

# 第七屆旺宏科學獎

## 成果報告書

參賽編號：SA7-101

作品名稱：

# 老菌新希望！

--- 談以 *Pseudomonas mendocina* 菌株降解污染土壤中戴奧辛與戴奧辛類化合物之效能並評估其實際整治應用之可行性

姓 名：李雅廷

關 鍵 詞：戴奧辛、微生物降解、戴奧辛分解菌

## 壹、研究動機

解決戴奧辛污染的問題是全球關注的熱門議題。中石化安順廠雖然早已於1982年關廠，但先前排放的污染物中，戴奧辛污染的含量是全球之冠，廠房周圍遭受污染土壤的照片(圖 1-1)，怵目驚心，叫我十分難忘！



圖 1-1 台南市中石化安順廠廠房周圍遭受污染的土壤

最新研究指出，戴奧辛為誘導生物體突變的致癌物，如果沒有妥善處理這類化合物就將之排放到外界，將會對環境造成嚴重影響。研究中所使用的戴奧辛處理法如固化法、移避法、焚化法、光能分解法、觸媒轉換法、活性碳吸附法等。在時間成本、珍惜資源、操作複雜度、根絕水污染及降低臭味等方面，都有其限制。在文獻資料中我發現以生物復育技術如微生物分解環境中污染物，有其獨特的優點，且不易造成分解過程二次污染，最終產物通常已不再危害環境。因此衡量生物復育之適用性、有效性及成本之評估，決定利用已知由中石化安順廠污染場址之土壤環境中篩選出的細菌，研究清除土壤中有毒的戴奧辛物質，希望能突破現有處理技術，並作為整治中石化安順場污染場址之新方法！

有了這樣的想法，我與正修科技大學負責「戴奧辛分析實驗室」的張簡國平教授聯繫，提出我的想法，獲得他大力的支持，於是開始我的研究。

## 貳、假說與願景

實驗之初，我以金剛蚯蚓復育作為清除戴奧辛的研究，由於污染土壤中重金屬含量與土壤條件限制，蚯蚓幾乎在兩天內全數死亡，但意外發現蚯蚓死亡後一週，竟遭受其他生物分解，因此我推測土壤中依舊有微生物生存，於是轉以微生物的方向進行研究。在網路上我找到中山大學生物科學所有用 *Pseudomonas mendocina* 菌株來分解五氯酚，經與老師討論，我們認為五氯酚的結構與戴奧辛相似(圖 2-1)，因此發想以 *Pseudomonas mendocina* 菌株分解戴奧辛。

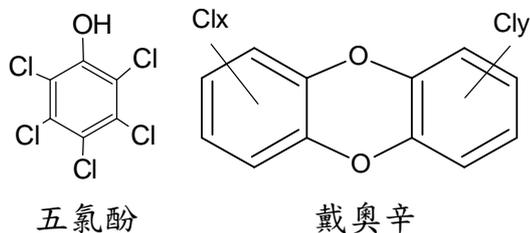


圖 2-1 五氯酚與戴奧辛結構示意圖

據了解，*Pseudomonas mendocina* 菌株篩自中石化土壤，為本土菌種，沒有引進外來菌種可能產生的生態破壞及微生物菌相干擾問題。因此，我先分析中石化土壤、製備土壤、乾淨土壤不同土樣中，固有之微生物族群。由表 1. 的分菌結果可了解，不論乾淨土、中石化土還是製備土，都有培養出菌落出來，且隨著週數增加，菌數也隨之減少，其中以製

表 1. 菌相分布

	1 週	2 週	3 週
乾淨土			
中石化土			
製備土			

備土 3 週的菌數最少，但是三種土壤中都仍有菌種存活，中石化土也不例外，所以我們相信，除了 *Pseudomonas mendocina* 之外，中石化土中應該還有其他菌種可以降解戴奧辛，這是叫人值得興奮也值得再深入研究的地方。

經由進一步研究探討原始土壤中微生物的情形，發現中石化土壤中含有高濃度的重金屬汞。一般微生物對於汞並不具備這麼高的耐受度，但是本次研究的這株菌卻不受高濃度汞的影響，依舊存活於該污染土壤，我們也根據此一現象進一步探討這株菌對於汞的耐受度；於是我設計了以下的實驗。



圖 2-2 *P. mendocina* 在 400X 數位顯微鏡下情形

### 參、研究目的

根據上述假說與願景的想法，我將研究分成五部分進行並探討研究下列問題：

#### 第一部分：探討 *Pseudomonas mendocina* 的生理屬性

探討 *Pseudomonas mendocina* 菌株在不同 pH 值、溫度、氧濃度下之生長情形。

#### 第二部分：探討 *Pseudomonas mendocina* 對重金屬耐受度

探討 *Pseudomonas mendocina* 對汞離子的耐受度。

#### 第三部分：評估「戴奧辛」污染土壤以生物復育的可行性

1. 探討 *Pseudomonas mendocina* 在中石化土壤、製備土壤中降解戴奧辛情形。
2. 探討 *Pseudomonas mendocina* 在滅菌後中石化土壤降解戴奧辛情形。
3. 探討 *Pseudomonas mendocina* 對 17 種具有 2,3,7,8 取代位置之戴奧辛降解能力情形。

#### 第四部分：評估 *Pseudomonas mendocina* 對「戴奧辛類化合物」之降解能力

1. 探討 *Pseudomonas mendocina* 對 12 種多氯聯苯降解能力。
2. 探討 *Pseudomonas mendocina* 對 7 種具有 2,3,7,8 取代位置之溴化戴奧辛降解能力。
3. 探討 *Pseudomonas mendocina* 對 29 種多溴聯苯醚降解能力。
4. 探討 *Pseudomonas mendocina* 對 16 種多環芳香烴降解能力。

#### 第五部分：評估 *Pseudomonas mendocina* 實際應用於整治中石化污染土壤之可行性

將中石化土壤直接加入 *Pseudomonas mendocina* 菌液，探討其在土壤中之實際降解能力，以作為田間試驗(Field Test)之證據。

## 肆、研究設備及器材

*Pseudomonas mendocina* (由國立中山大學劉仲康教授之微生物實驗室，協助菌種篩選實驗)

nutrient broth (NB) 培養液

震盪培養箱

argar 培養基

中石化土壤(含戴奧辛及汞)

已製備土(含戴奧辛)

乾淨土(指未受戴奧辛污染)

正己烷

丙酮

二氯甲烷

氮氣

濃硫酸

矽膠

硝酸銀矽膠

氫氧化鈉矽膠

硫酸矽膠

無水硫酸鈉

酸性氧化鋁

甲醇

甲苯

二氯甲烷

環己烷

二氯甲烷

超音波震盪器

多層矽膠管柱

玻璃棉

平底燒瓶

減壓濃縮機

活性碳/矽藻土管柱

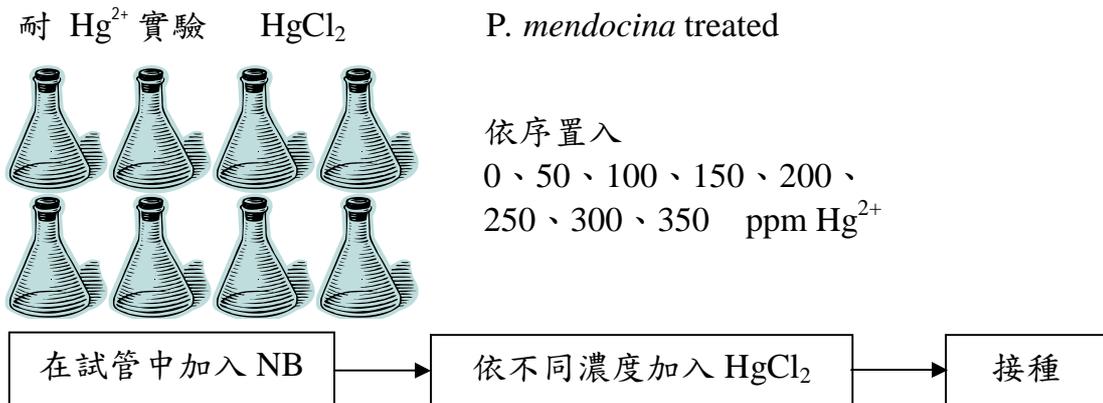
高解析度氣相層析/高解析度質譜儀 (由正修科技大學超微量研究科技中心張簡國平教授協助操作)

