

菲降解菌之分離及土壤生物復育之應用

劉瑞美^{1*} 陳世雄¹ 張瓊方¹ 賴姵慈² 陳澄安¹ 鄭蕙玲³
黃政賢¹ 洪睦雅¹ 賴振立¹

¹ 嘉南藥理科技大學環境工程與科學系(所)

² 嘉南藥理科技大學醫藥化學系

³ 嘉南藥理科技大學環境資源管理系

摘 要

本研究比較不同加油站排水溝汙泥所馴化篩選出之菲降解菌株 E12、E4、N2、M1、L2、L3，進行革蘭氏染色皆為革蘭氏陽性菌，並利用 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)PAHs 16S rDNA 引子進行 (Polymerase Chain Reaction)PCR 反應，進行菌種之親緣關係鑑定。篩選出來之菌株可分為三大群。此外，針對菲降解菌的降解能力及添加界面活性劑對於菌株降解活性之影響進行探討，結果顯示，E12、M1、L3 菌株對菲之降解效果較為顯著，培養過程中添加 Tween80 界面活性劑可提升對降解菌的生長，且較添加 Triton X-100 佳。從各分離源所篩選出之降解菌株 E4、E12、N2、M1、L2、L3 均具有菲降解能力，其中 L3 之降解效果最好。選出三株降解效率較好之菌株進行土壤模擬試驗，研究發現 L3 試驗菌株於粘板岩沖積土(粘壤土)中有較好的降解效果。模擬菲污染土壤復育中，接種 E12 菌株於砂頁岩沖積土降解速率較快，M1 菌株於紅壤中降解速率較快，L3 菌株於粘板岩沖積土中降解速率較快，顯示不同種類之土壤，因具有不同之土壤特性，各菌株之生長與降解狀態亦有所差異。

關鍵字：菲、生物降解、土壤、生物復育

*通訊作者:嘉南藥理科技大學環境工程與科學系(所)。

Tel: +886-6-2660035

E-mail: mrmliou@mail.chna.edu.tw

壹、前言

PAHs來源是由碳化合物高溫不完全燃燒、或石化燃料使用過程所產生，石油中含有萘、菲、蒽等多環芳香族碳氫化合物⁽¹⁾(polycyclic aromatic hydrocarbons；PAHs)，因其具有高脂溶性、不易被分解、微揮發等特性，能進入生物體，且具有生物累積性⁽²⁾。其中菲具三個苯環，與蒽為同分異構物，是環境中常見的污染物質，而PAHs污染之處理方式，可簡分成化學處理及生物處理⁽³⁾，其中化學處理法常需大量投入藥劑及耗費能源以順利進

行復育技術，且可能需承擔後續衍生出的二次環境污染物處理之問題；生物分解則是從環境中移除PAHs的主要機制，PAHs之生物分解常應用細菌或真菌直接攝取PAHs作為碳源，故生物復育(bioremediation)被認為是最節省成本與最符合環保之方法，且可實際應用於現地整治。

由於PAHs難溶於水中，故部分研究會選擇額外添加界面活性劑來幫助微生物與PAHs接觸而加強其生物分解。界面活性劑可降低溶水與不溶

水之有機添加物的不親和性，能使微生物均勻懸浮分散且呈安定之性質。常應用於PAHs生物降解之界面活性劑有 Brij、Triton、Tween 等系列⁽⁴⁻⁸⁾。

本研究利用菲作為馴養培養基中的唯一碳源，自加油站附近的排水溝汙泥馴化篩選出能耐100 mgL⁻¹菲之降解菌，探討菌株相關之生理特性、菌種親緣關係、降解能力及其活性、外加界面活性劑對菌株降解能力之影響等，進而接種高效能之降解菌株進行模擬汙染土壤降解實驗，藉此可以探討不同來源之菲降解菌分離株之親緣關係，期望未來能運用在現地生物復育之整治處理參考中。

貳、材料與方法

一、菲降解菌分離源

以園藝用採樣鏟採集本校附近老舊加油站的溝渠表層底泥，包括：高雄市湖內（M）、台南市一心（E）、台南市新力（N）、仁德（L）等加油站之汙泥，各採樣點之汙泥之代碼與座標詳如表 1 所示。樣品收集後，置於4℃冷藏，以備後續降解菌種馴養與分離之用。

