

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

非法棄置場址有機污染土壤之處理及生物毒性評估 (1) 受多環芳香族碳氫化合物污染土壤計畫名稱

計畫類別：C 個別型計畫 整合型計畫
計畫編號：NSC89 - 2211 - E - 040 - 001 -
執行期間：89 年 08 月 01 日至 90 年 07 月 31 日

計畫主持人：張時獻 助理教授

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

執行單位：中山醫學院公共衛生學系

中 華 民 國 90 年 10 月 27 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

非法棄置場址有機污染土壤之處理及生物毒性評估(1)受多環芳香族碳氫化合物污染土壤

計畫編號：NSC89 - 2211 - E - 040 - 001 -

執行期限：89 年 08 月 01 日至 909 年 07 月 31 日

主持人：張時獻 中山醫學大學公共衛生學系

一、中文摘要

非法棄置成份複雜，其可能同時含有機污染物及重金屬，本研究以生物泥漿法評估重金屬對多環芳香烴 fluoranthene 之生物降解影響，並以線蟲、Microtox、Ames test 測試污染土壤前後之生物毒生。土壤添加 400mg/kg 銅或 20mg/kg 鎘，不會抑制 fluoranthene 生物降解，fluoranthene 降解情形與 fluoranthene 分解菌及總菌數密度無關。Ames test 結果指出，處理後之土壤對 TA98 之突變量增加，但對 TA100 之致突變量減少。處理前後之受重金屬及 fluoranthene 污染土壤對線蟲 *Caenorhabditis Elegans* 24 小時毒性測試，皆不具急毒性。

關鍵詞：非法棄置場，fluoranthene，bioslurry，Ames test，nematode，Microtox test，heavy metal

Abstract

Illegal dumping sites contained a variety of contaminants including organic compounds and heavy metals. Bioslurry reactor was used to assess effects of heavy metals on the biodegradation of fluoranthene. Furthermore, a battery of bioassay, including nematode, Microtox test, and Ames test were used to evaluate the toxicity of soil before and after treatment.

Soil containing 400 mg/kg of copper or 20mg of cadmium did not inhibit the biodegradation of fluoranthene. The biodegradation rate was not related to either the density of fluoranthene degrader or the total bacterium density. The results of Ames test indicated that mutagenicity of treated soil was higher than untreated soil when TA98 was used to evaluate the mutagenicity. However, the results of TA100 showed that bioslurry treatment lowered the mutagenicity of fluoranthene-contaminated soil. The 24 hour toxicity tests indicated that the contaminated soil were not acute toxic to the nematode, *Caenorhabditis Elegans*.

一、前言

國內已發現多處非法棄置場址，其成份複雜與國外土壤污染情況不同，尤其常混合多種有機物及重金屬，多環芳香烴、氯酚、銅、鋅、鎘、鉻等，重金屬之存在會抑制減緩土壤有機物生物分解致有機污染物長期殘留，重金屬亦可能進入食物鏈危害人體。

多環芳香烴具疏水性及不易生物分解性，且土壤之異質性 (heterogeneity) 及強吸附性，導致其於環境中大量累積。其於土壤半衰期 (half-lives)，隨其分子量增加而增長，尤其四、五苯環之多環芳香族碳氫化合物為生物難分解性，多環芳香烴 fluoranthene, benzo(a)pyrene, chrysene, benzo(b)fluoranthene 亦具致突變性。如何有效及低成本處理含有機物及重金屬土壤為目前重要土壤環境課題

二、研究方法的目的

生物泥漿法為較新土壤復育技術，可增加土壤污染物，分解菌，營養鹽，氧氣傳輸限制，加速污染有機物分解。

本計畫將以平板數菌法，重金屬土壤吸附實驗，生物泥漿法，探討以泥重金屬對多環芳香烴 fluoranthene 之生物分解影響，並以線蟲，Microtox，Ames tes 測試生物處理前後毒性變化情形。

