



## 行政院環境保護署

109 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

# 商業有機肥料與沼渣沼液作為環境抗生素 抗藥性發展的潛在來源探究

期末報告（定 稿）

主 辦 單 位： 行政院環境保護署

專案執行單位：國立中央大學／環境工程研究所

專案主持人：林居慶 教授

專案執行期間：109 年 01 月 30 日起至  
109 年 12 月 04 日止

中 華 民 國 109 年 12 月 印製



商業有機肥料與沼渣沼液作為環境抗生素抗藥性發展的潛在來源探究

林居慶

期末報告（定稿）



## 專案基本資料表

專案性質		<input checked="" type="checkbox"/> 實驗性質 <input type="checkbox"/> 非實驗性質		專案類別(單選)		<input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型	
研究主題		<input checked="" type="checkbox"/> 調查 <input type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 其他					
申請機構系所		國立中央大學環境工程研究所					
機構地址		32001 桃園市中壢區中大路 300 號					
專案主持人		林居慶		職等 / 職稱		教授	
協同主持人		陳婉如		職等 / 職稱		副教授	
專案名稱	中文	商業有機肥料與沼渣沼液作為環境抗生素抗藥性發展的潛在來源探究					
	英文	Commercially available organic fertilizers and anaerobic digestion residues as the potential source of antibiotic resistance development in the environment					
	關鍵字	有機肥料, 沼渣沼液, 抗生素抗藥性, 環境來源					
執行期程		自 民 國      1 0 9      年      0 1      月      3 0      日 起 至 民 國      1 0 9      年      1 2      月      0 4      日 止					
專案主持人		姓名：林居慶		Email： <a href="mailto:chuching@ncu.edu.tw">chuching@ncu.edu.tw</a>		專線：(03) 422-7151x34654 手機：0937-991-256	
專任助理		姓名：		Email：		專線： 手機：	
經費分析總表 (僅模場試驗專案需填寫兩年度金額)	專 案 預 估 經 費		第一年 金額	第二年 金額	編列說明		
	1.	人事費用	277,000		(1~5 項相加之 50%為限)		
	2.	貴重儀器使用含維護費	36,800		(與計畫實驗相關)		
	3.	消耗性器材與主要費用	619,693		(與計畫主體相關)		
	4.	其它研究相關費用	29,234		(含差旅與租賃費用)		
	5.	雜支費用	10,000		(1~6 項相加之 5%為限)		
	6.	行政管理費	97,273		(1~5 項相加之 10%為限)		
	7.	自籌款	0		(自行籌備款項)		
	申請補助金額(1~6 項)		1,070,000		總金額：1,070,000		
計畫總金額(1~7 項)		1,070,000		總金額：1,070,000			

專案主持人(簽名及蓋章)：

日期：2020/12/28



(本頁留白)





## 中文摘要

抗生素自發現後已廣泛應用在醫療及畜牧養殖產業(主要為添加至飼料)，但隨著抗生素的濫用及糞肥的農地施用，抗生素抗性基因(ARGs)在環境的背景濃度逐漸升高，其後果將可能嚴重威脅現代醫學的成就，引起許多國際衛生組織的關注。過往的文獻已指出相較於堆肥，傳統經由中、常溫厭氧消化方式處理後的禽畜糞便，其所含的 ARG 濃度無法被有效削減，某種程度暗示如要推動畜牧糞尿經厭氧消化處理後的沼液沼渣作為農地肥分的使用時，應先審慎調查評估並排除是否會因此而導致施作土壤環境的抗藥性增長的問題。有鑑於此，本計畫針對市售的堆肥以及畜牧場的沼液沼渣進行有系統的抗生素抗藥性分析，藉此了解何種來源(如豬糞、牛糞、雞糞以及非糞便類別的廢棄物等)與何種程序(好氧堆肥、厭氧消化)所得的有機肥料具有相對較高的抗藥性發展及累積潛勢；此外，也進行堆肥及沼渣沼液添加的短期(一個月)土壤縮模試驗，以了解國內新舊型態肥料中的 ARGs 在土壤環境的增殖與降解宿命。檢測的結果與當初的預期相符，即本期計畫於夏季所採集的 27 件沼液沼渣樣品，其內所含不論是 ARG 或是整合子基因的相對豐度，皆顯著高於 28 件堆肥樣品；不僅如此，沼液沼渣組別中豬糞高於牛糞，堆肥組別中非禽畜糞低於任何禽畜糞樣品(包括雞糞、豬糞、牛糞與混合糞肥)。由於本研究所檢測的樣品數量足以代表一般常見的現況，說明禽畜糞便的確是促成環境抗藥性增長的關鍵因素，值得注意。更甚者，本計畫所分析的沼液沼渣已屬亞熱帶地區戶外溫度較高的情況下所得的樣品，但在這樣的厭氧處理條件下依舊無法表現出優於堆肥程序的抗藥性削減效率，代表其他季節所產出的沼液沼渣更是需要檢視其抗藥性程度(即 ARG 濃度以及抗性菌密度與組成)，以完整掌握此管道所造成的環境抗藥性發展潛勢。最後，利用乾淨壤土所進行的短期土壤縮模培養試驗結果顯示，添加兩種肥料的土壤內 ARG 與整合子基因相對豐度的減少程度，整體而言與無添加肥料的土壤對照組相當；此外，大部分組別的基因豐度減少程度約略在一個層級，且降解後的豐度含量仍高於對照組，說明如果在此實驗條件下的沼液沼渣施肥一個月內再次澆灌的話，將有可能造成 ARGs 的累積。由於這樣的實驗設計僅只實驗室的模擬試驗，確切的環境抗藥性宿命仍須藉由實際接受沼液沼渣的農地土壤採樣、分析，才能準確說明現況。即使如此，本研究初步調查的結果某種程度仍可闡述禽畜糞肥內的抗藥性在土壤介質的變化。

關鍵字：沼液沼渣、禽畜堆肥、抗生素抗性基因、土壤縮模培養



## 英文摘要

Antibiotic resistance is accelerating at a very scary rate, as evidenced by the fact that “the 10-year-grace-period” for resistance to develop has been shortened to be within a year, and the potential threat level can be equivalent to climate change according to WHO. This is mainly attributed to the misuse of antibiotics at an alarming rate, particularly in agricultural activities. While application of organic fertilizers derived from animal manure including the anaerobic digestate in farmland is considered one of the routes that leads to the development of antibiotic resistance in the environment, little has been undertaken in Taiwan. This is of concern, because many studies have shown that mesophilic anaerobic digestion fails to reduce the levels of antibiotic resistance genes (ARGs) as compared to composting and thermophilic anaerobic digestion. Here, 27 digestate samples from anaerobic digestion systems of both cow and pig farms from Hsinchu to Yunlin were collected and determined the abundance of ARGs. Twenty-eight commercially available compost samples were also purchased and processed with the same analyses. Results showed that relative abundance of the tested ARGs was higher in digestate samples than in compost samples, implying that application of digestate as fertilizers may impose a higher potential of antibiotic resistance proliferation in farmland soils, as compared with composts. In addition, we observed that composts prepared from biomass wastes exclusive of manures contained lower ARG abundance than manured composts. To probe the fate of ARGs in agricultural soil, microcosm experiments were conducted using clean loam-type soil excavated from a pristine area in the Shimen Reservoir, spiked with digestate or composts and incubated for a month. Soils with no fertilizers were used as controls. Results showed that ARGs in fertilized soils declined to the same extent as in control soils, indicating that repeating irrigation of digestates within a month may lead to accumulation of ARGs in soils. If the policy of reuse of animal excretions continues to implement, we suggest that the application of biochar materials in farmland soil in a way similar to active capping used for sediment remediation may improve the limitation of ARG proliferation in the agricultural area.

Keywords: Anaerobic digestate, composted manure, antibiotic resistance genes, soil microcosm incubation

---



## 目錄

第一章 前言 .....	1
1.1 計畫緣起 .....	1
1.2 研究目的 .....	4
第二章 文獻探討 .....	5
2.1 抗生素使用現況 .....	5
2.2 抗生素作用機制 .....	6
2.3 抗生素抗性機制 .....	7
2.4 水平基因轉移(horizontal gene transfer, HGT) .....	9
2.5 ARGs 與 ARB 的傳播及影響 .....	10
2.6 環境因素在人體暴露於 ARG 途徑所扮演的角色 .....	12
2.7 農業行為對於環境抗生素抗性發展的影響 .....	14
2.8 畜牧業與抗生素之關係 .....	15
2.9 禽畜糞所製的有機肥料與抗生素、ARGs 之關係 .....	16
第三章 研究方法 .....	19
3.1 肥料的選取 .....	19
3.2 抗性基因相關分析 .....	20
3.3 化學分析與土壤質地分析 .....	25
3.3.1 肥料有機質含量(燃燒法) .....	25
3.3.2 肥料重金屬檢測(王水消化法) .....	25
3.3.3 肥料總氮與總磷檢測 .....	26
3.3.4 抗生素萃取與分析 .....	26
3.3.5 土壤粒徑分析(比重計試驗法) .....	29
3.4 土壤縮模試驗 .....	31
3.4.1 縮模試驗前處理 .....	31
3.4.2 縮模試驗 .....	31
3.5 研究進度及預期完成之工作項目 .....	33
第四章 結果與討論 .....	35
4.1 市售有機肥料(堆肥) .....	35
4.1.1 堆肥樣品之營養源與重金屬含量 .....	35
4.1.2 堆肥樣品 DNA 萃取品管品保確定 .....	42



4.1.3 堆肥樣品所含 ARGs 與 MGE 之定量:絕對濃度.....	43
4.1.4 堆肥樣品所含 ARGs 與 MGE 之定量:相對濃度.....	51
4.2 沼液沼渣.....	54
4.2.1 沼液沼渣樣品基本特性分析 .....	55
4.2.2 沼液沼渣樣品 DNA 萃取品管品保確認 .....	56
4.2.3 沼液沼渣樣品所含 ARGs 與 MGE 之定量:絕對濃度.....	56
4.2.4 沼液沼渣樣品所含 ARGs 與 MGE 之定量:相對濃度.....	65
4.3 抗性基因相對豐度 vs. 四環素類與磺胺類抗生素濃度.....	69
4.4 堆肥與沼液沼渣之土壤添加縮模試驗 .....	71
4.5 環境風險與管理上的意義.....	79
4.6 結論與建議.....	80
參考文獻 .....	81



## 圖目錄

圖 1-1 各 ARG 及 intI1 於廢水處理單元水質參數之冗餘(相關度)分析 .....	3
圖 3-1 沼液沼渣採樣 .....	19
圖 3-2 抗生素萃取方法 .....	28
圖 3-3 USDA 土壤三角座標分類法 .....	30
圖 3-4 土壤縮模試驗(A)穴盆架設整體照，(B)穴盆架設近照，(C)沼液沼渣土壤近照，(D)堆肥土壤近照 .....	32
圖 4-1 本期計畫所用之 28 件市售有機肥料(堆肥)外包裝 .....	37
圖 4-2 不同組別之堆肥樣品其單位乾重所含的(A)四環素類、(B)磺胺類類、(C) $\beta$ -內醯胺類、(D)大環內酯類的抗生素抗性基因，以及(E)第一型整合子基因的絕對豐度值 .....	45
圖 4-3 各堆肥樣品單位重量所含的 16S rRNA gene 絕對定量值 .....	46
圖 4-4 各堆肥樣品其單位乾重所測得的不同 ARG 絕對濃度加總 .....	46
圖 4-5 不同組別之堆肥樣品其單位乾重所含的(A)四環素類、(B)磺胺類類、(C) $\beta$ -內醯胺類、(D)大環內酯類的抗生素抗性基因，以及(E)第一型整合子基因的絕對豐度值，以同樣品相同單位乾重之 16S-rRNA 基因的絕對豐度標準化後的相對豐度值 .....	53
圖 4-6 各堆肥樣品內的各個抗性基因的相對豐度加總 .....	53
圖 4-7 不同組別之沼液沼渣樣品其單位體積所含的(A)四環素類、(B)磺胺類類、(C) $\beta$ -內醯胺類、(D)大環內酯類的抗生素抗性基因，以及(E)第一型整合子基因的絕對豐度值 .....	64
圖 4-8 沼液沼渣樣品內的各個抗性基因的絕對豐度加總 .....	64
圖 4-9 各沼液沼渣樣品單位體積所含的 16S rRNA gene 絕對定量值 .....	65
圖 4-10 同組別之沼液沼渣樣品其單位體積所含的(A)四環素類、(B)磺胺類類、(C) $\beta$ -內醯胺類、(D)大環內酯類的抗生素抗性基因，以及(E)第一型整合子基因的絕對豐度值，以同樣品相同單位乾重之 16S-rRNA 基因的絕對豐度標準化後的相對豐度值 .....	67
圖 4-11 各沼液沼渣樣品所測得的不同 ARG 相對豐度加總 .....	68
圖 4-12 堆肥與沼液沼渣樣品的四環素類抗生素濃度與 tet 相對豐度的(A)半對數與(B)全對數關係，以及磺胺類抗生素濃度與 sul 相對豐度的(C)半對數與(D)全對數關係 .....	69
圖 4-13 土壤縮模試驗期間溫度紀錄。藍、紅、黃圖標分別表為晴、雨、陰天。 .....	71





圖 4-14 縮模試驗 30 天期程前後(A)堆肥組與(B)沼液沼渣組別 (含對照組) 單位土壤乾重的 16S rRNA 基因濃度變化 .....	76
圖 4-15 縮模試驗 30 天期程前後(A)堆肥組與(B)沼液沼渣組別 (含對照組) 的整合子基因 intI1 的相對豐度變化 .....	77
圖 4-16 縮模試驗 30 天期程前後(A)堆肥組與(B)沼液沼渣組別 (含對照組) 的總抗性基因相對豐度的變化.....	78



## 表目錄

表 3-1 PCR 反應物配製 .....	20
表 3-2 TA 克隆反應試劑配製 .....	21
表 3-3 LB—藍白篩培養基配製 .....	22
表 3-4 qPCR 反應物配製 .....	22
表 3-5 PCR 與 qPCR 操作條件 .....	23
表 3-6 分子序列與擴增子大小 .....	24
表 3-7 MS 偵測各抗生素的參數 .....	27
表 3-8 研究進度及預期完成之工作項目(甘特圖).....	33
表 4-1 本計畫所使用的各有機堆肥品牌名稱與其原料組成 .....	36
表 4-2 本計畫 28 件堆肥樣品之氮磷鉀與有機質含量 .....	40
表 4-3 本計畫 28 件堆肥樣品之重金屬含量 .....	41
表 4-4 各肥料樣品萃取所得之 DNA 的濃度與品質 .....	42
表 4-5 有機肥料抗性基因、第一類整合子基因的絕對豐度 (單位: ARG or MGE copies/g dry weight) .....	47
表 4-6 有機肥料抗性基因、第一型整合子基因與 16S 核糖體基因的相對豐度 (單 位: ARG or MGE copies/16S rRNA gene copies).....	49
表 4-7 沼渣沼液樣品酸鹼度 .....	55
表 4-8 沼渣沼液樣品導電度 .....	56
表 4-9 各沼液沼渣樣品萃取所得之 DNA 的濃度與品質 .....	57
表 4-10 沼液沼渣抗性基因、第一型整合子基因與 16S 核糖體基因的相對豐度 (單 位: ARG or MGE copies/16S rRNA gene copies).....	58
表 4-11 沼液沼渣抗性基因、第一型整合子基因的絕對濃度 (單位: ARG or MGE copies/mL) .....	60
表 4-12 肥料樣品中四環素類及磺胺類抗生素濃度 .....	70
表 4-13 沼液沼渣樣品中四環素類及磺胺類抗生素濃度.....	70
表 4-14 堆肥土壤縮模試驗起始 DNA 濃度與品質 .....	73
表 4-15 堆肥土壤縮模試驗 30 天結束時 DNA 濃度與品質 .....	74
表 4-16 沼液沼渣土壤縮模試驗起始 DNA 濃度與品質 .....	75
表 4-17 沼液沼渣土壤縮模試驗 30 天結束時 DNA 濃度與品質 .....	75



(本頁留白)



## 第一章 前言

### 1.1 計畫緣起

循環經濟所提倡的資源可恢復且可再生的經濟產業系統的概念，讓原本被視為無用的「生質廢棄物(原料)」在經過諸如消化、堆肥等適當的生化程序處理後，得以“安全回歸”生態圈成為養分的作法，再次受到政府重視並積極推動。然而，現今具一定規模的商業化養殖系統，不論是禽畜養殖或是水產養殖，大多採取「集約飼養」(confined animal feeding operations, CAFOs)的圈養方式進行，過程中為了促進動物生長與預防感染發生(主要)、以及治療感染(次要)等因素，常定期的在飼料中添加亞治療劑量(sub-therapeutic levels)的抗生素(Gilchrist et al., 2006)。此種低劑量的抗生素施用方式已知是目前抗生素用量的最大宗。相較於人體醫療，農業行為的抗生素用量約佔整體抗生素產量的 70-80% (Dorit, 2009)。此舉雖能讓農產產值得以有一定程度的保障，但由於抗生素在一般高等生物體內的吸收率最多僅達 20-30% (Sarmah et al., 2006)，且當腸道微生物長期處在抗生素所帶來的壓力時易讓帶有抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)的抗性細菌(antibiotic resistant bacteria, ARB)繁衍成特定的優勢菌群(Mcwen, 2012)，因此農業上抗生素的廣泛使用及禽畜糞便等生物固體(biosolids)的再利用等人為活動，已被確認為是造成環境中抗生素抗性群體(antibiotic resistome, 即所有能抵抗抗生素的菌群與基因的總稱)的主要來源之一(Pruden et al., 2013)。

值得注意的是，抗生素抗性群體近年來在環境背景含量的大幅提高已對公共衛生品質的維護帶來警訊(WHO, 2017)，其嚴重性因「可威脅現代醫學的成就」而讓世界衛生組織從 2014 年開始將抗生素抗藥性列為全球健康的最大威脅之一(WHO, 2014)，程度上與氣候變遷、空氣污染等並列前五名(WHO, 2019)。此問題令人擔憂的主因在於細菌天生快速的突變能力，及彼此間可利用獨特的水平基因轉移機制(horizontal gene transfer, HGT)，特別是藉由質體(plasmid)、整合子(integron)及轉座子(transposon)等「可移動遺傳因子」(mobile genetic elements, MGEs)的協助而讓更多群體獲得抗性基因(ARGs)而免疫(Gillings et al., 2015; Ma et al., 2017)。ARGs 在環境散播時由於可藉由細菌而增生，因此已被學者視為是獨特的新興污染物(Pruden et al., 2006; Schnoor, 2014)，其在環境濃度升高的趨勢如不加以監控與管制，考量到目前各大藥廠自 1980 年代末期基於抗生素的毛利過低而不願開拓新型藥物的局面下(Silver, 2011)，最終將可能造成臨床致病菌因 HGT 之故被賦予抗藥性的機率倍增，導致具多重抗藥能力的病菌帶來無藥可醫



的威脅更勝以往。美國疾管署近期的報告甚至指出抗藥性的問題已嚴重到抗生素在問世後病菌對其產生抗性的緩衝期從十年縮短為一年(CDC, 2013)。

環境抗生素抗藥性問題的複雜度除了抗生素會對微生物帶來“直接”的選擇壓力外，環境中尚存有其他能持續對原核生物施加生存/生長上的壓力並誘發對抗生素具實質抵抗力的物質。此種不是藉由抗生素但卻能對抗生素產生抗藥能力的過程稱為“共選擇”(co-selection)效應(Seiler and Berendonk, 2012)。這樣的物質雖然包括消毒劑跟重金屬，或其他能產生環境壓力的物質，但若基於(i)抗生素在環境的半衰期一般而言偏短；(ii)重金屬在環境中相對穩定且不會降解；(iii)原核生物對重金屬與對抗生素的抗性機制雷同，且兩類的抗性基因常共存於 MGEs；以及(iv)細菌的抗藥性強度與所暴露的重金屬濃度有一定的關係等考量，重金屬極可能是維持 ARGs 與 ARB 在環境流佈與存續最為關鍵的因子之一(Baker-Austin et al., 2006)。由此可知，源頭掌控以避免抗生素、ARGs/ARB 與重金屬等污染物過量進入一般環境，是面對抗生素抗藥性的問題時最佳的管理與解決之道，否則一但因攝取受污染的食物進而造成人與人之間的傳染接觸(Travers and Barza, 2002; Chang et al., 2015)、或與農場動物的直接接觸(van den Bogaard et al., 2001; Voss et al., 2005; Andersson and Hughes, 2011)、或因非直接性的職業暴露(如在有糞肥和/或再生水應用的農場/田地的工作)(Pruden et al., 2012)，或藉由空氣，土壤和水等管道而暴露接收到 ARGs 與 ARB 時(Chapin et al., 2005; Gibbs et al., 2006; Rule et al., 2008; Echeverria-Palencia et al., 2017)，將可能讓自身處於抗藥性高風險的情境/狀態。

由於國內截至目前為止對於抗生素抗藥性在環境發展與流布等資料仍極缺乏，本研究群自 2016 年開始，遂陸續針對流經中壢工業區的埔心溪與黃墘溪流域周圍的農地土壤，以及台北/桃園等地的污水處理廠處理單元展開調查，希望能：(1)瞭解在灌排不分的政策下，因偷排所造成的農地重金屬污染是否、及如何影響 ARGs 在農地土壤中的維持及傳播，藉此探討受重金屬污染的環境是否能夠誘發抗生素抗性的共選擇，並同時探討重金屬的移動性(即生物可觸性與生物可利用性)對於環境中抗生素抗性發展的影響(鄧教毅，2018；潘弘益，2019)；(2)瞭解 ARGs 及 ARB 在污水處理單元間的生成與削減，以確定何種污水處理系統能有效限制/降低 ARGs 的傳播(張智聖，2019)。在調查的過程中注意到 ARGs 在廢水處理程序的多寡似乎與一般的厭氧參數有較強的關聯性(圖 1-1)，某種程度暗示如要推動經過厭氧處理後的畜牧糞尿沼渣沼液作為農地肥分的使用時，應先審慎調查評估並排除是否會因此而導致施作土壤環境的抗藥性增長的問題。

有鑑於此，本計畫擬針對市售的有機肥料(包括用於農用作物栽培與家用盆





栽種植)，以及可得的沼渣沼液：(1)進行有系統的抗生素、ARGs、ARB、重金屬和營養源等的含量分析，藉此了解何種來源(如豬糞、牛糞、雞糞等)與何種程序(好氧堆肥、厭氧發酵、厭氧消化等)所得的有機肥料具有相對較高的抗藥性發展及累積潛勢；此外，也將：(2)進行肥料及沼渣沼液添加的短期(一至二個月)土壤縮模試驗，藉由不同土壤深度的 ARG 濃度分析，以了解源自於國內市售的肥料及沼渣沼液中的 ARGs，在土壤環境隨著時間有無受到日照後的增殖(proliferation)與降解(decay)宿命。計畫所選擇的抗生素包括 tetracyclines, sulfonamides, -lactams 及 macrolides 四種台灣常用的抗生素，和各自對應的 *tet(O)*, *tet(W)*, *tet(M)*, *tet(A)*; *sul(I)*, *sul(II)*; *blaTEM*, *blaCTX-M*, *blaSHV*; *erm(F)*, *erm(B)* 等 ARGs，以及與多重抗藥性相關的第 1 類整合子(class 1 integrons)的基因(*intI1*)為目標基因予以量化(qPCR)，而縮模試驗所採用的乾淨土壤將自石門水庫集水區人煙較少的步道周圍採集，土壤在試驗前會先測定 ARG 含量，以確定其 ARG 濃度介於環境背景值的土壤。本計畫所得的結果除了能釐清沼渣沼液再利用是否不具顯著的環境衝擊外，也盼能有助於更準確地預測與管理本土抗生素抗藥性的環境誘發與持續的問。

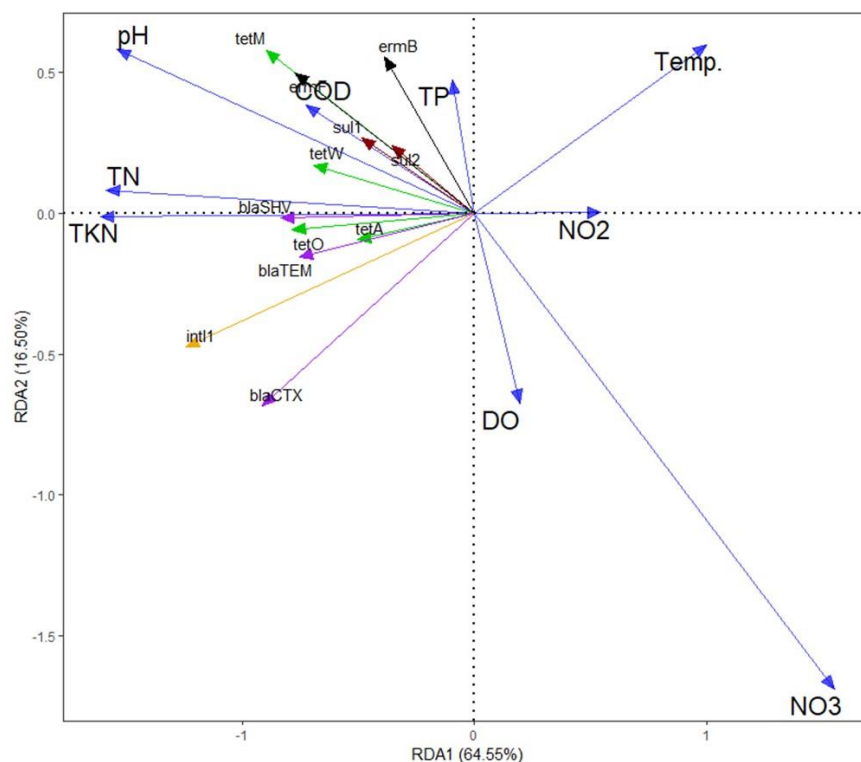


圖 1-1、各 ARG 及 *intI1* 於廢水處理單元水質參數之冗餘(相關度)分析



## 1.2 研究目的

政府近年來積極推動沼渣沼液農地再利用的政策，其出發點除了仿效國外農業活動所產生的糞肥多半直接農地農用以做為作物生長所需的養分跟做為土壤改良劑使用的作法外，也試著替畜牧業者為因應水污法的開徵而未雨綢繆。然而，動物性生質廢棄物回歸農地的適用性近年來已在國際引起相當多的爭議與討論，主要的考量在於此等廢棄物含有的新興污染物可能對環境與生態所帶來的潛在風險。抗生素、抗生素抗性菌(ARB)以及抗生素抗性基因(ARGs)即是當前糞肥使用最值得關注的新興污染物。在台灣，由於未經處理的動物糞便已被禁止農用，因此這類有機肥料該關注的焦點應為：「何種前處理才算是“恰當”且能衍生出“環境友善”的產品」。有鑑於任何環境相關的政策皆需要嚴謹且完善的科學證據予以支撐，而堆肥已是行之有年的糞肥前處理工法，因此本計畫將針對抗生素抗藥性的問題，(1)普查市面販售之有機肥料與沼渣沼液的抗生素抗性基因含量，以比較沼渣沼液所具有的抗生素抗藥性潛勢是否顯著高於有機肥；以及(2)將經分析後的肥料與沼渣沼液藉由土壤縮模試驗探討抗生素抗性量隨時間在不同土壤位置的宿命，以得知在一般施作條件下具肥分之土壤與其他土壤相比，抗生素抗藥性含量之差異。

本研究預期的貢獻與效益包括：(1) 確定由過往文獻所指的經牲畜排泄製成的肥料及沼渣沼液，其蘊藏的抗生素抗藥性潛力與其他如堆肥等有機肥料相比，是否顯著較高；(2) 確定從抗生素抗藥性發展來源評估時，沼渣沼液所造成的環境風險是否將顯著高於原有的如堆肥等農藝工法；(3) 所得的數據希望可反映出不同品牌、不同料源、不同程序製成的有機肥料其抗藥性含量的程度高低，以及施作後抗性基因的環境宿命，這些資訊除可作為風險評估的參考依據外，也對公衛與環境領域方面的科研進展有所助益。



## 第二章 文獻探討

### 2.1 抗生素使用現況

抗生素自被發現後顯著地促進人類醫藥學的快速發展，除了用於治療人類疾病之外，也被大量使用於畜牧業，作為動物疾病治療與生長促進劑(Van Boeckel et al., 2015)。全球的抗生素使用其中超過一半以上都是用於動物用途，例如美國食用動物的抗菌劑銷售量為人類使用的四倍(Maron et al., 2013)。中國主要使用抗生素依序為巨環內酯類抗生素(macrolides)、乙內醯胺類抗生素( $\beta$ -lactams)、喹諾酮類抗生素(quinolones)、四環素類抗生素(tetracyclines)及磺胺類抗生素(sulfonamides)，人類和動物的抗生素使用量分別占 48%、52% (Zhang et al., 2015)。根據財政部關務署的統計資料庫顯示，106 年國內抗生素進口量由大至小為乙內醯胺類、四環素類、巨環內酯類、胺基苷類(aminoglycosides)及磺胺類抗生素，其中人類和動物使用分別占 43%、57% (磺胺類抗生素不納入計算) (行政院財政部關務署 2018)；另外，抗生素為國內放流水的主要藥物成分之一，其中以畜牧業、醫院與製藥廠為主要排放來源(Lin et al., 2008)。然而，抗生素無法被人體或動物體完全代謝，大部分抗生素或其代謝物被排出體外，這些物質可能仍具有活性，而尿液和糞便可能作為農耕肥料，造成抗生素進入土壤中，並且在土壤或糞便中的代謝物可能重新轉換為母體化合物(Tolls, 2001; Qiao et al., 2012; Jechalke et al., 2014)。另一方面，污水管道系統收集來自家庭、工業及醫院的廢水送至污水處理廠，但是目前污水處理程序並未針對去除抗生素而設計，其去除效果極其有限，因此抗生素依然存在於污水處理廠的放流水中(Rodriguez-Mozaz et al., 2015)。

在亞洲地區的未受處理廢水含有阿奇黴素(巨環內酯類抗生素)(1.5~303,500 ng/L)、克拉黴素(巨環內酯類抗生素)(5~1854 ng/L)、磺胺甲噁唑(磺胺類抗生素)(3~3931 ng/L)及甲氧苄啶(4~4992 ng/L) (Williams et al., 2019)，這些抗生素可能進入至自然環境中。在受到人為活動與季節的影響之下，河流系統檢測到 35 種抗生素的總濃度為 0.37~508.6 ng/L (Huang et al., 2019)，並且可能造成抗生素的生物累積(Ondarza et al., 2019)。此外，台灣畜牧業時常坐落於農田區域(行政院農業委員會 2018)，現階段對於處理畜牧廢水的方式無法有效去除抗生素，若有施打抗生素可能成為沉積物與土壤的主要來源(Fang et al., 2018)。最後，抗生素通過地表逕流和滲透擴散至土壤、地表水及地下水(Kim et al., 2010)。另外，透過糞便直接施作於農地，發現夏季或冬季的抗生素濃度(喹諾酮類、四環素類、磺胺類及巨環內酯類抗生素；夏季與冬季的抗生素總濃度為 50.59 ng/g、112.44 ng/g)顯著



高於果園(夏季與冬季的抗生素總濃度為 6.55 ng/g、24.86 ng/g)和自然保護區森林(夏季與冬季的抗生素總濃度為 2.1 ng/g、5.09 ng/g)的土壤，由於抗生素的濃度顯著受到人為活動強度的影響，並且隨著土壤深度的增加，而抗生素濃度逐漸降低(Zhao et al., 2018)。

## 2.2 抗生素作用機制

土壤為地球上最多樣性的微生物棲息地之一，大多數臨床相關抗生素起源於天然存在土壤中的微生物(Allen et al., 2010; Chen et al., 2013)，因為土壤是 *Streptomyces* 的天然棲地，其物種可產生大部分天然的抗生素(D'costa et al., 2006; Forsberg et al., 2012)，因此抗生素抗性早在抗生素被廣泛的商業化生產與使用前，即已存在於自然環境中，但此僅代表原本的環境背景程度。抗生素具有滅菌或抑制菌生長的效果，依作用機制可分為五大類：抑制葉酸(folic acid)合成影響代謝、阻斷細胞壁合成、抑制核酸合成、抑制蛋白質(protein)合成及破壞細胞膜通透性與完整性，簡述如下：

### 抑制葉酸合成影響代謝

葉酸屬於 B 族維生素，參與許多的代謝作用，其中包含 DNA 合成，細菌在合成葉酸需要二氫葉酸合成酶(dihydropteroate synthase, DHPS)和二氫葉酸還原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)參與，但是磺胺類抗生素與對氨基苯甲酸(para-aminobenzoic Acid, PABA)競爭 DHPS 的結合位點，其作為 DHPS 的競爭性抑制劑(competitive inhibition)，抑制二氫葉酸(dihydrofolic acid, DHF)合成；另外，甲氧苄啶(trimethoprim)則作為 DHFR 的競爭性抑制劑，阻止四氫葉酸(tetrahydrofolic acid, THF)合成(Brogden et al., 1982)，進而達到抑制細菌的生長和繁殖。

### 阻斷細胞壁合成

肽聚糖(peptidoglycan)為革蘭氏陽性菌(Gram-positive bacteria)的細胞壁主成分，其主要骨架由 N-乙酰葡萄糖胺(N-acetylglucosamine, GlcNAc)和 N-乙酰胞壁酸(N-acetylmuramic acid, MurNAc)交替相連的形成線性聚糖鏈，線性聚糖鏈相互交聯形成肽聚糖(Schleifer and Kandler, 1972)。在細胞壁合成過程中有許多酶參與，其中會與乙內醯胺類抗生素共價鍵結的酶通稱為盤尼西林結合蛋白(penicillin-binding protein, PBPs)，包括使線性聚糖鏈交錯鏈結的轉肽酶(transpeptidase)，乙內醯胺類抗生素與轉肽酶結合除了可抑制肽聚糖生成，也可能活化胞外自溶酶(autolytic enzymes)，造成細菌死亡(Novak et al. 2000)。萬古黴素(vancomycin)則抑





制肽聚醣合成機制為透過與肽聚醣前驅物結合，以阻止肽聚醣合成(Hammes and Neuhaus, 1974)。

### 抑制酶合成

在轉譯(translation)過程需要核醣體(ribosome)的參與，原核細胞(細菌)則具有 30S 與 50S 核醣體次單元，當進行轉譯而讀取 messenger RNA (mRNA)時，胺基苷類抗生素與 30S 核醣體次單元結合，導致密碼子的誤讀或提前終止轉譯(Mingeot-Leclercq et al., 1999)。四環素類與巨環內酯類抗生素分別結合於 30S、50S 核醣體次單元，阻止 transfer RNA (tRNA)結合於核醣體，抑制多肽鏈(polypeptide chain)的延伸，阻斷酶的合成(Omura, 2002; Connell et al., 2003)。

### 抑制核酸合成

在 DNA 進行複製或轉錄(transcription)時，需要拓撲異構酶(topoisomerase)參與，喹諾酮類抗生素通過抑制第二型拓撲異構酶(type II topoisomerase)，其與 DNA 旋轉酶(DNA gyrase) (topoisomerase II)和拓撲異構酶 IV (topoisomerase IV)結合，將這些酶轉換為細胞毒素(cellular toxins)，於複製時，由此二種酶切開之 DNA 無法重新連接形成碎片，並增加 DNA 碎片濃度，使細菌致死(Aldred et al. 2014; van Bambeke et al., 2017)。利福平(rifampicin)藉由抑制 DNA-dependent RNA Polymerase，以達到抑制 RNA 的生成(Campbell et al., 2001; Calvori et al., 1965)。

### 破壞細胞膜通透性與完整性

多黏桿菌素(polymyxin)是同時具有疏水性和親水性的兩性分子且為帶正電之分子，但是導致細菌死亡的作用機制尚未清楚解析(Satlin and Jenkins, 2017)。推測其透過靜電吸引與細菌外膜的脂多醣(lipopolysaccharide, LPS)之帶負電的磷酸基團結合，競爭性置換 LPS 與細胞膜的結合位點的二價陽離子( $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ )，造成外膜結構不穩定，而改變細胞膜的通透性，使其他物質容易進出細胞(包含抗生素)，然後多黏桿菌素滲透至細胞膜與磷脂質(phospholipids)結合，破壞細胞膜的完整性，導致細胞質外漏 (Velkov et al., 2010; Allison and Lambert, 2015)。

