

[illegible]

計畫主持人：周晉澄

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

中 華 民 國 八 十 九 年 九 月 十 五 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

以底泥糞脂醇探討畜牧廢水之時序性變化

Temporal change investigation of livestock wastewater pollution by
using sediment fecal sterol

計畫編號：NSC89-2313-B-002-071

執行期限：88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

主持人：周晉澄 國立台灣大學獸醫學系

計畫參與人員：林彥嵐、馮玉琳 國立台灣大學獸醫學系

一、摘要

本研究以豬場排放渠下游不同深淺層之底泥樣本糞脂醇含量與其比例特性，作為養豬場廢水污染河川水體之時序性消長標記。糞脂醇是高等哺乳類動物腸道分解排出之特異性物質，其於厭氧環境與底泥中非常穩定，因之可為生物時序性污染研究依據。由在養豬場與因口蹄疫停養後未再復育之豬場排樣放渠下游底泥糞脂醇特性與含量分析比較得知，在養豬場下層底泥因長期累積效應的影響，其檢測量較上層高但無種類比例差異。對已棄養之豬場而言，分層底泥含量比例則有顯著的時序性差異，下層含量明顯高出上層。檢測地區以屏東縣之糞脂醇含量最高，並超出多國檢測值許多，此與其飼養規模而造成的污染有關。

關鍵詞：糞脂醇、污染指標、時序性變化、氣相層析質譜儀分析

Abstract

The aim of this study is through animal fecal sterols in different layers of bottom sediment located at the downstream of the animal raising farms to study the temporal changes of livestock wastewater pollution. Fecal sterols are presented in mammalian feces. They are very stable in both anaerobic environment and the bottom sediment. Thus, fecal sterols can be used to study the time trend difference of biota pollution. This project selected treated

wastewater discharging downstream of the densely piggery raising area and aged pig farm destroyed by foot-and-mouth disease outbreak to compare the sterols difference in different bottom sediment layers of previous pollution. The results showed that bottom layer of the sediment in current raising farm had a higher concentration of sterols than the upper layer but did not have sterol profile difference. On the contrary, not only the concentration but also the profiles of the sterol in bottom layer of aged farm were all different from the upper layer. An easy distinguishable of the pollution due to time difference can be reached.

Keywords: fecal sterols, pollution indicators, temporal changes, GC/MS

二、緣由與目的

生物源廢水不當的排放，除了有機質污染河川、改變生態、造成美學上的不雅外，尚有水媒疾病傳播之公共衛生上的隱憂。因此，市鎮污水與畜殖廢水都需經過處理，減廢至放流水標準才可排放[1]。河川污染監測以生物需氧量、化學需氧量、懸浮固體、磷、氨氮等非特異性指標為主。生物源污染則以糞大腸桿菌群（FC）與糞鏈球菌群（FS）菌落數表之。然 FC 與 FS 對不同環境條件敏感[2,3,4]，加上其對不同污染源之識別能力受到懷疑[5,6]。因此，欲以 FC 與 FS 區別污染源的污染特性需更進一步的分析與解釋。

[7,8], 而且亦只能表示採樣時間之污染情況, 不能說明不同時間點, 尤其是長時間之污染變化態勢。

糞脂醇為高等動物腸道微生物降解膽固醇而得之特殊產物[9], 不同動物種別之糞脂醇組成不同, 稱之為脂醇指紋 (sterol fingerprint) [10], 因此可以區分不同生物源污廢水。人糞便糞脂醇之主要成分 coprostanol 於其他動物中含量明顯較少, 草食獸以 24-ethylcoprostanol 為主, 羊的糞便中有 5% 的 24-ethylepicoprostanol, 人類糞便中的 sitosterol 量則遠低於其他家畜禽[10]。故上述特性用以區分市鎮污水與畜牧廢水造成之污染是可能的。

糞脂醇於底泥中不易分解且具累積效應, 因此可以用來評估過去之污染。不同層底泥之糞脂醇為不同時間累積所得, 長時間之污染態勢可以依此而知。如由歐洲 Constance 湖底沈積物分析, 得知過去百年來 coprostanol 之量與日俱增[11]。但是只以 coprostanol 來分析與推估則尚需考量不同哺乳動物之排泄物所產生之干擾, 如西元前 3500 年之南極海岸土層可分析出 coprostanol 與 epicoprostanol[12], 此 coprostanol 並非人類的遺跡, 而是海洋哺乳類動物所產生。Epicoprostanol 為 coprostanol 的結構異構物, Epicoprostanol 的量會隨著廢水處理消化時間增加而增加[14], 檢測放流口底泥 epicoprostanol 的含量可以評估廢水是否有經適當的處理。

糞脂醇於廢水的研究大都用於探討污染排放及用於各種高等哺乳動物源糞便廢水之辨認。台灣在 80 年代中起要求豬場必須處理養豬與其他畜殖糞尿廢水, 因之廢水放流下游不同深度底泥糞脂醇含量應可反應不同年代之污染態勢。本計畫即利用脂醇類及其相關分子物質作為畜殖污廢水不同時空排放污染監測依據, 除了依循上一年度建立的脂醇類物質之萃取與分析方法外, 並尋找有代表性之樣本及適宜之採樣方法, 依不同層底泥以推估污染排放, 以為廢水安全排放使用。

