

行政院環境保護署

「99 年度土壤及地下水污染研究與技術提昇計畫」

應用生物反應槽進行石化污染物之生物復育研究

期末報告

EPA-99-GA103-03-A236-1

主辦單位：



行政院環境保護署

受託單位：

國立高雄師範大學

計畫主持人：

陳士賢

協同主持人：

陳師慶

計畫執行人員：

詹凱帆、張浚銘、黃瓊儀、陳經明

計畫執行期間：

99/12/29 ~ 100/12/28

中華民國 100 年 12 月

中文摘要

甲基第三丁基醚(Methyl *tert*-butyl ether, MTBE)於 1990 年代開始廣泛使用，作為提高汽油辛烷值的含氧添加劑，由於具可水溶性及高揮發性；因此在地下水層與地面水間具有高移動性，且可藉由揮發作用污染到地表土壤與底泥。

本研究主要探討利用來自石化污染場址中所分離的菌種(*Pseudomonas sp.* NKNU01, *Bacillus sp.* NKNU01, *Klebsiella sp.* NKNU01, *Enterobacter sp.* NKNU01, *Enterobacter sp.* NKNU02)，進行 MTBE 生物降解實驗，並找出最具有分解 MTBE 潛力菌種及其降解途徑。分別利用批次試驗求得單一菌種及混合菌種將 MTBE 當作碳源之降解能力、共代謝物質對微生物降解 MTBE 情形的影響。使用生物反應槽利用批次試驗所得實驗條件進行提高 MTBE 濃度降解試驗。分解途徑以蛋白質體技術進行鑑定，針對二維電泳蛋白質表現量差異兩倍以上蛋白質點，再利用基質輔助雷射脫附-飛行時間質譜法(MALDI-TOF MS)分析與 PMFs(peptide mass fingerprints)資料庫比對鑑定。

在批次實驗中，混合菌加入共代謝物質降解效果為最佳，可降解 MTBE 約達 64%，在單一菌種則是 *Bacillus sp.* NKNU01 為最佳，可降解 MTBE 約 21%；共代謝物質挑選，屬正戊烷(Pentane)具有最佳效果。另外，不添加共代謝物質試驗中，發現 *Enterobacter sp.* NKNU02 降解 MTBE 效率約達 29%較添加共代謝物質時效率佳，且屬單一菌種試驗中具有最佳降解 MTBE 潛力菌種。

生物反應槽試驗結果顯示 *Enterobacter sp.* NKNU02 可於不添加共代謝物質之實驗分解 MTBE 約達 56%；另一方面加入共代謝物試驗中，*Bacillus sp.* NKNU01 與 *Klebsiella sp.* NKNU01 降解 MTBE 皆約達 22%，與批次實驗相較之下皆有顯著差異，故推測利用生物反應槽可促進生物降解效率提升。

結果顯示 *Enterobacter sp.* NKNU02 為具有最佳分解 MTBE 潛力菌種，蛋白質鑑定其代謝蛋白包含 alcohol dehydrogenase、phospho- glyceromutase、transaldolase 與 isocitrate dehydrogenase；另外利用 GC/MS 進行定性分析，推估出具可能性之代謝產物，如 acetic acid、2-propenoic acid 與 2-propanol。實驗發現 *Enterobacter sp.* NKNU02 進行 MTBE 分解時，不經過第三丁醛(*tert*-butyl formate, TBF)轉化，而直接氧化生成第三丁醇(*tert*-butyl alcohol, TBA)進而生成

2-Propanol 與 Lactate 再進入 TCA cycle，完成 MTBE 代謝作用。

降解實驗添加 BTEX 以模擬汽油發生洩漏，結果發現 *Enterobacter sp.* NKNU02 分解 MTBE 會受 BTEX 所抑制，使降解率約減為 16%。然而，BTEX 亦會被 *Enterobacter sp.* NKNU02 分解，甲苯被分解效果為最佳約有 36%，苯約有 32%，故此菌種對其他汽油污染物亦具有降解效用。本研究結果可應用提升汽油污染場址之生物復育可能性。

關鍵字: 甲基第三丁基醚、生物降解、生物反應槽、共代謝作用、正戊烷

Abstract

Methyl *tert*-butyl ether (MTBE) has been the most commonly used high octane additive to gasoline since 1990. The compound is partially water soluble and moderately volatile; thus, it is highly mobile in both groundwater and surface water and can be volatilized to contaminate the vadose zone, surface soils, and sediments. However, biological treatment of MTBE-contaminated groundwater appears to be the most economical, energy efficient, and environmentally sound approach.

The objective of this reach was to investigate the biodegradation potential of MTBE by the microorganisms specified (*Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*) at a petroleum contaminated site. It was intended to evaluate the pure culture with the best ability of biodegradability of MTBE and to evaluate the biodegradation pathway for these microorganisms. MTBE can be metabolized by bacteria either as a primary carbon source, or cometabolized when bacterial growth requires another substrates at the batch experiments involving either mixed or pure cultures. The bioreactor with conditions obtained from the batch experiment was applied to enhance degradation of MTBE. The metabolic pathways and cellular responses of these microorganisms during growth on MTBE were studied through proteomics approach. Protein spots of interest were identified through database searching according to peptide mass fingerprints (PMFs) obtained using matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).

The pentane was used as the cometabolic chemical to enhance MTBE degradation. On the other hand, the pure culture (*Enterobacter sp.* NKNU02) shown the best degradation potential about 29 % of MTBE without adding pentane. *Enterobacter sp.* NKNU02 could degrade about 56 % of MTBE without adding pentane. *Bacillus sp.* NKNU01 and *Klebsiella sp.* NKNU01 could degrade about 22 % of MTBE with adding pentane. Comparing with the batch experiments, bioreactor could enhance MTBE degradation significantly.

Four metabolic enzymes may involve alcohol dehydrogenase, phosphoglyceromutase, transaldolase, and isocitrate dehydrogenase. Assessing the potential products of MTBE degradation by gas chromatograph/mass spectrometer(GC/MS) involved acetic acid, 2-propenoic acid, and 2-propanol. *Enterobacter sp.* NKNU02

followed the pathway in the initial steps of MTBE degradation, without converting MTBE to *tert*-butyl formate, which was directly hydrolysed to *tert*-butyl alcohol, and then transformed 2-propanol and lactate to the TCA cycle (tricarboxylic acid cycle).

MTBE and BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes) can coexist in gasoline-contaminated groundwater, and MTBE-degradability of *Enterobacter sp.* NKNU02 could reduce about 16% of MTBE but inhibited by BTEX. However, it could also degrade BTEX including 36% of toluene and 32% of benzene. The effectiveness of bioremediation of MTBE will be assessed for potential field-scale application.

Key words: Methyl *tert*-butyl ether, biodegradation, bioreactor, cometabolism, pentane

計畫成果摘要(詳細版)

計畫名稱：應用生物反應槽進行石化污染物之生物復育研究

計畫編號：EPA-99-GA103-03-A236-1

計畫執行單位：國立高雄師範大學

計畫主持人：陳士賢

計畫期程：99 年 12 月 29 日起 100 年 12 月 28 日止

計畫經費：994 千元

摘要

本研究利用石化污染場址中所分離的菌種(*Pseudomonas sp.* NKNU01, *Bacillus sp.* NKNU01, *Klebsiella sp.* NKNU01, *Enterobacter sp.* NKNU01, 及 *Enterobacter sp.* NKNU02)進行甲基第三丁基醚(methyl tert butyl ether, MTBE)生物降解實驗，探討最具有分解 MTBE 潛力菌種及其降解途徑。

在批次實驗中以混合菌加入共代謝物質降解效果為最佳，可降解 MTBE 約達 64%；共代謝物質以正戊烷(Pentane)具有最佳效果，不添加共代謝物質試驗中，發現 *Enterobacter sp.* NKNU02 降解 MTBE 效率約達 29%較添加共代謝物質時效率佳，且屬單一菌種試驗中具有最佳降解 MTBE 潛力菌種。由生物反應槽試驗結果顯示 *Enterobacter sp.* NKNU02 於不添加共代謝物質之實驗可分解 MTBE 達 56%；加入共代謝物試驗中，*Bacillus sp.* NKNU01 與 *Klebsiella sp.* NKNU01 降解 MTBE 皆約達 22%，與批次實驗相較之下皆有顯著差異，利用生物反應槽可促進生物降解效率提升。研究發現 *Enterobacter sp.* NKNU02 進行 MTBE 分解時，不經過第三丁醛(*tert-butyl formate*, TBF)轉化，而直接氧化生成第三丁醇(*tert-butyl alcohol*, TBA)進而生成 2-Propanol 與 Lactate 再進入 TCA cycle，完成 MTBE 代謝作用。於降解實驗添加 BTEX 結果發現 *Enterobacter sp.* NKNU02 分解 MTBE 會受 BTEX 所抑制，使降解率約減為 16%。然而，BTEX 亦會被 *Enterobacter sp.* NKNU02 分解，甲苯被分解效果為最佳約有 36%，苯約有 32%，故此菌種對其他汽油污染物亦具有降解效用，本研究結果可應用於汽油污染場址之生物復育規畫。

The objective of this reach was to investigate the biodegradation potential of methyl *tert*-butyl ether (MTBE) by microorganisms specified (*Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*) at a petroleum contaminated site. It was intended to evaluate the pure culture with the best ability of biodegradability of MTBE and to explore the biodegradation pathway for these microorganisms.

Pentane was employed as the cometabolic chemical to enhance MTBE degradation. However, the pure culture (*Enterobacter sp.* NKNU02) illustrated the best degradation potential of MTBE (about 29%) without adding pentane.

Enterobacter sp. NKNU02 could degrade about 56% of MTBE without adding pentane. *Bacillus sp.* NKNU01 and *Klebsiella sp.* NKNU01 could degrade about 22% of MTBE with adding pentane. Comparing with the batch experiments, bioreactor could significantly enhance MTBE degradation. Protein spots of interest were identified through database searching according to peptide mass fingerprints (PMFs) obtained using matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Four metabolic enzymes including alcohol dehydrogenase, phosphor- glyceromutase, transaldolase, and isocitrate dehydrogenase may be involved. The potential products of MTBE degradation including acetic acid, 2-propenoic acid, and 2-propanol were analyzed by gas chromatograph/mass spectrometer(GC/MS). *Enterobacter sp.* NKNU02 followed the pathway in the initial steps of MTBE degradation, without converting MTBE to *tert*-butyl formate, which was directly hydrolysed to *tert*-butyl alcohol, and then transformed 2-propanol and lactate to the TCA cycle (tricarboxylic acid cycle).

Since MTBE and monoaromatics such as benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX) can coexist in gasoline-contaminated groundwater, the MTBE-degradability of *Enterobacter sp.* NKNU02 could be reduced about 16%. However, it could also degrade BTEX including 36% of toluene and 32% of benzene. The effectiveness of bioremediate MTBE contaminated groundwater will serve the potential for field-scale application.

前言

本計畫應用生物復育法，針對石化污染場址中受汽油污染的地下水，進行復育成效探討，研究目的為應用研究團隊於汽油洩漏污染場址中分離出之五株菌株 (*Pseudomonas sp.* NKNU01、*Bacillus sp.* NKNU01、*Klebsiella sp.* NKNU01、*Enterobacter sp.* NKNU01 與 *Enterobacter sp.* NKNU02)，針對主要汽油添加物-甲基第三丁基醚(methyl tert butyl ether, MTBE)進行生物分解試驗，依先前研究的微生物族群結構，設計不同類數的純菌株，植入生物反應器中，進行生物復育成效的探討，藉以評估石化污染場址中菌種對污染物分解能力，同時尋找具有最佳 MTBE 分解能力菌種，後續進行在各種條件下污染物分解能力之評估探討，與推估微生物之分解 MTBE 途徑。本計畫各分項目的如下:1.以批次試驗尋找 MTBE 分解菌種的最佳生長條件，2.利用生物反應槽評估菌種 MTBE 分解能力，3.以蛋白質體分析建立菌種的 MTBE 分解途徑，4.評估不同基質下 MTBE 分解能力，5.各菌種分解 MTBE 污染地下水之分解動力學探討。

研究方法

針對石化污染場址中種類眾多的石化污染物，本計畫探討微生物分解石化污染物之移除效率及其應用性，建置生物反應槽系統，此系統為結合可降解 MTBE

之培養菌種及提供氧氣來源，並具有監測系統的一套生物處理系統，並評估此生物復育系統對污染物的移除效率及降解成效。

本計畫之工作方法包括下列各項：

1. 批次實驗：利用不同條件下，最原始的批次實驗找出五株菌種的最佳生長條件。
 - (1) 進行批次實驗，推估 MTBE 分解菌最適當菌量濃度，及找出分解菌最適生長環境條件。
 - (2) 進行批次實驗，比較分解菌各菌種間分解目標污染物能力。
 - (3) 由批次實驗進行共代謝物質選擇試驗。
2. 生物反應槽：首先測試由批次試驗求得五菌株都可以接受的生長環境條件，套用到生物反應槽，由於生物反應槽具有連續調控培養環境條件的能力，故可維持菌種生長條件因子。
 - (1) 生物反應槽對 MTBE 所造成揮發程度測試。
 - (2) 採用批次試驗條件於生物反應槽，比較各菌種分解受 MTBE 污染地下水情形。
 - (3) 判斷各菌種於生物反應槽中進行共代謝分解 MTBE 的效力。
3. 蛋白質體分析：應用生物反應槽評估具有 MTBE 分解效果最佳的菌種，分析鑑定其蛋白質種類，藉以建立此菌種的 MTBE 分解途徑。
 - (1) 依據菌種生長與 MTBE 分解程度，挑選時間點上具代表性菌種蛋白質。
 - (2) 純化菌種蛋白質。
 - (3) 以蛋白質體技術進行鑑定。
 - (4) 針對二維電泳蛋白質表現量差異兩倍以上蛋白質點，再利用基質輔助雷射脫附-飛行時間質譜法(MALDI-TOF MS)分析與 PMFs (peptide mass fingerprints)資料庫比對鑑定。
 - (5) 分析蛋白質表現量差異，應用蛋白質鑑定預測 MTBE 在實驗菌種之生物分解途徑。
4. 評估不同基質條件下 MTBE 分解能力：考量汽油發生洩漏，MTBE 會與汽油中主要污染物(苯、甲苯、乙苯、二甲苯，合稱 BTEX)同時存在，於具有 BTEX 環境下利用生物反應槽，觀察具有 MTBE 分解效力較佳之菌種分解地下水污染物情形。
 - (1) 利用拉午爾定律評估地下水層遭受汽油洩漏時，汽油中目標污染物在地下水中預期濃度。
 - (2) 在生物反應槽中，菌種同時分解 MTBE 與 BTEX 之能力，了解污染物 BTEX 影響菌種分解 MTBE 情形。
5. 各菌種分解 MTBE 污染地下水之分解動力學探討：利用生物反應槽試驗中每日所得數據，對各菌種生物分解動力學(biodegradation kinetics)進行評估，藉以了解 MTBE 被分解情形。
 - (1) 分析 MTBE 分解之代謝產物，並建立與 MTBE 之質量關係。

(2) 應用生物降解分解動力學建立 MTBE 生物降解模式，以供石化污染場址擬定生物復育策略參考 MTBE 生物分解。

結果

I. 菌種間降解能力比較

在批次試驗中，分析在不同時間點下各搖瓶中菌種對 MTBE 分解情形，*Enterobacter* sp. NKNU02 是屬效果最佳的菌種，在第 10 天時即降解 MTBE 約 26%，而第 15 天降解率到達 30%，故推測 *Enterobacter* sp. NKNU02 在降解初期降解速率較大，而後期時有代謝產物 TBA 產生，進而減少 MTBE 分解率而影響降解速度，故可以解釋在實驗後期當 TBA 產生時，MTBE 分解效率有減低現象。

利用同菌量混合成混合菌(分別取同菌數)，再稀釋菌量為 $OD_{600}=0.1$ 進行相同批次降解試驗，在實驗第 10 天時降解 MTBE 約 25.7%，但於第 15 天時降解率增加約為 29.32%。各菌種降解情形比較發現 *Enterobacter* sp. NKNU02 在降解第 15 天時與混合菌降解能力無顯著差異($p>0.05$)，故推測構成混合菌降解效力主要來自於 *Enterobacter* sp. NKNU02 影響效力。各五株菌間降解 MTBE 效果都有明顯差異存在，其中降解效果最佳為 *Enterobacter* sp. NKNU02，其次為 *Enterobacter* sp. NKNU01。

II. 選擇共代謝物質試驗

在固定菌量為 $OD_{600} = 0.1$ 、MTBE 污染濃度為 10 mg/L，批次試驗時間為期 21 天，加入共代謝物質-正戊烷在實驗第 10 天時，MTBE 降解幅度顯著提升(p value <0.05)，正戊烷對於本研究中所使用菌種進行 MTBE 降解時，都會造成顯著影響，如 *Bacillus* sp. NKNU01 與 *Klebsiella* sp. NKNU01 是正影響，其中單一菌種 MTBE 降解效果提升最大為 *Bacillus* sp. NKNU01，其次為 *Klebsiella* sp. NKNU01；但 *Enterobacter* sp. NKNU02 在使用共代謝物質情況下，反而會使降解效果明顯下降，正戊烷對於 *Enterobacter* sp. NKNU02 則是屬於抑制影響，反而會減緩菌種對 MTBE 的分解效果。另外實驗第 20 天時降解率與實驗第 15 天兩者於統計上並無顯著差異。

混合菌在添加正戊烷的共代謝試驗中，除了 *Pseudomonas* sp. NKNU01 在降解第 15 天與第 10 天並無明顯增加，其餘四株菌在第 15 天時降解 MTBE 效果都有明顯增加現象；但其中因正戊烷會抑制 *Enterobacter* sp. NKNU02 降解 MTBE，但在具有正戊烷的環境下卻無法有效分解 MTBE，故共代謝降解效果最佳為 *Bacillus* sp. NKNU01。

試驗第二種共代謝物質乙醇，顯示降解作用在第十五天時，*Enterobacter* sp. NKNU01 與 *Enterobacter* sp. NKNU02 兩株菌雖然也有些許共代謝情形產生，但與 MTBE 為單一碳源相較之下卻無明顯共代謝作用使 MTBE 降解效果增加之現象產生；相較之下，*Bacillus* sp. NKNU01 與 *Klebsiella* sp. NKNU01 在添加乙醇後，MTBE 移除率有顯著增加之現象。考量實驗設計 MTBE 在添加共代謝物質

後，其揮發程度變化穩定性，且正戊烷與乙醇共代謝效果影響比較之下，雖然正戊烷會抑制 *Enterobacter* sp. NKNU02，其他四株菌種在共代謝物質協助下，降解 MTBE 效果皆有較顯著的增幅；且對乙醇添加後有明顯增加效果只有 *Bacillus* sp. NKNU01 與 *Klebsiella* sp. NKNU01，其餘菌種並無明顯穩定的效果，故在本研究後續實驗中選擇正戊烷為共代謝物質進行生物反應槽試驗。

III. 生物反應槽試驗

在生物反應槽中模擬配製 MTBE 濃度 100 mg/L 之污染水溶液，利用生物反應槽調控其酸鹼值，使微生物可提高生物降解效果，降解效果最佳亦為 *Enterobacter* sp. NKNU02，其次為 *Enterobacter* sp. NKNU01(圖 1)，此與批次試驗結果相符；而 *Klebsiella* sp. NKNU01、*Pseudomonas* sp. NKNU01、*Bacillus* sp. NKNU01 直接分解 MTBE 效果仍然有限。*Enterobacter* sp. NKNU02 可以將 MTBE 質量轉換為生長能量來源，使菌量亦有明顯增加現象，而非需透過共代謝物質引導做為生長來源，而 MTBE 只單純為能量來源。故在未來發展此菌種作為生物復育，生物促進法中外來添加菌種之一，但須考量外界環境與生物適應存活可行性。*Enterobacter* sp. NKNU01 在此實驗中為降解效果僅次於 *Enterobacter* sp. NKNU02 的菌種，且亦能提高菌種菌量產生；在批次試驗中其直接降解 MTBE 效果不彰顯，須透過共代謝物質而降解效果有增加；然而，在生物反應槽試驗中，直接降解 MTBE 發現效果卻比共代謝作用好，且與 *Enterobacter* sp. NKNU02 菌屬相似，推測此菌屬直接降解高濃度 MTBE 效果會比低濃度佳，且不需藉由共代謝促使微生物進行代謝作用。

在生物反應槽共代謝試驗中(圖 2)，*Bacillus* sp. NKNU01 與 *Klebsiella* sp. NKNU01 降解效果相似且為最佳，其次為 *Enterobacter* sp. NKNU01，與批次試驗相比解有些許提高 MTBE 降解效果，且實驗中各菌量亦有生長增加現象，效果最不明顯者為 *Pseudomonas* sp. NKNU01，降解效果約為 12 %與批次試驗(實驗第 15 天結果約為 13.4%)相比亦無改善。

IV. BTEX 影響生物分解 MTBE 應用評估

利用生物反應槽試驗，發現 BTEX 的存在會影響為期 7 天之降解試驗中 *Enterobacter* sp. NKNU02 分解 MTBE 效率。其中苯與甲苯降解效果相當顯著(圖 3 及 4)，雖然在實驗後期 MTBE 因為被 BTEX 所影響使降解效果無明顯成長，但苯與甲苯仍然持續降解中，故本研究推論在實驗時間在延長時仍有機會使 *Enterobacter* sp. NKNU02 在完成分解苯與甲苯後，開始進行分解 MTBE。如文獻中所發現，因為微生物分解 BTEX 與 MTBE 之降解途徑不同，所需要降解蛋白亦有所不同，故分解 BTEX 時會影響 MTBE 分解情形，符合本研究發現降解情形，同時預測在低/無濃度的 BTEX 會再重新進行 MTBE 降解。

V. 利用蛋白質體預測 MTBE 生物分解途徑

利用 PBS buffer 進行生物反應槽降解 MTBE 試驗，使 *Enterobacter* sp. NKNU02 維持在停滯期(Rest phase)，使其生長在含有 100 mg/L MTBE 之 PBS buffer，共培養 24 小時，其中每兩個小時連續進行揮發性與半揮發性物質 GC/MS 定性分析，測得 1-Pentene、acetic acid、2-Methyl-1-butene、2-propenoic acid 與 2-propanol，其中可能性較高之與 MTBE 分解相關產物包括 acetic acid、2-propenoic acid 與 2-propanol。

實驗結果發現 *Enterobacter* sp. NKNU02 分解 MTBE 過程中，中間產物 HIBA 降解途徑推論出主要是經由 Lactate 與 Propanol 兩種形式分解(圖 5)，而較無直接證據顯示 *Enterobacter* sp. NKNU02 代謝 HIBA 衍生出 Isobutyrate，再進入 TCA cycle。Spot 280 為 Isocitrate dehydrogenase [NADP]。Isocitrate dehydrogenase 是為與碳水化合物、蛋白質與能源代謝分解相關之蛋白質，且與 TCA cycle 相關。根據蛋白質鑑定結果，推論出屬於本實驗所使用具 MTBE 分解潛力之 *Enterobacter* sp. NKNU02，MTBE 生物降解途徑。

VI. 生物降解動力學

在直接代謝 MTBE 中，在 Zero order model 中 k 值約為 2.439-11.407，且 p 值皆小於 0.005，而 R^2 約為 0.671-0.945，生物系統半衰期為 4.38-20.50 天。其中 k 值最大為 *Enterobacter* sp. NKNU02，表示此菌降解速度最快，且可約在 4.38 天降解 50% 之 MTBE；以相同資料進行 First order model 分析， k 值約為 0.0263-0.1883，其 p 值皆小於 0.005，而 R^2 約為 0.746-0.958，生物系統半衰期為 3.68-26.36 天。其中 k 值最大亦為 *Enterobacter* sp. NKNU02，而半衰期約為 3.68 天，但其 R^2 約為 0.9376 比 Zero order model 中 R^2 大，故推測 *Enterobacter* sp. NKNU02 降解 MTBE 情形以 First order model 進行判定較為適合。

在共代謝試驗中，在 Zero order model 中 k 值最大為 *Bacillus* sp. NKNU01，表示此菌降解速度最快，且可約在 9.34 天降解 50% 之 MTBE；其次為 *Klebsiella* sp. NKNU01，約在 10.20 天時可降解 50% 之 MTBE。First order model 分析， k 值約為 0.0411-0.0648，其 p 值皆小於 0.005，而 R^2 約為 0.3727-0.8989，生物系統半衰期為 10.70-16.88 天。推測 *Bacillus* sp. NKNU01 共代謝作用降解 MTBE 情形以 First order model 進行判定較為適合。另外 k 值其次亦為 *Klebsiella* sp. NKNU01，但約在 11.96 天時才可降解 50% 之 MTBE，比以 Zero order model 時間較長，其中 R^2 為 0.8781 與 Zero order model 相似，故兩模式皆適合用來推估 *Klebsiella* sp. NKNU01 降解 MTBE 模式。

共代謝作用降解 MTBE 之半衰期($t_{1/2}$)所需時間變短，符合共代謝作用會增加降解效力。降解效率較佳的 *Enterobacter* sp. NKNU02，因為代謝 MTBE 過程使菌量提升，故平均每天每毫克細胞降解 MTBE 速率約為 1.07 mg/g cells/day(約為 44.59 mg/mg cells/h)，與目前公認 MTBE 降解效率最佳，在 2000 年 Deeb et al.

文獻中之 PM1 降解速率 50 mg/g cells/h 差異不大，且本研究所使用菌種為台灣本土菌種，更能符合適應當地環境條件以利應用於生物復用工法。

VII. MTBE 生物分解之代謝產物

利用不同菌種對 MTBE 進行生物降解，發現 TBA 濃度約佔移除 MTBE 含量 6.5-18%，實驗組中加入共代謝物質-正戊烷後，TBA 產生量與 MTBE 移除量較無明顯線性關係，當實驗組 MTBE 被微生物進行降解作用旺盛時，TBA 產生亦會明顯提升；但當 MTBE 分解速率(mg/L/d)漸緩時，會偵測到 TBA 濃度達實驗中最大值，而後逐漸減少，故推測實驗中微生物先以 MTBE 為主要碳源，當代代謝物產出時即轉向較易分解的 TBA 進行降解，藉由了解 TBA 產生與 MTBE 被分解情形之相關性，未來可利用 TBA 發展作為 MTBE 被微生物進行生物分解情形之指標判定，有助於生物復育或自然衰減法長期監測工作之規劃。

結論

本研究利用污染場址的現地菌種進行對 MTBE 的生物分解試驗，發現 *Klebsiella* sp. NKNU01 與 *Bacillus* sp. NKNU01 利用正戊烷可以增加降解 MTBE 效果；對 *Pseudomonas* sp. NKNU01 影響變化不大；而正戊烷對 *Enterobacter* sp. 則都具有抑制生物分解 MTBE 現象。

其中 *Enterobacter* sp. NKNU02 直接代謝 MTBE 效果最佳，但在模擬遭汽油污染地下水中，雖然會被 BTEX 抑制其分解 MTBE 效果。但 *Enterobacter* sp. NKNU02 亦對 Benzene 與 Toluene 具有降解能力，可以再延長實驗時間，監測是否在 Benzene 與 Toluene 被降解至低濃度時，使 MTBE 降解作用再被 *Enterobacter* sp. NKNU02 開啟，恢復其 MTBE 降解率。另外，可以再尋找適當共代謝物質，以維持其在具有 BTEX 環境中分解 MTBE 之效果。

應用本研究發現具有較佳之降解菌種於受汽油污染地下水時，可以考慮先使用具有 BTEX 分解能力菌種降低 BTEX 濃度後，再使用 *Enterobacter* sp. NKNU02 進行 MTBE 分解，避免 BTEX 影響 *Enterobacter* sp. NKNU02 分解率。降解效率較佳的 *Enterobacter* sp. NKNU02，與目前公認 MTBE 降解效率最佳之 PM1 降解速率差異不大，且本研究所使用菌種為台灣本土菌種，更能符合適應當地環境條件，且本研究所使用菌量(OD₆₀₀ 為 0.1)與文獻中菌量相較屬於較低菌數，且培養溫度因為預模擬地下水溫度(25°C)，與文獻中培養溫度相較之下亦較低，且非 *Enterobacter* sp. NKNU02 最適生長溫度，故降解 MTBE 效果會有所限制。若提高培養溫度與增加菌量與文獻相符，推測降解率則會有明顯增加現象，故可以將 *Enterobacter* sp. NKNU02 應用於汽油污染場址生物復育工法規畫。

建議事項

1. 改進分解 MTBE 之生物最佳條件，在實際應用於生物復育法中，可藉由加入以評估後具有分解污染物潛力之微生物，促進生物分解進行清除污染。本實驗中微生物所在之生物反應槽是屬懸浮態生長方式，有文獻指出利用固著物可使微生物承受更高濃度之污染物，且具有更好分解效果，故可以找尋適當之固著物加入生物反應槽中，對增加生物降解效率有所助益。
2. 研究中所測試菌種，因在實驗室中所設定之生長條件對微生物而言為最適當之因子，但實際運用至現地污染場址中，考量因子非只有環境條件，同時需要考量現地微生物菌相，是否會對其造成影響(競爭、拮抗、促進)，都是需要加以評估才可實施進行。再者，對於研究中微生物是否對環境造成二次傷害都需要在實用前進行再研究與測試，才不會在改善污染場址後卻又造成生物污染。
3. 未來後續研究可針對下列各項工作進行，以提高石化污染場址之生物復育成效:
 - (1) 開發對污染場址中污染物具親和力且適合固化微生物的固定化材料，以有效捕捉目標污染物，減少質傳上的阻力，並增加微生物的生存力。
 - (2) 以電腦模擬的方式，說明整個微生物降解的機制，以及質傳上的限制。
 - (3) 開發新一代的生物反應器或組合反應器(氣舉式反應器)，以有效處理土壤中的污染物。
 - (4) 依本研究發現可透過生物科技技術結合環境工程技術，利用具降解功能之蛋白質大量表現於環境微生物體內，藉由生物補強技術以增加實場微生物降解成效。

圖表

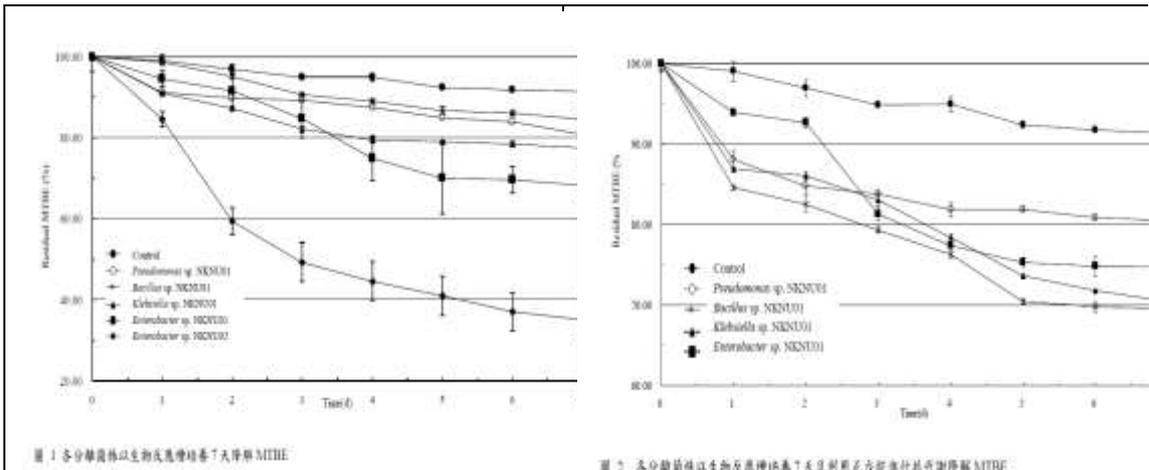


圖 1 各分離菌株以生物反應槽培養 7 天降解 MTBE

圖 2 各分離菌株以生物反應槽培養 7 天並利用正交矩陣進行代謝降解 MTBE

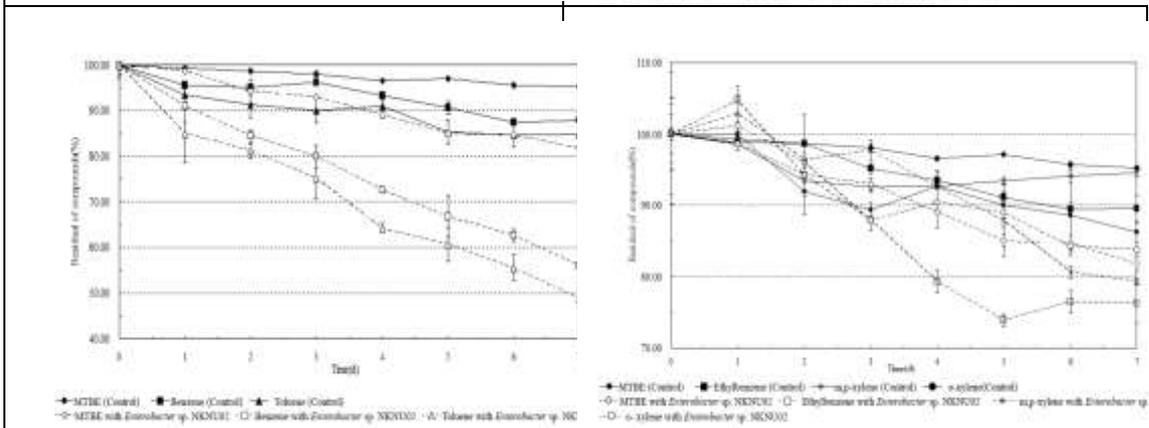


圖 3 *Enterobacter* sp. NKNU02 在培養 7 天生物反應槽試驗中降解 MTBE - 苯與甲苯化合物

圖 4 *Enterobacter* sp. NKNU02 在培養 7 天生物反應槽試驗中降解 MTBE - 乙基與二甲苯化合物

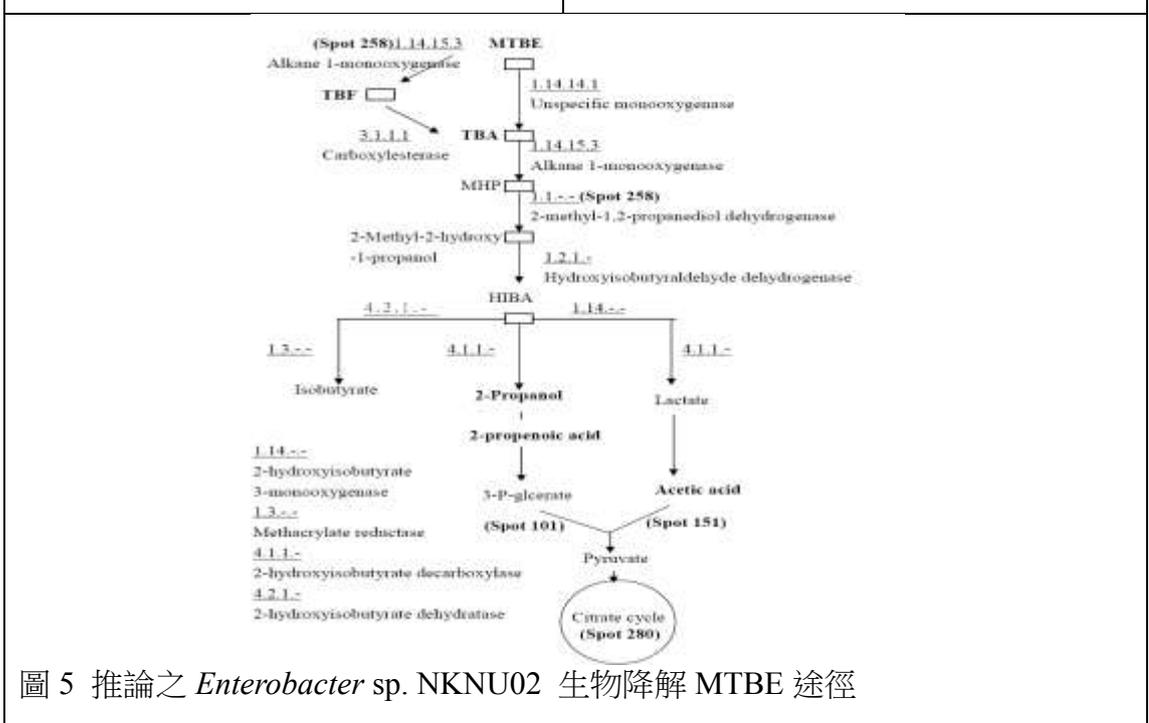


圖 5 推論之 *Enterobacter* sp. NKNU02 生物降解 MTBE 途徑

第一章、計畫緣起與目標

1.1 計畫緣起

石油的成分主要由碳、氫兩種元素組成，此兩種元素佔石油產品組成的95%-98%，含碳原子數從 C₁ 到 C₆₀，其構造包括複雜的直鏈、支鏈、及環狀結構，但也含有少量的硫、氮、氧等元素，石油與其所衍生的化合物通稱為碳氫化合物(hydrocarbon)，含碳愈多，分子愈大，化學結構也就愈複雜。石化污染物是泛指石油和石化工業在開採、運送、及煉製過程中所產生的污染物質，最主要的成分包含：(1)煉油廠製造的石油產品，(2)煉油廠和石化工業廢水中的有機物質和無機污染物，及(3)以石油煉製的石化相關產品。

汽油大量使用下為了提高汽油品質與改善能源轉換率，在汽油中添加了有機鉛以提高辛烷值與抗震爆程度，但 1970 年代後期因為有機鉛之加入導致嚴重空氣污染(Deeb et al., 2003)，因而有含氧替鉛劑之產生，如乙醇、乙醚及甲基第三丁基醚(methyl tert butyl ether, MTBE)等。這些替鉛劑不但可提高辛烷值亦可改善燃燒，且可減少震爆、減少臭氧形成的煙霧、一氧化碳、燃燒不完全的碳氫化合物等空氣污染物，進而改善空氣品質(Waul et al., 2009)。

過去研究顯示，某些有機含氧化合物是性能較好的燃料抗爆劑(Chen et al., 1997)，例如一些醇和醚類化合物就具有這樣的性能。因此關於汽油含氧化合物組成的研究近年來受到人們的重視。汽油中加入有機含氧化合物的目的主要為：(1)替代有害環境之烷基鉛化合物(如四乙基鉛(tetraethyl lead))，提高汽油的辛烷值(Deeb et al., 2003)；(2)使燃料完全燃燒，減少空氣中一氧化碳和烴的含量；(3)減少燃料中芳烴和烯烴的含量，含氧化合物可以使烯烴轉化，避免光化學反應，減少臭氧的形成(Shah et al., 2009; Waul et al., 2009)。

MTBE 屬揮發性有機物(Volatile Organic Compound, VOC)之一種，透過製造、儲存、使用或意外洩漏釋放於環境(Deeb et al., 2000a; Moussavi et al., 2009)，MTBE 可能透過加油站及汽機車排放之廢氣吸入人體、接觸或飲用遭儲油槽滲漏污染之地下水、意外接觸到濺漏的汽油等方式進入生物體中，對生物體之健康風險造成影響(Ahmed, 2001)。以美國為例 MTBE 被大量製造，被認為是具有廣泛污染地下水能力(Deeb et al., 2000a; Schmidt et al., 2004)，因此美國環保署(United States Environmental Protection Agency, USEPA)針對使用於汽油中 MTBE 含量開

始加以限制，甚至於某些區域禁止添加；我國行政院環保署於亦將之公告為第四類毒性化學物質(環保署，2000)。

甲基第三丁基醚污染地下水之復育方式通常是藉物理及化學方式，迄今為止以生物分解 MTBE 研究執行生物復育方式卻極為少數，MTBE 因其物化性質仍被認為是難被生物分解之污染物(Jensen and Arvin, 1990; USEPA, 2004)，本研究利用污染場址分離菌種進行 MTBE 分解效力之評估。

1.2 計畫目標

本計畫應用生物復育法(bioremediation)，針對石化污染場址中受汽油污染的地下水，進行復育成效探討，生物復育法一方面可藉由分子生物技術快速鑑定污染場址之微生物族群結構，另一方面可以判定微生物對污染物傳輸及轉化機制的影響，研究目的為延續研究團隊於 2008 至 2009 年執行環保署委託研究計畫「以微生物及蚯蚓發展石化污染土壤之環境復育技術研究」之具體成果，從汽油洩漏污染場址中分離出五株菌株(*Pseudomonas sp.* NKNU01、*Bacillus sp.* NKNU01、*Klebsiella sp.* NKNU01、*Enterobacter sp.* NKNU01 與 *Enterobacter sp.* NKNU02)，將針對主要汽油添加物-甲基第三丁基醚(methyl tert butyl ether, MTBE)進行生物分解試驗，依先前研究的微生物族群結構，設計不同顆數的純菌株，植入生物反應器中，進行生物復育成效的探討，藉以評估石化污染場址中菌種對污染物分解能力，同時尋找具有最佳 MTBE 分解能力菌種，後續進行在各種條件下污染物分解能力之評估探討，與推估微生物之分解 MTBE 途徑。本計畫各分項目的如下所述：

1. 以批次試驗尋找 MTBE 分解菌種的最佳生長條件

利用不同條件下，最原始的批次試驗找出實驗中五株菌種的最佳生長條件。實驗中所使用的五株菌種為好氧菌(兼性厭氧菌)，故在批次試驗中，推測溶氧值是微生物生長所受限的原因之一(Fortin et al., 2001)。另外，其菌種生長空間受限亦為造成生長困難之因素。在批次試驗中，可以先用多種共代謝物質與 MTBE 進行多碳源代謝培養，加以比較可選出最適合此五菌株的共代謝物質。其目的如下：

(1) 尋找最適合這五株菌種的分解 MTBE 生長環境條件

(2) 評估較適合之共代謝物質

(3) 獲得具有最佳 MTBE 分解能力的菌種

2. 利用生物反應槽評估菌種 MTBE 分解能力

在批次試驗中，首先測試五菌株都可以接受的生長環境條件，以此條件套用到生物反應槽中，由於生物反應槽具有連續調控培養環境條件的能力(Zein et al., 2006)，故可維持菌種生長條件因子。其目的如下：

(1) 利用生物反應槽改良培養菌種生長環境，評估分解能力

(2) 評估菌種分解污染物效力的優缺點、限制...等

3 蛋白質體分析建立菌種的 MTBE 分解途徑

應用生物反應槽評估具有 MTBE 分解效果最佳的菌種，考量 MTBE 分解情形與菌種生長情形，將其菌種蛋白質進行二維電泳分析，並分析鑑定蛋白質種類，藉以建立此菌種的 MTBE 分解途徑。

4 評估不同基質下 MTBE 分解能力

考量汽油發生洩漏，MTBE 會與汽油中主要污染物同時存在，故於具有 BTEX 環境下利用生物反應槽，觀察具有 MTBE 分解效力較佳之菌種分解地下水污染物情形。

5 各菌種分解 MTBE 污染地下水之分解動力學探討

利用生物反應槽試驗中每日所得數據，對各菌種生物分解動力學 (biodegradation kinetics) 進行評估，藉以了解 MTBE 分解情形。其目的如下：

(1) 估算各菌種生物分解速度

(2) 根據質量守恆定律，分析 MTBE 被分解後轉變趨勢

1.3 工作項目

本計畫之工作項目包括下列各項:

1. 批次實驗: 利用不同條件下, 最原始的批次實驗找出五株菌種的最佳生長條件。
 - (1) 進行批次實驗, 推估 MTBE 分解菌最適當菌量濃度, 及找出分解菌最適生長環境條件。
 - (2) 進行批次實驗, 比較分解菌各菌種間分解目標污染物能力。
 - (3) 由批次實驗進行共代謝物質選擇試驗。
2. 生物反應槽: 首先測試五菌株都可以接受由批次試驗求得知生長環境條件, 以套用到生物反應槽, 由於生物反應槽具有連續調控培養環境條件的能力(Zein et al., 2006), 故可維持菌種生長條件因子。
 - (1) 生物反應槽對 MTBE 所造成揮發程度測試。
 - (2) 採用批次試驗條件於生物反應槽, 比較各菌種分解受 MTBE 污染地下水情形。
 - (3) 判斷各菌種於生物反應槽中進行共代謝分解 MTBE 的效力。
3. 蛋白質體分析: 應用生物反應槽評估具有 MTBE 分解效果最佳的菌種, 分析鑑定其蛋白質種類, 藉以建立此菌種的 MTBE 分解途徑。
 - (1) 依據菌種生長與 MTBE 分解程度, 挑選時間點上具代表性菌種蛋白質。
 - (2) 純化菌種蛋白質。
 - (3) 以蛋白質體技術進行鑑定。
 - (4) 針對二維電泳蛋白質表現量差異兩倍以上蛋白質點, 再利用飛行時間質譜儀(MALDI-TOF MS)分析與 PMFs(peptide mass fingerprints)資料庫比對鑑定。
 - (5) 分析蛋白質表現量差異, 應用蛋白質鑑定預測 MTBE 在實驗菌種之生物分解途徑。
4. 評估不同基質條件下 MTBE 分解能力: 考量汽油發生洩漏, MTBE 會與汽油中主要污染物(苯、甲苯、乙苯、二甲苯, 合稱 BTEX)同時存在, 於具有 BTEX 環境下利用生物反應槽, 觀察具有 MTBE 分解效力較佳之菌種分解地下水污染物情形。

- (1) 利用拉午爾定律評估地下水層遭受汽油洩漏時，汽油中目標污染物濃度。
 - (2) 在生物反應槽中，菌種同時分解 MTBE 與 BTEX 之能力，了解污染物 BTEX 影響菌種分解 MTBE 情形。
5. 各菌種分解 MTBE 污染地下水之分解動力學探討: 利用生物反應槽試驗中每日所得數據，對各菌種生物分解動力學(biodegradation kinetics)進行評估，藉以了解 MTBE 被分解情形。
- (1) 分析 MTBE 分解之代謝產物，並建立與 MTBE 之質量關係。
 - (2) 應用生物降解分解動力學建立 MTBE 生物降解模式，以供石化污染場址擬定生物復育策略參考 MTBE 生物分解。

