物...等是胺基酸中常被用來當作保護劑的物質。胺基酸的保護機制被認為是胺基酸上的胺基 (amino group) 與菌體蛋白質上的羧基 (carboxyl groups) 能產生反應，穩定了蛋白質結構 (Morange 1970)。然而 Font de Valdez 等學者指出，半胱氨酸 (Cystene) 的保護機制主要是避免蛋白質上的硫醇基 (SH groups) 氧化 (De Valdez *et al.* 1983)。

蛋白質類的保護劑主要有脫脂奶粉，其對於微生物的保護效果已被許多研究證實 (Carvalho *et al.* 2002, Abadias *et al.* 2001)。脫脂奶粉溶於水中易形成過冷狀態的溶液，使溫度在凝固點以下時溶液中溶質濃度較小，蛋白質較不易變性，且脫脂奶粉中的乳清蛋白可在細菌表面形成蛋白膜、固定冷凍乾燥後膜上的蛋白質，

避免菌體的曝露及傷害 (Champagne *et al.* 1991)。

#### (4) 其他物質：

其他常被用來作為冷凍乾燥的保護劑還有抗壞血酸 (ascorbic acid)、谷胺酸鈉 (monosodium glutamate) (Teixeira *et al.* 1995)、谷胺酸鹽、檸檬酸、維生素 C... 等。

### 2.7.1.3 冷凍乾燥後菌株貯存之安定性

除了希望冷凍乾燥後的菌體能有高存活率以外，我們也希望在長期的存放後，微生物能仍保持其活性。最容易影響乾燥後菌體的存活率為以下幾種物質：氧氣、水氣、光、微生物污染及高溫 (Morgan *et al.* 2006)，因此乾燥後微生物包裝形式及貯存環境溫度的選擇就顯得相當重要。

#### (1) 包裝形式：

研究指出，將乾燥後的微生物存放於真空或是墮性氣體中，可讓微生物在貯存過程中維持其存活率 (Yang and Sandine 1979)。一般用來裝乾燥後菌體的容器有安瓶 (ampoules or glass vials) 及高阻隔塑膠袋 (high barrier plastic bags)，其可避免外界氣體的進入及微生物污染。貯存過程中，若有水氣及氧氣進入易使產品回溶或發生其他反應使菌體死亡 (Costa *et al.* 2002)。此外氧氣也可視為自由基，當自由基累積或擴散至細胞，易使細胞膜上脂質產生氧化反應 (membrane lipid oxidation) 且微生物無法代謝，故會對微生物造成不可逆的傷害 (Bozoglu *et al.* 1987)。

#### (2) 貯存溫度

許多文獻指出，存放溫度的高低對於乾燥後菌體的存活率扮演著一個非常關鍵的角色 (Teixeira *et al.* 1995, Abadias *et al.* 2001)。一般乾燥後菌體存放於較低溫度時，細胞狀態較穩定，可降低細胞膜上脂肪酸的氧化反應、延緩蛋白質的變性，因而存活率也會較高 (Castro *et al.* 1995)。

## 2.7.2 烘乾之原理及應用

2.7.1 節中我們介紹了冷凍乾燥的技術及應用，其很適用於特定微生物的保存。接下來我們則簡介烘乾的原理及應用。烘乾是指將物品放置溫度較高的環境下，藉由高溫熱空氣來移除掉物品中的水分，溫度越高則水分的蒸發速率與擴散速率均會增加，使樣品能快速乾燥。

一般來說，烘乾不適用於微生物的乾燥，因為除了一些能耐高溫的菌株以外，許多微生物無法在高溫的情況下生存。文獻中指出，微生物大多含有對熱較敏感的蛋白質，蛋白質為細胞膜、細胞質的重要成分之一，其在高溫下容易產生變性，使細胞膜及細胞質構造改變，生物代謝功能喪失，因而微生物無法生存 (方鴻源 1999)。且利用高溫烘乾易使產品體積縮小，質地變硬，不易溶於水中。另外，高溫的情況下也使細胞膜上的脂質溶解，造成細胞結構硬度之喪失及細胞內容物的流失。若細胞膜上飽和脂肪酸含量越高則熔點會較高，較能耐高溫；不飽和脂肪酸含量較多時熔點較低，故可耐低溫。

由此可知，烘乾方法較適合用來乾燥無生命且不易變質的物品，或是用來殺菌。本研究採用烘乾的方法來乾燥微生物，主要是因其生命活性的存在與否對於在實驗中表現出來的效果沒有太大的影響，且利用烘乾的方法來乾燥物品較冷凍乾燥的方法來得快速簡易，成本也較低。

### 第三章 實驗材料與方法

這個章節將介紹本研究中所使用的菌株來源、儀器和藥品，同時也會詳細的列出實驗的方法流程、配製藥品的條件及儀器參數的設定，以供之後實驗同學參考。

#### 3.1 實驗菌株

本實驗中所使用的菌株最早是由實驗室人員 (盧曉鳳 2000) 從桃園縣中油採集之生物污泥槽廢水，接著以異十九烷和萘馴養，篩選純化後所得到的混合菌種 (mixed culture)，將之命名為 TN-4 混合菌株。TN-4 混合菌株具有運動性且在平板培養基上菌落呈現暗黃色。經過一連串培養和挑選後發現 TN-4 混合菌株是由三種菌株組成。接著委託食品工業發展研究所進行 16SrDNA 序列分析和鑑定，得到這三種菌株最接近 *Bacillus fusiformis*、*Ochrobactrum sp.* 及 *Rhodococcus erythropolis* (本實驗室將之命名為 *Rhodococcus erythropolis* NTU-1，以下簡稱為 NTU-1)。

本實驗室在之前的實驗中指出 (張緯農 2003)，TN-4 混合菌株具有明顯包覆和降解異十九烷 (pristane) 的現象，但是若以 *Bacillus fusiformis* 及 *Ochrobactrum sp.* 這兩種菌株在以烷類為唯一碳源的條件下培養，發現這兩株菌都沒有生長的情形發生，由此可知 TN-4 混合菌株中主要能分解及包覆異十九烷的菌株為 *Rhodococcus erythropolis* NTU-1。而接下來本研究將探討 NTU-1 的細胞聚集現象對於烷類生物復育過程中的應用。

*Rhodococcus erythropolis* NTU-1 為好氧、不具運動性的革蘭氏陽性桿菌，在計數平板培養基上呈現表面光滑且顏色為淡粉紅色的菌落。若由顯微鏡觀察可看到 NTU-1 外觀呈現大小約為 2~3  $\mu\text{m}$  的桿狀細胞，且在營養液中會有互相糾結靠攏的情形，如照片 3.1-1 所示。另外，食品所鑑定報告顯示，NTU-1 的細胞壁含有 meso-DAP 與 mycolic acids，細胞中含 galactose 及 arabinose 等醣類，主要脂肪酸成分為直鏈  $\text{C}_{16:0}$  及  $\text{C}_{18:0}$  (食品工業發展研究所告)。



照片 3.1-1 顯微鏡下的 *Rhodococcus erythropolis* NTU-1

## 3.2 培養基組成與配製

### 3.2.1 液態礦物培養基

微生物培養實驗中，液態礦物培養基 (mineral salt medium, MSM) 提供微生物生長所需的養分，包含碳源、氮源、無機性養分及去離子水，表 3.2.1-1 為液態礦物培養基的配製條件及組成。

#### (1) 碳源 (carbon source)

碳源在微生物培養中主要的功能為形成細胞之碳水化合物、脂質、蛋白質或是成為代謝產物。本實驗中所使用碳源以正十六烷 (*n*-hexadecane) 為主，NTU-1 能夠在降解代謝正十六烷的過程中產生聚集現象，可加速烷類的移除。

#### (2) 氮源 (nitrogen source)

氮源也是微生物生長的必要營養源之一，其主要功能除了成為代謝產物以外，還有形成細胞之蛋白質及核酸。氮源又分為有機氮化物或無機氮化物，本實驗採用無機氮化物中的硫酸銨  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  來作為微生物生長所需氮源。

#### (3) 無機性養分

無機性養分包含了硫、磷、鉀、鎂、鈣、鐵、鈉、氯...等元素，是除了碳源、氮源及水分以外讓微生物生長及作為酵素輔助因子的重要成分。實驗中使用了氯化鈉 (NaCl)、硫酸鎂 ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) 及磷酸二氫鉀 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) 作為無機性養分來源。其中，NaCl 還能調節培養基的滲透壓，供細胞良好的生長環境。 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  除了提供細胞生長所需磷、鉀來源外，也能提供礦物培養基酸鹼值的緩衝能力，避免微生物降解碳氮化合物時產生的代謝物造成酸鹼值劇烈變化而影響微生物

的生長。

除了以上介紹的幾種無機性養分以外，實驗中也添加了微量元素，它們能作為酵素的輔助因子，雖然所需的量很少，但也不能缺乏。加入的三種微量元素分別為硫酸鐵 ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )、氯化錳 ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 及硫酸鋅 ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )，其配製組成如表 3.2.1-2 所示。

液態礦物培養基配置方法依序如下：

- (1) 秤取表 3.2-1 所列之化合物加入 1 L 的去離子水中，並加入表 3.2-2 所配制好的 Trace salt 溶液 1 mL，均勻攪拌溶解。
- (2) 使用濃度為 1 N 的鹽酸溶液 (HCl) 或氫氧化鈉溶液 (NaOH) 調整培養基至實驗條件所需酸鹼值。
- (3) 以量筒量取 100 mL 液態礦物培養基分別倒入 250 mL 的錐形瓶中，加入透氣篩後置入高壓滅菌釜中，以  $121^\circ\text{C}$ 、15 psi 的條件進行滅菌 20 分鐘。
- (4) 待其冷卻降溫後，置入無菌操作台再依不同實驗條件進行下一步的操作。



表 3.2.1-1 液態礦物培養基組成表

NaCl	1.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0 g
Trace salt solution	1.0 mL
Deionized water	1 L

表 3.2.1-2 Trace Salt Solution 組成表

FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.0 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.0 g
Deionized water	1 L

### 3.2.2 菌株保存培養基

本實驗以異十九烷作為固態菌株保存培養基的碳源，以維持 NTU-1 分解碳氫化合物的能力。異十九烷固態保存培養基的組成如表 3.2.2-1 所示，配製方法如下：

- (1) 將表 3.2.2-1 中所示的化合物加入去離子水後，均勻攪拌使其溶解。
- (2) 使用濃度為 1 N 的鹽酸溶液 (HCl) 或氫氧化鈉溶液 (NaOH) 調整培養基酸鹼值至 7，置入滅菌釜中滅菌 20 分鐘。
- (3) 取出放入無菌操作台並加入異十九烷，搖晃使其分布均勻並分裝至 8 cm 的培養皿中。
- (4) 待其冷卻並靜置約 2 小時後除去多餘霧氣水分，以 parafilm 密封，並置於 30 °C 烘箱中保存。



表 3.2.2-1 菌株保存培養基組成表

Pristane	750 $\mu$ L
Agar powder	24.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.0 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0 g
NaCl	1.0 g
Trace salt solution	1.0 mL
Distilled water	1 L

### 3.2.3 菌株活化培養基

本實驗利用 Nutrient Broth (簡稱 NB, 成分比例為 62.5% peptone 與 37.5% beef extract) 營養液作為活化菌株的液態培養基。其配置方法依序為：

- (1) 1 L 的去離子水中加入 8 g 的 NB 粉末，均勻攪拌使其溶解。
- (2) 量取 100 mL NB 菌株活化培養基，分別倒入 250 mL 的錐形瓶，置入高壓滅菌釜中進行滅菌 20 分鐘。
- (3) 待其冷卻降溫後，置入無菌操作台進行實驗操作。

### 3.2.4 計數平板培養基

本實驗使用的計數平板培養基成分為 Nutrient Agar (簡稱為 NA)，配製條件如下：

- (1) 於每 1 L 去離子水中加入 20 g 的 NA 粉末，攪拌溶解後置入滅菌釜以 121°C、15 psi 進行滅菌 20 分鐘。
- (2) 取出置入無菌操作台，待其溫度降至 40~50°C (NA 溶液熔點約為 35°C) 後，分裝至 8 cm 的培養皿中。
- (3) 靜置約 2 小時冷卻並除去多餘霧氣水分，以 parafilm 密封。
- (4) 接著將其放入 30°C 烘箱中，經過 2 天後若沒有長出其他微生物的菌落，代表沒有被污染，即可保存或使用。



### 3.3 實驗方法

#### 3.3.1 菌株的活化及生長曲線

- (1) 取出存放於 4℃ 冰箱中的固態菌株保存培養基放入無菌操作台，利用以酒精燈消毒的白金接種環取出固態培養基上的 NTU-1 菌落，接種至 3.2.3 節中配置好的 NB 營養液中。
- (2) 將接種好的 NB 營養液瓶口以酒精燈消毒，並以 parafilm 密封，置放於 30℃ 迴旋式恆溫培養箱下培養，轉速為 100 rpm。
- (3) 開始培養後，每 1 個小時取出 2 mL 測量 OD<sub>600</sub> 值，以無菌的 NB 培養液作為對照組，將測得的 OD<sub>600</sub> 值相減後對培養時間作圖，即可得到 NTU-1 的生長曲線，如圖 3.3.1-1 所示。

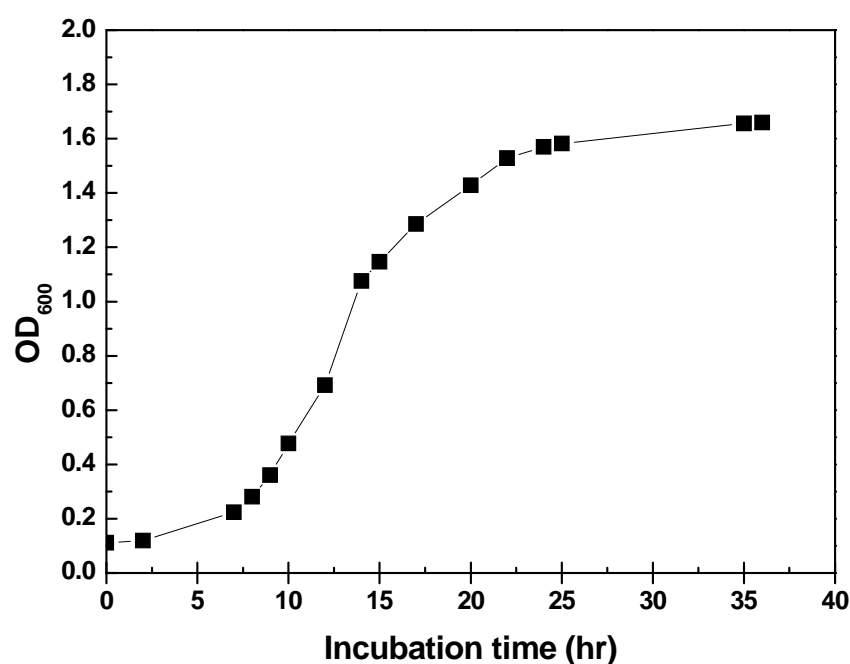


圖 3.3.1-1 NTU-1 菌株在 Nutrient Broth (NB) 營養液中的生長曲線。

### 3.3.2 礦物培養基菌液製作

#### 礦物培養基菌液

- (1) 步驟同 3.3.1 節所示，以白金接種環取出菌株保存培養基上的 NTU-1 菌落，接種至 NB 營養液中，在 30°C、100 rpm 的條件下進行活化培養。經過 18~20 小時，菌株生長至穩定期初期後停止培養。
- (2) 將活化菌株後的 NB 培養液以 15°C、4800 rpm 的條件下離心 15 分鐘，之後在無菌操作台內移除離心後的上清液。
- (3) 此時再加入相同體積無菌 MSM 礦物培養基 (如 3.2.1 節中配置)，充分搖晃使底部細胞再次懸浮並達到清洗的目的。接著以同樣條件離心 15 分鐘，離心完成後於無菌的環境下移除上層礦物培養基。
- (4) 最後在濃縮的 NTU-1 細胞中加入適量的無菌礦物培養基，充分搖晃使其均勻懸浮，測量 OD<sub>600</sub> 吸收值，將 OD<sub>600</sub> 值控制在 1 左右即完成 NTU-1 液態礦物培養基菌液。本研究中即以此作為正十六烷生物復育實驗中的植菌來源。

#### 細胞生菌數之測定

- (1) 取上一部分製作完成的 NTU-1 液態礦物培養基菌液 (OD<sub>600</sub> 值約為 1)，以無菌礦物培養基進行連續稀釋，將濃度稀釋為原本濃度的  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ ... $10^{-7}$  至所需倍率，通常為  $10^{-5}$ ~ $10^{-7}$  倍。
- (2) 分別取出 50  $\mu$ L 稀釋液，以無菌玻璃勾環均勻塗抹在 NA 計數平板培養基上 (配置方法如 3.2.4 節)，接著利用 parafilm 將其密封。使用後的玻璃勾環以酒精潤洗後再用酒精燈殺菌，以供下一次塗菌用。

- (3) 將密封的 NA 計數平板培養基置放於 30°C 培養箱中，2 天後觀察計算生長的菌落數。經由換算可知此 OD<sub>600</sub> 值下每 1 mL 菌液中下有多少活菌。
- (4) 生菌數的計數單位為 CFU (colony-forming units)，是假設一個活菌只會生成一顆菌落的情況，通常計數平板培養基中的菌落數控制在 30~200 的範圍內較準確。
- (5) 上述方法也可測得不同 OD<sub>600</sub> 值菌液所對照的生菌數。
- (6) 長出菌落的計數平板培養基可存放於 4°C 冰箱中，以供之後活化菌株使用。

### 3.3.3 正十六烷之生物降解與生物復育實驗

#### 正十六烷生物復育實驗的流程與各項測定

- (1) 將 3.2.1 節中配置好的液態礦物培養基 (pH=7) 取 100 mL 倒入 250 mL 錐形瓶，此時錐形瓶中依照不同實驗條件可能置入不同孔徑大小及不同折角的篩網。
- (2) 接著置入滅菌釜以 121°C、15 psi 的條件下滅菌 20 分鐘。待其冷卻並噴灑 75% 酒精後置入無菌操作台，滅菌後的液態礦物培養基 pH 值會降至 6.8。
- (3) 以酒精燈將錐形瓶口殺菌後，依照實驗條件以微量滴管加入 200 µL 的正十六烷及 5 mL 的 NTU-1 液態礦物培養基菌液，此時初始 NTU-1 細胞量 OD<sub>600</sub> 值約為 0.05 (初始細胞密度約 0.035g/L)。
- (4) 完成植菌動作後同樣以酒精燈將瓶口殺菌，並以 parafilm 封住瓶口。接著依不同實驗條件將培養錐形瓶放入往復式恆溫震盪水槽或是迴旋式恆溫培養箱中，以溫度 30°C、轉速 100 rpm 的條件進行培養。

- (5) 實驗進行至 20、32、44、56 及 68 小時後，取出幾瓶錐形瓶停止培養，拍照記錄細胞生長外觀的變化，並進行培養基酸鹼值的測量。
- (6) 若培養過程中 NTU-1 產生細胞聚集現象，則利用 60 mesh 的濾網 (孔徑大小：0.246 mm) 進行菌塊與培養基液體的分離，並量測培養基液體的 pH 值。分離後的菌塊以去離子水加入至初始反應體積 100 mL。
- (7) 完成分離及 pH 值量測後，每組錐形瓶中加入 30 mL 的乙酸乙酯進行殘餘培養基或細胞顆粒內包覆正十六烷的萃取，同時也加入 100  $\mu$ L 的正十二烷作為 GC 氣相層析儀量測的內標準品。
- (8) 接著用不透氣矽膠塞將瓶口塞住並以 parafilm 密封後，均勻的搖晃以混合水相及有機相，接著放入 30°C 的培養箱中靜置萃取，約 2 個小時後取出上層有機相溶液 2 mL 加入微量試管中保存。若沒有要馬上利用 GC 量測的話，可存放至 -20°C 冰箱中，以避免有機相揮發過快造成日後量測上的誤差。
- (9) 萃取且完成保存有機相溶液的步驟後，利用烘乾後的濾紙 (ADVANTEC GF-75, 厚度：0.35 mm, 孔徑大小：0.3  $\mu$ m) 進行抽氣過濾，使細胞留在濾紙上，過濾完成後將濾紙放入 80°C 烘箱中約 24 小時，待其乾燥後取出置放於室溫下 1 小時回溫並秤重，測得的重量再減去初始濾紙重則可得到 NTU-1 細胞乾重，並可換算成細胞密度。
- (10) 步驟 (8) 中保存於微量試管的萃取液以微量注射針取出 2  $\mu$ L，利用氣相層析儀 (GC) 分析正十六烷的含量。將積分軟體所顯示的波峰面積對照校正曲線，經過換算可得不同培養時間及實驗條件下的培養基殘餘及 NTU-1 細菌結塊中正十六烷的量。

### 正十六烷校正曲線

- (1) 利用微量滴管取 50、100、150、200  $\mu\text{L}$  的正十六烷 (*n*-hexadecane) 各加入含 100 mL 礦物培養基的錐形瓶中，同時各加入 100  $\mu\text{L}$  的正十二烷 (*n*-dodecane) 作為內標準品。
- (2) 取 30 mL 的乙酸乙酯 (ethyl acetate) 分別倒入錐形瓶中，並以矽膠塞密封。均勻搖晃後置放於  $30^{\circ}\text{C}$  下進行萃取，2 小時後取出上層有機液約 2 mL 存放於微量試管中。
- (3) 以微量注射針取出 2  $\mu\text{L}$  溶液並以氣相層析儀進行分析正十六烷的含量，將積分面積與濃度作圖可即可得到正十六烷的校正曲線，如圖 3.3.3-1。

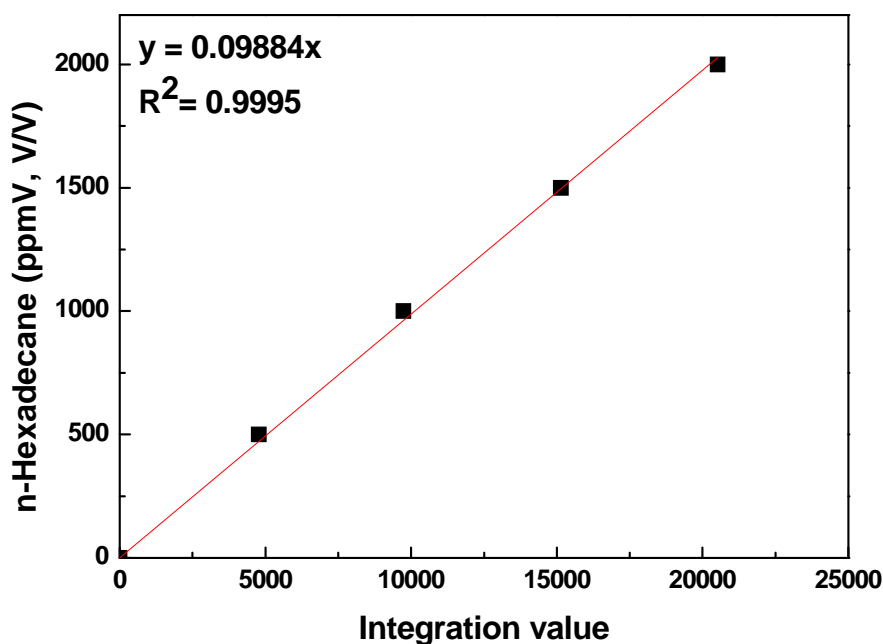


圖 3.3.3-1 正十六烷在氣相層析儀中之校正曲線

### 氣相層析儀之條件設定

- ◆ 型號：Perkin Elmer Autosystem
- ◆ 管柱：填充物材質 fused silica capillary column、管長 30 m、內直徑 0.53 mm、填充物膜厚 0.25  $\mu\text{m}$ 。
- ◆ 偵測器：FID
- ◆ 氣體流量：空氣 450 mL/min、氬氣 45 mL/min
- ◆ 載運氣體 (carrier gas)：氮氣 5 mL/min
- ◆ 爐溫 (oven temperature) 變化：起始溫度 80°C，停留 2 分鐘後以 40°C/min 的速率升溫至 280°C 後停留 2 分鐘。
- ◆ 注入器溫度 (injector)：250°C
- ◆ 偵測器溫度 (detector)：300°C
- ◆ 積分軟體：ABDC Chrommanager Multisystem 層析總管，立行科技有限公司



### 3.3.4 以 NB 培養的 NTU-1 進行冷凍乾燥及其存活率測試

- (1) 以下每項操作步驟皆在無菌的條件下進行。將菌株保存培養基上的 NTU-1 菌落以白金接種環取下並放入 0.8 % (w/v) NB 營養液中。接著置放於 30°C、100 rpm 迴旋式恆溫培養箱中進行活化培養。
- (2) 經過 20 小時後停止培養，此時為 NTU-1 生長期的穩定期初期。接著利用冷凍離心機，以 15°C、4800 rpm 的條件下進行離心 15 分鐘。離心完成後分離上清液並加入同體積的無菌去離子水進行清洗。
- (3) 接著以同樣的條件進行離心 15 分鐘。離心完成後，分離上層去離子水而得到下層濃縮的 NTU-1 細胞。

- (4) 將配置好不同濃度的無菌保護劑溶液加入濃縮的 NTU-1 細胞，以加入去離子水的組別作為對照組，均勻搖晃讓在底部的 NTU-1 懸浮於溶液後靜置 10 分鐘，靜置 10 分鐘的目的是使細胞重新適應環境。另外，若保護劑為糖類的話，可利用 0.22  $\mu\text{m}$  孔徑的濾膜來除菌。
- (5) 測量含保護劑 NTU-1 溶液的 OD<sub>600</sub> 值，並將其值控制在 2 左右。接下來以 3.3.2 節中所介紹的計數平板培養基來測量初始的 NTU-1 活菌數（約在  $0.54 \sim 1.49 \times 10^9$  CFU/mL 的範圍內）。
- (6) 接著將含保護劑 NTU-1 溶液以微量吸管吸取 5 mL 放入真空玻璃瓶（總體積 10 mL），並置入  $-20^\circ\text{C}$  的冰箱中冷凍 24 小時。
- (7) 經過 24 小時後，將其取出並放入真空冷凍乾燥機中進行真空乾燥 24 小時。  
真空冷凍乾燥機設定條件：溫度  $-50^\circ\text{C}$  以下、壓力小於 100 mTorr。
- (8) 冷凍乾燥步驟完成後，於真空的環境將真空瓶密封，使乾燥的 NTU-1 處於真空的環境下。接著依不同實驗條件存放於  $-20^\circ\text{C}$ 、 $4^\circ\text{C}$ 、 $30^\circ\text{C}$  下 0、10、30 天。
- (9) 經過不同實驗條件下的存放後，取出含乾燥 NTU-1 的真空瓶並放入無菌操作台內。接著進行復水的動作，加入液態礦物培養基 (MSM) 至其初始體積 5 mL，復水完成後置放於  $30^\circ\text{C}$ 、100 rpm 的迴旋式培養箱中搖晃 10 分鐘，搖晃 10 分鐘的目的是為了讓 NTU-1 恢復活性，且不會因為搖晃時間太長而使 NTU-1 開始繁殖影響實驗結果。
- (10) 搖晃 10 分鐘後，同樣利用 3.3.2 節中所介紹的計數平板培養基計算活菌數的方法來測量復水後 NTU-1 的生菌數。乾燥後 NTU-1 的存活率計算式子如下：

$$\text{NTU-1 存活率 (\%)} = \frac{\text{乾燥 NTU-1 復水後的濃度 } \left(\frac{\text{CFU}}{\text{mL}}\right)}{\text{乾燥前初始 NTU-1 濃度 } \left(\frac{\text{CFU}}{\text{mL}}\right)} \times 100$$

### 3.3.5 以正十六烷培養的 NTU-1 細菌結塊進行冷凍乾燥

不同於 3.3.4 節中以 NB 培養的 NTU-1 是以自由的細胞狀態 (free cells) 均勻的存在於溶液中。這一節所使用的 NTU-1 是利用正十六烷培養後所呈現細胞聚集體 (cell aggregates or bioflocules) 的狀態來進行冷凍乾燥。

- (1) 同 3.3.3 節中所介紹的正十六烷生物復育實驗步驟 (1)~(4)，NTU-1 以 2000 ppmv 的正十六烷培養 3 天，此時 NTU-1 已形成細胞聚集體並將大量正十六烷包覆於其中。
- (2) 利用 14 mesh 篩網 (1.18 mm) 將 NTU-1 菌塊與培養基分離，並將 NTU-1 菌塊放入 10 mL 的真空瓶中，接著依不同實驗條件加入不同濃度及成份的無菌保護劑溶液。每 10 mL 的真空瓶中約加入 2~3 瓶反應錐形瓶產生的 NTU-1 菌塊，並各加入 5 mL 的保護劑溶液，使 NTU-1 菌塊重量與保護劑的重量比值約為 0.1 左右 (詳細原因如 4.3.2 (1) 部分所示)。
- (3) 將保護劑與 NTU-1 菌塊劇烈搖晃使結塊分散並均勻混合後放入 -20°C 冰箱中冷凍 24 小時。
- (4) 經過 24 小時後，將其取出並放入真空冷凍乾燥機中進行真空乾燥 24 小時。  
真空冷凍乾燥機設定條件：溫度 -50°C 以下、壓力小於 100 mTorr。
- (5) 冷凍乾燥步驟完成後，於真空的環境將真空瓶密封，使乾燥的 NTU-1 處於真空的環境下。接者依不同實驗條件存放於 -20、4、30°C 下 0、10、30 天。
- (6) 冷凍乾燥後的 NTU-1 菌塊能作為正十六烷生物復育的植菌來源，詳細步驟參照 3.3.7 節。

### 3.3.6 烘乾以正十六烷培養的 NTU-1 細菌結塊

- (1) 同 3.3.3 節中所介紹的正十六烷生物復育實驗步驟 (1)~(4)，NTU-1 以 2000 ppmv 的正十六烷培養 3 天，此時 NTU-1 已形成細胞聚集體並將大量正十六烷包覆於其中。
- (2) 利用 14 mesh 篩網 (1.18 mm) 將 NTU-1 菌塊與培養基分離，將 NTU-1 菌塊平鋪於直徑 7 公分的鋁箔紙盤上，置入烘箱中進行烘乾。
- (3) 烘乾的溫度測試了 60、80、100、120、160℃，烘乾所需時間分別為 48、15、6、2、0.5 小時。不同溫度所需乾燥時間不同，對於乾燥後 NTU-1 結塊的表現也會有影響。
- (4) 烘乾後的 NTU-1 菌塊以勺子刮取下來，放入小血清瓶後置於 30℃ 培養箱中進行保存。
- (5) 烘乾後的 NTU-1 菌塊能作為正十六烷生物復育的植菌來源，詳細步驟參照 3.3.7 節。



### 3.3.7 乾燥後 NTU-1 細菌結塊對於正十六烷的包覆與移除

此部分實驗流程大致與 3.3.3 節中正十六烷生物復育實驗相同，主要不同地方在於將 3.3.3 節中的植菌來源由液態礦物培養基菌液轉換成冷凍乾燥或烘乾後的 NTU-1 結塊。

- (1) 將 3.2.1 節中配置好的液態礦物培養基 ( $\text{pH} = 7$ ) 取 100 mL 倒入 250 mL 錐形瓶，接著放入滅菌釜以  $121^{\circ}\text{C}$ 、15 psi 的條件下滅菌 20 分鐘。待其冷卻並噴灑 75% 酒精後置入無菌操作台，高溫滅菌後的液態礦物培養基 pH 值會降至 6.8。
- (2) 依照不同實驗目的，以微量滴管添加不同體積的正十六烷至礦物培養基中。接著依實驗條件加入不同重量的乾燥 NTU-1 結塊（乾燥 NTU-1 結塊的製備如 3.3.5 及 3.3.6 節所示）。完成植菌動作後，將培養錐形瓶置入往復式恆溫震盪水槽，以溫度  $30^{\circ}\text{C}$ 、轉速 100 rpm 的條件進行培養。
- (3) 實驗進行至 12、24、36 及 48 小時後，取出幾瓶錐形瓶停止培養，拍照記錄細胞生長外觀的變化。
- (4) 若培養過程中 NTU-1 產生細胞聚集現象，則利用 60 mesh 的濾網（孔徑大小：0.246 mm）進行菌塊與培養基液體的分離，並量測培養基液體的 pH 值。分離後的菌塊以去離子水加入至初始反應體積 100 mL。
- (5) 接下來步驟如同 3.3.3 (7)~(10)。

### 3.3.8 不同條件乾燥下 NTU-1 細菌結塊之細胞表面疏水性測定

本研究中用來測試細胞表面疏水性的方法為參考 Rosenberg 等學者於 1980 年提出的 MATH (microbial adhesion to hydrocarbons)，此為目前最常被使用，操作也最簡易的方法之一 (Rosenberg *et al.* 1991)。許多文獻利用此法來測量不同微生物的細胞表面疏水性，雖然作法會隨著實驗有所修改，但主要皆是利用波長 600 nm 下的吸光值 (OD<sub>600</sub>) 來作為疏水性的指標，詳細實驗流程如下：

- (1) 取出由 3.3.5 及 3.3.6 節中所得不同處理方法的乾燥 NTU-1 結塊細胞，並利用 MSM 礦物培養基進行清洗兩次，以移除添加的保護劑或隨著結塊而乾燥的代謝物。
- (2) 將不同處理方法的乾燥 NTU-1 細胞 (冷凍乾燥或烘乾後的 NTU-1 菌塊) 以 MSM 稀釋，使初始 OD<sub>600</sub> 值 (OD<sub>i</sub>) 控制在 0.5~0.8 左右。
- (3) 取 2 mL 稀釋後的 NTU-1 菌液放入塑膠比色管 (cuvette)，接著加入 0.5 mL 的正十六烷。
- (4) 利用試管振盪器劇烈搖晃 1 分鐘後，靜置於 30℃ 的環境下，每十分鐘測量一次 OD<sub>600</sub> 值 (OD<sub>a</sub>)。
- (5) 所測得的 OD<sub>600</sub> 值 (OD<sub>a</sub>) 與初始 OD<sub>600</sub> 值 (OD<sub>i</sub>) 可經由計算而得吸收百分比。本實驗所定義之吸附百分比 Percentage of adhesion (%) =  $\frac{OD_i - OD_a}{OD_i} \times 100$
- (6) 接著以吸附百分比與時間作圖可以得到細胞表面疏水性隨著時間的變化。

### 3.4 實驗藥品與器材

#### 3.4.1 實驗藥品

本研究中所使用的實驗藥品皆為分析級 (analytical grade, 99% + or 98% purity)。

- ◆ 異十九烷 Pristane (Sigma-Aldrich, USA)
- ◆ 正十六烷 *n*-Hexadecane (Sigma-Aldrich, USA)
- ◆ 正十二烷 *n*-Dodecane (Sigma-Aldrich, USA)
- ◆ 硫酸銨 Ammonium sulfate,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (J. T. Baker, USA)
- ◆ 氯化鈉 Sodium chloride, NaCl (富田製藥株式會社, Japan)
- ◆ 磷酸氫二鉀 Di-potassium phosphate,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Merck, Germany)
- ◆ 硫酸鎂 Magnesium sulfate,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, USA)
- ◆ 硫酸亞鐵 Iron (II) sulfate,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Riedel-de Haen, Germany)
- ◆ 氯化亞錳 Manganese (II) chloride,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Riedel-de Haen, Germany)
- ◆ 硫酸鋅 Zinc sulfate,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Riedel-de Haen, Germany)
- ◆ 蘇丹紅 Sudan I (Acros, U.S.A)
- ◆ 醋酸乙酯 Ethyl acetate,  $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$  (HPLC, R.D.H, U.S.A)
- ◆ 瓊脂粉 Agar powder (昭和化學株式會社, Japan)
- ◆ 營養瓊脂 Nutrient agar (Merck, Germany)
- ◆ 營養肉湯 Nutrient broth (DIFCO, France)
- ◆ 麥芽糖 Maltose (Merck, Germany)
- ◆ 乳糖 Lactose (DIFCO LABORATORIES, USA)
- ◆ 甘露糖醇 D-Mannitol (Sigma-Aldrich, USA)

### 3.4.2 實驗儀器

- ◆ 無菌操作台 (海天)
- ◆ 滅菌釜 (Tomin)
- ◆ 電子微量天平 (ATX-224, SHIMADZU)
- ◆ 微量吸管 (Gilson 0-1000 $\mu$ L)
- ◆ 酸鹼測定儀 (HANNA instrument)
- ◆ 玻璃電極 (LE409, METTLER TOLEDO)
- ◆ 磁力攪拌器 (CORNING)
- ◆ 分光光度計 (Spectronic Genesys 20 spectrophotometer)
- ◆ 往復式恆溫震盪水槽 (東達)
- ◆ 迴旋式恆溫培養箱 (LM-600R, YIH DER)
- ◆ 冷凍離心機 (GS-15R Centrifuge, Beckman)
- ◆ 烘箱 Circulator Oven (宇田企業有限公司)
- ◆ 玻璃纖維濾紙 (ADVANTEC GF-75)
- ◆ 抽氣過濾機 Aspirator (AS-3, NEWLAB Instrument)
- ◆ 試管振盪器 Mixer (UZUSIO VTX-3000L, LMS)
- ◆ 微量注射針 Syringe (10F-GT, SGE Analytical Science)
- ◆ GC 氣相層析儀 (Perkin Elmer Autosystem)
- ◆ 冷凍真空乾燥機 (金鳴實業)
- ◆ 超音波震碎儀 Sonicator (XL2020, HEAT SYSTEMS)
- ◆ 光學顯微鏡 (Nikon)

## 第四章 實驗結果與討論

石油碳氫化合物廣泛的被利用在人們的生活中，但由於過度不當的使用，對人類環境造成的污染也日益嚴重，因而有許多處理此污染問題的方法產生。其中，利用微生物來進行石油碳氫化合物的生物復育是一項成本低且易操作的方法。

根據之前的研究，NTU-1 在利用長碳鏈烷類（異十九烷、正十八烷、正十六烷、正十四烷...）培養時，除了對長碳鏈烷類有很好的降解能力外，還會在第 40 個小時左右產生 0.1~2 公分的細菌結塊，把未降解的烷類包覆起來，故能同時利用生物降解及物理撈除的方式在短時間內把烷類移除（張緯農 2009）。

而目前實驗室研究出提早 NTU-1 形成結塊使正十六烷移除效率提升的方法包含了在培養基中加入 NB (Nutrient Broth)、福馬酸或是於反應器中通入氣體加速 NTU-1 的生長，因此結塊形成的時間提前了 12~24 小時，在約 24~32 小時間即能移除大量的烷類（梁茂實 2007, 劉志文 2007）。

本實驗為延續實驗室人員的研究，探討如何提升及應用 NTU-1 所形成之細胞聚集體，使長碳鏈烷類能在短時間內快速移除。主要分成以下幾個部分：

- (1) 比較正十六烷生物復育的過程中，往復式及迴旋式培養下正十六烷的移除效果，並在迴旋式培養下的反應錐形瓶中加入篩網來改善細菌與正十六烷的接觸形式及正十六烷的分布，進而加速正十六烷的移除。
- (2) 探討以 NB (Nutrient Broth) 培養的 NTU-1 在冷凍乾燥時加入不同的保護劑、存放於不同的溫度及時間下，NTU-1 的存活率及生理特性是否受到影響。
- (3) 了解以 NB 培養的 NTU-1 冷凍乾燥後的存活率及降解包覆能力後，進而探討利用正十六烷培養產生的 NTU-1 菌塊經過冷凍乾燥後的存活率及其對於正十六烷的移除效果。
- (4) 利用烘乾的方式來乾燥以正十六烷培養的 NTU-1 菌塊，探討烘乾後的 NTU-1 菌塊對於正十六烷的包覆移除效果。

## 4.1 不同搖晃培養對於 NTU-1 生物降解及包覆正十六烷能力的影響及改進方法

不同的培養搖晃方式代表著細菌與碳源的接觸及氣體質傳形式的不同，故細菌生長的狀態也會有所差異。本實驗使用的菌株 *R. erythropolis* NTU-1，經由實驗室人員的研究指出，NTU-1 在進行正十六烷生物復育時，隨著時間的增加，NTU-1 會直接接觸正十六烷並利用降解，細胞表面的疏水性會隨著培養時間而增強，接著開始形成由細胞與油滴組成的白色棉絮狀聚集體，這些小聚集體再以正十六烷作為連結，同時以疏水性作用力堆疊成更大的細胞顆粒，且包覆殘餘的正十六烷而達到很好的移除效率，此即所謂的 NTU-1 細胞聚集現象 (張緯農 2009)。

但實驗發現當 NTU-1 與正十六烷間碰撞的方式或是接觸形式不同時，細菌形成結塊的能力及形態也會被影響。故這個部分的實驗主要在探討利用往復及迴旋這兩種搖晃培養方式時，NTU-1 降解及包覆正十六烷的效果是否會有所不同，接著改進迴旋式培養方式下錐形瓶中的構造，以提高 NTU-1 聚集形成結塊包覆正十六烷的能力，同時配合物理撈除的方式移除大量的烷類。

### 4.1.1 比較往復式及迴旋式培養下 NUT-1 對正十六烷生物復育的效果

本實驗中皆以正十六烷為主要培養碳源，主要是因為微生物常以末端氧化的方式將碳源分解成分子量較低的化合物，而正十六烷的分子結構較單純，故常被使用來當作生物降解實驗的主要碳源。

實驗條件如下：

- 培養基 pH 值：7 → 6.8 (滅菌後)

- 培養基正十六烷濃度：2000 ppmv
- 培養基體積：100 mL
- 培養溫度：30℃
- 培養形式：往復式恆溫震盪水槽、迴旋式恆溫培養箱
- 培養轉速：100 rpm
- 初始植菌量：5 mL 礦物培養基菌液 ( $OD_{600} \doteq 1$ )
- 分析時間點：20、32、44、56、68 hr

為了了解 NTU-1 在生物降解過程中的行為及特性，以下分別討論培養過程中培養基酸鹼值變化、NTU-1 的生長趨勢、正十六烷的生物降解量及形成細胞聚集體後所包覆正十六烷的量。以圖 4.1.1-1~4 表示。

圖 4.1.1-1 為 NTU-1 在不同搖晃培養方式下利用正十六烷的酸鹼值變化。許多文獻指出 (Britton 1984, Van Hamme *et al.* 2003, Wentzel *et al.* 2007)，微生物在利用烷類的過程中會先把烷類氧化成有機酸及脂肪酸，接著藉由  $\beta$ -氧化而形成更短鏈的有機酸或脂肪酸。故由酸鹼值變化的圖可以看出，NTU-1 在不同搖晃的培養方式下，正十六烷逐漸的被 NTU-1 利用分解而形成有機酸，而有機酸會釋放出氫離子使得培養基中的 pH 值下降。

而實驗結果顯示，不同旋轉培養方式下所造成的培養基中酸鹼值變化的差異並不明顯，整個生物降解過程中均會由 pH 6.8 下降至 pH 4~5 左右。其中往復式培養的實驗組別，NTU-1 在第 44 小時形成細菌結塊以後達生長平緩期 (stationary phase)，因而 pH 值在 44 小時後呈現持平的趨勢，大約維持在 pH 4.5 左右。反觀迴旋式培養 NTU-1 經過約 56 小時才形成結塊進入生長平緩期，另外也可能此時培養基 pH 值已降到 4 左右，不利微生物繼續生長故培養基酸鹼值開始呈現持平的趨勢。文獻指出，*Rhodococcus* 菌屬對於環境酸鹼值的最高忍受力約為 pH 4 右，若低於此數值則會導致微生物死亡，這也是為什麼培養基酸鹼值在實驗過程中若降到 4 左右時，其變化就不會再有很大幅的變動 (Benoit *et al.*

2000)。

由圖 4.1.1-2 NTU-1 的生長曲線上可以看出利用迴旋式培養的細胞生長量比往復式培養來得高一些，但差異並不大。往復式培養的組別中，NTU-1 在 44 小時形成結塊後生長速率變得較緩慢，細胞密度在第 68 小時約有 0.267 g/L 左右。而迴旋式培養中細菌則是在 56 小時形成細菌結塊後開始趨緩，在 56 小時約維持在 0.28 g/L 左右。

根據文獻指出，影響微生物聚集現象的產生的因素除了碳源種類、溫度、細胞表面疏水性及細胞表面電位...以外 (Busch and Stumm 1968, Bossier and Verstraete 1996)，微生物的生長階段也是造成微生物聚集現象發生的原因之一 (Bowen *et al.* 2001)，因此由實驗結果可以知道 NTU-1 形成結塊將正十六烷包覆主要發生在細胞生長平緩期的前後，但其他影響因子如環境酸鹼值的變化及細胞表面疏水性增強都可能促使結塊現象的產生。

接下來探討的是在不同搖晃培養方式下的正十六烷生物降解量、包覆量及總移除量。在進行此項結果討論時，我們必須對烷類的計算方式作一些定義，以便清楚呈現實驗的現象及結果。

- 總移除量 = 正十六烷生物降解量 + 正十六烷被 NTU-1 包覆的量
- 生物降解量：代表正十六烷直接被微生物的生理機制如分解、氧化或代謝掉的量。
- 包覆量：指利用 NTU-1 降解正十六烷時，常伴隨著形成細胞聚集體而把大量正十六烷包覆在結塊內，結塊內正十六烷的量即所謂包覆量。
- 正十六烷殘餘量 = 正十六烷的初始添加量 - 總移除量

圖 4.1.1-3 為 NTU-1 在不同搖晃培養方式下的正十六烷生物降解曲線，而圖 4.1.1-4 將正十六烷的生物降解量及包覆量匯集成一張圖 ((A) 往復式培養、(B) 迴旋式培養)。由圖 4.1.1-3 結果顯示無論以何種搖晃方式來進行培養，正十六烷

的生物降解量會隨著時間增加而增加，由於往復式搖晃下的實驗組別在第 32 至 44 小時間即有細菌結塊的產生，故 44 小時後正十六烷的降解量開始變的較緩慢，但仍持續進行，到第 68 小時約可以降解掉約 600 ppmv，未被分解的正十六烷則會被包覆在 NTU-1 結塊顆粒中。另外，迴旋式培養中的細菌結塊在 44~56 小時產生，68 小時後約可降解掉 680 ppmv 的正十六烷。

而圖 4.1.1-4 顯示出往復式搖晃培養中，正十六烷在第 44 小時以後即有 95% 以上的總移除量。到達第 68 小時，2000 ppmv 正十六烷中約有 30% 的正十六烷被降解而約有 65~70% 的正十六烷被包覆在 NTU-1 結塊。迴旋式培養中的正十六烷由於形成結塊時間較晚，故在 56 小時後才有 90% 以上的總移除量。在第 68 小時，2000 ppmv 正十六烷約有 34% 被降解而有 60~65% 的被包覆在 NTU-1 結塊中。

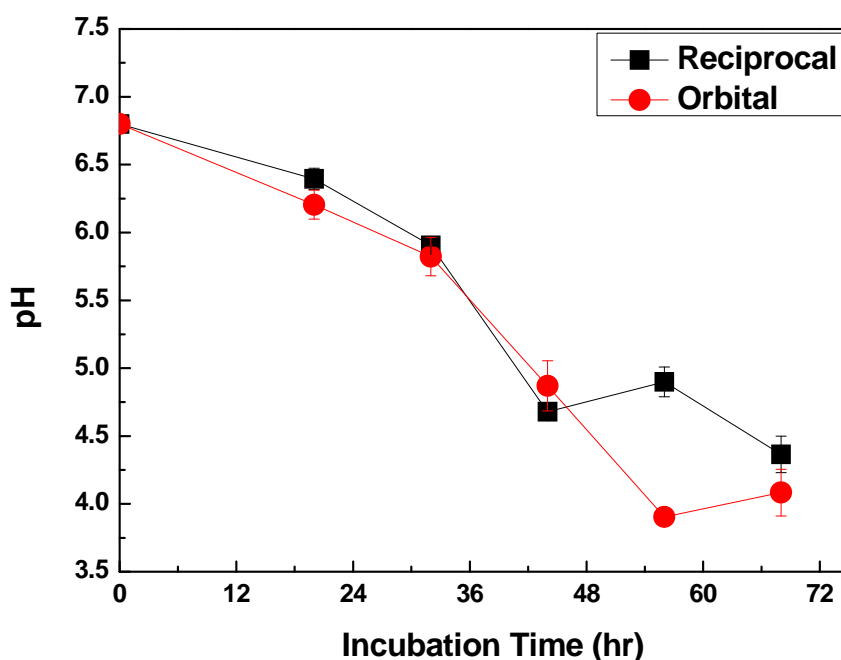


圖 4.1.1-1 培養條件 30°C、100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷時，不同搖晃培養方式下的培養基酸鹼值變化。

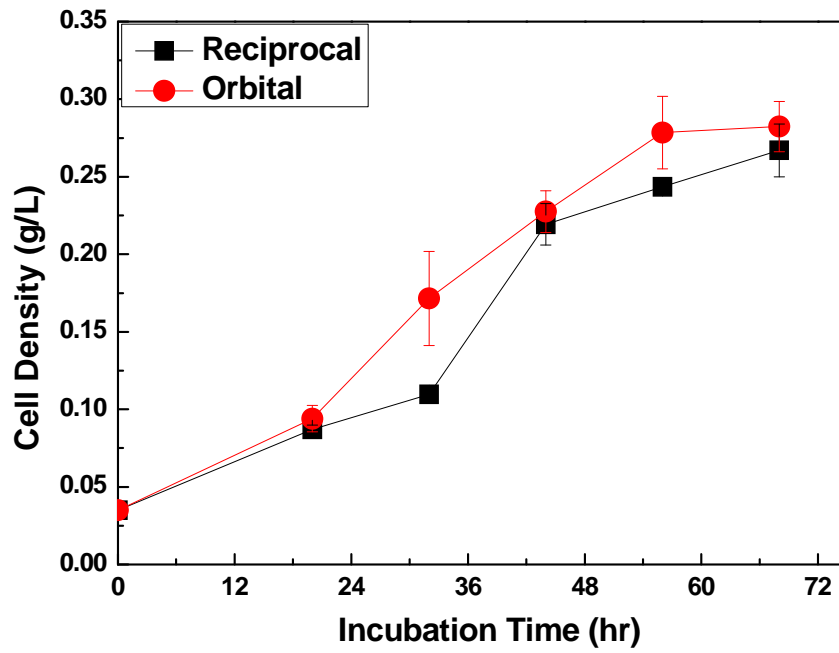


圖 4.1.1-2 培養條件 30℃、100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷時，不同搖晃培養方式下之細胞生長曲線。

