

中華民國 第 50 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 生物（生命科學）科

佳作

040713

丟水池好安心—光觸媒對校園水池殺菌之影響

學校名稱：國立臺南第一高級中學

作者： 高二 陳柏鈞 高二 孫于景 高二 黃偉綸 高一 王振宇	指導老師： 林偌婷
---	--------------

關鍵詞：細菌、光觸媒

摘要

我們想針對學校水池中的微生物做處理，找出可以抑制水池中細菌生長的方法，讓校園的水池更乾淨。我們選擇近年頗為熱門的光觸媒，因為光觸媒能殺菌，而且可持續重複使用。

我們先進行水池的池水細菌的調查及分析，再自行合成光觸媒來殺菌。

在一開始，爲了提高 TiO_2 的殺菌效果，我們將幾丁質加入作保護劑使 TiO_2 能奈米化，提高反應性。由經過殺菌處理完的水樣之細菌培養中發現，0.1g 的光觸媒便可讓 20ml 的水樣在 5 分鐘之內達到完全殺菌的效果，0.3g 的光觸媒更可在 1 分鐘左右達到相同的效果。

我們透過多個劑量不同的實驗組，找出水池中最適當的處理方式來達到最好的殺菌效果，希望使校園水池中的水質更優良。

壹、研究動機

在我們的生活中，到處都是細菌。學校一向有壽星要被丟水池的傳統，但那汗濁的水池卻也往往讓人不敢恭維。於是我們想，如果能知道學校水池內有哪些細菌，再做處理，並且找出可以抑制水池中細菌生長的方法，讓校園的水池更乾淨、讓壽星被丟的更安心。我們選擇光觸媒用來殺菌，希望可以使菌數有效的降低。



圖 1-1：校園噴水池



圖 1-2：水池內部的環境

貳、研究目的

- 一、分析學校水池內的細菌數、菌種及原生、腐生生物的種類及分佈。
- 二、瞭解細菌的生長情形。
- 三、以幾丁質溶膠為保護劑、醋酸鉍當緩衝劑，製備奈米級光觸媒，並進行特性分析。
- 四、探討光觸媒殺菌的最佳化條件。

參、研究原理與文獻探討

總生菌數及大腸桿菌為檢測水質微生物的一般指標，隨時監測水質以提昇衛生品質，確保同學的健康，減少疾病散佈之機率。

林口長庚醫院臨床毒物科主任林傑樑表示，總生菌數超過標準，顯示水質衛生不好，抵抗力較弱者若不慎誤喝到，會引起腸胃炎，嚴重有可能導致敗血症，或被污水嗆到支氣管，有可能會引起上呼吸道感染、肺炎等，若不小心碰到眼睛，就有可能引起結膜炎。

衛生署疾病管制局 96 年 4 月 13 日訂頒「營業衛生基準」行政命令，各親水池中的水，總生菌數每公撮（毫升）菌落數不可超過 500 單位，大腸桿菌群以每 100 公撮（毫升）所含菌落數計算。

為了瞭解學校水池的水質狀況，我們依環檢所公告的標準方法進行細菌的培養及生菌數的計算^[1]。

一、生菌的採樣及計數

(一)採樣與保存：

為避免水樣遭受汙染，使用清潔並經滅菌之玻璃瓶盛裝水樣，且於採樣前清潔手部。我們分層在不同深度、不同位置各採若干水樣，採完水樣後立即進行培養。

為使水樣中的菌數恆定，水樣運送時以冰桶維持低於 10 °C，並於實驗室內溫度維持在 4 ± 2 °C 的冰箱中保存。並且在採樣後 24 小時內完成處理過程，置入培養箱中培養。

(二)細菌的培養：

我們依環檢所公告的標準方法進行細菌的培養及生菌數的計算，使用瓊脂平板法 (viable counting) 進行細菌培養，並以滾珠法使微生物在培養基上均勻分布。

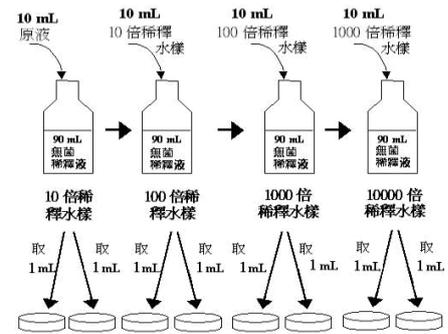
以瓊脂平板法培養細菌時，可以用塗抹法、倒皿法或滾珠法使微生物於培養基上生長。滾珠法是目前較為接受的方法。先將適量稀釋過的菌液注入培養基上，再置入約 4~5 顆玻璃滾珠，蓋上蓋子並水平晃動使菌液均勻分布在培養基上，最後再取出滾珠即可。

(三)培養基的製作^[2]：

細菌的培養基提供了碳、水分、氮、磷、硫.....營養物質。我們的培養基主要成份是酵母菌萃取物(yeast extract)、蛋白胨(tryptone) 洋菜(agar)和葡萄糖。並以高溫高壓滅菌鍋 (121°C，蒸氣壓15Psi) 滅菌30分鐘，以免有雜菌。

(四)細菌的稀釋^[1]：

一般瓊脂平板法，每個平板上最適合計數之菌落數應介於 30~300 個，但學校所採水樣的菌數可能超過此一範圍，因此須將水樣稀釋以無菌水連續稀釋，再以塗抹法或倒皿法，將稀釋之細菌懸浮液塗佈或傾注於適當之營養培養基上，經培養過夜，計數菌落數目，再乘以稀釋倍數，便可得到總菌數。每一稀釋度應進行二重複。



結果處理：

以含 30 至 300 個菌落之同一稀釋度的兩個培養皿計算其總菌落數，總菌落數以菌落數 (CFU)/ mL (colony forming units / mL) 表示之。計算公式如下：

$$\begin{aligned} \text{總菌落數(菌落數(CFU)/mL)} &= \frac{\text{選取培養皿之菌落數總和}}{\text{選取之實際體積總和}} \\ &= \frac{X+Y}{(1.0/D) + (1.0/D)} \end{aligned}$$

註：D：菌落數在 30 至 300 個之間的稀釋度

X、Y：D 稀釋度的兩個培養皿之菌落數

若各稀釋度中有兩個稀釋度的培養皿之菌落數在 30 至 300 個之間，則以下列公式計算：

$$\begin{aligned} \text{總菌落數(菌落數(CFU)/mL)} &= \frac{\text{選取培養皿之菌落數總和}}{\text{選取之實際體積總和}} \\ &= \frac{X_1+Y_1+X_2+Y_2}{(0.2/D_1)+(0.2/D_1)+(0.2/D_2)+(0.2/D_2)} \end{aligned}$$

註：D₁、D₂：菌落數在 30 至 300 個之間的稀釋度

X₁、X₂：D₁稀釋度的兩個培養皿之菌落數

Y₁、Y₂：D₂稀釋度的兩個培養皿之菌落數

含小數的數值進位處理；總菌落數小於 100 時，以整數表示（小數位數四捨五入），總菌落數大於 100 以上時，只取兩位有效位數，並以科學記號表示之。

檢測紀錄須註明採樣時間、培養起始及終了時間、培養基名稱、培養溫度及各稀釋度的原始數據等相關資料。

二、細菌的純化與鑑定^[3]

