

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

人工濕地系統對水中毒性去除能力的探討

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC93-2313-B-041-003-

執行期間：93 年 08 月 01 日至 94 年 07 月 31 日

執行單位：嘉南藥理科技大學環境資源管理系

計畫主持人：陳健民

共同主持人：劉明昭

計畫參與人員：蘇于菁、梁任賢

報告類型：精簡報告

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 94 年 10 月 25 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 ☒ 成果報告
☐ 期中進度報告

人工濕地系統對水中毒性去除能力的探討

計畫類別：☒ 個別型計畫 ☐ 整合型計畫

計畫編號：NSC 93-2313-B-041-003

計畫執行時間：民國 93 年 8 月 1 日至 94 年 7 月 31 日

主持人：陳健民 嘉南藥理科技大學環境資源管理系

共同主持人：劉明昭 嘉南藥理科技大學環境資源管理系

計畫參與人員：蘇于菁、梁任賢 嘉南藥理科技大學環境工程衛生系

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：☒ 精簡報告 ☐ 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- ☐ 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

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、
列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

☐ 涉及專利或其他智慧財產權，☐ 一年 ☐ 二年後可公開查詢

執行單位：

中 華 民 國 94 年 10 月 25 日

一.中英文摘要

一般家庭污水中皆可發現環境賀爾蒙物質的蹤跡，再加上其未能被傳統污水處理廠有效去除而存在於放流水中。故，本研究之旨在探討人工濕地系統（constructed wetland systems）對去除家庭污水中雌激素活性的能力。本研究選用青魚將魚（*Oryzias latipes*, Japanese medaka）為指標生物，並採用更替靜水式使其連續暴露五天，做為檢測不同處理系統間之進流水及放流水的雌激素活性的方法。本實驗並以西方點墨法量測雄性青魚將成魚體內肝臟中卵黃蛋白前質（vitellogenin, VTG）含量以做為雌激素誘導作用的參考依據。本研究結果顯示：（1）雄性青魚將成魚是相當適合直接作為反應污水中雌激素活性之指標生物。例如，二行社區的家庭污水含高濃度的仿雌激素化學物質，可促使雄魚體內 VTG 被誘發。其經濕地處理後的放流水，雌激素活性可被大幅的降低；（2）不同處理設備之人工濕地系統對於家庭污水中雌激素活性的降解能力各有差異；（3）以活性污泥法為二級處理設施之污水處理廠，對於污水中之雌激素活性具有一些程度的降解能力。

關鍵字：人工濕地系統、雌激素活性、青魚將魚、卵黃蛋白前質、烷基苯酚聚乙氧基醇

Abstract

Environmental hormones (EHs) have been detected in domestic wastewater. Some EHs could not be removed by sewage treatment plants (STPs), thus are present in effluents. The objective of this study was to investigate the removal of estrogenicity of wastewater by different constructed wetland systems. Japanese medaka was chosen as a biological indicator in the present study. A static-renewal system with a 5-day exposure was applied to determine the estrogenicity of influent

and effluent samples collected from systems studied. Estrogenic responses were identified based on expression of liver vitellogenin (VTG) in Japanese medaka using western blotting. Gonadosomatic index (GSI) and hepatosomatic index (HSI) were also measured to observe hepatic and reproductive effects on male adult fish by wastewater. Furthermore, an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit was used for analyzing alkylphenol ethoxylate (APE) in wastewater. The major findings in this study are as followed. 1. male medaka is suitable for serving as a bio-indicator for determination of estrogenicity in wastewater. The domestic wastewater collected from the Er-hang could induce VTG in fish, but after treated with a constructed system, a substantially removal of estrogenicity was observed in its effluent. 2. due to characteristics variation of different constructed wetland systems, the removal abilities of different systems for estrogenicity are different. 3. because of short exposure period, no obvious physiological alteration, in term of weight changes (hepatosomatic and gonadosomatic indices), was observed in fish treated with various samples. 4. a STP, using activated sludge as the secondary treatment process, could remove some estrogenicity in wastewater. 5. APE concentrations detected by ELISA in some wastewater samples collected from constructed wetland systems and STPs were very low, and may not be fully responsible for the VTG induction observed in fish resulted from exposure to influent samples.

Keywords: VTG ; Japanese medaka ; constructed wetland systems ; STPs ; estrogenicity ; APE.