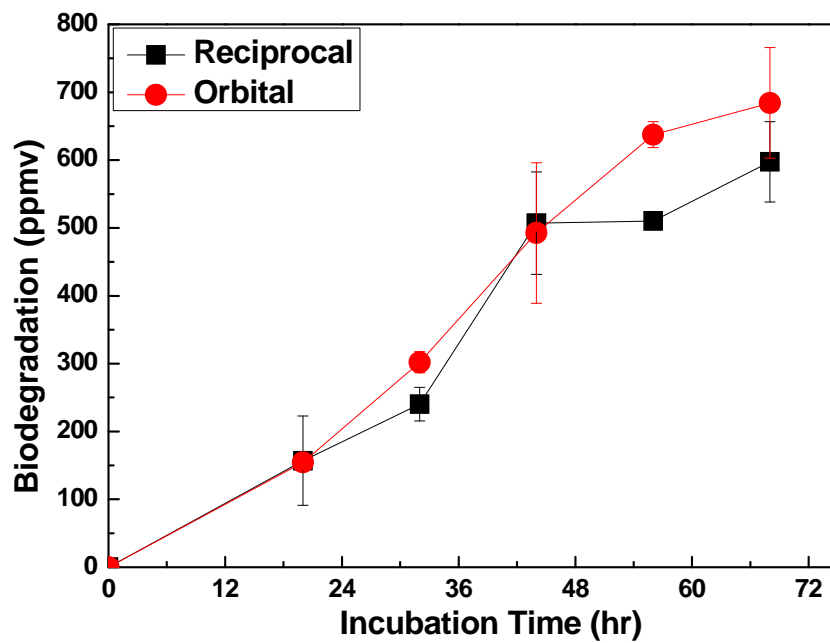


圖 4.1.1-3 培養條件 30℃、100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷時，不同搖晃培養方式下的正十六烷生物降解曲線。

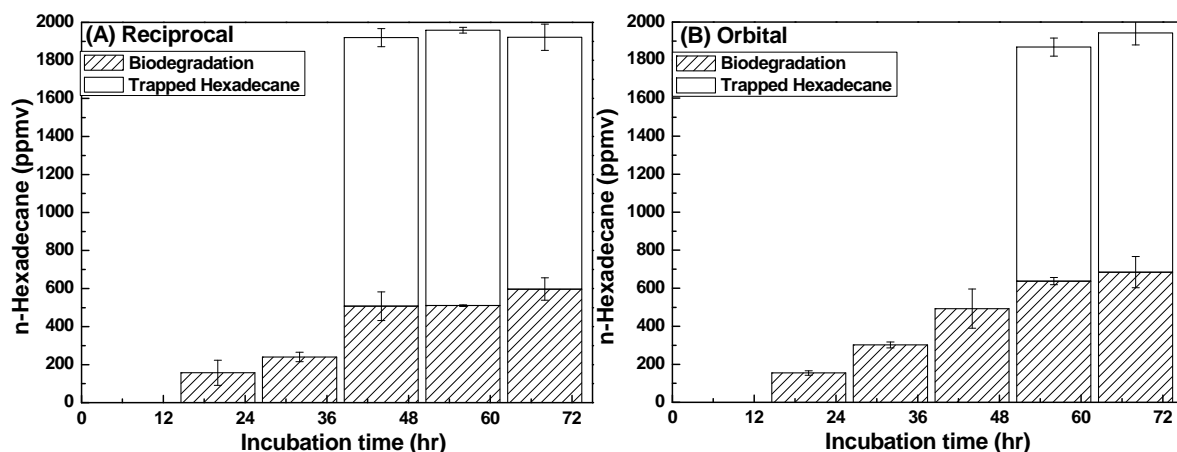


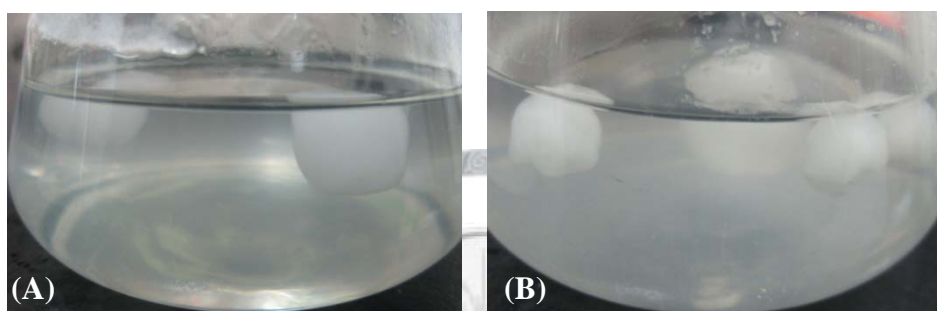
圖 4.1.1-4 培養條件 30°C、100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷時，不同旋轉培養方式下之生物降解量及包覆量。(A) 往復式；(B) 迴旋式。

實驗中也可以觀察到 NTU-1 結塊的形態及形成的時間隨著培養時搖晃的方式不同而有所差異，如照片 4.1.1-1 及 4.1.1-2 所示。照片 4.1.1-1 中，往復式培養下的細胞結塊都呈現 0.5~2 cm 的圓球狀且呈現乳白色的結塊。而照片 4.1.1-2 則顯現出迴旋式培養下，NTU-1 在第 44 小時呈現棉絮狀的細胞聚集形態，而第 68 小時則呈現出黃色片狀的細菌結塊。

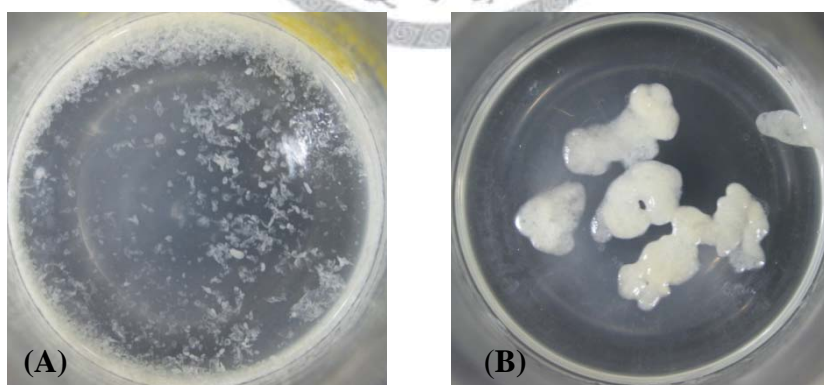
造成結塊形態差異主要原因可能是因為在往復式的培養方式中，細菌來回的與正十六烷碰撞，故細胞表面與正十六烷的接觸機會較大且細菌結塊容易像混雪球一樣的情形產生。迴旋式培養方式中，正十六烷因為密度的關係浮在水面上且在這種搖晃方式下正十六烷與下方培養基無法有太大的交換，故只有上方的 NTU-1 比較容易接觸到正十六烷。隨著培養時間增加，細胞表面的疏水性增強，細菌結塊逐漸形成，但因為這種搖晃方式無法使細菌結塊與正十六烷來回的碰撞接觸，所以形成的結塊構形呈現片狀浮在培養基上。

另外，由 NTU-1 細菌結塊顏色也可以看出細胞密度及其包覆正十六烷量的差異。由實驗結果得知往復式培養的細菌密度雖然較低但卻包覆了較多的正十六烷 (第 68 小時，細胞密度約 0.267 g/L 包覆了約 1325 ppmv 的正十六烷)。相對的，迴旋式培養中的細胞密度較高，但卻包覆了較少的正十六烷 (第 68 小時，細胞

密度約 0.282 g/L 包覆了約 1260 ppmv 的正十六烷)。因而往復式搖晃培養方式下的細胞結塊顏色因為 NTU-1 細胞量較低但烷類較多而呈現乳白色；迴旋式搖晃培養下的細胞結塊顏色因為細胞量較多、烷類較少而呈現淡黃色。張緯農在 2009 年的論文中提到，相似的細胞密度下，高濃度碳源環境形成的細胞結塊為乳白色，而低濃度時則呈現結塊較紮實的淡黃色顆粒 (張緯農 2009)。故以上實驗結果也符合之前過去實驗室人員的觀察。



照片 4.1.1-1 培養條件 30°C、往復式搖晃培養，轉速 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，不同時間點 NTU-1 細胞的聚集現象。(A) 第 44 小時；(B) 第 68 小時。



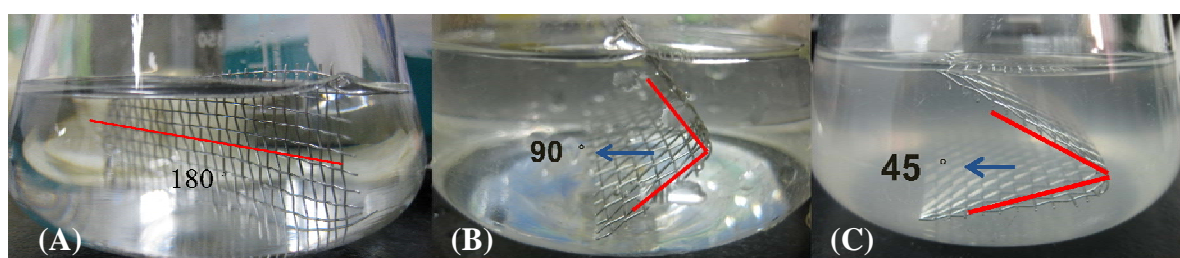
照片 4.1.1-2 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養，轉速 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，不同時間點 NTU-1 細胞的聚集現象。(A) 第 44 小時；(B) 第 68 小時。

### 4.1.2 迴旋式培養下錐形瓶中加入篩網時正十六烷生物復育的效果

由上一節的實驗結果可觀察到以迴旋式培養時，NTU-1 與正十六烷的碰撞及接觸機會較小並可能侷限於上方的培養基，導致 NTU-1 形成細菌結塊的時間較晚且結塊的形態呈現片狀。這一節的實驗則試著改進以迴旋式培養時，反應錐形瓶內的構造。在錐形瓶中加入不同孔徑大小及不同折角的篩網，目的是希望增加正十六烷在錐形瓶中的攪拌效果，使正十六烷油滴顆粒變更小，NTU-1 能以較大的面積接觸利用正十六烷並增加碰撞機會，同時探討其 NTU-1 形成的結塊構形及正十六烷移除效率。

#### 4.1.2.1 篩網孔徑大小為 10 mesh

本部分實驗中的篩網大小皆為 10 mesh (1.7 mm)，將篩網折成三個角度 (180、90、45 度) 置放於反應錐形瓶內，如照片 4.1.2.1-1 所示。接著探討不同折角對於正十六烷的生物復育是否會有不同的效果。



照片 4.1.2.1-1 10 mesh 篩網不同折角置放於 250 mL 反應錐形瓶中。(A) 180°；(B) 90°；(C) 45°。

實驗條件如下：

- 培養基 pH 值：7 → 6.8 (滅菌後)
- 培養基正十六烷濃度：2000 ppmv
- 培養基體積：100 mL
- 培養溫度：30℃
- 培養形式：迴旋式恆溫培養箱
- 篩網孔徑大小：10 mesh (1.7 mm)
- 篩網角度：180、90、45°
- 培養轉速：100 rpm
- 初始植菌量：5 mL 礦物培養基菌液 ( $OD_{600} \doteq 1$ )
- 分析時間點：20、32、44、56、68 hr

接下來分別觀察討論其培養基酸鹼值變化，細胞生長曲線、正十六烷生物降解量及總移除效率。圖 4.1.2.1-1 為迴旋式培養錐形瓶中含 10 mesh 篩網時培養基酸鹼值的變化。由圖 4.1.2.1-1 可以看出，培養基內的酸鹼值皆隨著培養時間增加而下降，其下降趨勢至形成結菌結塊後（加入篩網組約在 32~44 小時內形成細菌結塊，無篩網組約在 44~56 小時形成細菌結塊）便開始趨於平緩，主要原因與上一節相同，因為此時細菌形成結塊並進入生長平緩期，且此時培養基中的酸鹼值已降到 4 左右，不利 NTU-1 繼續生長。

同時由圖 4.1.2.1-1 可觀察到篩網折角為 180 度時 pH 下降趨勢與不加篩網的實驗組別較相近，主要可能是因為篩網折角 180 度的組別中，篩網面積較折角為 90 度或 45 度時來得小，故正十六烷的攪拌效果較 90 度或 45 度的篩網來得差一些。但折角為 180 度的這組實驗也會在 44 小時內即形成細菌結塊，故 44 小時之後酸鹼值下降趨勢就趨於平緩。

由細胞生長曲線圖 4.1.2.1-2 可觀察到隨著時間的增加，NTU-1 因為降解利用正十六烷故細胞密度也跟著增加，且在形成細菌結塊後生長趨勢則會開始持平趨緩。且由此趨勢可以看出沒加入篩網的組別其細胞生長的情形在 44 小時以前比有加入篩網的組別來得緩慢一些。加入篩網的三組實驗組別到了 44 小時形成結塊以後細胞密度皆維持在 0.28 ~ 0.29 g/L 左右。沒加入篩網的控制組則在第 56 小時形成結塊後細胞的生長趨勢才開始趨於平緩，到第 68 小時約可以長到 0.28 g/L 左右。

因此，我們知道在反應錐形瓶中加入篩網對於細胞生長是有正面的幫助，正十六烷在錐形瓶中的攪拌分散效果會提升，使其不是只浮在培養基液面上而能與下方的培養基有較多的交換，故 NTU-1 能夠以較大的面積接觸到正十六烷，也幫助 NTU-1 形成結塊包覆正十六烷的能力，使 NTU-1 形成結塊的時間提前到第 44 小時以前。

圖 4.1.2.1-3 為生物降解曲線圖，反應錐形瓶中加入篩網的組別，正十六烷的降解量於 44 小時前皆高於無加入篩網的控制組。而加入篩網的實驗組別所呈現的正十六烷降解量並沒有太明顯的差異，隨著時間的增加，降解量也跟著遞增，在第 44 個小時後隨著結塊的形成，正十六烷降解的情形開始趨緩，這個實驗結果也符合了前面培養基酸鹼值及細胞生長的趨勢圖。

接著，將含 10 mesh 不同折角篩網實驗中的正十六烷生物降解量及包覆量匯集成圖 4.1.2.1-4。由上面一節定義我們知道總正十六烷移除量等於生物降解量加上被包覆在細菌結塊中的量。由此圖可知加入篩網的實驗組別在第 44 個小時內即能形成明顯的細菌結塊並可移除掉 95% 以上的正十六烷，因此可以確定篩網的加入不僅可以使 NTU-1 細胞密度在較短時間內增加同時也可以加速正十六烷的降解及包覆情形。

另外，由圖 4.1.2.1-4 中也可以看到隨著時間的增加結塊中的正十六烷的量會逐漸的減少，顯示在形成細胞結塊後，NTU-1 仍可降解利用正十六烷，只是速率變緩慢了。到達第 68 小時，加入篩網的實驗組，2000 ppmv 的正十六烷中約

可降解掉 32~35% 並包覆 60~65% 的量。沒有加入篩網的組別，在第 56 個小時左右形成細菌結塊並移除掉 95% 左右的正十六烷，到達第 68 小時，2000 ppmv 中約可降解掉 34% 及包覆 63% 左右的正十六烷。

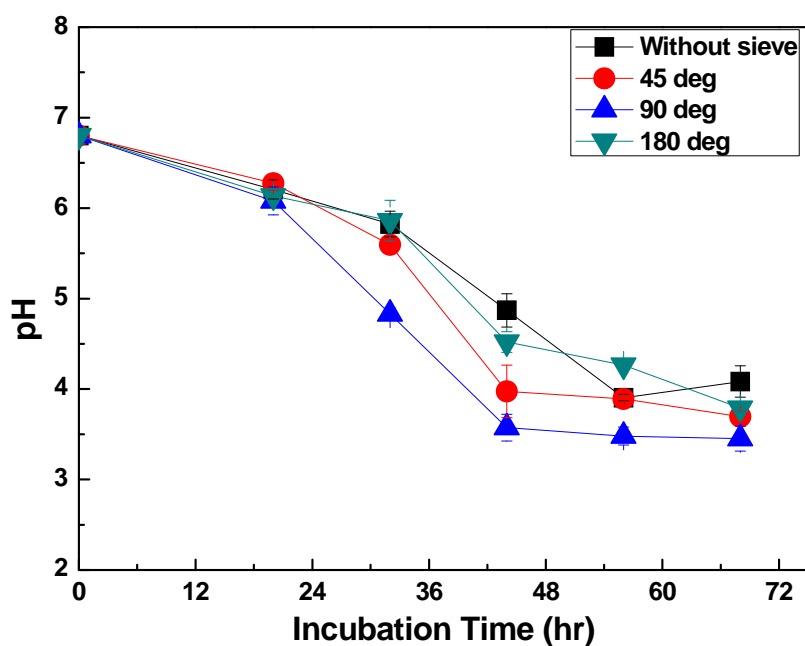


圖 4.1.2.1-1 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，錐形瓶中加入不同折角之 10 mesh 篩網之培養基酸鹼值的變化。

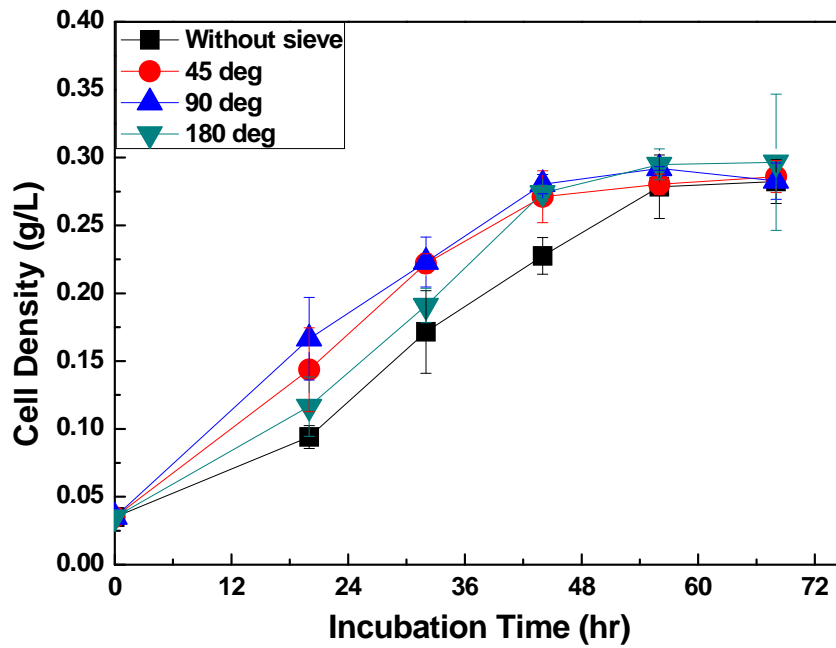


圖 4.1.2.1-2 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，錐形瓶加入不同折角之 10 mesh 篩網時細胞生長曲線。

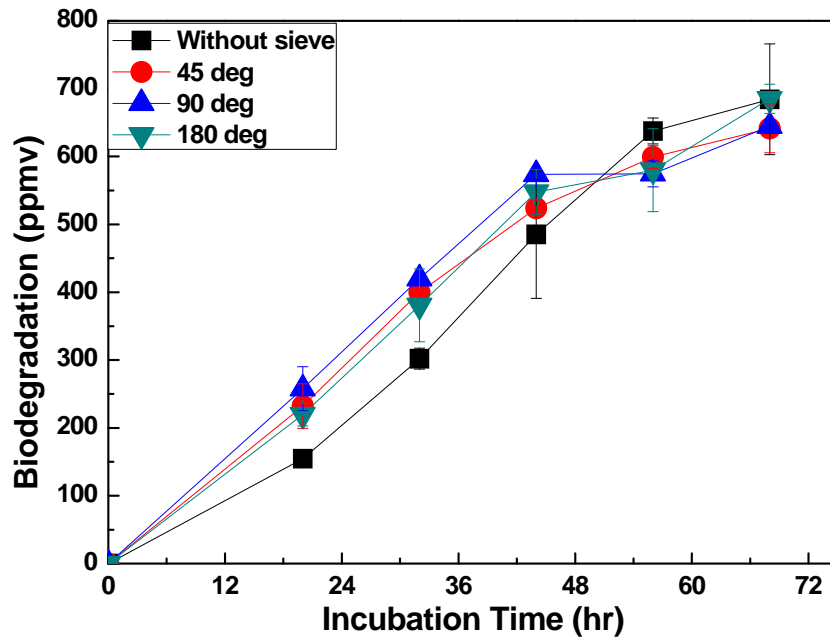


圖 4.1.2.1-3 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，錐形瓶中加入不同折角之 10 mesh 篩網，正十六烷生物降解量。

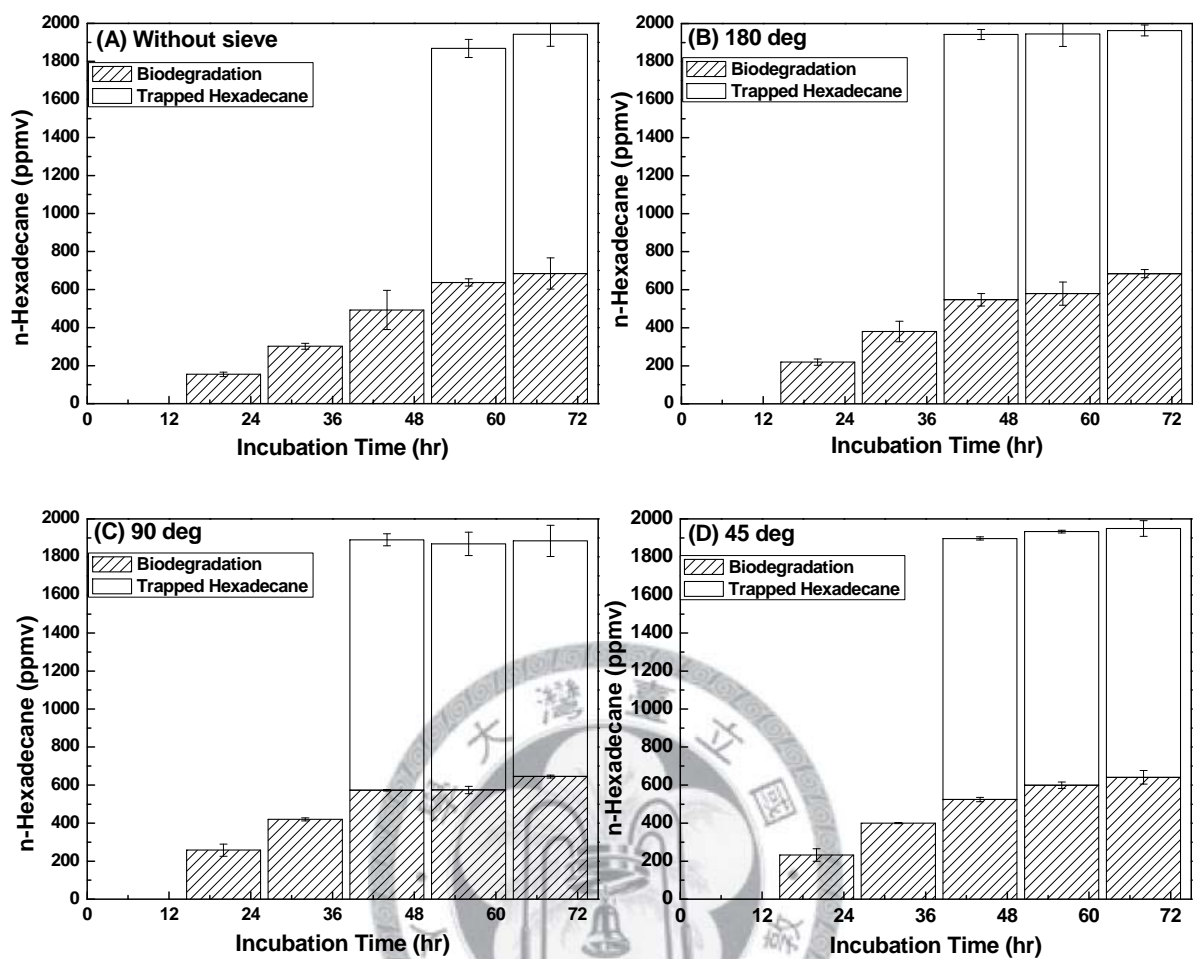


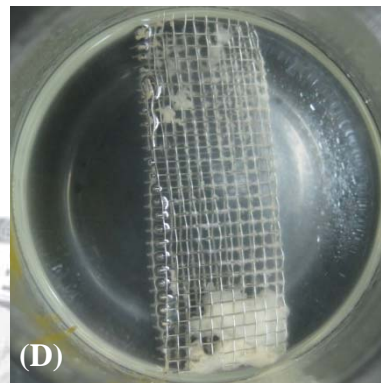
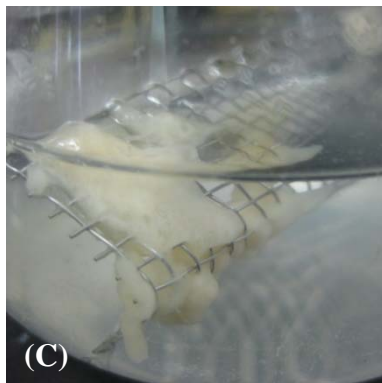
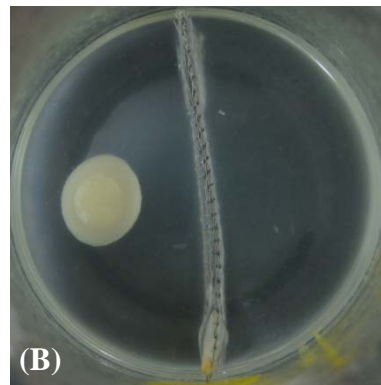
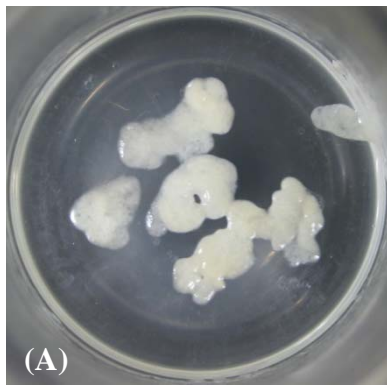
圖 4.1.2.1-4 培養條件 30℃、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，於錐形瓶中加入 10 mesh 不同折角篩網之正十六烷生物降解量及包覆量比較。(A) 沒有加入篩網；(B) 篩網折角為 180 度；(C) 篩網折角為 90 度；(D) 篩網折角為 45 度。

實驗過程中也可觀察到加入篩網的實驗組別其細胞結塊的形態與未加入篩網的控制組有明顯的差異。如照片 4.1.2.1-2 所示。

無篩網的實驗組別中 (照片 4.1.2.1-2 (A)) 可發現細菌結塊的形態呈現片狀的情形，主要原因如上一節所提到，是因為在迴旋式的培養方式中，正十六烷因為密度的關係分布於液面上層，故只有位於上層的細胞能夠接觸到正十六烷，而迴旋式的搖晃方式並不容易像往復式的震盪一樣可以使細胞上下來回的接觸到正十六烷或其他細菌結塊，所以細菌結塊無法像滾雪球一樣的形成圓球狀反而形成片狀結構。

反觀有加入篩網的實驗組別，結塊的形態也有差異且都不會呈現片狀。若置入反應錐形瓶中的篩網為 180 度時，反應至 68 小時可以看到細菌的結塊呈現與往復式震盪培養時類似的結果，結塊大小約為 1~2 cm 的圓球狀 (照片 4.1.2.1-2 (B))。主要可能是因為隨著培養時間的增加，當細菌結塊形成時，較大的顆粒無法通過篩網故會在以 180 度篩網為分邊的某一邊不斷的與篩網來回碰撞，此時細菌結塊會隨著與正十六烷及篩網的碰撞而逐漸形成圓球狀的顆粒。

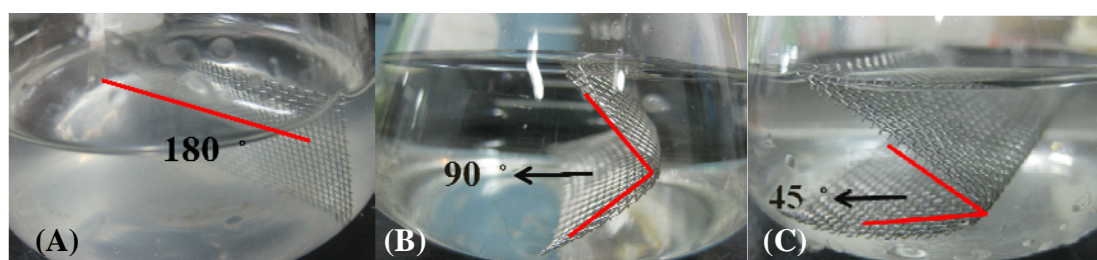
同時也觀察到當置入反應錐形瓶中的篩網為 90 度或 45 度時，結塊形成的位置會在於兩個地方，主要與培養時旋轉的方式及折角面向的方向有很大的關係。如照片 4.1.2.1-2 (C) 及 (D) 所示。由於培養箱旋轉的方向為逆時鐘方向，且在實驗中皆將篩網折角的方向放置朝向左邊。實驗結果可以看出，結塊可能形成在篩網下方的折角開口處及上方背向開口處的位置。這個現象推測是因為當細胞隨著時間成長，細菌結塊逐漸形成且包覆掉未降解的正十六烷，此時較大的細菌結塊無法通過篩網而集中在篩網的左邊或是右邊，故隨著培養箱的逆時鐘旋轉方向及離心力的作用，在左邊的細菌結塊會較容易聚集在下方的角度開口處，而右邊較大無法通過篩網的細菌結塊則易卡在上方的背向開口處。當細菌結塊形成時，烷類的移除效果可達到 95% 以上。



照片 4.1.2.1-2 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，於錐形瓶中加入 10 mesh 篩網不同折角，實驗至第 68 小時的細菌結塊形態。(A) 沒有加入篩網 (俯視)；(B) 篩網折角為 180 度 (俯視)；(C) 篩網折角為 90 度 (側視)；(D) 篩網折角為 45 度 (俯視)。

#### 4.1.2.2 篩網孔徑大小為 20 mesh

與 4.1.2.1 節的實驗條件相似，但實驗中的篩網大小改為 20 mesh (0.85 mm)，一樣將篩網折成三個角度 (180、90、45 度) 如照片 4.1.2.2-1。探討 20 mesh 不同折角的篩網置放於反應錐形瓶中時，正十六烷生物復育的效果。



照片 4.1.2.2-1 20 mesh 篩網不同折角置放於反應錐形瓶中。(A) 180°; (B) 90°; (C) 45°。

實驗條件如下：

- 培養基 pH 值：7 → 6.8 (滅菌後)
- 培養基正十六烷濃度：2000 ppmv
- 培養基體積：100 mL
- 培養溫度：30°C
- 培養形式：迴旋式恆溫培養箱
- 篩網孔徑大小：20 mesh (0.85 mm)
- 篩網角度：180、90、45°
- 培養轉速：100 rpm
- 初始植菌量：5 mL 礦物培養基菌液 ( $OD_{600} \doteq 1$ )
- 分析時間點：20、32、44、56、68 hr

圖 4.1.2.2-1 為 NTU-1 在迴旋式培養方式下反應錐形瓶中含 20 mesh 不同折角篩網時培養基酸鹼值的變化、圖 4.1.2.2-2 為 NTU-1 生長曲線。由圖 4.1.2.2-1 及圖 4.1.2.2-2 可以看出其酸鹼值變化及細胞生長的趨勢皆與上一節 10 mesh 篩網實驗中的結果很相似，有加入篩網的組別其細胞生長的情形在 44 小時以前較沒有加入篩網的組別好一些。而每組實驗中的培養基酸鹼值皆隨著培養時間的增加而降低；細胞密度也隨著時間而增加，且在形成細菌結塊後，酸鹼值變化及細胞生長的趨勢則會開始逐漸變得較緩慢，在第 68 小時後，每組實驗培養基酸鹼值皆降至 4 左右而細胞密度約為 0.28 ~ 0.3 g/L。

圖 4.1.2.2-3 為 20 mesh 篩網不同折角時之生物降解量曲線，結果同樣顯示出有加入篩網的實驗組別其正十六烷的生物降解量在第 44 小時以前比沒有加入篩網的組別來得高，尤其以篩網折角 45 及 90 度的這兩組更能看出較明顯的差別。在第 44 小時後，由於加入篩網的組別此時形成細菌結塊將未降解之正十六烷包覆且進入生長平緩期，所以可以看出正十六烷被降解的情形開始減緩，以較慢的速率持續進行。在第 68 小時後，篩網折角為 90 度的正十六烷降解量約達 680 ppmv 與沒加入篩網的組別相近。而篩網折角為 45 及 180 度的組別中則約有 550 ~ 600 ppmv 的正十六烷被降解掉，剩下未被降解掉的正十六烷大部分皆被包覆在細菌結塊顆粒中。

接下來同樣將實驗中的正十六烷生物降解量及包覆量匯集成圖 4.1.2.2-4。由圖 4.1.2.2-4 可以看出加入篩網的組別在反應第 44 小時後 NTU-1 即形成細菌結塊並包覆掉大量的正十六烷，使其移除效果在第 44 小時以後即可到達 95% 以上。

由 4.1.2.1 及 4.2.2.2 節實驗結果顯示，若反應錐形瓶中加入 10 或是 20 mesh 篩網皆可以使 NTU-1 形成細菌結塊的時間提前並包覆大量的烷類，因而正十六烷在較短的時間內即可大量移除。

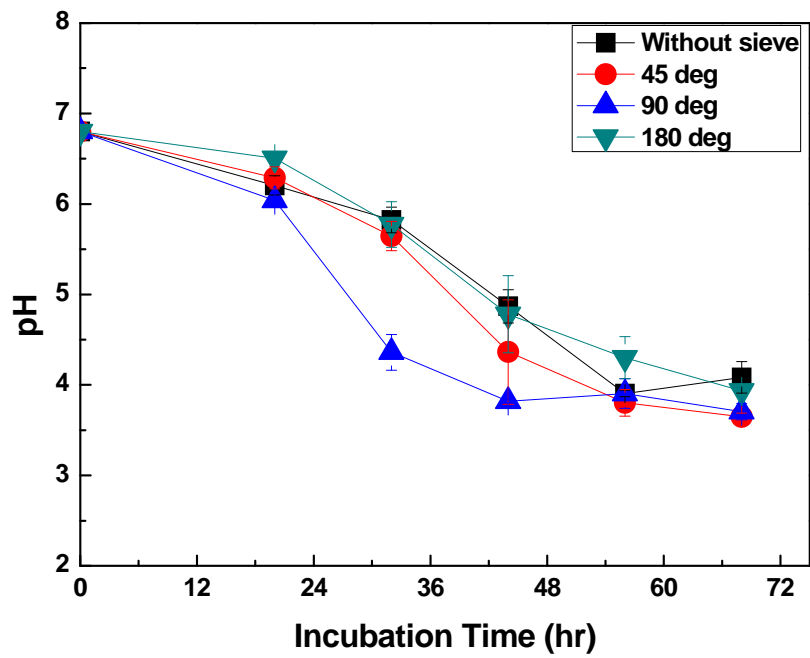


圖 4.1.2.2-1 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，於錐形瓶中加入 20 mesh 篩網不同折角時之培養基酸鹼值變化。

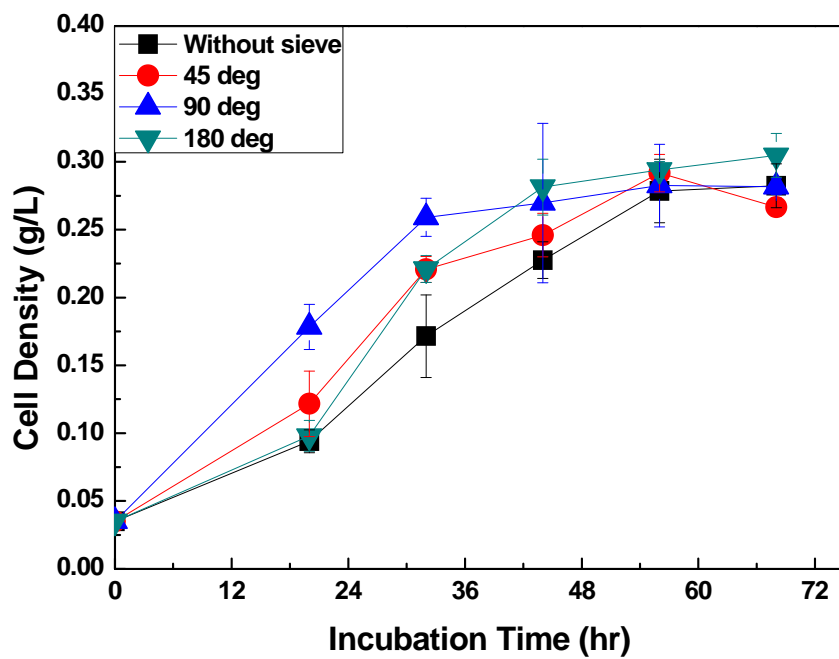


圖 4.1.2.2-2 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，於錐形瓶中加入 20 mesh 篩網不同折角時之細胞生長曲線。

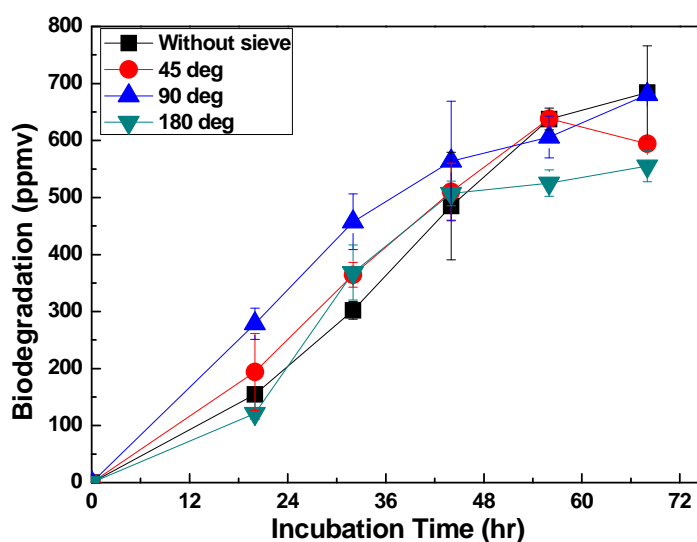


圖 4.1.2.2-3 培養條件 30°C、迴旋式搖晃 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，錐形瓶中加入 20 mesh 篩網時之正十六烷生物降解量。

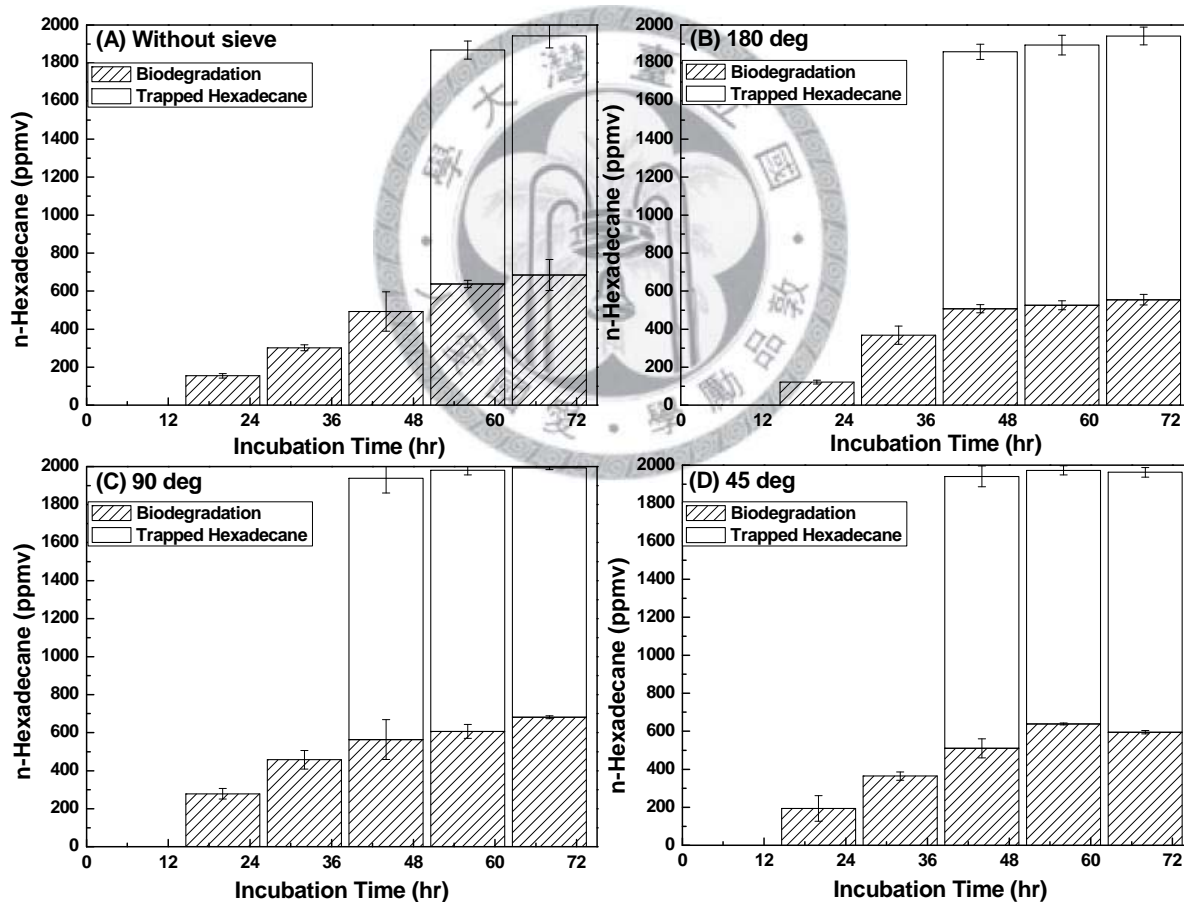
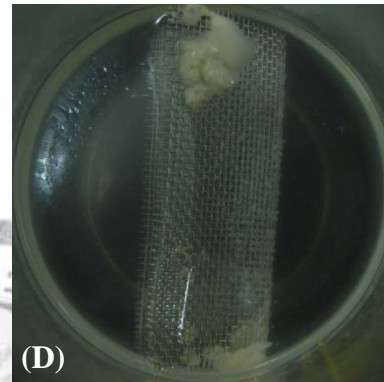
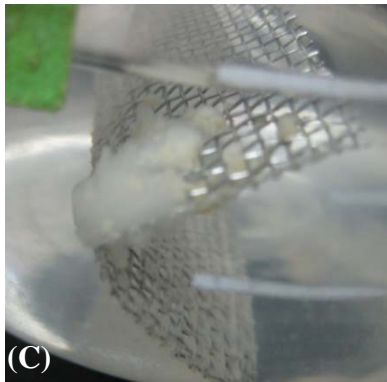
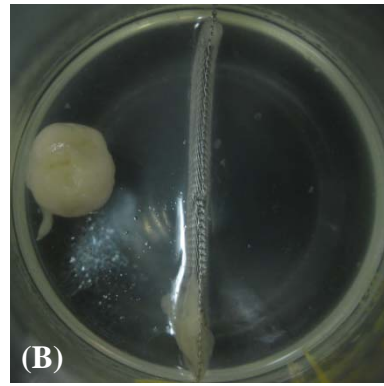
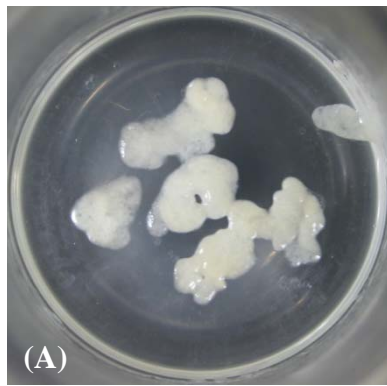


圖 4.1.2.2-4 培養條件 30°C、100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，錐形瓶中加入 20 mesh 篩網之生物降解量及包覆量比較。(A) 沒有加入篩網；(B) 篩網折角為 180 度；(C) 篩網折角為 90 度；(D) 篩網折角為 45 度。

將錐形瓶中含 20 mesh 篩網、實驗第 68 小時細菌結塊的情形與沒加入篩網組別的結塊情形來作比較，以照片 4.1.2.2-2 表示。由照片 4.1.2.2-2 可以看出其細菌結塊的形態與上一節中篩網大小為 10 mesh 的組別很相似，其中照片 4.1.2.2-2 (B) 篩網折角為 180 度的細胞結塊呈現 1~2cm 的圓球狀，其主要形成原因已於上一節討論過。

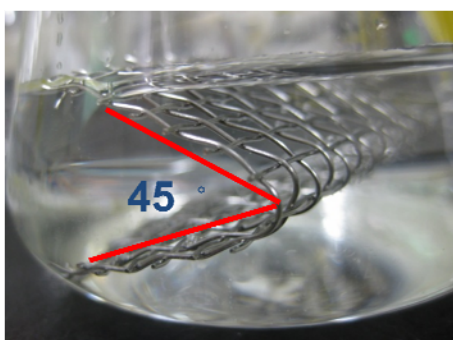
而照片 4.1.2.2-2 (C)、(D) 篩網折角為 90 及 45 度的實驗組別中可以看到細胞結塊並不如折角 180 度所呈現的圓球狀，而呈現貼附或聚集在篩網上某一端的情形。主要是因為折角的存在不像沒有折角 (180 度) 的篩網，其可如檔板一樣的在 NTU-1 細胞形成結塊後與顆粒較小的結塊或正十六烷來回的碰撞並容易像滾雪球一樣的產生圓球狀的結塊；有折角的篩網會因為其角度的關係而阻礙了細菌結塊形成圓球狀的機會，而由於培養箱旋轉的方向為逆時鐘方向，且實驗中皆將篩網折角的方向放置朝向左邊，故細菌結塊會呈現聚集於折角開口的下方或是背向折角開口的上方處。這個情形比 10 mesh 篩網折角 90 及 45 度來得明顯，主要是因為 20 mesh 的篩網孔徑較小，所以細菌一旦形成較大的結塊後，就很容易無法通過篩網的孔洞，此時細菌結塊就會隨著水流及旋轉方向而使左邊的細菌結塊會較容易聚集在下方的角度開口處，而右邊較大無法通過篩網的細菌結塊則易卡在上方的背向開口處。



照片 4.1.2.2-2 迴旋式培養下 20 mesh 篩網不同折角實驗至第 68 小時的細菌結塊形態。(A) 沒有加入篩網 (俯視)；(B) 篩網折角為 180 度 (俯視)；(C) 篩網折角為 90 度 (側視)；(D) 篩網折角為 45 度 (俯視)。

### 4.1.2.3 不同孔徑大小但相同折角 (45 度) 篩網之比較

在這一小節中，主要是想要比較相同折角 (45 度) 但不同孔徑大小的篩網放置反應錐形瓶中，對於 NTU-1 降解及包覆正十六烷的能力是否有不同的效果，實驗條件如上面兩小節，主要的不同是在於篩網折角皆為 45 度，而三種篩網的孔徑大約為 6 (3.35 mm，照片 4.1.2.3-1)、10 (1.7 mm)、20 (0.85 mm) mesh。



照片 4.1.2.3-1 6 mesh 篩網 45 度折角置放於反應錐形瓶中。

圖 4.1.2.3-1 為 NTU-1 在迴旋式培養下反應錐形瓶中放置 45 度、不同孔徑大小篩網時培養基的酸鹼值變化，圖 4.1.2.3-2 為 NTU-1 生長曲線。由圖 4.1.2.3-2 可以看出 6 mesh 的實驗組別中，細胞密度較 10 及 20 mesh 的篩網來得低一些，其也符合培養基的酸鹼值變化。接下來由圖 4.1.2.3-3 正十六烷生物降解曲線圖，可以看出在 44 小時前，6 mesh 篩網的實驗組別中的正十六烷生物降解量比 10 及 20 mesh 的組別來得低一些，但在 44 小時左右形成細菌結塊後，三組實驗組別的生物降解量趨勢開始趨緩，到達第 68 小時皆可以降解掉約 600 ~ 650 ppmv 的正十六烷。圖 4.1.2.3-4 則是將 6 mesh 篩網的實驗組別中的正十六烷降解量及包覆量匯集成一張圖，其可看出 6 mesh 篩網 45 度折角的實驗下，NTU-1 一樣在第 44 小時即形成細菌結塊並把其他未降解的正十六烷包覆起來，所以在第 44 小時以後即有 95% 以上的總移除效率，其移除效果與 10 及 20 mesh 篩網 45 度折角的組別一樣好。

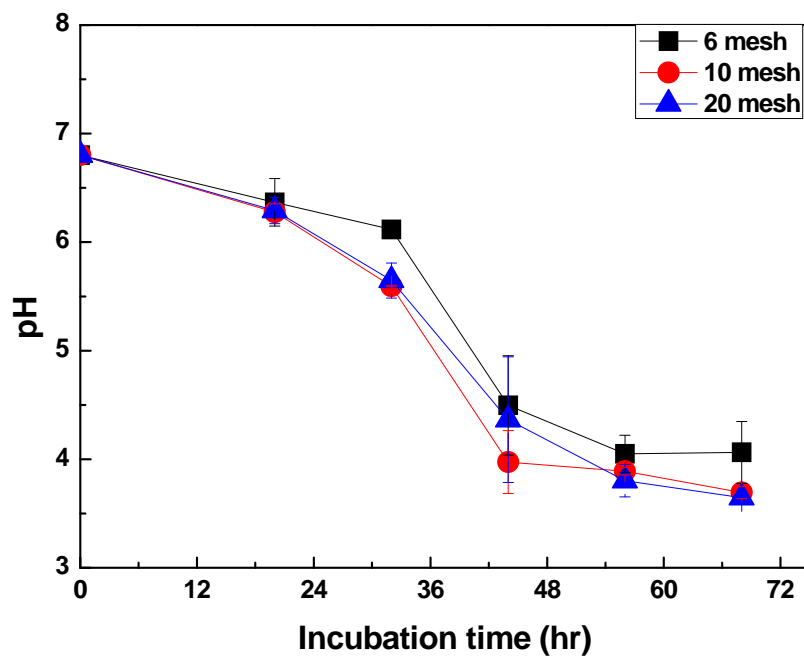


圖 4.1.2.3-1 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，於錐形瓶中加入折角 45 度不同孔徑大小篩網之培養基酸鹼值變化。