## 伍、研究過程及方法

### 第一部分：探討 *Pseudomonas mendocina* 的生理屬性

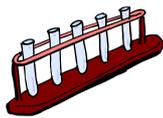
利用  $\text{HCl}_{(\text{aq})}$  依次調配出 pH 值為 5~10 之水溶液，分別加入 *P. mendocina* 菌株，每一小時取適量測其菌數 ( $\text{OD}_{600}$ )，共進行 12 小時，比較 *P. mendocina* 在不同 pH 值下的生長情形。

### 第二部分：探討 *Pseudomonas mendocina* 對重金屬耐受度



### 第三部分：評估「戴奧辛」污染土壤以生物復育的可行性

#### 1. *Pseudomonas mendocina* 菌種降解 Dioxins 實驗 I

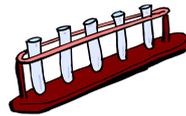


9 tubes

2g 中石化 soil  
6ml NB + *P.mendocina* 30°C  
soil : solution = 1 : 3

Test Dioxins degrading time

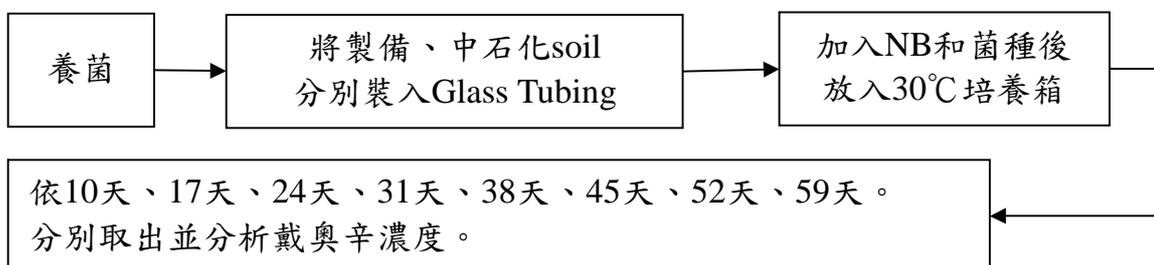
10 天、17 天、24 天、31 天、38 天、45 天、5



9 tubes control

2g 製備 soil(Only Dioxins)  
6ml NB + *P.mendocina*  
30°C

其流程如下：



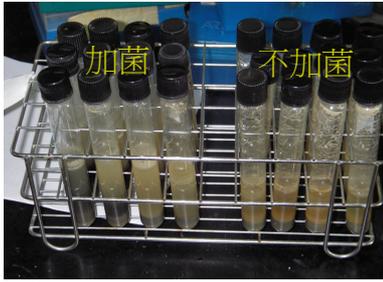


圖 5-1 中石化土壤對照實驗

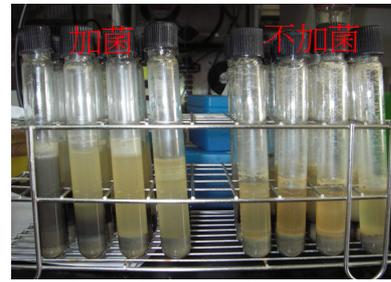
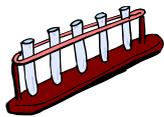


圖 5-2 已製備土壤對照實驗

## 2. *Pseudomonas mendocina* 菌種降解 Dioxins 實驗 II



9 tubes

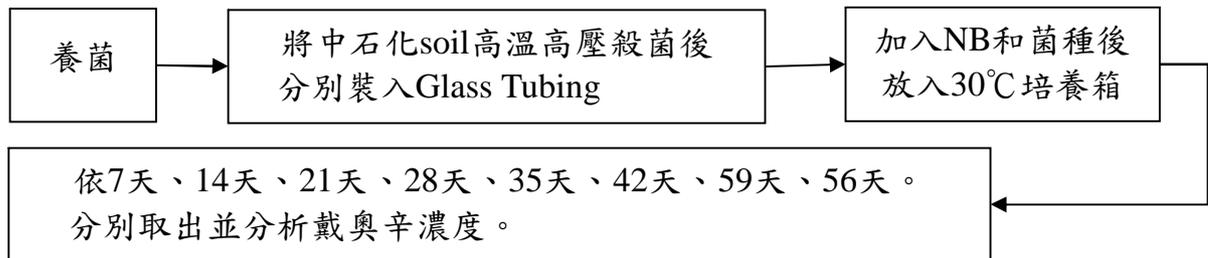
2g 中石化 soil  
6ml NB + *P. mendocina*  
30°C