表1. 汙泥採集點之代碼與座標

採樣點與代碼	座標
湖內加油站(M)	N22°90'61.57"
	E120°20'77.99"
台南一心加油站(E)	N22°59'49.46"
	E120°13'58.82"
台南新力加油站(N)	N22°92'23.92"
	E120°22'37.19"
仁德加油站(L)	N22°58'29.36"
	E120°14'38.14"

二、菌種之培養與分離

加入約1g 汙泥植入含唯一碳源100 mgL⁻¹菲之BHB(Bushnell Hass Broth) 無機鹽培養基(示如表2)中，於培養箱恆溫震盪培養(30℃、150rpm)，利用連續稀釋塗抹於含100 mgL⁻¹菲之平板培養基，挑選單一菌落，將菌種保存於NB (nutrient broth) 斜面試管，待菌長出後置於4℃下保存，以做為進行後續研究之菌種保存。

表2. 無機鹽培養基成分

Component	Conc. (g L ⁻¹)
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.4
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.026
KH ₂ PO ₄	1
K ₂ HPO ₄	1
NH ₄ NO ₃	1
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.08

三、生理生化鑑定

1. 革蘭氏染色 (Gram stain)

將分離菌株以 NB 培養基並置於恆溫震盪培養1天，接著進行革蘭氏染色，並於以1000倍油鏡(Oil immersion lens)及目鏡測微器進行鏡檢，觀察染色結果、菌體型態以及大小染色結果依據其不同的細胞壁組成及結構而有不同的反應，其中革蘭氏陽性菌由於不會被酒精脫色所以呈現最初的染料顏色也就是藍紫色，而革蘭氏陰性菌由於會被酒精脫色所以呈現最後的染料顏色也就是紅色⁽¹⁰⁾。

2. 氧化酶試驗 (Oxidase test)

將菌株接種在固體無機鹽培養基上，放置於25℃恆溫培養箱中培養，加入1% tetramethyl-*p*-phenylenediamine hydrochloride solution 2 mL至培養平板上。具有氧化酶之菌落，在1分鐘內呈粉紅色逐漸變為紫紅色為氧化酶試驗陽性，否則為陰性⁽¹⁰⁾。

3. 催化酶試驗 (Catalase test)

催化酶試驗培養條件與氧化酶試驗相同，加入3% H₂O₂至菌體上，此試驗如果細胞含catalase，則可分解過氧化氫為水與氧氣，產生氣泡，則表示有催化酶酵素⁽¹¹⁾。

四、純菌 DNA 萃取與 PCR

收集培養於28℃、150rpm下，OD₆₀₀達到1之菌液，離心收集細胞。使用快速萃取 Genomic DNA Mini Kit (Blood /Cultured Cell) (Geneaid 公司) 萃取DNA。

參考 Zhang 等人所設計之引子對對菲降解菌之16S rDNA保守區域加以設計之引子(primer)，包含：27f與1492r，約可選取出約1465bp的PCR片段產物⁽¹²⁾。

五、DNA 定序與親緣樹狀圖

將PCR產物送交至「國立成功大學研究總中心分子醫研究中心核酸自動定序中心」利用核酸自

動序列定序儀代為定序，待取得利用定序之結果，使用 DNA Star 之 SeqMan 軟體做檢查及連接序列，將連接好之 DNA 序列至 NCBI(National Center for Biotechnology Information)網頁上，利用 Nucleotide Blast 查詢並與已發表序列進行比對。

利用 BioEdit 之 Cluster W Multiple alignment 軟體整理序列，經 MEGA 4 軟體計算兩兩序列間之遺傳距離。再以 *p-distance* 模式計算鹼基替代率及遺傳距離，並利用聚類分析法(Neighbor-joining; NJ)而得各菌株間之親緣樹狀圖。

六、界面活性劑添加對菌株之影響

分別添加 0.2 mL Tween 80 或 Triton X-100 至 100mL 無機鹽培養基。將菌株接種於滅菌後之培養基中恆溫震盪培養(30°C, 150rpm)，並以未接種為空白對照組，利用 OD₆₀₀ 觀察菌株生長情形。

七、菌種對菲之降解能力

取 0.1 mL 菌液 (OD₆₀₀ = 1) 植入內含 100 mgL⁻¹ 菲及 Tween80 界面活性劑 (0.2 g / 100mL) 之無機鹽培養基，並以未接種作為空白對照組，定期採樣並以 HPLC 分析菲殘餘量。HPLC 之操作條件如表 3 所示：

