

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

以混合固定化菌株顆粒生物濾床同時分解甲苯及乙酸乙酯 混合廢氣之研究 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2221-E-216-020-
執行期間：95年08月01日至96年07月31日
執行單位：中華大學土木與工程資訊學系

計畫主持人：黃思蕓
共同主持人：張慧玫
計畫參與人員：碩士班研究生-兼任助理：蔡佳汝、何欣怡、黃千鳴

處理方式：本計畫涉及專利或其他智慧財產權，2年後可公開查詢

中華民國 96年11月01日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告
 期中進度報告

以混合固定化菌株顆粒生物濾床同時分解 甲苯及乙酸乙酯混合廢氣之研究

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 95-2211-E-216-020-

執行期間：95年8月1日至96年7月31日

計畫主持人：黃思蓊 教授

共同主持人：張慧玫 助理教授

計畫參與人員：蔡佳汝、何欣怡及黃千鳴

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：中華大學土木工程與工程資訊學系

中華民國 96 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

以混合固定化菌株顆粒生物濾床同時分解甲苯及乙酸乙酯混合廢氣之研究 Biofiltration of waste gases containing ethyl acetate and toluene using various strain PVA-immobilized cell beads

計畫編號：95-2211-E-216-020-

執行期限：95 年 8 月 1 日至 96 年 7 月 31 日

主持人：黃思蕓 教授 中華大學土木工程學系

共同主持人：張慧玫 助理教授 中華大學生物資訊學系

計畫參與人員：蔡佳汝、何欣怡及黃千鳴 中華大學土木與工程資訊學系

摘要

以懸浮菌液處理甲苯及乙酸乙酯混合物時，常遭遇到甲苯處理效率因乙酸乙酯的存在而受到抑制的問題。本研究以固定化技術區隔菌株，探討在混合菌株對甲苯及乙酸乙酯去除能力之變化。於同碳源比例的條件下，懸浮菌株隨著 T/E 比的增加，甲苯需要較長的降解時間，但懸浮菌株經固定化後，至少只有當 T/E 比為 16:16 時才無法完全分解。而乙酸乙酯的降解則因親水性容易被 PVA 所吸附，而使得處理效率獲得更進一步的提昇。於不同碳源比例的實驗中，各種不同組合的懸浮菌株經固定化處理後，可以避免族群競爭，有效提昇微生物降解甲苯與乙酸乙酯的能力。有關固定化對甲苯及乙酸乙酯去除機制之探討，於菌株 AC6 與菌株 B5 的組合上，當 T/E 比為 16:16 時，懸浮菌株經固定化後，純粹是因為甲苯本身濃度過高，造成基質抑制的加劇；而固定化的方式卻隔離原本有互助效果的組合，情況反而變得更差。在菌株 B5 與菌株 F1 的組合上，當 T/E 比為 16:16 時，懸浮菌株經固定化後，純粹是因為甲苯本身濃度過高，造成基質抑制的加劇；而固定化的方式能夠有效隔離共用相同基質的族群競爭。在菌株 AC6 與菌株 F1 的組合上，在 T/E 比為 12:12 時，有些微地改善，固定化的方式能夠有效隔離非相同基質（乙酸乙酯）的族群競爭。至於增加甲苯量對混合菌株分解乙酸乙酯的影響，菌株 B5 和菌株 F1 分解乙酸乙酯所需要的時間，在固定化之後，可以有效地改善其原先在懸浮狀態下分解時間嚴重或些微落後的現象，先前推論族群競爭的機制是正確的。

關鍵字：多重揮發性有機污染物、生物降解、甲苯、乙酸乙酯、固定化、族群競爭。

Abstract

Simultaneously treating ethyl acetate and

toluene mixed vapor gas often encounter a lower treatment efficiency of toluene due to the inhibition of ethyl acetate. In the study, the entrapment immobilization technique is employed to build a non-interfered microbial community structure to avoid the microbial competition for living space after uptake of substrate. In the organic loading test, longer time is required for degradation of toluene by the free cells as the concentration of toluene increase. Once the immobilization technique is adopted, we found only the case of T/E ratio of 16:16 had the problem to complete the toluene degradation. The high concentration of ethyl acetate has the same hydrophilic property of PVA, so it was absorbed into the PVA cell beads before metabolized by the bacteria. In the various T/E ratio test, the immobilization technique can avoid the microbial community competition, so the removal efficiency of ethyl acetate and toluene is improved significantly. In sight of the microbial degradation mechanism, immobilized strains AC6 and B5 or strains B5 and F1, encountering with the inhibition are caused by the high-concentration toxic effect when the T/E ratio is 16:16. Immobilized strains AC6 and B5 get rid of the original synergism effect, so the high removal efficiency in free cells couldn't be observed again. Immobilized strains B5 and F1 significantly improved the microbial competition of the same target compound of toluene. Something is still needed for clarified.

一、前言

國內有許多工廠的作業流程，常需使用到大量的揮發性有機溶劑，而這些有機溶劑或廢溶劑在使用中會產生揮發性有機化合物（volatile organic compounds, VOCs），若處理不當，則會直接的逸散、洩漏或經由煙道而排放至大氣環境中，對於環境與人體健康均會造成負面的影響。行政院環保署為了加強管制 VOCs 之排放，分別於民國 86 年 2 月及 88 年 1 月發佈『揮發性有機物空

氣污染管制及排放標準』與『半導體製造業空氣污染管制及排放標準』，以期達到 VOCs 排放減量之目標。

隨著 VOCs 的污染日益受到重視，發展經濟有效之 VOCs 控制技術已成為迫切必行的工作。對於 VOCs 廢氣而言，一般業者皆是採用物理-化學方法來處理，雖然短期的處理效果良好，但處理成本卻相對地高且可能會產生二次污染的問題。生物處理因具備低成本、高處理效率、節能且無二次污染問題等優點，最具發展潛力。

就噴塗業來說，其製程中所產生之廢氣以甲苯和乙酸乙酯為主，而甲苯和乙酸乙酯皆為高生物分解性之揮發性有機化合物，所以很適合用生物濾床來處理 (Deviny *et al.*, 1998)。然而，根據本實驗室先前的研究成果 (黃思蓁, 1997)，發現以填充泥炭土、堆肥、活性碳及稻穀混合濾料之生物濾床處理含二甲苯、甲苯及乙酸乙酯之噴塗業廢氣時，發現在高濃度乙酸乙酯存在下，甲苯與二甲苯之去除會受到抑制而導致處理效果大幅下降。為了了解甲苯和乙酸乙酯彼此間分解抑制的機制，本實驗室遂於往後的數年間投入不少人力，以純菌培養的方式來探討其生物降解抑制的機制，如李惠娟 (1999)、林晉成 (1999)、史孟燕 (2001) 等。彙整其成果，普遍發現各菌株皆會受到基質抑制的影響；若菌株生存在不受基質濃度影響的條件下，菌株 AC6 和菌株 B5 可形成互補的族群，前者的快速降解乙酸乙酯，可以促進後者對甲苯的降解。然而，菌株 TO3 則是易受到其他族群的競爭，而失去原本有效的甲苯降解能力。不過，以上有關族群競爭機制的判定，仍僅屬於推論的階段，更進一步的證據，可經由固定化包埋技術或基因族群鑑定的技術來獲得。

近年來的確有許多研究證實固定化技術具有保護菌體、穩定性高和防止菌體的流失等優點，因此推測可有效解決族群間的競爭問題。本研究遂利用 PVA 固定化技術包埋菌體，除全面性檢討各種操作條件外，並期盼能藉由菌株的分隔來維持原有的加乘效應，但卻可以降低族群間不良的競爭。

另外，固定化菌株顆粒的製作環境並非無菌的狀態，顆粒內存在其他菌種是可能的；若族群間數量的消長可以藉由分生技術來有效地加以鑑定並量測其活性，則可以提供族群競爭機制的直

接證據。為此，本研究亦嘗試自行設計引子，希望藉由 23SrRNA 末端各純菌株共有的保守區域之間剪裁出大小不一的特性段來加以利用，並作為各純菌株的區別判定依據。若此種方法可行，則可以有效監控環境間微生物族群間的消長，並依此證明族群間的消長亦有可能是因為接觸掠食所導致。

二、材料與方法

2-1 實驗藥品

本研究中將以 PVA (polyvinyl alcohol; 99.92% saponification and 2,000 degrees of polymerization) 固定化顆粒分別包埋能分解甲苯及乙酸乙酯的菌株，而 PVA 是由長春石化公司 (Chang Chun Petrochemical Co., Miaoli, Taiwan) 提供。菌種培養因新購的 F1 菌株，經 BCRC (Food Industry Research and Development Institute, Hsinchu, Taiwan) 建議而統一使用 NB 培養基；Beef extract (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis) 及 Peptone (USB Corporation, Cleveland)。

2-2 菌種

本研究所選定之菌株有三株，分別是(1) *Rhodococcus fascians* BCRC 17224 strain AC6；(2) *Rhodococcus sp.* BCRC 17223 strain B5；及(3) *Pseudomonas putida* ATCC 700007 strain F1。前二者，由國立中興大學環境工程學系 李季眉教授實驗室 (台灣省，台中市) 所提供，而菌株 F1，則是購自新竹市食品工業發展研究所菌種保存中心 (BCRC; Food Industry Research and Development Institute, Hsinchu, Taiwan)。根據先前的研究成果 (Hwang, *et al.*, 2003)，其中菌株 AC6 只會分解乙酸乙酯，但不會分解甲苯，最適生長溫度為 28.5°C。菌株 B5 不只會分解乙酸乙酯，同時也會分解甲苯，最適生長溫度為 24°C。而先前的菌株 TO3 因為長期保存後失效，只好經文獻蒐尋後選定菌株 F1 (Reardon, *et al.*, 2000) 來替代菌株 TO3。

2-3 菌株保存、活化與前培養

作為菌種 DNA 的 -78°C 低溫保存作法：取 2 ml 菌液，先離心後，去除上澄液，然後加入 Solution I (50 mM Glucose, 25 mM Tris Cl, 10 mM EDTA)，上下輕搖；接著重複先前步驟，分別加入 Solution

II (0.2 N NaOH, 1% SDS) 與 Solution III (Potassium Acetate, Glacial acetic, H₂O)。進一步離心後，取上澄液 1 ml，並加入 1 ml 酒精，上下輕搖以混合均勻，再離心一次以去除上澄液，靜置 10 分鐘後放入 -78 °C 冰箱保存。

活化：自滅菌釜取出一根經滅菌的 10ml 試管，內含 5ml 的活化培養基 (NB 培養基：3.0 g/L beef extract；5.0 g/L peptone,

http://www.teknova.com/plates/plates-additional_pg3.shtml)，俟其冷卻後，加入自繼代 (每月) 培養皿勾起來之完整顆粒菌落一顆，蓋上棉花塞，放入振盪培養箱於 28 °C、150 rpm 下培養 24 小時。在實驗期間，所選取的每一顆菌落大小須皆近似。前培養：取 10 ml 已活化之懸浮菌液接種至內含 100 ml LB 培養基的 500 ml 有溝槽之錐形瓶裡，在培養溫度為 28 °C，轉速為 150 rpm 下，震盪培養 24 小時。

搖瓶批式培養：活化完成之前培養菌液，在沒有特別說明下，以 20% (v/v) 的比例接種至 125 ml 的氣密瓶，內含 25 ml 試驗培養基，於 28 °C、150 rpm 震盪培養下以進行甲苯及乙酸乙酯的分解試驗。培養基組成如表 2-1 所示。試驗開始後，定時取樣測量菌重，分析氣相甲苯及乙酸乙酯的濃度、OD 值以及 pH 值大小。

2-3 PVA 固定化菌體顆粒製備方法

利用清華大學化學工程系陳國誠教授實驗室自行開發的 PVA 磷酸酯化法 (PVA 7.5%，菌體 2%) (Chen and Lin, 1994；陳國誠等，1993) 將甲苯及乙酸乙酯之分解菌株固定化。將定量的 PVA 加熱溶於水中，待其冷卻至室溫後，與一定比例之濃縮菌液均勻混合後滴入成形溶液中製備成固定化菌體顆粒。

2-4 菌量測定方法

懸浮菌體濃度之量測：菌體重測定方法採用濁度測定法，利用光學密度 (optical density, O.D.) 與細胞乾重之間存在一線性關係，根據此關係換算成菌體重而得知植種的菌體濃度。固定化顆粒內菌體濃度之測量：顆粒內菌體濃度的測定為利用蛋白質測定法，藉由蛋白質與菌體濃度的檢量線得知菌體濃度大小值。將由所測得顆粒中之蛋白質含量，對照蛋白質與菌體濃度之檢量線即可估算顆粒內菌體的含量大小，如圖 2-2、2-3 所示。