(一)細菌的純化—畫線法

自然界中之微生物係以混生存在，因此我們須將特定菌種分離而做純培養，以獲得獨立菌落。我們可用畫線平板、塗佈平板及傾注平板的方法來獲得獨立菌落。

1. 畫線法：

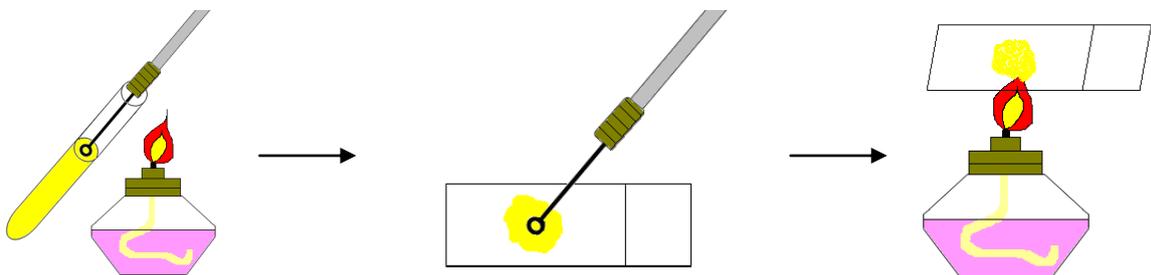
以四區劃線法為例。此法僅用來分離細菌的單一菌落。以下每一個步驟都是注意事項：

- (1) 用左手培養皿，右手持接種環在酒精燈上以火焰燒紅、滅菌。
- (2) 接種環冷卻後，用右手小指及手掌心將培養皿蓋子打開，以接種環輕觸菌落，使接種環上沾有細菌。
- (3) 取另一個新的無菌營養平板，將接種環上的細菌畫於此新的營養平板上。此為第一區菌區。
- (4) 將接種環以火焰滅菌後，輕觸瓊脂無菌處冷卻。
- (5) 將平板轉個角度，由第一區之邊緣，畫出第二區。
- (6) 重複第 4 以及第 5 步驟，由第二區之邊緣畫出第三區。
- (7) 將平板轉個角度，接種環不需燒紅，直接由第三區將菌以鋸齒狀畫開，此為第四區。（畫第四區時應避免接觸到先前畫過線之區域。）可得到由單一細胞所長成之獨立菌落
- (8) 將接種環以火焰滅菌後冷卻並收好。
- (9) 將已畫好之平板上標示菌名、操作日期，倒放置於 35°C 培養箱中培養 24~48 小時。

(二)細菌的鑑定—革蘭氏染色法

1. 玻片塗抹法

- (1) 玻片先以清潔劑洗淨，再以蒸餾水與95%酒精潤濕後擦乾備用。
- (2) 以接種環取出一菌落，塗抹於乾淨玻片中央，再均勻分散之。
- (3) 先在乾淨之玻片中央，以滴管滴一滴蒸餾水置於上，再以接種環輕沾培養基上之單一菌落（不要取太多），與水充分混合後，均勻塗抹於玻片。
- (4) 塗抹之玻片為半透明、白色的一層膜狀物，風乾後，快速在酒精燈上加熱2~3次，以便將菌體固定於玻片上（如下圖為液體培養基的做法，而固體培養基亦然）。



2. 簡單染色法 (Simple Stain) :

(1) 取出染色盤，內置少量蒸餾水。

(2) 將依上述方法處理過之載玻片，平放在染色架上，在塗有菌處滴下結晶紫（或甲基藍）染料，作用 1 分鐘後（染料蓋滿菌體，但不外溢），倒掉染料，用裝有蒸餾水的洗瓶將剩餘的染料沖掉，玻片乾後（可以濾紙吸乾），置於顯微鏡下觀察。

(3) 先以低倍鏡找出含有菌體的位置，逐次增加倍數，最後加入一滴油鏡油，以高倍油鏡觀察，並加以紀錄。

3. 革蘭氏染色法 (Gram Stain) :

(1) 依上述同樣方法，將欲觀察之三種細菌的隔夜培養菌液，以接種環均勻塗布於玻片上，並於旁邊註明菌名。

(2) 將此玻片瓶放在染色架上，先以 2% 染液作用 1 分鐘，再以蒸餾水將剩餘染料沖洗去除。

(3) 加入 Gram Iodine 媒染液 (Mordant)，作用 1 分鐘，用水沖洗。

(4) 再以 95% 酒精進行脫色作用。將玻片斜置於染色架上，由上往下滴入酒精溶液，直到流出的酒精變成無色後，再用水沖洗。

(5) 加入第二種染液 3.6% 之 Safranin (Counterstain)，繼續作用 1 分鐘後，用水沖掉多餘之染料，以濾紙吸去玻片上之水分，於顯微鏡下仔細觀察，並紀錄細胞之外形與顏色。

4. 結果 :

(1) Gram (-) : 革蘭氏陰性菌，被染成紅色。

(2) Gram (+) : 革蘭氏陽性菌，被染成藍紫色。

三、光觸媒的合成 :

近年來，利用光觸媒為催化劑，以光催化法處理染料廢水、 NO_x 廢氣處理技術及大腸桿菌之去除的相關研究，在國內外均受到相當之重視^{[4][5][6][7]}。

(一) 光觸媒照光分解有機物的原理 :

光觸媒的材料眾多，包括 TiO_2 、 ZnO 、 SnO_2 、 ZrO_2 等氧化物及 CdS 、 ZnS 等硫化物。其中以 TiO_2 (Titanium Dioxide, 二氧化鈦) 具氧化能力強、化學性安定、無毒之特性而受到廣泛之應用。

二氧化鈦是一種半導體，1972 年由 A. Fujishima 及 K. Honda 發表於 Nature 雜誌中^[8]，其發現 TiO_2 半導體在光照下會出現和植物光合作用類似之反應。其先是應用於光能之轉換儲存，然後於環境觸媒中發揚光大，成為現今最熱門之科技話題之一。

銳鈦礦型二氧化鈦的能隙大小約為 3.2 電子伏特^{[9][10]}，相當於波長約為 380 奈米的光波所攜帶的能量，二氧化鈦經過光照射後產生電子-電洞對 (圖 3-3-1)。其中電子具還原性，電洞具氧化性，這些電洞會將附近水分子氧化，使其成為活性極大的氫氧自由基 (OH radical) (圖 3-3-2)；這些氧化力極強的氫氧自由基幾乎可分解所有對人體或環境有害的有機物質及部份無機物質。

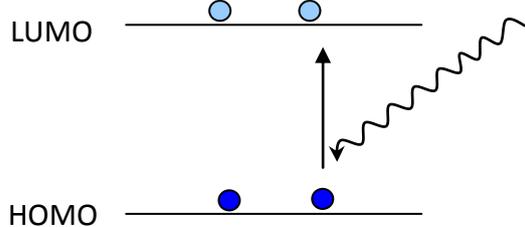


圖 3-3-1 TiO₂ 能階示意圖

(改繪自 <http://www.photocatalyst.co.jp>)

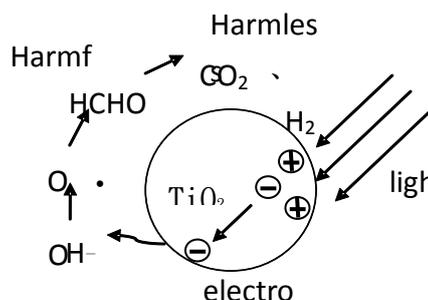


圖 3-3-2 TiO₂ 光分解示意圖

(改繪自 <http://www.photocatalyst.co.jp>)

(二)光觸媒應用之必要條件-奈米尺寸

Almquist and Biswas (2002) [11] 指出利用火焰法所合成的 TiO₂ 光觸媒微粒時，對水中有機物氧化去除的最佳粒徑範圍為 25nm~40 nm 間。但粒徑應小於多少 nm 才有效，目前尚未有定論，但是光觸媒要在 100nm 以下才有較好的效果，則已是不爭的事實。

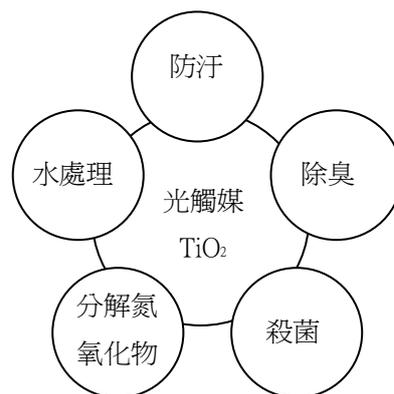


圖 3-3-3 光觸媒的五大效能

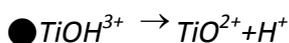
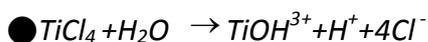
(三)粉體奈米 TiO₂ 光催化劑的製備