1.4 執行進度

依據合約規定本計畫執行期間自 2010 年 12 月 29 日起至 2011 年 12 月 28 日止完成，共計 365 日曆天，工作進度詳見表 1-1。

本計畫於 2010 年 12 月 28 日議價後，於 2011 年 1 月提送第一次工作報告書，於 5 月 2 日提送期中報告，於 8 月 2 日提送第二次工作報告書，有關所完成之各項工作執行成果摘要如表 1-2 所示。

計畫執行工作包括如下:

表 1.1 本計畫預定工作進度及查核點

工作項目	月	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	備註	
批次試驗															
菌種分解能力		■													
共代謝物質挑選		■													
適當菌量挑選			■												
生物反應槽試驗															
各菌種分解能力			■												
共代謝作用試驗			■												
BTEX 對菌種分解 MTBE 影響					■										
蛋白質體分析															
分析各蛋白質表現量						■									
鑑定各蛋白質及確定其功能							■								
推估 MTBE 生物分解途徑							■								
監測 MTBE 分解產物						■									
分析分解產物與 MTBE 關係						■									
期中報告						◎									
期末報告													◎		
工作進度估計百分比 (累積數)		10%	15%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%	100%		
預定查核點		第 1 季：完成批次試驗、第一次工作進度報告													
	◎	期中：進行生物反應槽試驗、完成期中報告													
	◎	期末：推估 MTBE 生物分解途徑、生物復育效益評估、完成期末報告													

表 1-2 本計畫主要工作執行成果

重要工作項目	工作比重%	預定進度	2011 年					總進度%	
			1-2 月	1-2 月	2-3 月	3-4 月			
1. 批次試驗	20	工作內容及 權重	單一菌種分解試驗(5%)	混合菌種分解試驗(5%)	共代謝降解試驗(7%)	適當菌量挑選(3%)			
		進度百分比	100	100	100	100		20	
2. 生物反應槽試驗	40	預定進度	3-7 月	4-8 月	5-8 月				
		工作內容及 權重	菌種分解試驗(15%)	共代謝降解試驗(15%)	BTEX 對菌種分解效力影響(10%)				
		進度百分比	100	100	100			40	
3. 蛋白質體分析	25	預定進度	4-5 月	4-5 月	6-9 月	7-10 月	7-10 月		
		工作內容及 權重	蛋白質樣點選取(5%)	蛋白質萃取淨化(5%)	分析蛋白質表現量(5%)	鑑定各蛋白質及確定其功能(5%)	推估 MTBE 生物分解途徑(5%)		
		進度百分比	100	100	100	100	100	25	
4. 降解動力學	15	預定進度	6-10 月	6-11 月					
		工作內容及 權重	監測 MTBE 分解產物(5%)	分析分解產物與 MTBE 關係(10%)					
		進度百分比	100	100				15	
5. 期中及期末報告撰寫	-	預定進度	12-1 月	1-3 月	4-5 月	5-10 月	10-11 月	11-12 月	
		工作內容	第一次工作進度報告		期中報告撰寫			期末報告撰寫	
		進度百分比	100	100	100	-	-	100	
累計總進度	百分比		15	30	50	70	80	100	100

第二章、計畫背景

2.1 土壤及地下水油品污染概況

加油站數目為國家經濟活動發展之重要指標之一，依據經濟部能源局於2011年4月份之統計資料顯示，全國公民營加油站共計2,631座，以台中市329座分布最多，其次為桃園縣及台南市。加油站的普及化對經濟活動與人們生活帶來很大便利，但也因為趨於便民考量許多加油站設立於人口密集都會區，隨著環保意識高漲以及環保法規關注下，加油站是否會影響附近居民生活品質，逐漸受到關切。另外若以1個加油站平均有4座地下儲油槽估算，全國至少約有10,400餘座地下儲油槽，其數量相當可觀，倘該等地下儲槽系統發生油品滲漏導致土壤及地下水污染時，由於隱藏於地下環境，當發生污染時往往不易察覺，而任何污染持續與惡化，終將達到危害人類環境與破壞生態的程度(環保署, 2007)。

如油槽車卸油及車輛加油過程中，產生揮發性有機污染物溢散、油品洩漏造成土壤及地下水污染等，若洩漏造成地下環境污染，則在長期暴露情況下會對人體健康造成相當程度的危害，故特別需要重視土壤及地下水污染概況。土壤與地下水被燃料油、汽油、柴油及其他油品所污染為日趨普遍且嚴重的問題。油品污染之主要來源包括地下儲油槽(underground storage tanks, USTs)漏油、油管破裂、及地面油品意外洩漏等。在美國有三百萬以上的儲油槽，據估計有35%的儲油槽可能在漏油(Brar et al., 2006)；在台灣，油品污染亦是主要的土壤及地下水污染來源。中油公司高雄煉油廠及苓雅寮儲運所之漏油事件即為兩起過去頗受矚目之案例。油品中之主要組成包括總石油碳氫化合物(total petroleum hydrocarbon, TPH)、汽油添加劑-甲基第三丁基醚、BTEX(Benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes)及TMB (1,2,4-trimethylbenzene and 1,3,5-trimethylbenzene)均對人體造成危害，其中MTBE及苯皆屬具有高水溶性及對土壤吸附性低之特性，因此當其洩漏至土壤後，會迅速的滲漏至地下水中，並形成一範圍廣大之污染團，進而增加整治上之困難(Brar et al., 2006)。

當油品發生洩漏後，污染物首先滲透到不飽和層，然後依據污染物的特性，土壤結構以及場址狀況等因素，污染物極可能滲透至含水層，而污染地下水。尤其是當滲漏之污染物量非常大時，污染物將吸附在土壤中形成非水相溶液

(non-aqueous phase liquids, NAPLs)，並緩慢脫附而形成一長期之污染源，對地下水之水質造成長期危害(Soga et al., 2004)。在世界各地地下水使用情形，在美國有25%之用水(包括飲用水，農業用水，工業用水等)來自地下水，50%之飲用水來自地下水。依經濟部水利署2008年資料(經濟部水利署/水力統計)，全國總用水量為179.8億立方公尺，主要用途依序為農業用水、工業用水、與生活用水，其中抽用地下水58.3億立方公尺，占全部用水量之32.4%(環保署，2010)。故若地下水遭受污染，將會造成民生安全與各產業界之重大影響。

2.2 汽油中含氧添加物質

在 1920 年代為了改善汽油性能，因此在汽油中添加四乙基鉛(Tetra ethyl lead, TEL)藉以提高辛烷值與抗震爆性。到了 1970 年代後期，使用汽油導致有機鉛排放進而造成嚴重空氣污染(Deeb et al., 2003)，因而有替鉛劑產生，如乙醇、乙醚及甲基第三丁基醚等。這種替鉛劑不但可提高辛烷值亦可改善燃燒，且可減少震爆、減少臭氧形成的煙霧、一氧化碳、燃燒不完全的碳氫化合物等空氣污染物，進而改善空氣品質(Waul et al., 2009)。

汽油含氧添加劑為近來多受重視之研究議題，在 1970 年起含氧添加劑開始被應用在汽油中，其中甲基第三丁基醚(MTBE)添加體積百分比約為百分之七，於 1979 年起 MTBE 被開始正式當作氧化劑(Oxygenate)加入汽油中使用，添加體積提高約為 11-15%。從 1979 年起直到 1980 年代中期，新英格蘭、紐澤西、美國東岸等地區開始廣泛使用。美國環保署(USEPA)分別於 1992 年與 1995 年開始推動 Wintertime Oxyfuel Program 與 Federal RFG (Reformulated gasoline) Program，預期汽油能達 1990 年空氣清淨法(Clean Air Act)修正條款要求。

Oxyfuel Program 中要求在秋冬季節，一氧化碳排放較高之地區其汽油中含有氧氣重量百分比需達 2.7%以上，故 MTBE 添加於汽油中時，其體積百分比必須達到 15%才會符合標準要求；RFG Program 則要求空氣污染嚴重的都會區全年度汽油中含氧之重量百分比需要達 2%以上，其添加的 MTBE 體積也需要約 11%以上才可符合要求。

2.2.1 含氧添加劑種類

汽油中加入有機含氧化合物的目的主要為(1)替代有損環境和催化劑的烷基鉛化合物，提高汽油的辛烷值；(2)使燃料完全燃燒，減少空氣中 CO 和煙的含量；(3)減少燃料中芳烴和烯烴的含量。含氧化合物可以使烯烴轉化，避免光化學反應，減少臭氧的形成(Shah et al., 2009; Waul et al., 2009)。

除了 MTBE 之外，乙基第三丁基醚(ethyl tert-butyl ether, ETBE)、第三戊基甲基醚(tert-amylmethyl ether, TAME)(Korte et al., 1997)、二異丙基醚(diisopropyl ether, DIPE)、第三丁基醇(tert-butyl alcohol, TBA)、甲醇(methanol)、乙醇(ethanol)等(Schmidt, 2003)，均屬於含氧有機物，可作為含氧添加劑使用。70 年代末期，人們開始重視對醚類化合物的開發。除了具有上述作用以外，它們不會像甲醇那樣由於共沸作用而改變汽油的蒸發特性，醚類蒸汽壓遠遠低於醇類，在水中的溶解度小於醇類，上述特性是醚類成為添加於發動機燃料之主流原因(Schmidt, 2003)。

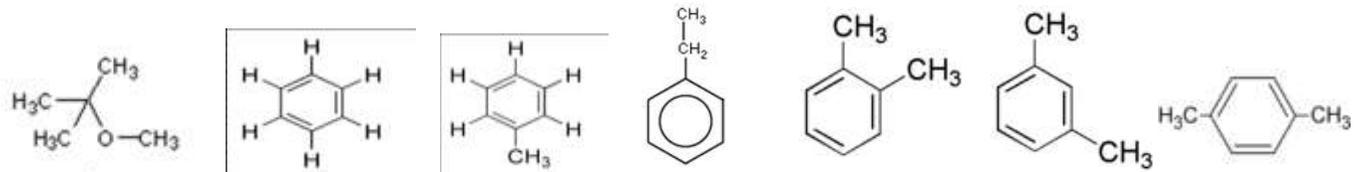
添加在汽油中的含氧物質種類繁多，其目的為代替鉛以提高辛烷值，減少空氣污染物的產生。甲基第三丁基醚是目前含氧添加劑中應用最為廣泛的化合物之一，在過去 30 年來成為廣泛的污染物(Chen et al., 2008a)。由於 MTBE 具備高辛烷值、製造成本低、與汽油互融易於摻配、易於轉移與分佈等特殊物理化學條件所造成的優勢更是使 MTBE 在含氧添加劑選擇上獨占鰲頭(Squillace et al., 1996; Davidson et al., 2000)。其次為甲醇、乙基第三丁基醚、第三戊基甲基醚、二異丙基醚等(Squillace et al., 1998)。以 1997 年為例，美國 MTBE 年平均生產量約有 80 億公斤；我國國內每年使用量大於五十萬噸。

2.2.2 甲基第三丁基醚之基本物化性質

MTBE 化學式為 $(CH_3)_3COCH_3$ ，結構式如表 2.1，分子量為 88.149，是由天然氣中的甲醇與異丁烯合成出來的一種人造化學物質，屬高揮發性有機物，在大氣中可完全以氣相狀態存在，在室溫時無色但在高溫下有刺鼻味。沸點為 55.2 °C，由純相溶於水中溶解度為 43000-54300 mg/L，由汽油中溶於水之溶解度為 5200-5400 mg/L，屬高水溶性(USEPA, 2004)，且分配係數辛醇比低($K_{ow} = 1.2$)；

表 2.1 MTBE 與 BTEX 物化性質表

	MTBE	Benzene	Toluene	Ethylbenzene	<i>o</i> -xylene	<i>m</i> -xylene	<i>p</i> -xylene
Molecular weight [g/mol]	88.2	78.1	92.1	106.2	106.2	106.2	106.2
Specific gravity	0.74	0.88	0.87	0.87	0.88	0.86	0.87
Boiling point (°C)	53.6–55.2	80.1	110.6	136.3	144.4	139.3	137–138
Water solubility [mg/L]	43 000–54 300	1780	515	187	180	158	175
Vapor pressure [mm Hg]@25 °C	245–256	76–95	28	9.53	6.6	8.3	8.7
Log K_{oc}^a	1.0–1.1	1.5–2.1	1.6–2.2	2.0–3.0	1.7–1.8	2.2–3.2	2.1–3.1
Log K_{ow}^b	1.2	1.6–2.2	2.1–2.8	3.2	2.8–3.1	3.2	3.1–3.3



^a K_{oc} is the organic carbon based partition coefficient.

^b K_{ow} is the octanol water partition coefficient.

Adopted from Mackay and Shiu, 1981; Deeb et al., 2000a; and Mackay et al., 2006.

密度為 0.74 g/mL，比水的密度小；低吸附能力(Squillace et al., 1996; Shaffer and Uchirin, 1997; Fischer et al., 2004);亨利常數(K_H)於 10 °C 約 0.01(Fischer et al., 2004)。由表 2.1 可知 MTBE 從溶解態(水相)揮發到氣相的量遠比苯低(亨利常數苯為 MTBE 十倍大)，MTBE 在土壤中有機碳上的吸附潛勢較苯為小(MTBE 之 K_{oc} 為最小)，且因為其化學結構具有第三丁基官能基與醚鍵，屬微生物較難進行分解之化學結構，故分解性較苯小(Suflita and Mormile, 1993)。

MTBE 屬高水溶解性且吸附常數(K_{oc})低，故使 MTBE 污染團在地下水中移動速度與地下水流一致(Squillace et al., 1997)。此特性也造就 MTBE 在地下水中高移動性，進而不易被微生物所進行分解。最常發現有 MTBE 污染情形是在儲油槽洩漏，其水溶解度比其餘在汽油中的污染物大，且在汽油中所占比例也相對的比較高情形下，相較於共同出現污染物(如: BTEX)，BTEX 較容易吸附於地下水層，造成較低移動性，使 MTBE 污染團位於 BTEX 污染團前端(Stocking et al., 2000)，故在地下水檢測中 MTBE 是最常被偵測出之汽油洩漏污染物(Squillace et al., 1996)。

MTBE 具有高揮發性，因此主要之空氣污染源包含在製造、汽油混合、運送與儲存過程中逸散。除此之外，汽油引擎與油箱，更甚於管線亦或是汽機車在排放廢氣時都有 MTBE 污染現象。有報導顯示在使用 MTBE 的地區，汽機車排放碳氫化合物廢氣中，MTBE 約占有 2.5%；在汽油揮發逸散之碳氫化合物中 MTBE 占約 8-10% (USEPA, 2002)。

2.2.3 甲基第三丁基醚在環境中之宿命與傳輸

MTBE 污染途徑為透過油庫或儲油槽的裂縫而滲漏至地表下，造成地下水水源污染，地下水污染(Squillace et al., 1995; Church et al., 1997; Bradley et al., 1999; 2001a) 因其具備高水溶解性、低分配係數、生物難分解性，大多分佈於地表水(Reuter et al., 1998)、逕流水、土壤或空氣(Backer et al., 1997; Grosjean et al., 1998)，依據 2000 年 3 月美國化學協會 (American Chemical Society) 調查報告指出，美國有三十一州九千個社區水井水質被 MTBE 污染(American Chemical Society, 2000)。

甲基第三丁基醚在環境中之宿命與傳輸如下列所述:

1. 土壤流佈：若 MTBE 洩漏於地表上，會溶於水中並下滲進入土壤，其亨利常數為 5.87×10^{-4} mmHg/mole/L 及蒸汽壓為 249 mmHg，故其可逸散至土壤孔隙中。 K_{oc} (污染物在土壤有機碳與水之分配係數)為 11.2，故在土壤中之移動性極大，可能污染地下水(Squillace et al., 1997)，可被底泥中之微生物分解但不水解。
2. 水體流佈：MTBE 若在含水層則不易揮發，文獻指出在地下水半衰期約為 2 年(Suflita and Mormile, 1993)，污染團則會與地下水流移動傳輸，而傳播四處各地造成廣泛的環境污染。MTBE 在水中不會吸附在沈澱物或懸浮微粒上、不易水解、不會在水生植物或魚體中行生物累積作用。根據亨利常數其於水表面層可迅速地揮發，半衰期約 4.1 小時。MTBE 可透過水中底泥之微生物進行分解移除(Hubbard et al., 1994; Davidson, 1995)。
3. 空氣流佈：MTBE 是高揮發性有機物，在大氣中可完全以氣相狀態存在。MTBE 與光化學氧化產物氫-氧自由基($HO \cdot$)作用之半衰期為 5.6 天。由於醚類無法接受波長大於 290nm 之光波，故直接光解非其重要反應(Roy et al., 1997)。

2.2.4 甲基第三丁基醚毒性資料

MTBE 已經被美國環保署證實對一般動物具有致癌的潛在危害，如肝細胞線瘤、腎小管細胞瘤、睪丸癌、血癌或淋巴腫瘤等。目前對人類的致癌性尚無實驗證明，但是暴露在高濃度的 MTBE 時，會引起噁心、嘔吐、頭暈、意識不清等症狀(USEPA, 2002)。於 1992 年，美國阿拉斯加有超過一百五十位居民在吸入含 15% MTBE 的汽油後，產生了頭痛、暈眩、睏倦、噁心、嘔吐、喉部刺激及失去方向感等症狀(USEPA, 1997a)。目前美國環保署已把 MTBE 列為 C 級(可能為)造成人體的致癌物質，我國環保署亦將其列為第四類毒性化學物質。

有關 MTBE 的毒性研究資料，其非致癌毒性之最低劑量，經由吸入暴露以未造成不良健康效應之濃度(no observable adverse effect levels, NOAEL)為 1,440 mg/m^3 ，急性致死濃度為 649,000 mg/m^3 (USEPA, 1997a；環檢所，2002)。

因為 MTBE 揮發性高，所以駕駛人在行駛或加油過程中都會接觸或吸入，甚至於在主要幹道與高流量道路空氣中都會偵測微量 MTBE，透過攝入到被 MTBE 污染之地下水亦會造成健康風險影響。

MTBE 進入人體有三種途徑，吸入、皮膚接觸與吞食(Ahmed, 2001)。MTBE 被吸入人體中，大部分會經由呼氣方式排出體外，少部分會經由尿液以 MTBE 與代謝產物(第三丁醇, *tert-butyl alcohol*, TBA)形式排出，且因 TBA 水溶解度較 MTBE 高，故停留於人體時間較長。目前已知 MTBE 在人體中代謝物為第三丁醇、乙醛、二氧化碳與丙酮等(Belpoggi et al., 1995)。

MTBE 目前被發現對人類與動物健康有危害性，少量吸入會有鼻、喉以及上呼吸道刺激，高濃度可能會有麻痺及抑制中樞神經系統等症狀，長期且太高濃度暴露被認為對淋巴、血液、腎臟、肝臟、睪丸有潛在的致癌性。在呼吸毒性測試中，發現 MTBE 會造成大鼠腎臟癌及小鼠肝細胞腺腫瘤與惡性腫瘤的發生率增加(Bird et al., 1997)。此外在餵食毒性測試中，發現 MTBE 造成大鼠淋巴瘤、白血病及睪丸腺腫瘤的發生率增加。因此推論 MTBE 經由食入及吸入均有導致癌症的潛在風險(Belpoggi et al., 1995)。目前 MTBE 的致癌機轉尚未明確，但動物致癌性是可以確定的，因此在使用量成長快速的情形下，MTBE 的大量使用，是否對人類造成致癌危害令人憂心(環檢所，2002)。

2.2.5 世界各國使用及限制甲基第三丁基醚情形

美國是 MTBE 最大製造地與消費地，因廣泛使用 MTBE，而使其成為在美國地下水中最常見的污染物(Deeb et al., 2000a; Schmidt et al., 2004)。因為地下水中普遍皆偵測到 MTBE 使美國環保署(USEPA)對其加以限制，更甚禁止 MTBE 作為汽油中含氧添加劑(Bradley et al., 2001a)。

全球 MTBE 產量以 1997 年為例約為 200 億噸，其中 30.3 億是由歐洲製造，英國使用量約為 1.4 億噸(European Fuel Oxygenates Association, 2002)。之前研究報導中，MTBE 在歐洲影響不廣泛，有部分原因是因為添加於汽油中比例太低(Shah et al., 2009)，且 MTBE 在歐洲(European Union, E.U.)添加於汽油中價格昂貴，MTBE 在歐洲汽油中含量約 1-5%，然而在某些國家甚至會添加到 15% (Eweis et al., 1997;

Morgenroth et al., 2003), 而美國添加量約為 10-15% (Hall et al., 2000; EFOA, 2002), 故相較之下歐洲 MTBE 污染沒有美國廣泛。

在亞洲地區，甲基第三丁基醚廣泛使用於韓國、台灣及泰國，在日本、馬來西亞、印尼及中國大陸亦有使用，但其用量占總汽油消耗的比例較少。在 2005 年，MTBE 在全亞洲之消耗量將超過 80,000 桶/天。其中台灣每天平均消耗 9,700 桶，截至目前為止，國內甲基第三丁基醚使用量每年大於 50 萬公噸，大部分仰賴進口，本國業者自行產製者約 20 萬公噸(環保署，2001)。

目前世界各國只有美國加州與紐約分別於 2002 年與 2004 年全面禁用，其他國家均尚未限制。我國環保署於民國八十九年三月十五日公告 MTBE 為第四類毒性化學物質，管制濃度標準為 20 w/w %，適用毒性化學物質管理法第二十三、二十九、三十三、三十四條規定加以列管，但尚未禁止使用。

美國環保署為澄清此物質在飲用水中對人體潛在的健康風險，進行研究期程超過四年以上評估。MTBE 出現於飲用水時，從味覺與嗅覺可被判斷出最小濃度為 2 g/L(Fiorenza et al., 2003)。美國飲用水諮詢委員會在西元 1997 年 12 月對 MTBE 建議在飲用水中的濃度範圍為不可超過 20-40 g/L (Bradly et al., 1999)，主要基於嗅覺與味覺之考量，並且對健康無負面影響所設定之標準。美國環保署已於西元 2000 年將其納入飲用水水質標準中管制項目。美國各州自 2000 年起陸續全面禁用 MTBE 或降低 MTBE 可添加比例上限，其中密西根州、明尼蘇達州、科羅拉多州已全面禁用。另外美國加州飲用水條例(California Department of Health Services, 1999)限制 MTBE 檢出濃度不得超過 5 g/L，於 2003 年起 MTBE 逐漸減量退場；但歐盟則在去年初決議暫不禁用(Weaver and Exum, 2007)；在丹麥限制 MTBE 濃度亦為 5 g/L，且希望可低於 2 g/L (Waul et al., 2009)；在義大利，規範 MTBE 在地下水中濃度最大不得超過 10 g/L(Volpe et al., 2009)。

2.2.6 甲基第三丁基醚替代物質發展狀況

1994 年時美國環保署聲稱氧化劑使用會超過 30 %，到 2000 年會超過 70 %，未來會持續增加(USEPA, 2006)。MTBE 易於儲槽或管線滲漏而污染地下水源，且其對人體健康之毒害性也備受爭議，美國環保署(USEPA)首先制訂油槽法令以管理

防止漏油及測漏，自 2000 年起陸續全面禁用或降低 MTBE 在汽油中使比例上限；美國環保署並研擬以其它含氧添加劑取代 MTBE 可行性(Weaver and Exum, 2007)。

一旦禁用MTBE，除將造成生產廠商的蒙受巨額損失外，MTBE是否有良好的替代品，亦是當前世界各國相當重視的問題。MTBE 的替代品主要可分為醚類，如ETBE、TAME及DIPE，與醇類(如甲醇與乙醇)等二種。

由於 MTBE 的生產量受異丁烯原料的限制，近年來人們對 TAME 的研究也很活躍。雖然 TAME 的抗爆程度略低於 MTBE，但是其具有非常適宜的蒸汽壓、較高的沸點和極小的極性，能與汽油很好地調合，成為繼 MTBE 之後發展最快的含氧化合物。另外關於 ETBE 的發展，主要取決於原料甲醇和乙醇在市場上的競爭。另外由於乙醇與 ETBE 為目前發展最普遍的生質燃料，具備原料取得容易與環境友善的特性，係目前最受矚目的 MTBE 替代品。MTBE、ETBE 與生質酒精在生產製造與各項特性上亦有許多差異，茲簡述如表 2.2。

表 2.2 含氧化合物之比較

	甲基第三丁基醚 (MTBE)	乙基第三丁基醚 (ETBE)	生質酒精 (bioethanol)
Source	Methanol and isobutylene	47% methanol and 53% isobutylene	sugar cane, sugar beet or cereals
Solubility (mg/L)	43000-54300	26000	Miscible
Octane Value	116	111	108
Vapor Pressure (mm Hg)	245-256	152	49-56.5
Advantage	<ol style="list-style-type: none"> 1. low cost 2. high octane value 3. ease of transfer and distribution 4. ease of blending with gasoline 	<ol style="list-style-type: none"> 1. similar property with MTBE, no modification of transfer lines and engines 2. aerobic biodegradable 3. blended with petrol without changing the vapour pressure 	<ol style="list-style-type: none"> 1. the most universal biofuel
Disadvantage	<ol style="list-style-type: none"> 1. high aqueous solubility 2. possible human carcinogen 3. recalcitrant to biodegradation processes 	<ol style="list-style-type: none"> 1. high cost 2. less output 	<ol style="list-style-type: none"> 1. high volatility 2. ozone forming potential 3. damage to car engines

(資料來源: 吳, 2008; Piel and Thomas, 1990; Niven, 2005)

2.3 土壤及地下水整治技術發展趨勢

在許多不同的污染場址整治工程中，通常所遭遇到的二個主要的問題為：

1. 尋找合適整治污染技術
2. 在污染場址特定條件下，評估挑選使用工法原則並無加以規定

污染場址整治技術可依受污染土壤或地下水之取出與否、整治機制、處理程度差異與待整治之污染物濃度將其分類。受污染土壤或地下水之取出與否可分為現地方法(in-situ)及離地方法(ex-situ) (Randall et al., 1992)；依整治技術所使用之機制歸屬可分為物理化學方法、生物方法、熱處理方法等；依其對污染物之處理程度差異可以分成不移動化或阻絕技術(immobilization/Isolation)、破壞性技術(destruction)、分離濃縮技術(concentration/separation)、毒性/移動性降低技術(toxicity/mobility reduction)等；依待整治之污染物濃度及強度則又可分為污染源(source)整治技術、污染團中心區(core zone of the plume)整治技術、以及污染團邊緣區(distal zone of the plume)整治技術等(Siegrist et al., 2001; Kao et al., 2005; Brar et al., 2006)。

2.3.1 現地土壤及地下水整治技術介紹

1. 自由態產物回收(free product recovery)

當油品洩漏於地表時，油品中部分有機物含量高且水溶解度相當低，所以當油品與地下水層接觸時，會形成非水相液體(Nonaqueous Phase Liquids, NAPLs)，依照比重區分為比重比水低者之輕非水相液體(Light nonaqueous phase liquids, LNAPLs)與重非水相液體(dense non-aqueous phase liquid, DNAPLs) (Yang, 2002)。

事實上對於非水相液體回收是意外事件後緊急應變程序中最重要的一環，地面的作業包括液相的有機化合物及土壤的緊急處置，而地下層處理作業則首重污染範圍控制及浮油回收。通常區域性的地下水NAPLs整治在採用浮油回收方式時，尚需配合該區域之污染成因、種類、分布範圍、水文特性及地表特徵為考量。

2. 土壤氣體抽取法(soil vapor extraction)

土壤氣體抽取法又稱為土壤真空抽取法，為現地復育技術之一，可將吸附於不飽和土壤中油品濃度減低。土壤萃取系統之操作效率主要取決於兩特性：土壤

滲透性及污染物揮發性。基本上，此二因子決定了最初的污染物抽取速率，而隨著操作的時間增長，土壤中污染物濃度下降後，抽取速率亦會隨之下降。主要利用抽真空的技術使土壤中成負壓環境，將油品中揮發性物質移除。抽取出氣體需要經過再處理(例如:活性炭吸附有機物)後，才可以排放於大氣環境。此技術常用於去除地下儲油槽中之揮發性有機物或半揮發性有機物(semivolatiles organic compounds, SVOC)，較輕質(或更易揮發)之油品使用SVE技術進行整治是較容易成功的，例如汽油、柴油、燃料油、煤油等其揮發性較汽油差，較不易以SVE系統進行整治(Beckett and Huntley, 1994)。

3. 空氣注入(air sparging)

空氣注入法藉由注入空氣在地下水中產生氣泡，將水中污染物氣提趕出到不飽和層中，再配合空氣抽取設備(SVE)將氣體抽至地面處理。在注入氣體同時，增加地下水與不飽和層土壤氧氣濃度，進一步提升污染物生物降解作用。在操作空氣注入系統時，污染物主要藉由下列三個程序移除: (1)溶解性之揮發性有機物的現地提除(stripping)；(2)使地下水位下及毛細邊緣所捕捉及吸附之污染物揮發(volatilization)；(3) 溶解性及吸附性污染物之好氧生物降解(Alan et al., 1999)。

以現地空氣注入法整治石油碳氫化合物污染場址時可發現，在整治前期內，提除及揮發對移除碳氫化合物之貢獻較以生物降解方式多。相較於傳統抽取處理系統(pump and treat)，將受污染地下水抽出於地表在加以處理過程，產生較少廢水問題。空氣注入法則更適用於處理受汽油污染之地下水，主要去除之污染物為揮發性有機物及部分的燃料油，以汽油主要成分BTEX為例，同時具有氣提與促進生物分解作用。因為空氣注入法需要透過氣泡傳送，對於均質且透水性高之含水層效果最佳。但因注入氣泡分布不均可能造成污染擴散現象，使用尚須多方評估。一般而言，高揮發性之污染物之主要去除機制是揮發，而低揮發性之污染物主要去除機制則是生物降解。因此在整治的初期，氣體抽除是移除機制主要之控制因子，而生物促進程序(biostimulation process)則是整治後期之控制因子，亦常稱生物注氣法(biosparging)。

4. 現地熱處理法(in-situ thermal treatment)

指將高溫熱空氣、熱水或蒸汽注入地下環境中，或利用電阻、電磁或加熱的方式，使土壤中之有機物藉由揮發、汽化、脫附及移動等機制，將有機污染物(尤其是非水相液體)移動化，並配合適當之不飽和層抽氣，將揮發之物質抽出以達到整治的目的(USEPA, 1997b)。

5. 現地化學氧化技術介紹(in-situ chemical oxidation, ISCO)

可在現地分解破壞石油碳氫化合物，和其他整治技術比較之下，污染物可在短時間內削減與降解。其原理為將氧化劑送入到地下，以轉換目標污染物(contaminants of concern, COC)，並降低其質量、移動性或毒性的方法。因此氧化劑之氧化能力和傳輸能力即是影響ISCO整治效率之主因(Li and Schwartz, 2004; Brar et al., 2006)。目前有幾種化學氧化劑以使用於各污染場址中。目前應用處理污染物之氧化劑包括有Fenton試劑、臭氧(ozone)、過錳酸鹽(permanganate, KMnO_4)及過硫酸鹽(persulfate)。現地化學氧化法的適用範圍非常廣，不論是污染源區或污染團區，均可以此工法進行應用整治，但必須注意注入之劑量，以免對於現地微生物生態造成影響(Ferguson et al., 2004)。

6. 監測式自然衰減法(monitored natural attenuation)

監測式自然衰減是一種被歐美國家認可的整治技術之一。自然衰減法係指土壤與地下水中的污染物質進行自然清除或衰減的過程，機制包括延散、稀釋、吸附、揮發、化學與生化穩定化及生物衰減等，經由其中一種或多種機制作用，可有效減低污染物濃度，以達到降低污染物對環境及人類健康危害的目的。此過程可減少污染物之重量、毒性、移動性、體積或濃度。大多數污染場址均會發生自然衰減，但須配合適當的地下狀況才有較佳的清除效果，否則整個清除程序將會非常緩慢或導致清除效果不完全。科學家利用儀器監測或採樣檢測，確保自然衰減作用持續進行，此方法稱做監控的自然衰減法。

2.3.2 非現地土壤及地下水整治技術介紹

1. 抽取處理系統(pump and treat)

為最被廣泛使用的地下水整治技術，即使許多技術推陳出新，抽取處理法仍是最被常使用方式。抽取處理系統主要目的有二：侷限控制，防止污染物擴散；

整治(restoration)，將污染物移除。利用抽水井將受污染之地下水抽到地表進行處理，利用活性碳吸附法(actively carbon adsorption)、生物處理法、濾膜法、離子交換法、化學氧化法，以去除污染物；經處理後的水可重新注入地下水體中或直接排入地面水體，或是排放至廢水處理廠。當受污染的地下水抽至地面後，我們可以使用處理飲用水及廢水的技術將地下水中之污染物移除至極低濃度。然而從含水層中抽取受污染的地下水並無法保證所有的污染物皆可從場址中移除(USEPA, 1998)。

2. 熱脫附技術

應用在將挖掘出土壤送到機器中，加熱到污染物沸點之上，使其完全氣化已達脫附之目的，所使用溫度大約為 150-300°C (低溫熱脫附)與 400-600°C (高溫熱脫附)，污染物自土壤中脫附出來後轉成氣態，經由後續空氣處理設備去除懸浮固體與有機氣體然後排放，土壤處理後經長期監測後方可再利用。

2.3.3 MTBE 污染整治技術

相較於其他汽油之主要成分，MTBE 本身分子構造穩定，導致在環境中之生物分解性較低，研究指出在厭氧的情況下，微生物幾乎很難分解 MTBE，且 MTBE 不易被土壤和含水層的物质所吸收，故其在地下水層中之傳輸速度較其他汽油主要成分為快。MTBE 的特性使得其不易自水中移除，一些環境復育技術曾被使用來去除水中的 MTBE，但大多數處理效果不佳且費用偏高(Chen, 2005a; 2005b)。依目前可被利用之水質處理技術為：

1. 抽取處理系統

在污染場址裡，將受污染的地下水抽出後，再經活性碳等方法處理。以活性碳來說，吸附水中的 MTBE 污染物質之效果並不理想，只能夠去除 1/3~1/8 左右，可能和 MTBE 本身物化性質有關；根據研究指出，利用空氣曝氣法可將濃度 20 ppm 降到 10 ppb 的範圍內，以處理成本較利用紫外光-觸媒氧化法便宜，因此可說是經濟的處理技術之一(USEPA, 1998)。

2. 空氣注入法(air sparging)

研究中指出在二年內可將污染物濃度 1000 g/L 降到 10 g/L 左右，可以說相當有效的方法之一(USEPA, 1998)。利用土體加熱/氣提法整治受 MTBE 污染土壤時，顯示土壤溫度之升高有助於 MTBE 之快速移除。另在利用蒸氣注入/真空萃取法整治 MTBE 污染土壤時，發現一小時內即可達 90 %以上之移除效率。

3. 高級氧化法

光催化分解(Photocatalysis)為一種高級氧化技術，利用催化劑於適當之光源照射下，進行低溫且快速之氧化反應，將有機物完全礦化，最終產物常為二氧化碳、水等無害無機物，也就是光催化分解利用半導體材質(如：二氧化鈦，TiO₂)在適合之光源照射下，將半導體激發成為催化劑，以加速氧化還原反應之進行，迅速分解有機污染物，並可能使一非自發性反應發生(Stefan et al, 2000)。

2.4 生物處理技術

生物處理技術是利用微生物分解受污染土壤或地下水的污染物，特別是有機污染物。由於生物復育成本較低，且微生物多可將有毒害之污染物分解轉換成無毒產物，因此被廣泛應用土壤與地下水污染整治。

2.4.1 現地與離地生物復育法

在土壤污染生物處理技術整治上，同樣也可分現地及離地處理二大類別。前者不開挖土壤，利用提供足夠氧氣(電子接受者)與適當營養鹽(如氮、磷等)至飽和層中，此法稱生物通氣法，供給氧氣方式與SVE相同，只是空氣流量遠小於SVE。後者是將受污染土壤移出，到現場或移到其他場所的表面進行處理，此法可迅速解決污染場址問題(DeJong et al., 2010)。

地下水污染整治方面，大多是利用現地處理方式，讓受污染地下水留在地下水層進行生物分解。其中分成無需人為介入控制與利用大自然力量自我修復(監測式自然衰減)與利用人為工程技術提供生物必須營養源，以能加速生物分解為首要目標(Zanardini et al., 2002)。如果僅涉及添加營養源(含溶氧)，稱為生物刺激(Bio-stimulation)；若另外添加菌種到污染水體，稱為生物補強(Bio-augmentation)。

現地地下水生物整治法(In-situ groundwater bioremediation)簡單來說就是促進飽和水層之現地微生物生長，強化生物分解作用。此法可以有效處理地下水中有機污染物質，例如油品類物質。為了加強生物作用需要額外添加足夠生物作用的電子接受者(硝酸鹽或氧氣)、營養鹽類(氮、磷)以及碳源，在污染場址時有機物即為生物的碳源，至於生物分解速率限制因子便主要是營養源與電子接受者，特別是在進行好氧分解作用，電子接受者(溶氧)供給便往往成為反應速率的問題瓶頸(Kharoune et al., 2001)。

現地地下水污染生物整治法中可以分成許多種類型進行，好氧作用(aerobic)、厭氧作用(anaerobic)以及共代謝作用(cometabolic)等。其中好氧作用已證明在單苯環芳香族碳氫化合物或是低脂肪族化合物中，生物分解效果相當顯著(Kao and Wang, 2000; Shim et al., 2006)。

2.4.2 生物反應槽

利用生物特性進行相關生化反應的裝置，稱為生物反應槽(bioreactor)或發酵槽(fermentor)，現今生物反應槽是以機械攪拌式(stirred tank)及氣動攪拌式(pneumatically agitated)兩種最為常見(Ohta et al., 1995)。

1. 機械攪拌式生物反應槽 (mechanical stirred tank bioreactor)

此種生物反應槽主要是利用攪拌葉片來達到混合，使質傳效果提高，增加培養液中的溶氧量，來營造一個對於好氣性微生物生長良好的環境。攪拌式生物反應槽的攪拌系統主要為攪拌翼組及擋版所構成，利用槽底的分散器(Sarger)將空氣通入槽體中，在藉由攪拌翼的旋轉與擋版的配合，使氣泡及流體均勻分佈於槽體中，故此種生物反應槽具有高氣液質傳能力及流體混合性佳的特性 (Roukas et al., 1999)。

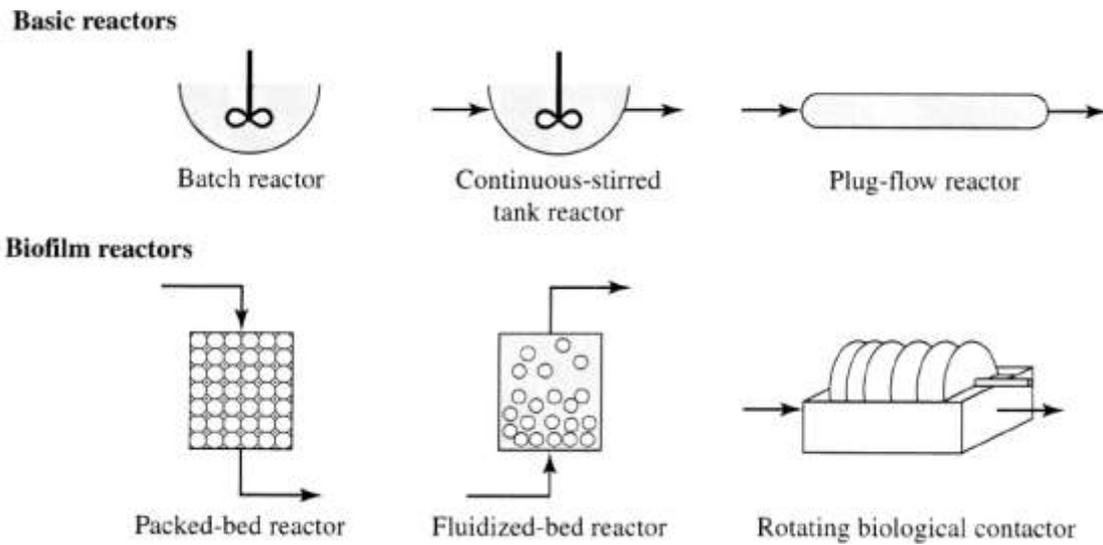
此種生物反應槽的優點為可提供反應系統良好的氣、液質傳導能力、混合能力強與可處理高黏度的培養基。缺點則是設備成本較高、剪切力較大、能量消耗高與機械性產熱(Roukas et al, 1999)。

2. 氣舉式生物反應槽 (Airlift bioreactor)

此種生物反應槽主要是在槽體裝置一個導流管(draft tube)，此導流管將槽內液體被區隔為進氣區域的上升流動區(riser)與非進氣區域的下降流動區(downcomer)(Kawagoe et al., 1997)。進氣區域的流體有較高的氣體佔有率(gas holdup)，使得此區域的流體密度低於非進氣區的流體密度，由於流體密度上的差異，造成流體自然的循環流動。此種生物反應槽具有較佳的液態循環流動的特性。

此種生物反應槽的優點有較簡單的機械結構，較低剪切力傷害的培養環境，可適用於黏度較高的培養環境。缺點則有混合效能與氧氣質傳性能較差、起泡問題較為嚴重、氣泡破裂造成的傷害，原因為此種生物反應槽在槽頂的氣液交界面附近區域，培養液中的氣泡會以極快的速度逸散出液面，在氣泡破裂離開液面的瞬間，由於表面張力而產生劇烈的動量變化，會傷害培養中的細胞，尤其是對於剪切力敏感的動物細胞 (Roukas et al., 1999)。

在環境工程應用上有許多不同樣式的生物反應槽，大多種應用於環境工程上的反應槽不外乎兩種不同生物存在形式，懸浮態(suspended)與固著態生物膜(biofilm)(圖2.1)。通常培養懸浮態細胞生物反應槽，又稱懸浮塊狀培養反應槽(suspended floc, dispersed growth, or slurry reactors)。另外使用生物膜之生物反應槽，又稱固著式生長生物反應槽(fixed-film reactors, attached-growth reactors, or immobilized-cell reactors)。不同樣是生物反應槽的選擇，主要由幾個因子所影響(1)生物反應槽中所目標分解化合物的物化特性；(2)被分解之目標污染物濃度；(3)氧氣需求量；(4)處理污染物效率；(5)設置反應槽的環境條件；(6)設置反應槽成本與資源(Rittmann and McCarty, 2000)。



Adopted from Rittmann and McCarty, 2001.