soil : solution = 1 : 3

Test Dioxins degrading time

7 天、14 天、21 天、28 天、35 天、  
42 天、49 天、56 天。

其流程如下：



## 3. *Pseudomonas mendocina* 菌種降解 Dioxins 實驗 III

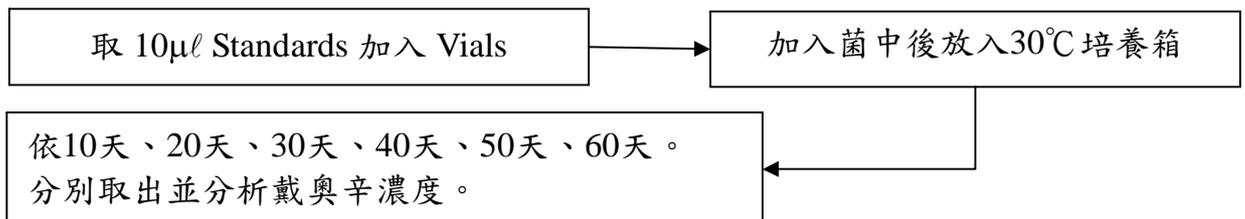


10 µl 戴奧辛 Standards  
1ml *P. mendocina* 30°C



10 µl 戴奧辛 Standards  
1ml NB 30°C

其流程如下：



第四部分：Pseudomonas mendocina 菌種降解「戴奧辛類化合物」實驗



20 µl 溴化戴奧辛 Standards  
1ml *P. mendocina*、30°C



20 µl 溴化戴奧辛 Standards  
1ml NB、30°C



20 µl 多溴聯苯醚 Standards  
1ml *P. mendocina*、30°C



20 µl 多溴聯苯醚 Standards  
1ml NB、30°C



20 µl 多氯聯苯 Standards  
1ml *P. mendocina*、30°C



20 µl 多氯聯苯 Standards  
1ml NB、30°C

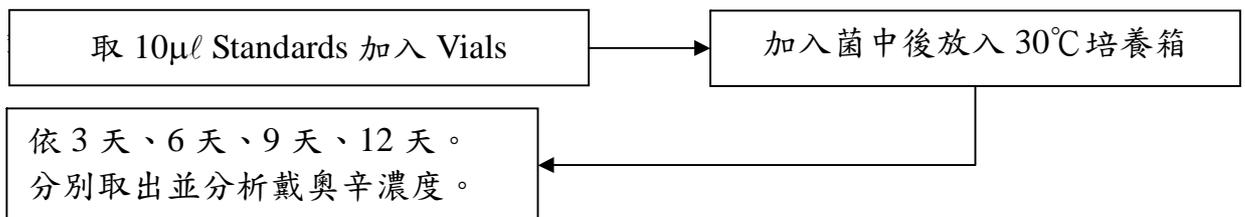


50 µl 多環芳香烴 Standards  
1ml *P. mendocina*、30°C



50 µl 多環芳香烴 Standards  
1ml NB、30°C

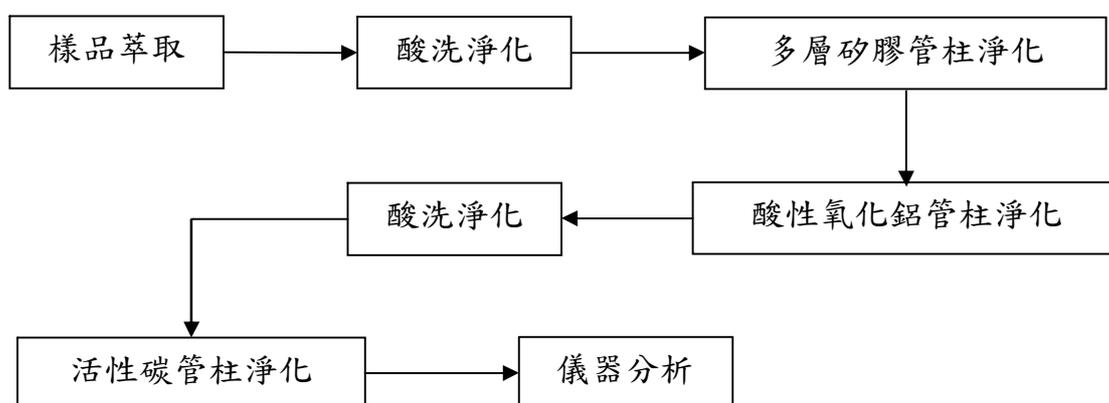
其流程如下：



第五部分：評估 Pseudomonas mendocina 實際應用於整治中石化污染土壤之可行性

1. 60g 中石化土加入 140g *P. mendocina* 菌液，(水份含量為 70%) 進行 60 天降解實驗。
2. 每隔 10 天取出並分析戴奧辛濃度。

## ※ 戴奧辛分析實驗流程



## ※ 土壤處理

### A. 萃取

1. 將分解後的土壤樣品風乾後加入淨化標準品20ℓ再以正己烷/丙酮萃取。
2. 萃取後濾液利用減壓濃縮將萃取液濃縮至近乾。

### B. 酸洗淨化

1. 以二氯甲烷將萃取濃縮液轉移至 6 dram 樣品瓶中，並以氮氣吹乾。
2. 隨後加入 7 ml 之正己烷，振盪約 5 秒後加入淨化標準品 10ℓ。
3. 再加入 4 ml 之濃硫酸，以超音波震盪器震盪酸洗後，靜置分層。

### C. 多層矽膠管柱之淨化步驟

1. 多層矽膠管柱(如圖 5-3): 尖底部裝填玻璃棉後再依序填入 0.5c.c 矽膠、1c.c 硝酸銀矽膠、0.5c.c 矽膠、1.5c.c. 氫氧化鈉矽膠、0.5c.c 矽膠、6.2c.c 硫酸矽膠、0.5c.c 矽膠、0.5c.c 無水硫酸鈉，充填時須以玻璃棒壓實。
2. 以 30 ml 正己烷預洗管柱，洗液丟棄。
3. 將完成酸洗之正己烷溶液移入管柱中，再以 5ml 次正己烷，共兩次流洗管柱。
4. 再以 120ml 正己烷流洗多層矽膠管柱，以 250 ml 平底燒瓶收集流洗液，利用減壓濃縮將流洗液濃縮至 1ml 左右。

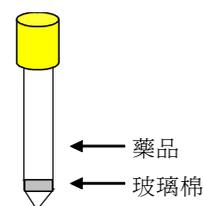


圖 5-3 多層矽膠管柱

### D. 酸性氧化鋁管柱淨化

1. 淨化管柱製備：取層析管柱(如圖 5-3)，於尖底部裝填玻璃棉後再裝填 7.5ml 之酸性氧化鋁及約 1ml 之無水硫酸鈉。
2. 管柱預洗：以 20 ml 之正己烷預洗酸性氧化鋁管柱。

### 3. 管柱淨化：

(1) 以(2 ml/次\*3)正己烷轉移濃縮瓶之有機溶液至酸性氧化鋁管柱。依序以 10 ml 正己烷，20 ml 二氯甲烷/正己烷(2/98, v/v)溶劑，流洗酸性氧化鋁管柱，流洗液收集於 50 ml 瓶中。

(2) 以 20ml 之二氯甲烷/正己烷(40/60, v/v)溶劑流洗酸性氧化鋁管柱，流洗液收集於 250 ml 濃縮瓶，並減壓濃縮至近乾。待進行活性碳/矽藻土管柱之淨化。另將酸性氧化鋁管柱編號儲存。

- ◆ 多溴聯苯醚、多氯聯苯實驗進行於此即以減壓濃縮將流洗液濃縮至近乾，以正己烷轉移至注射樣品瓶內，以氮氣吹至近乾，加入回收標準品 20 $\mu$ l，待進行質譜分析。

### E. 活性碳管柱淨化步驟：

1. 活性碳/矽藻土管柱製備：取層析管柱(如圖 5-3)尖底部裝填玻璃棉後再依序裝填 1.0c.c 之矽膠、1.0c.c (或 1.5 c.c) 之活性碳/矽藻土、1.0c.c 之矽膠，充填時須以玻璃棒壓實。

2. 管柱預洗：依序以甲醇、甲苯、二氯甲烷/甲醇/甲苯(75/20/5)、環己烷/二氯甲烷(50/50)、及正己烷各 5ml 預洗，洗液丟棄。

3. 將完成酸性氧化鋁淨化之 1ml 正己烷溶液移入管柱中，全部轉移完成後，再以 1ml/次正己烷，共三次清洗樣品瓶並移入管柱中。

4. 以 2 ml/次環己烷/二氯甲烷(50/50)，共三次移入活性碳淨化管柱，再以 3ml 二氯甲烷/甲醇/甲苯(75/20/5)，共一次移入活性碳淨化管柱，以上流出液皆合併於 6dram 瓶中。

5. 再以 50 ml 甲苯溶劑流洗活性碳管柱，收集於 250 ml 平底燒瓶，利用減壓濃縮將流洗液濃縮至近乾，再以正己烷轉移至注射樣品瓶內，以氮氣吹至近乾，加入回收標準品 20 $\mu$ l，待進行質譜分析。

- ◆ 多環芳香烴以酸性矽膠管柱做為淨化，以二氯甲烷/正己烷(40/60, v/v)流洗後以減壓濃縮將流洗液濃縮至近乾，以正己烷轉移至注射樣品瓶內，以氮氣吹至近乾，加入回收標準品 50 $\mu$ l，待進行質譜分析。

## 陸、實驗結果與討論

### 第一部分 *Pseudomonas mendocina* 的生理屬性

#### *Pseudomonas mendocina* 分類地位

Bacteria 細菌界

Proteobacteria 變形菌門

Gamma Proteobacteria  $\gamma$ -變形菌綱

Pseudomonadales 假單胞菌目

Pseudomonadaceae 假單胞菌科

Pseudomonas 假單胞菌屬

P. mendocina 門多薩假單胞菌

1. 酸鹼值對 *P. mendocina* 降解五氯酚的影響，以 pH=6 時最能促進五氯酚的降解，降解速率也最快。當 pH 值升高或降低時，完全分解五氯酚所需的時間隨之延長速率亦隨之減緩(蔡啟堂等)。
2. 溫度對 *P. mendocina* 降解五氯酚的影響方面，以 30°C 的環境降解最快。當溫度升高或降低時，完全分解五氯酚所需時間隨之延長，速率也減緩，甚至抑制該菌降解五氯酚(蔡啟堂等)。
3. 氧氣濃度對 *P. mendocina* 降解五氯酚的影響方面，五氯酚降解速度將隨著氧氣濃度減少而減緩(蔡啟堂等)。
4. *P. mendocina* 降解五氯酚的機制為先破苯環再去氯，因五氯酚結構與戴奧辛及戴奧辛類化合物相似，因此我認為 *P. mendocina* 降解戴奧辛及戴奧辛類化合物的機制也應是先破環再去氯，而讓戴奧辛的毒性大為下降。
5. 由圖 6-1.(林偉志等)可以很明顯的看出來，菌的數目約在 17 小時時達到飽和，在好氧的情況下生長曲線圖比厭氧好很多，但是我們同時也可以發現，*P. mendocina* 不論在厭氧還是好氧的環境中都可以生長。這對我們將來打算以此菌株處理中石化污染土是有利的，因為土表與土裡的氧濃度自上而下遞減，由圖 6-1 可確知，不論土壤中氧濃度多寡，*P. mendocina* 都可存活，進而降解戴奧辛。