表 3. HPLC 之操作條件

偵測波長(nm)	250
流動相比比(%)	甲醇：水 = 65:35
流動相流速 mL min ⁻¹	1
分析管柱	250 × 4.6 mm, C18
樣品體積(μL)	20

八、土壤性質分析與生物復育

收集國內重要土類土壤，包括：砂頁岩沖積土(粉質土)、紅壤(粘質土)及粘板岩沖積土(粘質土)，將土壤自然風乾，於風乾後將其磨碎並以孔徑小於 2 mm 之篩網篩濾，以進行菌種於受菲污染土壤中生物復育效率之探討。參考土壤分析手冊進行土壤之質地、酸鹼值、有機質與土壤電導度分析。

配置經滅菌後之含 Tween80 與 100mgL⁻¹ 菲之土壤懸浮液(土壤：無機鹽培養基，1：10，w/v)，植入菌株，並以未接種作為空白對照組，恆溫震盪

培養。定時取出菌液並添加適量甲醇經超音波震盪萃取，再以 0.2 μm 醋酸纖維濾膜過濾，以 HPLC 分析菲之殘餘量。

參、結果與討論

一、菌株生理特性

1. 革蘭氏染色

由汙泥馴養過程中篩出六株菲降解菌，分別為 E12、E4、L2、L3、M1、N2 等，皆為革蘭氏陽性菌且呈桿狀，其中 L2、L3 之菌株桿狀結構為棒狀桿菌；E4、N2 菌株桿狀結構為分歧桿菌及棒狀桿菌；M1、E12 菌株之桿狀結構較為明顯。

2. 氧化酶及催化酶試驗

微生物於有氧呼吸過程中，會產生過氧化氫，甚至劇毒之超氧化物(superoxide)，這些物質之堆積，除非藉由酵素分解，否則將引起微生物之死亡，能產生催化酶(catalase)或過氧化酶(peroxidase)之微生物可將過氧化氫迅速分解。由氧化酶與催化酶試驗中，可了解菌株對氧氣的需求程度。催化酶試驗中，呈現陽性反應，表示這些菌株可能是微好氧菌。E12、M1 菌株在氧化酶及催化酶試驗皆為陽性，可能為微好氧菌；L2、L3 菌株在氧化酶試驗中為陽性及催化酶試驗為陰性，則菌株有可能為好氧菌，N2、E4 菌株於氧化酶試驗為陰性及催化酶試驗為陽性，則菌株可能為微好氧菌。

二、菲降解菌 16S rDNA 親緣關係

由圖 1 之試驗菌株 16S rDNA 保守片段親緣樹狀圖，在此樹狀圖中可以顯示出篩選出來之菌株可分為三大群。在 *Rhodococcus* sp. 菌種為單系群(monophyly)是石油中常見的降解菌之一，且 N2、E4 菌株與菲降解菌株 *Rhodococcus* sp. AY864339、AY864340、EU878293，與 EU196564 之親緣關係最為接近^(13,14)，其中經遺傳距離之分析，N2、E4 菌株可能為 *Rhodococcus* sp. 屬；而 E12 可能為 *Bacillus megaterium* 菌種，L2、L3 菌株應為同種菌株，且與此兩株菌株親緣關係最接近之菲降解菌株為 *Sphingomonadaceae* sp. EU851055；而 M1 菌株與其他菌株之親緣關係極為遙遠，可能為

其他菌種。

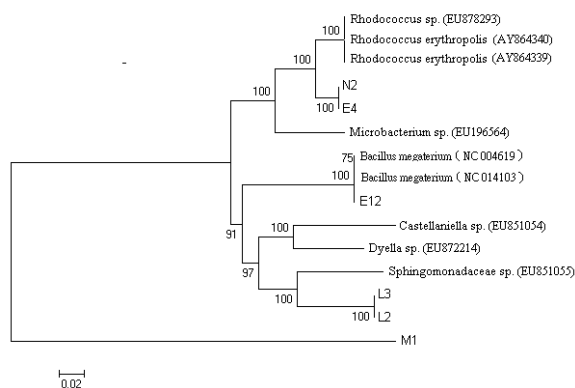


圖 1. 試驗菌株之 16S rDNA 保守片段親緣樹狀圖

三、界面活性劑添加對菌株之影響

為測試界面活性劑對試驗菌株是否有抑制作用，利用無機鹽液體培養基分別外加 Tween80、TritonX-100，利用 OD₆₀₀ 觀察菌株生長曲線：

1. 外加 Tween 80

外加 Tween 80 於無機鹽培養基中，結果如圖 2 所示。其中 N2 菌株之 OD₆₀₀ 值於培養期間約在 0.7 左右，E4 菌株之 OD₆₀₀ 值於培養期間約在 0.4 左右，L2、L3 菌株之 OD₆₀₀ 值於培養期間約在 0.15 左右，M1、E12 菌株之 OD₆₀₀ 值於培養期間約在 0.05 左右。