## 2.3 抗生素抗性機制

抗生素為天然的產物，因此抗生素抗性在抗生素用於臨床前已經存在於環境中(Knapp et al., 2009; D'Costa et al., 2011)，其發展往往只局限於含有抗生素壓力的局部環境，但抗生素濫用導致抗生素抗性的快速發展及傳播，細菌為了生存而





獲得抗生素抗性，抗生素的抗性機制可分為不滲透屏障(impermeable barrier)、外排泵(efflux pumps)、抗性突變(resistance mutation)與藥物去活性(drug inactivation)，簡述如下：

### **不滲透屏障(impermeable barrier)**

革蘭氏陰性菌(Gram-negative bacteria)的外膜與部分革蘭氏陽性菌的細胞壁上存在著孔蛋白(porin) (Besnard et al., 1997)，孔蛋白提供親水性小分子穿過細胞膜的途徑(例如乙內醯胺類、四環素類、氟喹諾酮類抗生素及氯黴素)，藉由丟失、減少孔蛋白數量、改用具選擇性的孔蛋白，或者進行特定突變以降低細胞膜的通透性(例如孔蛋白直徑縮小)，使得親水性抗生素難以進入細胞內(Pages et al., 2008; Delcour, 2009; Bajaj et al., 2016; Blair et al., 2015)。另一方面，透過修飾 LPS 而改變其電性，或於細胞膜表面釋放莢膜多醣體(capsular polysaccharides, CPSs)，CPSs 藉由靜電吸引力捕獲或結合多黏桿菌素，阻止其與 LPS 結合(Olaitan et al., 2014)。

### **外排泵(efflux pumps)**

細胞膜上有許多的膜轉運蛋白(membrane transport protein)，使特定物質順利進出細胞，而大多數藥物外排蛋白屬於 5 個不同的蛋白質家族：耐藥節結化細胞分化家族(resistance-nodulation-cell division family, RND)、主要的易化因子超家族(major facilitator superfamily, MFS)、小多重耐藥家族(small multidrug resistance family, SMR)、ATP 結合盒超家族(ATP-binding cassette superfamily, ABC)及多藥及毒性化合物外排家族(multidrug and toxic compound extrusion family, MATE) (Li and Nikaido 2009)，例如四環素類抗生素的 *tetA* 和 *tetB* 屬於 MFS 家族(Arioli et al. 2014; Perez et al., 2017)。ABC 轉運蛋白利用 ATP 水解作為能量來源，其他種類的轉運蛋白則依賴質子動力(proton-motive force) (Li et al., 2015)，透過多組成外排系統抗生素直接排出胞外，或由單組成外排系統將其排至周質(periplasm)後，再藉由孔蛋白(porin)或擴散排出胞外(Alekshun and Levy, 2007)，以降低抗生素在胞內的濃度(Nikaido and Pages, 2012; Olaitan et al., 2014; Garneau-Tsodikova and Labby, 2016)。

### **抗性突變(resistance mutation)**

細菌經常暴露於非致死濃度的抗生素環境，非致死濃度促使細菌自發性突變(Drlica, 2003; Andersson and Hughes, 2014)，並且中等選擇性壓力可能產生高水平程度的抗生素抗性(Baym et al., 2016a)。抗生素作用可能造成 DNA 損傷，誘發 SOS 反應(SOS response)，使基因發生突變(McKenzie et al., 2000)，讓細菌獲得抗生素抗性能力(Cirz et al., 2005)，例如藥物結合位點結構發生變化，導致抗生素無法與其結合發揮作用；或產生某種酶，其作用為修飾藥物結合位點，造成抗生素的親



和力降低(Kuzin et al., 2000; Ruiz, 2003; Wilson, 2014; Garneau-Tsodikova and Labby, 2016; Blair et al., 2015)。

### **藥物去活性(drug inactivation)**

細菌利用水解酶破壞抗生素的分子結構，使抗生素失去藥理作用(Bush and Jacoby, 2010; Canton et al., 2012; Blair et al., 2015)，例如廣效性乙內醯胺酶(extended-spectrum- $\beta$ -Lactamases, ESBLs)具有水解乙內醯胺類抗生素的能力(Bush, 2013)；或通過酶的化學修飾改變抗生素結構，降低抗生素對藥物結合位點的親和力(Wright, 2005; Blair et al., 2015)，例如胺基苷類抗生素最常藉由胺基苷類修飾酶(aminoglycoside-modifying enzymes, AMEs)去除其活性(Garneau-Tsodikova and Labby, 2016)。

## **2.4 水平基因轉移(horizontal gene transfer, HGT)**

可動遺傳因子(mobile genetic elements, MGEs)為一種遺傳物質，它們介導細胞內或細胞間的 DNA 運輸，由於其具有獨特核心的基因，允許獨立於細胞染色體的複製，並可進行同源或非同源的基因重組，其同時主導水平基因轉移(Frost et al., 2005)，並且經常攜帶對其宿主或其宿主周遭鄰居有益的基因(Rankin et al., 2011)，因而增強宿主的適應性。現今已發現多種的可動遺傳因子(MGEs)，例如質體(plasmid)、噬菌體(bacteriophages)、基因組島(genomic islands, GIs)、接合性轉座子(integrative and conjugative elements, ICEs)、插入序列(insertion sequences, ISs)、轉座子(transposons)、整合子(Integrins)與微型反向重複轉座子(miniature inverted repeat transposable elements, MITEs) (Stokes and Gillings, 2011)。許多研究經常可從 MGEs 發現抗生素、消毒劑與重金屬抗性基因的存在(Silver and Phung, 2005; Stokes and Gillings, 2011; Altimira et al., 2012; Jechalke et al., 2013; San Millan et al., 2014; Jechalke et al., 2015; Pehrsson et al., 2016)。抗生素抗性可透過染色體的抗性突變及通過 MGEs 獲得，通過後者獲得的耗費適應成本較低(Vogwill and MacLean, 2015)。雖然透過 MGEs 獲得抗生素抗性基因具有較低適應成本，但是某些 MGEs 仍可能導致宿主高昂的適應成本(Diaz Ricci and Hernández, 2000)，當無環境壓力存在時，宿主將丟棄這些無用且高昂適應成本的 MGEs (Subbiah et al., 2011)。

Integron 可分為兩大類：移動性整合子(mobile integrons, MI)與染色體整合子(chromosomal integrons, CI)，前者經常發現作為轉座子的一部分，這些轉座子可位於質體，通常攜帶有限數量的基因盒(平均 2~3 個，最多 10 個)；後者位於染色體上，不具有移動性，其可擁有數百個基因盒(Cambray et al., 2010; Lacotte et al.,



2017)。Integron 主要由三個元件組成：(1)負責編碼 Integrase 的 *intI* 基因，介導基因盒的插入、切除與重組；(2)基因盒插入的 *attI* 重組位點；(3)負責基因盒表達的 Pc 啟動子(promoter) (Cambray et al., 2010)，因此能夠捕獲及表達嵌入基因盒的抗性基因(Stokes and Hall, 1989)。基於編碼整合子的序列(40 ~ 58%相同序列則定義為同一類)已經定義五種不同類型的移動型整合子(Mazel, 2006)。然而，有研究指出 Class 1 integron 是最常見且最普遍的，特別是在臨床環境中，也是抗生素抗性傳播問題的主要貢獻者之一(Cambray et al., 2010)，在自然環境、人為活動範圍處處可見(Wright et al. 2008; Gillings et al., 2015; Jechalke et al., 2015; Ma et al., 2017)，因 Integrase 的 *intI* 基因表達被嚴格調控、強度較弱的 Pc 啟動子，並且另外通過限制攜帶基因盒的數量成為低適應成本的結構，利於無環境壓力下保留抗性基因(Lacotte et al., 2017)，例如天然攜帶 3 copies Integrase 的質體，它們所需維持的成本可能小於 5 倍(Avila and de la Cruz, 1988)。此外，Class 1 Integron 常攜帶抗生素、消毒劑和重金屬抗性基因，且存在於致病菌與非致病菌之間，其豐富度可快速反應環境的變化，透過 HGT 擴散，而作為人為污染的指標(Wright et al., 2008; Gillings et al., 2015)。

## 2.5 ARGs 與 ARB 的傳播及影響

自 1928 年青黴素(penicillin)被英國蘇格蘭學者 Alexander Fleming 發現以來，抗生素的施打與服用由於可以只攻擊與病原菌相似的原核生物族群而不傷害人體細胞，因此在之後由 Selman Waksman 所主導的抗生素大量開發、純化、量產的黃金年代期間(即 1940-1960)，幾乎讓所有因細菌所引起的感染性疾病得以有效治癒甚至根絕，使得醫學界在術後感染的治療、以及在公共衛生的管理皆獲得突破性的進展。自此之後，抗生素因價格便宜且容易取得，除了被廣泛地用在醫療相關的疾病管控上，也被大量地施用在畜牧養殖業(主要是添加至飼料中)，以達促進牲畜魚蝦生長及預防傳染病之目的(Van Boeckel et al., 2015)。

目前全球的抗生素使用超過一半以上都是用於動物用途，例如美國食用動物的抗菌劑銷售量為人類使用的四倍(Maron et al., 2013)。中國主要使用抗生素依序為巨環內酯類抗生素(macrolides)、乙內醯胺類抗生素( $\beta$ -lactams)、喹諾酮類抗生素(quinolones)、四環素類抗生素(tetracyclines)及磺胺類抗生素(sulfonamides)，人類和動物的抗生素使用量分別占 48%、52%(Zhang et al., 2015)。根據我國財政部關務署的統計資料庫顯示，106 年國內抗生素進口量由大至小為乙內醯胺類、四環素類、巨環內酯類、氨基苷類及磺胺類抗生素，其中人類和動物使用分別占 43%、57% (磺胺類抗生素不納入計算) (行政院財政部關務署，2018)。然而，抗生素無





法被人體或動物體完全代謝，大部分抗生素或其代謝物被排出體外，這些物質可能仍具有活性，而尿液和糞便可能作為農耕肥料，造成抗生素進入土壤中，並且在土壤或糞便中的代謝物可能重新轉換為母體化合物(Tolls, 2001; Qiao et al., 2012; Jechalke et al., 2014)。

台灣畜牧業時常坐落於農田區域(行政院農業委員會，2018)，現階段對於處理畜牧廢水的方式無法有效去除抗生素，若有施打抗生素可能成為沉積物與土壤的主要來源(Fang et al., 2018)。最後，抗生素通過地表逕流和滲透擴散至土壤、地表水及地下水(Kim et al., 2010)。另外，透過糞便直接施作於農地，發現夏季或冬季的抗生素濃度(喹諾酮類、四環素類、磺胺類及巨環內酯類抗生素；夏季與冬季的抗生素總濃度為 50.59 ng/g、112.44 ng/g)顯著高於果園(夏季與冬季的抗生素總濃度為 6.55 ng/g、24.86 ng/g)和自然保護區森林(夏季與冬季的抗生素總濃度為 2.1 ng/g、5.09 ng/g)的土壤，由於抗生素的濃度顯著受到人為活動強度的影響，並且隨著土壤深度的增加，而抗生素濃度逐漸降低(Zhao et al., 2018)。

抗微生物藥劑抗性(antimicrobial resistant, AMR)細菌的發生和傳播正擴散至全球，且危害到公共健康。近年來，世界衛生組織在關於抗菌藥劑抗藥性監測的第一份全球報告中指出在調查地區中常見而導致感染的細菌(例如大腸桿菌，肺炎克雷伯桿菌，金黃色葡萄球菌)有很高的抗性率。由 AMR 細菌引起的感染與死亡率提高，導致住院時間延長及醫療成本增加，因此了解抗生素抗藥性在環境中傳播及如何影響人類就顯得相當重要。由人類和動物的微生物群為主要貢獻，其中治療性或預防性抗生素發揮其作用，腸道細菌從人類和動物糞便被引入到的環境中，人們可能通過在受污染的水體中活動、飲用受污染的水、藉由農作物或水產動物和吸入生物氣膠而暴露於這些細菌(Huijbers et al., 2014)。其次為醫院、長期護理設施、農場或擁擠的易受感染之個體並暴露於細菌交換區域。再來是廢水及廢水產生源的生物殘餘物，包括潟湖、污水處理廠或堆肥廁所，其中來自許多不同個體的微生物有機會混合交換遺傳基因物質。最後是土壤和地表或地下水環境，其中會與來自上述的微生物混合並與環境生物發生反應。而水是這些傳輸途徑的關鍵因素，尤其是土壤和地表或地下水環境(Baquero et al., 2008)。

水環境被認為是自然界中的保存庫，也是相關抗生素抗藥性傳播的途徑(Michael et al., 2013)，因為飲用水是由地表水產生，而且也是自然細菌生態系統中引入抗性基因的途徑。在這樣的系統中，非致病細菌可以作為抗性基因的儲庫。在中低發展中的國家無法控制高度的抗生素使用量，因此，大量的抗生素最終出現在水環境系統中。而且抗生素通過消化系統約 50-90%經由人或動物的尿液或糞便被排出。為了在高濃度的抗生素環境中生存，細菌已經形成了許多不同的



ARGs，其中許多是容易通過水平基因轉移在細菌中交換傳輸的抗性基因。由於易感菌株被殺死，但也讓抗性菌得以生存，並且在廢水中會增加抗性病原體的生存機會。人和動物的致病性和潛在致病性細菌隨著廢水釋放到水環境中，這些細菌中都含有許多的抗生素抗性基因，最終能嵌入於水和土壤細菌群落中傳播的MGEs。此外，重金屬抗微生物劑、洗滌劑、消毒劑和工業污染殘留物在累積及流入至環境中有助於抗性菌在水環境中的進化和擴散(Alonso et al., 2001; Baquero et al., 2008)。

人口與城市化快速的發展，增加了對區域水資源的需求，隨著淡水供應的減少，使用廢水灌溉農田的概念已經慢慢的在全球展開。因此，利用廢水灌溉農業系統可能是抗性菌與抗性基因傳播到環境中強而有力的途徑，尤其對發展中國家使用廢水灌溉就有急需評估的必要，包括檢測都市農業廢水中抗性的傳播潛力；污染廢水中抗性致病菌的種群分析，以及通過對水和食物鏈在人類和動物間的傳播(Bougnom and Piddock, 2017)。水資源的短缺也攸關人類對飲用水的需求，人們紛紛提出非水回收再利用的觀念，全球也慢慢地推動水再利用等措施的基礎設施。然而，人們越來越擔心廢水流出物中富含的抗生素、抗生素抗性細菌和抗生素抗性基因。有必要研究以了解水生環境作為抗生素抗藥性擴散的途徑、機制以及對人類抗藥性感染的影響。因此，水再利用標準主要面向保護公共衛生免受病原體的影響，並監測直接或間接與被處理廢水發生相關的參數(Paranychianakis et al. 2014)。

## 2.6 環境因素在人體暴露於 ARG 途徑所扮演的角色

已有許多研究指出環境介質對於抗性基因發展與傳播上的重要性，包括水域環境 (Baquero et al., 2008; Marti et al., 2014; Martins et al., 2014; Pruden et al., 2012; Storteboom et al., 2010)、生物膜 (Engemann et al., 2008; Schwartz et al., 2003)、土壤與底泥 (Chen et al. 2013; Cummings et al., 2011; Yang et al., 2013)等都是抗性基因的重要儲區，尤其是在農業活動附近的區域 (McEachran et al., 2015; Pruden et al., 2012)。抗性菌可經由大氣與水往外傳播(Chapin et al., 2005; Gibbs et al., 2006; Rule et al., 2008)，藉此將抗性基因轉運到其他地區；假使在這些地區有選擇性和共選擇性的物質存在與作用時，將有可能進一步提高抗性基因的含量。。

這些在特定環境中的抗性基因總量(即所謂的 environmental resistome)如增加到某種程度，將會讓這些基因轉移進致病菌細胞內的機率大幅上升，而當這些致病菌被賦予更多、更強大的抗性能力時，最終將使得這些致病菌在接觸人體後所





帶來的呼吸、消化、泌尿等系統的感染極難或根本無法治療的慘況。目前已有證據顯示臨床上某些相關的抗性基因的確是源自於環境中的微生物(Wright 2010)，且環境系統確實是抗藥性基因最大的儲庫(reservoirs)，特別是土壤環境(Aminov and Mackie, 2007; Eisen 2007)，其中尤以與「外排泵」(efflux pumps)此等抗性機制相關的基因為最常見的抗性基因，而且如此豐富、多樣的抗性基因並非是隨機地出現/分佈在環境系統中(Nesme et al., 2014)。

人類暴露於抗性菌的途徑非常複雜。有幾種途徑可以增加抗性菌和抗性基因的環境儲藏量，從而影響人類健康。目前公認的途徑包括食物、人與人的接觸，以及與農場動物的直接接觸。舉例來說，人類可因暴露於對抗生素具有抗藥性的人畜共患病原體(不適用於人與人之間的傳播)而被感染(Chang et al., 2014; McEwen 2012; Travers and Barza, 2002)。人畜共患病原體直接轉移的已知事件包括每年因沙門氏菌(*Salmonella*)和曲狀桿菌(*Campylobacter*)等病原體導致的數百萬例食源性胃腸道疾病(Scallan et al., 2011)；在這種情況下，由於缺乏人與人之間的轉移，這種疾病是自限性的。相比之下，抗性基因也可以轉移到能夠人與人之間傳播的細菌中。一些細菌，例如耐萬古黴素的腸球菌(vancomycin-resistant enterococci, VRE)可以作為動物和人類的病原體，一旦它們越過物種壁壘，可能導致人類持續患病(Lipsitch et al., 2002)。但即使起源於動物的非致病細菌也可能是人類微生物組中抗性基因的來源，隨後可能在生物物種間傳播。

至於未探索的暴露途徑包括非直接的職業接觸，例如在有肥料和/或再生水應用的田地裡進行農場作業，以及空氣，土壤和水中的環境暴露。這些基質中存在抗性基因，因此需要通過環境途徑進行更多的研究。

由此可知，即使目前與醫療領域相比(即臨床及獸醫場所)，「一般環境」此因子對於造成人體受到抗性菌與抗性基因的暴露程度仍有待進一步的量化，但這些研究結果反映出環境系統在抗生素抗性病原體的傳播與進化扮演著關鍵的角色，因此深入了解現階段特定容易造成人體暴露的環境系統的總抗性基因量、這些抗性基因如何出現/流入在此環境系統，以及在何種環境/生態條件下、藉由何種機制讓這些基因轉移至病菌體等資訊，對於抗生素及其他造成共選擇壓力的化學品的管理，甚或是新型態抗生素的開拓皆至關重要(Huijbers et al., 2015)。

事實上，針對「環境維度」(environmental dimensions)在全球抗藥性發展所帶來的衝擊研究上，學者們已指出四個迫切需要的關鍵領域：(1)不同來源的抗生素與抗性菌對於環境中的抗藥性發展的相對貢獻；(2)人為擾動對抗藥性在環境演化所造成的作用；(3)人體與動物暴露於環境中的抗性菌後的整體健康影響；(4)不同的技術、社會、經濟與行為上的干預措施對減輕環境抗生素抗藥性的功效及可行



性 (Larsson et al., 2018)。但不論如何，有鑒於環境中抗藥性的發展除非是受到製藥廠廢水所殘留的高濃度抗生素的影響，大部分都源自於出流水中所夾帶的抗性菌與抗性基因所造成(Karkman et al., 2019)，現階段我們可以採取的措施包括：(1)減少環境細菌中抗性基因向人類病原體的傳播，(2)減少通過食品，廢物和水向人和動物傳播的抗性細菌，並(3)儘量減少抗生素和抗藥性細菌的水平引入環境(Canton 2009)。而如欲減少以上這種風險，則必須立即改善對含有抗生素殘留和抗性菌與抗性基因的廢水/廢棄物管理(Bengtsson-Palme et al., 2018)。

## 2.7 農業行為對於環境抗生素抗性發展的影響

根據約翰霍普金斯大學宜居未來中心(Center for a Livable Future)的數據，每年約有 330 萬公斤的抗生素用於人類醫學。 抗生素在人體內的使用通常由醫生監管，並規定以「治療劑量」(therapeutic doses)治療感染，這種劑量設計為不會導致耐/抗藥性的擴散。 然而，每年卻有多達 1300 萬公斤的抗生素用於動物，其目的是為了促進牲畜的生長以及治療感染(包括家畜、家禽以及水產養殖)。 因此，這些藥物中的許多都是以「亞治療劑量」(subtherapeutic doses)給予的，這可以使含有耐/抗藥基因的細菌受益。 少量抗生素的存在會導致「直接選擇性壓力」(direct selective pressure)，這意味著它將選擇能夠抵抗抗生素(或對其有利)的細菌。

具有抗藥性的病原體和抗性基因從動物傳到人的轉移可通過以下途徑發生：

- (1) 直接傳染。 與動物相關的抗性菌可以直接轉移到動物飼養者和屠宰場工人。 在荷蘭已有耐萬古黴素腸球菌(VRE)轉移到家禽養殖者的案例記載(Andersson and Hughes, 2010)，也有耐氟喹諾酮(fluoroquinolone-resistant)的大腸桿菌轉移到家禽養殖者 (van den Bogaard et al., 2001)，以及抗青黴素金黃葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA)向豬農的傳播等案例(Voss et al., 2005)。
- (2) 環境傳染。 具有抗藥性的細菌可能會從農場中轉移到周圍的環境中，進而影響人體健康。 例如靠近耕地和牲畜與 MRSA 感染增加有關。
- (3) 商業食品供應傳染。 食源性病原體(如沙門氏菌)獲得了抗生素抗性後對人們構成巨大威脅。

Silbergeld 等人(2008)的調查顯示，由於氟喹諾酮類藥物(fluoroquinolones)被許可用於家禽和家畜，對這些藥物產生抗藥性的 *Campylobacter jejuni* 病原體從臨床被分離出的百分比有所增加。 另外 Dutil 等人 2010 年的研究顯示，當農民自願停用抗生素後，抗藥性百分率急劇下降。 其原因可能是當用來提供抗藥性的基因對於細菌的生存不再是必要時，細菌攜帶此基因的「成本」(稱為適應性成本，fitness cost)可能會使細菌傾向將該基因放手以讓負擔減緩而讓生存更為有利。 雖



然這結果是令人鼓舞的，因為它表明在某些情況下抗生素耐藥性增生可以減緩甚至逆轉， 但有其他證據表明，攜帶基因的適應性成本有時可以忽略不計，這使得還需要有更多這方面的研究已確定通則。

## 2.8 畜牧業與抗生素之關係

在畜牧業中，抗生素的功效是促進生長、用於治療或預防家畜或家禽之間的疾病。常見的動物用抗生素包括  $\beta$ -內醯胺類、大環內酯類、磺胺類、動物用四環素類、氨基糖苷類及其他種類的抗生素，而這些抗生素也可以運用在其他動物身上，有些甚至可以使用在人類身上。隨著抗生素的廣泛運用，用於禽畜身上的抗生素，大約有 17~75%的劑量，將隨著禽畜的尿液及糞便排出體外，最終進入污水處理廠中，或是直接製成肥料施用於農業用地並且存在土壤中(Chee-Sanford et al., 2009)。

若將施用於畜牧業的抗生素也可用於人類身上的話，環境中將會有某些對人類可以致病的細菌，可能透過施用於作物上以禽畜糞便製成的肥料中獲取抗性基因，造成人類健康危機。因此，歐盟不僅嚴格控管抗生素的使用量，更是研發出動物用的抗生素與人類使用的抗生素區隔開，避免人畜共用的抗生素衍生出的問題。同樣地，在 2015 年時，我國行政院農委會已全面禁止使用人畜共用的抗生素施用於畜牧業上，以動物用的抗生素取而代之，如安痢黴素(apramycin)、阿美拉黴素(avilamycin)、培可黴素(bicozamycin)、恩黴素(enramycin)、富樂黴素(flavomycin, 又稱 bambermycin)、六肽黴素(nosiheptide)、磺胺二甲嘧啶(sulfamethazine)、泰妙素(tiamulin)，並且訂定藥物使用規範，來減少此類問題。

在台灣，針對畜牧業的禽畜糞便中的抗生素含量及抗性基因的研究，僅僅對常見的抗生素，如四環素類、磺胺類、 $\beta$ -內醯胺類、大環內酯類等做調查，對於其他動物用的抗生素並沒有太多相關資訊。根據先前的文獻資料中，我們可以得知大環內酯類(macrolides)可以在豬、牛、雞的肉(Hurd et al., 2004)及糞便(Xie et al., 2018; Beukers et al., 2015)中發現其抗性基因及抗性菌菌株。同樣地，其他抗生素抗性基因也被發現存在在糞便之中。畜試所程梅萍等人針對新鮮豬糞、排放水、堆肥及施用養豬廢水之土壤等樣品中抗生素含量與四環素抗性基因分布所做的調查，即觀察到使用化肥之水稻田土壤抗藥性生菌數較施灌新鮮豬糞尿之水稻田少，且施灌豬糞尿水稻田土壤中抗四環素基因檢出數高於化肥組，以及養豬場環境樣品皆可檢出抗氯四環素(chlorotetracycline, CTC)菌株及抗四環素(tetracycline, TC)基因(程等人，2018)。





## 2.9 禽畜糞所製的有機肥料與抗生素、ARGs 之關係

畜牧廢水中含有高濃度的有機質以及植物所需的元素，相當於化學肥料年施用量中氮、磷、鉀素之 48 %、214 %與 100 %。而畜牧廢水若是沒有經過適當處理就排放至自然水體中時，廢水中所含有的養分就會導致水體優養化而影響生態。故將畜牧廢水製成有機肥料，幾乎是各國都在推行的一項資源再利用的政策。

畜牧廢水通過固液分離、厭氧處理與好氧處理及堆肥與污泥處理等步驟來處理，被分離出來的固體部分經過堆肥化作用後將其製成肥料，而肥料中含有低濃度抗生素以及抗性基因殘留的問題，這些將導致農業用地上的菌相改變或是產生抗生素抗性細菌(Heuer et al., 2011)。而肥料也可以提供有利於水平基因事件發生的營養物質和攜帶抗生素抗性基因的細菌生長。其中，第二階段的厭氧發酵所產生的沼氣則可以用來發電，為近年來政府所推行的沼氣發電。而厭氧發酵過後的沼渣沼液，可以直接施用於作物上，或是製成商業肥料。前者施用前必須向政府機關提出申請，而後者仍處於開發階段，未在市面上販售。對土地來說，施用有機肥料優於化學肥料。因為施用有機肥料不會造成土壤鹽鹼化，所以為了能讓土地長久使用，現今的作物大多會優先選擇有機肥料來使用。而有機肥料中可能會提供低劑量的抗生素及帶有抗生素抗性基因的移動遺傳因子給環境中的細菌，反覆且長期的施肥反而會造成土壤中的抗性基因的豐度增加，使得環境受到污染。

針對禽畜糞便在製成肥料所做的前處理方法中，國外的許多調查已觀察到如果是直接取自堆置於氧化池塘類的糞便，其所含的 ARGs 濃度並無法隨著堆置時間的長久而降低(Chen et al., 2010; Marti et al., 2014)；更關鍵的是，許多研究皆一再注意到堆肥處理是極佳顯著降低源自禽畜糞便的有機肥料中的 ARGs 濃度(Yu et al., 2005; Chen et al., 2007; Sharma et al., 2009; Selvam et al., 2012; Wang et al., 2012; Wang et al., 2015; Cheng et al., 2019;)，主要的原因在於堆肥屬於好氧處理，且過程中需經過穩定的高溫殺菌程序。高溫的重要性也反映在利用厭氧消化處理禽畜糞便以及廢水污泥上：相較於傳統中溫式的厭氧消化，高溫厭氧消化才能完善降低處理料源中的 ARGs (Diehl et al., 2010; Ma et al., 2011; Sui et al., 2016; Luo et al., 2017; Wallace et al., 2018)。處理不當的禽畜糞便有機肥也被觀察到將造成農作物抗性基因殘留濃度過高的現象(Wang et al., 2015)。這些研究結果某種程度說明若是從抗生素的殘留與抗藥性累積的角度來看，禽畜糞便的再利用前(包括沼渣沼液)應盡可能需要先經過堆肥或高溫厭氧消化處理，才不至於衍生後續的公衛與環境的問題。

舉例來說，未經處理的豬糞含有高濃度的抗生素與抗性基因(Binh et al., 2008)，也因此當這些糞肥重複施作於農地時，無意外地將導致抗生素及抗性基因的累積



(Sengeløv et al., 2003; Heuer et al., 2011; Tang et al., 2015)。而溫度雖然對於廢水污泥厭氧消化過程中的抗性基因的降解(或失活)有時並無實質助益(Zhang et al., 2015)，但針對牛糞的厭氧消化處理而言，Sun 等人(2016)發現高溫(55°C)確實比常溫(20°C)跟中溫(35°C)來的顯著有效，背後的原因可能與兩種生質廢棄物的理化特性、抗生素的類型和濃度，以及微生物群落組成等差異有關(Stasinakis 2012; Aydin et al., 2015)。作者進一步調查發現，抗性基因和細菌群落的變化在常溫和中溫的處理下相似，但與高溫系統中所觀察到的變化不同，而通過高熱消化可去除常溫和中溫仍存在的潛在病原體，因此歸納出細菌群落演替是影響厭氧消化過程中抗性基因和整合子(integrans)變化的主要機制。然而不僅抗性基因，Resende 等人(2014)也觀察到中溫操作下的厭氧消化對於去除牛糞中的抗性菌效果也不彰。值得一提的是，在 Wallace 等人(2018)的調查結果中除了呼應中溫厭氧消化對於抗性基因的降低並無實質幫助外，也觀察到抗生素濃縮富集在消化過後的固體殘渣，即使液體殘渣中的濃度是下降的。

除了牛糞外，Chen et al (2010)也顯示中溫厭氧消化及氧化塘保存法對於豬糞廢棄物所含的抗性基因幾無削減功效。Sui et al. (2013)藉由實場規模的中溫及常溫的豬糞尿廢水厭氧消化後發現，當所調查的抗性基因對 16S rRNA 基因標準化後，其豐富度除了無顯著變化外，就是反而被富集；而當這些被厭氧消化後的沼渣沼液施作在農地後，不論是以單位土壤重量或單位 16S rRNA 基因表現去衡量抗性基因的豐度，皆觀察到抗性基因在農地土壤的持效性。Tao 等人(2014)針對台灣養豬戶的豬糞尿廢水進行抗性基因於處理程序的調查結果也同樣發現，厭氧消化單元出流水中的抗性基因濃度較好氧處理單元的出流水為高。

相較於一般操作下的厭氧消化(高溫系統除外)，多數文獻已證實堆肥可有效降解抗生素以及抗性基因濃度(Sharma et al., 2009; Youngquist et al., 2016)，但前提是在堆肥的過程中，各個程序必須完整執行，特別是氧氣的通透、溫度的要求、以及時間的掌握。Zhu 等人(2013)針對原始豬糞、豬糞堆肥，以及施用豬糞堆肥的土壤所做的調查有幾個重要的發現：(1)只要是在飼養過程中有添加抗生素，豬隻所產的糞便中可測得的抗性基因總量，顯著高於未施打抗生素(即對照組)的豬隻糞便；(2)同樣地，施用抗生素飼養所得之糞便製成的堆肥其內的抗性基因量也高於對照組別的堆肥；(3)堆肥過程如有妥善/嚴謹操作，所測得的抗性基因量將低於原始糞便內的含量，除非過程中有上述因子的操作不當；(4)施用堆肥的土壤所測得的抗性基因量將少於或與原本堆肥含量持平。此結果也暗示堆肥的施用仍是存有風險。

同樣地，與氧化塘堆置法相比，堆肥可有效降解豬糞中的抗生素及抗性基因





濃度，說明糞肥在施用前的堆置與處理對於後續抗性基因在環境的傳播可能影響甚遠(Chen et al., 2007; Wu et al., 2011; Selvam et al., 2012; Wang et al., 2012; Wang et al., 2015; Wang et al., 2016)。Kim et al. (2012)發現豬糞在堆肥的過程中，chlortetracycline (CTC), sulfamethazine (SMZ), and tylosin (TYL)等抗生素的濃度可以顯著降低。然而，即使堆肥相對有效，但並非對於所有抗性基因皆有削減效應，例如在 Cheng 等人(2019)隨著堆肥程序所做的調查發現，雖然 tetracycline 與 fluoroquinolone 的抗性基因量隨著堆肥程序的演進而下降，但針對 sulfonamide 的抗性基因濃度反而上升；作者藉由統計分析對肥時諸如碳氮比、濕度、pH 值、通氣量等的操作與環境因子皆能顯著影響最終的抗生素與抗性基因的去除率。

值得注意的是，過去在探討施用有機肥料於農業土壤中可能的抗生素抗藥性的發展潛勢時，多著重在 transformation 這項微生物水平基因轉移的機制，病毒在此環境系統的水平基因轉移所扮演的角色著墨甚少。但近期已有文獻報導只要是施用有機肥料的農地，不論肥料的產源來自動物糞便或是廢水污泥，皆可於土壤中採集到含高量抗性基因的噬菌體(即僅會感染細菌的病毒)，暗示 transduction 此水平基因轉移機制也需納入風險評估的探討範疇(Ross and Topp, 2015; Debroas and Siguret, 2019)。此結果除了凸顯環境與公衛問題的複雜性外，也說明有機農業的低污染/低風險的價值。



## 第三章 研究方法

本研究主要擬分成兩部分進行調查與試驗，分別為：(1)普查市面販售之有機肥料與沼渣沼液的抗生素抗性基因含量，以比較沼渣沼液所具有的抗生素抗藥性潛勢是否顯著高於有機肥；以及(2)將經分析後的肥料與沼渣沼液藉由土壤縮模試驗探討抗生素抗性量隨時間在不同土壤位置的宿命，以得知在一般施作條件下具肥分之土壤與其他土壤相比，抗生素抗藥性含量之差異。由於常見的畜牧用抗生素類別包括 $\beta$ -內醯胺類、大環內酯類、磺胺類、氨基糖苷類等，因此本期計畫將針對 $\beta$ -lactams, macrolides, sulfonamides, streptomycin 以及人畜共用的 tetracycline 等抗生素所對應的諸如 *bla*TEM, *bla*CTX-M, *bla*SHV; *erm*(F), *erm*(B); *sul*(I), *sul*(II); *tet*(O), *tet*(W), *tet*(M), *tet*(A)等 ARG 進行量化外，也會同時量化與多重抗藥性相關的第 1 類整合子(class 1 integrons)的基因(*intI1*)，以及 16S rRNA 基因。

### 3.1 肥料的選取

商業有機肥料的選取乃是根據農糧署所公告的 108 年國產有機質肥料品牌推薦名單中，依禽畜糞堆肥、植物渣粕肥料以及不含禽畜糞的雜項堆肥等分類挑選出幾種產品進行抗性基因、營養鹽、重/類金屬等進行分析。另外，由於許多市售的堆肥其禽畜糞便乃為混雜多種牲畜的糞便，因此除了挑選在推薦名單上已明確標示糞便種類的堆肥外，也致電堆肥的原生產單位進行確認後決定。沼液沼渣則是與地方縣市環保與農政當位聯繫後，在其承辦人員的帶領下至畜牧場（養豬場與養牛場）的紅泥膠皮沼氣袋儲存槽採集（圖 3-1）。所取得的樣品在分析前都先保存在-20 或-80°C 的冷凍庫中，待分析時解凍處理。



圖 3-1 沼液沼渣採樣



## 3.2 抗性基因相關分析

### (1) DNA 萃取

本研究將使用 DNeasy Power Lyzer Power Soil Kit (Qiagen, Germany)之套組進行樣品之 DNA 萃取。取一定量體積之樣品至含有 0.1 mm 玻璃珠的 Power Bead Tube 中，添加 Power Bead Solution 再加入 SDS 溶液，利用 Mini Bead Beater 震盪數秒達到細胞破裂，之後依照套組標準步驟進行固液分離，去除樣品中有機質與無機質干擾，再利用乙醇溶液去除矽膠膜上的鹽類及其他雜質，最後加入洗脫液 (10 mM Tris)使矽膠膜上的 DNA 脫附，將得到約 100  $\mu$ L 的 DNA 樣品，保存於-80°C 冷凍櫃，待後續的分子生物實驗使用。DNA 定量使用分光光度計 A260/A320 得到 DNA 的濃度，A260/A230 及 A260/A280 評估 DNA 純化程度。

