

## 由污染場址分離純種五氯酚分解菌及其特性研究

楊茱芳<sup>1</sup> 李季眉<sup>2</sup> 王俊欽<sup>3</sup>

關鍵詞：五氯酚、生物分解、*Sphingomonas chlorophenolica*。

### 摘 要

五氯酚被大量使用在木材防腐上，隨著藥劑的生產及使用所排出大量含五氯酚的廢水，若滲入土壤將是一大污染。氯酚化合物的處理，一般多為物化處理，如活性碳吸附、離子交換、焚化等。這些方法均有其處理效果，但基於費用及二次污染的問題而限制其應用。故本研究將採用生物處理方式，從受五氯酚污染之場址土壤篩選出五氯酚分解菌，並研究菌株的生理特性，進而對污染場址中五氯酚之去除有所助益。本研究分離出一株五氯酚分解菌，經 16S rDNA 序列鑑定菌名為 *Sphingomonas chlorophenolica*；其最佳生長溫度在以濃度 400 mg/l 之葡萄糖為基質時是 28°C，以濃度 400 mg/l 之醋酸鈉作為基質時，最佳生長溫度則是 30°C；在 pH 值為 6.9~7.6 時有最佳降解五氯酚能力，濃度 75 mg/l 之五氯酚皆可在 37 小時內降解完全；菌株對不同五氯酚濃度之降解情形如下：在添加濃度 100 mg/l 五氯酚時，可在 25 小時達 100% 降解；添加濃度 250 mg/l 之五氯酚則可在 90 小時內達到完全降解；當添加濃度 400 mg/l 之五氯酚時，五氯酚在 110 小時達去除率 89%，之後便不再降解；添加較高濃度 600 及 800 mg/l 之五氯酚時，菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 則無法降解五氯酚。本研究所分離出菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 其降解五氯酚能力較文獻所提菌株之能力佳。

## REMOVAL OF PENTACHLOROPHENOL BY PENTACHLOROPHENOL DEGRADING BACTERIA

Chu-Fang Yang Chi-Mei Lee Chun-Chin Wang

Department of Environmental Engineering,  
National Chung Hsing University,  
Taichung 402, Taiwan, R.O.C.

Key Words: Pentachlorophenol, biodegradation, *Sphingomonas chlorophenolica*.

### ABSTRACT

Pentachlorophenol (PCP) has been widely used as a wood preservative for more than 100 years. This widespread use has resulted in the uncontrolled release of PCP into

<sup>1</sup> 國立中興大學環境工程學系碩士班研究生

<sup>2</sup> 國立中興大學環境工程學系教授

<sup>3</sup> 國立中興大學環境工程學系博士後研究員

the soil and aquatic environments. This environmental contamination is significant because PCP has been shown to have a relatively high potential for aqueous phase migration in soils and is considered to be very toxic. Several physical, chemical and biological methods including activated carbon adsorption, ion exchange, incineration and biological degradation have been proposed for treating or recovering chlorophenolic compounds. The biological treatment is superior to physicochemical methods such as activated carbon adsorption and incineration because the latter ones have high treatment costs and possibilities of causing a secondary pollution. This study attempts to isolate and identify the PCP degrading bacteria, which utilize PCP as the substrate, from PCP contaminated soils. The performance of the PCP degrading bacteria for treating different initial PCP concentrations was also investigated under aerobic conditions. The results indicated that one strain was isolated from the PCP contaminated soils. This strain was identified as *Sphingomonas chlorophenolica* by methods based on 16S rDNA gene sequence. The optimum growth temperatures of *Sphingomonas chlorophenolica* were 28°C and 30°C by utilizing glucose and sodium acetate as substrates, respectively. When the pH values were 6.9 and 7.6, the PCP removal rate of *Sphingomonas chlorophenolica* was best and 75 mg/l of PCP was completely removed at 37 hours. When the initial PCP concentrations were 100 mg/l and 250 mg/l, *Sphingomonas chlorophenolica* could remove PCP completely within 25 hours and 90 hours, respectively. When the initial PCP concentration was 400 mg/l, the removal efficiencies were 89% for 110 hours. When the initial PCP concentration was above 600 mg/l, *Sphingomonas chlorophenolica* could not degrade PCP. Data from this investigation and previous studies of the degradation of PCP illustrate the potential use of this bacterium to biodegradation of PCP in the contaminated soils.