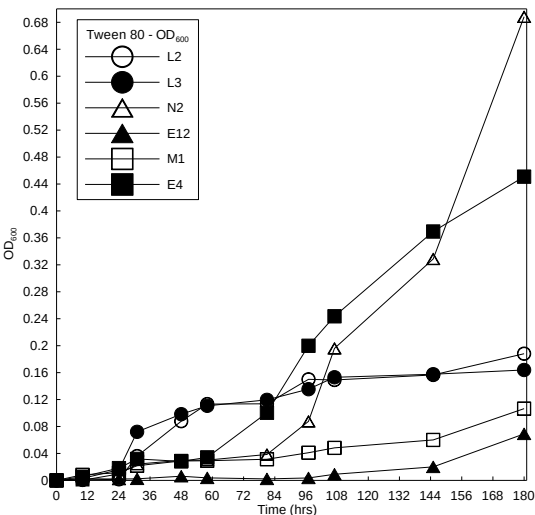


圖 2. 外加 Tween 80 對菲降解菌株之生長影響

2. 外加 Triton X-100

外加 Triton X-100 於無機鹽培養基中，結果如圖 3 所示。其中 L2 菌株之 OD₆₀₀ 值於培養期間約在 0.16 左右，L3 菌株之 OD₆₀₀ 值於培養期間約在

0.14 左右，N2 菌株之 OD₆₀₀ 值於培養期間約在 0.06 左右，E4 菌株之 OD₆₀₀ 值於培養期間約在 0.04 左右，M1、E12 菌株之 OD₆₀₀ 值於培養期間約在 0.02 左右，顯示各菌株於 Triton X-100 之培養基之生長情形較不理想。推測原因是因為 Triton X-100 含有苯環，毒性較高，可能抑制生物生長⁽¹⁵⁾，故後續研究中選擇添加 Tween 80 以增加菲降解菌與汙染物間之親和力。

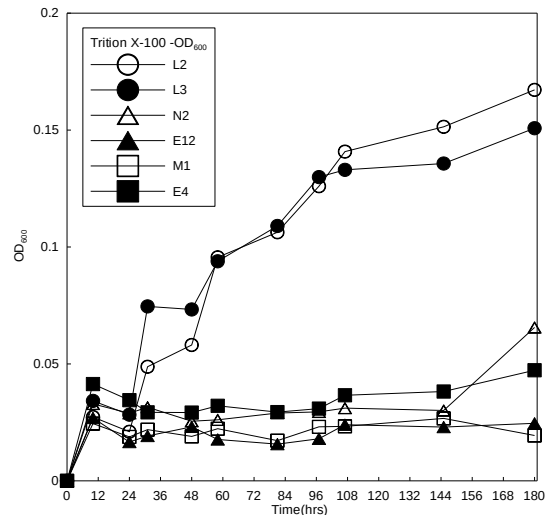


圖 3. 外加 Triton X-100 對菲降解菌株之生長影響

四、模擬菲污染土壤之生物復育

為了解各菌株應用於污染土壤之生物復育可行性，收集三種南部之重要土類土壤，分別為砂頁岩沖積土、紅壤及粘板岩沖積土，用以測試菲降解菌之降解成效，土壤之性質示如表 4，其中砂頁岩沖積土為粉質壤土，有機質含量為三種土壤中最低，紅壤和粘板岩沖積土則屬粘質壤土，為酸性土壤，紅壤之電導度較另二種土壤為低，粘板岩沖積土之有機質含量最高。土壤特性之差異對微生物之生長與汙染物降解有重要影響，本研究利用三種不同特性土壤來進行模擬試驗，可了解各菌株於不同土壤中之生長狀況及降解效率差異，未來在現地土壤生物復育時，可利用控制土壤之環境條件，以提升菲降解菌對汙染物之降解成效。

