

行政院環境保護署

102 年度土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案

有機堆肥分解受十溴二苯醚污染底泥及其生物多樣性

期末報告

主 辦 單 位： 行政院環境保護署

計畫執行單位：東吳大學／微生物系

計畫主持人：張怡塘 副教授

計畫執行期間：101年12月10日起至

102年12月09日

中 華 民 國 102 年 12 月 印製

土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案 成果自評表

請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況、研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）、是否適合在學術期刊發表或申請專利、主要發現或其他有關價值等，作一綜合評估。

1. 請就研究內容與原計畫相符程度、達成預期目標情況作一綜合評估

☒ 達成目標

☐ 未達成目標（請說明，以 100 字為限）

☐ 實驗失敗

☐ 因故實驗中斷

☐ 其他原因

說明：

2. 研究成果在學術期刊發表或申請專利等情形：

論文：☐已發表 ☐未發表之文稿 ☒撰寫中 ☐無

專利：☐已獲得 ☐申請中 ☐無

技轉：☐已技轉 ☐洽談中 ☐無

其他：（以 100 字為限）

3. 請依學術成就、技術創新、社會影響等方面，評估研究成果之學術或應用價值（簡要敘述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性）（以 500 字為限）

1. 學術成就: 十溴聯苯醚 (deca-bromodiphenyl ether, DBDE) 為工業上常用之溴系火焰阻燃劑來源，DBDE 因結構穩定、水中溶解度低，故在環境中傾向蓄積底泥，且很難經由生物直接降解，故易造成生態毒性，威脅生物體健康，是近年來受到重視的新興污染物。有機堆肥由於有高含量的可溶性有機碳，具有很好的還原能力，可當作良好電子提供者，將不同種類的環境污染物還原，可作為新興污染物之整治技術，本研究首次利用商用有機堆肥對受污染 DBDE 底泥進行厭氧生物降解。實驗結果證實堆肥可以吸附及生物分解方式有效移除 DBDE，其生物性還原作用機制是由高溴數聯苯醚逐步脫溴至低溴數聯苯醚同源異構物，另由生物多樣性結果偵測出脫鹵球菌及其功能性脫鹵基因，在其他國內外厭氧生物處理 PBDE 相關文獻中並不多見，預定將本實驗結果撰寫於國際性期刊論文。

2. 技術創新: 針對實廠應用，本研究提出離廠(off-situ)處理 DBDE 並同時達到底泥資源化之方案，建立綠色整治技術。實施做法上是先疏濬受 DBDE 污染之河川底泥，以離場方式送至商用有機堆肥處理場進行厭氧生物處理，調整化學組成比例後可作為土壤改良劑，達成底泥資源再利用之目標。另由於堆肥中含有許多具分解能力之厭氧及兼氧性細菌，策略上可用於其他含鹵素之苯環結構化合物如 PCB、TCE 等，待後續更進一步研究及實務發展。

摘要(簡要版)

十溴聯苯醚 (deca-bromodiphenyl ether, DBDE) 為工業上常用之溴系火焰阻燃劑來源，DBDE 因結構穩定、水中溶解度低，故在環境中傾向蓄積底泥，且很難經由生物直接降解，故易造成生態毒性，威脅生物體健康，是近年來受到重視的新興污染物。堆肥由於有高含量的可溶性有機碳，具有很好的還原能力，可當作良好電子提供者，將不同種類的環境污染物還原，可作為新興污染物之整治技術。本計畫是利用血清瓶建立厭氧微系統 (anaerobic microcosms)，利用台灣地區不同有機堆肥進行厭氧生物處理受 DBDE (20 mg/sediment-kg) 污染底泥，並於實驗過程中觀察隨時間變化所生成之脫溴產物之同源異構物，同時以分子生物技術分析微生物族群結構及其生物多樣性。

實驗結果發現實驗所選用三種有機堆肥樣本 (分別標示為 C2, C6, B2) 均具有高有機質成分，對 DBDE 具強烈吸持特性。添加有機堆肥進行厭氧生物降解 DBDE 結果可發現，其擬一階降解速率(k)為 C6 (0.0458 day^{-1}) > C2 (0.0352 day^{-1}) > B2 (0.0286 day^{-1})，其過程共測得 23 種 PBDEs 同源異構物。微生物族群結構方面，細菌域(Domain Bacteria)三種堆肥之微生物族群結構有很大不同。分子選殖結果除鑑定厭氧堆肥中常見之微生物之外，並發現許多具降解 DBDE 能力之微生物族群，如 *Pseudomonas* spp. 及 *Dehalococcoides* spp.。功能性基因實驗結果證實三種堆肥菌群中均具脫鹵基因，因此在實驗中發生生物性還原脫溴反應。本研究結果說明有機堆肥的確可有效移除受污染 DBDE 底泥，就工程實務而言，建議將河川底泥進行疏濬後，利用離場整治技術與底泥混合後進行厭氧生物處理，同時達到底泥資源化之目標。

Abstract(簡要版)

Decabromodiphenyl ether (DBDE) is a flame retardant commonly used in the industry, and it has become an emerging contaminant in recent years. Due to its structural stability and low solubility in water, DBDE has a tendency of accumulating in the sediment, increasing the difficulty of being biodegraded. Thus, DBDE can lead to ecotoxicity and threaten the health of various organisms. The study applies the high biological activity, richness in carbons and electron donors of three different organic composts, to evaluate the initial DBDE concentration (20 mg/sediment-kg) on the biological debromination efficiency in contaminated sediment. The anaerobic microcosms will be conducted in the serum bottles with DBDE-polluted sediments and compost sample. The DBDE concentration is measured by GC/PDECD during anaerobic biodegradation. PBDE congeners are measured by GC-MS. The change of bacterial community is measured by PCR-DGGE-Cloning during DBDE biodegradation. Functional genes of bacterial species such as reductive debromination genes and dioxygenases are measured by selective specific primers.

As a result, three sampling composts (C2, C6 and B2) with high organic compounds demonstrate the significant ability of DBDE adsorption. The *pseudo* rate constant (k) of the first order equation for anaerobic biodegradation of DBDE is compared as $C6 (0.0458 \text{ day}^{-1}) > C2 (0.0352 \text{ day}^{-1}) > B2 (0.0286 \text{ day}^{-1})$. Metabolites including 23 PBDE congeners are measured by GC-MS. The DGGE profiles are different during anaerobic DBDE biodegradation. *Pseudomonas* spp. and *Dehalococcoides* spp. related to DBDE biodegradation are identified in anaerobic microcosms. Amplification of PCR-products for biological debromination are positive. An approach of *off-site* bioremediation is mentioned to combine DBDE-contaminated sediment with commercial organic compost is suggested as the practical engineering technology of remediation.

專案成果摘要（詳細版）

十溴聯苯醚(deca-bromodiphenyl ether, DBDE)為工業上常用之溴系火焰阻燃劑來源，DBDE 因結構穩定、水中溶解度低，故在環境中傾向蓄積底泥，且很難經由生物直接降解，故易造成生態毒性，威脅生物體健康，是近年來受到重視的新興污染物。堆肥由於有高含量的可溶性有機碳，具有很好的還原能力，可當作良好電子提供者，將不同種類的環境污染物還原，可作為新興污染物之整治技術。本計畫是利用血清瓶建立厭氧微系統(anaerobic microcosms)，利用台灣地區不同有機堆肥進行厭氧生物處理受 DBDE (20 mg/sediment-kg) 污染底泥，並於實驗過程中觀察隨時間變化所生成之脫溴產物之同源異構物，同時以分子生物技術分析微生物族群結構及其生物多樣性。

實驗結果發現實驗所選用三種有機堆肥樣本均具有高有機質成分，對 DBDE 具吸持特性，台糖雲林堆肥廠蔗渣堆肥（兩個月與六個月，分別標示為 C2 與 C6），及南投旭惠公司所製備的兩個月厭氧堆肥（標示為 B2）。本研究建立之 DBDE 分析方法，回收率可達到 90-97% ($R^2 = 0.9991$)，方法偵測極限 (MDL) 可達 0.032 $\mu\text{g/g}$ 。大安溪橋底泥表層樣本為粉質壤土，有機質為 0.749%；義里大橋底泥表層樣本則為砂土，有機質為 0.474%，分析兩底泥樣本分別含有濃度 32 及 35 ng/kg DBDE，為最主要的 PBDEs 污染物，同時並偵測出二到九溴不等的同源異構物，其中 BDE-207 (1.28-3.12 ng/kg) 及 BDE-206 (1.5-1.8 ng/kg) 為次主要的污染物。有機堆肥生物吸附降解實驗結果發現，對堆肥吸附的貢獻，B2 的吸附貢獻百分比為 25.65%，C2 為 31.45%，C6 為 38.95%；生物降解貢獻百分比 B2 為 4.7%，C2 為 34.9%，C6 為 23.4%，C2 有最好的降解效果，以擬一階反應方程式表示其降解速率為 C6 (0.0458 day^{-1}) > C2 (0.0352 day^{-1}) > B2 (0.0286 day^{-1})，C6 有最快的降解速率。降解過程中分析其代謝產物發現可測得 23 種 PBDEs 同源異構物，可知生物降解過程是由 DBDE 逐一脫溴至低溴數(三溴)PBDEs。

分析微生物族群結構及功能性基因表現方法，實驗結果發現三種堆肥的微生物族群有很大的不同，細菌域 (Domain Bacteria) 方面，相同的堆肥降解 DBDE 過程發現，C2 的微生物族群並沒有太大的改變（條帶數 18-21-19），C6

的微生物族群改變較大 (條帶數 11-12-21)，其條帶數有逐漸增長趨勢，B2 的微生物菌群也發生改變 (條帶數 14-13-11)。然而在降解過程中古細菌域 (Domain Archaea) 族群並沒有明顯的改變。分子選殖 (cloning) 結果可鑑定出具有降解 DBDE 能力之微生物族群，例如 *Pseudomonas* spp. (相似度 97-99%)，在樣本中發現許多存在堆肥系統中之微生物族群，如 *Lactobacillus* spp. (相似度 99%)，*Clostridium* spp. (相似度 99%) 及 *Bacillus* spp. (相似度 99%)。利用 PCR 方法鑑定生物降解 DBDE 目標污染物之功能性基因表現，結果發現三種堆肥厭氧初期(0 個月)至末期(4 個月)均可偵測出脫鹵基因，推斷出三種堆肥降解 DBDE 過程中均進行生物性還原脫溴行為。此外亦有偵測出雙氧化酵素，推估在此厭氧堆肥降解過程中，存在某些兼性厭氧菌具有雙氧化酵素。本研究結果顯示所選擇之有機堆肥的確可移除 DBDE 污染底泥，並證實脫鹵基因之存在，可同時作為微生物、有機質以及營養源供應者，由於台灣河川底泥中普遍存在 DBDE，此研究成果可提供後續整治參考。工程實務上建議以離場(ex situ)整治方法進行，搭配河川底泥疏濬後進行混合有機堆肥進行厭氧生物處理，並可達到底泥資源化之效果。

一、報告大綱

本期末報告內容主要分為五個部分：計畫緣起與目的、研究方法與過程、主要發現與結論、後續研究、參考文獻。計畫緣起與目的說明此研究專案的由來、構想及目的，主要是利用有機堆肥微生物進行厭氧處理受十溴聯苯醚(DBDE)污染底泥；研究方法與過程說明本研究所使用之三種有機堆肥及兩種污染底泥之特性、實驗前處理方法與實驗規劃；主要發現與結論說明實驗主要結果；後續研究為討論未來河川底泥復育之實場應用；參考文獻則列舉相關重要的研究文獻。

二、計畫緣起與目的

2.1 計畫緣起:

土壤底泥環境是人類活動與利用的主要空間，除了可孕育生物外，在生態循環中亦扮演很重要的角色。自古以來，人類頗能順天應理，扮演生態系統中之一環，但是自十九世紀工業革命後，人類力求安全、舒適的生活品質，開始發展許多工業與科技，並在無形中將大量危害物質排放於環境中，超出環境所能容忍的極限，因而造成環境污染與破壞。

為符合現今防火安全之需求，消耗性電器產品或塑膠外殼、傢俱產品、電(纜)線外皮，依據現今法規標準需要添加火焰阻燃劑以阻擋火焰蔓延以利增加民眾逃亡時間，其中以多溴聯苯醚 (polybrominated diphenyl ethers, PBDEs) 最為常見的阻燃劑。在現今市場上，主要添加到這些電器產品的PBDE混合物為五溴聯苯醚混合物 (Penta-brominated BDE)、八溴聯苯醚混合物 (Octa-brominated BDE)、十溴聯苯醚混合物 (Deca-brominated BDE, DBDE) (La Guardia et al., 2006)。DBDE為工業上常用之火焰阻燃劑，是近年來受到重視的新興污染物之一，DBDE 因結構穩定、水中溶解度低，故在環境中傾向蓄積底泥，且很難經由生物直接降解，故易造成生態毒性，威脅生物體健康。

PBDE 是一種添加型火焰阻燃劑，只和產品中的聚合體混合在一起，因此在隨意丟棄放置或燃燒不完全性況下較易洩漏至環境中 (Costa et al., 2008)。環 1980 年代檢測日本大阪地區河川底泥中的 PBDEs 濃度，發現十溴二苯醚所佔比例較高，濃度是其餘 PBDEs 的 10 倍之多。環保署自民國 93 年至 99 年持續調查台灣地區 33 條河川底泥中 PBDEs 之總量分布，發現在 24 種環境中常見的溴化物同源物中，以十溴二苯醚 DBDE 濃度為所有最高，其中淡水河系 (94 年 163 $\mu\text{g/kg dw}$)、二仁溪 (94 年 126 $\mu\text{g/kg dw}$)、老街溪 (98 年 244 $\mu\text{g/kg dw}$) 之河川底泥中 DBDE 濃度顯著高於其他同源物或同族物 (環保

署，2011），國外調查下水道污泥發現 DBDE 濃度可高達 5 mg/kg 乾重（Hale et al., 2003）。

PBDEs 具有高疏水性、親脂性及不易降解等特性，容易造成生物累積效應而殘留於水生哺乳類、魚類、人類母乳、血清及脂肪組織中，有研究指出，暴露在 DBDE 的情況下會增加啮齒類動物發生肝癌和甲狀腺瘤的機率（Darnerud et al., 2001; Darnerud et al., 2003），在人體中，則可作為雄性激素、黃體激素和雌激素的拮抗劑或是促效劑（Costa et al., 2008），干擾正常內分泌運作。基於人類證據無資料及動物證據有限，國際癌症研究署(IARC)將 DBDE 歸類為 Group 3；美國環境保護署歸類為 Group C。歐盟亦於2003年開始公布禁用五溴及八溴聯苯醚混合物，臺灣環保署則已公告 DBDE 為第四類毒性化學物質，五溴二苯醚混合物、六溴二苯醚混合物(BDE-154)、七溴二苯醚混合物(BDE-175及BDE-183)、八溴二苯醚混合物、四溴二苯醚混合物(BDE-147)為第一類毒性化學物質。

有鑑於 PBDEs 對環境與生物帶來的負面影響，有必要針對已受污染的土壤及底泥進行適當污染整治工作，以減少所帶來的生態毒性（ecotoxicity）危害，並恢復其正常用途。目前 PBDEs 的降解研究已逐漸受到科學家重視，但主要仍以低溴數 PBDEs 的污染整治研究為主。生物復育（bioremediation）因為不會對環境造成二次污染，所需費用較低，成為處理 PBDE 污染的新選擇，特別是高溴數的 DBDE。生物復育 DBDE 可依微生物種類不同，分為好氧及厭氧生物處理。微生物在有氧環境時，分解 DBDE 速率較快，但降解過程會形成毒性較高之低溴數代謝產物，反而會抑制微生物生長，進而影響生物分解速率，因此生物處理 DBDE 多以厭氧生物處理為主。堆肥除了具有農業應用的價值外，堆肥亦可做為環境污染物的整治之用（Tsui and Roy, 2007; Tsui et al., 2007; Tsui et al., 2011）。舉例而言，堆肥可還原脫硝水中的硝酸鹽，且由於堆肥具有良好的緩衝能力，而能穩定系統中的 pH 值（Tsui et al., 2007）。此外，堆肥可當作吸附劑，以吸附土壤地下水中的農藥（Tsui and Roy, 2007）。

堆肥由於具有高含量的可溶性有機碳，亦可當作良好電子提供者，還原脫氯地下水中的四氯乙烯（tetrachloroethylene, TCE）（Tsui et al., 2011）。鐘苑慈（2008）選取數種堆肥，在沒有外加微生物與營養源的情況下，所有堆肥的微生物菌群均有能力將TCE還原成乙烯，且未腐熟的堆肥，由於含有較高的有機碳含量，所以較腐熟度高的堆肥，對TCE有更好還原脫氯的效果。此外，將高濃度（1.8 mM）的 TCE與堆肥一起置入血清瓶中，經過100天的培育後，仍能持續見到氫氣的生成，而在140天時外加葡萄糖的情形下，甚至可觀察到乙烯的產物產生。這些結果證明，堆肥可作為一長效的電子提供者，用作現地復育含氯污染物或含鹵素類（halogen）污染物之用。

2.2 研究目的

本研究首次利用有機堆肥對底泥中受污染之 DBDE 進行厭氧生物降解，其主要去除機制是發生還原性脫溴作用（reductive debromination），並藉電子傳遞作用將化合物上的鹵素原子移去並以氫原子取代。本研究利用血清瓶建立厭氧微系統（anaerobic microcosms），添加有機堆肥進行生物處理高濃度 DBDE（20 mg/sediment-kg）污染底泥。實驗過程以 GC 分析 DBDE 濃度並以 GC-MS 觀察隨時間變化所生成脫溴產物之同源異構物（PBDE congeners）。利用分子生物技術（PCR-DGGE-Cloning）同時分析降解過程微生物族群結構與菌種鑑定，並偵測其功能性基因（脫鹵基因及雙氧化酵素基因等），評估其堆肥微生物分解 DBDE 之關鍵酵素。本研究結果可評估商用有機堆肥處理受 DBDE 污染底泥之可行性，建立綠色整治技術，並因此瞭解其代謝產物及其微生物族群之多樣性。處理完之污染底泥亦可作為土壤改良劑，達成資源再利用。

2.3 執行程度

期程：101 年 12 月 10 日起至 102 年 12 月 09 日止

經費：(全程)： 1,000 仟元 (年度)： 1,000 仟元

1.執行進度: 預定(%) 實際(%) 比較(%)

年度	100	100	0
----	-----	-----	---

總進度	100	100	0
-----	-----	-----	---

2.經費支用: 預定(仟元) 實際(仟元) 支用比率(%)

年度經費	1000	1000	100
------	------	------	-----

自備款	0	0	0
-----	---	---	---

總經費	1000	1000	100
-----	------	------	-----

2.4 執行現況

本研究流程圖如圖 2.1 所示。研究主要分為三部分進行，第一部分是採集有機堆肥及底泥樣品，並對堆肥樣品進行物化特性分析；第二部分為目標污染物 PBDE 分析方法之建立；第三部分為批次厭氧生物降解實驗。

第一部分為堆肥及底泥樣品之採集，並且對於堆肥及底泥樣品進行物化特性分析及 PBDEs 濃度分析。第二部分目標污染物 PBDEs 分析方法已建立完成，分析方法包括檢量線線性水準(r^2)、再現性、偵測極限及回收率情形。第三部分批次厭氧生物降解實驗利用堆肥樣品(微生物)處理受 DBDE 污染底泥，並定期分析 DBDE 濃度分析及水質參數 (pH, ORP 及 DOC) 變化，分解

過程同時利用分子生物技術分析微生物族群多樣性(bacterial community)，包括：(1)微生物族群結構解析（PCR-DGGE）；(2)微生物菌種鑑定（Cloning）；(3)分解過程功能性基因（functional gene）之表現。實驗完成後將所得之數據進行整理與統計分析，彙整後進行實驗結果之討論。