### (2) 目標基因標準品製備—基因擴增與純化

本計畫將於桃園地區的某養豬場採集豬排泄物，從排泄物中經由基因萃取，再將其基因片段作為後續基因定量標準品使用，萃取後通過聚合酶連鎖反應 (Polymerase chain reaction, PCR)和凝膠電泳定性與純化目標基因。PCR 試劑分別為(表 3-1)：GoTaq® Green Master Mix, 2X (12.5  $\mu$ L)、10  $\mu$ M FW 和 RV 引子各 1.25  $\mu$ L (PCR 反應物、引子設計參照張智聖論文 2019)、DNA 模板，最後用無核酸試劑水稀釋至 25  $\mu$ L。進行 PCR 反應條件：初始變性 94°C，2 分鐘；然後進行 94°C，30 秒，35 個循環；退火溫度參照張智聖論文 2019；延伸展 72°C，30 秒；最終延伸步驟在 72°C 下 5 分鐘。將 PCR 反應後的產物與 DNA 染劑(5  $\mu$ L)混合注入至 25%的凝膠(25%瓊脂糖凝膠配製：2.5 克的凝膠粉末溶於 100 mL 0.5X TAE Buffer，微波加熱 90 秒待冷卻，冷卻至適當溫度後加入 100  $\mu$ L EtBr 並混合均勻，接著倒入模具冷卻至凝固)，在電泳操作條件下 120 伏特 60 分鐘的電泳程序進行 16S rRNA gene、目標抗性基因和 *intI1* 的定性與純化。利用利用 Gel Doc™ XR + imager (Bio - Rad, US)觀察亮帶位置，與 DNA 標準片段(DNA marker)比對位置以確認亮帶是否為目標基因。

表 3-1 PCR 反應物配製

試劑名稱	配製體積
GoTaq® Green Master Mix, 2X	12.5 $\mu$ L
Forward Primer, 10 $\mu$ M	1.25 $\mu$ L
Reverse Prime, 10 $\mu$ M	1.25 $\mu$ L
DNA template	依實驗需求而定
添加無核酸試劑水至體積 25 $\mu$ l	



使用 UV 照膠系統確認目標基因的位置，將含有目標基因的凝膠進行切膠，並依照 Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, US) 套組之標準步驟進行 DNA 純化。添加 Membrane Binding Solution 於裝有目標基因凝膠之微量離心管中，於 65°C 待凝膠完解融化，將融化的凝膠倒入裝有 SV Minicolumn 的收集管，以 16000 xg 離心且廢棄液體，添加 Membrane Wash Solution 清洗 SV Minicolumn，經離心後轉移 SV Minicolumn 至乾淨的微量離心管，最後加入 Nuclease-Free Water 洗脫 DNA，離心後保存含有洗脫液的離心管，待後續 TA 克隆使用。

### (3) 目標基因標準品製備—TA 克隆與檢量線製備

將確認的 16S rRNA gene、目標抗性基因和 *int1* 利用 pGEM®-T Easy Vector System I (Promega, US) 進行質體接合與克隆，將克隆的試劑與目標基因進行混合 (參考表 3-2，質體與純化後的目標基因大約 1:10)，隔夜培養於 4°C，然後以水浴 42°C 之熱休克法將轉化混合溶液轉化到勝任細胞細胞 (DH5 Alpha Competent Cells (Protech, Taiwan)) 中，之後將升任細胞加到 SOC 培養液，在 37°C 150 rpm 震盪培養 1.5 小時，隨後將細胞培養在含有 Ampicillin、X-gal 與 IPTG 的 LB 固態培養基上培養進行藍/白篩選 (表 3-3)。培養 12 小時後，將白色的菌落培養至含有 Ampicillin 的 LB 液態培養基，根據 QIAprep™ Spin Miniprep Kit (QIAGEN) 套組之標準步驟萃取細胞的質體，再次通過 PCR 步驟以驗證勝任細胞的質體是否含有目標基因。若欲保存含有目標基因的大腸桿菌，與 30% 甘油混合，保存在 -80°C。接著使用 nanodrop 測定純化的質體 DNA 的濃度，通過 10 倍系列稀釋將 DNA 萃取物製備不同濃度範圍的標準品，以 qPCR 方法進行絕對定量，製備標準曲線 (Standard curves) 以定量 16S rRNA gene、抗性基因和 *int1*。本研究所製備的檢量線判定係數 > 0.995，擴增效率為 90% - 110%。

**表 3-2 TA 克隆反應試劑配製**

反應試劑名稱	配製體積
2X Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5 µL
pGEM®-T Easy Vector (50 ng)	1 µL
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl)	1 µL
PCR product	依實驗需求而定
添加無核酸試劑水至體積 10 µl	





#### (4) 目標基因定量

本研究使用 CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, US) qPCR 測定 16S rRNA、抗性基因和 *int11* 的基因量。於反應管添加 iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, US) (10 µL)、10 µM FW 和 RV 引子各 0.4 µL 和 DNA 模板(1 µL)，最終加入無 DNA 試劑水至 20 µL (參考表 3-4)。每次樣品實驗都包含負對照組以及正對照組。qPCR 操作條件為 95°C，5 分鐘變性；然後進行 95°C，15 秒，40 個循環(*tetA*：35 個循環) (參考表 3-5)；引子黏合和延伸 72°C，30 秒。解離曲線(Melting curve)在每次實驗後分析以確定目標基因與引子的專一性。單位表示有絕對濃度(copies/L)，代表每單位之體積中含有的基因量；另一個表示方式為相對濃度(ARGs copies/16S rRNA gene copies)，將 16S rRNA gene 標準化(Normalization)用以去除菌數干擾，其表示方式也可解釋為單位活菌中含有 ARGs 的量。每次的採樣樣品皆分析三重複。分子序列與擴增子大小示於表 3-6。

**表 3-3 LB—藍白篩培養基配製**

藥品名稱	配製濃度
Tryptone	10 g/L
Yeast extract	5 g/L
NaCl	5 g/L
Agar	15 g/L
Ampicillin	100 mg/L
X-gal–IPTG Ready Solution (32 mg/mL X-gal, 40 mg/L IPTG)	1 mL/L

**表 3-4 qPCR 反應物配製**

試劑名稱	配製體積
iQ™ SYBR® Green Supermix, 2X	10 µL
Forward Primer, 10 µM	0.4 µL
Reverse Prime, 10 µM	0.4 µL
DNA template	依實驗需求而定
添加無核酸試劑水至體積 20 µl	



表 3-1 PCR 與 qPCR 操作條件

種類	基因名稱	初始變性溫度 (PCR/qPCR)	變性溫度 (PCR/qPCR)	PCR(35 個循環)/qPCR(40 個循環)		最終擴增溫度 (PCR/qPCR)
				黏合溫度 (PCR/qPCR)	擴增溫度 (PCR/qPCR)	
Housekeeping	16S rRNA gene			59°C, 30 sec/ 65°C, 30 sec	72°C, 30 sec/ 72°C, 30 sec	
Tetracycline	<i>tetA</i>			55°C, 1 min/ 65°C, 30 sec	72°C, 30 sec/ 72°C, 30 sec	
	<i>tetM</i>			55°C, 30 sec/ 55°C, 30 sec	72°C, 30 sec/ 72°C, 30 sec	
	<i>tetO</i>			60°C, 30 sec/ 55°C, 30 sec	72°C, 30 sec/ 72°C, 30 sec	
	<i>tetW</i>			60°C, 30 sec/ 61.4°C, 30 sec	72°C, 30 sec/ 72°C, 30 sec	
	<i>sul1</i>			55.9°C, 30 sec/ 65°C, 30 sec	72°C, 30 sec/ 72°C, 30 sec	
Sulfonamide	<i>sul2</i>	95°C, 2 min/ 95°C, 5 min	95°C, 30 sec/ 95°C, 15 sec	60.8°C, 30 sec/ 65°C, 30 sec	72°C, 30 sec/ 72°C, 30 sec	72°C, 5 min/ none
Beta-lactam	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>			60.5°C, 30 sec/ 61.4°C, 30 sec	72°C, 30 sec/ 72°C, 30 sec	
	<i>bla<sub>SHV</sub></i>			65°C, 30 sec/ 61.4°C, 30 sec	72°C, 30 sec/ 72°C, 30 sec	
	<i>bla<sub>TEM</sub></i>			62.5°C, 30 sec/ 61.4°C, 30 sec	72°C, 45 sec/ 72°C, 30 sec	
	<i>ermB</i>			60°C, 30 sec/ 61.4°C, 30 sec	72°C, 45 sec/ 72°C, 30 sec	
	<i>ermF</i>			56°C, 30 sec/ 61.4°C, 30 sec	72°C, 45 sec/ 72°C, 30 sec	
Mobile genetic element	<i>intI1</i>			57°C, 30 sec/ 60°C, 30 sec	72°C, 30 sec/ 72°C, 30 sec	

表 3-6 分子序列與擴增子大小

種類	基因名稱	引子序列	擴增子大小(bp)	參考文獻
Housekeeping	16S-rRNA gene	FW GGGTTGCGCTCGTTGC	60	(Zhu et al., 2013a)
		RV ATGGYTGTCGTCAGCTCGTG		
Tetracycline	<i>tetA</i>	FW GCTACATCCTGCTTGCCTTC	210	(Ng et al., 2001b)
		RV CATAGATCGCCGTAAGAGG		
	<i>tetM</i>	FW ACAGAAAGCTTATTATATAAC	171	(Aminov et al., 2001a)
		RV TGGCGTGTCTATGATGTTTAC		
	<i>tetO</i>	FW ACGGARAGTTTATTGTATACC	171	(Aminov et al., 2001a)
		RV TGGCGTATCTATAATGTTGAC		
Sulfonamide	<i>tetW</i>	FW GAGAGCCTGCTATATGCCAGC	168	(Aminov et al., 2001a)
		RV GGGCGTATCCACAATGTTAAC		
	<i>sul1</i>	FW CGCACCGGAAACATCGCTGCAC	163	(Pei et al., 2006)
		RV TGAAGTTCCGCCGCAAGGCTCG		
	<i>sul2</i>	FW TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG	191	(Pei et al., 2006)
		RV CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG		
Beta-lactam	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	FW CTATGGCACCACCAACGATA	103	(Marti et al., 2013)
		RV ACGGCTTTCTGCCTTAGGTT		
	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	FW CGCTTTCCCATGATGAGCACCTTT	110	(Xi et al., 2009a)
		RV TCCTGCTGGCGATAGTGGATCTTT		
	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	FW GCKGCCAACTTACTTCTGACAACG	247	(Xi et al., 2009a)
		RV CTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTA		
MLSB	<i>ermB</i>	FW GAATCGAGACTTGAGTGTGCAA	71	(Alexander et al., 2015)
		RV GGATTCTACAAGCGTACCTT		
	<i>ermF</i>	RV ATGGTCTATTTCAATGGCAGTTACG	309	(Chen et al., 2007)
		FW CGACACAGCTTTGGTTGAAC		
Mobile genetic element	<i>intI1</i>	RV GGACCTACCTCATAGACAAG	148	(Luo et al., 2010)
		FW GGCTTCGTGATGCCTGCTT		
		RV CATTCCTGGCCGTGGTTCT		



### 3.3 化學分析與土壤質地分析

#### 3.3.1 肥料有機質含量(燃燒法)

- (1) 將肥料以 10 mesh 過篩使其粒徑 $< 2\text{ mm}$  後，取約 2 g 陰乾。
- (2) 取乾淨的坩鍋和鍋蓋以  $900 \pm 5^{\circ}\text{C}$  空燒後，將其移置烘箱以  $105 \pm 5^{\circ}\text{C}$  烘乾 1 hr，然後移置乾燥器冷卻 45 min 後，秤重(標示為  $m_0$ )。
- (3) 取 1 g 肥料置入坩鍋中，秤重(標示為  $m_1$ )後放入烘箱，以  $105 \pm 5^{\circ}\text{C}$  烘乾 16~24 hr 後，移到乾燥器冷卻 45 min，秤重(標示為  $m_2$ )，需乾燥到恆重。
- (4) 將此乾燥後含樣品之坩鍋移置高溫爐，以  $550 \pm 5^{\circ}\text{C}$  加熱 2 hr 後取出，放置乾燥器冷卻 45 min，秤重(標示為  $m_3$ )。
- (5) 利用公式底下公式求得肥料有機質含量，以重量百分比(%，w/w)表示：

$$\text{有機質含量(\%)} = (m_2 - m_3) \div (m_2 - m_0) \times 100\%$$

#### 3.3.2 肥料重金屬檢測(王水消化法)

此法讓肥料樣品以鹽酸和硝酸混合，在室溫下靜置萃取 16 hr，再加熱至沸騰並迴流 2 hr，所得消化液稀釋至適當體積後，以火焰式原子吸收光譜儀(FAAS)進行分析。

- (1) 為使樣品均勻化、增加表面積及提高反應效率，將樣品再研磨使通過 0.150 mm 篩網(100 mesh)。
- (2) 稱取適量已均勻化樣品，依照「土壤及底泥水分含量測定方法—重量法(NIEA S280)」測定水分含量。
- (3) 另取已均勻化樣品約 2 g (精秤至 1 mg)，置於反應瓶中。以 0.5 至 1.0 mL 試劑水潤濕樣品避免揚塵發生。
- (4) 緩慢加入 14 mL 濃鹽酸，再慢慢加入 4.6 mL 濃硝酸，搖盪使充分混合均勻，封上兩層石臘膜(parafilm)避免酸氣逸散。
- (5) 於冷凝管中加入 15 mL 的 0.5 M 硝酸溶液，將冷凝管及反應瓶依圖一方式組裝。在室溫下靜置此裝置 16 hr，可適時將反應瓶搖晃使充分反應，反應瓶中會附著許多的黃棕色酸性液體。



- (6) 緩慢加熱溶液至迴流溫度，使溶液在沸騰狀態下維持約 2 hr。加熱程度需能使迴流區段維持在冷凝管高度之三分之一以下。
- (7) 消化樣品經冷卻至室溫後，將溶液經由冷凝管加入反應瓶中，以約 10 mL 0.5 M 硝酸溶液沖洗吸收管及冷凝管，並收集於反應瓶中。
- (8) 將反應瓶中溶液利用濾紙過濾倒入 100 mL 量瓶，剩下無法倒入的黏稠溶液以 0.5 M 硝酸溶液沖洗，並將過濾收集消化液倒入於 100 mL 定量瓶中。
- (9) 消化液以 AAS 定量分析。

### 3.3.3 肥料總氮與總磷檢測

肥料樣品經上述的王水消化後，總氮濃度利用 Shimadzu 總有機碳分析儀 (TOC-LCSH) 的總氮檢測儀定量，總磷濃度的分析則利用離子層析儀測定 (Dionex ICS-1100)。

### 3.3.4 抗生素萃取與分析

#### 肥料之抗生素前處理(萃取)程序

秤取 1 g 預先以 105°C 烘箱烘至恆重的肥料樣品置於 50 mL 離心管中，添加 4 mL 含有 5 mM EDTA 的 50% 甲醇，以 vortex 均勻混和 10 s 後，以超音波震盪槽震盪 45 min，並以 6000 rpm 離心 20 min 取出上清液至 15 mL 離心管中。再將添加的萃取液更換為 2 mL 含有 0.1 M EDTA 的 Mcilvaine buffer (pH 4)，重複 Mcilvaine buffer 步驟 2 次，最終萃取液總體積為 8 mL，以 vortex 將其均勻混和 10 s 後，取 1.5 mL 萃取液至 1.5 mL 離心管中以 14000 rpm 離心 2 min，取出上清液通過 0.22  $\mu$ m PVDF 濾膜過濾至棕色玻璃 vial 瓶中以便後續使用 LC-MSMS 分析。流程圖請見圖 3-2。

#### 抗生素 LC-MSMS 分析程序

使用高效液相層析串聯式質譜儀 (HPLC-MS/MS) 檢測萃取液與沼液中的氯四環素 (chlorotetracycline, CTC)、氧四環素 (oxytetracycline, OTC) 和四環素 (tetracycline, TC) 等四環類抗生素，以及磺胺吡啶 (sulfapyridine, SP)、磺胺嘧啶 (sulfadiazine, SDZ)、磺胺甲噁唑 (sulfamethoxazole, SMX) 和磺胺二甲嘧啶



(sulfamethazine, SMZ)等磺胺類抗生素，液相層析儀使用層析管柱為 Dionex - Acclaim 120 C18 column, 3  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  150 mm，以 100%乙腈及 0.1%甲酸進行等梯度沖提(30%：70%)。進樣體積為 200  $\mu\text{L}$ 。串聯式質譜儀為正離子電噴灑模式，Spray voltage 為 3300 V，Vaporizer temperture 為 350 $^{\circ}\text{C}$ ，Sheath gas pressure 為 30 psi，Aux gas pressure 為 5 arb，Capillary temperture 為 200 $^{\circ}\text{C}$ ，而每種抗生素的偵測條件則如表 1 所示，CTC 定量離子對為  $m/z$  479  $\rightarrow$   $m/z$  444，定性離子對為  $m/z$  479  $\rightarrow$   $m/z$  154；OTC 定量離子對為  $m/z$  461  $\rightarrow$   $m/z$  426，定性離子對為  $m/z$  461  $\rightarrow$   $m/z$  337；TC 定量離子對為  $m/z$  445  $\rightarrow$   $m/z$  410，定性離子對為  $m/z$  445  $\rightarrow$   $m/z$  154；SP 定量離子對為  $m/z$  250  $\rightarrow$   $m/z$  92，定性離子對為  $m/z$  250  $\rightarrow$   $m/z$  108；SDZ 定量離子對為  $m/z$  251  $\rightarrow$   $m/z$  92，定性離子對為  $m/z$  251  $\rightarrow$   $m/z$  108；SMX 定量離子對為  $m/z$  254  $\rightarrow$   $m/z$  108，定性離子對為  $m/z$  254  $\rightarrow$   $m/z$  92；SMZ 定量離子對為  $m/z$  279  $\rightarrow$   $m/z$  186，定性離子對為  $m/z$  279  $\rightarrow$   $m/z$  108。參數詳列於表 3-7。

表 3-7 MS 偵測各抗生素的參數

化合物	監測過渡離子( $m/z$ )	碰撞能量(V)
TC	(445 $\rightarrow$ 410) <sup>a</sup>	17
	(445 $\rightarrow$ 154) <sup>b</sup>	17
OTC	(461 $\rightarrow$ 426) <sup>a</sup>	13
	(461 $\rightarrow$ 337) <sup>b</sup>	42
CTC	(479 $\rightarrow$ 444) <sup>a</sup>	5
	(479 $\rightarrow$ 154) <sup>b</sup>	28
SP	(250 $\rightarrow$ 92) <sup>a</sup>	26
	(250 $\rightarrow$ 108) <sup>b</sup>	21
SDZ	(251 $\rightarrow$ 92) <sup>a</sup>	30
	(251 $\rightarrow$ 108) <sup>b</sup>	30
SMX	(254 $\rightarrow$ 108) <sup>a</sup>	16
	(254 $\rightarrow$ 92) <sup>b</sup>	23
SMZ	(279 $\rightarrow$ 186) <sup>a</sup>	18
	(279 $\rightarrow$ 108) <sup>b</sup>	17

\*a：用於定量；b：用於定性



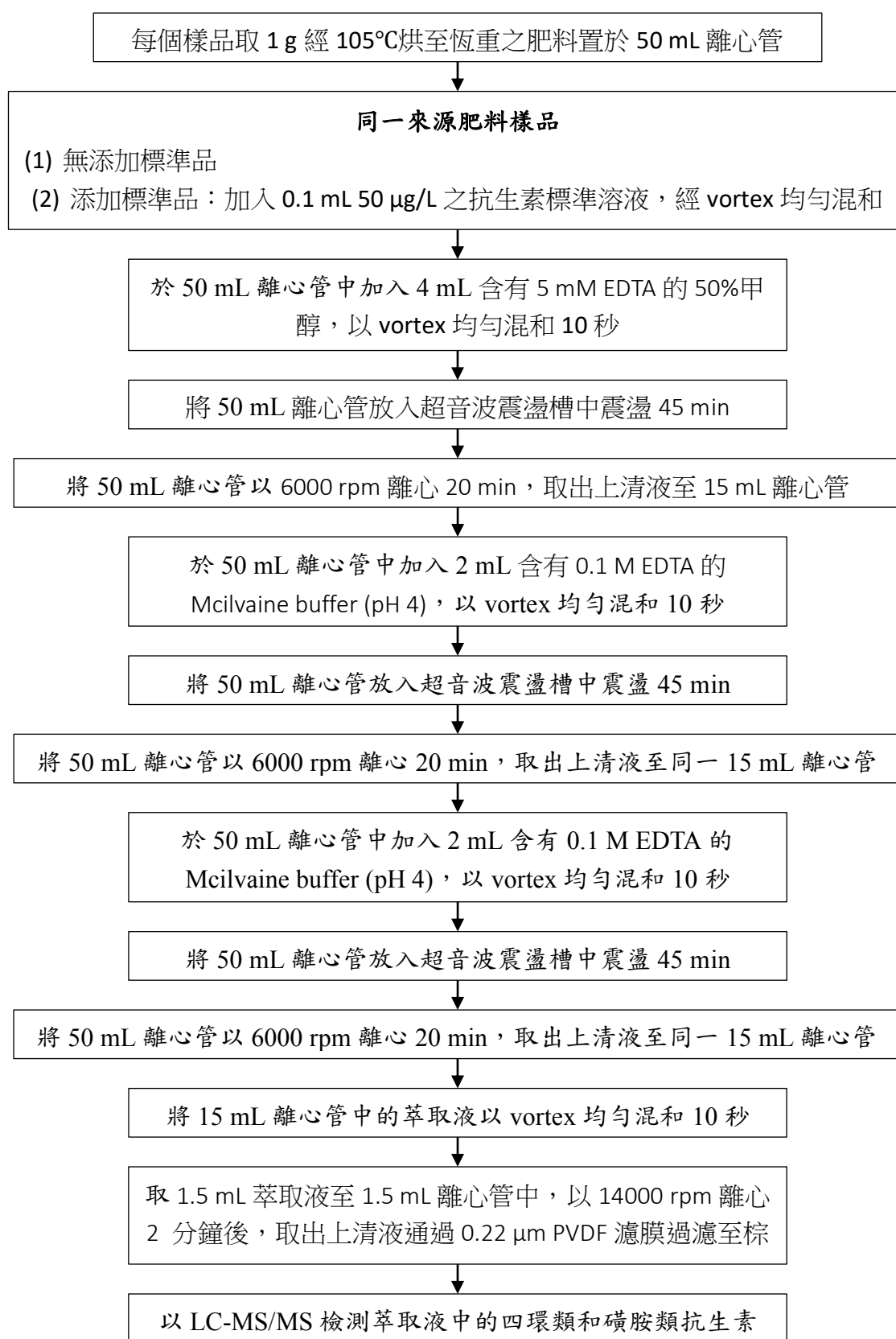


圖 3-2 抗生素之萃取方法



### 3.3.5 土壤粒徑分析(比重計試驗法)

此法利用 Stoke 顆粒沈降原理來決定粉土及黏土等細粒土壤(粒徑小於 0.074 mm)之顆粒大小分佈，液及應用不同粒徑大小的顆粒在水中沉澱速率不同的原理，量測較小顆粒間的大小分佈狀況。分析步驟如下：

- (1) 土壤以 10 mesh 過篩陰乾後，取 50 g 置於 250 mL 錐形瓶中。
- (2) 取 40 g 的六偏磷酸鈉( $\text{NaPO}_3$ )<sub>6</sub> 配製成 1000 mL 的溶液(配製完為透明無色溶液)。
- (3) 取 125 mL 已配製好的( $\text{NaPO}_3$ )<sub>6</sub> 和 50 g 的土壤到 250 mL 錐形瓶，混合均勻，此為 Sample。
- (4) 另單取 125 mL 已配製好的( $\text{NaPO}_3$ )<sub>6</sub> 到 250 mL 錐形瓶，混和均勻，作為 Blank。
- (5) 將錐形瓶放置於振盪器上，以 250 rpm 振盪 20 ~ 24 hr。
- (6) 取出 Sample 和 Blank 倒入 1000 mL 玻璃量筒，以去離子水(18.2 MΩ.cm)補充到 1000 mL 刻度，使用石臘膜(parafilm)封口，另再用兩大片石臘膜(parafilm)和厚紙板擋住，上下混合均勻 1 min 後再靜置。
- (7) 分別於 2、5、15、30、60、250、1440 min 時放入比重計，並記測比重計讀數和溫度(兩分鐘讀數後，取出比重計放入另一裝有蒸餾水之量筒內，以旋轉方式洗淨，在下一讀數前 30 秒，才將比重計置入懸浮液中)。
- (8) 以比重計讀值換算出相對應數值 L<sub>2</sub>、L<sub>5</sub>、L<sub>15</sub>、L<sub>30</sub>、L<sub>60</sub>、L<sub>250</sub>、L<sub>1440</sub>。

以比重計 151H 規格處理結果： $L = L_1 + 0.5 [L_2 - (V_B/A)]$ 。

L = 有效深度(cm)

L<sub>1</sub> = 游標上刻度至液面的距離 = 10.5 cm

L<sub>2</sub> = 比重計總長 = 14.0 cm

V<sub>B</sub> = 比重計體積 = 67.0 cm<sup>3</sup>

A = 沉降圓筒截面積 = 27.8 cm<sup>2</sup>

- (9) 查表以比重(2.65)及溫度(26°C)得 K 值(0.01272)，代入  $D = K\sqrt{L/T}$  以求得每個時間點之對應粒徑：D<sub>2</sub>、D<sub>5</sub>、D<sub>15</sub>、D<sub>30</sub>、D<sub>60</sub>、D<sub>250</sub>、D<sub>1440</sub>。

- (10) 計算  $P = [(100000/W) \times G / (G - G_1)] (R - G_1)$

P = 土壤在懸浮狀態下測得的比例

R = 比重計讀值



$W$  = 烘箱乾燥土壤質量 = 50 g

$G$  = 土壤顆粒比重 =  $2.65 \text{ g/cm}^3$

$G_1$  = 空白溶液測得的比重計讀值

(11) 依美國農業部 USDA 規範為分類依據(圖 3-6)，求出各粒徑(mm)對應之百分率(P%)：

名稱                      粒徑(mm)

砂粒(sand)              0.05-2

粉粒(silt)                0.002-0.05

黏粒(clay)                <0.002

黏粒百分率(clay%) = P1440

粉粒百分率(silt%) = P2 - P250

砂粒百分率(sand%) =  $100 - (\text{clay}\%) - (\text{silt}\%)$

(12) 最後根據各粒徑比例，得知該土壤質地類型(圖 3-3)。

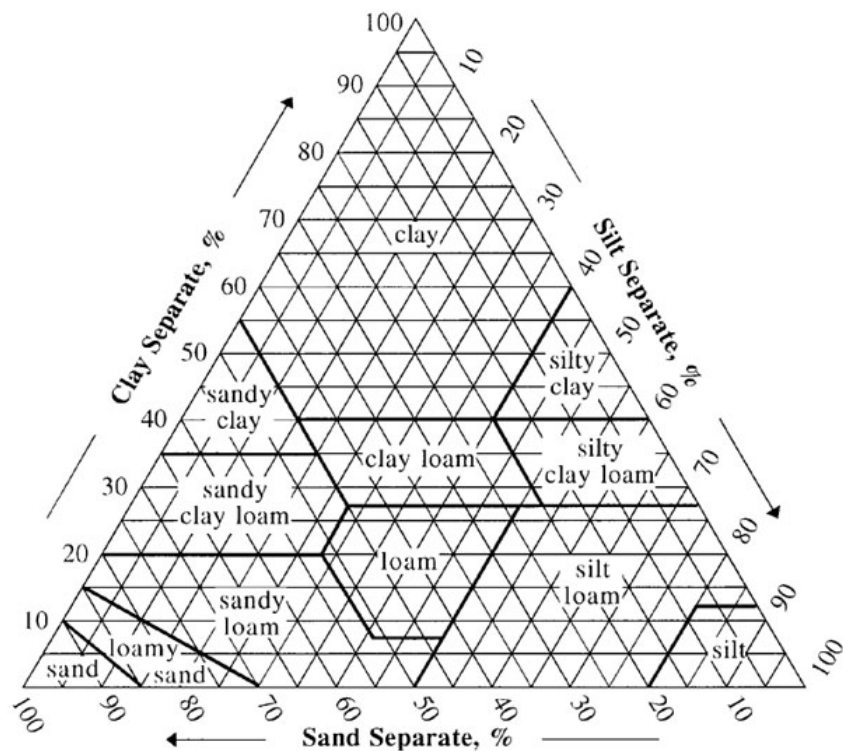


圖 3-3 USDA 土壤三角座標分類法



### 3.4 土壤縮模試驗

#### 3.4.1 縮模試驗前處理

##### 環境土壤的選擇

由於抗性基因濃度多寡與人類活動有關，故選擇人煙較為稀少的山區進行環境土樣的採集。於大芄芎古道步道內稍偏離主要步道的位置進行採樣作業。

##### 環境土壤的處理

將採集回來的土壤，去除土壤中的蚯蚓、樹枝、石礫等等物質後，置於乾淨的塑膠盆中陰乾六到七天後，以 10 mash 的標準篩網過篩。過篩後的環境土以雙層夾鏈袋置於室溫下避光保存，待後續實驗使用。

##### 有機肥料的均質化

將有機肥料以標準篩網過篩均質，去除有機肥料中較大顆粒，過篩後的有機肥料以夾鏈袋雙層保存，以利於縮模實驗使用

##### 溫室網架的架設

在縮模試驗執行過程中，由於發生蟲害，故在試驗前期緊急架設溫室網架，利用溫室菜網、不鏽鋼波浪層架等等物品架設小型溫室網架，來減少試驗過程中蟲害的影響。

##### 有機肥料及沼渣沼液樣品之挑選以及實驗施用量

首先利用先前各肥料以及沼渣沼液樣品之抗性基因相對豐度調查結果，選取各類別肥料或沼渣沼液中相對豐度最高、中等以及最低之樣品作為代表進行縮模試驗，所選取之樣品編號如下：非禽畜糞堆肥 CS#1、CS#2、CS#3；雞糞堆肥 CS#11、CS#12、CS#14；牛糞堆肥 CS#16、CS#18、CS#19；豬糞堆肥 CS#20、CS#22、CS#23；養豬場沼渣沼液 DS#1、DS#5、DS#22；養牛場沼渣沼液 DS#6、DS#14、DS#16。樣品添加量的部分，肥料樣品根據包裝袋上的建議施用量取平均值，再依照各類別的肥料建議施用量平均值加總取平均。沼渣沼液則以各採樣畜牧場之年沼渣沼液施灌量之平均值並換算平均每月之澆灌量進行試驗。

#### 3.4.2 縮模試驗

準備六個 72 孔的穴盤，分成第 0 天的取樣盆以及要進行 30 天的實驗穴盆，將過篩後的有機肥料以及沼渣沼液分別與環境土壤混合後分裝至乾淨的穴盆中，





將要進行 30 天的穴盆至於室外（圖 3-4）。從取樣盆中以滅菌過的 1000 uL 的微量吸管破壞性取樣，將取出的樣品裝至 2 mL 的微量離心管中，並且將所有樣品冰至-80 度冰箱內低溫保存，供基因萃取分析。在試驗期間，每日以灑水瓶裝取超純水來噴灑，並且記錄其天氣狀態及溫度。縮模試驗結束後，以 1000 uL 的微量吸管尖取表層約 0.2 cm 的土壤裝進 2 mL 的微量離心管中。底層土樣的蒐集則是表層土壤取樣完後，以乾淨的雙頭藥勺取樣，經酒精消毒後，先以較大面積的藥勺移除中間層，大約離穴盆底部約有 0.2 cm 的距離時，以小面積的藥勺將底部土壤敲碎後，裝進 2 mL 的微量離心管中，所有樣品冰至-80 度冰箱內低溫保存。

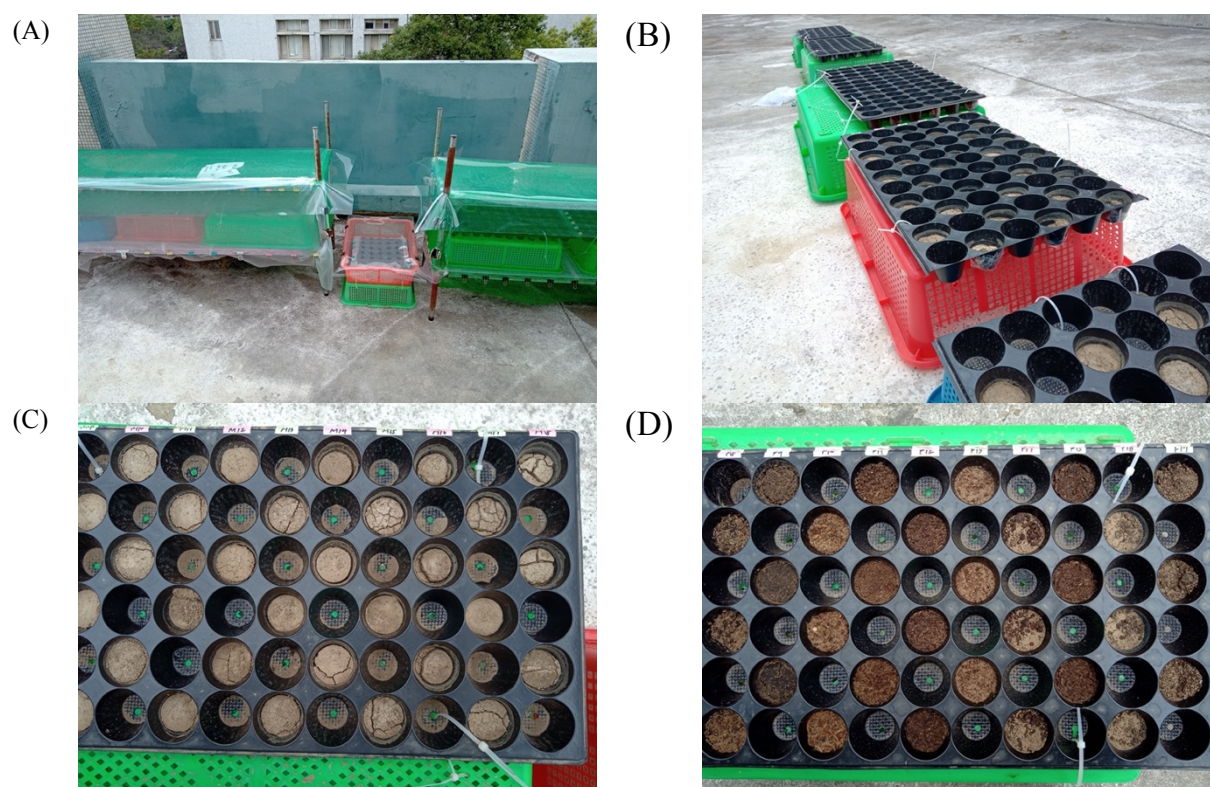


圖 3-4 土壤縮模試驗(A)穴盆架設整體照，(B)穴盆架設近照，(C)沼液沼渣土壤近照，(D)堆肥土壤近照。



### 3.5 研究進度及預期完成之工作項目

表 3-8 研究進度及預期完成之工作項目(甘特圖)

工作項目	年月												備註
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1. 文獻收集整理													
2. 市售有機肥採樣分析													
3. 沼渣沼液採樣與分析													
4. 土壤縮模建立與試驗													
5. 數據分析整李													
6. 期末報告撰寫結案													
工作進度估計百分比 (累 積 數)	5 %	10 %	20 %	30 %	35 %	45 %	50 %	60 %	70 %	85 %	100 %		
預定查核點	期中		文獻收集完成、市售有機肥料與沼渣沼液採樣與分析完成近八成、土壤縮模系統建立										
	期末		市售有機肥料與沼渣沼液採樣分析完成、土壤縮模試驗完成、數據分析整理完成、結案報告撰寫完成										



(本頁留白)