三、實驗材料與方法

1. 實驗材料

本實驗以具弱致突變性多環芳香烴 fluoranthene 及銅，鎘為目標污染物(target compounds)，探討重金屬對多環芳香烴生物分解影響。土壤為取自校園土壤，於 103 烘乾，過 20 號篩，並經三次高壓滅菌後備用，經分析其 pH 為 7.6，土壤有機物含量為 1.32%。

生物泥漿反應槽共計三組，分別為控制組(無添加重金屬)，銅添加組，鎘添加組，每槽皆為 15 公升之圓柱形槽，所用泥漿體積為 8 公升，土及水重量比例為 3:7，依土壤中有機物含量加入適量營養劑，進行攪拌曝氣，曝氣量為每分鐘 1.2 升，為維持泥漿之懸浮，並加入一組螺旋葉片及馬達進行攪拌，監控泥

漿之 pH 值 (pH 7.65) , 溶氧控制在 2 ppm 以上。

2. 實驗方法

Fluoranthrene 溶解於丙酮, 並均勻添加至土壤中, 並其最終濃度為 10mg fluoranthrene/kg soil, 並置放於黑暗中七天進行吸附。於生物反應前一小時, 加入

銅添加槽及鎘添加槽, 分別加入銅及鎘溶液, 其達成銅 400mg/kg soil, 及鎘 20 mg/kg soil, 並於實驗開始加入 1ml fluoranthrene 分解菌 (10^6 cfu/ml), 並於第 0, 2, 5, 9, 15, 22, 30 天採樣, 分析項目包括 fluoranthrene 及重金屬, fluoranthrene, PAH 分解菌數, 總菌數, 線蟲毒性, 及致突變性 Ames test。

Fluoranthrene 之分析流程泥漿以冷凍乾燥後, 以索氏萃取法 (Soxhlet extraction method) 進行 24 小時萃取, 萃取液為二氯甲烷加己烷, 迴流速率為每小時三至四次, 經過二十四小時後之萃取液經 Whatman GF/A 玻璃纖維濾紙及 Millport 0.22 μ m 濾紙過濾後, 以高效率液相層析儀(HPLC)檢測, 分析管柱為 C18 reverse phase column。

致突變性試驗(Ames Test)為索氏萃取液經吹乾後, 轉換至 DMSO, 取適量進行 Ames Test, 量測泥漿之致突變性(Ball et al, 1990)。本實驗以 TA98 及 TA100 二種菌測試, 每組以三重覆進行, 並進行正負控制組。

線蟲毒性評估為測試 *Caenorhabditis Elegans* 泥漿上澄液進行生物毒性測試。並用 Trimmed Spearman-Kärber Method (Montana State University)所發展程式計算 LC 50, 反應槽所求得之結果, 可銅、鎘重金屬溶液所求得之 LC50 比較, 本實驗以二重複進行。

結果與討論

四、結果與討論

圖 1 為三組反應槽 fluoranthrene 生物降解情形, 原本添加之 fluoranthrene 濃度為 10mg/kg, 經七天吸附

後, 三個反應槽第 1 小時所測得之濃度約為 80%。其添加 fluoranthrene 分解後, 開始生物分解, 48 小時後分解快速, 其可能為分解菌快速增長, 360 個小時之後分解速度趨慢, 其可能為土壤殘存之 PAH 為土壤吸附, 不易脫附。

另控制組與重金屬添加組生物分解情形相近, 其可能所添加之重金屬為土壤所吸附, 不超過土壤吸附容量, 水溶液狀實驗可知, 土壤吸附重金屬之能力極強, 溶液中之重金屬就相對減少其與平板稀釋數菌法所測出銅鎘對 fluoranthrene 分解菌抑制濃度分別為銅 400mg/L, 鎘 20mg/L 之結果不同, 故水溶液所推得之重金屬生物抑制濃度, 應先進行評估。