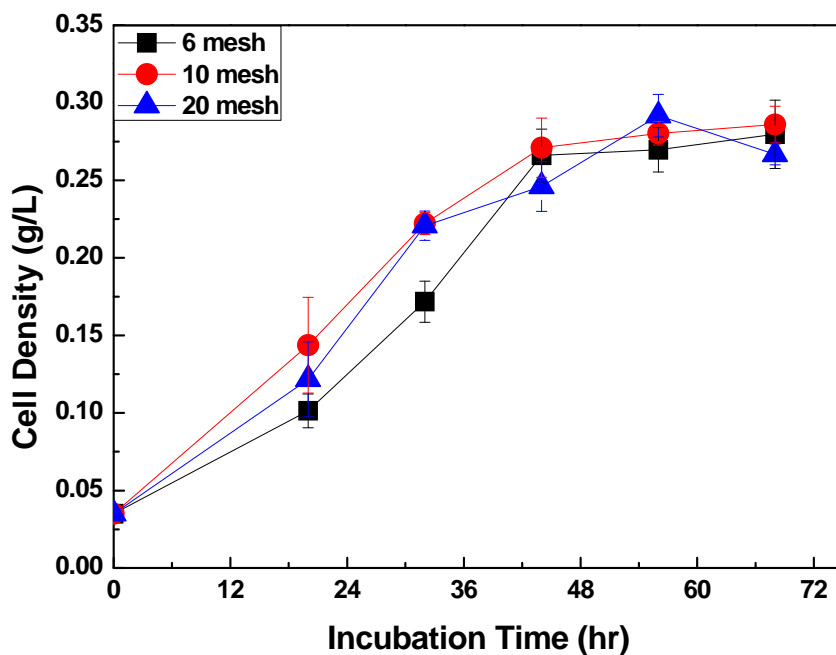


圖 4.1.2.3-2 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，於錐形瓶中加入折角 45 度不同孔徑大小篩網之細胞生長曲線。

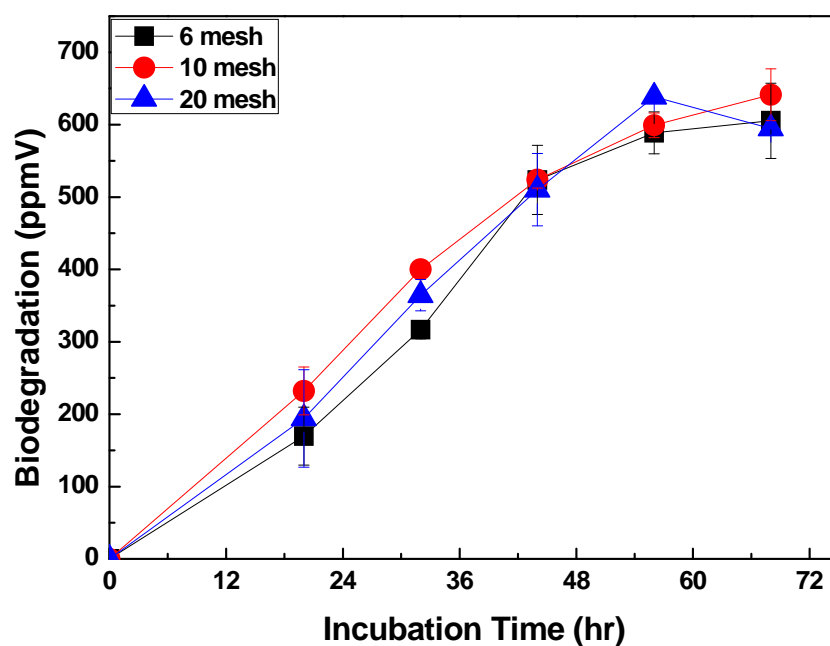


圖 4.1.2.3-3 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，於錐形瓶中加入折角 45 度不同孔徑大小篩網之正十六烷生物降解量。

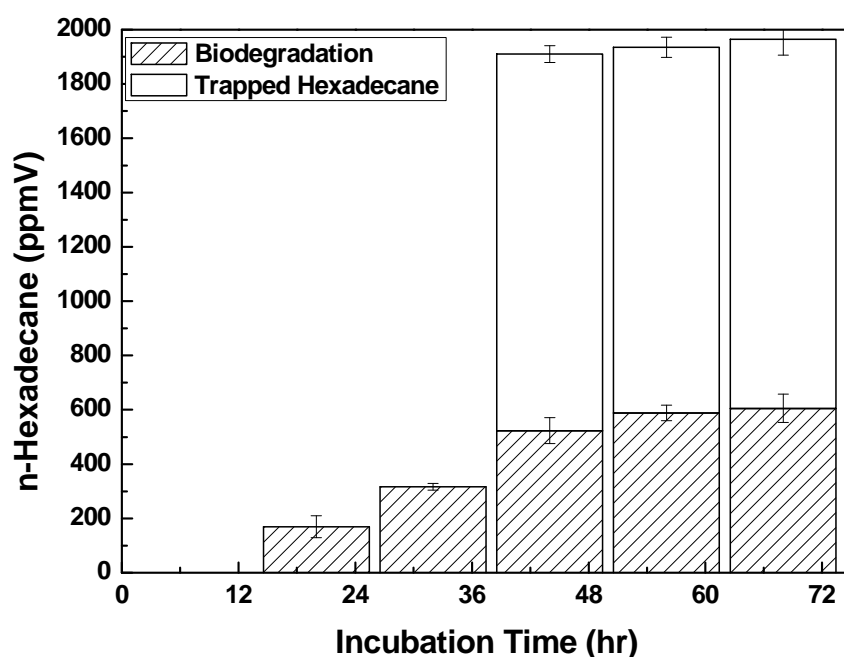
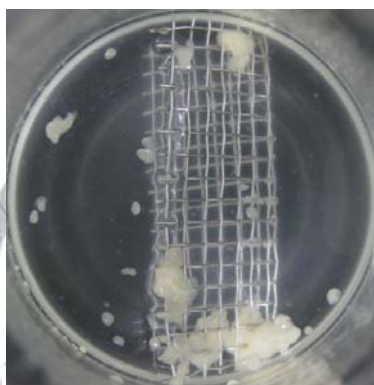


圖 4.1.2.3-4 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 處理 2000 ppmv 正十六烷，於錐形瓶中加入折角 45 度、6 mesh 篩網之正十六烷生物降解量及包覆量比較。

另外，照片 4.1.2.3-2 為 6 mesh 篩網 45 度折角在第 68 小時後的細菌結塊圖。由此照片可以看出大部分細菌結塊的位置一樣是在下方折角開口處及上方背向折角開口處，結塊易聚集在這兩處的原因已於上兩節討論過。與前面 10 及 20 mesh 篩網 45 度折角實驗結果比較不同的地方在於培養基中仍有一些小顆粒的細菌結塊懸浮在液面上，其主要原因可能是因為 6 mesh 篩網的孔徑較大，所以小顆粒的細菌結塊較易通過篩網，而不如 10 及 20 mesh 有折角篩網的實驗組別中，因為孔徑較小，故細菌在形成結塊後就容易因為篩網孔徑較小而卡在篩網折角的某一處。

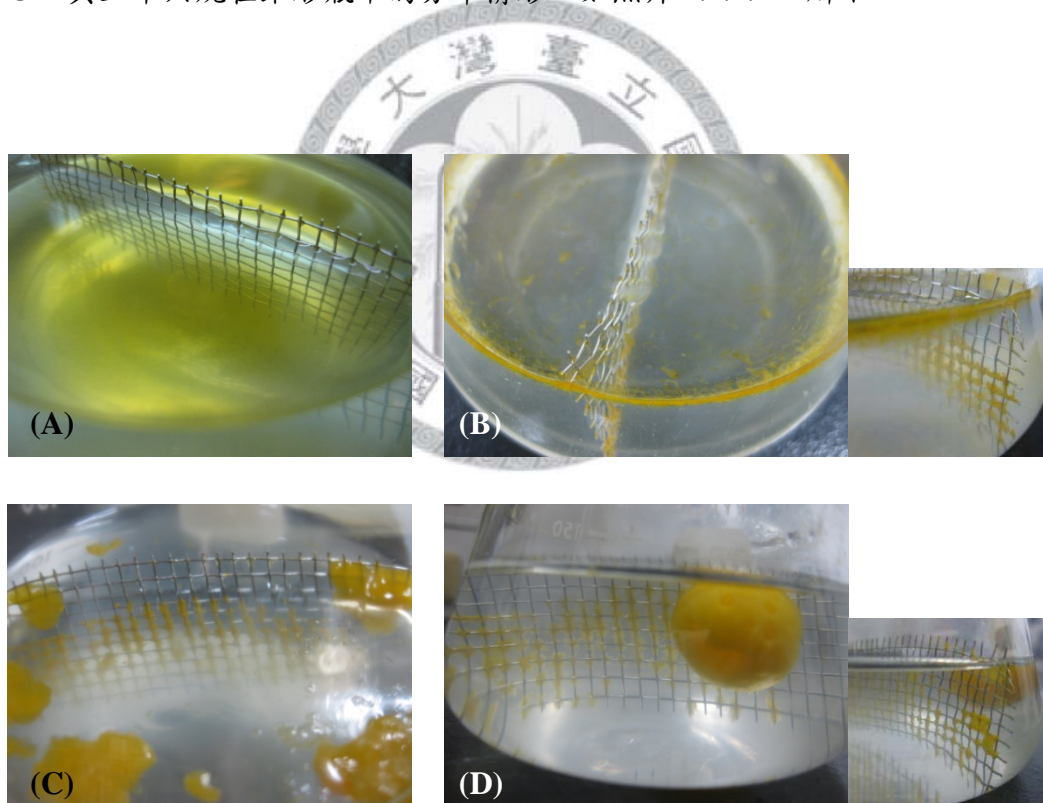


照片 4.1.2.3-2 實驗條件 6 mesh 篩網 45 度折角在第 68 小時後細菌結塊圖 (開口左，俯視)。

### 4.1.3 討論

根據 4.1.2 節實驗之結果與觀察，2000 ppmv 的正十六烷、迴旋式的培養方式，若在反應錐形瓶中加入不同折角及大小的篩網，可幫助細胞的生長、提升 NTU-1 生物降解及包覆的能力，形成結塊的時間也會與 4.1.1 節中往復式培養的時間類似，44 小時內 NTU-1 即把大量的正十六烷包覆起來，此時移除效果高達 95% 以上。這個結果對於處理石油污染問題有很大的幫助，未來反應器設計中可嘗試加入這些篩網，期望其對於大量烷類連續式的生物復育可有正面的效果。

4.1.2 節實驗結果中可發現在迴旋式培養方式下，於反應錐形瓶中加入篩網雖然可以幫助 NTU-1 降解及包覆正十六烷的能力，但加入不同篩網孔徑大小及折角時，正十六烷的移除效果並不會因此而有太大的差異。推測其中一項原因可能是加入的篩網孔徑大小太相近不足以看出不同的效應，另外我們認為篩網除了能幫助攪拌使油滴顆粒變小，增加 NTU-1 與其接觸的面積與機會以外，可能還有其他的作用。為了能更清楚觀察正十六烷在加入篩網的組別且轉速 100 rpm 條件下的分布位置，我們先以脂溶性染料 Sudan I ( $C_{16}H_{12}N_2O$ ) 將無色正十六烷染成橘色，取 200  $\mu\text{L}$  加入含有 10 mesh、折角 180 度篩網的錐形瓶中，並加入 NTU-1 礦物培養基 NTU-1 菌液 ( $OD_{600} \doteq 1$ )。分別觀察反應在第 0、24、48 及 72 小時 NTU-1 與正十六烷在錐形瓶中的分布情形。如照片 4.1.2.4-1 所示。



照片 4.1.2.4-1 以脂溶性染料 Sudan I ( $C_{16}H_{12}N_2O$ ) 將無色正十六烷染成橘色，加入含有 10 mesh 折角 180 度篩網的錐形瓶中，觀察不同時間 NTU-1 與正十六烷在錐形瓶中的分布情形。(A) 第 0 小時；(B) 第 24 小時；(C) 第 48 小時；(D) 第 72 小時。

由照片 4.1.2.4-1 (A) 可以看出一開始在加入染色後正十六烷時，因密度較小而分布於培養基的表面。經過 24 小時培養後 (照片 4.1.2.4-1 (B))，可以看到染色的正十六烷會被 NTU-1 所貼附並懸浮在培養基表面，此時染色的正十六烷已不如剛加入時的均勻分布在液面。另外，由照片 4.1.2.4-1 (B) 中可以看出，被 NTU-1 貼附的染色正十六烷有部分會黏附在篩網上。我們推測，迴旋式搖晃培養實驗中，分布於外圓周的正十六烷會因為篩網及搖晃的方式而散亂的分布在培養基中，其他例如接近圓心部分的烷類，則可能因為流體的流動的圓周較小而卡在篩網的孔隙或交叉處，此時 NTU-1 就會黏附在篩網上的正十六烷並開始降解利用，故我們由照片 4.1.2.4-1 (C) 及 (D) 中除了看到已經形成的細菌結塊外，皆可以看到黏附在篩網上的 NTU-1 及正十六烷。這個現象推測也是能幫助 NTU-1 利用並包覆正十六烷的原因，因為正十六烷間接的被固定在培養基中的某處，使分散於培養基中 NTU-1 能穩定的接觸並利用碳源，故隨著時間的增加，NTU-1 會因為降解正十六烷而跟著增加，當 NTU-1 細胞長到一定量時就會逐漸的把未降解的正十六烷包覆起來，使正十六烷的移除效果在短時間內即達到 95% 以上。

總結篩網的加入為何可以提升迴旋式培養下正十六烷的移除效率，主要的原因可能有以下兩點：

- (1) 篩網的加入可幫助正十六烷的在培養基中攪拌分散的效果，使正十六烷油滴顆粒變得更小，並且不會只是停留在培養基的上層處，因此可幫助 NTU-1 與正十六烷的接觸，當 NTU-1 與正十六烷接觸的機會變大時，其降解及包覆的機會也會跟著提升。
- (2) 實驗中有觀察到結塊除了較明顯的聚集在篩網開口的上下處外，篩網中間的部分也會有細菌結塊的黏附。其主要是在於當反應錐形瓶以迴旋式來培養時，少部分正十六烷會因為瓶中培養基的搖晃旋轉而有停留在篩網上的現象，此時 NTU-1 則會貼附在這些正十六烷，進而黏附在篩網上，幫助 NTU-1 生長及使移除正十六烷的效率提升。

## 4.2 以NB培養的NTU-1冷凍乾燥後細胞存活率及降解包覆能力探討

冷凍乾燥是將含有大量水分的物質預先降溫凍結成固體，然後在真空條件下使冰直接昇華被除去的一種乾燥方法 (張玉華等 2006)。冷凍乾燥的技術廣泛的應用於食品、製藥工業及菌株保存上，主要目的為使其在一般環境下能長時間保存，不會因為溫度及溼度而遭受污染及破壞活性。

根據文獻指出，冷凍乾燥過程中菌株的存活率會受到許多因素影響，例如：微生物的生長期、生長的條件、保護劑、復水的條件...等 (Morgan *et al.* 2006)。其中保護劑是最複雜、最難選擇的一個關鍵因素，必須考量細菌的特性來選擇適合的保護劑，降低細菌在冷凍乾燥的過程中的傷害 (Zhao and Zhang 2005)。

本部分實驗在探討加入不同的保護劑對於以NB培養的NTU-1在冷凍乾燥時的保護效果，並利用平板計數法來計算冷凍乾燥後的活菌數 (CFU/mL, CFU: 菌落形成單位)，探討其存活率及其對烷類生物降解及包覆的能力是否受到影響。

### 4.2.1 利用NB培養的NTU-1經過冷凍乾燥後之存活率探討

這一節的實驗中固定了培養NTU-1時的其他條件，主要探討不同的保護劑對於NTU-1冷凍乾燥後的存活率，並觀察在不同溫度下存放及存放時間的長短對於NTU-1存活率是否會造成影響。文獻中指出，保護劑的種類主要是要依據不同微生物來選擇，不同的微生物對於不同的保護劑所產生的保護效果也會有很大的差異 (De Valdez *et al.* 1983)。實驗中，我們選擇了幾種較常見且本實驗室現有又不會影響結果分析的保護劑來進行比較。

進行冷凍乾燥前，微生物生長期的選擇對於冷凍乾燥的結果也會有差異，而實驗中選定在穩定期初期的微生物來進行冷凍乾燥，主要是因為生長週期至穩定

期的微生物由於此時的碳源已接近用盡，故細胞會激發出逆境反應 (stress responses) 並容易誘導出不同生理的狀態，使其能夠保護細胞並維持活性。文獻中指出，初始細菌濃度的選擇通常要高於  $10^8$  CFU/mL 較佳，故在實驗中會將 NTU-1 的初始濃度控制在  $10^9$  CFU/mL 左右。選擇較高的細胞濃度是因為微生物會在冷凍乾燥的過程中受到傷害或是死亡，此時若有較高濃度的初始微生物量的話，相對的也會有較多的微生物存活下來，進而可以繼續繁殖增長，並維持其生理特性 (Morgan *et al.* 2006)。

實驗條件如下：

- NTU-1 在 NB (0.8%) 中的生長時間：20 小時 (穩定期初期)
- 離心取得濃縮 NTU-1:  $15^{\circ}\text{C}$ 、4800 rpm，15 分鐘
- 加入保護劑：(1) 去離子水 or (2) 1%麥芽糖 or (3) 10%麥芽糖 or (4) 10%甘露糖醇 (w/v)
- 初始 NTU-1 濃度： $0.54 \sim 1.49 \times 10^9$  CFU/mL
- 冷凍菌液體積：5 mL
- 冷凍溫度及時間： $-20^{\circ}\text{C}$ ，24 小時
- 真空乾燥條件： $-50^{\circ}\text{C}$  以下，100 mTorr 以下，24 小時
- 存放條件：真空封瓶後於  $30^{\circ}\text{C}$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ 、 $-20^{\circ}\text{C}$  下存放 0，10，30 天
- 復水培養基：MSM 礦物培養基 5 mL (初始體積)
- 復水條件： $30^{\circ}\text{C}$  下於迴旋式培養箱中搖晃 10 分鐘
- NTU-1 存活率計算 (%) = 
$$\frac{\text{乾燥 NTU-1 復水後的濃度 } (\frac{\text{CFU}}{\text{mL}})}{\text{初始 NTU-1 濃度 } (\frac{\text{CFU}}{\text{mL}})} \times 100$$

接下來分別討論以 NB 培養之 NTU-1 加入不同保護劑並經過冷凍及冷凍乾燥後的細胞存活率，同時討論存放溫度與時間對於細胞存活率的影響。

首先探討 NTU-1 在冷凍後的細胞存活率，如圖 4.2.1-1 表示。在濃縮的 NTU-1

中加入不同保護劑並以加入去離子水的組別作為對照組，經過  $-20^{\circ}\text{C}$  下冷凍 24 小時後，置放於  $30^{\circ}\text{C}$  下的環境 10~15 分鐘使其解凍，並利用平板計數法來計算活菌數。冷凍造成的傷害主要在於冰晶的形成會破壞細胞膜，且當水結成冰後細胞質中殘餘部分的溶液濃度會增大，易引起胞內 pH 和離子強度改變，使有害化學反應速率的提高，造成蛋白質變性及細胞膜破壞 (Bozoglu *et al.* 1987)。由實驗結果圖 4.2.1-1 可以看出不管 NTU-1 是加入不同保護劑或是加入沒有任何保護作用的去離子水，其存活率在冷凍後皆接近 100%。這個實驗結果顯示冷凍產生的冰晶並不會造成 NTU-1 的傷害。

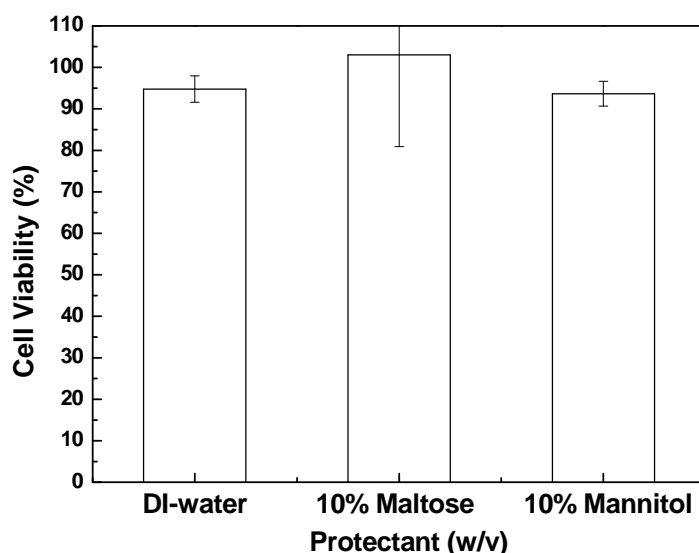


圖 4.2.1-1 不同保護劑下，以 NB 培養的 NTU-1 在  $-20^{\circ}\text{C}$  冷凍 24 小時後的存活率。

接著探討在真空冷凍乾燥後直接進行復水動作的 NTU-1 存活率，實驗結果如圖 4.2.1-2 所示。由於在乾燥的過程中，細菌表面快速的失去水份，使其容易因為脫水而損害了細胞的活性，也可能導致脂類或蛋白質氧化反應，產生自由基，降低細胞活性 (Selmer Olsen *et al.* 1999)。由實驗結果圖 4.2.1-2 我們可以看到添加去離子水的組別，其 NTU-1 的存活率約為 60% 左右，相較於利用 10% 麥芽糖 (約 97%) 或 10% 甘露糖醇為保護劑的組別 (約 85%) 來得低，顯示在乾燥的過程中，保護劑的添加對於 NTU-1 的存活率是有正面的幫助。Bozoglu 等學者於 1987

年提出，冷凍乾燥後微生物的存活率為初始菌數的 0.1%時即足以使微生物繼續繁殖下去 (Bozoglu *et al.* 1987)。而實驗中添加去離子水的 NTU-1 進行冷凍乾燥後仍具有 60%的存活率，顯示 NTU-1 具有相當的抗凍、抗脫水的特性，主要可能是因為 NTU-1 是一種細胞壁擁有分枝酸 (mycolic acid) 的放線菌，因此其細胞表面具有抵抗化學性傷害、疏水性以及抵禦脫水等性質 (Collins *et al.* 1982)，故其在冷凍乾燥後仍能維持較高的存活率。

至於兩種不同種類的保護劑來比較可以看出雙糖類的麥芽糖其保護效果較多元醇類的甘露糖醇來得高，顯示以麥芽糖為保護劑是 NTU-1 較佳的選擇。麥芽糖屬於雙糖類，而糖類的保護機制於文獻回顧中已有稍作介紹，其主要可以在冷凍期間穩定脂質雙層膜且醣類上的氫氧基能與水分子結合，避免冰晶之形成 (Burke 1986)。同時，醣類的氫氧基能於乾燥期間取代細胞膜結構水，亦能藉由以氫鍵結合細胞膜上蛋白質的極性端而避免蛋白質變性 (Leslie *et al.* 1995)。多元糖醇的保護機制與糖類相似，而甘露醇大量被用來當作冷凍乾燥時的保護劑主要是因為其物理穩定性，不易被氧化，可提供支持結構、非吸濕性以及良好的化學惰性 (不與氨基反應)，因而適用於冷凍乾燥時添加的保護劑。

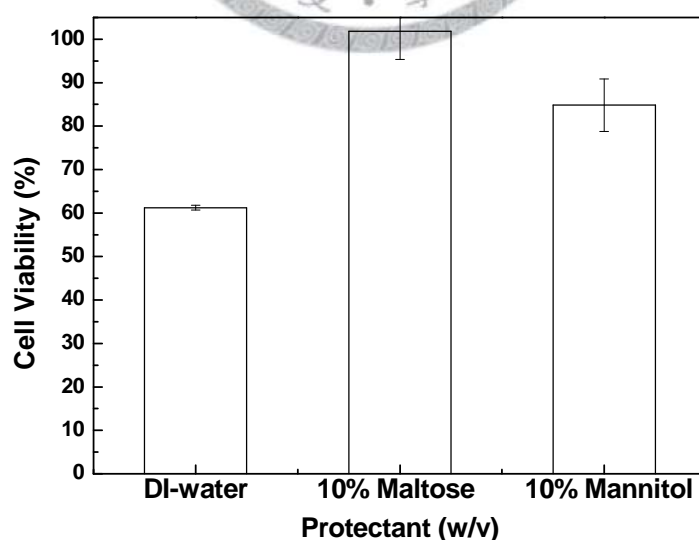


圖 4.2.1-2 不同保護劑下，以 NB 培養的 NTU-1 經過冷凍乾燥後馬上進行復水的細胞存活率。

接下來探討冷凍乾燥後貯存溫度的選擇及存放的時間，實驗測試了三個保存溫度，分別是 $-20^{\circ}\text{C}$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ 及 $30^{\circ}\text{C}$ 且存放於這些溫度下0、10及30天後來進行NTU-1存活率的實驗，以圖4.2.1-3 (A)  $-20^{\circ}\text{C}$ 、(B)  $4^{\circ}\text{C}$ 、(C)  $30^{\circ}\text{C}$ 表示。由實驗結果圖4.2.1-3可以很明顯看出，不管是哪一種保護劑的添加，菌體存放的溫度越高，死亡率隨著存放時間增長也跟著提高。故當保存的溫度為 $-20^{\circ}\text{C}$ 時，細胞的存活率最高， $4^{\circ}\text{C}$ 次之，而 $30^{\circ}\text{C}$ 的組別則存活率為最低。造成如此的差異主要是由於在乾燥過程中，引起蛋白質變性的時間尺度為小時；然而對於貯存而言，時間的尺度通常較長，是日、月甚至是年，因此當乾燥後的菌株貯存溫度越低時，細胞狀態較穩定，也可降低細胞膜上脂肪酸的氧化反應、延緩蛋白質的變性，因而存活率也會較高 (Castro *et al.* 1995)。

當了解不同保護劑的選擇及存放的溫度對於冷凍乾燥後NTU-1存活率的影響後，另一個重點即是存放時間的長短，其對於微生物的保存也非常重要。因為冷凍乾燥菌株的目的就是希望能長時間的保存菌株，希望在經過長時間的保存後還能維持很高的存活率，並維持其生理特性。由圖4.2.1-3可以看出隨著存放的時間增加，細菌的存活率會逐漸降低，其中以存放溫度為 $30^{\circ}\text{C}$ 下的存活率下降最快，而貯放溫度為 $-20^{\circ}\text{C}$ 及 $4^{\circ}\text{C}$ 且有加入保護劑的實驗組別細菌在經過30天的存放後仍具有相對高的存活率。

同時由圖4.2.1-3也可以看出三種添加的保護劑中，以麥芽糖的保護效果較好，其在 $-20^{\circ}\text{C}$ 下經過30天的存放，存活率仍有80%左右；存放在 $4^{\circ}\text{C}$ 經過30天也有70%左右的存活率，甚至將存放溫度提高到 $30^{\circ}\text{C}$ ，經過30天也仍有65%左右的存活率。這個現象顯示出以NB培養的NTU-1，適合利用麥芽糖來作為冷凍乾燥時的保護劑並適合存放在 $-20^{\circ}\text{C}$ 的環境中，這樣的條件可以使乾燥後的NTU-1經過長時間的存放後仍具有很高的存活率。

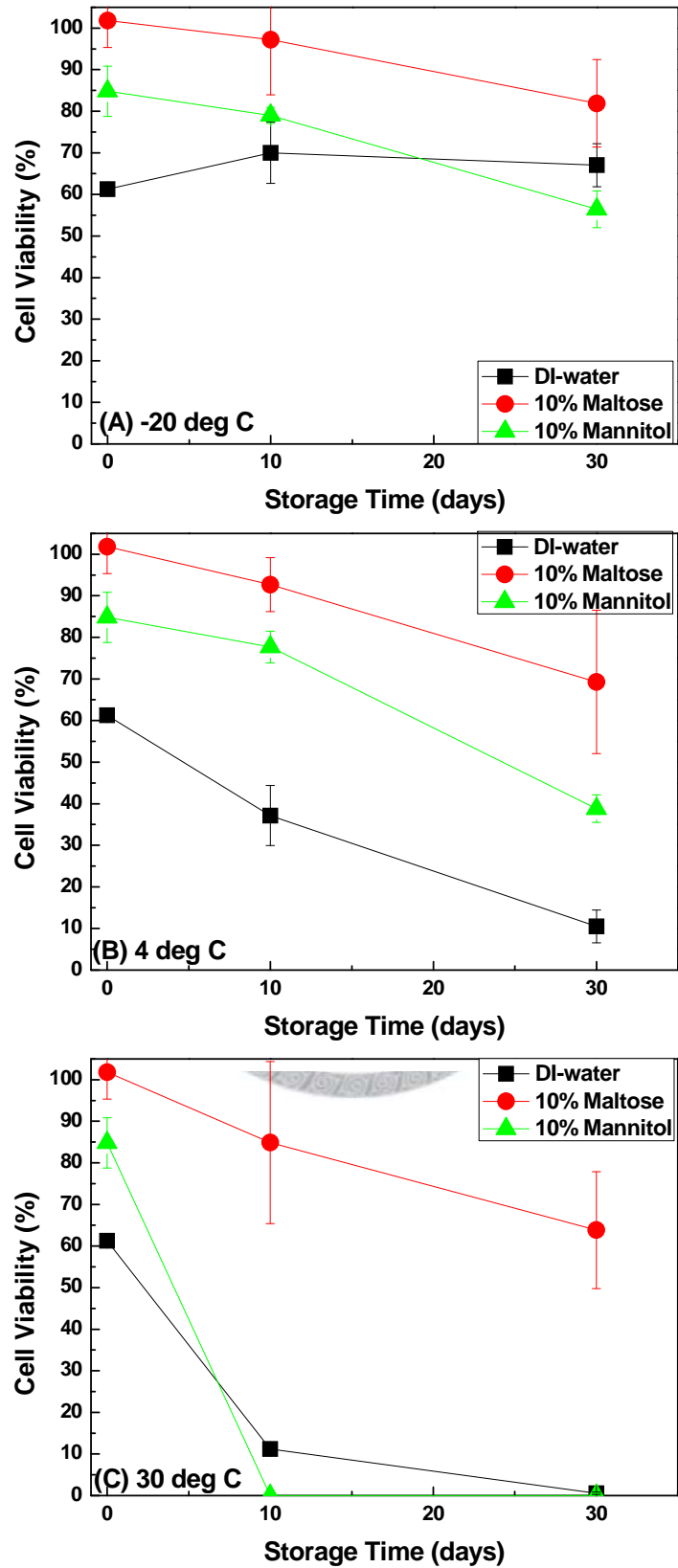


圖 4.2.1-3 以 NB 培養的 NTU-1，添加不同保護劑並在冷凍乾燥後存放於不同溫度下 0，10 及 30 天後的存活率。(A)  $-20^{\circ}\text{C}$ 、(B)  $4^{\circ}\text{C}$ 、(C)  $30^{\circ}\text{C}$ 。

由以上實驗結果可知道以麥芽糖溶液作為 NTU-1 冷凍乾燥時的保護劑是較佳的選擇，故接下來測試不同濃度的麥芽糖溶液來探討不同濃度對於 NTU-1 的保護效果是否會有明顯的差異。我們以保護劑 1% 及 10% 濃度的麥芽糖測試了三個不同的貯存溫度，分別為  $-20^{\circ}\text{C}$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  及  $30^{\circ}\text{C}$ ，且存放於這些溫度下 0、10 及 30 天後進行細菌存活率的實驗，實驗結果以圖 4.2.1-4 (A)  $-20^{\circ}\text{C}$ 、(B)  $4^{\circ}\text{C}$ 、(C)  $30^{\circ}\text{C}$  表示。

由圖 4.2.1-4 可以看出以 1% 麥芽糖的溶液作為保護劑，其保護效果仍然是非常的好，其在  $-20^{\circ}\text{C}$  下經過 30 天的存放，存活率仍有 92% 左右；存放在  $4^{\circ}\text{C}$  經過 30 天也有 89% 左右的存活率，甚至將存放溫度提高到  $30^{\circ}\text{C}$ ，經過 30 天也仍有 51% 左右的存活率。顯示了濃度約為  $10^9$  CFU/mL 的 NTU-1 細胞並不需要太高濃度的麥芽糖就可以提供相當的保護效果。



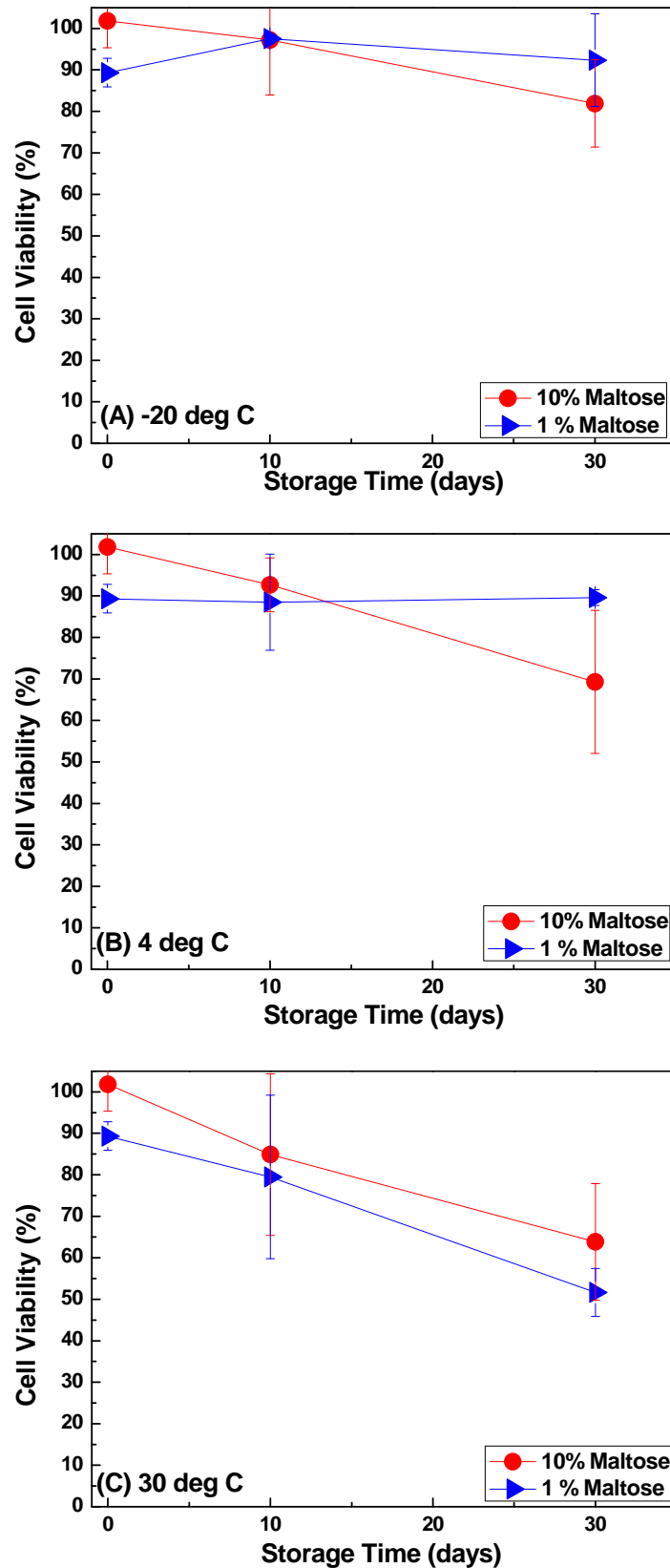
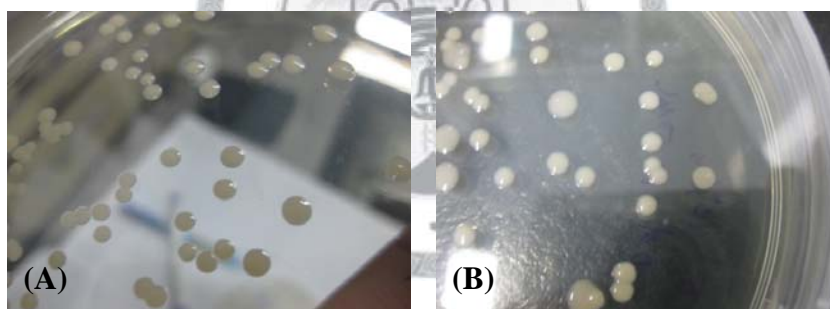


圖 4.2.1-4 以 NB 培養的 NTU-1，添加保護劑 1%或 10%麥芽糖溶液並在冷凍乾燥後存放於不同溫度下 0，10 及 30 天後的存活率 (A) -20°C、(B) 4°C、(C) 30°C。

#### 4.2.2 以 NB 培養的 NTU-1 經過冷凍乾燥後對於正十六烷降解及包覆能力探討

接下來的實驗將討論經過冷凍乾燥後的 NTU-1，對正十六烷的生物降解及包覆能力是否會受到影響。由於 4.2.1 節中發現利用 NB 培養的 NTU-1 在選擇正確的保護劑並進行冷凍乾燥後仍然具有相當高的存活率，由菌落形態也可以看出其與初始的菌落形態並沒有差異，如照片 4.2.2-1 所示。故推測 NTU-1 的細胞生理特性應該不會因為冷凍乾燥的這個步驟而受到影響或改變。為了確定此項推論，我們測試以 1% 麥芽糖作為 NTU-1 冷凍乾燥的保護劑，並在冷凍乾燥後來進行正十六烷生物復育實驗，探討其生物降解及包覆的效果為何。



照片 4.2.2-1 以 1% 麥芽糖為保護劑不同條件下的菌落形態。(A) 初始 NTU-1 菌落形態；(B) 冷凍乾燥的 NTU-1 進行復水後的菌落形態。

實驗條件如下：

- 培養基 pH 值：7 → 6.8 (滅菌後)
- 培養基正十六烷濃度：2000 ppmv
- 培養基體積：100 mL
- 培養溫度：30°C
- 篩網孔徑大小：10 mesh (1.7 mm)

- 篩網折角：180°
- 培養箱及轉速：迴旋式恆溫培養箱 100 rpm
- 初始植菌量：1%麥芽糖為保護劑冷凍乾燥後的 NTU-1，以初始體積 5 mL MSM 礦物培養基進行復水後，測得初始濃度： $9 \times 10^8$  CFU/mL。
- 存放條件：-20°C 下，10 天
- 分析時間點：20、32、44、56、68 hr

接下來觀察討論實驗中培養基酸鹼值變化，細胞生長曲線、正十六烷生物降解量及總移除效率。實驗結果以圖 4.2.2-1~4 表示。由圖 4.2.2-1 可以看出培養基內的酸鹼值一樣會隨著時間的增加而下降，到達第 44 小時以後即為持在 4 左右，主要的原因與 4.1 節中所討論的一樣，因為在 32~44 小時間，NTU-1 即形成結塊並把未降解的正十六烷給包覆起來且此時 pH 值已下降到 4 左右，不利 NTU-1 繼續生長，而使培養基酸鹼值維持在 4 附近。

由 NTU-1 生長曲線圖 4.2.2-2 可觀察到隨著時間的增加，NTU-1 的細胞密度也會增加，不過可看到 NTU-1 細胞密度在第 32 小時後即長到 0.3 g/L，且開始呈現持平的趨勢。推測這是因為在這一組實驗下，初始的植菌密度 (0.065 g/L) 相對於 4.1.2.1 節 (約 0.035 g/L) 中高，而培養基中含有保護劑麥芽糖可作為 NTU-1 的另一個碳源，故細胞生長速率較快，且在第 35 小時左右即會形成細菌結塊，因而 NTU-1 細胞密度約在第 32 小時候即呈現持平的狀態。

接著探討圖 4.2.2-3 正十六烷的生物降解量，圖中可以看到 NTU-1 降解正十六烷的情形與 4.1.2.1 節中以液態 NTU-1 植菌液作為菌種來源的趨勢差不多。在形成結塊後，正十六烷的降解速率即開始趨緩，到達第 68 小時約可降解掉 600 ppmv。

最後將實驗中的正十六烷生物降解量及包覆量匯集成圖 4.2.2-4，由此圖也可看出正十六烷的移除效果在第 44 小時以後即可達到 95% 以上，在第 68 小時約可以降解掉 600 ppmv 及包覆 1380 ppmv 的正十六烷。這樣的結果顯示，以 NB 培

養的 NTU-1 在經過冷凍乾燥且存放的步驟後，其生物降解及包覆的能力皆不會受到影響。

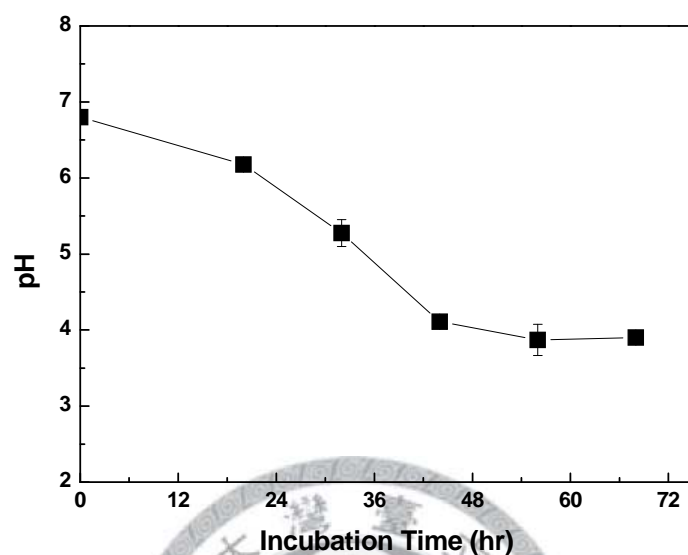


圖 4.2.2-1 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，培養基中加入以保護劑 1%麥芽糖冷凍乾燥後的 NTU-1，處理 2000 ppmv 正十六烷時之酸鹼值變化。

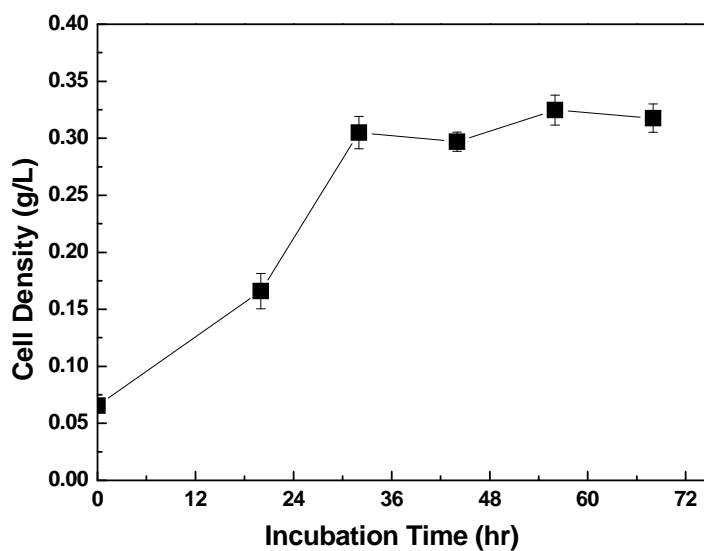


圖 4.2.2-2 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，培養基中加入以保護劑 1%麥芽糖冷凍乾燥後的 NTU-1，處理 2000 ppmv 正十六烷時之細胞密度變化趨勢。

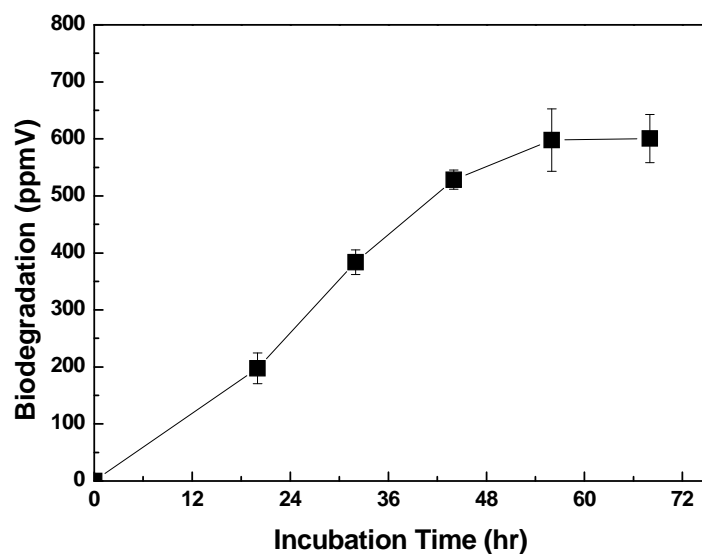


圖 4.2.2-3 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，培養基中加入以保護劑 1%麥芽糖冷凍乾燥後的 NTU-1，處理 2000 ppmv 正十六烷時之正十六烷生物降解量。

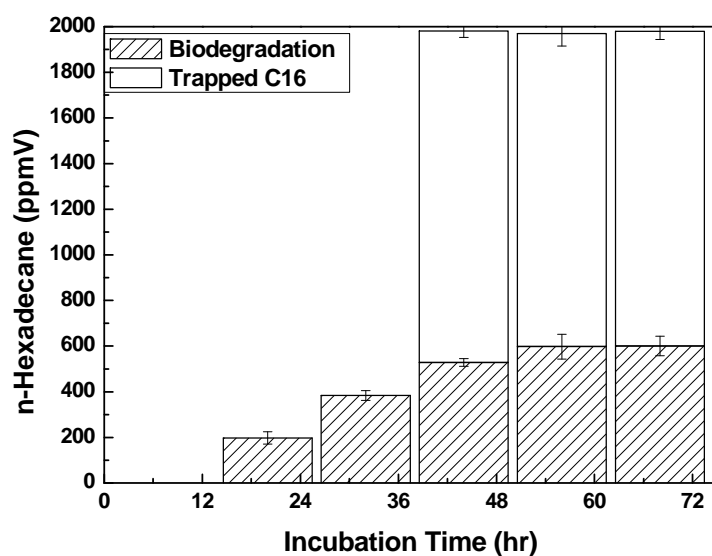


圖 4.2.2-4 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，培養基中加入以保護劑 1%麥芽糖冷凍乾燥後的 NTU-1，處理 2000 ppmv 正十六烷時之正十六烷生物降解量及包覆量比較。

### 4.2.3 討論

大部分的文獻指出，海藻糖及蔗糖為糖類中最佳的保護劑，使菌株在冷凍乾燥後仍維持很高的存活率 (Berny and Hennebert 1991, Morgan *et al.* 2006)。而本實驗中採用的保護劑為實驗室現有的藥品，且由實驗結果發現以麥芽糖為保護劑也可提供 NTU-1 相當的保護性。另外實驗發現以去離子水加入 NTU-1 並進行冷凍乾燥，存放於 $-20^{\circ}\text{C}$ 下經過 30 天以後，NTU-1 仍維持約有 70% 的存活率，顯示 NTU-1 本身的抗冷凍及抗乾燥的能力很強，主要可能是跟其細胞表面的特性有關，其為革蘭氏陽性且表面具有分枝酸 (mycolic acid) 的放線菌。在存放溫度方面，貯存於 $-20^{\circ}\text{C}$ 下的環境 NTU-1 存活率最高。

並由 4.2.2 節實驗證實，NTU-1 在經過冷凍乾燥後，其生物降解及包覆烷類的能力並不會受到影響，故我們可以利用冷凍乾燥的方法來進行 NTU-1 (NB 培養) 的保存，使其能在長時間貯藏下仍具有其生理特性。而接下來也將探討冷凍乾燥對於以正十六烷培養形成的 NTU-1 細菌結塊的影響，進一步研究其對於正十六烷生物復育的應用。

### 4.3 利用正十六烷培養的 NTU-1 細菌結塊冷凍乾燥後其存活率及降解包覆能力探討

由 4.2 節中知道以 NB 培養後的 NTU-1 進行冷凍乾燥時，可以加入麥芽糖溶液作為保護劑，使其在冷凍乾燥後仍具有相當高的存活率。這一章節中，我們將 4.2 節中所用到的保護劑加入利用正十六烷培養產生的 NTU-1 細菌結塊上，希望這些保護劑也可以在形成結塊後的 NTU-1 上產生保護作用。將正十六烷培養後的 NTU-1 細菌結塊進行冷凍乾燥的目的是為了大量貯存這些乾燥後的細菌結塊，希望其能在短時間內再次形成結塊把正十六烷包覆起來並降解，進而省去 NTU-1 培養的時間在短時間內移除烷類。

實驗中因為利用正十六烷培養的 NTU-1 會形成顆粒或圓球狀的細菌結塊，不像利用 NB 培養時的 NTU-1 可以均勻的分散於溶液中，故沒辦法利用計算菌落數的方法來計算 NTU-1 結塊的存活率，只能將乾燥後的 NTU-1 細菌結塊與碳源正十六烷再加入礦物培養基進行培養，間接的藉由培養基中酸鹼值的變化及細胞密度的變化來判斷乾燥後的 NTU-1 結塊是否仍具有活性，並探討冷凍乾燥後的細菌結塊對於正十六烷包覆降解的效果。

#### 4.3.1 NTU-1 細菌結塊降解及包覆正十六烷的能力（未經冷凍乾燥）

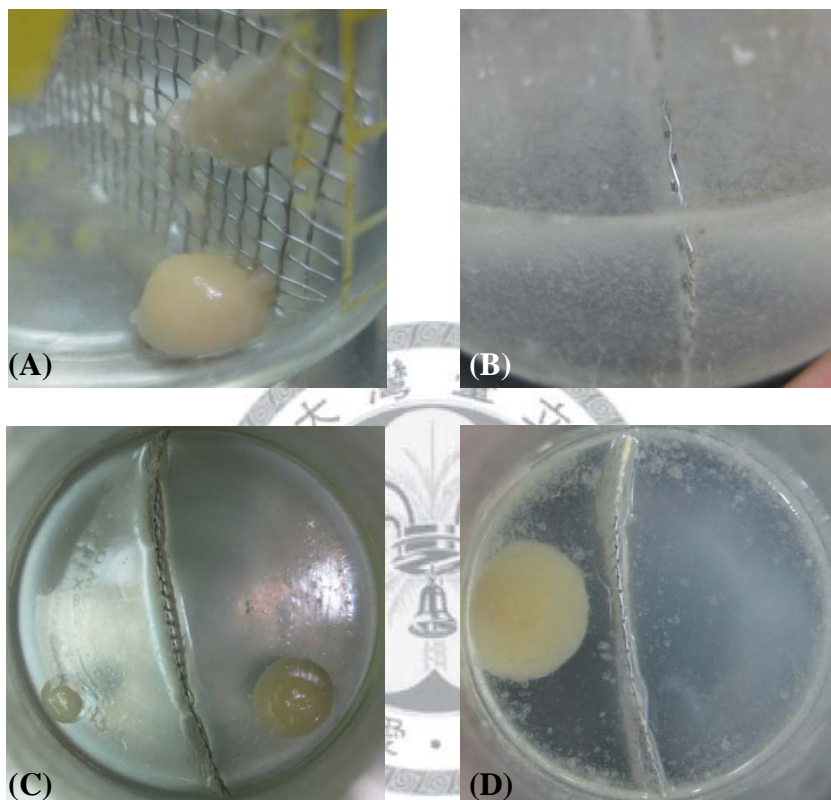
在進行 NTU-1 細菌結塊冷凍乾燥以前，必需先知道 NTU-1 在利用正十六烷後形成的細菌結塊是否具有再包覆及降解新添加正十六烷的能力，同時觀察培養基酸鹼值及細胞密度隨時間的變化。