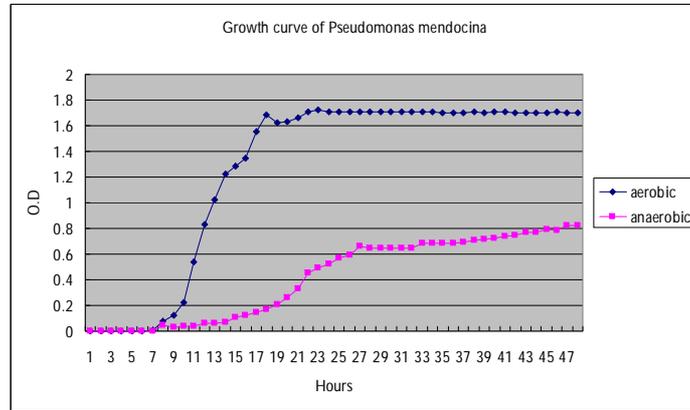


圖 6-1. *P. mendocina* 在好氧與厭氧下的生長情形

6. 從 pH 值的實驗(圖 6-2)來看，我們可以發現，*P. mendocina* 在 pH=7 的時候生長最好，其順序依次為 pH7 > pH6 > pH8 > pH5 > pH9 > pH10。由此可知，*P. mendocina* 菌株較適合微酸性~微鹼性的環境中生存，而在強鹼的環境下，雖然生長較慢，但是仍可存活，這也對我們未來要處理曾經是「鹼氣工廠」的中石化土壤是有助益的。

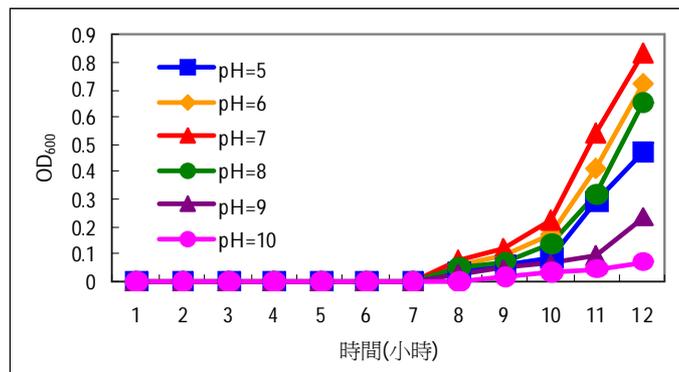


圖 6-2. *P. mendocina* 在不同 pH 值下的生長情形

7. 由於純的戴奧辛樣品價格昂貴，以及操作上較有安全的疑慮，因此有關 *P. mendocina* 菌株的生理屬性，除了圖 6-2(以不同 pH 的水溶液測量)外，其餘均參考文獻資料。綜合以上 *P. mendocina* 的生理屬性都支持我們當初的假說與願景，因此我繼續以下的研究。

## 第二部分 汞耐受度

由中石化土用  $HgCl_2$  溶液進行 *Pseudomonas mendocina* 這株菌的汞耐受度測試，如圖 6-3 所示，明顯看出在 0 ppm 與 50 ppm 的養菌管柱中可以發現到溶液



圖 6-3 *P. mendocina* 汞耐受度試驗

變混濁，由此可知這株菌種在這兩支管柱中能夠存活。

在 100 ppm 以上的養菌管柱中溶液依舊維持澄清，由此結果看出並未有菌種存活下來，因此我們可以確定 *P. mendocina* 這株菌對汞的耐受度是在 50 ppm 到 100 ppm 的耐受度。

### 第三部分 評估「戴奧辛」污染土壤以生物復育的可行性

#### 1. *Pseudomonas mendocina* 菌種降解 Dioxins 實驗 I

加菌前分析三種土壤中戴奧辛含量，如表 2.所示，在不同天數經過加菌與不加菌的比較分析後的結果可以看出 10 天到 59 天 OCDD 與 OCDF 濃度均有明顯下降(表 3、表 4)，但是因為濃度差不一致不容易比較，我們將數據轉為與不加菌的土壤中，最高濃度的 OCDD 與 OCDF 濃度作「濃度百分比」換算，就能做更客觀的比較。

經由濃度差可以清楚看出在時間的作用下不同戴奧辛在加菌與不加菌的差距，尤以 31 天、59 天「中石化土」及「製備土」的 OCDD 與 OCDF 濃度差最為明顯（如圖 6-4、6-5 所示）。

加菌與不加菌在「中石化土」及「製備土」濃度差距並不一致，我們推測是原始土壤中菌相不一致所造成。這可以印證假說與願景分菌實驗中三種土壤中不管土壤是否遭受高濃度污染均有菌種存活，進一步關察其菌相分佈，如表 1.所示，並將分菌所得到的結果用數位顯微鏡拍成照片，如圖 2-1 所示。

表 2. 實驗前 Dioxins 分析結果表

	製備土(pg/g)	中石化土(pg/g)
2,3,7,8-TeCDF	199.160	5007.616
1,2,3,7,8-PeCDF	113.250	2228.577
2,3,4,7,8-PeCDF	136.043	1586.167
1,2,3,4,7,8-HxCDF	144.137	3396.843
1,2,3,6,7,8-HxCDF	126.258	843.591
2,3,4,6,7,8-HxCDF	106.594	493.854
1,2,3,7,8,9-HxCDF	62.438	491.961
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	292.022	41548.947
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	81.441	1481.701
OCDF	220.117	382912.172
2,3,7,8-TeCDD	0.000	15.587
1,2,3,7,8-PeCDD	1.496	62.788
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0.000	97.028
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0.000	891.275
1,2,3,7,8,9-HxCDD(平均)	1.394	237.747
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	34.026	38185.808
OCDD	264.937	586752.487

表 3. 加菌後 OCDF 分析結果

	製備土 (pg/g)	中石化土(pg/g)	製備土 濃度百分比(%)	中石化土 濃度百分比(%)
10 天加菌	205.115	382292.942	76.787	99.838
17 天加菌	191.939	373762.042	71.855	97.610
24 天加菌	192.770	210979.667	72.166	55.099
31 天加菌	194.943	181924.845	72.979	47.511
38 天加菌	180.600	175315.695	67.610	45.785
45 天加菌	118.047	152463.249	44.192	39.817
52 天加菌	91.860	128604.841	34.389	33.586
59 天加菌	61.146	48174.406	22.891	12.581

※ 製備土以 267.121 pg/g 與中石化土 382912.172 pg/g 為分析最高濃度

表 4. 加菌後 OCDD 分析結果

	製備土 (pg/g)	中石化土(pg/g)	製備土 濃度百分比(%)	中石化土 濃度百分比(%)
10 天加菌	202.954	533244.153	76.880	89.760
17 天加菌	199.889	491770.787	74.865	82.779
24 天加菌	183.470	523657.619	68.715	88.146
31 天加菌	121.489	301537.269	45.501	50.757
38 天加菌	113.409	282277.313	42.475	47.515
45 天加菌	47.069	210259.118	17.629	35.393
52 天加菌	64.824	154345.444	24.279	25.981
59 天加菌	41.923	78360.575	15.702	13.190

