

酚對於固定化微生物分解2,4,6-三氯酚之影響

王俊欽¹ 李季眉² 盧至人³

關鍵詞：固定化、*Pseudomonas testosteroni*、*Bacillus insolitus*、酚、2,4-二氯酚、2,4,6-三氯酚。

摘 要

本研究擬探討酚濃度對固定化菌株*Pseudomonas testosteroni* 分解 2,4,6-三氯酚之影響；並試驗當菌株 *Bacillus insolitus* 及 2,4-二氯酚存在時，酚之添加對菌株 *Pseudomonas testosteroni* 分解 2,4,6-三氯酚之影響。結果顯示：酚之添加有助於固定化菌株*Pseudomonas testosteroni* 分解 2,4,6-三氯酚，其最佳酚添加量介於 200 至 400 mg/L 之間。而共同固定化菌株*Pseudomonas testosteroni* 與*Bacillus insolitus*，在 200 mg/L 之酚存在時，2,4,6-三氯酚之去除效果較無酚時好，但2,4-二氯酚則相反。而菌株 *Bacillus insolitus* 及2,4-二氯酚之存在對菌株 *Pseudomonas testosteroni* 是否分解 2,4,6-三氯酚並無關連，最重要的是在於酚是否添加。

THE EFFECT OF PHENOL ON THE BIODEGRADATION OF 2,4,6-TRICHLOROPHENOL BY IMMOBILIZED CELLS

Chun-Chin Wang¹, Chi-Mei Lee² and Chih-Jen Lu³

Department of Environmental Engineering,
National Chung Hsing University
Taichung, Taiwan 40227, R. O. C

Key words: Immobilized cells, *Pseudomonas testosteroni*, *Bacillus insolitus*, phenol, 2,4-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol.

ABSTRACT

This study focused on the effect of the addition of phenol on the biodegradation of 2,4,6-trichlorophenol by the immobilized *Pseudomonas testosteroni*. This study also focused on the addition of phenol on the removal of 2,4,6-trichlorophenol with the presence of both *Bacillus insolitus* and 2,4-dichlorophenol. The experiment was conducted with a batch reactor. The results indicated that the addition of phenol enhanced the removal of 2,4,6-trichlorophenol by the immobilized *Pseudomonas testosteroni*. The optimum concentration of

¹ 國立中興大學環境工程學研究所碩士班研究生

² 國立中興大學環境工程學研究所教授

³ 國立中興大學環境工程學研究所教授

phenol was in the range of 200 to 400 mg/L. The presence of phenol also enhanced the removal of 2,4,6-trichlorophenol by the coimmobilized cells containing both *Pseudomonas testosteroni* and *Bacillus insolitus*. However, the addition of phenol retarded the removal of 2,4-dichlorophenol in the coimmobilized system, even if *Bacillus insolitus* had been shown to effectively removal 2,4-dichlorophenol. The enhanced removal of 2,4,6-trichlorophenol by *Pseudomonas testosteroni* was independent of the presence of 2,4-dichlorophenol and *Bacillus insolitus*, but was dependent on the presence of phenol.

一、前言

氯酚類化合物為環境中常見之污染物，普遍存於煉油、冶金、煉焦、石化、塑膠、煤氣及染料等工業廢水中[1][2]。其不僅為生物難分解之物質，且對人體有致基因突變及致癌性，故引起世人普遍關切。在芬蘭曾因鋸木工廠使用氯酚作為防腐劑，導致周圍環境如土壤及水體之污染；又因將紙漿廢水排入湖泊導致湖水及底泥的污染。在紐西蘭則發現垃圾掩埋場滲出水含有氯酚並污染鄰近海岸；於國內高雄後勁地區水樣檢出2,4,6-三氯酚在 40.6 ~ 80.6 ppb 之間 [3]，顯見各國遭受氯酚類污染的事實，故如何有效的處理氯酚類物質，是非常重要的。