三、研究材料與研究方法

本研究需要尋找足夠深度的底泥, 而且要有厭氧及上層無劇烈沖刷的環境。採樣以 Wildco Instrument 公司的內徑 4.3 公分長度可由 52 公分延伸至 300 公分之 hand corer 沿岸及淺水底泥採樣器採集可分層樣本。台灣之疏濬道與小河流在近幾年來幾乎都已經過整治, 底部多已鋪上水泥層, 水流速度快底泥難以累積, 因此選地更加困難。本研究累計合於選地條件樣本共計 28 個, 其中在養豬場樣本 26 個, 來自於竹南、屏東縣萬丹坑子橋、隘寮溪上游、崙上鄉、新潭鄉及台南縣下營鄉等處, 上述樣本可分為屏東區 (約一萬頭以上的大型豬場匯流渠)、竹南區 (約一千頭左右的中型豬場匯流渠) 及台南區 (一千頭以下的小型豬場匯流渠)。另過去因口蹄疫爆發後未再復養的豬場排放渠者有屏東圓富及台南 C 場 2 個樣本; 樣本中除崙上豬場底泥可分三層外, 大部份的底泥樣本只能分兩層或無法分層。

底泥樣本取回後, 依土柱高度分層處理。樣本以 1500 g 離心 4 分鐘, 待沉澱物乾燥後再研磨, 並通過 0.25 mm 不鏽鋼篩保存備用。使用時, 樣本依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 60°C、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。重覆上述萃取步驟二次。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, 並以 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。收集之沖提液以高純氮氣濃縮吹乾, 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°C, 60 分鐘, 衍生為 TMS ethers。冷卻後加入內部標

準品 5 α -cholestane，取 1 μ L 注入 HP 6890 GC/5972 MSD 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 $^{\circ}$ C 維持 1 分鐘後以 20 $^{\circ}$ C/min 的速度升溫至 270 $^{\circ}$ C，再以 30 $^{\circ}$ C/min 至 295 $^{\circ}$ C 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 及 sitosterol 等。

四、結果與討論

屏東、竹南與台南三個地區的糞脂醇含量統計分析（有分層樣本者以上層樣本為主）結果顯示 coprostanol 與 epicoprostanol 在三個地區並沒有顯著差異，其餘糞脂醇檢測項目含量則有顯著差異；各項糞脂醇檢測含量最高的地區皆在屏東區，可能原因與該地區的飼養規模有關。如加上中、下層的底泥糞脂醇檢測結果進行分析，則三個地區的每一種糞脂醇含量皆有顯著差異。整體而言，因 coprostanol 為 cholesterol 代謝最終產物，所以含量會較其他 8 種檢測糞脂醇高，因此 coprostanol 具有可以用為偵測此類污染指標之特性。

底泥樣本分層統計分析顯示，下層含量顯著高於上層的糞脂醇種類為 coprostanol、epicoprostanol、campesterol、sitosterol，沒有顯著差異的種類為 cholesterol、cholestanol、cholestanone、stigmasterol，而 coprostanone 則介於兩者之間（ $P=0.508$ ）。以上 9 種糞脂醇中，上下層有顯著差異者大多為含量比例佔多數者，而原本就很微量的糞脂醇，則無上下層的區別。

在養豬場的上下層糞脂醇含量比例並無顯著差異（圖一），但已停養的台南 C 豬場排放渠底泥之固醇含量，下層含量顯著高於上層，糞脂醇比例亦不同。圓富排放渠的底泥非常淺，未能作分層檢驗，但由其糞脂醇比例分佈情形推論，因停養後豬源污染源被河水冲刷而逐漸減少，來自於人類的污染源逐漸取代之，由區分指標值 34.6%

$((\text{coprostanol} \div \text{epicoprostanol}) \times$

coprostanone) 較其他豬源高可證明之。

由底泥特性發現，若養豬廢水未經厭氣處理就直接排出水體中，取得之底泥樣本會呈現持續進行厭氣發酵的現象，該樣本檢測出的 coprostanol 與 epicoprostanol 量和直接由厭氣處理槽中取得之污泥檢測結果類似，糞脂醇檢測量皆呈現極高值。區分指標不適用於此種狀態之底泥，意即未經處理之豬糞尿排放水底泥不能依此指標評估之。除上述狀態之底泥外，其餘豬源底泥之指標值平均為 $20 \pm 11\%$ ，與上年度所推算出的範圍（ $22 \pm 14\%$ ）相去不遠，此代表豬源底泥之區分指標應在此範圍中，可與人源（ $91\% \pm 26\%$ ）、牛源（ $2.27\% \pm 0.06\%$ ）或禽類（ $0.66\% \pm 0.07\%$ ）區分之。