實驗條件如下：

- 培養基 pH 值：7 → 6.8 (滅菌後)
- 初始植菌量：5 mL 液態礦物培養基菌液 ( $OD_{600} \doteq 1$ )
- 培養基體積：100 mL
- 更換培養積時間：第 72、102 小時
- 培養基總正十六烷濃度：2000 (0 – 72 hr)、4000 (72 – 102 hr)、6000 (102 – 146 hr) ppmv
- 添加正十六烷時間：第 0、72、102 小時
- 篩網孔徑大小：10 mesh (1.7 mm)
- 篩網折角：180°
- 培養溫度：30°C
- 培養箱及轉速：迴旋式恆溫培養箱 100 rpm
- 分析時間點：第 72、102、146 小時

實驗流程如下：首先利用 2000 ppmv 正十六烷來培養 NTU-1，經過 72 個小時以後，NTU-1 已形成聚集體並把未降解的正十六烷包覆於其中，此時將結塊與培養基分離，如照片 4.3.1-1 (A) 所示。並於含結塊的錐形瓶中再加入 100 mL 新的 MSM 培養基，使酸鹼值回復到初始值 6.8。同時分析培養三天後分離培養基的酸鹼值、殘餘正十六烷的量及殘餘在培養基中的細胞密度。錐形瓶中加入新的 MSM 培養基後，同時重新再添加 2000 ppmv 的正十六烷，並置於 30°C 迴旋式培養箱中培養，觀察形成結塊的 NTU-1 是否能因為培養基中酸鹼值回復到適合生長的值而再繼續降解包覆正十六烷。反應經過 5 個小時可發現 NTU-1 結塊會分散成結塊前的棉絮狀聚集體，如照片 4.3.1-1 (B) 所示。經過 30 個小時以後，NTU-1 會重新聚集形成結塊，使培養基呈現澄清的狀態，如照片 4.3.1-1 (C) 所示。此時又將培養基與細菌結塊分離並測量培養基中的酸鹼值、殘餘正十六烷的量及殘餘細胞的密度。接著如上面的步驟再加一次新的培養基及 2000 ppmv 的正

十六烷。反應時間再經過約 44 小時後可以看到錐形瓶中生成的結塊比在第 72、102 小時都來得大一些，如照片 4.3.1-1 (D) 所示，顯示 NTU-1 的細菌結塊能因為培養基酸鹼值的提升及添加入新的正十六烷而繼續生長並形成更大的結塊將正十六烷包覆於其中。



照片 4.3.1-1 NTU-1 細菌結塊在重新更換培養基及添加 2000 ppmv 正十六烷後，不同時間下，細胞結塊的情形。(A) 反應經過 72 小時後，移除培養基；(B) 第 77 小時；(C) 第 102 小時；(D) 第 146 小時。

接下來分別來探討培養過程中培養基酸鹼值變化、NTU-1 細胞密度變化及培養過程中正十六烷殘餘在培養基的量、降解量及包覆量的分布情形，如圖 4.3.1-1 ~ 3 所示。

由圖 4.3.1-1 培養基中酸鹼值變化的趨勢可以看到隨著培養時間的增加，NTU-1 降解正十六烷產生酸性的代謝物使 pH 值下降。當反應到第 72 個小時後，將培養基移除並更換成新的培養基，使 pH 值回復到 6.8，同時再加入新的正十六烷，再經過約 30 個小時後已有明顯的 NTU-1 細菌結塊形成且 pH 值會由 6.8 降至 4.3 左右。此時再將結塊與培養基分離並加入新的培養基及正十六烷，再經過 44 小時以後，NTU-1 再次聚集包覆大部分未降解的正十六烷形成更大的細菌結塊且 pH 值也由 6.8 降到 4 左右。這個現象顯示了結塊後的 NTU-1 能在較短時間內利用新添加的正十六烷且重新聚集形成結塊並包覆未降解的正十六烷。

接著來看圖 4.3.1-2 細胞密度的變化趨勢圖，由於實驗中是利用形成結塊後的 NTU-1 來作為每次更換培養基及添加正十六烷的細菌來源，所以無法在第 72 及 102 小時來測得 NTU-1 細菌結塊的乾重，只能測得殘餘在舊培養基中的細胞密度。但由 4.1.2.1 節的實驗中可知道加入篩網的實驗組別中，在培養時間至 68 小時的細胞密度皆約為 0.3 g/L。本節實驗結果發現反應時間到 146 個小時所測得的總細胞密度約有 0.7 g/L (約有 0.6 g/L 為細胞結塊、0.1 g/L 為殘餘在培養基中的細胞密度)。由此可知，NTU-1 細菌結塊會隨著更換培養基及添加新的正十六烷而成長，細胞密度也會提升。

圖 4.3.1-3 為 NTU-1 細菌結塊重新更換 MSM 培養基及添加 2000 ppmv 正十六烷後，不同時間下培養基中正十六烷分布的變化。這個部分與細胞密度的測量一樣，由於是利用形成結塊後的 NTU-1 來作為每次更換培養基及添加正十六烷的細菌來源，所以無法在第 72 及 102 小時測得 NTU-1 細菌結塊內包覆的正十六烷量，只能測得其殘餘在 MSM 培養基中的正十六烷。而因為知道初始添加正十六烷的量，也知道殘餘在培養基中正十六烷的量，所以可以推出正十六烷的總移除量 (總移除量 = 烷類的初始添加量 - 烷類殘餘量)。圖上的黑線代表的是不

同時間的總正十六烷量 (72 小時前培養基內正十六烷的總量有 2000 ppmv、72 ~ 102 小時之間總正十六烷的量有 4000 ppmv 而 102 ~ 146 小時間總正十六烷的量為 6000 ppmv)。由圖 4.3.1-3 可以看出在第 72 小時就可以移除掉約 1920 ppmv 的正十六烷，在第 102 小時內則可移除掉約 3700 ppmv 的正十六烷。而到達第 146 小時後，NTU-1 總共約包覆了 3600 ppmv 的正十六烷而降解掉 1900 ppmv 的正十六烷，使 6000 ppmv 的正十六烷在 146 小時內移除掉 90% 以上。

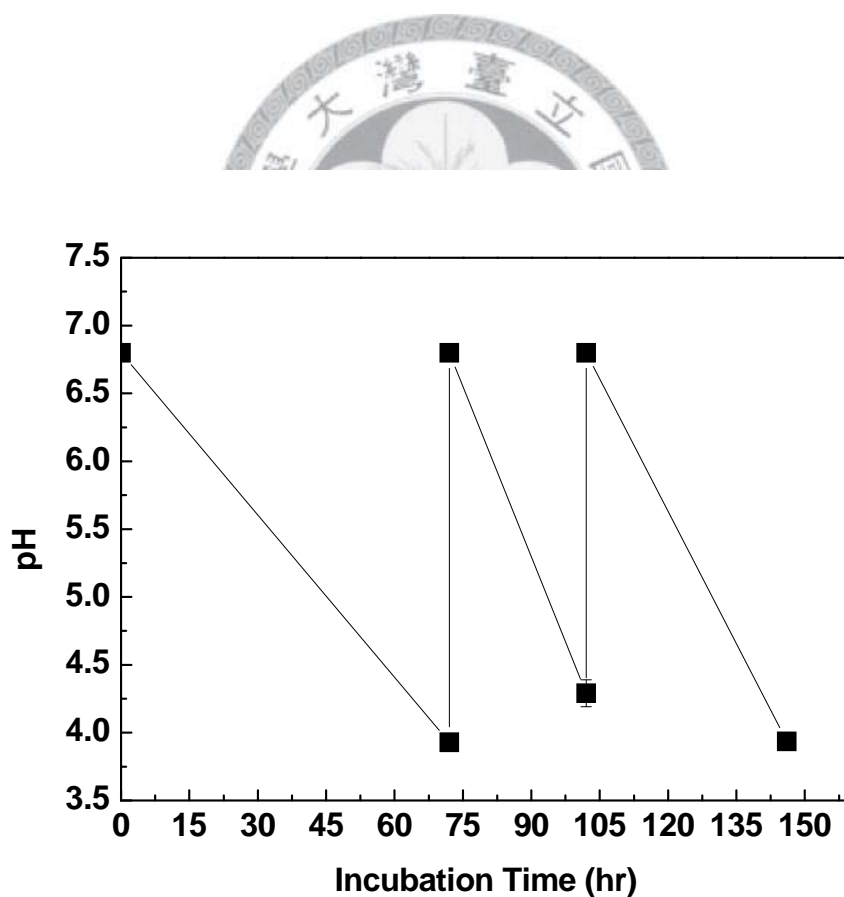


圖 4.3.1-1 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 形成細菌結塊後重新更換 MSM 培養基及添加 2000 ppmv 正十六烷，不同時間下培養基中酸鹼值的變化。(更換 MSM 時間：第 72、102 小時)。

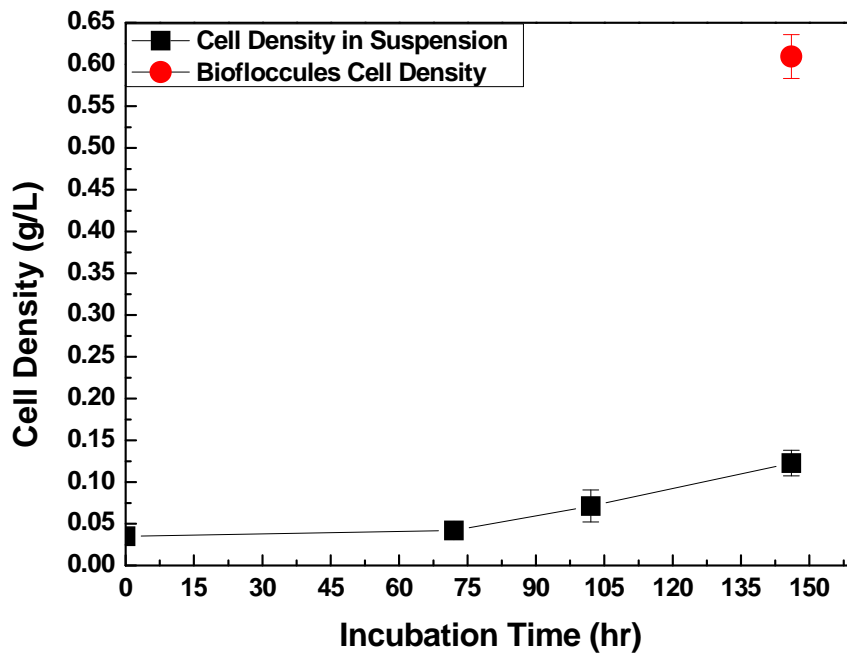


圖 4.3.1-2 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 形成細菌結塊後重新更換 MSM 培養基及添加 2000 ppmv 正十六烷，不同時間下培養基中細胞密度的變化。(更換 MSM 時間：第 72、102 小時)。

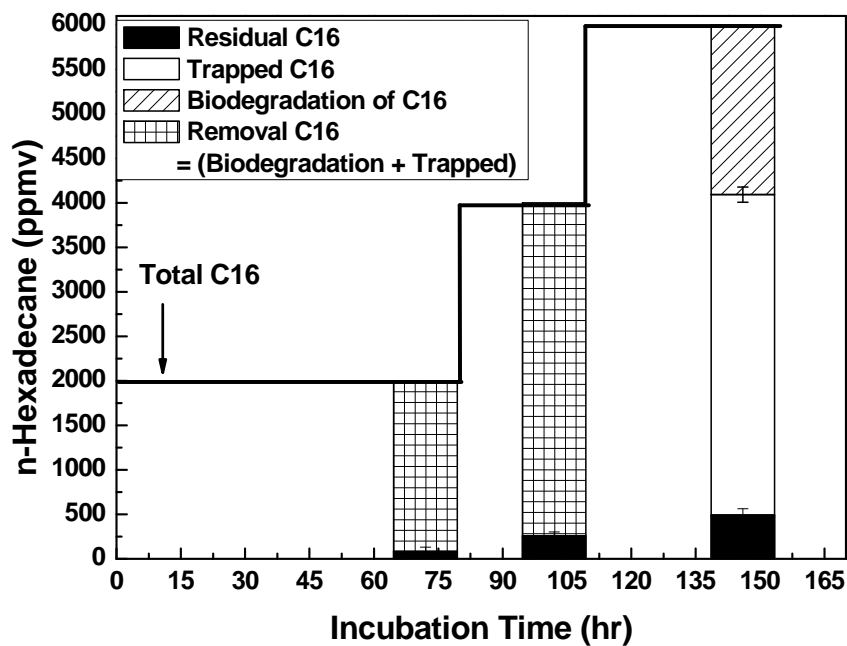


圖 4.3.1-3 培養條件 30°C、迴旋式搖晃培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，NTU-1 形成細菌結塊後重新更換 MSM 培養基及添加 2000 ppmv 正十六烷，不同時間下培養基中正十六烷分布的變化。(更換 MSM 時間：第 72、102 小時)。

### 4.3.2 NTU-1 細菌結塊在冷凍乾燥後降解及包覆正十六烷的能力

將 NTU-1 細菌結塊冷凍乾燥的目的在於大量且長期的儲存乾燥的細菌結塊，因而一有需要時就能馬上應用，希望其可在短時間內重新形成聚集進而移除掉污染源碳氫化合物。

4.3.1 節中確定了未經冷凍乾燥的 NTU-1 細菌結塊能夠因為培養基的更換及添加入新的正十六烷而繼續生長並能降解且包覆掉大部分未降解的正十六烷。在這個過程中，培養基的酸鹼值會降低且細胞的密度也會隨時間增加。另外，由 4.2 節知道以 NB 培養的 NTU-1 在冷凍乾燥後仍維持一定的活性，且對正十六烷仍有很好的移除效果。故接下來將探討冷凍乾燥後的 NTU-1 細菌結塊是否具有相同的特性，能使正十六烷在短時間被包覆降解，並能使細胞密度提升及使培養基的酸鹼值降低。實驗中分別會討論幾個不同初始克數的乾燥 NTU-1 結塊對於正十六烷復育實驗結果。

由於冷凍乾燥過程中，有添加保護劑來減少冷凍乾燥對於 NTU-1 細菌結塊的傷害，所以乾燥後的產品除了細菌結塊以外，其他大部分皆為乾燥後的保護劑，故無法很準確的量測我們加入的初始 NTU-1 細菌結塊之重量，不過大概可以將其固定在某一個範圍內。下面則分別討論幾個初始乾燥後 NTU-1 細菌結塊重量 (每 100 mL 的 MSM 礦物培養基)：(1) 初始乾燥 NTU-1 結塊重量為 0.024 ~ 0.025 g。(2) 初始乾燥 NTU-1 結塊重量為 0.007 ~ 0.008 g。(3) 初始乾燥 NTU-1 結塊重量為 0.018 ~ 0.02 g。

### (1) 初始乾燥 NTU-1 結塊重量為 0.024 ~ 0.025 g

首先選擇加入的初始 NTU-1 細菌結塊重量為 0.024 ~ 0.025 g，主要是因為在 4.1 節的實驗中發現利用液態礦物培養基菌液來進行正十六烷生物復育實驗時，當 NTU-1 長到約 0.02 g (每 100 mL 礦物培養基) 以上時就會聚集形成結塊並把未降解的正十六烷包覆起來。接下來的實驗會探討不同的保護劑、不同存放溫度及時間對於乾燥後 NTU-1 結塊之降解包覆能力的影響。

實驗條件如下：

- NTU-1 結塊製備：5 mL ( $OD_{600} \doteq 1$ ) 礦物培養基菌液與 2000 ppmv 正十六烷 加入 100 mL MSM 礦物培養基，培養 3 天後取得 NTU-1 細菌結塊。
- 保護劑：10%麥芽糖或 10%甘露糖醇 (w/v)
- 混合 NTU-1 結塊與保護劑：NTU-1 結塊重與保護劑重量比值控制在 0.1 左右，即  $\frac{\text{NTU-1 結塊重 (g)}}{\text{保護劑重 (g)}} \doteq 0.1$
- 冷凍條件：-20°C 下冷凍 24 hr
- 真空乾燥條件：-50°C 以下，100 mTorr 以下，24 小時
- 乾燥後存放條件：
  - 10%麥芽糖組：0 天
  - 10%甘露糖醇組：-20°C 下 30 天
- 乾燥後初始取樣重量 (保護劑 + NTU-1 結塊)：
  - 10%麥芽糖組：0.249 ( $\pm 0.0013$ ) g
  - 10%甘露糖醇組：0.283 ( $\pm 0.008$ ) g
- 乾燥後初始 NTU-1 結塊重量 (經過加入培養基復水後以 0.3  $\mu\text{m}$  濾紙過濾)：
  - 10%麥芽糖組：0.0238 ( $\pm 0.0008$ ) g
  - 10%甘露糖醇組：0.0256 ( $\pm 0.0005$ ) g

- 培養基 pH 值：7 → 6.8 (滅菌後)
- 添加培養基正十六烷濃度：2000 ppmv
- 培養基體積：100 mL
- 培養溫度：30℃
- 培養箱及轉速：往復式恆溫震盪水槽，100 rpm
- 分析時間點：第 12、24、36、48 小時

這部分的實驗中皆採取添加濃度為 10% 的保護劑，主要是因為由 4.2 節中可知道以麥芽糖為保護劑時，不管是 1% 或是 10% 的濃度皆能對 NB 培養的 NTU-1 產生很好的保護效果。若以重量來比較的話，以 NB 培養的 NTU-1 細胞 ( $OD_{600} \approx 2$ ) 在 5 mL 下重量大約為 0.006 g；換算 1% 的麥芽糖 5 mL 下的重量約為 0.05 g，而換算 10% 麥芽糖溶液 5 mL 下重量約為 0.5 g。所以在 NTU-1 細胞與保護劑重量比值約在 0.012 ~ 0.12 時 (即  $\frac{\text{NTU-1 重 (g)}}{\text{保護劑重 (g)}} \approx 0.012 \sim 0.12$ )，保護劑皆能達到保護 NTU-1 的效果。因此，本實驗中將 NTU-1 細菌結塊與保護劑的重量比值控制在 0.1 左右。

實驗流程大至如下：首先我們將 5 mL 礦物培養基 NTU-1 菌液與 200  $\mu$ L 的正十六烷一同加入體積為 100 mL 的礦物培養基，經過培養 72 小時後，利用孔徑大小 14mesh (1.18 mm) 的篩網將形成的 NTU-1 結塊分離放入玻璃真空瓶中，此時每 100 mL 礦物培養基中產生的 NTU-1 結塊量大約為 0.02 ~ 0.025 g。接著我們加入 10% 保護劑 (w/v) 2 mL (NTU-1 細菌結塊與保護劑的重量比值約為 0.1)，將結塊與保護劑充分搖晃混合後，置入 -20℃ 的冰箱冷凍 24 小時。24 小時後進行真空冷凍乾燥的步驟將水份移除，所需時間一樣為 24 小時。冷凍乾燥完成後，將乾燥完成的 NTU-1 結塊在真空下封瓶並置放於不同環境下保存。接著依實驗條件秤取乾燥後的產品，而由於乾燥產品中不僅含有乾燥 NTU-1 結塊且含有乾燥後的保護劑，因而要知道實際初始的 NTU-1 結塊重量，必須先將乾燥後的成

品加入礦物培養基復水之後，再利用 0.3  $\mu\text{m}$  的濾紙過濾，過濾完成後置入烘箱中乾燥，進而測得初始乾燥 NTU-1 結塊量。而我們將乾燥後的產品（含乾燥保護劑及 NTU-1 結塊）與 2000 ppmv 正十六烷再加入 100 mL 礦物培養基後，則開始進行正十六烷的生物復育實驗。

以下以培養基酸鹼值變化、NTU-1 細胞密度分布變化及正十六烷之分布來觀察討論 NTU-1 的生長情形，分別以圖 4.3.2-1~3 表示。由圖 4.3.2-1 中可以發現培養基中酸鹼值的變化在兩組不同保護劑及存放條件下的變化趨勢並不明顯。以 10%麥芽糖為保護劑的組別到達第 48 個小時，培養基酸鹼值的變化大約從 6.8 降到 6.4 左右。而以 10%甘露糖醇為保護劑的組別則更明顯的沒有太大的變化，從第 12 小時開始就維持在 6.6 左右。這個現象顯示了乾燥後 NTU-1 細菌結塊的活性可能很低或是已經不具活性，所以對正十六烷不會進行降解而產生酸性代謝物。

為了更清楚的了解乾燥後的 NTU-1 細菌結塊是否具有活性，接著來看圖 4.3.2-2 NTU-1 細胞密度的分布圖。圖 4.3.2-2 也可明顯看出細胞密度的分布及趨勢，由變化趨勢來看可以看出在 48 小時內，以 10%麥芽糖為保護劑的組別其總細胞密度由初始的 0.24 g/L 增加到 0.29 g/L，變化量在 48 小時中只增加了 0.05 g/L。另外一組以 10%甘露糖醇為保護劑的組別，其細胞密度變化由初始的 0.25 g/L 到第 48 小時約為 0.27 g/L，也只提升了 0.02 g/L。由這樣的變化趨勢來看可以知道細胞的生長速率很緩慢甚至可以說是幾乎沒有生長，再次的顯示乾燥後的 NTU-1 結塊活性很低。

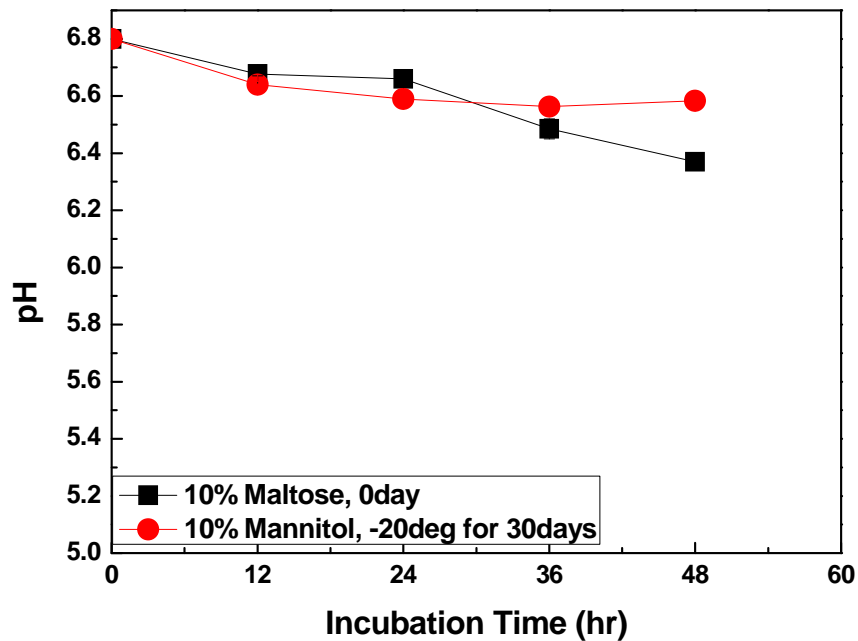


圖 4.3.2-1 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊 (以 10%麥芽糖或 10%甘露糖醇為保護劑)，處理 2000 ppmv 正十六烷時之酸鹼值變化。

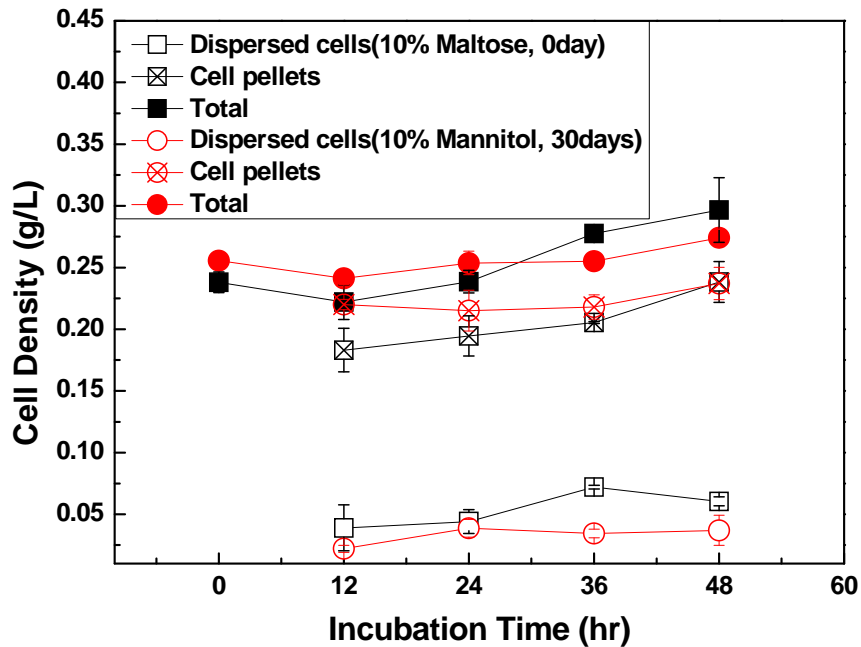


圖 4.3.2-2 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊 (以 10%麥芽糖或 10%甘露糖醇為保護劑)，處理 2000 ppmv 正十六烷時之細胞密度分布及變化趨勢。

接著將初始正十六烷的量及反應過程中正十六烷殘餘在培養基及被 NTU-1 細菌結塊包覆的量匯集成圖 4.3.2-3。由圖中第 0 個小時來看，可以看出初始正十六烷的濃度不只有實驗中所添加的 2000 ppmv，而有 2500~2600 ppmv 左右。這是因為實驗中是先利用 NTU-1 礦物培養基菌液來降解正十六烷並聚集形成結塊，接著利用這些細菌結塊來進行冷凍乾燥，所以乾燥後的 NTU-1 細菌結塊上含有一些殘留的正十六烷，乾燥後 NTU-1 細菌結塊如照片 4.3.2-1 (A)、(B) 所示。因而當將乾燥後的結塊加入 MSM 礦物培養基時，同時也會把一部分的正十六烷帶進到培養基中。

實驗過程中發現反應經過 1~2 小時以後，NTU-1 乾燥的粉末就能再形成結塊把正十六烷包覆起來，但結塊形成的初期形態顯得較鬆散，且由於我們希望能看到細胞生長的情形，所以選擇把分析的時間延長至第 12 個小時才開始取第一個點。

由正十六烷分布圖 4.3.2-3 可以看出，乾燥後的 NTU-1 結塊能在 12 小時內把大部分在培養基中的正十六烷給包覆起來因而能以 60 mesh 的篩網來進行分離。其結塊形態如照片 4.3.2-1 (C)、(D) 所示。但隨著時間的增加，正十六烷包覆的量並沒有明顯的提升，顯示在第 12 小時以內，NTU-1 能包覆的正十六烷的量已經達到平衡。另外由正十六烷分布圖 4.3.2-3 (A)、(B) 這兩張圖的每個時間點來看，第 12 及 24 小時正十六烷分布於礦物培養基及被包覆的量總和與初始的正十六烷量差不多，而在第 36 及 48 小時的總正十六烷分布和則相較於初始正十六烷的值來得少一些，大概少了 100~200 ppmv。這個 100~200 ppmv 的正十六烷有可能是被 NTU-1 降解掉的量，但也有可能是實驗中取樣及測量的誤差值。這樣的實驗結果顯示，乾燥後 NTU-1 細菌結塊的活性是很低的，可見實驗中添加的保護劑對於 NTU-1 細菌結塊的保護效果有限，至於為什麼保護效果有限，將於 4.3.4 節進行討論。

由以上結果也可以發現，雖然乾燥後的 NTU-1 細菌結塊存活率不高，然而其包覆正十六烷的能力並沒有因為 NTU-1 的活性降低而喪失。故接著討論乾燥

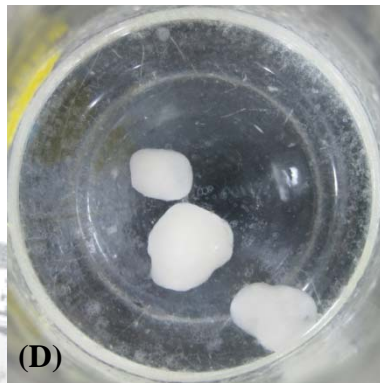
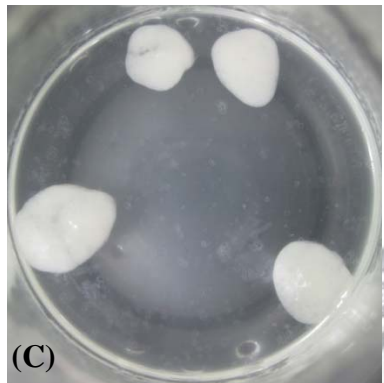
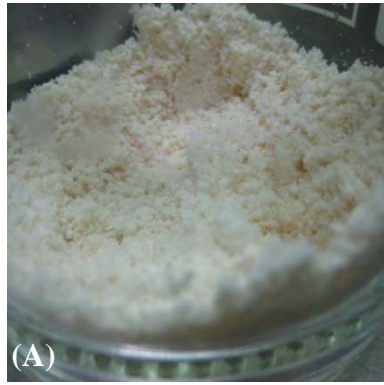
後 NTU-1 細菌結塊對於正十六烷的包覆效果，以第 24 個小時為例，實驗結果發現 10%麥芽糖為保護劑的組別，其 NTU-1 以 0.19 g/L 的結塊密度即包覆了約 2000 ppmv 的正十六烷。10%甘露糖醇為保護劑的組別在 24 個小時則以約 0.21 g/L 的結塊密度包覆了約 2100 ppmv 的正十六烷，這個結果顯示條件為初始乾燥菌量 0.24 ~ 0.25 g/L 的 NTU-1 能夠以每單位重量的細胞包覆約 8 倍重左右的正十六烷。

最後將正十六烷在此系統中的總移除百分比表示於圖 4.3.2-4 中。因為正十六烷在此實驗中的降解量很低，甚至可能根本沒有降解而只是實驗的誤差值，所以在這裡計算正十六烷總移除百分比的方法是將測得殘餘在培養基與包覆在結塊中的正十六烷量之和當作正十六烷的總量，再以被包覆於結塊中的正十六烷量除上正十六烷的總量來當作移除的效率。

- 總移除百分比 (%) =  $\frac{\text{包覆於 NTU-1 結塊中正十六烷的量}}{\text{正十六烷的總量}} \times 100$
- 正十六烷的總量 = 殘餘在礦物培養基中正十六烷的量 + 包覆於 NTU-1 結塊中正十六烷的量

由圖 4.3.2-4 顯示，以 10%麥芽糖或是以 10%甘露糖醇為 NTU-1 細菌結塊冷凍乾燥中的保護劑組別皆在第 12 小時內即可移除掉 80%~90%的正十六烷，但在 12 小時後並沒有因為搖晃培養時間的增加而提升其移除效果。

這個部分的實驗結果皆顯示乾燥後 NTU-1 細菌結塊的存活率不高，但可能因為細胞的疏水性表面並沒有遭受破壞，因而保存 30 天後仍具有相當高的包覆能力，在 12 小時以內就可以移除掉 80~90%的正十六烷，對比之前的實驗中要到第 32~44 小時才有明顯結塊產生，將冷凍乾燥後 NTU-1 結塊應用在烷類移除上，不僅可提早結塊形成的時間並能快速移除大量的烷類。故此方法對於石油碳氫化合物污染的移除是有其發展及應用性的。



照片 4.3.2-1 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷時之 NTU-1 細菌結塊形態圖。(A) 10%麥芽糖為保護劑；(B) 10%甘露糖醇為保護劑；(C) 10%麥芽糖組反應第 12 小時細菌結塊圖；(D) 10%甘露糖醇組反應第 12 小時細菌結塊圖。

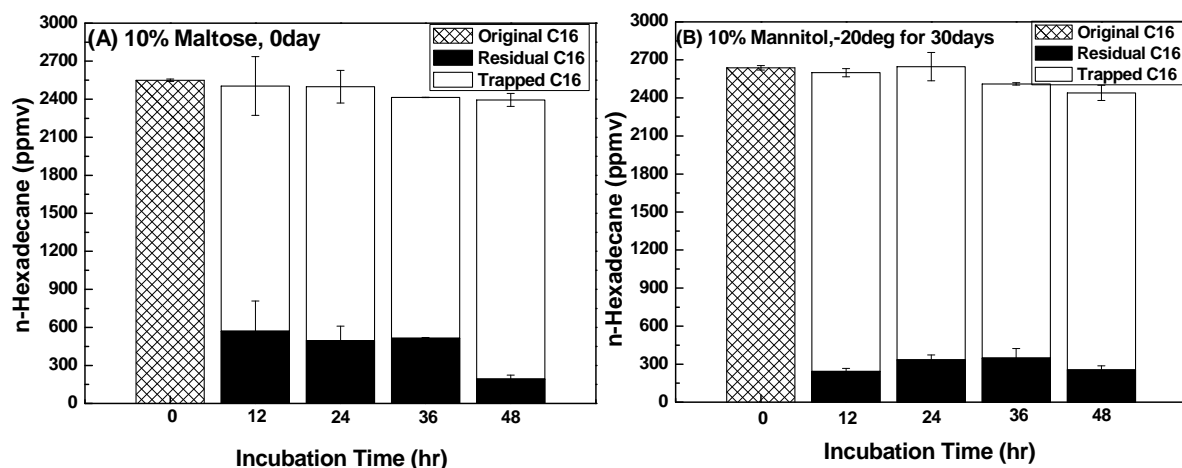


圖 4.3.2-3 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，(A) 以 10%麥芽糖、(B) 10%甘露糖醇為保護劑，處理 2000 ppmv 正十六烷時之正十六烷初始量及反應中殘餘在培養基及被包覆量的分布圖。

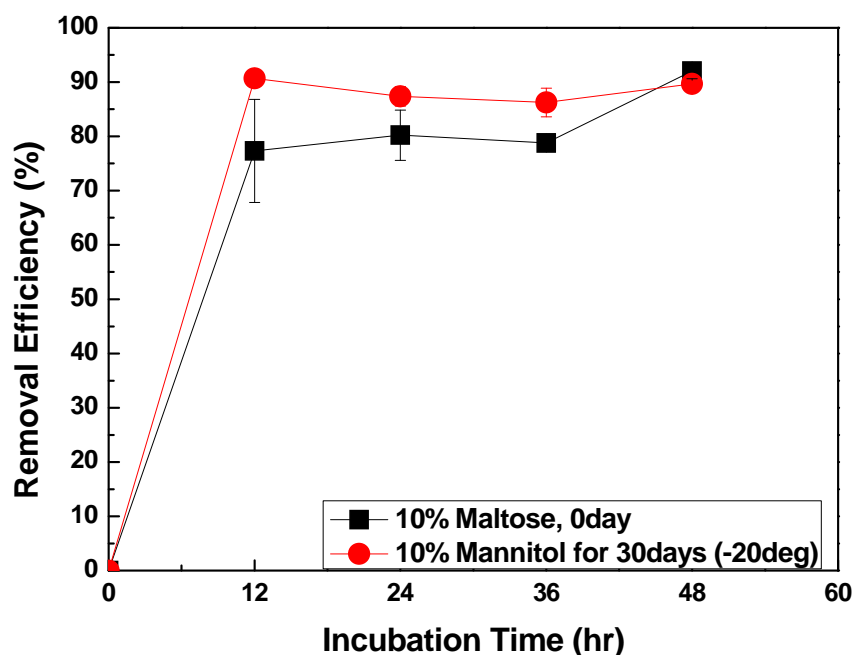


圖 4.3.2-4 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊 (以 10%麥芽糖或 10%甘露糖醇為保護劑)，處理 2000 ppmv 正十六烷時之正十六烷總移除百分比。

## (2) 初始乾燥 NTU-1 結塊重量為 0.007 ~ 0.008 g

在 (1) 部分的實驗中可發現添加保護劑於 NTU-1 結塊上並沒有在冷凍乾燥的過程中產生保護的效果，乾燥後的結塊活性很低甚至已經失去活性。故接下來我們將保護劑這個名稱改為“添加劑”。而添加劑對於 NTU-1 結塊的冷凍乾燥有一定的用處，因為實驗發現若在 NTU-1 結塊冷凍乾燥過程中不加入任何添加劑只加入去離子水進行冷凍後，真空乾燥的這個步驟無法完成，經過 2 天的真空乾燥產品仍然呈現溼黏的狀態，如照片 4.3.2-2 所示。



照片 4.3.2-2 NTU-1 細菌結塊加入去離子水冷凍後，真空乾燥 2 天後所呈現的溼黏狀態（冷凍乾燥失敗）。

對於為什麼以去離子水加入 NTU-1 結塊後進行的冷凍乾燥，其 NTU-1 結塊的乾燥效果會不好，推測這是因為在真空乾燥過程中，加入的去離子水會以昇華的方式被帶離，而此時因為 NTU-1 結塊上有烷類油滴的殘留，故 NTU-1 結塊會傾向於聚集在一起。聚集在一起後，結塊的乾燥表面就較結塊分散時來得小，殘餘的油類不容易在真空乾燥下被帶走，所以在經過 2 天真空乾燥後，產品還是呈現溼黏的狀態，無法完全乾燥。至於加入糖類或多元醇類的添加劑可以幫助冷凍乾燥過程中結塊的分散，當水分以昇華的方式被帶離時，這些添加劑也會變成固態而繼續存在於 NTU-1 分散的結塊之間，所以可以增加結塊表面乾燥的面積，

不會因為水分的帶離而使結塊重新聚集在一起，因而使冷凍乾燥能順利進行。

而由於冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊已經失去降解烷類的能力，故接下來的討論主要針對不同的添加劑及添加不同冷凍乾燥後 NTU-1 結塊重量對於正十六烷的包覆效果。此部分將初始乾燥的 NTU-1 結塊重量降低至 0.007 ~ 0.008 g，主要是想看在低 NTU-1 結塊重量時，是否仍可以將正十六烷包覆並探討其移除的效率。

實驗條件如下：

由於冷凍乾燥前的實驗條件並沒有太大的差異，如 (1) 部分所示，故接下來皆省略，以下直接列出冷凍乾燥後的實驗條件。

- 冷凍乾燥添加劑：10%麥芽糖、10%甘露糖醇、10%乳糖
- 冷凍乾燥後存放條件：
  - 10%麥芽糖組：(1) 0 天  
(2)  $-20^{\circ}\text{C}$  下 10 天
  - 10%甘露糖醇組： $-20^{\circ}\text{C}$  下 10 天
  - 10%乳糖組： $-20^{\circ}\text{C}$  下 10 天
- 乾燥初始取樣重量 (添加劑 + NTU-1 結塊)：
  - 10%麥芽糖組：(1) 0.063 ( $\pm 0.0009$ ) g  
(2) 0.062 ( $\pm 0.0008$ ) g
  - 10%甘露糖醇組：0.083 ( $\pm 0.0016$ ) g
  - 10%乳糖組：0.060 ( $\pm 0.0037$ ) g
- 乾燥初始 NTU-1 結塊重量 (經過加入培養基復水後以 0.3  $\mu\text{m}$  濾紙過濾)：
  - 10%麥芽糖組：(1) 0.00855 ( $\pm 0.0003$ ) g  
(2) 0.00835 ( $\pm 0.0007$ ) g
  - 10%甘露糖醇組：0.0081 ( $\pm 0.0007$ ) g
  - 10%乳糖組：0.00715 ( $\pm 0.0005$ ) g

- 培養基 pH 值：7 → 6.8 (滅菌後)
- 培養基正十六烷濃度：2000 ppmv
- 培養基體積：100 mL
- 培養溫度：30°C
- 培養箱及轉速：往復式恆溫震盪水槽，100 rpm
- 分析時間點：第 12、24 小時

這個部分的實驗中，由於培養基的酸鹼值沒有太大的變化，約從 6.8 降至 6.6 ~ 6.7 左右，故在此沒有將培養基的酸鹼值實驗結果列出。接著以細胞密度分布變化及正十六烷之分布圖來觀察討論，以圖 4.3.2-5 及 4.3.2-6 表示。實驗過程中，分析點只取了第 12 和 24 小時，這是因為從 (1) 部分的實驗中知道乾燥後 NTU-1 細菌結塊在 12 小時內就能包覆正十六烷且不再隨時間增加而提升包覆量。

圖 4.3.2-5 為細胞密度的變化及分布圖。由這兩張圖可以看到，細胞密度的變化在 24 小時內沒有明顯增加的趨勢，顯示乾燥後的 NTU-1 結塊並沒有生長。另外，此圖也可看出並不是所有乾燥後的 NTU-1 結塊皆會再次形成結塊將正十六烷給包覆，礦物培養基中還是會有殘餘的 NTU-1 細胞。在此推測是因為此時正十六烷的量太多而細胞量太少，因而造成再次形成的結塊結構較鬆散，無法緊密的將正十六烷包覆於結塊內，所以在以 60 mesh 篩網分離結塊的過程中，結構較鬆散的結塊會穿過篩網而殘留在 MSM 礦物培養基。

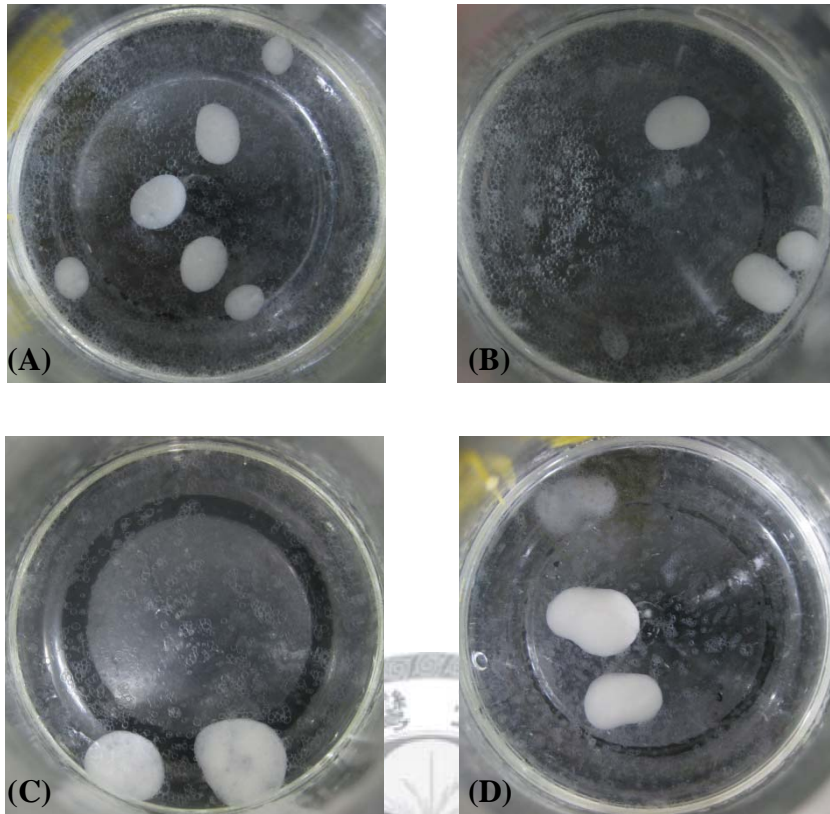
接著將初始正十六烷的量及反應過程中正十六烷殘餘在培養基及被乾燥後 NTU-1 結塊包覆的量匯集成圖 4.3.2-6。由圖中第 0 個小時我們可以看到每一組實驗的初始正十六烷的量有些許的差異，除了跟我們初始取的結塊重量不同外，主要還有我們製造每一批 NTU-1 結塊時，即使實驗中控制相同培養條件及時間，但 NTU-1 的生長情形還是會有一些差別，所以在冷凍乾燥後我們會將每一次以相同條件下製作的乾燥後結塊均勻的混合，使其乾燥的結塊狀態一致。但每一批不同時間所製作的結塊條件還是會有些許的差異，這也是為什麼每一組實驗中都

要取一個在第 0 小時的狀態來進行分析。

由圖 4.3.2-6 的第 12 及 24 小時顯示出在較低的初始添加 NTU-1 菌量時，其正十六烷的包覆效果較差且可看到其誤差值的範圍很大，NTU-1 細胞結塊的情形以照片 4.3.2-3 來表示。由照片可以看出形成的結塊呈現較鬆散，這樣的結果說明了低乾燥 NTU-1 菌量時，再形成的結塊構造不穩定且包覆的效果也不好。另外由圖 4.3.2-6 也可以看到每一組不同添加劑及保存條件下的實驗結果，在較低的結塊密度時，正十六烷被包覆的量大約都在 1200 ~ 1300 ppmv 左右，並沒有因為添加劑的不同而有不同的包覆量，所以添加劑的用途主要是使真空乾燥的這個步驟能夠順利完成，對於 NTU-1 結塊包覆烷類的效果並沒有幫助，這也符合 (1) 部分的實驗結果。

同樣的將正十六烷在此系統中的總移除百分比表示於圖 4.3.2-7 中。由此圖可看出在初始 NTU-1 密度為 0.07 ~ 0.08 g/L 時，正十六烷的移除效果較差，但也都可以在 12 小時內包覆掉約 50 ~ 60% 的正十六烷。





照片 4.3.2-3 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 12 小時之 NTU-1 細菌結塊形態圖。(A) 10%麥芽糖添加劑，存放 0 天；(B) 10%麥芽糖添加劑，於-20℃存放 10 天；(C) 10%甘露糖醇添加劑，於-20℃存放 10 天；(D) 10%乳糖添加劑，於-20℃存放 10 天。

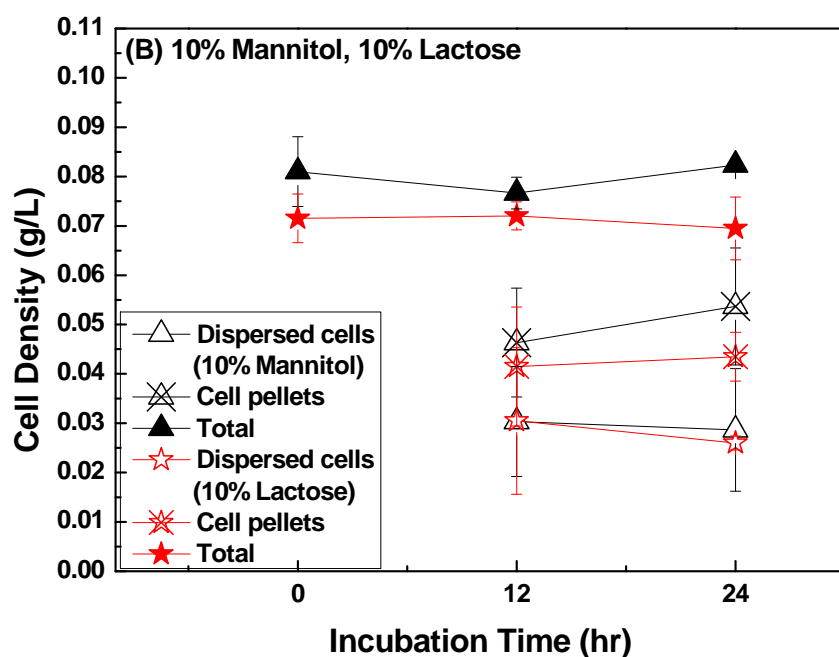
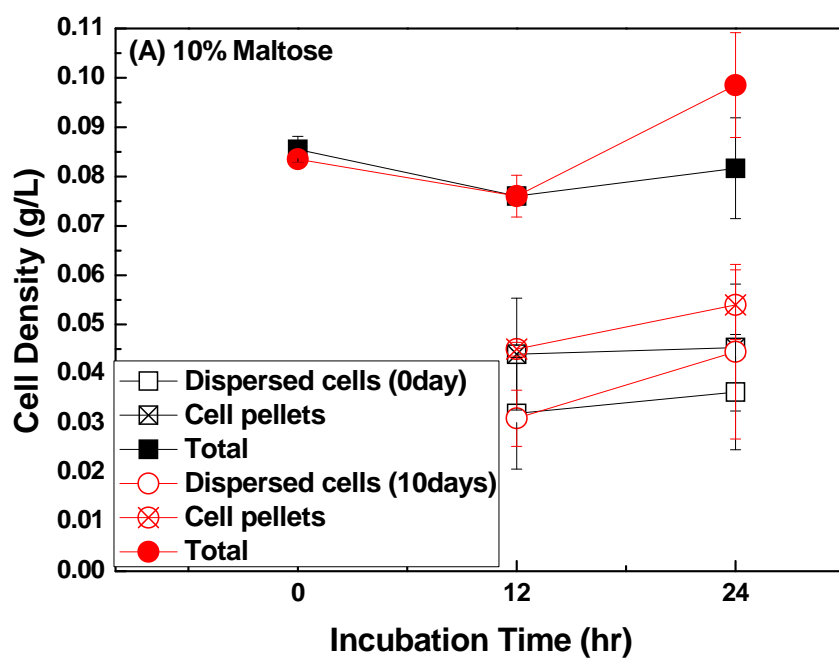


圖 4.3.2-5 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，細胞密度的變化及分布。(A) 10%麥芽糖為添加劑，不同保存條件：0 天及 -20°C 下 10 天；(B) 10%甘露糖醇及 10%乳糖為添加劑，存放在 -20°C 下 10 天。