表 3-3-1：

製備方法	優點	缺點
溶膠-凝膠法 ^[19]	粒徑小，分佈窄，晶型為銳鈦礦型，純度高，熱穩定性好	前驅體為鈦醇鹽，成本高
水熱合成法	晶粒完整，粒徑小，分佈均勻，原料要求不高，成本相對較低	反應條件為高溫、高壓，材質要求高
化學氣相沉積法 (CVD)	粒徑小，分散性好，分佈窄，化學活性高，可連續生產	技術和材質要求高，工藝複雜，投資大
微乳液法	可有效控制TiO ₂ 奈米粉末的尺寸	易團聚

1.濕式法：

最常見者為 Sol-Gel Method，以 TiCl_{4(l)}、Ti(i-C₃H₇)_{4(l)} 或 Ti(C₂H₅)_{4(l)} 水解製作，其優點為容易大量製造，但是尺寸控制較不易，考量反應器的填充需要較多量的奈米粒子，故實驗設計以濕式法加以發展，由 TiCl_{4(l)} 的水解製作 TiO₂。



由方程式可知 pH 值會影響 TiO₂ 的生成，實驗設計以含有醋酸 (K_a=1.8×10⁻⁵) 的溶液加入 NH₃ (K_b=1.8×10⁻⁵) 後溶液成醋酸銨緩衝液，控制 pH 值在 7 左右，使 TiO₂+SnO₂

的生成環境不至於有太大變動，希望可藉此使奈米粒子的粒徑分佈範圍較窄。

2.保護劑的選取：

以往使用硬脂酸 ($C_{17}H_{35}COOH$) 做為保護劑^{[12][13]}，但研究顯示分子量較大其做為保護劑的效果較好，因幾丁質為聚合物，分子量較大且具有網狀結構，且在醋酸中溶解形成凝膠狀溶液，可以降低質傳速率，有效分散所形成的 TiO_2 並防止其聚集，形成有光降解效果的奈米顆粒，而且幾丁質無毒性，所以實驗設計改用幾丁質作為保護劑。

幾丁質 (chitin) 又稱甲殼素或甲殼質，甲殼類動物外殼的重要結構物質，在自然界中儲量僅次於纖維素，是第二大天然多糖。它是通過 β -1, 4 糖苷鍵將 N-乙醯- β -D-葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine, ANG) 單元連接起來的長的直鏈聚合物，幾丁聚醣 (Chitosan) 是幾丁質去乙基醯基產物，通常將幾丁質去乙基醯基程度達 70% 以上即可變成可溶於酸性的幾丁胺糖產物，稱為幾丁聚醣。

幾丁質與幾丁聚醣的分子結構間存在很多強固的氫鍵，因此幾丁質多很堅硬，難溶於水及一般溶劑，但可溶於高濃度醋酸溶液，幾丁質與幾丁聚醣可用於水和廢水淨化^[14]，由其在吸附分解有機物與殺菌方面；幾丁質與幾丁聚醣作為穩定食物的食品添加劑和藥品，還可以作為染料、織物、黏合劑、工業的分離薄膜與離子交換樹脂。因具有良好的生物相容性、無生物毒性、價格低廉、容易改質、機械強度較好...等優點，極具發展的潛力。

3.沸石 (分子篩, Sieves) 的添加

沸石在 1756 年首先為瑞典礦冶學家克朗斯提 (B. Cronstedt) 發現，它是一種低密度軟性的礦石，由氧化矽、氧化鋁與鹼在水汽壓力下作用所形成的結晶性矽鋁酸鹽。沸石的結構是以矽或鋁氧化物的四面體 (SiO_4^{4-} 或 AlO_4^-) 為基本單元，以氧原子連接矽、鋁的四面體而成的三度空間骨架結構。沸石骨架結構中含有四、五、六、八、十或十二個四面體構成的環面，形成一定大小的孔洞及管道，使得加熱脫水處理過的沸石能選擇性的吸附大小適當的分子，因此沸石又稱為「分子篩」^{[15][16]}。

本實驗基於奈米級 TiO_2 可以分散在分子篩上而易沉降，希望處理後的水可以溶液回流至水池內，並希望利用分子篩對有機物的強吸附力來吸引細菌附著，促使光觸媒產生的自由基與細菌充分接觸，進而提升殺菌效果。

4.殺菌實驗

Zainal^[17]等人 (1994) 以 Pt/TiO_2 作催化劑，在金屬鹵化物燈照射 60—120min 的情況下完全殺死 *Escherichia coli*、*Saccharomyces cerevisiae* 及 *Lactobacillus acidophilus* 等細菌。Sierka (1995)^[18]則發現 TiO_2 光催化可使 90% 的 Phage MS₂ 病毒樣品喪失活性，加入 2×10^{-6} mol/L 的 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 溶液後失活率增至 99%，顯見光觸媒有很好的殺菌效果。因此被選為本實驗的對象。

(四)樣品性質的分析

1.SEM 分析：取少量鍛燒後的樣品使其附著於樣品座上，然後在樣品表面鍍金以利於掃描式電子顯微鏡的觀察，來確認所合成之光觸媒的狀態。

肆、研究設備及器材

一、器材



圖 4-1 垂直式無菌操作檯



圖 4-2 恆溫震盪培養箱



圖 4-3 高壓滅菌釜 HUXLEY



圖 4-4
SEM 高解析熱電子型場發射掃描式電子顯微鏡
High Resolution Field-Emission Scanning
Electron Microscope JEOL JSM-6700

(圖片引用自：成大微奈米中心網頁
<http://cmnst.ncku.edu.tw/bin/home.php>)



圖 4-5 高溫爐 HAMADA
PHA4-S03-K0000



圖 4-6 分光光度計 HITACHI
U-2900



圖 4-7 超音波震盪器 ST-45
再偉企業有限公司 DC300H



圖 4-8 烘箱
協德興業有限公司



圖 4-9 鐵氟龍壓力鍋 (水熱合成裝置)



量筒

錐形瓶

UV 燈管（照度 312.0 流明）

培養皿

加熱攪拌器及攪拌子

燒杯

離心機

離心管

二、藥品

表 4-2-1：

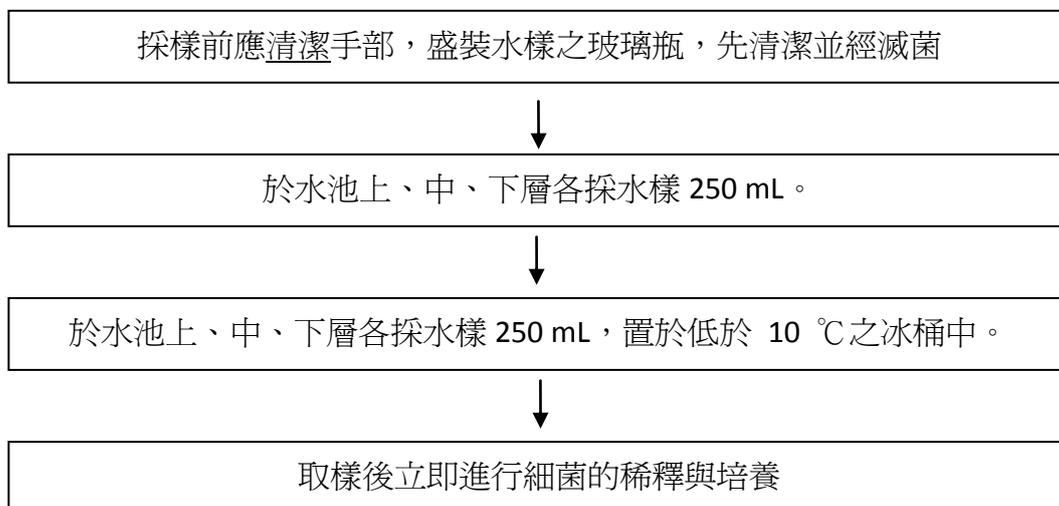
藥品名稱	製造商	等級
Agar	立光農工股份有限公司	
Yeast extract	Merck	
Pepton	Merck	
Glucose	片山化學工業株式會社	試藥特級
P25	島久藥品株式會社	試藥一級
Na ₂ SiO ₃ (powder)	片山試藥株式會社	試藥級
NaOH	片山試藥株式會社	試藥一級
Na ₂ Al ₂ O ₄	Alfa.Aesar	試藥級
SiO ₂	片山試藥株式會社	試藥一級
(NH ₄) ₂ SO ₄	片山試藥株式會社	試藥一級
HCl	NIHON.SHIYAKU BIO,LTD	試藥一級
SnCl ₄ · 5H ₂ O	昭和化學株式會社	特級
NH ₃	片山試藥株式會社	試藥一級
CH ₃ COOH	片山試藥株式會社	試藥一級
TiCl ₄	sigma.aidrich	試藥一級