圖 2.1 生物反應槽種類

1. 懸浮式培養生物反應槽(Suspended-growth reactors)

- (1) 批次式生物反應槽(batch reactor): 培養細菌分解適當定量的污染基質(液體或泥狀物)，培養過程需添加需要營養源(氮或磷)，以及藉由葉片轉動提供氧氣。通常是實驗室規模在測試微生物分解潛力與機制，缺點在於高成本且難以維持。
- (2) 連續式攪拌生物反應槽(Continuous-flow stirred-tank reactor, CSTR): 培養細菌分解連續式引入的污染基質(液體或泥狀物)，且可連續式分解目標污染物。微生物於連續式生物反應槽生長，且微生物會隨著出水端移除減少。最通常使用此反應槽在高濃度有機物質的有氧與缺氧生物分解。
- (3) 塞狀流生物反應槽(Plug-flow reactor, PFR): 從反應槽的一端將污染基質(液體或泥狀物)連續式引入至另一端離開，因進入端孔隙小使進流壓力大，在無其他混合裝置之長型反應槽中，可以利用進流與管壁相互產生碰撞而達混合。但因均質程度相較之下仍顯不足，待分解物在入口端與出口端有濃度上差異，造成微生物分解不均且效果不夠彰顯。

2. 生物膜式生物反應槽(Biofilm reactors): 具有許多可讓微生物附著之表面，而在表面形成生物膜。也有微生物從生物膜上脫落而在培養液中生長，此時在分解污染物懸浮態微生物便扮演次要角色(Rittmann and McCarty, 2000)。

- (1) 填充床反應槽(packed bed reactor): 最常見的生物膜反應槽，微生物附著在固定態物體(如石塊、塑膠板)，早期使用大石塊居多，現今多改用塑膠板或係小石塊進行填充，相較之下塑膠版提供較輕質且孔隙較小而使接觸面積提高，有亦增進微生物與污染物接觸時間而提高分解效果。
- (2) 流體化床生物反應槽(fluidized-bed reactor): 微生物附著在懸浮態的物體上，固著物體會隨著進流液來回移動。此固著物通常稱為生物膜攜帶者(biofilm carriers)，材質通常使用砂粒、活性碳顆粒(granular activated carbon, GAC)，彼此較不會在懸浮移動過程造成損傷。
- (3) 旋轉生物盤反應槽(rotating biological contactor, RBC): 進流液進入槽體方向會與生物盤成垂直狀，具有高混合與質量轉化之能力，生物盤通常使用塑膠材質製成圓形轉盤以供生物作附著使用而產生生物膜。通常使用於厭氧生物，轉盤部分可藉與空氣而吸收氧氣，使污染物達氧化效果。

2.5 甲基第三丁基醚生物分解

地下水MTBE復育技術通常使用物理化學與生物性方式進行整治(USEPA, 2004)。早期研究發現MTBE不論在好氧與厭氧下都很困難進行生物分解(Jensen and Arvin, 1990; Suflita and Mormile, 1993; Salanitro et al., 2000)，主要是因為MTBE化學結構鍵結官能基中醚鍵與第三丁基屬相當穩定之結構，而近十年以來許多研究不斷發現有微生物對MTBE具生物分解能力，促使MTBE生物分解能力逐漸被復育相關人士所注目。(Prince, 2000; Zanardini et al., 2002; Fiorenza and Rifai, 2003; Schmidt et al., 2004; Ferreira et al., 2006)。

MTBE最早被Salanitro et al (1994)發表可以被分離出的混合菌株(BC-1)分解，BC-1是來自於處理工業化學廠廢水處理廠的活性污泥，約有6株不同的菌種混合而成，分解MTBE速率約有34mg/g cells/h。現今有許多文獻指出MTBE可直接被生物分解(Hanson et al., 1999; Hatzinger et al., 2001; François et al., 2002) 或是通常使用

烷類物質(Volpe et al., 2009)進行共代謝分解(Hanson et al., 1999; David et al., 2002; Smith et al., 2003)。以下分別介紹MTBE藉由不同代謝方式進行生物分解。

2.5.1 好氧菌分解

即利用微生物在好氧情形下來分解有機物，其中二氧化碳和水則為好氧分解的最終產物，二者能量都很低且極為穩定，植物在行光合作用時再將其利用而進入循環。

早期MTBE生物分解研究，大都朝著好氧菌分解發展，通常菌種來自於廢水處理場活性污泥中分離。早期在1994年就有學者Salanitro 等人發現BC-1菌種，在最佳生長條件下分解MTBE速率約達34 mg/g cells/h；但在溫度低於20°C，或溶氧值小於約1 mg/L時，生物活性便會減低使生物分解效果變差。

在1997年Mo et al.在用銀杏樹下土壤所製成之活性污泥中，發現三株菌株(*Methylobacterium mesophilicum* ATCC 700107, *Arthrobacter ilicis* ATCC 700109, *Rhodococcus* sp. ATCC 700108)皆對MTBE具有分解效力，推測是因為銀杏樹會製造與MTBE相似之結構第三丁基官能團。此三株菌可分解MTBE(原始濃度200 mg/L)約29%，其中在實驗第一週時即有8%的MTBE氧化成二氧化碳，可推知菌種經由好氧分解，使電子從MTBE(電子供應者)轉換至氧氣(電子接受者)，產成代謝產物二氧化碳。

最近數年以來，針對使用好氧菌進行MTBE生物分解的研究相當多(Bradley et al., 2002 ; Tay et al., 2005; Ferreira et al., 2006; Shah et al., 2009; Kao et al., 2010)。具有代表性研究，是屬Deeb et al.在2000年所做一系列包含單一與混合菌進行MTBE好氧分解試驗。在這些被分離出具有MTBE分解潛力菌株中，PM1 (*Methylibium petroleiphilum*, PM1)在好氧環境下具有相當高能分解MTBE效力，PM1可將MTBE當作唯一碳源，雖然不及理想狀態下的分解情形，但分解效率達0.18 mg(MTBE)/mg(cells) (Hanson et al., 1999)。本研究整理出歷年來利用好氧菌分解MTBE比較表於表2.3。

表 2.3 在好氧環境下 MTBE 生物降解能力比較

Species	Metabolism	Initial concentration	Degradation rate	References
BC-1	Direct	MTBE 200 mg/L	34 mg/g cells/h	Salanitro et al., 1994
	Aerobic heterotrophic	TBA	14 mg/g cells/h	Salanitro and Wisniewski, 1996
<i>Methylobacterium mesophilicum</i> (ATCC 700107), <i>Arthrobacter ilicis</i> (ATCC 700109) <i>Rhodococcus</i> sp. (ATCC 700108)	Aerobic heterotrophic	MTBE 200 mg/L	0.18 mg/g cells/h	Mo et al., 1997
Nocardio-form bacteria ENV421	Cometabolic with propane	MTBE 20 mg/L	9.2 nmol min ⁻¹ mg of protein ⁻¹	Steffan et al., 1997
		TBA	2.4 nmol min ⁻¹ mg of protein ⁻¹	Steffan et al., 1997
<i>Rubrivivax</i> sp. PM1	Aerobic heterotrophic	MTBE 50 mg/L	50 mg/g cells/h	Deeb et al., 2000a.
Most closely related to <i>Nocardia</i> sp. ENV425	Aerobic heterotrophic	MTBE 20 mg/L	4.6 nmol min ⁻¹ mg of cell protein ⁻¹	Steffan et al., 1997
		TBA	1.6 nmol min ⁻¹ mg of protein ⁻¹	Steffan et al., 1997

表 2.3 (續)

Species	metabolism	Initial concentration	Degradation rate	References
BC-4 (MC-100) <i>Rhodococcus</i> sp.	Aerobic heterotrophic	MTBE 80 mg/L	80 mg/L-N.D. in weeks	Salanitro et al., 1999
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cometabolic with pentane	MTBE 10 mg/L	3.9 nmol min ⁻¹ mg of protein 34 mg h ⁻¹ g dried biomass ⁻¹	Garnier et al., 1999
		TBA	0.47 nmol h ⁻¹ mg dry weight ⁻¹ 0.016 nmol min ⁻¹ mg cell protein ⁻¹	Garnier et al., 1999
<i>Rubrivivax</i> sp. PM1	Aerobic heterotrophic	MTBE 500 mg/L	50 mg/g cells/h	Deeb et al., 1999 Deeb et al. 2000a
<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1	Aerobic heterotrophic	MTBE 5mg/L	0.07, 1.17, and 3.56 g ml ⁻¹ h ⁻¹	Hanson et al., 1999
<i>Hydrogenophaga flava</i> ENV 735	Aerobic heterotrophic	MTBE 75 mg/L	46 nmol min ⁻¹ mg of cell protein ⁻¹	Hatzinger et al., 2001
Mixed enrichment culture F	Aerobic heterotrophic	MTBE 100mg/L	2.7-20 nmol min ⁻¹ mg of cell protein ⁻¹	Fortin et al., 2001
<i>Mycobacterium austroafricanum</i> IFP 2012	Aerobic heterotrophic	MTBE 82mg/L	9 -20 nmol min ⁻¹ mg of cell protein ⁻¹	François et al., 2002

表 2.3 (續)

Species	metabolism	Initial concentration	Degradation rate	References
Air Force Base, CA	Aerobic heterotrophic	MTBE 150 mg/L	5.3 day ⁻¹ in two months	Wilson et al., 2002.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cometabolic with pentane	MTBE 1.1-12.3 g m ⁻³	3.9 nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ cell protein	Dupasquier et al., 2002
Mixed enrichment culture	Aerobic heterotrophic	MTBE 200 mg/L	1.8 mg/L/d	Kharoune et al., 2001
<i>Streptomyces</i> sp. IsoSL1	Aerobic heterotrophic	MTBE 200 mg/L	30.6 and 50.2% in 14 and 28 days	Okeke et al., 2003
Mixed enrichment culture CL-EMC-1	Aerobic heterotrophic	MTBE 2.1 mM	2.1 mM of MTBE in 10 days	Zaitsev et al., 2007
The mixed culture obtained from the wastewater treatment plant	Aerobic heterotrophic	MTBE 60mg/L	0.000778 h ⁻¹ and 0.029 mg l ⁻¹	Lin et al., 2007a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Multi-substrate biodegradation with BTEX	MTBE 28.4 mg/L	0.099 mg l ⁻¹ h ⁻¹	Lin et al., 2007b

表 2.3 (續)

Species	metabolism	Initial concentration	Degradation rate	References
<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1	Aerobic heterotrophic Gel immobilized	MTBE 10 mg/L	99% removal efficiency at 20 min	Chen et al., 2008
<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1	Aerobic heterotrophic	MTBE 5 µg/ml MTBE 50 µg/ml	14.8 nmol/min/mg protein 72.6 nmol/min/mg protein	Schmidt et al., 2008
Microcosm in a fractured chalk aquifer	Aerobic heterotrophic	MTBE 12mg/L	6.6±1.6 µg/L/day	Shah et al., 2009
<i>Rhodococcus aetherivorans</i> IFP 2017	Aerobic heterotrophic	MTBE 7.5 mg/L	14.3 µmol h ⁻¹ g ⁻¹ (dry weight)	Auffret and Labbe, 2009
<i>Achromobacter xylosoxidans</i> MCM1/1	Aerobic heterotrophic	MTBE 100 mg/L	78% after 5 days	Eixarch and Constant, 2010

2.5.2 厭氧菌分解

不同於好氧分解菌之微生物不憑藉著氧氣當作電子接受者，而利用體內酵素進行電子轉化，對於次微生物而言氧氣除非其必要，甚至是具有毒性，其中很多厭氧產生的最終產物是不穩定的。

MTBE在厭氧系統下的生物分解略嫌少數，且研究結果亦倍受爭議(Schmidt et al., 2004)，表2.4簡單介紹幾組批次試驗於厭氧環境下能對MTBE進行生物分解之研究(Waul et al., 2009)，表中說明分解作用試藉由在厭氧狀態之地下水可得電子接受者作用而進行。研究顯示厭氧試驗中，移除MTBE速率都低於1 mg/(L, d)，相較於好氧試驗之分解速率屬非常緩慢，好氧試驗分解速率約為500-1500 mg/(L, d)(Steffan et al., 1997; Finneran et al., 2001; Kuder et al., 2005; Somsamak et al., 2005)。而厭氧消化作用通常是污染物生物復育方法之自然衰減法中重要的要素(Kuder et al., 2005)。

當汽油儲槽發生洩漏時，污染團幾近處於缺氧環境。好氧菌能快速分解是憑藉著氧氣存在而進行(Fiorenza et al., 2003)，是故可以經由打氣通往地下水而使好氧菌快速分解污染團。另一方面，為了減少經濟成本，可以利用原先就存在於地下水層之電子接受者與MTBE為電子供應者，相互作用進行厭氧分解(Waul et al., 2008)。

表 2.4 在厭氧環境下 MTBE 生物降解能力比較

Inoculum	Metabolism (Redox)	Initial con.(mg/L)	Final con.(mg/L)	Degradation rate	References
Fuel impacted river sediment	HCO_3^-	48	22	0.51	Mormile et al., 1994
Petroleum impacted aquifer	HCO_3^-	1	0.1	0.003	Wilson et al., 2000
Surface water sediments (oasis)	SO_4^{2-}	1.5	1.38	0.00072	Bradley et al., 2001b
Petroleum impacted estuary	SO_4^{2-}	100	0	0.8	Somsamak et al., 2005
Fe(III)-reducing reactor	Fe(III)	5	0	0.012	Pruden et al., 2001&2005
Surface water sediments (oasis)	Fe(III)	1.5	1.32	0.0011	Bradley et al., 2001b
Petroleum impacted aquifer	Fe(III)/HS	50	5	1.13	Finneran et al., 2001
Surface water sediments (oasis)	Mn(IV)	1.5	1.08	0.0025	Bradley et al., 2001b
Surface water sediments (oasis)	NO_3^-	1.5	0.525	0.006	Bradley et al., 2001b
Petroleum impacted stream	NO_3^-	1.76	1.32	0.006	Bradley et al., 2001a

2.5.3 真菌分解

真菌也具有降解MTBE能力，是因為真菌對生長環境可接受能力比細菌大(如偏酸環境)，故其對污染場址適應力也相對的大於細菌，具被較大分解潛力(Volpe et al., 2009)，有研究顯示許多種不同真菌具被MTBE分解能力(Hardison et al., 1997; Eweis et al., 1997)。

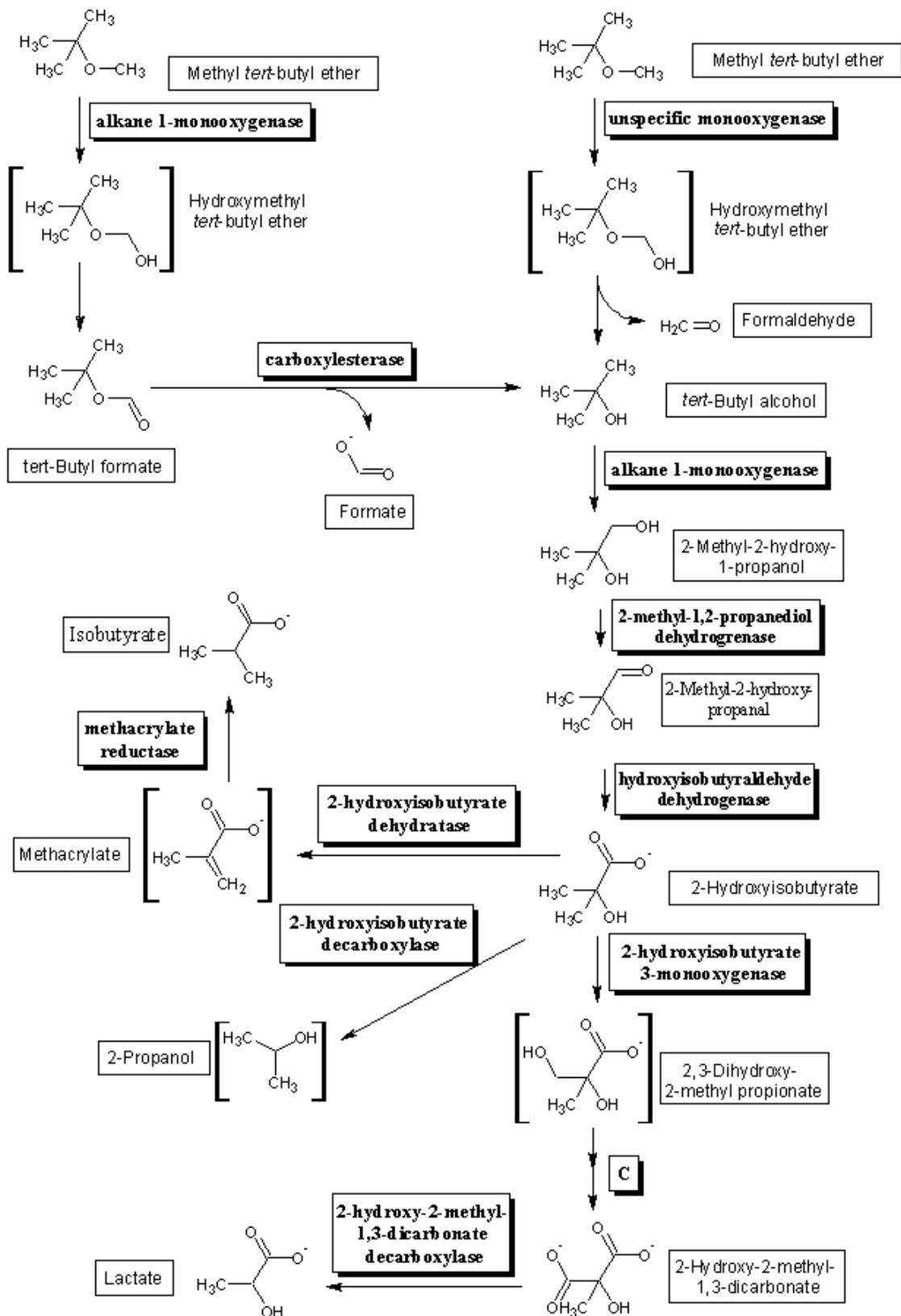
2.5.4 MTBE共代謝生物分解

另外細菌在分解污染物時，除了直接代謝(direct metabolism)外，還有另一方式為共代謝(cometabolism)。共代謝定義為兩個化合物同時被分解現象，其中有分成第一基質(the primary substrate)以提供生長能量，與第二基質(the secondary substrate)只能提供能量存活但不供以生長。共代謝分為二種，共氧化(co-oxidation)與共還原(co-reduction)，所有的共氧化均發生在絕對好氧狀態；而反之，大部分的共還原則發生在厭氧狀態(方，2002)。在好氧狀態下，擁有非特殊酵素(nonspecificenzyme)者，通常利用單氧(monooxygenase)或雙氧氧酵素(dioxygenase)。舉例而言，在分解甲烷、丙烷或是簡單醣類分子時，有些細菌(如: *Pseudomonas stutzeri* OX1)可以分解含氯有毒溶劑(四氯乙烯或三氯乙烯)，透過分解簡單化合物提供生長所需之碳源或能量來源，而去適應產生可分解污染物酵素(單氧化酶)降解污染物。在MTBE生物分解也適用於共代謝作用，亦有些菌種可利用簡單直鏈烷類當做第一基質，供給微生物生長所需能量碳源。例如: 正戊烷(Garnier et al., 1999)、丙烷(Steffan et al., 1997)、乙醇(PivetEAU et al., 2000)。有些真菌(*Graphium* sp.)亦可透過與正丁烷進行共代謝作用(Hardison et al., 1997)，MTBE分解速度為0.92 mg/g cells/h。而後又有研究發現(Hyman and O'Reilly, 1999) *Xanthobacter* sp.、*Alcaligenes eutrophus*與 *Mycobacterium vaccae* strains可利用簡單直鏈或支鏈烷類進行共代謝作用，其MTBE分解速率為43.6 mg/g cells/h皆比MTBE直接代謝作用降解效果佳。

2.6 甲基第三丁基醚生物分解途徑

微生物分解方面，MTBE 的醚鍵會被細菌中所分泌的酵素所打斷(一般而言係指單氧化酶)，氧化脫去一個甲醛(formaldehyde)而成TBA (Steffan et al., 1997 ; Salanitro et al., 2000)。但有些文獻(Hardison et al., 1997)指出MTBE 所產生的中間產物最先出現應該是第三丁醛(tert-butyl formate, TBF)，但是因為TBF 的水解速率非常地快速，可以在很快的時間內由碳氫脂酶氧化轉變成TBA，因此較難發現有累積的現象，換言之即在環境中非常不穩定，很難去測定出其化合物存在(Church et al., 1997)。而TBA更進一步會分解成2-methyl-2-hydroxy- 1-propanol (MHP)和2-hydroxyisobutyric acid (HIBA) (Steffan et al., 1997)，之後再繼續分解成2-丙醇(2-propanol)、丙酮(acetone) 和氫氧化酮(hydroxyactone) (Salanitro et al., 1994; Church et al., 1997; Steffan et al., 1997; Deeb et al., 2000b; Salanitro et al., 2000)。

目前已知有許多微生物皆具有分解MTBE能力，但針對MTBE分解機制卻尚未明確。如(圖2.2)為其分解機制，主要由Steffan et al. (1997)以具MTBE分解能力之*Nocardia* sp. ENV425中發現，更多相關資訊則是 François et al. (2002)與Smith et al. (2003)發表的*Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012 與 *Mycobacterium vaccae* JOB5分解途徑前段與Steffan et al. 有明顯不同的機制，將MTBE先分解成TBF，而後在進而水解成TBA與醛基。在分解過程啟始的酵素為單氧化酶是由Smith et al. (2003)指出，而在2006年 Ferreira et al. 便從*M. austroafricanum* IFP 2012 透過複製其分解相關基因等方式，完成TBA爾後降解途徑之預測。

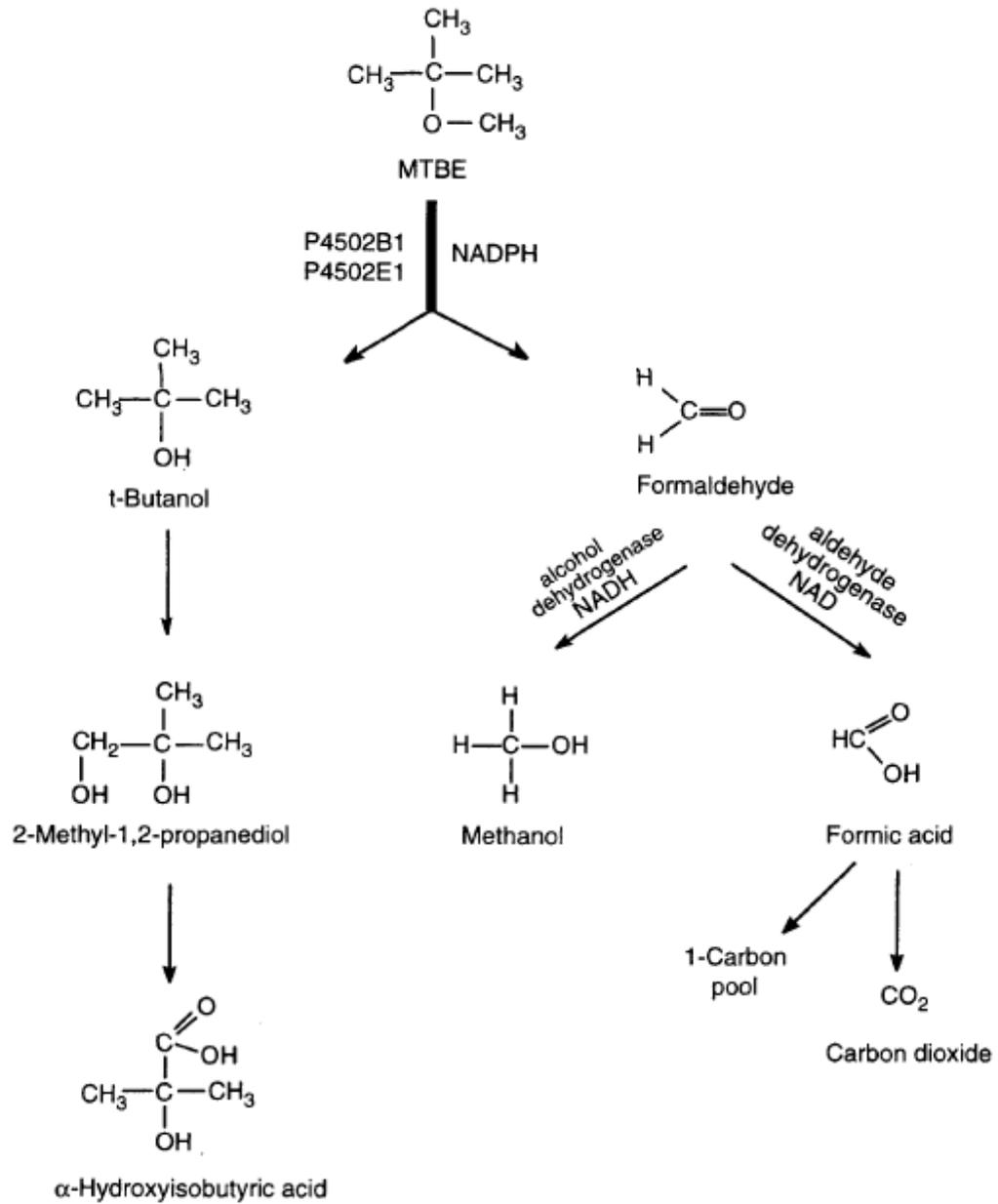


Adopted from Pedersen et al., 2008

圖2.2 甲基第三丁基醚之代謝分解機制圖

目前已有MTBE與TBA在人體與動物組織代謝過程之研究，研究結果指出在真核生物分解MTBE的起始之中間產物與原核生物代謝產物相似(Deeb et al., 2000b)。如已知MTBE 在哺乳類體內可藉由細胞色素 P4502E1(cytochrome P-4502E1) 、 細胞色素 P4502B1 (cytochrome P-4502B1) 及 NADPH(dihyronicotinamide adenine dinucleotide phosphate)將MTBE去甲基形成第三丁醇(tert-butyl alcohol, TBA)與甲醛(formaldehyde) (Brady et al., 1990)。TBA則代謝為MHP與HIBA(圖2.3)再由尿液排泄(Bioresearch Labs, 1990)，中間代謝產物TBA即是在真核與原核生物所共通物質。

許多研究指出單氧化酶(monooxygenase)在好氧環境中是最先將MTBE分解轉化成TBA的酵素 (Hardison et al., 1997; Salanitro et al., 2000; Steffan et al., 1997)。



Adopted from ATSDR (1996)

圖 2.3 甲基第三丁基醚於哺乳類之代謝分解機制圖

一些研究中顯示(Hardsion et al., 1997)，複合單氧酵素(Cytochrome P-450)是一種結合原核及真核的細胞，具有完整之膜蛋白，會將具氫氧有機化合物中之分子氧打斷，使之變成一個氧原子。此種型式之酵素，在老鼠和人體之肝臟組織時，會將MTBE和ETBE 轉變成TBA。研究中指出MTBE 若被人體所吸收，其主要代謝產物為MHP、HIBA 及少量之甲醛和丙酮。此四種化合物皆為MTBE 被細菌代謝時之中間產物(Deeb et al., 2000a&2000b)。

2.7 蛋白質體與甲基第三丁基醚

利用蛋白質體技術，可以分析鑑定出與MTBE接觸時，各生物體會為求生存進而合成之蛋白質種類。文獻中有Krayl et al. 於2003年發現*Pseudomonas putida* KT2440接觸MTBE時，透過監測其生長速度、ATP形成、死亡情形，且搭配蛋白質體分析發現MTBE會影響*Pseudomonas putida* KT2440氧化性壓力蛋白的產生，且於不同時間點測得 Alkylhydroperoxide reductase C (AhpC) 與 Superoxide dismutases (SodM, SodF)皆與氧化性壓力相關。另外Krayl et al.還有測出 Electron transfer flavoprotein A(EtfA)與能量電子轉移相關，與Eixarch and Constant'於2010年發現另一菌種*Achromobacter xylooxidans* MCM1/1接觸MTBE時產生蛋白相似。Eixarch and Constant'發現MTBE會誘導*Achromobacter xylooxidans* MCM1/1產生 50S ribosomal protein L10、Amino acid-binding periplasmic protein、ATP synthase 與Endoribonuclease L。可以用以解釋當生物接觸MTBE時，會為求其生存進而適應MTBE毒性，故產生氧化性相關蛋白，且為改變細胞本身結構去促使MTBE無法進入胞內而產生外膜蛋白亦或結構蛋白。另一部分為將MTBE移出胞外需要藉由主動運輸，故生物需要產生ATP合成蛋白，進而產生能量維持生物體存活 (Eixarch and Constant, 2010)。

2.8 共存污染物(co-contaminants)對分解甲基第三丁基醚之影響

在地下水污染團中會有與 MTBE 共同存在之有機污染物，可能會增加或抑制生物分解 MTBE 能力。藉由抑制微生物分解 MTBE 蛋白質；或是誘導微生物對此有機污染物進行分解，藉以減少 MTBE 分解效果(Deeb et al., 2000a)。在添加 MTBE 汽油發生洩漏，其中單環狀芳香族碳氫化合物即是與 MTBE 共存之有機污染物(其物化性質於附表 2.1)，即為苯、甲苯、乙苯與二甲苯，簡稱為 BTEX。

在 PM1 菌種試驗中，MTBE 與苯都可以直接進行單一碳源生物分解。但在乙苯與二甲苯則無明顯降解趨勢，且與 MTBE 共存之下 MTBE 降解速率減緩，推測抑制 PM1 分解 MTBE(Deeb et al., 2001)。研究發現 MTBE 與苯生物分解途徑有明顯不同。PM1 先用苯進行馴養再進行 MTBE 降解試驗，發現開始分解 MTBE 時間有延遲現象，且降解效果亦較差；反之先用 MTBE 馴養再進行苯分解試驗，結果亦然不如預期，推論 MTBE 與苯生物分解產生蛋白質與分解途徑不同(Deeb et al., 2000b)。在近期有研究指出(Lin et al., 2007)，發現 *Pseudomonas aeruginosa* 在分解 MTBE 與 BTEX 時，有相互競爭現象且互相影響分解效果。

第三章、研究方法

3.1 研究材料與架構

3.1.1 工作架構與作業流程

本計畫整體的工作架構與作業流程如圖 3-1 所示；針對石化污染場址中種類眾多的石化污染物，本計畫探討微生物分解石化污染物之移除效率及其應用性，將建置生物反應槽系統，此系統為結合可降解 MTBE 之培養菌種及提供氧氣來源，並具有監測系統的一套生物處理系統，並評估此生物復育系統對污染物的移除效率及降解成效。

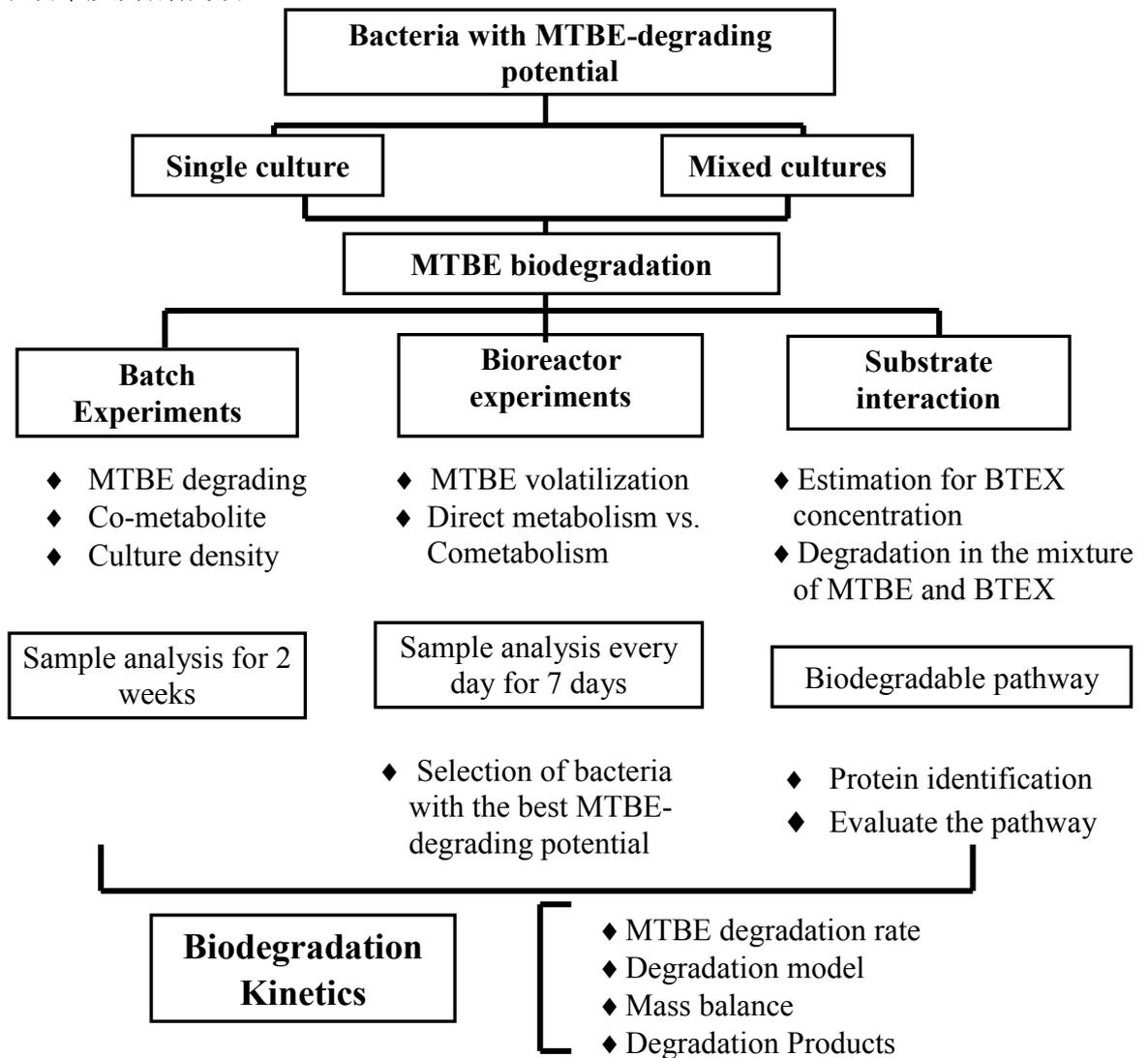


圖 3-1. 計畫研究架構

3.1.2 實驗材料

1. 菌種來源

本計畫是延續研究團隊於2008至2009年執行環保署委託研究計畫「以微生物及蚯蚓發展石化污染土壤之環境復育技術研究」之具體成果，從汽油洩漏污染場址中分離出五株菌株(*Pseudomonas* sp. NKNU01、*Bacillus* sp. NKNU01、*Klebsiella* sp. NKNU01、*Enterobacter* sp. NKNU01 與 *Enterobacter* sp. NKNU02)，菌種來自於高雄縣橋頭油庫，其儲存油品包括汽油、噴射燃料油、柴油、煤油及各種潤滑油，石化產品包括乙烷、乙烯、丙烷、丙烯、丁烷、丁烯、苯、甲苯、及二甲苯等。污染廠區地下水之石油碳氫化合物來源來自生產線的操作、儲存與處理廢棄物等作業而來，例如油槽及管線滲漏、油水分離池滲漏、清洗油槽油管之廢水排放等所造成，該場址於多年前發生洩漏，而造成地下水及土壤之污染。本研究室於先前研究發現附近污染場址中，於監測井採集之地下水中分離出具有MTBE分解潛力菌種(Kao et al., 2010)，目前寄存於新竹食品工業發展研究所 (Food Industry Research and Development Institute, FIRDI)之生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center)(圖3-2)，MTBE分解潛力菌種如下：

- (1) *Pseudomonas* sp. NKNU01 (BCRC 17914)
- (2) *Bacillus* sp. NKNU01 (BCRC 17910)
- (3) *Klebsiella* sp. NKNU01 (BCRC 17913)
- (4) *Enterobacter* sp. NKNU01 (BCRC 17911)
- (5) *Enterobacter* sp. NKNU02 (BCRC 17912)



圖 3-2. 分離菌株於生物資源保存及研究中心

2. 菌種培養

先利用 Nutrient Broth (NB)培養液加入 100 mg/L 的 MTBE，五株菌各自大量培養，再用甘油與菌液一比一，保存菌株於-80°C冰箱(先存於 4°C兩小時，置於-20°C兩小時，最後於-80°C保存)。進行降解試驗時需更換培養液，用微生物緩衝液清洗：(1)NB 培養 50ml 離心 10min 4400rpm，倒去上清液。(2)1ml PBS(phosphate buffer solution) 回溶洗菌塊放於 2 ml 離心管，再離心 10 分鐘 4400rpm，重複 3 次。(3)用 1 ml 培養液回溶菌塊。再用分光光度計測菌量，利用 OD₆₀₀ 測出五種不同菌種的吸光值。利用原菌液直接將所需體積加入培養液 (MSM)(Okeke et al., 2003)。

3.2 實驗設備

3.2.1 生物反應槽-攪拌式生物反應槽 (Stirred tank bioreactor)

1. 生物反應槽之結構

攪拌式生物反應槽為總容積5 L的玻璃槽體，容許運載量最高為4 L，藉由槽外底部之加熱板及槽內冷卻管調控槽體溫度，有一通氣管外接氣體流量計藉以監控槽體通氣量，兩個攪拌葉片藉著轉動軸的轉動而帶動槽內培養液的流動混合(圖 3-3)。

2. 生物反應槽之基本設計

生物反應槽之最重要的機能，是要能使微生物之生長在所需管理的環境下，達到所期望的增殖而獲得目的生產量。因此生物反應槽之設計與製作則需要有很多的考慮。

- (1) 生物反應槽需能保持其無菌污染性，能具有長時間的運作能力。
- (2) 依微生物的代謝情形，為滿足其溶氧量，可用通氣攪拌，但不能給予微生物機械衝擊方式強力攪拌。
- (3) 需配置溫度控制裝置。
- (4) 需要能控制 pH。
- (5) 需要能隨時簡易取得樣品。
- (6) 盡量降低飛沫間所引起的損失以及污染。
- (7) 要降低培養基的排出、洗淨、維護等所需的勞動力。
- (8) 在反應槽內部盡量保持光滑的內面，不要有焊接的介面，以免干擾到微生物生長情形。

在實驗中所使用的生物反應槽，是全槽體(包含 pH probe and DO probe)都可以進行高溫高壓滅菌，不用像舊式生物反應槽會有 probe 污染問題。利用生物反應槽的電腦程式化監控菌種生長環境的變化，可以有效改善在批次試驗時所遭遇微生物生長時受限制的問題。



圖 3-3. 生物反應槽

3.2.2 吹氣捕捉裝置(purge & trap)

本計畫所採用的樣品前處理方法為吹氣捕捉法。吹氣捕捉法為一種動態頂空法(dynamic headspace)，多用於捕捉溶解態揮發性有機化合物。其工作原理為吹氣捕捉裝置在固定溫度下，將適量水樣注入吹除管，通以惰性氣體，通常使用氦氣或氮氣。水樣經所通入的惰性氣體便會產生大量氣泡，使得溶於水相中的揮

發性有機物質因擾動而分散於氣相中，同時藉著管線後方填充有吸附劑之捕集管捕捉；吹氣捕捉動作完成後，瞬間加熱捕集管，將吸附於吸附劑上的揮發性物質熱脫附出，經過傳輸線注入氣相層析儀中，此方法可測量的濃度達 ppb 範圍。

水樣前處理條件如下，吹氣捕捉裝置是為底部需裝置多孔式玻璃篩，且容量為 5mL 的樣品體積吹除管。吹氣捕捉裝置設定參數為：樣品吹除溫度為室溫下，吹除速度為每分鐘 40 ± 3 mL，樣品吹氣時間以惰性氣體高純氮氣進行 11 分鐘，吹除吸附管中水氣 4 分鐘，以脫附溫度 250°C 進行 4 分鐘之脫附時間，脫附完成後以 260°C 加熱烘烤所有管路與吸附管，其烘烤時間為 10 分鐘，吹氣捕捉裝置處理一樣品時間為 29 分鐘。

3.2.3 氣相層析/質譜儀

本研究使用氣相層析/質譜儀(gas chromatograph/mass spectrometer, GC/MS) (HP 6890/5973, Agilent, USA)進行定性及定量分析，所使用的分離管柱(HP-5ms, Agilent J&W, USA)材質為 5% diphenyl, 95% di-methylpoly siloxane，內徑 0.32 mm，管柱壁厚度 $0.25\ \mu\text{m}$ ，30 m 長，攜帶氣體為高純度氮氣。

3.2.4 水相樣品使用 GC/MS 分析設定條件

GC/MS 儀器設定，使用分流進樣分流比為 23:1，管柱流速 1 mL/min，注射口 250°C ，掃描範圍 45-260 amu。GC/MS 溫度設定，起始溫度 35°C 維持 2 分鐘，接著每分鐘上升 8°C 到達 50°C ，接著每分鐘上升 16°C 到達 70°C ，再以每分鐘上升 22°C 到達 100°C 維持 2 分鐘，最後再以每分鐘上升 28°C 的升溫條件到達 220°C ，依此升溫模式，樣品分析共需 14.77 分鐘。

3.3 實驗方式

3.3.1 批次試驗

1. 化合物製備

Medium : mineral salts medium (MSM) (1L)(Okeke et al., 2003)

K ₂ HPO ₄	0.225g
KH ₂ PO ₄	0.225g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.225g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05g
FeCl ₂ · 4H ₂ O	0.005g
CaCO ₃	0.005g
Trace elements solution*	1 ml

Trace elements solution 成分(1L)

MnSO ₄ · H ₂ O	169.02 mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	287.56 mg
CuSO ₄	159.6 mg
NiSO ₄ · 6H ₂ O	26.285 mg
CoSO ₄ · 6H ₂ O	28.11 mg
Na ₂ SO ₄ · 2H ₂ O	24.195 mg

MSM 配製滅菌完備後，其中先加入 MTBE 以及正戊烷作稀釋到所需濃度，再做為 medium 使用。其中 MTBE 與正戊烷皆須先用 0.22 μm 過濾膜(材質為 Mixed Cellulose Ester)快速過濾，以防藥品有菌種殘留。

2. 分解菌分解能力探討

在固定菌量(OD₆₀₀= 0.1)及固定 MTBE 濃度(MTBE= 10 mg/L)下，將進行各菌種 MTBE 分解，實驗時間為期 15 天，共測 MTBE 濃度 2 次(各為第 10、15 天進行以氣相層析儀分析 MTBE 濃度)，其中控制組只有 MSM medium 添加 10 mg/L 之 MTBE；實驗組則包括各單一菌種(共五株)、等菌量的混合菌+ medium(10 mg/L MTBE)。實驗 medium 總體積為 60 mL，使用 125 mL 三角錐形瓶，且在用矽膠塞塞住，外層利用鐵氟龍膠帶加強密封效果。

3. 共代謝分解 MTBE 探討

在固定菌量($OD_{600}=0.1$)及固定 MTBE 濃度(MTBE= 10 mg/L)下，評估各菌在有無共代謝物質下 MTBE 分解情形(共代謝物質正戊烷與乙醇)，實驗時間為期 15 天，共測 MTBE 濃度 2 次(各為第 10、15 天進行以氣相層析儀分析含量)，其中控制組只有 MSM medium (MTBE 與正戊烷/乙醇)；實驗組為各單一菌種(共五株)、等比例的混合菌+ MSM(MTBE 與正戊烷/乙醇)，實驗總體積 medium 為 60ml，利用 125ml 三角錐形瓶，且在用矽膠塞塞住，外層利用鐵氟龍膠帶加強密封效果。共代謝物質 MTBE 的濃度比為共代謝物質: MTBE =10: 7(Garnier et al., 1999)

4. 不同菌量分解 MTBE 探討

探討固定 MTBE 濃度(MTBE= 10 mg/L)、固定共代謝物質(正戊烷/乙醇)下，各菌種在不同菌量下對 MTBE 分解效力。實驗時間為期 15 天，共測 MTBE 濃度 2 次(各為第 10、15 天進行以氣相層析儀分析含量)。控制組只有 MSM medium(10 mg/L MTBE+正戊烷)；實驗組為各單一菌種(共五株)、等比例的混合菌(分成 $OD_{600}=0.1$ ， $OD_{600}=0.2$) + MSM medium (10 mg/L MTBE+正戊烷)。實驗總體積為 60 ml，利用 125 ml 三角錐形瓶，且在用矽膠塞塞住，外層利用鐵氟龍膠帶加強密封效果。

3.3.2 生物反應槽試驗

1. 生物反應槽測試-無菌測試

利用 MSM medium 作無菌測試(temp= 25°C、pH= 7.2)，查看 medium 是否有混濁情形，有則代表管線有雜菌污染。

2. MTBE 於生物反應槽的維持

MTBE 屬揮發性有機物會在因為生物反應槽運作下，受機械力影響與操作方式造成 MTBE 揮發，利用調整機器設定條件以維持 MTBE 於生物反應槽存留能力。可藉由調整反應槽轉速、空氣進氣量調控與 MTBE 加入反應槽方式。

3. 在批次實驗所得環境因子套用

在適當菌量($OD_{600}=0.1$)、固定 MTBE 濃度(100 mg/L)下，進行降解試驗。接種完菌種後，添加高濃度(100 mg/L)於 medium 中，每天記錄監測 DO 值、 OD_{600} 值、菌落數、MTBE 濃度。共代謝降解試驗(固定菌量為 $OD_{600}=0.1$ 、MTBE 濃

度為 100 mg/L)，菌種接種完成後，同時添加 MTBE 與正戊烷於 medium 中，每天記錄測量 DO 值、OD₆₀₀ 值、菌落數、MTBE 濃度。

4. MTBE 代謝產物測定

從實驗結果中挑選出降解效力最佳菌種，分析可能之代謝產物。藉由微生物於磷酸緩衝液(PBS buffer)中無法持續生長之特性，使微生物維持在停滯期(Rest phase)，故能將能量轉移至分解 MTBE。在 PBS buffer 中加入 100 mg/L MTBE，連續每兩個小時進行揮發性(VOC)與半揮發性物質(SVOC)以 GC/MS 定性分析。

針對 Medium 分析方法如下：

- (1) 揮發性物質:以去離子水分別稀釋 medium 至各化合物檢量線範圍內，置於 Volatile organic analyte (VOA) vials 中，利用 Method 8260 直接以 Purge and Trap 進行捕捉水中溶解之揮發性有機化合物，再以 GC/MS 進行定性定量分析。
- (2) 半揮發性物質:取 medium 裝入 25 mL 樣品瓶中，依美國環保署 Method 625 方法進行酸性萃取後，再依 Method 8270 使用 GC/MS 進行定性分析 MTBE 代謝產物。首先取 medium 10mL 加入適量的硫酸調整 pH 值小於 2，將調整好 pH 值的 medium 緩緩加入 10 mL 的二氯甲烷，蓋上瓶蓋。以雙手連續劇烈搖晃 20 mL 樣品瓶二分鐘，使 medium 和萃取溶劑二氯甲烷能充份混合。其主要目的為使 medium 中代謝產物溶解至萃取溶劑二氯甲烷中。而當連續劇烈搖晃瓶子時，必須約每隔 30 秒打開瓶蓋，讓瓶內的二氯甲烷蒸氣釋放出來，以避免蓄積過多二氯甲烷蒸氣不慎噴出瓶外。連續劇烈搖晃二分鐘後，將盛裝萃取樣品的瓶子靜置，使不同比重的水和二氯甲烷分層，以玻璃滴管吸取下層液。重複步驟三次，再使用無水硫酸鈉過濾萃取液以達去水功能。將無水硫酸鈉過濾的萃取液，以真空減壓濃縮裝置，將其體積濃縮至 1.5-2mL，定量 2mL 後移至樣品瓶內。

3.3.3 蛋白質體分析

1. 菌種樣品挑選與取樣時間

評估生物反應槽實驗中具有最佳 MTBE 降解效力之菌種，進行其菌種蛋白質分析，透過 MTBE 降解過程中了解移除情形。利用生物反應槽降解試驗中，

相同生物量但不加入 MTBE 之設定作為控制組；另外，當 MTBE 降解試驗中濃度達分解量之百分之五十時(T1/2)，推測降解 MTBE 蛋白質大量產生中；且在降解 MTBE 過程中，當分解速率趨於平緩(T1)時其蛋白質量預測會達最大量，藉以取出兩點作為實驗組。

2. 蛋白質樣品分析(此部分委託生技公司執行)

(1) 萃取

加入磷酸緩衝溶液(PBS buffer)懸浮細胞後以 4 °C、4400 rpm 離心 10 分鐘，去除上清液，重複此步驟三次，以清除殘留的培養基，沉澱物即為細菌。將每公克細菌濕重加入 4 ml lysis buffer (7 M urea、2 M thiourea、4% CHAPS、1% dithiothreitol、40 mM Tris) 混勻，再加入 10.76 mg 之 proteinase inhibitor，vortex 震盪 (VORTEX-2 GENIE, Scientific Industries) 使 proteinase inhibitor 完全溶解後，分裝至 1.5 ml 微量離心管中置冰上，以超音波震盪儀 (Sonicator XL 2020, Operator's Manual) 打破細胞：每管震盪 2 秒停止 2 秒，持續 2 分鐘，共 2 循環，使細胞破碎後釋出蛋白質溶解於 Lysis buffer 中。以 15 °C、35,000 xg 高速離心 (himac CP 100β, HITACHI) 30 分鐘後，沉澱物為未破之細胞及胞器等雜質，上清液即為蛋白質萃取液，收集上清液後分裝保存於-70°C。

