

區隔台灣市鎮污水與畜牧廢水之分析指標可行性研究

Research on sewage and livestock wastewater pollution indicators of Taiwan

計畫編號：NSC88-2313-B-002-054

執行期限：87年8月1日至88年7月31日

主持人：周晉澄 國立台灣大學獸醫學系

一、摘要

本研究的目的為使用不同種動物不同糞脂醇類分子化合物之含量與比例的特性，作為台灣本土人源與動物源污廢水污染河川水體之標記的可行性研究。糞脂醇是高等哺乳類腸道分解排出之特異性物質，其於環境中與底泥沉澱微粒結合後非常穩定，故可以之作為生物源污染之依據。樣本首先以二氯甲烷萃取並以MSTFA及催化劑（TMSI / dichloromethane / triethylamine, 142:858:2）衍生，再以氣相層析質譜儀定性與定量分析脂醇類化合物。本土樣本特性則以市鎮污水與畜牧廢水（豬源與牛源）脂醇類之量與種類或比例之關係，將之歸納比較後，求得區分指標值即（Coprostanol ÷ Epicoprostanol）× Coprostanone，因不同源有不同之適用標記，故可做為環境中各類生物污染監測依據。廢水處理前後脂醇類之種類與量之不同，亦可為畜牧廢水有否處理與適切處理後排放檢測根據之用。

關鍵詞：糞脂醇、污染指標、
氣相層析質譜分析。

Abstract

The aim of this research was to study the possibility of utilizing animal fecal sterols from humans and animals as the markers to distinguish fecal pollution in receiving waters of Taiwan's river. Fecal sterols are present in mammalian feces and they are reduced from cholesterol by the colonic microbacteria. Sterols are stable in the environment when they are absorbed to particulate matters in the sediment and sludge. Thus, after clean up and extraction, sterols can be qualified and quantitated by gas chromatography/mass

spectrometric analysis. These sterols can be the good indicators of biopollution markers. Optimization of the cleanup, extraction, and GC/MS analysis are studied in this study. Domestic sewage, livestock wastewaters were investigated thereafter to characterize the specific types, amount and their ratio of the sterols, and these spectra were served as the field monitoring reference indicators whether livestock wastewater are treated or not before they are dumped into the receiving waters.

Keywords: fecal sterols, pollution indicators, GC/MS

二、緣由及目的

為了評估各種生物源對水質污染的程度，進而加以針對污染源作處理及管制，因此以特異性污染指標區分人源與動物源排水之研究有其必要。在微生物方面可藉由腸球菌菌種的鑑定來區分人源與動物源之污染^[13]。本實驗室曾提出相對的假設性指標X比值，即以水樣之（*E. durans* + *E. hirae*）總菌量除以（*E. faecalis* + *E. faecium*）之總菌量後所得。初步結論顯示，豬源水樣之比值顯著且穩定的高於人源^[15]。然而水中微生物指標菌的降解會受到外在環境中溫度、酸鹼值、鹽度、毒性物質、營養元、陽光照射與在水中時間的長短等因素所影響^[5,7,9]。McCalley等（1980）提出另一可行的特異性指標，即利用糞便固醇與固酮之檢測。而糞便之固醇與固酮主要來自cholesterol的降解與食物。當coprostanol沈降於底泥時，在厭氧的環境下，可維持長時間不被分解^[23]，且氯化及曝氣等處理對coprostanol不會造成明顯的影響，因此在海水或其他含鹽分的水質檢測中，被視為一個很好的市鎮污水污染指

標^[24]。

不同種別的動物由於攝取的固醇、代謝途徑及腸道內微生物菌叢之不同，糞便中的固醇類化合物也會有不同的組成特性^[14]，此稱之為固醇指紋（Sterol Fingerprints），因之Leeming等（1996）提出可以用之區分不同生物源污廢水之假說。人與豬之糞便固醇類與固酮類化合物含量比例相近，但豬僅為人之1/10-1/4。人糞便之固醇與固酮類化合物主要成份為coprostanol，其他動物則含量明顯較少；如貓與豬僅為人之十分之一，草食獸、狗、禽類等則更低。草食獸之糞便以24-ethylcoprostanol為主，狗及禽類的腸道中，能分解⁵⁻或^{5.22-}sterols成stanols的厭氧細菌較少，所以糞便中的5-和5-stanols量不多。羊的糞便中有5%的24-ethylepicoprostanol，於其它動物則不曾被檢出。以sitosterol而言，人類糞便中的量則遠低於其他家畜禽，如豬、牛、羊、狗、貓、鴨各為人之6、6、8、7、6、18倍^[14,19]。