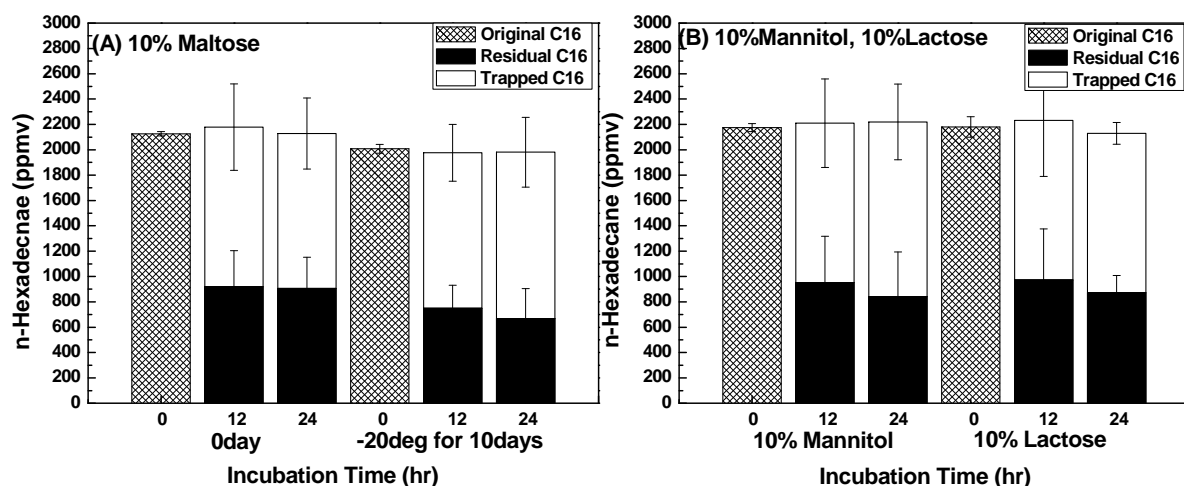


圖 4.3.2-6 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，正十六烷初始量及反應中殘餘在培養基及被包覆量的分布圖。(A) 10%麥芽糖為添加劑，不同保存條件：0 天及 -20℃ 下 10 天；(B) 10%甘露糖醇及 10%乳糖為添加劑，存放在 -20℃ 下 10 天。

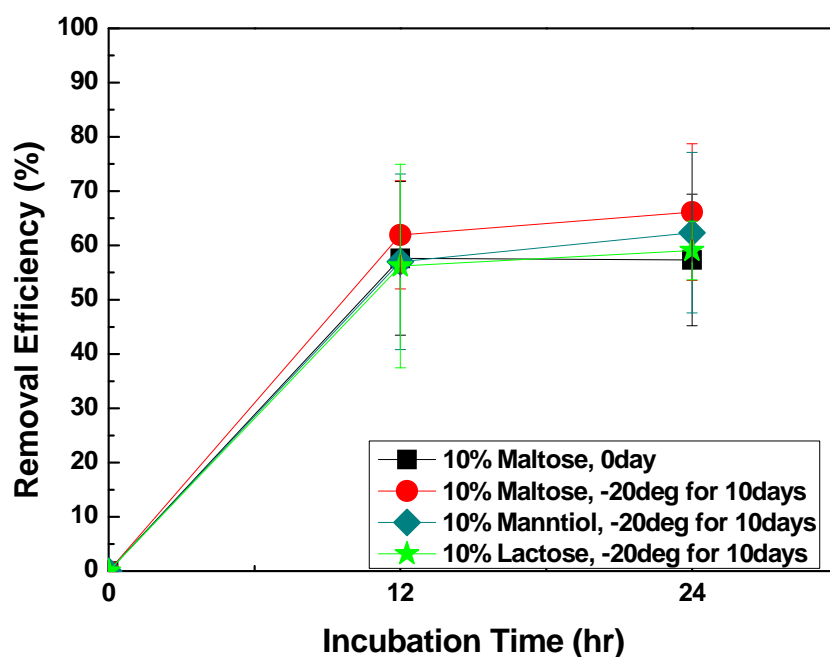


圖 4.3.2-7 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，正十六烷總移除百分比。

### (3) 初始乾燥 NTU-1 結塊重量為 0.018 ~ 0.02 g

由 (2) 部分的實驗結果知道當初始 NTU-1 乾燥結塊重量在 0.007 ~ 0.008 g 時，正十六烷的包覆效果不好，移除效率也較差。這個部分的實驗則提高了初始的 NTU-1 乾燥菌量至 0.018 ~ 0.02 g，並討論不同添加劑及保存條件下正十六烷的移除效率。

實驗條件如下：

由於冷凍乾燥前的實驗條件並沒有太大的差異，如 (1) 部分所示，故接下來皆省略，以下直接列出冷凍乾燥後的實驗條件。

- 冷凍乾燥添加劑：10%麥芽糖、10%甘露糖醇、10%乳糖
- 乾燥後存放條件：
  - 10%麥芽糖組：(1) 0 天  
(2)  $-20^{\circ}\text{C}$  下 10 天
  - 10%甘露糖醇組： $-20^{\circ}\text{C}$  下 10 天
  - 10%乳糖組： $-20^{\circ}\text{C}$  下 10 天
- 乾燥後初始取樣重量 (添加劑 + NTU-1 結塊)：
  - 10%麥芽糖組：(1) 0.153 ( $\pm 0.0012$ ) g  
(2) 0.152 ( $\pm 0.0004$ ) g
  - 10%甘露糖醇組：0.183 ( $\pm 0.0013$ ) g
  - 10%乳糖組：0.149 ( $\pm 0.0009$ ) g
- 乾燥後初始 NTU-1 結塊重量 (經過加入培養基復水後以 0.3  $\mu\text{m}$  濾紙過濾)：
  - 10%麥芽糖組：(1) 0.0196 ( $\pm 0.0014$ ) g  
(2) 0.0186 ( $\pm 0.0008$ ) g
  - 10%甘露糖醇組：0.0192 ( $\pm 0.0006$ ) g
  - 10%乳糖組：0.0190 ( $\pm 0.0003$ ) g

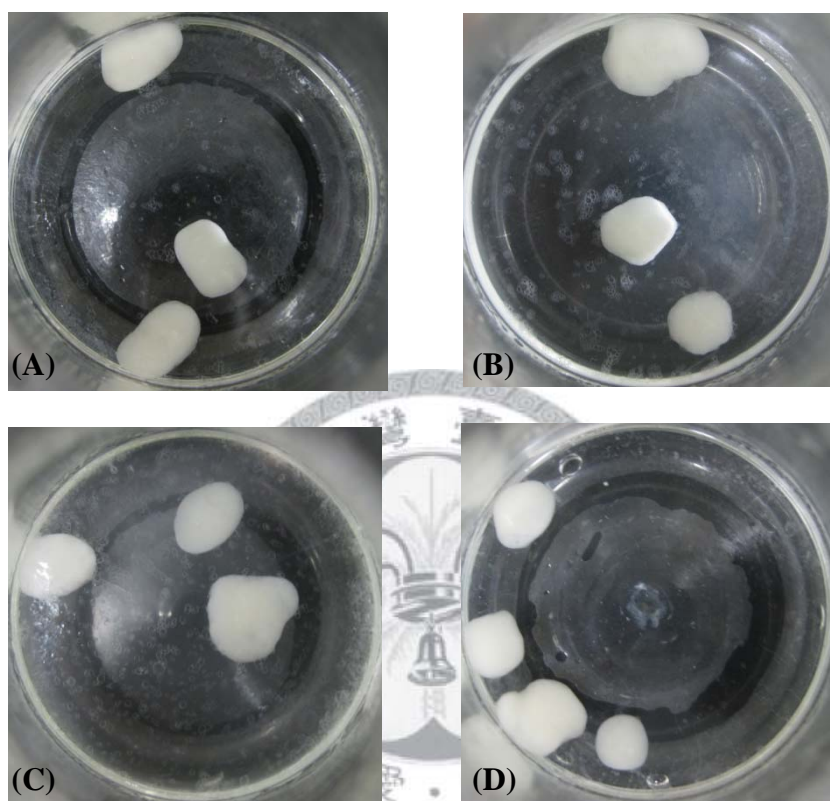
- 培養基 pH 值：7 → 6.8 (滅菌後)
- 培養基正十六烷濃度：2000 ppmv
- 培養基體積：100 mL
- 培養溫度：30°C
- 培養箱及轉速：往復式恆溫震盪水槽，100 rpm
- 分析時間點：第 12、24 小時

接下來一樣討論 NTU-1 細胞密度分布變化及正十六烷之分布，以圖 4.3.2-8、圖 4.3.2-9 表示。圖 4.3.2-8 為細胞密度的變化及分布圖，其中圖 4.3.2-8 (A) 是以 10% 麥芽糖為添加劑、在不同保存條件下的結果；圖 4.3.2-8 (B) 則是 10% 甘露糖醇及 10% 乳糖這兩種不同添加劑、相同保存條件下的實驗結果。由這兩張圖也可以看到，細胞密度的變化在 24 小時內沒有明顯增加的趨勢，顯示 NTU-1 結塊並沒有生長，而乾燥後的 NTU-1 並沒有完全形成結塊，在培養基中仍可測得一些殘餘的細胞量。

與前面 (1)、(2) 部分的實驗結果類似，不管在哪一種添加劑或是不同的存放條件下，乾燥後的 NTU-1 皆能在 12 小時內即形成結塊，而當提高初始 NTU-1 菌量至 0.018 ~ 0.02 g 時，可發現形成的結塊呈現較 (2) 部分的結塊來得紮實，與 (1) 部分中的結塊情形類似。NTU-1 細胞結塊的情形以照片 4.3.2-4 來表示。接著將初始正十六烷的量及反應過程中正十六烷殘餘在培養基及被乾燥後 NTU-1 細菌結塊包覆的量匯集成圖 4.3.2-9。由圖 4.3.2-9 可以看到每一組不同添加劑及保存條件下的 NTU-1 結塊皆能包覆掉約 1800 ~ 2000 ppmv 的正十六烷。

為了更清楚看出各組不同添加劑及不同保存條件下正十六烷的移除效果，我們將正十六烷在此系統中的總移除百分比表示於圖 4.3.2-10 中。由此圖可看出在初始 NTU-1 菌量為 0.018 ~ 0.02 g 時，正十六烷的移除效果可以在 12 小時內即達到 80 ~ 90%，其移除效果與 (1) 部分中初始菌量為 0.024 ~ 0.025 g 相似，顯示在這個範圍的菌量下，培養基中的烷類並不會因為菌量的提高而使移除效率提升，

但若是初始菌量太低的话，正十六烷的移除效果也会不好。因此有必要找到一个与添加正十六烷的浓度最适合的添加的 NTU-1 干燥菌量，这个部分在 4.4.5 节中有较清楚的讨论及分析。



照片 4.3.2-4 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 12 小時之 NTU-1 細菌結塊形態圖。(A) 10%麥芽糖添加劑，存放 0 天；(B) 10%麥芽糖添加劑，於 -20℃ 存放 10 天；(C) 10%甘露糖醇添加劑，於 -20℃ 存放 10 天；(D) 10%乳糖添加劑，於 -20℃ 存放 10 天。

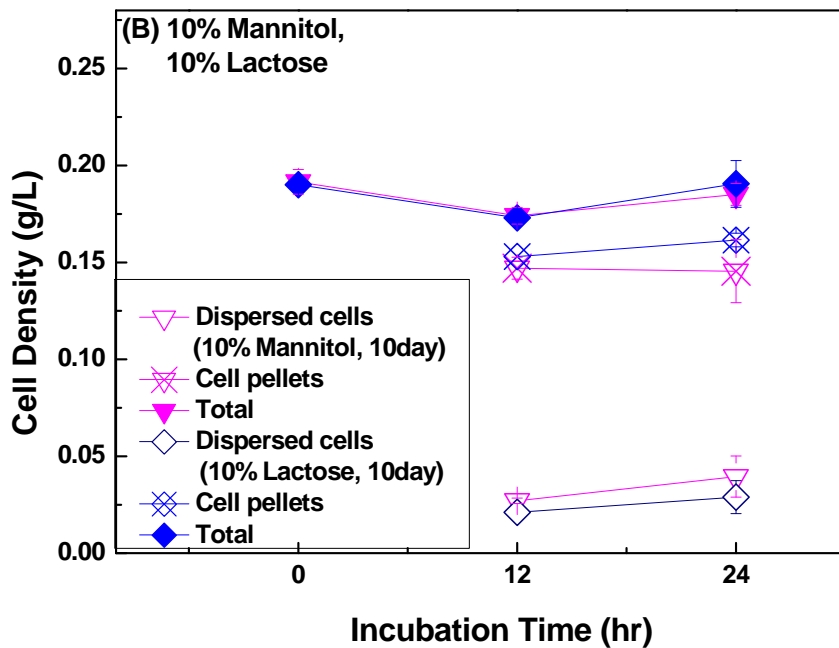
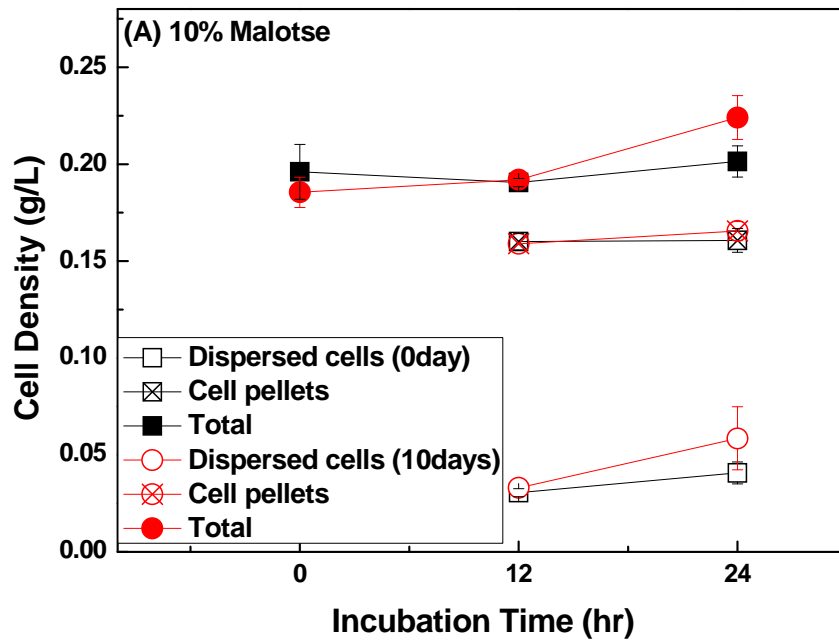


圖 4.3.2-8 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷時之細胞密度的變化及分布。(A) 10%麥芽糖為添加劑，不同保存條件：0 天及 -20℃ 下 10 天；(B) 10%甘露糖醇及 10%乳糖為添加劑，相同保存條件：-20℃ 下 10 天。

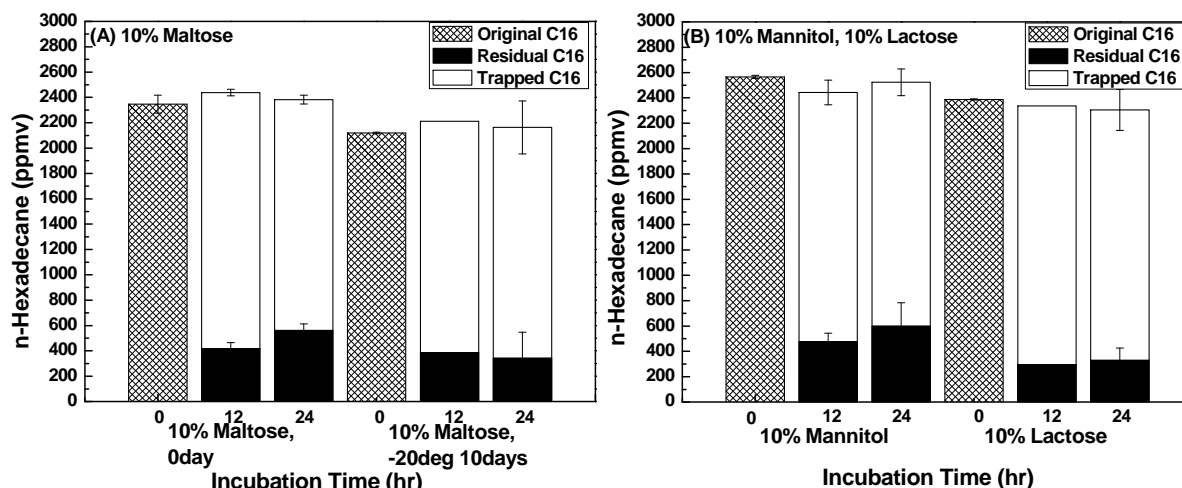


圖 4.3.2-9 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷時，正十六烷初始量及反應中殘餘在培養基及被包覆量的分布圖。(A) 10%麥芽糖為添加劑，不同保存條件：0 天及 -20°C 下 10 天；(B) 10%甘露糖醇及 10%乳糖為添加劑，相同保存條件：-20°C 下 10 天。

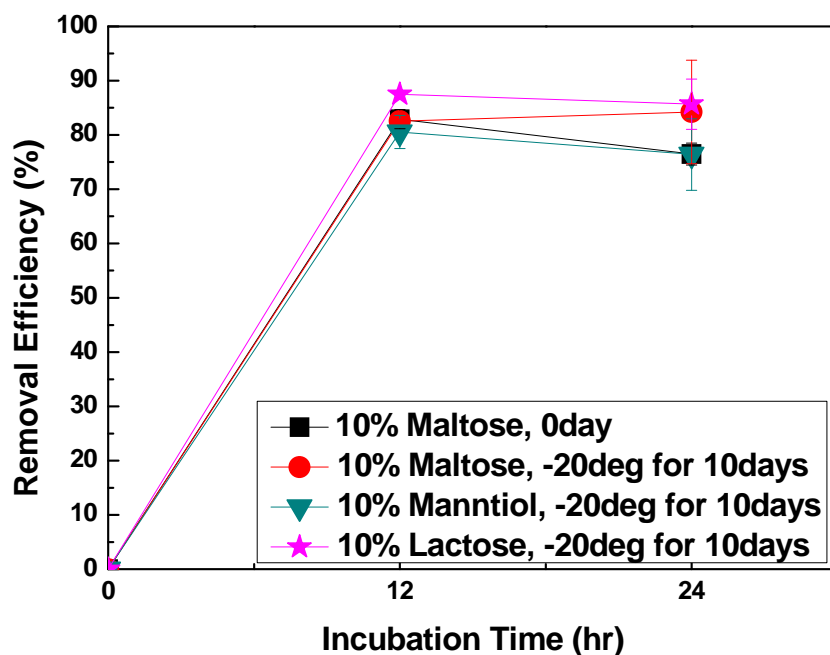


圖 4.3.2-10 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入以不同添加劑冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷時之正十六烷總移除百分比。

前面的實驗中，乾燥後 NTU-1 的存放條件都選擇為存放 0 天或存放在  $-20^{\circ}\text{C}$  下 10 及 30 天，實驗的結果也顯示乾燥後的 NTU-1 包覆效果不會受到存放溫度及時間的影響，為了更加確認這個結果，我們同樣也測試了將存放的條件改成  $30^{\circ}\text{C}$  下存放 30 天的實驗。實驗條件與前面皆類似，不同的是取樣的重量、NTU-1 結塊初始的重量及存放條件。以下標示出不同的實驗條件：

- 乾燥後存放條件：
  - 10%麥芽糖組：  $30^{\circ}\text{C}$  存放 30 天
  - 10%甘露糖醇組：  $30^{\circ}\text{C}$  存放 30 天
- 乾燥後初始取樣重量 (添加劑 + NTU-1 結塊)：
  - 10%麥芽糖組：  $0.162 (\pm 0.0017) \text{ g}$
  - 10%甘露糖醇組：  $0.162 (\pm 0.0004) \text{ g}$
- 乾燥後初始 NTU-1 結塊重量 (經過加入培養基復水後以  $0.3 \mu\text{m}$  濾紙過濾)：
  - 10%麥芽糖組：  $0.0186 (\pm 0.0002) \text{ g}$
  - 10%甘露糖醇組：  $0.0193 (\pm 0.0007) \text{ g}$
- 分析時間點：第 12 小時

這個部分的實驗取樣時間為第 12 個小時，因為由前面的實驗結果發現，實驗取樣的時間點在第 24 個小時與在第 12 小時的結果並無明顯差異。接下來探討第 12 小時的細胞密度分布變化、正十六烷之分布及總移除效果。以圖 4.3.2-11 ~ 13 表示。圖 4.3.2-11 顯示出乾燥後的 NTU-1 並沒有在反應過程中完全形成結塊，故能測得殘餘在培養基中的 NTU-1 結塊密度。由圖 4.3.2-12 正十六烷之分布圖可以看出以不同添加劑乾燥後的 NTU-1 結塊在  $30^{\circ}\text{C}$  下存放 30 天以後仍保有其包覆的能力，兩組實驗皆以約  $0.16 \text{ g/L}$  的結塊密度包覆掉約  $1700 \text{ ppmv}$  的正十六烷。將正十六烷的移除效果整理成圖 4.3.2-13，由圖 4.3.2-13 可以看到兩組不同添加劑的乾燥 NTU-1 結塊皆可以在 12 小時內包覆並移除掉 80 ~ 85% 的正十六烷，

與前面不同保存條件的實驗結果差不多。顯示乾燥後的 NTU-1 雖然已經不具活性然而其疏水性的表面並沒有因為冷凍乾燥的過程被破壞，使 NTU-1 在不同保存溫度及時間下皆維持相當好的包覆能力，配合篩網的撈除可使正十六烷在 12 小時內大量的移除。

另外，我們測試了結合 4.2 節中以 NB 培養冷凍乾燥後具活性的 NTU-1 及 4.3.2 節中冷凍乾燥後不具活性的 NTU-1 結塊，利用具活性的乾燥 NTU-1 來降解正十六烷並利用不具活性的 NTU-1 乾燥結塊來加速細胞聚集現象的產生，探討此結合方法時正十六烷的移除效率，詳細實驗內容可參考附錄 1。

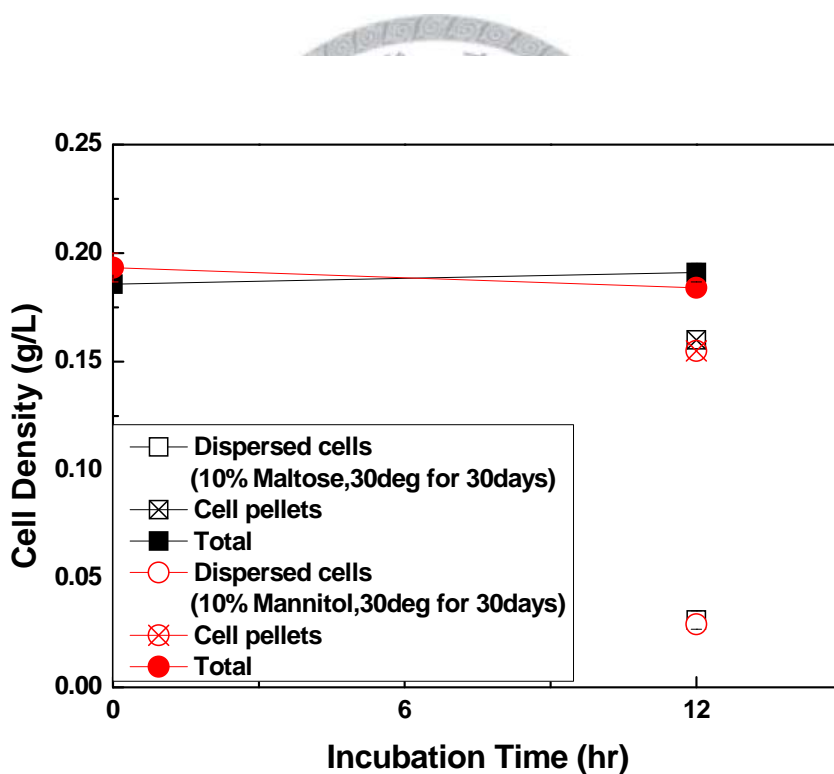


圖 4.3.2-11 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，存放於 30℃ 下 30 天，處理 2000 ppmv 正十六烷時之細胞密度的變化及分布。

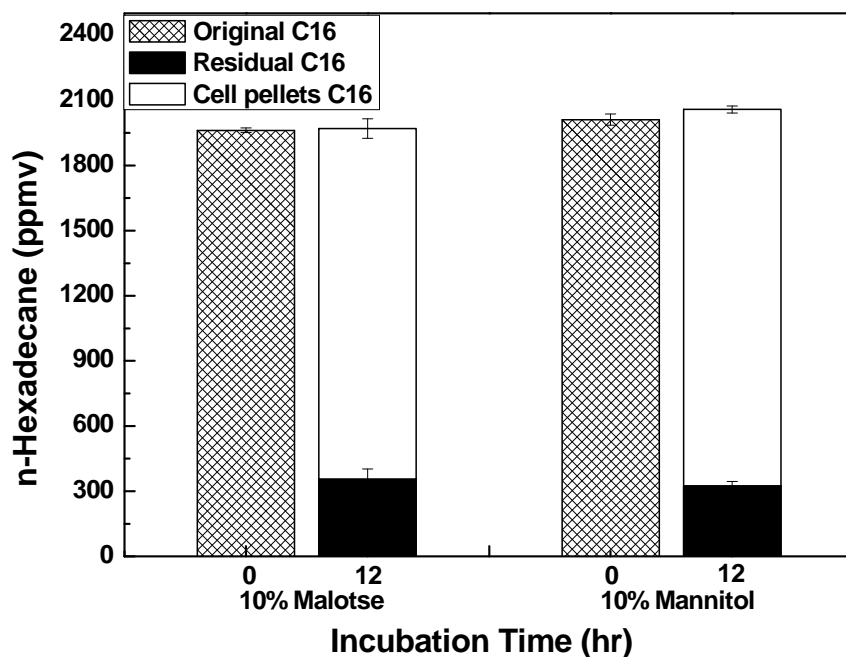


圖 4.3.2-12 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，存放於 30℃ 下 30 天，處理 2000 ppmv 正十六烷時，正十六烷初始量及反應中殘餘在培養基及被包覆量的分布圖。

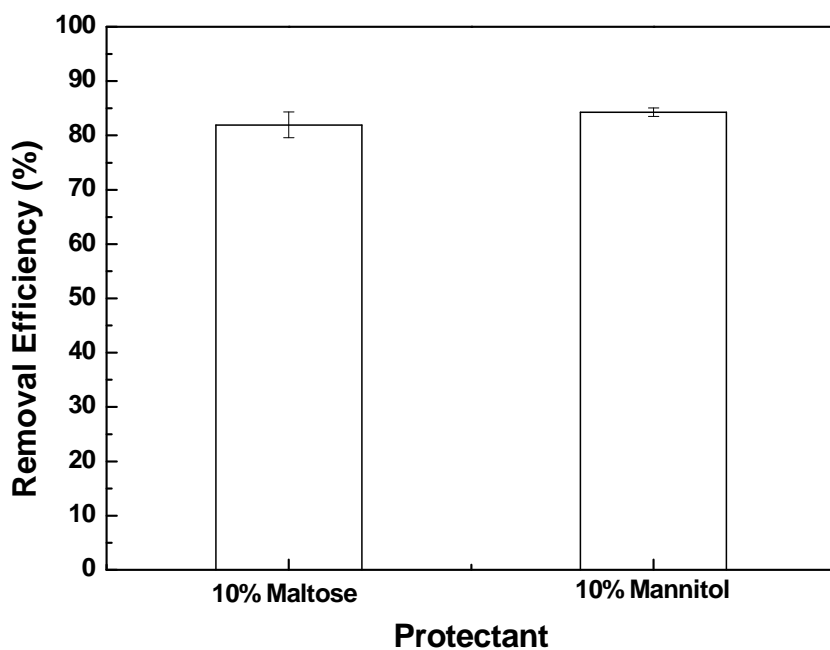


圖 4.3.2-13 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，存放於 30℃ 下 30 天，處理 2000 ppmv 正十六烷時之正十六烷總移除百分比。

### 4.3.3 超音波震碎 NTU-1 結塊並進行冷凍乾燥後之應用

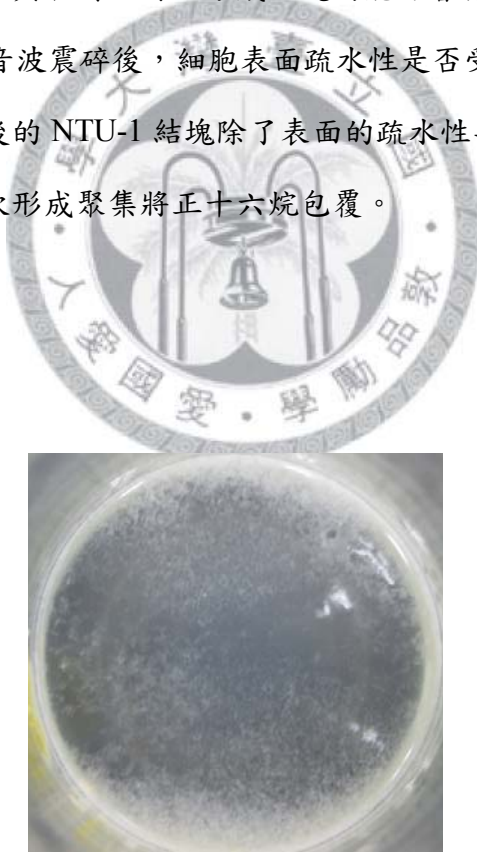
4.3.2 節中發現以正十六烷培養的 NTU-1 細菌結塊進行冷凍乾燥後會失去活性，但其再形成細胞聚集體（結塊）包覆正十六烷的能力並沒有受到影響，推測是因為 NTU-1 結塊的疏水性表面在冷凍乾燥過程中沒有受到破壞。而這一節中，我們將測試冷凍乾燥後細胞表面完整性與否對於 NTU-1 再形成結塊能力的影響。首先將 NTU-1 結塊利用超音波震碎成細胞碎片，接著進行冷凍乾燥，並於乾燥後進行正十六烷的包覆移除實驗。

實驗條件如下：

- NTU-1 結塊製備：5 mL ( $OD_{600} \doteq 1$ ) 礦物培養基菌液與 2000 ppmv 正十六烷加入 100 mL MSM 礦物培養基，培養 3 天後取得 NTU-1 細菌結塊。
- 添加劑：10% 麥芽糖溶液 (w/v)
- 利用超音波將細胞震碎
  - 強度：4 (約 100 瓦)
  - 時間：15 分鐘
  - Sonicate：1 秒
  - Pulse：0.5 秒
- 冷凍條件： $-20^{\circ}\text{C}$  下冷凍 24 hr
- 真空乾燥條件： $-50^{\circ}\text{C}$  以下，100 millitorr 以下，24 小時
- 乾燥後存放條件：0 天
- 乾燥後初始取樣重量：0.161 g
- 培養基 pH 值：7  $\rightarrow$  6.8 (滅菌後)
- 添加培養基正十六烷濃度：2000 ppmv
- 培養基體積：100 mL

- 培養溫度：30℃
- 培養箱及轉速：往復式恆溫震盪水槽，100 rpm
- 分析時間點：第 24 小時

超音波震碎細胞的原理主要是利用高頻率的聲波產生強而有力的剪切作用力進而將細胞打碎。利用乾燥後的 NTU-1 碎片進行正十六烷的包覆移除實驗，培養時間經過 24 小時以後發現，不同於 4.3.2 節中乾燥 NTU-1 結塊能再次形成聚集將正十六烷包覆，NTU-1 碎片沒有再次形成結塊，而呈現棉絮狀聚集體懸浮在礦物培養基的表面，如照片 4.3.3-1 所示。這樣的實驗結果顯示，乾燥後 NTU-1 細胞結塊表面的完整性與否對於再次形成結塊的能力會有很大的影響。至於 NTU-1 結塊在經過超音波震碎後，細胞表面疏水性是否受到影響，將於 4.4.2 中討論。在此推測乾燥後的 NTU-1 結塊除了表面的疏水性要存在以外還需具有完整的細胞表面才能再次形成聚集將正十六烷包覆。



照片 4.3.3-1 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入冷凍乾燥後的 NTU-1 碎片（經超音波震碎），處理 2000 ppmv 正十六烷，第 24 小時之 NTU-1 細胞形態圖。

#### 4.3.4 討論

4.2 節中發現以 NB 培養的 NTU-1 在冷凍乾燥前加入糖類或是多元醇類為保護劑時，NTU-1 可以在冷凍乾燥後仍具有很高的存活率，且其降解及包覆正十六烷的特性並不會受到影響。然而在 4.3.2 節實驗中發現以正十六烷培養的 NTU-1 細菌結塊在冷凍乾燥的過程中，不管加入的是 10% 麥芽糖、10% 甘露糖醇或是 10% 的乳糖作為添加劑，冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊所呈現包覆正十六烷的能力並沒有太大的差異，這是因為冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊活性很低或已不具活性，添加劑的功能是幫助冷凍乾燥的步驟能夠順利完成。

實驗發現若加入的 NTU-1 結塊量較少，正十六烷的移除效果會較差 (4.3.2 (2) 部分)，當初始加入的 NTU-1 結塊量大於 0.02 g (每 100 mL MSM 礦物培養基) 時，系統中正十六烷 (2000 ~ 2500 ppmv) 總移除效率就會維持在 80 ~ 90% 左右，且不會因為添加更多 NTU-1 結塊量而提高。

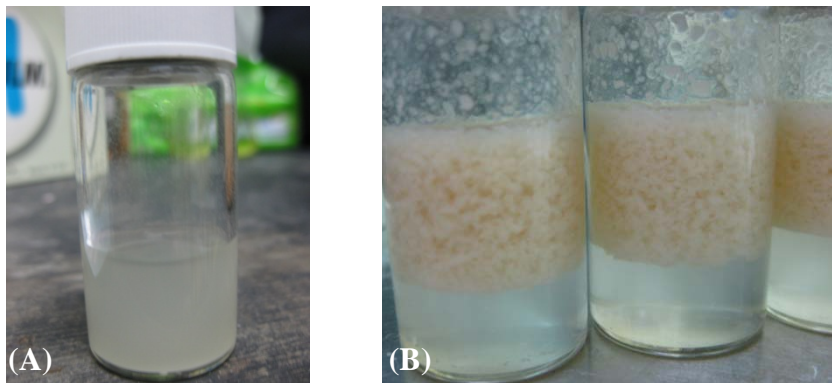
在 4.3.3 節的實驗中，我們先將 NTU-1 結塊震碎再拿去冷凍乾燥，接著發現震碎後的 NTU-1 碎片無法再次形成結塊，故推測細胞表面的完整性會影響細胞再次形成聚集的能力。我們認為，一般冷凍乾燥的步驟雖然使細胞失去活性，但細胞表面並不會完全受到破壞，所以乾燥後的 NTU-1 結塊表面仍具有很強的疏水性及完整性，可再次吸附正十六烷進而聚集形成結塊並把培養基中大部分的正十六烷給包覆起來。

而推測造成培養基中總是會殘餘 10 ~ 20% 正十六烷的原因可能是因為我們加入的乾燥 NTU-1 結塊並不是全部都具有完整的表面，還是會有少部分的細胞在冷凍乾燥的過程中破碎，因而無法全部再次聚集並把全部正十六烷給包覆起來。有些細胞碎片，其表面能貼附正十六烷然而並無法形成大的結塊，所以在以 60 mesh 篩網進行分離結塊時，就會因為顆粒太小而通過篩網，使培養基中總是殘餘一些正十六烷，這也是為什麼我們每次進行細胞密度量測時，總是會測到一些

殘餘在培養基中的 NTU-1 細胞密度，詳細的討論可參考 4.4.8 節。

接著探討同樣是菌株 NTU-1 但是在利用不同營養源 (NB 及正十六烷) 培養並經過冷凍乾燥後的存活率卻相差這麼多，造成差異的原因推測可能是以下 2 點：

- (1) 以 NB 培養的 NTU-1 是以均勻分散的形態分布在添加的保護劑中，然而以正十六烷培養的 NTU-1 是以結塊的形態分布於保護劑 (添加劑) 中，雖然實驗中會以搖晃的方式使結塊均勻分散在保護劑中，但由於 NTU-1 結塊表面貼附有正十六烷使整體密度小於 1，故當將結塊搖散接著靜置一段時間後，結塊又會重新聚集且趨向於浮在保護劑的表面 (如照片 4.3.5-1 (B))。因而加入的保護劑對於 NTU-1 結塊的保護面積會相對於以 NB 培養均勻分散的 NTU-1 (照片 4.3.5-1 (A)) 來得小。此外，形成結塊後的 NTU-1，其細胞表面性質如脂肪酸的成份也會在培養過程中而有所改變，故在冷凍乾燥這個過程中，NTU-1 的存活率是有可能呈現如此差異的。
- (2) 以正十六烷培養後的 NTU-1 結塊在加入保護劑 (添加劑) 後，除了因為結塊的形態使保護劑與 NTU-1 細胞表面接觸面積較小外，由於結塊表面有正十六烷的貼附，使加入的添加劑更加難以接觸到 NTU-1 的表面故無法在冷凍乾燥期間保護 NTU-1，所以易造成 NTU-1 在冷凍乾燥期間不可復原的傷害。



照片 4.3.5-1 冷凍乾燥前，以不同碳源培養 NTU-1 產生不同形態的 NTU-1 加入保護劑 (添加劑) 後 NTU-1 的分布情形。(A) 以 NB 培養後的 NTU-1 均勻分散在保護劑的情形；(B) 以正十六烷培養後的 NTU-1 結塊懸浮在添加劑表面的情形。

生物復育過程中，一般都會遇到微生物降解速率緩慢使其成效無法在短時間內顯現這個問題。而由以上的實驗知道，雖然冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊活性很低或已經不具活性，但我們發現礦物培養基中含 0.2 g/L 以上的 NTU-1 結塊密度與 2000 ppmv 的正十六烷，經過往復式搖晃的培養，NTU-1 結塊可以在 1~2 小時內再次吸附正十六烷並聚集形成結塊，在取樣的時間點第 12 小時配合物理撈除 NTU-1 形成的聚集體，能移除掉 80~90% 的正十六烷。這個結果顯示將 NTU-1 結塊以冷凍乾燥的方式來保存對於石油復育的研究中是有其潛力及發展性的。

## 4.4 利用正十六烷培養的 NTU-1 細菌結塊經烘乾後再聚集包覆烷類之能力探討

4.3 節的實驗結果發現利用正十六烷培養形成的 NTU-1 結塊經過冷凍乾燥後細胞會失去活性但其吸附正十六烷聚集形成結塊的能力並沒有受到影響，12 小時內仍能移除 80~90% 濃度為 2000~2500 ppmv 的正十六烷。然而冷凍乾燥有成本較高且較耗時間的缺點，故這一節中我們使用了較簡易的方法—烘乾，來乾燥 NTU-1 結塊，並探討烘乾後的 NTU-1 結塊包覆及移除正十六烷的能力是否會受影響。

### 4.4.1 烘乾 NTU-1 結塊時溫度與時間的選擇

這個部分的實驗將測試不同溫度來烘乾 NTU-1 結塊，探討烘乾所需的時間及乾燥後 NTU-1 結塊包覆正十六烷的能力，進而選擇一個較合適的溫度來作為日後實驗烘乾的條件。

實驗條件如下：

- NTU-1 結塊製備：5 mL ( $OD_{600} \doteq 1$ ) 礦物培養基菌液與 200  $\mu$ L 正十六烷加入 100 mL MSM 礦物培養基，培養 3 天後取得 NTU-1 細菌結塊。
- 烘乾溫度：(1) 60、(2) 80、(3) 100、(4) 120、(5) 160°C
- 烘乾測試時間：(1) 48、(2) 15、(3) 6、(4) 2、(5) 0.5 小時
- 初始取樣重量：0.051 ( $\pm 0.0008$ ) g
- 初始 NTU-1 結塊重量 (經過加入培養基復水後以 0.3  $\mu$ m 濾紙過濾): 0.0281 ( $\pm 0.001$ ) g
- 培養基正十六烷濃度：2000 ppmv

- 培養基 pH 值：7 → 6.8 (滅菌後)
- 培養基體積：100 mL
- 培養溫度：30°C
- 培養箱及轉速：往復式恆溫震盪水槽，100 rpm
- 分析時間點：第 12 小時

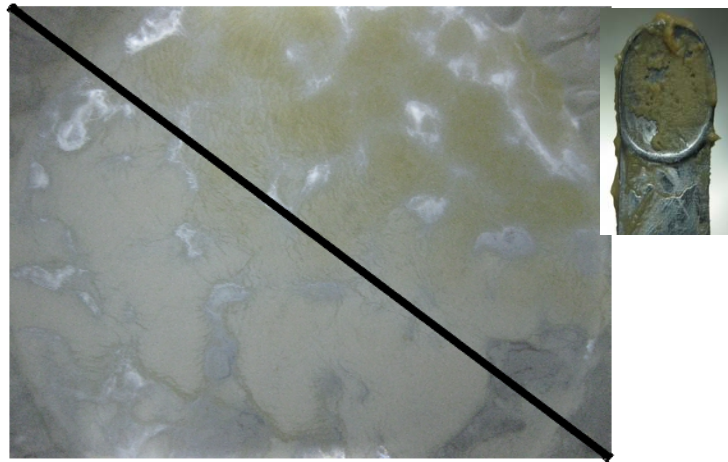
目前實驗的階段採用目測的方法來判斷產物是否已烘乾，若 NTU-1 結塊沒有完全烘乾則產品會呈現如照片 4.4.1-1 (A) 所示，此時乾燥表面呈現深黃色，若利用勺子將其刮下，產品會呈現溼黏狀。若產品已完全烘乾，則其乾燥表面的顏色明顯較淺，利用勺子將其刮下後會呈現粉末狀，如照片 4.4.1-1 (B) 所示。

實驗中，以溫度為 60°C 下來烘乾，所需時間約為 48 小時、利用 80°C 來烘乾所需時為 15 小時，利用 100、120 及 160°C 烘乾所需時間分別為 6、2 和 0.5 小時。其中，以 120 及 160°C 來烘乾的組別雖然花費時間較短，但是發現 NTU-1 結塊因為溫度過高而逐漸產生焦黑的情形，對照烘乾溫度為 80°C 的組別，如照片 4.4.1-2 所示。

接下來，觀察這幾個溫度烘乾後的 NTU-1 結塊是否皆能再次形成聚集體而將正十六烷給包覆並移除。培養第 12 小時的實驗結果如照片 4.4.1-3。由照片 4.4.1-3 可以看到烘乾溫度為 60 及 80°C 的組別，乾燥 NTU-1 能再次形成結塊，而乾燥溫度 100°C 的組別形成的結塊呈現鬆散、不穩固的情形；烘乾溫度為 120 及 160°C 的組別則無法再次形成結塊而呈現棉絮狀懸浮在礦物培養基上。

探討烘乾溫度高於 100°C 時乾燥 NTU-1 結塊無法再次形成聚集包覆正十六烷的原因，我們推測是因為當溫度高於 100°C 時，細胞上的疏水性脂肪酸會被破壞分解或是表面成分產生變化使細胞破裂、不完整。其中，以 160°C 烘乾的組別，NTU-1 結塊已經呈現焦黑的情形，可知此時 NTU-1 細胞變質、成分改變。探討 NTU-1 表面疏水性是否會因烘乾溫度不同而有所影響的實驗將在 4.4.2 節介紹。

**(A) 未乾燥完全**

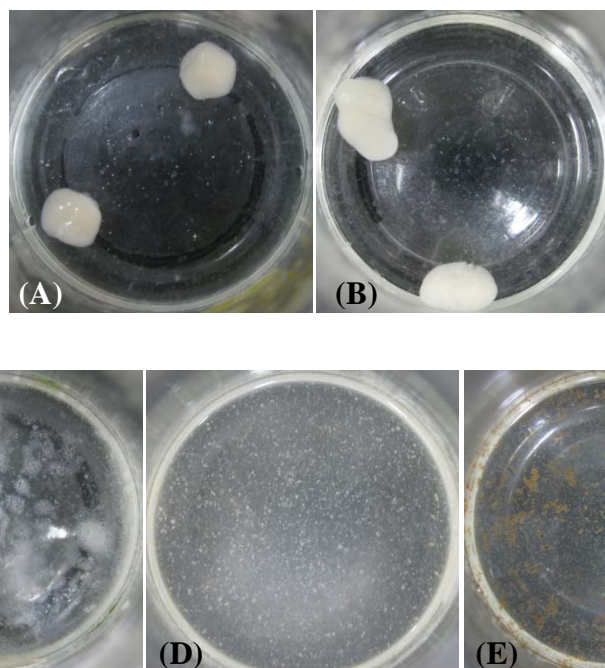


**(B) 完全乾燥**

照片 4.4.1-1 烘乾過程中，NTU-1 結塊不同乾燥程度之差別。(A) 未乾燥完全；  
(B) 完全乾燥。



照片 4.4.1-2 不同溫度烘乾後 NTU-1 結塊乾燥的情形，依左而右分別為 80℃、  
120℃ 及 160℃。



照片 4.4.1-3 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入不同溫度烘乾後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 12 小時 NTU-1 再形成結塊的情形。(A) 60°C；(B) 80°C；(C) 100°C；(D) 120°C；(E) 160°C。

另外，實驗發現當取乾燥後的 NTU-1 加入培養基時，其初始取的 NTU-1 重量會與加入培養基後再以 0.3  $\mu\text{m}$  濾紙過濾後的所測得的 NTU-1 乾重有差別，主要原因推測是因為在取得 NTU-1 結塊時，同時會將一些降解過程中的代謝物及培養基鹽類一起帶到烘箱中烘乾，另外結塊上也會殘留一些正十六烷。當這些物質一起被烘乾，因此在秤取 NTU-1 乾燥後的重量時也會把這些物質一起算進去，而這些物質在加入培養基後則會溶解掉，所以初始取的 NTU-1 重量會與加入培養基並用濾紙進行過濾後所得重量有所差異。

由於實驗中所選擇的 5 個烘乾溫度下，只有 60 及 80°C 的組別能夠在 12 小時內再次形成聚集並把正十六烷包覆在結塊內，故接下來只分析了烘乾溫度為 60 及 80°C 的組別的實驗結果，其他組別則不列出。

在 4.3 節中知道了乾燥後的 NTU-1 結塊不具活性，培養過程中培養基的酸鹼值與初始值 6.8 不會有太大的差異，故這一小節就不探討培養基酸鹼值的變化且取樣的時間點皆取第 12 個小時來作分析。接下來則分別來探討在第 12 個小時，NTU-1 細胞密度的分布及正十六烷的包覆量及殘餘量，以圖 4.4.1-1、4.4.1-2 表示。

由圖 4.4.1-1 細胞密度的分布圖可以看到在經過 12 小時的培養後，兩組不同烘乾條件 (60 及 80℃) 的實驗結果培養基中殘餘的細胞密度及形成結塊的結塊密度分布皆差不多，約有 0.02 g/L 的細胞密度殘餘在培養基中而約有 0.25 g/L 的 NTU-1 會再次形成結塊將正十六烷包覆於其中。

圖 4.4.1-2 正十六烷分布圖的第 0 小時可看出雖然乾燥後的 NTU-1 結塊上會殘留有一些正十六烷，但這些量不多約只有 30~40 ppmv，幾乎可以忽略。因而在接下來實驗中我們皆假設正十六烷的總量等於初始添加的量，不另外再測量第 0 小時正十六烷殘餘在 NTU-1 結塊上的量有多少。

由圖 4.4.1-2 也可看出兩組不同乾燥條件下的 NTU-1 結塊能於 12 小時內將正十六烷包覆並移除，且由細胞分布圖來看可以看出兩組約以 0.25 g/L 的結塊密度包覆了約 1700 ppmv 的正十六烷。

將正十六烷的移除效率以百分比來表示，如圖 4.4.1-3。實驗中移除百分比的計算如同 4.3.2 節中所定義：

- 總移除百分比 (%) =  $\frac{\text{包覆於 NTU-1 結塊中正十六烷的量}}{\text{正十六烷的總量}} \times 100$
- 正十六烷的總量 = 殘餘在培養基中正十六烷的量 + 包覆於 NTU-1 結塊中正十六烷的量  $\doteq$  初始正十六烷添加量

圖 4.4.1-3 可以看出兩組不同烘乾條件下正十六烷的移除效率在第 12 個小時皆能達到 86~90%。因此知道以 60 及 80℃ 來烘乾並不會對於乾燥後 NTU-1 結

塊的包覆能力造成影響，顯示雖然乾燥後的 NTU-1 已不具活性，但細胞的完整性及疏水性的表面並沒有因為這兩種乾燥溫度而受到破壞，所以在加入新的正十六烷後，NTU-1 結塊能因為搖晃震盪而吸附正十六烷並慢慢聚集形成結塊將大量正十六烷包覆於其中，使其移除效率在 12 小時內即能達到 80~90%。若以實驗時間方便來考量的話，選擇烘乾溫度為 80°C 較適合，因為其只需要 15 個小時即能把結塊烘乾，且乾燥後的 NTU-1 仍具有相當好的包覆能力。

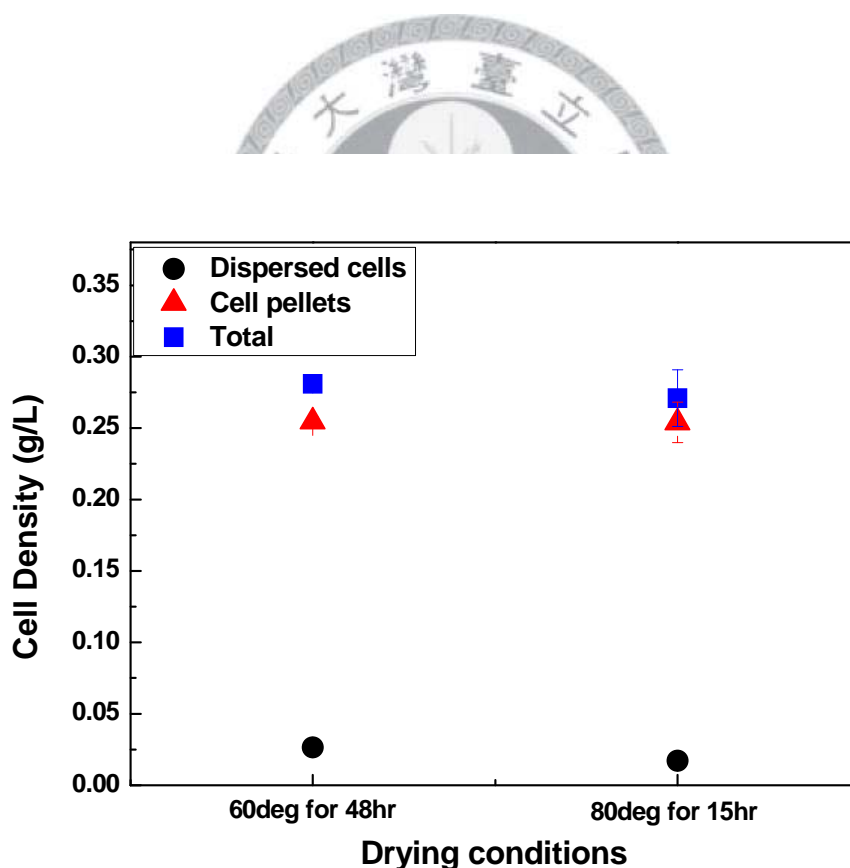


圖 4.4.1-1 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，培養基中加入不同烘乾條件乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 12 小時之細胞密度分布。