(2) 樣品製備與二維電泳

在粗抽蛋白中加入 TCA(trichloroacetic acid)，進行蛋白質沉澱，離心移除上清液，保留沉澱物。將樣品回溶後，進行蛋白質定量。抽取每一樣品 200 mg 蛋白質，利用 Ettan 2-D Clean-Up kit (Amersham) 進行純化，去除樣品中的離子、鹽類與脂質，以減少對二維電泳的影響，在溶於二維電泳緩衝液(standard 2-DE rehydration buffer : 8M urea, 2% CHAPS, 0.5% IPG buffer and 7 mM DTT)，使用 13 公分電泳膠條 (IPG strip, pH 4-7 linear) 於 IPG phor II system (GE Healthcare, Piscataway, NJ with a total 26,133 voltage-hours applied)。於等電聚焦一維電泳 (Isoelectric focusing as first dimension) 後，膠條平衡於(equilibration buffer) 再使用 1.0mm 厚之 12.5 % acrylamide 膠體，進行二維聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS-PAGE)。

(3) 蛋白質染色

本計畫利用 VisPro 5 minutes protein stain kit (Visual Protein, Taipei, Taiwan)與 Sypro Ruby gel stain kit (Invitrogen ,S12000)進行染色。VisPro 5 minutes protein stain kit 是經過電泳後膠體經去離子水沖洗置於黑色染箱避光，加入 Sensitization

solution 放置 5 分鐘，再以去離子水沖洗，加入 development solution 中 20 秒後，膠體背景會轉為白色，而蛋白質點以不透光單點呈現。另外 Sypro Ruby gel stain kit 進行染色比對時，膠體被固定於 fixed buffer (50% methanol,7% acetic acid)避光進行約 30 分鐘，加入 60 mL 染劑(Sypro Ruby gel stain) 至少 10 小時，再使用 washed buffer (10% methanol,7% acetic acid)清洗膠體約 30 分鐘。Sypro Ruby stained gels 利用 xenon arc lamp-based CCD camera system (ProXPRESS, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) 以波長 488/610 nm 以進行激發 / 放電 (excitation/emission) 反應。圖像由 REDFIN 2D 膠體影像分析軟體(Ludersi)進行分析判讀。

(4) 樣品質譜儀前處理

第一步驟:取點,將 1 mL 吸管尖端以手術刀切下約 1 mm。利用此吸管尖端，將膠體上欲鑑定的蛋白質點取下 (直徑約 1-2 mm)，裝入 1.5 mL 離心管。加入 0.5mL 10% Acetic Acid 靜置 20 分鐘。以 1ml 去離子水，震盪清洗二次，每次 10 分鐘，移去上清液後，直接移入 -20°C 保存，或加入 1 mL 去離子水，置於 4°C 冰箱。第二步驟:清洗，以 1 mL 去離子水，震盪清洗膠體三次，每次 10 分鐘。加入 0.5 mL 25 mM Ammonium bicarbonate / 50% Acetonitrile (v/v)，震盪清洗膠體 15 分鐘，移去上清液。加入 0.5 mL Acetonitrile，待膠體皺縮後移走 Acetonitrile。加入 0.5 mL 50 mM Ammonium bicarbonate 震盪 5 分鐘後，再加入相同體積 Acetonitrile 震盪 15 分鐘，移去上清液。再次加入 0.5 mL Acetonitrile，待 gel 皺縮成白色狀後，移走上清液，上數步驟重複一次。室溫下乾燥數分鐘，輕拍管壁可見膠體在管內跳動。第三步驟:Reduction and alkylation (optional)，加入 50 μ L 10 mM DTT 於上述離心管中，於 56°C 反應 45 分鐘後，移走上清液。加入 50 μ L 55 mM Iodoacetamide 室溫下避光反應 30 分鐘後，移走上清液。加入 0.5 mL 25mM Ammonium bicarbonate / 50% Acetonitrile (v/v)，震盪清洗膠體 15 分鐘兩次，移去上清液。第四步驟:蛋白酶水解，加入 1 μ L Trypsin (20 ng) 於 37°C 反應 30 分鐘。再加入 3 μ L 25 mM Ammonium bicarbonate，於 37°C 反應隔夜。第五步驟:萃取，確定樣品至少有 3 μ L 的情形下，若無則加入少量去離子水，以超音波震盪 10 分鐘。再加入 3 μ L 50% Acetonitrile / 1%TFA sonication，以超音波震盪 10 分鐘。重複此一步驟後，離心取上清液以真空乾燥濃縮機濃縮樣品，將樣品沉澱物溶於 2 μ L 的 50% Acetonitrile / 1%TFA。取出 1 μ L 樣品和 1 μ L MALDI-TOF matrix solution 在 parafilm 上，以微量吸管混勻。取 1 μ L 混合物，點在 MALDI-TOF 樣品盤上 (Target plate)，待其風乾成結晶狀後即可操作

MALDI-TOF 進行分析。

(5) 蛋白質點身分鑑定

MALDI/TOF 質譜儀是將雷射激發以基質處理好的胜肽樣品，此樣品在飛行管中飛行後，偵測飛行時間，利用飛行時間和質核比之方程式換算為質量。此部份委託長庚大學寄生蟲科鄧致剛教授實驗室進行。將分析資料利用 Biotoools 軟體開啟質譜圖後，點選 MS 鍵即出現 Peptide Mass Fingerprint 視窗，<http://www.matrixscience.com/cgi/nph-mascot.exe?1>，由資料庫進行比對，利用目前已知的序列(Proteobacteria 中 other bacteria)鑑定 Enterobacter sp. NKNU02 之胺基酸序列。結果將顯示許多不同分子量之訊號，去除角質污染(Keratin)、Trypsin 和基質 (Matrix) 所產生的訊號後，得到許多不同的蛋白質序列，再對照二維電泳膠片上蛋白質樣點之分子量及等電位點進行比對。

得到的序列可直接由 Mascot Search Results 中連線至 NCBI (www.nlm.nih.gov) 網站進行 protein-protein BLAST，找出可能的蛋白質後，利用網站 KEGG (<http://www.genome.ad.jp/kegg>) 以及 ExPASy-enzyme (<http://tw.expasy.org/enzyme/>) 查詢此蛋白質在代謝途徑或生化反應中所具有的功能。

3.3.4 實驗品保/品管

1. 檢量線製備

(1) 目標污染物

MTBE 及 BTEX 標準混合液 1 mL 中，每種化合物之濃度皆為 2000 mg/L，將 2000 mg/L 之標準液以甲醇稀釋為高濃度儲備溶液後，儲存於 4°C 的冰箱中，待測時自冰箱中取出回溫 30 分鐘，以試劑水將之稀釋成 50 g/L、100 g/L、200 g/L、300 g/L、400 g/L 及 500 g/L 六種濃度，以 Purge & Trap 為前處理方式，以 GC/MS 進行定量分析。檢量線之相關係數(R^2)須大於 0.995 以上才合乎標準。

(2) Tert-butyl alcohol

利用高純度 tert-butyl alcohol 原液以甲醇稀釋為高濃度儲備溶液後，儲存於

4 °C 的冰箱中，待測時自冰箱中取出回溫 30 分鐘，以試劑水將之稀釋成 50 g/L、100 g/L、200 g/L、300 g/L、400 g/L 及 500 g/L 六種濃度，以 Purge & Trap 為前處理方式，以 GC/MS 進行定量分析。而檢量線之相關係數(R^2)須大於 0.995 以上才合乎標準。

(3) Tert-butyl formate

利用高純度 tert-butyl formate 原液以甲醇稀釋為高濃度儲備溶液後，儲存於 4 °C 的冰箱中，待測時自冰箱中取出回溫 30 分鐘，以試劑水將之稀釋成 50 g/L、100 g/L、200 g/L、300 g/L、400 g/L 及 500 g/L 六種濃度，以 purge & trap 為前處理方式，以 GC/MS 進行定量分析。而檢量線之相關係數(R^2)須大於 0.995 以上才合乎標準。

2. 方法偵測極限

方法偵測極限(method detection limits, MDL)的製作方法，首先以標準品製作標準濃度檢量線，之後配置七個最低濃度之標準品，經過完整分析步驟，將此分析值經過運算，可得到標準偏差(standard deviation, SD)，3.14 倍標準差即為此研究之方法偵測極限。

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n}$$

$$SD = \sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 / n - 1}$$

$$MDL = 3.14 \times SD$$

3. MTBE 回收率

於水中添加 50 mg/L 之標準品與擬似標準品，Purge & Trap 為前處理方式，以 GC/MS 進行定量分析求其回收率，進行評估數據之可靠性。

4. 精密度(Precision)

精密度為一批次重複分析所得測量值之間的差異性，一般而言會重複分析相同濃度的標準溶液七次，計算所得結果的平均值與標準偏差，再將標準偏差值

除以平均值，所得之值稱為相對標準偏差(RSD)，以此表示分析系統的精密度，其值必須低於25%。

$$\text{相對標準偏差(RSD)}=(\text{標準偏差}/\text{平均值})\times 100\%$$

本研究分析校正曲線最低濃度七次，將所得結果依照上式計算本方法之精密度。

5. 準確度(Accuracy)

為一批次所得之分析平均值與真值的差異程度，以百分比表示，需低於30%，計算公式為準確度(Accuracy)=|分析平均濃度－配置理論濃度|/配置理論濃度×100%，本研究取校正曲線的最低濃度並分析七次，並將所得結果依照上式計算之。

第四章、結果與討論

4.1 批次試驗

本計畫利用批次試驗可找出分解 MTBE 最適當菌量濃度，以及生長環境條件 (Deeb et al., 2000a)。利用由批次試驗所得因子(如:共代謝物質、菌量濃度...等)帶入生物反應槽中，作連續性控制，藉以處理菌種培養時的所遭遇之環境問題，最後以最適當調控條件進行分解試驗，以提高分解 MTBE 的速率為最終目標。

本計畫批次實驗中 MTBE 被分離菌種進行生物降解效果，於加入 MTBE 為第 0 天且分別於第 10 天與第 15 天，利用移除 MTBE 的百分比計算，由控制組 ($C_{MTBE,control}$)減去實驗組($C_{MTBE,exp}$)之 MTBE 濃度再除以控制組濃度(Mckelvie et al., 2009)，最後以百分比方式表示。

$$MTBE \text{ biodegradation} = \frac{C_{MTBE, control} - C_{MTBE, exp}}{C_{MTBE, control}} \times 100\%$$

4.1.1 菌種間降解能力比較

在批次試驗中，分析在不同時間點下各搖瓶中菌種對 MTBE 分解情形，其中各菌量由 pre-culture 大量培養，調整菌量濃度為 $OD_{600} = 0.1$ ，添加 MTBE 濃度為 10 mg/L 於 MSM 培養液中模擬受 MTBE 污染之地下水，比較各菌種降解時間長短是否有明顯差異，其中除了 *Klebsiella* sp. NKNU01 在降解第十五天時 MTBE 移除率與第 10 天並無明顯增加，其餘四株菌移除 MTBE 效果隨著實驗時間延長都有明顯增加現象。故推測可能在第十天時 *Klebsiella* sp. NKNU01 細菌生長活性受阻，使菌量無明顯提升進而能去再多分解 MTBE；另外，在分解 MTBE 效率比較中，*Bacillus* sp. NKNU01 在前十天並無明顯降解情形，而在第 15 天後降解效果較明顯，但仍屬五株菌中效力較低的菌種(表 4.1)。

表 4.1 五株菌於培養 10 與 15 天之降解 MTBE 情形

Species	MTBE degradation (%) ^a	
	Day10	Day15
<i>Pseudomonas</i> sp. NKNU01	1.67(0-2.98)	8.20(6.69-9.06)*
<i>Bacillus</i> sp. NKNU01	0.23(0-0.76)	3.76(2.22-4.59)*
<i>Klebsiella</i> sp. NKNU01	2.89(0.39-4.22)	4.88(3.34-5.71)
<i>Enterobacter</i> sp. NKNU01	2.61(0.11-3.94)	10.20(8.71-11.07)*
<i>Enterobacter</i> sp. NKNU02	26.02(27.63-23.80)	29.06(27.72-30.08)* ^c
Mix culture ^b	25.70(23.49-27.31)	29.32(27.97-30.34)* ^c

The initial MTBE concentration in each experiment was 10 mg/L.

* means p value <0.05 between Day10th and Day15th of the same bacteria.

^a means percentage (%) of degradation was calculated from the ratio (the amounts of removable MTBE with bacterial inoculum divided by its amounts without bacterial inoculum) multiplied by 100, and was derived from the average of the results in three-independent experiment, with the values of variation coefficient less than 10% (Mckelvie et al., 2009).

^b means mix culture of the five species at the same bacteria number.

^c means p value >0.05 between *Enterobacter* sp. NKNU02 and mix culture at Day15th.

Enterobacter sp. NKNU02 是屬效果最佳的菌種，在第 10 天時即降解 MTBE 約 26%，而第 15 天降解率到達 30%，故推測 *Enterobacter* sp. NKNU02 在降解初期降解速率較大，而後期時有代謝產物 TBA 產生，有文獻指出微生物會趨向較易分解之中間代謝產物 (如: TBA) 進行分解 (Wilson et al., 2005)，進而減少 MTBE 分解率而影響降解速度，故可以解釋在實驗後期當 TBA 產生時，MTBE 分解效率有減低現象。利用同菌量 (*Pseudomonas* sp. NKNU01, *Bacillus* sp. NKNU01, *Klebsiella* sp. NKNU01, *Enterobacter* sp. NKNU01, 及 *Enterobacter* sp. NKNU02) 混合成混合菌 (分別取同菌數)，再稀釋菌量為 $OD_{600}=0.1$ 進行相同批次降解試驗，在實驗第 10 天時降解 MTBE 約 25.7%，但於第 15 天時降解率增加約為 29.32%。結果發現在培育 15 天後，各菌種降解情形比較 (表 4.1)，發現 *Enterobacter* sp. NKNU02 在降解第 15 天時與混合菌降解能力無顯著差異 ($p>0.05$)，故推測構成混合菌降解效力主要來自於 *Enterobacter* sp. NKNU02 影響效力。各五株菌間降解 MTBE 效果都有明顯差異存在，其中降解效果最佳為 *Enterobacter* sp. NKNU02，其次為 *Enterobacter* sp. NKNU01。

4.1.2 選擇共代謝物質試驗

許多有關於 MTBE 生物分解的研究陸續發展，如同有好氧菌在不同混合培養條件下對 MTBE 的分解情形；或是利用單一微生物菌種對 MTBE 的分解情形的探討。另外，有文獻指出如 *Mycobacterium vaccae* 和 *Xanthomonas* sp. 兩株菌則是利用直鏈烷類與支鏈烷類當作共代謝物質，與 MTBE 進行共代謝的分解作用(Hyman and O'Reilly, 1999)。此外，就其代謝分解效果而言，共代謝分解實驗通常比以 MTBE 為單一碳源時容易進行。故本研究使用直鏈烷-正戊烷(Garner et al., 1999)與近期文獻中指出能增加 MTBE 降解效果的共代謝物質-乙醇(Österreicher-Cunha et al., 2009)，進行對本實驗菌種之共代謝物質挑選。

1. 正戊烷

在固定菌量為 $OD_{600} = 0.1$ 、MTBE 污染濃度為 10 mg/L，批次試驗時間為期 21 天，各菌種在有/無共代謝物質下，MTBE 的分解情形。由表 4.2 可知加入共代謝物質-正戊烷在實驗第 10 天時，MTBE 降解幅度顯著提升(p value <0.05)，其中單一菌種 MTBE 降解效果提升最大為 *Bacillus* sp. NKNU01，其次為 *Klebsiella* sp. NKNU01；另外，*Enterobacter* sp. NKNU02 在使用共代謝物質情況下，反而會使降解效果明顯下降。另外，由於實驗第 20 天時降解率與實驗第 15 天兩者於統計上並無顯著差異，而在表 4.1 未呈現。正戊烷對於本研究中所使用菌種在進行 MTBE 降解時，都會造成顯著影響，如 *Bacillus* sp. NKNU01 與 *Klebsiella* sp. NKNU01 是正影響，能使原本分解 MTBE 效果提昇；另一方面，正戊烷對於 *Enterobacter* sp. NKNU02 則是屬於抑制影響，反而會減緩菌種對 MTBE 的分解效果。

混合菌在添加正戊烷的共代謝試驗中，可有效提高 MTBE 降解率。在添加正戊烷後，使原先無法正常生長之菌種得以藉由正戊烷得到碳源，進而供給細胞生理所需。推測混合菌在添加共代謝物質後，降解率明顯增加原因為混合菌株中的某一菌株降解 MTBE 或正戊烷後之代謝產物，可以被另一株菌株作為碳源繼續利用，使降解 MTBE 效力增加(Mo et al., 1997)。

表 4.2 菌種培養 10 與 15 天於添加與不添加正戊烷共代謝降解 MTBE 差異情形

Species	Removal of MTBE (%) ^b at Day10 th		Removal of MTBE (%)at Day15 th	
	- pentane	+ pentane (14.3 mg/L)	- pentane	+ pentane (14.3 mg/L)
<i>Pseudomonas</i> sp. NKNU01	1.67(2.98-0)	10.67(11.55-9.18)*	8.20(9.06-6.69)	13.40(14.86-11.03)* ^a
<i>Bacillus</i> sp. NKNU01	0.23(0.76-0)	17.90(18.84-16.47)*	3.76(4.59-2.22)	21.07(22.62-18.79)* ^a
<i>Klebsiella</i> sp. NKNU01	2.89(4.22-0.39)	15.48(16.40-14.03)*	4.88(5.71-3.34)	14.57(16.04-12.21)*
<i>Enterobacter</i> sp. NKNU01	2.61(3.94-0.11)	10.71(11.58-9.22)*	10.20(11.07-8.71)	13.87(15.34-11.51)* ^a
<i>Enterobacter</i> sp. NKNU02	26.02(27.63-23.80)	18.04(18.97-16.60)*	29.06(30.08-27.72)	19.42(20.96-17.13)* ^a
mix culture	25.70(27.31-23.49)	64.24(65.54-63.17)*	29.32(30.34-27.97)	64.48(66.58-62.75)*

The initial MTBE concentration in each experiment was 10 mg/L.

* means p value < 0.05 between biodegradation of MTBE in the presence or absence of pentane.

^a means p value < 0.05 between biodegradation of MTBE with pentane between day 10th and day 15th.

^b means percentage (%) of degradation was calculated from the ratio (the amounts of removable MTBE with bacterial inoculum divided by its amounts without bacterial inoculum) multiplied by 100, and was derived from the average of the results in three-independent experiment, with the values of variation coefficient less than 10% (Mckelvie et al., 2009).

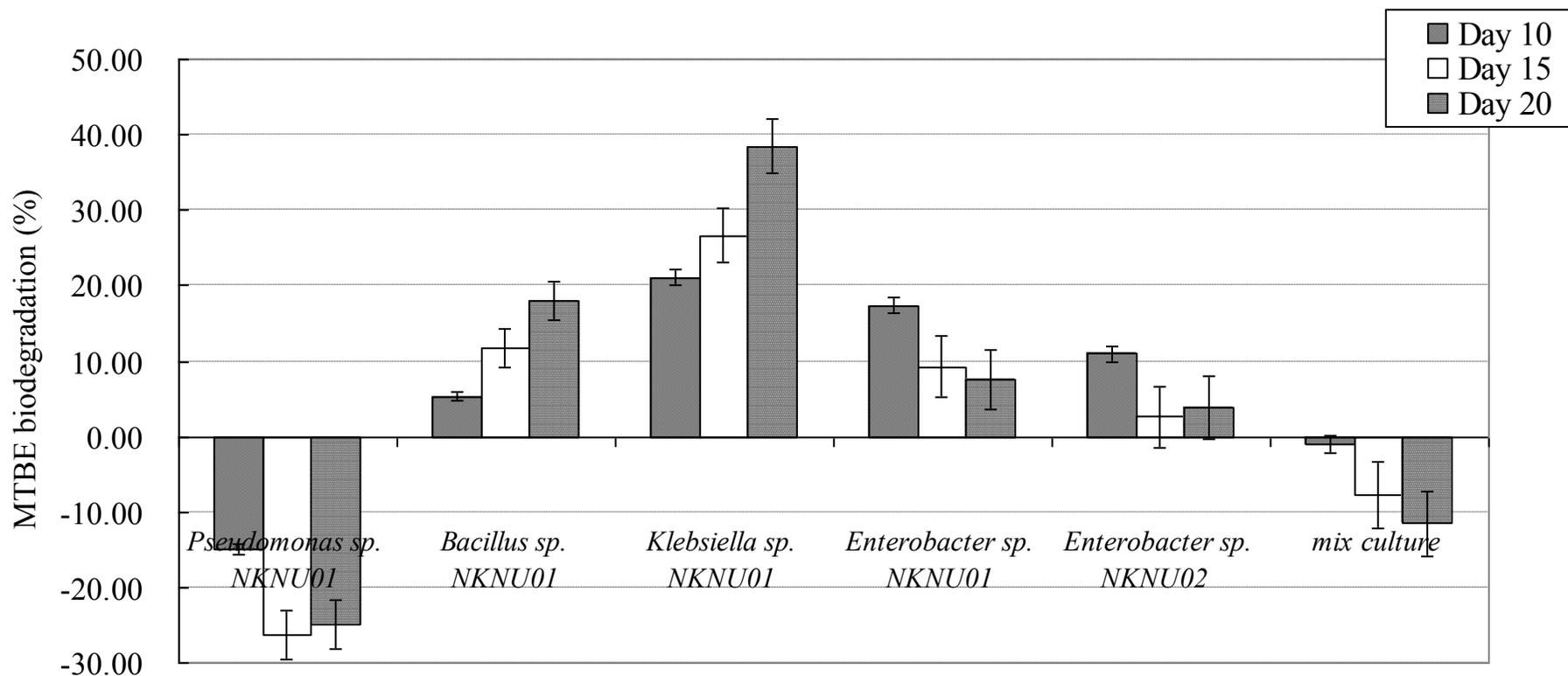
比較第 15 天與第 10 天降解資料，共代謝物質(Pentane)影響 MTBE 降解情形差異，如表 4.2 所示可知除了 *Pseudomonas* sp. NKNU01 在降解第 15 天與第 10 天並無明顯增加，其餘四株菌在第 15 天時降解 MTBE 效果都有明顯增加現象；但其中因正戊烷會抑制 *Enterobacter* sp. NKNU02 降解 MTBE，原本在 MTBE 為單一碳源前提下 *Enterobacter* sp. NKNU02 為五株菌中最具有潛力分解 MTBE 菌種，但在具有正戊烷的環境下卻無法有效分解 MTBE，故共代謝降解效果最佳為 *Bacillus* sp. NKNU01。

此批次實驗所使用共代謝物質-正戊烷，所添加含有 MTBE 培養液中濃度是參考前人研究所提之比例(Garner et al., 1999)，正戊烷與 MTBE 比值為($C_{\text{pentane}}/C_{\text{MTBE}}=10:7$ ，濃度單位(mg/L))，能使菌種降解 MTBE 效果為最佳，但本研究所使用菌種為高雄地下水中所分離出菌種，與文獻中菌種所需之最適當共代謝物質添加比例有所不同。各菌種降解 MTBE 最佳之共代謝物質會有所不同，且非所有菌種合適相同的共代謝物質添加於 MTBE 培養比例。故有些菌種 MTBE 降解率增加效果會有所不同。

2. 乙醇

第二種共代謝物質試驗為參考 Österreicher-Cunha et al.於 2009 發現的乙醇進行降解 MTBE 試驗。其中乙醇添加比例仿效正戊烷進行，由圖 4.1 可知僅有 *Bacillus* sp. NKNU01 與 *Klebsiella* sp. NKNU01 會隨時間而提高 MTBE 的移除效果。有文獻指出在添加了乙醇後會增加揮發性物質之蒸氣壓，造成物質揮發程度加劇(Niven, 2005)，如在控制組中發現加入乙醇當作共代謝物質時，會有效增加 MTBE 的揮發效果，進而會有實驗組比控制組 MTBE 殘留量高現象，其中使 *Pseudomonas* sp. NKNU01 與 Mix culture 呈現降解效果為負值(表 4.3)。故推論乙醇添加於 MTBE 的培養液中，可能會加速 MTBE 的揮發速度，而使實驗進行有所誤差。另外，由表 4.3 顯示降解作用在第十五天時，*Enterobacter* sp. NKNU01 與 *Enterobacter* sp. NKNU02 兩株菌雖然也有些許共代謝情形產生，但與 MTBE 為單一碳源相較之下卻無明顯共代謝作用使 MTBE 降解效果增加之現象產生；相較之下，*Bacillus* sp. NKNU01 與 *Klebsiella* sp. NKNU01 在添加乙醇後，與無添加其他碳源實驗組相較之下，MTBE 移除率有顯著增加之現象。

考量實驗設計 MTBE 在添加共代謝物質後，其揮發程度變化穩定性，且正戊烷與乙醇共代謝效果影響比較之下，雖然正戊烷會抑制 *Enterobacter* sp. NKNU02，其他四株菌種在共代謝物質協助下，降解 MTBE 效果皆有較顯著的增幅；且對乙醇添加後有明顯增加效果只有 *Bacillus* sp. NKNU01 與 *Klebsiella* sp. NKNU01，其餘菌種並無明顯穩定的效果，故在本研究後續實驗中將選擇正戊烷為共代謝物質進行生物反應槽試驗。



The initial MTBE concentration in each experiment was 10 mg/L. Percentage (%) of degradation was calculated from the ratio (the amounts of removable MTBE with bacterial inoculum divided by its amounts without bacterial inoculum) multiplied by 100, and was derived from the average of the results in three-independent experiment, with the values of variation coefficient less than 10% (Mckelvie et al., 2009).

圖 4.1 各菌株添加共代謝物質-乙醇共培養 10、15 與 20 天之 MTBE 降解情形

表 4.3 各菌種對 MTBE 與共代謝物質-乙醇之降解情形

Species	MTBE degradation (%) at Day 15	
	-Ethanol	+Ethanol
<i>Pseudomonas</i> sp. NKNU01	8.20(6.69-9.06)	-26.36(-31.30- -23.12)
<i>Bacillus</i> sp. NKNU01	3.76(2.22-4.59)	11.75(7.62-14.27)*
<i>Klebsiella</i> sp. NKNU01	4.88(3.34-5.71)	26.67(24.06-30.29)*
<i>Enterobacter</i> sp. NKNU01	10.20(8.71-11.07)	9.25(7.01-13.25)
<i>Enterobacter</i> sp. NKNU02	29.06(27.72-30.08)	2.61(0.52-6.75)
Mix culture	29.32(27.97-30.34)	-7.71(-10.21- -3.34)

* : $P < 0.005$ between biodegradation of MTBE with and without ethanol.

The initial MTBE concentration in each experiment was 10 mg/L. means percentage (%) of degradation was calculated from the ratio (the amounts of removable MTBE with bacterial inoculum divided by its amounts without bacterial inoculum)

4.1.3 不同菌量對 MTBE 分解能力影響

降解實驗中菌株的起始濃度也有一定影響力，根據文獻(Zhong et al., 2007)中的實驗結果，菌株 PM1 及菌株 *Chryseobacterium* sp. 在培養基的起始濃度越高，其 MTBE 的降解速度也會隨之提高，利用不同菌量(OD₆₀₀)進行批次試驗，分別以 OD₆₀₀ 為 0.1 與 0.2 來進行測試。預期結果提高菌量會使 MTBE 降解率提高，菌量等倍數放大提升亦會有倍率成長現象。實驗套用 4.1.2 所述，能提高 MTBE 降解效果的共代謝物質-正戊烷(Pentane)進行試驗，結果顯示各菌種在提高菌量後降解率都有明顯增加趨勢(Deeb et al., 2000b)。

其中利用 OD₆₀₀ 與菌量乾重相關減量線(表 4.4)，可知菌量 OD₆₀₀ 為 0.1 之各菌量乾重，*Enterobacter* sp. NKNU02 菌量重為 202.44 mg，其餘菌種 *Pseudomonas* sp. NKNU01、*Bacillus* sp. NKNU01、*Klebsiella* sp. NKNU01 與 *Enterobacter* sp. NKNU01 分別為 72.66、36.51、65.00 與 145.91 mg。提升菌量為 OD₆₀₀ 為 0.2，各菌量重分別為 *Pseudomonas* sp. NKNU01 為 89.52 mg，*Bacillus* sp. NKNU01 為 67.22 mg，*Klebsiella* sp. NKNU01 為 96.60 mg，*Enterobacter* sp. NKNU01 為 174.82 mg，與 *Enterobacter* sp. NKNU02 為 237.08 mg。

由分析高菌量實驗組(OD₆₀₀ = 0.2)與對低菌量實驗組(OD₆₀₀ = 0.1)是否具有顯著差異，所有單一菌種 *p* 值小於 0.05，由此顯示提高菌量會對 MTBE 降解效果產生顯著影響，其中單一菌效果最佳為 *Enterobacter* sp. NKNU02，其次為 *Bacillus* sp. NKNU01 與 *Klebsiella* sp. NKNU01。

然而，實驗預期高菌量實驗組(OD₆₀₀=0.2)降解 MTBE 效果會與低菌量實驗組(OD₆₀₀=0.1)相較之下，會成倍數成長，由表 4.5 可知高菌量實驗組(OD₆₀₀=0.2)對低菌量實驗組(OD₆₀₀=0.1)平均倍數(\bar{C})為 1.58。實際高菌量實驗組(OD₆₀₀=0.2)降解 MTBE 幅度略小於預期值最大值(與菌量等倍數成長的降解效果)，但 *Klebsiella* sp. NKNU01、*Enterobacter* sp. NKNU01 與 *Enterobacter* sp. NKNU02 於高菌量降解效果都在平均增加倍數效果以上，但尚未達到等倍數增幅效果。推測實驗使用 125 ml 三角錐型瓶，且裝有 MSM 培養液 60ml，其中空氣所佔比例有限，當菌量增加會造成生長空間變小、所需溶氧值增加，進而菌種間會有相互競爭現象(Shim et al.,

表 4.4 菌種乾重與吸光值(OD₆₀₀)檢量線

Species	Relationship ($W = a (OD_{600}) + b$)	R ²
<i>Pseudomonas</i> sp. NKNU01	$W = 0.1686 (OD_{600}) + 0.0558$	0.967
<i>Bacillus</i> sp. NKNU01	$W = 0.3071 (OD_{600}) + 0.0053$	0.9997
<i>Klebsiella</i> sp. NKNU01	$W = 0.319 (OD_{600}) + 0.0331$	0.9915
<i>Enterobacter</i> sp. NKNU01	$W = 0.2891 (OD_{600}) + 0.117$	0.9891
<i>Enterobacter</i> sp. NKNU02	$W = 0.3464 (OD_{600}) + 0.1678$	0.9471

表 4.5 不同菌量下各菌降解 MTBE 情形

Species	MTBE degradation (%)		Ratio ^c	Theoretical range of degradation ^d ($a \times \bar{C}$)-($a \times 2$)
	OD ₆₀₀ = 0.1 ^a	OD ₆₀₀ = 0.2 ^b		
<i>Pseudomonas</i> sp. NKNU01	12.25 (11.28-13.21)	16.79 (16.70-16.89)*	1.37	19.38-24.50
<i>Bacillus</i> sp. NKNU01	17.45 (16.50-18.40)	26.41(26.56-25.41)*	1.51	27.60-34.90
<i>Klebsiella</i> sp. NKNU01	16.92 (16.02-17.83)	26.37(26.27-26.46)* ^e	1.56	26.77-33.84
<i>Enterobacter</i> sp. NKNU01	13.03 (11.32-14.75)	23.53(23.43-23.62)* ^e	1.81	20.61-16.06
<i>Enterobacter</i> sp. NKNU02	20.33 (18.53-22.14)	33.77(33.68-33.87)* ^e	1.66	32.16-40.66

* means p value < 0.05 between low cell density (OD₆₀₀ = 0.1) and high cell density (OD₆₀₀ = 0.2)

^a means average of remove of MTBE (%) at the low cell density (OD₆₀₀ = 0.1)

^b means average of remove of MTBE (%) at the high cell density (OD₆₀₀ = 0.2)

^c means average of remove of MTBE (%) at the low cell density (OD₆₀₀ = 0.1) divided by at the high cell density (OD₆₀₀ = 0.2).

\bar{C} means average of the C of different bacteria $\bar{C} = \frac{\sum(b/a)}{n}$

^d means theoretical range of remove of MTBE (%) at the high cell density (OD₆₀₀ = 0.2)

^e means average of remove of MTBE (%) reach the expectative range at the high cell density (OD₆₀₀ = 0.2)

2002), 使生長現象已達飽和狀態, 無法使 MTBE 降解效果增幅情形與菌量增加成正比, 在此亦為符合菌量無法與分解關係成正比(Zhong et al., 2007)。實驗結果在菌量差異兩倍情形下, 降解效果提升有限, 考量操作流程、菌量大量培養耗成本等問題, 本實驗在進入生物反應槽試驗仍是使用低菌量實驗組($OD_{600}=0.1$)來進行實驗。

4.2 生物反應槽試驗

本研究使用之生物反應槽屬於批次反應槽(圖 4.2)，與批次實驗所使用之錐形瓶培養條件，除了生長空間增加，其批次試驗錐形瓶中氧氣約占總體積 7.14 %，另外生物反應槽中氧氣約占總體積之 11.67 % (錐形瓶/生物反應槽總空間減去培養積體積即為空氣體積，空氣體積所占總體積之百分比乘上空氣中氧氣比例)，培養基中溶氧值會因為生物反應槽之攪動葉片而使頂空氧氣溶入培養基有所不同，且攪動葉面會使培養基與 MTBE 與懸浮態之微生物接觸較為批次試驗中良好，另外生物反應槽可以藉由幫浦程式控制維持培養基中 pH 值為 7.2，使生物反應槽中微生物具有較適當的生長條件。



圖 4.2 生物反應槽實驗裝置

4.2.1 生物反應槽條件測試

生物反應槽設計規劃中(圖 4.3a)，有四具幫浦調控 pH 值的酸鹼瓶、防止菌種生長時產生氣泡的消泡劑、以及給予菌種能量的碳源，另外調控培養過程中的溶氧值(DO)所使用的空壓機，最後在槽體出氣端連接水瓶防止 MTBE 直接暴露環境中。實驗中發現添加於培養液的 MTBE 經由幫浦轉速(30 rpm)進入槽體時，因 MTBE 屬高揮發性物質容易在此過程快速流失，故不選擇幫浦投入 MTBE，而是直接由接種孔中直接注射，減低 MTBE 揮發現象。另外在實驗中也發現為維持培養液中溶氧值，空壓機打氣進入槽體在出氣端會將溶於水中液相的 MTBE 經由空氣的暴露而轉移成氣相型態，進而由出氣端逸散到水瓶；然而，實驗結果發現若空壓機持續打氣會使 MTBE 揮發速度達每小時 50%，進而無法在培養液中維持 MTBE 的濃度，故最後規劃空壓機只有在取樣過程中打入空氣，以防全槽體遭受污染，但實驗過程中溶氧值也無法得到維持恆定(圖 4.3b)。

其中因每次試驗添加入 MTBE 原液(> 99%, w/w)略有些許誤差，且取樣過程亦會造成誤差，故實驗中濃度以百分比表示：

$$\text{Residual of MTBE}(\%) = \frac{\bar{C}_{\text{MTBE experiment}}}{\bar{C}_{\text{MTBE initial}}} \times 100\%$$

由生物反應槽新式規劃設定，可使 MTBE 維持約在 91.4%，實驗進行中能確保分離菌株與 MTBE 混合均勻，能更彰顯分離菌種降解 MTBE 潛力。如表 4.6 顯示在實驗開始第七天，生物反應槽的架設，槽體攪拌機械力、取樣過程空氣逸散，使 MTBE 揮發逸散約 8.5%，在理想情形下，菌種在進行生物降解過程所損耗之 MTBE 百分率扣除控制組 MTBE 受機械力及自然逸散比例，其殘留 MTBE 百分率即為受菌種分解的部分。

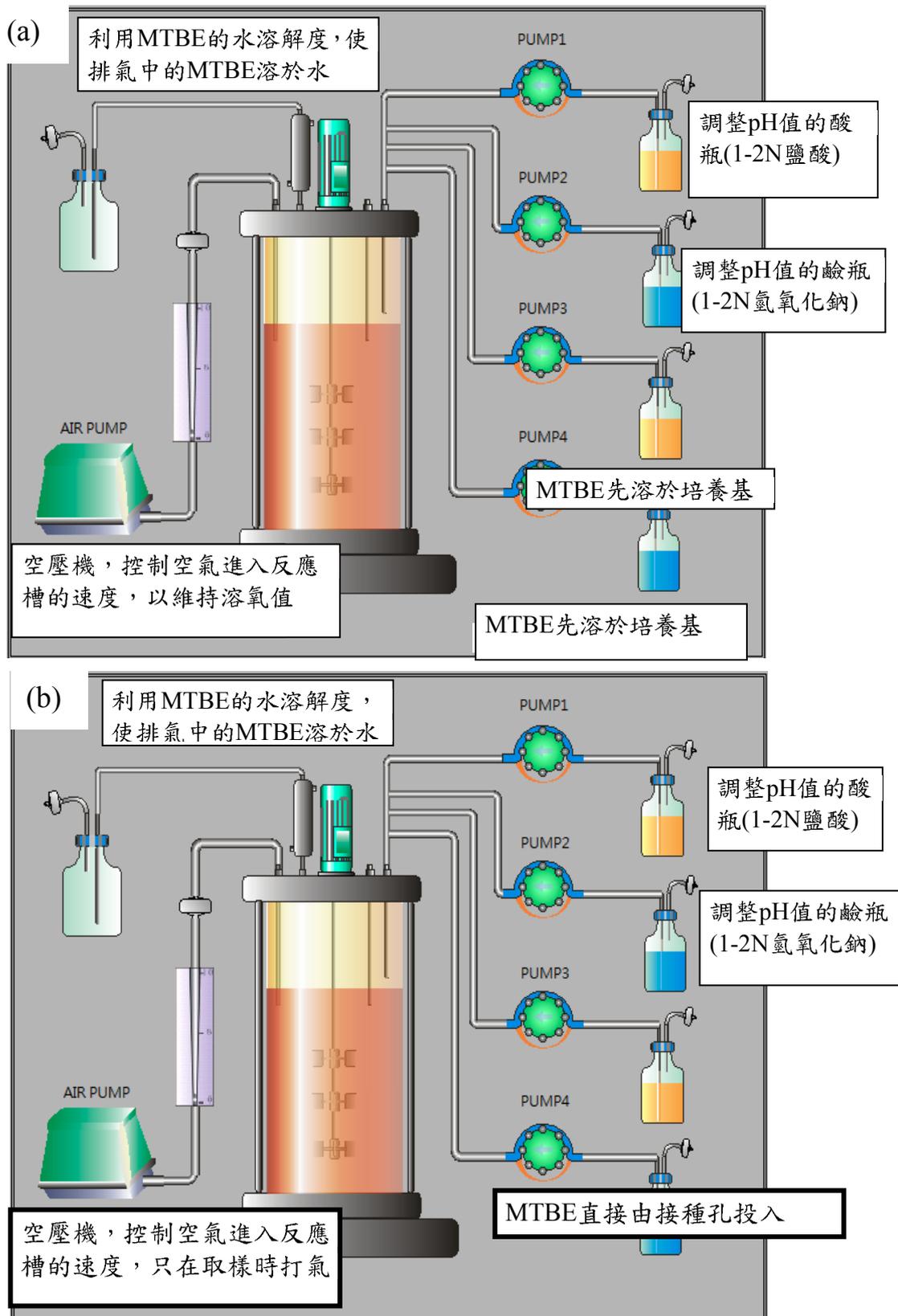


圖 4.3 生物反應槽規劃設計圖(a) 初步設計 (b) 更改後設計

表 4.6 MTBE 於生物反應槽之揮發情形

Day	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Con C (mg/L)	101.94 (101.46-102.41)	100.89 (100.18-101.61)	98.53 (98.36- 98.72)	96.22 (95.63- 96.81)	96.26 (95.83- 96.68)	93.38 (93.54- 94.22)	92.69 (92.06- 93.22)	92.32 (91.73- 92.91)
Residual percentage(%)	100.00	99.07	96.96	94.89	94.93	92.36	91.74	91.41

4.2.2 生物反應槽無菌測試

在實驗中所使用的生物反應槽，是屬於全槽體(包含 pH probe and DO probe)都是可以進行高溫高壓滅菌，而後進行連續性監控 pH 值、溶氧值以及吸光值 OD₆₀₀ 檢測。可知生物反應槽連續進行實驗十天，其 pH 達穩定(pH=7.2± 0.05)；且溶氧值維持穩定無明顯下降趨勢，但因應實驗關閉進氣幫浦使用，故溶氧值會有些許下降趨勢；再者，於抽樣利用分光光度計分吸波長 600 nm 的培養液，發現培養液大約維持恆定(OD₆₀₀ 約為 0.001)，即確定為無菌狀態，故利用此生物反應槽進行實驗，推論連續十天全槽體不會被環境中菌種污染。

4.2.3 菌種於生物反應槽分解 MTBE 情形

分別利用分離菌種 *Pseudomonas* sp. NKNU01、*Bacillus* sp. NKNU01、*Klebsiella* sp. NKNU01、*Enterobacter* sp. NKNU01 以及 *Enterobacter* sp. NKNU02 五株菌種進行利用生物反應槽測試單一菌種分解 MTBE 之潛力。其中 *Enterobacter* sp. NKNU02 在批次試驗中發現利用共代謝物質-正戊烷，會抑制菌種分解 MTBE 效果，故在生物反應槽試驗中，只使用 MTBE 為其唯一碳源；而其餘四株菌分別各自進行是否含有共代謝物對 MTBE 分解效果的影響試驗。另外，於 2010 年加油站污染場址監測 MTBE 數據，發現 MTBE 濃度為 10-252 mg/L，且考量 MTBE 揮發程度，故本研究選取 100 mg/L 的 MTBE 進行生物反應槽試驗。

1. *Enterobacter* sp. NKNU02 降解實驗

生物反應槽中所使用 100 mg/L MTBE 進行生物降解試驗，藉以評估在高濃度的 MTBE 下各菌種分解 MTBE 潛力。首先挑選在批次試驗中降解效果最佳的 *Enterobacter* sp. NKNU02，進行高濃度降解試驗，如圖 4.4 所示。在第 0 天將 MTBE 置入生物反應槽中，MTBE 起始平均濃度為 105.3 mg/L，起始平均菌量 OD₆₀₀ 為 0.102，平均菌落數為 2.14E+08 CFU/ml。在經過 24 小時，MTBE 移除量約為 15 mg/L，此時菌量亦有增加趨勢；於第三天發現，菌量與菌落數到達最大值。可推估降解速度大約在第三與第四天前為最大(MTBE 殘存率之曲線斜率最大)。可推測因空壓機在投入 MTBE 後就將其關閉，且約在第 3 天時溶氧值就完全降為零，故全槽體是屬缺氧環境，且使生物生長條件受限，使 MTBE 分解情形受影響。

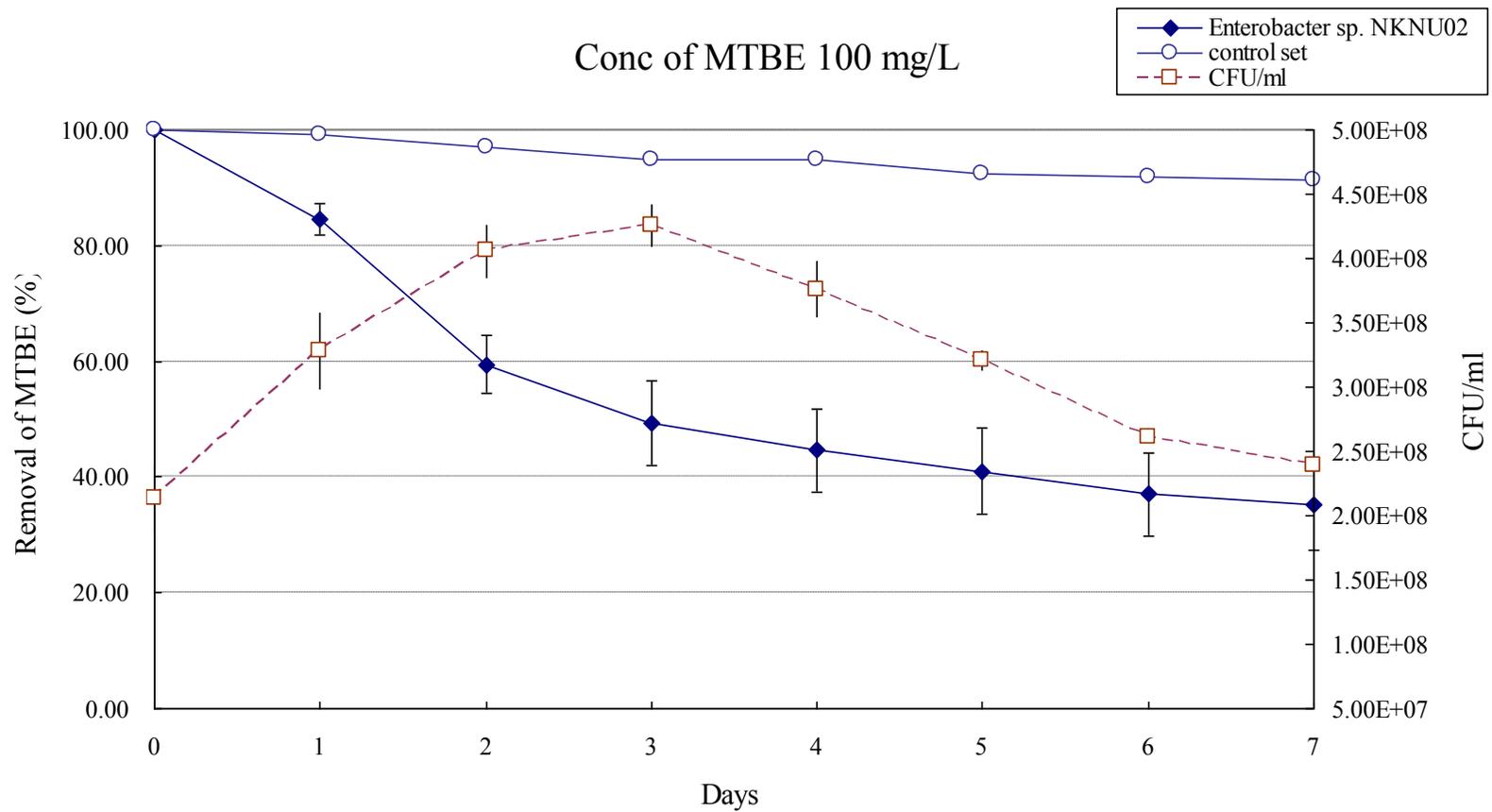


圖 4.4 *Enterobacter* sp. NKNU02 在生物反應槽試驗中降解 MTBE 與菌數表現(CFU/ml)趨勢圖

在降解試驗後期 MTBE 的濃度就無明顯變化，實驗結束 MTBE 約為 35 mg/L，實驗結束菌落數約為 $2.39E+08$ CFU/ml，菌量 OD₆₀₀ 吸光值為 0.122。*Enterobacter* sp. NKNU02 分解 100 mg/L 之 MTBE 約為 56.3%。