## 第四章 結果與討論

### 4.1 市售有機肥料（堆肥）

本期計畫在市售有機肥料上的挑選，是根據農糧署所公告的 108 年國產有機質肥料品牌推薦名單中，以廠商所標示的組成份裡頭「有無添加禽畜糞」、以及「添加何種禽畜糞」等資訊加以區分成六組，並從各組別中挑出四至五件商品。最後定案的六個組別分別是：(I)不含禽畜糞便、以植物類的生質廢棄物為主之堆肥組（5 件）；(II)含禽畜糞便但佔比在 50%以下之堆肥組（5 件）；(III)以雞糞為主之禽畜糞堆肥組（5 件）；(IV)以牛糞為主之禽畜糞堆肥組（4 件）；(V)以豬糞為主之禽畜糞堆肥組（4 件）；(VI)由兩種以上禽畜糞混合而成之禽畜糞堆肥組（5 件）。這些堆肥的料源除了禽畜糞便外，尚參雜了菜籽粕、米糠、大豆粕、椰子粕、芝麻粕、蓖麻粕、蚵殼粉、菇類培植廢棄包、蔗渣、糖蜜、麩皮、廢木屑、玉米穗稈、咖啡渣、菸砂等涵蓋了植物類與動物類的生質廢棄物。

值得記錄的是，在本期計畫的執行過程中，由於 COVID-19 疫情的關係，不少有機肥料品牌恰巧於今年上半年決定暫緩銷售，廠商表明將於疫情稍緩後才開始製作堆肥。此外，也由於疫情之故必須考量到學生的安全，因此對於樣品的取得我們盡可能的直接與廠商連繫，希望對方利用直送（或郵寄）而非學生親自至現場選購的方式讓我們獲得樣品。幸運的是，國內疫情自五月中開始趨緩，這使得我們後續在跟廠商的連繫上與樣品的取得上加快許多，最終於六月下旬前總共取得了 28 件的堆肥商品供本研究分析與試驗。表 4-1 為本計畫所得之堆肥樣品的品牌與詳細組成資訊。圖 4-1 為各有機肥料實品販售時的外表包裝。

#### 4.1.1 堆肥樣品之營養源與重金屬含量

表 4-2 與 4-3 分別為本期堆肥樣品的營養源與重金屬含量的分析結果，從中可知，所得的市售堆肥皆具有可供植作生長所需的氮磷鉀營養源外，其重金屬含量皆符合標準，代表著當這些有機肥料施用於未受重金屬污染的農地土壤後，土壤中微生物族群所含的抗生素抗性基因濃度，並非由於重金屬誘發的共選擇抗性所造成，而是來自於原生菌群的背景值，以及施用堆肥時的引入值所致。



表 4-1 本計畫所使用的各有機堆肥品牌名稱與其原料組成

分類	編號	廠牌商品名稱	原料組成
非禽畜糞	CS#1	台糖牌田寶有機質粒肥 P25 號	菜籽粕、米糠、大豆粕、椰子粕、芝麻粕、蓖麻粕
	CS#2	東農牌 1 號有機質肥料	花生粕、米糠、芝麻粕、椰子粕、蓖麻粕、黃豆粕
	CS#3	燕子牌燕子基肥	米糠、蓖麻粕、蚵殼粉、菇類培植廢棄包
	CS#4	台糖牌田寶 11 號有機質肥料	蔗渣、糖蜜
	CS#5	綠林牌好康 522	花生粕、菜籽粕、蓖麻粕、芝麻粕、麩皮
禽畜糞含量 50% 以下	CS#6	益發牌益生 2 號	廢木屑、牛糞、黃豆粉、米糠、魚骨粉
	CS#7	寶島牌地虎肥有機質肥料	禽畜糞、菇類培植廢棄包、豆粕、蓖麻粕、米糠
	CS#8	格林高級地力旺	糖蜜、禽畜糞、養菇廢包、木屑、果菜殘渣
	CS#9	東豐牌 NO.1 有機質肥料	禽畜糞、米糠、蓖麻粕
	CS#10	農友牌生技 12 號有機質肥料	菇類培植廢棄包、禽畜糞、蓖麻粕
以雞糞為主	CS#11	麗園系列好地底有機質肥料	雞糞、粗糠
	CS#12	順豐牌 3-1 號有機質肥料	禽畜糞(雞)、植物性廢渣(咖啡渣)
	CS#13	長虹牌有機質肥料	禽畜糞(雞)、菸砂、木屑
	CS#14	福壽牌祝有肥 1 號	米糠、甘蔗渣、蛋雞糞
	CS#15	尚禾二號	禽畜糞(雞)、稻殼
以牛糞為主	CS#16	益能牌二號有機質肥料	禽畜糞(牛)、菇類培植廢棄包、植物性廢渣
	CS#17	崙背牌有機質肥料	牛糞、木屑、蔗渣
	CS#18	田樂牌田樂一號高級有機質肥料	禽畜糞(牛)、菇類培植廢棄包
	CS#19	聯勝牌地利有機質肥	禽畜糞(牛)、廢木材(屑)
以豬糞為主	CS#20	久保田有機質肥料	禽畜糞(豬糞)、玉米穗稈、米糠、粗糠、菇類培植廢棄包之木屑
	CS#21	東農牌高級有機質肥料	蔗渣、花生殼、禽畜糞(豬)
	CS#22	農寶牌農寶二號肥料	豬糞、菇類培植廢棄包
	CS#23	基王牌有機質肥料	禽畜糞(豬)、菇類培植廢棄包
混合兩種以上禽畜糞	CS#24	阿猴城牌有機質肥料 1 號	雞糞、牛糞、豬糞、木屑
	CS#25	福強牌有機質肥料	雞糞、豬糞、菇類培植廢棄包
	CS#26	格林牌富地	禽畜糞(豬、雞)、農業污泥、菇類培植廢棄包、木屑
	CS#27	協益牌地龍 1 號有機質肥料	雞糞、牛糞、豬糞、花生殼粉、菇類培植廢棄包
	CS#28	豐展好機肥	禽畜糞、米糠、煙葉、黃豆粉、菇類培植廢棄包





#### 第四章 結果與討論



CS#1 台糖田寶有機質粒肥 P25 號



CS#2 東農牌 1 號有機質肥料



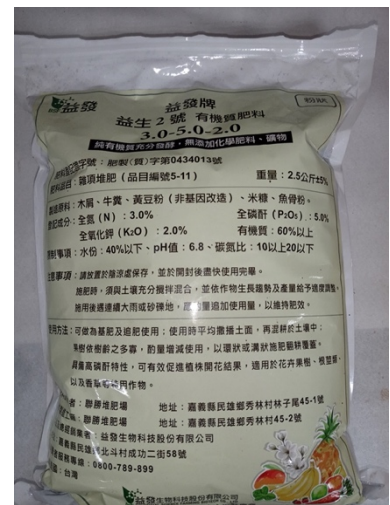
CS#3 燕子牌燕子基肥



CS#4 台糖牌田寶 11 號有機質肥料



CS#5 綠林牌好康 522



CS#6 益發牌益生 2 號



CS#7 寶島牌地虎肥有機質肥料



CS#8 格林高級地力旺



CS#9 東豐牌 NO.1 有機質肥料

圖 4-1 本期計畫所用之 28 件市售有機肥料（堆肥）外包裝





CS#10 農友牌生技12號有機肥



CS#11 麗園系列好地底有機質肥



CS#12 順豐牌3-1號有機質肥料



CS#13 長虹牌有機質肥料



CS#14 福壽牌祝有肥1號



CS#15 尚禾二號



CS#16 益能牌二號有機質肥料



CS#17 崙背牌有機質肥料



CS#18 田樂一號高級有機質肥料



CS#19 聯勝牌地利有機質肥

圖 4-1 本期計畫所用之28件市售有機肥料（堆肥）外包裝 [續]

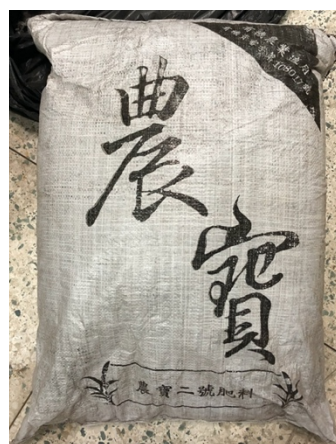




CS#20 久保田有機質肥料



CS#21 東農牌高級有機質肥料



CS#22 農寶牌農寶二號肥料



CS#23 基王牌有機質肥料



CS#24 阿猴城牌有機質肥料 1 號



CS#25 福強牌有機質肥料



CS#26 格林牌富地



CS#27 協益牌地龍 1 號有機質肥



CS#28 豐展好機肥

圖 4-1 本期計畫所用之 28 件市售有機肥料（堆肥）外包裝 [續]

表 4-2 本計畫 28 件堆肥樣品之氮磷鉀與有機質含量

分類	編號	全氮	全磷酐	全氧化鉀	有機質
		%			
非禽畜糞	CS#1	5.5	2.2	1.8	90.1
	CS#2	4.4	2.7	2.9	85.6
	CS#3	3.8	2.9	1.2	75.9
	CS#4	2.6	1	0.9	70.2
	CS#5	6	2.1	2	87.6
禽畜糞含量 50%以下	CS#6	3.1	3.7	2.2	67.4
	CS#7	3.1	3.2	2	72
	CS#8	2	4	1.5	--
	CS#9	3.9	2	1.5	77
	CS#10	2.7	2.1	1.1	73
以雞糞為主	CS#11	2.1	3.3	3.2	66.1
	CS#12	3.1	4.4	2.8	68.6
	CS#13	2	3.3	2	73.9
	CS#14	2.5	4.3	2.6	67.4
	CS#15	3.1	3.3	3.4	7
以牛糞為主	CS#16	3.1	3.7	1.9	82.1
	CS#17	2.5	2.3	2.8	64
	CS#18	2.9	3	2.5	70.5
	CS#19	2.4	1.5	1.8	75.1
以豬糞為主	CS#20	3.2	1.8	1	79.3
	CS#21	1.7	2.3	1.1	71.1
	CS#22	2.5	2.8	1.3	81.3
	CS#23	2	4	2.1	66.1
混合兩種以上禽畜糞	CS#24	2.9	2	1	74.4
	CS#25	1.8	5.6	3.3	51.1
	CS#26	2	3.2	2	69.5
	CS#27	3.2	2.4	1.3	61.7
	CS#28	2.3	2.5	1.9	67.9

表 4-3 本計畫 28 件堆肥樣品之重金屬含量（元素後的括弧內的數字代表該元素於堆肥內的允許法規值）

分類	編號	砷 As (< 25)	鎘 Cd (< 2)	鉻 Cr (< 15)	銅 Cu (< 100)	汞 Hg (< 1)	鎳 Ni (< 25)	鉛 Pb (< 150)	鋅 Zn (< 500)
mg/kg									
非禽畜糞	CS#1	< 0.3	< 0.3	14	22	< 0.1	5.7	< 2	91
	CS#2	1	< 0.3	14	23	< 0.1	7	2	85
	CS#3	1.6	0.7	19	22	< 0.1	6.5	5	97
	CS#4	2.1	< 0.3	40	31	< 0.1	14.2	17	116
	CS#5	0.3	< 0.3	8	21	< 0.1	4.5	3	75
禽畜糞含量 50% 以下	CS#6	1.2	< 0.3	23	49	< 0.1	7.7	4	210
	CS#7	0.6	< 0.3	12	26	< 0.1	7.4	3	151
	CS#8								
	CS#9	0.9	< 0.3	18	24	< 0.1	8.2	< 2	120
	CS#10	0.9	< 0.3	10	16	< 0.1	4	< 2	90
以雞糞為主	CS#11	0.6	0.4	8	46	< 0.1	7	< 2	334
	CS#12	0.5	0.3	9	51	< 0.1	6.1	3	270
	CS#13	< 0.3	< 0.3	8	34	< 0.1	4.5	2	252
	CS#14	1.4	0.3	13	53	< 0.1	7.2	4	315
	CS#15	4.6	< 0.3	7	59	< 0.1	6.6	< 5	329
以牛糞為主	CS#16	1.4	< 0.3	11	28	< 0.1	4.8	3	95
	CS#17	1.9	0.4	35	63	< 0.1	12.5	8	317
	CS#18	1.3	< 0.3	18	42	< 0.1	8	4	222
	CS#19	0.9	< 0.3	19	37	< 0.1	7.6	5	158
以豬糞為主	CS#20	1.1	< 0.3	11	40	< 0.1	5.5	3	195
	CS#21	1.2	< 0.3	16	15	< 0.1	5.9	< 2	98
	CS#22	0.9	< 0.3	8	29	< 0.1	4.9	2	149
	CS#23	0.6	0.3	13	55	< 0.1	7.1	4	371
混合兩種以上 禽畜糞	CS#24	0.7	0.3	16	46	< 0.1	6.1	18	210
	CS#25	1.1	0.3	8	61	< 0.1	5.9	2	455
	CS#26	1.6	0.4	17	53	< 0.1	9.3	5	338
	CS#27	1.9	< 0.3	67	48	< 0.1	21	14	194
	CS#28	0.8	0.3	10	42	< 0.1	6.1	3	221





### 4.1.2 堆肥樣品 DNA 萃取品質保證

表 4-4 為 28 件堆肥樣品(compost sample, CS)萃取後所獲得的 DNA 濃度與品質。由表可知，所得的 DNA 品質整體而言受蛋白質污染的情形雖可接受（即波長 260 nm 與 280 nm 的紫外線吸光值，A260/A280，的比值越接近 1.8 越好），但部分樣品受到鹽類污染的情形嚴重（即 A260/A230 比值小於 2）。一般當樣品遇到鹽類污染的情況時，若是試著執行 PCR 及 qPCR 的分析後，仍可偵測到標定核酸片段的訊號，代表該 DNA 萃取物依舊維持著一定程度的可分析的品質。本計畫所萃得的 DNA 樣品在後續的 PCR 分析上皆能檢測分析，也具專一性。

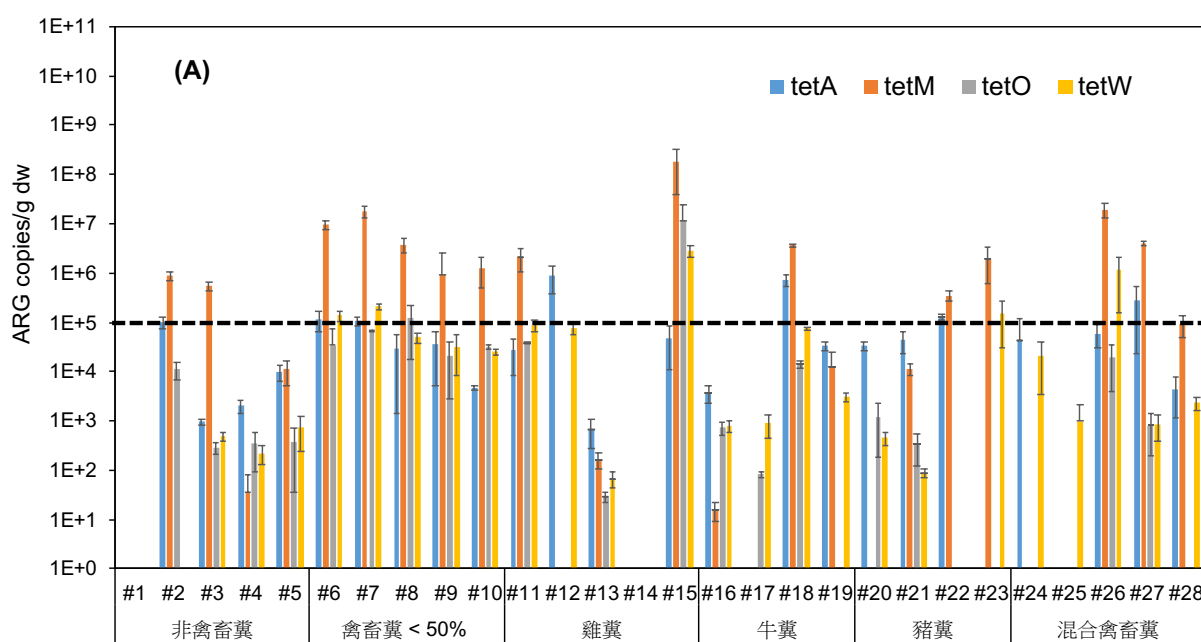
表 4-4 各肥料樣品萃取所得之 DNA 的濃度與品質

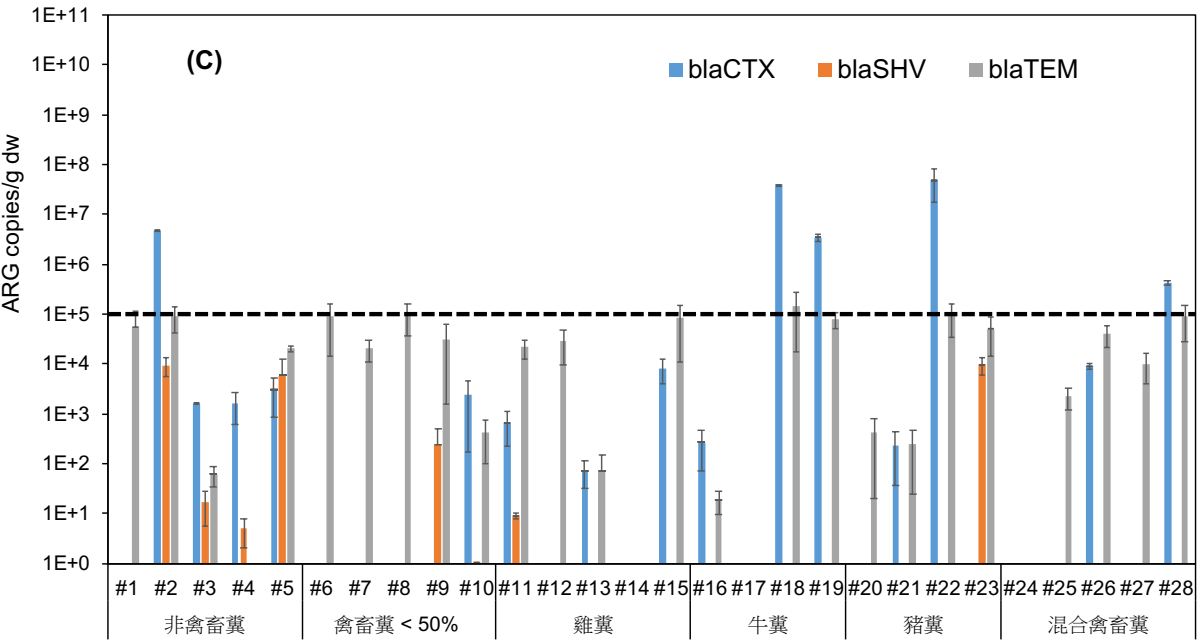
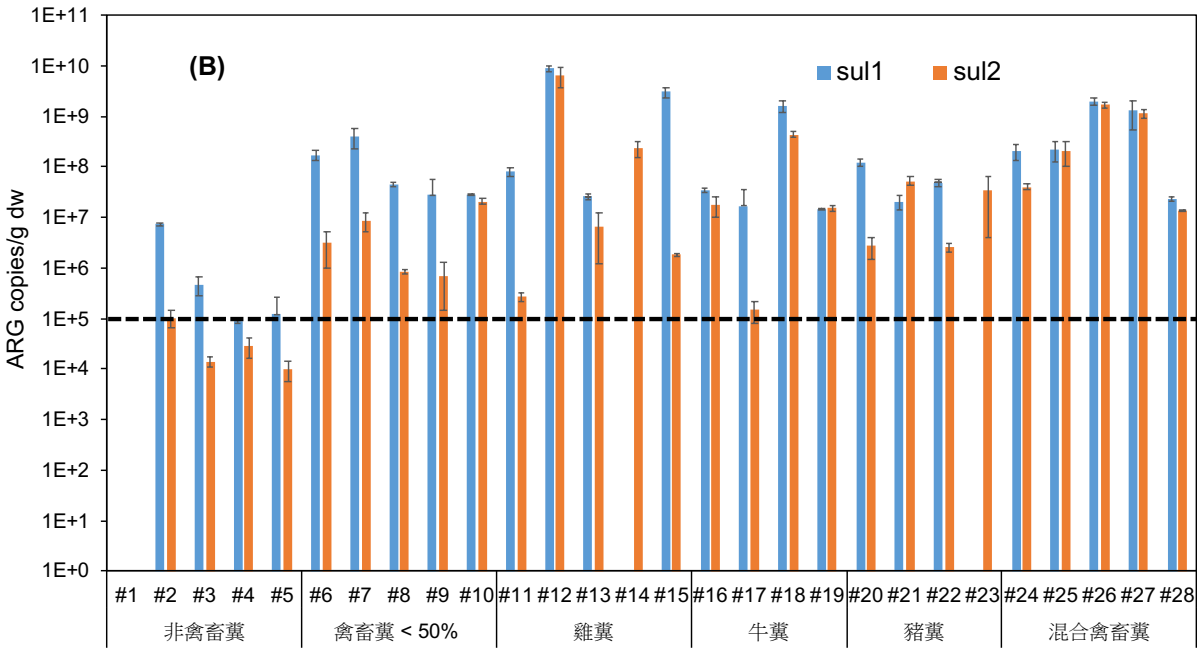
樣品編號	DNA (ng/μL)	A260/A280	A260/A230
CS#1	29.7	1.75	2.72
CS#2	7.7	1.69	1.24
CS#3	20.7	1.89	1.73
CS#4	69.6	1.85	2.00
CS#5	47.3	1.88	2.49
CS#6	30.8	1.87	2.80
CS#7	33.5	1.77	1.86
CS#8	21.3	1.79	3.15
CS#9	10.1	1.92	4.49
CS#10	43.3	1.89	2.10
CS#11	66.8	1.77	1.54
CS#12	49.9	1.83	2.10
CS#13	126.9	1.82	1.88
CS#14	43.6	1.76	0.81
CS#15	8.2	1.83	1.51
CS#16	66.7	1.83	1.67
CS#17	208.5	1.86	2.09
CS#18	5.7	1.45	1.51
CS#19	12.9	1.89	6.11
CS#20	51.1	1.86	1.98
CS#21	42.0	1.81	1.81
CS#22	2.9	1.72	1.51
CS#23	10.7	1.64	0.97
CS#24	224.8	1.84	1.78
CS#25	36.1	1.70	1.43
CS#26	17.6	1.90	1.95
CS#27	31.1	1.78	1.64
CS#28	6.3	1.94	3.88



### 4.1.3 堆肥樣品所含 ARGs 與 MGE 之定量：絕對濃度

表 4-5 為堆肥樣品內的各個抗生素抗性基因（含針對四環黴素的 *tetA*, *tetM*, *tetO*, *tetW*；針對磺胺類的 *sul1*, *sul2*；針對β-內酰胺類的 *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>；以及針對大環內酯類的 *ermF*, *ermB*）與第一型整合子基因(*intI1*)經 quantitative PCR (即 qPCR)量化後，所得到的單位堆肥乾重的絕對濃度值。將表格中的數值分別製圖，即可得圖 4-2。由於每件堆肥樣品中所含的菌量不同(如圖 4-3 所示，可看出各樣品單位重量可代表整體菌族群數量的 16S rRNA 基因濃度值皆不相同)，故圖 4-2 所呈現的結果，大抵上只能從同一件堆肥樣品中的不同抗性基因相比較。從圖 4-2 (A)到(D)的數值可看出(若以從  $10^5$  基因量劃出的黑色虛線為基準相比較)，同一件堆肥樣品裡所含的抗性基因，大致上以磺胺類的抗性基因較高，而β-內酰胺類則普遍相對較低。這與文獻所觀察到的現象雷同：在 Echeverria-Palencia 等人(2017)針對美國加州不同城市型態其公園的土壤採樣分析可看出除了農業縣內的土壤 *bla*<sub>SHV</sub> 濃度高於  $10^5$  copies/g 外，其餘城鎮皆低於  $10^4$  copies/g；土壤中的 *sul1* 則在  $10^5$  到  $10^7$  copies/g 之間。此外，從圖 4-2 (B)與(E)也可看出，若直接與含有禽畜糞的堆肥樣品相比，以不含禽畜糞料源所製成的堆肥其 *sul* 與 *intI1* 的基因含量皆較低。*intI1* 由於屬於微生物的「移動基因元件」(mobile genetic element, MGE)之一，因此其數值高低常被用來當作臨床或環境樣品中，微生物彼此間水平基因轉移的潛勢高低之指標。從這些堆肥樣品絕對濃度（或稱絕對豐度）的量化結果來看，禽畜糞的存在確實可一定程度地影響抗生素抗性基因的傳播。





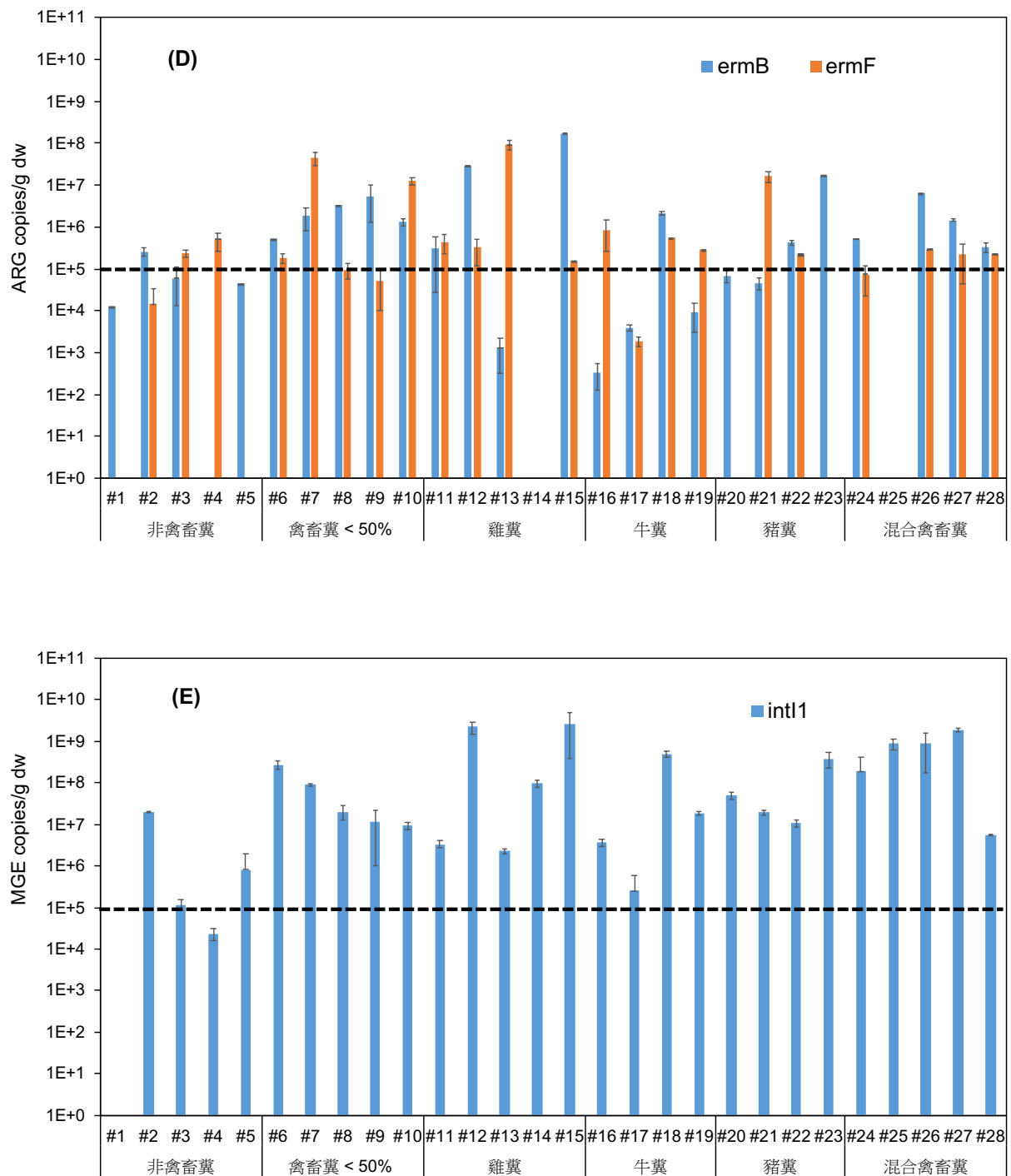


圖 4-2 不同組別之堆肥樣品其單位乾重所含的(A)四環素類、(B)磺胺類類、(C)  $\beta$ -內酰胺類、(D)大環內酯類的抗生素抗性基因，以及(E)第一型整合子基因的絕對豐度值。

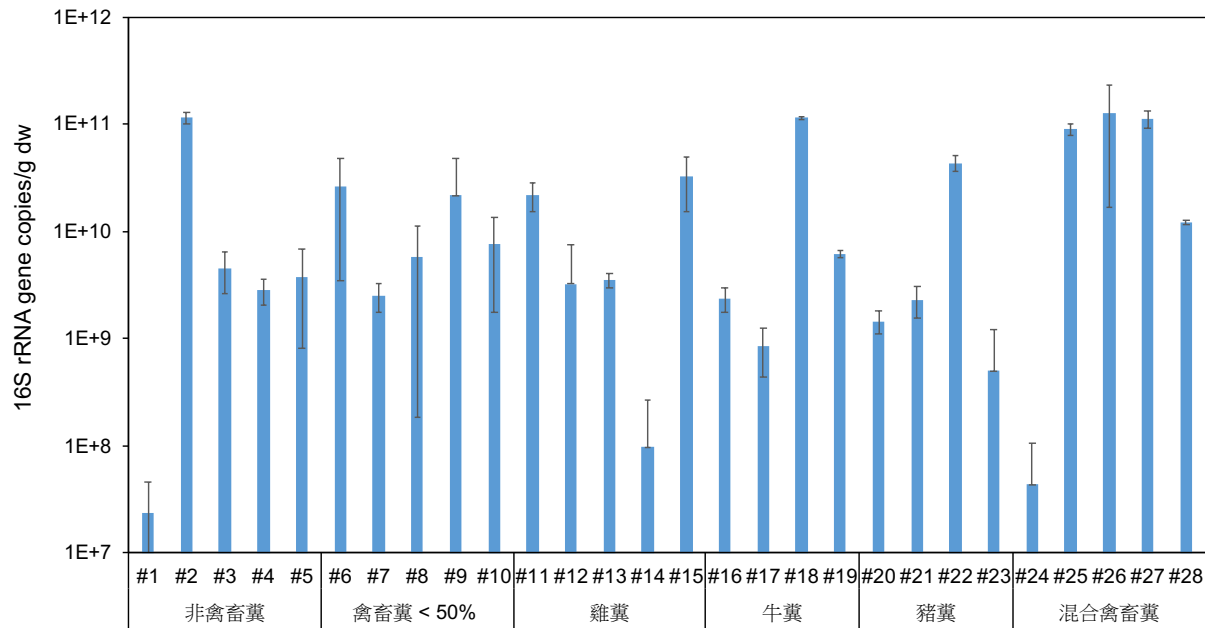


圖 4-3 各堆肥樣品單位重量所含的 16S rRNA gene 絕對定量值。

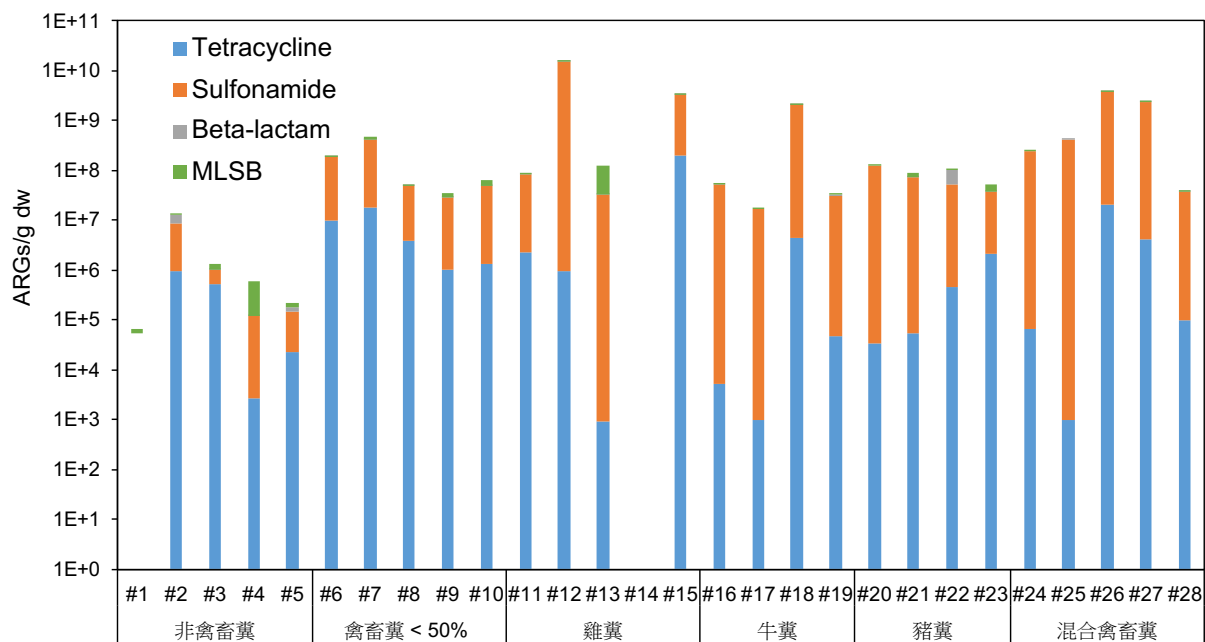


圖 4-4 各堆肥樣品其單位乾重所測得的不同 ARG 絕對濃度加總。

若將各個抗性基因的絕對濃度值加總後如圖 4-4 所示，也可觀察到非禽畜糞堆肥樣品內所測得的總抗性基因濃度較其他含有禽畜糞的堆肥低，亦即施用一樣克重的肥料時，不含禽畜糞的堆肥所引入的抗性基因量相對較少。不僅如此，從絕對濃度的角度來看，禽畜糞含量 < 50% 的堆肥其抗性基因濃度不比其他含有較高量禽畜糞的堆肥來得低，且雞糞堆肥整體而言含有最高的絕對抗性基因濃度。



表 4-5 有機肥料抗性基因、第一類整合子基因的絕對豐度 (單位: ARG or MGE copies/g dry weight)

樣品 (分類/編號)	Tetracycline				Sulfonamide		Beta-lactam			MLSB		MGE	
	<i>tetA</i>	<i>tetM</i>	<i>tetO</i>	<i>tetW</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>bla<sub>CTX</sub></i>	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	<i>ermB</i>	<i>ermF</i>	<i>intI1</i>	
非禽畜糞	#1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5.52E+04	1.27E+04	ND	ND	
	#2	9.99E+04	8.71E+05	1.10E+04	ND	7.36E+06	1.05E+05	4.71E+06	9.57E+03	9.20E+04	2.57E+05	1.45E+04	1.99E+07
	#3	9.44E+02	5.39E+05	2.90E+02	4.83E+02	4.78E+05	1.41E+04	1.63E+03	1.72E+01	6.22E+01	6.06E+04	2.36E+05	1.19E+05
	#4	2.03E+03	3.48E+01	3.42E+02	2.18E+02	8.61E+04	2.91E+04	1.64E+03	4.99E+00	ND	ND	5.02E+05	2.35E+04
	#5	1.00E+04	1.11E+04	3.84E+02	7.53E+02	1.20E+05	1.01E+04	3.06E+03	5.93E+03	2.06E+04	4.46E+04	ND	8.03E+05
禽畜糞含量<50%	#6	1.15E+05	9.76E+06	3.42E+04	1.37E+05	1.73E+08	3.19E+06	ND	ND	8.94E+04	5.17E+05	1.86E+05	2.70E+08
	#7	1.08E+05	1.75E+07	6.73E+04	2.11E+05	3.93E+08	8.82E+06	ND	ND	2.05E+04	1.85E+06	4.52E+07	8.94E+07
	#8	2.90E+04	3.80E+06	1.20E+05	4.97E+04	4.59E+07	8.36E+05	ND	ND	9.76E+04	3.38E+06	9.65E+04	2.01E+07
	#9	3.49E+04	9.40E+05	2.08E+04	3.19E+04	2.74E+07	7.14E+05	ND	2.46E+02	3.17E+04	5.56E+06	5.18E+04	1.18E+07
	#10	4.72E+03	1.29E+06	3.11E+04	2.57E+04	2.86E+07	2.09E+07	2.45E+03	1.02E+00	4.18E+02	1.32E+06	1.24E+07	9.34E+06
以雞糞為 主的禽畜 糞堆肥	#11	2.73E+04	2.09E+06	3.83E+04	8.88E+04	8.25E+07	2.66E+05	6.62E+02	9.30E+00	2.14E+04	3.11E+05	4.36E+05	3.35E+06
	#12	8.68E+05	ND	ND	7.53E+04	8.87E+09	6.63E+09	ND	ND	2.81E+04	2.88E+07	3.23E+05	2.20E+09
	#13	6.81E+02	1.65E+02	2.90E+01	6.76E+01	2.62E+07	6.63E+06	7.23E+01	ND	7.34E+01	1.29E+03	9.25E+07	2.26E+06
	#14	ND	ND	ND	ND	ND	2.35E+08	ND	ND	ND	ND	ND	9.65E+07
	#15	4.62E+04	1.80E+08	1.16E+07	2.83E+06	3.05E+09	1.84E+06	8.30E+03	ND	8.19E+04	1.73E+08	1.51E+05	2.59E+09