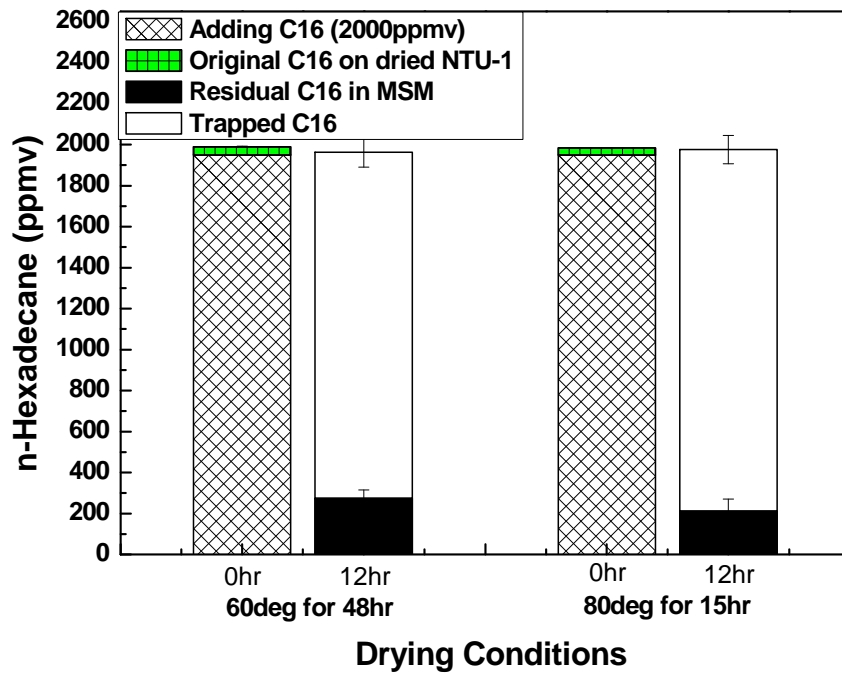


圖 4.4.1-2 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，培養基中加入不同烘乾條件乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 0、12 小時正十六烷殘餘在培養基及包覆量的分布圖。

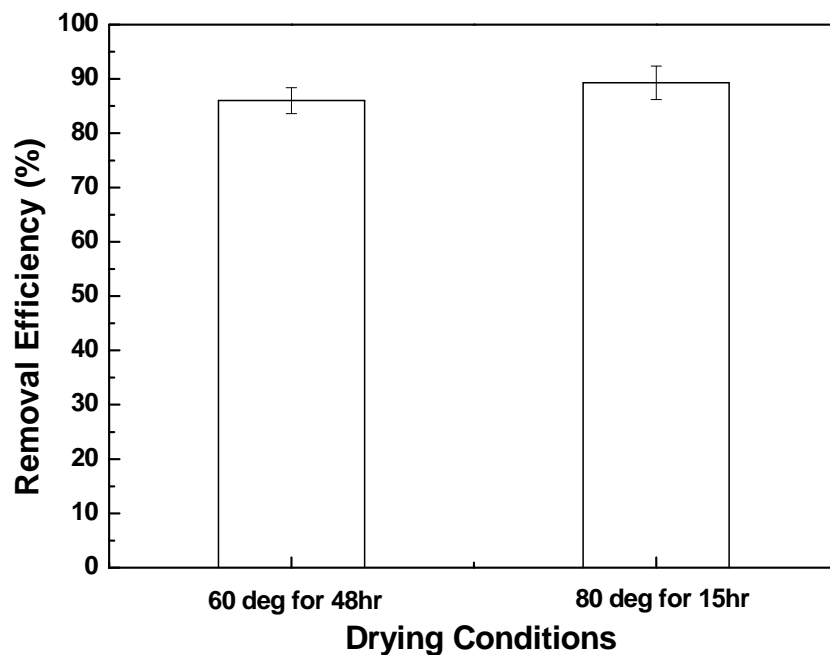


圖 4.4.1-3 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，培養基中加入不同烘乾條件乾燥後的的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 12 小時之正十六烷總移除百分比。

#### 4.4.2 不同條件乾燥下 NTU-1 結塊表面疏水性測定

由 4.4.1 節中可發現若烘乾溫度高於 100℃，乾燥後 NTU-1 再形成結塊包覆正十六烷的能力會變差。我們認為可能是在乾燥過程中，細胞表面之疏水性脂肪酸遭受破壞變質或是細胞已破裂不完整。這一節中，將測試不同條件乾燥下，NTU-1 細胞結塊表面的疏水性是否會有差異，進而了解乾燥後 NTU-1 結塊能再次形成聚集體的原因。

測試細胞表面疏水性的方法是由 Rosenberg 等學者所提出的 MATH (microbial adhesion to hydrocarbons) (Rosenberg *et al.* 1991)。由於此法操作容易、使用儀器較常見因而被文獻中大量的使用。

實驗條件如下：

- 菌株來源：
  - 不同溫度下烘乾的 NTU-1 結塊：60、80、100、120、160℃
  - 冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊
  - 利用超音波震碎後再進行冷凍乾燥的 NTU-1 結塊
- 分散相：去離子水 (2 mL)
- 初始 OD<sub>600</sub> 吸收值 (OD<sub>i</sub>)：0.5 ~ 0.8
- 正十六烷添加量：0.5 mL
- 溫度：27℃
- OD<sub>600</sub> 吸收值測量時間：每 10 分鐘 (OD<sub>a</sub>)
- 細胞吸附百分比計算

$$\text{Percentage of adhesion (\%)} = \frac{OD_i - OD_a}{OD_i} \times 100$$

實驗結果如圖 4.4.2-1 所示，其中也列出實驗室之前對於一般礦物培養基菌液（自由細胞狀、NB 培養，pH=7）的吸附百分比（劉志文 2007）來作比較。實驗結果顯示，除了以 160°C 烘乾的實驗組別其吸附百分比比較低以外，其他不同乾燥條件的組別吸附百分比皆能在前 3 個小時內達到 70% 以上。經過約一天以後，160°C 組別的吸附百分比約有 80% 而其餘乾燥組別皆能達到 90% 左右。同時也可以發現除了 160°C 烘乾的實驗組別，其他組別的吸附百分比皆會高於一般礦物培養基菌液的實驗組別。

文獻中指出，細胞的疏水性是主導微生物貼附現象的原因之一（Olofsson *et al.* 1998）。而使用 MATH 測量細胞表面疏水性時，吸附百分比能達到 70% 以上即顯示細胞具有相當的疏水性（Rosenberg 2006）。因此我們知道這些狀態下的 NTU-1 細胞都具有很高的疏水性，而形成結塊後的 NTU-1 細胞表面疏水性會比一般 NTU-1 菌液（以 NB 培養）來得高，主要是因為 NTU-1 在利用正十六烷時會產生一些長鏈脂肪酸鍵結在細胞表面，因而使表面疏水性增強，而這些長鏈脂肪酸的存在也是實驗中促使 NTU-1 形成結塊將正十六烷包覆的重要原因之一（張緯農 2009）。

另外，實驗中無法再次形成結塊的組別（烘乾溫度大於 100°C、經過超音波震碎再進行冷凍乾燥的 NTU-1 結塊），除了以 160°C 烘乾的組別 NTU-1 表面疏水性脂肪酸可能遭受破壞造成疏水性相對較低以外，其他組別皆還是能呈現很高的疏水性。在 4.3.4 節中發現震碎的 NTU-1 細胞碎片經冷凍乾燥後無法再次聚進形成結塊，但這一節中經過實驗發現其表面仍具有很高的疏水性，所以更加能確認細胞表面的完整性對於 NTU-1 再次形成結塊的能力有很大的影響。我們推測當烘乾溫度高於 100°C 時，細胞表面會因為溫度太高開始變質破裂，因而造成細胞的破碎，其中以 160°C 乾燥組別更為明顯，其細胞顏色已經改變而呈現焦黑的情形，然而此時表面脂肪酸並沒有完全被破壞，故仍具有一定疏水性，但是細胞已不完整，所以無法再次形成結塊將正十六烷包覆。乾燥後 NTU-1 再形成結塊的機制將於 4.4.8 節中詳細討論。

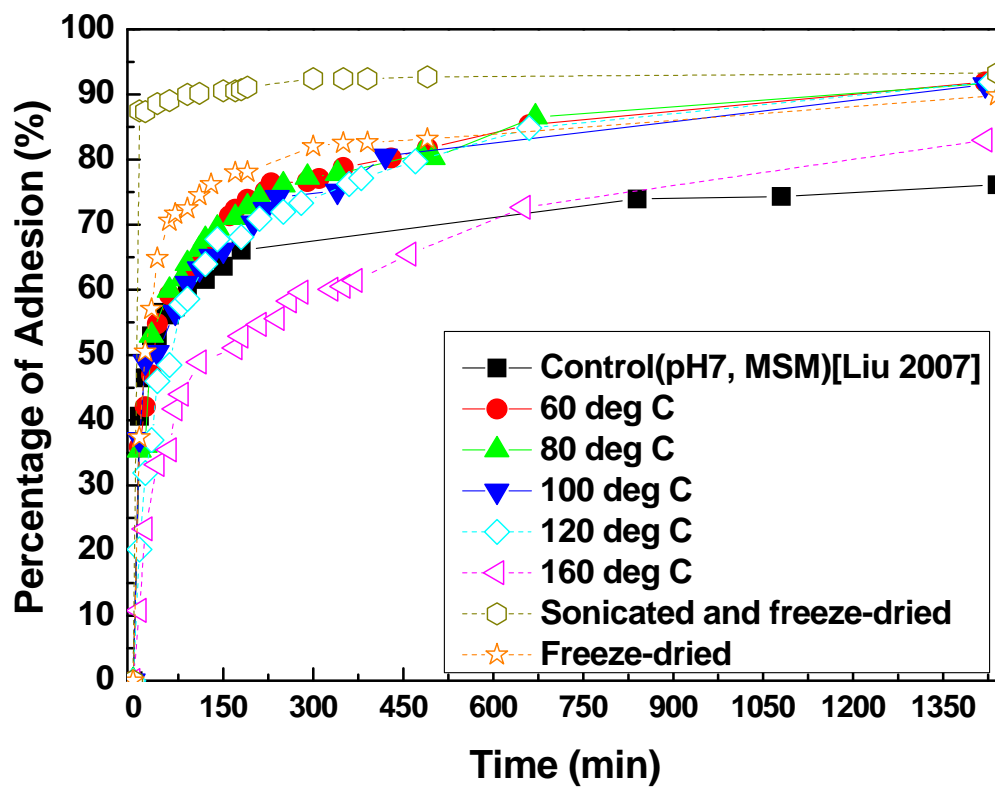


圖 4.4.2-1 不同乾燥條件下 NTU-1 細胞表面疏水性測定

#### 4.4.3 烘乾後的 NTU-1 結塊存放溫度與時間之探討

將以正十六烷培養而得的 NTU-1 結塊利用冷凍乾燥或是烘乾的方法使其乾燥的目的是因為乾燥後的結塊較易保存，且若將其與正十六烷重新加入礦物培養基進行搖晃培養，乾燥後的 NTU-1 結塊能以很快的速率重新包覆，配合物理撈除的方法可在短時間內移除大量的正十六烷。由 4.3 節發現冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊已失去活性無法再降解正十六烷，然而其在經過 30 天的存放下仍具有相當好的包覆能力。這一節中我們要探討以烘乾的方式乾燥後的結塊在經過長時間的存放後其包覆正十六烷的能力會不會受到影響。

實驗條件如下：

- NTU-1 結塊製備：5 mL ( $OD_{600} \doteq 1$ ) 礦物培養基菌液與 200  $\mu$ L 正十六烷加入 100 mL MSM 礦物培養基，培養 3 天後取得 NTU-1 細菌結塊。
- 烘乾溫度：80°C
- 烘乾所需時間：15 小時
- 存放溫度：30°C
- 存放時間：10 天、30 天
- 烘乾後初始取樣重量：0.0511 ( $\pm 0.0006$ ) g
- 烘乾後初始 NTU-1 結塊重量 (經過加入培養基復水後以 0.3  $\mu$ m 濾紙過濾)：0.0282 ( $\pm 0.0005$ ) g
- 培養基正十六烷濃度：2000 ppmv
- 培養基 pH 值：7  $\rightarrow$  6.8 (滅菌後)
- 培養基體積：100 mL
- 培養箱及轉速：往復式恆溫震盪水槽，100 rpm
- 分析時間點：第 12 小時

實驗中探討將乾燥 NTU-1 結塊存放於 30°C 的環境 10 天及 30 天後，對正十六烷的包覆效果是否會有影響。分別以第 12 小時細胞密度的分布變化及正十六烷之分布圖來觀察討論，以圖 4.4.3-1、圖 4.4.3-2 表示。

圖 4.4.3-1 NTU-1 細胞密度分布圖顯示出，不同存放條件下細胞密度之分布並沒有太大的差異，NTU-1 再形成結塊的密度於第 12 小時約有 0.25 ~ 0.27 g/L，剩餘在培養基中的 NTU-1 密度則約在 0.015 ~ 0.035 g/L 的範圍間。圖 4.4.3-2 一樣可以看出乾燥後的 NTU-1 結塊存放在 30°C 下經過 10 天及 30 天後仍具有相當好的包覆能力，兩組實驗皆能在 12 小時內包覆約 1700 ~ 1900 ppmv 的正十六烷。若將正十六烷的移除效率以百分比來表示，如圖 4.4.3-3，三組不同存放條件下的移除效率在第 12 小時皆能達到 86 ~ 95%。

此部分的實驗結果顯示，我們能將烘乾後的 NTU-1 結塊存放於一般的室溫環境下，且經存放 30 天後，乾燥 NTU-1 結塊包覆烷類的能力並不會受影響。

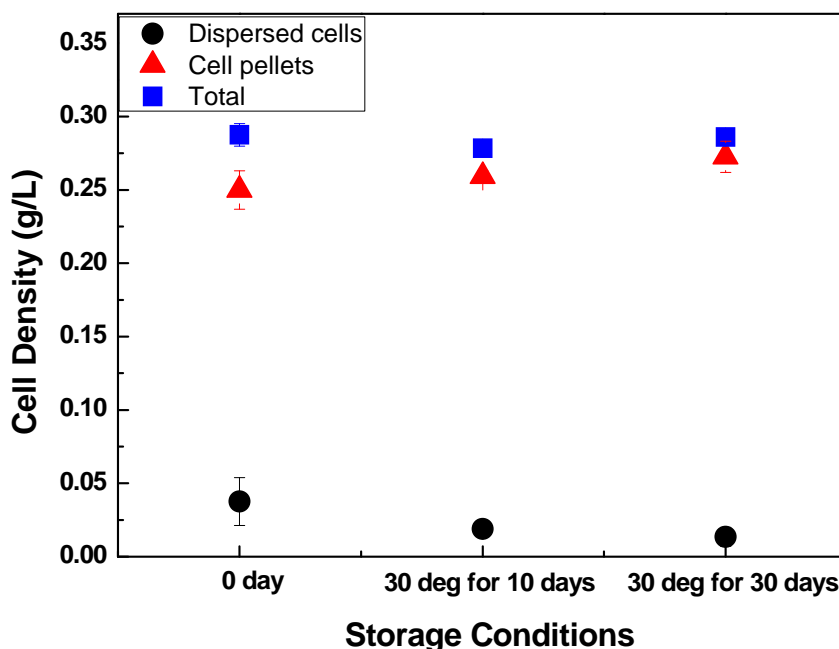


圖 4.4.3-1 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入烘乾後不同存放條件下的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 12 小時的 NTU-1 細胞密度之分布。

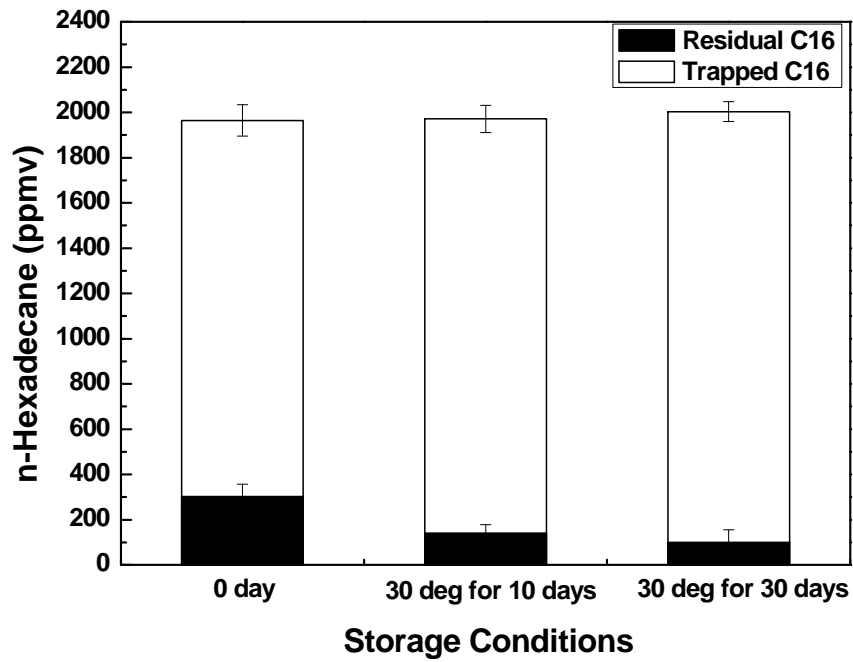


圖 4.4.3-2 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入烘乾後不同存放條件下的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 12 小時正十六烷殘餘在培養基及包覆量的分布圖。

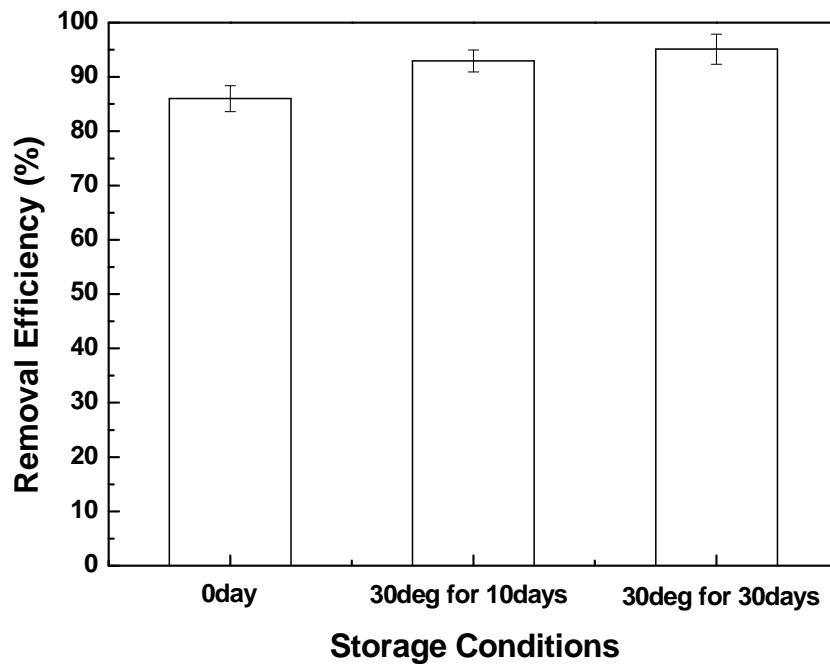


圖 4.4.3-3 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入烘乾後不同存放條件下的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 12 小時之正十六烷總移除百分比。

#### 4.4.4 烘乾後 NTU-1 結塊於培養過程 12 小時的細胞聚集情形

前面的實驗中，將乾燥後的 NTU-1 結塊與正十六烷加入礦物培養基進行震盪培養，都取第 12 個小時來作為分析時間點，此時 NTU-1 結塊重新包覆大量正十六烷使其移除效率能達到 85~95%。然而乾燥 NTU-1 結塊真正再次聚集包覆烷類的時間是在培養的第 1~2 小時間，故接下來將觀察 12 小時內 NTU-1 再形成結塊的情形及正十六烷包覆量隨時間的變化。

實驗條件如下：

- NTU-1 結塊製備：5 mL ( $OD_{600} \approx 1$ ) 礦物培養基菌液與 200  $\mu$ L 正十六烷加入 100 mL MSM 礦物培養基，培養 3 天後取得 NTU-1 細菌結塊。
- 烘乾溫度：80°C
- 烘乾所需時間：15 小時
- 烘乾後初始取樣重量：0.031 ( $\pm 0.0002$ ) g
- 烘乾初始 NTU-1 結塊重量 (經過加入培養基復水後以 0.3  $\mu$ m 濾紙過濾)：0.0172 ( $\pm 0.0007$ ) g
- 培養基正十六烷濃度：2000 ppmv
- 培養基 pH 值：7  $\rightarrow$  6.8 (滅菌後)
- 培養基體積：100 mL
- 培養溫度：30°C
- 培養箱及轉速：往復式恆溫震盪水槽，100 rpm
- 分析時間點：第 2, 4, 6, 9, 12 小時

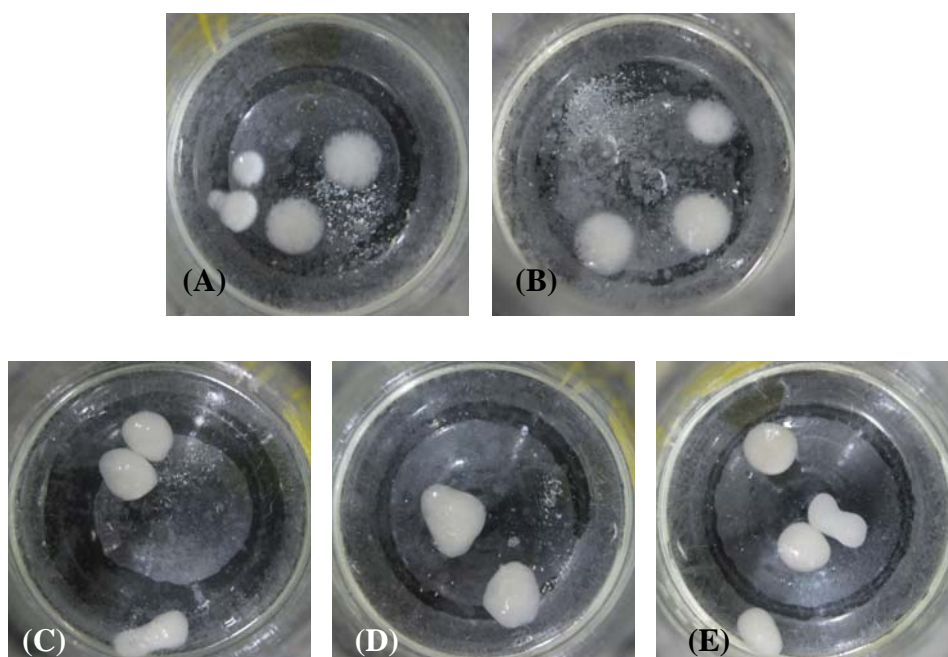
培養過程中 NTU-1 再形成結塊的情形如照片 4.4.4-1 所示，雖然 NTU-1 在 1~2 小時間即可再形成結塊，但結塊初期看起來較鬆散且是以錢幣狀的扁平圓形

聚集體懸浮在培養基的表面，如照片 4.4.4-1 (A)、(B) 所示。隨著時間的增加，第 6 個小時以後，結塊會漸漸形成較緊實的圓球狀懸浮在培養基上 (照片 4.4.4-1 (C)~(E))。同時測量培養過程中，培養基酸鹼值的變化、細胞密度的變化及正十六烷包覆的情形，以圖 4.4.4-1~3 表示。

由圖 4.4.4-1 可以看出加入乾燥後的 NTU-1 結塊後，反應經過 2 小時，培養基的酸鹼值即會從初始值 6.8 下降至 6.7 左右，而到第 12 小時培養基的酸鹼值皆會一直維在 6.7，這個結果除了顯示 NTU-1 結塊因為不具活性故不會降解正十六烷產生酸性代謝物以外，由此也可知在烘乾 NTU-1 結塊時，可能也把一些酸性的代謝物一起帶入烘乾，故當秤取乾燥後的 NTU-1 加入培養基時，這些酸性物質會重新溶解於培養基中。這也是為什麼在反應的第 2 個小時培養基的酸鹼值會有 0.1 的差距，且也可解釋乾燥後的 NTU-1 加入培養基後利用濾紙過濾所得的細胞重量會與初始加入的重量有所差異的原因。

接著，由圖 4.4.4-2 細胞密度分布變化圖可以看到隨著時間的增加，殘餘在培養基中的細胞密度會逐漸減少而形成結塊的細胞密度則會慢慢的上升，此情形與圖 4.4.4-3 正十六烷分布圖的趨勢符合，隨著時間增加正十六烷被包覆的量也跟著提升。這個現象顯示了結塊再次的形成是因為乾燥後的細胞結塊會吸附正十六烷，並隨著時間以正十六烷為連結慢慢聚集形成較大顆粒的結塊。圖 4.4.4-2 及 4.4.4-3 中可觀察到細胞密度的分布及正十六烷的包覆量在第 9 個小時以後已經趨於穩定平衡，約以 0.16 g/L 的結塊密度包覆了 1700 ppmv 的正十六烷，與第 12 小時所量測的結果差不多，往後的實驗中仍選擇以第 12 個小時來進行分析。

將正十六烷的移除效率以百分比來表示，如圖 4.4.4-4 所示。由圖 4.4.4-4 可以看出 NTU-1 結塊在 2 小時內即能包覆並移除掉 65% 濃度為 2000 ppmv 的正十六烷。隨著時間的增加，移除效率也跟著上升，到達第 9 個小時以後即達成平衡，能移除掉約 86% 的正十六烷，而第 12 小時則約能移除掉 90% 的正十六烷。



照片 4.4.4-1 培養條件 30°C、100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入烘乾後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷時，隨著時間 NTU-1 細胞結塊變化的情形。(A) 2 小時；(B) 4 小時；(C) 6 小時；(D) 9 小時；(E) 12 小時。

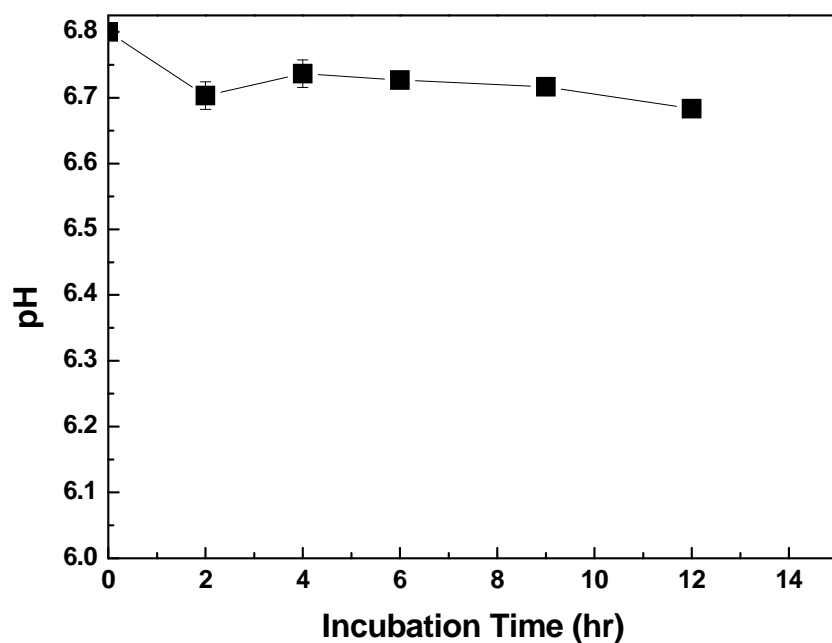


圖 4.4.4-1 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入烘乾後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷時，隨著時間培養基酸鹼值的變化。

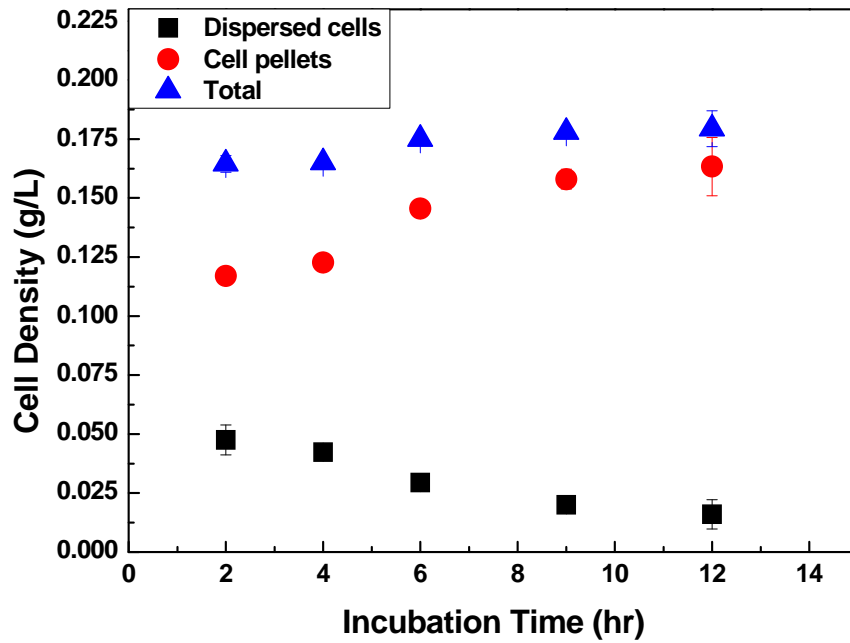


圖 4.4.4-2 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入烘乾後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷時，隨著時間 NTU-1 細胞密度之分布。

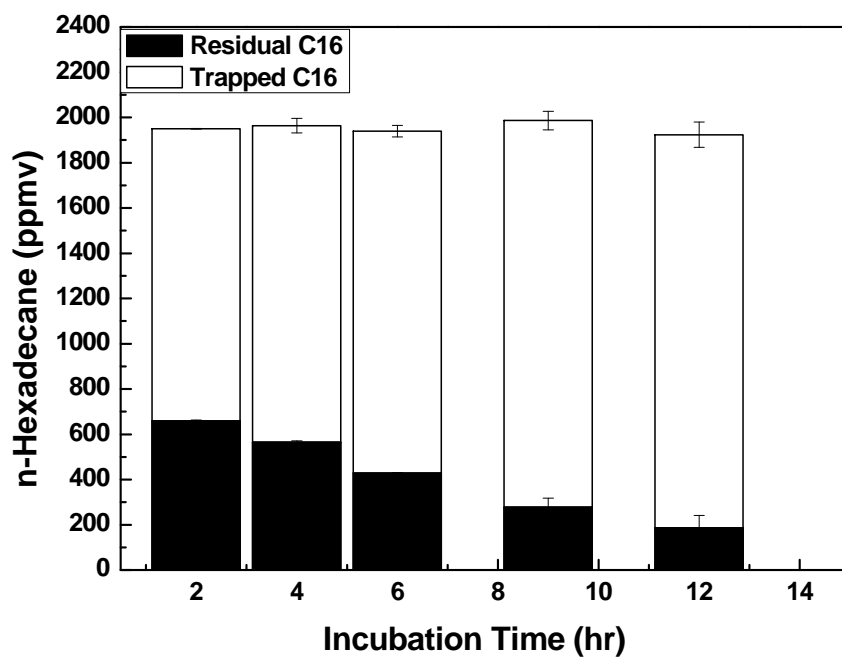


圖 4.4.4-3 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入烘乾後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷時，隨著時間正十六烷殘餘在培養基及包覆量的分布圖。

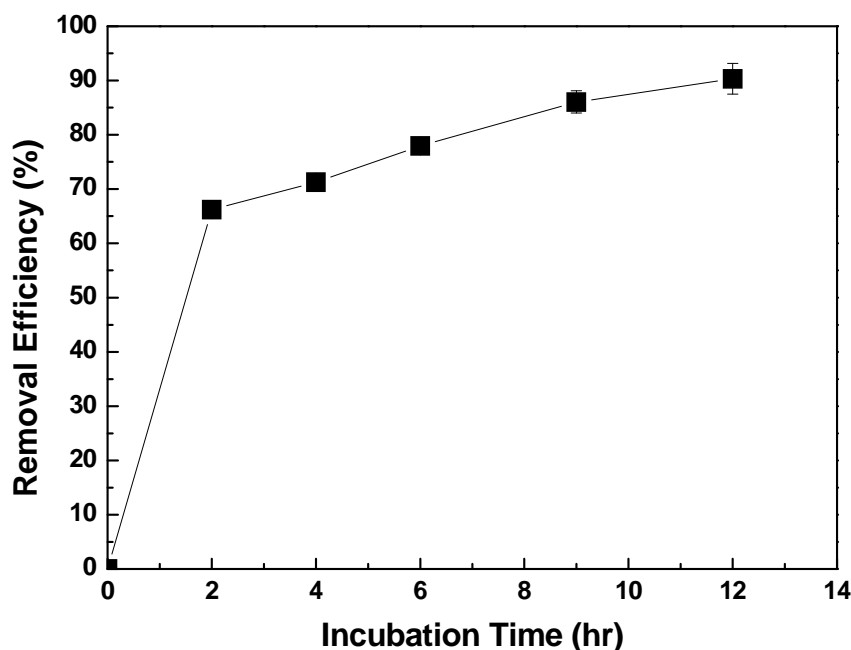


圖 4.4.4-4 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入烘乾後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷時，隨著時間正十六烷總移除百分比之變化圖。

#### 4.4.5 以不同量之乾燥 NTU-1 結塊處理 2000 ppmv 正十六烷

由前面實驗 4.4.1、4.4.3 節中發現 NTU-1 在第 12 小時約以 0.25 ~ 0.27 g/L 的結塊密度包覆了 1700 ~ 1900 ppmv 的正十六烷，然而 4.4.4 節中的 NTU-1 在第 12 小時卻以較低的結塊密度 0.16 g/L 包覆了 1700 ppmv 的正十六烷。不同密度的 NTU-1 結塊卻包覆了相同濃度的烷類，顯示在 NTU-1 添加的重量大於一定量後，正十六烷的包覆量不會隨著細胞量越高而增加。4.3.2 節中得到冷凍乾燥後 NTU-1 結塊密度為 0.08 g/L 時，正十六烷的包覆效果較差，2000 ppmv 的正十六烷中約只能移除掉 50 ~ 60%；而當冷凍乾燥後 NTU-1 密度大於 0.2 g/L 時，正十六烷即能達到 80 ~ 90% 的移除效果。在這一節實驗中，將添加的正十六烷濃度固定為 2000 ppmv，並測試每 100 mL 礦物培養基中加入不同重量的乾燥 NTU-1

結塊時，正十六烷被包覆及移除的效果為何，進而找出處理 2000 ppmv 正十六烷時，最適合添加的乾燥 NTU-1 重量。

實驗條件如下：

- NTU-1 結塊製備：5 mL ( $OD_{600} \doteq 1$ ) 礦物培養基菌液與 200  $\mu$ L 正十六烷加入 100 mL MSM 礦物培養基，培養 3 天後取得 NTU-1 細菌結塊。
- 烘乾溫度：80℃
- 烘乾所需時間：15 小時
- 烘乾後初始取樣重量：(A) 0.01；(B) 0.02；(C) 0.03；(D) 0.05；(E) 0.06；(F) 0.08；(G) 0.1 g
- 烘乾初始 NTU-1 結塊重量 (經過加入培養基復水後以 0.3  $\mu$ m 濾紙過濾)：(A) 0.0054；(B) 0.0122；(C) 0.0179；(D) 0.0278；(E) 0.0357；(F) 0.0463；(G) 0.0573 g
- 培養基正十六烷濃度：2000 ppmv
- 培養基 pH 值：7  $\rightarrow$  6.8 (滅菌後)
- 培養基體積：100 mL
- 培養箱及轉速：往復式恆溫震盪水槽，100 rpm
- 分析時間點：第 12 小時

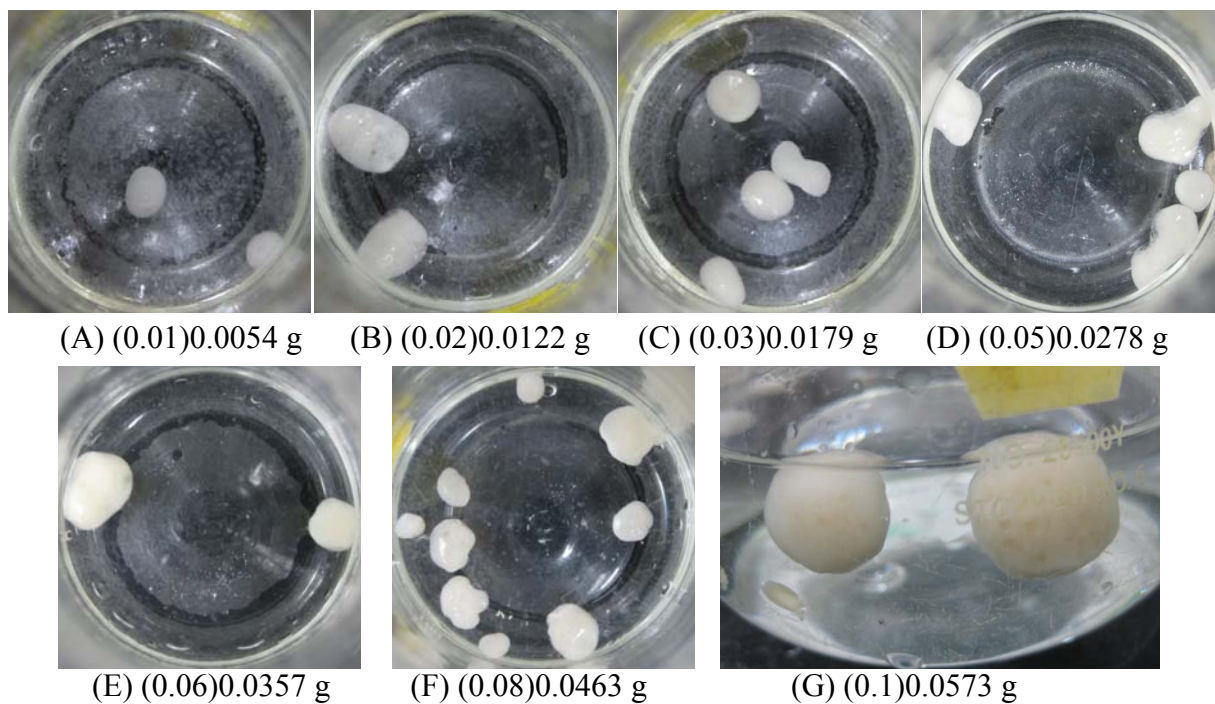
實驗中測試了 7 個不同初始的 NTU-1 結塊重量，分別觀察這 7 組不同重量的 NTU-1 在第 12 個小時所呈現的結塊形態，如照片 4.4.5-1 所示。同時也分析第 12 小時 NTU-1 細胞密度的變化及正十六烷的分布情形，以圖 4.4.5-1~2 表示。由照片 4.4.5-1 可以看出，隨著添加的 NTU-1 重量的不同，每一組實驗皆能再形成結塊將正十六烷給包覆起來，但包覆的效果卻有差異，且很明顯的看出當 NTU-1 添加初始重量較低時，結塊的形態會較鬆散且呈現白色，如照片 4.4.5-1 (A)、(B)。當初始 NTU-1 重量提高至 0.018 g 或 0.028 g 時，會形成較緊實的乳白色結塊，如照片 4.4.5-1 (C)、(D)。於更高添加 NTU-1 的重量下，結塊則會呈

現緊實且顏色為淡黃色的情形，如照片 4.4.5-1 (F)、(G) 所示。這個現象顯現出在相同濃度的正十六烷下，不同重量的乾燥 NTU-1 結塊皆能聚集並將其包覆於結塊中，且因為形成的細胞密度不同而呈現不同形態及顏色。

同時由圖 4.4.5-1 細胞密度分布圖可以看到隨著初始取樣 NTU-1 重量的增加，再次形成的結塊細胞密度會跟著提升，而殘餘在培養基的細胞密度則會維持在 0.02 g/L 左右，這也說明了為什麼 NTU-1 再次形成結塊的顏色及緊實程度會有差異，當形成細胞密度越高結塊形態會較緊密且顏色較深。

圖 4.4.5-2 正十六烷的分布圖則顯示出當初始 NTU-1 重量較低時，正十六烷的包覆量也較低。例如，初始 NTU-1 重量為 0.0054 g 的組別，約只能包覆 1100 ppmv 左右的正十六烷。同時我們也可觀察到，並不會因為添加成倍數的 NTU-1 結塊而包覆成倍數的正十六烷。正十六烷的包覆量在初始 NTU-1 結塊重量為 0.018 g 以上時會維持 1700 ~ 1900 ppmv 的包覆量。

將正十六烷的包覆量與殘餘量換算成移除百分比，以圖 4.4.5-3 表示。由此圖可以知道 NTU-1 結塊初始取樣的重量較低時，正十六烷的移除效率較差。其中，初始 NTU-1 結塊重量約為 0.0054 g 的這組實驗，可以發現其誤差範圍較大，主要是因為系統中乾燥後的 NTU-1 結塊密度太低不足以完全吸附 2000 ppmv 的正十六烷並形成結塊，符合 4.3.2 節中 (2) 部分 (初始冷凍乾燥後 NTU-1 結塊重量為 0.008 g 時，正十六烷的包覆效果較差) 的實驗結果。在初始 NTU-1 重量大於 0.018 g 時，正十六烷的移除效果皆能達到 90% 或以上，與 4.3.2 節中 (1) 及 (3) 部分的實驗結果相似 (冷凍乾燥後初始 NTU-1 重量大於 0.02 g 時，正十六烷的移除效率能達到 80 ~ 90%)。故當正十六烷濃度為 2000 ppmv (每 100 mL 礦物培養基) 時，若要使其移除效率達 90% 以上又不想浪費多餘的 NTU-1 結塊時，我們可取初始 NTU-1 重量約為 0.02 g 較佳，因為再高的 NTU-1 重量也不會再提升正十六烷的包覆效果。將其換算可以知道在較大的系統中可使用 1 g/L 的 NTU-1 結塊密度來處理 10000 ppmv 的正十六烷。



照片 4.4.5-1 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，培養基中加入不同初始重量烘乾後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷第 12 小時 NTU-1 細胞結塊的形態。

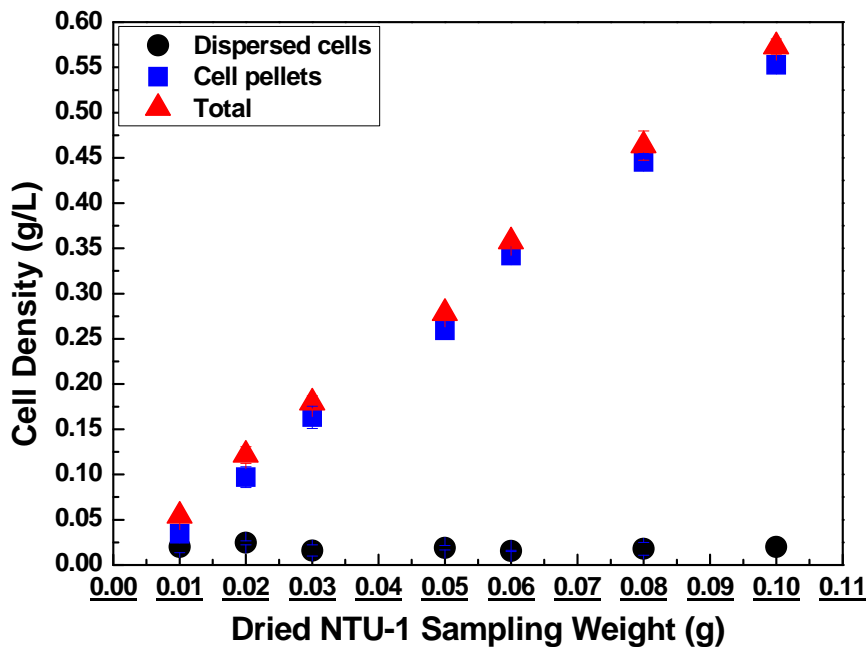


圖 4.4.5-1 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入不同初始重量烘乾後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷第 12 小時 NTU-1 細胞密度之分布。

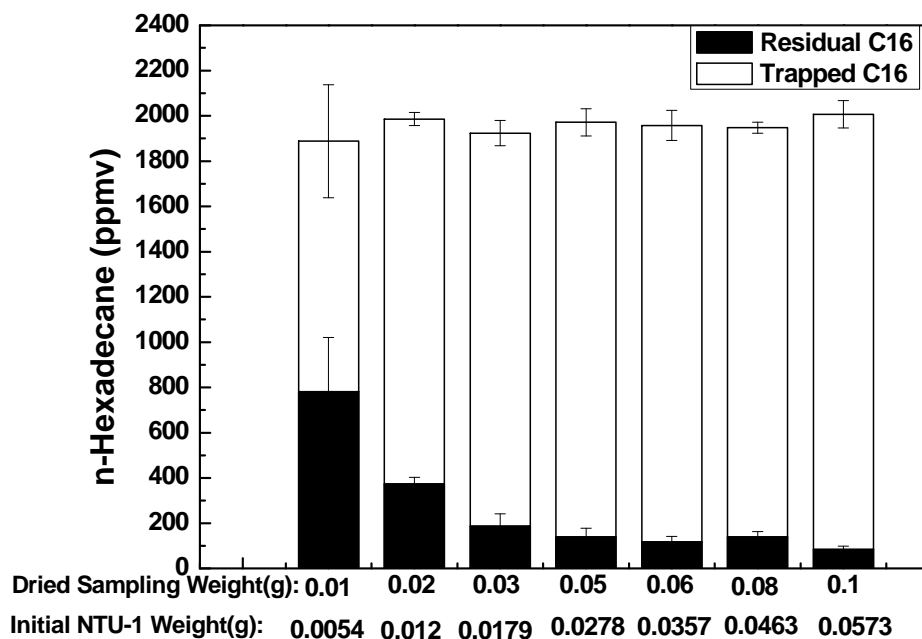


圖 4.4.5-2 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入不同初始重量烘乾後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 12 小時正十六烷殘餘在培養基及包覆量的分布圖。

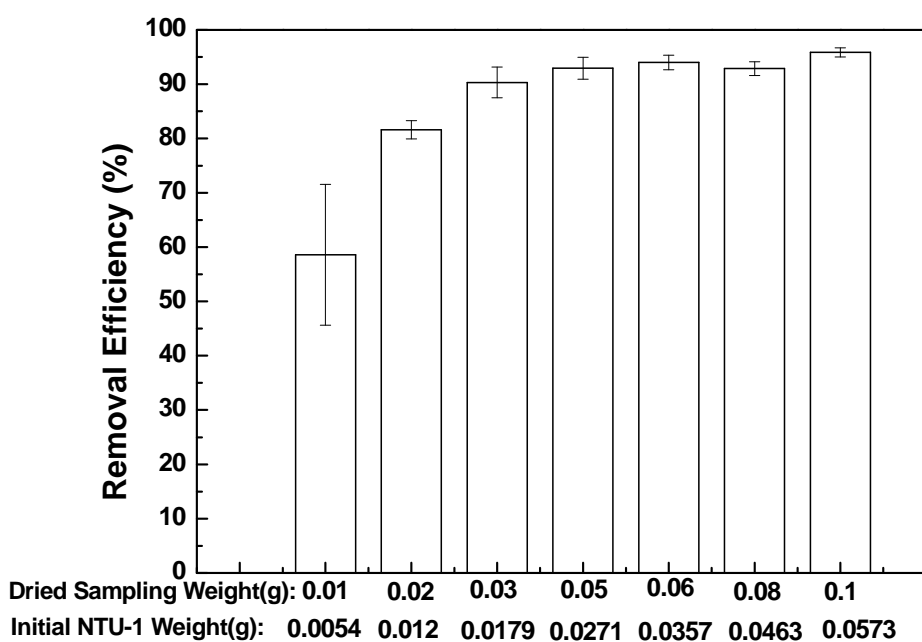


圖 4.4.5-3 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入不同初始重量烘乾後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 12 小時正十六烷總移除百分比。

#### 4.4.6 以固定量之乾燥 NTU-1 結塊處理不同濃度的正十六烷

上一節中發現 NTU-1 重量大於 0.02 g (初始取樣重量大於 0.03 g) 時，12 小時內皆能移除掉 90% 濃度為 2000 ppmv 的正十六烷。然而添加的克數越多，正十六烷移除效率的提升卻有限，NTU-1 無法完全將 100% 的正十六烷聚集包覆在形成的結塊中，反而是形成的結塊顏色會越來越深，此項實驗結果顯示了固定系統中碳源濃度，加入不同重量的乾燥 NTU-1 結塊時，這些細胞會以系統中的碳源濃度來分配吸附的量，因而再形成聚集體後的密度、形態及顏色會有所差異。而接下來這個部分的實驗是想要測試當加入固定重量的乾燥 NTU-1 結塊、不同體積的正十六烷時，NTU-1 再形成結塊的形態及包覆烷類的效果。

實驗條件如下：

- NTU-1 結塊製備：5 mL ( $OD_{600} = 1$ ) 礦物培養基菌液與 200  $\mu$ L 正十六烷加入 100 mL MSM 礦物培養基，培養 3 天後取得 NTU-1 細菌結塊。
- 烘乾溫度：80°C
- 烘乾所需時間：15 小時
- 烘乾後初始取樣重量：約 0.03 g
- 烘乾後初始 NTU-1 結塊重量 (經過加入培養基復水後以 0.3  $\mu$ m 濾紙過濾)：0.0184 ( $\pm$  0.0008) g
- 培養基正十六烷濃度：200, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000 ppmv
- 培養基 pH 值：7  $\rightarrow$  6.8 (滅菌後)
- 培養基體積：100 mL
- 培養溫度：30°C
- 培養箱及轉速：往復式恆溫震盪水槽，100 rpm