2. *Pseudomonas* sp. NKNU01 降解實驗

在 *Pseudomonas* sp. NKNU01 降解試驗中，在批次試驗中與共代謝物質反應下 MTBE 分解效果較好，故生物反應槽試驗中分別進行單一碳源-MTBE 與共代謝物質-正戊烷共存兩組試驗進行，降解情形如圖 4.5 所示。直接分解 MTBE 試驗中，MTBE 起始平均濃度為 108.12 mg/L，起始平均菌量 OD₆₀₀ 為 0.106，起始平均菌落數為 $1.26E+08$ CFU/ml。於 24 小時，MTBE 移除約 10%，且菌落數都有明顯生長現象，但在第二天到第七天降解 MTBE 的效果就不明顯；由菌量觀察在第二天到與第四天時菌落數為最大值，約在第五天快速下降。推測此現象可能是因為在實驗前 24 小時 *Pseudomonas* sp. NKNU01 可分解 MTBE 生成中間代謝產物(TBA)，較容易被 *Pseudomonas* sp. NKNU01 所利用分解，故會減少 *Pseudomonas* sp. NKNU01 分解 MTBE 之現象。

另外與共代謝物質-正戊烷共代謝試驗中，MTBE 與正戊烷同時置入生物反應槽中。於實驗 24 小時 MTBE 移除約 12%，且相較於直接代謝實驗中，共代謝試驗菌落數與菌量吸光值都有明顯生長現象，較直接代謝試驗 MTBE 降解率大；在降解試驗第三天時菌落數達到最高值，但降解速率卻無明顯增加，推測正戊烷可以維持 *Pseudomonas* sp. NKNU01 存活度，但對於降解速度卻無明顯效力，但與單一碳源相較之下，共代謝試驗 MTBE 移除率效果仍較佳。

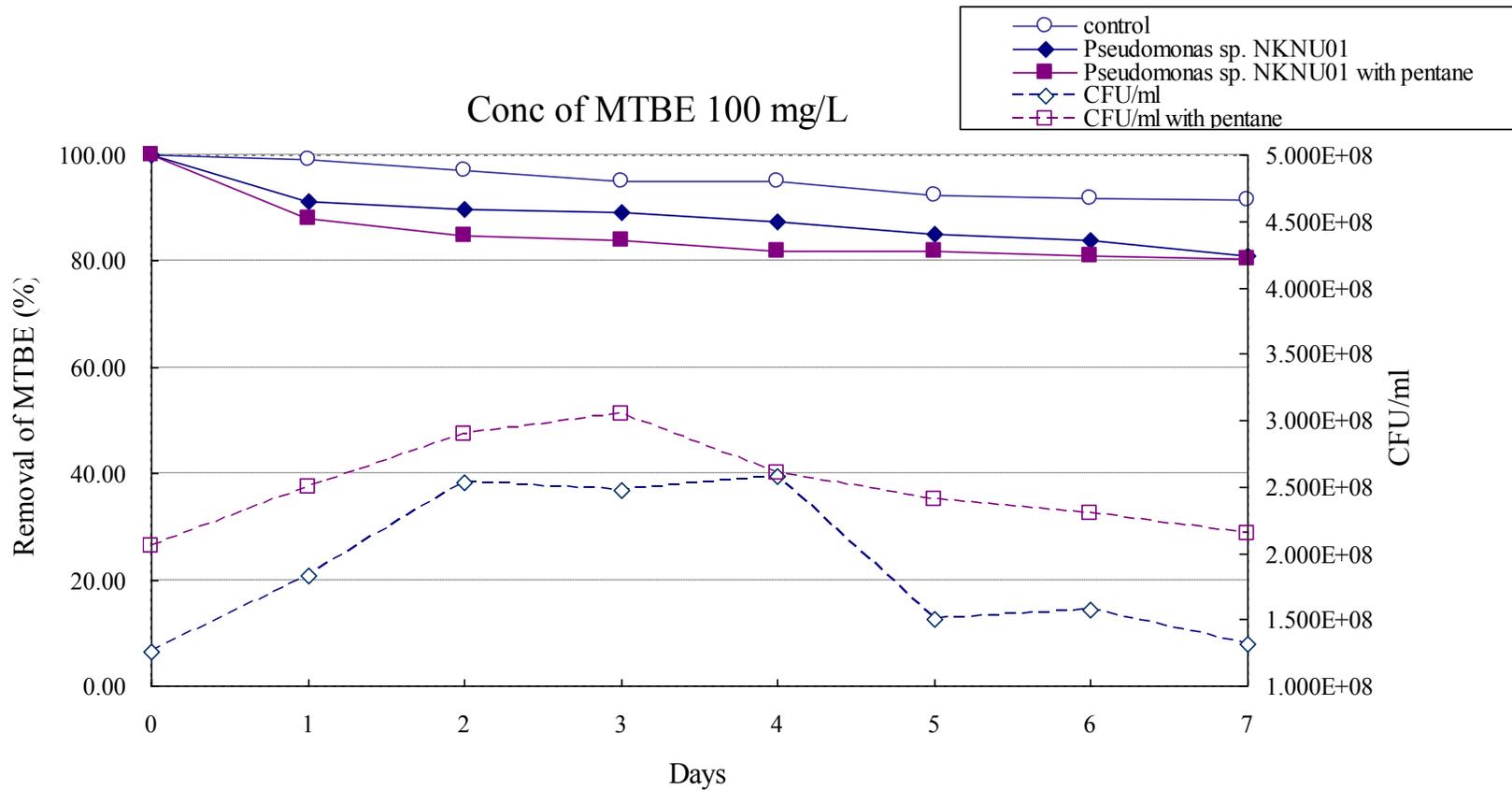


圖 4.5 *Pseudomonas sp. NKNU01* 在生物反應槽試驗中降解 MTBE 與菌數表現(CFU/mL)趨勢圖

3. *Bacillus* sp. NKNU01 降解實驗

在直接分解 MTBE 試驗中，MTBE 起始平均濃度為 97.98 mg/L，起始平均菌量 OD₆₀₀ 為 0.117，起始平均菌落數為 9.41E+07 CFU/ml，降解趨勢如圖 4.6 所示。可知降解 MTBE 的效果不明顯；且菌量吸光值與菌落數完全沒有增加的現象，且有下降趨勢。由此推論 *Bacillus* sp. NKNU01 無法直接分解 MTBE，MTBE 會導致菌種無生長現象，進而死亡。

另外與共代謝物質-正戊烷共代謝試驗中，於實驗 24 小時 MTBE 移除約 15%，與直接降解試驗有顯著差異；且相較之下，共代謝試驗菌落數與菌量吸光值都有明顯生長現象，由此推論共代謝物質-正戊烷可供 *Bacillus* sp. NKNU01 生長於高濃度的 MTBE 中，且能兼併將 MTBE 進行生物分解。推測因為在前期時部分 MTBE 已被 *Bacillus* sp. NKNU01 分解成中間產物，在碳源選擇之下，推測 *Bacillus* sp. NKNU01 選擇正戊烷亦或分解 MTBE 之代謝產物進行生物分解，以供細菌生存必須能量來源，使 MTBE 降解率減低。

4. *Klebsiella* sp. NKNU01 降解實驗

Klebsiella sp. NKNU01 降解試驗中，在直接代謝 MTBE 試驗中，MTBE 起始平均濃度為 94.175 mg/L，起始平均菌量 OD₆₀₀ 為 0.094，起始平均菌落數為 9.00E+07 CFU/ml，降解情形如圖 4.7 所示。於實驗 24 小時 MTBE 移除約 9%，但實驗降解 MTBE 的效果不明顯；且菌量吸光值與菌落數完全沒有增加的現象。由此推論 *Klebsiella* sp. NKNU01 在具有微生物活性時，實驗初期會分解 MTBE，但當 *Klebsiella* sp. NKNU01 失去活性會導致降解率減低。

另外與共代謝物質-正戊烷共代謝試驗中，於實驗 24 小時 MTBE 移除約 14%，與直接降解試驗有顯著差異；共代謝試驗菌落數與菌量吸光值都有明顯生長現象。與 *Bacillus* sp. NKNU01 相似，正戊烷可供微生物生長於高濃度的 MTBE 中，且亦可分解 MTBE。

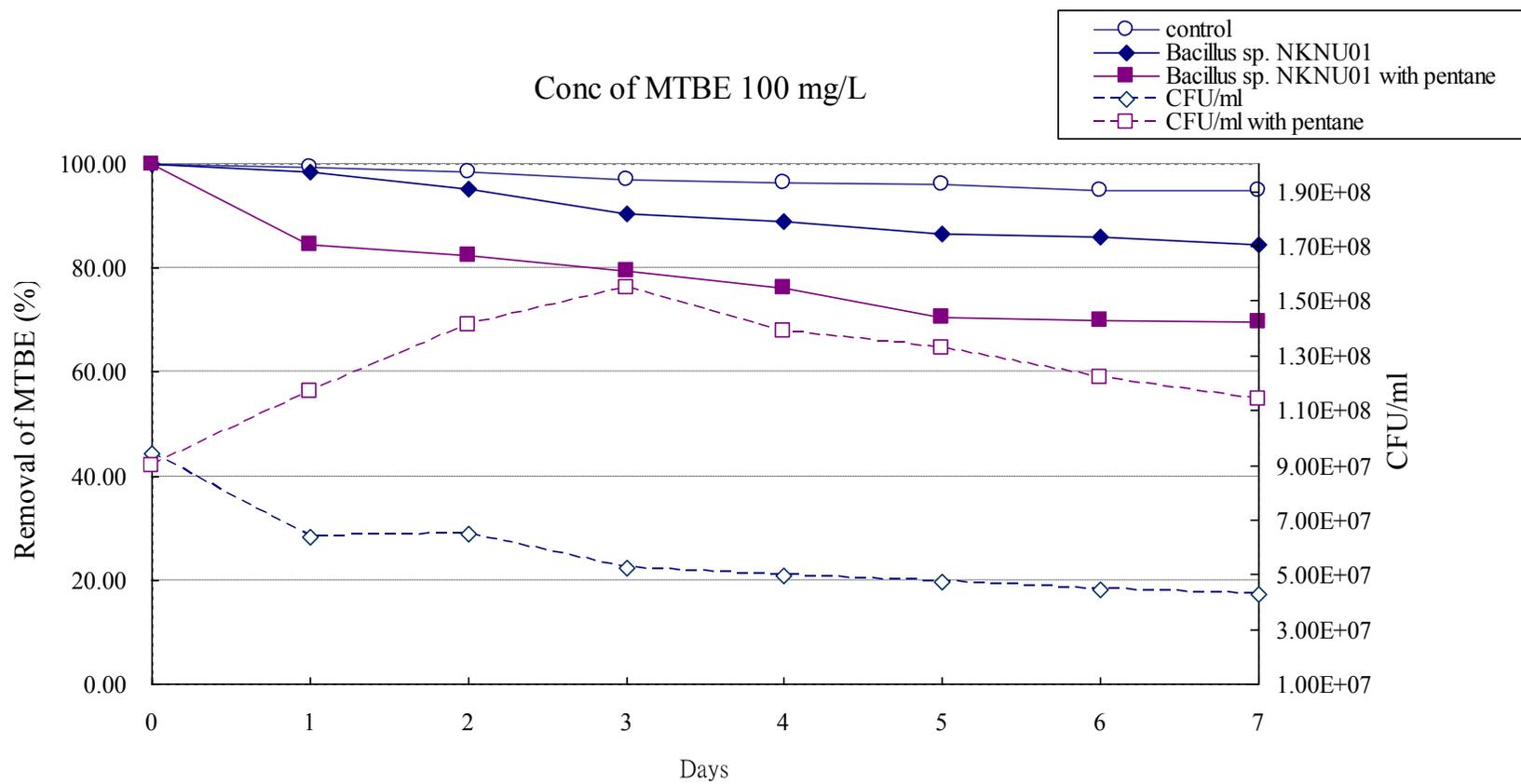


圖 4.6 *Bacillus* sp. NKNU01 在生物反應槽試驗中降解 MTBE 與菌數表現(CFU/mL)趨勢圖

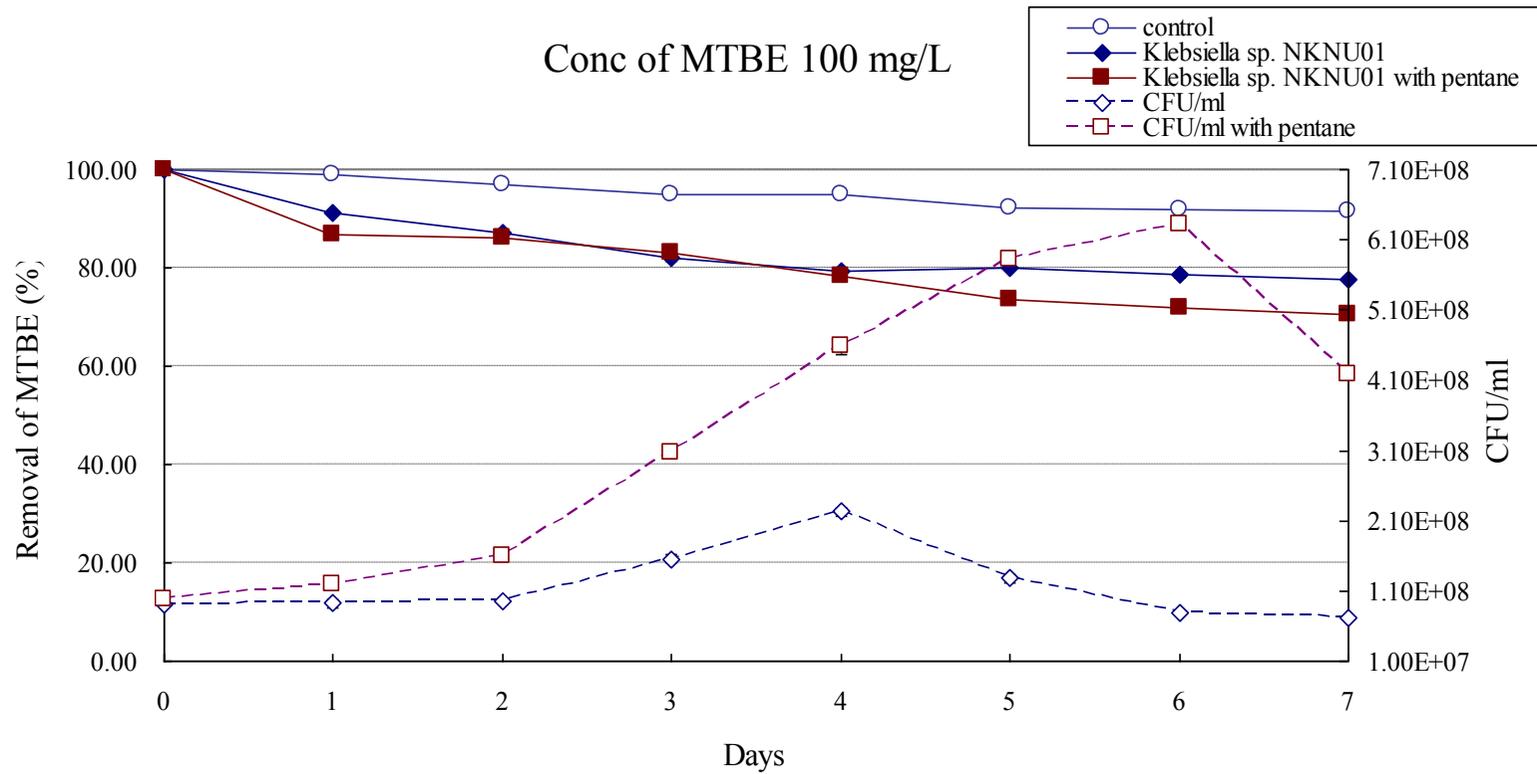


圖 4.7 *Klebsiella sp. NKNU01* 在生物反應槽試驗中降解 MTBE 與菌數表現(CFU/mL)趨勢圖

5. *Enterobacter* sp. NKNU01 降解實驗

Enterobacter sp. NKNU01 降解試驗中，在直接降解 MTBE 試驗中，MTBE 起始平均濃度為 98.1 mg/L，起始平均菌量 OD₆₀₀ 為 0.114，起始平均菌落數為 1.09E+08 CFU/ml，降解情形如圖 4.8 所示。*Enterobacter* sp. NKNU01 至實驗第四天皆有移除 MTBE 現象；且菌落數在第四天達最大值。由此推論 *Enterobacter* sp. NKNU01 會以 MTBE 為單一碳源進行生物分解試驗，且 *Enterobacter* sp. NKNU01 在高濃度之 MTBE 中亦可生長，故 *Enterobacter* sp. NKNU01 可將其做為生長能量來源。

另外與正戊烷共代謝試驗中，於實驗 24 小時 MTBE 移除約 6%，與直接代謝試驗沒有顯著差異，此推論正戊烷可協助 *Enterobacter* sp. NKNU01 生長於高濃度的 MTBE 中進而提高菌量，但卻影響其分解 MTBE。此試驗與 *Enterobacter* sp. NKNU02 相似，推測以同屬菌種被正戊烷影響效果相似，皆對 MTBE 分解效果有所影響。

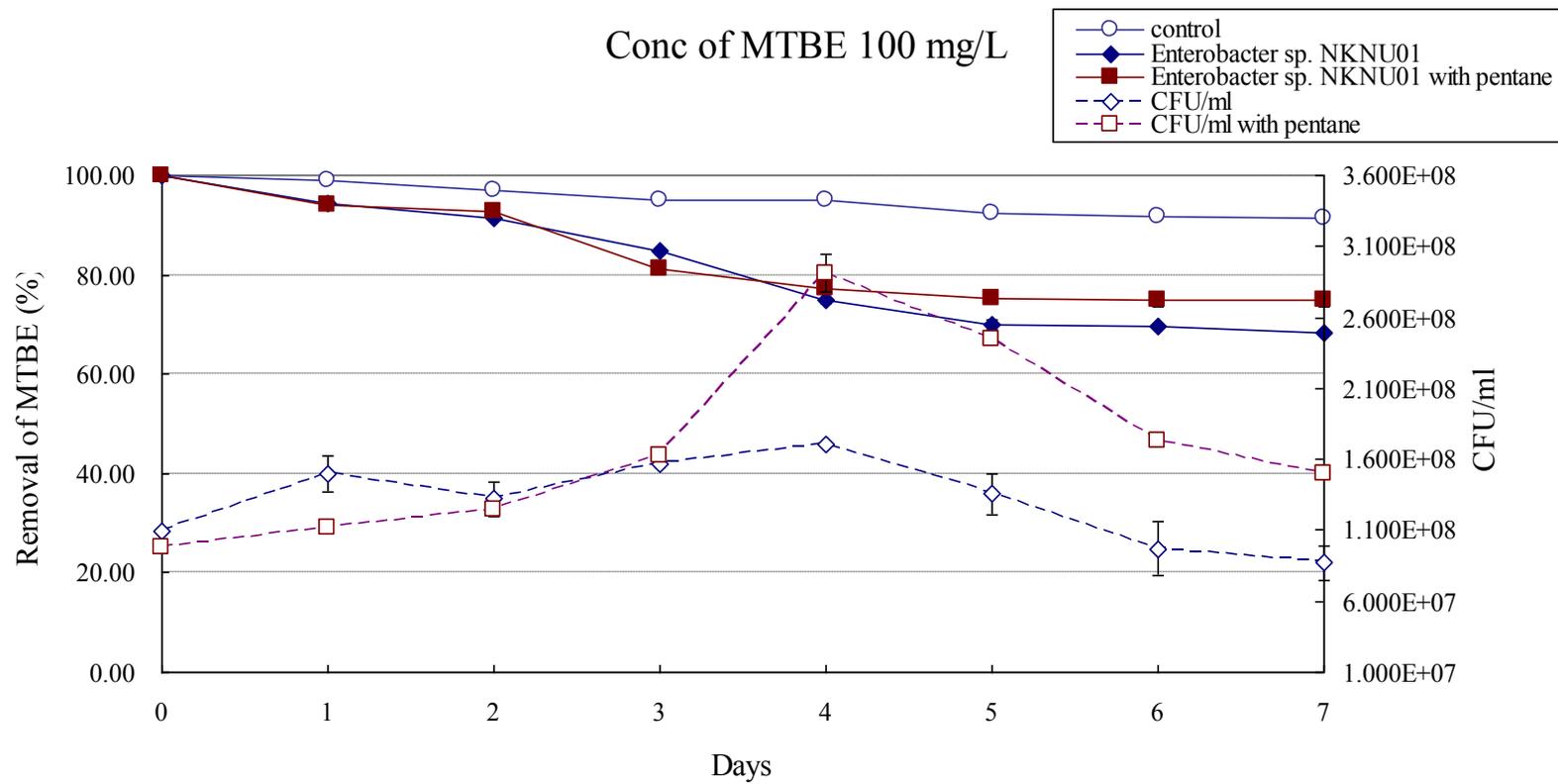


圖 4.8 *Enterobacter* sp. NKNU01 在生物反應槽試驗中降解 MTBE 與菌數表現(CFU/mL)趨勢圖

4.2.4 比較各菌種分解 MTBE 情形

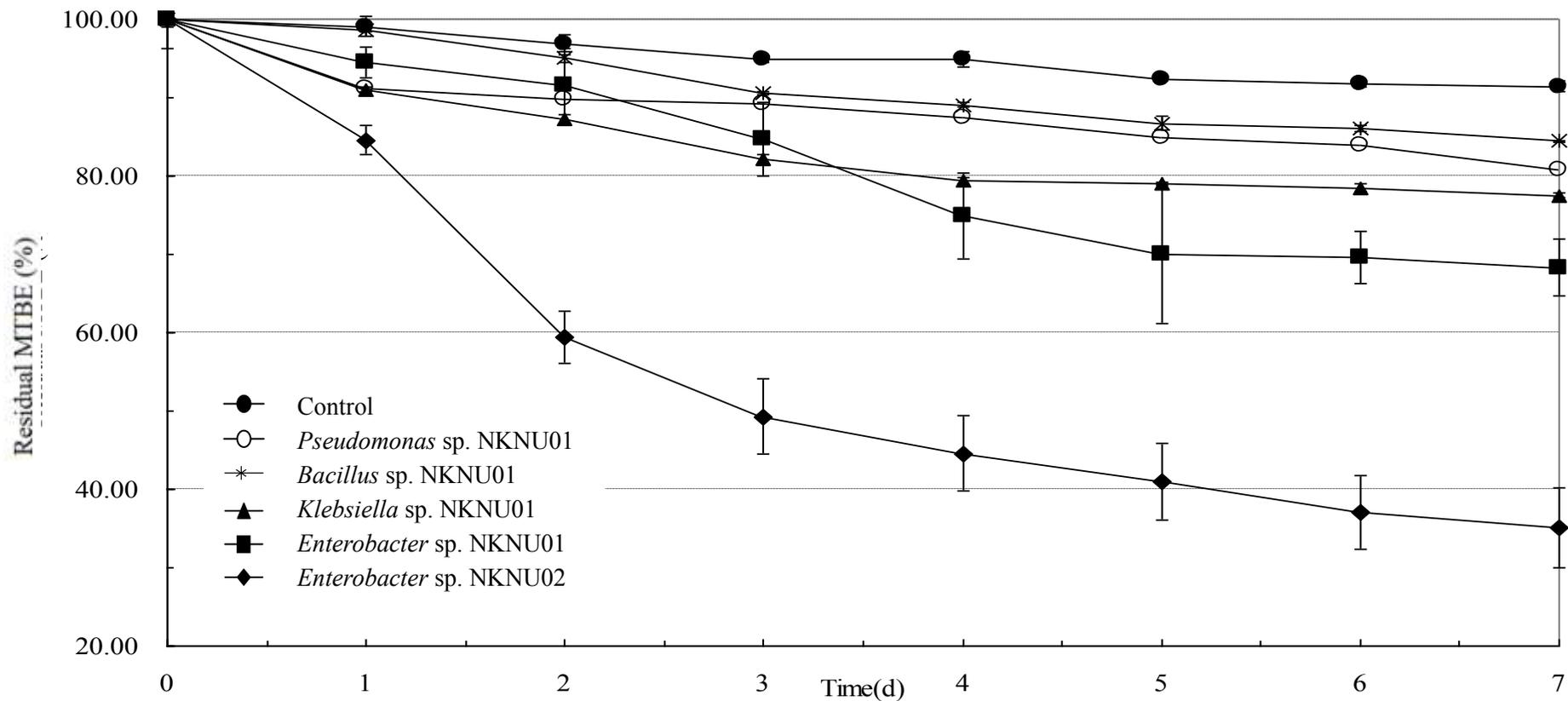
1. 直接代謝試驗

由批次試驗中測得 MTBE 降解效果最佳為 *Enterobacter* sp. NKNU02，在生物反應槽中模擬配製被 100 mg/L 之 MTBE 污染水溶液，利用生物反應槽調控其酸鹼值，使微生物可提高生物降解效果。在生物反應槽試驗中(圖 4.9)，降解效果最佳亦然為 *Enterobacter* sp. NKNU02，其次為 *Enterobacter* sp. NKNU01，此與批次試驗結果相符(表 4.1)；而 *Klebsiella* sp. NKNU01、*Pseudomonas* sp. NKNU01、*Bacillus* sp. NKNU01 直接分解 MTBE 效果仍然有限。

Enterobacter sp. NKNU02 可以將 MTBE 質量轉換為生長能量來源，使菌量亦有明顯增加現象，而非在第二章所述需透過共代謝物質引導做為生長來源，而 MTBE 只單純為能量來源。故在未來發展此菌種作為生物復育，生物促進法中外來添加菌種之一，但須考量外界環境與生物適應存活可行性。*Enterobacter* sp. NKNU01 在此實驗中為降解效果僅次於 *Enterobacter* sp. NKNU02 的菌種，且亦能提高菌種菌量產生；在批次試驗中其直接降解 MTBE 效果不彰顯，須透過共代謝物質而降解效果有增加；然而，在生物反應槽試驗中，直接降解 MTBE 發現效果卻比共代謝作用好，且與 *Enterobacter* sp. NKNU02 菌屬相似，推測此菌屬直接降解高濃度 MTBE 效果會比低濃度佳，且不需藉由共代謝促使微生物進行代謝作用。

另外，*Enterobacter* sp. NKNU01 在批次試驗(表 4.1)中，第 15 天效果比第 10 天佳，推測其在降解 MTBE 須有一時間延遲期(Lag periods)(Deeb et al., 2001)，延遲期是微生物在接觸化合物時須適應而產生具有分解化合物蛋白質時間，但若在 MSM 中延遲期會需要越長時間。

推測實驗中 *Enterobacter* sp. NKNU01 屬於具有延遲期微生物，但在生物反應槽試驗期間中，在實驗第二天即有降解效果，推測生物反應槽生長環境優於批次試驗，始延遲期減緩且在此階段有菌種生長現象。

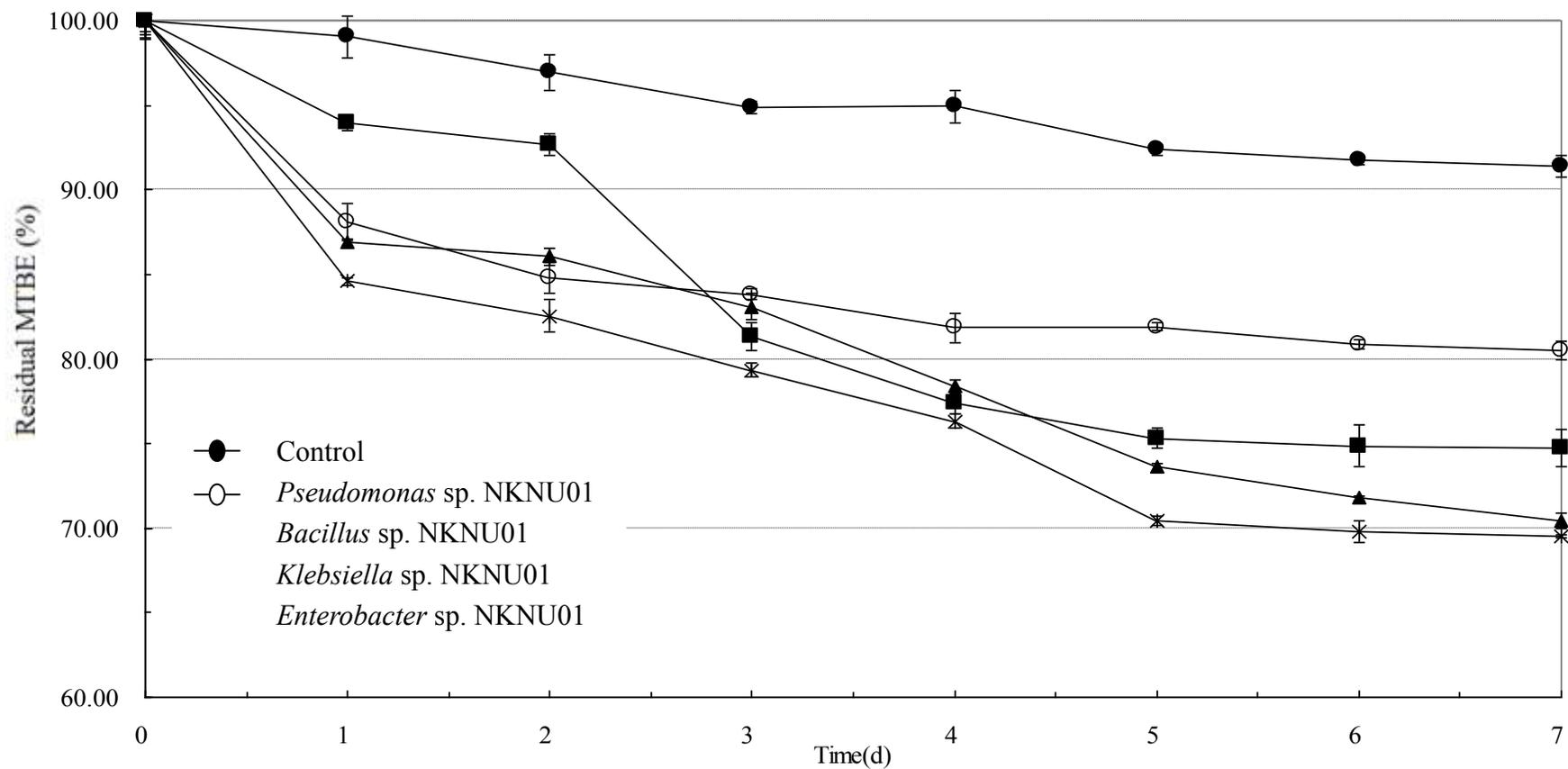


The percentage (%) was calculated from the ratio (the amounts of residual MTBE with bacterial inoculum divided by the initial MTBE) multiplied by 100. The initial MTBE concentration in each experiment was 100 mg/L. Error bars indicate the standard deviation of triplicate samples with the values of variation coefficient less than 10%.

圖 4.9 各分離菌株以生物反應槽培養 7 天降解 MTBE

2. 共代謝試驗

在批次試驗共代謝實驗中(表 4.2)，*Enterobacter* sp. NKNU02 在加入正戊烷會抑制 MTBE 分解效果，故在生物反應槽共代謝試驗中，即沒有探討 *Enterobacter* sp. NKNU02 加入共代謝物質-正戊烷後 MTBE 分解情形。批次試驗中(表 4.2)，以 *Bacillus* sp. NKNU01 最佳，其次為 *Klebsiella* sp. NKNU01，*Pseudomonas* sp. NKNU01 與 *Enterobacter* sp. NKNU01 相似。而在生物反應槽試驗(如圖 4.10 所示)中，*Bacillus* sp. NKNU01 與 *Klebsiella* sp. NKNU01 降解效果相似且為最佳，其次為 *Enterobacter* sp. NKNU01，效果最不明顯者為 *Pseudomonas* sp. NKNU01。*Pseudomonas* sp. NKNU01 生物反應槽降解試驗中，直接代謝與共代謝作用無顯著差異，生物反應槽降解效果約為 12 %與批次試驗 (實驗第 15 天結果約為 13.4%，表 4.2) 相比亦無改善，推測實驗設計環境非 *Pseudomonas* sp. NKNU01 最適生長條件，且可能利用其他共代謝物質進行試驗，會提升 *Pseudomonas* sp. NKNU01 對 MTBE 降解效果。其餘菌種 *Bacillus* sp. NKNU01、*Klebsiella* sp. NKNU01 及 *Enterobacter* sp. NKNU01，與批次試驗相比解有些許提高 MTBE 降解效果，且實驗中各菌量亦有生長增加現象。對比於批次試驗中，生物反應槽試驗以高濃度 MTBE 進行分解，生物毒性亦增加且尚具有分解之功能，故此分離菌種應具有分解 MTBE 潛力。共代謝作用有減少生物體適應時間且使生物分解效果增加的優勢，但會導致 MTBE 分解不夠完全且代謝產物 TBA 堆積 (Volpe et al, 2009)；共代謝分解時間通常會慢於直接代謝作用(Nava et al., 2007)。



The percentage (%) was calculated from the ratio (the amounts of residual MTBE with bacterial inoculum divided by the initial MTBE) multiplied by 100. The initial MTBE concentration in each experiment was 100 mg/L. Error bars indicate the standard deviation of triplicate samples with the values of variation coefficient less than 10%.

圖 4.10 各分離菌株以生物反應槽培養 7 天且利用正戊烷進行共代謝降解 MTBE

4.3 BTEX 影響菌種分解 MTBE 情形

在地下水層遭受汽油洩漏污染，其中單苯環芳香族碳氫化合物組成含量，是否會影響土壤中菌種對汽油添加物甲基第三丁基醚(MTBE)的分解效力。透過生物反應槽實驗模擬，在同時具有 MTBE 與單苯環芳香族碳氫化合物，在共存情形下，對生物反應槽降解試驗裡具有最佳效力菌種-*Enterobacter* sp. NKNU02，其降解情形是否會遭受影響。

4.3.1 模擬地下水層遭受汽油洩漏時 BTEX 濃度設定

根據前人文獻，拉午爾定律已被研究證實適用於非水相液體與水系統之分布行為，可估算當汽油與地下水層接觸後目標污染物在水中濃度最大值。本研究利用前人研究分析結果(賴，2008; Chen et al., 2008)可得台灣汽油中，單苯環芳香族碳氫化合物與 MTBE 之重量百分之濃度，推算各化合物於汽油中莫耳分率(X_0)，透過拉午爾定律計算出各化合物在汽油發生洩漏時，於水中各化合物最大濃度。本實驗設定，MTBE 與生物反應槽降解試驗濃度設定一致，單苯環芳香族碳氫化合物(BTEX)則是以二甲苯為基準取 12mg/L 濃度，在依序按照 BTEX 比例進行計算至整數位，設定本實驗 BTEX 濃度，其中仍以甲苯濃度為最高，其次為苯(表 4.7)。

4.3.2 模擬地下水層遭受汽油洩漏時菌種分解 MTBE 情形

首先利用生物反應槽進行控制組試驗，先以了解 MTBE 與 BTEX 在生物反應槽中，因槽體機械力與化合物揮發程度不同，各化合物在實驗七天中溢散情形。其中揮發程度最大為甲苯，在第七天時會揮發約 15%，主要因其物化性質於常溫下，飽和蒸汽壓為 22.0 mmHg 於 20°C，與 BTEX 其他單苯環碳氫化合物相較之下(如表 4.7)，屬蒸氣壓最高，具有較高揮發性，與實驗中甲苯揮發程度最高，其趨勢大致相符。

其中在實驗中發現二甲苯的濃度有起伏現象，如在第四天及第五天時發現濃度有些許提高現象，除了實驗操作誤差，推測因為有文獻記載(Pedro et al., 2001; Mackay et al., 2006; Feris et al., 2008 and Shim et al., 2006)各化合物之水溶解度不同且物化性質相異，導致化合物純相與水相之平衡時間有所偏差，因取樣時間一

表 4.7 依拉午爾定律推估汽油發生洩漏時 BTEX 最大水溶解度

Compound	Benzene	Toluene	Ethylbenzene	m-xylene	p-xylene	o-xylene
Molar fraction (X_0) ^a	0.026	0.153	0.036	0.067	0.067	0.067
Solubility(S_w , mg/L)	1780	515	187	180	158	175
C_{water} (mg/L) ^b	46.34	79.01	6.68	11.98	10.52	11.65
Experimental set (mg/L)	46	79	7	12	12	12

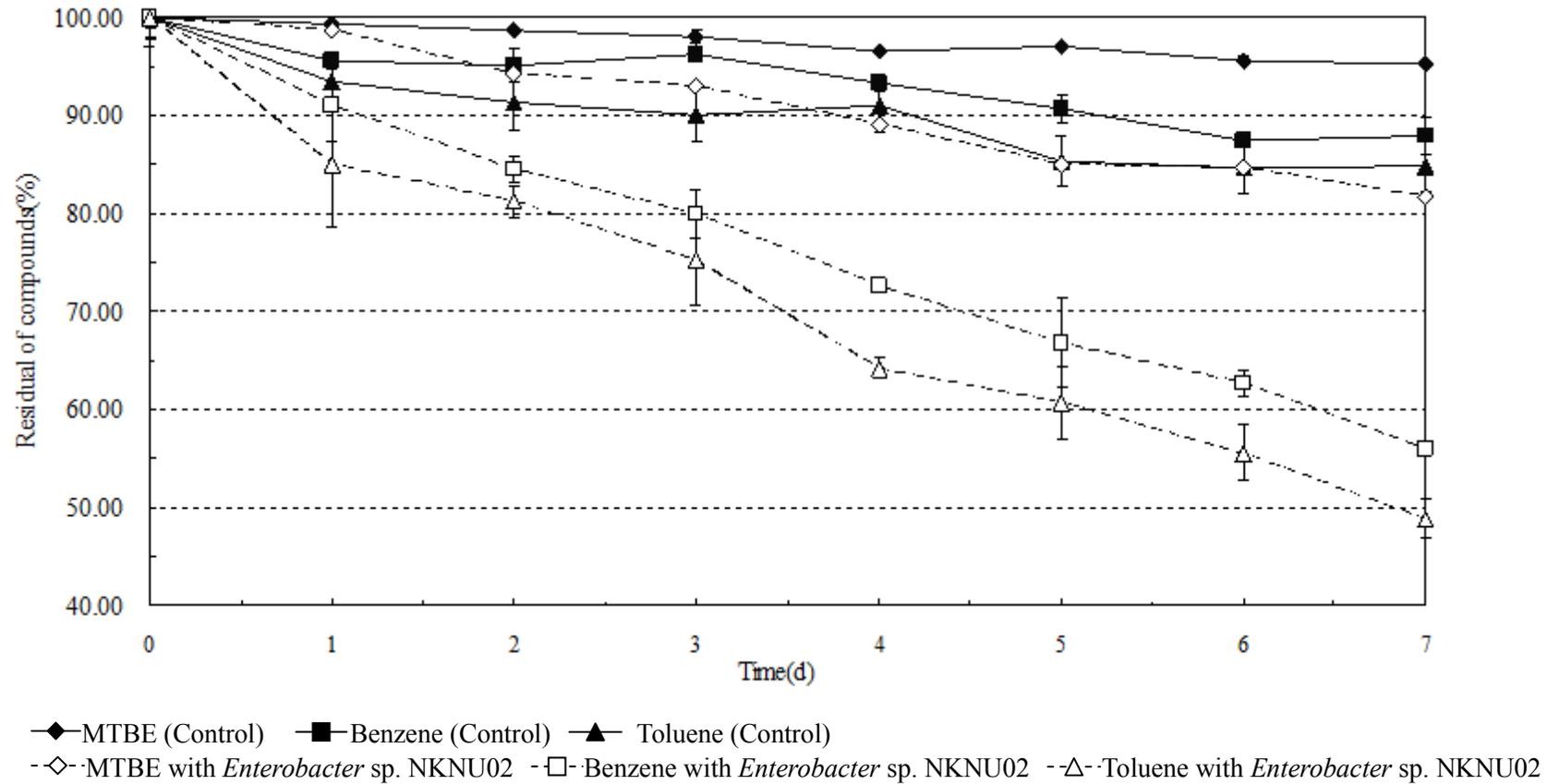
a : Molar fraction from the weight percentage of BTEX at the former study(賴, 2008)。

b : The concentration in water according to the Raoult's law. $C_{water} = S_w \times X_0$

致，導致非所有化合物達平衡時間，而使濃度測定有所誤差。另外，實驗控制組發現 MTBE 揮發程度未因與 BTEX 共存而有所增加，而與 BTEX 相較之下，MTBE 揮發程度屬較低者。由上一節以生物反應槽進行各單一分離菌種進行 MTBE 生物分解試驗發現，*Enterobacter* sp. NKNU02 分解 MTBE 效果為最佳，可於實驗第七天分解程度約 56%，故使用此單一菌種進行與 BTEX 共存下，菌種分解效力是否受影響。實驗結果如圖 4.11 與圖 4.12，發現在加入 *Enterobacter* sp. NKNU02 後，MTBE 仍然有被分解現象，但分解速度與趨勢並未如同以 MTBE 為單一碳源如此快速且明顯。*Enterobacter* sp. NKNU02 在同時具有 BTEX 條件下，分解程度大約 13.5%，故推測 BTEX 會影響且抑制 *Enterobacter* sp. NKNU02 進行 MTBE 生物分解，也有文獻(Deeb et al., 2000b)表示因為菌種在低營養的環境中，相對的會選擇較容易進行分解的化合物進行分解得以存活，且分解途徑不完全相同，(如 Deeb et al., 2001)為例，作者將 PM1 菌分別進行 MTBE 降解試驗加入單一單苯環芳香族化合物，會影響 MTBE 分解情形；且菌種透過不同前處理培養下，亦會有不同的分解情形，如利用 MTBE 前培養下，菌種對於苯的分解效果會有延遲且效果較差的現象，故作者推測菌種分解 MTBE 與 BTEX 的代謝途徑有所不同。在本實驗中發現，除了加入 BTEX 會影響菌種分解 MTBE，而有些單苯環芳香族碳氫化合物亦會受到 *Enterobacter* sp. NKNU02 分解，如分解效果最為明顯的甲苯約有 36%在加入 *Enterobacter* sp. NKNU02 後流失，其次為苯約有 32%，其中 MTBE 與乙苯效果相異不大。推測 *Enterobacter* sp. NKNU02 對於苯以及甲苯具有較高接受度，故影響菌種分散對 MTBE 之分解能力，先進行分解苯與甲苯，符合文獻中發現分解趨勢(Deeb et al., 2000c; 2001)。

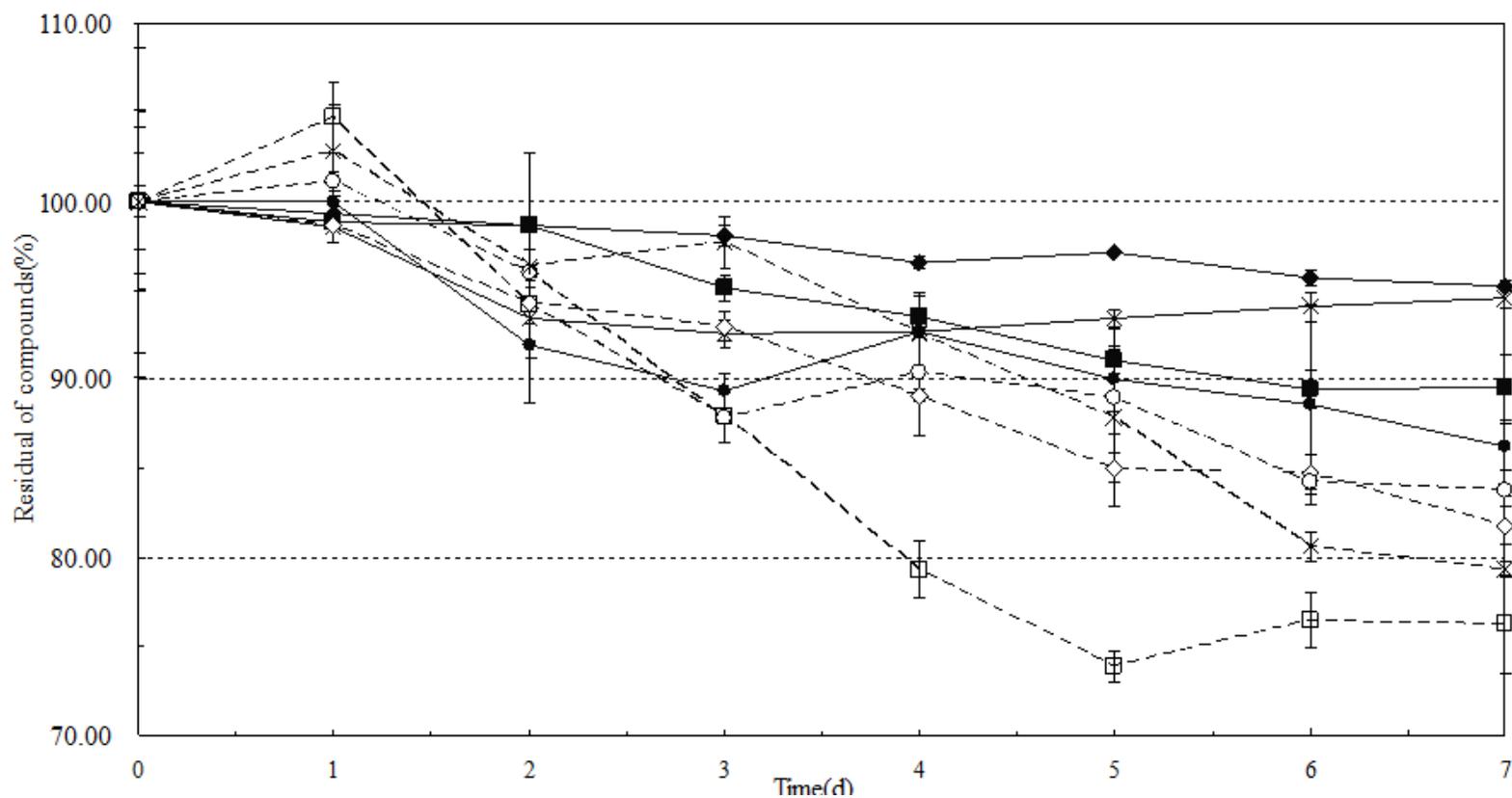
4.3.3 BTEX 影響生物分解 MTBE 應用評估

生物反應槽試驗發現 BTEX 的存在會影響為期 7 天之降解試驗中 *Enterobacter* sp. NKNU02 分解 MTBE 效率。其中苯與甲苯降解相當顯著，雖然在實驗後期 MTBE 因為被 BTEX 所影響使降解效果無明顯成長，但苯與甲苯仍然持續降解中，故本研究推論將實驗時間延長時仍有機會使 *Enterobacter* sp. NKNU02 在完成分解苯與甲苯後，開始進行分解 MTBE。因微生物分解 BTEX 與 MTBE 之降解途徑不同，所需要降解蛋白亦有所不同，故分解 BTEX 時會影響 MTBE 分解情形，符合本研究發現降解情形，同時預測在低/無濃度的 BTEX 會再重新進行 MTBE 降解。



The initial concentration of MTBE, benzene and toluene in experiment was 100, 46 and 79 mg/L. The percentage (%) was calculated from the ratio (the amounts of concentration of residual compounds divided by the initial concentration) multiplied by 100, was derived from the average of the triplicate samples, with the values of variation coefficient less than 10%.