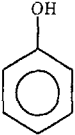
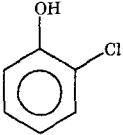
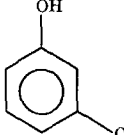
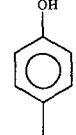
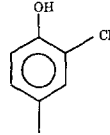
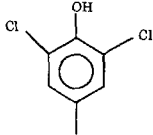
酚為苯環上有一個 OH 取代基之化合物，而氯酚化合物除由酚經氯化而成，亦可由殺蟲劑、除草劑分解而得。氯酚化合物具毒性，不易揮發，比水重，其物化性質如表一[4][5] 所示，而其合成方法及用途則列於表二[6]。根據水體分類及水質標準甲類水體酚類限值為 0.001 mg/L，五氯酚標準值為 5µg/L，而放流水

標準中，民國 82 年及民國 87 年酚類最大限值分別為 2.0 mg/L 及 1.0 mg/L，至於五氯酚及其鹽類均不得檢出。

處理氯酚類化合物的方法包括回收、焚化、活性碳吸附、離子交換、生物處理[1] 等。鑑於處理費用及預防二次污染，加上微生物易受到有毒物質的傷害及菌體易流失，而降低了處理效果，限制了吸附、焚化及傳統生物處理之應用。故將固定化細胞方法應用於生物處理系統中，藉由擔體之保護，菌體不僅能避免有毒環境直接傷害，亦不易流失，大幅提升了處理能力[7]。加上菌體做成固定化細胞後，不僅可長時間保存，活性亦維持穩定，並可存於高濃度中，使經濟效益大為提昇。由於固定化細胞具有免於受毒性物質傷害之特性，因此，常被用來去除環境中含毒性之污染物。Bettmann 和 Rehm 之研究顯示固定化之菌體可耐高濃度之含酚廢水[8]。

在一受污染之環境中，除難分解之物質外亦存在易分解之物質，故微生物分解這些有機物，常隨著有

表一、氯酚類化合物之物化性質

化合物	酚	2-氯酚	3-氯酚	4-氯酚	2,4-二氯酚	2,4,6-三氯酚
結構式						
分子量(g/mol)	94.11	128.56	128.56	128.56	163.01	197.46
熔點(°C)	41	9	32.8	43	45	68
沸點(°C)	182	175.6	214	217	210	244.5
比重	1.07	1.241	1.245	1.306	1.383	1.49
溶解度(g/L)	82	28.5	26	27.1	4.5	0.8
pka	9.96	8.52	9.12	9.41	7.85	7.42
毒性	-	0.67	0.57	0.67	-	-

註1. 毒性試驗為以鼠口服所得之LD50 值

表二、氯酚類化合物之合成及用途

氯 酚	合 成 方 法	主 要 用 途
4-氯酚	酚直接氯化	製造2,4-二氯酚及殺菌劑4-氯-2-甲酚。
2,4-二氯酚	酚直接氯化	製造殺菌劑2,4-二氯酚，並用為防腐劑及殺小蜘蛛劑
2,4,5-三氯酚	1,2,4,5-四氯苯水解	製造落葉劑2,4,5-三氯酚及有關產品，並用作防霉劑、防腐劑、除藻劑、殺菌劑。
2,4,6-三氯酚	酚直接氯化	製造2,3,4,6-四氯酚及五氯酚，並用作殺菌劑、木材防腐劑
2,3,4,6-四氯酚	酚或氯酚直接氯化	用作殺菌劑、殺蟲劑、防霉劑、木材及皮革防腐劑。
五氯酚	酚或氯酚直接氯化	用作木材防腐劑、除草劑、殺蟲劑。

機物之物種和濃度之高低產生了下列現象：(1) 共同代謝(Cometabolism)：微生物於生長基質存在下，將不能提供生長之基質進行分解之情形[9]；(2) Diauxic utilization：當兩種基質同時存在時，微生物會將其中一種基質利用完畢後，再利用另一基質[10]；(3) 促進作用：當加入第二碳源時，由於增加生物質量(biomass)因而促進分解或減少馴化所需時間[11]；(4) 抑制作用：由於不同基質間之相互競爭或抑制，反而延緩了個別基質之分解速率[12]。