可得知於懸浮液中 AC6 菌體濃度為 0.14 g/L、B5 菌體濃度為 0.13 g/L、F1 菌體濃度為 0.0913 g/L、而固定化顆粒內菌體濃度分別為 AC6 的 0.4959 g/L、B5 的 0.305 g/L 及 F1 的 0.1172 g/L。

2-5 甲苯及乙酸乙酯分析方法

以氣密針筒抽取 0.5 ml 待測氣體樣品，注入氣相色層分析儀 (GC/FID；China Chromatograph GC8700F，中國層析，台北縣) 中，GC / FID 之操作條件，如表 2-2 所示。

2-6 搖瓶批次試驗

搖瓶批次實驗的主要內容，如圖 2-4 所示。針對多重污染物，於不同有機負荷或不同 T/E 比的條件下，進行不同的菌株或菌株組合的搖瓶批次培養 (於 28 °C、150 rpm 的震盪培養箱中進行)。

2-7 基因分析方法

2-7.1 DNA 抽取法

將已培養的菌種取 2ml 至離心管中，離心 8 分鐘、10,000 rpm 後去除上澄液，加入 100 μ l 的 Ice-cold solution I (含 50 mM Glucose 4.5g、25mM Tris, pH 8, 6.25 ml 2M、10 mM EDTA 10.0 ml 0.5M ddH₂O to 500ml) 輕微上下搖晃均勻。接著加入 200 μ l 的 Freshly prepared solution II (含 0.2N NaOH 10.0 ml 10 N or 100 ml 2 M NaOH、1.0% SDS 25ml 20% 100 μ l 10% SDS、ddH₂O to 500ml 800 μ l H₂O to 1 ml) 輕微上下搖晃均勻。然後加入 150 μ l 的 Ice-cold solution III (含 3M K 147g KAc、5M acetate 68ml glacial acetic acid ddH₂O to 500ml) 輕微上下搖晃均勻，離心 10000rpm、5 分鐘，抽取上澄液至新的 1.5 ml 的離心管。接著加入 1ml 酒精輕微上下搖晃均勻再去離心 10000rpm、5 分鐘，去除上澄液 (抽乾淨) 後靜置風乾 10 分鐘左右即可收至 -80 °C 冰箱中保存。

2-7.2 引子製作

於 National Center for Biotechnology Information (NCBI 基因網站) 搜尋 *Pseudomonas Pseudo* 菌種、*Rhodococcus fasci* 菌種的 5S、16S、23S rRNA 基因序列，接著在 BLAST 2 SEQUENCES 找出以 x 軸 (*Pseudomonas Pseudo*)、

Y 軸 (*Rhodococcus fasci*) 所對應出來的空間段。放大此空間段並搜尋出此空間段的邊界點並設定出頭尾兩端的兩個新序列 (假設為 P1、P2)，將 P1、P2 分別與原始的 *Pseudomonas Pseudo*、*Rhodococcus fasci* 菌種的 5S、16S 23S rRNA 基因序列對應至相同區域上，分別選取出在 *Pseudomonas Pseudo* 序列與 *Rhodococcus fasci* 序列中 P1 至 P2 的序列段。

將此二段序列紀錄儲存於 SDSC Biology WorkBench 3.2 版本中並進行 CLUSTALW Multiple Sequence Alignment 的比對出有相同連續 20 個基因序列處進行七項鑑定作業，項目如下：
(1) 此序列必須是連續 20 個 (2) GC% (3) Nucleotide- Nucleotide Blast(4) 是否有 Hairpin(5) 是否有 Homodimer (6) 是否有 Heterodimer (7) 將此序列分別與 *Pseudomonas Pseudo* 序列、*Rhodococcus fasci* 序列作正向與反向的比對 Homodimer、Heterodimer，鑑定無誤之後正式命名為 TCJ1、TCJ2 兩段新引子並送至生物科技技術公司進行製作引子。

接著配製 200 ml 的 T₁E₁₀(Tris:1mM、EDTA:10mM) 作為純化 DNA 所需的試藥，經滅菌後取 500μl 的 T₁E₁₀ 加入原先於實驗中所抽取出來的 AC6、B5、F1 之 DNA 並置於室溫中 10 分鐘，再以 Vortex 將離心管混合均勻，另外再配製一組以 Phenoy: Chloroform = 25ml: 25ml 的藥品後取 500μl 加入於上述的離心管中以 Vortex 上下混合均勻 10 秒後離心 3~5 分鐘、10000rpm，取上澄液 (為 DNA 的部份) 至於新的 1.5 ml 的離心管中重複上述步驟三次後，將最後剩餘約 500μl 的 DNA 加入 95% 的酒精到滿為止並輕微上下混合均勻。

然後放入 -20°C 中 1 小時使 DNA 沉澱再去離心 3~5 分鐘、10000rpm，去除上澄液之酒精後風乾 10 分鐘左右再加入 20μl 的 T₁E₁₀ 保存 (-20°C)，將已純化之 DNA 與製作好的新引子 TCJ1、TCJ2 搭配進行 (PCR) 的分析可得知其結果。

2-7.3 聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase Chain

Reaction)

配製反應液於 100μl 的離心管中 (含 TCJ1:2μl、TCJ2:2μl、dNTP:2μl、Reaction buffer 10x:10μl、DMSO:10μl、Taq DNA Polymerase:4μl、ddH₂O:70μl) 混合均勻後分別取 25μl 於新的離心管中 (編號為 1.2.3.4)，於編號 2.3.4 中分別加入 1μl 的 AC6 DNA、B5 DNA、F1 DNA，混合均勻後以離心機離心 6000rpm、10 秒使之沉澱，將四根離心管置於 PCR 儀器中設定為 95°C、5 分鐘；51.8°C、30 秒；72°C、1 分鐘；95°C、30 秒；51.8°C、30 秒；72°C、10 分鐘；8°C、10 分鐘，執行完後分別將 4 管離心管取 5μl 並再添加 1μl 的 dye，以及一管 marker (含 3μl 的 marker、1μl 的 dye)，分別編號為 1.2.3.4.5，混合均勻後分別取 6μl 於電泳膠片 (含 2% Agarose、1x TAE、ETBr 10μl、100ml RO 水) 中以 100V 的電流跑膠約 30 分鐘，最後置於紫外燈暗箱中拍照保存並分析，如圖 2-5 所示。

三、結果與討論

3-1 微生物的特性

本實驗所使用的菌種包括：菌株 AC6、菌株 B5 及菌株 F1 皆是好氧性細菌，有關三種懸浮菌株 (AC6、B5 及 F1) 對個別污染物甲苯或乙酸乙酯的利用能力測試結果，如圖 3-1 所示。由圖中得知，就甲苯而言，菌株 B5 的分解能力較菌株 F1 為佳；其到達完全分解所需的時間平均值約為 7 小時，較菌株 F1 的 10 小時左右為佳。就乙酸乙酯而言，菌株 AC6 的分解能力與菌株 B5 相當，但是當乙酸乙酯濃度從 4μl 增加到 8μl 的添加量時 (25 ml of medium)，菌株 AC6 則明顯較佳 (data not shown)。另外，純菌株經固定化包埋後，所測得的乙酸乙酯初始濃度明顯較低，由此可見固定化包埋顆粒對於部份親水性揮發性有機化合物具有吸附能力。根據李惠娟 (2000) 的研究設計得知，其所使用的菌株 TO3 具有較菌株 B5 為佳的甲苯降解能力，其表現明顯與本實驗所採用的菌株 F1 不同。基於菌株 TO3 已不復得之，且菌株 F1 具有 TO3 無法降解乙酸乙酯之性質，而必須以菌株 F1 取代之，便於未來族群競爭之研究。

3-1.1 懸浮菌株分解多重污染物的環境因子探討

一、不同培養基體積與植種量的影響

由於揮發性有機化合物具揮發性，必須在密閉的搖瓶中進行實驗，對好氧菌而言，最重要的環境因子，莫過於溶氧的供應量是否充足。為了證明本實驗之設計可以提供足夠的氧氣，除了最後的溶氧測定化，並以可同時分解甲苯及乙酸乙酯的菌株 B5 作代表，在不同培養液體積下 (25 或 50 ml)，注入 4- μ l 甲苯或是乙酸乙酯的去除情形，探討其降解揮發性有機化合物的能力 (data not shown)。發現當培養液體積加大一倍時，並沒有獲得增加溶解度的益處，卻同步減慢兩種揮發性有機化合物的處理時間達三倍，且呈現隨著時間的增長而產生較多的菌量，說明菌種仍然持續生長。因此推論增加培養液體積而分解減緩的現象應該是由於溶氧的不足又被稀釋所導致。

而且就揮發性有機化合物的降解情形來看，當空間較小，溶氧不足的條件下 (50 ml 時)，過多的菌株也會造成溶氧需求的競爭而顯得不足，最後呈現紛歧的狀況。李惠娟 (2000) 所使用的培養液體積與血清瓶體積的比即 25/125=1/5，與微生物課本建議的 1/10 略高，但為了維持與過去相同的基準，往後的實驗皆是以 25 ml 來進行。

至於在不同接菌量對分解甲苯及乙酸乙酯的情形，除菌株 F1 為外，當植種飽和菌株的植種量達 15% (v/v) 以上，不論對於甲苯或乙酸乙酯，其分解情形也呈現飽和的狀態。然而，因為菌株 F1 的最佳植種量在 20%，因此往後的實驗皆採用 20% 的植種率。

二、不同酸鹼度的影響

若以甲苯的代謝情形作判斷，菌株 B5 的培養條件—pH 在 7-8.5 之間最佳；而菌株 F1 卻是在 4-5.5 之間，但是差距不大。根據李惠娟 (2000) 的研究成果，也是以 pH 7 的條件為最佳，所以往後的實驗皆是 pH 7 的條件來進行。

三、不同溫度的影響

在培養溫度上，每一株菌的表現不盡相同，以菌株 AC6 來看，其分解乙酸乙酯的最佳溫度在 15-25 °C 之間；以菌株 B5 來看，對分解乙酸乙酯而言，最佳的溫度在 25 °C，而對分解甲苯而言，則是 15-25 °C 之間；以菌株 F1 來看，其最佳溫度

在 25-30 °C 之間，與前二株菌比較，溫度明顯偏高。基於考慮到未來於環境上的應用，以及實驗室上的環境溫度，而決定以 28 °C 做為實驗進行的溫度。

3-1.2 固定化菌株分解多重污染物的環境因子探討

一、不同接菌量的影響

為了了解懸浮菌株經固定化後的微生物特性，必須依懸浮菌株實驗的條件，來進行探討與比較。首先，將已經馴養且內部菌量已達飽和的 PVA 固定化菌體顆粒置入含 2 μ l 甲苯 (或乙酸乙酯) 與 25 ml 無機培養基之血清瓶中。由圖 3-6 得知，當植種固定化菌體顆粒的植種量達 15% (w/w) 以上，對於甲苯的分解而言，其分解情形呈現逐步達到飽和的狀態；對於乙酸乙酯，則任何植種比率皆可以達到最佳的去除效率。不過基於之前於懸浮實驗，採用 20% 的植種。因此往後的實驗皆一併採用 20% 的植種率。

比較懸浮與固定化後的情形發現，懸浮菌株經固定後，甲苯達到完全分解所需要的時間明顯增長，從菌株 F1 或菌株 B5 的 6-9 小時 (懸浮的)，延長到菌株 F1 的 12-16 小時，菌株 B5 的 8-14 小時 (固定化的)。菌株 F1 受到的影響較大，若非在高植種比時，懸浮於水中的菌體量微增加 (data not shown)，促使反應加快，否則情況會更惡化。但對乙酸乙酯而言，任何菌株皆不太受到影響。因此，推論親水性的固定化材質—PVA，會增加疏水性甲苯擴散進入的阻力，而親水性的乙酸乙酯則無此問題。

二、不同酸鹼度的影響

如圖 3-7 所示，從乙酸乙酯的代謝情形並無法有效讀取其最佳酸鹼度值。若以甲苯的代謝情形作判斷，菌株 B5 的培養條件—pH 在 7 最佳；而菌株 F1 卻是在 4-8.5 之間；菌株 B5 明顯較菌株 F1 敏感。根據李惠娟 (2000) 的研究成果，也是以 pH 7 的條件為最佳，所以往後的實驗皆是以 pH 為 7 的條件來進行。比較懸浮與固定化後的情形發現，懸浮菌株經固定化，明顯改善其對甲苯的去除效率。固定化後的菌株 F1 只需 10 小時，而菌株 B5 只需 6 小時，即可以接近完全反應，改善效率約提前 2 小時。經量測反應後的 pH 值 (data not shown) 得知，原先懸浮所達到的 pH 4 並沒有