表 4. 試驗土壤之理化特性分析

	Sandy alluvial soil	Red soil	Slate alluvial soil
Texture	Silty	Clayey	Clayey

	loam	loam	loam
Sand (%)	24.3	25.6	27.8
Silt (%)	64.5	40.2	41.2
Clay (%)	11.2	34.2	31.0
pH	7.07	4.41	5.93
O.M. (%)	1.37	1.79	3.19
EC ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	2191	882	1169

挑選出降解效率較好之非降解菌株 M1、L3、E12，將此三株菌株分別植入已滅菌內含 100 mgL^{-1} 菲之土壤懸浮液（土壤：無機鹽培養基，1：10，w/v），並且額外配置一組未植入菌株含 100 mgL^{-1} 菲之土壤懸浮液做為空白對照組，定期取樣以超音波震盪萃取測定土壤中菲殘餘量。

由圖 4 得知 M1 菌株於砂頁岩沖積土壤懸浮液中第 2 天後開始明顯降解，於 12 天後降解明顯緩慢，在第 20 天之後降解率約 42% 左右；而在紅壤土壤懸浮液中第 6 天後開始有明顯降解，在第 12-18 天左右停滯期，於第 18 天後開始繼續降解，在第 20 天之後降解率約 33% 左右；在粘板岩沖積土壤懸浮液中第 2 天後開始降解，在第 12-18 天有明顯的停滯期，於第 18 天後開始降，在第 20 天之後降解率約 31% 左右。推測遲滯原因可能 M1 菌株不適合於偏酸性、有機質含量多、土壤質地之比例也差不多之土壤中

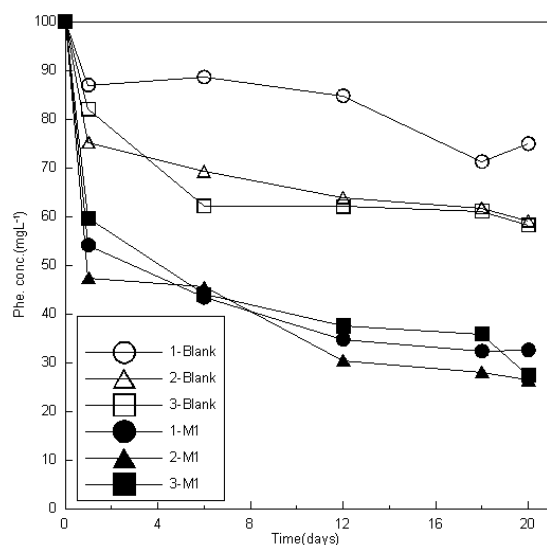


圖 4. M1 菌株於土壤懸浮液中降解菲之濃度曲線

1：砂頁岩沖積土；2：紅壤；3：粘板岩沖積土

由圖 5 得知 L3 菌株於砂頁岩沖積土壤懸浮液中第 2 天後開始明顯降解，在第 6-12 天降解明顯緩慢，於第 12 天後開始繼續降解，在第 20 天之後降解率約 52% 左右；而在紅壤土壤懸浮液中第 6 天後開始有明顯降解，在第 12-18 天之後降解速率較為緩慢，在第 20 天之後降解率約 32% 左右；在粘板岩沖積土壤懸浮液中第 2 天後開始降解，在第 12-18 天降解速率較為緩慢，在第 20 天之後降解率約 35% 左右。

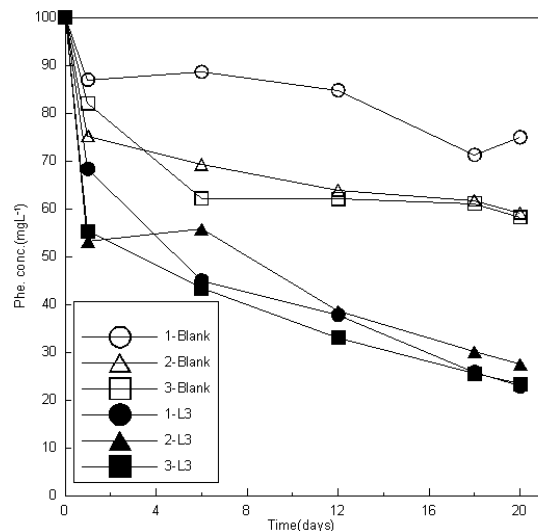


圖 5. L3 菌株於土壤懸浮液中降解菲之濃度曲線
1：砂頁岩沖積土；2：紅壤；3：粘板岩沖積土

圖 6 顯示 E12 菌株於砂頁岩沖積土壤懸浮液中第 2 天後開始明顯降解，於 12-18 天左右停滯期，於第 18 天後開始繼續降解，在第 20 天之後降解率約 49% 左右；而在紅壤土壤懸浮液中第 2 天後開始有明顯降解，在第 6-12 天左右降解速率稍些緩慢，但在第 12-18 天左右降解速率有快些，之後仍然繼續降解，在第 20 天之後降解率約 31% 左右；在板岩沖積土壤懸浮液中降解速率緩慢，在第 20 天之後降解率約 32% 左右。