本實驗室曾自受氯酚化合物馴化之混合族群中研究固定化細胞系統對六種氯酚類化合物之去除能力，並將馴化之混合族群加以分離、鑑定及篩選後得到四株氯酚分解菌，分別為 *Pseudomonas putida*、*Pseudomonas testosteroni*、*Pseudomonas aeruginosa* 和 *Agrobacterium radiobacter*，同時探討純種氯酚分解菌之固定化細胞對各種氯酚類化合物之分解力。研究結果顯示，各菌株對2,4,6-三氯酚皆無法分解，只有 *Pseudomonas testosteroni* 於添加第二基質“酚”後，才可以分解2,4,6-三氯酚[13]。另外類似之實驗結果得知 *Bacillus insolitus* 是一株2,4-二氯酚分解菌[14]。故本研究擬探討酚濃度對 *Pseudomonas testosteroni* 分解2,4,6-三氯酚之影響；並試驗菌株 *Bacillus insolitus* 及2,4-二氯酚存在時，酚之添加對菌株 *Pseudomonas testosteroni* 分解2,4,6-三氯酚之影響。

二、實驗方法

1. 純種菌種之液體培養

以固定化細胞進行生物處理時，需大量菌體，故採液體培養進行增殖；並藉由菌體與氯酚之預先接觸，增加菌株對氯酚之適應及分解能力。

首先將菌株接種至無機鹽培養液中，然後加入 Nutrient broth (1升無機鹽培養液溶解2克N.B)，待其大量生長後，以冷凍離心機收集菌體，再接種至無機鹽培養液中，隨後加入100 mg/L之酚、10 mg/L之2,4-二氯酚及5 mg/L之2,4,6-三氯酚為基質，置於振盪器振盪培養(25°C；120 rpm)。無機鹽營養源之成份及濃度如表三所示。

2. 固定化細胞擔體之選擇

本實驗選擇 Na-alginate 作為固定化細胞的擔體，選擇此擔體之原因是Na-alginate固定化效果較優。

表三、液體培養之無機營養源成份及濃度

無機營養源	濃度(g/L)
NH ₄ NO ₃	0.1
Ca(NO ₃) ₂	0.02
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1
K ₂ HPO ₄	0.05
KH ₂ PO ₄	0.03
*Trace element	1mL
*Trace element 之成份為	
H ₃ BO ₃	0.1 g/L
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.04 g/L
MnSO ₄ ·7H ₂ O	0.04 g/L
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.02 g/L
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.045 g/L

3. 固定化細胞之製備

- (1) 配製4%(w/v)之Na-alginate溶液及4%(w/v)之CaCl₂溶液，在121℃下滅菌40分鐘，待其冷卻後備用。
- (2) 菌體經液體培養後，所得之大量菌體以冷凍離心機(Hitachi 20 PR-52) (4℃、6000 rpm、10 min)收集，然後將等量菌體(約5 × 10⁷個/mL)置入Na-alginate溶液中，以磁石攪拌混合均勻。
- (3) 以定量滴管將含菌體之Na-alginate滴入4%之CaCl₂溶液中，形成球狀顆粒。
- (4) 靜置5小時後，以無菌水沖洗已形成之固定化細胞，然後加入無機鹽培養液及200 mg/L之酚進行活化程序。

4. 固定化細胞最佳活化時間之測定

- (1) 製作數瓶等量之固定化細胞，並分別加入50 mL之無機鹽培養液及200 mg/L之酚，振盪培養。
- (2) 隨後每隔一段時間取一瓶，倒去培養液，同時加入0.1 M之檸檬酸鈉溶液溶解固定化細胞，以分光光度計(Hitachi)測吸光度，波長設於560 nm。
- (3) 將時間和吸光度作圖，當吸光度為最大時，其時間為最佳活化時間。