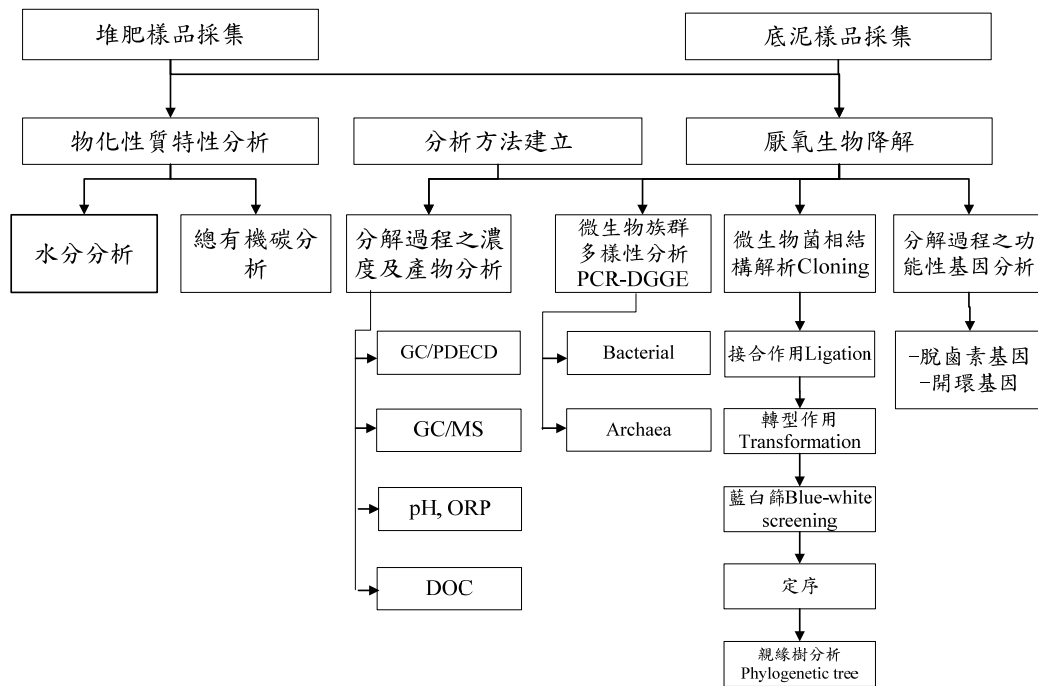


圖 2.1、本研究流程圖

表 2.1 為本研究進度之工作項目甘特圖，分別完成堆肥樣品及底泥樣品採集及其特性分析、目標污染物 DBDE 濃度分析方法建立，在堆肥吸持實驗及生物降解實驗中 DBDE 及其產物之濃度分析、水質特性分析、微生物族群結構、菌相解析及其功能性基因解析。本成果報告含括上述工作項目，均符合進度查核點。

表 2.1、研究進度之工作項目* (甘特圖)

年月	101/ 12	102/ 01	102/ 02	102/ 03	102/ 04	102/ 05	102/ 06	102/ 07	102/ 08	102/ 09	102/ 10	102/ 11
工作項目												
堆肥樣品採集	■											
土壤樣品採集	■											
堆肥樣品基本特性分析		■	■									
污染物之濃度方法建立		■	■	■								
污染物之產物分析方法建立			■	■	■							
堆肥之有機物吸持行為研究			■	■	■	■						
厭氧生物降解之濃度分析				■	■	■	■					
厭氧生物降解之產物分析					■	■	■	■				
厭氧生物降解之微生物族群多樣性分析						■	■	■	■	■		
厭氧生物降解之微生物菌相結構解析						■	■	■	■	■		
厭氧生物降解之生物分解之功能性基因分析								■	■	■	■	
期中報告						※						
期末報告												※
工作進度估計百分比(累積數)	5%	10%	20%	31%	42%	56%	67%	78%	86%	94%	97%	100%
預定查核點			期中： 1.DBDE 分析方法建立。 2.PBDESs 產物分析方法建立。 3.堆肥基本特性分析 4.堆肥中之有機物吸持行為研究									
			期末： 1.堆肥對 DBDE 處理效率評估 2.堆肥處理 DBDE 之產物分析 3.微生物族群結構解析 4.功能性基因表現									

三、研究方法與過程

3.1 研究方法

3.1.1 目標污染物十溴二苯醚(DBDE)

十溴二苯醚 (Deca-brominated diphenyl ethers, 簡稱 DBDE) 分子式為 $C_{12}Br_{10}O$, 化學結構如圖 3.1 所示, 分子量為 959.12 g/mol, CAS 化學註冊號碼為 1163-19-5。辛醇與水之分配係數 ($\log k_{ow}$) 為 2.54, 在水中溶解度很低, 約為 20~30 ppb (環保署毒理資料庫), 其他常見的物理化學性質列於表 3.1。實驗時將 DBDE (購自 AccuStandard Inc., New haven, USA) 完全溶於丙酮 (Acetone, J.T. Baker, Mallinckrodt Baker, Inc., USA) 中, 並進行盪振使其完全溶解成為 50 ppm 之儲備液。

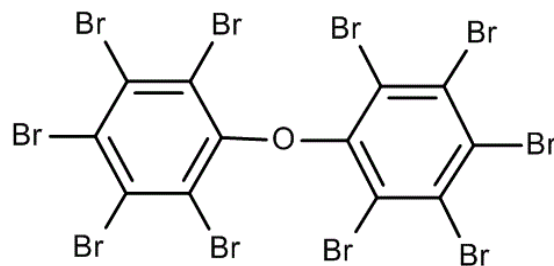


圖 3.1、十溴二苯醚(DBDE)的化學結構

表 3.1、DBDE 之基本物化性質 (環保署毒理資料庫, 2010)

物化性質	DBDE
熔點(MP)	295~305°C
密度及比重(DEN)	3.0
辛醇與水分配系數(OWPC)	$\log k_{ow}=2.54$
溶解度(SOL)	水中 20~30 ppb
蒸氣壓(VAP)	5 mmHg(306°C)
亨利定律常數	$4.45 \times 10^{-8} \text{ atm} \cdot \text{m}^3/\text{mole}$

3.1.2 DBDE 之分析方法

取 1g 底泥土壤樣本製鐵氟龍離心管 (Nalgene® LabWare, USA) 中，將等比例體積 (1:1) 的正己烷及丙酮進行混合，製得 DBDE 萃取液，取 10 mL 萃取液至鐵氟龍離心管中，於超音波振盪器中超音波萃取 1 小時後，在室溫下以轉速 12,000 rpm 離心 20 分鐘。

將酸性矽膠 (製備方法是將 60-200 mesh 中性矽膠於 180°C 下活化 1 小時，冷卻至室溫後以重量比 3:2 之比例添加純度 96 % 純濃硫酸，充分混合均勻)。裝填至底部塞有經矽甲烷處理後之玻璃棉 (Chromatography Research Supplied, Inc.) 之 16×300 mm 玻璃管柱內，並將樣本離心之上層萃取液通過酸性矽膠中進行淨化，再將淨化後之萃取液收集至濃縮瓶中，以減壓濃縮機濃縮至乾燥後，加入 1 mL 正己烷至濃縮瓶中回溶，最後將樣品以 0.20 µm TITAN ® PTFE 材質濾頭過濾至褐色樣品瓶 (林等人, 2009)，再經稀釋至適當濃度後以氣相層析儀 (gas chromatography pulsed discharge electron capture detector, GC/PDECD, HP 5890 series II/PDECD Valco Models D-2-I) 分析，表 3.2 為 GC/PDECD 分析條件。

本研究之 GC/PDECD 以耐高溫 (380~400°C) 之低極性 Rxi-5ht 管柱做為分離 PBDEs 之靜相使用。分析系統選擇超高純度氬氣 (99.999%，清豐行有限公司) 做為載流氣體 (10 mL/min) 與偵測器之放電氣體 (discharge gas)，偵測器則需另外提供高純度甲烷 (5 %) / 氦氣 (95 %) 之混合氣體 (清豐行有限公司) 以便進行 PDECD 偵測模式，上述氣體皆需通過純化裝置處理以降低雜質之背景干擾。

表 3.2 GC-PDECD 分析參數設定條件

GC(HP 5890 series II)/PDECD(Valco Models D-2-I)	
毛細管柱	Rxi-5HT(30 m×0.53 mm, 0.15μm film thickness, Resteck US)
載流氣體	99.999% 氮氣(10 mL/min)
注射口/進樣	320°C / Splitless(3 Ml)
升溫程序	110°C (1 min)→40°C /min→200°C (3 min)→10°C /min →330°C (4.75 min)
總分析時間	21 min (平衡 3 min)
溫度/電壓	380°C / 30V
氮氣/混合氣體	99.999% (30mL/min)/甲烷:氮氣(5 : 95)

3.1.3 DBDE 方法偵測極限 (Method detection limit, MDL)

實驗進行步驟將參考環檢所公告之「環境檢驗方法偵測極限測定指引 NIEA-PA107」(行政院環保署環境檢驗所, 2005)。準備 7 個不含多溴二苯醚之土壤樣品, 添加已知濃度的多溴二苯醚標準品, 使其濃度為預估 MDL 值之 1~5 倍, 將樣品置於抽氣櫃中使有機溶劑完全揮發後, 利用自行開發之分析方法, 進行第一次 MDL 值之測定, 分析後得到 7 組多溴二苯醚濃度測定值, 計算第一次測定值之 3 倍標準偏差(S)與均方(S^2), 而 3 倍的 S 值即為第一次 MDL 值。

準備 7 個不含多溴二苯醚之底泥樣品, 添加已知濃度的多溴二苯醚標準品, 使其濃度為第一次 MDL 值之 1~2 倍, 將樣品置於抽氣櫃中使有機溶劑完全揮發後, 利用自行開發之分析方法, 進行第二次 MDL 值之測定, 分析後得到 7 組多溴二苯醚濃度測定值, 計算第二次測定值之 S^2 。將前後二次的 S^2 相除, 以較大的 S^2 做為分子, 稱為 S_A^2 , 較小的 S^2 做為分母, 稱為 S_B^2 , 計算出 F 比值小於 3.05, 再以公式計算出同標準偏差 (S_{pooled}), 最後將計算出的 S_{pooled} 值乘以 2.681, 即可求得實際 MDL 值, 再將 MDL 值乘以 3 倍, 則可求得 LOQ (limit of detection)。

3.1.4 檢量線線性範圍

純溶劑檢量線不包含任何樣品基質且不需萃取處理，因此可用於評估基質效應及萃取處理對樣品所造成的回收率影響。購買市售多溴二苯醚混合物標準品，利用溶劑將其逐步稀釋為一系列不同濃度的標準溶液後，直接以 GC/PDECD 進行分析，分析後使用數據處理軟體將個別多溴二苯醚進行積分，以檢量線樣品設置濃度（X 軸）對應波峰積分面積（Y 軸）繪製一條檢量線，觀察該檢量線之線性範圍，上述迴歸線之線性相關係數 r 應大於或等於 0.995。

DBDE 濃度分析之檢量線製備方法是先將 50 ppm 的 DBDE 儲備液稀釋至 200、400、500、600、800、1,000 ppb，以 GC/PDECD 分析後，將所測得的層析面積對相對應的濃度作線性回歸（圖 3.2），求得線性回歸方程式與相關係數值（ $Y=1.0131X-18.239$, $R^2=0.9991$ ）。萃取後的樣本經 GC/PDECD 分析後所得的層析面積大小即帶入檢量線之線性迴歸方程式以回推樣本中之 DBDE 濃度。

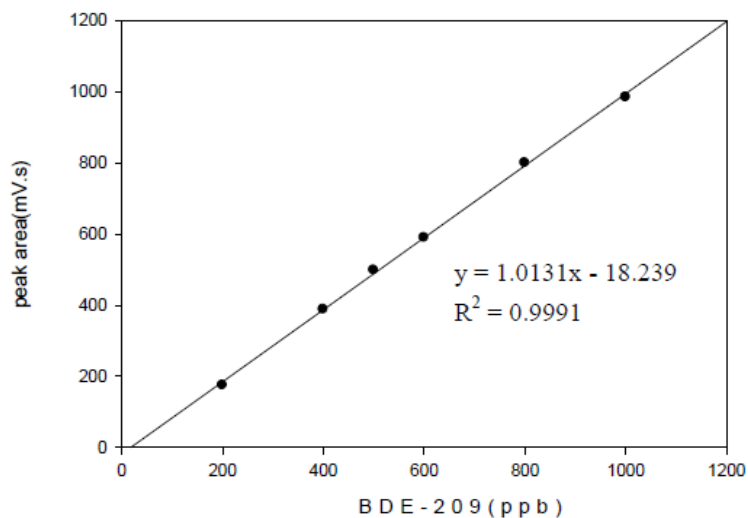


圖 3.2、DBDE 濃度分析之檢量線

3.1.5 分析方法專一性

為證實分析方法能準確地區分待測樣品中的多溴二苯醚標的物及其餘雜質，故須進行本項實驗，準備二組不含多溴二苯醚之土壤樣品，添加已知濃度之多溴二苯醚標準品於其中一組，另一組不添加任何物質，接著利用自行開發之分析方法，執行土壤樣品前處理，待進行儀器分析步驟時，依序檢測空白土壤樣品、已知多溴二苯醚濃度之土壤樣品與一組已知濃度的多溴二苯醚標準溶液，比對三組分析圖譜，觀察是否有基質干擾的現象，用以判斷分析方法專一性之表現情形。

3.1.6 分析方法回收率

為證實分析方法能有效地將多溴二苯醚標的物從土壤樣品中萃取出來，故須進行本項實驗，準備一組不含多溴二苯醚之土壤樣品(樣品數 ≥ 3)，添加已知濃度之多溴二苯醚標準品，將樣品置於抽氣櫃中使有機溶劑完全揮發後，利用自行開發之分析方法進行樣品濃度檢測，最後以檢量線定量樣品分析結果並計算分析方法回收率。

本實驗設計以 20.0 mg/kg DBDE 之底泥生物降解實驗，為確認此萃取方法在反應降解至低濃度 DBDE 時仍具有可信度，因此分別使用之濃度為 2.0、4.0 及 20.0 mg/kg DBDE 之底泥進行回收率分析，實驗步驟如下。

精秤 1.0 g 底泥土壤於鐵氟龍離心管中，分別加入 2.0 μL 、4.0 μL 10 ppm 及 4.0 μL 50 ppm 的 DBDE 儲備溶液後，置於抽風櫃中使溶劑完全揮發，即為含有 2.0、4.0 及 20.0 mg/kg DBDE 之底泥。加入 20 mL Milli-Q water，水平振盪 16 小時（水土比例為 20:1），再以轉速 12,000 rpm 在 4°C 下離心 30 分鐘，將水溶液移除後使用上述方法進行 DBDE 萃取分析。將萃取後的樣本稀釋至檢量線濃度範圍中，以 GC/PDECD 分析其濃度，再以式 3-1 計算回收率。

$$\text{回收率} = \frac{\text{DBDE 分析濃度} \times \text{稀釋倍數}}{\text{DBDE 理論濃度} \times \text{土壤重量} \times (1 - \text{含水率})} \times 100\% \quad \dots\dots\dots \text{式 3-1}$$

3.1.7 同日內與異日間分析方法再現性

為證實分析方法在相同操作人員、儀器及實驗室等條件下，即使在不同的工作日分析樣品，其分析結果仍能保持穩定，當上述各項實驗數據之結果，經評估後若其表現符合限定標準，則可判定自行開發之多溴二苯醚分析方法，具有良好的分析能力，可將其應用於檢測環境土壤樣品中多溴二苯醚的濃度，做為各領域內研究多溴二苯醚的分析工具。故須分別在 3 個不同的工作日，重複進行此項實驗。準備一組不含多溴二苯醚之土壤樣品(樣品數 ≥ 3)，添加已知濃度之多溴二苯醚標準品，將樣品置於抽氣櫃中使有機溶劑完全揮發後，利用自行開發之分析方法進行樣品檢測，最後以檢量線定量樣品分析結果並計算其變異係數。每日樣品分析結果之變異係數，做為同日內分析方法再現性的評估依據，而 3 日間樣品分析結果之變異係數，則做為異日間分析方法再現性的評估依據。

3.1.8 真實環境土壤樣品之多溴二苯醚分析

本階段實驗之重點，在於將自行開發且完成確效的分析方法，實際應用於國內環境中各種類型的土壤樣品，包括土壤、河川底泥及汙泥等，首先要從過去國內調查多溴二苯醚環境流佈文獻研究結果中，瞭解土壤環境中多溴二苯醚的種類與濃度組成，才能進一步決定採樣地點，並進行實地採樣，當土壤樣品被採回後，便可進行樣品分析而獲知多溴二苯醚濃度，同時本實驗也預定將這些樣品，以目前公告之標準檢驗方法「氣相層析/高解析質譜法」進行分析，最後將二種分析技術之檢測結果加以比較，客觀評估新分析方法與公告標準方法的差異性，做為後續使用者選擇分析方法之依據。

3.1.9 低溴數 PBDEs 中間產物分析 (GC-MS)

將上述樣品經酸性矽膠填充之玻璃層析管柱淨化，淨化樣品經減壓濃縮至乾燥後，以 30 μ L 己烷回溶後置於褐色樣品瓶，以 HRGC-HRMS (HP6890N-Agilent 5975B inert MSD) 分析 24 種 PBDEs 濃度。使用之毛細管柱為 DB-5HT，並以超高純度氮氣 (99.999%) 做為載流氣體，其他分析之相關設定條件分別見表 3.3、表 3.4，另將 PBDEs 標準品進行 GC/MS 分析，並將分析後之 MS 圖新建至資料庫中。分析後之樣本層析圖與控制組進行比較，以觀察樣本經化學或生物處理後有無新增波峰的出現，將新增之波峰與資料庫進行比對，或使用該波峰之質譜圖推測該波峰之化學結構。

目標分析物與其荷質比分別為三溴二苯醚(Tri-BDE)的 BDE-17、BDE-28 (405、407 m/z)；四溴二苯醚(Tetra-BDE)的 BDE-47、BDE-49、BDE-66、BDE-71、BDE-77(483、485 m/z)；五溴二苯醚(Penta-BDE)的 BDE-85、BDE-99、BDE-100、BDE-119、BDE-126(563、565 m/z)；六溴二苯醚(Hexa-BDE)的 BDE-138、BDE-153、BDE-154、BDE-156(641、643 m/z)；七溴二苯醚(Hepta-BDE)的 BDE-183、BDE-184、BDE-191(721、723 m/z)；八溴二苯醚(Octa-BDE)的 BDE-196、BDE-197 (799、801 m/z)；九溴二苯醚(Nona-BDE)的 BDE-206、BDE-207(719、721 m/z)及十溴二苯醚(DBDE)的 BDE-209 (797、799 m/z)，以內標標準品測定濃度。

表 3.3、GC 分析參數設定條件

GC (HP6890N)	
毛細管柱	DB-5HT(15m × 0.25mm × 0.1μm film thickness, Agilent Technologies, USA)
載流氣體	99.999% He(1 ml/min)
流速控制	Electronic pressure control
注射口	320℃
進樣方式	Splitless(1 μL)
升溫程序	110℃ (1 min)→40℃/min→200℃ (3 min)→10℃/min →330℃ (4.75 min)
總分析時間	26.25 min

表 3.4、MS 分析參數設定條件

MS (Agilent 5975B inert MSD)	
偵測溫度	320℃
偵測方式	Full Scan(50-800 amu)
離子化方式	Electron Impact mode, EI
加速電壓	1600V
離子化電壓	69.9 eV
離子化電流	34.6 μA
MS source	300 °C
Quadrupole溫度	150 °C
Tune parameters	DFTPP tune