二.緣由與目的

近年來，有很多學者開始研究利用生態工程之自然淨化技術來處理廢

水，使其符合一般放流水標準。生態工程技術進行廢水處理的方法很多，其中又以人工濕地系統（constructed wetland system）處理廢水之研究最為廣泛。人工溼地為利用自然生態的淨化機制及生物成員（水生植物及微生物），在人為控制下強化其污染物的去除能力，達到廢污水處理的目標，被證實是一種省能源、低成本、操作維護費用低之廢水處理技術（International Water Association, 2000），亦可做為二級處理程序或高級處理程序，處理工業廢水、垃圾滲出水、畜牧養殖廢水或市政等不同類似及性質的廢污水（Mehlum, 1995；Kadlec and Knight, 1996）。其能有效去除生化需氧量、化學需氧量、懸浮物質、有機性物質、氮磷營養鹽、重金屬、病原菌及大腸桿菌等污染物，使其達一般放流水標準。但，人工濕地系統仍有其限制與未及之處。主要原因可能是因為有些廢水含有較高濃度的毒性物質或不易分解的化合物所致。即使是一般的家庭污水，亦有可能含有具上述特性的化學物質，一些所謂的環境荷爾蒙物質或內分泌干擾物質即是其中之一（Chen et al., 2002；Fred et al., 2002）。

根據幾十年來的研究顯示，這些被俗稱為環境賀爾蒙或內分泌干擾物質，有些是自然生成，而有些是人工合成的，這些化學物質不僅存在於生物體中，且具有干擾人體及其他生物內分泌系統作用、抑制其正常運作，改變其原來的調節機能及生物體內免疫及神經系統的正常運作，進而產生不良影響（USEPA, 2000）。有些環境賀爾蒙物質的生物作用機制類似於生物體內的雌性激素，因此亦被稱為仿雌激素物質。環境中的仿雌激素物質的種類與產生源相當多，無論是天然或人工合成的賀爾蒙物質皆可在水體中發現其存在，進而導致魚類幼期的發育造成影響（Papoulias et al., 2000），而

有些則會干擾水中生物的內分泌功能，產生使魚類第二性徵不明顯、性早熟、雌性化或雙性化等現象（Leatherland, 1993）。許多研究文獻顯示傳統的廢水處理系統，旨在能有效去除生化需氧量、化學需氧量、濁度、營養鹽類等並達到一般規定之放流水標準，卻無法有效的去除一些環境賀爾蒙物質（家庭、家畜或工業），並而導致這些物質常被發現存在於排放水以及其下游的承受水體中（Sheahan et al., 2002；Higashitani et al., 2003）。

本研究將以青魚將魚類為測試生物探討經人工濕地系統去除一般家庭污水中的雌激素活性。各工作階段的研究方法與步驟已於原計畫書中有詳細說明，故不在此贅述。

三.結果與討論

青魚將魚的活體實驗結果(表1)顯示，2003年8~10月及2004年5月經C-18萃取二行社區人工濕地的進流水樣本具有仿雌激素物質的存在，且可在足夠的濃度（或劑量）下促使雄青魚將魚體內VTG的大量產生，其最大誘導量為56.13 μg 。此進流水經濕地後，儘管雌激素活性則被大幅的降低。但是，在2003年8月份的放流水樣本，可觀察到有微弱的VTG誘導表現（2.61 μg ），此現象與2004年8月份的二行社區人工濕地的進流水（115.54 μg ）樣本是相類似的，這結果可研判此月份的污水中具有大量仿雌激素物質的存在，進而導致在人工濕地放流水樣本（56.69 μg ）可檢測出雌激素活性。反之，幾個月份原水暴露之進流水及放流水樣本，並無觀測出雌激素活反應產生，其原因可能是所暴露的原水中含有較多的溶解性物質、被微生物或光分解等因素，進而導致疑似環境賀爾蒙物質減少的可能，因此不足以會對雄青魚將魚有雌激素活性產生。另外，污水中包含數以千種的化學物質呈一混合狀態，及幾年來的研究都只