圖 4.11 *Enterobacter* sp. NKNU02 在培養 7 天生物反應槽試驗中降解 MTBE、苯與甲苯混合物



—◆— MTBE (Control) —■— Ethylbenzene (Control) —*— m,p-xylene (Control) —●— o-xylene (Control)
 -◇- MTBE with *Enterobacter* sp. NKNU02 -□- Ethylbenzene with *Enterobacter* sp. NKNU02 -*- m,p-xylene with *Enterobacter* sp. NKNU02
 --○-- o-xylene with *Enterobacter* sp. NKNU02

The initial concentration of MTBE, ethylbenzene, m, p-xylene and o-xylene in experiment was 100, 7, 12 and 12 mg/L. The percentage (%) was calculated from the ratio (the amounts of concentration of residual compounds divided by the initial concentration) multiplied by 100, was derived from the average of the triplicate samples, with the values of variation coefficient less than 10%.

圖 4.12 *Enterobacter* sp. NKNU02 在培養 7 天生物反應槽試驗中降解 MTBE、乙苯與二甲苯混合物

4.4 利用蛋白質體預測 MTBE 在實驗菌種之生物分解途徑

當微生物接觸有機化合物時，有歸納出兩個不同型態的影響機制。一為微生物在進行生物分解污染物時，細胞生長與分解污染物相互質轉機制(Loh and Wu, 2006; Wang and Loh, 2000; Wang et al., 2003)；另外，當微生物為分解毒性物質時，其細胞為適應而改變之分子機制(Hartig et al., 2005)。雖然分解途徑機制可以由生物基因體與染色體判斷，但因當細胞接觸毒性物質時，蛋白質轉譯情形會受到污染物影響而有所不同，故直接分析其蛋白質體較可預估出其代謝途徑(Bhushan et al., 2005; Iwaki and Hasegawa, 2007)。

由Krayl et al., 2003與Eixarch and Constant', 2010分別發現*Pseudomonas putida* KT2440與*Achromobacter xylosoxidans* MCM1/1接觸MTBE後產生之蛋白，屬細胞為適應有機物質(MTBE)而產生之蛋白質，而較無明顯提出與代謝相關之蛋白質。本研究利用與文獻相同蛋白質體技術，進而推論出屬於此物種之分解途徑。

4.4.1 蛋白質表現

在生物反應槽試驗中，*Enterobacter* sp. NKNU02 分解 MTBE 效力為最佳，故選擇此菌株進行其蛋白質鑑定。其中選取樣品時間點為尚未加入 MTBE(Control)、在此生物系統中 MTBE 降解率達最大降解率 50%($T_{1/2}$)以及降解率近乎達最大降解率 90 %時期(T_1)共三個樣點，其中考量所使用培養基為 MSM 培養基不會促成微生物自然生長，故菌量在 T_1 與 $T_{1/2}$ 兩時期相近，故分別重新設置實驗再取點，避免菌量因取點後有所更動，分別進行二重複蛋白質體實驗。蛋白質前處理後再利用 15 mg 樣品進行一維電泳，其中是以 VisPRO 5 minutes Protein Stain 進行染色。接著分別進行二維電泳-等電點電泳(Isoelectric focusing, IEF)，取 200 mg /strip 樣品，使用 VisPRO 5 minutes Protein Stain、SYPRO Ruby stain 進行染色。

分析利用 Sypro Ruby Protein Stain 結果(圖 4.13、圖 4.14 與圖 4.15)，結果顯示 $T_{1/2}$ 與控制組相比表現量達 2 倍差異的蛋白點約有 14 個； T_1 與控制組相比與控制組相比表現量達 2 倍差異的蛋白點約有 14 個；而 $T_{1/2}$ 與 T_1 相比表現量達 2 倍差異的蛋白點約有 10 個。統合整理出 $T_{1/2}$ 、 T_1 與控制組相較下表現量達 2 倍差異的蛋白點約有 25 個，但以 MALDI/TOF-MS 和 HPLC-MS/MS 成功鑑定出之蛋白點為 13 個，再比較各蛋白質點於控制組、 $T_{1/2}$ 與 T_1 進行表現量比較(圖 4.16)。

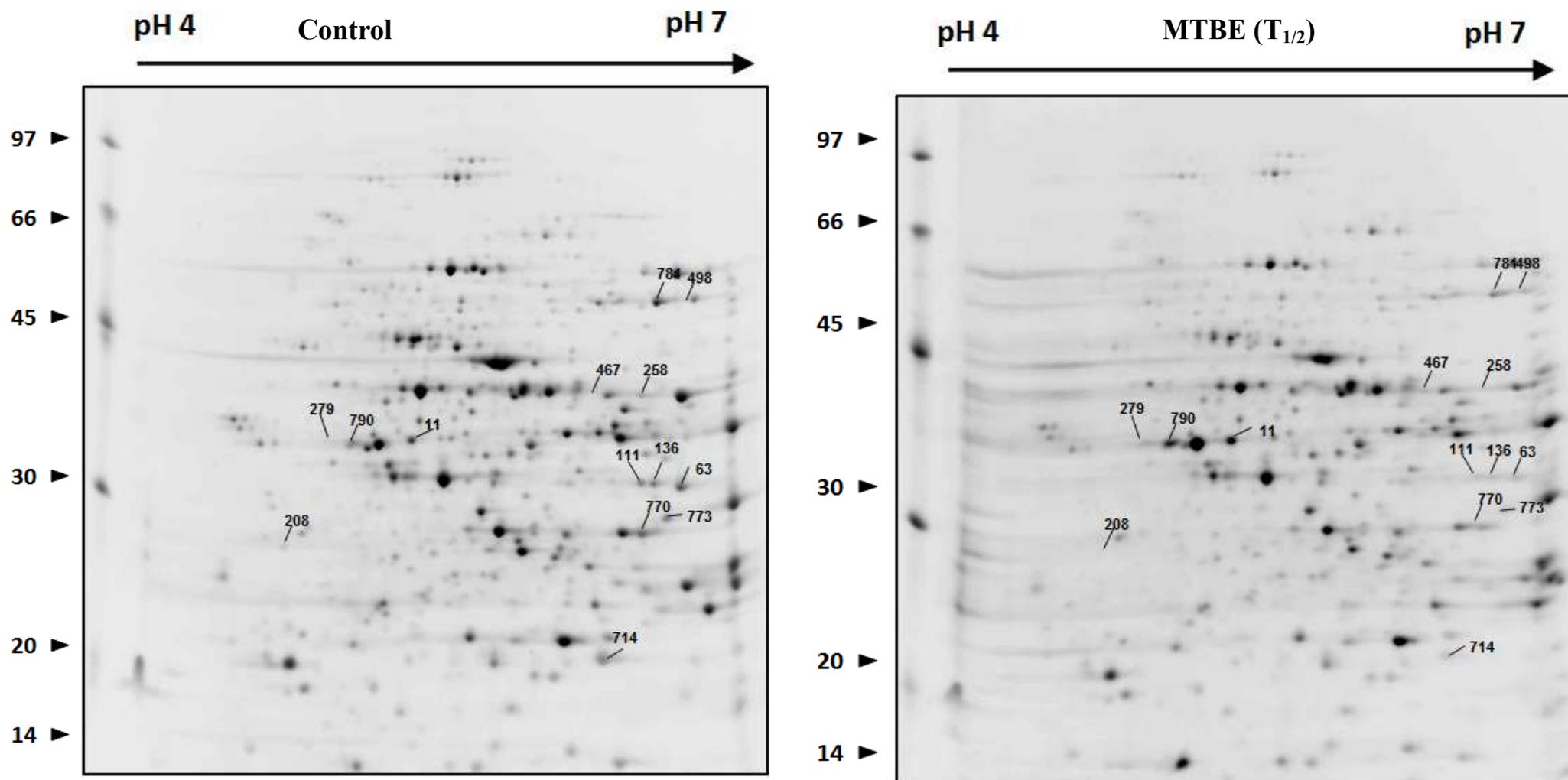


圖 4.13 *Enterobacter* sp. NKNU02 蛋白質於控制組(Control)與 50%MTBE 降解率(T_{1/2})比較後表現量具有 2 倍差異之二維電泳選點圖

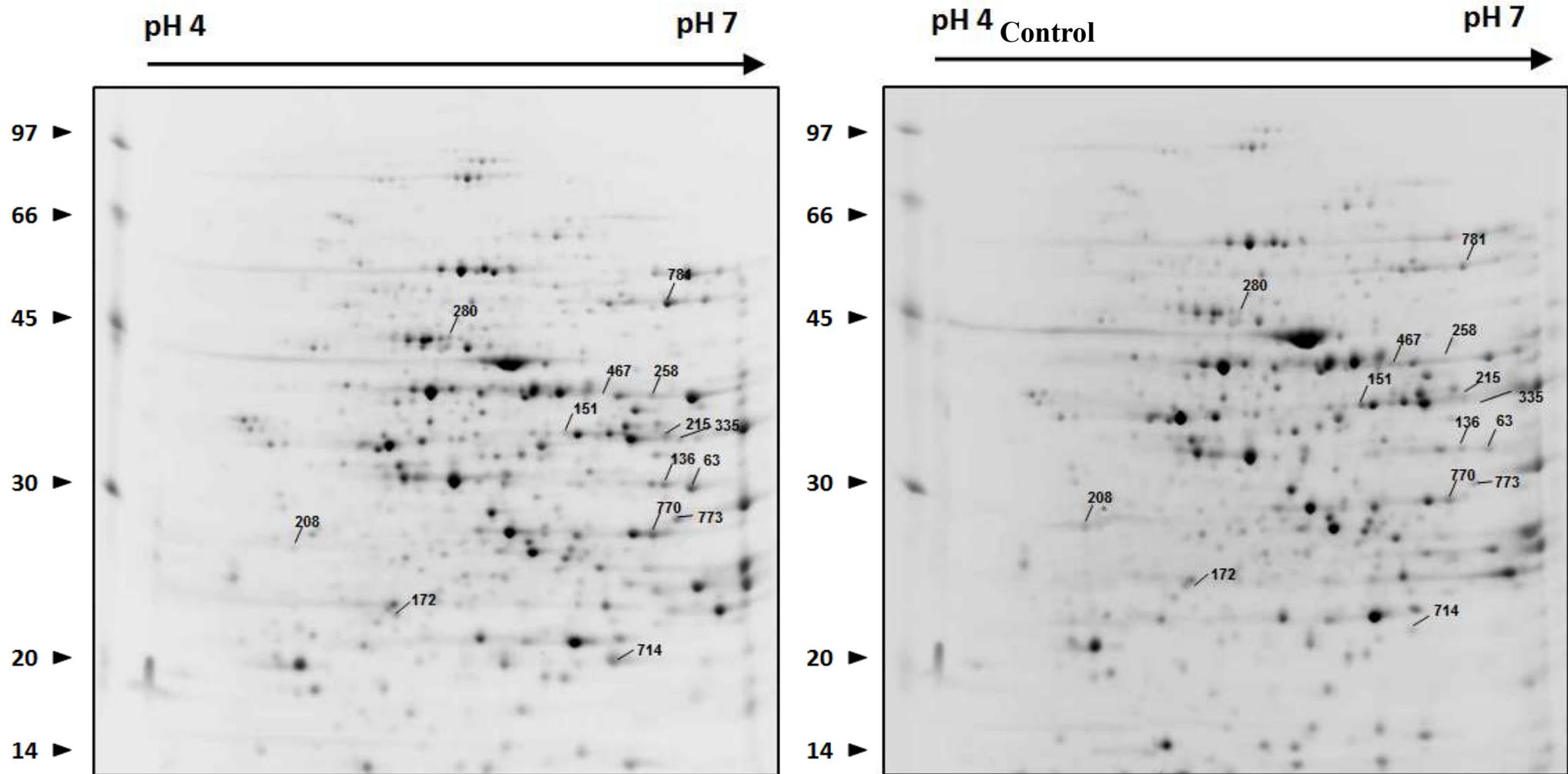


圖 4.14 *Enterobacter* sp. NKNU02 蛋白質於控制組(Control)與 MTBE 降解率達平緩(T₁)比較後表現量具有 2 倍差異之二維電泳選點圖

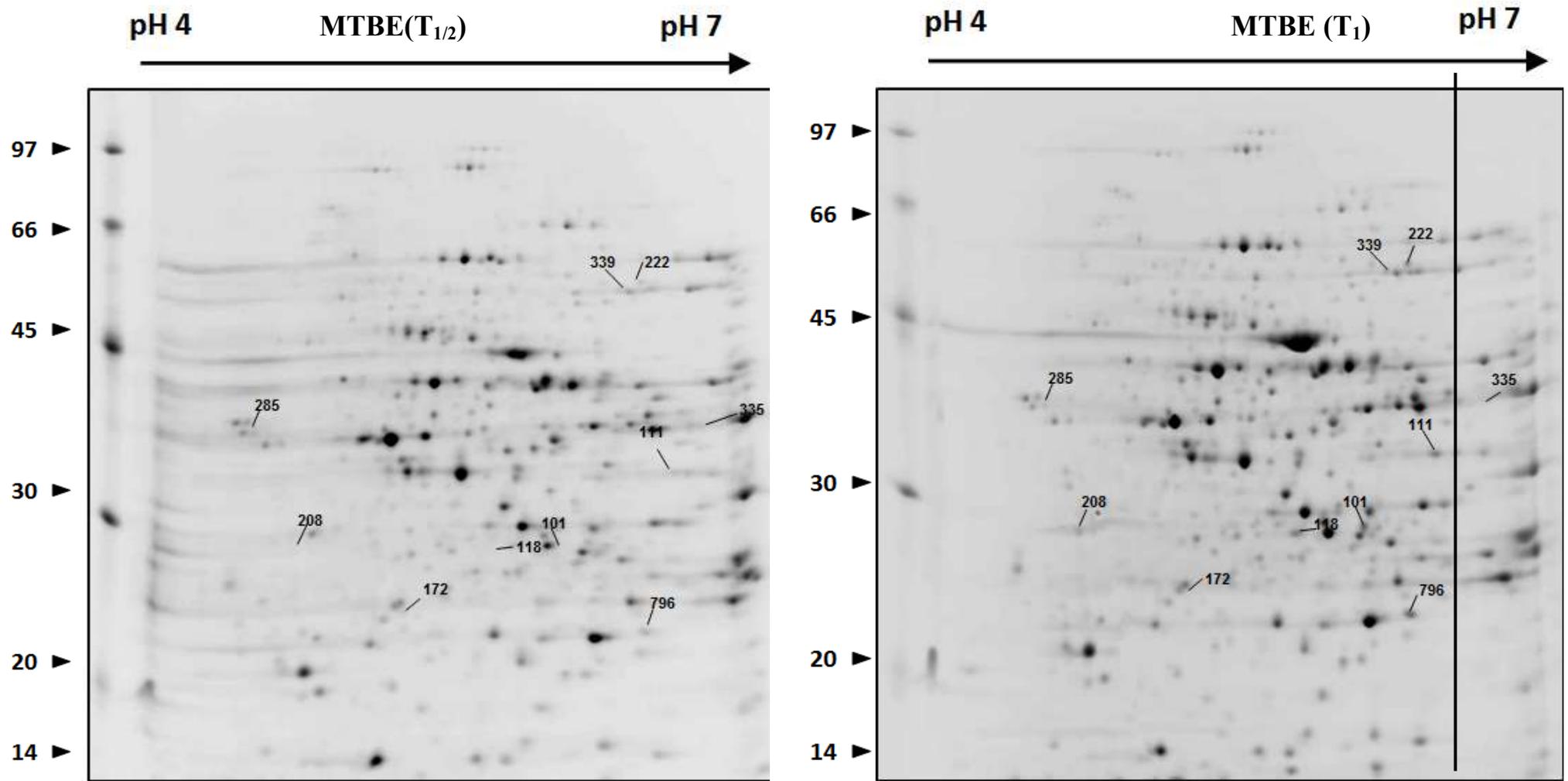


圖 4.15 *Enterobacter* sp. NKNU02 於 50%MTBE 降解率(T_{1/2})與 MTBE 降解率達平緩(T₁)比較表現量具有 2 倍差異之二維電泳選點圖

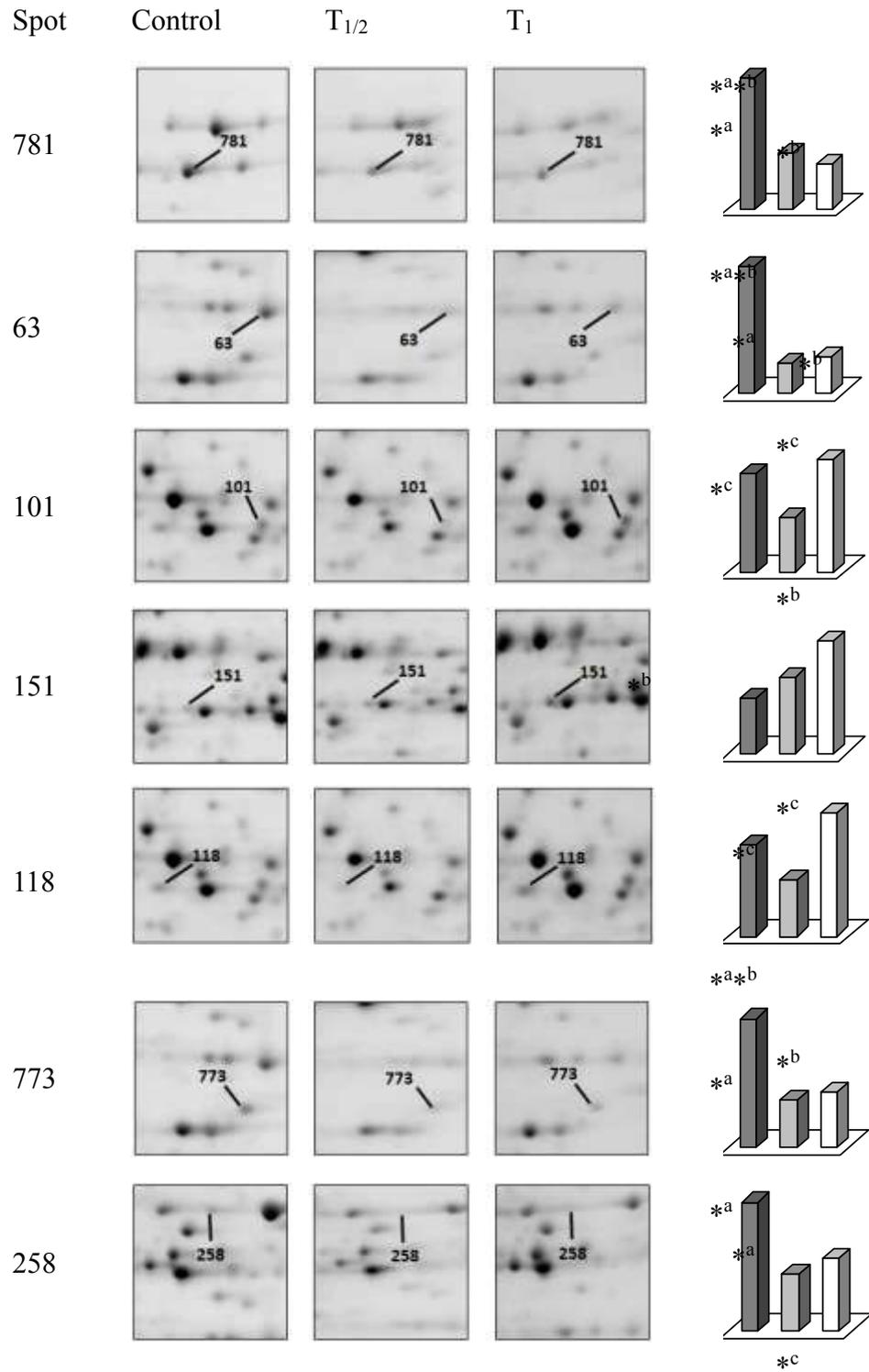


圖 4.16 *Enterobacter* sp. NKNU02 於生物反應槽降解試驗之蛋白質於 50% MTBE 降解率(T_{1/2})、MTBE 降解率達平緩(T₁)與控制組(Control)各蛋白質點放大圖與表現量差異

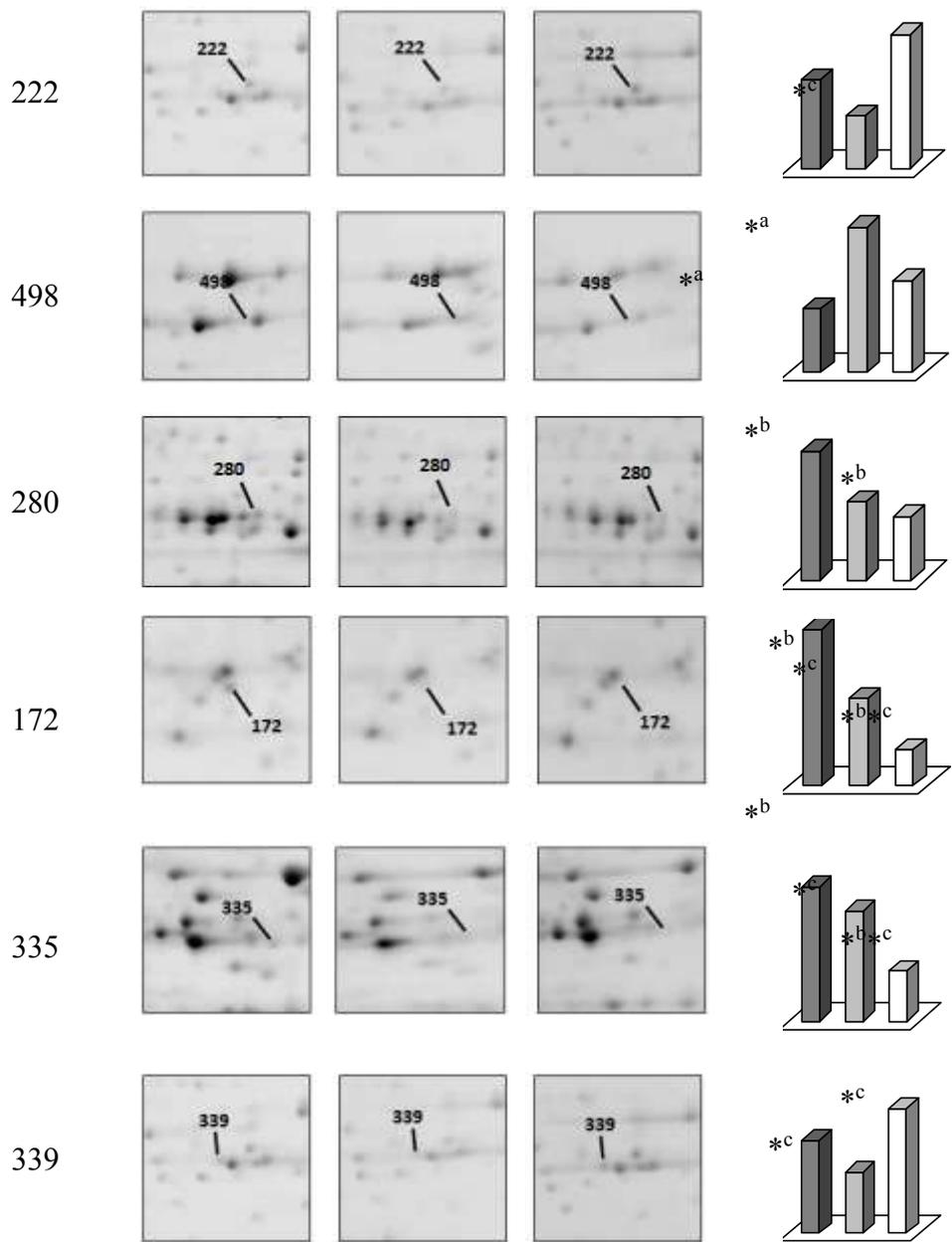


圖 4.16 (續)

4.4.2 蛋白質鑑定

(+)本實驗中取分數在77分以上 ($p < 0.05$) 且覆蓋百分比 (sequence coverage) 20%以上的序列,再對照二維電泳膠片上蛋白質樣點之分子量及等電位點進行比對。蛋白質分析鑑定結果,結果顯示 $T_{1/2}$ 與控制組相比表現量達2倍差異的蛋白點約有14個,但成功鑑定出為5個; T_1 與控制組相比與控制組相比表現量達2倍差異的蛋白點約有14個,但成功鑑定出為8個;而 $T_{1/2}$ 與 T_1 相比表現量達2倍差異的蛋白點約有10個,但成功鑑定出為7個。統合整理出 $T_{1/2}$ 、 T_1 與控制組相較下表現量達2倍差異的蛋白點約有25個,其中成功鑑定出之蛋白點且分數在77分以上($p < 0.05$)有13個。表現量實驗組大於控制組有6個。根據文獻中所述當微生物接觸有機化合物時,可能形成數種蛋白,適應與對抗有毒環境進而生存,包括結構蛋白(如:外膜蛋白可改變細胞通透性)、能量蛋白(如:ATP形成酶提供能量)、代謝蛋白(如:氧化酶協助分解有機物),故表4.8分別以此分類探討蛋白質鑑定結果(Eixarch and Constant', 2010)。

(2)1. 結構蛋白

Spot 781為在控制組表現量大於實驗組,最有可能為Hypothetical protein ENTCAN_08325,是屬ABC-type dipeptide transport system, periplasmic component可能與Amino acid 傳輸及代謝作用有關(Tomii and Kanehisa, 1998)。其次為Extracellular solute-binding protein,亦屬於ABC-type dipeptide transport system,與細胞膜上傳遞相關蛋白。文獻指出當細菌接觸毒性物質為了適應困境,改變細胞膜通透性使細胞能繼續生存 (Segura et al., 1999; Eixarch and Constant', 2010)。Spot 63為在控制組表現量較大,為ABC transporter periplasmic binding protein,蛋白功能與Spot 781相似亦為細胞膜上與細胞通透相關蛋白質(Petty et al., 2010)。

Spot 773為在控制組表現量大於實驗組,最有可能為Cationic amino acid ABC transporter,細胞膜binding protein,與陽離子(NH_4^+)、肽鏈、醣分子、維他命在細胞膜傳遞相關之蛋白質(Cao and Loh, 2009; Hediger et al., 2004)。Spot 498 為在實驗組表現量大於控制組,是為Hypothetical protein ENTCAN_08325, ABC-type dipeptide transport system, periplasmic component可能與Amino acid 傳輸及代謝作用有關。其蛋白功能與Spot 781(Extracellular solute-binding protein)相似亦為細胞膜上與細胞通透相關之蛋白質(Petty et al., 2010),且推測因在Spot 498(ABC-type dipeptide transport system, periplasmic component)在實驗組表現量較大,故為由MTBE所影響導致通透

性改變，而使MTBE不易通過細胞膜；另外Spot 781(Extracellular solute-binding protein)與Spot 63(ABC transporter periplasmic binding protein)則可能是被MTBE影響，始分子正常進出細胞膜情形受影響，而有不同表現量差異(Tomii and Kanehisa, 1998; Eixarch and Constant', 2010)。

2. 能量蛋白

Spot 222為在實驗組表現量大於控制組，為F₀F₁ ATP synthase subunit alpha，在細菌的細胞膜上發現，分別在粒線體與葉綠體thylakoid的胞膜上發現F-ATPase。ATP synthase表現量可以表示當細胞被外來因子影響，使ATP生產減低的情形(如文獻中Krayl et al. 於2003指出MTBE會造成ATP減少)或者藉由水解作用，使對細胞會引起不可逆損害的有機化合物以主動運輸方式排出細胞膜外。因為MTBE對於細胞屬於外來有機化合物，故實驗組中ATPase表現量會高於控制組，推測需要透過ATP能量，以主動運輸方式將MTBE移出細胞外的保護細胞作用(Eixarch and Constant', 2010; Kucerova et al., 2010)。

Spot 339為在實驗組表現量大於控制組，為NADP-dependent malic enzyme，蘋果酸酵素(Malic enzyme)廣泛地分布於細菌、動物和植物界，其中在動物體內約有90%的蘋果酸酵素之細胞質中，其將蘋果酸(malate)氧化脫氫反應產生NADPH，為細胞內NADPH的重要來源，並參與體內脂質合成作用，為脂質生合成酵素(lipogenic enzyme)之一(Campbell et al., 2009)。另外也有研究顯示Malic enzyme目的是生成pyruvate，進而生成ATP以提供細胞生存能量(Finley et al., 2010)。Malic enzyme表現量在加入MTBE後，發現在實驗後期表現量為最大，推測細胞已利用MTBE做為能量來源轉化，且利用Malic enzyme進行生物量合成作用(Eixarch and Constant', 2010)。

③3. 代謝蛋白

Spot 258為在控制組表現量大於實驗組，為Alcohol dehydrogenase, propanol-preferring，屬於ENZYME class 1.1.-中之氧化酵素，可以將乙醇與丙烷氧化去除氫原子。文獻中有記載，尤其在(*M. vaccae* JOB5 與 a *Graphium* sp.)在進行MTBE分解時發現會產生TBF，亦同樣會出現Alcohol dehydrogenase，主要是因為此酵素是主要參與碳氫鍊氧化的氧化酶(Johnson et al., 2004; Smith et al., 2003)。但因此蛋白表現量是在控制組中較多，而在實驗組所測得量較少，可就此推論*Enterobacter* sp. NKNU02，在進行MTBE分解時主要是轉化產生TBA為主之方式。另一方面，

ENZYME class 1.1.-.-可將MHP轉換成2-Methyl-2-hydroxy-1- propanol，故推測 Alcohol dehydrogenase參與氧化MHP反應。

Spot 101與Spot 118 為在實驗組表現量大於控制組，是為Phospho- glyceromutase，由組胺酸(histidine) 磷酸脂酵素(phosphatase) domain 發現，多為磷酸化酵素(phosphatases)；在磷酸化反應過程中會包含組胺酸片段。其中另一蛋白，2,3-bisphosphoglycerate-dependent 會催化 2-phosphoglycerate 互相轉化成 3-phosphoglycerate。Phosphoglyceromutase 囊括了酸甘油變位酶(phosphoglyceromutase)、烯醇酶(enolase)、烯醇化酶(pyruvatekinase)，3-P-glycerate 受到Phosphoglyceromutase的幫助而形成丙酮酸(pyruvate)。實驗組中MTBE被 *Enterobacter* sp. NKNU02 分解產生中間產物 TBA 與 Propanol 進而在由 Phosphoglyceromutase轉化進入TCA cycle。故在實驗後期所測得之蛋白質表現量為最大，但 $T_{1/2}$ 時因降解時間較短，使中間產物累積量較少，導致出 Phosphoglyceromutase蛋白質表現量亦較少(Funahashi et al., 2008；Kang et al., 2009)。

Spot 151 為在實驗組表現量大於控制組，為轉醛酶(Transaldolase)，包含TalA 與 TalB。轉醛酶會催化部分dyhydroxyacetone反轉化作用，如由fructose-6-phosphate 轉化成 erythrose-4-phosphate，進而亦於變成 sedoheptulose-7-phosphate 與 glyceraldehyde-3-phosphate。轉醛酶可催化Pyruvate與Acetolactate兩者之間轉化。此轉醛酶從蛋白質表現量判斷，發現實驗時間越長，而蛋白質表現量越高，推測此轉醛酶應該是與MTBE產物相關，且由文獻中可知應該是將中間產物HIBA氧化生成之 Lactate轉化成Pyruvate，進而以下生物代謝作用(Whiteley and Lee, 2006; Ezeji et al., 2007)。

Spot 280為在控制組表現量大於實驗組，鑑定結果是為Isocitrate dehydrogenase [NADP]。與碳水化合物、蛋白質與能源代謝分解相關之蛋白質(Petty et al., 2010)。但發現在控制組表現量較大，可能是原將細菌培養於豐富培養基中，代謝產物為完全分解之殘留量，仍是進入TCA cycle；而在實驗組中推測只有MTBE做為 *Enterobacter* sp. NKNU02唯一碳源，使細胞進入TCA cycle機會變小，但從蛋白質表現量發現Isocitrate dehydrogenase 在實驗組中仍然維持穩定，只是表現量變低，推測細胞是仍然有利用MTBE做為碳源(Cao and Loh, 2009)。

4. 受壓力影響而產生蛋白質

Spot 172為在控制組表現量大於實驗組，可能為alkyl hydroperoxide reductase/Thiol specific antioxidant/ Mal allergen與Antioxidant, ahpc/TSA family，當為生物產生氧化性壓力時，會產生的氧化性壓力蛋白。過氧化作用是指當細胞受傷過後，而產生重組修改蛋白質轉譯序列現象。此蛋白質屬Peroxiredoxin (PRX) family (Typical 2-Cys PRX subfamily)，PRXs 是指針對硫醇類化合物之抗毒性蛋白(TSA)，可藉由還原過氧化氫、過氧化亞硝酸鹽與有機物化合物，進而達保護細胞效用。控制組中是不添加任何碳源之培養，推測亦會對微生物產生氧化性壓力，但MTBE對*Enterobacter* sp. NKNU02 而言同屬會造成氧化性壓力之有機化合物；另一方面微生物可將MTBE做為細胞生長碳源，使細胞得以繼續生存，進而使原先因缺乏碳源所產生氧化性壓力蛋白表現量降低；且在實驗加入MTBE後細胞會產生適應MTBE反應，如細胞膜上通透性改變等保護反應，進而可推論*Enterobacter* sp. NKNU02 可利用MTBE做為細胞生長之碳源，但MTBE毒性對其造成的氧化性壓力不明顯(Li et al., 2009; Cao and Loh, 2009; Eixarch and Constant', 2010)。

Spot 335 為在控制組表現量大於實驗組，是為 Cysteine synthase A，此蛋白質包含 Cystathionine beta-synthase (CBS) 與 Cysteine synthase。CBS 為一種特殊含有血紅素之酵素，可催化 Pyridoxal 5'-phosphate (PLP)-dependent 生成 Serine 與高半胱胺酸(Homocysteine)進而產生半胱胺甲硫胺酸(Cystathionine)。如果高半胱胺酸(Homocysteine)沒有轉化成半胱胺甲硫胺酸(Cystathionine)將會影響細胞生理機能(Yu and Gu, 2007)。在加入 MTBE 後會對細胞造成影響，由表現量差異比較在 $T_{1/2}$ 時表現量與控制組相似，故推測此時 Cysteine synthase A 仍是可以正常運作，但當細胞生長不明顯且趨於平緩時發現 Cysteine synthase A 表現量下降，推測細胞因生長環境受限，使細胞生理機能受到影響，進而影響正常 Cysteine synthase A 產生量，進而表現量開始下降(Bhushan et al., 2005)。

4.4.3 MTBE 分解產物

利用PBS buffer進行生物反應槽降解MTBE試驗，使*Enterobacter* sp. NKNU02維持在停滯期(Rest phase)，使其生長在含有100 mg/L MTBE之PBS buffer，共培養24小

時，其中每兩個小時連續進行揮發性與半揮發性物質以GC/MS定性分析，測得1-Pentene、acetic acid、2-Methyl-1-butene、2-propenoic acid與2-propanol，其中可能性較高之與MTBE分解相關產物包括acetic acid、2-propenoic acid與2-propanol。如圖4.17所示為培養24小時後，PBS buffer進行萃取所分析之圖譜，因24小時所分析得到訊號最為大，且亦發現隨時間越長，所分析之化合物pick面積越大，故可推知所得化合物為代謝產物可能性極高。

表 4.8 在 MTBE 處理下以 MALDI/TOF-MS 分析鑑定之 *Enterobacter* sp. NKNU02 蛋白質鑑定結果

Spot	Accession No.	Protein description	Matched peptides ^a	Coverage ^a (%)	MOWSE Score ^b	Theoretical Mr / pI	Experimental Mr / pI	Induction ratio ^c	
								T _{1/2} /Control ^d	T ₁ /Control ^e
781	gi 237728854	Extracellular solute-binding protein	17	36.1	142	60.4/6.3	50.21/6.46	0.431±0.098	0.342±0.006
63	gi 291085994	ABC transporter Periplasmic binding protein ytfq	8	43.7	88.2	34.3/6.0	30.16/6.58	0.239±0.016	0.288±0.102
101	gi 152969325	Phosphoglyceromutase	9	39.6	86.8	28.3/5.6	26.65 / 6.02	0.561±0.0248	1.155±0.185
151	gi 261340771	Transaldolase	16	53.5	142	35.7/5.6	35.43 / 6.00	1.366±0.167	2.018±0.015
118 ^s	gi 295057780	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	16	44.0	481	28.36 / 5.5	26.60 / 5.71	0.6232±0.410	1.3561±0.315
773	gi 146312500	Cationic amino acid ABC transporter, periplasmic binding protein	16	66.2	146	28.6/5.6	28.37 / 5.00	0.368±0.015	0.428±0.024
258	gi 288549655	Alcohol dehydrogenase, propanol-preferring	10	36.9	88	37.2/6.5	38.84 / 6.40	0.441±0.037	0.5626±0.088
222	gi 156936114	F0F1 ATP synthase subunit alpha	15	36.6	128	55.4/5.9	51.23 / 6.26	0.5897±0.181	1.5131±0.043

表 4.8 (續).

Spot	Accession No.	Protein description	Matched peptides ^a	Coverage ^a (%)	MOWSE Score ^b	Theoretical Mr / pI	Experimental		Induction ratio ^c	
							Mr / pI	T _{1/2} / Control ^d	T ₁ / Control ^e	
498	gi 288550235	Hypothetical protein ENTCAN_08325	11	25.8	105	60.3/6.5	50.50 / 6.59	2.2960±0.190	1.4562±0.438	
280	gi 283784947	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	14	35.0	119	46.1/5.0	44.51 / 5.47	0.6074±0.157	0.4977±0.063	
172	gi 146310533	Alkyl hydroperoxide reductase/ Thiol specific antioxidant/ Mal allergen	6	38.0	79	22.3/5.0	23.07 / 5.22	0.5588±0.049	0.2284±0.043	
335	gi 261340754	Cysteine synthase A	12	48.9	153	34.5/6.0	34.70 / 6.53	0.8256±0.142	0.3783±0.023	
339	gi 224373224	NADP-dependent malic enzyme	7	22.0	78.6	48.1/5.1	50.07 / 5.56	0.6524±0.138	1.3309±0.180	

^a means criteria for confident identification were that the protein should have at least 20% sequence coverage and match at least four peptides.

^b means mascot scores greater than 77 are significant ($P < 0.05$).

^c means of induction ratio, derived from at least 2 excised spots from different gels after 2-D electrophoresis, more than two-fold is significant ($P < 0.05$).

^d means the volume^f of a spot of T_{1/2} (the 50 percentage of MTBE biodegradation) divide by the volume of control condition.

^e means the volume of a spot of T₁ (stable MTBE biodegradation) divide by the volume of control condition.

^f means spot quantity was expressed as the volume of a spot divide by total volume of all the spots in a gel.

^g means identified protein spot 118 was more than two-fold is significant by HPLC/MS/MS analysis.

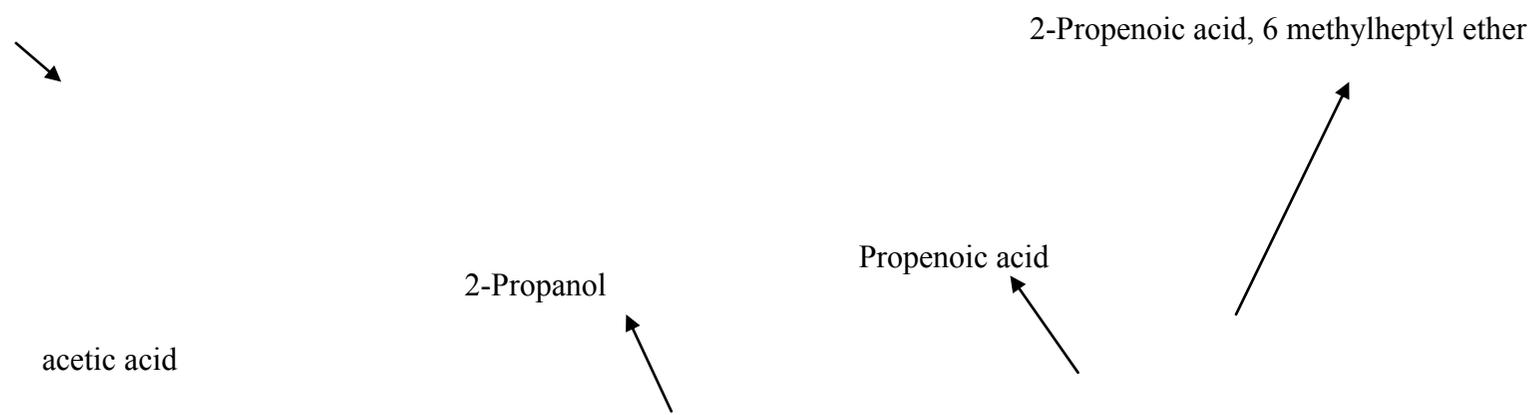


圖 4.17 以 PBS buffer(Phosphate buffer solution pH=7.4)培養 *Enterobacter* sp. NKNU02 進行 100 mg/L MTBE 生物降解，經萃取後以 GC/MS 定性分析之層析圖譜

4.4.4 MTBE 分解途徑

研究發現鑑定蛋白質點Spot 258，在相關文獻中顯示此蛋白質與MTBE氧化分解形成TBF有關，主要因為此酵素是主要參與碳氫鍊氧化的氧化酶(Johnson et al., 2004; Smith et al., 2003)，但且發現Spot 258表現量以控制組較大，故合理推論*Enterobacter* sp. NKNU02進行MTBE分解質轉成TBF得比例較少，以直接轉變為TBA為主要分解MTBE方式。

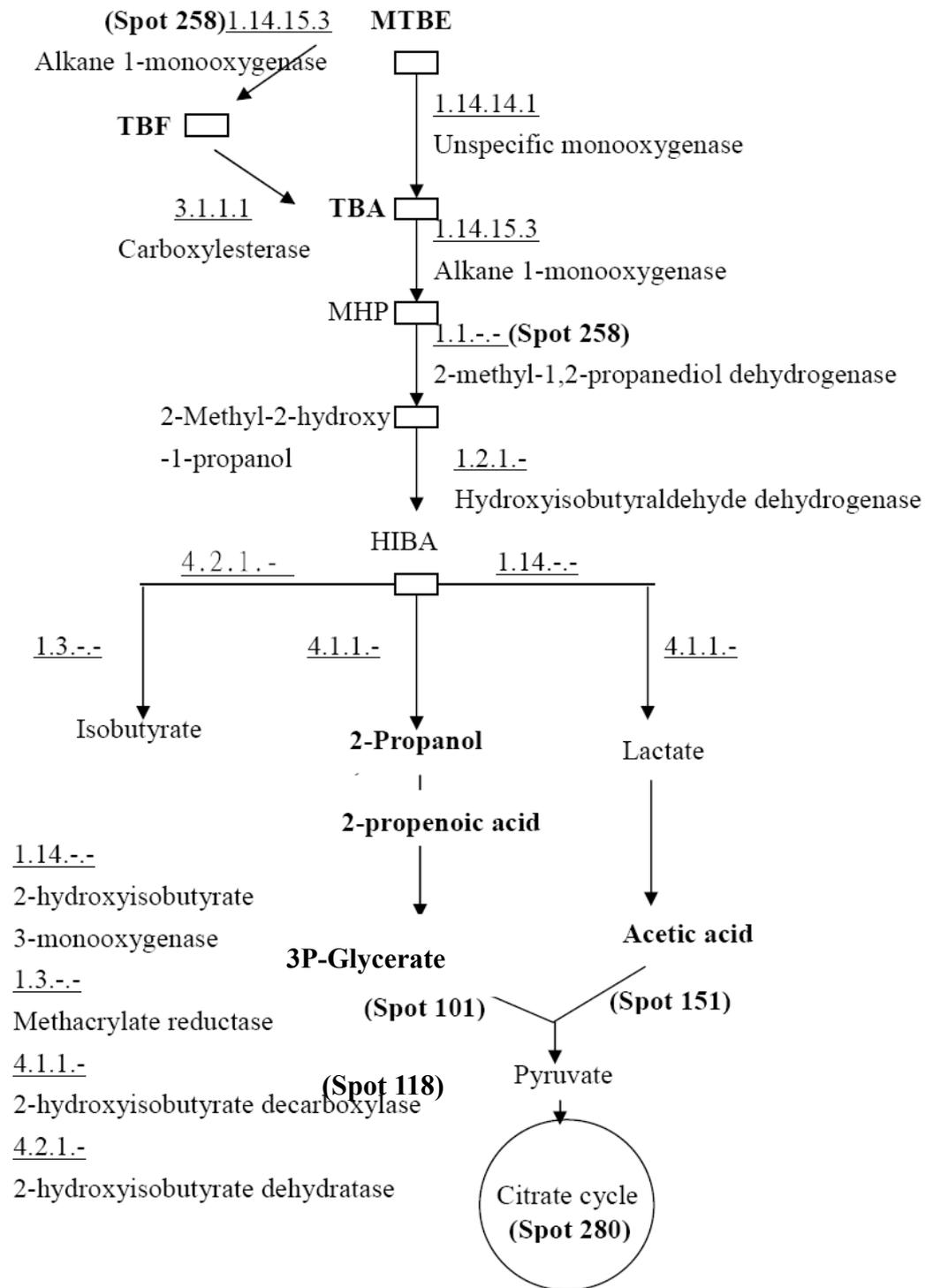
另外MTBE中間產物2-methyl- 2-hydroxy- 1-propanol (MHP)會經由ENZYME class 1.1.-中之氧化酵素脫去 $2H^+$ 與 $2e^-$ ，轉變為2-Methyl-2-hydroxy-1-propanol，且Spot 258屬ENZYME class 1.1.，故推測此蛋白質亦會促使MHP氧化分解，此亦說明在蛋白質表現量中 T_1 表現量會大於 $T_{1/2}$ ，因中間產物形成使分解酵素產生量增加(Ferreira et al., 2006)，故推測Alcohol dehydrogenase參與氧化MHP反應。

MTBE中間產物MHP會在被hydroxyisobutyraldehyde/ dehydrogenase經氧化生成NADPH，且形成HIBA(Ferreira et al., 2006)，HIBA降解途徑有三種不同方式，分別為脫去 H_2O 而轉變為Isobutyrate；二為轉變為2-Propanol，而後2-Propanol代謝途徑過程會產生propenoic acid(實驗中檢出相似化合物)，推測再經由Spot 101與Spot 118 (Phosphoglyceromutase其中包含烯醇酶，enolase)質轉為形成丙酮酸(pyruvate)，進入TCA cycle(Funahashi et al., 2008；Kang et al., 2009)。

其三為脫去 CO_2 而轉變為Lactate，而Lactate代謝途徑過程會產生Acetic acid(實驗中檢出相似化合物)。而Spot 151(轉醛酶Transaldolase)，可催化Pyruvate與Acetolactate兩者之間轉化(Whiteley and Lee, 2006; Ezeji et al., 2007)進而生成丙酮酸(pyruvate)，進入TCA cycle。

實驗結果發現*Enterobacter* sp. NKNU02分解MTBE過程中，中間產物HIBA降解途徑推論出主要是經由Lactate與Propanol兩種形式分解，而較無直接證據顯示*Enterobacter* sp. NKNU02代謝HIBA衍生出Isobutyrate，再進入TCA cycle。Spot 280為Isocitrate dehydrogenase [NADP]。Isocitrate dehydrogenase是為與碳水化合物、蛋白質與能源代謝分解相關之蛋白質，且與TCA cycle相關(Petty et al., 2010)。

根據以上蛋白質鑑定結果，推論出屬於本實驗所使用具MTBE分解潛力之*Enterobacter* sp. NKNU02，MTBE生物降解途徑(如圖4.18所示)。



Enzymes are represented by their EC numbers. Identified enzymes are in boldface and noted with their corresponding spot numbers. Identified products of MTBE degradation by GC/MS are in boldface. Enzymes underlined are those whose activities have been confirmed experimentally. TBA, *tert*-butyl alcohol. TBF, *tert*-butyl formate. MHP, 2-methyl-2-hydroxy-1-propanol. HIBA, 2-hydroxyisobutyric acid.