## 一、前言

氯酚化合物為含氯芳香族化合物，具毒性，不易揮發，比水重，且具有穩定之化學特性[1]，其普遍存於煉油、冶金、煉焦、石化、塑膠、煤氣等工業廢水中，為環境常見之污染物，因此氯酚化合物若未經妥善處置，將是一種危害[2]。氯酚化合物主要來源為農工業上所使用的殺蟲劑、除草劑及木材防腐劑，尤其是五氯酚被大量使用在木材防腐上[3]；另一部份也可能由環境中其他化合物(如：六氯苯)經生物轉化作用而形成[4]。隨著藥劑的生產及使用所排出大量含五氯酚的廢水，若滲入土壤將是一大污染。雖然土壤和水體一樣具有基本的自淨能力，但在五氯酚的大量使用下，早已超出其自淨能力範圍[5]。五氯酚在土壤中並無明顯的光解及水解作用，主要需依賴土壤中的微生物來達到降解目的。五氯酚會因吸入、皮膚接觸及誤食或經食物鏈累積進入

人體，對健康的危害可分急性及慢性兩部分，且據國外研究指出五氯酚亦可能導致畸形及突變[6]。氯酚化合物的處理，一般多為物化處理，如活性碳吸附、離子交換、焚化等。這些方法均有其處理效果，但基於費用及二次污染的問題而限制其應用[1]。故本研究將採用生物處理方式，希望從受五氯酚污染之場址土壤篩選出五氯酚分解菌，並研究這些菌株對五氯酚之去除情況與生理特性，進而對污染場址中五氯酚之去除有所助益。

## 二、實驗方法

### 2.1 混合族群的馴化

將 6 g 經五氯酚污染之土壤置入經滅菌的 Waring blender 中，加入滅菌後之無機營養鹽液及 Tween 80，攪打 1 分鐘，取適量攪打液加入裝有經滅菌之無機營養鹽液的三角瓶內，添加 40 mg/l 五氯酚用以馴化

土樣中的混合菌株，三角瓶置於 30°C、120 rpm 下振盪培養。每隔一段時間，吸取瓶中溶液過濾分析五氯酚含量，視情況予以再添加五氯酚或提升五氯酚濃度，使混合菌可穩定利用五氯酚為基質成長。無機鹽液之成份(g/l)為  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} : 0.2$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} : 0.02$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 : 0.5$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4 : 0.5$ 、 $\text{NH}_4\text{NO}_3 : 0.5$  及微量元素每升中添加 10 ml。微量元素成份(mg/l)為  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} : 300$ 、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} : 50$ 、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} : 106$ 、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} : 34$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} : 40$ 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} : 50$ 。五氯酚在水中溶解度極低，因此在配製時，是將 225 mg 五氯酚溶於 30 ml 無菌水中，再將 pH 值調高至五氯酚完全溶解，如此將可大幅提升五氯酚之溶解度，因此便配得高濃度之五氯酚儲備液，待實驗時再予以稀釋即可。

## 2.2 純種菌株的分離

取經馴化後之混合菌液 10 ml 作  $10^{-1}$ ~ $10^{-5}$  的稀釋系列，每稀釋系列吸取 0.1 ml 菌液塗抹於含濃度 40 mg/l 五氯酚之低限培養基上，抹碟後之培養皿放入 30°C 培養箱培養。菌落長出後，選取不同型態菌落，以接種環接種至另一含五氯酚之低限培養基上，重覆接種直至確定菌株為純菌。