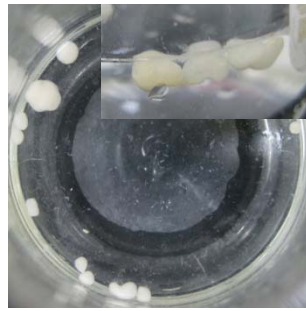
● 分析時間點：第 12 小時

實驗中測試了 13 個不同的正十六烷濃度，最小濃度為 200 ppmv 而最高濃度為 8000 ppmv。經過 12 個小時培養後，可以發現這 13 個濃度所形成細胞結塊的形態可大致分成三種類形，如照片 4.4.6-1 所示。當正十六烷添加濃度為 500 ppmv 以下時，由照片 4.4.6-1 (A) 可看到其形成的結塊呈現黃色不規則的小顆粒，大小約為 0.3 ~ 0.5 公分。當正十六烷添加濃度介於 500 ppmv 與 2000 ppmv 之間時，NTU-1 再形成的結塊則會呈現較緊實的淡黃色或白色圓球狀，大小約為 0.5 ~ 1.5 公分且表面較光滑 (照片 4.4.6-1 (B) ~ (F))。當添加正十六烷的濃度大於 3000 ppmv 時，NTU-1 則會形成較鬆散且顏色呈現白色的扁平橢圓狀結塊 (照片 4.4.6-1 (G) ~ (K))。隨著添加濃度越高，如 7000 及 8000 ppmv 組別 (照片 4.4.6-1 (L)、(M))，可以看到雖然 NTU-1 會吸附正十六烷，但卻無法完全將正十六烷聚集形成結塊，故培養基表面會像是浮著一層油狀懸浮物。

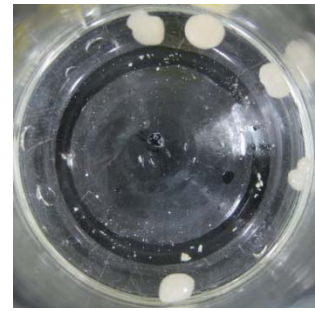




(A) 200 ppmv



(B) 500 ppmv



(C) 750 ppmv



(D) 1000 ppmv



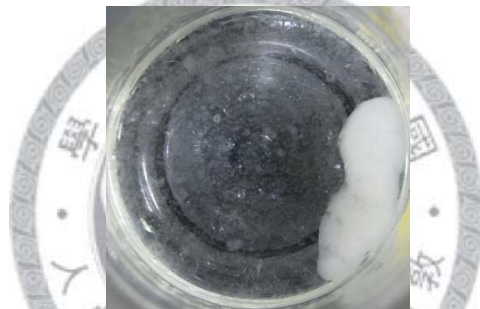
(E) 1500 ppmv



(F) 2000 ppmv



(G) 3000 ppmv



(H) 3500 ppmv



(I) 4000 ppmv



(J) 5000 ppmv



(K) 6000 ppmv



(L) 7000 ppmv



(M) 8000 ppmv

照片 4.4.6-1 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入相同初始重量烘乾後的 NTU-1 結塊，處理不同濃度正十六烷，第 12 小時 NTU-1 細胞結塊的形態。

接著討論實驗中 NTU-1 結塊細胞密度分布的變化及正十六烷的包覆效果，以圖 4.4.6-1、圖 4.4.6-2 來表示。由圖 4.4.6-1 可以看出殘餘在培養基中的細胞密度在添加的正十六烷濃度大於 3500 ppmv 時會有增加的趨勢，形成結塊的細胞密度則相對的逐漸下降，將這個結果配合圖 4.4.6-2 正十六烷分布圖來看，當殘餘在培養基中的細胞密度提升，正十六烷留在培養基的量也會增加。另外，當正十六烷添加濃度小於 2000 ppmv 時，雖然形成的結塊構造較緊實，但是經過分析後仍可看出每組實驗都會有部分正十六烷殘餘在培養基中，造成移除效率無法達到 100%。

推測這些殘餘在培養基中正十六烷的量與 NTU-1 細胞殘餘在培養基中的密度有關，我們認為乾燥後的 NTU-1 結塊與正十六烷加入培養基後，NTU-1 會隨著正十六烷的濃度不同而吸附不同濃度的正十六烷且以正十六烷作為連結物再次形成結塊，但是總是會有一些 NTU-1 細胞在烘乾的過程中受到破壞造成其表面不完整，而這些 NTU-1 碎片是能黏附一些正十六烷，但是卻無法再次聚集形成大顆粒結塊，因而這些貼附正十六烷的細胞碎片會在分離過程中通過濾網而殘餘在培養基。此外，乾燥的 NTU-1 結塊也可能會因為添加的正十六烷濃度太高，因而在搖晃培養時，油滴顆粒量太多、細胞量較少，造成形成的結塊構造較鬆散不緊密，故在使用篩網分離時鬆散的 NTU-1 細胞容易通過濾網而留在培養基中。這也是為什麼實驗中總是能測得殘餘在培養基的 NTU-1 密度，且若這些測得的密度增加的話，殘餘在培養基中正十六烷的比例也會增加。

探討培養基中每單位乾燥後的 NTU-1 結塊能包覆正十六烷的量  
( $= \frac{\text{NTU-1 結塊中正十六烷包覆量 (g/100 mL)}}{\text{NTU-1 結塊細胞密度 (g/100 mL)}}$ )，我們取在較高濃度下仍具有接近 90% 移除效率，初始正十六烷濃度為 3500 ppmv 的組別來計算，其以 0.0153 g/100 mL 的結塊密度即包覆了約 3060 ppmv 的正十六烷，換算後可以發現每單位重量的 NTU-1 結塊約能包覆 15.5 倍重的正十六烷。若以初始正十六烷濃度為 5000 ppmv 的正十六烷來計算，可得到每單位重量的 NTU-1 結塊能包覆 22 倍的

正十六烷 (培養基中 NTU-1 以結塊密度 0.0149 g/100 mL 包覆了約 4300 ppmv 的正十六烷)。以上的結果顯示，培養基中同樣重量的 NTU-1 結塊會因為添加正十六烷的濃度不同而展現不同的吸附及包覆能力，但如果添加的正十六烷濃度過高，這些吸附正十六烷的結塊細胞無法再次聚集，使移除效果變得較差。

最後將正十六烷的包覆量與殘餘量換算成移除百分比，以圖 4.4.6-3 表示。由此圖可以看出當添加正十六烷的濃度小於 6000 ppmv 時，乾燥的 NTU-1 結塊皆能展現很好的包覆能力使其移除效果達到 80% 以上；正十六烷濃度小於 3000 ppmv 時，大部分的組別其移除效率甚至能達到 90% 或 90% 以上，再一次顯示了 NTU-1 結塊相當高的包覆及移除正十六烷能力。

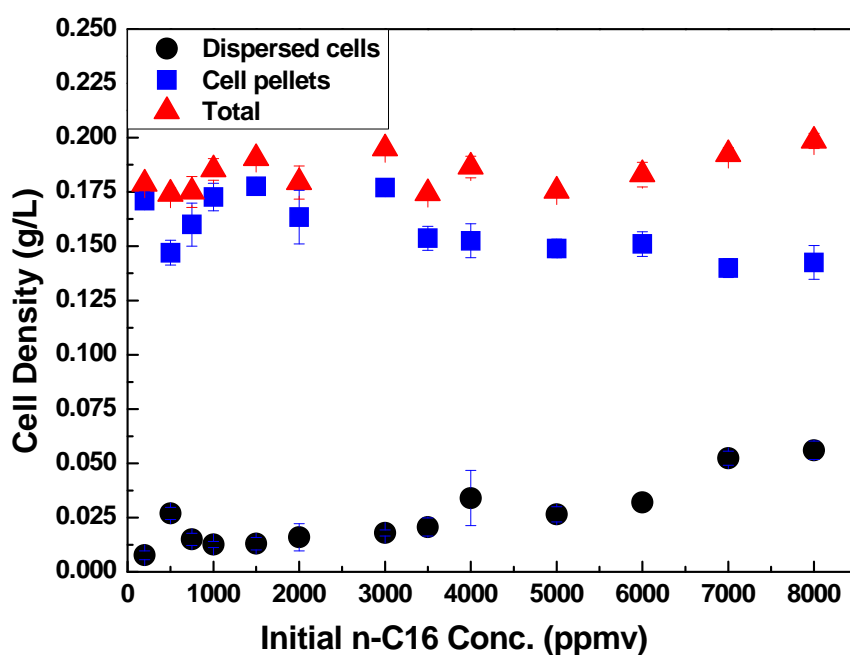


圖 4.4.6-1 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入相同初始重量烘乾後的 NTU-1 結塊，處理不同濃度正十六烷，第 12 小時 NTU-1 細胞密度之分布。

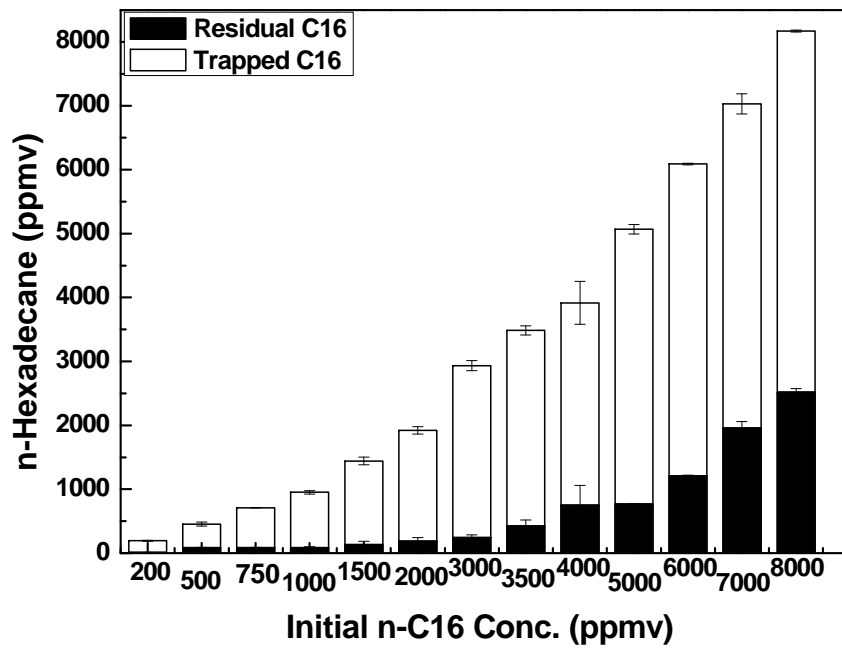


圖 4.4.6-2 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入相同初始重量烘乾後的 NTU-1 結塊，處理不同濃度正十六烷，第 12 小時正十六烷殘餘在培養基及包覆量的分布圖。

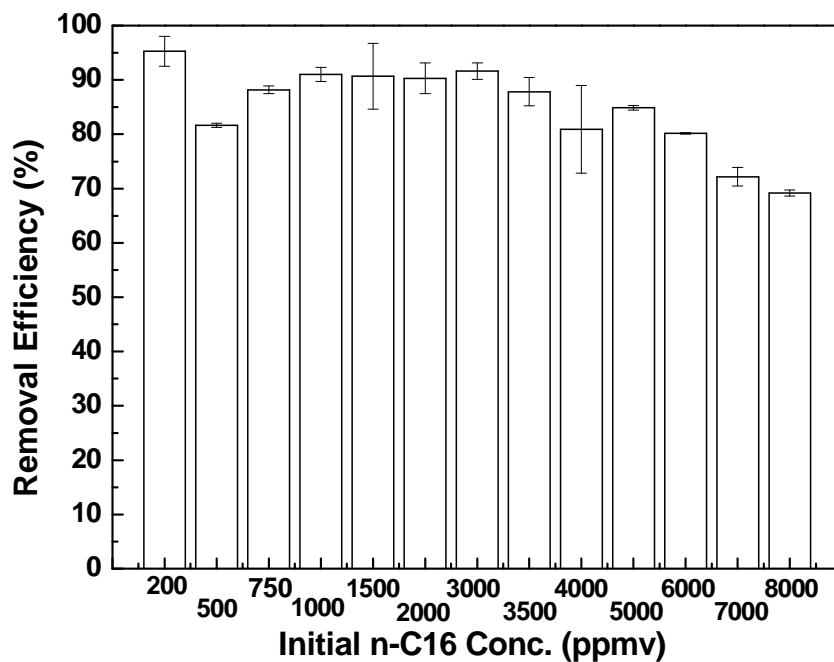


圖 4.4.6-3 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，礦物培養基中加入相同初始重量烘乾後的 NTU-1 結塊，處理不同濃度正十六烷，第 12 小時正十六烷總移除百分比。

#### 4.4.7 提高乾燥 NTU-1 結塊移除正十六烷效率的方法

上一節實驗中發現不管添加的正十六烷濃度為多少，經過添加乾燥後的 NTU-1 結塊來包覆移除時，總會有一些正十六烷殘餘在培養基中。以添加正十六烷的濃度為 2000 ppmv 為例，其在經過 12 小時培養後進行分離結塊及分析，可發現約有 200 ppmv 左右的正十六烷殘餘在培養基中。接下來我們設計了一個兩段式添加乾燥 NTU-1 結塊的實驗，試著來移除這些剩餘的正十六烷。

實驗條件如下：

- NTU-1 結塊製備：5 mL ( $OD_{600} \approx 1$ ) 礦物培養基菌液與 200  $\mu$ L 正十六烷加入 100 mL MSM 礦物培養基，培養 3 天後取得 NTU-1 細菌結塊。
- 烘乾溫度：80°C
- 烘乾所需時間：15 小時
- 烘乾後初始取樣重量：(1) 0.0311 ( $\pm 0.0003$ ) g；(2) 0.0312 ( $\pm 0.0005$ ) g
- 添加乾燥 NTU-1 時間：(1) 第 0 小時；(2) 第 6 小時
- 培養基正十六烷濃度：2000 ppmv
- 培養基 pH 值：7  $\rightarrow$  6.8 (滅菌後)
- 培養基體積：100 mL
- 培養溫度：30°C
- 培養箱及轉速：往復式恆溫震盪水槽，100 rpm
- 分析時間點：第 6、12 小時

實驗流程大致如下：首先取約 0.03 g 烘乾後的結塊與 2000 ppmv 的正十六烷加入 100 mL 礦物培養基中，經過 6 小時的培養後，將已形成的白色圓球狀結塊以 60 mesh 的篩網過濾分離並進行正十六烷包覆量及細胞密度的分析，接著在剩

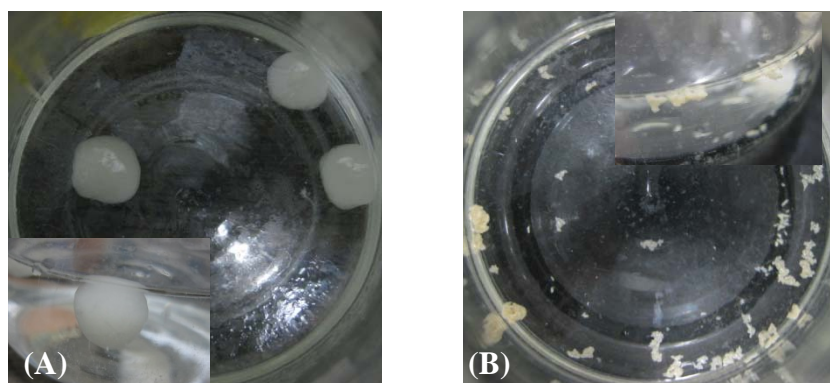
餘的培養基中重新再加入 0.03 g 的乾燥結塊，反應再經過 6 小時 (第 12 小時)，可發現 NTU-1 結塊呈現黃色不規則狀的小顆粒，同樣將結塊再次分離後進行正十六烷包覆量及殘餘量分析。實驗中 NTU-1 結塊的情形如照片 4.4.7-1 所示。由照片 4.4.7-1 可以看出當培養基中正十六烷濃度較高時，NTU-1 所形成的結塊會呈現白色圓球狀 (照片 4.4.7-1 (A))，當系統中正十六烷濃度減少時，NTU-1 的結塊則會呈現黃色不規則的小顆粒狀 (照片 4.4.7-1 (B))。

於第 6 小時及第 12 小時進行了 NTU-1 細胞密度及培養基中正十六烷濃度的分析，結果如圖 4.4.7-1~2 所示。圖 4.4.7-1 為 NTU-1 細胞密度的分布，培養第 6 小時將結塊分離並測量其乾重，但是無法測得此時殘餘在培養基的細胞重量，因為分離結塊後會在殘餘的培養基中再加入新的乾燥 NTU-1 結塊，故殘餘在培養基的 NTU-1 細胞密度只能在第 12 個小時測得。由圖 4.4.7-1 可以看出在 12 小時後，殘餘在培養基中的細胞密度約剩下 0.0075 g/L，而形成結塊的密度約有 0.18 g/L，比在第 6 個小時分析得到的 0.15 g/L 來得高，然而其包覆的正十六烷量較少，所以很明顯的細胞結塊形態也會有所差異，這個現象再次證明了乾燥後的 NTU-1 結塊會因為系統中烷類濃度的不同而展現不同的吸附能力且形成不同形態顏色的細菌結塊。

接著由圖 4.4.7-2 培養基中正十六烷濃度分布圖可以看出反應經過 6 小時以後，NTU-1 形成的結塊約能包覆 1680 ppmv 的正十六烷，此時殘餘在培養基中的正十六烷濃度約為 320 ppmv。將形成的 NTU-1 聚集體分離並加入新的乾燥後 NTU-1 結塊，再經過培養 6 個小時後，我們可以發現第 12 小時殘餘在培養基中的正十六烷濃度只剩下 25 ppmv 左右，顯示再加入的 NTU-1 結塊能將約 300 ppmv 的正十六烷包覆並移除。

將正十六烷的總包覆量以移除百分比表示，如圖 4.4.6-3 所示。由此圖可以看到反應經過 12 小時，2000 ppmv 的正十六烷的移除效率高達 98.6%，比 4.4.6 節中單獨添加一次 0.03 g 乾燥結塊的移除百分比高了將近 10%。這樣的實驗結果顯示了系統中殘餘的正十六烷能因為新添加的乾燥 NTU-1 結塊而被包覆並移除，

使正十六烷的移除效率能在 12 小時內接近 100%。



照片 4.4.7-1 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，兩段式添加 0.03 g 乾燥 NTU-1 結塊 (第 0 小時及第 6 小時)，處理 2000 ppmv 正十六烷，不同時間點下的細胞結塊情形。(A) 第 6 小時；(B) 第 12 小時。

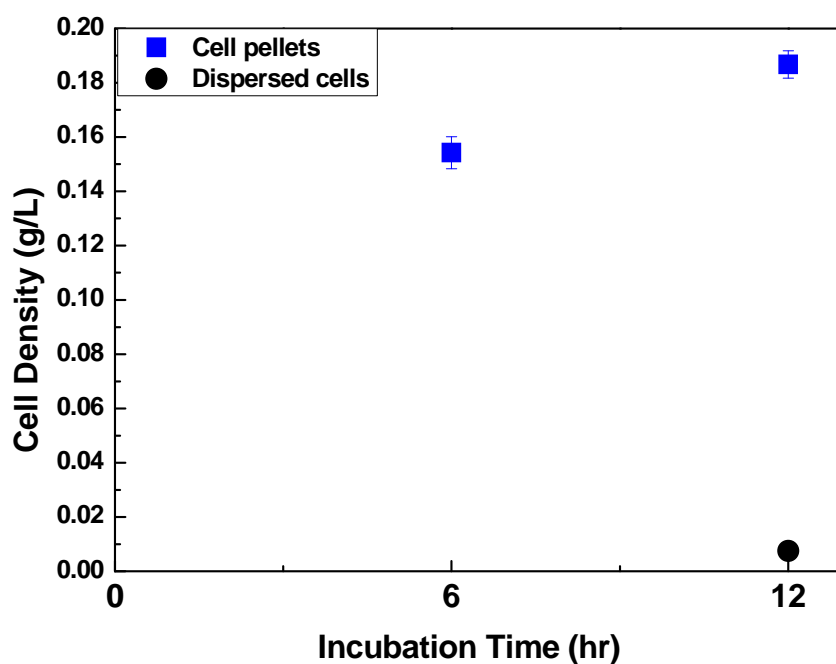


圖 4.4.7-1 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，兩段式添加 0.03 g 乾燥 NTU-1 結塊 (第 0 小時及第 6 小時)，處理 2000 ppmv 正十六烷，不同時間點下 NTU-1 細胞密度之分布。

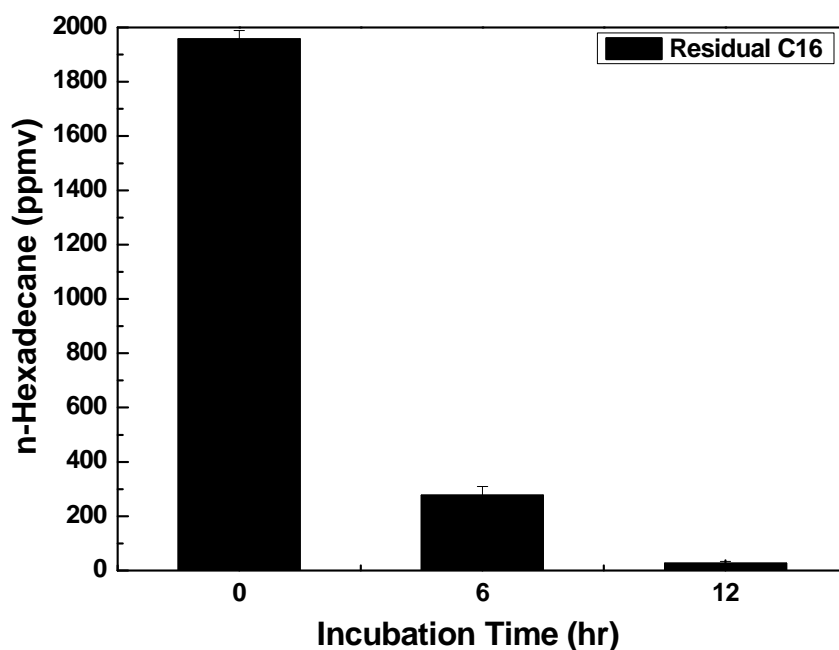


圖 4.4.7-2 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，兩段式添加 0.03 g 乾燥 NTU-1 結塊 (第 0 小時及第 6 小時)，處理 2000 ppmv 正十六烷，不同時間點殘餘在培養基中正十六烷的濃度分布。

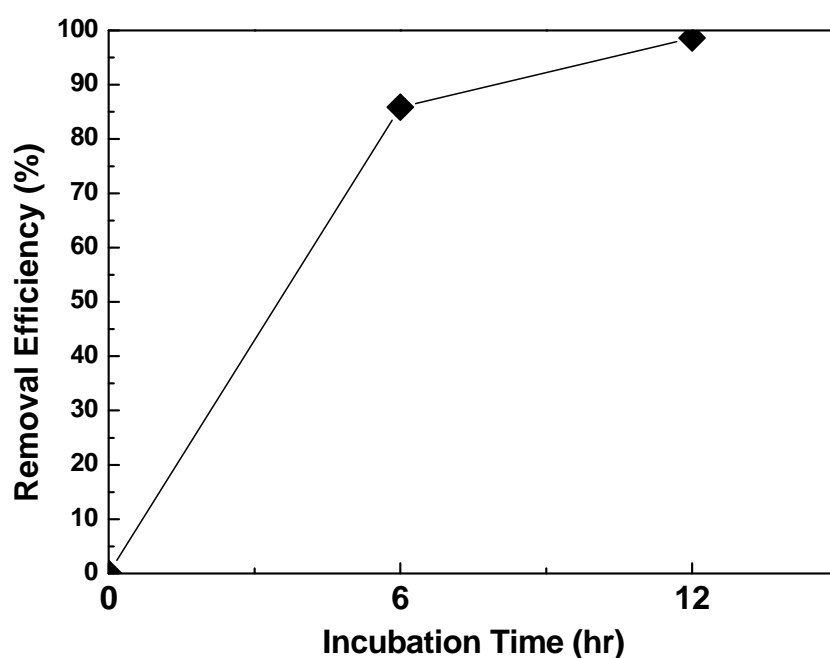


圖 4.4.7-3 培養條件 30℃、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，兩段式添加 0.03 g 乾燥 NTU-1 結塊 (第 0 小時及第 6 小時)，處理 2000 ppmv 正十六烷，不同時間點下正十六烷的移除效率百分比。

#### 4.4.8 乾燥 NTU-1 結塊再形成聚集體包覆正十六烷之機制

這一節中，我們將為不同方法乾燥（冷凍乾燥及烘乾）的 NTU-1 結塊，其再聚集形成結塊將正十六烷包覆的機制作個整理與討論。

文獻中提到影響微生物聚集現象的幾個因子包含有碳源種類、溫度、疏水性作用力、凡得瓦力、靜電作用力、微生物生長期...等 (Busch and Stumm 1968, Bossier and Verstraete 1996, Malik *et al.* 2003)。以上幾個影響因子皆是指微生物還具活性的情況下，本實驗中將已形成結塊的 NTU-1 乾燥後再與烷類加入培養基後進行培養，由於乾燥後的 NTU-1 結塊已不具活性，故推測此時細胞表面的完整性與否也是影響 NTU-1 再形成結塊包覆正十六烷的重點之一。

若利用自由細胞態的 NTU-1 菌液處理正十六烷時，培養經過 40 小時以後，細胞結塊開始慢慢形成，經過實驗室人員以掃描式電子顯微鏡觀察 NTU-1 結塊外觀，發現結塊是由許多不規則排列的細胞所組成，而經由萃取細胞表面脂肪酸則發現細胞表面上的脂肪酸有大幅增加的現象，尤其是以碳鏈長度  $C_{12}$ 、 $C_{14}$ 、 $C_{16}$ 、 $C_{18}$  的脂肪酸變化幅度最為明顯 (張緯農 2009)。文獻中指出，*Rhodococcus* 在降解烷類的過程中會產生一些界面活性劑，其中主要成分有脂肪酸 (fatty acids) 及醣脂類 (glycolipids)，這些物質常存在於 *Rhodococcus* 的細胞壁，且因其均具有長碳鏈結構故對烷類有很強的疏水性親和力 (Peng *et al.* 2007)。此實驗結果也說明了 NTU-1 結塊的形成與其細胞表面疏水性增強有很大的關係。

而利用乾燥後 NTU-1 結塊移除正十六烷的實驗中，發現若只添加了乾燥後的 NTU-1 結塊粉末而沒有加入正十六烷，此時 NTU-1 不會再形成結塊而是呈現粉末狀的細胞懸浮在液體中或是沈在底部。因而知道正十六烷的加入可作為 NTU-1 的連結劑，當疏水性 NTU-1 結塊吸附正十六烷時，會以一層正十六烷一層 NTU-1 結塊慢慢的堆疊成我們所看見的細胞結塊，這個現象也符合實驗室過往研究中對於以正十六烷培養 NTU-1 時結塊形成機制的推測 (劉志文 2007, 張

緯農 2009)。

4.3.4 節的實驗結果中發現若 NTU-1 結塊經過超音波處理成細胞碎片時，乾燥後的 NTU-1 碎片無法再次聚集，但以經過 MATH 實驗卻發現 NTU-1 碎片表面仍具有相當高的疏水性，因此知道細胞表面的完整性是影響 NTU-1 再次聚集的原因之一。同樣的結果也可以用在 4.4.1 節中烘乾溫度高於 100°C 的情況，NTU-1 細胞表面會因為溫度過高而產生變質，甚至有燒焦的情形，而雖然細胞的疏水性脂肪酸沒有被破壞分解，故細胞表面仍疏水，但此時細胞表面已不完整，因而無法再次形成聚集體。為了證明烘乾的 NTU-1 結塊是否會因為溫度太高而使細胞破碎，我們測量了乾燥後 NTU-1 結塊的細胞大小，詳細實驗可參考附錄 2。附錄 2 的實驗結果顯示，烘乾溫度大於 100°C 或是經超音波震碎的 NTU-1 結塊細胞大小確實相較於正常 NTU-1 及結塊烘乾溫度為 60、80°C 來得小。進而證實乾燥後 NTU-1 細胞需同時具備完整的細胞表面及疏水性才能順利將正十六烷包覆移除。

接下來將 NTU-1 結塊表面為完整或不完整的情況下與正十六烷的交互作用以圖 4.4.8-1 及 4.4.8-2 來表示。搖晃培養的過程中，正十六烷會分散成小油滴，在 100 rpm 轉速條件下，油滴大小分布主要為 0.5 ~ 1.2  $\mu\text{m}$  及 2 ~ 10  $\mu\text{m}$  (劉志文 2007, 張緯農 2009)，而 NTU-1 大小約為 2 ~ 3  $\mu\text{m}$ 。由圖 4.4.8-1 可以看出，當乾燥後 NTU-1 結塊表面完整時，其能順利黏附正十六烷，並能以堆疊的方式逐漸聚集形成較大顆粒的結塊。反之由圖 4.4.8-2 可以看到，當 NTU-1 細胞破裂形成細胞碎片時，雖然疏水性的脂肪酸沒有被破壞，且同樣會貼附在正十六烷上，但因為此時細胞已不完整，故無法以一層正十六烷一層 NTU-1 細胞的堆疊方式形成大顆粒結塊，因而呈現棉絮狀的細胞懸浮在液面上。

由此也可以推測，利用冷凍乾燥或烘乾溫度為 60 及 80°C 來乾燥 NTU-1 結塊的實驗組別，細胞表面大部分皆呈現完整的狀態，然而還是會有少部分的細胞在這些乾燥條件下被破壞而成為細胞碎片，這也是為什麼在前面的實驗中，儘管

已提高添加的 NTU-1 結塊量，但都還是會有一些正十六烷及 NTU-1 細胞殘餘在培養基中的原因 (如圖 4.4.8-3)。

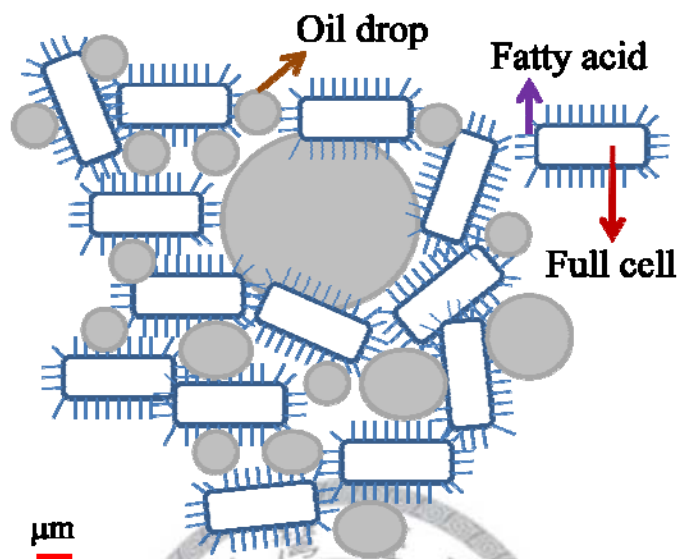


圖 4.4.8-1 乾燥後 NTU-1 結塊表面完整時，細胞貼附正十六烷形成大顆粒結塊示意圖。

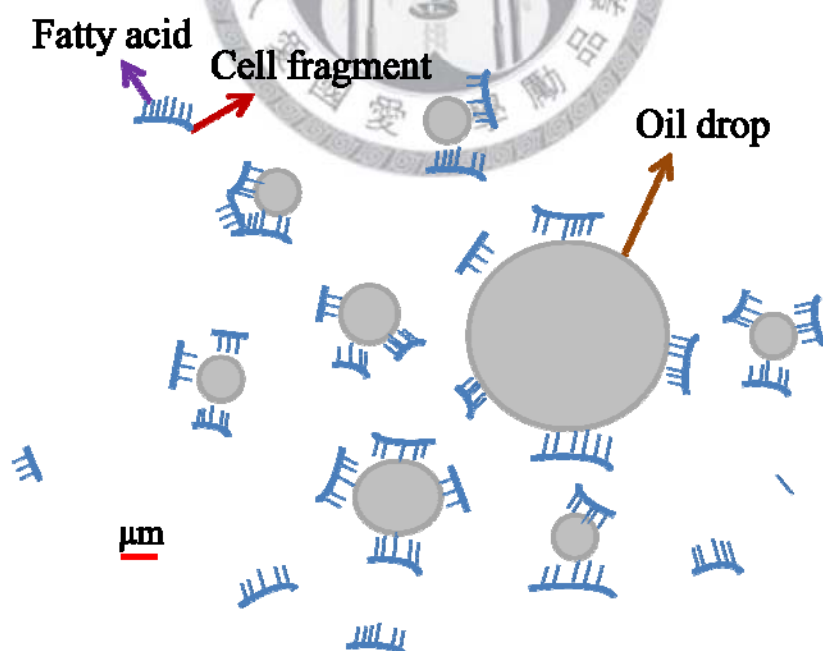


圖 4.4.8-2 乾燥後 NTU-1 結塊表面不完整時 (細胞碎片)，細胞貼附正十六烷示意圖。

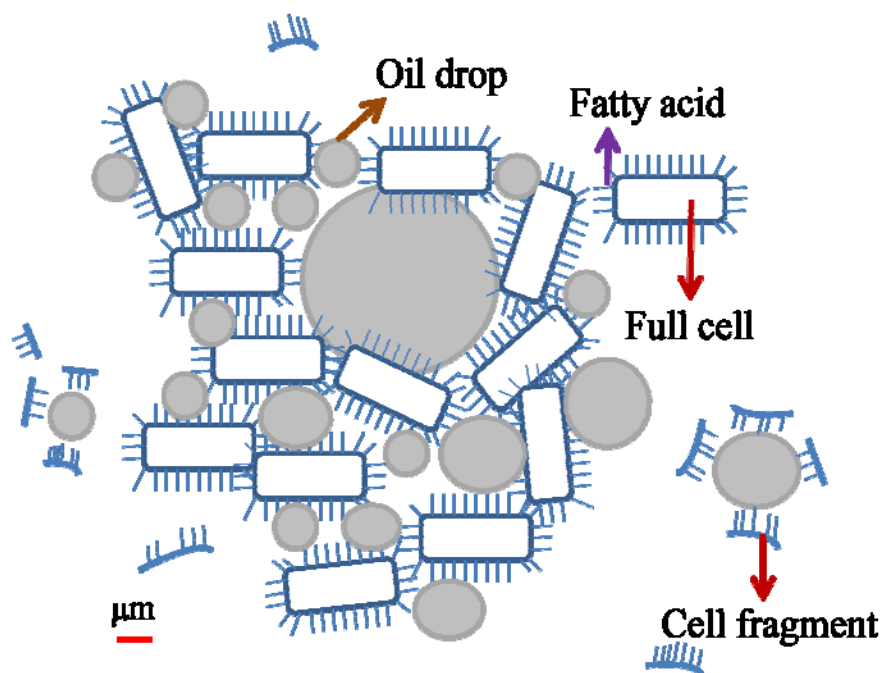


圖 4.4.8-3 NTU-1 結塊經過冷凍乾燥或以 60 及 80℃ 的條件烘乾後，細胞貼附正十六烷再形成聚集體之示意圖。

#### 4.4.9 討論

4.4.1 節中測試了不同烘乾溫度的乾燥 NTU-1 結塊來進行正十六烷的生物復育實驗，實驗中發現烘乾溫度以 80℃ 為較好的選擇，因為其烘乾時間只需 15 小時且包覆正十六烷的效果也很好。4.4.2 節中則測試了不同乾燥條件下的 NTU-1 結塊表面疏水性，結果發現細胞表面的完整性與否對於正十六烷包覆效果有很大的影響。當 NTU-1 結塊經過超音波震碎再進行冷凍乾燥或是烘乾 NTU-1 結塊的溫度高於 100℃ 時，NTU-1 細胞會破碎或是表面成分變質而使細胞不再完整，此時雖然細胞上的脂肪酸仍存在故具有一定的疏水性，然而細胞表面已不再完整，因而無法再次聚集將正十六重新包覆並移除。

同時進行了存放溫度及時間的測試，結果發現乾燥後的 NTU-1 結塊在經過 30 天存放於 30℃ 的環境下，仍保有很好的包覆移除正十六烷能力，故知道乾燥

後的結塊可以在室溫下長期的存放，這對於石油碳氫化合物污染的應用有很大的幫助，我們可以大量收集乾燥後的 NTU-1 結塊，一旦有需要時，其馬上就可以派上用場，不需等待細菌生長的時間即可在短時間內移除污染物。

討論乾燥後 NTU-1 再次形成結塊的時間，實驗中大多採取在第 12 個小時進行取樣分析。然而實驗過程中發現其實在 1~2 小時內 NTU-1 即能形成結塊但其構造會較鬆散，培養時間經過 6 小時以後，NTU-1 結塊會越趨穩定與緊實，故在 6 小時以後進行正十六烷包覆效果的分析較佳，其包覆正十六烷的量也會達一個穩定值。

接著測試了以不同添加的 NTU-1 重量來處理固定濃度 2000 ppmv 的正十六烷時並探討其移除效果，實驗中發現當系統中初始 NTU-1 結塊密度大於 0.2 g/L 時，2000 ppmv 中 90% 左右的正十六烷能被移除掉。而細胞結塊的構形及顏色則會因為添加的 NTU-1 克數越多而呈現越緊密及顏色較深的情形。這個部分的實驗推算出以密度約為 1 g/L 的 NTU-1 結塊來處理濃度為 10000 ppmv 的正十六烷較佳的選擇，因為這樣的 NTU-1 結塊密度即能對正十六烷有很好的移除效率，不需浪費多餘的 NTU-1 細胞。

同時測試了以相同初始 NTU-1 密度約 0.2 g/L 來處理不同濃度下的正十六烷，實驗中發現當正十六烷添加濃度低於 500 ppmv 時，結塊的形態會呈現不規則的黃色小顆粒。當濃度介於 500~2000 ppmv 時，細胞結塊則會呈現較緊實的圓球狀，且隨著濃度的增加，結塊顏色會越接近乳白色。若加入正十六烷的濃度大於 3000 ppmv 時，NTU-1 會形成較鬆散扁平狀的結塊，且當添加濃度越高，形成的結塊會越鬆散，移除效率也會跟著變差。實驗結果顯示添加正十六烷的濃度小於 6000 ppmv 時，乾燥重量約 0.02 g (每 100mL 礦物培養基) 的 NTU-1 結塊皆能展現很好的包覆能力使其移除效果達到 80% 以上。這個部分的實驗我們看出 NTU-1 具有很大的包覆能力，並能因為添加濃度的不同而展現不同的包覆能力而形成不同形態的細胞結塊。

4.4.7 節中則測試了兩段式添加乾燥 NTU-1 結塊的方法來提升正十六烷的移

除效果，培養經過 12 小時發現正十六烷的移除效率能由原本的 90%提升到近 100%，顯示這是一個有效能提高正十六烷移除效率的方法。

最後則整理出乾燥 NTU-1 結塊再形成聚集將正十六烷包覆的機制，主要與細胞表面的疏水性脂肪酸及細胞完整性有關。由乾燥後 NTU-1 結塊的疏水性測試及細胞粒徑大小的分析，我們推測出若單純的只有細胞表面脂肪酸存在而細胞已破碎不完整時，乾燥 NTU-1 無法再形成聚集包覆烷類。結塊的形成需同時具備這兩點特性，乾燥 NTU-1 才可順利貼附正十六烷，並能以不規則的堆疊方式慢慢的聚集形成大顆粒結塊，形成結塊的同時也能移除掉大部分的烷類，因而在相當短的時間內即能達到移除石油碳氫化合物的目標。



## 第五章 結論

石油碳氫化合物生物復育過程中，往往會因為碳氫化合物在水中的溶解度太低，造成微生物攝取不易、降解速率緩慢，使污染物之移除成效不彰。而本研究中的實驗結果顯示，在錐形瓶中加入篩網來幫助正十六烷的攪拌情形及增加 NTU-1 接觸及碰撞正十六烷的機會，使 NTU-1 在 44 小時內形成聚集並將殘餘正十六烷包覆於結塊中，此時正十六烷的移除效率可達到 95% 以上。另外，將已形成結塊包覆烷類的 NTU-1 進行冷凍乾燥或烘乾，乾燥後的 NTU-1 結塊雖然不具活性，但其能再次形成聚集且將新添加的烷類包覆，因而 12 小時內即能移除大量的烷類。這些研究成果對於石油污染處理方面有很大的潛力，也具有相當的應用性及競爭力。根據本論文的各項實驗結果及討論，作了以下的結論：

不同搖晃培養方式對於 NTU-1 形成聚集（結塊）的時間及形態會有差異，往復式培養下 NTU-1 的結塊時間較迴旋式培養提早了約 12 小時，且往復式培養下 NTU-1 結塊呈現 0.5~2 公分圓球狀而迴旋式培養方式下的 NTU-1 細胞聚集呈現片狀。在培養錐形瓶中加入不同大小及折角的篩網，可幫助迴旋式培養下 NTU-1 與正十六烷的接觸機會及形式，使 NTU-1 形成結塊將烷類包覆的時間提早到 44 小時以前，因而在 44 小時左右，配合物理撈除的方式可讓正十六烷的移除效率達 95% 以上。

利用冷凍乾燥的方式來保存以 NB 培養的 NTU-1，實驗結果發現若利用 1% 及 10%(w/v) 麥芽糖溶液作為冷凍乾燥時添加的保護劑，並存放於 -20°C 的環境下，可使乾燥後的 NTU-1 在經過 30 天存放下仍具有很高的存活率。且經實驗證實，冷凍乾燥後 NTU-1 的生理特性並不會受到影響及破壞。

同樣利用冷凍乾燥的方式來乾燥以正十六烷培養而得的 NTU-1 細菌結塊。然而實驗發現，不管添加任何保護劑，乾燥後的 NTU-1 結塊活性皆很低，因而無法降解烷類，但其包覆烷類的能力並不會受到影響，若添加的乾燥 NTU-1 密度約大於 0.02 g 時 (每 100 mL 礦物培養基)，2000 ~ 2500 ppmv 的正十六烷在 12 小時內即可移除掉 80 ~ 90%。推測造成 NTU-1 細胞活性如此差異的原因與其細胞表面性質的改變有關，且形成結塊後的 NTU-1 易聚集及表面有烷類的貼附，因而造成添加的保護劑無法接觸到細胞使保護效果不佳。

發現 NTU-1 結塊的生物活性對於烷類移除效果的影響不大後，我們利用烘乾的方式取代成本高及費時的冷凍乾燥法來使 NTU-1 結塊乾燥。實驗發現烘乾溫度高於 100°C，乾燥 NTU-1 結塊再聚集的能力會變差，因而選擇烘乾溫度 80°C，其乾燥所需時間約 15 小時且乾燥後的 NTU-1 結塊具有良好的包覆效果。這個部分發現可利用 1 g/L 的 NTU-1 結塊密度來處理 10000 ppmv 的正十六烷，因為在這樣的比例下正十六烷即能有很好的移除效率，不需再浪費多餘的乾燥 NTU-1 結塊。

而若固定初始乾燥 NTU-1 的結塊密度在約 0.2 g/L、添加不同濃度的正十六烷時，可看到 NTU-1 再形成結塊的形態及顏色也會有所差異。當正十六烷添加濃度為 500 ppmv 以下時，形成的結塊呈現黃色不規則的小顆粒，大小約為 0.3 ~ 0.5 公分；添加濃度介於 500 ppmv 與 2000 ppmv 之間時，NTU-1 再形成的結塊則會呈現較緊實的淡黃色或白色圓球狀，大小約為 0.5~1.5 公分且表面較光滑；當添加正十六烷的濃度大於 3000 ppmv 時，NTU-1 則會形成較鬆散且顏色呈現白色的扁平橢圓狀結塊，此時若再將正十六烷濃度的提高，NTU-1 包覆烷類的效果會越趨不佳。實驗中，添加正十六烷的濃度小於 6000 ppmv 時，乾燥的 NTU-1 結塊皆能展現很好的包覆能力使其移除效果達到 80% 以上；若正十六烷濃度小於 3000 ppmv，大部分的組別其移除效率甚至能達到 90% 或 90% 以上。另外，以兩

段式添加乾燥 NTU-1 結塊的方法，可使濃度為 2000 ppmv 的正十六烷移除效率在 12 小時內由原本的 90% 提升至將近 100%。

推測乾燥後 NTU-1 結塊再形成聚集將烷類包覆的主要原因與其細胞表面疏水性及完整性有關。乾燥後細胞表面不完整的組別，如經過超音波震碎後進行冷凍乾燥或是以溫度大於 100°C 烘乾的 NTU-1 結塊，經由 MATH 測試發現這些細胞表面的疏水性並沒有受到破壞，然而經過粒徑分析儀測得這些情況下的 NTU-1 細胞相較於正常狀態下來得小。由此可知細胞表面的完整性及疏水性需同時存在，乾燥 NTU-1 結塊才能順利貼附烷類且能以烷類為連結劑堆疊形成大顆粒結塊，配合物理分離可將正十六烷在 12 小時內大量移除。若對以正十六烷培養的 NTU-1 結塊進行冷凍乾燥或以溫度為 60、80°C 來烘乾，乾燥後的 NTU-1 結塊表面大部分皆呈現完整的狀態，然而可能還是會有少部分的細胞在這些乾燥條件下被破壞而成為細胞碎片，這也是為什麼在實驗中，儘管已提高添加的 NTU-1 結塊量，但都還是會有一些正十六烷及 NTU-1 細胞殘餘在培養基中的原因。

本研究提出一個相當快速移除石油碳氫化合物污染的方法，乾燥後的 NTU-1 結塊能再次形成聚集體將烷類包覆，配合篩網的撈除，使烷類在短時間內即可達到相當好的移除效果。未來建議可朝向研究如何將包覆於細胞內的烷類取出並還原，進而應用在實際石油污染發生的狀況下，將石油回收再利用，不僅可減少環境的污染，也可減輕石油逐漸短缺的問題。

## 參考文獻

- Abadias, M., A. Benabarre, N. Teixido, J. Usall & I. Vinas (2001) Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*, 65, 173-182.
- Abdel-Megeed, A. 2004. *Psychrophilic degradation of long chain alkanes*. VDM Verlag Dr. Muller Aktiengesellschaft & Co. KG.
- Aeckersberg, F., F. A. Rainey & F. Widdel (1998) Growth, natural relationships, cellular fatty acids and metabolic adaptation of sulfate-reducing bacteria that utilize long-chain alkanes under anoxic conditions. *Archives of Microbiology*, 170, 361-369.
- Al-Araji, L., R. N. Z. R. A. Rahman, M. Basri, A. B. Salleh, N. M. Nasaruddin, K. Harikrishna, R. Y. Othman, L. S. Hoon, J. A. Harikrishna & N. Adnan (2007) Microbial Surfactant. *Asia Pacific J. Molec. Biol. Biotechnol*, 15, 99-105.
- Allard, A.-S. & A. H. Neilson (1997) Bioremediation of organic waste sites: A critical review of microbiological aspects. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 39, 253-285.
- Alloway, B. & D. Ayres (1998) Chemical principles of environmental pollution. *Water Air and Soil Pollution*, 102, 209.
- Alvarez, H. M. (2003) Relationship between [beta]-oxidation pathway and the hydrocarbon-degrading profile in actinomycetes bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52, 35-42.
- Ashraf, W., A. Mihdhir & J. Colin Murrell (1994) Bacterial oxidation of propane. *FEMS Microbiology Letters*, 122, 1-6.
- Atlas, R. & J. Bragg (2009) Bioremediation of marine oil spills: when and when not—the Exxon Valdez experience. *Microbial Biotechnology*, 2, 213-221.
- Atlas, R. M. & R. Bartha (1992) Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. *Advances in Microbial Ecology*, 12, 287-338.
- Bartha, R. & R. M. Atlas (1977) The microbiology of aquatic oil spills. *Advances in Applied Microbiology*, 22, 225-266.
- Bell, K., J. Philp, D. Aw & N. Christofi (1998) The genus *Rhodococcus*. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 195-210.
- Benoit, S., S. Taouji, A. Benachour & A. Hartke (2000) Resistance of *Rhodococcus equi* to acid pH. *International Journal of Food Microbiology*, 55, 295-298.
- Berny, J. F. & G. Hennebert (1991) Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze-drying: effects of protectants and cooling rates. *Mycologia*, 805-815.