5. 固定化細胞之培養

- (1) 固定化細胞經製備及活化後，以無菌水沖洗，接著再加入無機鹽培養液及依實驗需求加入不同種類、不同濃度之氯酚類，振盪培養。
- (2) 每隔一段時間自每瓶中取0.2 mL之液體，所取之樣品經真空過濾裝置(millipore)過濾後，以HPLC分析。

6. 氯酚濃度分析方法

本實驗以HPLC(Hitachi)進行2,4-二氯酚及2,4,6-三氯酚之分析。

- (1) U.V.detector(L4000/L4200型)之波長設定為284.2 nm，此為先前測試過氯酚吸收強度最大之波長。
- (2) 沖提劑(mobile phase)之流量為1.0 mL/min。
- (3) 樣品以真空過濾裝置(millipore)過濾，濾液收集後以微量針筒抽取20μl注入分析。

- (4) 以HPLC分析sample得到之面積經標準曲線換算成濃度，並經由計算C/C₀與天數之關係知其分解能力。

三、結果與討論

1. 各純種菌株活化時間之選定

圖一顯示共同固定化菌株*Pseudomonas testosteroni*與*Bacillus insolitus*活化時間之測定結果。由圖一得知，共同固定化菌株*Pseudomonas testosteroni*與*Bacillus insolitus*於培養69.92小時後，可達最高之活性。至於以*Pseudomonas testosteroni*為菌株之固定化細胞的最佳活化時間，則為48小時[13]。

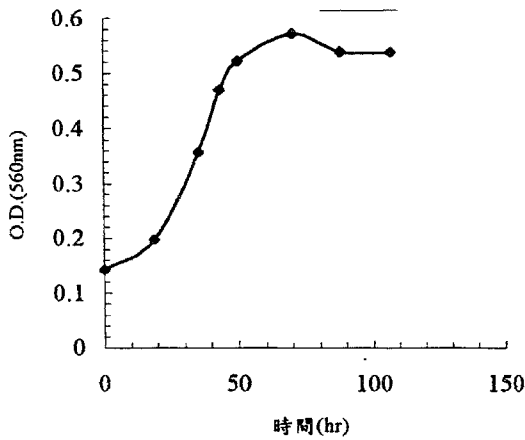
2. 添加不同濃度之酚對*Pseudomonas testosteroni*分解2,4,6-三氯酚之影響

圖二～圖六為*Pseudomonas testosteroni*對5 mg/L之2,4,6-三氯酚的分解情形，其中酚添加之濃度分別為50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L、300 mg/L和400 mg/L。

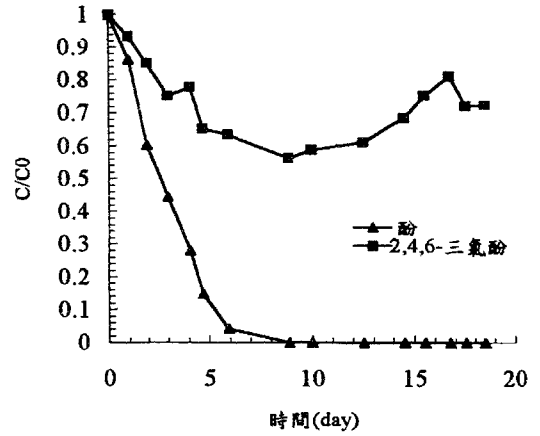
由圖二及圖三中可看出50 mg/L及100 mg/L之酚分別於第1天及第2天分解完畢，但2,4,6-三氯酚分解效果不理想，經兩週後其去除率僅分別為10%及20%。