發生，絕大數的實驗皆在微生物可以生存的 pH>5 的範圍下進行，所以整個甲苯的分解趨勢差異不大。

三、不同溫度的影響

如圖 3-8 所示，在培養溫度上，每一株菌的表現大致相同，以菌株 AC6 來看，其分解乙酸乙酯的最佳溫度在 15-35 °C 之間；以菌株 B5 來看，對分解乙酸乙酯而言，最佳的溫度在 15-30 °C，而對分解甲苯而言，則是 15-30 °C 之間；以菌株 F1 來看，其最佳溫度在 15-30 °C 之間。配合懸浮性以 28°C 作為實驗進行的溫度，往後實驗仍以該溫度來進行。比較懸浮與固定化後的情形發現，純菌株經固定化後呈現兩極的效果。對甲苯而言，增加溫度到 35 °C 以上會造成菌株 F1 或菌株 B5 無法完全分解甲苯；相反之，增加溫度卻促進乙酸乙酯的分解時間，由菌株 B5 原先的 8 小時，減少到 2 小時；而菌株 AC6 從原有的 2-10 小時，減少到 2-4 小時。由此可見，升溫對疏水性甲苯的擴散進入是不利的，而對親水性的乙酸乙酯卻是有利的，尤其是對菌株 B5。

3-2 單一菌株對甲苯及乙酸乙酯去除能力之批次實驗

單一菌株對甲苯及乙酸乙酯混合物的去除能力是往後混合菌株實驗的基礎，唯有先建立單一菌株的能力，方能得知各菌株混合之後的情形是否有所不同。而先前發現當甲苯及乙酸乙酯的負荷增加時，每一種菌株分解有機物所需的時間都明顯增加，倘若增加的時間不成比例，即可能會有基質抑制的情形發生。本研究的目的乃為了確知族群間是否存在直接的競爭情形，如爭食基質或是互補性地利用基質，因此實驗的設計，已經加強溶液的緩衝能力，並在最佳的生長條件下進行。目前唯一要控制的是 T/E 比的變化，例如等比例的增加 T/E 比、增加 E 的比例或是增加 T 的比例，這可以了解甲苯或乙酸乙酯的負荷在臨界值時，族群間的競爭情形。

根據過去本實驗室的研究成果，當甲苯和乙酸乙酯的個別濃度達到 40 μ L，則甲苯和乙酸乙酯的濃度都會累積下來；若甲苯和乙酸乙酯以混合進料的方式進行實驗，則當甲苯的濃度達到 8 μ L 時其濃度就會累積。因此，當增加 E 時，T 則有 4 μ L 與 8 μ L 二種情形；同理，當 T 增加時，E 則有 4 μ L

與 8 μ L 二種情形。

3-2.1 同碳源比例的影響

一、懸浮性菌株的表現

由圖 3-9 得知，隨著 T/E 比的增加（從 2:2 到 16:16），不論是甲苯或是乙酸乙酯皆需要較長的降解時間，尤其是甲苯所需的降解時間呈現約等間距的增加（data not shown）。若以菌種來看，菌株 AC6 僅在 16:16 時才會造成降解時間的增加；反觀菌株 B5，超過 4:4 即無法在 2 小時內完成。這結果與先前的推論相同，菌株 AC6 具適合分解高濃度的乙酸乙酯。至於只能降解甲苯的菌株 F1，其表現與菌株 B5 相當，但開始時甲苯濃度較菌株 B5 下降快，可見沒有基質抑制的效應，所以反應速率較快。而且比較懸浮菌株 F1 的 OD 值較菌株 B5 來得高（data not shown）。

二、固定化菌體顆粒的表現

將已經馴養且內部菌量已達飽和的 PVA 固定化菌體顆粒置入含 25 ml 無機培養基之血清瓶中，其內注入各種等比例的揮發性有機化合物，如圖 3-10 所示。比較懸浮與固定化後的情形發現，隨著碳源濃度的增加，使用菌株 B5，乙酸乙酯的降解有明顯促進的跡象。然而，對甲苯而言，經固定化處理後，卻造成高等比例 T/E 比（8:8 以上）的反應受到嚴重抑制，從原有的 10-18 小時，增加到 16-24 小時。基於 PVA 的屬性親水，研判乙酸乙酯乃因親水性，容易被 PVA 所吸附，而使得處理效率獲得更進一步的提昇；反之，甲苯則有不利的影響。

3-2.2 不同碳源比例的影響

一、懸浮性菌株的表現

如圖 3-11 所示，隨著 T/E 比的改變，對於菌株 AC6 而言，增加乙酸乙酯到 16:16，仍然可以在 2 小時內完全分解；反觀菌株 B5，T/E 比超過 4:4 後，隨 T/E 比增加而增加。這結果與先前的推論相同，菌株 AC6 具有較高的乙酸乙酯分解能力；而菌株 B5 卻因為同時兼顧甲苯的降解，而受到影響。對於菌株 F1 而言，由於甲苯一直都是維持 4 μ l 的添加量，所以只能降解甲苯的菌株 F1 表現地與乙酸乙酯的增量無關；反觀菌株 B5 而言，卻因為乙酸乙酯的增加而逐漸延長，若加以考慮酸鹼度，發現並無中間產物所造成的酸化現象。因為本實驗中大幅增加緩衝強度而使得酸鹼度維持在中性，

顯見基質抑制的效應已經獲得證實。

二、固定化菌體顆粒的表現

將已經馴養且內部菌量已達飽和的 PVA 固定化菌體顆粒置入含 25 ml 無機培養基之血清瓶中，其內注入各種等比例 (T/E 比: 4:0、4:4、4:8、4:12、4:16) 的揮發性有機化合物，如圖 3-12 所示。比較懸浮與固定化後的情形發現，對乙酸乙酯而言，懸浮菌株經固定化處理後對於乙酸乙酯的分解有明顯的改善效果，尤其是菌株 B5 的變化最大。至於對甲苯而言，則發現懸浮菌株經固定化處理後，會使反應速率變快。菌株 B5 降解甲苯的時間由最快的 10 小時提昇到 6 小時；而菌株 F1 降解甲苯的時間也由原來最快的 10 小時，提昇到 8 小時。以上證據顯示，當沒有族群競爭時，懸浮菌株經固定化處理後，有效吸附親水性的乙酸乙酯，可以有效提昇微生物降解甲苯與乙酸乙酯混合廢氣的能力，尤其適合乙酸乙酯的濃度明顯高於甲苯的情況。

3-3 混合菌株對甲苯及乙酸乙酯去除能力之批次實驗

在完成單一菌株對甲苯及乙酸乙酯混合化合物的降解能力後，接著將各單一菌株兩兩配對，使得各種組合 (菌株 AC6+菌株 B5；菌株 B5+菌株 F1；菌株 AC6+菌株 F1) 皆有能同時處理甲苯及乙酸乙酯。另外，基於之前已對各菌株的植種量進行實驗，發現只要菌量植種比達 15-20% 以上，微生物降解甲苯或乙酸乙酯的能力即達到飽和。因此，本實驗有別於過去李惠娟 (2000) 之作法，擬採取添加等量菌種的作法，直接比較懸浮菌株經固定化後，是否會改變各菌株間競爭的情形。

3-3.1 同碳源比例的影響

一、懸浮性菌株的表現

如圖 3-13 所示，隨著等比例 T/E 比的增加，甲苯需要較長的降解時間，如同單一菌株時呈現約等間距的增加，但卻在高等比例時無法完全分解，族群間的抑制效應於焉發生。若以菌種組合來看乙酸乙酯的分解，只要有菌株 AC6 的加入，即使 T/E 比達 16:16 也可以在 4 小時內完成分解。反觀菌株 B5+菌株 F1 的組合，超過 4:4 即無法在 2 小時內完成，且隨 T/E 比增加而逐步增高。這結果與先前的推論相同，菌株 B5 對於乙酸乙酯的分

解能力沒有菌株 AC6 來得好，而菌株 F1 又無能為力。

至於甲苯的分解情形，發現不論是那一種組合，只要 T/E 比達 8:8 以上，就有可能無法將甲苯與乙酸乙酯完全分解。而且，同樣具有降解甲苯的菌株 B5 和菌株 F1 的表現最差，由此可見微生物利用相同基質時的競爭情形是相當嚴重的。這現象亦可比較混合菌株 (圖 3-13) 與單一菌株 (圖 3-9) 的表現中發現，甲苯及乙酸乙酯的分解還是受到明顯的抑制。

二、固定化菌體顆粒的表現

如圖 3-14 所示，比較懸浮與固定化後的情形發現，隨著 T/E 比的增加，甲苯需要較長的降解時間，但懸浮菌株經固定化後，至少只有當 T/E 比為 16:16 時才無法完全分解。與先前 T/E 比為 8:8 即無法分解，明顯改善很多。若再將混合固定化顆粒 (圖 3-14) 與單一懸浮菌株 (圖 3-9) 作比較，仍然無法達到沒有族群間問題出現時的表現。儘管如此，懸浮菌株經固定化後，對乙酸乙酯的降解則是全面性的提昇。如先前所述，研判乙酸乙酯乃因親水性，容易被 PVA 所吸附，而使得處理效率獲得更進一步的提昇。

3-3.2 不同碳源比例的影響

一、懸浮性菌株的表現

如圖 3-15 所示，當甲苯濃度固定時，只有菌株 AC6 和菌株 B5 的組合不會因乙酸乙酯的增加而影響到甲苯的降解時間；反之，只要有菌株 F1 在的組合，皆需要較長的降解時間，尤其是與共用甲苯基質的菌株 B5 在同一組合時的情形會更嚴重。由此可見，菌株 F1 容易受到族群間因競爭非共同基質所需的溶氧 (菌株 AC6+菌株 F1) 或共同基質 (菌株 B5+菌株 F1) 而產生的族群競爭；相對而言，(菌株 AC6+菌株 B5) 則有互利共生的情形發生。這現象與李惠娟 (2000) 先前所使用的菌株 TO3 的表現非常類似。

至於乙酸乙酯的利用，若以菌種組合來看乙酸乙酯的分解，發現只要有菌株 AC6 的參加，即使 T/E 比達 16:16 也可以在 4 小時內完成分解。反觀菌株 B5+菌株 F1 的組合，需要 8 小時才能降解完全，且隨 T/E 比增加而逐步增高。這結果與先前的推論相同，菌株 B5 對於乙酸乙酯的分解能力沒有菌株 AC6 來得好，而菌株 F1 又無能為力。

以上這現象亦可比較混合菌株（圖 3-15）與單一菌株（圖 3-11）的表現中發現，甲苯及乙酸乙酯的分解的確受到明顯的抑制。

二、固定化菌體顆粒的表現

由圖 3-16 得知，對乙酸乙酯而言，懸浮混合菌株經固定化處理後對於乙酸乙酯的分解有明顯的改善效果，尤其是菌株 B5+菌株 F1 的組合的變化最大，大幅改善原先會隨著乙酸乙酯的增加而需要較長降解時間的問題。至於對甲苯而言，則發現懸浮菌株經固定化處理後，會使反應速率變快，且針對所有的菌株組合而言，降解甲苯所需的時間明顯變少，但卻隨乙酸乙酯的添加量的減少而有更好的效果。菌株 AC6+菌株 B5 的組合降解甲苯的時間由最快的 12 小時提昇到 6 小時；而菌株 B5+菌株 F1 的組合降解甲苯的時間由最快的 10 小時提昇到 6 小時；菌株 AC6+菌株 F1 的組合降解甲苯的時間由最慢的 14 小時提昇到 12 小時，改善最小。

3-4 固定化對甲苯及乙酸乙酯去除機制之探討

為了進一步確認混合菌株在較高等比例的 T/E 比時，無法完全分解甲苯的原因，以及固定化後又無法完全改善的原因。特地選在 T/E 比為 12:12（固定化後有改善）及 16:16（固定化後沒改善）的條件下，針對上述三種菌株的組合，重覆進行三次以上的實驗（data not shown），以確認溶氧、pH 及 OD 的逐時變化皆為正確，並萃取出基因保存，以利後續之分析。

3-4.1 菌株 AC6 與菌株 B5 的組合

在 T/E 比為 16:16 時，懸浮菌株經固定化後，反而造成甲苯降解的更少；在 T/E 比為 12:12 時，頂多只與懸浮菌株時相當。這結果與先前的懸浮菌株組合（圖 3-13）和混合固定化顆粒（圖 3-14）的情況相同，固定化並無法使高等比例 T/E 比的甲苯降解效果獲得改善。在觀察其他分析條件後，發現 pH 也沒有問題，應該沒有中間產物的干擾，而溶氧與菌量都維持一定水準，故認為當 T/E 比為 16:16 時，純粹是因為甲苯本身濃度過高，造成基質抑制的加劇；而固定化的方式卻隔離原本有互助效果的組合，情況反而變得更差。