※製備土以 263.988 pg/g 與中石化土 594077.817 pg/g 為分析最高濃度

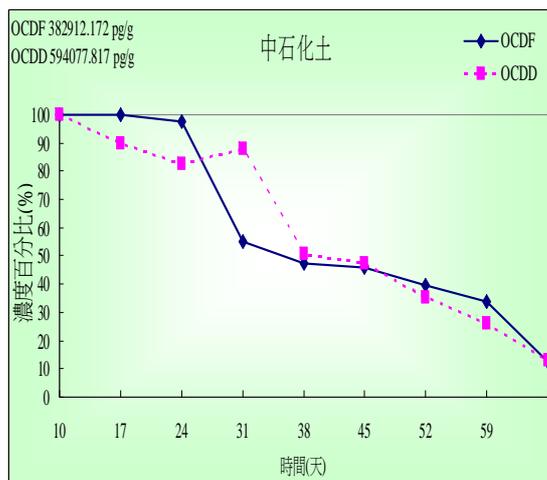


圖 6-4 中石化土中 OCDD 與 OCDF 濃度百分比

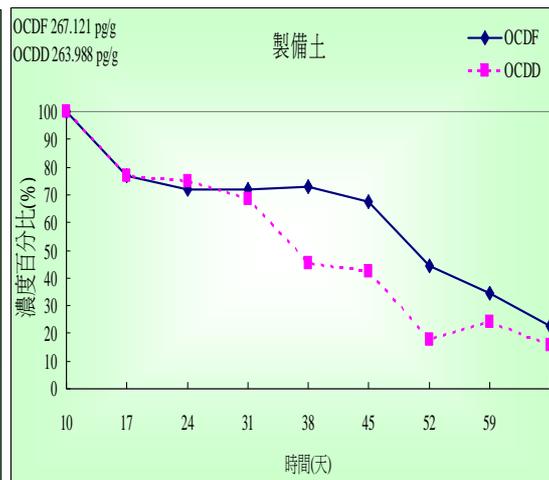


圖 6-5 製備土中 OCDD 與 OCDF 濃度百分比

## 2. *Pseudomonas mendocina* 菌種降解 Dioxins 實驗 II (滅菌後)

分析不同土壤中戴奧辛含量以後，我發現在不同天數的 OCDD 與 OCDF 加菌與不加菌後均有明顯差距，由於土壤取自於中石化，所以是否

有其他菌種一起做用我們無法確定，因此我們將中石化經過高溫高壓殺菌，確定無其他菌種做用後再進行相同實驗。

由實驗結果可以發現，滅菌後的中石化土壤中戴奧辛降解效率與沒有經過滅菌的中石化土壤降解效率相似，所以我們可以確定戴奧辛降解是因為這株菌所造成；在圖 6-6 中更由濃度百分比看到 OCDD 與 OCDF 均有明顯的降解效果。

表 5. 滅菌中石化 OCDD 與 OCDF 分析結果

	OCDF (pg/g)	OCDD (pg/g)	OCDF 濃度百分比(%)	OCDD 濃度百分比(%)
7 天加菌	392569.393	343979.055	92.998	95.861
14 天加菌	340444.101	273321.100	80.65	76.169
21 天加菌	348096.015	236735.638	82.462	65.974
28 天加菌	121971.969	214344.220	28.895	59.734
35 天加菌	127121.080	190133.030	30.114	52.987
42 天加菌	124479.132	192099.137	29.489	53.534
49 天加菌	89698.351	160403.547	21.249	44.701
56 天加菌	83445.233	175640.792	19.768	48.948

※ OCDF 以 462126.771 pg/g 為分析最高濃度

※ OCDD 以 448832.855 pg/g 為分析最高濃度

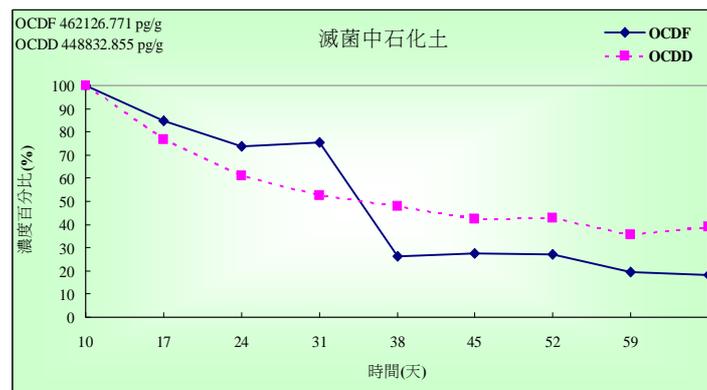
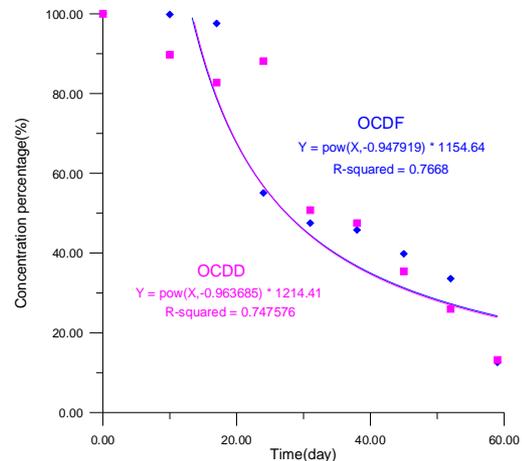


圖 6-6 滅菌中石化土中 OCDD 與 OCDF 濃度百分比

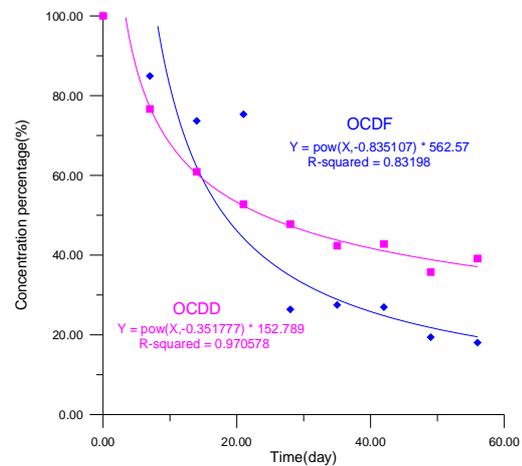
◎ 中石化土壤滅菌前後數據圖形分析：

A. 滅菌前：取滅菌前 OCDD 與 OCDF 的濃度百分率 v.s 時間作圖，取相關係數( $R^2$  值)最高的趨勢線，由右圖中發現 OCDD 與 OCDF 之趨勢線幾乎重疊， $R^2$  值約在 0.75 附近。



B. 滅菌後：取滅菌後 OCDD 與 OCDF 的濃度百分率 v.s 時間作圖，取相

關係數(R<sup>2</sup> 值)最高的趨勢線，由右圖中發現 OCDD 與 OCDF 之趨勢線 R<sup>2</sup> 值比滅菌前提高許多，尤其是 OCDD 的趨勢線幾乎是百分之百吻合，我認為，滅菌後移除其他菌種的干擾，所以我決定以滅菌後的數據來分析 *P. mendocina* 降解 OCDD 與 OCDF 之反應級數。



◎ *Pseudomonas mendocina* 降解 OCDD 與 OCDF 之反應級數分析：

以中石化滅菌後的土壤中，OCDD 的趨勢線方程式：

$$y = x^{-0.351777} \times 152.789, \quad R^2 = 0.97$$

為例，在 Excel 中將 x 表示的反應天數代入方程式中，求出每一個對應的 y 值(表濃度百分比)，再求出  $r = \Delta y / \Delta x$  對應值，作反應速率 r v.s. y 圖形，得下左圖。由圖中所得方程式：

$y = x^{4.61311} \times 8.22514 \times 10^{-9}$ ，亦即反應速率定律式為：

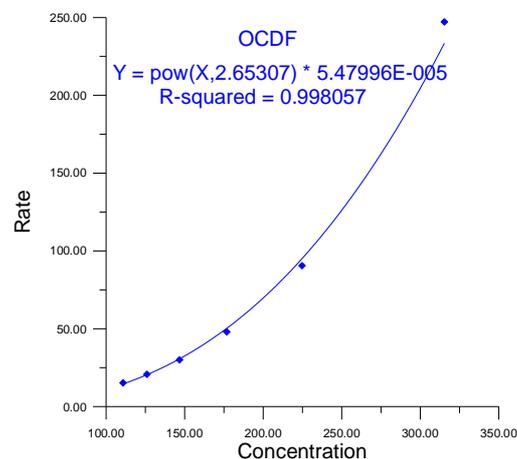
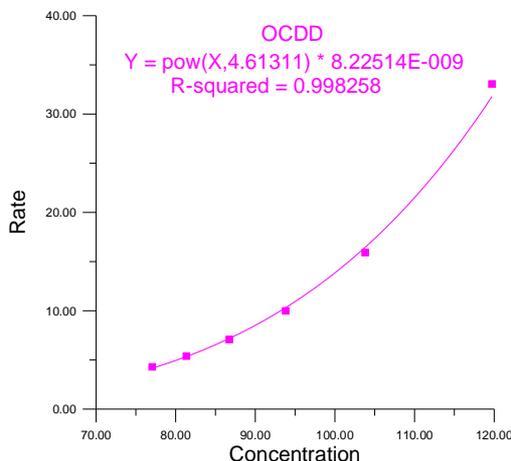
$$r = 8.22514 \times 10^{-9} \times [\text{OCDD}]^{4.61311}$$