於圖四～圖六中可知，200 mg/L～400 mg/L之酚，最快於第9天以後才完全分解，而2,4,6-三氯酚之分解率分別提昇為27.5%、34%及46%。

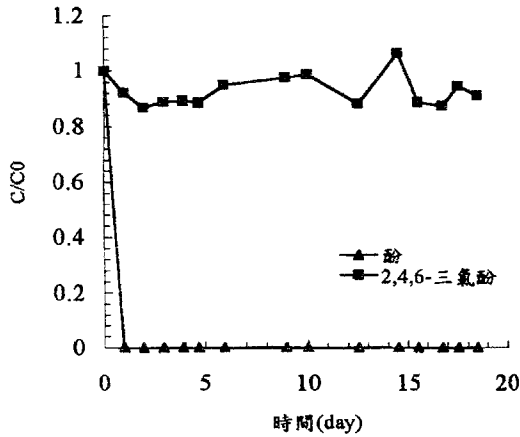
從圖二～圖六中，可發現一個現象，當2,4,6-三氯酚濃度快速減少時，亦是酚急速分解時候，當酚分解完畢後，所偵測到2,4,6-三氯酚濃度又明顯增加，增加約為完全未分解時濃度之20%，其後所得到之濃度值才又逐漸減少。此種現象應為當固定化菌株*Pseudomonas testosteroni*開始大量分解酚時，其固定化細胞外壁吸附足夠量之酚及2,4,6-三氯酚，當酚快速被分解時，2,4,6-三氯酚只微量被分解，但部份未被分解之2,4,6-三氯酚因被吸附而未溶解於無機鹽溶液中，故取溶液偵測時，會發現2,4,6-三氯酚濃度大量減少，因此造成2,4,6-三氯酚被大量分解之假象，當酚分解完畢後，2,4,6-三氯酚仍持續少量被分解，但被細胞外壁吸附之2,4,6-三氯酚逐漸脫離吸附，而溶於溶液中，因此造成酚分解完畢後，所偵測到之2,4,6-三氯酚逐漸增加，而再緩慢的下降。



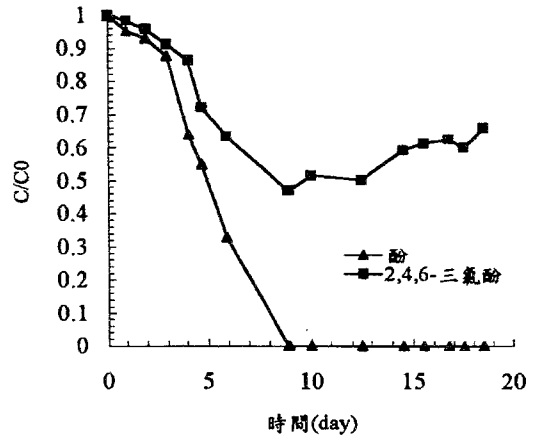
圖一、*Bacillus insolitus* 及 *Pseudomonas testosteroni* 共同固定化細胞之最佳活化時間



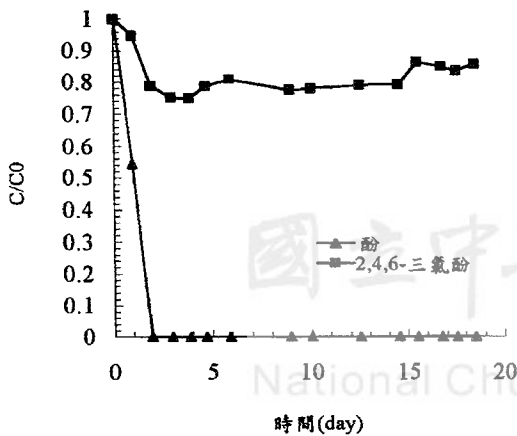
圖四、添加酚(200 mg/L) 對 *Pseudomonas testosteroni* 分解2,4,6-三氯酚(5 mg/L) 之影響， C/C_0 ：殘存率