3-4.2 菌株 B5 與菌株 F1 的組合

在 T/E 比為 16:16 時，懸浮菌株經固定化後，

沒有幫助甲苯的降解；但在 T/E 比為 12:12 時，卻是明顯地改善。這結果與先前的懸浮菌株組合（圖 3-13）和混合固定化顆粒（圖 3-14）的情況相同，固定化使共用甲苯為基質的菌株組合，獲得大幅的改善，而在 T/E 比為 16:16 時，仍無改善。在觀察其他分析條件後，認為當 T/E 比為 16:16 時，純粹是因為甲苯本身濃度過高，造成基質抑制的加劇；而固定化的方式能夠有效隔離共用相同基質的族群競爭。

3-4.3 菌株 AC6 與菌株 F1 的組合

在 T/E 比為 16:16 時，懸浮菌株經固定化後，沒有幫助甲苯的降解；但在 T/E 比為 12:12 時，卻是些微地改善。這結果與先前的懸浮菌株組合（圖 3-13）和混合固定化顆粒（圖 3-14）的情況相同，固定化使共用非相同基質（乙酸乙酯）的菌株組合，獲得大幅的改善，而在 T/E 比為 16:16 時，仍無改善。在觀察其他分析條件後，認為當 T/E 比為 16:16 時，純粹是因為甲苯本身濃度過高，造成基質抑制的加劇；而固定化的方式能夠有效隔離共用非相同基質的族群競爭。

四、結論

以懸浮菌液處理甲苯及乙酸乙酯混合物時，常遭遇到甲苯處理效率因乙酸乙酯的存在而受到抑制的問題。今利用固定化技術將懸浮菌體包埋後，發現可以提昇甲苯與乙酸乙酯之去除能力。其結果整理歸納如下：

1. 混合菌株對甲苯及乙酸乙酯去除能力之批次實驗
 - (1) 於同碳源比例的實驗中，發現隨著 T/E 比的增加，甲苯需要較長的降解時間，但懸浮菌株經固定化後，至少只有當 T/E 比為 16:16 時才無法完全分解。而乙酸乙酯的降解則因親水性容易被 PVA 所吸附，而使得處理效率獲得更進一步的提昇。
 - (2) 在不同碳源比例的實驗中，各種不同組合的懸浮菌株經固定化處理後，可以避免族群競爭，有效提昇微生物降解甲苯與乙酸乙酯的能力。
2. 固定化對甲苯及乙酸乙酯去除機制之探討
 - (1) 於菌株 AC6 與菌株 B5 的組合上，當 T/E 比為 16:16 時，懸浮菌株經固定化後，純

粹是因為甲苯本身濃度過高，造成基質抑制的加劇；而固定化的方式卻隔離原本有互助效果的組合，情況反而變得更差。

- (2) 在菌株 B5 與菌株 F1 的組合上，當 T/E 比為 16:16 時，懸浮菌株經固定化後，純粹是因為甲苯本身濃度過高，造成基質抑制的加劇；而固定化的方式能夠有效隔離共用相同基質的族群競爭。
 - (3) 在菌株 AC6 與菌株 F1 的組合上，在 T/E 比為 12:12 時，有些微地改善，固定化的方式能夠有效隔離非相同基質（乙酸乙酯）的族群競爭。
3. 增加甲苯量對混合菌株分解乙酸乙酯的影響
菌株 B5 和菌株 F1 分解乙酸乙酯所需要的時間，在固定化之後，可以有效地改善其原先在懸浮狀態下分解時間嚴重或些微落後的現象，先前推論族群競爭的機制是正確的。

參考文獻

- 史孟燕，2002，應用純菌 (*Rhodococcus sp.* & *Rhodococcus fascians*) 生物濾床處理含甲苯及乙酸乙酯混合廢氣之研究”，中華大學土木工程研究所碩士論文，台灣新竹。
- 李惠娟，2000，生物濾床中甲苯及乙酸乙酯基質

抑制效應之研究，國立中興大學環境工程研究所碩士論文，台灣台中。

- 林晉成，2000，以純菌 (*Pseudomonas putida* & *Rhodococcus sp.*) 生物濾床處理含甲苯及乙酸乙酯混合廢氣之研究，中華大學土木工程研究所碩士論文，台灣新竹。

陳國誠、林瑩峰，1993，聚乙烯醇微生物或酵素固定化擔體之製法及其應用，中華民國專利發明第 60729 號，民國 82 年 2 月。

黃思蕁，1997，應用生物濾床處理噴塗業含 BTEX 有機廢氣之研究，中國技術服務社八十六年度計畫委外執行成果報告。

Chen KC, Lin YF (1994) Immobilization of microorganisms or enzymes in polyvinyl alcohol beads. US Patent: 5290693.

Devanny JS, Deshusses MA, Webster TS (1998) Biofiltration for air pollution control. Lewis Publishers.

Reardon KF, Mosteller DC, Bull Rogers JD (2000) Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for *pseudomonas putida* F1. Vol.69(4): 385-400.

附 錄

Table 2-1. HCMM2 成份表 (Ridgway *et al.*, 1990)

成份	濃度	藥品
KH_2PO_4	1.36	SIGMA
Na_2HPO_4	1.42	島久藥品
KNO_3	0.50	MERCK
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.38	聯工試藥
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05	和光試藥
CaCl_2	0.01	聯工試藥
H_3BO_3	2.86	和光試藥
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.54	MERCK
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	3.53	MERCK
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.039	島久藥品
ZnCl_2	0.021	MERCK
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.041	聯工試藥
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025	島久藥品

Table 2-2. 有機氣體分析之設備與操作條件

氣相層析儀型號	CHINA CHROMATOGRAPHY GC8700F
管柱規格	J&W, DB-5 Fused Silica Capillary Column, 30m, 0.53mm ID, 5.0 μm film thickness; -60~260/280 $^{\circ}\text{C}$ 操作溫度
Detector	FID
FID Temp	230 $^{\circ}\text{C}$
Injector Temp	210 $^{\circ}\text{C}$
Oven Temp	120 $^{\circ}\text{C}$
Carrier Gas	N_2
Sample Injector Loop Quantity	Gas sample : 0.5 ml

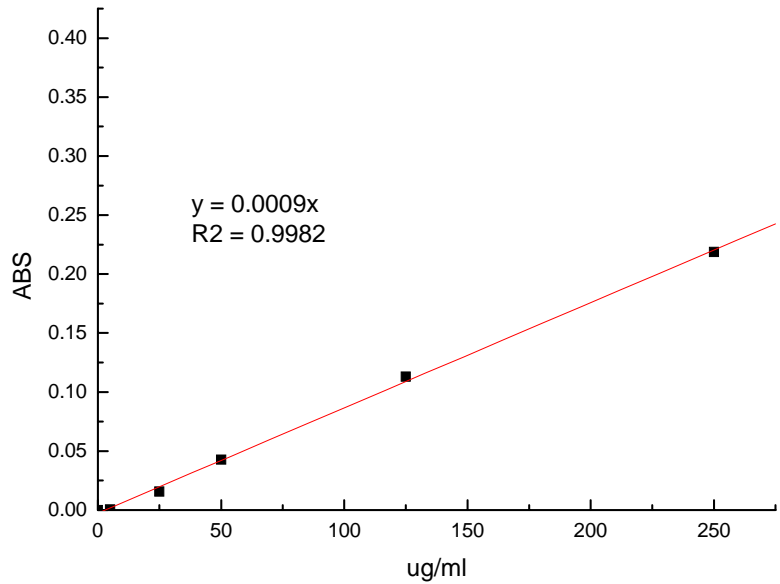


Figure 2-2. 蛋白質與菌體濃度之檢量線(固定化)

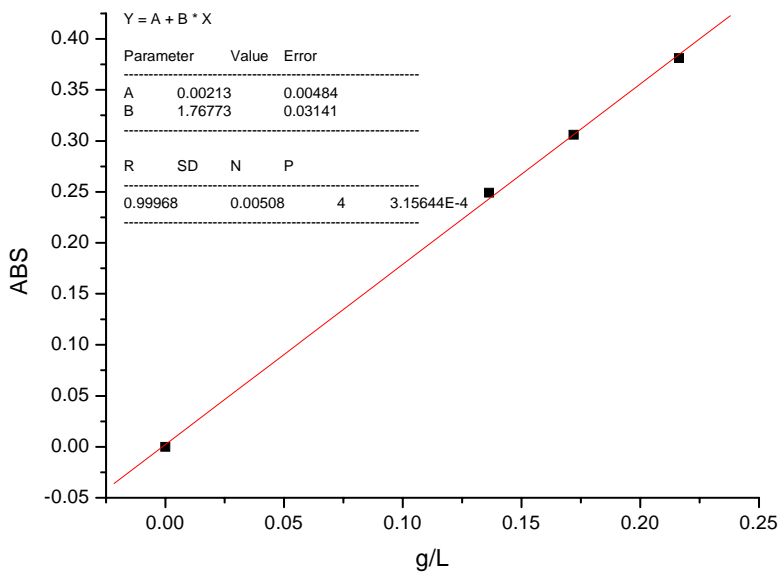


Figure 2-3. 蛋白質與菌體濃度之檢量線(懸浮)