3.1.10 水質參數分析

1. pH分析

堆肥的測定方法，是根據環保署環境檢驗所 94 年 9 月 19 日公告，編號 S410.61C「土壤中酸鹼值測定方法」(環保署環境檢驗所，2008)，土壤與水的比例為 5：1，以 pH meter (CONSORT C833) 進行 pH 的量測。量測前，先以 pH=7 及 pH=4 之標準緩衝溶液進行校正，再直接插入待測溶液中量測，得以得到其 pH 值。水中 pH 的測定法，則是在選定時間內定期拆取血清瓶，直接以 pH meter (CONSORT C833) 直接對溶液進行 pH 的量測。

2. 氧化還原電位 (Oxidation-Reduction Potential, ORP)

在選定時間內定期拆取血清瓶以簡易式氧化還原電位電極測定溶液中之氧化還原電位(廠牌型號：Lutron ORP-203測量範圍為-1999 mV ~1999 mV)，量測前先以標準溶液校正後再直接將ORP電極放入開封後的血清瓶進行測量。

3. 總溶解有機碳 (DOC)

本研究以總有機碳分析儀(廠牌型號：O.I. Analytical 1010)，測定溶液中之總有機碳的變化(偵測極限為 0-10ppm)，樣品擺入前先以去離子水作五次的背景值測定及潤洗以及樣品測定完成後以大量的去離子做潤洗動作以降低儀器的背景值。

檢量線的製作以鄰苯二甲酸氫鉀(KHP)標準溶液配製 0.0、2.0、4.0、6.0、8.0 及 10 ppm 的標準溶液。待儀器潤洗完成之後建立偵測積分面積與化合物濃度關係的檢量線。

4. 離子濃度分析

為確認堆肥液中是否有結合氧型態之離子，本研究進行相關離子濃度分析。樣本至玻璃注射針筒以 0.22 μm Acrodisc® Nylon 濾頭(Pall Corporation., USA) 過濾至褐色樣品瓶，以離子層析儀 IC(Metrohm 883) 分析溶液中亞硝酸鹽(NO_2^-)、硝酸鹽(NO_3^-)及硫酸根(SO_4^{2-})。分析條件如表 3.5。

表 3.5、IC 分析條件參數

IC (Metrohm 882)	
Column	Metrosep A Supp7-250 (250 mm $\times$ 4.0 mm)
Mobile phase	0.009 M Na_2CO_3 (0.8 mL/min)
Auto sampler	Metrohm 863
Detector	conductivity detector
Inlet	20 μL

3.1.11 DBDE 污染底泥製備

本研究選用 DBDE 污染底泥濃度為 20 mg/kg，其製備方法為精秤 1.0 g 底泥於鐵氟龍離心管中，分別加入 4.0 μL 50 ppm 的 DBDE 儲備液後，置於抽風櫃中使溶劑完全揮發，即底泥為含有 20.0 mg/kg DBDE 之濃度。由國內外文獻顯示（行政院環境保護署，2011; Environmental Agency, 1991; 陳重羽，2005; Darnerud et al., 2001），較嚴重 DBDE 污染於河川底泥之濃度分佈可能為 $\mu\text{g/kg}$ -mg/kg 範圍。另考慮添加堆肥中之 DBDE 具有吸持效果，並容易區別堆肥生物之降解作用，因此選用較高濃度的 DBDE 進行實驗。

3.1.12 堆肥吸附實驗

稱取 20.0 g 底泥及 10.0 g 有機堆肥(2:1)於 125 mL 夾壓式棕色玻璃厭氧瓶，再加入已配製好之 80 mL DBDE 溶液(此實驗之 DBDE 濃度為 20 mg/kg，其溶液為無機鹽培養基 MSB)，並添加抑菌劑 (0.4% NaN_3)，接著蓋上鋁蓋以壓蓋器夾緊，放入迴轉式振盪器 (Firstek scientific S103) 搖晃進行動力試驗，轉速設定為 120 rpm，於室溫下培養。之後於不同時間點(每個時間點做三重複)開瓶，以正己烷及丙酮 (1:1) 進行全萃取，萃取方法參照 3.1.2 節 (DBDE 分析方法)，利用 GC/PDECD 分析 DBDE，試驗由時間的漸增達至平衡後，做出動力學曲線。

樣本添加之無機鹽培養基(簡稱MSB) 包括4.35 g/L K_2HPO_4 , 0.5 g/L KH_2PO_4 , 0.2 g/L MgSO_4 , 0.5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 及 10 mL 微量元素 (12 g/L $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.0 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g/L CaCl_2 , 10.0 g/L Na_2SO_4 , 0.4 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4 g/L $\text{MnO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mL H_2SO_4)。

3.1.13 厭氧堆肥生物降解實驗

批次實驗使用三種堆肥，實驗組樣本製備方法是分別稱取 20.0 g 底泥及 10.0 g 有機堆肥(2:1)於 125 mL 夾壓式棕色血清瓶中與含 DBDE 高濃度底泥和 80 mL 無菌 MSB 混合，使底泥樣本中含有 20 mg/kg 的 DBDE。對照組的樣本則是在血清瓶中額外加入 0.4 % NaN_3 溶液作為抑菌劑，每個處理組進行三重複。製備後樣本瓶口以鐵氟龍墊片與鋁蓋封口，在 25°C 下以 120 rpm 振盪培養，定期取一組實驗組及對照組樣本分析以 GC/PDECD 分析 DBDE 的濃度及水質參數。此外同時亦進行：(1) PBDE 低溴數中間產物鑑定；(2)功能性基因分析；(3)菌種鑑定。

3.2 研究過程

3.2.1 底泥樣品採集

本研究底泥採集台灣地區中部之大安溪流域中游及下游之大安溪橋與義里大橋處底泥，以 GPSMAP®60CSx (Garmin Ltd.) 定位，設定的大地座標系統採 TWD67，座標顯示格式為經緯度，大安溪底泥採樣地點為大安溪流域下游之大安溪橋（北緯 24 度 22 分 20.7 秒，東經 120 度 38 分 27.7 秒）（圖 3.3）與義里大橋（北緯 24 度 20 分 27.4 秒，東經 120 度 44 分 20.9 秒）（圖 3.4）沿岸，共二個採樣點，採樣方法直接於大安溪河床邊以採樣鏟挖取 0-15 公分表層底泥置於 PE 瓶中，底泥樣本採集於乾淨容器中，去除多餘的石礫、樹枝及雜物後，自然風乾 3-7 天，再經敲碎、研磨成粉狀，再通過 100 mesh (2.0 mm) 之篩目收集，密封保存於室溫之下，供日後實驗及底泥基本性質分析使用。底泥樣品之特性分析測定底泥質地及有機質含量，委託國立中興大學農學院土壤調查試驗中心檢測，分別採用「比重計」與「重鉻酸鉀氧化法」分析方法，分析底泥中砂粒、粉粒、粘粒所佔之比例與底泥中有機質含量。

(A)



(B)



圖 3.3、底泥採樣照片(A)大安溪橋；(B)大安溪橋底泥採樣現況
(採樣時間 2013/04/21，天氣：晴天)

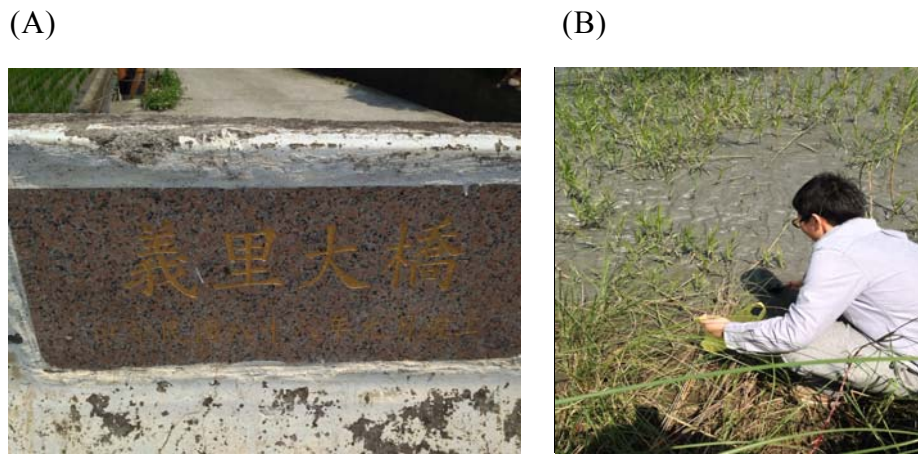


圖 3.4、底泥採樣照片(A)義里大橋；(B)義里大橋底泥採樣現況
(採樣時間 2013/04/21，天氣: 晴天)

3.2.2 堆肥樣品採集與性質分析

本研究採用兩種不同腐熟度的台糖雲林堆肥廠蔗渣堆肥（圖 3.5、兩個月與六個月，分別標示為 C2 與 C6），及南投旭惠公司所製備的兩個月厭氧堆肥（圖 3.5、標示為 B1）。台糖堆肥廠的堆肥是將蔗渣與豬糞以 20：1 的重量比混合後，每兩週翻堆一次；而南投旭惠公司的厭氧堆肥，則是以竹子粉做為原料，加入以該公司所培育微生物（主要為酵母菌、乳酸菌、枯草桿菌與光合菌的混合菌），置入密閉的塑膠袋中密封發酵兩個月所製成。

收集的三種堆肥，先取部分的樣本置於 105 °C 烘箱中乾燥 2 小時去除水分，再以破碎均質器粉碎後備用，以進行化學成分分析。為了分析堆肥樣品中的無機成分，將烘乾的樣本約 10 克置入 800 °C 高溫爐中後通入空氣燃燒 1 小時，殘餘的重量即為樣品的無機組成重量。堆肥的有機成分，則是利用元素分析儀（Perkin Elmer Series II 2400）測定，將烘乾之試樣稱取 3~5 mg，置於自動進樣旋轉盤，分析碳、氮、氫、硫的元素含量，在經過不包含灰份的有機組成後運算後，氧元素含量為扣除碳、氮、氫、及硫含量求得。

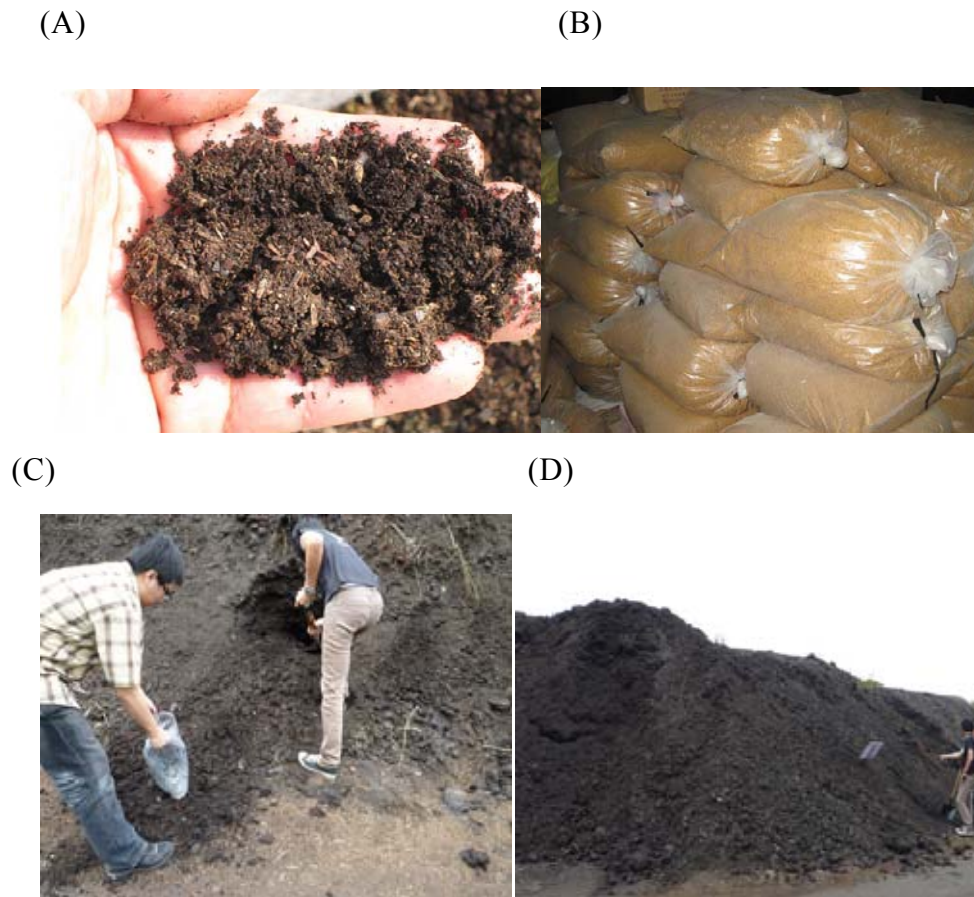


圖 3.5 有機堆肥採樣照片(A)南投旭惠公司有機堆肥; (B)南投旭惠公司堆肥成品; (C) 台糖雲林堆肥廠蔗渣堆肥兩個月; (D) 台糖雲林堆肥廠蔗渣堆肥六個月

3.2.3 堆肥生物降解 DBDE 濃度分析

上述堆肥析附實驗完成後，於不同時間點(每個時間點做三重複)開瓶取出待測溶液樣本，直接測定 pH 值及 ORP，從瓶中取 50 mL 樣品進行過濾，再利用 TOC 分析 DOC，另外再取 20 mL 樣品萃取過後利用 GC/PDECD 分析 DBDE，並隨著時間做出吸附生物降解動力曲線。

3.2.4 堆肥生物降解 DBDE 微生物 DNA 萃取

本實驗之 DNA 萃取方法採用 Soil Genomic DNA Purification Kit (DP024, GeneMark), 其萃取步驟如下:

- 1.取 400 μL extraction solution 到 1.5 mL 之微量離心管, 再將小於 1 g 之污泥樣本添加於微量離心管中, 熱水水浴 10 秒, 震盪 30 秒使之均勻混合, 於室溫下以 3,500 g 離心 5 min, 使大分子與小分子分離;
- 2.將上清液移到新的 1.5 mL 之微量離心管中。添加樣品 1/3 體積之 precipitation solution, 反覆倒置離心管使之充份混合, 再冰浴 5 分鐘;
- 3.室溫下再以高轉速(13,000g)離心 5 分鐘, 吸取上清液到新的 1.5 mL 微量離心管中;
- 4.添加樣品 0.5 倍體積的 binding solution 與同樣品體積的 ethanol, 以微量吸量管抽吸數次使之混合均勻;
- 5.取 650 μL 包含沉澱物之混合溶液到已經裝置於 collection tube 的 spin column 中, 離心 1 分鐘, 使溶液穿過濾膜, 直到樣品全過濾膜;
- 6.將過濾液丟棄, 添加 500 μL 之 binding buffer, 以 13,000 g 離心 1 分鐘。將過濾液丟棄, 再添加 700 μL 之 wash solution, 以 13,000 g 離心 1 分鐘, 重複兩次後再離心 5 分鐘;
- 7.丟棄過濾液, 高速離心使 ethanol 完全移除;
- 8.添加 150 μL 已預熱 60-70°C 之 elution solution, 等待 1-2 分鐘, 再離心 1 分鐘, 將 DNA 保存在-20°C 待後續使用。

3.2.5 堆肥生物降解 DBDE 微生物族群多樣性

1. 聚合酵素連鎖反應 (PCR)

將萃取得到的 DNA 相對於 *Escherichia coli* 16S rDNA 序列中的相對片段用來進行 PCR (Polymerase Chain Reaction) 聚合酵素連鎖反應。本研究使用的引子(primer)為 16S rDNA 中之 V6-V8 變異區, 針對細菌域的微生物族群利用 968F (5'-ATT-ACC-GCG-GCT-GCT-GCT-GG-3') 與 1392R (5'- CAG-GCC-TAA-CAC-ATG-CAA-GTC-3') (Fang et al., 2002), 25 μL 體

積 PCR 試劑濃度為 template DNA 1 μ L, 10 μ M primer 各 1.5 μ L, 5xPCR master mix 5 μ L, 其餘為無菌水, 總體積為 25 μ L。PCR 放大在 96 孔聚合酶連鎖反應儀(PC-816, ASTEC®, Japan) 進行 PCR 增幅放大, 操作程序為: 起始溫度為 94°C、2 分鐘, 每一循環的變性溫度為 94°C、30 秒, 接合溫度 55°C、30 秒, 延伸溫度 72°C、40 秒, 共 30 循環, 最終溫度為 72°C、10 分鐘。完成後以 1.5 %瓊脂凝膠電泳(Agarose gel)分析確認 PCR 反應是否是正確增幅目標序列片段, PCR 產物保存於 4°C。

針對古細菌域的微生物族群, 本研究利用 nested PCR 方法得到代表性古細菌之族群結構, 使用之第一段 Primers 為 PRA46f (5'-YTA-AGC-CAT-GCR-AGT-3') 與 PREA1100r (5'-YGG-GTC-TCG-CTC-GTT-RCC-3') 所得到的產物大小約為 1,072 bp (Øvreås et al., 1997), 使用第二段 Primers 為 PARCH340f (5'-CCC-TAC-GGG-GYG-CAS-CAG-3') 與 PARCH519r (5'-TTA-CCG-CGG-CKG-CTG-3') 所得到的產物大小約為 179 bp (Øvreås et al., 1997)。操作程序為: 起始溫度為 92°C、2 分鐘, 每一循環的變性溫度為 92°C、60 秒, 接合溫度 55°C、30 秒, 延伸溫度 72°C、60 秒, 共 30 循環, 最終溫度為 72°C、6 分鐘。完成後以 1.5 %瓊脂凝膠電泳(Agarose gel)分析確認 PCR 反應是否是正確增幅目標序列片段, PCR 產物保存於 4°C。

2. 變性梯度明膠電泳(DGGE)分析

本研究所用 PCR-DGGE 技術, 係採用 Muyzer's 方法加以修正 (Muyzer et al., 1993)。使用的 968F primer 須具有 GC-clamp (5'-CGC-CCG-CCG-CGC-GCG-GCG-GGC-GGG-GCG-GGG-GCA-CGG-GGG-GGC-3'), 此設計利於 DNA 條帶分離。DGGE 使用 8%聚丙醯胺 polyacrylamide 凝膠 (base pair separation: 300-1,000 bp), 為尿素及 formamide 形成一個 40-65%的變性梯度。PCR 產物大約為 50 ng 與 loading dye 混合後再緩緩 loading 至 gel 凹槽中, 電泳槽中的緩衝液 1 x TAE buffer (40 mM tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.5) 事先配置預熱至 60°C, 以固定式電壓 110V 於 60°C 下泳動 16 小時。使用之電泳設備為美國 BIO-RAD 公司 D-code Universal

Mutation Detection System (Model 475, BIO-RAD, Hercules, California, USA) 及梯度傳遞系統 (Model 170-908, BIO-RAD, Hercules, California, USA), 待電泳完成之後, 利用銀染進行膠體染色, 並用玻璃紙封印保存。DGGE 電泳中不同位置所呈現的條帶 (band) 代表不同單一細菌的 16S rDNA 序列為一種微生物菌種。

銀染步驟為: Silver impregnation (AgNO_3 0.3g, Mini-Q Water 至 300 mL) 低速震盪染色 20 分鐘, Wash (Mini-Q Water 至 300 mL) 清洗 10 秒, 去除 AgNO_3 , Development stain (NaBH_4 0.03g, Formaldehyde 1.2 mL, NaOH 3.6g, Mini-Q Water 至 300 mL) 低速震盪至 pattern 明顯, Enhancement stain (Na_2CO_3 2.25g, Mini-Q Water to 300 mL) 固定 pattern 顯色。