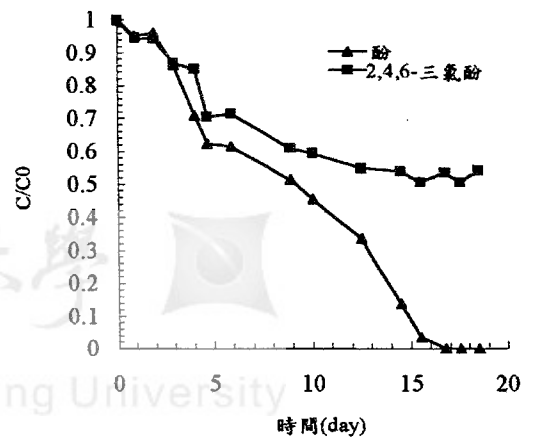
圖二、添加酚(50 mg/L) 對 *Pseudomonas testosteroni* 分解2,4,6-三氯酚(5 mg/L) 之影響， C/C_0 ：殘存率



圖五、添加酚(300 mg/L) 對 *Pseudomonas testosteroni* 分解2,4,6-三氯酚(5 mg/L) 之影響， C/C_0 ：殘存率



圖三、添加酚(100 mg/L) 對 *Pseudomonas testosteroni* 分解2,4,6-三氯酚(5 mg/L) 之影響， C/C_0 ：殘存率



圖六、添加酚(400 mg/L) 對 *Pseudomonas testosteroni* 分解2,4,6-三氯酚(5 mg/L) 之影響， C/C_0 ：殘存率

於上述現象可知，2,4,6-三氯酚之分解與酚之利用有密切之關係，雖無法瞭解酚於此溶液中所伴演之角色，但仍可歸納出三點可能造成此現象之原因：(1) 菌株 *Pseudomonas testosteroni* 利用酚時產生誘導酵素，促進2,4,6-三氯酚之分解；(2) 菌株 *Pseudomonas testosteroni* 利用易分解之酚，使生物質量(biomass)大為提高，由於菌數之增加，因而加速了2,4,6-三氯酚之分解；(3) 由於酚之分解提供了還原能以促進2,4,6-三氯酚之氧化性轉換，使2,4,6-三氯酚加速分解。

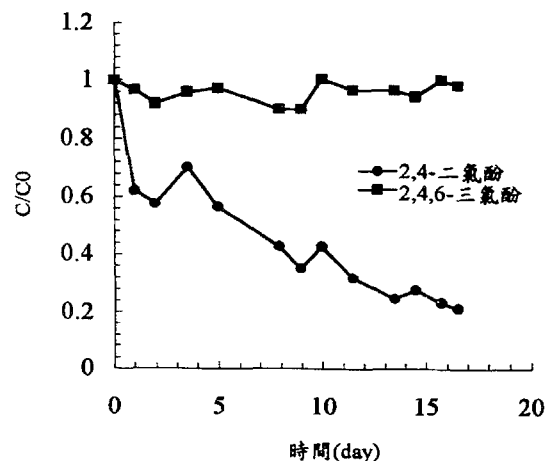
從圖二~圖六中可知，當酚濃度太低時，對固定化菌株 *Pseudomonas testosteroni* 分解2,4,6-三氯酚並無太大幫助，而最佳酚添加量應介於200 mg/L 至400 mg/L 之間，但由圖六中可知，添加400 mg/L 之酚，2,4,6-三氯酚有最大之分解率：(46%)，不選擇此濃度為最佳酚添加量之原因乃是根據前述所提出之現象，加上400 mg/L 之酚於第16.75 天才分解完畢，而實驗偵測2,4,6-三氯酚之濃度變化只至第18.5 天，故推測未來幾天，2,4,6-三氯酚之濃度會再上升，即去除率會下降，依照圖四及圖五之經驗，其分解率應由46% 降至26% 附近，此值與添加300 mg/L 之酚，2,4,6-三氯酚有34% 之分解率相比，反而略低，故最佳酚添加量不選擇400 mg/L，而是介於200 mg/L 與400 mg/L 之間。