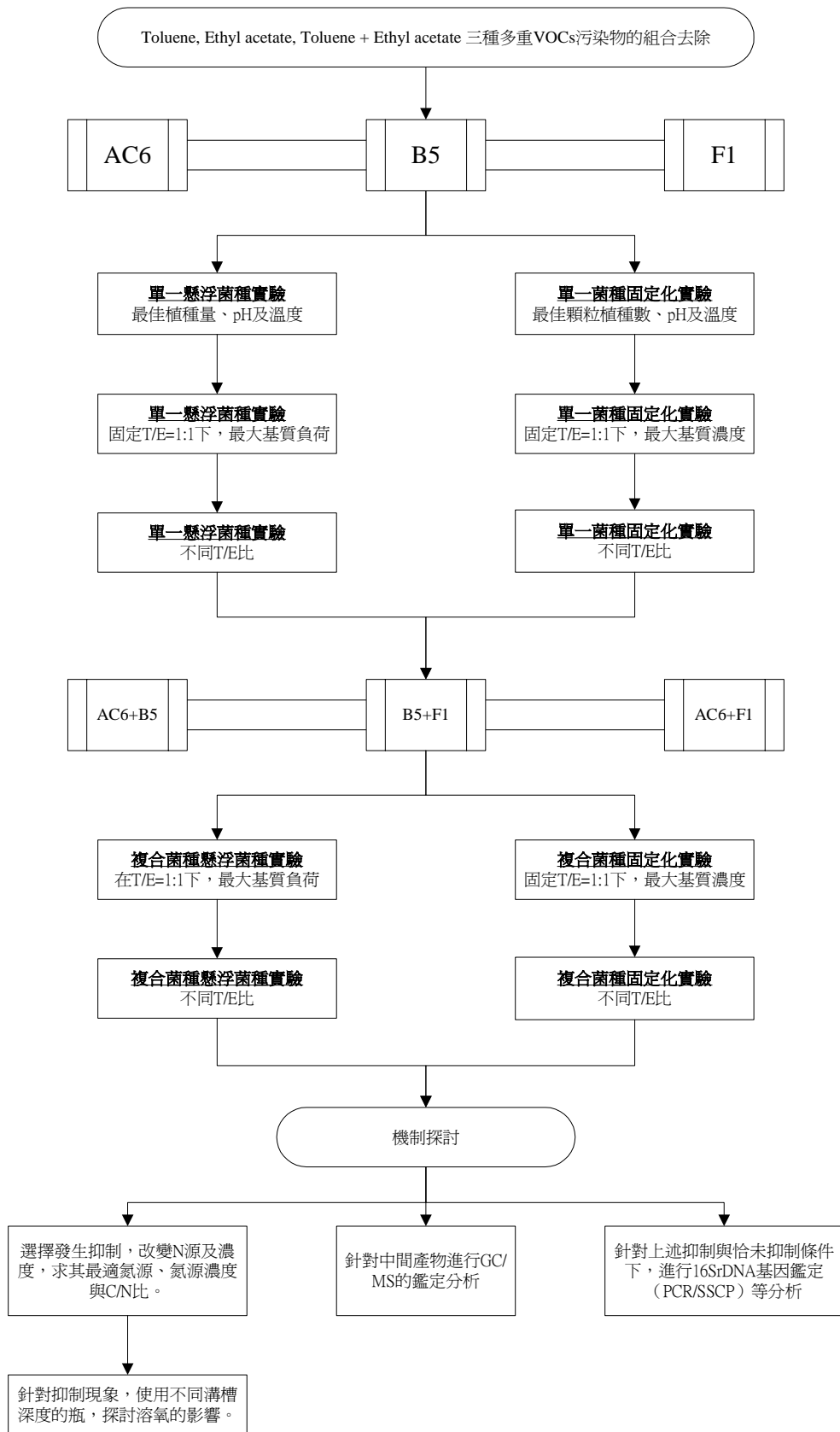


Figure 2-4. 實驗流程

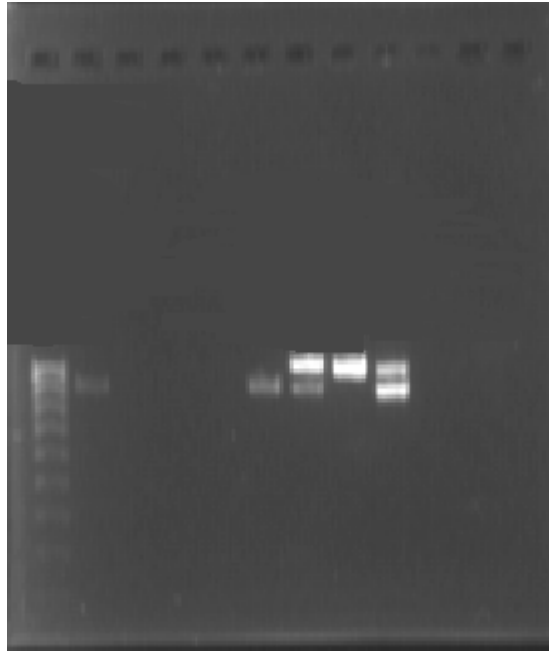


Figure 2-5. 聚合酶鏈鎖反應之電泳膠片

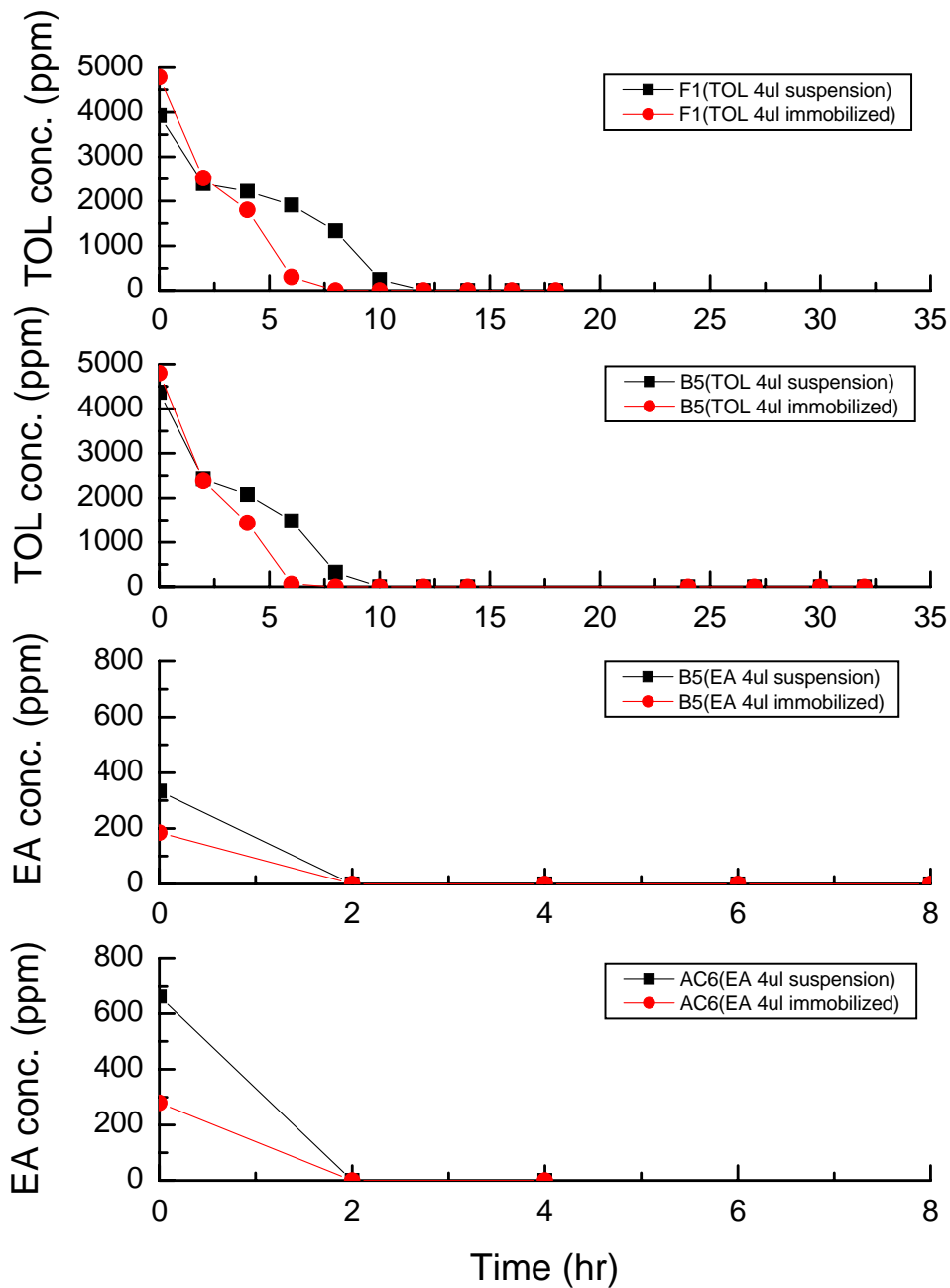


Figure 3-1. Time course profiles of biodegradation of 4- μ l ethyl acetate or toluene by strain F1, strain B5, and strain AC6 in suspension (square) or in immobilized cell beads (circle) at pH 7 and 28 °C using a 125-ml serum bottle containing 25 ml of medium with 20% inoculated seed.

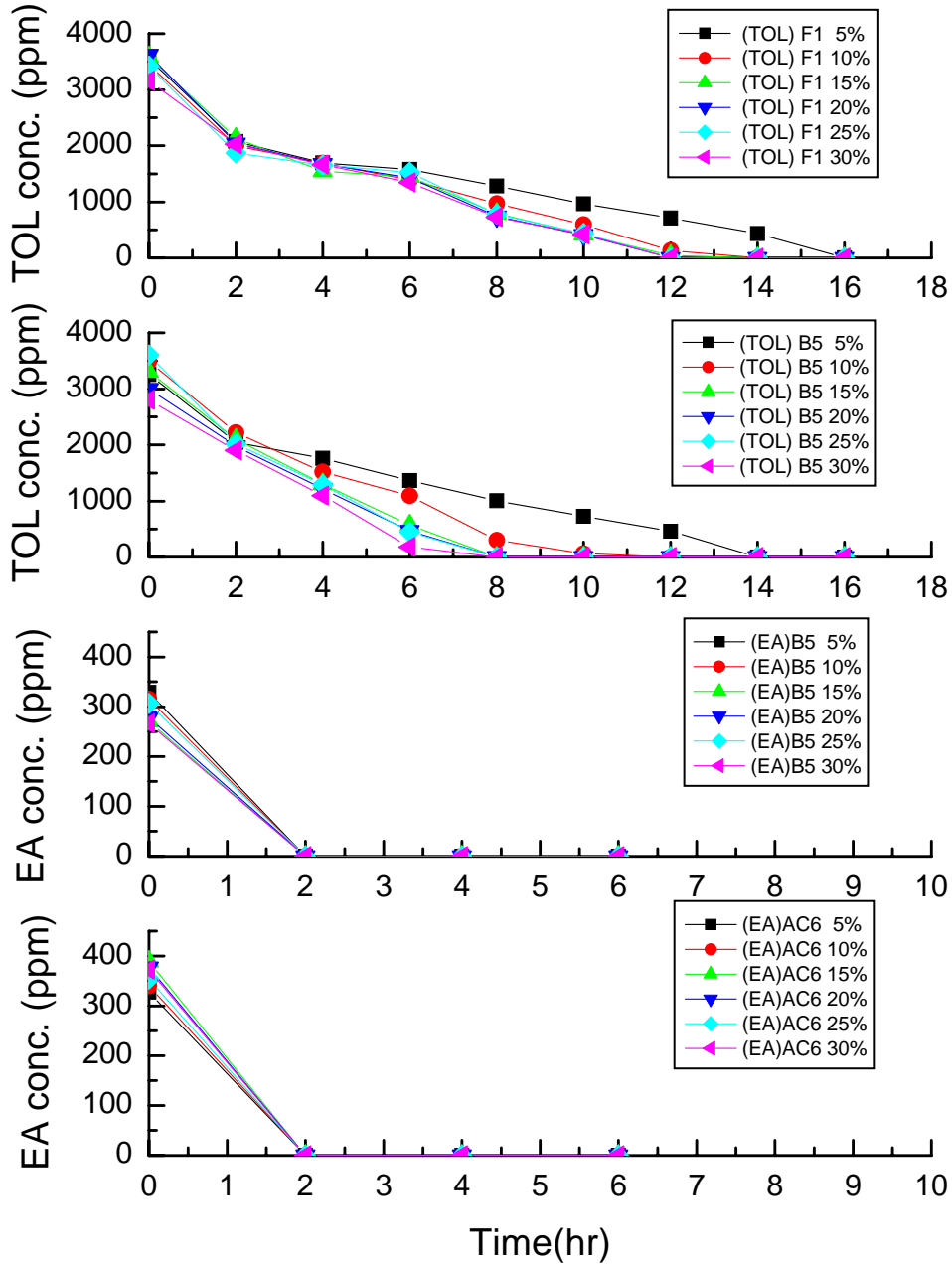


Figure 3-6. Time course profiles of biodegradation of 4- μ l ethyl acetate or toluene by strain F1, strain B5, and strain AC6 in immobilized cell beads at pH 7 and 28 °C using a 125-ml serum bottle containing 25 ml of medium with various amount of inoculated seed.

不同接菌量(固定化)

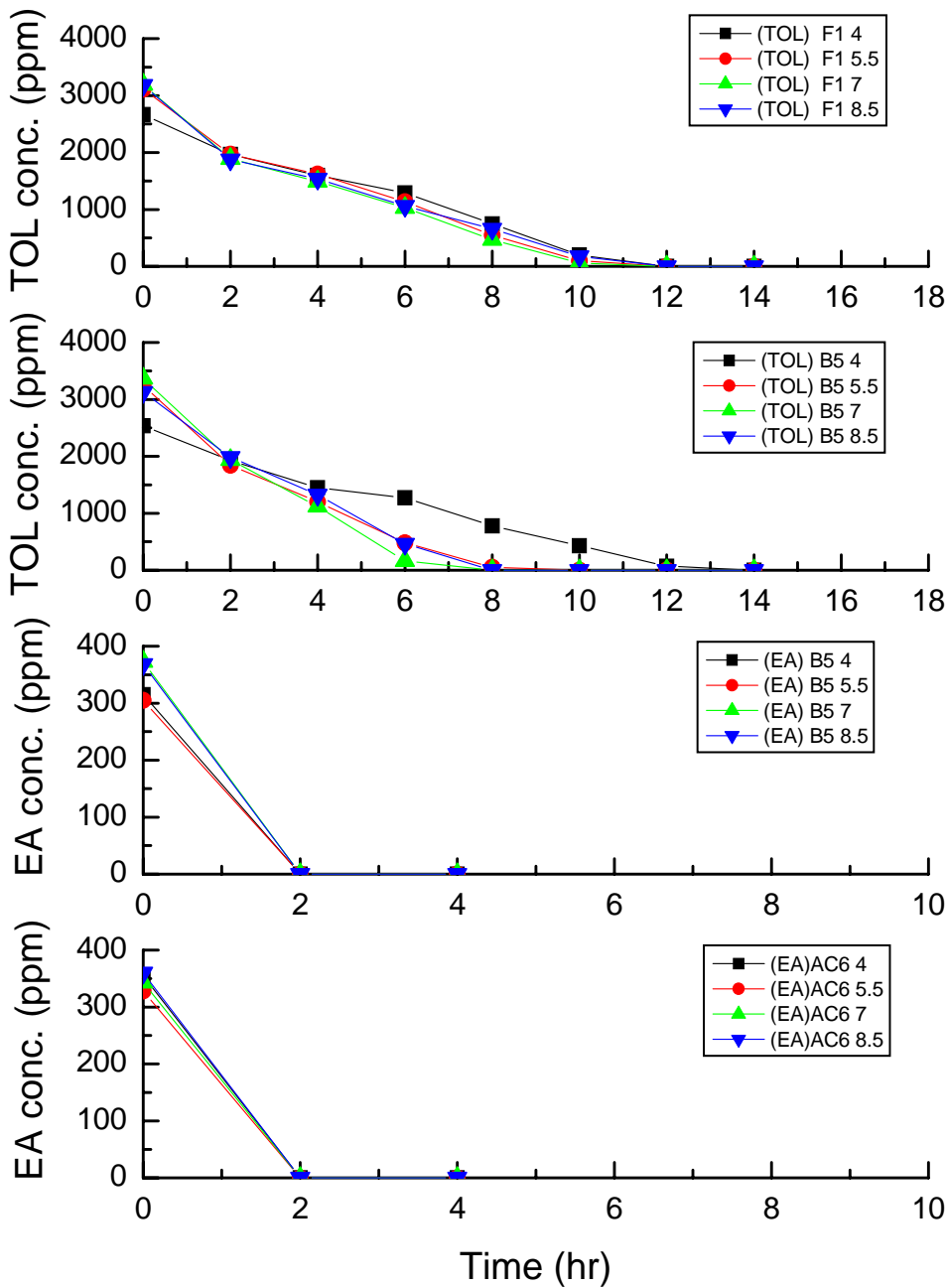


Figure 3-7. Time course profiles of biodegradation of 4- μ l ethyl acetate or toluene by strain F1, strain B5, and strain AC6 in immobilized cell beads at 28 °C using a 125-ml serum bottle containing 25 ml of medium with 20% inoculated seed, starting at various initial pH.