由於fecal sterols中的coprostanol以及cholesterol在操作系統中大部份會和污泥結合，因此在放流河流的底泥中，其coprostanol及cholesterol的含量會明顯的較少，如此可以推論經三段式處理後才放流之附近河流底泥的脂醇含量應比未經處理便放流者要相對低的多，反之若未處理便排放，則與底泥結合之coprostanol及cholesterol的量將很高。如果上述成立，當可作為評估畜牧場的污廢水是否真的經過三段式處理的依據。本研究的目的是在於利用脂醇類分子物質作為區分人源與動物源污廢水排放之根據，因此首先要建立脂醇類物質的萃取與分析方法，再依本土市鎮污水與畜牧廢水之處理前後特性分析比較，找出可用之以區分的脂醇特異性指標，以為生物廢水安全排放監測使用。

三、研究材料與研究方法

採取表層4公分以內深度之底泥，置入玻璃瓶中，於4、避光下運送回實驗室。

將樹枝、樹葉及石塊等異質物與水粗篩濾除，再經離心1500 g、4分鐘，取其下層沉澱物乾燥保存備用。使用時將乾燥底泥樣品研磨，並以0.25 mm不鏽鋼篩網篩選至少10 g樣本。樣本以下述步驟進行三重複分析。將0.5 g底泥樣品與等重無水硫酸鈉混合，倒入離心管。加入10 mL之0.5 N氫氧化鉀之甲醇溶液，於超音波水浴器中60、60分鐘。冷卻後，調整pH值至7.0，再加入10 mL水及20 mL二氯甲烷，劇烈搖晃2分鐘後靜置，有機層以Whatman 40號濾紙將固形物去除，收集濾液至圓底瓶中。上述萃取步驟重覆二次。將萃液減壓濃縮至乾，再溶解於1 mL正己烷中。固相管柱以5 mL正己烷預洗，將上述樣品轉移至管柱中，以0.5 mL之正己烷清洗圓底瓶兩次，併同移入管柱內。以5 mL正己烷沖提除去可能的污染物，捨棄沖提液。加入1.5 mL丙酮溶劑於管柱，重複沖提4次。收集之沖提液以氮氣濃縮吹乾，加入80 μ L的MSTFA及1 μ L催化劑（TMSI / dichloromethane / triethylamine, 142:858:2），於超音波水浴器中60、60分鐘，衍生為TMS ethers。冷卻後加入內部標準品5-cholestane，取1 μ L注入HP 6890 GC/5972MSD分析。層析管柱為30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m film thickness之HP-50⁺毛細管柱，管柱流速每分鐘2 mL；烘箱升溫條件設定180 維持1分鐘，以20 /min的速度升溫至270，再以30 /min至295 維持8分鐘。整個流程共14.33分。主要分析脂醇類分子為coprostanol、epicoprostanol、cholesterol coprostanone、24-ethylcoprostanol及sitosterol等。環境底泥檢測樣本採自各種污染源廢水：（1）不同動物畜殖場（豬源3處、牛源1處、鴨源1處）；（2）市鎮污水處理廠排放口下游4處；及（3）高屏溪溪水檢測：圓富排水1處（上游）、萬丹排水2處（中下游）及隘寮溪上游1處臨近養豬區之排放渠底泥，檢測分析糞便固醇與固酮類化合物含量。

四、結果與討論

九種衍生固醇、固酮類化合物與內部標準品之分子離子及含量最高之八個離子整理於表1。各固醇與固酮接上三甲基矽基後，分子離子較衍生前增加72 a.m.u.，所形成之分子離子除了coprostanol與epicoprostanol外，相對百分比介於10-29%；而coprostanol與epicoprostanol分子在電子撞擊後，分子離子相對百分比低於0.5%。Coprostanol(5, 3)、epicoprostanol(5, 3)與cholestanol(5, 3)三個立體異構物，衍生後於GC的HP-50⁺管柱上有良好的分離，所產生之質譜亦可加以區別。其餘固醇與固酮含此離子明顯較少，而cholestanol則幾乎不產生此種斷裂。