3.2.6 堆肥生物降解 DBDE 微生物菌相結構

1. 聚合酵素連鎖反應 (PCR)

DNA 樣本依據上述方法取得, 再進一步的進行 PCR 分析, PCR 使用之 primers 為 E8F (5'-AGA-GTT-TGA-TCA-TGG-CTC-AG-3') 及 U1510R (5'-CGG-TTA-CCT-TGT-TAC-GAC-TT-3') (Reysenbach and Pace, 1995), 25 μL 體積 PCR 試劑濃度為 template DNA 2 μL , 10 μM primer 各 1.5 μL , 5xPCR master mix 5 μL , 其餘為無菌水。操作程序為: 起始溫度為 94°C、5 分鐘, 每一循環的變性溫度為 94°C、60 秒, 接合溫度 58°C、60 秒, 延伸溫度 72°C、60 秒, 共 25 循環, 最終溫度為 72°C、15 分鐘。

2. 接合作用 (Ligation)

利用 pGEM®-T Vector Systems (Promega, Madison, Wisconsin) 做 ligation, 首先利用純化 kit (Bioman, Taiwan) 進行 PCR 產物純化, 純化之 PCR 產物與欲插入載體的 DNA (insert) 與載體 DNA 以分子數比約 3:1 的比例混合均勻, 約是取 5 μL 2X Rapid Ligation Buffer (此 buffer 含有 ATPase 所以最好先分裝好, 以防 ATPase 失效), 加入 1 μL pGEM®-T, 再加入比例的 insert, 最後加入 1 μL T4 DNA Ligase (3 Weiss units/ μL) 再補

deionized water 到總體積為 10 μ L。混勻後放於 4°C 下 over night，使 DNA 互相黏合，此即為 ligation 產物。

3. 轉型作用(Transformation)

取適量的 ligation 產物與 *E.coli* K12 competent cell 勝任細胞 50 μ L 混合均勻，以 pipetung 方式混合，其混合比例為 1:10，置於冰上 30 分鐘，再置於 43°C 水浴槽中進行 heat shock 反應 45 秒，再放回冰上，再將反應後產物塗抹於含有 IPTG (final conc. 200 μ g/mL)，X-gal (final conc. 40 μ g/mL)之 Ampicillin (final conc. 50 μ g/mL)-LB agar 上，於 37°C 培養 over night。由於載體具有抗抗生素基因及可分解 X-gal 的基因，因此在含 Ampicillin、X-gal 及 IPTG 的 LB 培養基下，以 37°C 培養隔夜後，以藍白篩方式淘汰未成功將抗抗生素基因及載體植入體內的細菌。

4. 藍白篩(Blue-white screening)

挑選 Ampicillin-LB agar 上白色菌落 (代表轉殖成功)，長出之白色菌落可能具有 1,500 bp 大小插入序列的菌體，挑出其單一菌落於 50 μ L 無菌水中，沸水中煮沸 10 分鐘，離心 5 分鐘 16,000g，上清液即為 DNA 樣本，以 M13F (5'-GTT-TTC-CCA-GTC-ACG-AC-3')與 M13R (5'-ACA-GGA-AAC-AGC-TAT-GA-3') primer 進行 PCR 來確定插入序列的大小 1,500 bp (Messing, 1983)。將成功產物之 PCR 產物送廠商定序，即可得到此菌株序列。

5. 定序(sequences)及親緣樹繪製

將成功轉質之 PCR 產物委託廠商進行 DNA 序列鑑定，再將定序結果所得到之序列輸入 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 網站，並應用 blast 程序與資料庫中 DNA 資料進行比對，以得到相似度較高之菌種。將比對後之 DNA 序列結果匯入 Mega 5.2 軟體，使用 Bootstrap method 設定 Replication 次數為 5,000，進行分析後繪製親緣樹圖譜。

3.2.7 堆肥生物降解 DBDE 微生物功能性基因分析

本研究選用來自 Phylum Chloroflexi 厭氧微生物之還原性脫鹵酵素 (reductive dehalogenase, RDase) 基因進行分析，選用引子為 RRF2 (5'-SHM-GBM-GWG-ATT-TYA-TGA-ARR-3') 與 B1R (5'-CHA-DHA-GCC-AYT-CRT-ACC-A-3') (Krajmalnik-Brown et al., 2004)，目標序列大小 1,500- 1,700 bp，其操作程序為：起始溫度為 94℃、130 秒，每一循環的變性溫度為 94℃、60 秒，接合溫度 46℃、60 秒，延伸溫度 72℃、130 秒，共 35 循環，最終溫度為 72℃、6 分鐘。

另也利用雙氧化酵素基因進行分析，選用引子為 C23OF (5'-CCA-GCA-AAC-ACC-TCG-TTG-CGG-TTG-CC-3')與 C23OR (5'-AAG-AGG-CAT-GGG-GGC-GCA-CCG-GTT-CGG-TTC-GAT-CA-3')，目標序列大小為 450bp (Alfreider et al., 2003)，其操作程序為：起始溫度為 94℃、5 分鐘，每一循環的變性溫度為 94℃、60 秒，接合溫度 52℃、90 秒，延伸溫度 72℃、60 秒，共 35 循環，最終溫度為 72℃、10 分鐘。

完成上述所有反應後藉由 1.5 % 瓊脂膠體電泳確認 PCR 產物擴增與否，藉以得知三堆肥微生物菌群是否具有脫鹵素基因及雙氧化酵素基因。

四、主要發現與結論

4.1 主要發現

4.1.1 DBDE 分析方法

圖 4.1 為 DBDE 回收率分析結果，本回收率分別採用濃度 2.0、4.0 及 20.0 mg/kg DBDE 之土壤進行，其回收率平均分別為 90.34 %、97.03 %及 97.56 %，三種不同濃度之 DBDE 均有很高的回收率結果，由此可見此分析方法在 DBDE 生物降解過程中，當 DBDE 降解至 2.0 mg/kg 時仍具有可信度。

此外，本實驗進一步對於分析方法進行分析，表 4.1 為本研究對於 DBDE 應用於底泥分析方法之檢量線線性水準(R^2)、再現性、偵測極限 (limit of detection, LOD)，其偵測極限為 0.032 $\mu\text{g/g}$ ，相關係數值 $R^2=0.9991$ ，相對標準偏差結果顯示出再現性很高 (10 mg kg^{-1} , 8 ± 0.1 mg kg^{-1} ; 20 mg kg^{-1} , 24 ± 4 mg kg^{-1})。

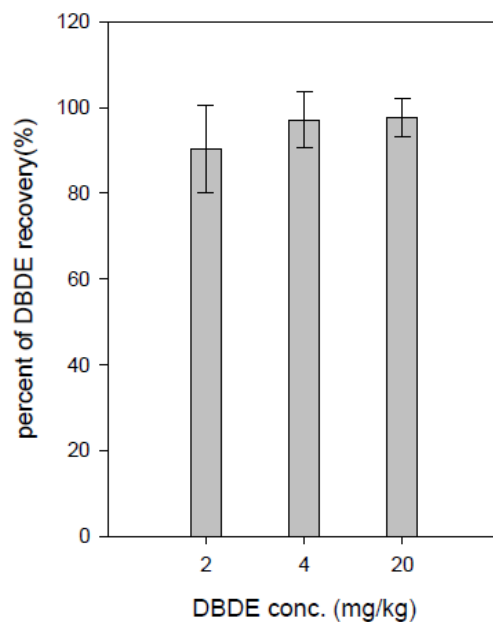


圖 4.1、土壤樣本中不同 DBDE 濃度之萃取回收率

表 4.1、自行開發之 DBDE 分析方法應用於底泥之檢量線線性水準(r^2)、再現性、偵測極限及回收率表現情形

Compound	Linearity (<i>r</i> ²)	Repeatability %		LOD	Recoveries(%) 20 mg kg ⁻¹
		RSD (n=3)		s/n=3	
		10 mg kg ⁻¹	20 mg kg ⁻¹	(mg kg ⁻¹)	
DBDE	0.9991	8±0.1	24±4	0.032	97.56±4

4.1.2 土壤樣品特性分析及其 PBDEs 濃度分析

本研究採集大安溪流域上游及下游大安溪橋及義里大橋之底泥進行底泥樣品之研究，底泥樣品採集後進行基本特性分析，如表 4.2 顯示，結果發現義里大橋及大安溪橋兩種底泥之質地分別為砂土及粉質壤土，在土壤有機值部分，位於上游之大安溪橋底泥有機質含量 0.749 % 高於下游義里大橋底泥 0.474 %。進一步以 GC/PDECD 分析土壤底泥中 PBDEs 濃度(表 4.3)，針對二到十溴二苯醚進行分析，結果發現兩處底泥 DBDE 濃度高達 32-35 ng/kg，為最主要的 PBDEs 污染物，此外也偵測到二到九溴不等之溴化物，九溴二苯醚(BDE-207 及 BDE-206)為次主要的 PBDEs 污染物(BDE-207 1.28-3.12 ng/kg、BDE-206 1.5-1.8 ng/kg)。此結果在許多國內外文獻也有相同實驗結果。

表 4.2、底泥基本特性分析

底泥名稱	含水量(%)	有機質(%)	質地	砂粒(%)	粉粒(%)	粘粒(%)
義理大橋	30	0.474	砂土	89.2	3.9	6.9
大安溪橋	30	0.749	粉質壤土	28.4	50.8	20.8

國外文獻顯示Eljarrat et al. (2004) 調查西班牙河川沉積物測得DBDE濃度平均2.1-132 ng/g dry wt；荷蘭河川沉積物發現DBDE濃度平均有4-510 ng/g dry wt (De Boer et al., 2003) 調查；而在瑞典河川沉積物中也可偵測到DBDE濃度平均有68-7100 ng/g dry wt (Sellstr et al., 1998)；而調查美國Virginia watersheds所測得知PBDEs總濃度結果有<0.5-52.3 ng/g dry wt (Hale et al., 2001)，甚至調查下水道污泥發現DBDE濃度可高達5 mg/kg乾重 (Hale et al., 2003)。

亞洲地區調查結果發現，1980年代檢測日本大阪地區河川底泥中的PBDEs濃度，發現DBDE所佔比例較高，濃度是其餘PBDEs的10倍之多 (Environmental Agency of Japan)；Li et al. (2012)調查長江流域東部沿岸底泥PBDEs濃度，DBDE濃度高達0.3-44.6 ng/g，其餘PBDEs (BDE-28, 47, 99, 100, 153, 154, 183)濃度則有ND-8.0 ng/g；南韓調查工業園區附近溪流底泥中發現23種PBDEs總濃度平均1.3-18700 ng/g dry wt (Moon et al., 2012)；此外在日本海域Osaka Bay及韓國海域的PBDEs濃度平均分別為8-352 ng/g dry wt及1.1-33.8 ng/g dry wt(Ohta et al., 2002; Moon et al., 2002)，所測得結果與本研究相差不遠。

國內研究方面環保署於民國 93 年至 99 年調查台灣地區 33 條河川底泥中 PBDEs 含量，發現在 24 種環境中常見的溴化物同源物中，以十溴二苯醚 DBDE 濃度為所有最高，其中北部區域淡水河系流域之河川底泥於 94 年調查時發現 DBDE 濃度高達 163 $\mu\text{g/kg dw}$ ，其他河川 DBDE 濃度亦有顯著高於其他同源物或同族物情形發生(環保署，2011)。李等人(2007)調查台灣 12 條河川的底泥 PBDEs 總平均濃度介於 825 pg/g dry wt.~90105 pg/g dry wt.，底泥樣本 PBDEs 同源物濃度分布情形，以 DBDE、BDE-197、BDE-47、BDE-183、BDE-99 等同源物為主。鍾尹如(2005)以加壓溶劑萃取法配合 GC/MS，開發環境固態樣品中 PBDEs 之分析方法，結果顯示台灣七處採樣點的底泥中皆有 PBDEs 污染，檢出率高達 100%，檢出物種包含 BDE-28、BDE-47、BDE-85、BDE-99、DE-100、BDE-138、BDE-153、BDE-154、BDE-183、BDE-203、BDE-206 及 DBDE，PBDEs 總濃度範圍介於 7,990 pg/g ~37,900 pg/g。陳重羽(2005)在台灣 12 條河川沉積物所測得 PBDEs 的總濃度

介於 0.8-80.1 ng/g dry wt，以八掌溪最高，卑南溪最低。底泥中 22 種 PBDEs 同源物其中以 DBDE 濃度為最高。江政傑(2006)研究調查台灣西南海域沉積物 PBDEs 的總濃度約 40.9-92 ng/g dry wt，河川底泥中以 DBDE 為最主要的優勢化合物佔全部的 68.8-77.9%。由這些研究結果顯示，PBDEs 已於台灣地區河川底泥中普遍存在。總和以上結果 PBDEs 普遍存在國各地的河川底泥中。

表 4.3、底泥 PBDE 濃度分析(ng/kg)

PBDEs Congeners		義里	大安	PBDEs Congeners		義里	大安
di-BDE	BDE-17	0.004	0.065	Hexa-BDE	BDE-154	0.016	0.022
Tri-BDE	BDE-28	0.011	0.018		BDE-153	0.038	0.041
Tetra-BDE	BDE-49	0.002	ND		BDE-138	0.013	0.005
	BDE-71	0.001	ND		BDE-156	0.011	ND
	BDE-47	0.046	0.215	Hepta-BDE	BDE-184	0.004	0.004
	BDE-66	0.026	ND		BDE-183	0.026	0.187
	BDE-77	ND	ND	Octa-BDE	BDE-191	0.011	0.006
Penta-BDE	BDE-100	0.008	0.008		BDE-197	0.043	0.164
	BDE-119	0.033	0.007		BDE-196	0.059	0.185
	BDE-99	0.109	0.075	Nona-BDE	BDE-207	1.285	3.125
	BDE-85	ND	0.004		BDE-206	1.556	1.871
	BDE-126	0.008	ND	DBDE	BDE-209	35.858	32.632

ND = 低於偵測極限

4.1.3 堆肥樣品特性分析

本研究選用之三種堆肥，其化學組成整理於表 4.4。灰份結果顯示，雲林蔗渣堆肥（C2 及 C6）之灰份（33.09 %及 46.23 %）明顯高於南投竹子粉製作堆肥（B2）之灰份（3.62 %），其原因為雲林糖廠蔗渣堆肥在製備的過程中，有加入適當的豬糞當作氮源（3.2.2 節），而豬糞中含有較多的無機雜

質，且又由於蔗渣原料中含有高含量的矽，因此雲林糖廠兩種蔗渣堆肥的無機成分均明顯高於南投竹子粉堆肥。

另外比較兩種蔗渣堆肥之有機質組成，有機質組成會隨著堆肥的腐熟度而逐漸礦化，C6 的灰份(46%)較 C2 的灰份(33%)為高，相對來說 C6 的腐熟程度(6 個月)的有機質含量較 C2 的腐熟程度(2 個月)的有機質含量為高。雖然三種堆肥的有機質組成比例相差不大，但如果考慮到南投竹子粉 B2 堆肥的灰份只有 3.6%，而雲林兩種蔗渣堆肥(C2 與 C6)的灰份含量卻高於 33%-46%，所以堆肥中有機質含量以單位重量來看，B2 的碳含量則是高出 C2 與 C6 許多的。

將有機質含量計算後比較為 C2>C6>B2，有機質含量扣除灰份後比例最高，其詳細計算如下:因此具有最強的吸附及分解之效果(表 4.4)，C2 及 C6 相比較，C2 > C6。

$$\text{C2 有機質(\%)} : (100\% - 33\%) \times 0.56\% = 37.83\%$$

$$\text{C6 有機質(\%)} : (100\% - 46\%) \times 0.63\% = 34.02\%$$

有機質含量越高不僅可以促進植物生長其微生物也會利用有機質取得能量與養分，才能大量繁殖以發揮其功能，推估因此可促進微生物分解污染物。

表 4.4、採集三種堆肥之化學組成

堆肥樣本	灰份(%)	C (%)	N (%)	H (%)	S (%)	O (%)
C2	33.09	56.55	2.57	5.11	0.70	35.06
C6	46.23	63.16	2.90	7.74	1.73	24.47
B2	3.62	67.87	4.39	3.50	0.64	23.60

4.1.4 堆肥吸附及生物降解行為

在吸附實驗中添加了疊氮化鈉(NaN_3) (做為控制組 control) 以抑制微生物的活性，所以 120 天 DBDE 的移除主要是以吸附為主。而在未加疊氮化鈉的系統中 (做為實驗組)，DBDE 的移除同時包含吸著作用 (sorption) 與生物降解作用 (biodegradation) 兩種機制，其實驗組扣除吸附作用所移除的量即為由微生物降解 DBDE 的量。三種有機堆肥(B2, C2, C6) 對 DBDE 吸附及生物降解結果圖 4.2 所示，分析如下：三組(B2, C2, C6)堆肥之吸附(控制組)結果分別減少至 14.87 mg/kg 及 13.71 mg/kg, 12.21 mg/kg。而 DBDE 生物降解實驗(實驗組)分別減少至 13.93 mg/kg 及 6.73 mg/kg, 7.53 mg/kg (設計之 DBDE 初始濃度為 20.0 mg/kg)。

進一步以 DBDE 濃度分析結果估算三組(B2, C2, C6)堆肥生物吸附部分之貢獻，計算方式以初始濃度減掉吸附後的濃度在除以初始濃度，即可得到吸附貢獻量百分比，其吸附貢獻量 B2, C2, C6 分別為 25.61%、31.4%及 38.95% (圖 4.3)，雲林蔗渣堆肥 6 個月(C6)有最好的吸附效果 38.95%，最差為南投 2 個月堆肥(B2) 25.61%。總合以上結果可得知，添加抑菌劑之控制組 DBDE 濃度亦有隨降解時間減少的現象，推測是因為堆肥樣本中含有較高有機質含量 (表 4.4)以及添加之土壤底泥具有高有機質成分(表 4.2)，對於 DBDE 具有吸持行為。

另外計算三組(B2, C2, C6)堆肥生物降解之貢獻，計算方式以生物降解濃度減掉吸附後的濃度在除以初始濃度，即可得到生物降解貢獻量百分比，B2, C2, C6 分別為 4.74 %、34.93 %及 23.4 % (圖 4.4)，雲林蔗渣堆肥 2 個月(C2)有最好的生物降解效果 34.93 %，最差為南投 2 個月堆肥(B2) 4.7 %。