不同 pH 值(固定化)

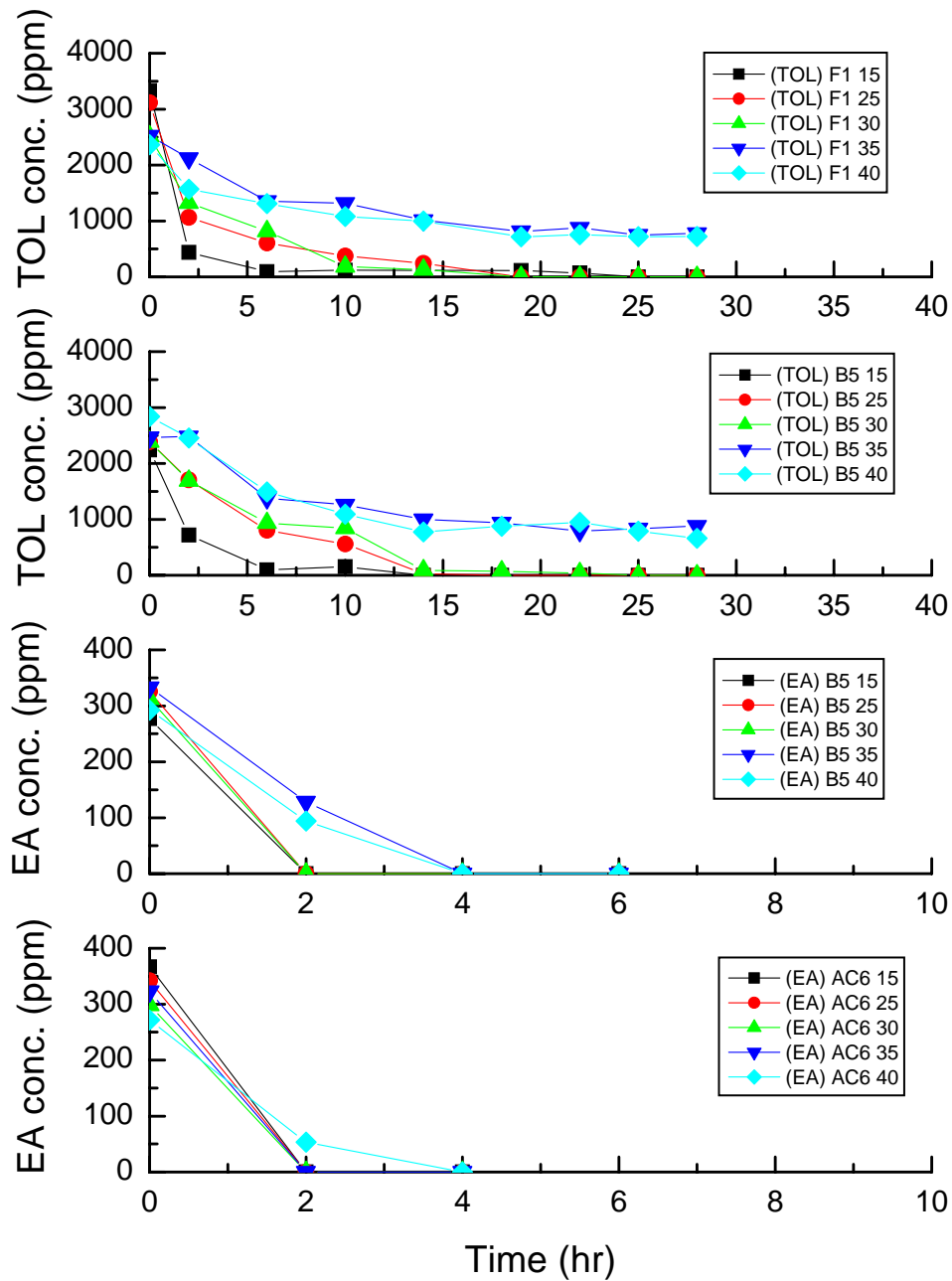


Figure 3-8. Time course profiles of biodegradation of 4- μ l ethyl acetate or toluene by strain F1, strain B5, and strain AC6 in immobilized cell beads at pH 7 using a 125-ml serum bottle containing 25 ml of medium with 20% inoculated seed, and cultivated at different temperature.

不同溫度(固定化)

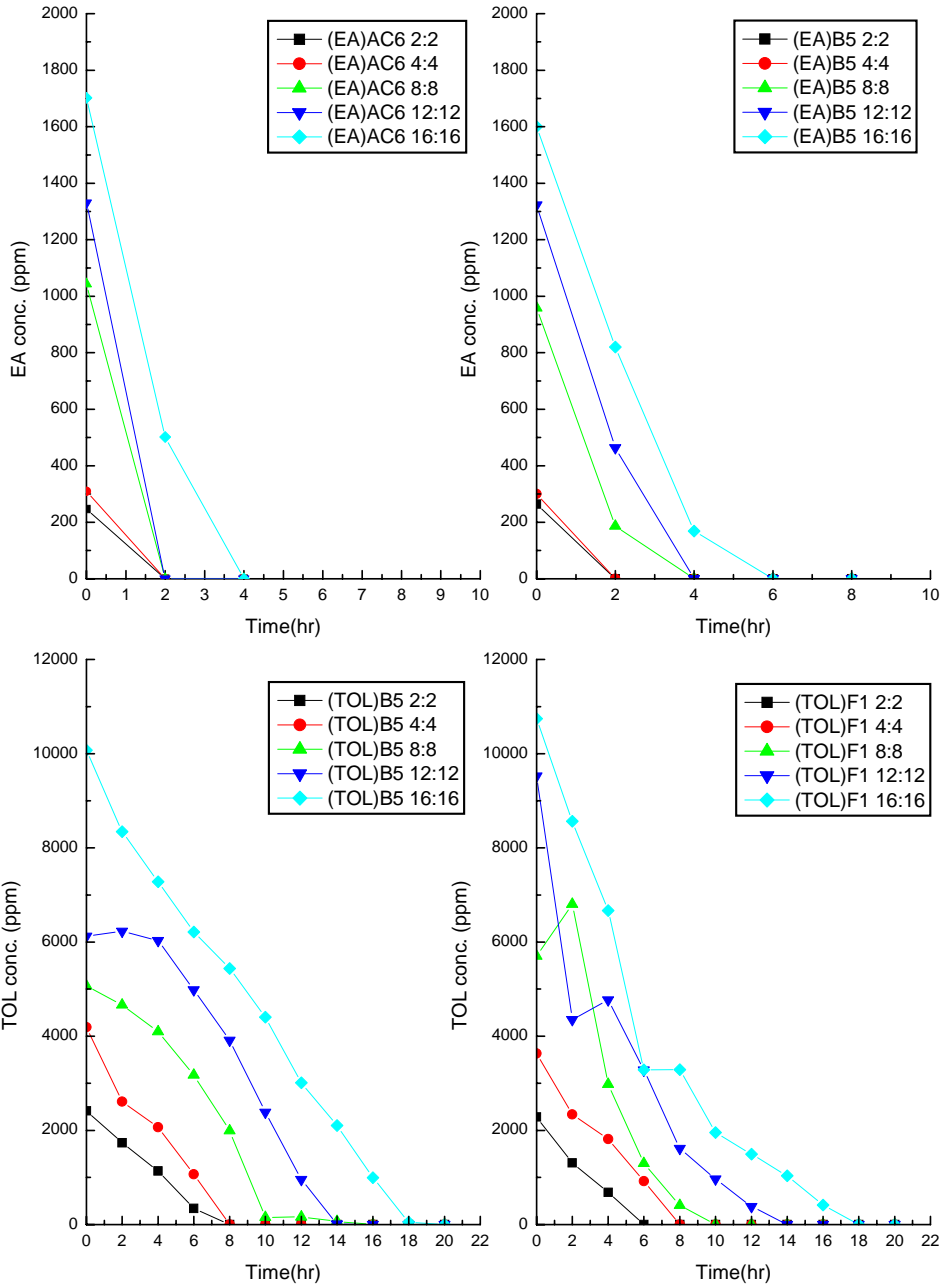


Figure 3-9. Time course profiles of biodegradation of ethyl acetate or toluene by suspended pure culture of strain AC6, strain B5, and strain F1 at pH 7 and 28 °C using a 125-ml serum bottle containing 25 ml of medium with 20% inoculated seed, under various proportional T/E ratios.

單一菌株同碳源比(懸浮)

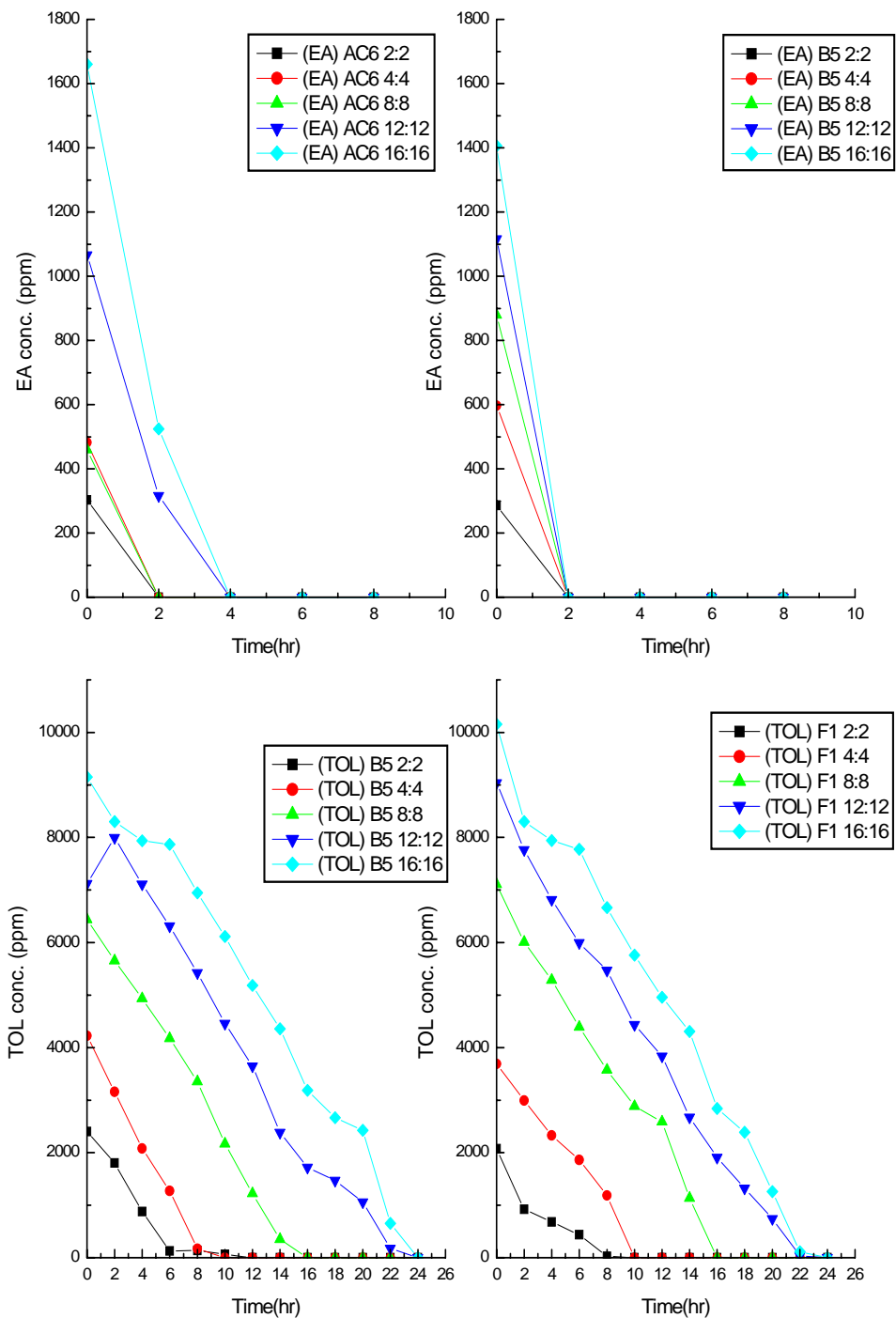


Figure 3-10. Time course profiles of biodegradation of ethyl acetate or toluene by mixed PVA-immobilized cell beads of strain AC6, strain B5, and strain F1 at pH 7 and 28 °C using a 125-ml serum bottle containing 25 ml of medium with 20% inoculated seed, under various proportional T/E ratios. 單一菌株同碳源比(固定化)