試劑水：蒸餾水或去離子水，導電度在 25 °C 時小於 2 μ mho/cm (μ S/cm)。

伍、研究過程及方法

一、學校水池細菌培養：

(一)取樣



(二)培養基 (Plate count agar, PCA) 的製作

葡萄糖 (Glucose)	1.0 g
胰化蛋白胨 (Tryptose)	5.0g
酵母抽出物 (Yeast extract)	2.5 g
瓊脂 (Agar)	15.0 g
試劑水	1 L

經 121 °C 滅菌 15 分鐘後,冷卻至約 50 °C,倒入無菌培養皿中,室溫下凝固。
可保存於冰箱中,保存期限為 14 天。可根據檢驗需求,依配方比例配製培養基。

(三)水樣的稀釋--無菌稀釋液

1.磷酸二氫鉀儲備溶液

取 3.4 g 磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4) 溶於 50 mL 之試劑水中,俟完全溶解後,以 1.0 N 氫氧化鈉溶液調整其 pH 值為 7.2 ± 0.1 。然後加試劑水至全量為 100 mL,滅菌 (過濾滅菌或 121 °C 高溫高壓滅菌 15 分鐘) 後,儲存於冰箱中備用。 4 ± 2 °C 下保存期限為 3 個月。

2.氯化鎂儲備溶液

取 8.1 g 氯化鎂 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$),先溶於少量試劑水中,俟完全溶解後,再加試劑水至全量為 100 mL,滅菌 (過濾滅菌或 121 °C 高溫高壓滅菌 15 分鐘) 後,儲存於冰箱中備用。 4 ± 2 °C 下保存期限為 3 個月。

3.無菌稀釋液

分別取 10 mL 氯化鎂儲備溶液和 2.5 mL 磷酸二氫鉀儲備溶液再加入試劑水至全量為 2,000 mL,混搖均勻後,分裝於稀釋瓶中,經 121 °C 滅菌 15 分鐘,做為無菌稀釋液備用。如欲用於水樣稀釋,分裝之無菌稀釋液滅菌後體積須為 90 ± 2.0 mL。 4 ± 2 °C 下保存期限為 3 個月。

(四)細菌的培養

水樣在進行檢測或稀釋之前必須劇烈搖晃 25 次以上,以使樣品充分混搖均勻。

視水樣中微生物可能濃度範圍進行水樣稀釋步驟,使用無菌吸管吸取 10 mL 之水樣至 90 mL 之無菌稀釋水中形成 10 倍稀釋度之水樣,混合均勻,而後自 10 倍稀釋度水樣以相同操作方式進行一系列適當之 100、1,000、10,000 倍等稀釋水樣並混搖均勻。

以 1mL 無菌吸管或微量吸管吸取 0.2 mL 的原液及 (或) 各稀釋濃度水樣滴在培養基上。原液及 (或) 各稀釋度水樣均需進行三重複。

置入滾珠於培養皿中,蓋上蓋子並水平搖晃,至水樣均勻分佈於培養基表面。

倒置培養皿於培養箱內,在 35 ± 1 °C 下培養 48 ± 3 小時。

(五)細菌的鑑定

初步培養出來的細菌有相當多種類，我們採用平板畫線法，將諸多不同種的細菌一一獨立出來培養，之後取樣做成玻片標本來觀察。

先將接種環上的細菌劃於培養基上，再將接種環以火焰滅菌後將平板轉個角度，由第一區之邊緣畫出第二區，重複步驟，由第二區之邊緣畫出第三區。



將已畫好之培養皿作上標示及操作日期，倒放置於 35°C 培養箱中培養 24~48 小時。



待培養好後，取第三區的細菌作成玻片標本，經染色後以顯微鏡作觀測，並拍照、紀錄。

(六)光觸媒對水樣生菌數的影響

各取 20 mL 水樣，分別加入 0.1g 自行合成的奈米粉末。



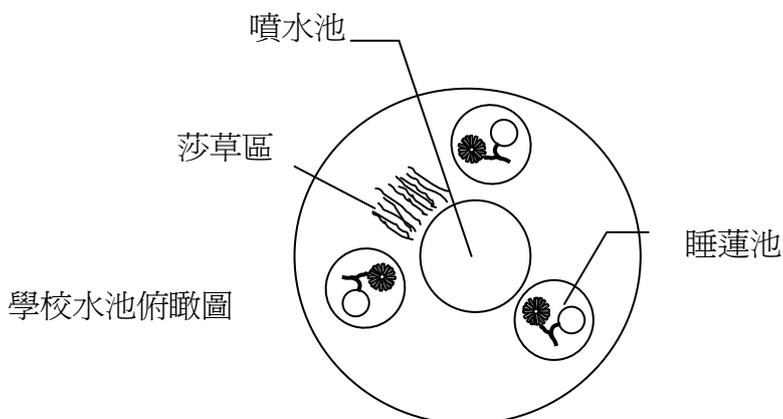
以 320 流明之紫外燈管照射 1、2、3、5、8、12、16、20 分鐘。



靜置 2 分鐘，待光觸媒粉末沉澱後，取上澄液進行細菌的培養

(七)底泥的生物調查

於不同位置採取底泥，進行池水的細菌培養及底泥的生物調查。



陸、研究結果

一、池水的採樣：

以 250ml 的採樣瓶先經高溫滅菌，以待取水樣潤洗三次後裝瓶，用顯微鏡觀察收集來的池水，並畫圖、照相記錄。

二、原水的稀釋與細菌的培養：

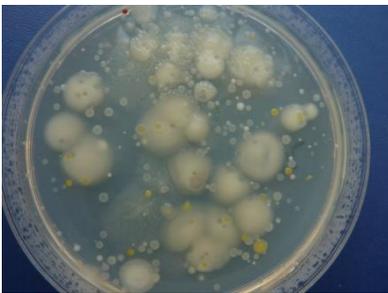
(一)將採集的水樣用無菌稀釋液分別稀釋成 0、10、100、1,000、10,000 倍

(二)分別將以上五種濃度不同的稀釋液塗在培養皿上，並以滅菌過的彎曲玻璃棒將菌液均勻分散。此過程須進行三重複，以避免過程中有汙染。

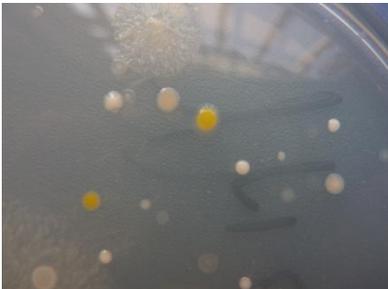
(三)將塗過菌液的培養皿置入生物培養箱中以 35°C 培養 48 小時，再取出來對照結果。

(四)培養的結果如下：

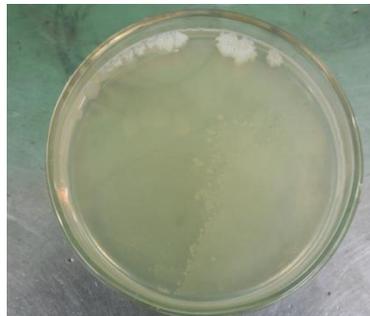
1.原液未稀釋（稀釋零倍），可明顯看到菌落生成(右方第一張是近照)



2.原液稀釋十倍



3.原液稀釋 100 倍



4. 原液稀釋 1000 倍



(五)細菌的純化與鑑定

以劃線法純化菌落後進行觀察與鑑定(如右圖)