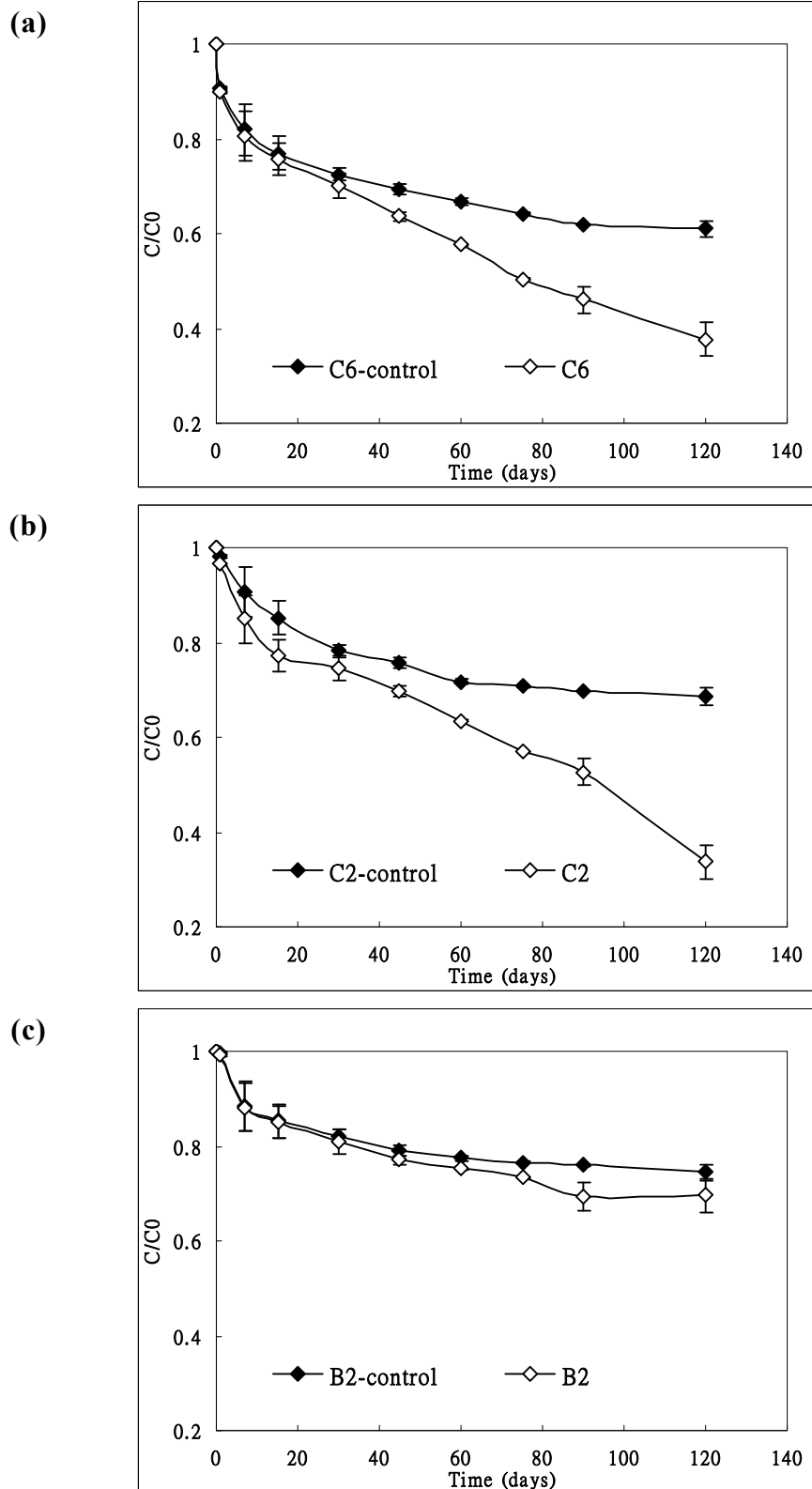


圖 4.2、堆肥樣品吸附及生物降解實驗 (a)雲林蔗渣堆肥 2 個月(C2)；(b)雲林蔗渣堆肥 6 個月(C6)；(c)南投堆肥 2 個月(B2)。

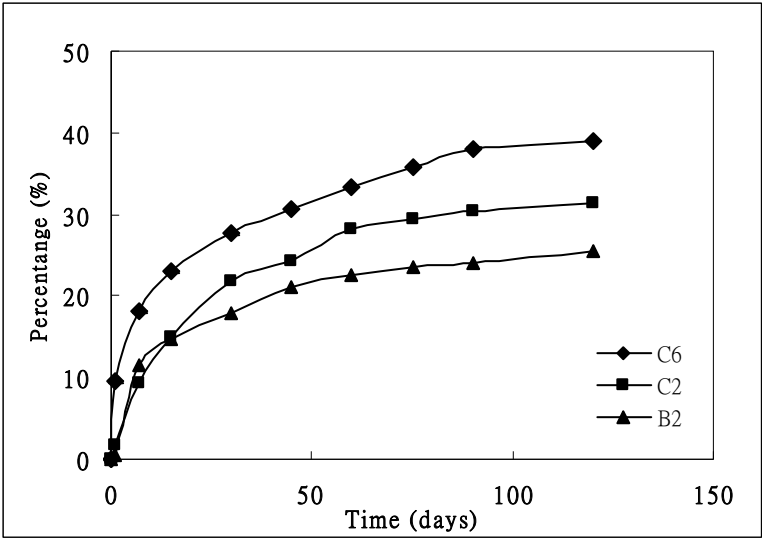


圖 4.3、三種堆肥之吸附貢獻百分比隨時間變化情形

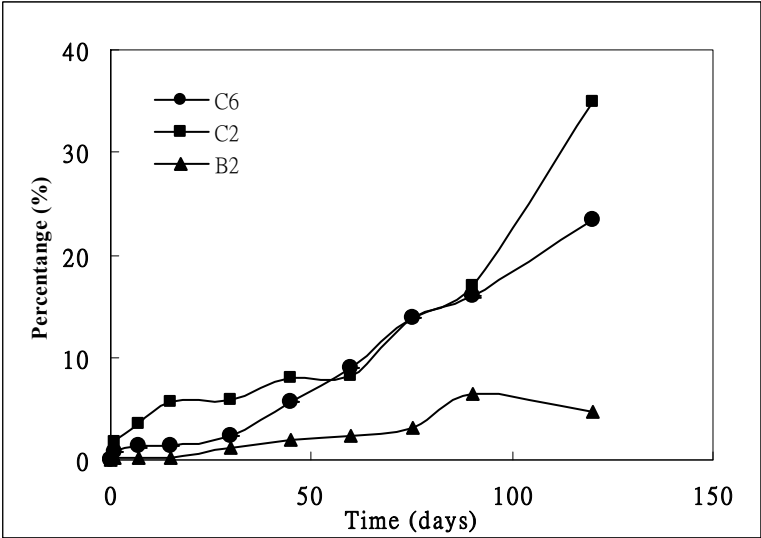


圖 4.4、三種堆肥之生物降解貢獻百分比隨時間變化情形

表 4.5、三種堆肥之吸附及降解之貢獻量(120 天)

	吸附效率	生物分解效率	總去除率
C2	31.45 %	34.9 %	66.35 %
C6	38.95 %	23.4 %	62.35 %
B2	25.65 %	4.7 %	30.5 %

由實驗結果可知添加三種堆肥均發生生物降解作用，堆肥生物降解 DBDE 過程中，以擬一階反應方程式表示：

$$C = C_0 e^{-kt}$$

式中 C 為濃度/時間， C_0 為初始濃度， k 為反應速率常數(min^{-1})， t 為時間，其反應速率常數 k 整理於表 4.5。

由結果得知，其降解速率 $C6 (0.0458 \text{ day}^{-1}) > C2 (0.0352 \text{ day}^{-1}) > B2 (0.0286 \text{ day}^{-1})$ ，與圖 4.2 結果比較，雲林蔗渣堆肥 C6 有較快的降解速率，雲林蔗渣堆肥 C2 有較好的降解效果，而南投 2 個月堆肥 B2 則有較慢的降解速率以及降解效果。參考過去厭氧生物分解 DBDE 速率 0.001 day^{-1} (Gerecke et al., 2006) 而言，做為離場整治方法仍具有高競爭性。

表 4.6、生物降解過程之反應速率常數 k

樣本	K (day^{-1})
C2	0.0352
C2-Control	0.0318
C6	0.0458
C6- Control	0.0338
B2	0.0286
B2- Control	0.0393

4.1.5 堆肥水質參數分析

B2 的碳含量高於 C2 與 C6，也在血清瓶的實驗中的可溶性有機碳含量 (DOC)數據中顯示 (圖 4.4)。B2 堆肥的 DOC，明顯的高於 C2 與 C6 的值，除了是因為 B2 樣本中含有較低的灰份含量外，在製備 B2 堆肥中所加入的菌液中，亦含有相當量的糖蜜。

而由於在製備 B2 堆肥所製備的菌液中，由於含有乳酸菌、酵母菌等產酸菌，所以 B2 在培育的過程中，血清瓶中的 pH 值平均小於 4.5，pH 值範圍介於 4.15-5.11 (圖 4.6)，其他兩種蔗渣堆肥 C2 與 C6，則能維持系統 pH 值均在 6 以上，pH 值範圍分別介於 6.26-6.91 及 6.53-7.06，顯示蔗渣堆肥樣本含有不錯的緩衝能力 (Tsui et al., 2011)。一般情況下，微生物適合生長溫度介於 5-9 之間，為中性 pH 值，如果 pH 值低於 5 或高於 9 時，微生物基礎代謝會受到阻礙，若系統中的 pH 值改變過大亦會使微生物代謝機制改變甚至造成不可回復的影響(陳紅彤，2011)，由此結果推亦解釋了 DBDE 降解過程中雲林蔗渣堆肥(C6 及 C2)的降解效率高於南投竹子堆肥(B2)。

觀察血清瓶中的ORP(圖4.7)，在生物降解初期7天，其ORP為正的，12天過後其ORP降至負值，均降至-130 mV以下，C2與C6的ORP值下降的較快，整個生物降解過程後期，ORP平均均在-150 mV以下，由ORP結果可得知此生物降解系統是在厭氧情況下發生，有助於微生物對於PBDEs的還原脫溴。此外實驗過程也發現後期ORP有上升情況，推估可能是電子供給者不足(林煦芳，2010)，或是在採樣開瓶過程中，空氣中氧氣進入之關係，而導致ORP上升。一般的含鹵素有機物介於 R-Cl 或 R-Br 和 R-H 狀態間的還原電位差為 +250 mv 至 +600 mv之間 (Ferguson and Pietair, 2000)。以熱力學角度觀察，在厭氧條件下是有利其作為電子接受者反應進行(Holliger et al., 1999)。

將 pH 值(圖 4.6)與 ORP(圖 4.7)相互比較發現，當 pH 值越高相對應之電位則會越低，例如:三種堆肥之 C6 的 pH 值最高其範圍為 6.53-7.06，相對應之 ORP 則是最低的，相反的三種堆肥之 B2 的 pH 值最低，其範圍為 4.15-5.11，相對應之 ORP 則是最高的。

本研究同時偵測溶液中其他離子 NO_3^- 、 NO_2^- 及 SO_4^{2-} 濃度(圖 4.8、圖 4.9 及圖 4.10)，發現三種堆肥也都存在這些離子，其中 C2, C6 堆肥液之 NO_2^- 以及 C2, C6, B2 之 SO_4^{2-} 濃度都有累積的現象，顯示在厭氧環境下兼氧性微生物可能可以利用硝酸鹽及硫酸鹽做為電子接受者， SO_4^{2-} 電子接受者後期濃度 (第 90 天) 均高於初期濃度 (第 0 天)。

堆肥具有很好的還原能力，而可將不同的污染物還原 (Lee et al., 2006; Tsui and Roy, 2007; Tsui et al., 2007; Tsui et al., 2010)。本研究團隊曾利用蔗渣堆肥、落葉堆肥、牛糞堆肥、雜草堆肥進行四氯乙烯的生物還原實驗，發現在不需要添加額外的電子提供者與微生物的情形下，所測試的堆肥均有能力將四氯乙烯還原成無害的乙烯，且腐熟度較低的堆肥還原能力較強(鐘苑慈，2008)。並發現在堆肥中添加葡萄糖可大幅的提升堆肥還原四氯乙烯的效率，甚至在四氯乙烯起始培育過程中，溶液的 pH 維持在 7 左右，而 ORP 隨著培育時間而下降，這些結果顯示堆肥或濃度為 2,000 ppm 的情形下也有明顯的還原脫氯現象產生。由於堆肥有極佳的緩衝能力，所以在整個可作為一適當的介質，以進行含氯有機物的還原脫氯 (林煦芳，2010)。

鐘苑慈 (2008) 利用微生物抑制劑來觀察對堆肥還原四氯乙烯的影響，實驗結果顯示在加入疊氮化鈉(NaN_3)時，四氯乙烯還原脫氯的現象幾乎完全被抑制，表示堆肥的還原脫氯主要是生物作用。堆肥有機物的吸持行為可能會影響生物有效性，降低生物降解的效率。不過此現象對底泥的污染整治卻不見得不利，因為過去的研究指出水體中的類似碳黑 (black carbon) 的成分，因可有效吸持疏水性污染物，而可減低污染物對水中生物的毒害 (Koelmans et al., 2006)。