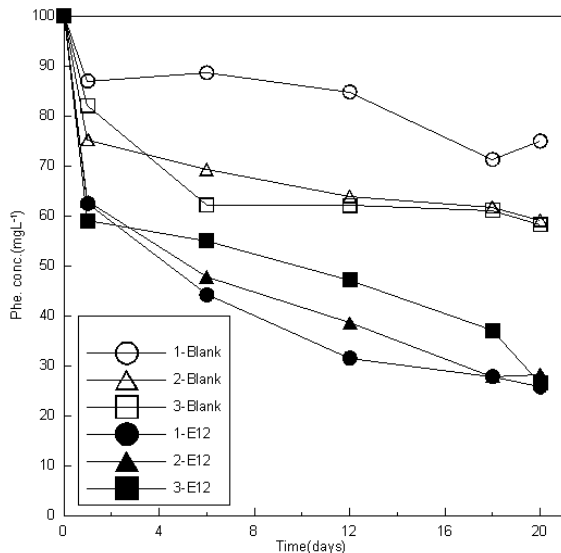


圖 6. M1 菌株於土壤懸浮液中降解菲之濃度曲線

1：砂頁岩沖積土；2：紅壤；3：粘板岩沖積土

綜合上述結果，M1、L3、E12 菌株於不同土壤懸浮液中降解效果有所差異，推測可能因土壤條件不盡相同，各菌株適合生長的條件亦不相同，其中 L3 菌株於砂頁岩沖積土效果較為好，且降解速率也比其他兩株菌株較為快速，推測可能此菌株適合於中性或弱酸性、鹽類離子多導電度佳之土壤環境中，文獻指出微生物存在於污染源愈久，愈能適應含 PAHs 之環境，其耐受性亦能相對提高⁽¹⁶⁾，與本研究由加油站周邊排水溝及工業區旁之排水溝採出之自然環境污泥有所不同。

肆、結 論

1. 從各分離源所篩選出之降解菌株 E4、E12、N2、M1、L2、L3 均具有菲降解能力，其中 L3 之降解效果最好。
2. 菌株經革蘭氏染色後，E4、E12、N2、M1、L2、L3 均為革蘭氏陽性菌，其中在氧化酶測試中 E4、N2 有陰性反應。L2、L3 菌株於催化酶試驗中則呈現陰性反應。
3. 在親緣樹狀圖中菌株可分為三群，其中 N2、E4 菌株可能為 *Rhodococcus* sp. 屬；而 E12 可能為 *Bacillus megaterium* 菌種；L2、L3 菌株應為同種菌株，且與此兩株菌株親緣關係最接近之菲降解菌株為 *Sphingomonadaceae* sp.；

雖然 E12 與 M1 菌株在生理生化鑑定中極為相似，但 M1 菌株在分子上有很大的差異，所以需更進一步研究探討。

4. 模擬菲污染土壤復育中，接種 E12 菌株於砂頁岩沖積土降解速率較快，M1 菌株於紅壤中降解速率較快，L3 菌株於粘板岩沖積土中降解速率較快，顯示不同種類之土壤，因具有不同之土壤特性，各菌株之生長與降解狀態亦有所差異。

伍、參考文獻

1. Finlayson-Pitts B.J., Pitts J.N., "Tropospheric air pollution: ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons and particles" Science, 276:1045-1052, 1997.
2. Christophe P., Gilles F., Pascal P., Benoit M., J.F. Muller, J.F. Fe'ard, "Isolation and characterization of a gene cluster involved in PAH degradation in *Mycobacterium* sp. strain SNP11: Expression in *Mycobacterium smegmatis* mc²155", Res. in Microbiol., 158:175-186, 2007.
3. Haritash A.K., Kaushik C.P., "Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review", J. Hazard. Mater., 169:1-15, 2009.
4. Lehrstuhl F.M., Universitat K., "Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants", Appl. and Environ. Microbiol., 60: 258-263, 1994.
5. Lei L., Khodadoust A.P., Suidan M.T., Tabak H.H., "Biodegradation of sediment-bound PAHs in field contaminated sediment", Water Res., 39:349-361, 2005.
6. Zhao H.P., Wu Q.S., Wang L., Zhao X.T., Gao H.W., "Degradation of phenanthrene by bacterial strain isolated from soil in oil refinery fields in Shanghai China", J. Hazard. Mater., 164:863-869, 2009.