表示 *P. mendocina* 菌株分解 OCDD 的反應級數為 4.6 級。

同理可證，菌株對 OCDF 反應速率定律式為(下右圖)：

$$r = 5.47996 \times 10^{-5} \times [\text{OCDF}]^{2.65307}$$

表示菌株分解 OCDF 的反應級數約為 2.7 級，較 OCDD 為小，亦即在較高濃度時，菌株對 OCDD 的影響較 OCDF 顯著。



### 3. *Pseudomonas mendocina* 菌種降解 17 種 Dioxins Standards

分析不同土壤中戴奧辛含量以後，我發現在不同天數的 OCDD 與 OCDF 加菌與不加菌後均有明顯差距。由於菌種取自於中石化土壤，所以為了進一步確定此菌種對戴奧辛的降解能力，因此我們使用戴奧辛標準品做為菌種降解的主要依據，並根據實驗結果，評估利用生物整治復育污染土壤的可行性。

由實驗結果可以看到菌種對於 17 種戴奧辛均有降解作用（如表 6 所示），但主要還是以 OCDD 與 OCDF 最為明顯（如圖 6-7 所示），由濃度百分比可以明顯看出 OCDD 與 OCDF 經過長時間作用後濃度百分比逐漸下降（如圖 6-8 所示）。

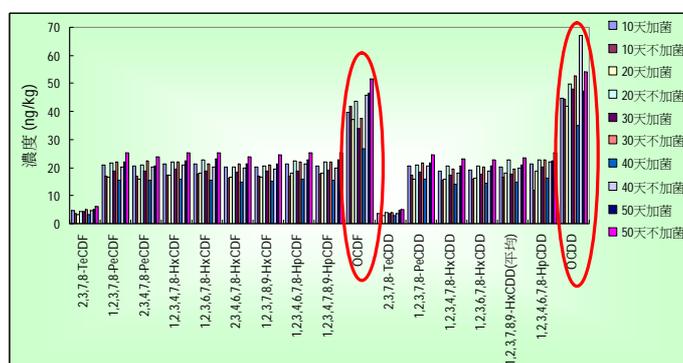


圖 6-7 Dioxins Standards 分析結果比較情形(單位：ng/kg)

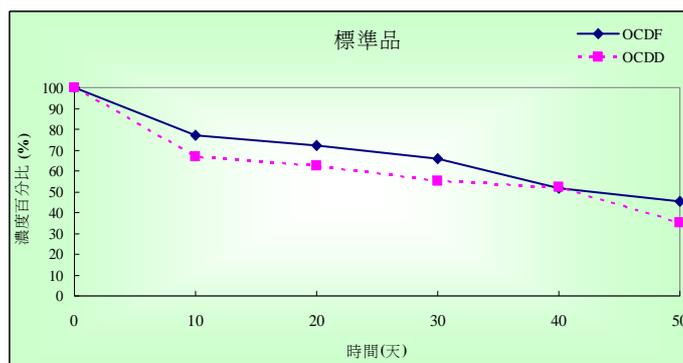


圖 6-8 Dioxins Standards 分析結果中 OCDD 與 OCDF 濃度百分比

表 6. Dioxins Standards 分析結果(單位：ng/kg)

	10 天 加菌	10 天 不加菌	20 天 加菌	20 天 不加菌	30 天 加菌	30 天 不加菌	40 天 加菌	40 天 不加菌	50 天 加菌	50 天 不加菌
2,3,7,8-TeCDF	4.683	3.561	3.366	4.461	4.206	5.068	3.419	4.737	5.030	6.032
1,2,3,7,8-PeCDF	20.854	16.829	16.477	21.695	18.760	21.837	15.495	20.246	22.061	25.149
2,3,4,7,8-PeCDF	20.694	16.991	15.938	20.854	18.784	22.343	15.380	20.338	20.675	23.973
1,2,3,4,7,8-HxCDF	21.319	17.429	17.451	21.869	19.342	22.144	15.918	20.764	22.517	25.296
1,2,3,6,7,8-HxCDF	21.369	17.783	18.130	22.804	18.914	21.357	15.451	20.257	22.956	25.435
2,3,4,6,7,8-HxCDF	20.127	16.268	16.752	20.318	18.368	21.274	14.962	19.802	21.279	23.970
1,2,3,7,8,9-HxCDF	20.054	16.798	16.488	20.444	18.867	21.093	15.121	19.635	21.218	24.471
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	21.332	16.981	18.171	22.204	18.905	21.878	15.746	21.278	22.571	25.291
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	20.572	17.630	18.204	21.944	19.099	21.930	15.588	19.759	22.683	25.365
OCDF	39.676	41.909	37.078	43.803	33.897	37.706	26.673	45.695	46.508	51.458
2,3,7,8-TeCDD	3.521	3.084	2.938	3.869	3.438	4.035	2.813	3.751	4.550	5.229
1,2,3,7,8-PeCDD	20.744	17.416	15.972	20.936	18.541	21.478	15.777	20.400	21.471	24.549
1,2,3,4,7,8-HxCDD	18.694	15.414	15.781	20.392	17.233	19.580	14.120	18.133	20.680	23.012
1,2,3,6,7,8-HxCDD	19.196	15.937	16.137	20.735	17.759	20.176	14.555	18.789	20.405	22.871
1,2,3,7,8,9-HxCDD(平均)	20.151	16.436	17.990	22.653	17.570	19.307	14.927	19.934	20.956	23.379
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	21.410	11.989	18.942	22.909	20.097	22.785	16.392	22.010	22.390	25.399
OCDD	44.620	44.380	41.679	49.757	47.997	52.765	34.916	66.991	47.170	54.039

#### 第四部分 探討 *Pseudomonas mendocina* 菌種對「戴奧辛類化合物」之降解能力

由第三部分實驗可以發現菌種對於戴奧辛有一定程度降解能力，我進一步探討菌種對於類戴奧辛的降解能力，由實驗結果發現 *Pseudomonas mendocina* 菌種對於類戴奧辛降解能力遠比戴奧辛顯著且效果更明顯（圖 6-9~6-12 所示）；其中以溴化戴奧辛(PBDDs)降解效能最為一致，12 天後濃度百分比均已降至 30% 以下；而多數的多氯聯苯(PCBs)降解效能更是明顯，在 12 天後濃度百分比降至幾近於 0；至於大多數的多溴聯苯醚(PBDEs)，濃度百分比在 12 天後也降至 30% 以下；多環芳香烴(PAHs)濃度百分比的變化差異雖大，但仍有明顯的降解。可見 *P. mendocina* 菌種對戴奧辛類化合物的確有明顯的降解效果。

這樣的發現，不啻對本研究的結果有重大突破，讓我想以從中石化安順廠污染場址之土壤篩選出的細菌，以生物復育技術用來清除土壤中有毒的戴奧辛物質的整治新法，有了重要的依據！