而若酚之添加量過高，除因酚的濃度較大相對增加其毒性效應外，亦須分析其溶氧需求。根據 $\text{phenol} + 7\text{O}_2 \rightarrow 6\text{CO}_2 + 3\text{H}_2\text{O}$ 計算得知，分解每單位質量之酚，須供應2.4倍之氧，因而，酚之添加量較大時，系統中之溶氧可能偏低，而致影響好氧分解。而相對於傳統之懸浮生長，固定化細胞需要較高之溶氧，以形成梯度變化，藉以克服傳輸較慢之缺點，而維持固定化顆粒內部之喜氣狀態，因此，外加碳源“酚”之添加量不宜過高。

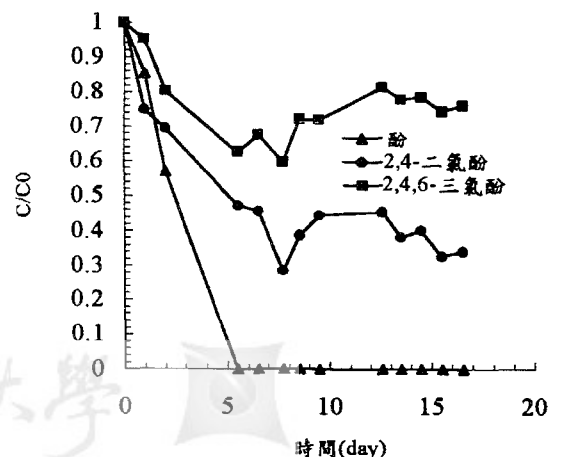
3. 當菌株 *Bacillus insolitus* 及2,4-二氯酚存在時，酚之添加對菌株 *Pseudomonas testosteroni* 分解2,4,6-三氯酚之影響

本實驗探討共固定化菌株 *Pseudomonas testosteroni* 與 *Bacillus insolitus* 對2,4-二氯酚及2,4,6-三氯酚之分解情形，其中2,4-二氯酚之濃度為10 mg/L，2,4,6-三氯酚之濃度則為5 mg/L，其中一組未添加酚，另外一組則添加200 mg/L 之酚。其實驗結果如圖七及圖八所示。

由圖七及圖八中得知，2,4-二氯酚之去除率分別為79% 及66%，而2,4,6-三氯酚則分別為不分解及去除24%，故可知phenol 之添加對2,4,6-三氯酚之分解有益，此與前述結果相符；而2,4-二氯酚之去除效果，於未添加酚時效果較好；另外於圖中可知菌株 *Bacillus insolitus* 及2,4-二氯酚之存在對菌株 *Pseudomonas testosteroni* 是否分解2,4,6-三氯酚並無太大之關連，最重要的是在於酚是否添加。



圖七、以 *Bacillus insolitus* 及 *Pseudomonas testosteroni* 共同固定化對2,4-二氯酚(10 mg/L) 及2,4,6-三氯酚(5 mg/L) 之分解情形， C/C_0 ：殘存率。



圖八、添加酚(200 mg/L) 對 *Bacillus insolitus* 及 *Pseudomonas testosteroni* 共同固定化細胞分解2,4-二氯酚(10 mg/L) 及2,4,6-三氯酚(5 mg/L) 之影響， C/C_0 ：殘存率。

由圖七及八可知，酚之添加對2,4-二氯酚的分解效果並無顯著之效益。由前人[13][14][15]之研究結果可知，酚及2,4-二氯酚被歸為較易被分解之酚類化合物，而2,4,6-三氯酚則較具抗分解性。由前述之結果可知較易分解之酚添加，則會因生物質量之增加及酵素之誘導而增加較難分解之2,4,6-三氯酚的分解。但對2,4-二氯酚而言，同屬較易分解之酚加入，會因為酵素競爭之影響，反而延緩2,4-二氯酚之分解。

四、結論

本實驗以批次式方法，藉控制定量的菌數、環境因子及改變基質濃度，以瞭解酚對於 *Pseudomonas testosteroni* 分解2,4,6-三氯酚之影響。其主要目的包括(1) 探討酚濃度對固定化菌株 *Pseudomonas testosteroni* 分解2,4,6-三氯酚之影響。(2) 瞭解當菌株 *Bacillus insolitus* 及 2,4-二氯酚存在時，酚對菌株 *Pseudomonas testosteroni* 分解2,4,6-三氯酚之影響。結果顯示：