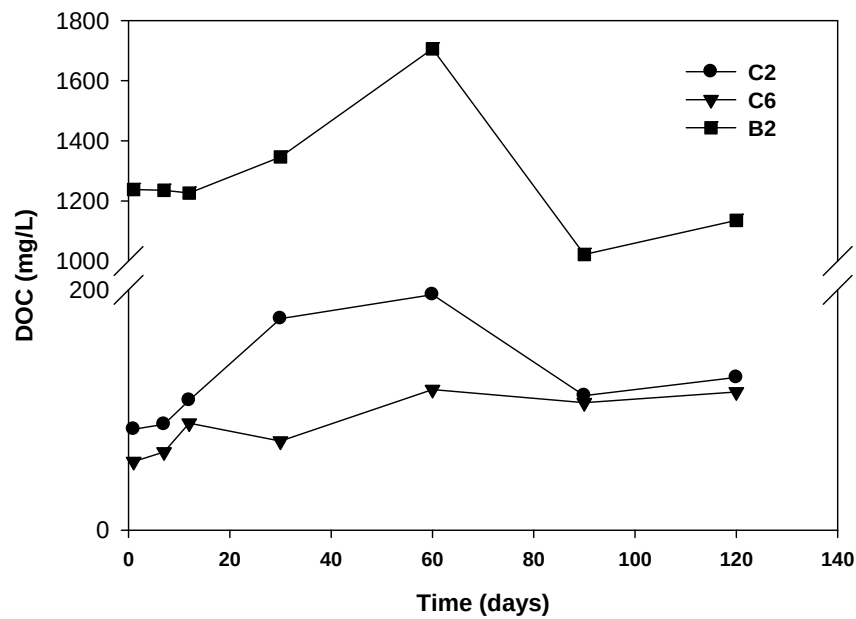


圖 4.5、三種堆肥之 DOC 隨時間變化之情形

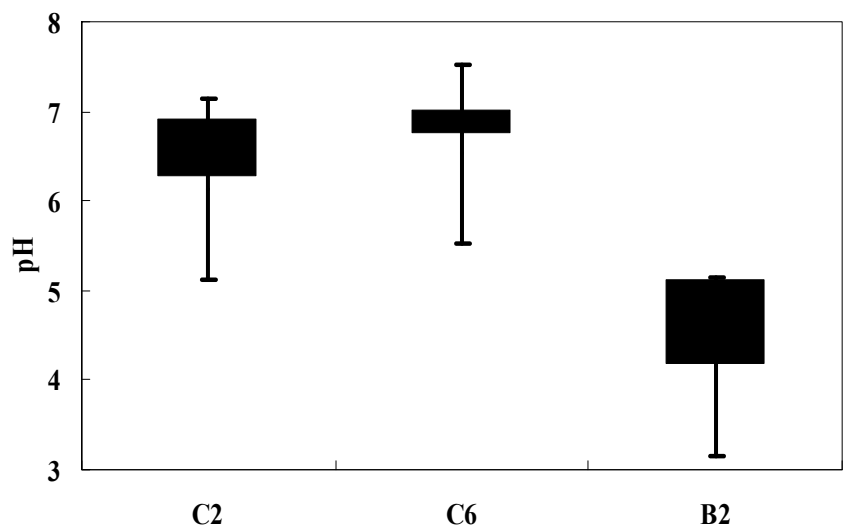


圖 4.6、三種堆肥降解 DBDE 期間之 pH 變化情形

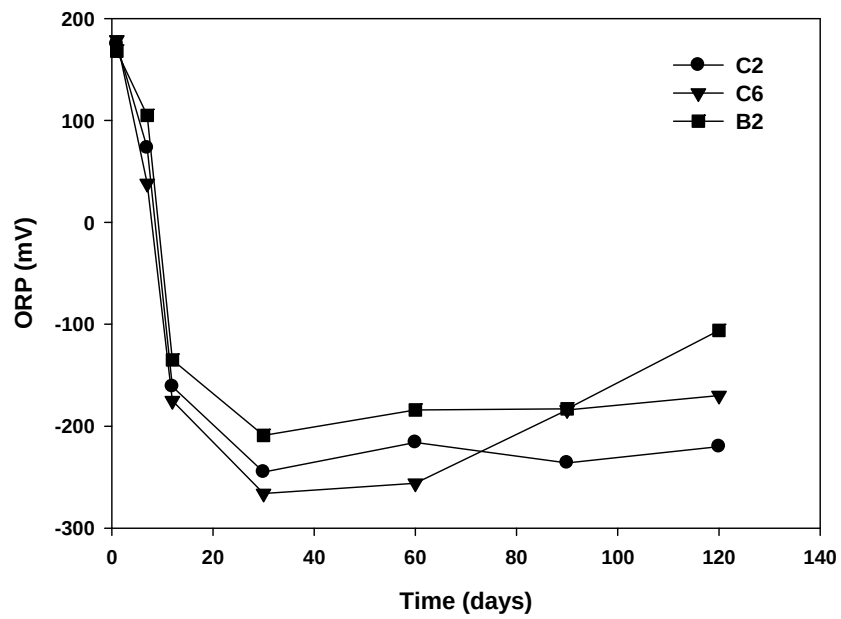


圖 4.7、三種堆肥之 ORP 隨時間變化之情形

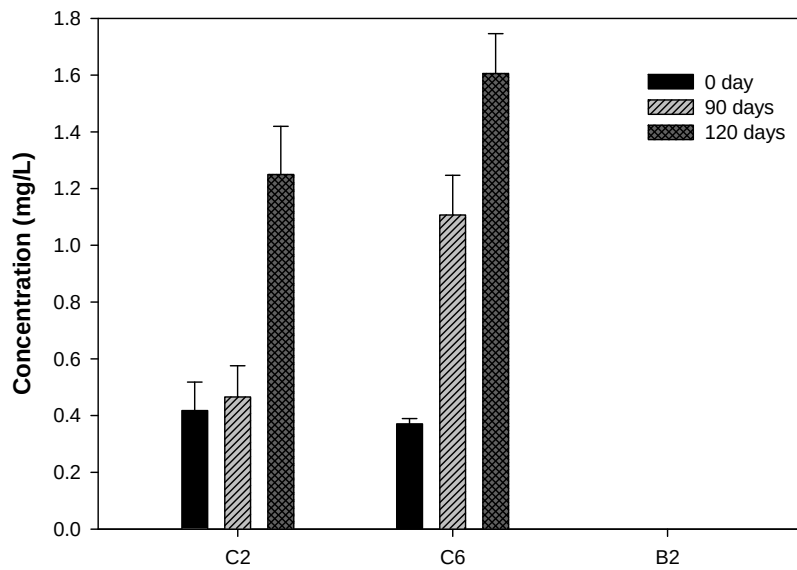


圖 4.8、三種堆肥降解 DBDE 之 NO₂⁻濃度變化

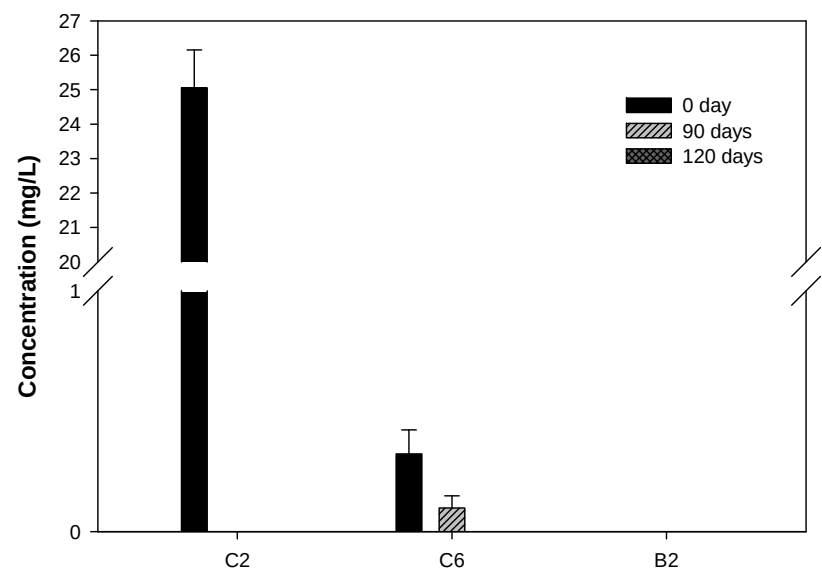


圖 4.9、三種堆肥降解 DBDE 之 NO_3^- 濃度變化

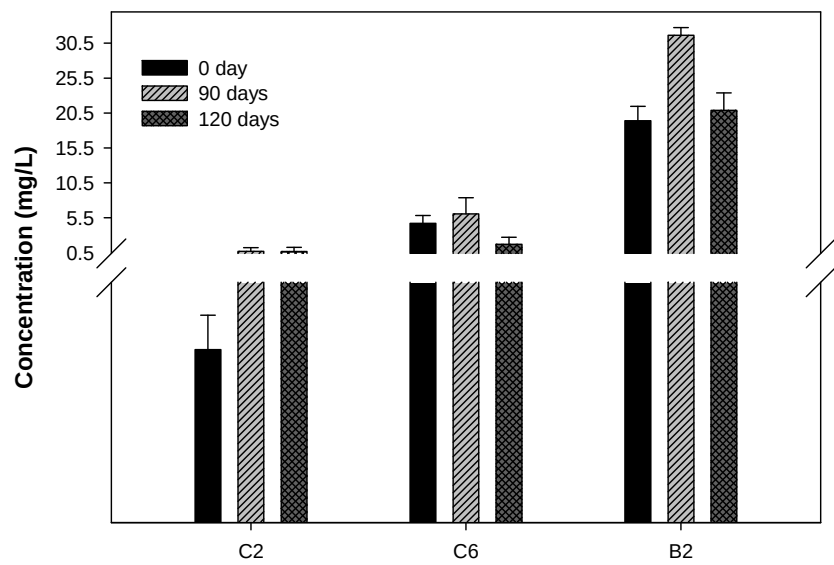


圖 4.10、三種堆肥降解 DBDE 之 SO_4^{2-} 濃度變化

4.1.6 堆肥生物降解產物分析

利用 GC-PDECD 進行 PBDEs 產物分析，DBDE 經過厭氧堆肥生物降解過程的脫溴代謝中間產物，表 4.7 表示各溴數之總濃度，顯示三種堆肥微生物降解 DBDE 之脫溴代謝產物，將其各 PBDEs 代謝產物之濃度繪製於圖 4.10，分析中間代謝產物可測得兩種九溴二苯醚 (BDE-206 及 BDE-207)，總濃度為 1,176-18,096 ng/g；兩種八溴二苯醚 (BDE-196 及 BDE-197)，總濃度為 51-1,402 ng/g；三種七溴二苯醚(BDE-191、BDE-184 及 BDE-183)，總濃度為 9-239 ng/g；四種六溴二苯醚 (BDE-138、BDE-154、BDE-153 及 BDE-156)，總濃度為 2-37.5 ng/g；五種五溴二苯醚 (BDE-85、BDE-99、BDE-100、BDE-119 及 BDE-126)，總濃度為 0.2-11.16 ng/g；五種四溴二苯醚 (BDE-66、BDE-49、BDE-47、BDE-71 及 BDE-77)，總濃度為 0.16-6 ng/g；兩種三溴二苯醚 (BDE-17 及 BDE-28)，總濃度為 0.07-2.4 ng/g，共 23 種 PBDEs 產物。由產物結果可推估此 DBDE 降解過程式進行還原脫溴反應，是由高溴數(十溴)逐一脫溴至低溴數(三溴)。

由表 4.7 及圖 4.11 結果發現，堆肥降解 DBDE 之初期(第 0 天)其 PBDEs 濃度較高，降解後期(第 90 天)其 PBDEs 濃度較低，在三種堆肥系統中均有相同的結果，推估其可能原因為堆肥吸附降解實驗中，不僅僅是添加內含其他 PBDEs 同源異構物之 DBDE(純度 99%，內含其他)，在實驗中使用之底泥含有 PBDEs，因此在初期均可偵測到 PBDEs，然而在後期 PBDEs 濃度均降解，由圖 4.2 證實是底泥及堆肥吸附或堆肥微生物進行生物降解去除而減少，導致 PBDEs 濃度降低。

許多研究證實，在厭氧過程中微生物脫溴反應為最主要的行為，Gerecke et al. (2005) 研究利用厭氧活性污泥降解 DBDE，結果發現厭氧微生物在降解的過程中有發生厭氧脫溴反應。此外，有研究證實了厭氧微生物降解 PBDEs 之代謝途徑主要為脫溴反應 (Robrock et al., 2008)。Lee and He (2010) 利用土壤與底泥中的微生物進行 PBDEs 厭氧生物降解，發現在厭氧過程中是以還原脫溴為主要的降解行為 (Lee and He, 2010)，上述結果可得知，本

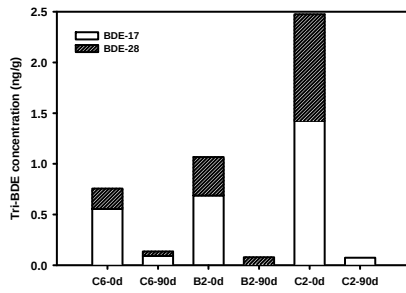
研究在厭氧環境下是以脫溴為主要的降解機制。進一步將分析所得之 PBDEs 的產物結果推估出堆肥微生物對於 DBDE 的主要脫溴途徑，結果顯示為圖 4.12，由此降解途徑發現，DBDE 是逐一脫溴，可降解至九溴到三溴。

表 4.7、三種堆肥微生物降解 DBDE 之各溴數代謝產物之總濃度

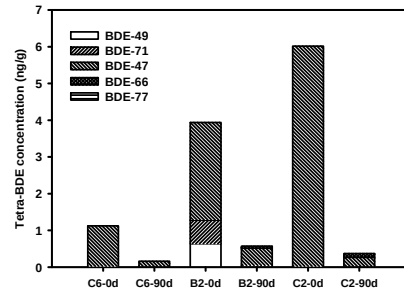
Days	Conc. (ng/g)					
	C2		C6		B2	
	0	90	0	90	0	90
Nona-BDE	18,096.6	1,886.7	4,289.2	1,176.5	6,932.4	2,149.1
Octa-BDE	1,402.4	118.6	594.98	51.83	586.3	75.7
Hepta-BDE	239.8	16.86	82.11	9.5	95.53	13.25
Hexa-BDE	37.9	4.19	12.46	2.25	17.69	2.61
Penta-BDE	11.16	0.38	4.77	0.198	4.075	1.17
Tetra-BDE	6.01	0.37	1.125	0.16	3.93	0.56
Tri-BDE	2.47	0.075	0.75	0.13	1.06	0.07

本研究結果推估溴化物的產物濃度與原始所添加的 DBDE 的量，並沒有達到質量平衡關係，可能原因為微生物經過一系列連續脫溴反應，形成更低溴數的化合物或未知的含溴代謝產物(Elkarmi et al., 2008)，因此 PBDEs 增加量並未與 DBDE 減少量達成平衡，此外亦有可能有其他 PBDEs 產物低於儀器偵測極限，因此無法分析到。亦有可能有些兼氧菌亦可能於厭氧環境中進行非脫溴反應行為。Gerecke 等人(2005)指出部份 DBDE 可能被微生物轉換成非偵測目標的未知代謝產物，造成部份代謝產物生成未被列入計算，導致 DeBDE 減少量與 PBDEs 增加量不符合質量平衡，本研究亦有相似結果，表示微生物降解過程中可能產生未知的含溴代謝產物，或先利用反應過程之低溴數中間產物，因此 PBDEs 增加量並未與 DBDE 減少量達成質量平衡(Gerecke et al., 2005)。本研究僅利用 GC/MS 進行脫溴代謝產物 PBDE 產物分析，但經質量平衡估算結果及其他文獻(Robrock et al., 2008)應會發生礦化反應。

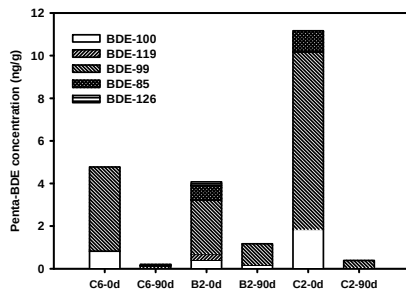
(A)



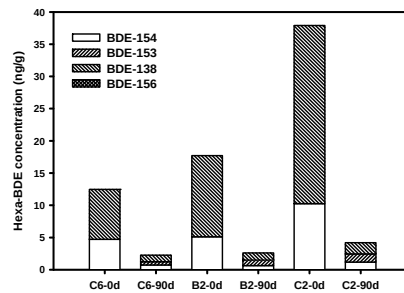
(B)



(C)



(D)



(E)

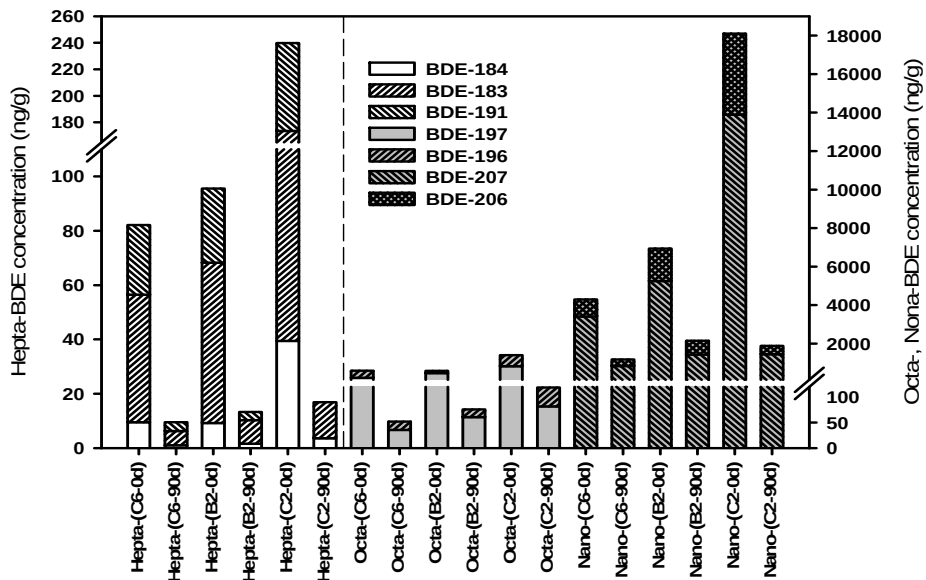


圖4.11、三種堆肥微生物降解DBDE之脫溴代謝產物。

(A)Tri-BDE產物(B) Tetra-BDE產物(C) Penta-BDE產物(D) Hexa-BDE產物
(E) Hepta-BDE, Octa-BDE及Nona-BDE產物。

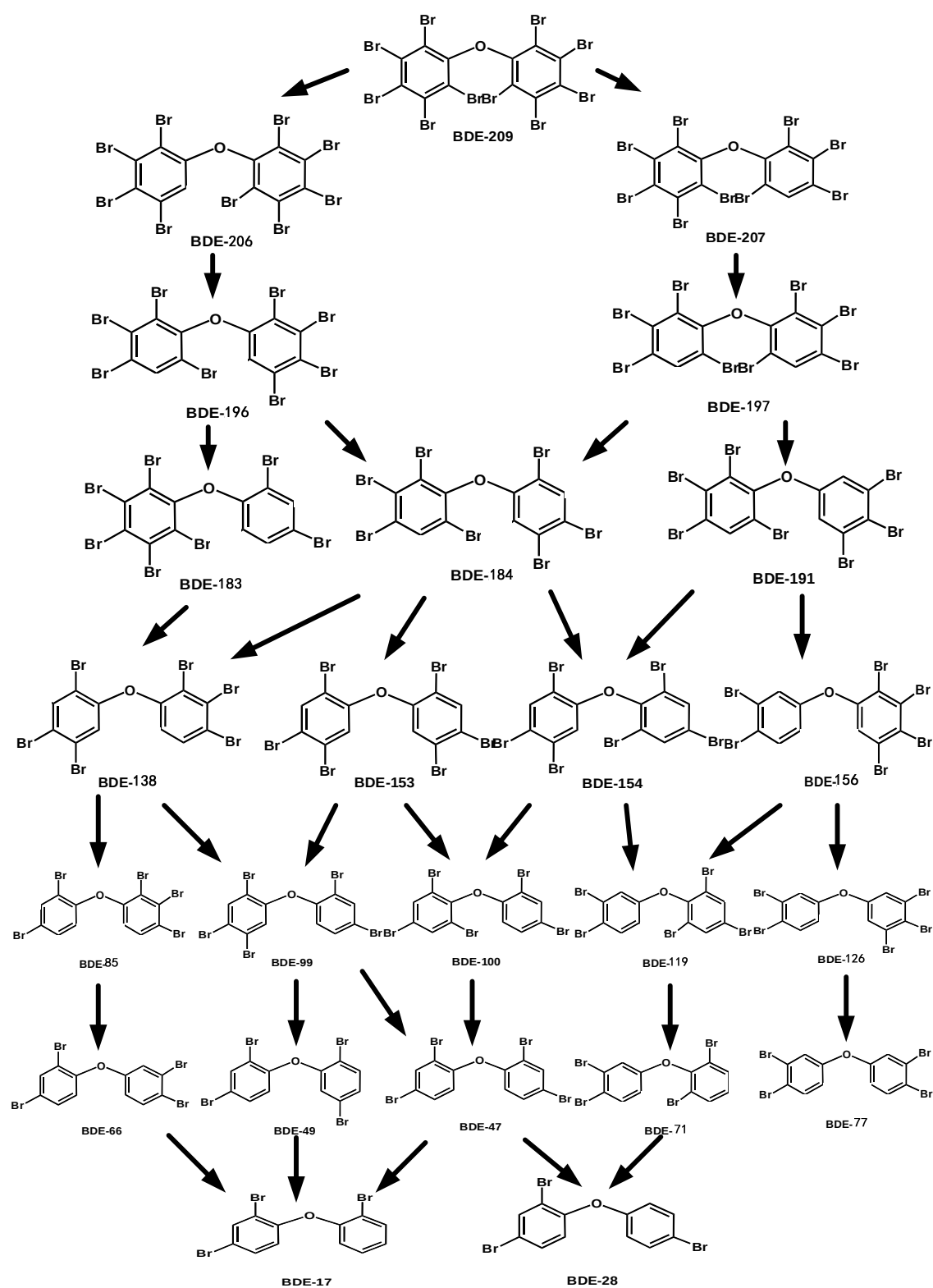


圖 4.12、本研究預測生物降解 DBDE 之脫溴降解途徑

4.1.7 堆肥生物降解之族群多樣性分析

堆肥吸附及生物降解 DBDE 過程中，於第 0、1 及 3 個月實驗結果點萃取其微生物 DNA，進行 PCR 反應，將所得到之細菌域 (Domain Bacteria) 的 PCR 產物進行 DGGE，分析族群多樣性，實驗結果顯示於圖 4.13，三種堆肥微生物的族群多樣性結果，實驗結果發現三種堆肥的細菌域的族群結果有很大不同，然而在相同堆肥的細菌降解 DBDE 過程中發現，C2 微生物族群變化並不明顯 (條帶變化為 18-21-19)；C6 的微生物族群改變較大 (條帶變化為 11-12-21)，條帶有逐漸增長趨勢；B2 的微生物菌群有些許的改變 (條帶變化為 14-13-11)，分解過程條帶數有減少的趨勢 (表 4.8)。

另外將其 DNA 進行古細菌域 (Domain Archaea)PCR 反應，所得到之古細菌域的 PCR 產物進行 DGGE，結果顯示於圖 4.14，發現三種堆肥的族群結構不同，其條帶數差異並不明顯 (表 4.8)，但三種堆肥之間之微生物族群仍有些許不同，由此結果可證實三種堆肥均存在著古細菌。

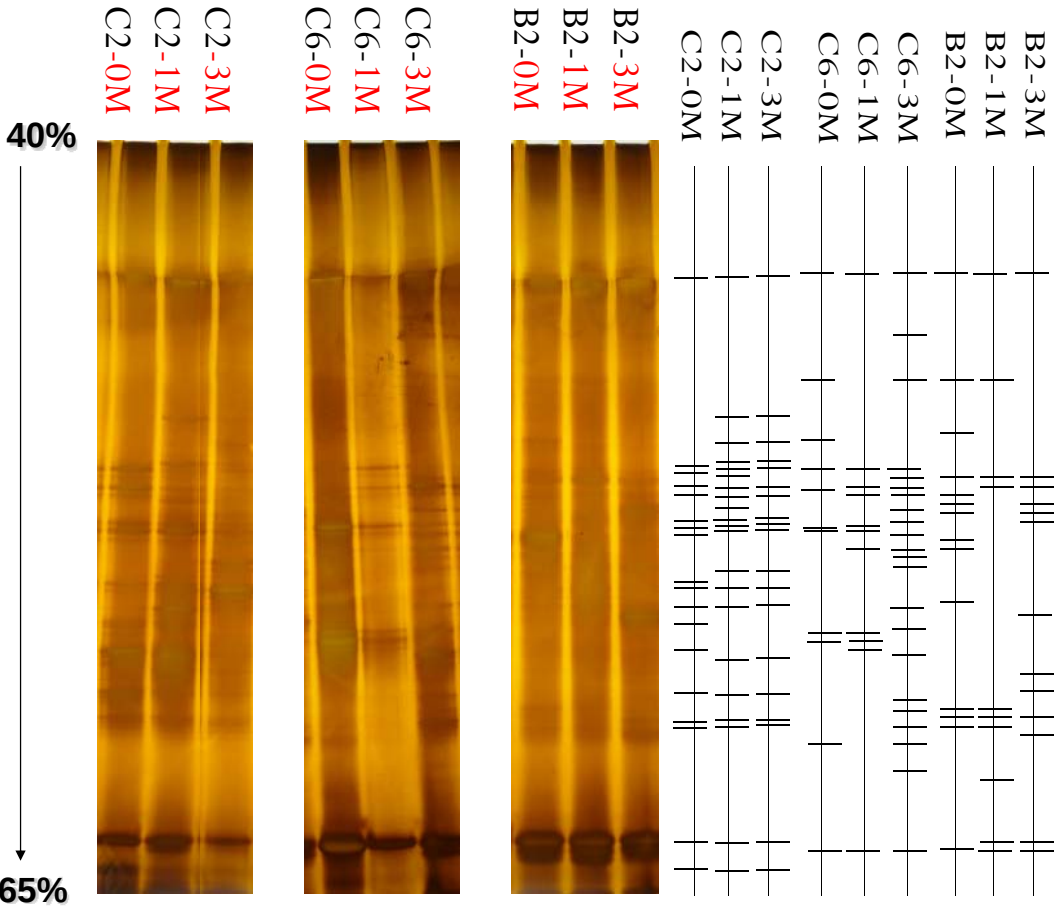


圖 4.13、細菌域微生物族群 DGGE 分析之族群多樣性

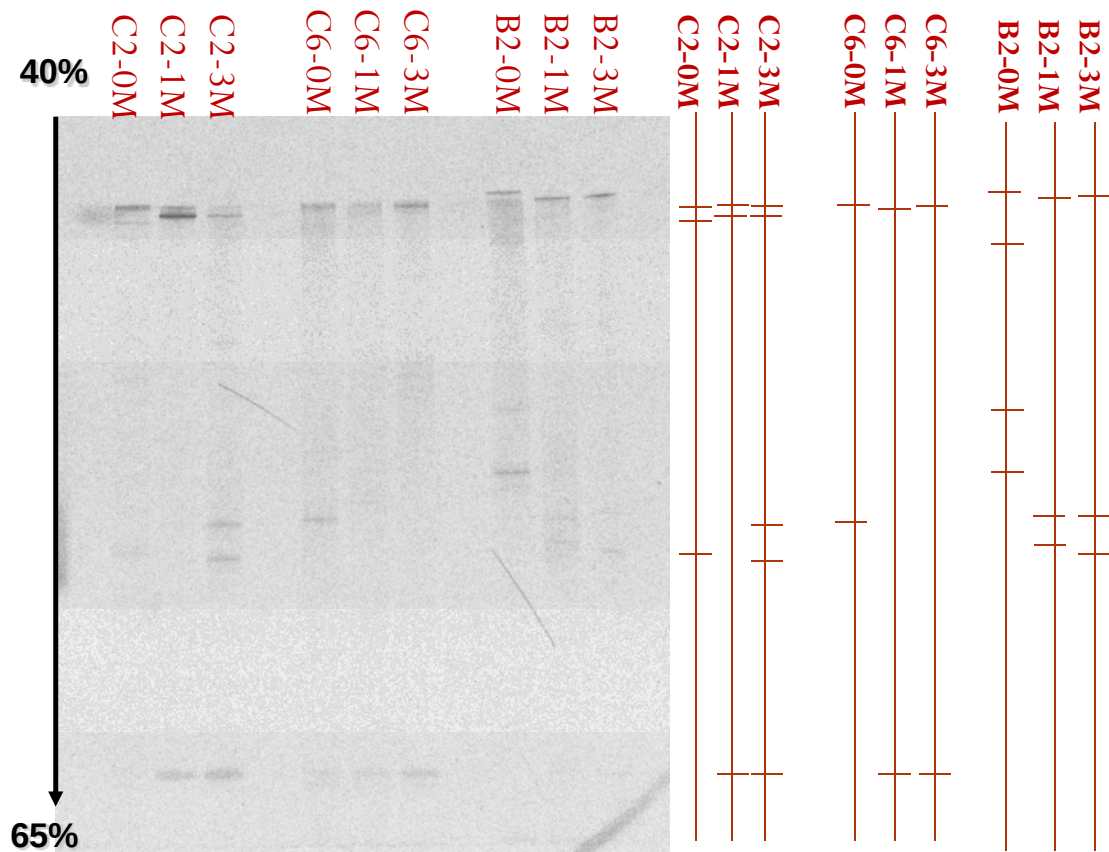


圖 4.14、古細菌域微生物族群 DGGE 分析之族群多樣性

表 4.8、微生物族群多樣性分析之條帶數變化

Time (days)	Band change					
	Domain Bacteria			Domain Archaea		
	C2	C6	B2	C2	C6	B2
0	18	11	14	3	2	4
30	21	12	13	3	2	3
90	19	21	11	5	2	3