圖 2 為三組反應槽 fluoranthrene 分解菌濃度消滅情形, 植種之分解菌經 48 小時馴養期後快速增加, 其分解菌密度皆大於 4×10^6 cfu/ml, 反應槽菌體密度與 fluoranthrene 降解並無直接關係, 其可能為土壤 fluoranthrene 濃度為 10mg/kg, 槽體內菌體濃度維持於一定濃度以上, 即有一定生物分解能力, 兩者並無明顯關係。

為測試槽體 fluoranthrene 分解菌與總菌數之是否有相關, 本計畫同時以 TSA agar, 分析槽體總菌數, 如圖 3 所示, 槽內總菌數密度與 fluoranthrene 分解菌, 及 fluoranthrene 之生物降解皆無直接關係。

圖 4 為反應槽 fluoranthrene 致突變性變化情形, 其中 TA98 之突變量隨 fluoranthrene 之降解而呈現升高的趨勢, 可推測反應槽中之 fluoranthrene 降解物, 可能增加 TA98 突變性。然而以 TA100 測試時發現, 隨反應時間增加反應泥漿致突變性有之降解趨勢, 其可能 TA98 與 TA100 之突變位置不同, 所以 fluoranthrene 及其降解物會對其造成不同的影響。

本計畫同時測試純銅及鎘水溶液對 *Caenorhabditis Elegans* 之半致死濃度(LC50), 經計算銅及鎘對 *C. Elegans* 之 LC50 分別為 60.7mg/L 及 71.1mg/L, 雖鎘對 *C. Elegans* 之 LC50 大於本實驗所用之鎘抑制濃度 20mg/kg, 惟為測試污染物對 *C. Elegans* 抑制是否具協同作用, 故 *C. Elegans* 仍用於

鎘添加槽生物毒性測試。經第二天及第四天採樣分析，三槽泥漿對反應槽之毒性皆未超出 LC50，故可推論泥將所含銅 400mg/kg 或鎘 20mg/kg 濃度皆對 *C. Elegans* 具急毒性。

重金屬土壤吸附實驗探討外加之重金屬於土壤之吸附速度及土壤水溶液中濃度，本實驗以三重覆進行，圖 5 為銅隨時間之水溶液殘存濃度，實驗之初所添加之銅濃度為 400mg/L，其吸附速度極快，於一小時後即降至 1mg/L，圖 6 為鎘隨時間之水溶液殘存濃度，其結果與銅相似，實驗後一小時，其水中鎘濃度降至 1mg/L 以下，其結果可解釋為何土壤中銅 400mg/kg 及鎘 20mg/kg 濃度，對 fluoanthene 之生物降解並無影響，及生物泥漿上澄液對 *C. Elegans* 並無急毒性。