趨向於具雌激素活性的化合物，對於仿雄激素物質是極少文獻被發表。Shore等人(1993)研究證實，家庭污水中和接收污水廠放流水的河流，可檢測出具有雄激素活性，被懷疑的化合物包括甾固酮、二氫甾固酮，且認為這可能來自於家畜養殖及人類。相關研究指出，以彩虹鱒為指標生物進行初代細胞離體試驗發現，重金屬鋁、鎘的濃度分別在 $0.05 \sim 0.1 \mu\text{M}$ （或 $> 0.06 \mu\text{M}$ ）、 $0.001 \mu\text{M}$ 時，將會抑制魚體內VTG產生。因此，必須考慮是否具有抑制VTG誘導或具雄激素活性的化學物質存在。為了去觀察水中是否具有仿雄激素物質的存在，因此在2003年11月份亦增加雌魚的活體試驗。結果顯示，除了暴露組的直接原水暴露之二行社區人工濕地的進流水樣本可觀察到與雄性樣本同樣有VTG反應外，此雌性樣本的VTG ($131.01 \mu\text{g}$) 表現程度較對照組 ($65.80 \mu\text{g}$) 是更加強烈的，而其他暴露組的雌魚樣本VTG誘導量 ($57.68 \sim 82.95 \mu\text{g}$) 則無明顯變化。因此，初步研判即使二行社區人工濕地的家庭污水有仿雄激素物質存在，但這濃度不足以會對魚體內VTG產生任何干擾作用。

然而，我們持續在2004年6~11月直接原水暴露之二行社區人工濕地的進流水樣本，同樣可觀察到有VTG反應。因此，更加證明二行社區的一般家庭污水中存在著具有仿雌激素活性的化學物質。這些藏身於水環境中之環境賀爾蒙物質，可能都是造成水中生物體內仿雌（雄）激素活性來源之一。但是，在2003年11月及2004年6、7、12月經C-18萃取二行社區人工濕地的進流水樣本並無被檢測出VTG反應，可能是進行水樣固相萃取所使用之固相萃取膜的關係，因萃取膜是主要針對有機物及分子量大的化學物質進行萃取濃縮，故研判水中的仿雌激素物質是無法完全能有效的將予以完全萃取濃縮出，使其進行活體試驗時

無法達到足夠濃度去促使魚體內VTG的誘導。相對於本地的狀況，經AIT人工濕地處理的校園廢水含較低量的雌激素物質，因此對青魚將魚體內VTG的誘導作用極有限。故，只有在2004年8月暴露於AIT校區人工濕地進流水及放流水的雄青魚將魚樣本檢測出有VTG反應。綜合以上訊息顯示，二行社區生活污水中的雌激素活性是較AIT校園廢水高。其經濕地處理後，雌激素活性是可被適度降解。但人工濕地處理系統設置及生物元件不同時，將可能影響放流水中的雌激素活性潛力。

相較於人工濕地系統，都市及工業廢水是仿雌激素物質排放至水體環境之主要來源，經由污水下水道排入廢污水處理廠予以處理。相關研究顯示，污水處理廠採用二級處理設備（活性污泥法）來處理都市中所產生之生活污水，其對雌激素活性去除率達90%以上。在其他國家有關污水廠的研究亦指出，對於類固醇及烷基酚類化合物之去除率通常 $> 80\%$ (Fauser et al., 2003)。但即使具有極高的去除率，這些低量的仿雌激素物質仍可在污水廠最終放流口被發現，並進一步對魚類產生影響，尤其是那些具有高生物活性的類固醇賀爾蒙。因此，污水處理廠放流水亦是貢獻水環境中仿雌激素來源之一。故，本研究於2004年10~12月增加污水處理廠放流水活體試驗暴露。結果顯示，不管是經C-18萃取或直接原水暴露的樣本都無檢測出有VTG誘導表現。雖然此污水處理廠主要收集以家庭所產生之生活污水為處理對象，但這生活污水來源途徑是先被排入河中後再以截流方式送入污水廠進行處理。生活污水可能因大量河水、雨水的流入或摻雜複雜性的化合物的廢水排入等不確定因子，以至造成水中仿雌激素濃度被稀釋或干擾。如再經採二級處理設備之污水處理廠，其處理後放流水雌激素活性則可能是更微乎其微。另外，季節變化