- Binazadeh, M., I. A. Karimi & Z. Li (2009) Fast biodegradation of long chain n-alkanes and crude oil at high concentrations with *Rhodococcus* sp. Moj-3449. *Enzyme and Microbial Technology*, 45, 195-202.
- Boopathy, R. (2000) Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74, 63-67.
- Bossier, P. & W. Verstraete (1996) Triggers for microbial aggregation in activated sludge? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 45, 1-6.
- Bouchez-Naitali, M., D. Blanchet, V. Bardin & J. P. Vandecasteele (2001) Evidence for interfacial uptake in hexadecane degradation by *Rhodococcus equi*: the importance of cell flocculation. *Microbiology*, 147, 2537-2543.
- Bouwer, E. J. & A. J. B. Zehnder (1993) Bioremediation of organic compounds--putting microbial metabolism to work. *Trends in Biotechnology*, 11, 360-367.
- Bowen, W. R., R. W. Lovitt & C. J. Wright (2001) Atomic force microscopy study of the adhesion of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 237, 54-61.
- Bozoglu, T., M. Ozilgen & U. Bakir (1987) Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. *Enzyme and Microbial Technology*, 9, 531-537.
- Britton, L. N. 1984. *Microbial degradation of organic compounds*. Marcel Dekker New York.
- Burke, M. J. (1986) The glassy state and survival of anhydrous biological systems. *Membranes, Metabolism and Dry Organisms*, 358-363.
- Busch, P. L. & W. Stumm (1968) Chemical interactions in the aggregation of bacteria bioflocculation in waste treatment. *Environmental Science & Technology*, 2, 49-53.
- Calleja, G. B. 1984. *Microbial aggregation*. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Camilli, R., C. M. Reddy, D. R. Yoerger, B. A. S. Van Mooy, M. V. Jakuba, J. C. Kinsey, C. P. McIntyre, S. P. Sylva & J. V. Maloney (2010) Tracking Hydrocarbon Plume Transport and Biodegradation at Deepwater Horizon. *Science*, 330, 201-204.
- Carvalho, A. S., J. Silva, P. Ho, P. Teixeira, F. X. Malcata & P. Gibbs (2002) Survival of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* during storage in the presence of protectants. *Biotechnology Letters*, 24, 1587-1591.
- (2004) Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 14, 835-847.
- Carvalho, C. C. C. R. & M. M. R. Fonseca (2005a) Degradation of hydrocarbons and alcohols at different temperatures and salinities by *Rhodococcus erythropolis*

- DCL14. *FEMS Microbiology Ecology*, 51, 389-399.
- (2005b) The remarkable *Rhodococcus erythropolis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 715-726.
- Carvalho, C. C. C. R., B. Parreno-Marchante, G. Neumann, M. M. R. da Fonseca & H. J. Heipieper (2005) Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* DCL14 to growth on *n*-alkanes, alcohols and terpenes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 383-388.
- Carvalho, C. C. C. R. d. & M. M. R. d. Fonseca (2004) Solvent toxicity in organic-aqueous systems analysed by multivariate analysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 26, 361-375.
- Castro, H., P. Teixeira & R. Kirby (1995) Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 172-176.
- Champagne, C., N. Gardner, E. Brochu & Y. Beaulieu (1991) The Freeze-drying of lactic acid bacterial. A review. *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 24, 118-128.
- Chang, Y. I. & C. Y. Su (2003) Flocculation behavior of *Sphingobium chlorophenolicum* in degrading pentachlorophenol at different life stages. *Biotechnology and Bioengineering*, 82, 843-850.
- Collins, M., M. Goodfellow & D. Minnikin (1982) A survey of the structures of mycolic acids in *Corynebacterium* and related taxa. *Microbiology*, 128, 129-149.
- Coon, M. J. (2005) Omega oxygenases: nonheme-iron enzymes and P450 cytochromes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338, 378-385.
- Costa, E., J. Usall, N. Teixido, R. Torres & I. Vinas (2002) Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA 2. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 873-878.
- Cravo-Laureau, C., V. Grossi, D. Raphel, R. Matheron & A. Hirschler-Rea (2005) Anaerobic *n*-alkane metabolism by a sulfate-reducing bacterium, *Desulfatibacillum aliphaticivorans* strain CV2803T. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 3458-3467.
- De Valdez, G. F., G. S. de Giori, A. P. de Ruiz Holgado & G. Oliver (1983) Comparative study of the efficiency of some additives in protecting lactic acid bacteria against freeze-drying. *Cryobiology*, 20, 560-566.
- Deng, S., R. Bai, X. Hu & Q. Luo (2003) Characteristics of a bioflocculant produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment. *Applied*

- Microbiology and Biotechnology*, 60, 588-593.
- Desai, J. D. & I. M. Banat (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 47-64.
- Eastcott, L., W. Y. Shiu & D. Mackay (1988) Environmentally relevant physical-chemical properties of hydrocarbons: a review of data and development of simple correlations. *Oil and Chemical Pollution*, 4, 191-216.
- Efiuvwevwere, B., L. Gorris, E. Smid & E. Kets (1999) Mannitol-enhanced survival of *Lactococcus lactis* subjected to drying. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 100-104.
- Ehrenreich, P., A. Behrends, J. Harder & F. Widdel (2000) Anaerobic oxidation of alkanes by newly isolated denitrifying bacteria. *Archives of Microbiology*, 173, 58-64.
- Fiechter, A. (1992) Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends in Biotechnology*, 10, 208-217.
- Finnerty, W. R. (1992) The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*. *Annual Reviews in Microbiology*, 46, 193-218.
- (1994) Biosurfactants in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 5, 291-295.
- Fraaije, M. W., N. M. Kamerbeek, W. J. H. van Berkel & D. B. Janssen (2002) Identification of a Baeyer-Villiger monooxygenase sequence motif. *FEBS Letters*, 518, 43-47.
- Fritsche, W. & M. Hofrichter (2000) Aerobic degradation by microorganisms. 145-155.
- Fujita, M., M. Ike, S. Tachibana, G. Kitada, S. M. Kim & Z. Inoue (2000) Characterization of a bioflocculant produced by *Citrobacter* sp. TKF04 from acetic and propionic acids. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89, 40-46.
- Gibson, D. T. 1984. *Microbial degradation of organic compounds*. Marcel Dekker New York.
- Gilliland, S. & M. Speck (1969) Biological response of *Lactic streptococci* and *Lactobacilli* to catalase. *Applied and Environmental Microbiology*, 17, 797-800.
- Goldberg, I. & L. Eschar (1977) Stability of lactic acid bacteria to freezing as related to their fatty acid composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 33, 489-496.
- Golwer, A. (1983) Underground purification capacity. *Ground Water in Water Resource Planning*, 2, 1063-1072.

- Gong, X.-Y., Z.-K. Luan, Y.-S. Pei & S.-G. Wang (2003) Culture Conditions for Flocculant Production by *Paenibacillus polymyxa* BY-28. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 38, 657 - 669.
- Goodfellow, M. (1987) The taxonomic status of *Rhodococcus equi*. *Veterinary Microbiology*, 14, 205-209.
- (1989) Genus *Rhodococcus*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 4, 2362-2371.
- Goodfellow, M., G. Alderson & J. Chun (1998) Rhodococcal systematics: problems and developments. *Antonie van Leeuwenhoek*, 74, 3-20.
- Gurtler, V., B. C. Mayall & R. Seviour (2004) Can whole genome analysis refine the taxonomy of the genus *Rhodococcus*? *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 377-403.
- Hanafusa, J. (1985) The hydration water and protein with cryoprotectant. *Fundamentals and Applications of Freeze Dried to Biological Materials, Drugs and Food Stuffs*, 59.
- Harayama, S., H. Kishira, Y. Kasai & K. Shutsubo (1999) Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1, 63-70.
- Heipieper, H. J., F. J. Weber, J. Sikkema, H. Keweloh & J. A. M. de Bont (1994) Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Trends in Biotechnology*, 12, 409-415.
- Hommel, R. K. (1990) Formation and physiological role of biosurfactants produced by hydrocarbon-utilizing microorganisms. *Biodegradation*, 1, 107-119.
- Hua, Z., J. Chen, S. Lun & X. Wang (2003) Influence of biosurfactants produced by *Candida antarctica* on surface properties of microorganism and biodegradation of *n*-alkanes. *Water Research*, 37, 4143-4150.
- Huang, L., T. Ma, D. Li, F. Liang, R. L. Liu & G. Li (2008) Optimization of nutrient component for diesel oil degradation by *Rhodococcus erythropolis*. *Marine Pollution Bulletin*, 56, 1714-1718.
- Huesemann, M. H. (1995) Predictive model for estimating the extent of petroleum hydrocarbon biodegradation in contaminated soils. *Environmental Science & Technology*, 29, 7-18.
- Israeli, E., B. T. Shaffer & B. Lighthart (1993) Protection of freeze-dried *Escherichia coli* by trehalose upon exposure to environmental conditions. *Cryobiology*, 30, 519-523.
- Iwabuchi, N., M. Sunairi, H. Anzai, H. Morisaki & M. Nakajima (2003) Relationships among colony morphotypes, cell-surface properties and bacterial adhesion to

- substrata in *Rhodococcus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 30, 51-60.
- Kakii, K., M. Hasumi, T. Shirakashi & M. Kuriyama (1990) Involvement of Ca<sup>2+</sup> in the flocculation of *Kluyvera cryocrescens* KA-103. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 69, 224-227.
- Kim, I. S., J. M. Foght & M. R. Gray (2002) Selective transport and accumulation of alkanes by *Rhodococcus erythropolis* S+ 14He. *Biotechnology and Bioengineering*, 80, 650-659.
- Korda, A., P. Santas, A. Tenente & R. Santas (1997) Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, 677-686.
- Kurane, R., K. Hatamochi, T. Kakuno, M. Kiyohara, K. Kawaguchi, Y. Mizuno, M. Hirano & Y. Taniguchi (1994) Purification and characterization of lipid bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58, 1977-1982.
- Lang, S. & J. C. Philp (1998) Surface-active lipids in rhodococci. *Antonie van Leeuwenhoek*, 74, 59-70.
- Larkin, M. J., L. A. Kulakov & C. C. R. Allen (2005) Biodegradation and *Rhodococcus*-masters of catabolic versatility. *Current Opinion in Biotechnology*, 16, 282-290.
- Leahy, J. G. & R. R. Colwell (1990) Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 54, 305-315.
- Lee, M., M. Kim, I. Singleton, M. Goodfellow & S. T. Lee (2006) Enhanced biodegradation of diesel oil by a newly identified *Rhodococcus baikonurensis* EN3 in the presence of mycolic acid. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 325-333.
- Leslie, S. B., E. Israeli, B. Lighthart, J. H. Crowe & L. M. Crowe (1995) Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3592-3597.
- Liu, C., W. Chang & H. Liu (2009) Bioremediation of *n*-alkanes and the formation of biofloccules by *Rhodococcus erythropolis* NTU-1 under various saline conditions and sea water. *Biochemical Engineering Journal*, 45, 69-75.
- Liu, C. W. & H. S. Liu (2010) *Rhodococcus erythropolis* strain NTU-1 efficiently degrades and traps diesel and crude oil in batch and fed-batch bioreactors. *Process Biochemistry*, 46, 202-209.
- Logan, B. E. & J. R. Hunt (1988) Bioflocculation as a microbial response to substrate limitations. *Biotechnology and Bioengineering*, 31, 91-101.
- Ly, M. H., M. Naitali-Bouchez, T. Meylheuc, M. N. Bellon-Fontaine, T. M. Le, J. M.

- Belin & Y. Wache (2006) Importance of bacterial surface properties to control the stability of emulsions. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 26-34.
- Madsen, E. (1991) Determining in situ bioremediation, facts and challenges. *Environ. Sci. Technol*, 25, 1663-1673.
- Malik, A., M. Sakamoto, T. Ono & K. Kakii (2003) Coaggregation between *Acinetobacter johnsonii* S35 and *Microbacterium esteraromaticum* strains isolated from sewage activated sludge. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96, 10-15.
- McKenna, E. & R. Kallio (1971a) Microbial metabolism of the isoprenoid alkane pristane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68, 1552-1554.
- (1971b) Microbial metabolism of the isoprenoid alkane pristane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68, 1552.
- Morgan, C., N. Herman, P. White & G. Vesey (2006) Preservation of micro-organisms by drying; a review. *Journal of Microbiological Methods*, 66, 183-193.
- Morgan, P. & R. Watkinson (1994) Biodegradation of components of petroleum. *Biochemistry of Microbial Degradation*, 1-31.
- Moriche, T. 1970. Nature and action of protective solutes in freeze-drying of bacteria. In *Proceedings of the 1st International Conference on Culture Collections*, 121-125. Tokyo: University Park Press.
- Mulligan, C. N. (2005) Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133, 183-198.
- Nakata, K. & R. Kurane (1999) Production of an extracellular polysaccharide bioflocculant by *Klebsiella pneumoniae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 63, 2064-2068.
- Neu, T. R. (1996) Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 60, 151-166.
- Nhi-Cong, L. T., A. Mikolasch, H. P. Klenk & F. Schauer (2009) Degradation of the multiple branched alkane 2, 6, 10, 14-tetramethyl-pentadecane (pristane) in *Rhodococcus ruber* and *Mycobacterium neoaurum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63, 201-207.
- Niescher, S., V. Wray, S. Lang, S. R. Kaschabek & M. Schlomann (2006) Identification and structural characterisation of novel trehalose dinocardiolipolates from n-alkane-grown *Rhodococcus opacus* 1CP. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70, 605-611.
- Olofsson, A. C., A. Zita & M. Hermansson (1998) Floc stability and adhesion of

- green-fluorescent-protein-marked bacteria to flocs in activated sludge. *Microbiology*, 144, 519-528.
- Palmfeldt, J. & B. Hahn-Hagerdal (2000) Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. *International Journal of Food Microbiology*, 55, 235-238.
- Pembrey, R. S., K. C. Marshall & R. P. Schneider (1999) Cell surface analysis techniques: what do cell preparation protocols do to cell surface properties? *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2877-2894.
- Peng, F., Z. Liu, L. Wang & Z. Shao (2007) An oil degrading bacterium: *Rhodococcus erythropolis* strain 3C 9 and its biosurfactants. *Journal of Applied Microbiology*, 102, 1603-1611.
- Pirnik, M., R. Atlas & R. Bartha (1974) Hydrocarbon metabolism by *Brevibacterium erythrogenes*: normal and branched alkanes. *Journal of Bacteriology*, 119, 868-878.
- Ram, N. M., D. H. Bass, R. Falotico & M. Leahy (1993) A decision framework for selecting remediation technologies at hydrocarbon-contaminated sites. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 2, 167-189.
- Ratledge, C. (1988) Products of hydrocarbon-microorganism interaction. *Biodeterioration*, 7, 219-236.
- Riser-Roberts, E. 1998. *Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical, and chemical processes*. CRC.
- Rajo, F. (2009) Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental Microbiology*, 11, 2477-2490.
- Rontani, J. F., J. C. Bertrand, F. Blanc & G. Giusti (1986) Gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry applied to the determination of a new pathway of pristane degradation by a marine mixed bacterial population. *Marine Chemistry*, 18, 9-16.
- Rosenberg, E. & E. Ron (1999) High-and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52, 154-162.
- Rosenberg, M. (2006) Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. *FEMS Microbiology Letters*, 262, 129-134.
- Rosenberg, M., M. Barki, R. Bar-Ness, S. Goldberg & R. J. Doyle (1991) Microbial adhesion to hydrocarbons (math). *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 4, 121 - 128.
- Rudge, R. 1991. Maintenance of bacteria by freeze-drying. In *Maintenance of Microorganisms*, 31-44. London: Academic Press.
- Rudolph, A. S. & J. H. Crowe (1985) Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology*, 22,

367-377.

- Rueter, P., R. Rabus, H. Wilkest, F. Aeckersberg, F. A. Rainey, H. W. Jannasch & F. Widdel (1994) Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria. *Nature*, 372, 455-458.
- Sannasi, P., J. Kader, O. Othman & S. Salmijah (2009) Physical growth and biomass characterization of bacterial cells exposed to Cd (II), Cr (VI), Cu (II), Ni (II), and Pb (II). *Journal of Environmental Research and Development*, 4, 8-18.
- Sayavedra Soto, L. A., W. N. Chang, T. K. Lin, C. L. Ho & H. S. Liu (2006) Alkane Utilization by *Rhodococcus* Strain NTU- 1 Alone and in Its Natural Association with *Bacillus fusiformis* L 1 and *Ochrobactrum* sp. *Biotechnology Progress*, 22, 1368-1373.
- Selmer Olsen, E., S. E. Birkeland & T. Sorhaug (1999) Effect of protective solutes on leakage from and survival of immobilized *Lactobacillus* subjected to drying, storage and rehydration. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 429-437.
- Sinha, R., A. Shukla, M. LAL & B. Ranganathan (1982) Rehydration of Freeze Dried Cultures of *Lactic Streptococci*. *Journal of Food Science*, 47, 668-669.
- So, C. M., C. D. Phelps & L. Young (2003) Anaerobic transformation of alkanes to fatty acids by a sulfate-reducing bacterium, strain Hxd3. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3892-3900.
- So, C. M. & L. Young (1999) Isolation and characterization of a sulfate-reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2969-2976.
- Souzu, H. (1999) Basic aspects and industrial strategies for the preservation of microorganisms by freezing and drying. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, 96, 231-265.
- Tago, Y. & K. Aida (1977) Exocellular mucopolysaccharide closely related to bacterial floc formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 34, 308-314.
- Takagi, H. & K. Kadowaki (1985) Purification and chemical properties of a flocculant produced by *Paecilomyces*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49, 3151-3164.
- Takeda, M., R. Kurane, J. Koizumi & I. Nakamura (1991) A protein bioflocculant produced by *Rhodococcus erythropolis*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55, 2663-2664.
- Teixeira, P., M. Castro, F. Malcata & R. Kirby (1995) Survival of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* following spray-drying. *Journal of Dairy Science*, 78, 1025-1031.
- Tezuka, Y. (1969) Cation-dependent flocculation in a *Flavobacterium* species

- predominant in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, 17, 222-226.
- Ulrici, W. (2000) Contaminated soil areas, different countries and contaminants, monitoring of contaminants. *Environmental Process II. Soil Decontamination Biotechnology*, 11, 5-42.
- Van Beilen, J., Z. Li, W. Duetz, T. Smits & B. Witholt (2003) Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil & Gas Science and Technology*, 58, 427-440.
- Van Beilen, J. B. & E. G. Funhoff (2007) Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 13-21.
- Van Hamme, J. D., A. Singh & O. P. Ward (2003) Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67, 503-549.
- Van Stempvoort, D. & K. Biggar (2008) Potential for bioremediation of petroleum hydrocarbons in groundwater under cold climate conditions: A review. *Cold Regions Science and Technology*, 53, 16-41.
- Vidali, M. (2001) Bioremediation. An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73, 1163-1172.
- Vik, E., P. Bardos, J. Brogan, D. Edwards, F. Gondi, T. Henrysson, B. Jensen, C. Jorge, C. Mariotti & P. Nathanail (2001) Towards a framework for selecting remediation technologies for contaminated sites. *Land Contamination and Reclamation*, 9, 119-127.
- Volkering, F., A. Breure & W. Rulkens (1997) Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation*, 8, 401-417.
- Watkinson, R. J. & P. Morgan (1990) Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Biodegradation*, 1, 79-92.
- Wentzel, A., T. E. Ellingsen, H. K. Kotlar, S. B. Zotchev & M. Throne-Holst (2007) Bacterial metabolism of long-chain *n*-alkanes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 1209-1221.
- Whyte, L., S. Slagman, F. Pietrantonio, L. Bourbonniere, S. Koval, J. Lawrence, W. Inniss & C. Greer (1999) Physiological adaptations involved in alkane assimilation at a low temperature by *Rhodococcus sp.* strain Q15. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 2961-2968.
- Whyte, L. G., J. Hawari, E. Zhou, L. Bourbonniere, W. E. Inniss & C. W. Greer (1998) Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus sp.* *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2578-2584.
- Wiacek, A. E. (2007) Electrokinetic properties of *n*-tetradecane/lecithin solution emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering*

- Aspects*, 293, 20-27.
- Yang, N. & W. Sandine (1979) Acid-producing activity of lyophilized lactic streptococcal cheese starter concentrates. *Journal of Dairy Science*, 62, 908-915.
- Zhao, G. & G. Zhang (2005) Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze drying. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 333-338.
- 方鴻源. 1999. 環境微生物學 第六章. 中華民國環境工程學會.
- 徐致遠, 劉榮, 郭本恒 & 李保國 (2006) 保護劑在乳酸菌凍乾過程中的應用. *乳業科學與技術*, 119, 155-165.
- 張玉華, 凌沛學, 籍保平 & 張天民 (2006) 糖類在生物活性物質冷凍乾燥的保護作用及其作用機制. *中國生化藥物雜誌*, 27, 247-249.
- 張緯農. 2003. 利用混合菌株(TN-4)處理異十九烷之研究. In 化學工程研究所. 國立台灣大學.
- . 2009. 利用 *Rhodococcus erythropolis* 進行碳氫化合物生物降解與細胞聚集現象之研究. In 化學工程研究所. 國立台灣大學.
- 張蘭英, 劉娜 & 孫立波. 2007. 現代環境微生物技術 清華大學出版社.
- 梁茂實. 2007. 微生物生物復育時細胞聚集與氫離子釋放的應用. In 化學工程研究所. 國立台灣大學.
- 華苟根 & 郭堅華 (2003) 紅球菌屬的分類及應用研究發展. *微生物學通報*, 30, 107-111.
- 黃武良. 1999. 石油—大自然孕育千萬年的珍藏. In 地球科學園地. 地球科學文教基金會.
- 劉志文. 2007. 微生物生物復育過程中細胞聚集現象之研究. In 化學工程研究所. 國立台灣大學.
- 盧至人. 2002. 現地生物復育技術. In 台灣土壤及地下水環境保護協會簡訊, 3-5.
- 盧曉鳳. 2000. 油品之生物分解--煉油廠廢水之實際應用. In 化學工程研究所. 國立台灣大學.

## 附錄 1 NB 培養的 NTU-1 及正十六烷培養的 NTU-1 結塊經

### 冷凍乾燥後的結合應用

由 4.3.2 節中我們觀察到利用正十六烷培養的 NTU-1 結塊在冷凍乾燥後雖然不具活性，但因其疏水的表面沒被破壞且可在 1 - 2 小時內再次吸附正十六烷形成結塊，並能於取樣的時間點 12 小時內移除 80 ~ 90% 濃度為 2000 ppmv 左右的正十六烷。移除效率為 80 ~ 90% 意味著培養基內還殘餘 200 ~ 400 ppmv 的正十六烷，故我們想結合 4.2 節中以 NB 培養並乾燥後具活性的 NTU-1 來降解正十六烷並配合加入乾燥後不具活性的 NTU-1 結塊來加速細胞聚集現象的產生，探討此結合方法的正十六烷移除效率是否會比單獨利用乾燥後不具活性的 NTU-1 結塊來得高。

實驗條件如下：

由於冷凍乾燥前的實驗條件並沒有太大的差異，如 4.3.2 (1) 部分所示，故以下直接列出冷凍乾燥後的實驗條件。

- 冷凍乾燥後存放條件：0 天
- 初始植菌來源 (第 0 小時)：
  - (1) 液態礦物培養基菌液 (5 mL，未經冷凍乾燥，控制組)： $4.12 \times 10^8$  CFU/mL
  - (2) NTU-1 以 10% 麥芽糖為保護劑乾燥後再以 MSM 礦物培養基復水 (5 mL)： $7.6 \times 10^8$  CFU/mL
  - (3) NTU-1 以 10% 乳糖為保護劑乾燥後再以 MSM 礦物培養基復水 (5 mL)： $1.33 \times 10^9$  CFU/mL
- 第 20 小時加入之乾燥結塊取樣重量 (添加劑+NTU-1 結塊)： $0.254 (\pm 0.001)$  g
- 第 20 小時加入的乾燥 NTU-1 結塊重量 (經過加入 MSM 復水後以  $0.3 \mu\text{m}$  濾

紙過濾，意即扣除添加劑後的 NTU-1 重量)：

(1) 10%麥芽糖為添加劑: 0.0253 ( $\pm$  0.0002) g

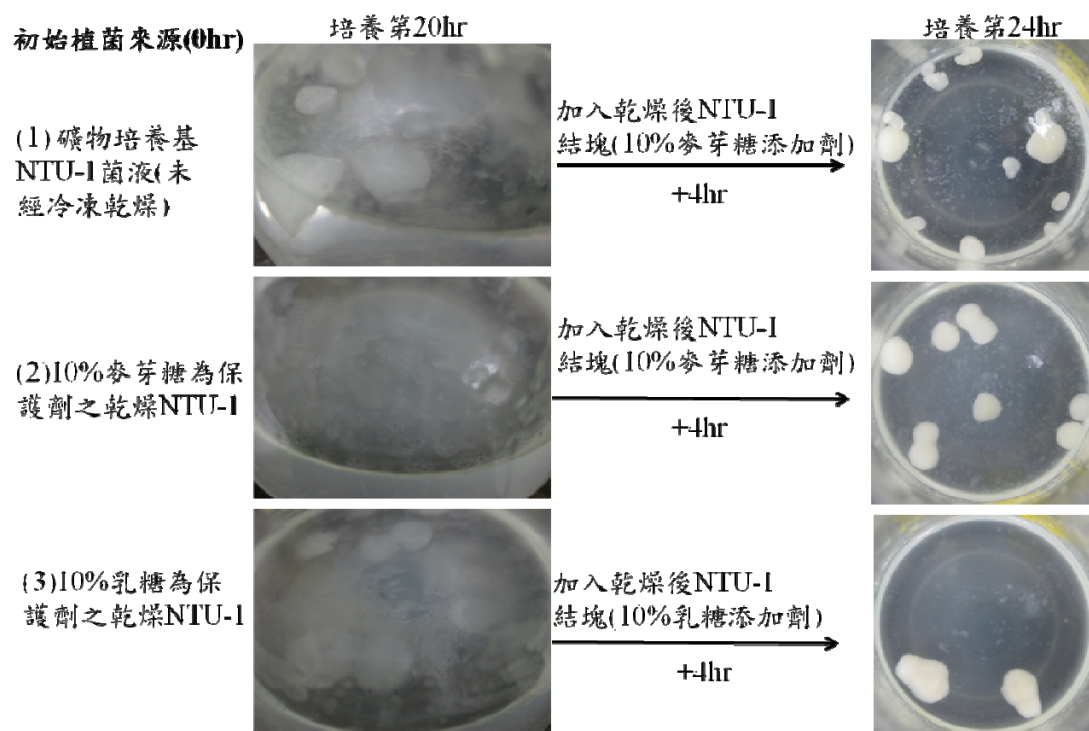
(2) 10%麥芽糖為添加劑: 0.0285 ( $\pm$  0.0018) g

(3) 10%乳糖為添加劑: 0.027 ( $\pm$  0.0024) g

- 培養基 pH 值：7  $\rightarrow$  6.8 (滅菌後)
- 培養基正十六烷濃度：2000 ppmv
- 培養基體積：100 mL
- 培養溫度：30°C
- 培養箱及轉速：往復式恆溫震盪水槽，100 rpm
- 分析時間點：第 24 小時

實驗流程大致如下：首先利用以 NB 培養後自由細胞狀的 NTU-1 進行冷凍乾燥，再以 MSM 礦物培養基復水 (加入與初始體積相同的 5 mL) 並利用平板計數法計算出活菌數，接著與 2000 ppmv 正十六烷一同加入 100 mL 礦物培養基進行培養。培養經過 20 小時以後，NTU-1 生長並降解掉一些正十六烷，接著再加入乾燥後的 NTU-1 細菌結塊 (不具活性) 將未降解的正十六烷包覆。

實驗中 NTU-1 生長及包覆的情形以附錄照片 1-1 來表示。由此照片可以看出以液態礦物培養基菌液或以 NB 培養並乾燥後的 NTU-1 組別，反應經過 20 個小時後 NTU-1 皆會因為接觸利用正十六烷而形成棉絮狀的聚集物懸浮在培養基的表面。接著加入乾燥後的 NTU-1 結塊 (不具活性)，反應再經過 4 小時，可以看到此時 NTU-1 會再次形成結塊將這些棉絮狀的細胞聚集體及正十六烷一起包覆起來。因而在第 24 小時，我們將形成的結塊分離並進行 NTU-1 降解及包覆正十六烷的分析。



附錄照片 1-1 培養條件 30°C、往復式震盪培養 100 rpm、初始 pH 值 6.8，MSM 礦物培養基中加入乾燥後的 NTU-1 (以 NB 培養) 及 NTU-1 結塊 (以正十六烷培養)，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 20 及 24 小時之 NTU-1 生長及結塊形態圖。

實驗結果第 24 小時的培養基酸鹼值、細胞密度分布變化、正十六烷之分布及總移除效果將以附圖 1-1 ~ 4 表示。

首先，由附圖 1-1 培養基酸鹼值的變化可以看出在 24 小時後這三組實驗組別皆會因為一開始加入以 NB 培養乾燥後 NTU-1 而使培養基酸鹼值會相對於只加入乾燥後 NTU-1 結塊來得低一些，大約在 6.4 ~ 6.5 左右 (單獨只加入乾燥後不具活性的 NTU-1 結塊，pH 值約為 6.6 ~ 6.7)，顯示以 NB 培養的 NTU-1 在乾燥後仍可降解利用正十六烷，但由於培養時間不長故酸鹼值沒有太大的下降。

接著由附圖 1-2 細胞密度變化分布圖可以看到由於有自由細胞態 NTU-1 的加入，所以在殘餘培養基中的 NTU-1 細胞密度約有 0.08 ~ 0.1 g/L 左右。而每一組 NTU-1 的總密度在第 24 小時也都約有 0.37 ~ 0.39 g/L，若是減去於 20 小時添

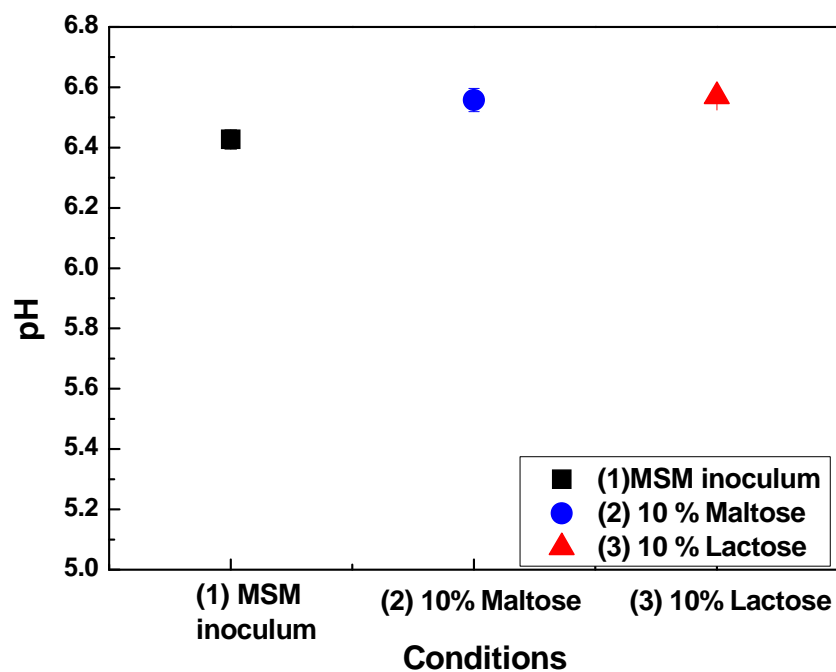
加的 NTU-1 乾燥結塊，可以大約算出在第 24 小時，以 NB 培養並乾燥後的 NTU-1 約能長到 0.12 g/L，相對於第 0 小時添加的細胞密度（約 0.04 ~ 0.06 g/L）可發現 NTU-1 有一定的生長量。

接著將實驗結果正十六烷初始量、殘餘在培養基中及包覆量匯整成附圖 1-3，由此圖可以看出初始培養基中的正十六烷量大約為 2500 ~ 2600 ppmv。因為此系統中有加入具活性之 NTU-1，所以在經過 24 小時的培養後我們將正十六烷初始量減去測得的正十六烷殘餘量及包覆量則可大概算出 24 小時正十六烷的降解量。

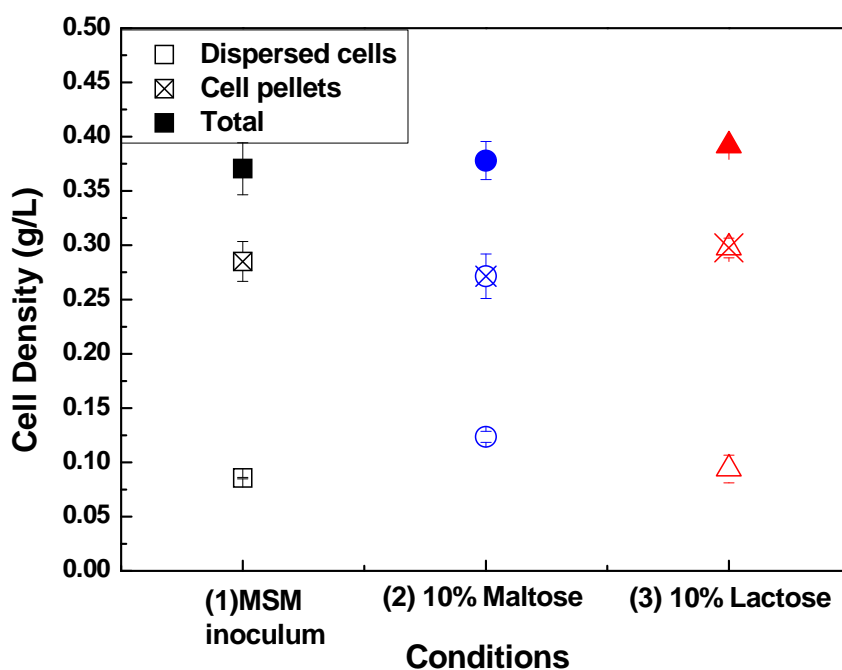
同時將實驗中正十六烷的分布情形換算成移除的百分比附圖 1-4，此部分的移除百分比與前面幾節較不同的是，在移除量中考慮到正十六烷的降解量。故此處總移除效率的百分比計算方法為：

- 總移除百分比 (%) =  $\frac{\text{包覆於 NTU-1 結塊中正十六烷的量} + \text{正十六烷降解量}}{\text{正十六烷的總量}} \times 100$
- 正十六烷的總量 = 正十六烷初始量 = 殘餘在培養基中正十六烷的量 + 包覆於 NTU-1 結塊中正十六烷的量 + 正十六烷降解量

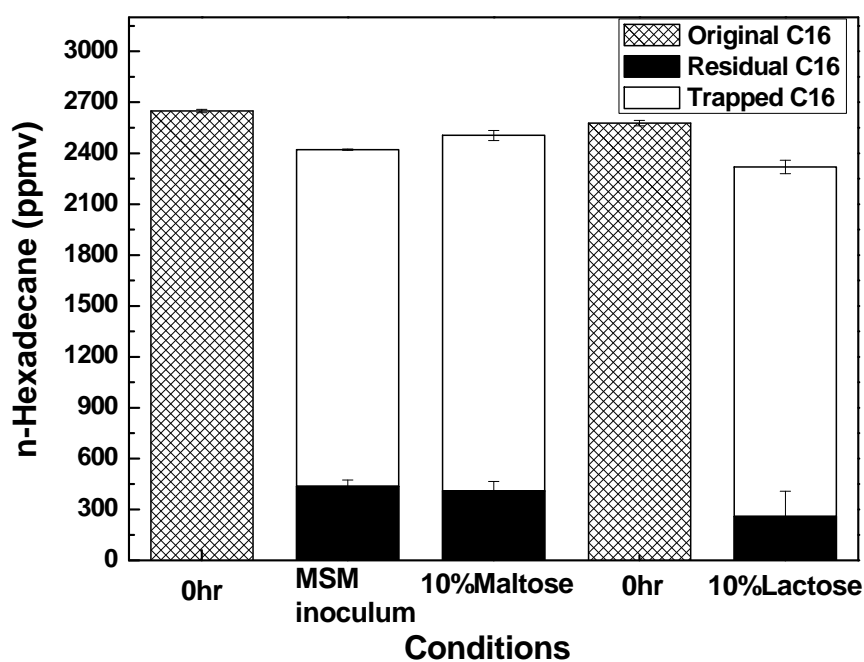
由上面公式計算出來的結果可以看出三組實驗下在培養經過 24 小時後正十六烷移除率為 85 ~ 90 % 左右，與前面幾節的實驗結果移除效率差不多，並沒有因為加入具活性的乾燥 NTU-1 而提高移除的效果。這個結果顯示系統中若含具活性之 NTU-1 確實可以增加正十六烷的降解量，然而因為降解的速率較慢，所以短時間內正十六烷的移除主要還是要靠乾燥後的 NTU-1 結塊的再形成聚集的包覆能力。



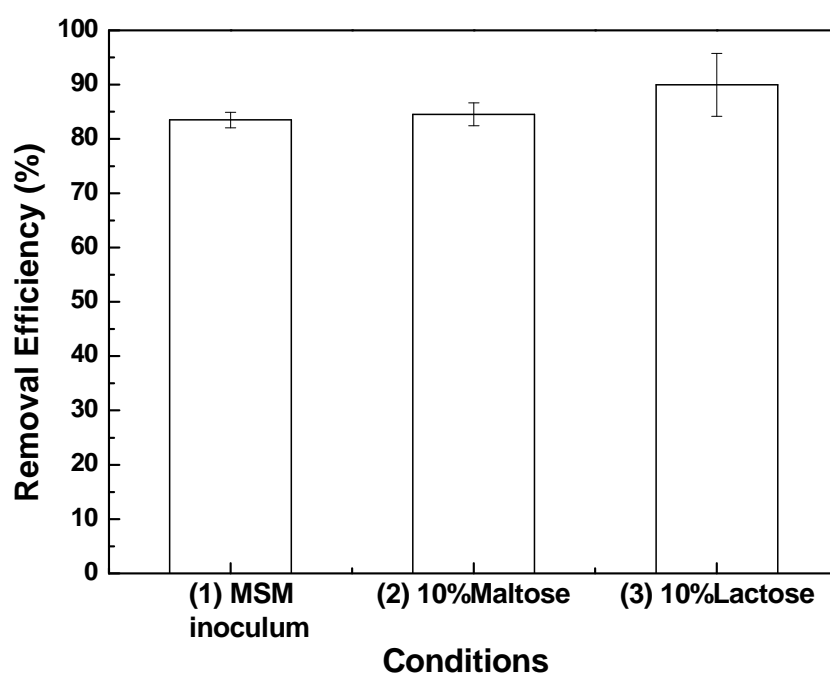
附圖 1-1 培養條件 30℃、100 rpm、初始 pH 值 6.8，培養基中加入以不同保護劑冷凍乾燥後的 NTU-1 及不同添加劑冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷第 24 小時之培養基酸鹼值變化。



附圖 1-2 培養條件 30℃、100 rpm、初始 pH 值 6.8，培養基中加入以不同保護劑冷凍乾燥後的 NTU-1 及不同添加劑冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷第 24 小時之細胞密度分布。



附圖 1-3 培養條件 30℃、100 rpm、初始 pH 值 6.8，培養基中加入以不同保護劑冷凍乾燥後的 NTU-1 及不同添加劑冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷。第 24 小時正十六烷初始量及殘餘在培養基及包覆量的分布圖。



附圖 1-4 培養條件 30℃、100 rpm、初始 pH 值 6.8，培養基中加入以不同保護劑冷凍乾燥後的 NTU-1 及不同添加劑冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊，處理 2000 ppmv 正十六烷，第 24 小時之正十六烷總移除百分比。

## 附錄 2 不同條件乾燥後 NTU-1 結塊之細胞粒徑大小

4.3 及 4.4 節實驗中推測乾燥後 NTU-1 結塊要能再次形成聚集體將正十六烷包覆需同時具備以下兩個條件：細胞表面疏水性及完整性。NTU-1 結塊可能會因為以超音波或是高於 100°C 的烘乾溫度而使細胞產生變質、破裂，此時 NTU-1 細胞無法再形成聚集體，因而無法將正十六烷包覆移除。在這一部分的實驗中將測量不同條件乾燥後 NTU-1 結塊的細胞大小分布，進一步了解 NTU-1 結塊細胞是否會因為超音波或是烘乾溫度高於 100°C 而破碎，並探討細胞完整性與否是不是真的對於乾燥 NTU-1 結塊再聚集能力會有所影響。實驗利用 Nano-ZS 粒徑分析儀來測量乾燥 NTU-1 結塊以去離子水為分散劑時細胞的粒徑大小。

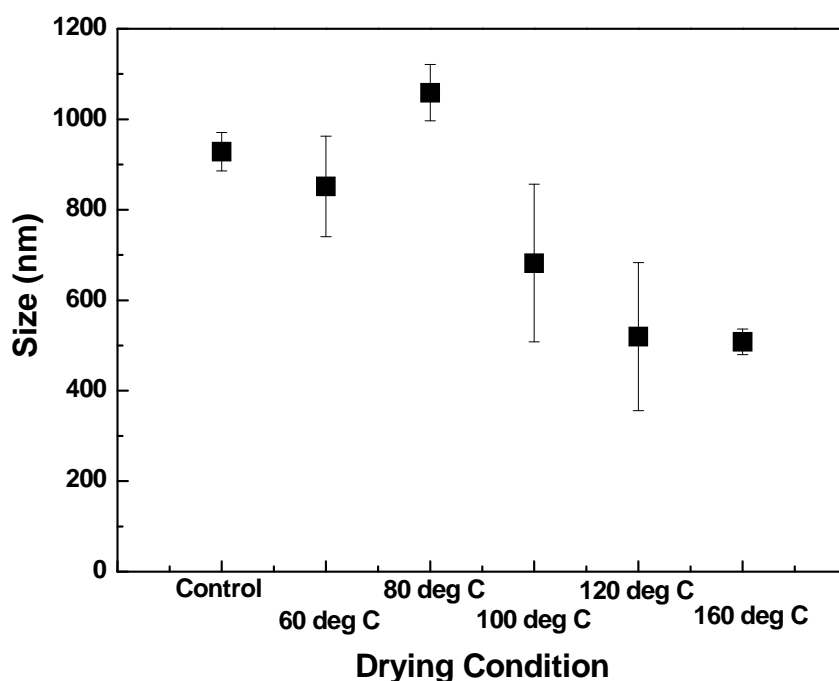
實驗條件如下：

- 不同條件下乾燥的 NTU-1 結塊：
  - 烘乾 (溫度 60、80、100、120 及 160°C)
  - 冷凍乾燥
  - 先經過超音波震碎後再進行冷凍乾燥
- 分散劑：去離子水 (DI-water)
- 量測儀器：粒徑分析儀 Malvern，Nano-ZS (0.6 ~ 6000 nm)

粒徑分析儀量測粒徑的原理主要是利用雷射光射入含粒子的懸浮溶液中，粒子本身進行不規則的布朗運動，粒子大小不同其擴散速度及布朗運動也會有所不同，因而雷射照射區域同時會有許多粒子產生散射光，散射光亦隨時間改變，利用散射光起代變化配合理論可計算出粒徑的大小。

不同烘乾溫度下的 NTU-1 細胞大小分布實驗結果如附圖 2-1 所示，其中以自由細胞態的 NTU-1 菌液 (以 NB 培養、未經乾燥) 作為對照組。由附圖 2-1 可

以看出，測量出的正常 NTU-1 細胞大小約為 900 ~ 1000 nm (0.9 ~ 1  $\mu\text{m}$ )。然而顯微鏡下觀察的 NTU-1 為大小 2 ~ 3  $\mu\text{m}$  的桿狀細胞。造成量測結果差異的原因可能是因為 NTU-1 屬於桿狀的細胞，但粒徑分析儀適合用於圓球狀粒子的量測，故兩種方式下觀察到的細胞大小會有差異。不過由附圖 2-1 中，仍大概可看出 NTU-1 結塊的細胞大小會在烘乾溫度大於 100°C 時變得相對較低，顯示在烘乾的過程中，NTU-1 結塊是有可能會因為溫度過高造成細胞的破碎，此時細胞變得不完整，因而無法再次形成聚集將烷類包覆。



附圖 2-1 不同烘乾溫度下，NTU-1 細胞粒徑大小分布

附圖 2-2 為以 120°C 烘乾的 NTU-1 結塊在去離子水中所測得的細胞粒徑大小相對於訊號強度的分布圖。圖中呈現出單一的波峰值，可以看出懸浮溶液中細胞大小均勻的分布在 500 nm 左右。

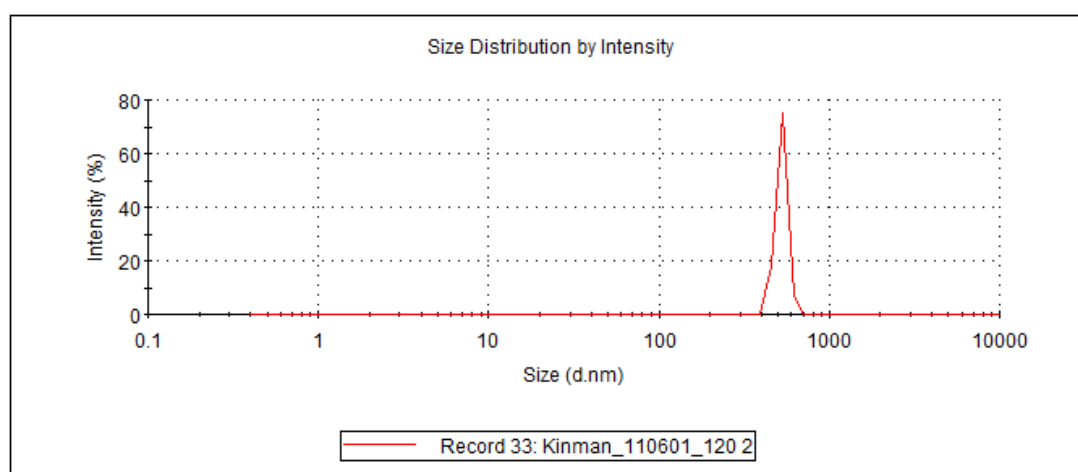
另外，將冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊所測得之細胞粒徑大小分布相對於訊號強度以附圖 2-3 表示。由附圖 2-3 可以看到有兩個明顯的波峰，推測是由於 NTU-1 結塊在冷凍乾燥時，會有一部分的細胞在過程中破碎（圖中粒徑大小 245 nm 處），

其他部分則能維持完整的狀態 (圖中粒徑大小 2400 nm 處)，因而冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊能重新聚集將正十六烷包覆。

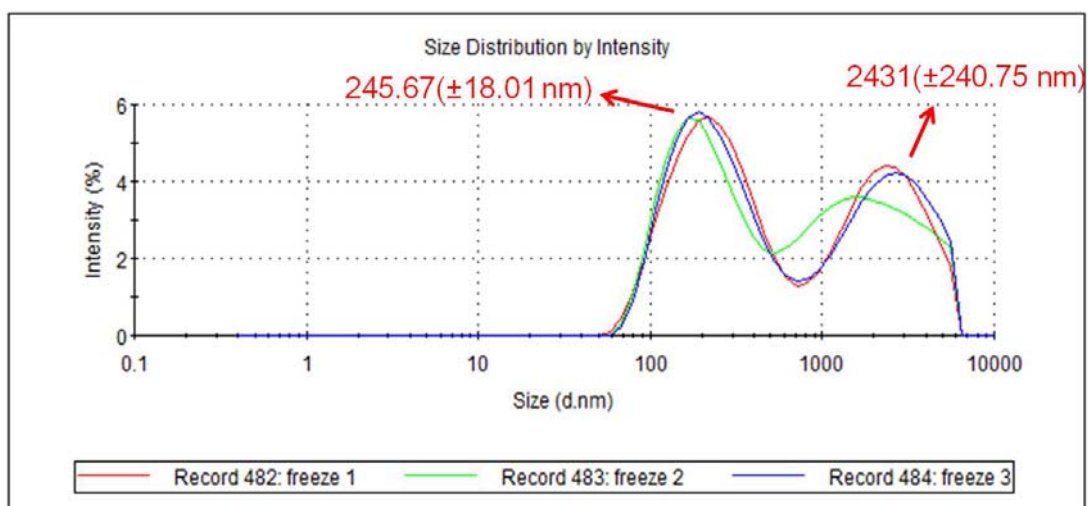
附圖 2-4 則為先利用超音波將 NTU-1 結塊震碎再進行冷凍乾燥後的細胞粒徑大小相對於訊號強度之分布。由附圖 2-4 也可看出有兩個明顯的波峰，且這兩個波峰大小分布約為 182 及 707 nm，相較於正常 NTU-1 細胞大小來得低。顯示 NTU-1 會因為高頻的超音波而震碎，這個狀態下的 NTU-1 因呈現破碎的情形，故無法再次聚集將正十六烷包覆移除。

由此部分實驗結果顯示，NTU-1 結塊細胞確實可能會因為超音波震碎或是高溫烘乾 (高於 100°C) 而產生破裂、不完整，造成粒徑分析儀量測出的細胞大小相對於正常 NTU-1 細胞來得小。配合 4.4.2 節中不同條件下乾燥的 NTU-1 結塊表面疏水性測定，可知道乾燥 NTU-1 結塊若要再形成聚集體將正十六烷包覆確實是需要在細胞完整性及疏水性同時具備的條件下才會產生。

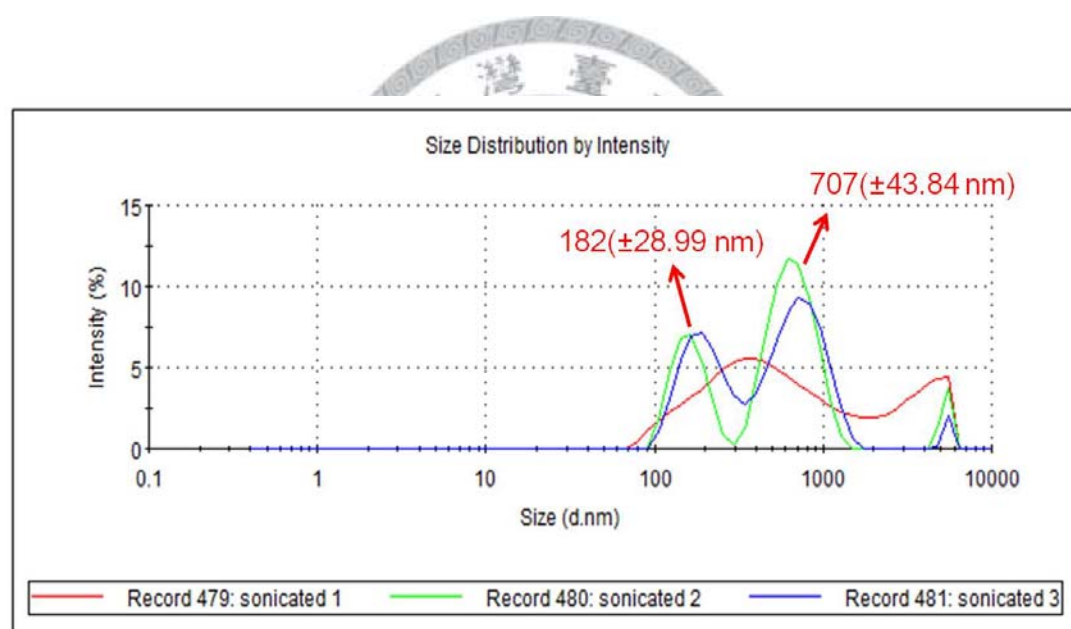
此部分所測量出的正常 NTU-1 細胞粒徑大小之絕對值與實際利用顯微鏡觀察的結果不太相同，所以我們只能藉由相對的細胞粒徑大小來評斷細胞的完整性。建議未來可利用穿透式顯微鏡或原子力顯微鏡等直接觀察乾燥 NTU-1 結塊細胞，將其幾何形貌呈現出來，進而推算出真實的細胞大小分布及觀察破碎的情形。



附圖 2-2 以 120°C 烘乾的 NTU-1 結塊在去離子水中所測得的細胞粒徑大小相對於訊號強度之分布圖。



附圖 2-3 冷凍乾燥後的 NTU-1 結塊在去離子水中所測得之細胞粒徑大小相對於訊號強度之分布圖。



附圖 2-4 先利用超音波將 NTU-1 結塊震碎再進行冷凍乾燥的 NTU-1 在去離子水中所測得之細胞粒徑大小相對於訊號強度之分布圖。