7. Bautista L. F., Sanz R., Molina M.C., González N., Sánchez D., "Effect of different non-ionic surfactants on the biodegradation of PAHs by diverse aerobic bacteria", Inter. Biodeter. Biodegrad., 63:913-922, 2009.
8. Kim J.D., Shim S. H., Lee C.G., "Degradation of phenanthrene by bacterial strains isolated from soil in oil refinery fields in Korea", J. Microbiol. Biotechnol., 15:337-345, 2005.
9. Pathak H., Kantharia D., Malpani A., Madamwar D. Naphthalene degradation by *Pseudomonas* sp. HOB1: *In vitro* studies and assessment of naphthalene degradation efficiency in simulated microcosms. J. Hazard. Mater., 166:1466-1473, 2009.
10. 張怡瑋, "環境微生物實驗", 高立出版社, 台北, 1999。
11. Uchiyama H., Nakajima T., Yagi O., Nakahara T., "Pole of heterotrophic bacteria in complete mineralization of trichloroethylene by *Methylocystis* sp. strain M", Appl. Environ. Microbiol., 58:3067-3071, 1992.
12. Zhang G.Y., Ling J.Y., Sun H.B., Luo J., Fan Y.Y., Cui Z.J., "Isolation and characterization of a newly isolated polycyclic aromatic hydrocarbons-degrading *Janibacter anophelis* strain JY11", J. Hazard. Mater., 172:580-586, 2009.
13. 林大成, "柴油分解菌之生物降解與浮起特性", 國立中興大學環境工程學系博士論文, 2004。
14. 廖書賢, "結合電泳晶片及拉曼光譜法進行油污土壤中油分解菌的分離和鑑定", 國立成功大學醫學工程研究所碩士論文, 2007。
15. Struijs, J., Stoltenkamp, J., "Testing surfactants for ultimate biodegradability", Chemosphere, 28:1503-1523, 1994.
16. Zhong, M., Zhang, J.Q., Wu, X.X., Yang, F., Ma, H., and Chen, L.J., "Isolation, identification, and degrading characteristics of a high-efficient pyrene-degrading bacterial strain", Chin. J. Appl. Ecol, 21:1334-1338, 2010.

Isolation of phenanthrene-degrading bacteria and their application on soil bioremediation

Rey May Liou^{1*} Shih Hsiung Chen¹ Chiung Fang Chang¹ Pei Tzu Lai² Ying An Chen¹,
Hui Ling Cheng³ Cheng Hsien Huang¹ Mu Ya Hung¹ Cheng Lee Lai¹

¹Department of Environmental Engineering and Science,

²Department of Medical Chemistry,

³Department of Environmental Resource and Management,

Chia-Nan University of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan 71710, R.O.C.

Abstract

In this study, the phenanthrene degraders are isolated from the exposed sludge samples from various petroleum stations in southern Taiwan. The isolated strains in this study are E12, E4, N2, M1, L2 and L3. They are all Gram positive based by Gram stain. Phylogenetic relationship of the isolated strains was identified by 16S rDNA gene fragment. NJ tree indicated that all strains can be divided into three groups. The biodegradation assay of phenanthrene and effect of surfactants (Tween80 and Triton X-100) were also discussed in aqueous media inoculation with test strains, respectively. E12, M1 and L3 could carry out efficient degradation of phenanthrene as sole carbon source. The higher growth rate of test strains was obtained when Tween80 was used as surfactant instead of TritonX-100. L3 strain was able to mineralize phenanthrene in slate alluvial soil (clayey loam) suspension.

Keywords: phenanthrene, biodegradation, soil, bioremediation

*Correspondence: Department of Environmental Engineering and Science, Chia-Nan University of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan 71710, R.O.C.

Tel: +886-6-2660035

E-mail: mrmliou@mail.chna.edu.tw