1. 酚之添加對固定化菌株 *Pseudomonas testosteroni* 分解2,4,6-三氯酚有一定程度之幫助，亦即添加酚之分解效果較沒有酚時好，但酚濃度太低時，效果不明顯。而最佳酚添加量介於 200 mg/L 至 400 mg/L 之間。
2. 共同固定化菌株 *Pseudomonas testosteroni* 與 *Bacillus insolitus*，若有 200 mg/L 之酚存在時，2,4,6-三氯酚之去除效果較無酚時好，但2,4-二氯酚則相反。
3. 菌株 *Bacillus insolitus* 及 2,4-二氯酚之存在對菌株 *Pseudomonas testosteroni* 是否分解 2,4,6-三氯酚並無影響，最重要的是在於酚是否添加。

五、誌謝

本研究承行政院國科會補助大學生暑期參與研究計劃(計劃編號：NSC 84-0115-C005-01-058E)之研究經費，得以順利完成。特此敬致謝忱。

參考文獻

1. 阮國棟，「廢水中各種酚類 (phenols) 去除之理論與實務」，工業污染防治，第三卷，第三期，第 88-103 頁，(1984)。
2. 劉靜宜、汪永璞、彭安、徐瑞薇、周定等，環境工程學，第31-33頁、第110-114頁，(1991)。
3. 江文仁、潘子明、袁紹英、張碧芬，「氯酚類化合物在環境中的消長」，化學，第四十九卷，第四期，第 347-357 頁，(1991)。
4. Verschueren, K., Handbook of Environmental Data on Organic Chemical, 2nd Edition. Van Nostrand Reinhold Company, Inc. (1983).
5. Merck Index. eleventh edition, pp.382, 484, and 1126 (1989).
6. 王碧，環境中有機毒性物質分析方法之研究，環保通訊雜誌社，第 31-35 頁(1988)。
7. Chibata, I., Tosa, T. and Sato, T., "Method of cell immobilization," In : *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. (Demain, A. L. and Solomon, N. A.), America Society of Microbiology, Washington, D.C. (1986).
8. Bettamann, H. and Rehm, H. J., "Degradation of Phenol by Polymer Entrapped Microorganisms", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 20, pp. 285-290 (1984).
9. Horvath, R. S., "Microbial Co-Metabolism and the Degradation of Organic Compounds in Nature", *Bacteriological Reviews*, Vol. 36(2), pp. 146-155 (1972).
10. Gaudy, A F., Jr. and Gaudy, E. T., *Microbiology for Environmental Scientists and Engineers*. (1980).
11. Wiggins, B. A. and Alexander, M., "Role of Chemical Concentration and Second Carbon Source in Acclimation of Microbial Communities for Biodegradation", *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 54 (11), pp 2803-2807 (1988).
12. Venkataramani, E. S. and Ahlert, R. C. "Role of Cometabolism in Biological Oxidation of Synthetic Compounds", *Biotechnol. Bioeng.*, Vol 27, pp.1306-1311 (1985).
13. 黃秋榕，「固定化氯酚分解菌處理廢水中含氯酚類有毒物質之研究」，碩士論文，國立中興大學環境工程學研究所，台中(1993)。

14. 官知嫻, “2,4-二氯酚分解菌之分離、鑑定及耐受能力探討”, 學士論文, 國立中興大學環境工程學系, 台中(1994)。
15. 張淑惠, “固定化細胞擔體種類對氯酚類物質生物分解之影響”, 國立中興大學環境工程學系暑期參與專題研究計畫成果報告, 台中(1993)。

論文收稿日期: 85年4月18日

論文修訂日期: 85年7月5日

論文接受日期: 85年8月26日

國立中興大學



National Chung Hsing University