## 2.3 純種菌株的鑑定

以 16S rDNA 序列作菌種鑑定。方法為先將菌株中染色體的 DNA 萃取純化出來，經瓊脂糖凝膠電泳確認 DNA 已獲得後，以 PCR 將樣品 DNA 量放大，之後再以瓊脂糖凝膠電泳分析確認經放大倍增之樣品 DNA，隨後將電泳跑出的 DNA 片段作純化，最後送去定序，以定序後所得之基因序列輸入基因序列資料庫(NCBI 網站上之 BLAST 程式)進行比對，即可鑑定該菌株。PCR 操作條件為(a)94°C、5 分鐘，進行 hot start，(b)94°C、1 分鐘，使模版 DNA 產生變性，(c)55°C、1 分鐘，讓引發物與模版 DNA 煉合，(d)72°C、2 分鐘，進行 DNA 延長作用。如此重複 30 個循環，再於 72°C 反應 10 分鐘，使 DNA 之合成能充分延長。所使用之引發物(primer)為 27f 與 1492f。27f 為 5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'。其中 M 為(AC)。1492f 為 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'。其中 Y 為(CT)[7]。

## 2.4 菌株質體存在與否實驗

本實驗利用 QIAprep® Spin Miniprep Kit 抽取質體，以確知菌株有無質體的存在[7]。

## 2.5 純種菌株最佳生長溫度之溫度梯度實驗

以無菌棉花棒將菌株由培養皿移入經滅菌的無機鹽液中，並以單光束分光光度計於波長 600 nm 下調整菌液吸光度值為 0.08~0.1，再將菌液分裝在 L 型玻璃管中，隨後加入菌株可利用之基質葡萄糖或醋酸鈉(濃度皆為 400 mg/l)，塞上棉花塞，將 L 型玻璃管置於已設定好一系列最低到最高溫度之溫度梯度儀 (TEMPERATURE GRADIENT INCUBATOR 12, TOYO®) 上振盪培養，定時以單光束分光光度計於波長 600 nm 下監測菌液之吸光度值變化。

## 2.6 純種菌株降解五氯酚之最適 pH 值實驗

配製 5.2、6.0、6.9、7.6、8.3 及 9.2 不同 pH 值(5.2~9.2)之無機鹽液，以無菌棉花棒將菌株移入經滅菌且不同 pH 值之無機鹽液中，並以單光束分光光度計於波長 600 nm 下調整菌液吸光度值為 0.08~0.1，隨後分裝菌液於 125 ml 三角瓶中，添加五氯酚作為唯一碳源，塞上棉花塞，置於 30°C、120 rpm 下振盪培養，定時分析五氯酚及 pH 值的變化。

## 2.7 五氯酚對純種菌株之最高抑制濃度批次實驗

以無菌棉花棒將菌株由培養皿移入經滅菌且不同 pH 值之無機鹽液中，並以單光束分光光度計於波長 600 nm 下調整菌液吸光度值為 0.08~0.1，隨後分裝菌液於 125 ml 三角瓶中，添加 100、250、400、600 及 800 mg/l 不同濃度五氯酚(100 ~ 800 mg/l)作為碳源，塞上棉花塞，置於 30°C、120 rpm 下振盪培養，定時分析五氯酚、pH 及 O.D. 值的變化。

## 2.8 分析方法

### 2.8.1 五氯酚

五氯酚是以高效率液相層析儀(HPLC, Hitachi 日本)進行分析。操作條件如下：UV detector 之波長設定為 295 nm，使用之層析管柱為 Merck Lichrospher 100RP-18 endcapped (5  $\mu\text{m}$ )，Mobile phase 組成為  $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{H}_3\text{PO}_4 = 65 : 35 : 0.1$  (v/v)，流量為 0.8