參考文獻

- Alexander M (1995) How Toxic Are Toxic Chemicals in Soil? *Environmental Science and Technology*, vol. 29, no.11:pp.2713-2717
- Bierkens J, Klein G, Corbisier P, Vandenheuevel R, Verschaeve L, Weltens R, Schoeters G (1998) Comparative Sensitivity of 20 Bioassays for Soil Quality, *Chemosphere*, vol. 37, no. 14-15:pp. 2935-2947
- Brooks LR, Hughes TJ, Claxton LD, Austern B, Brenner R, and Kremer F (1998) Bioassay-Directed Fractionation and Chemical Identification of Mutagens in Bioremediated Soils. *Environmental Health Perspectives*, vol. 106, supplement 6:pp. 1435-1440
- Carmichael LM and Pfaender FK (1997) The Effect of Inorganic and Organic Supplements on the Microbial-Degradation of Phenanthrene and Pyrene in Soils. *Biodegradation*, vol. 8, no. 1: pp. 1-13.
- Chang SH (1998) Bioremediation of PAHs in Landfarm Soil with Surfactants and Inoculation. Ph.D. dissertation, University of Southern California.
- Chen ZS, Lee GJ and Liu JC (2000) The Effects of Chemical Remediation Treatments on the Extractability and Speciation of Cadmium and Lead in Contaminated Soils. *Chemosphere*, 41, 235-242
- Geerdink MJ et al (1996) Microbial Decontamination of Polluted Soil in Slurry Process, *Journal of Environmental Engineering*, vol.122, no. 11, pp. 975
- Juhasz AL, Britz ML, Stanley GA (1997) Degradation of Fluoranthene, Pyrene, Benz(a)anthracene and Dibenz[a,h]anthracene by *Burkholderia cepacia*. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 83:pp. 189-198
- Keddy CJ, Greene JC, Bonnell MA.(1995) Review of whole-organism bioassays: soil, freshwater sediment, and freshwater assessment in Canada. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, vol. 30, no.3: pp. 221-51,
- Lewis RF (1993) SITE Demonstration of Slurry-Phase Biodegradation of PAH Contaminated Soil, *Journal of The Air and Waste Mangement Association*, vol 43,no.4: pp. 503-508
- Kwan KK (1995) Direct Sediment Toxicity Testing Procedure Using Sediment-Chromotest Kit. *Environmental Toxicology and Water Quality*, vol. 10, no.3: pp. 193-196
- Pignatello and Xing BS (1996) Mechanisms of Slow Sorption of Organic-Chemicals to Natural Particles. *Environmental Science and Technology*, vol. 31, no. 1:pp. 1-11
- Salanitro JP, Dorn PB, Huesemann MH, Moore KO, Rhodes IA, Jackson LMR, Vipond TE, Western MM, and Wisniewski HL (1997) Crude Oil Hydrocarbon Bioremediation and Soil Ecotoxicity Assessment, *Environmental Science and Technology*, vol. 37, no. 6: pp. 1769-1776
- Stringfellow WT and Aitken MD (1995) Competitive Metabolism of naphthalene, methyl-naphthalenes and Fluorene by Phenanthrene-Degrading Pseudomonads. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61:pp. 375-362

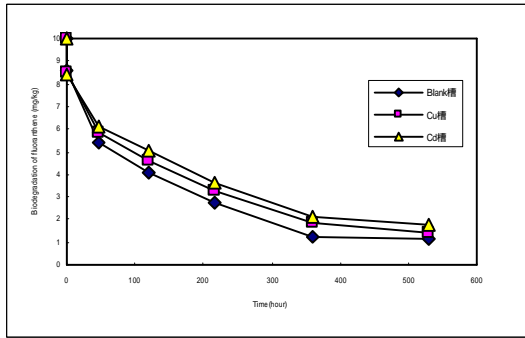


圖 1 生物泥漿槽 fluoranthene 生物降解情形，其中控制槽無添加重金屬，Cu 添加槽銅濃度為 400mg/kg，鎘添加槽鎘濃度為 20mg/kg。Fluoranthene 已先預吸附 7 天。