由其他國家之底泥調查顯示，coprostanol 範圍在 0.01–41 μ g/g 之間 [19]。前人亦曾於台灣高雄港及淡水河作檢測，其檢測值為 0.42–110 μ g/g 與 0.71–163 μ g/g [20]。而本研究之竹南、台南及屏東三個地區的含量為 2.54 ± 1.54 μ g/g、 0.42 ± 0.57 μ g/g 及 212.83 ± 369.85 μ g/g，屏東地區的檢出量較其他地區顯著高出許多。從屏東區與高雄港及淡水河之資料而言，污染相對於外國為嚴重。

綜合上述，不同年代的底泥在累積效應的影響下，上下層確實呈現相當明顯的差異。豬場排放水若未經三段式廢水處理後排放，廢水會在河流底泥中進行厭氣發酵作用，使各項糞脂醇含量大幅增加，尤其是以 coprostanol 與 epicoprostanol 兩者為主。屏東地區採樣點糞脂醇污染量已明顯高於其他國家及台灣其他地區的調查，因此建議養豬戶落實廢水處理系統使用以減少污染狀況。

五、計畫成果自評

本計畫已完成豬場排放渠下游之底泥檢測，並依豬場分佈及規模特性分成竹南、台南及屏東三區，比較三個地區糞脂醇含量及比例之相關性。另分層底泥樣本亦進行上下層含量之比較及在養與否之時序性關係。研究結果顯示台灣目前豬糞尿廢水造成

之污染現況，並建議改善之。

六、參考文獻

- [1] 行政院環保署。1993。放流水標準。水污染防治法規。台北。行政院環保署。
- [2] Bissonnette GK, Jezeski JJ, McFeters GA, Stuart DG. 1975. Influence of environmental stress on enumeration of indicator bacteria from natural waters. Appl Microbiol. 29:186-194.
- [6] American Public Health Association. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th edit. American Public Health Association, Inc. Washington DC.
- [7] Chou CC and Liu YP. 1999. Investigation of water pollution indicators for duck and cattle wastewater in Taiwan. J Chin Soc Vet Sci. 25(2): 96-103.
- [8] Lin YC. 1997. Specific water pollution indicators investigation for domestic sewage and swine waste water. Institute of Veterinary Medicine, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.
- [9] Kellogg TF, Wostmann BS. 1969. Fecal neutral steroids and bile acids from germ free rats. J. Lipid Res. 10:495-503.
- [10] Leeming R, Ball A, Ashbolt N, Nichols P. 1996. Using faecal sterols from humans and animals to distinguish faecal pollution in receiving waters. Water Res. 30: 2893-2900.
- [11] Mueller G, Kanazawa A, Teshima S. 1979. Sedimentary record of fecal pollution in part of lake Constance by coprostanol determination. Naturwissenschaften. 66:520-522.
- [12] Venkatesan MI, Ruth E, Kaplan IR. 1986. Coprostanol in Antarctic marine sediments: a biomarker for marine mammals and not human pollution. Marine Pollution Bulletin 17(12):554-547.
- [13] Adachi J, Ueno Y, Miwa A, Asano M, Nishimura A, Tatsuno Y. 1997.
- [3] Cheryl MD, Lilian ME. 1991. Sunlight and the survival of enteric bacteria in natural waters. J Appl Bacteriol. 70: 265-274.
- [4] Fujioka RS, Narikawa OT. Effect of sunlight on enumeration of indicator bacteria under field condition. Appl Environ Microbiol. 1982. 44: 395-401.
- [5] McFeters G, Kippin JS, LeChevallier MW. 1986. Injured coliforms in drinking water. Appl. Environ. Microbiol. 51:1-5.
- Epicoprostanol found in adipocere from five human autopsies. Lipids. 32: 1155-1160.
- [14] McCalley DV, Cooke M, Nickless G. 1981. Effect of sewage treatment on faecal sterols. Water Res. 15: 1019-1025.
- [15] Matusik JE, Hoslin GP, Sphon JA. 1988. Gas chromatographic/mass spectrometric confirmation of identity of coprostanol in Mercenaric mercenaria (Bivalvia) taken from sewage-polluted water. J AOAC. 71: 994-999.
- [16] Gerhardt KO, Gehrke CW, Rogers IT, Flynn MA, Hentges DJ. 1977. Gas-liquid chromatography of fecal neutral steroids. J. Chromatogra. 135:341-349.
- [17] Benfenati E, Cools E, Fattore E, Fanelli R. 1994. A GC-MS method for the analysis of fecal and plant sterols in sediment samples. Chemosphere. 29: 1393-1405.
- [18] Vahl HH, Karbe L, Westendorf J. 1997. Genotoxicity assessment of suspended particulate matter in the Elbe river: comparison of Salmonella microsome test, arabinose resistance test, and *umu*-test. Mutation Research 394:81-93.
- [19] LeBlanc LA, Latimer JS, Ellis JT, Quinn JG. The geochemistry of coprostanol in waters and surface sediments from Narragansett Bay. Estuar Coast Shelf Sci. 1992. 34:439-458.
- [20] Jeng WL, Han BC. Sedimentary coprostanol in Kaohsiung Harbour and the Tan-Shui Estuary, Taiwan. Mar Poll Bull. 1994, 28:494-499.

圖一、分層底泥中主要固醇與固酮含量比例圖