ml/min。

### 2.8.2 pH 值

pH 值是以 pH-meter 進行監測，pH-meter 為 HAMA Instrument Corp H1 8418 型。

## 三、結果與討論

### 3.1 經馴化後分離之菌株鑑定及質體存在與否

以濃度 30 mg/l 之五氯酚馴化土壤中混合菌液達 3 個月後，經初步分析確認混合族群可以降解五氯酚後始進行分離[8]，首先以 NA 為培養基，將混合菌液作稀釋系列後，各取 0.1 ml 抹碟於培養基上於 30°C 下培養，結果分離出 10 株純種菌株，此 10 株菌株分別以 10 及 25 mg/l 兩種濃度五氯酚為單一碳源作批次測試以確認分離出之純種菌株是否能夠降解五氯酚，經測試 2 個月後，10 株菌株皆無法降解五氯酚。為將混合族群中可忍受低濃度五氯酚毒性但卻無降解五氯酚能力之菌株剔除，因此將馴化之五氯酚濃度提高至 100、200、300、600 及 800 mg/l，經五種濃度五氯酚馴化 3 個星期後，再以 NA 為培養基作分離，結果分離出 8 株純種菌株。經批次測試(五氯酚濃度為 10 及 30 mg/l 兩種)仍無降解五氯酚能力。故改用低限培養基(R2A)[9]作分離培養基，低限培養基(R2A)之成份(g/l)為 yeast extract : 0.5、Difco Proteose Peptone no.3 : 0.5、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 0.3、Casamino Acids : 0.5、Glucose : 0.5、Soluble starch : 0.5、Sodium pyruvate : 0.3、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O : 0.05、Agar : 15。將經高濃度五氯酚馴化之菌液抹碟於塗有濃度 40 mg/l 五氯酚之 R2A 上，結果分離出 13 株純種菌株，經批次測試(五氯酚濃度為 50 mg/l)發現菌株 PCP-1 有降解五氯酚之能力。

菌株 PCP-1 經 16S rDNA 序列鑑定方式得知為 *Sphingomonas chlorophenolica*。該菌株經由 QIAprep® Spin Miniprep Kit 操作，結果發現菌株體內並無質體的存在(結果未圖示)，顯示菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 去除五氯酚之基因是位於染色體上。

### 3.2 菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* (PCP-1) 最適生長溫度

圖 1 為菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 於不

同溫度下的生長情形，由圖中可知，菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 在以濃度 400 mg/l 之葡萄糖為基質時(圖 1A)，其最佳生長溫度為 28°C；當改用濃度 400 mg/l 之醋酸鈉作為基質時(圖 1B)，菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 最佳生長溫度則是 30°C。

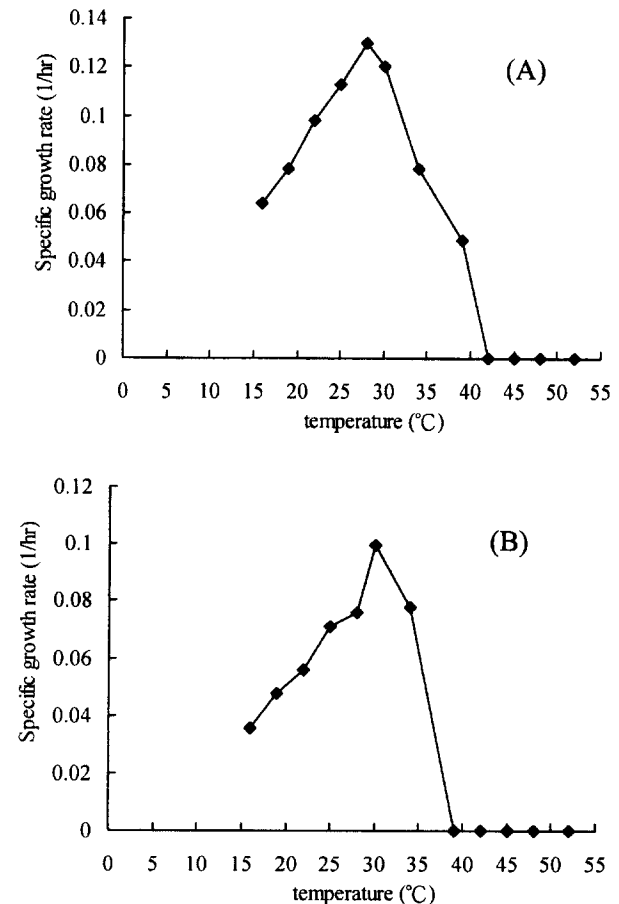


圖1 菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 於不同溫度下之比生長速率(A)以葡萄糖為基質 (B)以醋酸鈉為基質