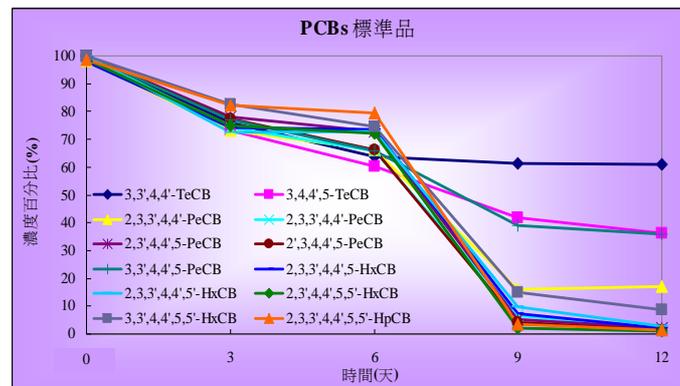


圖 6-9 多氯聯苯 Standards 濃度百分比

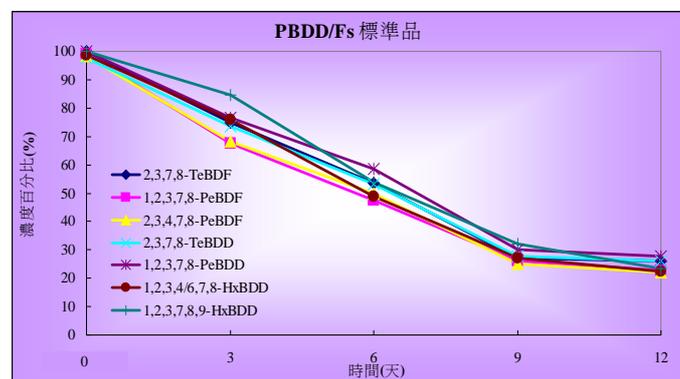


圖 6-10 溴化戴奧辛 Standards 濃度百分比

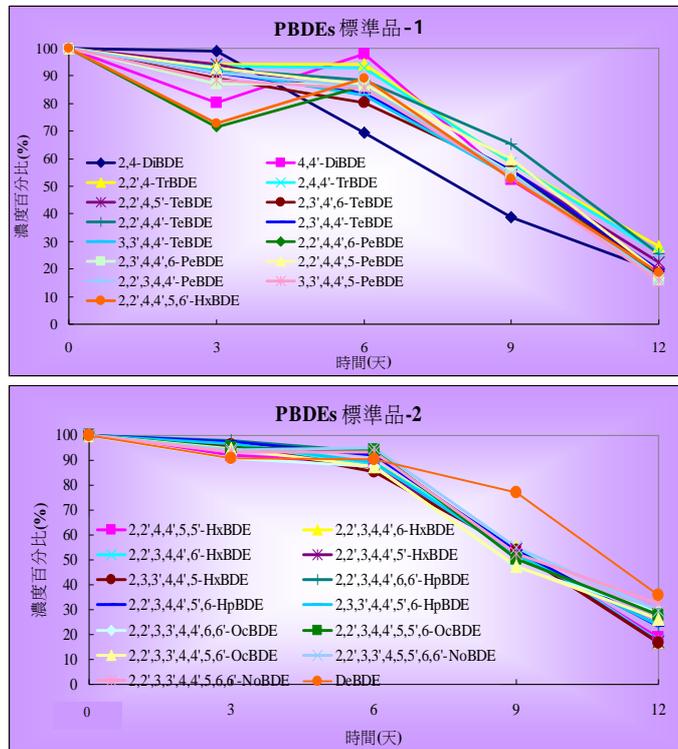


圖 6-11 多溴聯苯醚 Standards 濃度百分比

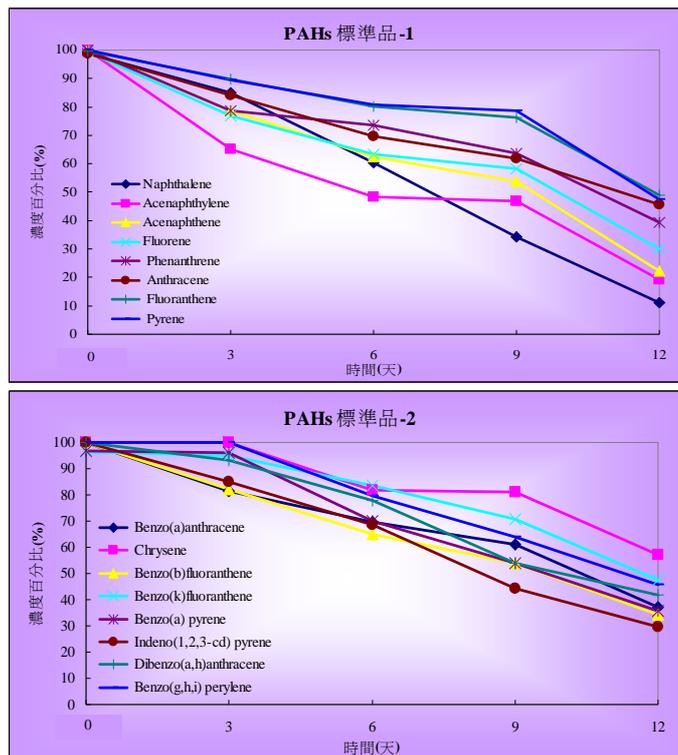


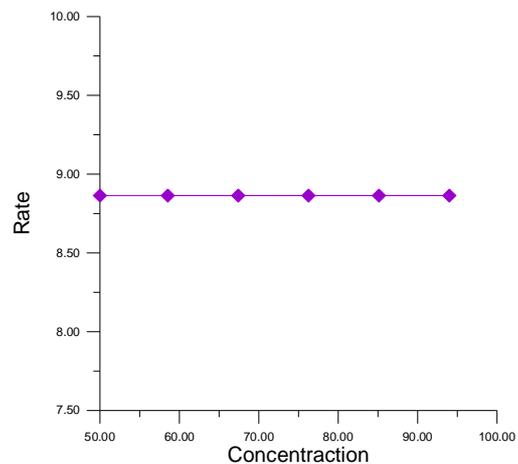
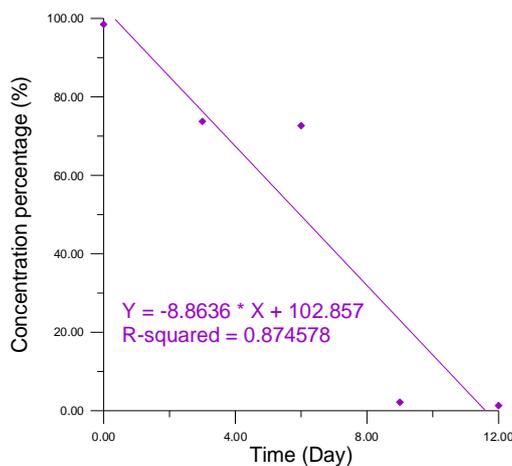
圖 6-12 多環芳香烴 Standards 濃度百分比

◎ *Pseudomonas mendocina* 降解 PCB 中 2,3',4,4',5,5'-HxCB 之反應級數分

析：

在第四部份的研究中，我發現多數的多氯聯苯(PCBs)降解效能最為明顯，在 12 天後濃度百分比降至幾近於 0，我在選擇其中降解最快的 2,3',4,4',5,5'-HxCB 進行反應及數的分析。

在濃度百分比 v.s 時間的作圖中，選擇相關係數(R<sup>2</sup> 值)最高的趨勢線，所得公式如下左圖： $[C]=T^{-8.8636} + 102.857$ ；在 Excel 中將 T 的反應天數代入方程式中，求出每一個對應的 [C] (濃度百分比)，再求出  $r = \Delta[C]/\Delta T$  對應值，作反應速率 r v.s. [C] 圖形，得下右圖。由圖中可知，2,3',4,4',5,5'-HxCB 的反應速率定律式為： $r = 8.8636 \times [2,3',4,4',5,5'-HxCB]^0$  屬於 0 級反應，意味著 *P. mendocina* 菌種對 2,3',4,4',5,5'-HxCB 的降解速率與 2,3',4,4',5,5'-HxCB 濃度多寡無關，係以一穩定的速率降解，代表調整 *P. mendocina* 菌的量並不影響 2,3',4,4',5,5'-HxCB 的降解速率，所以 *P. mendocina* 菌的濃度也不用多，只要使用「能夠有效降解 2,3',4,4',5,5'-HxCB」的 *P. mendocina* 菌濃度即可。



## 第五部分：評估 *Pseudomonas mendocina* 實際應用於整治中石化污染土壤

### 之可行性

前面的研究都是屬於控制變因之下的實驗測試，並非實際情況下的整治結果，為了印證利用 *P. mendocina* 作為整治中石化安順場污染場址的確是一個可行的新方法，於是我進行了田間試驗(Field Test)實驗。