各化合物SIM定量離子的選定，除了內部標準品選定217 m/z作定量外，其餘九種固醇與固酮類化合物皆以370 m/z以上之離子進行定量。表2為SIM之設定條件，各化合物挑選兩個偵測離子，其一為定量離子，另一作為定性輔助之用。九種固醇與固酮類化合物在0.2-20 ng/μL範圍內線性相關良好，R²均在0.997以上，偵測極限介於9-30 pg之間。

九種固醇與固酮類化合物以MSTFA加催化劑均可達完全衍生之效果，coprostanone於衍生後可分離出兩個同分異構物波峰。於室溫下，四天的26次分析中，九種固醇與固酮衍生化合物的濃度並未有顯著之差異(p < 0.05)，其變異係數值介於3.76% - 6.13%。各固醇與固酮的平均回收率介於coprostanone的78%與stigmasterol的89%之間，變異係數為5-11%。

表3為各生物源放流口底泥之固醇與固酮檢測結果。市鎮污水處理廠排放口下游底泥之固醇與固酮以coprostanol與cholesterol為主，兩者共佔74%，植物性固醇sitosterol僅佔3%，明顯低於其他動物之13%(豬源)，19%(牛源)與44%(鴨源)，此結果與Leeming等(1996)與Nichols等(1996)之報告相吻合；豬源固醇與固酮組成類似人源，同樣以

coprostanol與cholesterol為主，但epicoprostanol與sitosterol較人源為高；鴨源與牛源之放流口底泥皆以cholestanol、cholesterol及sitosterol為主，而鴨源之sitosterol 44%，及三種植物性固醇總和54%，含量比例顯著高於其他動物；鴨源cholesterol之降解產物coprostanone、epicoprostanol與coprostanol共為3%，顯著低於其他動物之39%(人源)，45%(豬源)與16%(牛源)，此結果是因鴨腸道內較缺乏將cholesterol降解之厭氣菌所致。由上述之結果得知各生物源廢水底泥中的固醇與固酮組成有其特殊性。因此，提出一區分指標以為評估之用，其為(Coprostanol ÷ Epicoprostanol) × Coprostanone，主要考量此三種化合物為高等動物腸道中cholesterol降解之中間與最終產物，一般食物及飼料中幾乎不含有，因此不受飲食不同而影響，且具有甚高之來源專一性，而不同動物腸道內之厭氣菌組成不同，降解cholesterol之途徑亦有差異。此區分指標於人源之值為91 ± 26%，豬源為22 ± 14%，牛源為2.27 ± 0.06%，與鴨源為0.66 ± 0.07%；人源廢水之值顯著高於其他動物。

為評估底泥糞便固醇與固酮是否可實際作為區分之污染指標，另外選取了豬源污染為主之高屏溪上游圓富排放渠、萬丹坑子橋兩處及上游約有1-2萬頭在養豬的隘寮溪進行底泥之檢測。於圓富與萬丹與隘寮溪的檢測中，可見九種固醇與固酮之含量比例接十分相近於豬源檢測結果，均以coprostanol為最高，並且三種植物性固醇含量為20%、27%與29%，相近於豬源之18%，而較異於人源之9%；區分指標值分別為35%、17%與26%，亦近於豬源之22%，而異於人源之91%，此結果指出以上各點之污染傾向來自於豬源。

五、計畫成果自評

在衍生的情況下，可將九種固醇、固酮化合物分別定性及定量，因此，氣相層析質

譜儀對於固醇與固酮類化合物而言為適切之分析儀器。於各種高等哺乳類動物源糞便廢水之辨認上，九種固醇與固酮組成具動物種別特異性，人源廢水之高區分指標值與低植物性固醇，可明確的與其他動物區別。鴨源之低cholesterol降解率，與高sitosterol比例亦具很高之特異性。因此本研究之分析方法除了可作為底泥coprostanol之檢測方法外，尚可實際應用於本土環境生物源污染之檢測。