圖 4.18 推論之 *Enterobacter* sp. NKNU02 生物降解 MTBE 途徑

4.5 生物降解動力學

4.5.1 實驗所得分解 MTBE 速率與前人實驗比較

利用每日監測 MTBE 濃度，以及推算 MTBE 在生物反應槽降解實驗期間，透過以時間為 X 軸殘留 MTBE 率為 Y 軸，可算出最大斜率，意即單位時間中瞬間最大降解速率(表 4.8)，可知以 *Enterobacter* sp. NKNU02 降解速率為最快，約為 19.901 mg/L/d；而於直接代謝試驗中，以 *Enterobacter* sp. NKNU02 為次之約為 7.448 mg/L/d，速率最小為 *Bacillus* sp. NKNU01 約為 3.174 mg/L/d。

透過共代謝速率與直接代謝速率比較，發現共代謝速率皆大於直接代謝速率。其中 *Pseudomonas* sp. NKNU01 與 *Bacillus* sp. NKNU01 發現共代謝速率約為直接代謝 1.5 與 2.0 倍，而 *Klebsiella* sp. NKNU01 兩種代謝模式速率效率相異較小約 1.13 倍，而 *Enterobacter* sp. NKNU01 降解模式與批次試驗中相異，以直接分解速率為較大，約為共代謝作用 1.3 倍。推測對於共代謝作用有明顯增加降解速率菌種為 *Pseudomonas* sp. NKNU01 與 *Bacillus* sp. NKNU01，故正戊烷對其而言屬有效用的共代謝物質；另一方面，正戊烷對 *Enterobacter* sp. NKNU01 與同屬之 *Enterobacter* sp. NKNU02 作用為抑制其分解 MTBE 效率。

另外利用測量菌量乾重與吸光值進行檢量線，估算各單位時間內增加生物乾重，求得單位時間與單位菌量中降解速率(表 4.9)。因為各菌種增加量不同，使此降解速率(mg/mg cells/d)與瞬間速率(mg/L/d)而有所不同。*Enterobacter* sp. NKNU02 因為細胞可降 MTBE 轉換成必須碳源，進而使菌量增加，使單位菌量中降解速率約為 1.072 mg/mg cells/d；*Klebsiella* sp. NKNU01 則菌量沒有明顯生長，而相對使單位菌量中降解速率增加為 1.49 mg/mg cells/d。

表 4.9 各菌種培養 7 天於生物反應槽試驗中正戊烷共代謝作用添加之降解 MTBE 速率

Species	pentane	Rate of MTBE degradation		
		Rate ^a (mg/L/d)	Rate ^b (mg/ mg cells /d)	R ²
<i>Pseudomonas</i> sp. NKNU01*	-	3.40±0.18	0.57±0.002	0.88
	+	5.18±0.34	0.83±0.004	0.68
<i>Bacillus</i> sp. NKNU01*	-	3.17±0.02	0.46±0.06	0.95
	+	6.40±0.15	1.07±0.05	0.86
<i>Klebsiella</i> sp. NKNU01*	-	5.15±0.18	1.49±0.01	0.83
	+	5.77±0.05	1.54±0.01	0.92
<i>Enterobacter</i> sp. NKNU01*	-	7.45±0.26	0.63±0.07	0.96
	+	5.79±0.03	0.48±0.05	0.88
<i>Enterobacter</i> sp. NKNU02	-	19.90±1.60	1.07±0.18	0.79

MTBE(100 mg/L) degradation by five bacteria in the presence of pentane(142.9 mg/L) at incubation 7 days by bioreactor and analysis sample every day. The curve of the amounts of removable MTBE with bacterial inoculum per day makes by the spots (day 0th-7th).

* means *p* value < 0.05 between the rate of MTBE biodegradation in the presence or absence of pentane

^a means the rate calculated from the maximum of the slopes (X-axis was the amounts of removable MTBE with bacterial inoculum ; and Y-axis was experiment time).

^b means the rate calculated from the equation(the rate^a divided by increase of biomass of bacterial inoculum in the same experiment time)and was derived from the average of the results in three-independent experiment, with the values of variation coefficient less than 10%.

在共代謝添加後進行 MTBE 降解實驗，除 *Enterobacter* sp. 兩株菌外，其於菌種降解效力皆有明顯增加現象，如 *Pseudomonas* sp. NKNU01 在添加正戊烷進行代謝後，可從約 23.79 mg/g cells/h 增加至 34.750 mg/g cells/h；而如 *Enterobacter* sp. NKNU01 則在加入正戊烷後，使降解速率約由 26.333 mg/g cells/h 抑制為 19.917 mg/g cells/h，故在 100 mg 之 MTBE 濃度中，添加正戊烷反而會抑制 *Enterobacter* sp. 降解 MTBE。相較於亦是用正戊烷做為共代謝物質，*Pseudomonas aeruginosa* (Garnier et al., 1999)，其降解 MTBE 速率約為 $34 \text{ mg h}^{-1} \text{ g dried biomass}^{-1}$ (mg/g cells/h)，本研究中 *Pseudomonas* sp. NKNU01 在添加共代謝物質後亦可達相似之速率，且本研究中 MTBE 濃度為 100 mg/L，而 Garnier et al. 是 10 mg/L 進行，故本研究之 *Pseudomonas* sp. NKNU01 仍可作為具分解 MTBE 菌種為前題，繼續發展並尋找最適當共代謝物質。

本研究中降解效率較佳的 *Enterobacter* sp. NKNU02，因為代謝 MTBE 過程使菌量提升，故平均每天每毫克細胞降解 MTBE 速率約為 1.07 mg/g cells/day(約為 44.59 mg/mg cells/h)，與目前公認 MTBE 降解效率最佳，在 2000 年 Deeb et al. 文獻中之 PM1 降解速率 50 mg/g cells/h 差異不大，且本研究所使用菌種為台灣本土菌種，更能符合適應當地環境條件以利應用於生物復用工法。

4.5.2 MTBE 生物降解模式

本研究生物反應槽實驗中，每日監測 MTBE 濃度變化，分別以 Zero order model ($S-S_0 = -kt$) 與 First order model ($S/S_0 = \text{Exp}(-kt)$) (Schmidt et al., 1985) 進行估算各菌種之生物分解速率(k)、在生物系統半衰期($t_{1/2}$)，且可判別各菌種直接代謝作用與共代謝作用較適用模式。

在直接代謝 MTBE 中，在 Zero order model 中 k 值約為 2.4394-11.4076(表 4.10)，且 p 值皆小於 0.005，而 R^2 約為 0.6705-0.9446，生物系統半衰期為 4.38-20.50 天。其中 k 值最大為 *Enterobacter* sp. NKNU02，表示此菌降解速度最快，且可約在 4.38 天降解 50% 之 MTBE；其次為 *Enterobacter* sp. NKNU01，約在 9.67 天時可降解 50% 之 MTBE。 R^2 值大小可代表是否適合以此模式代表菌種降解情形，以 *Enterobacter* sp.

NKNU01 為最大， R^2 值約為 0.9446；其次為 *Bacillus* sp. NKNU01 為 0.9430； R^2 最小為 *Klebsiella* sp. NKNU01。

表 4.10 直接代謝 MTBE 之 Zero order model

Species	Zero order model				
	$S-S_0 = -kt$	R^2	k (mg/L,d)	p -value	$T_{1/2}$ (day)
<i>Pseudomonas</i> sp. NKNU01	$y = 2.9843x$	0.7269	2.9843 ± 0.2552	0.000008	16.75
<i>Bacillus</i> sp. NKNU01	$y = 2.4394x$	0.9430	2.4394 ± 0.1194	0.000000	20.50
<i>Klebsiella</i> sp. NKNU01	$y = 3.9743x$	0.6705	3.9743 ± 0.3784	0.000015	12.58
<i>Enterobacter</i> sp. NKNU01	$y = 5.1700x$	0.9446	5.1700 ± 0.2509	0.000000	9.67
<i>Enterobacter</i> sp. NKNU02	$y = 11.4076x$	0.7581	11.4076 ± 0.9882	0.000008	4.38

另外以相同資料進行 First order model 分析，k 值約為 0.0263-0.1883，其 p 值皆小於 0.005，而 R^2 約為 0.7457-0.9580，生物系統半衰期為 3.68-26.36 天。其中 k 值最大亦為 *Enterobacter* sp. NKNU02，而半衰期約為 3.68 天，但其 R^2 約為 0.9376 比 Zero order model 中 R^2 大，故推測 *Enterobacter* sp. NKNU02 降解 MTBE 情形以 First order model 進行判定較為適合。另外 k 值其次亦為 *Enterobacter* sp. NKNU01，但約在 11.34 天時才可降解 50% 之 MTBE，尚比以 Zero order model 時間較長，其中 R^2 為 0.9580 與 Zero order model 相似，故兩模式皆適合用來推估 *Enterobacter* sp. NKNU01 降解 MTBE 模式。利用兩種模式推估菌種降解 MTBE 模式，在生物系統中半衰期最長為 *Bacillus* sp. NKNU01，其次為 *Pseudomonas* sp. NKNU01，分別為 (20.50-26.36) 天與 (16.75-21.07) 天。

在共代謝試驗中，在 Zero order model 中 k 值約為 3.6078-5.3517，且 p 值皆小於 0.005，而 R^2 約為 0.2658-0.8626，生物系統半衰期為 9.34-13.86 天。其中 k 值最大為 *Bacillus* sp. NKNU01，表示此菌降解速度最快，且可約在 9.34 天降解 50% 之 MTBE；其次為 *Klebsiella* sp. NKNU01，約在 10.20 天時可降解 50% 之 MTBE。

另外以相同資料進行 First order model 分析，k 值約為 0.0411-0.0648(表 4.11)，其 p 值皆小於 0.005，而 R^2 約為 0.3727-0.8989，生物系統半衰期為 10.70-16.88 天。其中 k 值最大亦為 *Bacillus* sp. NKNU01，而半衰期約為 10.7 天，但其 R^2 約為 0.7774 比 Zero order model 中 R^2 大，故推測 *Bacillus* sp. NKNU01 共代謝作用降解 MTBE 情形以 First order model 進行判定較為適合。另外 k 值其次亦為 *Klebsiella* sp. NKNU01，但約在 11.96 天時才可降解 50% 之 MTBE，比以 Zero order model 時間較長，其中 R^2 為 0.8781 與 Zero order model 相似，故兩模式皆適合用來推估 *Klebsiella* sp. NKNU01 降解 MTBE 模式。利用兩種模式推估菌種以共代謝作用降解 MTBE 模式，在生物系統中半衰期皆需要時間最長為 *Pseudomonas* sp. NKNU01，其次為 *Enterobacter* sp. NKNU01。

其中發現共代謝作用降解 MTBE 之半衰期($t_{1/2}$)所需時間變短，符合共代謝作用會增加降解效力。比較由模式推估之降解速率與上小節所算得降解速率有些許不同，原因為本研究所推算降解速率為找出瞬間最大速率，故在不同時間點求得之最大斜率(以 X 為時間，Y 為降解率)為最大速率；在模式推估是以實驗監測資料做平均求

出之速率，故速率會略小於瞬間降解速率(Schmidt et al., 1984 and 1985)。另外發現由 First order model 推算出 k 值(降解速率)與本研究推算出降解速率大小相似，故可推論本研究所求得之速率具其代表性，其中降解速率最大者仍為 *Enterobacter* sp. NKNU02(表 4.12)。

表 4.11 直接代謝 MTBE 之 First order model

Species	First order model				
	$S/S_0 = \text{Exp}(-kt)$	R^2	$k \text{ (d}^{-1}\text{)}$	$p\text{-value}$	$T_{1/2}$
<i>Pseudomonas</i> sp. NKNU01	$y = \text{Exp}(-0.0329x)$	0.7655	0.0329 ± 0.0028	0.000000	21.07
<i>Bacillus</i> sp. NKNU01	$y = \text{Exp}(-0.0263x)$	0.9526	0.0263 ± 0.0013	0.000000	26.36
<i>Klebsiella</i> sp. NKNU01	$y = \text{Exp}(-0.0456x)$	0.7457	0.0456 ± 0.0043	0.000000	15.18
<i>Enterobacter</i> sp. NKNU01	$y = \text{Exp}(-0.0611x)$	0.9580	0.0611 ± 0.0031	0.000000	11.34
<i>Enterobacter</i> sp. NKNU02	$y = \text{Exp}(-0.1883x)$	0.9376	0.1883 ± 0.0132	0.000000	3.68

表 4.12 共代謝 MTBE 之 Zero order model 與 First order model

Species	Zero order model				
	$S-S_0 = -kt$	R^2	k (mg/L,d)	p -value	$T_{1/2}$
<i>Pseudomonas</i> sp. NKNU01	$y = 3.6078x$	0.2658	3.6078 ± 0.4679	0.000115	13.86
<i>Bacillus</i> sp. NKNU01	$y = 5.3517x$	0.6846	5.3517 ± 0.4879	0.000012	9.34
<i>Klebsiella</i> sp. NKNU01	$y = 4.9033x$	0.824	4.9033 ± 0.3504	0.000002	10.20
<i>Enterobacter</i> sp. NKNU01	$y = 4.4157x$	0.8626	4.4157 ± 0.3189	0.000002	11.32

Species	First order model				
	$S/S_0 = \text{Exp}(-kt)$	R^2	k (d^{-1})	p -value	$T_{1/2}$
<i>Pseudomonas</i> sp. NKNU01	$y = \text{Exp}(-0.0411x)$	0.3727	0.0411 ± 0.0054	0.000000	16.88
<i>Bacillus</i> sp. NKNU01	$y = \text{Exp}(-0.0648x)$	0.7774	0.0648 ± 0.0058	0.000000	10.70
<i>Klebsiella</i> sp. NKNU01	$y = \text{Exp}(-0.0579x)$	0.8781	0.0579 ± 0.0040	0.000000	11.96
<i>Enterobacter</i> sp. NKNU01	$y = \text{Exp}(-0.0512x)$	0.8989	0.0512 ± 0.0036	0.000000	13.54

4.5.3 MTBE 生物降解與質量守恆關係

質量守恆定律(Law of conservation of mass, 或稱“質量不減定律”) 是由法國的拉瓦節根據 1744 年所作實驗, 發表了質量守恆定律, 論述無論物質經過何種化學變化, 反應前各物質的總質量恆等於反應後各物質之總質量。MTBE 經過生物反應槽試驗中, 利用控制組試驗了解 MTBE 在生物反應槽機械力干擾下會造成揮發量, 以及扣除實驗組中殘留的 MTBE 含量, 即為 MTBE 被菌種進行生物分解的部分。另外, 進行生物分解部分根據質量守恆定律, 可能質量轉移到生物質量增加, 亦或轉移至生物體代謝過程中間產物, 透過中間產物測定以及生物質量比較, 進而能較明確了解 MTBE 質量走向。

當中由文獻 (Salanitro et al., 1999 ; Steffan et al., 1997) 指出, MTBE 被生物分解後, 所衍生的中間代謝產物 TBF 及 TBA。經由儀器分析 TBF 發現, 數據皆低於偵測極限, 由文獻指出 TBF 是屬較不穩定化合物, 進而會快速轉換成 TBA; 另外, 分析 TBA 的含量中, 發現當 MTBE 生物分解量較大, TBA 濃度亦呈現較大趨勢, 如在進行 100 mg MTBE 降解試驗中, 具有降解 MTBE 最佳效力之 *Enterobacter sp.* NKNU02, 其 TBA 產生含量約有 3.77 mg, 屬其他菌種中最高含量。

生物質量檢測中, 利用吸光值 OD₆₀₀ 與其乾重製作各菌種檢量線, 以便可進行各生物反應槽試驗中生物質量變化測定。可利用吸光值最大質與最小值的差異, 計算出生物量增加質量, 如在進行 100 mg MTBE 降解試驗中, *Enterobacter sp.* NKNU02 其生物量增加 18.56 mg, 可推論有 18.56 mg MTBE 經由生物分解過程轉換成生物質量。其中 *Enterobacter sp.* NKNU02 由 MTBE 轉換成生物質量為最大值, 推論亦是由於 *Enterobacter sp.* NKNU02 具有最佳生物分解能力所造成現象; 另外, 如 *Bacillus sp.* NKNU01 在加入共代謝物質時, 降解效果較直接代謝 MTBE 實驗中明顯, 發現其生物量亦在具有共代謝物質時產生較大質量。

以 100 mg MTBE 為例, 扣除實驗中殘留於培養液與受生物反應槽機械力而揮發的 MTBE, 其於質量推論應被生物分解作用轉換為生物質量與代謝產物。其中以 *Enterobacter sp.* NKNU02 為例, 降解 100mg MTBE 實驗中 MTBE 殘餘於培養液中質量為 35.12mg; 由溶解態揮發成氣態進而逸散於空氣中, 由控制組試驗中 MTBE 質量為 8.59 mg; 以及 TBA 分析所得換算質量為 4.28 mg 與生物增加質量約有 18.56

mg；另外，剩餘 MTBE 質量約有 33.96 mg，推論可能轉換成其他代謝產物(圖 4.19；圖 4.20)。

其中生物分解 MTBE 部分中，直接分解 MTBE 質量轉換成生物質量的比例約為 28.13-57.62 %，轉換成其他代謝產物的比例約為 31.37-62.51 %。利用共代謝分解 MTBE 質量轉換成其他代謝產物之比例，在共代謝降解效果較佳之 *Bacillus* sp. NKNU01 與 *Klebsiella* sp. NKNU01 分別為 80.80 %與 73.37 %；相較於共代謝效果較不明顯之 *Pseudomonas* sp. NKNU01 與 *Enterobacter* sp. NKNU01 為 29.74 %與 18.63 %，而是轉換成生物量為最大比例(*Pseudomonas* sp. NKNU01 為 56.96 %與 *Enterobacter* sp. NKNU01 為 72.54 %)，故推論分解 MTBE 能力較差之菌種分解碳源後，質量大部分轉變成生物量；反之，則是分解 MTBE 轉換成其他中間產物，故各微生物分解唯一碳源質量轉換情形亦有所不同。

MTBE 代謝過程中，第一產物為 TBA(如文獻與本研究整合之代謝途徑)，推論因為 *Enterobacter* sp. NKNU02 降解 MTBE 過程最為迅速與明確，可能轉換成中間產物(TBA)程度越為明顯，導致雖然 TBA 有所增加，但因無測得其他明顯化合物作為指標，故無法明確完整解釋 MTBE 質量變化。其中根據文獻記載推論可能中間轉換代謝產物，如二氧化碳、有機醇類與有機酸類，如 2-methyl- 2-hydroxy- 1-propanol (MHP)和 2-hydroxyisobutyric acid (HIBA) (Steffan et al., 1997)，之後再繼續分解成 2-丙醇(2-propanol)、丙酮(acetone) 和氫氧化酮(hydroxyactone) (Church et al., 1997)。

Pseudomonas sp. NKNU01

Bacillus sp. NKNU01

Klebsiella sp. NKNU01

Enterobacter sp. NKNU01

Enterobacter sp. NKNU02

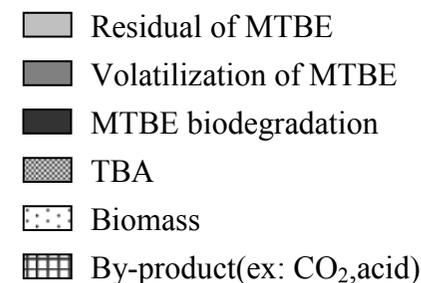
-  Residual of MTBE
-  Volatilization of MTBE
-  MTBE biodegradation
-  TBA
-  Biomass
-  By-product(ex: CO₂,acid)

The equation was calculated from [the total amount](#) of 100 mg MTBE composed of the amounts of residual of MTBE, volatilization of MTBE, and MTBE biodegradation (removable MTBE by bacterial inoculum). The amount of removable MTBE by bacterial inoculum was composed of the weight of TBA(the [increase](#) amount of TBA transformed by MTBE biodegraded), biomass (the [increase](#) amount of biomass that calculated from the calibration curve of **dry weight** content of **bacteria and** optical density (OD₆₀₀), and proposed metabolite (the other by-products as CO₂ and acid calculated from the remainder (the amounts subtracted the weight of biomass from the amount of MTBE biodegradation). The values(mg) of variation coefficient were less than 10%.

圖 4.19 各分離菌株以生物反應槽培養 7 天直接代謝 MTBE 之質量守恆分佈圖

Pseudomonas sp. NKNU01

Bacillus sp. NKNU01



Klebsiella sp. NKNU01

Enterobacter sp. NKNU01

The equation was calculated from [the total amount](#) of 100 mg MTBE composed of the amounts of residual of MTBE, volatilization of MTBE, and MTBE biodegradation (removable MTBE by bacterial inoculum). The amount of removable MTBE by bacterial inoculum was composed of the weight of TBA(the [increase](#) amount of TBA transformed by MTBE biodegraded), biomass (the [increase](#) amount of biomass that calculated from the calibration curve of **dry weight** content of **bacteria and** optical density (OD₆₀₀), and proposed metabolite (the other by-products as CO₂ and acid calculated from the remainder (the amounts subtracted the weight of biomass from the amount of MTBE biodegradation). The values(mg) of variation coefficient were less than 10%.

圖 4.20 各分離菌株以生物反應槽培養 7 天且利用正戊烷進行共代謝降解 MTBE 情形之質量守恆分佈圖

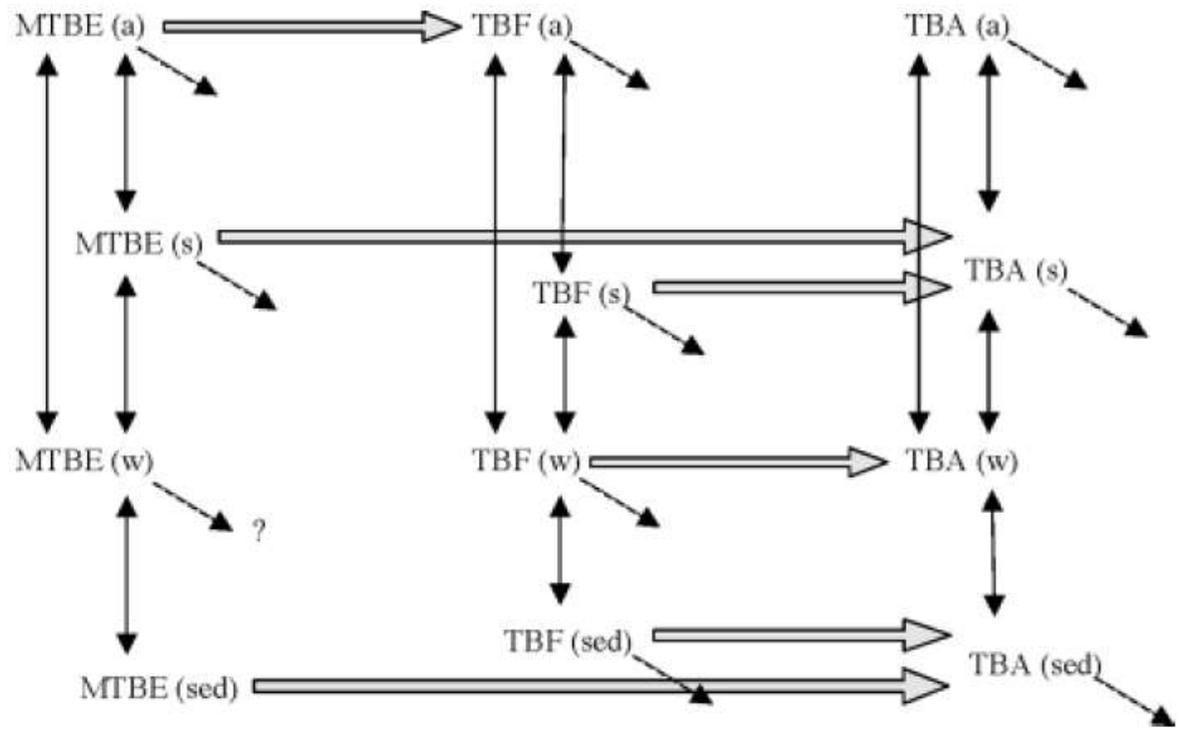
4.6 MTBE 生物分解之代謝產物

分析 MTBE 經過生物降解後產物，加以探討 MTBE 分解趨勢與代謝產物產量是否有相關性。結果發現分析 MTBE 同時亦具有 TBA 產生，由文獻中記載 TBA 是屬 MTBE 中間代謝產物，MTBE 經過單氧化酶氧化脫去一個甲醛(Formaldehyde)而成 TBA；亦或是藉由 MTBE 氧化分解為 TBF 再由碳氫脂酶氧化成 TBA(Deeb et al., 2000a; 2000c; Martiensen et al., 2006)

4.6.1 控制組中 MTBE 與代謝產物

控制組中在實驗有測得 TBA 濃度為 0.2mg/L，推論是因(1) MTBE 製造過程中藥品所含不純物所影響(Eweis et al., 2007)；(2) 原藥品中具有微生物使 MTBE 分解；(3) 存放藥品條件不適當。為排除以上問題，首先將藥品保存放置於 4°C 冰箱，且所有實驗用 MTBE 皆經 0.22 μ m 滅菌濾膜(MF-Millipore MCE membrane)除去當中微生物，以減少實驗誤差。

另一方面，有文獻(Arp et al., 2005)指出 MTBE 在自然情形下，轉變成 TBA 與 TBF 的可能性有所不同。在偏酸之水相中 MTBE 會被酸解而產生 TBA 與甲醇，故 MTBE 自行轉變成 TBA 機率較低。如圖 4.21 溶於水相中 MTBE 會藉由揮發逸散到大氣中(Arp et al., 2005)，而氣態分子 MTBE 會轉化成 TBF 的氣態分子，進而溶於液相中後 TBF 再水解而成 TBA，故 MTBE 在水相中無法直接水解成 TBA。故實驗中控制組，MTBE 中含有 TBA 原因可推論為非實驗過程中由 MTBE 轉變而成，而是製成藥物過程中不純物所影響產生(Schmidt et al., 2004；Wilson et al., 2005)。



Mineralization and degradation into other products (diagonal broken arrows) ; Transformation (horizontal block arrows)

From Arp et al., 2005

圖 4.21 在環境中 MTBE 轉變成 TBA 與 TBF 的途徑

4.6.2 代謝產物與 MTBE 相互影響關係

利用不同菌種對 MTBE 進行生物降解，發現 TBA 濃度約佔移除 MTBE 含量 6.5-18%(表 4.13)，故可用來推知 MTBE 被微生物分解後衍生成 TBA 含量比例。實驗中所得微生物分解 MTBE 含量與其衍生代謝產物 TBA 成線性關係，且針對不同菌種移除 MTBE 含量與代謝產物 TBA 含量關係式可得

$$Y = 0.0721X, R^2 = 0.809$$

X 為 MTBE 移除量(mg)；Y 為 TBA 產出量(mg)

可知當 MTBE 被分解越多時 TBA 產生量即越大，兩者成線性正相關性(且截距為 0，因假設 MTBE 無移除時，TBA 無產出量，意即通過原點)。符合文獻中 MTBE 代謝轉換成 TBA 比例變化趨勢(Wilson et al., 2005)。依照此關係式可由 TBA 產生量推算出 MTBE 污染濃度，協助了解污染情形。

另外實驗組中加入共代謝物質-正戊烷後，TBA產生量與MTBE移除量較無明顯線性關係，其中添加正戊烷之*Bacillus* sp. NKNU01與*Klebsiella* sp. NKNU01實驗中所生成TBA量比直接降解MTBE試驗較多；*Pseudomonas* sp. NKNU01 與*Enterobacter* sp. NKNU02則為反之。由文獻中亦發現加入共代謝物質後，代謝產物產生速率與產量皆與直接降解有所不同(Deeb et al., 2000a)，主要因為共代謝物質提供菌種另一種生長能量來源，並影響分解MTBE速率，且同時開始進行TBA共代謝作用，近而亦影響TBA分解速率(Schmidt et al., 2004)。以文獻中發現MTBE與TBA同時被共代謝物質影響，可解釋在質量守恆關係中，TBA濃度增加趨勢不明顯，但且其餘代謝產物所佔比例較大。共代謝作用有減少生物體適應時間且使生物分解效果增加的優勢，但會導致MTBE分解不夠完全且代謝產物TBA堆積(Volpe et al., 2009)。

其中利用TBA產生最大濃度為起始點，計算各菌種分解TBA速度，*Enterobacter* sp. NKNU02分解TBA速率為0.148 mg/L/d，*Klebsiella* sp. NKNU01、*Pseudomonas* sp. NKNU01與*Bacillus* sp. NKNU01分別為0.170、0.095與0.148mg/L/d，其中*Pseudomonas* sp. NKNU01、*Bacillus* sp. NKNU01與*Klebsiella* sp. NKNU01在進行共代謝分解MTBE後，各TBA分解速率分別為0.137、0.257與0.191 mg/L/d，其中*Bacillus* sp. NKNU01與*Klebsiella* sp. NKNU01共代謝分解MTBE效果較佳菌種，利用pentane共代謝分解TBA能力亦較佳。另外，由於*Enterobacter* sp. NKNU01分解MTBE累積最大TBA濃度為實驗後期，故無法求得TBA速率，進而可推知此菌種分解MTBE能力較

分解TBA能力明顯，而使TBA濃度不斷累積，在表4.12中發現其 $TBA_{max}/MTBE_{Residual}$ 為最大值，進而符合此現象。

當實驗組 MTBE 被微生物進行降解作用旺盛時，TBA 產生亦會明顯提升；但當 MTBE 分解速率(mg/L/d)漸緩時，會偵測到 TBA 濃度達實驗中最大值，而後逐漸減少，故推測實驗中微生物先以 MTBE 為主要碳源，當代謝物產出時即轉向較易分解的 TBA 進行降解(Deeb et al., 2000a)，以符合文獻中所述，TBA 與 MTBE 相較之下屬較易分解之化合物。如實驗組中 *Pseudomonas* sp. NKNU01 於實驗中前期，MTBE 降解率為最大值，TBA 開始大量產生。實驗第二天至第三天 MTBE 降解速率降低為 0.62 mg/L/d，且 TBA 濃度達最大值 1.5 mg/L；而後 TBA 濃度大幅減少，相對的 MTBE 降解速率回復，另外其於實驗組亦有相似現象。可推論在一開始 MTBE 便被微生物大量分解，近而持續產生 TBA，當 TBA 累積比例到達殘留 MTBE 約 0.93-2.56 %時(如表 4.13)，開始進行 TBA 生物分解。

表 4.13 菌種培養 7 天在添加正戊烷與直接降解 MTBE 生物反應槽試驗中 TBA 與 MTBE 比值關係

Species	Pentane	Biodegradation of MTBE ^a (mg)	TBA ^b (mg)	TBA/MTBE _{removeal} (%) ^c	TBA _{max} /MTBE _{Residual} (%) ^d
<i>Pseudomonas</i> sp. NKNU01	-	10.53±0.57	1.16±0.03	11.02±0.02	1.67±0.01
	+	10.9±2.69	1.45±0.02	13.30±0.02	2.08±0.02
<i>Bacillus</i> sp. NKNU01	-	6.98±0.16	1.24±0.06	17.77±0.12	1.75±0.01
	+	21.88±3.35	1.35±0.06	6.17±0.40	2.43±0.01
<i>Klebsiella</i> sp. NKNU01	-	13.89±3.20	1.29±0.03	9.29±1.16	2.03±0.03
	+	20.96±3.02	1.52±0.01	7.25±0.91	2.47±0.04
<i>Enterobacter</i> sp. NKNU01	-	23.12±0.21	1.50±0.09	6.49±0.28	2.45±0.04
	+	16.65±2.36	1.47±0.15	8.83±0.43	2.65±0.02
<i>Enterobacter</i> sp. NKNU02	-	56.78±2.17	3.77±0.27	6.70±0.18	0.93±0.04

^a means the amount of removable MTBE by bacterial inoculum was calculated from the amounts subtracted the amount of volatilization of MTBE from the total amount of 100 mg MTBE at incubation 7 days.

^b means the weight of increase amount of TBA transformed by MTBE biodegraded at incubation 7 days by bioreactor.

^c means the percentage (%) was calculated from the ratio (the increase amount of TBA transformed by MTBE biodegraded divided by the amounts of removable MTBE with bacterial inoculum) multiplied by 100.

^d means the percentage (%) was calculated from the ratio (the maximum concentration of TBA transformed by MTBE biodegraded divided by the concentration of residual of MTBE at the maximum amount of TBA-transformed time) multiplied by 100.

The values of variation coefficient were less than 10%.

文獻指出在 TBA 增加時亦會減緩 MTBE 分解效力(Schmidt et al., 2004)，而後因 MTBE 降解速度減緩進而使 TBA 衍生量減少，且 TBA 亦開始被微生物分解，故 TBA 濃度持續下降，但仍比控制組之 TBA 濃度高(約為 0.2 mg/L)，可推知 MTBE 仍是有在進行生物分解。故在 MTBE 持續被分解下會不斷產生 TBA，但因 TBA 易於分解且含量少，故容易消耗殆盡，而啟動分解 MTBE 機制(Martienssen et al., 2006)，故 MTBE 降解效率與 TBA 產出含量有相互牽制之關聯性，屬於共同競爭分解關係(如圖 4.22)。

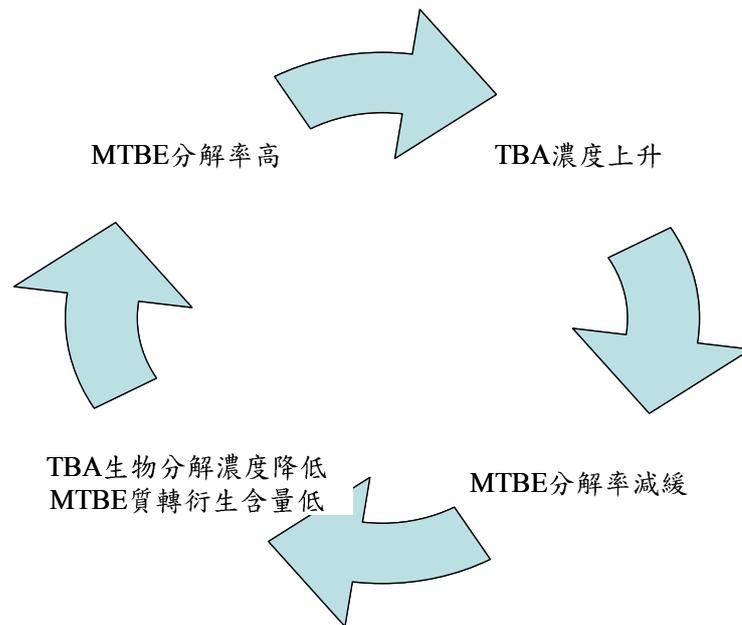


圖 4.22 TBA 與 MTBE 共同競爭分解關係

藉由了解 TBA 產生與 MTBE 被分解情形之相關性，未來可利用 TBA 發展作為 MTBE 被微生物進行生物分解情形之指標判定，近而有助於 MTBE 監測工作進行 (Martienssen et al., 2006)。

4.7 QA/QC

利用 MTBE(> 99%)污染貧營養液(MSM)進行生物降解實驗，分析培養液中 MTBE 濃度利用吹氣捕捉裝置前處理水相樣品，而後再利用 GC/MS 進行分析定量。MTBE 與其代謝產物之方法偵測極限(method detection limits, MDL)、儀器偵測極限(instrument detection limit, IDL)、精密度(Precision)與準確度(Accuracy)結果如表 4.14。

本研究中 MTBE、TBA 與 TBF 回收率結果為 $96.97 \pm 9.83\%$ 、 $105.84 \pm 9.64\%$ 與 $106.36 \pm 6.56\%$ ，而擬試標準品 4-Bromofluorobenzene、1,2-Dichlorethane-d4、Dibromofluoromethane 與 Toluene-d8 之回收率(%)分別為 97.17 ± 4.02 、 103.95 ± 7.75 、 87.79 ± 4.80 與 91.81 ± 4.29 。

表 4.14 MTBE、TBA與TBF之偵測極限、精密度與準確度

Compounds	MDL (g/L)	IDL(g/L)	精密度(Precision)	準確度 (Accuracy)
MTBE	4.47	1	5.87%	2.95%
TBA	10.20	10	6.14%	5.84%
TBF	9.00	1	5.39%	6.36%

第五章 結論與建議

5.1 結論

5.1.1 生物分解 MTBE 之應用可行性

本研究利用污染場址的現地菌種(*Pseudomonas* sp. NKNU01、*Bacillus* sp. NKNU01、*Klebsiella* sp. NKNU01、*Enterobacter* sp. NKNU01 與 *Enterobacter* sp. NKNU02)進行對 MTBE 的生物分解試驗,發現 *Klebsiella* sp. NKNU01 與 *Bacillus* sp. NKNU01 利用正戊烷可以增加降解 MTBE 效果;對 *Pseudomonas* sp. NKNU01 影響變化不大;而 *Enterobacter* sp.則都具有抑制生物分解 MTBE 現象。

其中 *Enterobacter* sp. NKNU02 直接代謝 MTBE 效果最佳,但在模擬遭汽油污染地下水中,會被 BTEX 抑制其分解 MTBE 效果。另一方面,*Enterobacter* sp. NKNU02 亦對 Benzene 與 Toluene 具有降解能力,可以在延長實驗時間監測是否在 Benzene 與 Toluene 被降解至低濃度時,可使 MTBE 降解作用再被 *Enterobacter* sp. NKNU02 開啟,恢復其 MTBE 降解率。另外,可以再尋找適當共代謝物質,以維持其在具有 BTEX 環境中分解 MTBE 之效果。

應用本研究發現具有較佳之降解菌種於受汽油污染地下水時,可以考慮先使用具有 BTEX 分解能力菌種降低 BTEX 濃度後,再使用 *Enterobacter* sp. NKNU02 進行 MTBE 分解,避免 BTEX 影響 *Enterobacter* sp. NKNU02 分解率。

5.1.2 生物分解 MTBE 代謝途徑之應用

此分解途徑除了可以供給微生物分解MTBE之模式,且由文獻歸納整合出較確切之屬於台灣本土菌*Enterobacter* sp. NKNU02分解MTBE機制,仍有生物科技與環境科技領域上有所重要性,生物性包括能推演出具有分解MTBE能力之蛋白質,可在未來利用基因工程技術再進化,製作出能大量表顯此功能蛋白質之突變菌種,有助生物復育工法進行。

環境上可以發現MTBE分解過程中,是否產生具有對環境造成影響或具有生態風險上疑慮之中間產物,可藉由進行評估或在進行復育工程時可以加以監測;另外,可以再利用此分解途徑了解是否在特定基質中,會加強具分解作用蛋白質表現量,亦或使MTBE趨向特定途徑進而減少有害中間產物形成,產生較無毒性之代謝產物。

5.1.3 生物分解 MTBE 代謝產物之應用

生物分解 MTBE 同時會產生其代謝產物，本研究主要偵測為 TBA 為主，文獻指出可利用 TBA 與 MTBE 濃度關係(Eweis et al., 2007)，推斷出污染場址生物分解 MTBE 之效力。另一方面，因 TBA 物化特性會長時間遲滯於環境水體中，且其亦具有生物毒性，故建議需要將其列為目標監測化合物。同時監測 MTBE 污染狀況，且有效控制 TBA 在環境中散佈情形，亦適用於汽油污染場址中進行生物復育工法時，瞭解 MTBE 降解情形；藉由監測 MTBE 及其代謝產物，可協助瞭解汽油污染場址進行生物復育之成效及可行性

5.1.4 以 *Enterobacter* sp. NKNU02 分解 MTBE 之優勢

本研究中降解效率較佳的 *Enterobacter* sp. NKNU02，與目前公認 MTBE 降解效率最佳之 PM1 降解速率差異不大，且本研究所使用菌種為台灣本土菌種，更能符合適應當地環境條件，且本研究所使用菌量(OD₆₀₀ 為 0.1)與文獻中菌量相較屬於較低菌數，且培養溫度因為預模擬地下水溫度(25°C)，與文獻中培養溫度相較之下亦較低，且非 *Enterobacter* sp. NKNU02 最適生長溫度，故降解 MTBE 效果會有所限制。若提高培養溫度與增加菌量與文獻相符，推測降解率則會有明顯增加現象，故可以將 *Enterobacter* sp. NKNU02 應用於生物復育工法。

5.2 建議

1. 改進分解 MTBE 之生物最佳條件

在實際應用於生物復育法中，可藉由加入以評估後具有分解污染物潛力之微生物，促進生物分解進行清除污染。本實驗中微生物所在之生物反應槽是屬懸浮態生長方式，有文獻(Rittmann and McCarty, 2000)指出利用固著物可使微生物承受更高濃度之污染物，且具有更好分解效果，故可以找尋適當之固著物加入生物反應槽中，對增加生物降解效率有所助益。

2. 研究微生物應用於生物復育之考量

研究中所測試菌種，因在實驗室中所設定之生長條件對微生物而言為最適當之因子，但實際運用至現地污染場址中，考量因子非只有環境條件，同時需要考

量現地微生物菌相，是否會對其造成影響(競爭、拮抗、促進)，都是需要加以評估才可實施進行。再者，對於研究中微生物是否對環境造成二次傷害都需要在實用前進行再研究與測試，才不會在改善污染場址後卻又造成生物污染。

未來後續研究可針對下列各項工作進行，以提高石化污染場址之生物復育成效:

1. 開發對污染場址中污染物具親和力且適合固化微生物的固定化材料，以有效捕捉處理對象(目標污染物)，減少質傳上的阻力，並增加微生物的生存力。
2. 以電腦模擬的方式，說明整個微生物降解的機制，以及質傳上的限制。
3. 開發新一代的生物反應器或組合反應器(氣舉式反應器)，以有效處理土壤中的污染物。
4. 依本研究的微生物的純菌株，植入生物反應器中，例如生物濾床、生物滴濾塔，甚至新開發的氣舉式反應器，最後亦可以應用生物濾床的原理進行現地生物復育的工作。
5. 依本研究發現可透過生物科技技術結合環境工程技術，利用具降解功能之蛋白質大量表現於環境微生物體內，藉由生物補強技術以增加實場微生物降解成效。