4.1.8 堆肥生物降解之微生物菌相結構解析

分子選殖 Cloning 結果分析，DBDE 生物降解過程中微生物族群結構，發現經由 NCBI 比對後鑑定出幾種細菌的存在於三種堆肥環境中，菌種鑑定結果顯示於表 4.9。根據這些微生物的 16S rRNA 基因序列，三種堆肥微生物最接近的種類是：*Bacillus* spp. (相似度 97-99%) 屬於 Firmicutes；*Pseudomonas* spp. (相似度 97-99%) 屬於 γ -proteobacteria。其他微生物菌種 *Lactobacillus* spp. (相似度 97-99%) 屬於 Firmicutes；*Methylophilus* spp. (相似度 97-99%) 屬於 β -proteobacteria；*Clostridium* spp. (相似度 97-99%) 屬於 Firmicutes。將其菌種結果與 clone 菌株進行親緣樹繪製，顯示於圖 4.15。

表 4.9、分子選殖之菌種鑑定結果

B2		C6		C2	
菌種	相似度(%)	菌種	相似度(%)	菌種	相似度(%)
<i>Methylophilus</i> spp.	97	<i>Nitrosomonas</i> spp.	97-98	<i>Nitrosomonas</i> spp.	97-98
<i>Bacillus</i> spp.	97-99	<i>Clostridium</i> spp.	97-99	<i>Clostridium</i> spp.	97-99
<i>Pseudomonas</i> spp.	97-99	<i>Bacillus</i> spp.	97-99	<i>Bacillus</i> spp.	97-99
<i>Actinobacteria</i> spp.	97-98	<i>Pseudomonas</i> spp.	97-99	<i>Pseudomonas</i> spp.	97-99
<i>Lactobacillus</i> spp.	97-99	<i>Enterococcus</i> spp.	97-98	<i>Enterococcus</i> spp.	97-98
		<i>Dehalococcoides</i> sp.	97	<i>Dehalococcoides</i> sp.	97
		<i>Nitrobacter</i> spp.	97-98	<i>Nitrobacter</i> spp.	97-98

本研究經過 120 天的生物降解發現主要以 proteobacteria、Firmicutes 及 Actinobacteria 為主要的微生物菌群。而 proteobacteria 最主要的微生物為 β -proteobacteria 和 γ -proteobacteria。Zhu et al. (2010) 研究顯示 α -proteobacteria 微生物菌群在 1 ng/g 的 DBDE 環境下而受到抑制，而 β -proteobacteria 和 γ -proteobacteria 微生物菌群則可以忍受 DBDE (Zhu et

al., 2010)。本研究結果發現 *proteobacteria* 主要為 β -*proteobacteria* 和 γ -*proteobacteria* 兩種微生物族群，並無鑑定出 α -*proteobacteria*。

Lactobacillus spp. 為革蘭氏陽性菌屬於兼性厭氧菌，普遍存在於堆肥的環境中，本研究選用之南投 2 個月堆肥，此堆肥在生產過程中有額外添加枯草桿菌，因此鑑定出此菌種亦可能是在製做過程中所添加之菌種。另外有研究指出 *Lactobacillus* spp. 普遍存在於堆肥環境中，為主要的堆肥菌種 (Makarova et al., 2006)。此外，本研究另一種主要的菌群為 *Bacillus* spp.，在堆肥中亦是常見的微生物菌種之一，屬於好氧微生物或兼性厭氧菌，具有過氧化氫酶(catalase) (Marinka et al., 2001)，此菌株在三種堆肥系統中均可以被鑑定出來。

甲烷氧化菌 *Methylophilus* spp. 在許多研究中證實可將有機氯化化合物進行厭氧脫氯，此菌株在 B2 環境下被鑑定出來。*Methylophilus* spp. 能對許多環境污染物包括含氯脂肪族碳氫化合物如三氯乙烯 (TCE) 進行初始氧化作用，這是因為在甲烷代謝途徑的第一個酵素甲烷單氧化酵素有寬廣的基質專一性，可以進行共同代謝作用 (李和盧，1997)。Bader and Leisinger (1994) 發現 *Methylophilus* sp. strain DM11 可以進行脫鹵分離。Stourman et al. (2003) 使用了相同的菌株可以產生二氯甲烷脫鹵素酶，並用它在二氯甲烷中的厭氧脫氯。Cai et al. (2011) 分離並鑑定出 *Methylophilus* spp. 能降解 benazolin-ethyl 和利用該化合物為唯一碳源。在本研究中，存在的 *Methylophilus* spp.，可能具有脫溴的能力存在，此菌株推估可能產生類似的酶用於降解多溴聯苯醚 (Stourman et al., 2003)。

Pseudomonas spp. 不管是好氧環境或厭氧環境下，是最普遍用來降解含鹵素類的碳氫化合物的微生物，普遍存在自然環境中，本研究三種堆肥均可鑑定出此菌種。其 Kiyohara et al. (1992) 利用 *Pseudomonas pickettii* 對 0.5 mM 的 2,4,6-trichlorophenol 進行生物降解，15 小時後可以偵測到 1.5 mM 的氯離子產生。Kimbara et al. (1988) 鑑定出 *Pseudomonas* spp. 可以有效的降解 PCBs，包括 2,3,4,2',5'-pentachlorobiphenyl、1,2,4,5,2',5'-pentachlorobiphenyl 和 2,3,4,5,6-pentachlorobiphenyl 因此可推估

Pseudomonas spp. 在本研究中具有降解 DBDE 能力的一種微生物。Zhang et al. (2012) 從土壤中分離出 *Pseudomonas stutzeri* 可以有效的降解 BDE-47，並可以 BDE-47 當作為唯一的碳源，並在兩週內有效的轉換 97.94% 的 BDE-47 (Zhang et al., 2012)。

Clostridium spp. 又稱梭狀芽孢桿菌屬或厭氧芽孢桿菌屬，是一類能產生內生孢子的厭氣性革蘭氏陽性菌。Hou 和 Dutta (2000) 研究顯示 *Clostridium* spp. 常見於厭氧環境中，為 PCB 降解菌群中最常見的優勢菌群 (Hou and Dutta, 2000)。此外，亦有研究顯示以 Aroclor 1242 和 3,4,2'-CB 連續轉殖馴養的 PCB 降解菌群，發現最主要的微生物菌群屬於 *Clostridium* spp.，故推論內生孢子菌為脫氯菌群之重要組成 (La Montagne et al., 1998)，由於上述結果可推論出此微生物菌群在堆肥環境中亦可能進行脫溴反應。樣本中另發現另一株脫氯菌群為 *Dehalococcoides* sp. 在許多文獻證實可以降解含鹵素類的化合物 (Rosa et al., 2007; Holmes et al., 2006)。

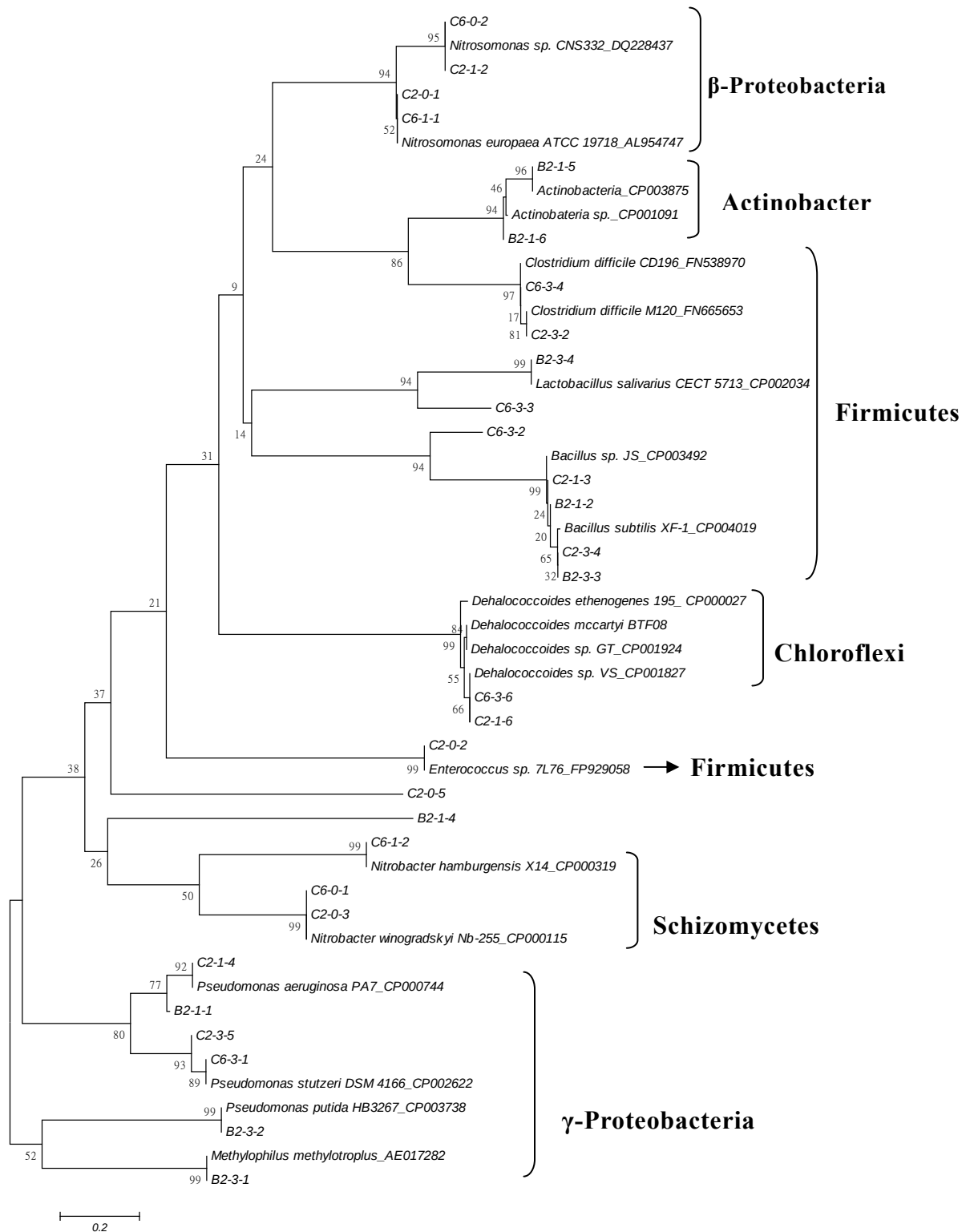


圖 4.15、三種堆肥微生物之親緣樹分析
(第一碼代表堆肥樣本；第二碼代表採樣月份；第三碼代表挑選菌株編號)

4.1.9 堆肥生物降解之功能性基因分析

本研究利用PCR方法鑑定生物降解DBDE之功能性基因表現，分別選用兩種功能性基因，為還原性脫鹵酵素(圖4.14)及雙氧化酵素(圖4.15)。由圖4.14顯示結果三種堆肥實驗初期(0個月)至末期(4個月)均可偵測出還原性脫鹵基因，由圖4.11結果顯示降解過程以GC-MS分析出低溴數產物，因此可推斷出三種堆肥降解DBDE過程中均會進行生物性還原脫溴反應，此外，由表4.8菌種鑑定結果鑑定出 *Dehalococcoides* sp.，此菌可以進行生物性還原脫溴(Tokarz et al, 2008; Rosa et al., 2007; Holmes et al., 2006)，由上述兩種原因，可以確定此研究所使用的堆肥微生物菌群可進行生物性還原脫鹵反應。

圖4.15結果可發現，雙氧化酵素均有正反應的表現，推估此厭氧堆肥降解過程中，存在某些兼性厭氧菌(表4.8)具有雙氧化酵素，例如 *Pseudomonas* spp. 無論在好氧厭氧下，均可分解含鹵素類化合物(Kiyohara et al., 1992; Kimbara et al., 1988; Zhang et al., 2012)，因此在降解過程中有可能進行氧化分解，以至於無法達到溴離子的質量平衡。

過去有許多研究亦利用功能性基因去分析其降解能力，Robrock et al. (2011) 分析 *Rhodococcus jostii* RHA1中聯苯雙氧酶(biphenyl dioxygenase, BPDO)的 *bphAa* 基因和乙苯雙氧酶(ethylbenzene dioxygenase, EBDO)的 *etbAa1* 和 *etbAc* 基因，其基因表現和RHA1降解PBDEs有負相關性。

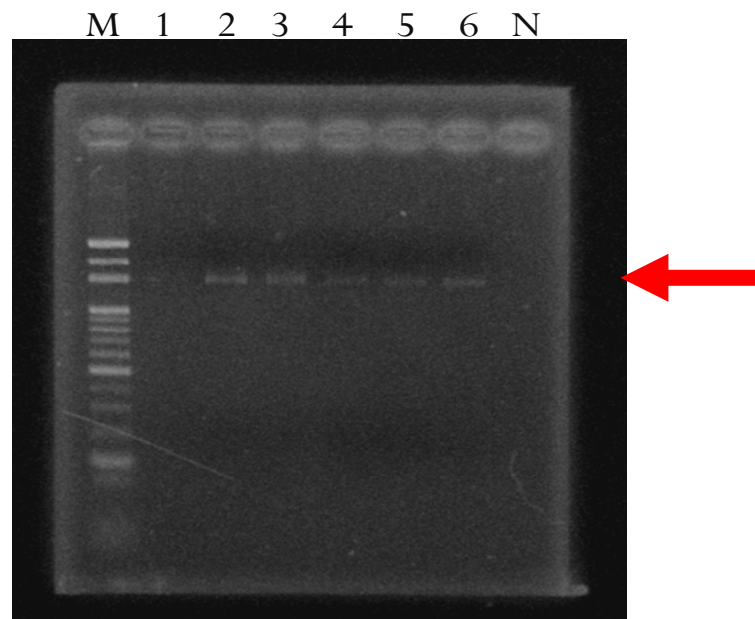


圖 4.15、三種堆肥降解 DBDE 之脫鹵素功能性基因

M:Marker; 1:B2-0M;2: B2-4M; 3:C2-0M; 4:C2-4M; 5:C6-0M; 6:C6-4M; N: negative control.

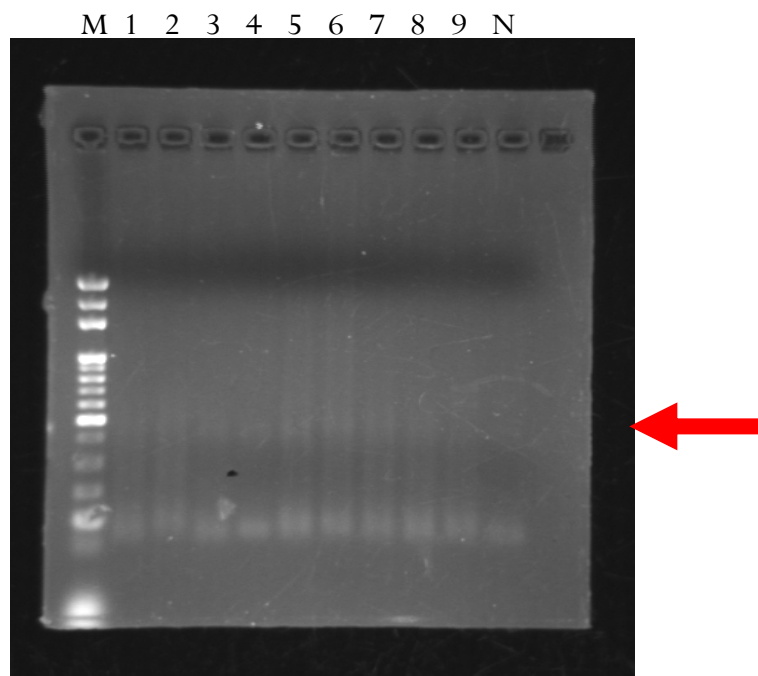


圖 4.16、三種堆肥降解 DBDE 之雙氧化酵素

M:Marker; 1:B2-0M; 2: B2-3M; 3:B2-4M; 4:C2-0M; 5:C2-3M; 6:C2-4M; 7:C6-0M; 8:C6-3M; 9:C6-4M; N: negative control.