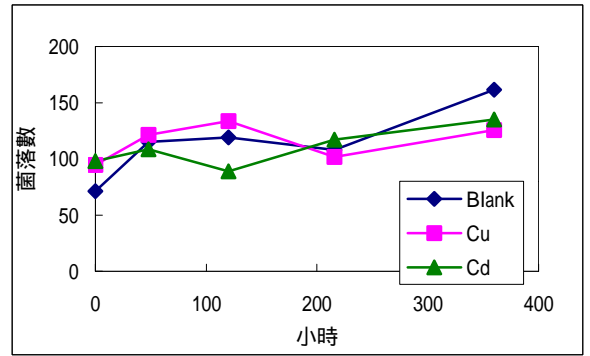


圖 4 槽內生物泥漿以 TA98 測試致突變性變化情形

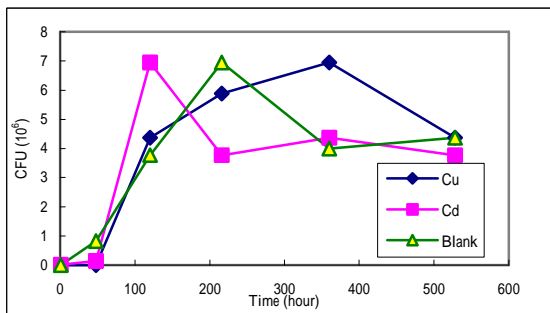


圖 2 槽體內 fluoranthene 分解菌密度隨時間變化情形。

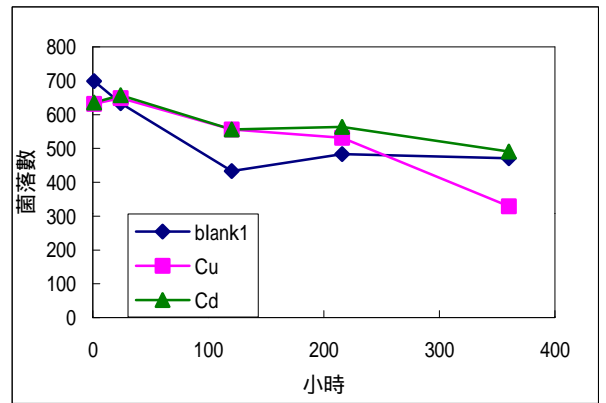


圖 5 槽內生物泥漿以 TA100 測試致突變性變化情形

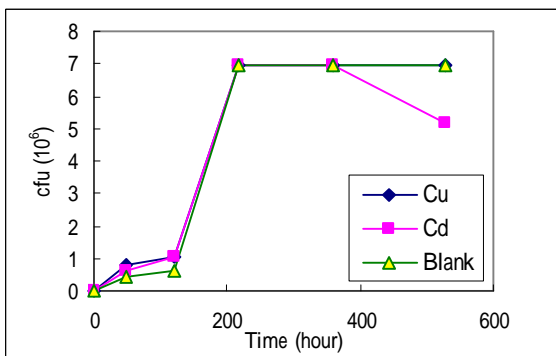


圖 3 槽體內總菌數密度隨時間變化情形。

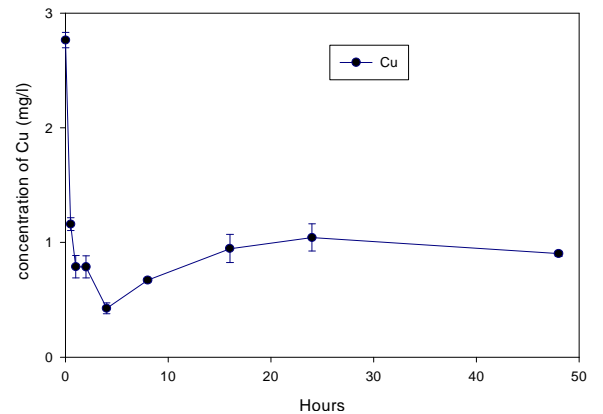


圖 6 銅於土壤之吸附試驗(銅添加濃度為 400mg/L)

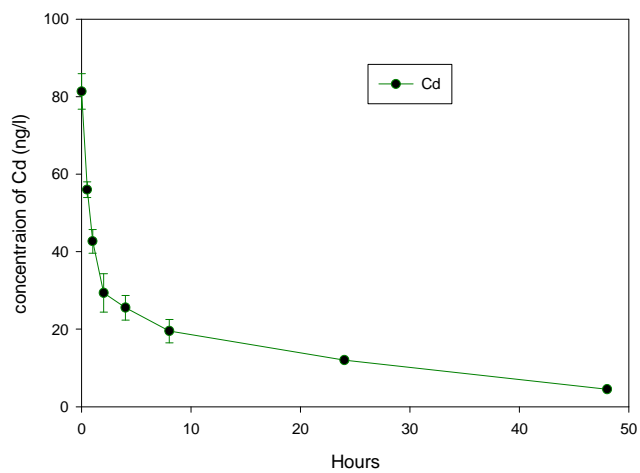


圖 7 鎘於土壤之吸附試驗 (鎘添加濃度為 20mg/L)