這部份的實驗，我實際取用中石化土壤 60g，加入水份含量為 70%的 *P. mendocina* 菌液 140g，進行 60 天降解實驗，這樣的規模遠大於我之前的用量，已經可以作為田間試驗(Field Test)的證據了；結果發現，常見的 17 種戴奧辛都有明顯的降解，尤其是毒性最強的 OCDD 降解效果最明顯，60 天之後即降解至原有濃度之 21%，其次是 OCDF 降解至原有濃度之 24%，這樣的結果除了與我第三部份的研究結果吻合之外，也證明將 *P. mendocina* 菌株用來整治受戴奧辛污染的土壤確有相當顯著的降解比率。

由此可知，利用微生物復育處理，以 *P. mendocina* 菌株應用在戴奧辛污染土壤的實際整治上是可行的。

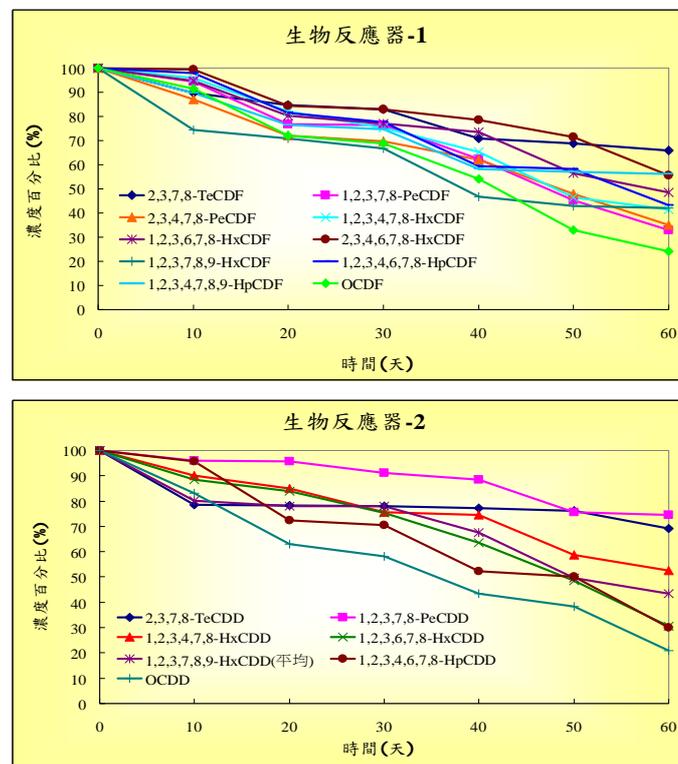


圖 6-13 田間試驗下 17 種戴奧辛濃度百分比

## 柒、結論

在前人實驗中，*Pseudomonas mendocina* 這株菌種可以完全分解五氯酚，本研究更進一步發現到它對於戴奧辛也具有降解的能力，且作用愈多天對於戴奧辛的降解能力越為明顯。更令我們振奮的就是它對於汞離子更具有至少 50 ppm 以上的耐受度，可抵抗一般污染環境土壤中汞離子所造成的傷害，這對於我們環境整治是相當令人興奮的結果。

在本研究結果中，以中石化土壤作為實驗土樣，可以明確看出菌種作用後的變化。隨著菌種作用時間越長，其降解的效果越明顯。其中又以 OCDD 與 OCDF 這兩種戴奧辛降解效果最為明顯。以中石化減菌土數據分析，*P. mendocina* 菌株分解 OCDD 的反應級數為 4.6 級，OCDF 的反應級數約為 2.7 級，表示在較高濃度時，菌株對 OCDD 的影響較 OCDF 顯著。

以製備土作為實驗土樣，也可以看出菌種作用後有相同的變化。平均菌種作用 31 天後，由濃度百分比結果可以看到加菌後 OCDD 與 OCDF 濃度差將近一半。由此可知，*P. mendocina* 菌種在中石化土及製備土壤中，均對於戴奧辛有降解效果。因此我推測污染土壤中的戴奧辛，應是被菌種所分泌的某種酵素所分解，至於製造這種菌種酵素的基因為何，值得進一步深入探討。

由標準品實驗結果，可以更加確定此菌種對於 17 種戴奧辛確實有降解作用，尤其以 OCDD 與 OCDF 最為明顯，由此可以證明此株菌種對於生物整治有其開發利用之價值，值得深入研究與探討。

由類戴奧辛的降解結果發現 *Pseudomonas mendocina* 菌種對於類戴奧辛降解能力遠比戴奧辛顯著且效果更明顯，其中以溴化戴奧辛(PBDDs)降解效能最為一致，而對多數的多氯聯苯(PCBs)降解效能更是明顯，其中 2,3',4,4',5,5'-HxCB 的反應速率以近似 0 級的反應進行，在 12 天後濃度百分比降至幾近於 0。

最後，我為了要證實 *P. mendocina* 菌株在實際整治方面是可行的，我取中石化高濃度戴奧辛污染土壤，利用 *Pseudomonas mendocina* 菌株作生物整治的研究，結果顯示降解比率相當顯著，不僅與前面的研究結果吻合，亦可作為田間試驗的證據。

最值得高興的是：*Pseudomonas mendocina* 菌種是本土菌種，非國外購進菌種，沒有引進外來菌種可能產生的生態破壞及微生物菌相干擾問題；菌種培養迅速，成本費用低，降解戴奧辛污染物所需時間短，降解成效顯著；常溫下即可將戴奧辛及戴奧辛類化合物，轉變為無害的簡單化合物，解決環境污染問題；微生物復育處理過程中，不會產生有害副產物，不造成環境二次污染，未來若能善加利用此菌做為生物整治，相信對於污染土壤的生物復育技術，將提供相當程度的貢獻。

## 捌、未來展望

我預計還要找出 *Pseudomonas mendocina* 菌株降解戴奧辛的反應機制，想進一步了解 *Pseudomonas mendocina* 菌株反應時的中間產物，以便明瞭菌株在對戴奧辛反應時是先破環再去氯嗎？而且去氯時是先斷哪一個位置的氯；只是目前儀器正在維修，所以我無法如期完成，但這會是我期盼能得到的結果。

## 玖、參考資料

1. 陳秋炳等 6 人(民 95)，基礎化學第 2-3.2 土壤的污染與防治，初版，台南，翰林出版社，p.46~p.48。
2. Sakai, S.; Watanabe, J.; Honda, Y.; Takatsuki, H.; Aoki, I.; Futamatsu, M.; Shiozaki, K. *Combustion of brominated flame retardants and behavior of its byproducts*. Chemosphere 2001, 42, 519-531.
3. 蔡啟堂(民 91)，五氯酚分解菌之生理特性探討，國立中山大學生物科學系碩士論文，未出版，高雄。
4. 戴奧辛物質特性簡介，行政院環境保護署，民 95 年 12 月 1 日，取自：<http://www.epa.gov.tw/>
5. 全民認識戴奧辛，行政院環境保護署，民 95 年 12 月 1 日，取自：<http://www.epa.gov.tw/>
6. 世紀之毒-戴奧辛，高雄醫學大學附設紀念醫院，民 95 年 12 月 7 日，取自：[www.kmuh.org.tw/](http://www.kmuh.org.tw/)
7. hiraishi, A., *Biodiversity of Dioxin-Degrading Microorganisms and Potential Utilization in Bioremediation*. Microbes and Environments, 2003. Vol.18, No.3,: p. 105-135.
8. 國際厚生健康園區編輯群，戴奧辛的處理方法，2005 [cited; Available from:[http://www.24drs.com/special\\_report/content\\_article.asp?sp=88&sec=8&no=0740&type=perspective](http://www.24drs.com/special_report/content_article.asp?sp=88&sec=8&no=0740&type=perspective)].
9. 台灣光復後的奇蹟-台鹼安順廠民眾血液戴奧辛量狂飆世界紀錄，綠色陣線協會，民 93 年 10 月 25 日，取自：<http://www.gff.org.tw/new/news20041025.htm>
10. Wang, L. C.; Chang-Chien, G. P. *Characterizing the emissions of polybrominated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans from municipal and industrial waste incinerators*. Environ. Sci. Technol. 2007, 41, 1159-1165
11. Wang, L. C.; Lee, W. J.; Lee, W. S.; Chang-Chien, G. P.; Tsai, P. J. *Characterizing the emissions of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans from crematories and their impacts to the surrounding environment*. Environ. Sci. Technol. 2003, 37, 62-67.