4.2 結論

1. 本研究建立 DBDE 分析方法回收率可達 90-97% ($R^2=0.9991$)，方法偵測極限 (MDL) 可達 0.032 ug/g。分析大安溪流域上游大安溪橋及下游義里大橋河川表面底泥樣本之多溴聯苯醚濃度發現，DBDE 濃度達 32-35 ng/kg，另偵測出二到九溴不等之 PBDE 溴化物，說明多溴聯苯醚類化合物的確普遍存在於該河川底泥中。
2. 三種有機堆肥 (B2, C2, C6) 堆肥吸附分別貢獻為 27.3%、39.95% 及 42.5%，雲林蔗渣堆肥 6 個月 (C6) 有最好的吸附效果 42%，最差為南投 2 個月堆肥 (B2) 27%。三種有機堆肥 (B2, C2, C6) 堆肥生物降解部分分別貢獻為 8.65%、12.1% 及 17.05%，雲林蔗渣堆肥 6 個月 (C6) 有最好的生物降解效果 17%，最差為南投 2 個月堆肥 (B2) 8%。K 值變化 $C6(0.0458 \text{ day}^{-1}) > C2(0.0352 \text{ day}^{-1}) > B2(0.0286 \text{ day}^{-1})$ ，C6 有最好的降解效率。
3. B2 堆肥的可溶性有機碳含量，明顯的高於 C2 與 C6 的值，B2 的 pH 值平均小於 4.5，pH 值範圍介於 4.15-5.11，其他兩種蔗渣堆肥 C2 與 C6，則能維持系統 pH 值均在 6 以上，pH 值範圍分別介於 6.26-6.91 及 6.53-7.06，整個生物降解過程後期，ORP 平均均在 -150mV 以下，由 ORP 結果可得知此生物降解系統是在厭氧情況下發生，有助於微生物對於 PBDEs 的還原脫溴。
4. 分析中間代謝產物測得 23 種 PBDEs 產物。由產物結果可推估此 DBDE 降解過程式進行還原脫溴反應，是由高溴數(十溴)逐一脫溴至低溴數(三溴)。
5. 三種堆肥的細菌域的族群結果有很大的不同，然而在相同的堆肥的細菌降解 DBDE 過程發現，C2 的微生物族群並沒有太大的改變(條帶數 18-21-19)，C6 的微生物族群改變較大(條帶數 11-12-21)，條帶有逐漸增長趨勢，B2 的微生物菌群也有些許的改變(條帶數 14-13-11)，條帶數有減少的趨勢。然而在相同的堆肥細菌降解 DBDE 過程發現，古細菌微生物族群並沒有明顯的改變，可證實堆肥環境下具有細菌域與古細菌域的微生物族群。
6. 分子選殖 Cloning 結果顯示，DBDE 生物降解過程中微生物族群系統分析。鑑定出 *Lactobacillus* spp. (相似度 99%)，*Bacillus* sp. (相似度 99%)，

Pseudomonas spp. (相似度 97-99 %), *Methylophilus* spp. (相似度 99 %), *Nocardia* spp. (相似度 97-99 %); *Actinobacteria* .(相似度 99 %), *Clostridia* spp. (相似度 97-99 %)。

7. 利用 PCR 方法鑑定生物降解目標污染物之功能性基因表現，發現三種堆肥厭氧初期(0 個月)至末期(4 個月)均可偵測出脫鹵基因，由此結果亦可推斷出三種堆肥降解 DBDE 過程中有進行還原脫溴行為。此外亦有偵測出雙氧化酵素，推估在此厭氧堆肥降解過程中，存在某些兼性厭氧菌具有雙氧化酵素可利用溶液中 NO_3^- 、 NO_2^- 及 SO_4^{2-} 等結合氧型式的離子。
8. 本研究結果顯示所選擇之有機堆肥的確可移除十溴二苯醚污染底泥，並證實脫鹵基因之存在，因此可同時作為微生物、有機質以及營養源供應者，處理十溴二苯醚，由於台灣河川底泥中普遍存在十溴二苯醚，此研究成果可提供後續整治參考。

五、後續研究(河川底泥復育之實場應用)

本研究結果顯示所選擇之有機堆肥的確可移除十溴二苯醚污染底泥，並證實脫鹵基因之存在，因此可同時作為微生物、有機質以及營養源供應者，處理十溴二苯醚，由於台灣河川底泥中普遍存在十溴二苯醚，就環境角度而言，此類化合物對生態具有環境荷爾蒙之風險，本節提出三種工程實務處理技術方案，提供後續整治參考。

方案一、現地(*in situ*)方式操作：在有機堆肥中添加一定比例之水溶液至堆肥中成為堆肥液，這些堆肥液預期含有許多可分解十溴二苯醚之微生物，接著直接將這些兼氧性及厭氧性微生物注入底泥中(生物添加法)，藉此加速分解十溴二苯醚。此法優點為現地直接進行十溴二苯醚分解，缺點為所添加之堆肥液微生物是否仍持續為優勢微生物，並可有效在現地環境中進行分解十溴二苯醚。

方案二、現址(*on site*)方式操作：將受十溴二苯醚污染底泥自河川中取出後，置於河岸邊，混合有機堆肥進行生物分解。此法優點為不需運輸底泥離場費用，缺點則是厭氧處理過程可能產生之臭味，並考慮地表河川水文，如強降雨所產生之地表逕流等，因此需妥善挑選處理場址。

方案三、離場(*off site*)方式操作：挖取受十溴二苯醚污染底泥後送可直接送至堆肥場有機堆肥中進行生物分解，此法雖需運輸底泥之離場費用，但卻可因此同時達到疏濬底泥及其底泥資源化之目的，成功處理之底泥若搭配有機堆肥的製作，其產品將可成為土壤改良劑。

國外文獻顯示含鹵素及高苯環數之難分解有機污染物，如 PCB, PAH (Loick et al, 2009; Antizar-Ladislao, 2005)在進入衛生掩埋場(landfill)前利用有機堆肥先進行前處理。本研究結果已經證明有機堆肥對 DBDE 具分解能力，後續可依循此一概念，將受 DBDE 污染底泥調整溫度、濕度及厭氧狀態後，以批次方式進料(底泥)至 Tunnel composting 處理至低濃度後，再調整營

養分(碳、氮、磷)及含水比例成為土壤改良劑 (圖 5.1)。此系統厭氧狀態可設計成氣流流動之厭氧環境 (如該氣流不送入空氣或改送 N_2 增加處理效率等方法)，在溫度、溼度控制情況下，達到底泥資源化之目標。

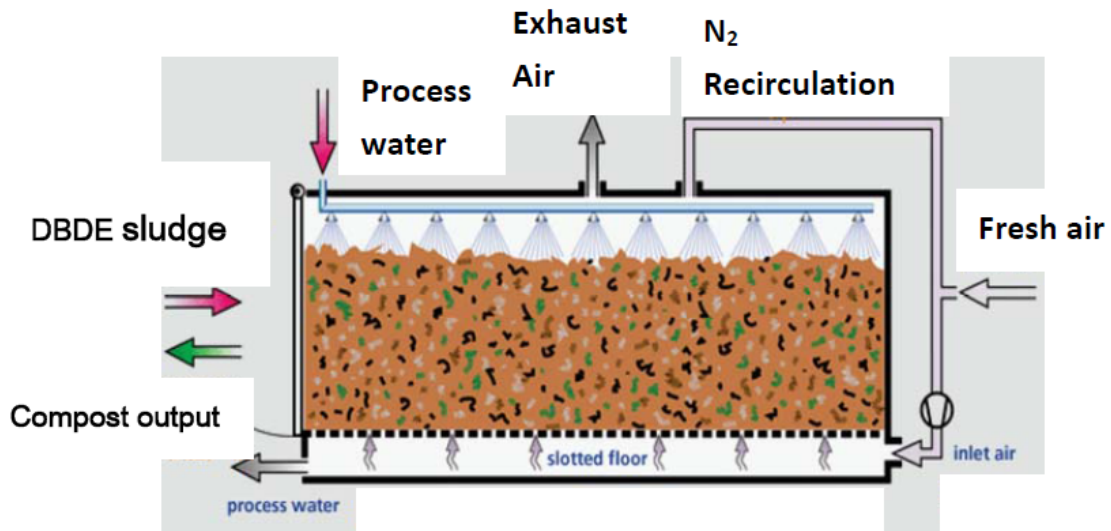


圖 5.1、有機堆肥共處理受 DBDE 污染底泥概念設計圖
(<http://www.allconfs.org/img1/201374175735133.pdf>)

由實務工法分析，由於本研究僅達成底泥中 DBDE 處理效率評估，對進入堆肥場離廠(*ex situ*)處理後之底泥如何獲得最佳操作條件，一方面在系統中維持高 DBDE 去除率條件下，又能達成堆肥成品，評估其腐熟度是否達到標準，建議可進一步納入後續研究。

唯上述各種規劃方法，仍需進一步進行現地模場實驗才能作更進一步的評估。

六、參考文獻

行政院環境保護署，2011。毒性化學物質環境流佈調查成果手冊，p24-26。

行政院環境保護署，2010。環境白皮書，p332-336。

行政院環保署毒理資料庫 www.epa.gov.tw

行政院環保署環境檢驗所，2005，環境檢驗方法偵測極限測定，NIEA-PA107

行政院環境保護署環境檢驗所，2008，土壤酸鹼值（pH 值）測定方法－電極法，NIEA S410.61C。

行政院環境保護署環境檢驗所，2002，土壤水分含量測定方法－重量法，NIEA S280.61C。

李季眉，盧至人，含溶解性甲烷單氧氧化酵素之甲烷氧化菌對三氯乙烯之分解(II)，國科會研究計畫，1997。

林煦芳，2010，四氯乙烯濃度對於還原脫氯效率的影響，明志科技大學生化工程研究所碩士論文。

林政君，2011，結合化學氧化法及生物分解處理土壤中之十溴聯苯醚，東吳大學微生物學系碩士論文。

陳重羽，2005，台灣地區主要河川PBDE污染分布研究，國立成功大學環境醫學研究所碩士論文。

陳紅彤，2013，控制電子提供者添加條件對堆肥微生物降解四氯乙烯效率評估，明志科技大學碩士論文。

鐘苑慈，2008，堆肥作為電子提供者以進行四氯乙烯脫氯反應之可行性研究，明志科技大學碩士論文。

鍾尹如，2006，以質譜技術對環境中多溴聯苯醚檢測之方法開發與應用，國立

中央大學碩士論文。

江政傑，2006，台灣西南海域沉積物中持久性有機化合物含量分布之研究，國立中山大學碩士論文。

- Alfreider, A., Voget, C., Babel, W. 2003. Expression of chlorocatechol 1,2 dioxygenase and chlorocatechol 2,3 dioxygenase gene in chlorobenzene-contaminated subsurface samples. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 69:1372-1376.
- Antizar-Ladislao, B., Lopez-Real, J. Beck A.J., 2005. Laboratory studies of the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated soil by in-vessel composting, *Waste Management*, 25: 281–289.
- Bader, R., Leisinger, T. 1994. Isolation and characterization of the *Methylophilus* sp. strain DM11 gene encoding dichloromethane dehalogenase/glutathione S-transferase. *Journal of Bacteriology*. 176, 12: 3466-3473.
- Cai, B., Vuilleumier, S., Wackett, L.P. 1998. Site-directed mutagenesis of the dichloromethane dehalogenase gene from *Methylophilus* sp. strain DM11. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 38, 3:163-167.
- Costa, L.G., Giordano, G., Tagliaferri, S., Caglieri, A., Mutti, A. 2008. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants: environmental contamination, human body burden and potential adverse health effects. *Acta Biomed*. 79:172-183.
- Darnerud, P.O. 2003. Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife. *Environment International*. 29, 6:841-853.
- Darnerud, P.O., Eriksen, G.S., Jóhannesson, T., Larsen, P.B., Viluksela, M. 2001. Polybrominated diphenyl ethers: occurrence, dietary exposure, and toxicology. *Environ. Health Perspect*. 109:49-68.

- De Boer, J., Westwe, P.G., Van der Horst, A., Leonards, P.E.G. 2003. Polybrominated diphenyl ethers in influents, suspended particulate matter, sediments, swage treatment plant and effluents and biota from the Netherlands. *Environmental Pollution*. 122: 63-74.
- Eljarrat, E., de la Cal, A., Raldua, D., Duran, C., Barcelo, D. 2004. Occurrence and bioavailability of polybrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane in sediment and fish from the Cinca river, a tributary of the Ebro River (Spain). *Environmental Science and Technology*. 38:2603-2608.
- Elkarmi, A., Abu-Elteen, K., Khader, M., 2008. Modeling the biodegradation efficiency and growth of *Pseudomonas alcaligenes* utilizing 2,4-dichlorophenol as a carbon source Pre- and Post-exposure to UV radiation, *Jordan Journal of Biological Sciences*. 1:7-11.
- Environmental Agency of Japan. 1991. Surveyed chemical substances and their detected levels in the environment (A cumulative list for Fiscal Year 1974-1998). Report on environmental survey and wildlife monitoring of chemicals (FY 1996). Tokyo, Japan: Environmental Health and Safety Division, Environmental Agency of Japan.
- Fang, H.H.P., T. Zhang, and H. Liu, 2002, Microbial diversity of a mesophilic hydrogen-producing sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58: 112-118.
- Ferguson, J. F., and J. M. H. Pietari. 2000. Anaerobic transformation of chlorinated solvents. *Environmental pollution*. 107: 209-215.
- Gerecke, A., Hartmann, P., Heeb, N., Kohler, H.P., Giger, W., Schmid, P., Zennegg, M., Kohler, M. 2005. Anaerobic degradation of decabromodiphenyl ether. *Environmental Science and Technology*. 39:1078-1083.

- Hale, R.C., Alaei, M., Manchester-Neesvig, J.B., Stapleton, H.M., Ikononou, M.G. 2003. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants in the North American environment. *Environment International* 29: 771-779.
- Hou, L.H., Dutta, S.K. 2000. Phylogenetic characterization of several para- and meta-PCB dechlorinating *Clostridium* species: 16S rDNA sequence analysis. *Letters of Applied Microbiology*. 30: 238-243.
- Holliger, C., G. Wohlfarth, and G. Diekert. 1999. Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 22: 383-398.
- Holmes, V. F., J. He, P. K. H. Lee, and L. Alvarez-Cohen. 2006. Discrimination of functionally distinct *Dehalococcoides* strains in a trichloroethene enrichment by quantification of their functional reductases. *Applied and Environmental Microbiology*. 72:5877-5883.
- Kimbara, K., Hashimoto, T., Fukuda, M., Koana, T., Takagi, M., Oishi, M., Yano, K., 1998. Isolation and characterization of a mixed culture that degrades polychlorinated biphenyls. *Agricultural and Biological Chemistry*. 52, 2885-2891.
- Kiyohara, H., Hatta, T., Ogawa, Y., Kakuda, T., Yokoyama, H., Takizawa, N., 1992. Isolation of *Pseudomonas pickettii* strains that degrade 2,4,6-trichlorophenol and their dechlorination of chlorophenols, *Applied and Environmental Microbiology*. 58:1276-1283.
- Koelmans, S., Willett, A., Sutherland, M. 2006. Controlled release electron donors: hydrogen release compound (HRC)-An overview of a decade of case studies. *Bioremediation. J.* 10:45-57.
- Krajmalnik-Brown, R., Hoelscher, T., Thomson, I.N., Saunders, F.M., Ritalahti,

- K.M., Loeffler, F.E. 2004. Genetic Identification of a Putative Vinyl Chloride Reductase in *Dehalococcoides* sp. Strain BAV1. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:6347-6351.
- La Montagne, M.G., Daveport, G.J. Hou, L.H., and Dutta, S.K. 1998. Identification and analysis of PCB dechlorinating anaerobic enrichments by amplification: accuracy of community structure base on restriction analysis and partial sequencing of 16S rRNA genes. *Journal of Applied Microbiology*. 84:1156-1162.
- La Guardia, M.J., Hale, R.C., Harvey, E. 2006. Detailed polybrominated diphenyl ether (PBDE) congener composition of the widely used penta-, octa-, and deca-PBDE technical flame-retardant mixtures. *Environmental Science and Technology*. 40:6247-6254.
- Lee, L.K., He, J. 2010. Reductive debromination of polybrominated diphenyl ethers by anaerobic bacteria from soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(3):794-802
- Li, Y., Lin, T., Chen, Y., Hu, L., Guo, Z., Zhang, G. 2012. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in sediments of the coastal East China Sea: occurrence, distribution and mass inventory. *Environmental Pollution*. 171:155-161.
- Loick N., Hobbs P.J., Hale M.D.C., Jones D.L., 2009. Bioremediation of poly-aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil by composting, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 39: 271-332.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V. 2006. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 103, 15611–15616.
- Marinka, G., Gilbert, O.F., Andreas, P., Fritz, L., Karl-Heinz, R., Artut, C.-P.,

- Georg, M.G., 2001. A catalase-peroxidase from a newly isolated thermoalkaliphilic *Bacillus* sp. with potential for the treatment of textile bleaching effluents. *Extremophiles*. 5:423–429
- Messing, J. 1983. New M13 vectors for cloning. *Methods in Enzymology*, 101: 20-78.
- Moon, H., Choi, H., Kim, S., Jeong, S., Lee, P., Ok, G. 2002. Contamination of polybrominated diphenyl ethers in marine sediments from the southeastern coastal areas of Korea. *Organohalogen Compounds*. 58: 217-220.
- Moon, H.B., Choi, M., Yu, J., Jung, R.H., Choi, H.G. 2012. Contamination and potential sources of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in water and sediment from the artificial Lake Shihwa, Korea. *Chemosphere*. 88:837-843.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:695–700.
- Ohta, S., Nakao, T., Nishimura, H., Okumura, T., Aozasa, O., Miyata, H. 2002. Contamination levels of PBDEs, TBBPA, PCDDs/DFs, PBDDs/DFs, and PXDDs/Fs in the environment of Japan. *Organohalogen Compounds*. 57: 57-60.
- Øvreås, L., Forney, L., Daae, F.L., Torsvik, V. 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:3367–3373
- Reysenbach A-L, Pace, N.R. 1995. Reliable amplification of hyperthermophilic archaeal 16S rRNA genes by PCR. In: Robb FT, Place AR (eds) *Thermophiles*. Cold Spring Harbor Press, New York, 101–106

- Robrock, K.R., Korytár, P., Alvarez-Cohen, L. 2008. Pathways for the anaerobic microbial debromination of polybrominated diphenyl ethers. *Environmental Science and Technology*. 42:2845-2852.
- Robrock, K.R., Mohn, W.W., Eltis, L.D., Alvarez-Cohe, L. 2011. Biphenyl and Ethylbenzene Dioxygenases of *Rhodococcus jostii* RHA1 Transform PBDEs. *Biotechnology and Bioengineering*. 108 : 313-321.
- Rosa Krajmalnik-Brown, F Saunders, K Ritalahti, F Löffler. 2007. Environmental distribution of the trichloroethene reductive dehalogenase gene (tceA) suggests lateral gene transfer among Dehalococcoides. *FEMS Microbiology Ecology*. 59:206-214.
- Stourman, N.V., Rose, J.H. Vuilleumier, S. and Armstrong, R.N. 2003, Catalytic Mechanism of Dichloromethane Dehalogenase from *Methylophilus* sp. Strain DM11. *Biochemistry*. 42, 11048-11056
- Tsui, L., Krapac, I.G., Roy, W.R. 2010. The feasibility of applying immature yard-waste compost to remove nitrate from agricultural drainage effluents: a preliminary assessment. *Journal of Hazardous Materials*. 144:585-589.
- Tsui, L., Fan, C.H., Chung, Y.T., Lin, S.F. 2011. Reductive dechlorination of tetrachloroethene to ethene by compost samples with different maturity. *Bioresource Technology*. 102: 10498-10504.
- Tsui, L., Krapac, I.G., Roy, W.R. 2007. The feasibility of applying immature yard-waste compost to remove nitrate from agricultural drainage effluents: a preliminary assessment. *Journal of Hazardous Materials*. 144: 585-589.
- Tsui, L., Roy., W.R. 2007. Effects of compost age and composition on atrazine removal from solution, *Journal of Hazardous Materials*. B139: 79-85.
- Zhang, Y., Pu, X., Fang, M., Zhu, J., Chen, L., Rittmann, B.E. 2012.

2,4,6-trichlorophenol (TCP) photobiodegradation and its effect on community structure. *Biodegradation*. 23:575–583.

Zhu, W., Liu, L., Zou, P., Xiao, L., 2010. Effect of decabromodiphenyl ether (BDE 209) on soil microbial activity and bacterial community composition. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 26: 1891-1899.