表 4-5 有機肥料抗性基因、第一類整合子基因的絕對豐度 (單位: ARG or MGE copies/g dry weight) [續]

樣品		Tetracycline				Sulfonamide		Beta-lactam			MLSB		MGE
(分類/編號)		<i>tetA</i>	<i>tetM</i>	<i>tetO</i>	<i>tetW</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>bla</i> <sub>CTX</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>ermB</i>	<i>ermF</i>	<i>intI1</i>
以牛糞為 主的禽畜 糞堆肥	#16	3.70E+03	1.56E+01	7.36E+02	7.76E+02	3.49E+07	1.75E+07	2.68E+02	ND	1.91E+01	3.41E+02	8.47E+05	3.78E+06
	#17	ND	ND	8.19E+01	9.10E+02	1.69E+07	1.51E+05	ND	ND	ND	4.00E+03	1.91E+03	2.50E+05
	#18	7.22E+05	3.63E+06	1.42E+04	7.44E+04	1.60E+09	4.39E+08	3.92E+07	ND	1.41E+05	2.14E+06	5.52E+05	4.97E+08
	#19	3.36E+04	1.23E+04	ND	3.12E+03	1.47E+07	1.52E+07	3.44E+06	ND	7.88E+04	9.22E+03	2.83E+05	1.88E+07
以豬糞為 主的禽畜 糞堆肥	#20	3.28E+04	ND	1.22E+03	4.45E+02	1.25E+08	2.78E+06	ND	ND	4.12E+02	6.89E+04	ND	4.91E+07
	#21	4.28E+04	1.15E+04	3.27E+02	8.52E+01	2.03E+07	5.31E+07	2.33E+02	ND	2.42E+02	4.69E+04	1.66E+07	1.92E+07
	#22	1.29E+05	3.43E+05	ND	ND	4.83E+07	2.61E+06	4.93E+07	ND	9.85E+04	4.24E+05	2.17E+05	1.06E+07
	#23	ND	1.98E+06	ND	1.54E+05	ND	3.51E+07	ND	9.71E+03	5.10E+04	1.71E+07	ND	3.84E+08
混合兩種 以上禽畜 糞的堆肥	#24	4.34E+04	ND	ND	2.13E+04	2.05E+08	4.06E+07	ND	ND	ND	4.96E+05	7.24E+04	1.87E+08
	#25	ND	ND	ND	9.76E+02	2.22E+08	2.08E+08	ND	ND	2.20E+03	ND	ND	8.78E+08
	#26	5.98E+04	1.95E+07	1.92E+04	1.13E+06	2.02E+09	1.70E+09	9.03E+03	ND	4.09E+04	6.57E+06	2.94E+05	8.66E+08
	#27	2.73E+05	4.00E+06	8.09E+02	8.44E+02	1.31E+09	1.14E+09	ND	ND	9.99E+03	1.48E+06	2.18E+05	1.92E+09
	#28	4.45E+03	9.27E+04	ND	2.30E+03	2.35E+07	1.38E+07	4.35E+05	ND	9.05E+04	3.38E+05	2.22E+05	5.57E+06

表 4-6 有機肥料抗性基因、第一型整合子基因與 16S 核糖體基因的相對豐度 (單位：ARG or MGE copies/16S rRNA gene copies)

樣品 (分類/編號)	Tetracycline				Sulfonamide		Beta-lactam			MLSB		MGE	
	<i>tetA</i>	<i>tetM</i>	<i>tetO</i>	<i>tetW</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>bla</i> <sub>CTX</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>ermB</i>	<i>ermF</i>	<i>intI1</i>	
非禽畜糞	#1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.31E-05	5.29E-06	ND	ND	
	#2	1.44E-08	1.26E-07	1.59E-09	ND	1.06E-06	1.51E-08	6.79E-07	1.38E-09	1.33E-08	3.71E-08	2.09E-09	2.87E-06
	#3	2.26E-07	1.29E-04	6.94E-08	1.16E-07	1.14E-04	3.38E-06	3.90E-07	4.11E-09	1.49E-08	1.45E-05	5.64E-05	2.83E-05
	#4	7.29E-07	1.25E-08	1.23E-07	7.84E-08	3.12E-05	1.05E-05	5.50E-07	1.30E-09	ND	ND	1.80E-04	1.41E-05
	#5	1.06E-05	ND	1.01E-09	1.98E-09	3.15E-07	2.65E-08	8.04E-09	1.56E-08	5.41E-08	1.17E-07	ND	2.11E-06
禽畜糞含量<50%	#6	4.41E-08	3.74E-06	1.31E-08	5.23E-08	6.65E-05	1.22E-06	ND	ND	3.43E-08	1.98E-07	7.12E-08	1.03E-04
	#7	4.34E-05	7.04E-03	2.71E-05	8.49E-05	1.58E-01	3.55E-03	ND	ND	8.26E-06	7.48E-04	1.82E-02	6.01E-02
	#8	6.30E-08	8.25E-06	2.61E-07	1.08E-07	9.97E-05	1.81E-06	ND	ND	2.12E-07	7.34E-06	2.09E-07	4.36E-05
	#9	2.61E-08	8.52E-07	1.52E-08	3.26E-08	3.13E-05	6.78E-07	ND	4.08E-10	2.72E-08	5.45E-06	4.73E-08	1.22E-05
	#10	7.41E-07	2.02E-04	4.89E-06	4.03E-06	4.49E-03	3.29E-03	3.84E-07	1.60E-10	6.56E-08	2.07E-04	1.94E-03	2.44E-03
以雞糞為 主的禽畜 糞堆肥	#11	1.28E-06	9.83E-05	1.80E-06	4.18E-06	3.89E-03	1.25E-05	3.12E-08	4.38E-10	1.01E-06	1.46E-05	2.06E-05	1.84E-04
	#12	1.08E-03	ND	ND	2.90E-07	3.41E-02	2.55E-02	ND	ND	1.08E-07	1.11E-04	1.24E-06	8.48E-03
	#13	1.96E-07	4.75E-08	8.36E-09	1.95E-08	7.55E-03	1.91E-03	2.08E-08	0.00E+00	2.11E-08	3.71E-07	2.66E-02	1.00E-03
	#14	ND	ND	ND	ND	ND	2.36E-02	ND	ND	ND	ND	ND	9.86E-03
	#15	1.88E-08	7.31E-05	4.71E-06	1.15E-06	1.24E-03	7.49E-07	3.38E-09	ND	3.33E-08	7.02E-05	6.16E-08	1.05E-03

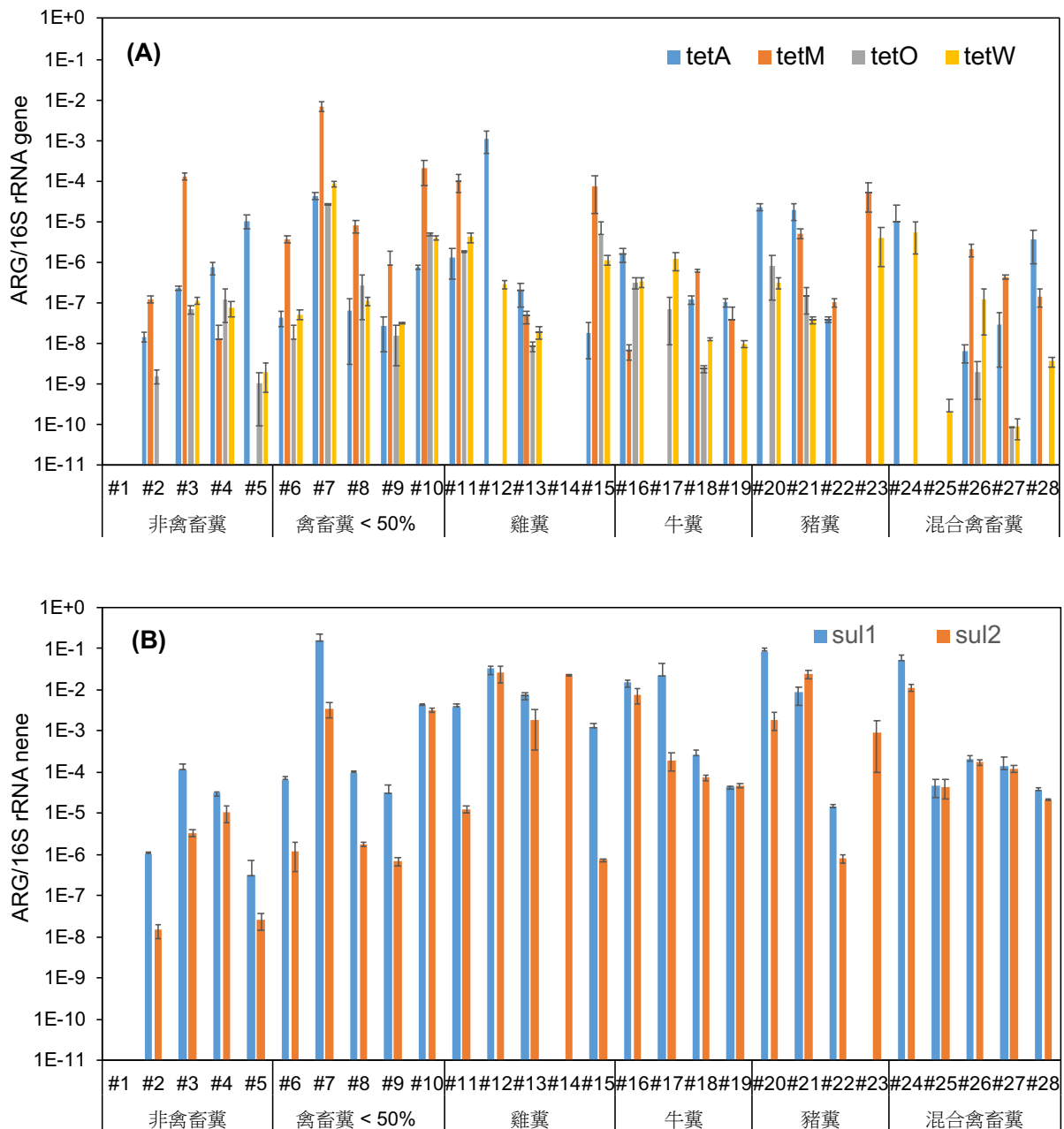
表 4-6 有機肥料抗性基因、第一型整合子基因與 16S 核糖體基因的相對豐度 (單位：ARG or MGE copies/16S rRNA gene copies) [續]

樣品 (分類/編號)		Tetracycline				Sulfonamide		Beta-lactam			MLSB		MGE
		<i>tetA</i>	<i>tetM</i>	<i>tetO</i>	<i>tetW</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>bla</i> <sub>CTX</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>ermB</i>	<i>ermF</i>	<i>int11</i>
以牛糞為 主的禽畜 糞堆肥	#16	1.59E-06	6.71E-09	3.16E-07	3.34E-07	1.50E-02	7.55E-03	1.15E-07	ND	8.23E-09	1.47E-07	3.65E-04	2.50E-03
	#17	ND	ND	7.13E-08	1.19E-06	2.21E-02	1.96E-04	ND	ND	ND	5.22E-06	2.49E-06	5.49E-04
	#18	1.21E-07	6.07E-07	2.37E-09	1.25E-08	2.67E-04	7.36E-05	6.57E-06	ND	2.36E-08	3.58E-07	9.24E-08	8.32E-05
	#19	1.03E-07	3.80E-08	ND	9.62E-09	4.54E-05	4.69E-05	1.06E-05	ND	2.43E-07	2.84E-08	8.71E-07	5.80E-05
以豬糞為 主的禽畜 糞堆肥	#20	2.28E-05	ND	7.88E-07	3.10E-07	8.70E-02	1.94E-03	ND	ND	2.88E-07	4.80E-05	ND	5.27E-02
	#21	1.93E-05	5.20E-06	1.47E-07	3.84E-08	9.16E-03	2.39E-02	1.05E-07	ND	1.09E-07	2.11E-05	7.48E-03	1.33E-02
	#22	3.94E-08	1.04E-07	ND	ND	1.47E-05	7.95E-07	1.50E-05	ND	3.00E-08	1.29E-07	6.62E-08	3.22E-06
	#23	ND	5.25E-05	ND	4.10E-06	ND	9.32E-04	ND	2.58E-07	1.35E-06	4.55E-04	ND	1.02E-02
混合兩種 以上禽畜 糞的堆肥	#24	9.99E-06	ND	ND	5.57E-06	5.40E-02	1.16E-02	ND	ND	ND	1.33E-04	1.74E-05	4.72E-02
	#25	ND	ND	ND	2.06E-10	4.68E-05	4.39E-05	ND	ND	4.65E-10	ND	ND	1.85E-04
	#26	6.29E-09	2.05E-06	2.02E-09	1.19E-07	2.12E-04	1.79E-04	9.50E-10	ND	4.31E-09	6.91E-07	3.10E-08	9.11E-05
	#27	3.01E-08	4.41E-07	8.92E-11	9.30E-11	1.44E-04	1.25E-04	ND	ND	1.10E-09	1.63E-07	2.40E-08	2.11E-04
	#28	3.59E-06	1.45E-07	ND	3.59E-09	3.67E-05	2.16E-05	6.79E-07	ND	1.41E-07	5.28E-07	3.46E-07	8.68E-06

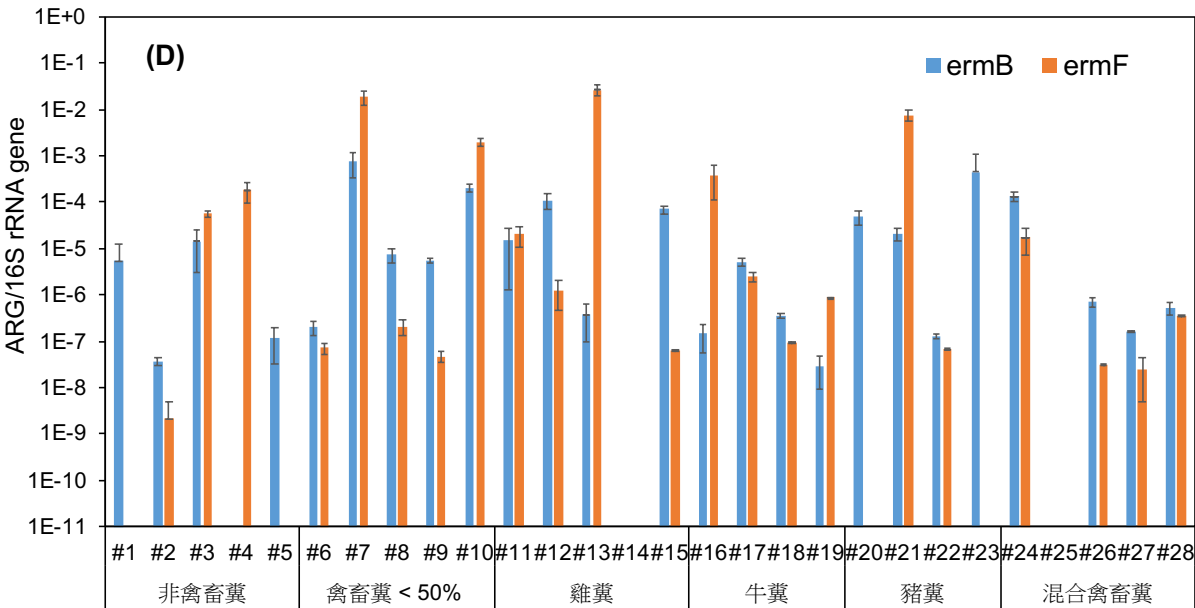
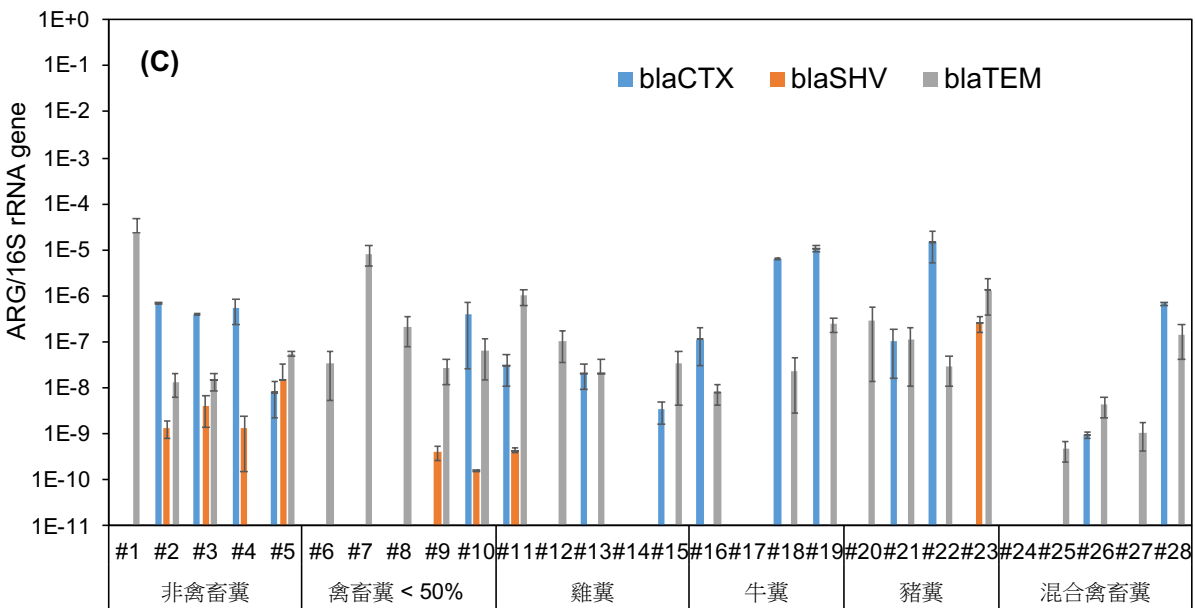


#### 4.1.4 堆肥樣品所含 ARGs 與 MGE 之定量：相對豐度

表 4-6 為堆肥樣品內的各個抗生素抗性基因的絕對濃度以其 16S rRNA 基因的絕對濃度標準化後所得的相對豐度。將表格中的不同類別的 ARG 與 MGE 數值製圖成圖 4-5，以及將各個抗性基因相對豐度加總後所得到結果示於圖 4-6。







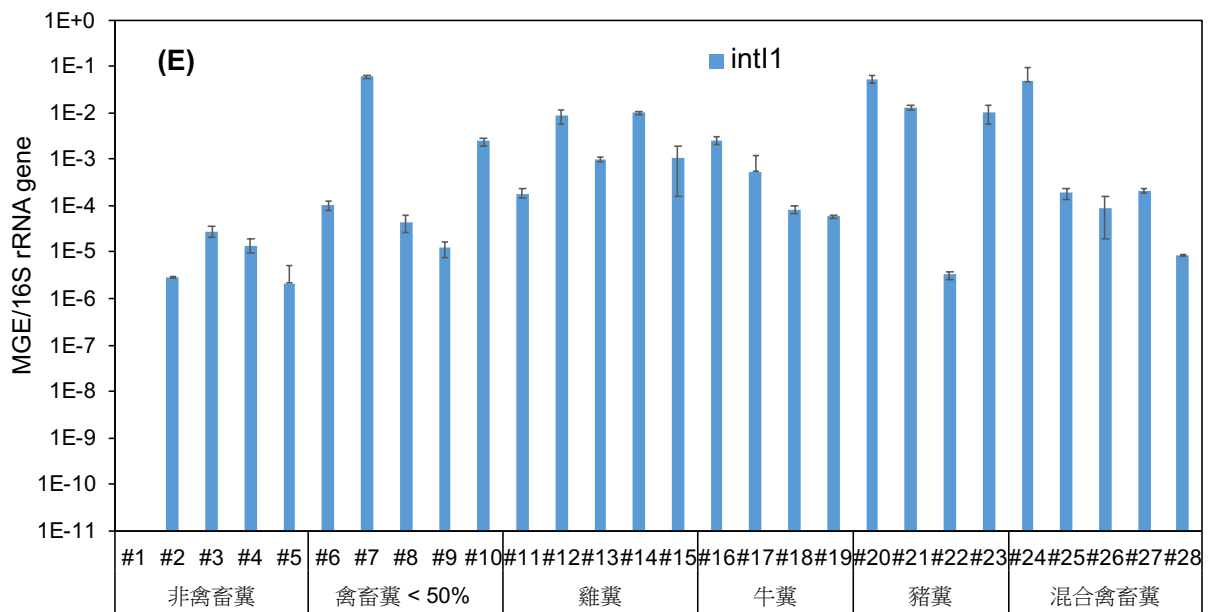


圖 4-5 不同組別之堆肥樣品其單位乾重所含的(A)四環素類、(B)磺胺類類、(C)β-內醯胺類、(D)大環內酯類的抗生素抗性基因，以及(E)第一型整合子基因的絕對豐度值，以同樣品相同單位乾重之 16S-rRNA 基因的絕對豐度標準化後的相對豐度值。

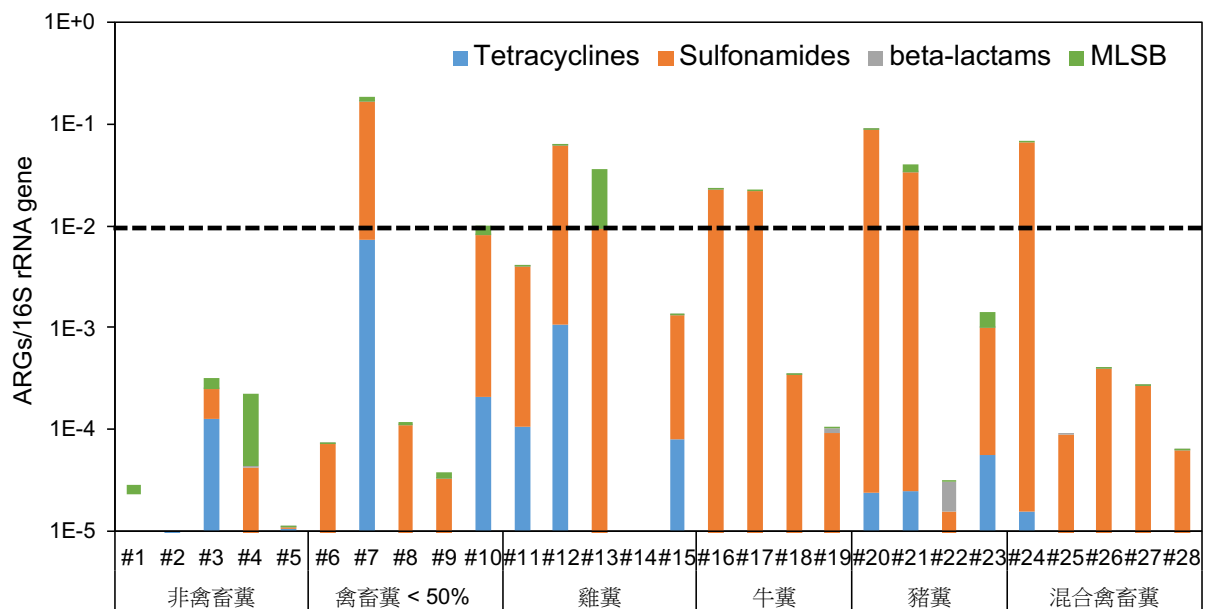


圖 4-6 各堆肥樣品內的各個抗性基因的相對豐度加總。



由於本研究所分析的為胞內的遺傳物質，因此不同樣品內的抗性基因濃度經 16S-rRNA 基因標準化以彌平因不同樣品內所含的細菌細胞數不同而帶來的差異後，可開始互相比較各樣品間的抗性基因含量高低。由圖 4-5 與圖 4-6 更可看出不含禽畜糞便的堆肥樣品，不管在不同種類的抗性基因濃度（包括移動基因元件）、或是在所有抗性基因加總後的濃度，皆比含有禽畜糞的堆肥樣品為低，進一步說明禽畜糞便即使在經過堆肥程序後，與植物類的生質廢棄物相比，將會蘊藏較高潛勢的抗生素抗性傳播。

值得一提的是，在含有禽畜糞的堆肥樣品中，不論是含有何種型態的禽畜糞（單獨的豬糞、雞糞、牛糞或互相混合），且不論含量多寡（<50%或幾乎以禽畜糞為基底），其 *intI1* 的相對豐度彼此間的差異並不顯著（ $p > 0.05$ ），暗示著只要含有禽畜糞，堆肥內不同物種的微生物彼此間互換基因的潛力與程度相差無幾，亦即相較於不含禽畜糞的堆肥，這些從禽畜糞製成的堆肥在抗生素抗性基因的傳播上，會更為容易。從圖 4-5 與 4-6 也可觀察到含有禽畜糞的各堆肥樣品其抗性基因的相對豐度彼此間也有顯著差異，這或許與堆肥製造過程的操作參數有關。非禽畜糞的堆肥樣品除了 CS#1 外，其餘間的抗性基因相對濃度上的差異，反而沒有禽畜糞堆肥來得這麼劇烈。

## 4.2 沼液沼渣

本期計畫的主要用意是希望能調查與了解沼液沼渣於農地再利用時，是否將顯著造成抗生素抗藥性在農地、以至於一般環境的累積與傳播。過往的文獻資料以及上述針對國內市售堆肥的採樣分析結果，都已顯示出禽畜糞便是導致環境抗生素抗藥性顯著發展的源頭之一，而國外將此“源頭”用於農地以作為肥料或土壤改質劑的作法，近年來備受爭議與檢討，背後的原因主要在於這些“再利用”的糞肥大多只經過一段時間的簡單堆置後，即馬上施用於農地，其後果除了造成環境的優養化問題之外（如許多像是墨西哥灣等海岸邊所觀察到的 dead zone 現象），也已被視為是一般環境中培養“超級細菌”的溫床，並易間接造成國外務農者發生諸如皮膚感染、軟組織感染，以及慢性肺阻塞(chronic obstruction pulmonary disease, COPD)等疾病或公衛的問題。而從源頭阻止這些帶有高濃度抗性菌與抗性基因的禽畜糞便進入環境的方法，遂成為管控環境抗生素抗藥性孳長的必要手段。這當中，堆肥已被證實是相對有效的「降解」(degradation)與「滅活」(deactivation)的程序，此程序在針對抗生素與抗性菌/抗性基因的削減功效上是否達標，關鍵在於經歷“高溫”階段時的完整性是否足夠。

“高溫”的重要性也顯現在利用厭氧消化以降低抗藥性的程序上。相較於常溫跟中溫式的厭氧消化，過去的調查已表明“高溫”厭氧消化才是此問題的真正解決之道，但這卻非國內一般養豬養牛戶在處理動物排泄物時的厭氧消化操作方式。本計畫即為了釐清目前這項政策所推動的農藝方法，是否將對國內環境帶來衝擊，亦即藉由比對「沼液沼渣」內的抗性基因含量真否顯著高於「市售堆肥」：



如是，則代表此沼液沼渣「肥料」的施用相較於台灣一直以來常用的肥料（即一般堆肥），對於環境與公衛所帶來的風險潛勢較大。此外，除了源頭的比較，仍須檢視當沼液沼渣施作於農地後，抗生素抗藥性在土壤環境中的降解與失活速率是否較堆肥顯著：如是，則代表從促成抗藥性累積與傳播的角度來看，一般的農地施用將有可造成風險提高的後果，必須要有適當的“管末處理”配套措施，好讓政策可以繼續施行、延續；如否，則代表此政策確實是一項值得鼓勵推廣的「廢棄物再利用」、「循環經濟」的典範。

這裡必需強調的是，區域性與全球性的抗生素抗藥性管控已被聯合國與世衛視為是建構「同一健康」“One Health”，使得人類、動物與生態環境的健康得以共同促進、維護和改善，以達到 2030 年永續發展目標的重要途徑。

本期計畫執行時在沼液沼渣的樣品取得上，與堆肥樣品相同，疫情的關係不僅讓執行團隊自身有所顧忌外，畜牧產養殖戶本身對於採樣時農友及養殖牲畜直接與外界接觸也有所顧忌。所幸這些問題最後都獲得解決，團隊在地方環保與農政單位、以及承攬相關業務的顧問公司協助下，於六月中旬至七月下旬期間，從新竹到雲林取得 20 戶養豬場與 7 戶養牛場紅泥膠皮沼氣袋旁的沼液沼渣樣本。

### 4.2.1 沼液沼渣樣品基本特性分析

表 4-7 與 4-8 分別為沼液沼渣樣品(digestate sample, DS)所測得的酸鹼度與電導度：pH 值在 6.3 與 7.2 之間，而電導度則差異較大，在 1.60 至~15 mS/cm 之間。

表 4-7 沼渣沼液樣品酸鹼度

樣品編號	pH	樣品編號	pH
DS#1	6.9	DS#15	6.6
DS#2	6.3	DS#16	6.6
DS#3	6.3	DS#17	6.6
DS#4	6.3	DS#18	6.6
DS#5	6.6	DS#19	6.6
DS#6	6.6	DS#20	6.6
DS#7	6.9	DS#21	7.2
DS#8	6.9	DS#22	6.6
DS#9	6.6	DS#23	6.6
DS#10	6.9	DS#24	6.9
DS#11	6.6	DS#25	6.9
DS#12	6.9	DS#26	6.6
DS#13	6.6	DS#27	7.2
DS#14	6.9		



表 4-8 沼渣沼液樣品導電度

樣品編號	EC (mS/cm)	樣品編號	EC (mS/cm)
DS#1	7.93	DS#15	1.60
DS#2	3.12	DS#16	2.24
DS#3	4.95	DS#17	4.75
DS#4	2.81	DS#18	1.70
DS#5	3.61	DS#19	7.72
DS#6	1.67	DS#20	2.21
DS#7	7.63	DS#21	5.47
DS#8	7.99	DS#22	3.05
DS#9	2.21	DS#23	5.94
DS#10	3.96	DS#24	4.84
DS#11	5.15	DS#25	14.69
DS#12	7.93	DS#26	1.99
DS#13	6.25	DS#27	6.12
DS#14	4.16		

至於總氮（~160 至~1200 mg/L 之間）、總磷（~12 至~300 mg/L）之間、銅（< 1.2 mg/L）及鋅（< 9 mg/L）的含量也與中興工程顧問社所測得的數據相當。

#### 4.2.2 沼液沼渣樣品 DNA 萃取品質品保確定

表 4-9 為 27 件沼液沼渣樣品萃取後所獲得的 DNA 之濃度與品質，整體而言與堆肥樣品（表 4-4）的情況相同：A260/A280 比值約略在 1.8 左右，A260/A230 比值則較為跳動、分散，但仍可接受。

#### 4.2.3 沼液沼渣樣品所含 ARGs 與 MGE 之定量：絕對濃度

表 4-10 為沼液沼渣樣品內的各個抗生素抗性基因與第一型整合子基因單位體積下的絕對濃度值。同樣地，將表中不同種類的抗性基因的數值分別與加總製圖，可如圖 4-7 與 4-8 所示。從表 4-10 與圖 4-7 可看出，雖然無法直接類比，但相較於堆肥樣品（表 4-5 與圖 4-2），沼液沼渣樣品本身除了β-內醯胺類相關的基因無法一一測得外（尤其是 *bla*<sub>CTX</sub>），其餘抗性基因的檢測率皆高於堆肥樣品。較高的檢測率某種程度說明沼液沼渣內的基因含量較堆肥豐富或完整，也代表著與堆肥程序相比，或許“中/常溫”厭氧消化程序對於遺傳生物分子（即抗性基因等）、甚至為生物細胞（即抗性菌）的削減率也較差。





表 4-9 各沼液沼渣樣品萃取所得之 DNA 的濃度與品質

樣品編號	DNA (ng/μL)	A260/A280	A260/A230
DS#1	22.2	1.77	1.64
DS#2	40.6	1.79	1.69
DS#3	20.1	1.78	1.30
DS#4	56.2	1.80	1.67
DS#5	83.6	1.84	2.19
DS#6	33.6	1.83	1.95
DS#7	61.3	1.80	1.96
DS#8	70.9	1.84	2.06
DS#9	32.9	1.79	0.96
DS#10	41.9	1.78	1.87
DS#11	22.2	1.95	4.12
DS#12	66.9	1.87	3.39
DS#13	32.8	1.93	0.99
DS#14	65.1	1.82	1.88
DS#15	31.8	1.96	2.02
DS#16	30.0	1.88	1.84
DS#17	22.1	2.01	1.92
DS#18	37.8	1.92	2.16
DS#19	40.7	1.87	2.02
DS#20	47.8	1.85	1.85
DS#21	88.0	1.85	2.26
DS#22	25.5	1.82	2.03
DS#23	40.7	1.93	3.14
DS#24	50.4	1.85	2.58
DS#25	20.0	1.83	1.99
DS#26	31.9	1.83	2.42
DS#27	32.6	1.79	2.17

若進一步檢視沼液沼渣樣品內各類別抗性基因的相對佔比，可知四環素類的抗性基因以 *tetM* 為主、磺胺類的則以 *sul1* 為主、 $\beta$ -內醯胺類及大環內酯類則分別以 *bla<sub>TEM</sub>* 及 *ermB* 為主，此種佔比趨勢與堆肥不同，堆肥樣品除了在三環素類有較明確的也是以 *tetM* 為主外，其餘類別的則較不易分辨出相對優勢的抗性基因，這也許可解釋成堆肥程序對於各類抗性基因的降解程度較為相近。即使如此，「堆肥」與「沼液沼渣」兩類肥料的抗性基因絕對濃度幾乎都以磺胺類的 *sul1* 與 *sul2* 濃度最高。

從圖 4-7 及圖 4-8 的結果也可看出，各養殖場不論豬隻或牛隻糞便內所含的抗性基因經過驗氧消化程序後的絕對濃度，兩者不至於差異過大，此點與堆肥樣品類似，也就是不同動物的禽畜糞所含的抗性基因絕對值，但如前節所述，不含禽畜糞的堆肥樣品所帶有抗性基因含量較禽畜糞堆肥少。即使如此，沼液沼渣樣品內的抗性基因仍較堆肥內的分佈較為均勻。此外，沼液沼渣的抗性基因絕對濃度上也不因縣市（竹、苗、中、彰、雲）及動物（豬、牛）而有明顯差異。

表 4-10 沼液沼渣抗性基因、第一型整合子基因的絕對濃度 (單位：ARG or MGE copies/mL)