1.我們觀察到一些菌落：



表一:菌落的型態描述

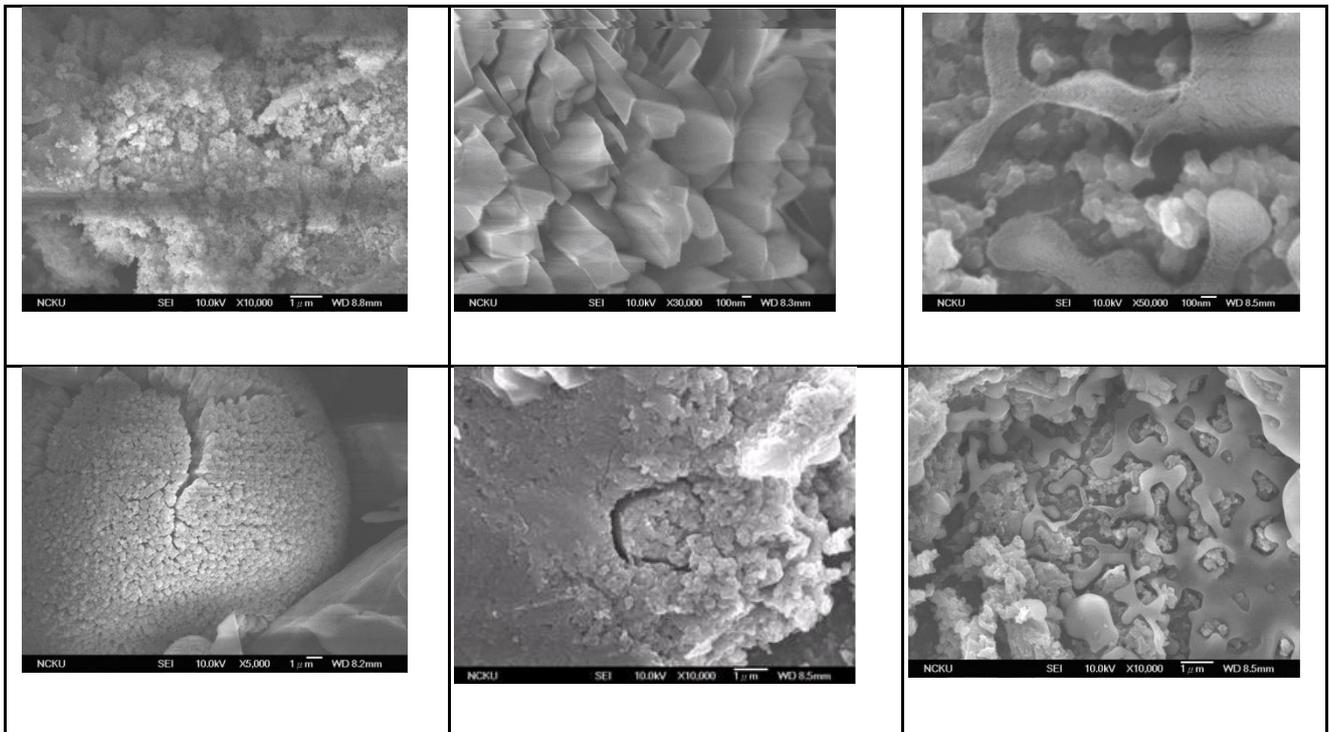
菌落的外觀描述	顏色	形狀	側視	表面
菌落 A	紅色	圓形	乳突	光滑
菌落 B	白色	圓形	平突	無光澤
菌落 C	黃色	不規則	平突	粗糙
菌落 D	黃褐色	不規則	平突	粗糙

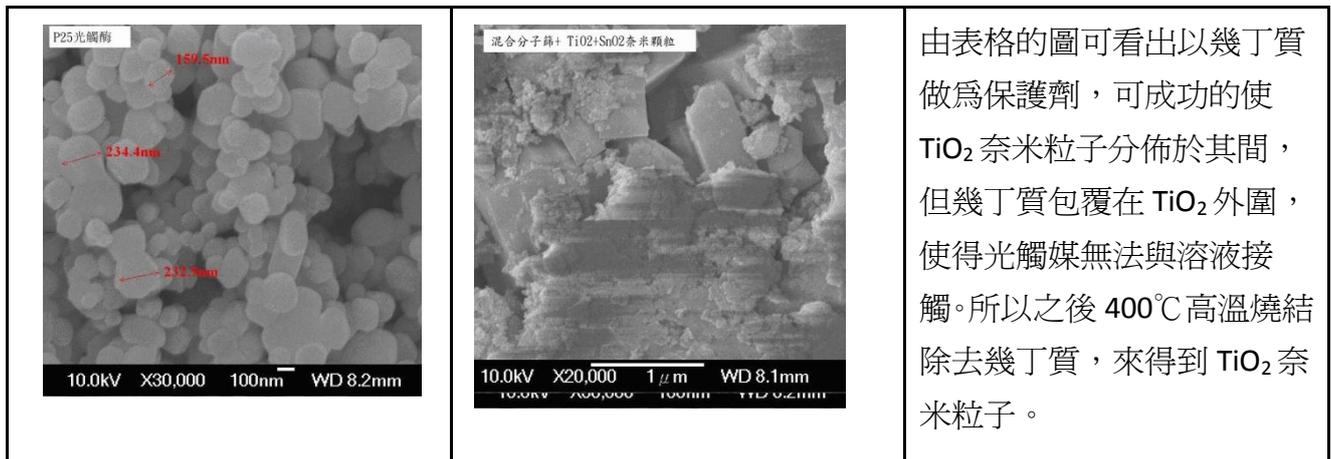
三、光觸媒的製備

(一)奈米分子篩的製備	(二)TiO ₂ +SnO ₂ 奈米顆粒的製備
	

(三)SEM 測量結果

1.分子篩





四、用光觸媒殺菌

(一)將不同劑量、不同製程的光觸媒加入剛取好的水樣中，以相同的照光時間比較殺菌的成果。

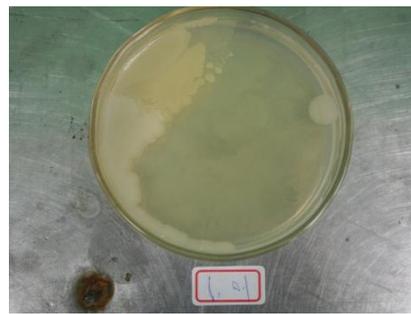
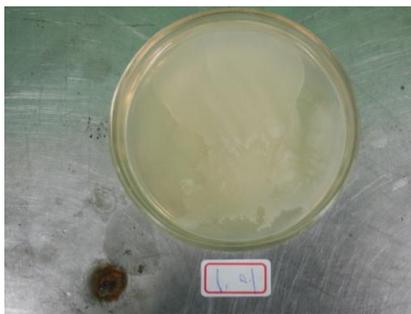
(二)分別加入 0.1、0.2、0.3g 的光觸媒。

(三)以紫外燈光，分別照射 1、3、5、8、12、16、20 分鐘，取水樣進行細菌培養。

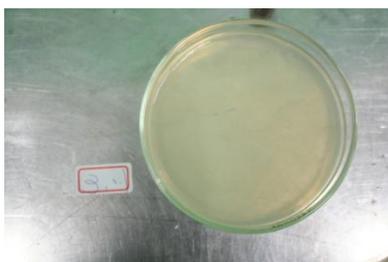
(四)結果如下：

1.加入 0.1g 光觸媒的分解情形：

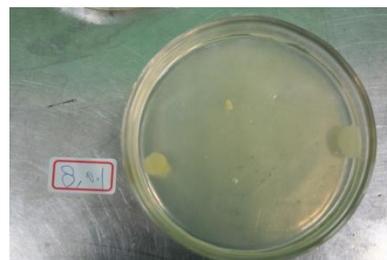
(1)照光一分鐘後



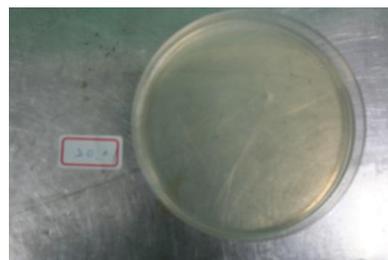
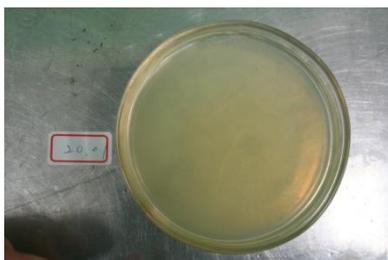
(2)照光三分鐘後