可能會影響微生物降解（仿）雌激素物質的能力，使其水中具有仿雌激素活性之化合物劑量（濃度）隨一年四季有所差異。Jurgens(Jurgens et al., 2002)等人研究顯示，夏季時微生物是更有能力去降解 E2，而在河水稀釋作用是略於春季及冬季。並進一步指出，於春季時好氧狀況下，EE2 是較 E2 更難於被生物降解，其半衰期分別為 17 及 1.2 天。相較於其他類似研究，Chen 及 Cooper(Chen and Cooper, 2003)學者以青魚將魚為測試生物，採靜水更新暴露方式，將其暴露於 100% 污水處理廠放流水，發現暴露 7 天後可觀察到魚體內 VTG 誘導的現象。潘(潘弋戎, 2004)以吳郭魚為指標生物，採連續流方式，將其暴露於取自與本研究相同污水來源之污水處理廠放流水，觀察其雌激素活性。結果顯示，雄魚在冬季時暴露於稀釋 50%和在春季時 100%，分別須達 7 天後和 14 天後才可觀察到有 VTG 表現。在英國，Rodgers-Gary 等人(Rodgers-Gray et al., 2000)採取 Essex 當地污水處理廠放流水。結果發現，濃度 50%及 100%放流水稀釋比例，須暴露 30 天後 VTG 誘導量才有顯著的被提升；濃度稀釋比例至 25%及 12%時，必須暴露 120 天以上，才能發現 VTG 被誘導的現象。由相關研究獲得的誘發條件差距發現，當污水稀釋濃度比例偏低或暴露時程較短時，未必能檢測出魚體內 VTG 被誘發的現象，而必須給予足夠長的暴露時程，才能促使 VTG 被誘發。選擇暴露方式上亦須慎重考慮，一般而言採用連續流式或箱網進行活體試驗，除可維持真實環境中實際濃度外，更能提高生物體之生理敏感度。更新靜止式則必須注意生物體吸收代謝後，水體中原劑量的改變及水質殆損情形。這些訊息將可提供後續研究設計上，必須慎重考慮及留意暴露條件可能造成最後結果的改變。

因此，我們在隔年 4 月增加進流

水活體試驗，除了去驗證排入污水廠處理之一般家庭污水是否有雌激素活性的存在外，並去確認是否因 C-18 固相萃取過程中，無法有效將環境賀爾蒙物質萃取出之關係，導致放流水中無法檢測出 VTG 誘導表現。結果顯示，C-18 萃取或原水暴露之污水處理廠進流水樣本，可發現有 VTG 誘導表現，其誘導量分別為 96.73 μg 及 113.42 μg ；放流水樣本方面，則是與 2004 年 10~12 月相類似，並無發現有 VTG 表現。有此可知，一般家庭污水中是具有仿雌激活性的化學物質存在，並因處理系統的不同而其降解能力各有所異。但是，各處理系統對於環境賀爾蒙物質的去除能力是無法去評定的，因我們並沒有去進一步分析存在於污水中的各種環境賀爾蒙物質及其濃度（劑量）。綜合上述，我們可由 VTG 反應推斷，直接原水暴露對魚體的內分泌較經 C-18 萃取為敏感，且 VTG 誘導之相對總蛋白質量，直接原水暴露較經 C-18 萃取高。

四.計劃成果自評

以下幾點說明本計劃執行上與原計劃出入或缺失之處以及原因的探討：

1. 本計畫部分經費是由教育部之國際合作計畫支助，特在此說明。本計畫主要之工作項目亦是延續該國合計畫之構想與研究方向。
2. 以活體進行試驗仍面臨使用數量較多，且耗時之缺點，未來如能以培養之肝臟初代細胞為之，將可省時省力。
3. 未來研究工作重點將探討環境賀爾蒙物質所造成的生殖病理作用，並發展以初級肝培養細胞作為檢測工具。

五.參考文獻

Chen C.M. and Cooper K.R. 2003. A treated municipal wastewater was estrogenic to Medaka (*oryzias latipes*).