### 3.3 菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 降解五氯酚之最適 pH 值

不同 pH 值下菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 對五氯酚的降解情形如圖 2 所示。實驗結果顯示菌株在 pH 值為 6.9 及 7.6 時有最佳降解五氯酚能力，且濃度 75 mg/l 之五氯酚皆可在 37 小時內降解完全；在 pH 值為 8.3 時，濃度 75 mg/l 之五氯酚降解可在 87 小時達完全降解；而在較高 pH 值 9.2 情況下，菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 於實驗終點對濃度 75

mg/l 之五氯酚有 90% 的去除率；在 pH 值較低時(5.2 及 6.0)，五氯酚則呈現沒有被降解的情形。由以上可知菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 降解五氯酚最佳的 pH 值介於 6.9 ~ 7.6 間，且在 pH 值偏鹼性的範圍生長良好並保有降解五氯酚之能力，但在環境偏酸性的情況下則無法降解五氯酚。菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 可在 pH 值較高情況下降解五氯酚可能由於菌株來源土樣之 pH 值屬偏鹼性，亦或顯示降解五氯酚的酵素在偏鹼性的環境下仍有活性，但在偏酸性環境下失去活性。

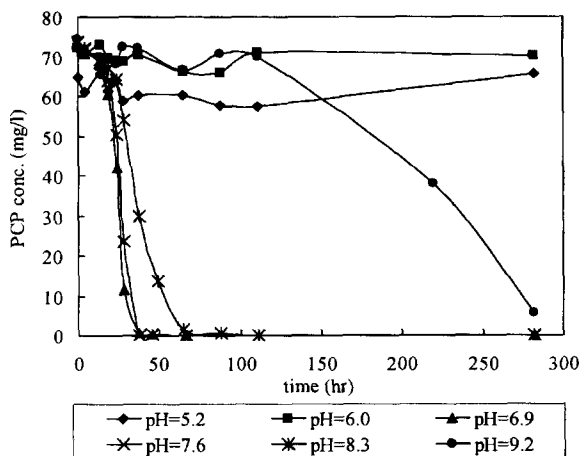


圖2 菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 於不同 pH 值下對濃度 75 mg/l 五氯酚之降解情形

### 3.4 五氯酚對純種菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 之最高抑制濃度

菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 對五種不同濃度(100、250、400、600、800 mg/l) 五氯酚之去除情形如圖 3 所示。結果顯示當五氯酚濃度為 100 mg/l 時，菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 在 25 小時可將五氯酚 100% 降解；添加濃度 250 mg/l 之五氯酚則可在 90 小時內達到完全降解；當添加濃度 400 mg/l 之五氯酚時，五氯酚在 110 小時達去除率 89%，之後便不再降解；當五氯酚濃度為 600 及 800 mg/l 之時，菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 則無法降解五氯酚。由以上可知，當五氯酚濃度高於 400 mg/l 時，菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 可能被高濃度五氯酚毒性抑制而無法降解。當五氯酚添加濃度為 400 mg/l 時，菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 無法將五氯酚完全降解之可能原因除五氯酚本身之毒性外，亦可能為五氯酚降解過程中產生之酸性產

物抑制菌株的活性使五氯酚不再被降解。此外，由圖 3 中亦發現隨著五氯酚起始濃度增高，菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 的遲滯期就越長，故推測此乃菌株體內適應不同濃度五氯酚所需時間不同。此外，在不同濃度五氯酚下菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 細胞乾重變化方面，以濃度 400 mg/l 五氯酚為基質生長之菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 細胞乾重變化幅度較以 100 mg/l 及 250 mg/l 五氯酚為基質生長之菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 細胞乾重變化幅度大(監測時間終止時(231 hr)，以 100 mg/l、250 mg/l 及 400 mg/l 五氯酚為基質生長之菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 細胞乾重分別為 0.01195 g、0.011198 g 及 0.019094 g)(結果未圖示)。此可能原因為菌株降解濃度 100 mg/l 及 250 mg/l 五氯酚時，因碳源不足導致菌株 O.D. 值沒有明顯變化或五氯酚降解後轉變成生物質量的量很少，因而降解低濃度時 O.D. 值變化不明顯。