(3)照光八分鐘後



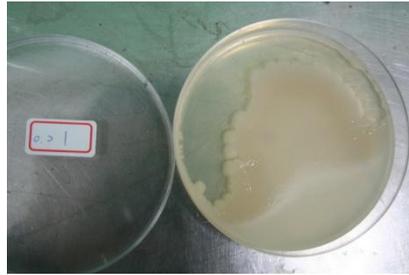
(4)照光二十分鐘後



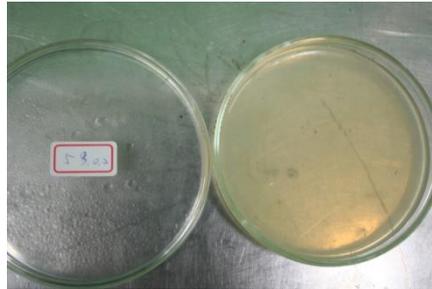
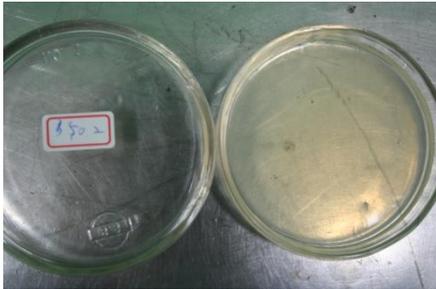
※照光約 3 分鐘後細菌即大幅減少，8 分鐘後幾乎無菌落出現在培養基上。

2. 加入 0.2g 光觸媒的分解情形：

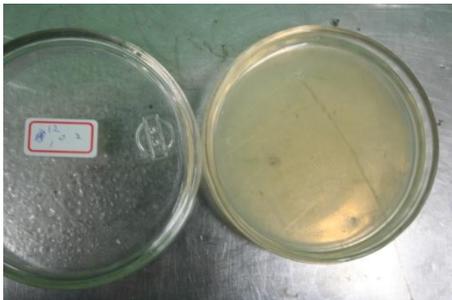
(1) 照光一分鐘後



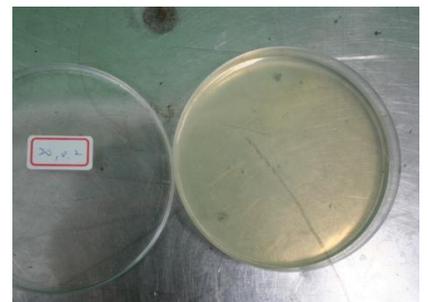
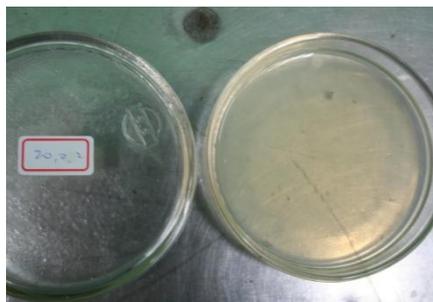
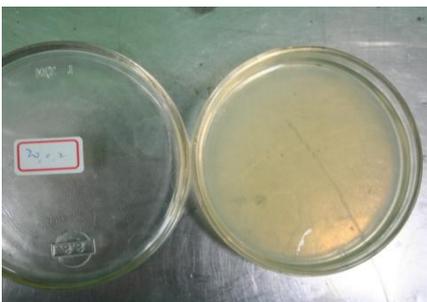
(2) 照光五分鐘後



(3) 照光十二分鐘後

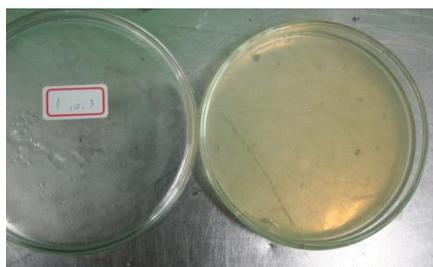
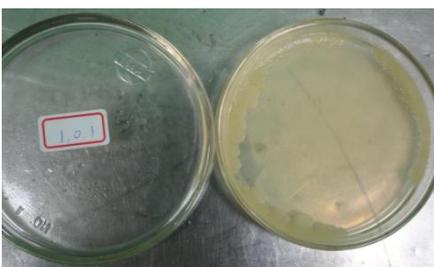


(4) 照光二十分鐘後

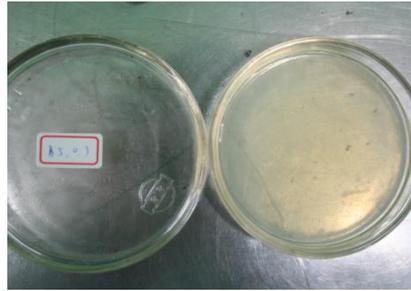
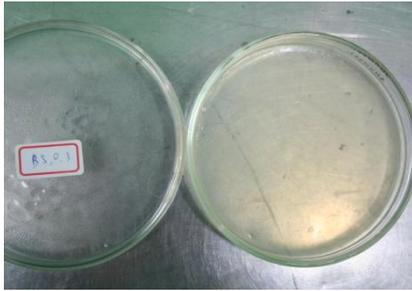


3. 加入 0.3g 光觸媒的分解情形：

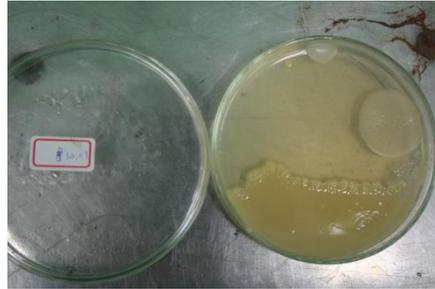
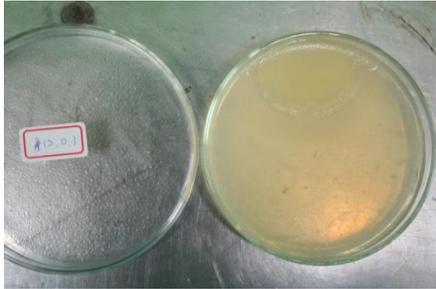
(1) 照光一分鐘後



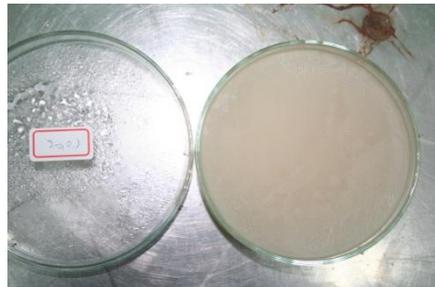
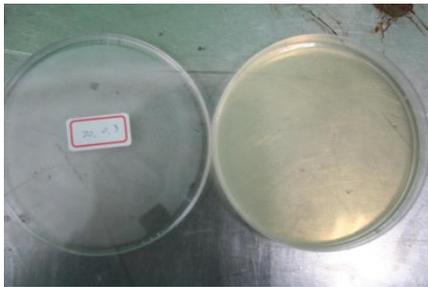
(2) 照光五分鐘後