- Proceedings of Asian-Pacific Regional Conference on Practical Environmental Technologies. Taiwan. D-143.
- Fausser P., Vikeloe J., Sorensen P.B. and Carlsen L. 2003. Phthalates, nonylphenols and LAS in an operated wastewater treatment plant-fate modeling based alternatively on measured concentrations in wastewater and sludge. *Water Res.* 37:1288-1295.
- Fred Tilton., William H. Benson, Daniel Schlenk. Evaluation of estrogenic activity from a municipal wastewater treatment plant with predominantly domestic input. *Aquatic Toxicology*. 2002 ; 61 : 211-224.
- Harries J.E., Sheahan D.A., Jobling S., Matthiessen P., Paula N., Sumpter J.P., Tylor T. and Zaman N. 1997. Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environ. Toxicol. Chem.* 16:534-542.
- Higashitani T., Tamamoto H., Takahashi A. and Tanaka H. 2003. Study of estrogenic effects on carp (*Cyprinus carpio*) exposed to sewage treatment plant effluents. *Water Sci. Technol.* 47:93-100.
- International Water Association. 2000. Constructed Wetlands for Pollution Control. Processes, Performance, Design and Operation. IWA Publishing, London.
- Jurgens M.D., Holthaus K.I.E., Johnson A.C., Smith J.J.L., Hetheridge M. and Williams R.J. 2002. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers. *Environ. Toxicol. Chem.* 21:480-488.
- Kadlec R.H. and Knight R.L. 1996. *Treatment Wetlands*, 2nd ed., Lewis.
- Chen F.A., Shue M.F., Chen T. C., Hideo Utsumi., Chen C.Y. The Effects of Treating Eco-toxicity in the Wastewater Treatment Plants in Fossil Fuel Industrial Sites. *Environmental Sciences*. 2002 ; 9 : 252-253.
- Leatherland J.F. 1993. Field observations on reproductive and developmental dysfunction in introduced and native salmonids from the Great Lakes. *J. Great Lakes Res.* 19:737-751.
- Mehlum T. 1995. Treatment of landfill leachate in on-site lagoon and constructed wetland. *Water Sci. Technol.* 32:129-136
- Papoulias D.M., Noltie D.b. and Tillitt D.E. 2000. Effects of methyl testosterone exposure on sexual differentiation in medaka, *Oryzias latipes*. *Mar. Environ. Res.* 51:181-184.
- Rodgers-Gray T.P., Jobling S., Morris S., Kelly C., Kirby S., Janbakhsh A., Harries J.E., Waldock M.J., Sumpter J.P. and Tyler C.R. 2000. Long-term temporal changes in the estrogenic composition of treated sewage effluent and its biological effects on fish. *Environ. Sci. Technol.* 34:1521-1528.
- Sheahan D.A., Briggly G.C., Daniel M., Kirby S.J., Hurst M.R., Kennedy J., Morris S., Routledge E.J., Sumpter J.P. and Waldock M.J. 2002. Estrogenic activity measured in a sewage treatment works treating industrial inputs containing high concentrations of alkylphenolic compounds — a case study. *Environ. Toxicol. Chem.* 21:507-14.
- Shore L.S., Gurevitz M. and Shemesh M. 1993. Estrogen as an environmental pollutant. *Mar. Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 51:361-366.
- USEPA, US Environmental Protection Agency. 2000. Special reports on environmental endocrine disruption, An effects assessment and analysis. EPA/630/R96/012.
- 王正雄。2000。壬基苯酚環境荷爾蒙對環境生態之影響。環境檢驗雙月刊第 39 期。

潘弋戎，2004。利用吳郭魚卵黃蛋白
先質誘導檢測都市污水處理廠雌激
素活性。嘉南藥理科技大學環境工
程與科學系碩士論文。



表 1、卵黃蛋白前質誘導反應及影像量化分析結果

2004 年 5 至 12 月 VTG 相對總蛋白質濃度 (μg)									
組 別		五月		六月		七月		八月	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
C-18 萃取之人行社區人工濕地	進流水	56.13	×	--	×	--	×	75.36	×
	放流水	--	×	--	×	--	×	--	×
C-18 萃取之泰國人工濕地	進流水	×	×	×	×	×	×	86.09	×
	放流水	×	×	×	×	×	×	46.97	×
原水暴露之人行社區人工濕地	進流水	--	×	55.52	×	79.65	×	115.54	×
	放流水	--	×	--	×	×	×	56.69	×
C-18 萃取之污水處理廠	放流水	--	×	--	×	×	×	×	×
原水暴露之污水處理廠	放流水	--	×	--	×	×	×	×	×
溶劑對照組		--	×	--	×	×	×	×	×
對照組		--	65.80	--	54.17	--	65.70	--	54.07
組 別		九月		十月		十一月		十二月	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
C-18 萃取之人行社區人工濕地	進流水	95.70	×	30.73	×	40.43	×	--	×
	放流水	--	×	--	×	--	×	--	×
C-18 萃取之泰國人工濕地	進流水	--	×	--	×	×	×	×	×
	放流水	--	×	--	×	×	×	×	×
原水暴露之人行社區人工濕地	進流水	63.96	×	75.64	×	56.40	×	85.87	×
	放流水	--	×	--	×	--	×	--	×
C-18 萃取之污水處理廠	放流水	×	×	--	×	--	×	--	×
原水暴露之污水處理廠	放流水	×	×	--	×	--	×	--	×
溶劑對照組		--	×	--	×	--	×	--	×
對照組		--	54.07	--	54.07	--	60	--	65.70

說明：¹-- 代表因無 VTG 誘導反應，故無進行光學量化分析。

²× 代表本月份並無此樣本。