六、參考文獻

- [1] Adachi J, Ueno Y, Miwa A, Asano M, Nishimura A, Tatsuno Y. Epicoprostanol found in adipocere from five human autopsies. *Lipids*. 1997. 32: 1155-1160.
- [2] American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th edit. 1992. American Public Health Association, Inc. Washington DC.
- [3] Bartlett PD. Degradation of coprostanol in an experimental system. *Mar Poll Bull*. 1987. 18: 27-29.
- [4] Benfenati E, Cools E, Fattore E, Fanelli R. A GC-MS method for the analysis of fecal and plant sterols in sediment samples. *Chemosphere*. 1994. 29: 1393-1405.
- [5] Bissonnette GK, Jezeski JJ, McFeters GA, Stuart DG. Influence of environmental stress on enumeration of indicator bacteria from natural waters. *Appl Microbiol*. 1975.
- [6] Brooks CJW and Middleditch BS. Some aspects of mass spectrometry in steroid analysis. *Modern methods of steroid analysis*. 1973. Academic press. New York and London.
- [7] Cheryl MD, Lilian ME. Sunlight and the survival of enteric bacteria in natural waters. *J Appl Bacteriol*. 1991. 70: 265-274.
- [8] Chou CC and Liu YP. Investigation of water pollution indicators for duck and cattle wastewater in Taiwan. *J Chin Soc Vet Sci*. 1999. 25: 96-103.
- [9] Fujioka RS, Narikawa OT. Effect of sunlight on enumeration of indicator bacteria under field condition. *Appl Environ Microbiol*. 1982. 44: 395-401.
- [10] Hewlett-Packard company. HP GC-MSD ChemStation and instrument operation. Analytical education. 1998. Hewlett-Packard Company America's Technical Center, USA.
- [11] Jeng WL, Han BC. Coprostanol in a sediment core from the anoxic Tan-Shui Estuary, Taiwan. *Estuar Coast Shelf Sci*. 1996. 42: 727-735.
- [12] Jeng WL, Huh CA, Chen CL. Alkanol and sterol degradation in a sediment core from the continental slope off southwestern Taiwan. *Chemosphere*. 1997. 35: 2515-2523.
- [13] Leclerc H, Devriese LA, Mossel DAA. Taxonomical changes in intestinal (fecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of fecal contamination in drinking water. *J Appl Bacteriol*. 1996. 81: 459-466.
- [14] Leeming R, Ball A, Ashbolt N, Nichols P. Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters. *Water Res*. 1996. 30: 2893-2900.
- [15] Lin YC. Specific water pollution indicators investigation for domestic sewage and swine waste water. 1997. Institute of Veterinary Medicine, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.
- [16] Masse R, Ayotte C, Dugal R. Studies on anabolic steroids. *J Chromatogr B*. 1989. 489: 2086-2095.
- [17] McCalley DV, Cooke M, Nickless G. Coprostanol in severn estuary sediments. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1980. 25: 374-381.
- [18] McCalley DV, Cooke M, Nickless G. Effect of sewage treatment on faecal

- sterols. *Water Res.* 1981. 15: 1019-1025.
- [19] Nichols PD, Leeming R, Rayner, MS, Latham V. Use of capillary gas chromatography for measuring fecal-derived sterols application to stormwater, the sea-surface microlayer, beach greases, regional studies, and distinguishing algal blooms and human and non-human sources of sewage pollution. *J Chromatogr A.* 1996. 733: 497-509.
- [20] Paul JH, Rose JB, Jiang S, Kellogg C, Shinn EA. Occurrence of fecal indicator bacteria in surface aquifer in Key Largo, Florida. *Appl Environ Microbiol.* 1995. 61: 2235-2241.
- [21] Sherwin MR, Vleet ESV, Fossato VU, Dolci F. Coprostanol (5 beta-cholestan-3 beta-ol) in lagoonal sediments and mussels [25] of Venice, Italy. *Mar Poll Bull.* 1993. 26: 501-507.
- [22] Takada H, Farrington JW, Bothner MH, Johnson CG, Tripp BW. Transport of sludge-derived organic pollutants to deep-sea sediments at deep water dump site 103. *Environ Sci Technol.* 1994. 28: 1062-1072.
- [23] Venkatesan MI, Kaplan IR. Sedimentary coprostanol as an index of sewage addition in Santa Monica Basin, Southern California. *Environ Sci Technol.* 1990. 24: 208-214.
- [24] Venkatesan MI, Santiago CA. Sterols in ocean sediments: novel tracers to examine habitats of cetaceans, pinnipeds, penguins and humans. *Mar Biol.* 1989. 102: 431-437.