			Tetracycline				Sulfonamide		Beta-lactam			MLSB		MGE
樣品 (縣市/動物/編號)			<i>tetA</i>	<i>tetM</i>	<i>tetO</i>	<i>tetW</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>bla</i> <sub>CTX</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>ermB</i>	<i>ermF</i>	<i>int1</i>
臺中	豬	#1	6.03E+04	6.40E+06	7.63E+05	7.93E+05	1.88E+07	7.14E+05	N.D.	1.14E+02	3.21E+03	4.15E+06	2.50E+03	1.49E+07
臺中	豬	#2	1.01E+08	2.23E+08	1.59E+07	2.35E+07	3.97E+09	2.18E+08	N.D.	1.40E+03	1.32E+06	6.48E+07	2.67E+04	3.93E+08
臺中	豬	#3	3.99E+06	2.58E+08	3.94E+07	1.92E+07	4.94E+08	7.35E+07	N.D.	N.D.	6.94E+04	3.46E+07	2.06E+04	1.36E+08
臺中	豬	#4	4.05E+05	1.67E+07	1.33E+06	2.22E+06	6.26E+07	4.14E+06	N.D.	1.90E+00	2.42E+04	2.50E+06	1.37E+03	1.68E+07
臺中	豬	#5	4.78E+06	1.47E+10	2.08E+07	2.02E+08	7.01E+08	6.12E+07	N.D.	6.32E+01	3.82E+05	4.24E+07	9.09E+03	2.27E+08
臺中	牛	#6	1.18E+06	7.53E+06	8.01E+05	1.14E+06	2.25E+08	7.21E+06	N.D.	3.49E+01	1.22E+05	7.54E+05	9.72E+03	1.15E+08
彰化	豬	#7	1.84E+06	3.50E+08	7.48E+07	4.90E+07	7.57E+09	5.63E+08	N.D.	1.46E+02	1.37E+05	1.21E+08	4.25E+04	3.17E+09
彰化	豬	#8	8.69E+04	1.31E+08	9.53E+06	2.10E+07	1.31E+09	6.71E+07	N.D.	N.D.	4.44E+04	7.15E+07	1.65E+04	7.91E+07
彰化	牛	#9	2.76E+06	5.07E+07	3.28E+07	2.19E+07	3.40E+08	4.63E+07	N.D.	2.45E+02	9.13E+04	5.15E+06	4.76E+04	2.53E+08
彰化	牛	#10	1.87E+06	1.35E+07	4.18E+06	6.44E+06	7.35E+08	4.12E+07	N.D.	4.82E+01	4.68E+04	1.24E+07	1.10E+04	7.65E+08
彰化	豬	#11	1.19E+04	8.66E+06	6.85E+05	4.78E+05	3.00E+07	1.05E+06	N.D.	N.D.	2.91E+03	1.79E+06	5.09E+03	3.78E+06
彰化	豬	#12	1.70E+05	1.82E+08	2.89E+07	1.34E+07	2.52E+09	2.16E+07	N.D.	N.D.	2.56E+04	4.03E+07	2.53E+04	4.38E+07
彰化	豬	#13	4.90E+04	1.61E+07	5.07E+06	5.63E+05	8.64E+07	1.02E+06	N.D.	N.D.	4.51E+03	4.52E+06	2.86E+03	1.81E+07
雲林	牛	#14	2.24E+06	4.10E+07	2.53E+07	1.54E+07	1.94E+08	1.38E+07	N.D.	N.D.	3.81E+04	6.81E+06	2.33E+04	7.49E+07
雲林	豬	#15	1.73E+05	1.56E+06	2.81E+05	2.26E+05	1.03E+08	8.95E+06	N.D.	N.D.	1.61E+03	1.10E+05	3.28E+03	3.70E+07
雲林	牛	#16	2.64E+05	6.21E+06	7.56E+05	1.49E+06	5.09E+07	2.19E+06	N.D.	4.63E+04	1.34E+05	1.27E+06	4.64E+03	2.46E+07
雲林	豬	#17	4.23E+06	9.93E+07	4.48E+06	4.68E+06	1.13E+08	1.47E+07	N.D.	N.D.	2.57E+05	1.07E+07	6.73E+03	4.24E+07
雲林	牛	#18	1.90E+06	1.47E+07	3.98E+06	3.67E+06	6.15E+07	2.07E+07	1.38E+04	5.11E+04	2.56E+05	4.80E+06	8.68E+03	6.62E+07

表 4-10 沼液沼渣抗性基因、第一型整合子基因的絕對濃度 (單位：ARG or MGE copies/mL) [續]

			Tetracycline				Sulfonamide		Beta-lactam			MLSB		MGE
樣品 (縣市/動物/編號)			<i>tetA</i>	<i>tetM</i>	<i>tetO</i>	<i>tetW</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>bla</i> <sub>CTX</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>ermB</i>	<i>ermF</i>	<i>intI1</i>
雲林	豬	#19	3.20E+06	9.96E+07	3.11E+07	1.30E+07	1.81E+08	2.21E+07	N.D.	N.D.	1.28E+05	4.29E+07	1.33E+04	8.58E+07
雲林	牛	#20	6.66E+06	4.21E+07	8.69E+06	1.15E+07	2.06E+08	6.65E+07	1.48E+05	2.70E+03	8.02E+05	1.92E+07	1.12E+04	1.81E+08
雲林	豬	#21	1.37E+07	N.D.	2.85E+06	3.93E+06	1.57E+09	9.38E+07	N.D.	1.77E+01	4.22E+04	2.61E+07	6.55E+03	7.18E+10
雲林	豬	#22	6.17E+05	1.32E+07	3.00E+06	1.87E+06	7.13E+07	2.27E+06	7.58E+02	6.75E+01	8.16E+04	1.05E+06	2.39E+03	3.98E+07
雲林	豬	#23	5.53E+04	2.92E+07	3.08E+06	2.83E+06	1.85E+08	1.86E+06	1.19E+03	6.69E+01	1.29E+04	1.19E+07	1.17E+04	1.82E+07
苗栗	豬	#24	5.77E+05	3.43E+07	8.82E+06	1.45E+06	2.39E+08	1.99E+07	N.D.	1.01E+01	2.56E+04	4.66E+06	4.50E+03	2.31E+08
苗栗	豬	#25	7.34E+05	3.31E+07	2.25E+06	4.81E+05	5.45E+07	3.89E+06	N.D.	4.63E+00	9.07E+04	5.47E+06	4.91E+03	3.92E+07
新竹	豬	#26	3.33E+05	2.64E+06	3.45E+05	1.51E+05	5.45E+07	1.85E+07	N.D.	2.28E+01	1.91E+03	2.77E+05	3.11E+03	4.28E+07
雲林	豬	#27	4.36E+05	3.16E+07	1.83E+06	1.47E+06	1.14E+08	7.35E+06	N.D.	3.20E+01	2.28E+03	9.04E+06	6.60E+03	1.09E+08

表 4-11 沼液沼渣抗性基因、第一型整合子基因與 16S 核糖體基因的相對豐度 (單位：ARG or MGE copies/16S rRNA gene copies)

			Tetracycline				Sulfonamide		Beta-lactam			MLSB		MGE
樣品 (縣市/動物/編號)			<i>tetA</i>	<i>tetM</i>	<i>tetO</i>	<i>tetW</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>bla</i> <sub>CTX</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>ermB</i>	<i>ermF</i>	<i>intI1</i>
臺中	豬	#1	3.27E-05	3.47E-03	4.14E-04	4.30E-04	1.02E-02	3.87E-04	N.D.	6.18E-08	1.74E-06	2.25E-03	1.35E-06	8.08E-03
臺中	豬	#2	7.90E-03	1.74E-02	1.24E-03	1.84E-03	3.10E-01	1.70E-02	N.D.	1.10E-07	1.03E-04	5.06E-03	2.09E-06	3.07E-02
臺中	豬	#3	3.73E-04	2.41E-02	3.69E-03	1.80E-03	4.62E-02	6.87E-03	N.D.	N.D.	6.49E-06	3.24E-03	1.93E-06	1.27E-02
臺中	豬	#4	1.83E-04	7.55E-03	5.99E-04	1.00E-03	2.83E-02	1.87E-03	N.D.	8.59E-10	1.09E-05	1.13E-03	6.20E-07	7.60E-03
臺中	豬	#5	2.47E-04	7.60E-01	1.08E-03	1.04E-02	3.62E-02	3.16E-03	N.D.	3.27E-09	1.97E-05	2.19E-03	4.69E-07	1.17E-02
臺中	牛	#6	1.47E-04	9.39E-04	9.99E-05	1.42E-04	2.81E-02	9.00E-04	N.D.	4.35E-09	1.53E-05	9.40E-05	1.21E-06	1.43E-02
彰化	豬	#7	4.98E-05	9.47E-03	2.02E-03	1.33E-03	2.05E-01	1.52E-02	N.D.	3.95E-09	3.70E-06	3.27E-03	1.15E-06	8.60E-02
彰化	豬	#8	3.79E-06	5.73E-03	4.16E-04	9.15E-04	5.71E-02	2.93E-03	N.D.	N.D.	1.94E-06	3.12E-03	7.20E-07	3.45E-03
彰化	牛	#9	8.37E-05	1.53E-03	9.92E-04	6.62E-04	1.03E-02	1.40E-03	N.D.	7.40E-09	2.77E-06	1.56E-04	1.44E-06	7.67E-03
彰化	牛	#10	5.41E-05	3.90E-04	1.21E-04	1.87E-04	2.13E-02	1.19E-03	N.D.	1.40E-09	1.36E-06	3.60E-04	3.18E-07	2.21E-02
彰化	豬	#11	4.75E-05	3.45E-02	2.73E-03	1.90E-03	1.20E-01	4.18E-03	N.D.	N.D.	1.16E-05	7.15E-03	2.03E-05	1.51E-02
彰化	豬	#12	1.30E-05	1.40E-02	2.22E-03	1.02E-03	1.93E-01	1.65E-03	N.D.	N.D.	1.96E-06	3.08E-03	1.94E-06	3.35E-03
彰化	豬	#13	9.21E-05	3.03E-02	9.53E-03	1.06E-03	1.63E-01	1.91E-03	N.D.	N.D.	8.48E-06	8.50E-03	5.38E-06	3.40E-02
雲林	牛	#14	4.70E-05	8.62E-04	5.31E-04	3.25E-04	4.08E-03	2.90E-04	N.D.	N.D.	8.01E-07	1.43E-04	4.89E-07	1.57E-03
雲林	豬	#15	1.71E-04	1.54E-03	2.78E-04	2.23E-04	1.02E-01	8.85E-03	N.D.	N.D.	1.59E-06	1.09E-04	3.24E-06	3.65E-02
雲林	牛	#16	8.37E-05	1.97E-03	2.40E-04	4.73E-04	1.61E-02	6.96E-04	N.D.	1.47E-05	4.24E-05	4.04E-04	1.47E-06	7.80E-03
雲林	豬	#17	1.33E-03	3.12E-02	1.41E-03	1.47E-03	3.55E-02	4.61E-03	N.D.	N.D.	8.07E-05	3.37E-03	2.11E-06	1.33E-02
雲林	牛	#18	1.18E-04	9.13E-04	2.47E-04	2.28E-04	3.82E-03	1.29E-03	8.57E-07	3.18E-06	1.59E-05	2.99E-04	5.40E-07	4.11E-03

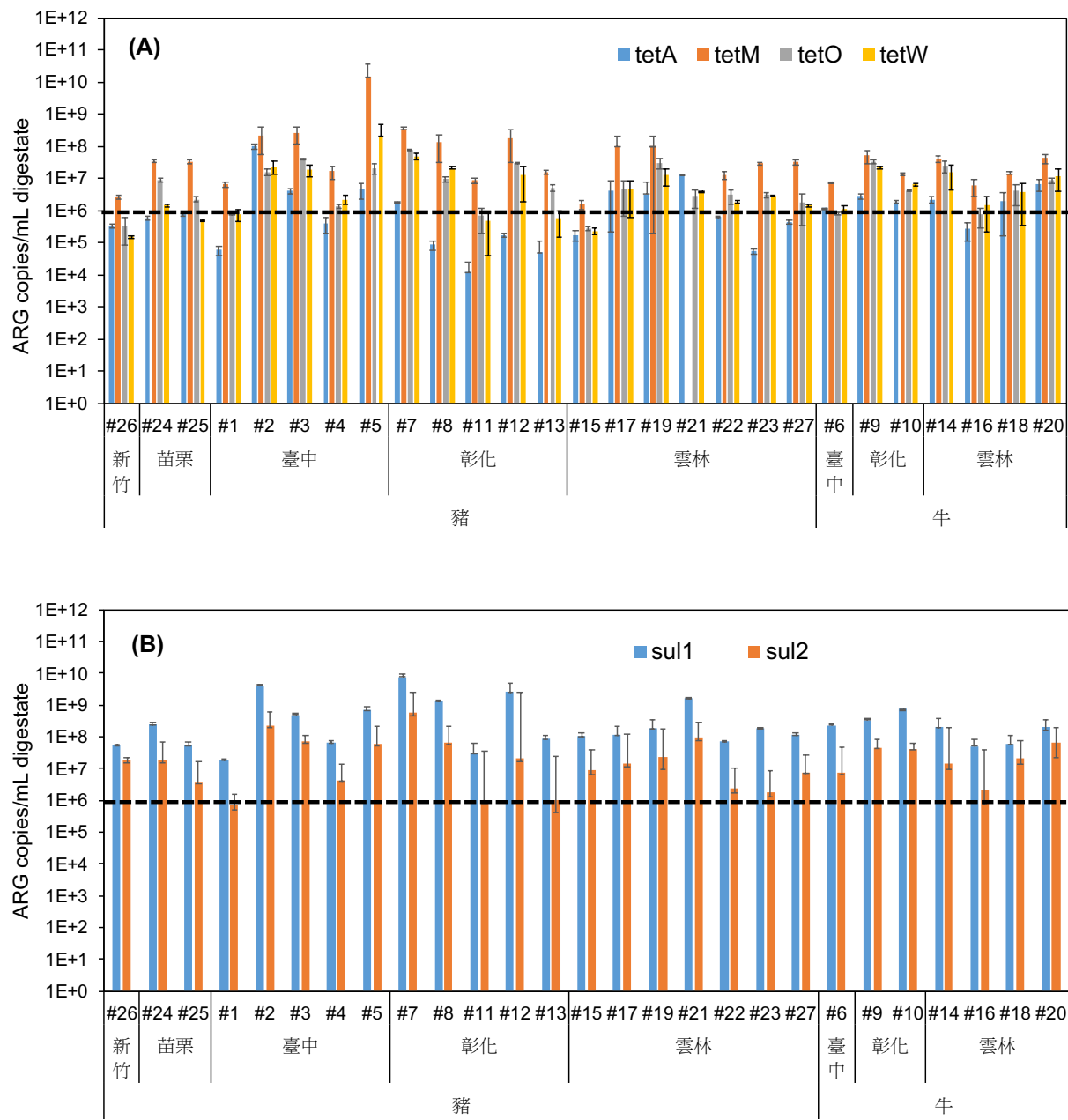
表 4-11 沼液沼渣抗性基因、第一型整合子基因與 16S 核糖體基因的相對豐度 (單位：ARG or MGE copies/16S rRNA gene copies) [續]

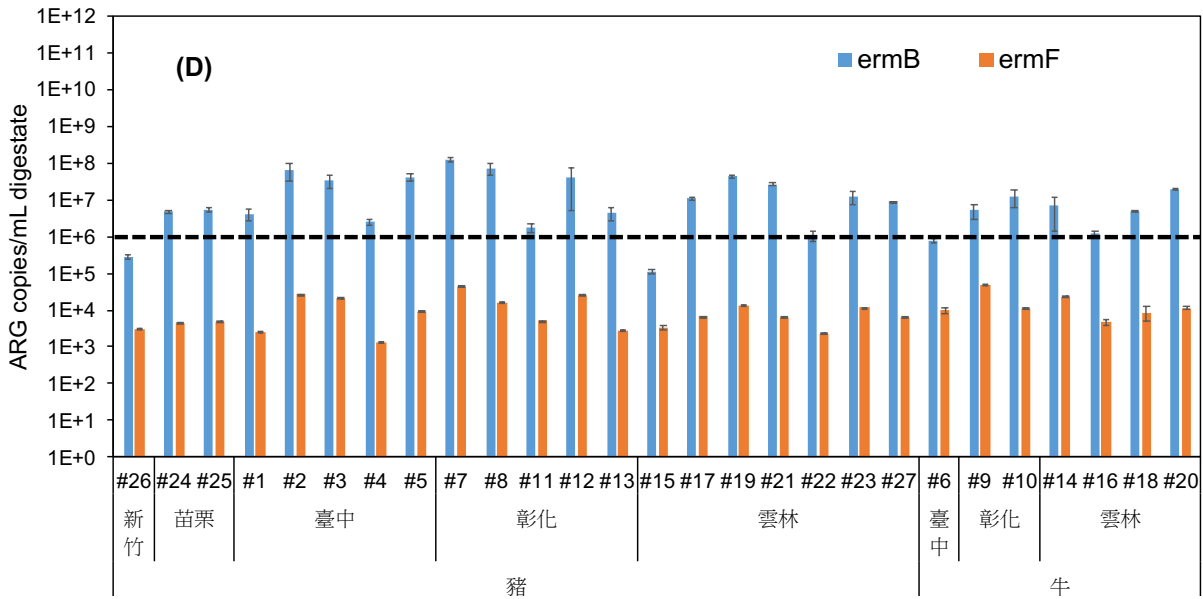
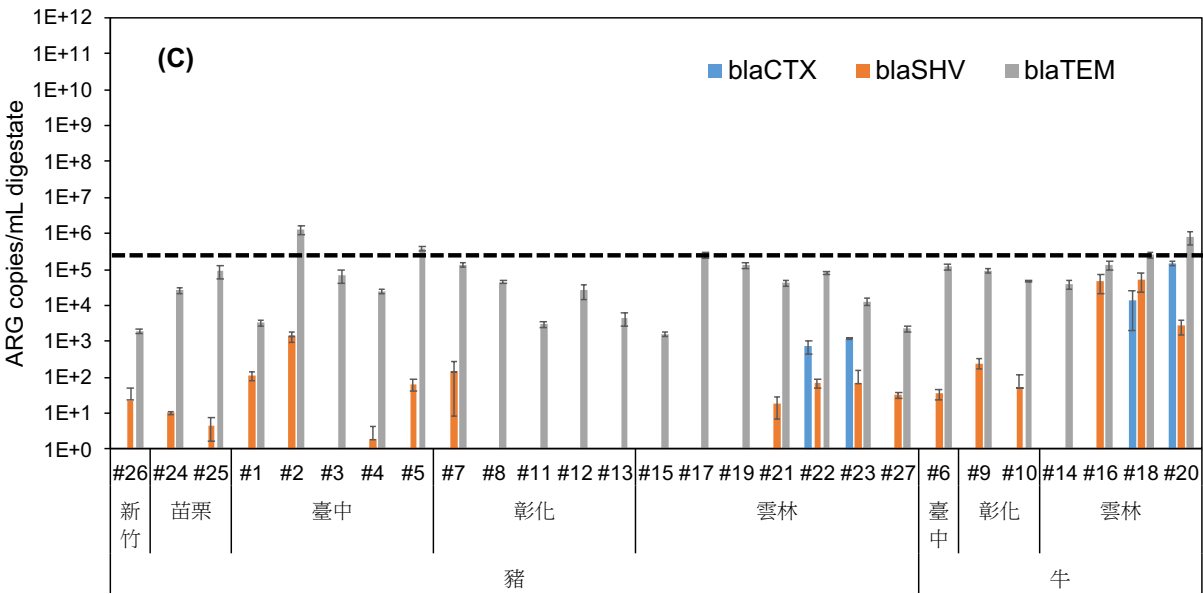
			Tetracycline				Sulfonamide		Beta-lactam			MLSB		MGE
樣品 (縣市/動物/編號)			<i>tetA</i>	<i>tetM</i>	<i>tetO</i>	<i>tetW</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>bla</i> <sub>CTX</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	<i>ermB</i>	<i>ermF</i>	<i>intI1</i>
雲林	豬	#19	4.76E-04	1.48E-02	4.62E-03	1.94E-03	2.69E-02	3.28E-03	N.D.	N.D.	1.90E-05	6.37E-03	1.97E-06	1.27E-02
雲林	牛	#20	3.85E-04	2.43E-03	5.02E-04	6.62E-04	1.19E-02	3.84E-03	8.55E-06	1.56E-07	4.64E-05	1.11E-03	6.47E-07	1.05E-02
雲林	豬	#21	6.49E-04	N.D.	1.36E-04	1.87E-04	7.47E-02	4.45E-03	N.D.	8.39E-10	2.00E-06	1.24E-03	3.11E-07	3.41E+00
雲林	豬	#22	5.85E-04	1.25E-02	2.84E-03	1.77E-03	6.75E-02	2.15E-03	7.18E-07	6.40E-08	7.73E-05	9.98E-04	2.27E-06	3.77E-02
雲林	豬	#23	2.04E-05	1.08E-02	1.14E-03	1.05E-03	6.83E-02	6.89E-04	4.39E-07	2.47E-08	4.77E-06	4.39E-03	4.32E-06	6.73E-03
苗栗	豬	#24	3.10E-04	1.84E-02	4.74E-03	7.81E-04	1.28E-01	1.07E-02	N.D.	5.42E-09	1.37E-05	2.50E-03	2.42E-06	1.24E-01
苗栗	豬	#25	2.74E-04	1.24E-02	8.40E-04	1.80E-04	2.04E-02	1.45E-03	N.D.	1.73E-09	3.39E-05	2.05E-03	1.83E-06	1.46E-02
新竹	豬	#26	1.41E-04	1.12E-03	1.46E-04	6.38E-05	2.30E-02	7.82E-03	N.D.	9.63E-09	8.07E-07	1.17E-04	1.31E-06	1.81E-02
雲林	豬	#27	2.87E-04	2.08E-02	1.20E-03	9.69E-04	7.52E-02	4.84E-03	N.D.	2.11E-08	1.50E-06	5.95E-03	4.34E-06	7.15E-02





商業有機肥料與沼渣沼液作為環境抗生素抗藥性發展的潛在來源探究





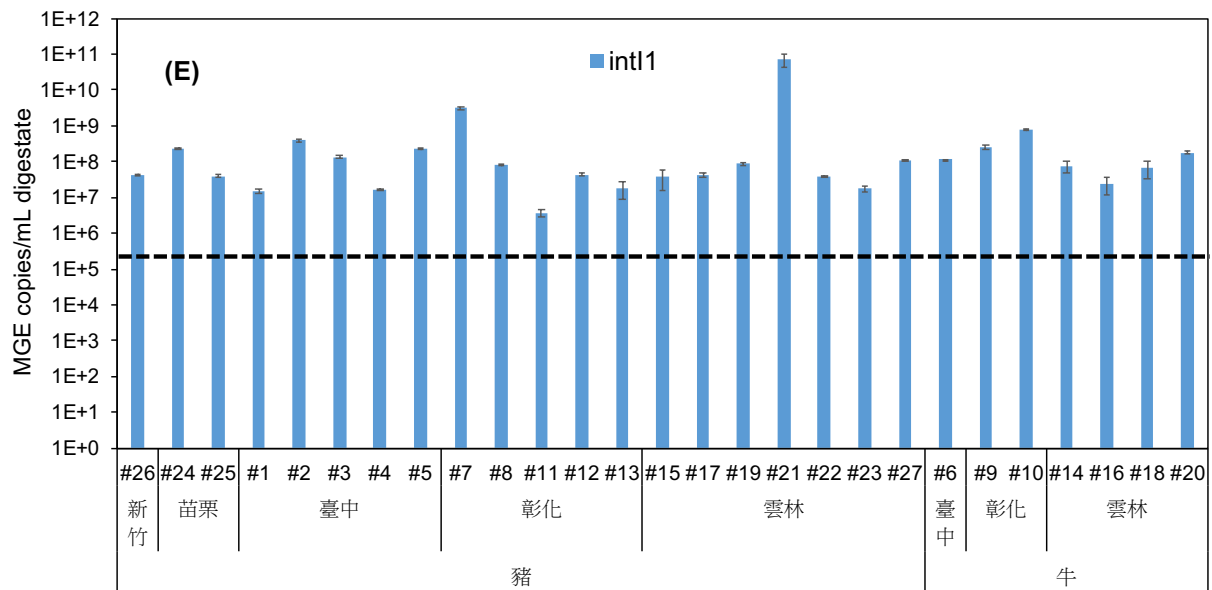


圖 4-7 不同組別之沼液沼渣樣品其單位體積所含的(A)四環素類、(B)磺胺類類、(C)β-內醯胺類、(D)大環內酯類的抗生素抗性基因，以及(E)第一型整合子基因的絕對豐度值。

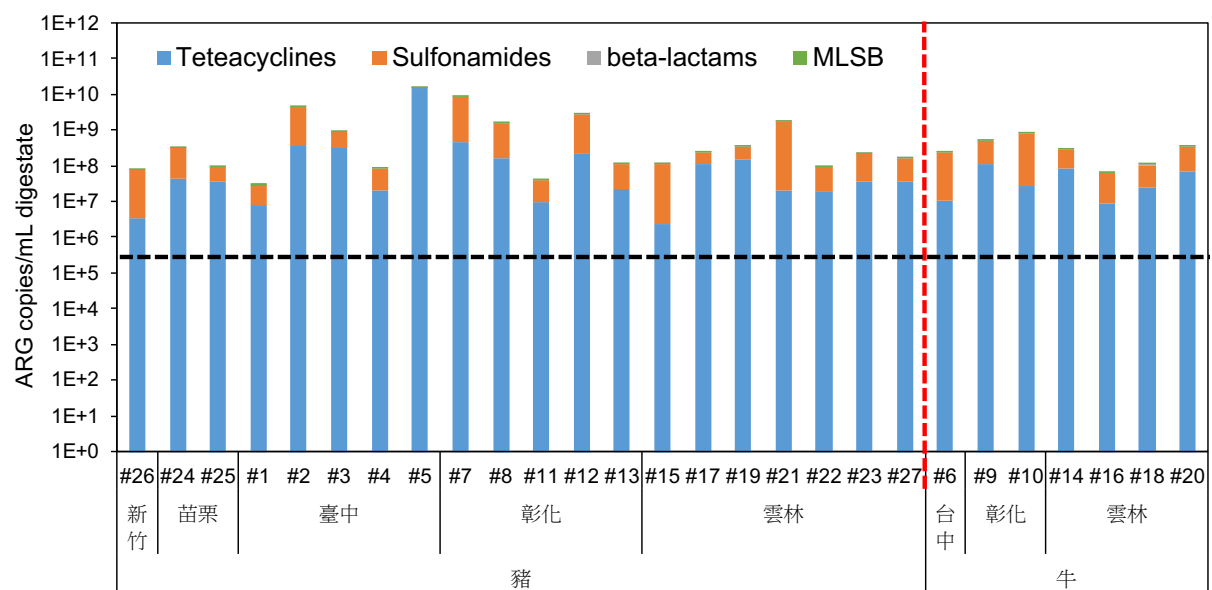


圖 4-8 沼液沼渣樣品內的各個抗性基因的絕對豐度加總。



#### 4.2.4 沼液沼渣樣品所含 ARGs 與 MGE 之定量：相對濃度

表 4-11 為沼液沼渣樣品內的各個抗生素抗性基因的絕對濃度以其 16S rRNA 基因的絕對濃度（圖 4-9）標準化後所得的相對豐度。這邊同樣也將表格中的不同類別的 ARG 與 MGE 數值製圖成圖 4-10，以及將各個抗性基因相對豐度加總後所得結果示於圖 4-11。

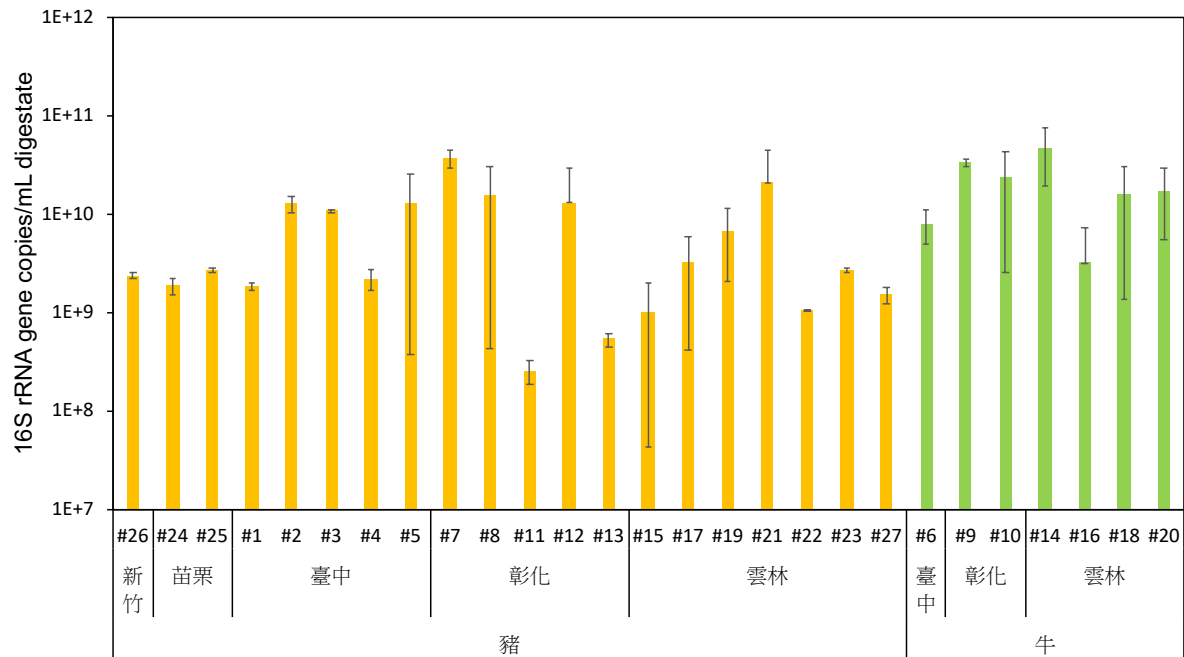
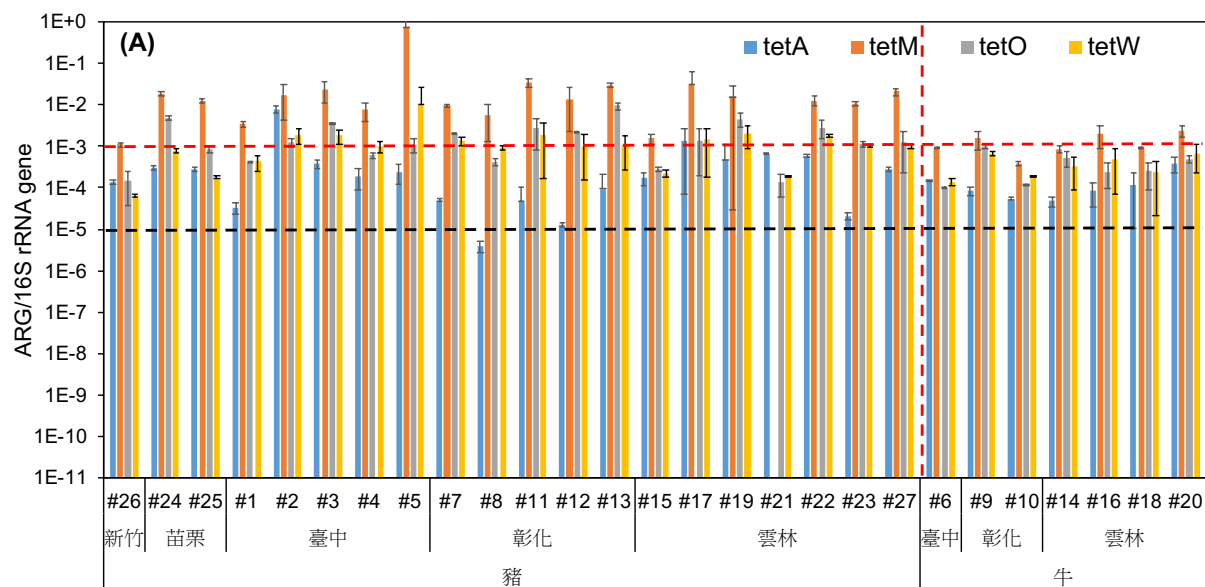
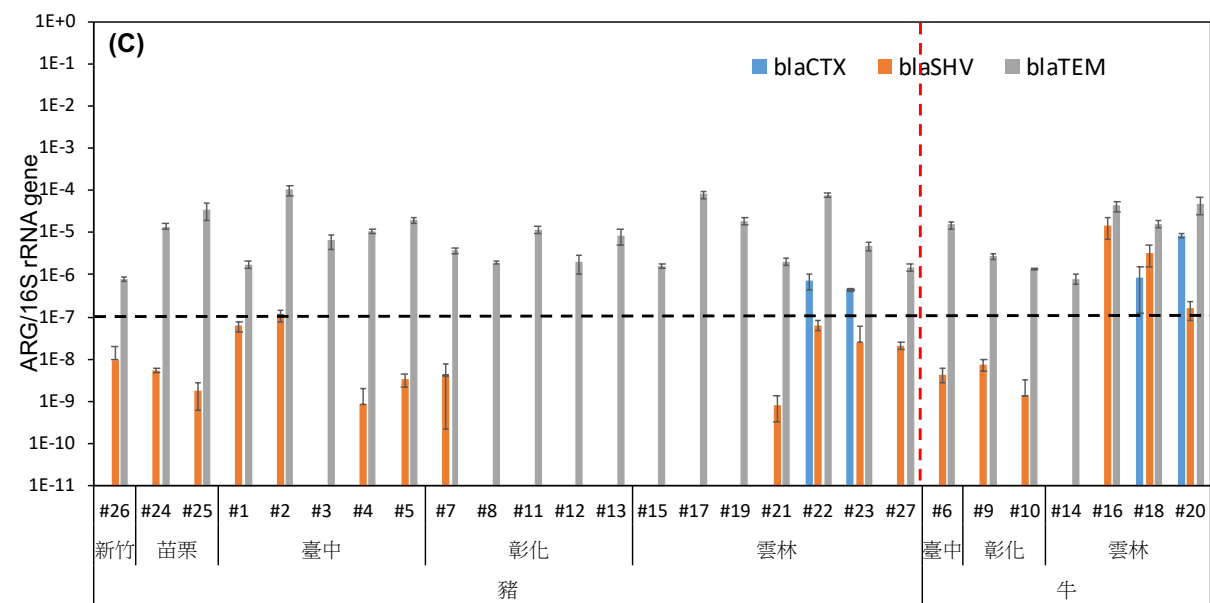
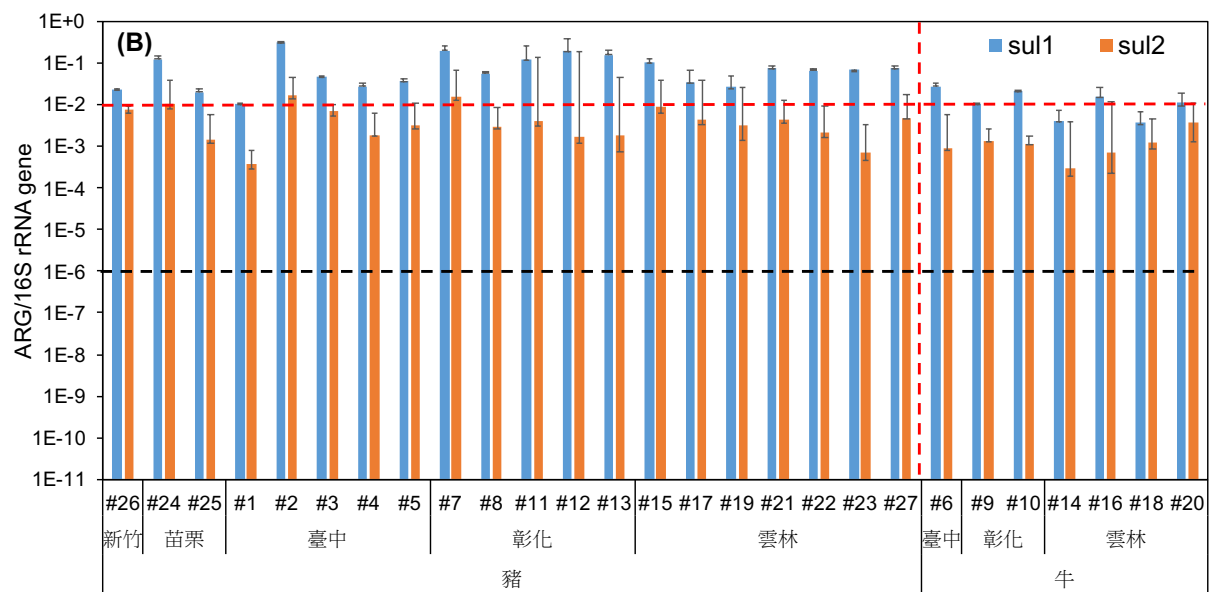
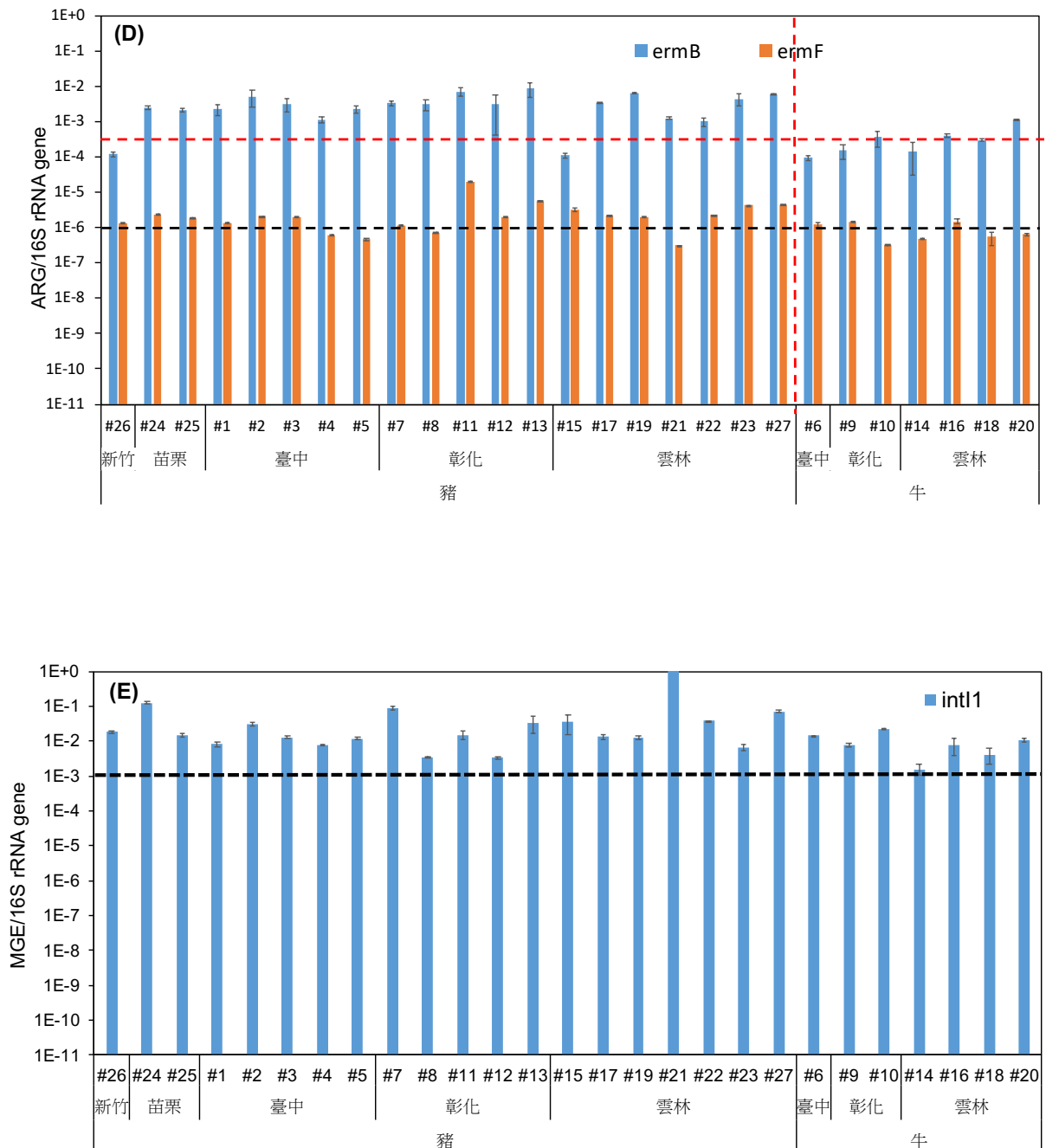