(3) 照光十二分鐘後



(4) 照光二十分鐘後



※照光 1 分鐘的培養基仍有菌落出現在培養基上，其餘的培養基上都沒有菌落出現。

五、底泥的生物調查

(一)採樣結果：

我們分別在噴水區、睡蓮池、莎草區及其靠外側的池底進行採樣，各區採得的底泥在外觀、顏色、氣味均明顯不同

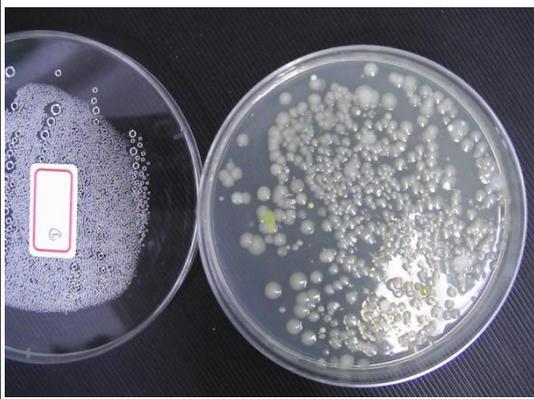


在陽光充足的莎草區及靠外側的池底所採得的底泥呈顆粒狀，看起來黃綠色，外表帶有青苔。

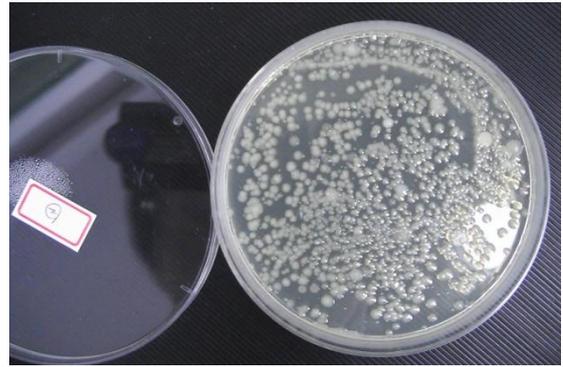


噴水池及睡蓮池的底泥呈灰黑色，散發一股異味。且採集時底泥有氣泡冒出，呈現厭氧的狀態。

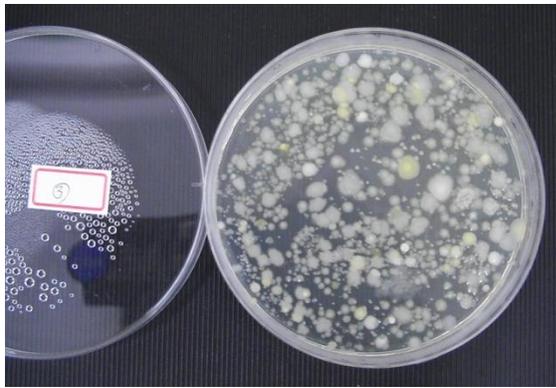
(二)細菌培養



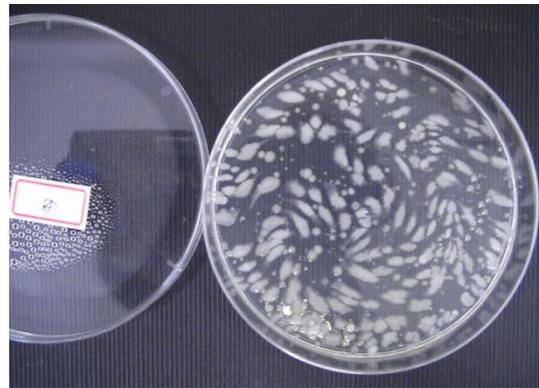
從水池外側的底泥中培養出的菌種



從莎草區的底泥中培養出的菌



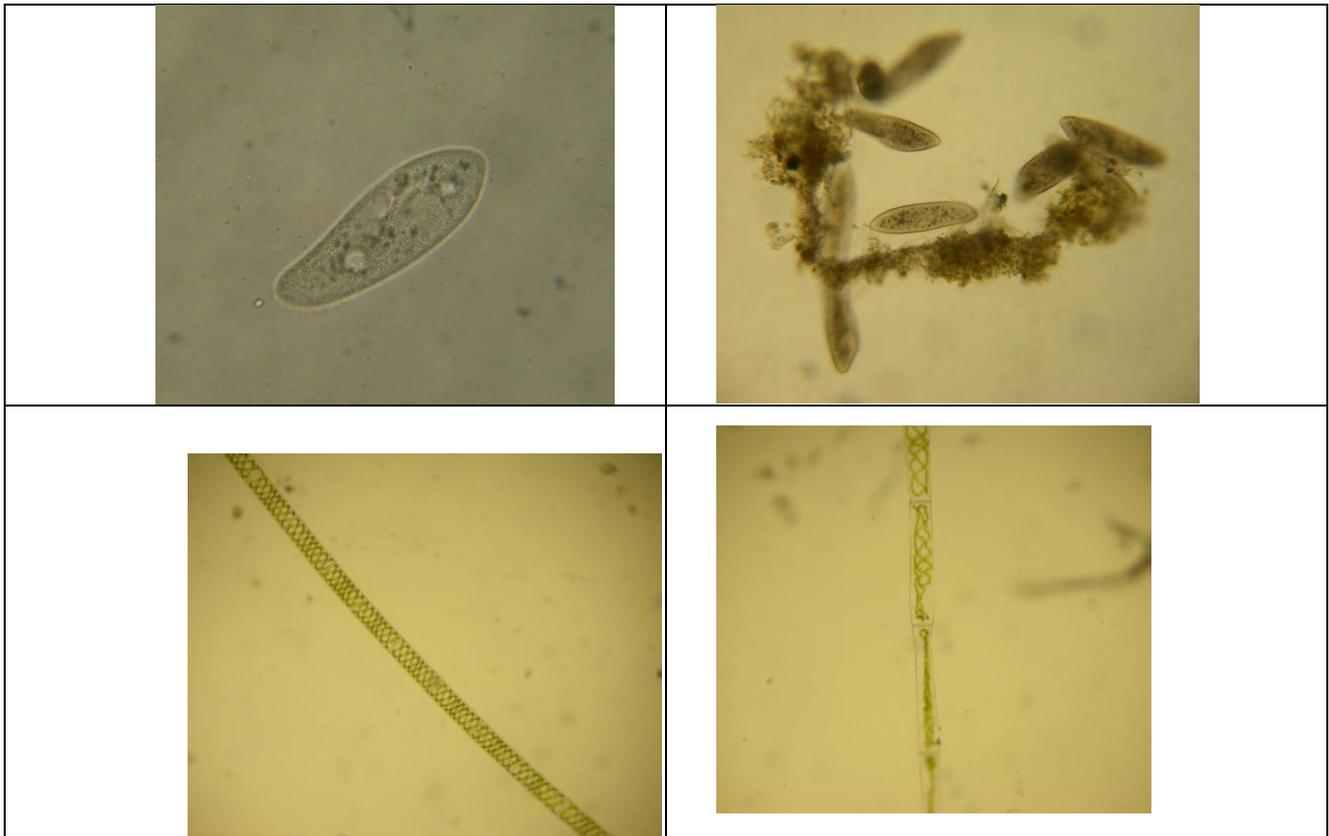
從噴水池的底泥中培養出的菌



從蓮花池的底泥中培養出的菌

(三)觀察到的生物

1. 從底泥中觀察到的微生物



柒、討論

一、水樣採集過程：

細菌的生長易受到溫度、培養基成分、pH 值、氧氣濃度.....等影響，不同環境養出的細菌及菌落數可能不同。為使檢驗結果具有可信度，我們採用環檢所的標準方法進行採樣分析及細菌培養。

(一)水樣量須以能做完所需檢驗為度，但不得少於 100 mL。

(二)在採集之前，需先潤洗樣品瓶，使內外的水樣濃度一定。

(三)採樣時，可取不同深度的水樣做試驗，可能得到不同的結果，因為不同深度的水，細菌分佈的狀態不一定一樣。

二、品質管制：

(一)每次採樣時，進行運送空白。

(二)每次水樣都需進行試劑空白實驗。

(三)採樣後 30 分鐘內完成檢測步驟，以免造成細菌死亡或增生，影響實驗結果。

(四)實驗中培養所得之細菌可能具有感染性，檢測後之培養基及器皿都經高溫高壓滅菌處理。

三、細菌培養三重複：

我們為確保實驗結果，必須進行三重複試驗，空氣中有許多黴菌的孢子，在我們實驗操作時偶爾會落入培養基中生長，而黴菌成長速度很快，且黴菌成長過程中會分泌化學物質使細菌無法成長。為了避免培養基因受到黴菌的污染，而造成實驗數據的漏失，標準方法中明定須進行二重複。若培養基中長出一大片而且還有菌絲，研判是受到黴菌的污染，則此實驗不可列入數據參考中。