表1. 內部標準品與衍生固醇、固酮之分子離子及含量最高八個質量電荷比離子。

化合物	分子離子(%)	質量電荷比 (%)
5 -cholcholestane	372 (21)	217 (100), 55 (62), 81 (57), 67 (56), 149 (55), 218 (53), 95 (53), 109 (47)
Coprostanone	458 (29)	143 (100), 73 (66), 142 (42), 127 (29), 458 (29), 75 (28), 57 (24), 55 (22)
Coprostanol	460 (<0.5)	370 (100), 355 (40), 75 (33), 215 (32), 371 (27), 93 (20), 57 (18), 107 (18)
Epicoprostanol	460 (<0.5)	370 (100), 75 (74), 215 (73), 355 (37), 216 (36), 95 (29), 73 (28), 257 (28)
Cholestanol	460 (10)	75 (100), 215 (48), 73 (31), 55 (31), 81 (31), 95 (30), 107 (29), 216 (28)
Cholesterol	458 (17)	129 (100), 75 (79), 73 (68), 329 (54), 368 (50), 105 (49), 91 (47), 95 (47)
Cholestanone	458 (28)	143 (100), 73 (62), 142 (57), 127 (48), 75 (37), 55 (30), 57 (29), 458 (28)
Campesterol	472 (15)	129 (100), 73 (87), 75 (60), 343 (51), 55 (39), 382 (39), 105 (38), 119 (37)
Stigmasterol	484 (12)	55 (100), 73 (92), 129 (91), 83 (78), 69 (61), 75 (60), 81 (52), 255 (38)
Sitosterol	486 (12)	129 (100), 73 (79), 57 (57), 75 (54), 357 (42), 55 (39), 119 (35), 396 (35)

表2. 內部標準品與固醇及固酮化合物之SIM模式選擇離子。

群組	化合物	定量離子	確認離子	理論比例
1	5 -cholestane	217.3	372.4	4.76
2	Coprostanone-TMS	458.5	143.2	0.29
	Coprostanol-TMS	370.5	215.3	3.13
	Epicoprostanol-TMS	370.5	215.3	1.37
3	Cholestanol-TMS	460.5	215.3	0.21
	Cholesterol-TMS	458.5	329.4	0.31
4	Cholestanone-TMS	458.5	143.2	0.28
5	Campesterol-TMS	382.5	129.2	0.39
	Stigmasterol-TMS	394.4	129.2	0.20
6	Sitosterol-TMS	396.5	357.4	0.83

表3.各源底泥中固醇與固酮之含量比例，單位為%。括號內為採樣數。

	人源 (4)	豬源 (9)	牛源 (1)	鴨源 (1)	圓富 (1)	萬丹 (2)	隘寮溪 (1)
Coprostanone	2.37 ± 2.32	4.15 ± 2.17	0.77 ± 0.04	0.21 ± 0.01	5.06 ± 0.05	3.75 ± 0.67	5.19 ± 0.03
Coprostanol	35.58 ± 4.56	33.96 ± 8.21	11.52 ± 0.22	2.29 ± 0.20	46.69 ± 0.04	35.94 ± 4.51	37.85 ± 0.70
Cpicoprostanol	0.93 ± 0.91	6.76 ± 3.82	3.90 ± 0.10	0.74 ± 0.02	6.82 ± 0.14	8.20 ± 1.66	7.55 ± 0.23
Cholestanol	14.10 ± 2.31	11.90 ± 2.66	17.69 ± 0.22	22.96 ± 0.51	5.46 ± 0.01	9.39 ± 2.00	6.50 ± 0.12
Cholesterol	37.67 ± 6.50	23.76 ± 8.73	37.22 ± 0.27	20.00 ± 2.68	15.41 ± 0.17	14.02 ± 0.64	11.96 ± 0.17
Cholestanone	0.73 ± 0.52	1.17 ± 0.88	0.72 ± 0.04	0.12 ± 0.01	0.81 ± 0.01	1.42 ± 0.53	1.39 ± 0.04
Campesterol	4.77 ± 2.09	3.71 ± 1.71	4.37 ± 0.28	5.88 ± 0.11	5.10 ± 0.03	5.68 ± 0.08	6.24 ± 0.09
Stigmasterol	0.82 ± 0.49	1.94 ± 1.53	4.84 ± 0.11	3.94 ± 0.14	2.14 ± 0.04	4.19 ± 0.51	5.37 ± 0.09
Sitosterol	3.03 ± 2.01	12.65 ± 2.90	18.96 ± 0.23	43.85 ± 2.37	12.51 ± 0.02	17.40 ± 0.30	17.94 ± 0.43
區分指標值	91.32 ± 25.06	22.35 ± 13.52	2.27 ± 0.06	0.66 ± 0.07	34.61 ± 0.76	16.56 ± 2.51	26.04 ± 0.80

區分指標值：(Coprostanol ÷ Epicoprostanol) × Coprostanone