圖 4-9 各沼液沼渣樣品單位體積所含的 16S rRNA gene 絕對定量值。









**圖 4-10** 不同組別之沼液沼渣樣品其單位體積所含的(A)四環素類、(B)磺胺類類、(C)β-內醯胺類、(D)大環內酯類的抗生素抗性基因，以及(E)第一型整合子基因的絕對豐度值，以同樣品相同單位乾重之 16S-rRNA 基因的絕對豐度標準化後的相對豐度值。

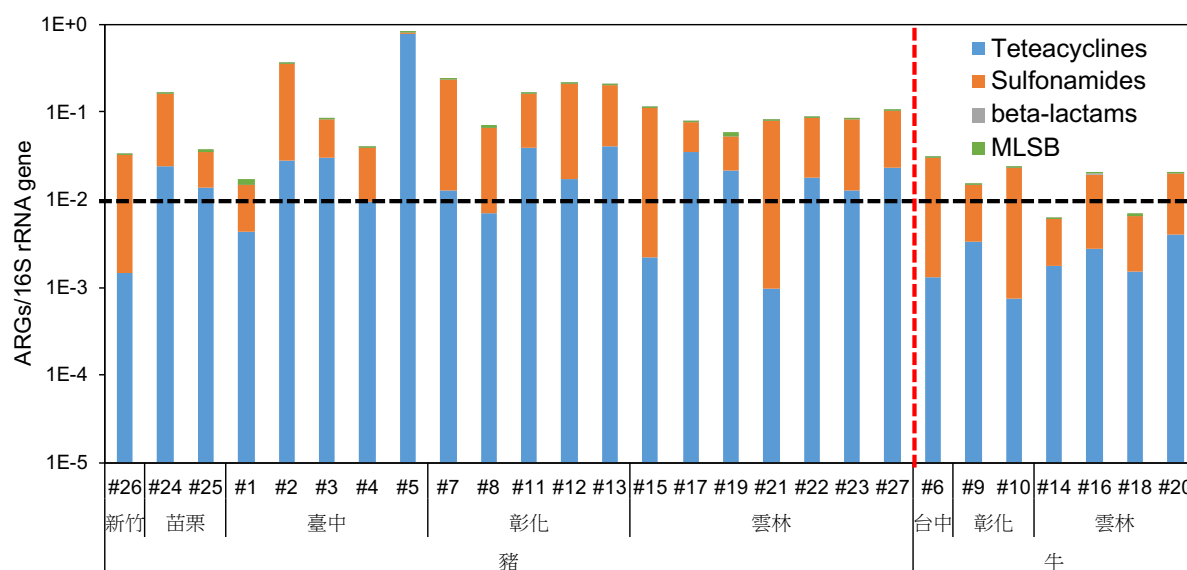


圖 4-11 各沼液沼渣樣品所測得的不同 ARG 相對豐度加總。

圖 4-9 的結果顯示出各樣品內含有的細菌數量不同，因此如要沼液沼渣樣品間互相比較，甚至與堆肥樣品比較抗性基因的多寡，勢必要針對“細菌細胞數”標準化、得到相對豐度值後才能開始相比。直到這裡開始進入本計畫的重頭戲。

從圖 4-10 的結果可看出，相對於豬糞尿，牛糞內的 *sul*、*erm* 以及 *intI1* 的相對豐度較低，因此當所有抗性基因的相對豐度一起考慮、加總後（比較符合實際施用肥料時會遇到的狀況），牛糞的數值顯著低於豬糞（圖 4-11 紅色虛線左右兩邊相比,  $p < 0.05$ ）。不僅如此，如果與所有堆肥樣品的總抗性基因相對豐度相比（圖 4-11 vs. 圖 4-6 兩圖的黑色虛線處），可看出沼液沼渣“整體”所蘊藏的抗生素抗藥性發展的風險遠高於堆肥，甚至即使部分以禽畜糞為基底的堆肥樣品其抗性基因相對豐度偏高，但程度上也不及沼液沼渣（可比較兩者的最大值）。如果進一步比對這些糞肥在施用後，其內所含的抗性基因藉由水平基因轉移的機制與途徑而在細菌族群間擴散的風險高低時，由圖 4-10 (E) vs. 圖 4-5 (E) 的整合子基因 *intI1* 的相對豐度值也可看出沼液沼渣“整體均勻”且“顯著”的高於堆肥。

這些結果與文獻所記錄的相同，也符合我們的假說，亦即「非」高溫式的厭氧消化程序對於生質廢棄物內的抗性基因含量多寡的處理，相較於堆肥並不有效。此也暗示著從源頭來看，以沼液沼渣作為肥料施灌於農地對於環境抗生素抗藥性的發展具有較高的潛勢與較大的風險。即使如此，仍是要檢視肥料澆灌至土壤後，抗性菌與抗性基因的「宿命」，才能做最後的判斷，因此需進行土壤培養縮模試驗，以及現地農地土壤的檢測。



### 4.3 抗性基因相對豐度 vs. 四環素類與磺胺類抗生素濃度

為了解抗性基因的相對豐度是否與抗生素濃度有相關性，本研究將抗性基因相對豐度最高的兩類抗生素四環素類與磺胺類，從堆肥與沼液沼渣樣品萃取並定量。因期程有限，本期計畫只能根據抗性基因的濃度梯度挑選出特定樣品進行抗生素的檢測（8 件堆肥及 8 件沼液沼渣）。檢測結果如表 4-12 與表 4-13 所示。從兩表的數據看來，可知四環素類中的四環素(tetracycline)以及磺胺類中的磺胺嘧啶(sulfadiazine)較易從堆肥樣品中測出；沼液沼渣樣品在四環素類則除了四環素外，氧四環素(oxytetracycline)也同樣在所有樣品中被檢出，而磺胺類中的磺胺嘧啶與磺胺二甲嘧啶(sulfamethazine)的檢出率則相當。從表可知所有被檢測到的抗生素濃度皆屬於 ppt 層級，與一般的環境測值類似；不過，若檢視堆肥 vs. 沼液沼渣的抗生素含量時，可發現沼液沼渣略高，特別是磺胺二甲嘧啶。這樣的結果也符合文獻所述，亦即禽畜糞便經堆肥處理後，許多抗生素的濃度可因此降低或去除。

若將兩類抗生素濃度分別與所對應的抗性基因製圖（圖 4-12），可看出「抗生素」與「抗性基因」兩者間並無任何顯著相關性，符合文獻所述與原本的預期。

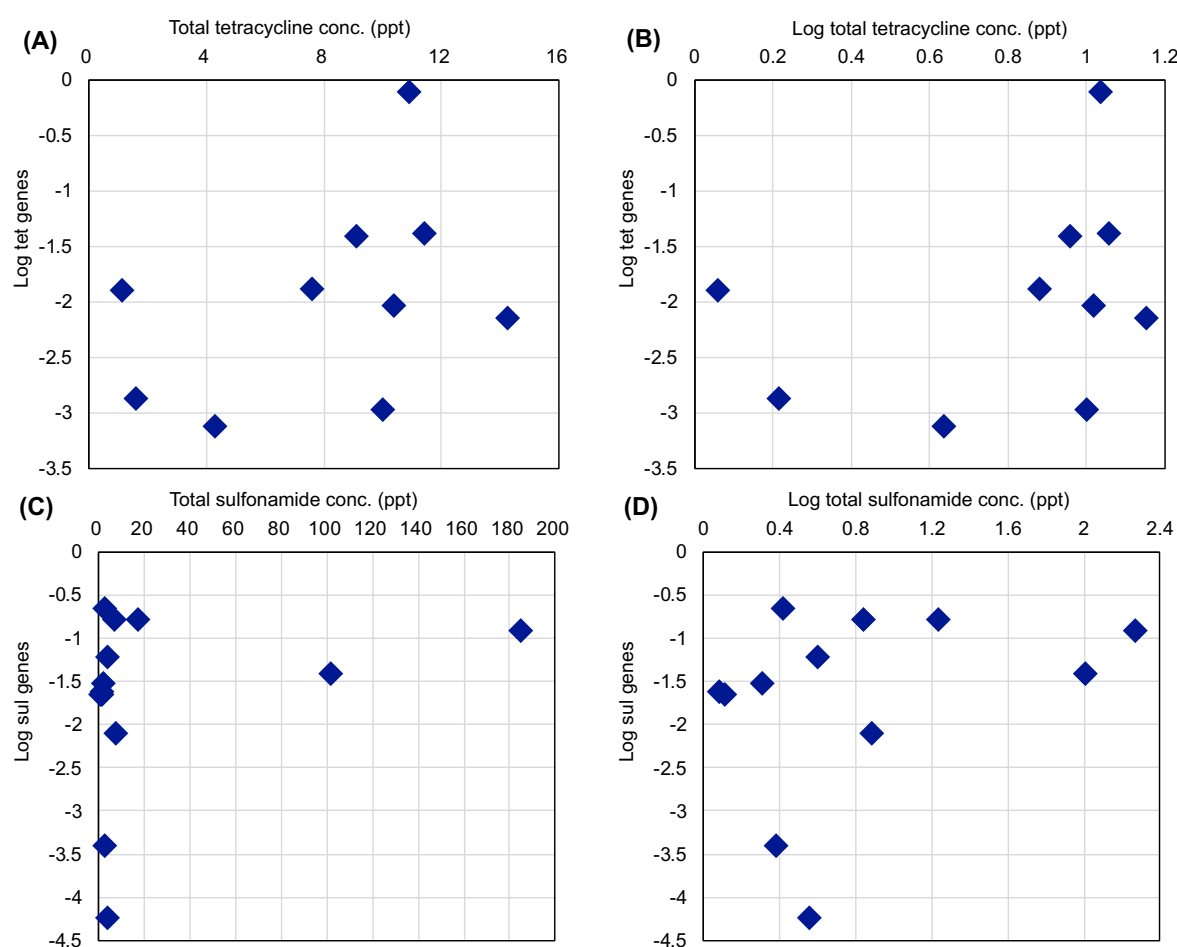


圖 4-12 堆肥與沼液沼渣樣品的四環素類抗生素濃度與 *tet* 相對豐度的(A)半對數與(B)全對數關係，以及磺胺類抗生素濃度與 *sul* 相對豐度的(C)半對數與(D)全對數關係。

表 4-12 肥料樣品中四環素類及磺胺類抗生素濃度

編號	肥料樣品名稱	氯四環素 Chlorotetracycline	氧四環素 Oxytetracycline	四環素 Tetracycline	磺胺嘧啶 Sulfadiazine	磺胺二甲嘧啶 Sulfamethazine	磺胺甲噁唑 Sulfamethoxazole	磺胺吡啶 Sulfathiazole
		(µg/kg)	(µg/kg)	(µg/kg)	(µg/kg)	(µg/kg)	(µg/kg)	(µg/kg)
CS#1	田寶 P25 號	3.04	ND	ND	2.27	ND	ND	1.84
CS#7	寶島牌地虎肥	2.12	ND	12.16	4.74	0.81	ND	1.38
CS#10	農友牌生技 12	ND	ND	ND	7.64	ND	ND	ND
CS#12	順豐 3-1 號	ND	ND	10.01	3.95	<LOQ	ND	ND
CS#14	祝有肥	ND	ND	5.61	1.21	ND	ND	ND
CS#16	益能牌	ND	ND	ND	1.30	ND	ND	ND
CS#26	格林牌富地	ND	ND	ND	2.40	ND	ND	ND
CS#28	豐展好機肥	ND	ND	ND	3.62	<LOQ	ND	ND

表 4-13 沼液沼渣樣品中四環素類及磺胺類抗生素濃度

編號	縣市/動物	氯四環素 Chlorotetracycline	氧四環素 Oxytetracycline	四環素 Tetracycline	磺胺嘧啶 Sulfadiazine	磺胺二甲嘧啶 Sulfamethazine	磺胺甲噁唑 Sulfamethoxazole	磺胺吡啶 Sulfathiazole
		(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)	(µg/L)
DS#4	台中/豬	5.57	2.62	2.23	2.01	0.03	<LOQ	ND
DS#5	台中/豬	1.96	1.68	7.25	0.09	101.34	<LOQ	ND
DS#6	台中/牛	<LOQ	0.87	0.77	ND	ND	ND	ND
DS#7	彰化/豬	ND	0.46	0.68	2.53	0.08	<LOQ	ND
DS#10	彰化/牛	ND	2.63	1.70	0.39	<LOQ	0.33	ND
DS#11	彰化/豬	ND	7.70	1.41	0.21	184.46	ND	ND
DS#13	彰化/豬	ND	11.07	0.38	11.53	1.00	4.64	ND
DS#23	雲林/豬	ND	5.91	1.70	<LOQ	<LOQ	<LOQ	ND



#### 4.4 堆肥與沼液沼渣之土壤添加縮模試驗

為進一步了解堆肥與沼液沼渣等肥料施用於土壤後，抗性基因在土壤環境的降解行為，本研究採集石門水庫周圍偏僻地區的土壤作為背景土壤，並依照一般單位土壤面積所需澆灌的肥料量，將堆肥與沼液沼渣分別均勻地加入乾淨土壤混合，接著定期灑水以維持土壤一定的保水程度後，觀察 30 天內的土壤抗性基因相對豐度的變化。藉由土壤縮模試驗可模擬兩類肥料（一為固肥、一為液肥）實際加入土壤及維持一般土壤用於耕種時的情況後，窺得抗生素抗藥性的發展。值得一提的是，抗性基因真正的「環境宿命」仍是需要藉由現場農地的採樣與分析才最具代表性，但此時的複雜度會因諸多環境影響因子的加入而倍增，且考量到計畫的時程有限，因此本研究退而求其次，先以簡單且較能完整掌控各參數的縮模試驗進行宿命探討，也較能讓沼液沼渣組與堆肥組一起比較。

試驗進行期間，穴盆每日均會澆水一次以維持土壤濕潤（約 70% 的土壤保水力），並記錄澆水當下之天氣概況及氣溫。試驗期間一共有 5 日雨天（Day 5、Day 9、Day 16、Day 18、Day 23），每日所紀錄之氣溫範圍為 19-27°C（如圖 4-13 所示），而根據交通部中央氣象局網站所提供之中壢測站觀測資料，縮模試驗期間當地每日平均氣溫範圍落在 18.8-27.3°C。試驗前期（Day 1-Day 12）穴盆置於室外，若遇降雨則會將穴盆移至室內，但 Day 12 半夜下大雨，隔日上午才緊急將穴盆移至室內，此時土壤表面能觀察到積水，因此 Day 13 與 Day 14 兩日並未澆水。試驗中後期（Day 16-Day 30）則改將穴盆放置於室外溫室網架中，並在網架頂部鋪設透明防水墊避免降雨破壞穴盆系統，但仍能照到陽光，且每日均會澆水。

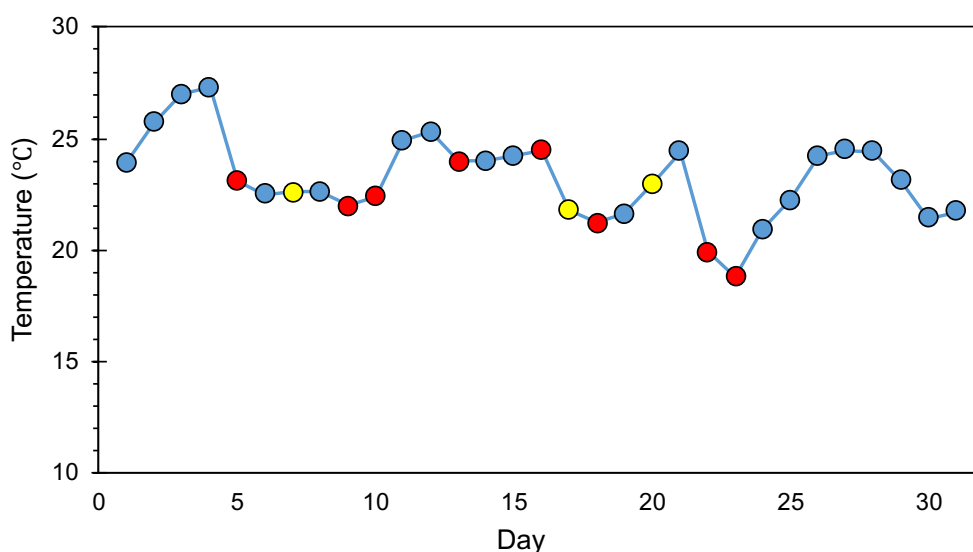


圖 4-13 土壤縮模試驗期間溫度紀錄。藍、紅、黃圖標分別表示為晴、雨、陰天。





表 4-14 與 4-15 分別是添加堆肥之土壤縮模 Day 0 與 Day 30 的 DNA 萃取；表 4-16 與 4-17 則是沼液沼渣組的 DNA 萃取濃度與品質，當中的 Blank 是無添加任何肥料、僅有背景土壤的對照組。圖 4-14、15 與 16 分別是試驗始末定量所得的 16S-rRNA 基因絕對濃度、整合子基因 *intI1* 的相對豐度，以及總抗性基因的相對豐度。從圖 4-14 可看出除了某些堆肥組別的 16S rRNA 基因濃度有些微減少外，整體而言，在試驗條件下的 30 天內，包括對照組土壤中的微生物族群數量並無顯著下降。值得注意的是，試驗組不論是堆肥組還是沼液沼渣組，兩者的 16S rRNA 基因絕對量相差不多，皆比不含任何肥料的對照組高出 3 個層級以上，說明縮模試驗所用的背景土壤(壤土、pH 5.72 且 SOM 為 4.82%)的確相當“乾淨”。

圖 4-15 為與水平基因轉移有關的 *intI1* 的相對豐度。圖 4-15 (B)可看出沼液沼渣組以及對照組在一個月內其 *intI1* 的變化並無明顯差異(編號 16 的沼液沼渣組其中一重複經分析有上升的現象，但三重複平均下來，*intI1* 相對豐度的升降在試驗期間並無顯著區別)，不過在圖 4-15 (A)的堆肥組中的非禽畜糞縮模土壤卻都觀察到 *intI1* 相對豐度增加的情形，幅度約 1.5 個層級，此現象目前為止尚無法合理解釋。比較堆肥與沼液沼渣兩類肥料可知，除了編號 5 的沼液沼渣組偏高約在  $10^{-2}$  外，兩類肥料 *intI1* 的相對豐度的平均值約在  $10^{-3}$ ，似乎說明兩者的水平基因轉移潛勢相當。

在關鍵的總抗性基因相對豐度的結果上(圖 4-16)，30 天下來絕大部分的組別可觀察到下降的趨勢，且下降的程度較對照組稍高，但非禽畜糞堆肥組卻呈現顯著增長的趨勢。不僅如此，雞糞堆肥也較其他糞便堆肥在總抗性基因的相對豐度上來得突出。但如果比較相同類型的糞肥，可看到在兩類肥料的變化趨勢雷同(可以黑色虛線判斷)。此結果可說明沼液沼渣在施用後，對於土壤環境的抗生素抗藥的發展潛力，與堆肥相去不遠。



表 4-14 堆肥土壤縮模試驗起始 DNA 濃度與品質

Sample	DNA (ng/uL)	A260/A280	A260/A230
CS#1-1	40.5	1.85	1.95
CS#1-2	31.3	1.84	1.69
CS#1-3	43.0	1.87	1.69
CS#2-1	26.6	1.88	1.9
CS#2-2	26.6	1.86	2.02
CS#2-3	35.5	1.85	1.38
CS#3-1	26.7	1.95	1.64
CS#3-2	30.6	1.91	1.84
CS#3-3	26.8	1.88	1.67
CS#11-1	17.8	1.81	1.81
CS#11-2	22.7	1.86	1.77
CS#11-3	25.2	1.88	1.78
CS#12-1	52.0	1.79	1.53
CS#12-2	33.3	1.77	1.54
CS#12-3	29.3	1.77	1.28
CS#14-1	25.2	1.78	1.71
CS#14-2	22.9	1.84	1.49
CS#14-3	16.2	1.78	1.49
CS#16-1	42.3	1.78	1.78
CS#16-2	30.6	1.76	1.65
CS#16-3	31.0	1.75	1.72
CS#18-1	33.8	1.81	1.20
CS#18-2	26.7	1.77	1.33
CS#18-3	23.7	1.88	1.47
CS#19-1	39.5	1.84	1.40
CS#19-2	22.8	1.82	1.57
CS#19-3	41.5	1.86	1.65
CS#20-1	56.7	1.84	1.67
CS#20-2	53.6	1.86	1.76
CS#20-3	26.8	1.85	1.71
CS#22-1	29.3	1.89	1.90
CS#22-2	22.1	1.88	1.81
CS#22-3	44.0	1.88	1.95
CS#23-1	16.1	1.88	1.80
CS#23-2	20.3	1.85	1.68
CS#23-3	13.6	1.94	1.73



表 4-15 堆肥土壤縮模試驗 30 天結束時 DNA 濃度與品質

Sample	DNA (ng/uL)	A260/A280	A260/A230
CS#1-1	35.7	1.79	1.75
CS#1-2	21.3	1.84	1.75
CS#1-3	15.8	1.72	1.24
CS#2-1	17.8	1.83	1.71
CS#2-2	23.6	1.77	1.53
CS#2-3	21.6	1.80	1.46
CS#3-1	23.3	1.79	1.48
CS#3-2	18.1	1.82	1.65
CS#3-3	15.7	1.77	1.83
CS#11-1	49.1	1.76	1.55
CS#11-2	33.3	1.73	1.37
CS#11-3	31.5	1.77	1.61
CS#12-1	17.4	1.74	3.01
CS#12-2	22.5	1.75	3.66
CS#12-3	24.7	1.78	3.72
CS#14-1	24.2	1.80	2.49
CS#14-2	16.6	1.74	4.38
CS#14-3	16.8	1.74	4.70
CS#16-1	23.9	1.78	5.66
CS#16-2	29.7	1.84	3.73
CS#16-3	23.6	1.74	5.64
CS#18-1	26.8	1.73	3.55
CS#18-2	22.2	1.77	5.21
CS#18-3	26.9	1.63	1.60
CS#19-1	47.7	1.83	2.42
CS#19-2	37.1	1.8	2.39
CS#19-3	45.7	1.83	2.58
CS#20-1	46.9	1.81	2.65
CS#20-2	42.5	1.82	2.77
CS#20-3	18.1	1.77	4.17
CS#22-1	42.2	1.83	2.57
CS#22-2	52.9	1.83	2.59
CS#22-3	51.4	1.85	2.21
CS#23-1	52.0	1.78	2.20
CS#23-2	30.0	1.80	1.57
CS#23-3	40.8	1.79	2.72



表 4-16 沼液沼渣土壤縮模試驗起始 DNA 濃度與品質

Sample	DNA (ng/uL)	A260/A280	A260/A230
DS#5-1	28.4	1.88	1.92
DS#5-2	26.6	1.86	1.69
DS#5-3	18.3	1.83	2.02
DS#22-1	15.9	1.89	1.55
DS#22-2	22.3	1.80	1.68
DS#22-3	24.6	1.81	1.96
DS#1-1	34.3	1.84	1.57
DS#1-2	26.5	1.80	1.86
DS#1-3	25.8	1.86	1.76
DS#6-1	22.8	1.80	1.43
DS#6-2	24.5	1.82	1.37
DS#6-3	19.3	1.77	1.25
DS#16-1	20.0	1.84	1.59
DS#16-2	29.3	1.68	0.34
DS#16-3	16.6	1.84	1.77
DS#14-1	18.8	1.88	1.78
DS#14-2	17.5	1.94	1.98
DS#14-3	13.4	1.84	1.52
Blank 1	35.5	1.93	2.04
Blank 2	33.4	1.88	2.03
Blank 3	34.4	1.93	2.09

表 4-17 沼液沼渣土壤縮模試驗 30 天結束時 DNA 濃度與品質

Sample	DNA (ng/uL)	A260/A280	A260/A230
DS#5-1	48.3	1.93	3.15
DS#5-2	40.5	1.95	4.52
DS#5-3	36.4	1.94	4.93
DS#22-1	44.5	1.93	5.54
DS#22-2	41.7	1.93	3.73
DS#22-3	37.5	1.93	5.75
DS#1-1	41.0	1.93	5.03
DS#1-2	42.7	1.92	5.14
DS#1-3	41.6	1.97	5.76
DS#6-1	79.7	1.90	2.58
DS#6-2	58.5	1.90	2.61
DS#6-3	55.5	1.91	2.66
DS#16-1	54.6	1.91	3.43
DS#16-2	52.9	1.92	4.18
DS#16-3	48.5	1.92	3.81
DS#14-1	39.8	1.93	4.60
DS#14-2	45.6	1.90	4.23
DS#14-3	41.6	1.95	4.24
Blank 1	27.7	1.76	3.47
Blank 2	26.3	1.78	3.20
Blank 3	37.7	1.92	4.76

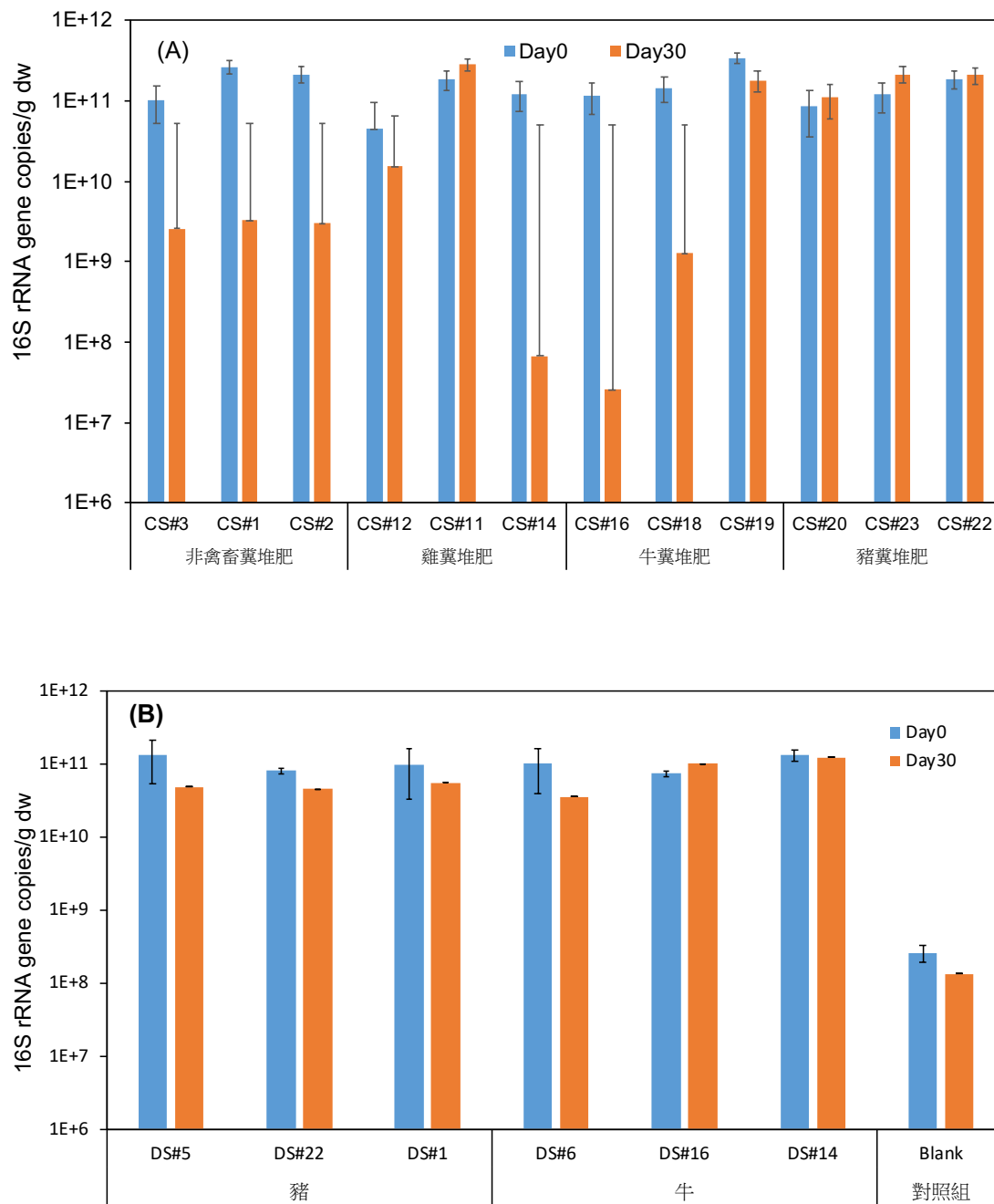


圖 4-14 縮模試驗 30 天期程前後(A)堆肥組與(B)沼液沼渣組別（含對照組）單位土壤乾重的 16S rRNA 基因濃度變化。



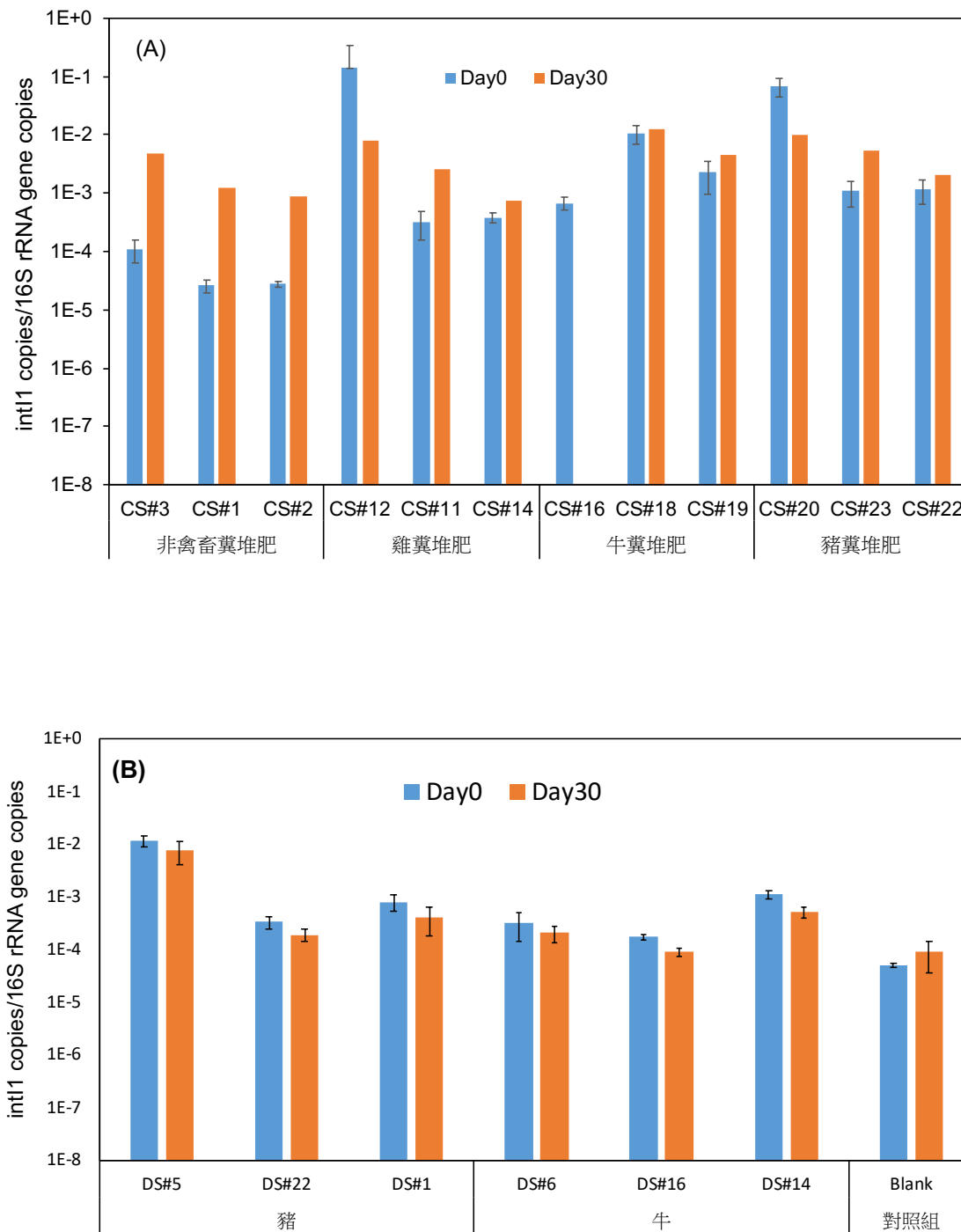


圖 4-15 縮模試驗 30 天期程前後(A)堆肥組與(B)沼液沼渣組別（含對照組）的整合子基因 *int11* 的相對豐度變化。

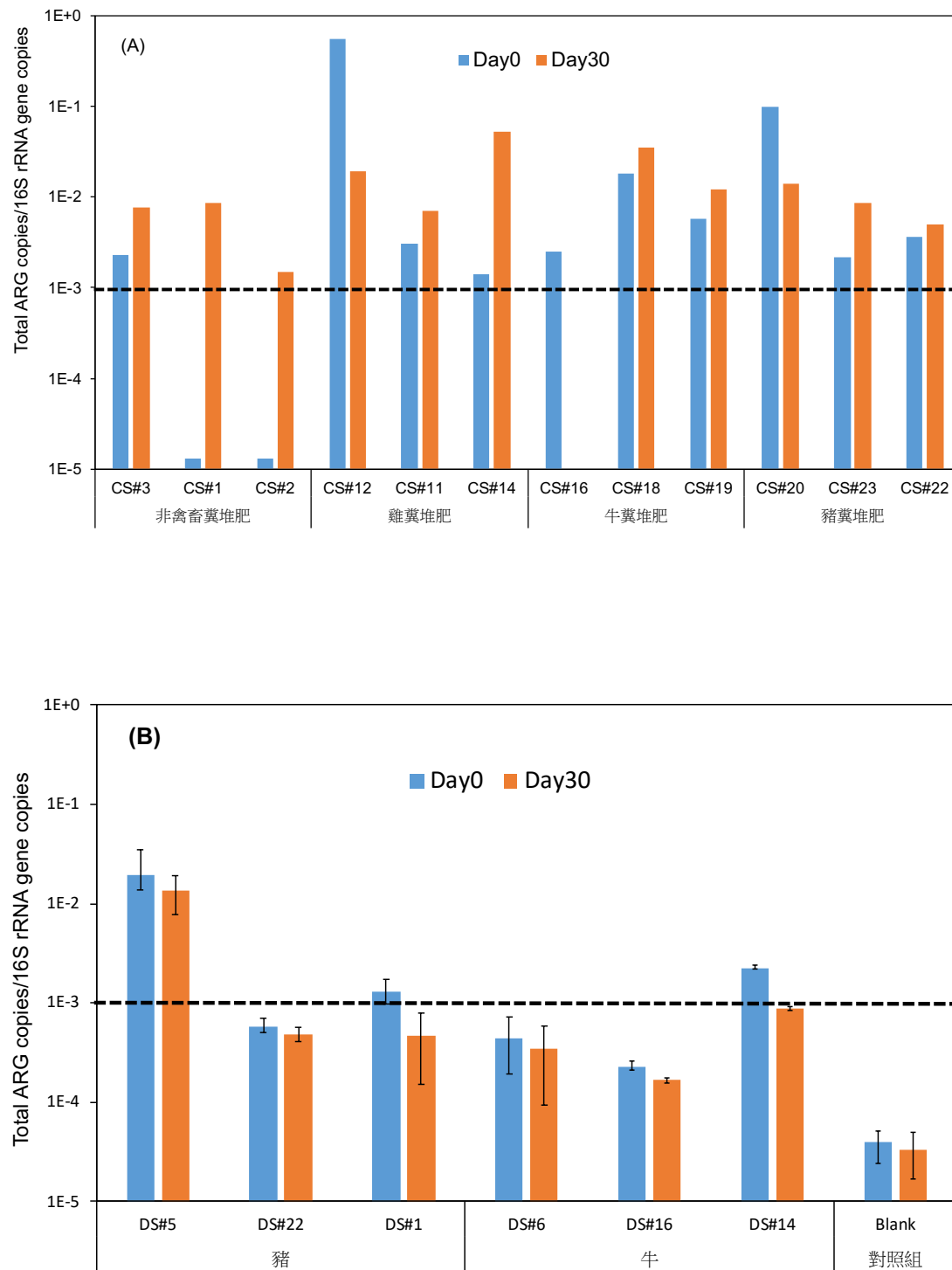


圖 4-16 縮模試驗 30 天期程前後(A)堆肥組與(B)沼液沼渣組別（含對照組）的總抗性基因相對豐度的變化。



## 4.5 環境風險與管理上的意義

全球各地抗生素抗藥性的增長已讓包括 WHO 以及 US CDC 等衛生組織開始謹慎看待此問題，並大力呼籲各國政府必須嚴肅看待及儘早管控。雖然臨床上具多重抗藥性的病菌已知多是從一般環境的微生物演化而來，但“環境”本身在抗藥性發展、持續與繁衍的過程中所扮演的確切角色為何，以及所發揮的功能為何，目前為止仍在研究調查的階段，這包括該以何種微生物與抗性基因作為“指標”、一般環境的背景基線資訊的建立、抗藥性發展將導致高風險的閥值該設定在哪裡等，這些關鍵資訊如無法釐清跟全面掌握，對於法規的建立以及風險的判斷將無法有更進一步推動與進展。即便如此，從可誘發微生物對於藥物產生抗藥性的物質（例如抗生素、金屬與消毒劑等）在環境的流佈可知，減少這些物質進入環境以保持環境的「衛生與安全」是真正的預防之道。