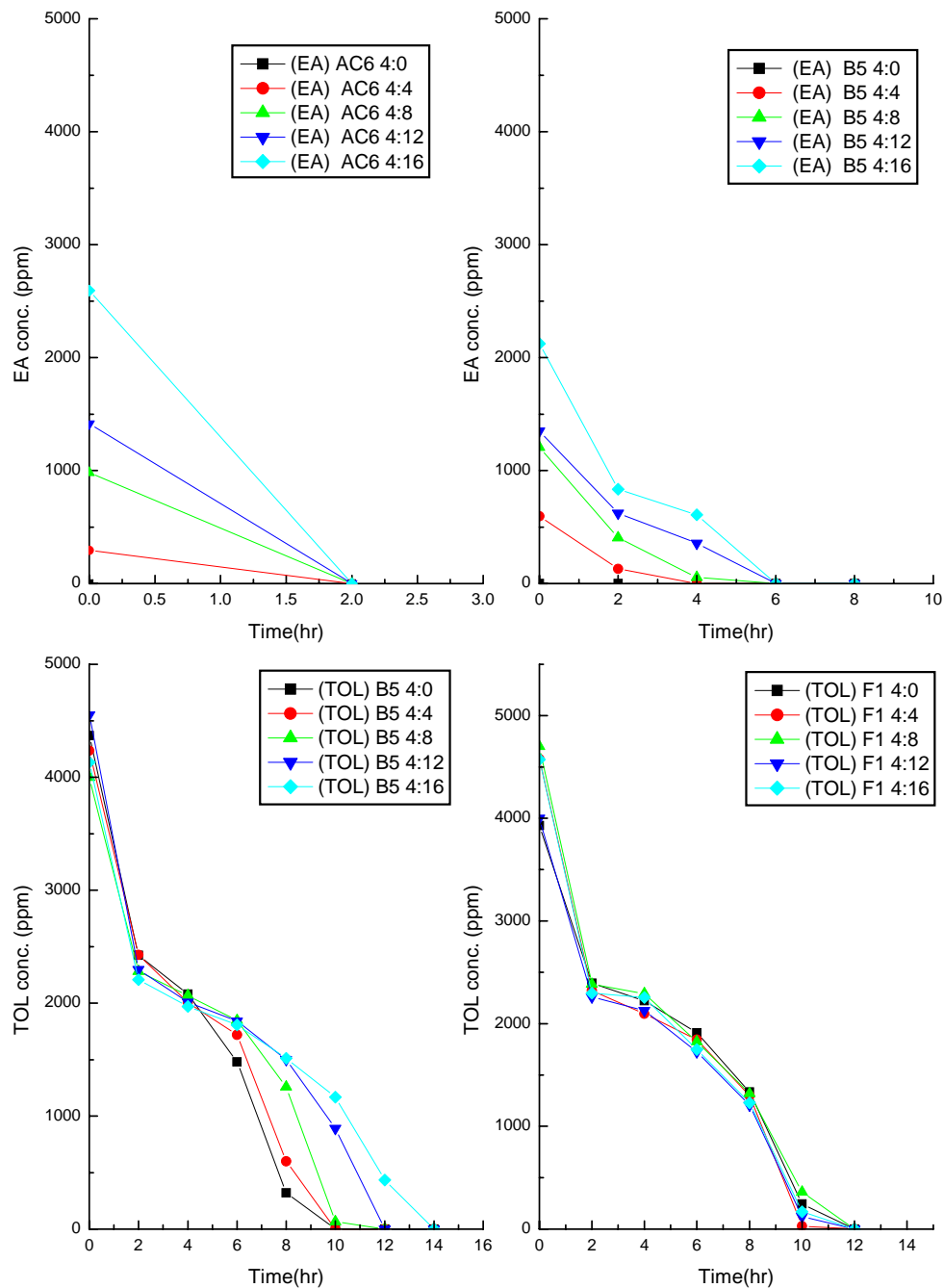


Figure 3-11. Time course profiles of biodegradation of ethyl acetate or toluene by suspended pure culture of strain AC6, strain B5, and strain F1 at pH 7 and 28 °C using a 125-ml serum bottle containing 25 ml of medium with 20% inoculated seed, under various T/E ratios.

單一菌株不同碳源比(懸浮)

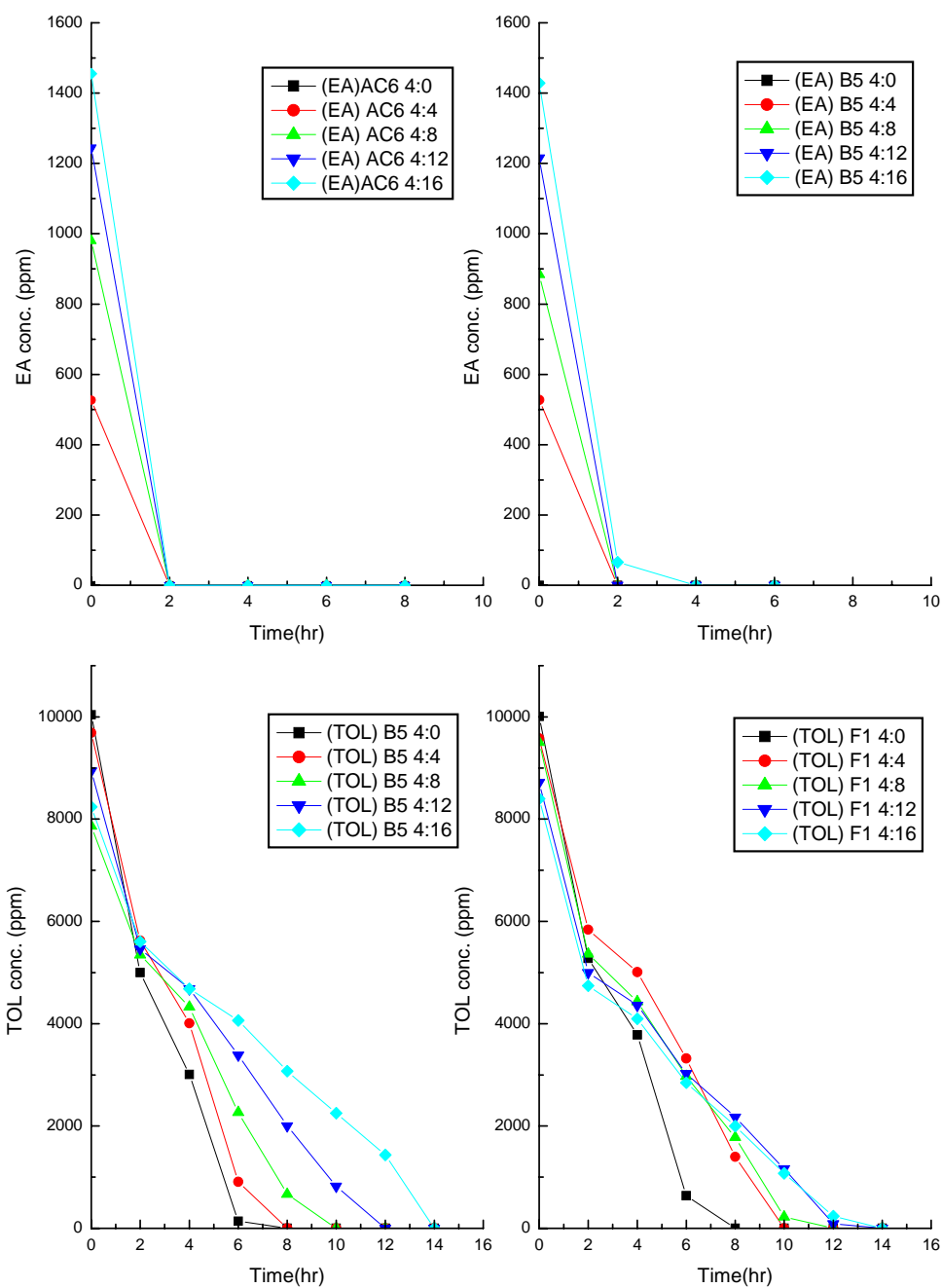


Figure 3-12. Time course profiles of biodegradation of ethyl acetate or toluene by mixed PVA-immobilized cell beads of strain AC6, strain B5, and strain F1 at pH 7 and 28 °C using a 125-ml serum bottle containing 25 ml of medium with 20% inoculated seed, under various T/E ratios.

單一菌株不同碳源比(固定)

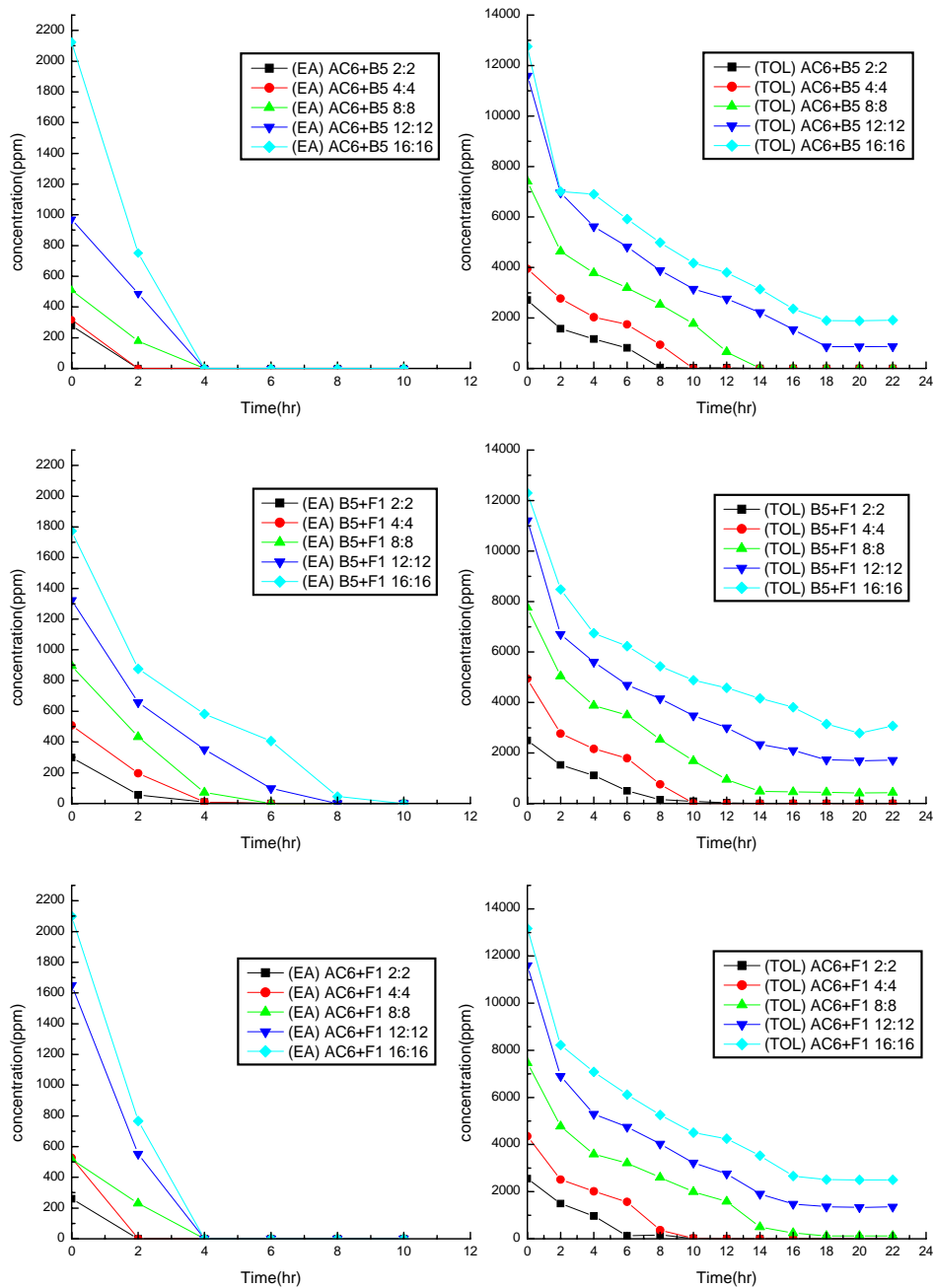


Figure 3-13. Time course profiles of biodegradation of ethyl acetate or toluene by suspended mixed culture of strain AC6, strain B5, and strain F1 at pH 7 and 28 °C using a 125-ml serum bottle containing 25 ml of medium with 20% inoculated seed, under various proportional T/E ratios.