參考文獻

- 方瑋寧(2002) MTBE好氧分解之可行性研究，國立中山大學環境工程研究所碩士論文。高雄。
- 楊士賢(2003) 水中MTBE氧化特性之研究，國立成功大學環境工程學系碩士論文。台南。
- 林盈君(2007) 以基因體和蛋白體技術分析 2-aminobiphenyl 和 4-aminobiphenyl 對人類肝臟細胞 (HepG2) 之基因和蛋白質產生毒性影響，高雄師範大學生物科技研究所碩士論文。高雄。
- 蔡輔育(2008) 油污染場址之菌相分析及分離具分解MTBE潛力之菌種，高雄師範大學生物科技研究所碩士論文。高雄。
- 賴允偉(2008) 乙醇汽油及生質柴油於地下水分佈行為研究，高雄師範大學生物科技研究所碩士論文。高雄。
- 陳谷汎與高志明(2002) 土壤及地下水物理/化學復育技術。TASGEP Newsletter，5，3-5。
- 吳榮華、黃乙倫與洪鼎倫(2008) ETBE之國際發展趨勢分析。石油市場雙週報 專題分析報導。
- 行政院環境保護署(2000) 公告毒性化學物質及其管制濃度大量運作基準。
- 行政院環境保護署(2001) 飲用水與甲基第三丁基醚相關資料。
<http://www.epa.gov.tw/waterpollution/drinkwater/mains/m10.htm>。
- 行政院環境保護署(2001) 汽油添加劑MTBE(甲基第三丁基醚)之環境污染特性相關資料。<http://www.epa.gov.tw/training/49-4-2.htm>。
- 行政院環境保護署環境檢驗所(2002) 毒性化學物質甲基第三丁基醚檢測方法之研究。台北。
- 行政院環境保護署(2008) 以釋氧化劑整治牆處理受油污染之地下水 EPA-96-04-006。台北。
- 經濟部工業局(2007) 石油碳氫化合物土壤及地下水污染預防與整治技術手冊。台北。
- 行政院環境保護署(2010) 民國98年環境水質監測年報。台北。
- Ahmed, F.E., 2001. Toxicology and human effects following exposure to oxygenated

- or reformulated gasoline. *Toxicology Letter*. 123: 89-113.
- Alan, J.R., Blayden, J.M., and Ganguly, C.D., 1999. Field performance of air-sparging system for removing TCE from groundwater. *Environmental Science & Technology*.33: 157-162.
- American Petroleum Institute, 1989. A guide to the assessment and remediation of underground petroleum releases, *API Publication*. 1628, 2nd ed.
- American Chemical Society, 2000. MTBE threatens thousands of public drinking wells.
- Anderson, M., 2000. Removal of MTBE and other organic contaminants from water by sorption to high silica zeolite. *Environmental Science & Technology*. 34: 725-727.
- Anderson, N.L., and Anderson, N.G., 1998. Proteome and proteomics: New technologies, new concepts and new words. *Electrophoresis*. 19, 11: 1853-1861.
- Arp, H.P., and Schmidt, T.C., 2004. Air-water transfer of MTBE, its degradation products, and alternative fuel oxygenates: The role of temperature. *Environmental Science & Technology*. 38, 20: 5405-5412.
- Arp, H.P., Fenner, K., and Schmidt, T.C., 2005. Predicting Methyl *tert*-Butyl Ether, *tert*-butyl formate, and *tert*-butyl alcohol levels in the environment using the fugacity approach. *Environmental Science & Technology*. 39, 9: 3237-3244.
- Auffret, M., and Labbe, D., 2009. Degradation of a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives by *Rhodococcus aetherivorans* and *Rhodococcus wratislaviensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 75, 24: 7774- 7782.
- Backer, L.C., Egeland, G.M., Ashley, D.L., Lawryk, N.J., Weisel, C.P., White, M.C., Bundy, T.S.E., and Middaugh, J.P., 1997. Exposure to regular gasoline and ethanol oxyfuel during refueling in Alaska. *Environmental Health Perspective*. 105: 850-855.
- Beckett, G.D., and Huntley, D., 1994. Characterization of flow parameters controlling soil vapor extraction. *Groundwater*. 32, 2: 239-247.
- Belpoggi, F., Soffritti, M., and Maltoni, C., 1995. Methyl Tertiary Butyl Ether (MTBE) — a gasoline additive — causes testicular and lympho haematopoietic cancers in rats. *Toxicology and Industrial Health*. 11, 2: 119-149.
- Bhushan, B., Halasz, A., and Hawari, M., 2005. Biotransformation of CL-20 by a dehydrogenase enzyme from *Clostridium* sp. EDB2. *Applied Microbiology and*

- Biotechnology*, 69, 4: 448-455.
- Brady, J., Xiao, F., and Ning, S., 1990. Metabolism of methyl tertiary-butyl ether by rat hepatic microsomes. *Archives of Toxicology*. 64, 2: 157-160.
- Bradley, P.M., Landmeyer, J.E., and Chapelle, F.H., 1999. Aerobic mineralization of MTBE and ter-butyl alcohol by stream-bed sediment microorganisms. *Environmental Science & Technology*. 33:1877-1879.
- Bradley, P.M., Chapelle, F.H., and Landmeyer, J.E., 2001a. Effect of redox conditions on MTBE biodegradation in surface water sediments. *Environmental Science & Technology*. 35: 4643-4647.
- Bradley, P.M., Chapelle, F.H., and Landmeyer, J.E., 2001b. Methyl t-butyl ether mineralization in surface-water sediment microcosms under denitrifying conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 1975-1978.
- Bradley, P.M., Landmeyer, J.E., and Chapelle, F.H., 2002. TBA biodegradation in surfacewater sediments under aerobic and anaerobic conditions. *Environmental Science & Technology*. 6: 4087-4090.
- Brar, S.K., Verma, M.R., Surampalli, Y., Misra, K., Tyagi, R.D., and Meunier, J.F., 2006. Blais, Bioremediation of hazardous wastes - a review. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*. 10: 59-72.
- Bioresearch Laboratories, 1990. Disposition of radioactivity and metabolism of MTBE in male and female Fischer-344 rats after nose-only inhalation to 14-C MTBE. 38845, Senneville, Quebec, Canada.
- Bird, M.G., Burleigh-Flayer, H.D., Chun, J.S., Douglas, J.F., Kneiss, J.J., and Andrews, L.S., 1997. Oncogenicity studies of inhaled Methyl t-butyl ether (MTBE) in CD-1 mice and F-344 rats. *Journal of Applied Toxicology*. 17: S45-S55.
- Campbell, B.J., Smith, J.L., Hanson, T.E., Klotz, M.G., Stein, L.Y., Lee, C.K., Wu, D., Robinson, J.M., Khouri, H.M., Eisen, J.A., and Cary, S.C., 2009. Adaptations to submarine hydrothermal environments exemplified by the genome of *Nautilia profundicola*. *PLoS Genet*. 5, 2, e1000362.
- Cao, B., and Loh, K.C., 2009. Catabolic Pathways and Cellular Responses of *Pseudomonas putida* P8 During Growth on Benzoate With a Proteomics Approach. *Biotechnology and Bioengineering*. 101, 6: 1297-1312.
- Carlos, G., Bayona, J.M., and Readman, J.W., 2004. Sources, distribution and

- behaviour of Methyl t-butyl ether (MTBE) in the Tamar Estuary, UK. *Chemosphere*. 57: 429-437.
- Caro, J., and Gallego, M., 2009. Environmental and biological monitoring of volatile organic compounds in the workplace. *Chemosphere*. 77: 426-433.
- Chen, K.F., Kao, C.M., Hsieh, C.Y., Chen, S.C., and Chen, Y.L., 2005a. Natural biodegradation of MTBE under different environmental conditions: microcosm and microbial identification studies. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 74, 2: 356-364.
- Chen, K.F., Kao, C.M., Wang, J.Y., and Chien, C.C., 2005b. Natural attenuation of MTBE at two petroleum-hydrocarbon spill sites. *Journal of Hazardous Materials*. 125, 1-3: 10-16.
- Chen, C.S., Hseu, Y.U., Liang, S.H., Kuo, J.Y., and Chen, S.C., 2008. Assessment of genotoxicity of methyl-*tert*-butyl ether, benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene to human lymphocytes using comet assay. *Journal of Hazardous Materials*. 153: 351-356.
- Chen, C.S., Lai, Y.W., and Tien, C.J., 2008. Partitioning of aromatic and oxygenated constituents into water from regular and ethanol-blended gasolines. *Environmental Pollution*. 156, 3: 988-996.
- Chen, J., Chen, D., Zhong, W., Zhang, J., and Chen, X., 2007. Biodegradation of methyl *tert*-butyl ether by *Methylibium etroleiphilum* PM1 in poor nutrition solution. *Journal of Environmental Science and Health Part A*. 42: 2123-2129.
- Chen, D., Chen, J., Zhong, W., and Cheng, Z., 2008. Degradation of methyl *tert*-butyl ether by gel immobilized *Methylibium petroleiphilum* PM1. *Bioresource Technology*. 99: 4702-4708.
- Chisala, B.N., Tait, N.G., and Lerner, D.N., 2007. Evaluating the risks of Methyl tertiary butyl ether (MTBE) pollution of urban groundwater. *Journal of Contaminant Hydrology*. 91: 128-145.
- Cho, E.A., and Bailer, A.J., 2003. Effect of methyl *tert*-butyl ether on the bioconcentration and photoinduced toxicity of fluoranthene in fathead minnow larvae (*Pimephales promelas*). *Environmental Science & Technology*. 37, 7: 1306-1310.
- Cho, J.H., and Zein, M.M., 2007. Biodegradability of alkylates as a sole carbon source in the presence of ethanol or BTEX. *Chemosphere*. 68, 2: 266-273.

- Church, C.D., Isabelle, L.M., Pankow, J.F., Rose, D.L., and Tratnyek, P.D., 1997. Method for determination of Methyl tertiary butyl ether and its degradation products in water. *Environmental Science & Technology*. 31, 12: 3723-3726.
- Cooper, W.J., Mezyk, S.P., O'Shea, K.E., Kim, D.K., and Hardison, D.R., 2003. Kinetic modeling of the destruction of Methyl tertiary butyl ether (MTBE). *Radiation Physics and Chemistry*. 67: 523-526.
- Davidson, J.M., 1995. Fate and transport of MTBE - The latest data. In: Proceedings of the Petroleum Hydrocarbons and Organic Chemicals in Ground Water: Prevention, Detection, and Remediation Conference. 285-301.
- Davidson J.M., and Creek D.N., 2000. Using the gasoline additive MTBE in forensic environmental investigations. *Environmental Forensics*. 1: 31-36.
- Deeb, R.A., Scow, K.M., and Alvarez-Cohen, L., 2000a. Aerobic MTBE biodegradation: An examination of past studies, current challenges and future research directions. *Biodegradation*. 11: 171-186.
- Deeb, R.A., Nishino, S., Spain, J., Hu, H.-Y., Scow, K., and Alvarez-Cohen, L., 2000b. MTBE and benzene biodegradation by a bacterial isolate via two independent monooxygenase-initiated pathways. *Preprints of Extended Abstracts*. 40: 280-282.
- Deeb, R.A., and Alvarez-C., L., 2000c. Aerobic Biotransformation of gasoline aromatics in multicomponent mixtures. *Bioremediation Journal*. 4, 2: 171-179.
- Deeb, R.A., Hu, H.Y., Hanson, J.R., Scow, K.M., and Alvarez-Cohen, L., 2001. Substrate interactions in BTEX and MTBE mixtures by an MTBE-degrading isolate. *Environmental Science & Technology*. 35: 312-317.
- Deeb, R.A., Chu, K.H., Shih, T., Linder, S., Suffet, I., Kavanaugh, M.C., and Alvarez-Cohen, L., 2003. MTBE and other oxygenates: environmental sources, analysis, occurrence, and treatment. *Journal of Environmental Engineering and Science*. 20: 433-447.
- DeJonga, J.T., Mortensenb, B.M., Martinezb, B.C., and Nelsonc, D.C., 2010. Bio-mediated soil improvement. *Ecological Engineering*. 36: 197-210.
- Dupasquier, D., Revah, S., and Dauria, R., 2002. Biofiltration of methyl *tert*-butyl ether vapors by cometabolism with pentane: modeling and experimental approach. *Environmental Science & Technology*. 36: 247-253.
- Eixarch, H., and Constant', M., 2010. Biodegradation of MTBE by *Achromobacter*

- xylooxidans* MCM1/1 induces synthesis of proteins that may be related to cell survival. *Process Biochemistry*. 45: 794-798.
- Erdem-Senatarar, A.E., Bergendahl, J.A., 2004. Observations on solid phase micro-extraction for MTBE analysis. *Chemosphere*. 57, 6: 523-527.
- Eweis, J., Chang, D.P., Schroeder, E.D., Scow, K.M., Morton, R.L., and Caballero, R.C., 1997. Meeting the challenge of MTBE biodegradation. In: Proceedings of the 90th Annual Meeting and Exhibition of the Air and Waste Management Association, 8-13, Canada.
- Eweis, J.B., Schroeder, E.D., Chang, D.P.Y., and Scow, K.M., 1998. Biodegradation of MTBE in a pilot-scale biofilter. In Wickramanayake G.B. & Hinchee R.E.(ed.), Natural attenuation: Chlorinated and recalcitrant compounds. Battelle Press, Columbus, Ohio.
- Eweis, J., Labolle, E., Benson, D., and Fogg, G., 2007. Role of volatilization in changing TBA and MTBE concentrations at MTBE-contaminated sites. *Environmental Science & Technology*. 41: 6822-6827.
- Ezeji, T.C., Qureshi, N., and Blaschek, H.P., 2007. Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. *Current Opinion in Biotechnology*. 18: 220-227.
- Ferguson, S.H., Woinarski, A.Z., Snape, I., Morris, C.E., and Revill, A.T., 2004. A field of in situ chemical oxidation to remediate long-term diesel contaminated antarctic soil. *Cold Regions Science and Technology*. 40: 47-60.
- Feris, K., Macky, D., Desieyes, N., Chkraborty, I., Einarson, M., Hristova, K., and Scow, K., 2008. Effect of ethanol on microbial community structure and function during natural attenuation of benzene, toluene, and *o*-xylene in a sulfate-reducing aquifer. *Environmental Science & Technology*. 42: 2289-2294.
- Ferreira, N.L., Malandain, C., and Fayolle-G., F., 2006. Enzymes and genes involved in the aerobic biodegradation of Methyl tert-butyl ether (MTBE). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 72: 252-262.
- Finley, S.D., Broadbelt, L.J., and Hatzimanikatis, V., 2010. In silico feasibility of novel biodegradation pathways for 1, 2,4-trichlorobenzene. *BMC Systems Biology*. 4, 7.
- Finneran, K., and Lovley, D., 2001. Anaerobic degradation of Methyl tert-butyl ether (MTBE) and tert-butyl alcohol (TBA). *Environmental Science & Technology*. 35:

1785-1790.

- Fiorenza, S., and Rifai, H.S., 2003. Review of MTBE Biodegradation and Bioremediation. *Bioremediation Journal*. 7, 1: 1-35.
- Fischer, A., Müller, M., and Klasmeier, J., 2004. Determination of Henry's law constant for Methyl tert-butyl ether (MTBE) at groundwater temperatures. *Chemosphere*. 54, 6: 689-694.
- Fischer, A., Oehm, C., Selle, M., and Werner, P., 2005. Biotic and abiotic transformations of Methyl tert-butyl ether (MTBE). *Environmental Science and Pollution Research International*. 12: 381-386.
- Fortin, N.Y., Morales, M., Nakagawa, Y., Focht, D.D., and Deshusses, M.A., 2001. Methyl tert-butyl ether (MTBE) degradation by a microbial consortium. *Environmental Microbiology*, 3, 6: 407-416.
- François, A., Mathis, H., Godefroy, D., Piveteau, P., Fayolle, F., and Monot, F., 2002. Biodegradation of Methyl tert-butyl ether and other fuel oxygenates by a new strain, *Mycobacterium austroafricanum* IFP 2012. *Applied and Environmental Microbiology*. 68, 6: 2754-2762.
- Franklin, P.M., Koshland, C.P., Lucas, D., and Sawyer, R.F., 2001. Evaluation of combustion by-products of MTBE as a component of reformulated gasoline. *Chemosphere*. 42: 861-872.
- Funahashi, A., Matsuoka, Y., Jouraku, A., Morohashi, M., Kikuchi, N., and Kitano, H., 2008. CellDesigner 3.5: A versatile modeling tool for biochemical networks. *Proceedings of the IEEE*. 96, 8: 1254 -1265.
- Garnier, P. M., Auria, R., Augur, C., and Revah, S., 1999. Cometabolic biodegradation of methyl t-butyl ether by *Pseudomonas aeruginosa* grown on pentane. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51: 498-503.
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., and Weiss, W., 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradient. *Electrophoresis* 21, 6: 1037-1053.
- Grosjean, E., Grosjean, D., Gunawardena, R., and Rasmussen, R.A., 1998. Ambient concentrations of ethanol and Methyl tert-butyl ether in Prorto Alegre, Brazil. *Environmental Science & Technology*. 32: 736-742.
- Hanson, J.R., Ackerman, C.E., and Scow, K.M., 1999. Biodegradation of Methyl tert-butyl ether by a bacterial pure culture. *Applied and Environmental*

- Microbiology*. 65: 4788-4792.
- Hardison, L.K., Curry, S.S., Ciuffetti, L.M., and Hyman, M.R., 1997. Metabolism of diethyl ether and cometabolism of methyl tert-butyl ether by a filamentous fungus, a *Graphium* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 3059-3067.
- Harry, R. Beller, H.R., Kane, S.R., and Legler, T.C., 2001. Effect of Ethanol on Hydrocarbondegrading Bacteria in the Saturated Zone: Microbial Ecology Studies. UCRL-AR-145380, 4.
- Hartig, C., Loffhagen, N., and Harms, H., 2005. Formation of trans fatty acids is not involved in growth-linked membrane adaptation of *Pseudomonas putida*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 4: 1915-1922.
- Hatzinger, P.B, McClay, K., Vainberg, S., Tugusheva, M., Condee, C.W., and Steffan, R.J., 2001. Biodegradation of Methyl tert-butyl ether by a pure bacterial culture. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 5601-5607.
- Hediger, M.A., Romero, M.F., Peng, J.B., Rolfs, A., Takanaga, H., and Bruford, E.A., 2004. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*. 447: 465-468.
- Hickman, G.T., and Novak, J.T., 1989. Relationship between subsurface biodegradation rates and microbial density. *Environmental Science & Technology*. 23, 5: 525-532.
- Hong, S., Zhang, H., Duttweiler, C.M., and Lemley, A.T., 2007. Degradation of Methyl tert-butyl ether (MTBE) by anodic Fenton treatment. *Journal of Hazardous Materials*. 144: 29-40.
- Hristova, K., Gebreyesus, B., Mackay, D., and Scow, K.M., 2003. Naturally occurring bacteria similar to the Methyl tert-butyl ether (MTBE) -degrading strain PM1 are present in MTBE-contaminated groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 5: 2616-2623.
- Hristova, K.R., Lutenegger, C.M., and Scow, K.M., 2001. Detection and quantification of MTBE-degrading strain PM1 by real-time TaqMan PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 5154-5160.
- Hubbard, C.E., Barker, J.F., O'Hannesin, S.F., Vandegriendt, M., and Gillham, R.W., 1994. Transport and fate of dissolved methanol, MTBE, and monoaromatic

- hydrocarbons in a shallow sand aquifer. API Publication 4601.
- Hunkeler, D., Butler, B.J., Aravena, R., and Barker, J.F., 2001. Monitoring biodegradation of Methyl tert-butyl ether (MTBE) using compound- specific carbon isotope analysis. *Environmental Science & Technology*. 35: 676-681.
- Hong, S., Duttweiler, C.M., and Lemley, A.T., 1999. Analysis of Methyl tert-butyl ether and its degradation products by direct aqueous injection onto gas chromatography with mass spectrometry or flame ionization detection systems. *Journal of Chromatography A*, 857: 205-216.
- Hyman, M., and O'Reilly, K., 1999. Physiological and enzymatic features of MTBE-degrading bacteria. In Alleman B.C. and Leeson A. (ed.), *In situ bioremediation of petroleum hydrocarbon and other organic compounds*. Battelle, Columbus, Ohio.
- Iwaki, H., and Hasegawa, Y., 2007. Degradation of 2-nitrobenzoate by *Burkholderia terrae* strain KU-15. *Biosci Biotechnol Biochem*. 71, 1: 145-151.
- Jensen, H.M., and Arvin, E., 1990. Solubility and degradability of the gasoline additive MTBE, and gasoline compounds in water. *Contaminated soil*. 90: 445-448.
- Johnson, E.L., Smith, C.A., O'Reilly, K.T., and Hyman, M.R., 2004. Induction of Methyl tert-butyl ether oxidizing activity in *Mycobacterium vaccae* JOB5 by MTBE. *Applied and Environmental Microbiology*. 4: 1023-1030.
- Kampman, B.E., Boer, L.C., and Croezen, H.J., 2005. Biofuels under development. An analysis of currently available and future biofuels, and a comparison with biomass application in other sectors. Delft, CE.
- Kang, Y.M., Prewitt, M.L., and Diehl, S.V., 2009. Proteomics for biodeterioration of wood: Challenging analysis by 2-D PAGE and MALDI-TOF/TOF/MS. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 63, 8: 1036-1044.
- Kao, C.M., and Wang, C.C., 2000. Control of BTEX migration by intrinsic bioremediation at a gasoline spill site. *Water Research*. 34: 3413-3423.
- Kao, C.M., Huang, W.Y., Chang, L.J., Chien, H.Y., and Hou, F., 2005. Application of monitored natural attenuation to remediate a petroleum- hydrocarbon spill site. *Water Science and Technology*. 53: 321-328.
- Kao, C.M., Chen, C.S., Tsa, F.Y., Yang, K.H., Chien, C.C., Liang, S.H., Yang, C.A., and Chen, S.C., 2010. Application of real-time PCR, DGGE fingerprinting, and

- culture-based method to evaluate the effectiveness of intrinsic bioremediation on the control of petroleum-hydrocarbon plume. *Journal of Hazardous Materials*.178: 409-416.
- Kawagoe, M., Hyakumura, K., Suye, S.I., Miki, K., and Naoe, K., 1997. Application of bubble column fermentors to submerged culture of *Schizophyllum commune* for production of L-malic acid. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 84, 4: 333-336.
- Kharoune, M., Kharoune, L., Lebeault, J.M., and Pauss, A., 2001. Isolation and characterization of two aerobic bacterial strains that completely degrade Ethyl tert-butyl ether (ETBE). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55, 3: 348-353.
- Klein, J.B., and Thongboonkerd, V., 2004. Overview of proteomics. *Contrib. Nephrol.* 141: 1-10.
- Kopinke, F.D., Georgi, A., and Richnow, H.H., 2005. New evaluation scheme for two-dimensional isotope analysis to decipher biodegradation processes: Application to groundwater contamination by MTBE. *Environmental Science & Technology*. 39, 21.
- Korte, N.E., Pankow, J.F., Zogorski, J.S., and Squillace, P.J., 1997. Review of the environmental behavior and fate of Methyl tert-butyl ether. *Environmental Toxicology and Chemistry*.16: 1836-1844.
- Krayl, M., Benndorf, D., Loffhagen, N., and Babel, W., 2003. Use of proteomics and physiological characteristics to elucidate ecotoxic effects of methyl tert-butyl ether in *Pseudomonas putida* KT2440 *Proteomics*. 3: 1544-1552.
- Kucerova, E., Clifton, S.W., Xia, X.Q., Long, F., Porwollik, S., Fulton, L., and Fronick, C., 2010. Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species. *PLoS One*. 8, 5, 3, e9556.
- Kuder, T., Wilson, T., Kaiser, P., Kolhatkar, R., Philp, P., and Allen, J., 2005. Enrichment of stable carbon and hydrogen isotopes during anaerobic biodegradation of MTBE: Microcosm and field evidence. *Environmental Science & Technology*. 39, 1: 213-220.
- Li, X.D., and Schwartz, F.W., 2004. DNAPL remediation with in situ chemical oxidation using potassium permanganate. II. Increasing removal efficiency by

- dissolving Mn oxide precipitates. *Journal of Contaminant Hydrology*. 68: 269-287.
- Li, H., Yan, J., Wang, Q., Karlson, U.G., Zou, G., and Yuan, Z., 2009. Biodegradation of Methyl tert-butyl ether by enriched bacterial culture. *Current Microbiology*. 59: 30-34.
- Li, D., Liu, Q., Gong, Y., Huang, Y., and Han, Y., 2009. Cytotoxicity and oxidative stress study in cultured rat Sertoli cells with Methyl tert-butyl ether (MTBE) exposure. *Reproductive Toxicology*. 27, 2: 170-176.
- Liang, S., Soo, P., Yates, R.S., Davis, M.K., Bruno, J-M., and Wolfe, R.L., 1999. Oxidation of MTBE by ozone and peroxone processes. *American Water Works Association*. 91: 104-114.
- Lin, C.W., Tsai, S.L., and Hou, S.N., 2007. Effects of environmental settings on MTBE removal for a mixed culture and its monoculture isolation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74, 1: 194-201.
- Lin, C.W., Cheng, Y.W., and Tsai, S.L., 2007. Multi-substrate biodegradation kinetics of MTBE and BTEX mixtures by *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochemistry*. 42: 1211-1217.
- Loh, K.C., and Wu, T.T., 2006. Cometabolic transformation of 2-chlorophenol and 4-chlorophenol in the presence of phenol by *Pseudomonas putida*. *Canadian Journal of Chemical Engineering*. 84, 3: 356-367.
- Mackay, D., and Shiu, E.Y., 1981. Critical review of Henry's constants for chemicals of environmental interest. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. 10, 1175-1199.
- Mackay, D., Desieyes, N., Einarson, M., Feris, K., Pappas, A., Wood, I., Jacobson, L., Justice, L., Noske, M., Scow, K., and Wilson, J., 2006. Impact of ethanol on the natural attenuation of benzene, toluene, and *o*-xylene in a normally sulfate-reducing aquifer. *Environmental Science & Technology*. 40: 6123-6130.
- Maherm, Z., Makramt, S., and Albertd, V., 2004. MtBE Biodegradation in a Gravity Flow High-Biomass Retaining Bioreactor. *Environmental Science & Technology*. 38: 3449-3456.
- Maherm, Z., Makramt, S., and Albertd, V., 2006. Bioremediation of Groundwater Contaminated with Gasoline Hydrocarbons and Oxygenates Using a Membrane-Based Reactor. *Environmental Science & Technology*. 40:

1997-2003.

- Marcia Morales, M., Vel'azquez, E., Jan, J., Revah, S., Gonz'alez, U., and Flores, E.R., 2004. Methyl *tert*-butyl ether biodegradation by microbial consortia obtained from soil samples of gasoline-polluted sites in Mexico. *Biotechnology Letter*. 26: 269-275.
- Martienssen, M., Fabritius, H., Kukla, S., Balcke, G.U., Hasselwander, E., and Schirmer, M., 2006. Determination of naturally occurring MTBE biodegradation by analysing metabolites and biodegradation by-products. *Journal of Contaminant Hydrology*. 87: 37-53.
- Mckelvie, J., Hyman, M., Christysmith, M., Aslett, D., and Barbarasherwoodlollar, G., 2009. Isotopic fractionation of Methyl *tert*-butyl ether suggests different initial reaction mechanisms during aerobic biodegradation. *Environmental Science & Technology*. 43: 2793-2799.
- McKinnon, R.J., and Dyksen, J.E., 1984. Removing organics from groundwater through aeration plus GAC. American Water Works Association. 76, 5: 42-47.
- Mezyk, S.P., Hardison, D., Song, W., O'Shea, K.E., Bartels, D.M., and Cooper, W.J., 2009. Advanced oxidation and reduction process chemistry of Methyl *tert*-butyl ether (MTBE) reaction intermediates in aqueous solution: 2-Methoxy-2-methyl-propanal, 2-methoxy-2-methyl-propanol, and 2-methoxy-2-methyl-propanoic acid. *Chemosphere*. 77: 1352-1357.
- Mo, K., Lora, O.C., Wanken, E.A., Javanmardian, M., Yang, X., and Kulpa, F.C., 1997. Biodegradation of Methyl *tert*-butyl ether by pure bacterial cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 47: 69-72.
- Mormile, M., Liu, S., and Suflita, J.M., 1994. Anaerobic biodegradation of gasoline oxygenates: extrapolation of information to multiple sites and redox conditions. *Journal of Environmental Engineering and Science*. 28: 1727-1732.
- Moussavi, G., and Mahmoudi, M., 2009. Removal of azo and anthraquinone reactive dyes from industrial wastewaters using MgO nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*. 168 , 2-3: 806-812.
- Mukherjee, K.J., Rowe, D.C., Watkins, N.A., and Summers, D.K., 2004. Studies of single-chain antibody expression in quiescent *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 5: 3005-3012.
- Nakatsu, C. H., Hristova, K., Hanada, S., Meng, X. M., Hanson, J. R., Scow, K.M.,

- and Kamagata, Y., 2006. *Methylibium petroleiphilum* gen. nov., sp. nov., a novel Methyl tert-butyl ether -degrading methylotroph of the Betaproteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 983-989.
- Nava, V.N., Morales, M., and Revah, S., 2007. Cometabolism of Methyl tert-butyl ether (MTBE) with alkanes. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. DOI 10.1007/s11157-006-9119-7.
- Niven, R.K., 2005. Ethanol in gasoline: environmental impacts and sustainability review article. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 9: 535-555
- Nyer, E.K., 1985. *Groundwater Treatment Technology*, Van Nostrand Reinhold, New York.
- Ohta, N., Park, Y.S., Yahiro, K., and Okabe, M., 1995. Comparison of neomycin production from *Streptomyces fradiae* cultivation using soybean oil as the sole carbon source in an air-lift bioreactor and a stirred-tank reactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 79, 5: 443-448.
- Okeke, B.C., and Frankenberger, W.T., 2003. Biodegradation of Methyl tert-butyl ether (MTBE) by a bacterial enrichment consortia and its monoculture isolates. *Microbiological research*. 158: 99-106.
- Österreicher-Cunha, P., Vargas, E.D.A., Guimarães, J.R.D., Lago, G.P., Antunes, F.D.S., and Silva, M.I.P.D., 2009. Effect of ethanol on the biodegradation of gasoline in an unsaturated tropical soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 63, 2: 208-216.
- Pauss, K.H., and Lebeault, j. M., 2001. Aerobic biodegradation of an oxygenates mixture: etbe, mtbe and tame in an up flow Fixed-bed reactor. *Water Research*. 35: 1665-1674.
- Pedro, J.J., Alvarez, P.J.J., Graciela, M.L., Fernandez-Sanchez, J.M., Kim, D., Beller, H.R., and Kane, S.R., 2001. Effect of Ethanol and MtBE on BTEX Biodegradation in the Saturated Zone: Kinetic Studies. UCRL-AR-145380, 3.
- Petty, N.K., Bulgin, R., Crepin, V.F., Schroeder, G.N., Quail, M.A., Lennard, N., and Corton, C., 2010. The *Citrobacter rodentium* genome sequence reveals convergent evolution with human pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 192, 2: 525-38.
- Reuter, J.E., Allen, B.C., Richards, R.C., Pankow, J.F., Goldman, C.R., Scholl, R.L.,

- and Seyfried, J.S., 1998. Concentrations, sources, and fate of the gasoline oxygenate Methyl tert-butyl ether in a multiple use lake. *Environmental Science & Technology*. 32: 3666-3672.
- Piel, W.J., and Thomas, R.X., 1990. Oxygenates for reformulated gasoline. *Hydrocarbon Processing*. 69: 68-73.
- Piveteau, P., Fayolle, F., Penru, Y. L., and Monot, F., 2000. Biodegradation of MTBE by cometabolism in laboratory-scale fermentations. In: *Bioremediation and Pytoremediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds*, Battelle press, Columbus, Ohio, 141-148.
- Rittmann, B.E., and McCarty, P.L., 2000. *Environmental biotechnology: principles and applications*. New York.
- Plotkin, J.S., 2009. MTBE/ETBE Update: Technical and Commercial Effects of U.S. MTBE Phaseout. PERP06/07S12. Chem Systems Process Evaluation/Research Planning (PERP)
- Roukas, T., and Kyriakides, M.L., 1999. Production of pullulan from beet molasses by *Aureobasidium pullulans* in a stirred tank fermentor. *Journal of Food Engineering*. 40: 89-94.
- Roy, j. I., Mark, V.M., Lynette, S., Marion, D.S., and Wendy, B., 1997. Mtbe entry. *Environmental contaminants encyclopedia*.
- Prince, R.C., 2000. Biodegradation of Methyl tert-butyl ether (MTBE) and other feul oxygenates. *Crit. Microbiol.*, 26, 163-178.
- Pruden, A., Suidan, M.T., Venosa, A. D., and Wilson, J.D., 2001. Biodegradation of Methyl tert-Butyl Ether under Various Substrate Conditions. *Environmental Science & Technology*. 35, 21: 4235-4241.
- Pruden, A., Sedran, M.A., Suidan, M.T., and Venosa, A.D., 2005. Anaerobic biodegradation of Methyl tert-butyl ether under iron-reducing conditions in batch and continuous-flow cultures, *Water Environmental Research*. 77: 297-303.
- Purswani, J., Pozo, C., Az, M.R.G., and Pez, J.S.L., 2008. Selection and identification of bacterial strains with Methyl tert-butyl ether, ethyl tert-butyl ether and tert-amyl methyl ether degrading capacities. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 11: 2296-2303.
- Ryand, W., Douglasm, M., and Katen, S., 2002. In situ MTBE biodegradation supported by diffusive oxygen release. *Environmental Science & Technology*. 36:

190-199.

- Salanitro, J.P., Diaz, L.A., Williams, M.P., and Wisniewski, H.L., 1994. Isolation of a bacterial culture that degrades Methyl tert-butyl ether. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 2593-2596.
- Salanitro, J.P., and Wisniewski, H.L., 1996. Observations on the biodegradation and bioremediation potential of Methyl tert-butyl ether. In: Proceedings of the 17th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry.
- Salanitro, J.P., Johnson, P.C., Spinnler, G.E., Maner, P.M., Wisniewski, H. L., and Bruce, C., 2000. Scale Demonstration of Enhanced MTBE Bioremediation through Aquifer Bioaugmentation and Oxygenation. *Environmental Science & Technology*. 34, 19: 4152-4162.
- Schirmer, M., Butler, B.J., Church, C.D., Barker, J.B., and Nadarajah. N., 2003. Laboratory evidence of MTBE biodegradation in Borden aquifer material. *Journal of Contaminant Hydrology*. 60: 229-249.
- Schmidt, S.K., Simkins, S., and Alexander, M., 1985. Models for the Kinetics of Biodegradation of Organic Compounds Not Supporting Growth. *Applied and Environmental Microbiology*. 50, 2: 323-331.
- Schmidt, T.C., 2003. Analysis of methyl tert-butyl ether (MTBE) and tert-butyl alcohol (TBA) in ground and surface water. *Trends in Analytical Chem.* 22, 10: 776-780.
- Schmidt, T.C., Schirmer, M., Weiß, H., and Haderlein, S.B., 2004. Microbial degradation of methyl tert-butyl ether and tert-butyl alcohol in the subsurface. *Journal of Contaminant Hydrology*. 70: 173-203.
- Schmidt, R., Battaglia, V., Scow, K., Kane, S., and Hristova1, K.R., 2008. Involvement of a novel enzyme, MdpA, in methyl tert-butyl ether degradation in *Methylibium petroleiphilum* PM1. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 6631-6638.
- Segura, A., Duque, E., Mosqueda, G., Ramos, J.L., and Junker, F., 1999. Multiple responses of gram-negative bacteria to organic solvents. *Environmental Microbiology*. 1. 3: 191-198.
- Seigrist, R.L., Urynowicz, M.A., West, O.R., Crimi, M.L., and Lowe, K.S., 2001. Principle and during in-situ air sparging. *Journal of Hazardous Materials*. 57, 1-3: 209-230.

- Shaffer, K.L., Uchirin, C., and Bull, G., 1997. Uptake of methyl tert-butyl ether (MTBE) by groundwater solids. *Environ. Contam. Toxicol.* 59: 744-749.
- Shah, N.W., Thornton, S.F., Bottrell, S.H., and Spence, M.J., 2009. Biodegradation potential of MTBE in a fractured chalk aquifer under aerobic conditions in long-term uncontaminated and contaminated aquifer microcosms. *Journal of Contaminant Hydrology.* 103: 119-133.
- Shim, E.H., Kim, J., Cho, K.S., and Ryu, H.W., 2006. Biofiltration and inhibitory interactions of gaseous benzene, toluene, xylene, and methyl tert-butyl ether. *Environmental Science & Technology.* 40, 9:3089-3094.
- Simkins, S., and Alexander, M., 1984. Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. *Applied and Environmental Microbiology.* 47, 6: 1299-1306.
- Smith, C.A., O'Reilly, K.T., and Hyman, M.R., 2003. Characterization of the initial reactions during the cometabolic degradation of methyl tert-butyl ether (MTBE) by propane-grown *Mycobacterium vaccae* JOB5. *Applied and Environmental Microbiology.* 69: 796-804.
- Soga, K., Page, J.W.E., and Illangasekare, T.H., 2004. A review of NAPL source zone remediation efficiency and the mass flux approach. *Journal of Hazardous Materials.* 110: 13-27.
- Somsamak, P., Richnow, H., and Ha-ggblom, M., 2005. Anaerobic biotransformation of methyl tert-butyl ether and *tert*-amyl methyl ether. *Environmental Science & Technology.* 39: 103-109.
- Squillace, P.J., Pope, D.A., and Price C.V., 1995. Occurrence of the gasoline additive MTBE in shallow groundwater in urban and agricultural areas. USGS Fact Sheet FS-114-95.
- Squillace, P.J., Zogorski, J.S., Wilber, W.G., and Prince, R.C., 1996. Preliminary assessment of the occurrence and possible sources of MTBE in ground water in the United States. *Environmental Science & Technology.* 30: 1721-1730.
- Squillace, P.J., Pankow, J.F., Korte, N.E., and Zogorski, J.S., 1997. Review of the environmental behavior and fate of methyl tert-butyl ether. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 16, 1836-1844.
- Squillace, P.J., Pankow, J.F., Korte, N.E., and Zogorski, J.S., 1998. Environmental behavior and fate of methyl tertiary-butyl ether. *Water online newsletter by Ian*

Lisk 2(2).

- Steffan, R.J., McClay, K., Vainberg, S., Condee, C.W., and Zhang, D., 1997. Biodegradation of the gasoline oxygenates methyl tert-butyl ether, ethyl tert-butyl ether, and tert-amyl methyl ether by propane-oxidizing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 11: 4216-4222.
- Stefan, M.I., Mack, J. and Bolton, J.R., 2000. Degradation pathways during the treatment of Methyl tert-butyl ether by the UV/H₂O₂ process. *Environmental Science & Technology*. 34: 650-658.
- Stocking, A.J., Deeb, R.A., Flores, A.E., Stringfellow, W., Talley, J., Brownell, R., and Kavanaugh, M.C., 2000. Bioremediation of MTBE: a review from a practical perspective. *Biodegradation*. 11, 2: 187-201.
- Suflita, J.M., and Mormile, M.R., 1993. Anaerobic biodegradation of known and potential gasoline oxygenates in the terrestrial subsurface. *Environmental Science & Technology*. 6: 976-978.
- Tay, S.T., Zhuang, W.Q., and Tay, J.H., 2005. Start-up, microbial community analysis and formation of aerobic granules in a tert-butyl alcohol degrading sequencing batch reactor. *Environmental Science & Technology*. 39, 15: 5774-5780.
- Tomii, K., and Kanehisa, M., 1998. A comparative analysis of ABC transporters in complete microbial genomes. *Genome Research*. 8, 10: 1048-1059.
- US Environmental Protection Agency, 1995. How to evaluate alternative cleanup technologies for underground storage tank site. EPA510-B-95-007 (http://www.epa.gov/swerust1/pubs/tum_cvr.pdf)
- US Environmental Protection Agency, 1997a. Drinking Water Advisory: Consumer Acceptability Advice and Health Effects Analysis on Methyl Tertiary-Butyl Ether (MTBE) No. 822-F-97-008; Office of Water, U.S. Environmental Protection Agency: Washington, DC.
- US Environmental Protection Agency, 1997b. Analysis of Selected Enhancements for Soil Vapor Extraction. EPA-542-R-97-007.
- US Environmental Protection Agency, 1998. MTBE fact sheet#1, overview. EPA 510-F97-014. (<http://www.epa.gov/OUST/mtbe/mtbef1.pdf>)
- US Environmental Protection Agency, 1998. MTBE fact sheet#2, Remediation of MTBE contaminated soil and groundwater. EPA 510-F97-015.

- (<http://www.epa.gov/OUST/mtbe/mtbef2.pdf>)
- US Environmental Protection Agency, 2001. Risk Assessment of Tert-butyl methyl ether. EINECS-No. 216-653-1. US Government Printing Office: Washington, DC.
- US Environmental Protection Agency, 2004. Monitored natural attenuation. In: How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers. EPA 510-R-04-002, US Government Printing Office: Washington, DC.
- US Environmental Protection Agency, 2006. Frequently asked question (FAQs) about MTBE and USTs. (<http://www.epa.gov/oust/mtbe/mtbefaqs.htm>)
- US Environmental Protection Agency, 2007. Underground Storage Tank Program Directory, Office of Solid Waste and Emergency Response, EPA510-B-07-001, Washington, DC.
- Vieira, P.A., Vieira, R.B., Faria, S., Ribeiro, E.J., and Cardoso, V.L., 2009. Biodegradation of diesel oil and gasoline contaminated effluent employing intermittent aeration. *Journal of Hazardous Materials*. 168: 1366-1372.
- Volpe, A., Moro, G.D., Rossetti, S., Tandoi, V., and Lopez, A., 2009. Enhanced bioremediation of methyl tert-butyl ether (MTBE) by microbial consortia obtained from contaminated aquifer material. *Chemosphere*. 75: 149-155.
- Wang, S.J., and Loh, K.C., 2000. New cell growth pattern on mixed substrates and substrate utilization in cometabolic transformation of 4-chlorophenol. *Water Research*. 34, 15: 3786-3794.
- Wang, S.J., Loh, K.C., and Chua, S.S., 2003. Prediction of critical cell growth behavior of *Pseudomonas putida* to maximize the cometabolism of 4-chlorophenol with phenol and sodium glutamate as carbon sources. *Enzyme and Microbial Technology*. 32, 3-4: 422-430.
- Waul, C., Arvin, E., and Schmidt, E.J., 2009. Long term studies on the anaerobic biodegradability of MTBE and other gasoline ethers. *Journal of Hazardous Materials*. 163: 427-432.
- Weaver, J., and Exum, L., 2007. Impacts of regulation on U.S. gasoline composition. 19th National tank conference.
- Westermeier, R. 1993. Electrophoresis in Practic, 1th ed. VCH
- Whiteley, C.G., and Lee, D.J., 2006. Enzyme technology and biological remediation.

- Enzyme and Microbial Technology*. 38: 291-316.
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Gooley, A.A., Appel, R.D., Humphery-Smith, I., Hochstrasser, D.F., and Williams, K.L., 1996. Progress with proteomic project: Why all proteins expressed by genome should be identified and how to do identified and how to do it. *Biotechnology & genetic engineering reviews*. 13: 19-50.
- Wilson, J.T., Cho, J.S., Wilson, B.H., and Vardy, J.A., 2000. Natural attenuation of MTBE in the subsurface under methanogenic conditions, U.S. EPA, National Risk Management Laboratory, Cincinnati.
- Wilson, G. J., Pruden, A., Suidan, M. T., and Venosa, A. D., 2002. Biodegradation kinetics of MTBE in laboratory batch and continuous flow reactors. *Journal of Environmental Engineering*. 128, 9: 824-829.
- Wilson, J. T., Kolhatkar, R., Kuder, T., Philp, P., and Daugherty, S., 2005. Stable isotope analysis of MTBE to evaluate the source of TBA in ground water. *Ground Water Monitoring & Remediation*. 25: 108-116.
- Yang, C.C., Wu, L.C., and Wu, C.S., 2002. Field performance of a treatment train for removing petroleum volatile organic compounds from a spill site in the petroleum refinery. 17th Conference on Waste Management Technology, Taipei.
- Yeh, C.H., Lin, C.W., and Wu, C.H., 2010. A permeable reactive barrier for the bioremediation of BTEX-contaminated groundwater: Microbial community distribution and removal efficiencies. *Journal of Hazardous Materials*. 178: 74-80.
- Yu, X.Z., and Gu, J.D., 2007. Differences in Michaelis-Menten kinetics for different cultivars of maize during cyanide removal. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 67, 2: 254-259.
- Zanardini, E. Pisoni, C., Ranalli, G., Zucchi, M., and Sorlini, C., 2002. Methyl tert-butyl ether (MTBE) bioremediation studies. *Annals of Microbiology*. 52: 207-221.
- Zein, M., Suidan, M., and Venosa, A., 2006. Bioremediation of groundwater contaminated with gasoline hydrocarbons and oxygenates using a membrane-based reactor. *Environmental Science & Technology*. 40: 1997-2003.
- Zein, M.M., Suidan, M.T., and Venosa, A.D., 2004. MtBE biodegradation in a gravity flow high-biomass retaining bioreactor. *Environmental Science & Technology*.

38, 12: 3449-3456.

Zhang, R.L., Huang, G.Q., Lian, J.Y., and Li, X.G., 2007. Degradation of MTBE and TBA by a new isolate from MTBE-contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences*. 19: 1120-1124.

統一編號
EPA03410001
9

本報告僅係受託單位或個人之意見

僅供環保署施政之參考

本報告之著作財產權署環保署所有

非經環保署同意

任何人均不得重製、仿製或為其他之侵害

中華民國 100 年 12 月