四、細菌的處理：

在每次做完實驗後，培養基與細菌不可直接到入水槽或環境中，否則會造成污染。需一併置入高壓蒸氣滅菌釜中處理。

五、奈米光觸媒的製作

(一)奈米顆粒在溶膠凝膠法及沉澱法中，都必須避免團聚生成，以免造成顆粒不均勻及顆粒太大的現象，實驗利用 TiOSO_4 在 $60-70^\circ\text{C}$ 溶解度上升重新溶解成透明狀的溶液後加入幾丁質當保護劑，再藉由快速加入氨水提供 OH^- ，生成大量粒徑小的晶核分散在保護劑中，而限制大晶體及團聚沉澱物生成，利用此法產生的奈米顆粒的粒徑在 10nm 左右，比市面上的 P25 光觸媒小 10 倍左右。

(二)製備幾丁質溶液時須先將蛋白質及油脂以強鹼去除，如此 $\text{HCl}_{(\text{aq})}$ 才可以充分跟蟹殼接觸，將其碳酸鈣溶解，留下幾丁質。幾丁質在使用之前須去乙酰化，去乙酰化之後的幾丁質有更多可以產生氫鍵的部位，使其與水的作用力更強，再加上胺基的鹼性可與醋酸藉中和來溶解，因此可以分散在醋酸水溶液中作為保護劑使用。幾丁質製備好後須保存在純水中，以免其在乾燥的過程中重新聚集而使分子量改變，也變得較不易溶解。

(三)幾丁質無毒且燒結除去溫度較低，可在低於 TiO_2 相轉移溫度下操作，來生成粒徑小的奈米顆粒，而不使 TiO_2 由銳鈦礦的晶相轉變為金紅石晶相(一般轉移溫度約 450°C ，實驗中以 400°C 燒結)。

六、水樣的處理結果

以 TiO_2 +紫外光處理水樣，發現照射 1 分鐘的水樣中仍有許多細菌，詳細的數量有待稀釋後培養確認之。而照射 5 分鐘左右幾乎已達完全的殺菌，顯見所合成的光觸媒具有十分良好的效果。

七、底泥的生物調查

從以上的圖中可明顯的看見，學校水池中分佈著各式各樣的水生生物，包括草履蟲、水棉、綠藻、念珠藻.....等微生物，他們的存在，也是影響水池濁度的一大變因。

捌、結論

一、本實驗採取校園水池中的水樣經稀釋後以不同濃度的水樣來做細菌的培養，可以發現稀釋成 2-3 倍的水樣最適合用來培養計數，由結果推估，水池內的菌數約在 1000-1500 單位/毫升，超過衛生標準萬倍以上。

二、本實驗為了使奈米顆粒避免產生效率較低的金紅石晶相，參考文獻資料後決定添加錫元素，使銳鈦礦晶相在較高溫仍能存在，再者 SnO_2 也具光催化效能，添加後有可能不影響，甚至增加奈米粒子的光降解效果，故本實驗以添加錫的方式，來製造 $\text{TiO}_2+\text{SnO}_2$ 奈米顆粒。

三、本實驗以新的方式製造光觸媒，除製作方法簡單、快速，且成功控制 pH 值使極小顆粒的奈米粒子形成，又能快速分解有機染料，值得進一步推廣至其他有機污染物之分解，以降低工業進步後對地球環境所造成之污染危害。

四、水樣中加入的光觸媒，在紫外燈管下照射下，在 5 分鐘之內便可達到完全的殺菌，且光觸媒可回收再利用，實為處理水中細菌的良好選擇。

玖、參考資料及其他

- [1] 環境微生物檢測通則—細菌，檢索於 <http://www.niea.gov.tw/niea/LIVE/E10102C.htm>，99年3月8日
水中總菌落數檢測方法—塗抹法，檢索於 <http://www.niea.gov.tw/niea/LIVE/E20355B.htm>，99年3月8日
水中總菌落數檢測方法—混合稀釋法，檢索於 <http://www.niea.gov.tw/niea/LIVE/E20454B.htm>，99年3月8日
- [2] <http://sciedu.ncu.edu.tw/up/appendix/93Aphy0900a922271.pdf> 檢索於 2010/3/5
- [3] 王進琦編著。1990。微生物學實驗。藝軒圖書出版社。臺北市。546 頁。
楊美桂編著。2004。普通微生物學實驗。藝軒圖書出版社。臺北市。187 頁。
- [4] Z. Zainal, N. Saravanan, N. S. Fang, "Electrochemical assisted photodegradation of oxalate ions using sol-gel coated TiO₂ on ITO glass", *Mater. Sci. Eng. B-Solid State Mater. Adv. Technol.*, 2004, 111, 57-63.
- [5] 林世明，摻雜氮元素之二氧化鈦薄膜改善光觸媒性質研究，國立成功大學環境工程學研究所碩士論文，台南 (2008)
- [6] Ryong Ryoo, J. M. Kim, C. H. Ko, and C. H. Shin, "Disordered Molecular Sieve with Branch Mesoporous Channel Network", *J. Phys. Chem.* 1996, 100, 17718-17721
- [7] Wei C, Lin W Y, Zainal Z *et al.*, *Environ.Sci.Technol.*, 1994, 28(5), 934.
- [8] Fujishima, Akira, Kenichi Honda, "Electrochemical Photolysis of Water at a Semiconductor Electrode". *Nature* 238, 1972, : 37-38
- [9] 高濂、鄭珊、張青紅(2004)。奈米光觸媒。台灣：五南出版
- [10] 藤島昭、橋本和仁、渡部俊也(2006)。圖解光觸媒。台灣：世茂出版
- [11] Phillip Sawunyama, Lei Jiang, Akira Fujishima, Kazuhito Hashimoto, "Photodecomposition of a Langmuir-Blodgett Film of Stearic Acid on TiO₂ Film Observed by in Situ Atomic Force Microscopy and FT-IR", *The Journal of Physical Chemistry B*, 1997, 101 (51), pp 11000-11003
- [12] Kenkichi Kobayashi, Yasumasa Tomita, Kazutaka Matsuhisa and Yuji Doi, Nano-photocatalytic decomposition of a stearic acid film deposited on the TiO₂ by an atomic force microscope, *Science Direct*, 2005, Volume 244, Issues 1-4, , Pages 389-393
- [13] Mechanisms of Aging, 檢索於 2010/1/3, <http://www.benbest.com/lifeext/aging.html#define.>
- [14] Feng-Shou Xiao, "Ordered mesoporous materials with improved stability and catalytic activity", *Topics in Catalysis* Vol.35 Nos 1-2, June 2005
- [15] Michael Grün, Klaus K. Unger, Akihiko Matsumoto, Kazuo Tsutsumi, "Novel pathways for the preparation of mesoporous MCM-41 materials: control of porosity and morphology", *Microporous and Mesoporous Materials* 27 (1999) 207-216
- [16] Z. Zainal, N. Saravanan, N. S. Fang, "Electrochemical assisted photodegradation of oxalate ions using sol-gel coated TiO₂ on ITO glass", *Mater. Sci. Eng. B-Solid State Mater. Adv. Technol.*, 2004, 111, 57-63.
- [17] Jon C, Sjogren, Raymond A. Sierka, "Inactivation of Phage MS-2 by Iron-Aided Titanium Dioxide Photocatalysis", *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(1): 344-347

[18] Yanhui Ao, Jingjing Xu, Degang Fu, Xunwei Shen, Chunwei Yuan , "Low Temperature Preparation of anatase TiO₂-coated Activated Carbon" , Colloids and Surfaces A : Physicochem. Eng. Aspects 312 (2008) 125-130

【評語】 040713

此作品以自製的奈米二氧化鈦，配合幾丁質及分子篩的添加，以提升其殺菌效果，其結果可能具有應用潛力。若能與目前常用的二氧化鈦進行殺菌力效果比較，則更能提升其未來應用潛力。此外，也建議測試幾株較為常見的細菌，使結果較有專一性，大範圍使用二氧化鈦可能需評估對該生態系的影響。