混合菌株同碳源比(懸浮)

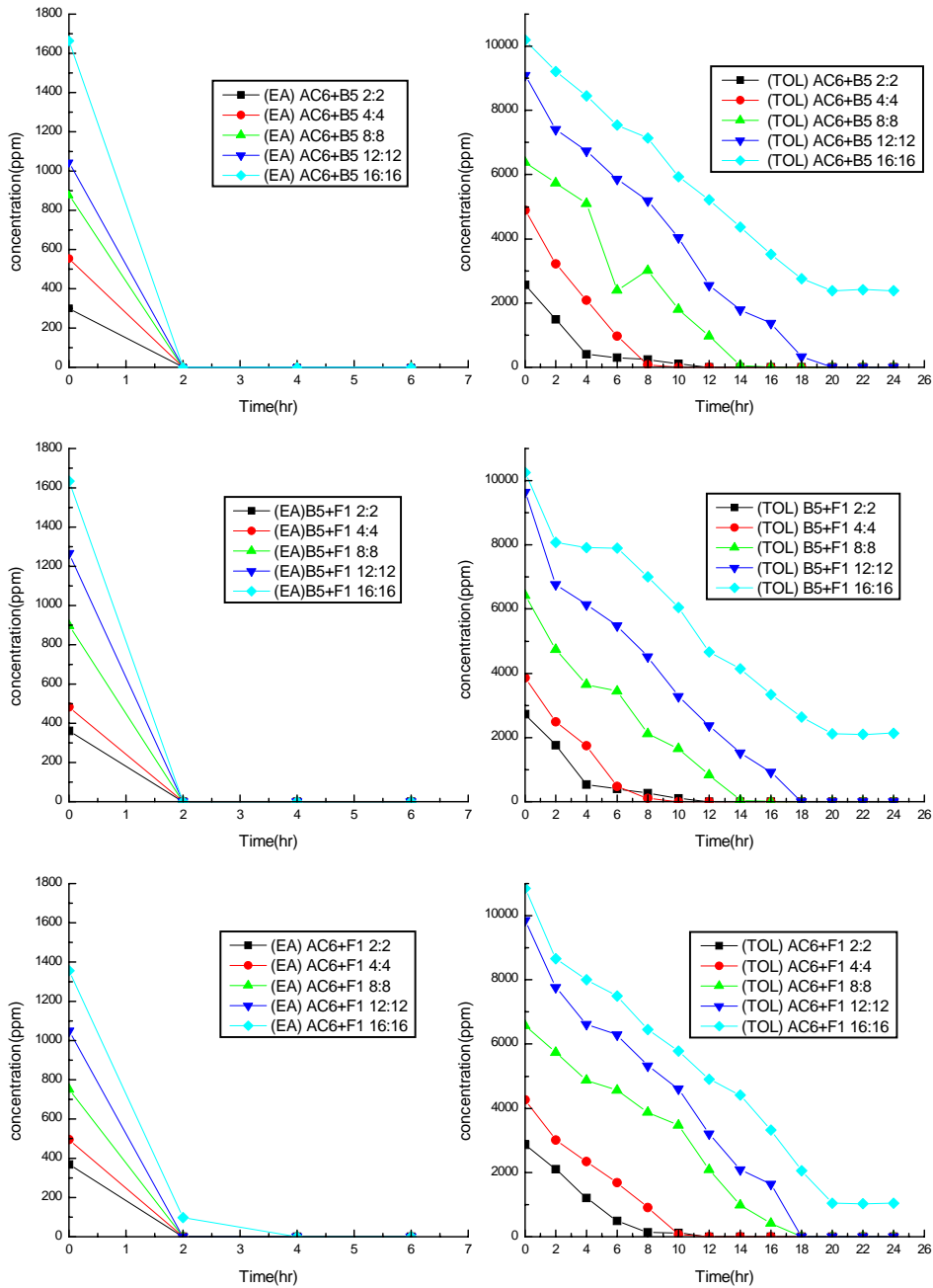


Figure 3-14. Time course profiles of biodegradation of ethyl acetate or toluene by mixed PVA-immobilized cell beads of strain AC6, strain B5, and strain F1 at pH 7 and 28 °C using a 125-ml serum bottle containing 25 ml of medium with 20% inoculated seed, under various proportional T/E ratios.混合菌株同碳源比(固定)

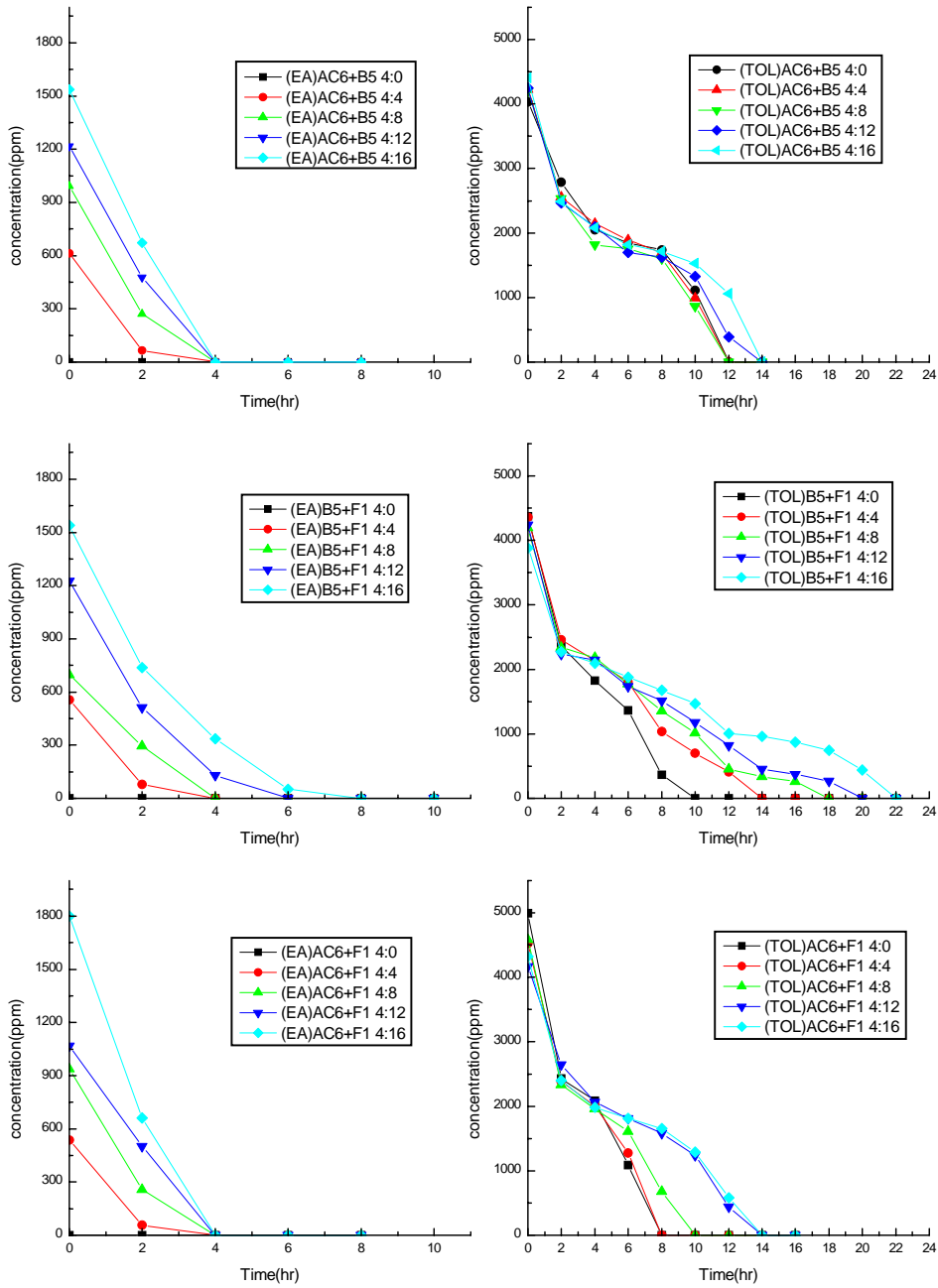


Figure 3-15. Time course profiles of biodegradation of ethyl acetate or toluene by suspended mixed culture of strain AC6, strain B5, and strain F1 at pH 7 and 28 °C using a 125-ml serum bottle containing 25 ml of medium with 20% inoculated seed, under various T/E ratios.

混合菌株不同碳源比(懸浮)

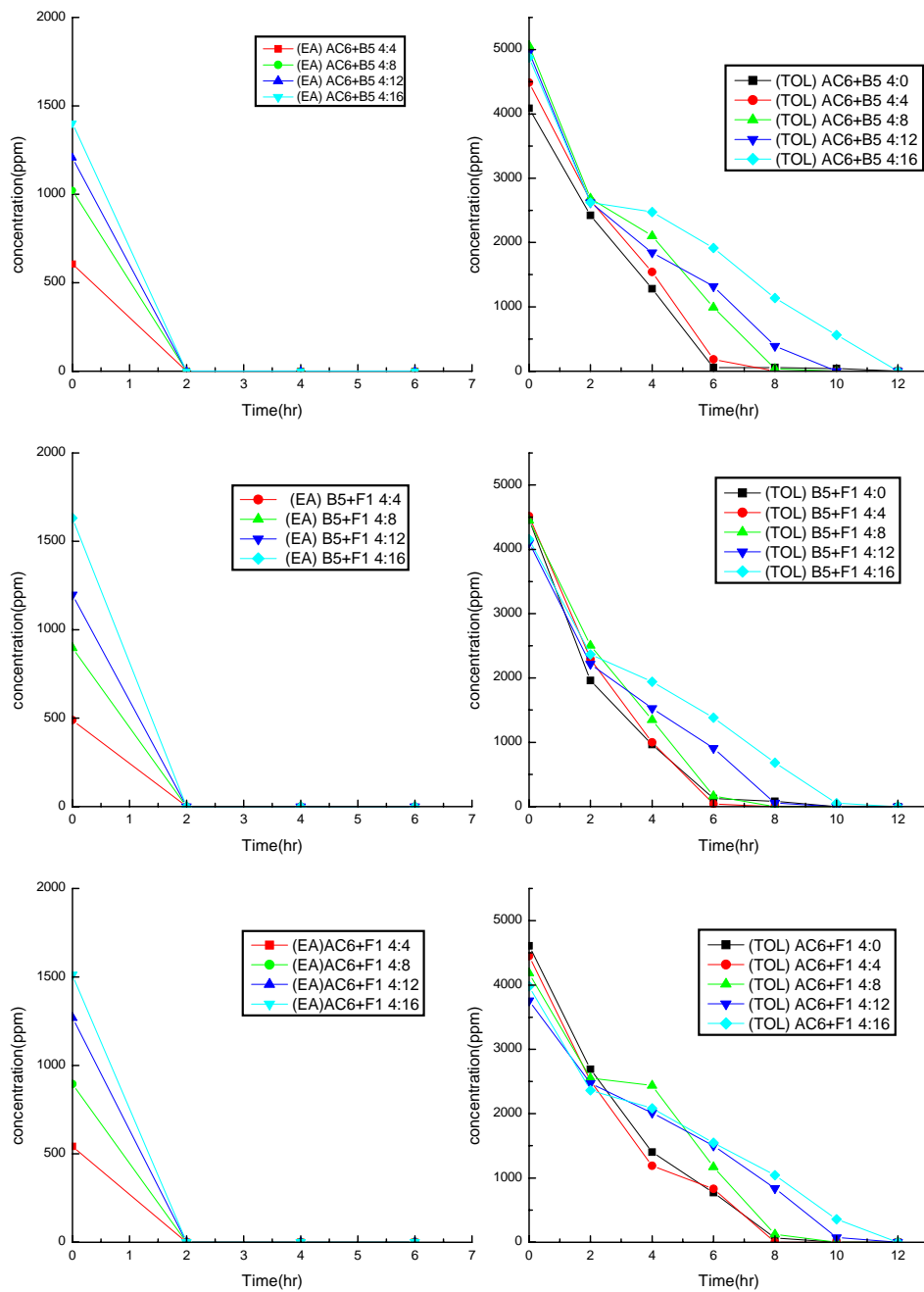


Figure 3-16. Time course of biodegradation of ethyl acetate or toluene by mixed PVA-immobilized cell beads of strain AC6, strain B5, and strain F1 at pH 7 and 28 °C using a 125-ml serum bottle containing 25 ml of medium with 20% inoculated seed, under various T/E ratios.

混合菌株不同碳源比(固定)