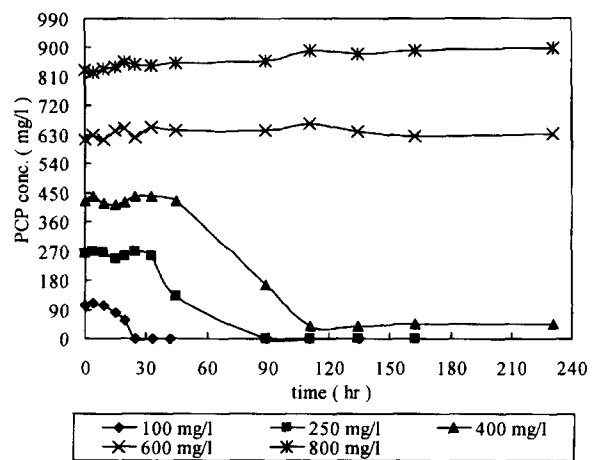


圖3 添加濃度 100、250、400、600 及 800 mg/l 五氯酚對菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 之降解情形

Radehaus 及 Schmidt[10]從受五氯酚污染之土壤分離出菌株 *Pseudomonas* sp.(RA2)能在 4 天內降解濃度 40 mg/l 之五氯酚達 95%，當五氯酚濃度為 150 mg/l 時，則在 8 天內達 97% 去除率，但當五氯酚濃度為 200 mg/l 時，菌株 *Pseudomonas* sp.(RA2)的生長則被五氯酚所抑制，且無法降解五氯酚。劉氏[11]利用受五氯酚污染之土樣所篩選出的五氯酚分解菌作五氯酚生物降解實驗，其結果在添加五氯酚為唯一基質時，

五氯酚分解菌可在 12 天完全去除 40 mg/l 的五氯酚；添加濃度 500 mg/l 葡萄糖與 40 mg/l 五氯酚時，微生物可在 10 天內將五氯酚降解完全。Rona 和 Ulrich[12] 植種 *Mycobacterium chlorophenicum*(PCP1) 和 *Sphingomonas chlorophenolica*(RA2) 兩菌株於含五氯酚濃度 30 mg/kg soil 的土壤中，結果發現植種 PCP1 的五氯酚礦化速率為 7 個月達 80%，而植種 RA2 可在 1 個月內達到 80% 礦化，比起未接種兩菌株的土樣需 7 個月方達到 80% 礦化，明顯發現植種 RA2 有益於五氯酚的快速降解。本研究分離出的菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 降解五氯酚濃度為 100 mg/l 時，可在 25 小時達 100% 降解；添加濃度 250 mg/l 之五氯酚時則可在 90 小時內達到完全降解；添加濃度 400 mg/l 之五氯酚時，五氯酚在 110 小時達去除率 89% (圖 3)。本研究分離出菌株能力較文獻為佳相信對於受污染水體中五氯酚的去除將有幫助。

#### 四、結 論

本實驗主要從受五氯酚污染之土壤中分離出五氯酚分解菌，並探討該分解菌的生理特性，希望進一步能對受五氯酚污染之土壤中五氯酚的去除有所助益。實驗結果顯示：

1. 取自受污染土樣中之菌液經五氯酚為單一基質馴化一段時間後分離出一株五氯酚分解菌 PCP-1，在經 16S rDNA 序列鑑定下，獲得菌名為 *Sphingomonas chlorophenolica*。
2. 菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 並不含有質體。
3. 菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 以葡萄糖濃度 400 mg/l 為基質時，其最佳生長溫度為 28°C；當改用濃度 400 mg/l 之醋酸鈉作為基質時，最佳生長溫度則是 30°C。
4. 菌株 *Sphingomonas chlorophenolica*，在 pH 值為 6.9 及 7.6 時有最佳降解五氯酚能力，濃度 75 mg/l 之五氯酚皆可在 37 小時內降解完全；在 pH 值為 8.3 時，濃度 75 mg/l 之五氯酚降解可在 87 小時達完全降解；而在較高 pH 值情況下，即 pH 為 9.2，菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 於實驗終點對濃度 75 mg/l 之五氯酚有 90% 的去除率；在 5.2 及 6.0 pH 值較低時，五氯酚則呈現沒有被降解的情形。

5. 不同五氯酚濃度對菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 抑制結果顯示在添加濃度 100 mg/l 五氯酚時，可在 25 小時達 100% 降解；添加濃度 250 mg/l 之五氯酚則可在 90 小時內達到完全降解；當添加濃度 400 mg/l 之五氯酚時，五氯酚在 110 小時達去除率 89%，之後便不再降解；添加較高濃度 600 及 800 mg/l 之五氯酚時，菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 則無法降解五氯酚。
6. 本研究分離出之菌株 *Sphingomonas chlorophenolica* 降解五氯酚能力較 Radehaus 及 Schmidt [10]、劉氏[11]與 Rona 與 Ulrich [12] 之研究菌株五氯酚降解能力佳。

#### 參考文獻

1. 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)。
2. 王俊欽，「固定化微生物對 2,4-二氯酚及 2,4,6-三氯酚之分解」，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(1994)。
3. Saleem A.M., Darwin L.S., Ronald C.S. and Judith L.S., "Pentachlorophenol and Phenanthrene Biodegradation in Creosote Contaminated Aquifer Material," *Chemosphere*, Vol. 37, No. 1, pp. 103-111 (1998).
4. Pignatello J.J., Martinson M.M., Steiert J.G., Carlson R.E. and Crawford R.L., "Biodegradation and Photolysis of Pentachlorophenol in Artificial Freshwater Streams," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 46, No. 5, pp. 1024-1031 (1983).
5. 葉玉雯，「比較索氏萃取法與超臨界萃取法對含萘及五氯酚土壤萃取之研究」，碩士論文，國立中興大學環境工程學研究所，台中(1999)。
6. Saber D.L. and Crawford R.L., "Isolation and Characterization of *Flavobacterium* Strains that Degrade Pentachlorophenol," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 50, No. 6, pp. 1512-1518 (1985).
7. 王俊欽，「以難分解化合物為基質之脫硝菌的分離及特性研究」，博士論文，國立中興大學環境工程

- 學研究所，台中(2001)。
8. 楊榮芳、李季眉，「降解五氯酚之混合族群的馴化及特性」，第二十六屆廢水處理技術研討會論文摘要集，台中，第 1-16 頁(2001)。
  9. Reasoner D.J. and Geldreich E.E., "A new Medium for the Enumeration and Subculture of Bacteria from Potable Water," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 49, No. 1, pp. 1-7 (1985).
  10. Radehaus P.M. and Schmidt S.K., "Characterization of a Novel *Pseudomonas* sp. That Mineralizes High Concentration of Pentachlorophenol," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 58, No. 9, pp. 2879-2885 (1992).
  11. 劉文愷、高志明、蔡啓堂、陳師慶、劉仲康，「利用生物處理法整治五氯酚污染之土壤／地下水」，第二十五屆廢水處理技術研討會論文集，雲林，第 951~955 頁 (2000)。
  12. Rona M. and Ulrich K., "Accelerated Mineralization of Pentachlorophenol in Soil upon Inoculation with *Mycobacterium Chlorophenicum* PCP1 and *Sphingomonas Chlorophenolica* RA2," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 62, No. 12, pp. 4361-4366 (1996).

論文收稿：91 年 3 月 28 日

論文修訂：91 年 4 月 23 日

論文接受：91 年 5 月 22 日