目前除了抗生素的使用需嚴格限制外，可讓抗性菌與抗性基因流入環境的源頭更是需要嚴格把關。這些源頭主要包括醫療廢水、家庭污水以及畜牧廢水，還有禽畜廢棄物等。從禽畜廢棄物源頭控管的角度來看時，如前面章節所述，堆肥以及高溫厭氧消化是目前已知相對有效的方法，而本研究初步調查的結果也的確呼應文獻上的報導：由於台灣本土養殖戶所採用的厭氧消化系統鮮少在高溫下操作，這使得本計畫所採集的養豬與養牛戶的沼液沼渣內所含的抗性基因相對豐度，確實高於一般市售的有機堆肥（而有機堆肥當中的禽畜糞堆肥，不論來自何種動物，皆高於非禽畜糞製成的堆肥）。值得一提的是，本計畫的採樣階段正值台灣炎熱的夏季，此季節置於戶外的紅泥膠皮沼氣袋內的溫度應比一般的“常溫”或“中溫”厭氧消化系統更高，但即使在這樣的環境下採集測得的抗性基因含量，仍舊高於堆肥的含量，代表在溫度偏低的季節所產出的沼液沼渣理論上將含有更高的抗性基因濃度，或更高的抗藥性發展潛勢，但實情為何有待深入地採檢驗證。

而除了源頭的調查外，本研究也進行土壤縮模試驗。初步得到的結果顯示不論是堆肥或是沼液沼渣，只要是源自於禽畜糞便的有機肥，施用到土壤後的 30 天內，在土壤表層的抗性基因降解程度幾乎與一般環境背景的降解程度相當，代表在實驗條件下如果一個月內進行二度施肥的話，將可能造成抗性基因累積的問題。當然，實際情況為何仍須以農地/耕地現場的環境因子與施肥操作程序決定（如施肥量、施肥頻率、土壤深度、植作種類等）。

假使台灣目前的沼液沼渣農地再利用的現況無法做大幅度的變動，抗藥性在國內一般環境發展的管理或許可藉由「管末處理」來補救。近期文獻雖已顯示某些生物炭與奈米顆粒的添加可有效的促進抗性基因的降解，但考量到奈米顆粒的不確定性，以生物炭進行類似活性覆蓋的方式，或許是目前較為可行的選項。



## 4.6 結論與建議

本研究針對台灣為因應國內畜牧廢水污染問題而提倡「新型態」的農地肥料——沼液沼渣——可能蘊藏的環境抗生素抗藥性發展的問題，除了採集台灣中北部地區 27 座養豬、養牛畜牧場紅泥膠皮系統的沼液沼渣樣品，以分析其內所含的常見動物用抗生素所對應的抗性基因與移動遺傳基因元件整合子的濃度外，也同時採購並檢測 28 組常見市售的「舊型態」肥料——有機堆肥——內的相同生物分子的濃度，藉此探究是否台灣農戶所採用的常溫或中溫形式的厭氧消化處理系統，確實無法有效削減畜牧排泄物的抗生素抗藥性。檢測的結果與當初的預期吻合，亦即本期計畫於夏季所採得的沼液沼渣樣品，其內所含不論是抗性基因或是整合子基因的相對豐度，皆顯著高於堆肥樣品。不僅如此，堆肥組別中非禽畜糞的堆肥樣品相較於任何禽畜糞堆肥（包括雞糞、豬糞與牛糞），含有較低的抗生素抗藥性。由於本研究所檢測的樣品數量足以代表一般常見的現況，說明禽畜糞便的確是促成環境抗藥性增長的關鍵因素，值得觀察注意。不僅如此，本期計畫所分析的沼液沼渣已屬亞熱帶地區戶外溫度較高的情況下，經厭氧消化程序所得的樣品，但在這樣的處理條件下，依舊無法表現出優於堆肥程序的抗藥性削減效率，代表其他季節所產出的沼液沼渣肥料，更是需要檢視其抗藥性程度（即抗性基因濃度以及抗性菌密度與組成），以完整掌握此管道所造成的環境抗藥性發展的潛勢。

抗生素抗藥性的問題除了最關鍵的源頭把關外，如無法避免抗性菌與抗性基因進入一般環境，也須清楚掌握這些細菌與遺傳分子在環境介質的增長與衰退。本研究為了了解新、舊型態的有機肥料進入農地後的宿命，也採集乾淨壤土(loam soil)進行土壤縮模試驗，將肥料以一般常用的施加量混入背景土壤，戶外培養一個月後檢測抗性基因與整合子基因的濃度變化。土壤縮模試驗的結果顯示添加肥料的土壤內抗性基因與整合子基因相對豐度的減少程度，整體而言與無添加肥料的土壤對照組相當；此外，大部分組別的基因豐度減少程度約略在一個層級，且降解後的豐度含量仍高於對照組，說明如果在此實驗條件下的施肥一個月內再次澆灌肥料，將有可能造成抗性基因的累積。由於這樣的實驗設計僅只於實驗室的模擬試驗，確切的環境抗藥性宿命仍須藉由實際受到沼液沼渣施肥的農地土壤的採樣與分析，才能準確說明現況。即使如此，本研究初步調查的結果某種程度仍可闡述禽畜糞肥內的抗藥性在土壤介質的變化。

此領域未來的調查研究方向除了上述的季節性採樣與實地土壤採樣分析外，假使政策無法修正，或許可朝向農地端的管控進行研究，測試某些具有環境友善性的材料在添加跟混入農地土壤後，是否可有效限制抗藥性的增長與累積，甚至降低其濃度。截止目前為止，生物炭是具有此潛力的材料，值得後續的關注。



## 參考文獻

- Agga et al. (2015). Antimicrobial-resistant bacterial populations and antimicrobial resistance genes obtained from environments impacted by livestock and municipal waste. *PLoS One*, 10(7): e0132586.
- Andersson and Hughes (2011). Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiol. Rev.*, 35(5): 901-911.
- Avila and de la Cruz (1988). Physical and genetic map of the IncW plasmid R388. *Plasmid*, 20(2): 155-157.
- Baker-Austin et al. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends Microbiol.*, 14(4): 176-182.
- Baquero et al. (2008). Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 19: 260-265.
- Bengtsson-Palme and Larsson (2016). Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. *Environ. Int.*, 86, 140-149.
- Beukers et al. (2015). Effect of in feed administration and withdrawal of tylosin phosphate on antibiotic resistance in enterococci isolated from feedlot steers. *Front. Microbiol.*, 6: 483.
- Binh et al. (2008). Piggery manure used for soil fertilization is a reservoir for transferable antibiotic resistance plasmids. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 66(1): 25-37.
- Blair et al. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.*, 13(1): 42-51.
- Burch et al. (2014). Fate of antibiotic resistance genes and class 1 integrons in soil microcosms following the application of treated residual municipal wastewater solids. *Environ. Sci. Technol.*, 48(10): 5620-5627.
- Byrne-Bailey et al. (2011). Integron prevalence and diversity in manured soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(2): 684-687.





- Cambray et al. (2010). Integrons. *Annu. Rev. Genet.*, 44: 141-166.
- Canton. (2009). Antibiotic resistance genes from the environment: a perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clin. Microbiol. Infect.*, 15: 20-25.
- CDC (2013). Antibiotic Resistance Threats in The United States.
- Chang et al. (2015) Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? *Evol. Appl.*, 8(3): 240-247.
- Chantziaras et al. (2013). Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *J. Antimicrob. Chemother.*, 69(3): 827-834.
- Chapin et al. (2005). Airborne multidrug-resistant bacteria isolated from a concentrated swine feeding operation. *Environ. Health Perspect.*, 113(2): 137-142.
- Chee-Sanford et al. (2009). Fate and transport of antibiotic residues genes following land application of manure waste. *J Environ. Qual.*, 38(3): 1086-108.
- Chen et al. (2007). Development and application of real-time PCR assays for quantification of *erm* genes conferring resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure management systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(14): 4407-4416.
- Chen et al. (2010). Occurrence and persistence of erythromycin resistance genes (*erm*) and tetracycline resistance genes (*tet*) in waste treatment systems on swine farms. *Microb. Ecol.*, 60(3): 479-486.
- Chen et al. (2017). Adsorption of sulfamethoxazole and sulfapyridine antibiotics in high organic content soils. *Environ. Pollut.*, 231: 1163-1171.
- Cheng et al. (2019). Dynamics of oxytetracycline, sulfamerazine, and ciprofloxacin and related antibiotic resistance genes during swine manure composting. *J. Environ. Manage.*, 230: 102-109.
- Davis et al. (2011). An ecological perspective on US industrial poultry production: the role of anthropogenic ecosystems on the emergence of drug-resistant bacteria from agricultural environments. *Curr. Opin. Microbiol.*, 14(3): 244-250.



- D'Costa et al. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 477(7365): 457-461.
- Diaz Ricci and Hernández (2000). Plasmid Effects on *Escherichia coli* Metabolism. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 20(2): 79-108.
- Diehl et al. (2010). Effect of temperature on the fate of genes encoding tetracycline resistance and the integrase of class 1 integrons within anaerobic and aerobic digesters treating municipal wastewater solids. *Environ. Sci Technol.*, 44(23): 9128-9133.
- Dorit (2009). Routes of resistance. *Am. Sci.*, 97(1): 20-22.
- Echeverria-Palencia et al. (2017). Disparate Antibiotic Resistance Gene Quantities Revealed across 4 Major Cities in California: A Survey in Drinking Water, Air, and Soil at 24 Public Parks. *ACS Omega*, 2: 2255–2263.
- Fang et al. (2018). Dissemination of antibiotic resistance genes and human pathogenic bacteria from a pig feedlot to the surrounding stream and agricultural soils. *J. Hazard. Mater.*, 357: 53-62.
- Finley et al. (2013). The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clin. Infect. Dis.*, 57(5): 704-710.
- Ghosh et al. (2009). The role of anaerobic digestion in controlling the release of tetracycline resistance genes and class 1 integrons from municipal wastewater treatment plants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84(4): 791-796.
- Gibbs et al. (2006). Isolation of antibiotic-resistant bacteria from the air plume downwind of a swine confined or concentrated animal feeding operation. *Environ. Health Perspect.*, 114(7): 1032–1037.
- Gilchrist et al. (2006). The potential role of concentrated animal feeding operations in infectious disease epidemics and antibiotic resistance. *Environ. Health Perspect.*, 115(2): 313-316.
- Gillings et al. (2015). Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME*, 9(6): 1269-1279.
- Heuer et al. (2011). Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr. Opin. Microbiol.*, 14(3): 236-243.
- Huijbers et al. (2014). Role of the Environment in the Transmission of Antimicrobial



Resistance to Humans: A Review. *Environ. Sci. Technol.*, 49: 11993–12004.

Hurd et al. (2004). Public health consequences of macrolide use in food animals: a deterministic risk assessment. *J. Food Prot.*, 67: 980-992.

Jechalke et al. (2014). Fate and effects of veterinary antibiotics in soil. *Trends Microbiol.*, 22(9): 536-545.

Jechalke et al. (2015). Effects of 100 years wastewater irrigation on resistance genes, class 1 integrons and IncP-1 plasmids in Mexican soil. *Front. Microbiol.*, 6: 163.

Karkman et al. (2019). Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments. *Nature Communications*, 10(1): 80.

Khachatourians (1998). Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Cmaj*, 159(9): 1129-1136.

Kim et al. (2010). Occurrence and Environmental Fate of Veterinary Antibiotics in the Terrestrial Environment. *Water, Air, & Soil Pollut.*, 214(1-4): 163-174.

Knapp et al. (2009). Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environ. Sci. Technol.*, 44(2): 580-587.

Lacotte et al. (2017). Class 1 integrons are low-cost structures in *Escherichia coli*. *ISME*, 11(7): 1535-1544.

Larsson et al. (2018). Critical knowledge gaps and research needs related to the environmental dimensions of antibiotic resistance. *Environ. Int.*, 117: 132-138.

Lipsitch et al. (2002). Antibiotics in agriculture: When is it time to close the barn door? *PNAS*, 99(9): 5752-5754.

Liu et al. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.*, 16(2): 161-168.

Luby et al. (2016). Molecular methods for assessment of antibiotic resistance in agricultural ecosystems: prospects and challenges. *J. Environ. Qual.*, 45(2): 441-453.

Luo et al. (2017). Antibiotic resistance genes and correlations with microbial community and metal resistance genes in full-scale biogas reactors as revealed by metagenomic analysis. *Environ. Sci. Technol.*, 51(7): 4069-4080.



- Ma et al. (2011). Effect of various sludge digestion conditions on sulfonamide, macrolide, and tetracycline resistance genes and class I integrons. *Environ. Sci. Technol.*, 45(18): 7855-7861.
- Ma et al. (2017). The prevalence of integrons as the carrier of antibiotic resistance genes in natural and man-made environments. *Environ. Sci. Technol.*, 51(10): 5721-5728.
- Maron et al. (2013). Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Glob. Health*, 9 (1):48.
- Marti et al. (2014). Safely coupling livestock and crop production systems: how rapidly do antibiotic resistance genes dissipate in soil following a commercial application of swine or dairy manure?. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(10): 3258-3265.
- Mazel (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat. Rev. Microbiol.*, 4(8): 608-620.
- McEwen (2012). Human Health Importance of Use of Antimicrobials in animals and its Selection of Antimicrobial Resistance. In *Antimicrobial Resistance in the Environment*.
- Miller et al. (2016). Survival of antibiotic resistant bacteria and horizontal gene transfer control antibiotic resistance gene content in anaerobic digesters. *Front. Microbiol.*, 7: 263.
- Nesme et al. (2014). Large-scale metagenomic-based study of antibiotic resistance in the environment. *Curr. Biol.*, 24(10): 1096-1100.
- Pal et al. (2015). Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics*, 16(1), 964.
- Pruden et al. (2006). Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. *Environ. Sci. Technol.*, 40(23):7445-7450.
- Pruden et al. (2012). Correlation between upstream human activities and riverine antibiotic resistance genes. *Environ. Sci. Technol.*, 46: 11541-11549.
- Pruden et al. (2013). Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environ. Health Perspect.*, 121(8): 878-885.
- Qiao et al. (2012). Fate of tetracyclines in swine manure of three selected swine farms



in China. *J. Environ. Sci.*, 24(6): 1047-1052.

Rahube et al. (2014). Impact of fertilizing with raw or anaerobically digested sewage sludge on the abundance of antibiotic-resistant coliforms, antibiotic resistance genes, and pathogenic bacteria in soil and on vegetables at harvest. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(22): 6898-6907.

Resende et al. (2014). Prevalence and persistence of potentially pathogenic and antibiotic resistant bacteria during anaerobic digestion treatment of cattle manure. *Bioresour. Technol.*, 153: 284-291.

Rule et al. (2008). Food animal transport: a potential source of community exposures to health hazards from industrial farming (CAFOs). *J. Infect. Public Health*, 1(1): 33-39.

Rysz et al. (2013). Tetracycline resistance gene maintenance under varying bacterial growth rate, substrate and oxygen availability, and tetracycline concentration. *Environ. Sci. Technol.*, 47(13): 6995-7001.

Sancheza et al. (2016). Antibiotic resistance in airborne bacteria near conventional and organic beef cattle farms in California, USA. *Water, Air, Soil Pollut.*, 227(8), 280.

Sarmah et al. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65(5): 725-759.

Schnoor (2014). Re-emergence of emerging contaminants. *Environ. Sci. Technol.*, 48(19): 11019-11020.

Seiler and Berendonk (2012). Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Front. Microbiol.*, 3: 1-10.

Selvam et al. (2012). Fate of tetracycline, sulfonamide and fluoroquinolone resistance genes and the changes in bacterial diversity during composting of swine manure. *Bioresour. Technol.*, 126: 383-390.

Sengeløv et al. (2003). Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environ. Int.*, 28(7): 587-595.

Sharma et al. (2009). Selected antimicrobial resistance during composting of manure from cattle administered sub-therapeutic antimicrobials. *J. Environ. Qual.*, 38(2), 567-





575.

Singer et al. (2016). Review of antimicrobial resistance in the environment and its relevance to environmental regulators. *Front. Microbiol.*, 7, 1728.

Silver (2011). Challenges of antibacterial discovery. *Clin. Microbiol. Rev.*, 24(1): 71-109.

Smith et al. (2002). Animal antibiotic use has an early but important impact on the emergence of antibiotic resistance in human commensal bacteria. *PNAS*, 99(9): 6434-6439.

Stokes and Gillings (2011). Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.*, 35(5): 790-819.

Su et al. (2015). Antibiotic resistome and its association with bacterial communities during sewage sludge composting. *Environ. Sci. Technol.*, 49(12): 7356-7363.

Subbiah et al. (2011). Selection pressure required for long-term persistence of bla<sub>CMY-2</sub>-positive IncA/C plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(13): 4486-4493.

Sui et al. (2016). Distribution of antibiotic resistance genes (ARGs) in anaerobic digestion and land application of swine wastewater. *Environ. Pollut.*, 213: 751-759.

Tang et al. (2015). Effects of long-term manure applications on the occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes (ARGs) in paddy soils: evidence from four field experiments in south of China. *Soil Biol. Biochem.*, 90: 179-187.

Tao et al. (2014). Evaluation of five antibiotic resistance genes in wastewater treatment systems of swine farms by real-time PCR. *Sci. Total Environ.*, 496: 116-121.

Thanner et al. (2016). Antimicrobial resistance in agriculture. *MBio*, 7(2): e02227-15.

Tolls (2001). Sorption of Veterinary Pharmaceuticals in Soils: A Review. *Environ. Sci. Technol.*, 35(17): 3397-3406.

Travers and Barza (2002). Morbidity of infections caused by antimicrobial-resistant bacteria. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 34 Suppl 3(Suppl 3): S131–S134.

UN Environment Programme, *Frontiers 2017: Emerging issues of environmental*



concern.

van Boeckel et al. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. PNAS, 112(18): 5649-5654.

van den Bogaard et al. (2001). Antibiotic resistance of faecal Escherichia coli in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. J. Antimicrob. Chemother., 47(6): 763-771.

Vogwill and MacLean (2015). The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: a meta-analysis approach. Evol. Appl., 8(3): 284-295.

Voss et al. (2005). Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in pig farming. Emerging Infectious Diseases, 11(12): 1965-1966.

Wallace et al. (2018). Occurrence and transformation of veterinary antibiotics and antibiotic resistance genes in dairy manure treated by advanced anaerobic digestion and conventional treatment methods. Environ. Pollut., 236: 764-772.

Wang et al. (2012). Persistence of resistance to erythromycin and tetracycline in swine manure during simulated composting and lagoon treatments. Microb. Ecol., 63(1), 32-40.

Wang et al. (2015). Effects of thermophilic composting on oxytetracycline, sulfamethazine, and their corresponding resistance genes in swine manure. Environ. Sci.: Process. Impacts, 17(9): 1654-1660.

Wang et al. (2015). Antibiotic resistance genes in manure-amended soil and vegetables at harvest. J. Hazard. Mater., 299: 215-221.

WHO (2014). Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance.

WHO (2017). Ten Years in Public Health, 2007-2017.

WHO (2019). Ten Threats to Global Health in 2019.

Wright et al. (2008). Influence of industrial contamination on mobile genetic elements: class 1 integron abundance and gene cassette structure in aquatic bacterial communities. ISME, 2(4): 417-428.

Wright (2010). Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic?. Curr Opin. Microbiol., 13(5): 589-594.



Xie et al. (2017). Y., et al. Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: a review. *Eur. J. Soil Sci.*, 69(1): 181-195.

Yu et al. (2005). Development and application of real-time PCR assays for quantification of genes encoding tetracycline resistance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(11), 6926-6933.

Zhang et al. (2015). Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance. *Environ. Sci. Technol.*, 49 (11): 6772-6782.

Zhao et al. (2018). Distribution, dynamics and determinants of antibiotics in soils in a peri-urban area of Yangtze River Delta, Eastern China. *Chemosphere*, 211: 261-270.

程梅萍，蕭庭訓，廖仁寶，「豬糞尿和廢水中抗生素與四環素抗性基因流布研究」，畜產研究，頁 39-51，2018。

鄧教毅，「重金屬生物有效性對於抗生素抗性基因在農地土壤的分佈與持續之影響」，中央大學碩士論文，2018。

張智聖，「抗生素抗性菌與抗性基因在污水處理程序中的動態變化」，中央大學碩士論文，2019。

潘弘益，「鎘的生物有效性為引起大腸桿菌對四環黴素共選擇抗性的關鍵因子」，中央大學碩士論文，2019。

行政院財政部關務署 (2018) 統計資料庫查詢系  
<https://portal.sw.nat.gov.tw/APGA/GA01>.

行政院農業委員會(2018)畜牧場登記管理系統 <https://aris.coa.gov.tw/>

行政院農業委員會農糧署 108 年國產有機質肥料品牌推薦名單  
<https://www.afa.gov.tw/>



(本頁留白)



**行政院環境保護署土壤及地下水污染整治基金管理會  
土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案**

**109 年度專案成果績效自評表**

**一、專案基本資料**

填表日期：109 年 11 月 2 日

專案性質	<input checked="" type="checkbox"/> 實驗性質 <input type="checkbox"/> 非實驗性質	專案類別	<input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型
研究主題	<input type="checkbox"/> 整治 <input checked="" type="checkbox"/> 調查 <input type="checkbox"/> 其他		
申請機構系所	國立中央大學環境工程研究所	專案主持人	林居慶
專案名稱	商業有機肥料與沼渣沼液作為環境抗生素抗藥性發展的潛在來源探究		
專案執行期程	<input type="checkbox"/> 申請階段 <input type="checkbox"/> 期中 <input checked="" type="checkbox"/> 期末		

**二、成果績效自評**

「計畫總預估數」應與計畫審查核定值相符，請執行單位依實際達成之量化成果填寫於欄位中。

**(一) 學術面**

項目 \ 目標達成程度			申請 預估數	期中 達成數	期末 達成數	結案後半年 達成率	備註 (說明未達成 原因或學術產 出發表名稱)
A 學術 產 出 及 活 動	1.國內投稿 (篇數)	(1)論文					
		(2)研討會論文	1	0	1		已達成
	2.國外投稿 (篇數)	(1)期刊論文	1	0	0		半年內
		(2)研討會論文					
	3.報告 (篇數)	(1)技術報告	1	0	1		已達成
		(2)研究報告					
	4.專著 (本數)						
	5.辦理學術 會議(場數)	(1)研討/說明會					
		(2)成果發表會					
		(3)論壇					
	6.研發改良 技術(項數)	(1)已開發技術					
		(2)技術平台					
B 人 才 培 育	7.研發人員 (人數)	(1)碩士	2	2	3		新增一名
		(2)博士	1	1	1		已達成
	8.研究團隊 (個數)	(1)跨領域團隊					
		(2)跨機構團隊					
		(3)形成研究中 心					
		(4)形成實驗室					
	9.其他指標 (請自行命名)		(請自填)				





## (二) 產業面

項目\目標達成程度				申請 預估數	期中 達成數	期末 達成數	結案後半年 達成率	備註 (說明未達成原因 或專利、技術轉移 相關詳細資料)
A 智慧 財產 權	1.專利 (件數)	已 核 准	發明					
			新型/設計					
			合計					
		申 請 中	發明					
			新型/設計					
			合計					
B 研 發 技 術 轉 移	2.先期技術 成果移轉	件數						
		授權金(仟元)						
		衍 生 利 益 金 ( 仟 元)						
	3.技術移轉 (專利)	件數						
		授權金(仟元)						
		衍 生 利 益 金 (仟元)						
	4.技術移轉 (應用技 術)	件數						
		授權金(仟元)						
		衍 生 利 益 金 ( 仟 元)						
	5.可移轉 產業技術	(1)技術(件數)						
		(2)品種/系(件數)						
C 產 學 研 合 作	6.促成合作 研究	件數						
		金額(仟元)						
	7.促成投資	件數						
		投資金額 (仟元)						
	8.促成取得 業界科專	件數						
業界投資金額 (仟元)								
9.其他指標 (請自行命名)		(請自填)						



## (三) 政策面

項目		目標達成程度	申請預估數	期中達成數	期末達成數	結案後半年達成率	備註 (說明未達成原因 或其他詳細資料)
A 服 務 便 民	1.技術服務	次數					
		收入(仟元)					
	2.諮詢服務	次數					
		收入(仟元)					
B 支 援 合 作	3.協助政府制定 (件數)	(1)政策					
		(2)法規					
		(3)規範					
		(4)標準					
D 社 會 效 益	4.獲得認證(件數)						
	5.獲得獎項(件數)						
	6.提升能源效率(%)						
	7.節能減碳效率(%)						
8.其他指標 (請自行命名)		(請自填)					

三、請依學術成就、技術創新、經濟效益、社會影響等方面，評估研究成果對現況或本署之學術或應用價值。(簡述成果所代表之意義、價值、影響或進一步發展之可能性，500字為限)

農業上抗生素的廣泛使用及禽畜糞便的再利用，已被確認為是造成環境中抗生素抗性群體(antibiotic resistome)的主要來源之一。抗性群體近年來在環境背景含量的大幅提高已對公共衛生品質的維護帶來警訊，其嚴重性因可威脅現代醫學的成就而讓世界衛生組織將抗生素抗藥性列為全球健康的最大威脅之一。由於國內截至目前為止對於抗生素抗藥性在環境發展與流佈等資料仍極缺乏，因此在推動經厭氧處理後的畜牧糞尿沼渣沼液作為農地肥分的使用時，應先審慎調查評估並排除是否會因此而導致施作土壤環境的抗藥性增長的問題。本計畫擬針對市售的有機肥料及可得的沼渣沼液(1)進行有系統的抗生素、抗性菌、抗性基因、重金屬和營養源等含量分析，藉此了解何種有機廢棄物來源與前處理程序(好氧堆肥、厭氧發酵、厭氧消化等)所得的有機肥具有相對較高的抗藥性發展及累積潛勢；此外，也將(2)進行肥料及沼渣沼液添加的土壤縮模試驗，藉由不同土壤深度的抗性基因濃度分析，了解市售的肥料及沼渣沼液中的抗性基因在土壤環境隨著時間有無受到日照後的增殖與降解宿命。本計畫所得的結果除了能釐清沼渣沼液再利用的政策是否不具顯著的環境衝擊外，也盼能有助於更準確地預測與管理本土抗生素抗藥性的環境誘發與持續的問題。



(本頁留白)



# 行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☐申請計畫書   ☐期中報告   ☒修正計畫書   ☒期末報告   **審查意見回復對照表**

計畫年度	109 年度	計畫類型	<input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型
計畫類別	<input type="checkbox"/> 整治 <input checked="" type="checkbox"/> 調查 <input type="checkbox"/> 其它	主持人：林居慶   NO：B5	
計畫名稱	商業有機肥料與沼渣沼液作為環境抗生素抗藥性發展的潛在來源探究		
委員審查意見		計畫單位回覆	
委員一 1. 資料收集完整。 2. 研究設計與分析數據豐富。 3. 結果討論深入務實。 4. 中英文摘要加”關鍵詞”。		感謝委員提醒，關鍵詞已加入定稿版中英文摘要。	
委員二 1. 本研究以商業有機肥料與沼渣沼液作為研究標的，進行「環境抗生素抗藥性發展的潛在來源探究、評估」，於實驗室中針對不同農用肥料(液)進行環境抗生素及抗藥性分析檢測；本計畫已依預定期程與項目執行實驗及研究工作，並如期提出期末報告。 2. 本計畫經實驗分析、檢測後獲得下列成果： (1) 本研究所取得之市售堆肥重金屬含量皆符合標準，顯示土壤中微生物族群所含的抗生素抗性基因濃度，並非由於重金屬誘發的共選擇抗性所造成。 (2) 由本計畫堆肥樣品所含 ARGs 與 MGE 之絕對濃度的量化結果來看，禽畜糞的存在確實可一定程度地影響抗生素抗性基因的傳播。 (3) 本計畫經實驗結果顯示：以沼液沼渣作為肥料施灌於農地對於環境抗生素抗藥性的發展具有較高的潛勢與較大的風險，但建議後續仍須檢視肥料澆灌至土壤後，抗性菌		感謝委員建議，後續確定將針對我國有機肥料與沼渣沼液的實際使用狀況（區域、模式、作物別、施用頻率、用量等）進行有系統的資料搜集與探究。	



<p>與抗性基因的「宿命」，才能做最後的判斷，因此需進行土壤培養縮模試驗，以及現地農地土壤的檢測來進一步釐清。</p> <p>3. 環境抗生素及抗藥性為環境安全衛生之重大議題，本研究計畫所提出之成果與建議事項，值得主管機關作為未來施政之參考。</p> <p>4. 我國有機肥料與沼渣沼液實際使用狀況(區域、模式、作物別、施用頻率、用量等)對於本研究後續研究工作計畫之延伸及成果應用等具有一定參考價值，並可作為研究、評估之依據，建議可蒐集上述資料，以供未來相關計畫參考、使用。</p>	
<p>委員三</p> <p>1. 研究進度符合期末報告查核內容。</p> <p>2. 一般來說作物施肥頻率及用量差異大，本研究採用 30 天的依據？此外天氣狀況如氣溫、濕度、日照、澆灌或降雨的影響可進一步說明？是否有模擬上述條件？</p> <p>3. 對於結論『30 天內二度施肥會造成抗藥性累積的數據依據？及其風險的意義？</p> <p>4. 研究結論的具體應用建議？</p>	<p>2. 採用 30 天之依據：根據過去文獻的試驗結果可知(Fahrenfeld et al., 2014; Sandberg et al., 2016; Burch et al., 2014; Wang et al., 2018; Joy et al., 2014; Liu et al., 2017; Echeverria Palencia, 2018)，抗性基因在環境中的削減所需的時間範圍從數天到數月不等，而本研究最初在擬定縮模試驗之方法時，從 Echeverria Palencia 於 2018 年所發表之研究結果給予了許多啟發。該篇文獻實驗結果顯示，在土壤施用肥料一個月後，便能觀察到 ARGs 顯著的變化情形。除此之外，實物面上在考慮到計畫預定的執行期程以及各項實驗進行的時間分配等因素後，最終將縮模試驗時間訂為 30 天。</p> <p>天氣狀況的影響：就現有的文獻調查結果來看，溫度確定是影響沼液沼渣中 ARGs 含量的關鍵因素之一(Selvam et al., 2012; Diehl et al., 2010; Luo et al., 2017; Wei-Sun et al., 2016)，因此氣溫、日照極有可能對縮模試驗過程中 ARGs 豐度的變化造成影響；另外抗性菌(Antibiotic Resistant Bacteria, ARB)的多寡也可能造成影響，因此外界環境條件若造成菌相之改變，均有可能影響環境中的 ARGs 豐度。由於本期計畫的重點在於比對沼液沼渣與堆肥的殊異，以及與對照組的差</p>



異，這些環境因素並非實驗控制因子，所有組別所遭遇的環境條件皆相同，藉此才得以互相比較。

**是否模擬天氣條件：**縮模試驗系統架設於戶外，以透明的塑膠墊鋪設於系統上方，做為擋雨之用，系統周圍則以溫室網包圍，阻擋昆蟲或小動物破壞系統，但未阻絕外界空氣進入。因此試驗執行過程中，氣溫、濕度、日照均隨著外界環境而變化，模擬實際的環境情況，但考慮到穴盆材質強度以及土壤深度較淺，實驗系統可能會受到降雨破壞，因而改用超純水澆灌於試驗土壤中用以保持土壤濕度，並未模擬自然環境中的實際降雨情況。

**3. 30 天內二度施肥會造成抗藥性累積的數據依據及其風險的意義：**從實驗結果可以看到，土壤施用含禽畜糞堆肥以及沼液沼渣 30 天(實驗組)後，其中 ARGs 相對豐度降解程度與一般環境背景值(對照組)相當，但實驗組土樣中 ARGs 相對豐度普遍高於對照組土樣(施用沼液沼渣土樣 ARGs 相對豐度高於對照組約 1-3 個 orders)，因而合理推論若是一個月內連續施用含有禽畜糞之堆肥或是沼渣沼液的話，便有可能造成在試驗土壤環境中抗藥性的累積。

**而其風險意義在於：**30 天內二度施肥會使得環境中因施肥而進入土壤中的抗性基因累加，導致環境中的抗性基因的含量維持在較高的濃度，長期下來使得環境中病原菌產生抗性而造成健康隱憂。

**4. 結論具體應用建議：**本研究發起初衷是希望能做為行政單位進行抗藥性相關管理政策制定之參考，然而本研究之調查結果雖然證實目前國內的糞肥施用以及沼液沼渣再利用行為有造成抗藥性問題之風險，但僅只一期（不到一年）的研究調查計畫尚不能夠對含禽畜糞之堆肥以及沼液沼渣所產生的農地抗藥性發展風險進行完整評估，未來還需要進行不同季節沼液沼渣中 ARGs 豐度之檢測、長期的現地調查及監測、糞肥中 ARGs





	在當地菌群中的傳播機制，以及 ARB 對人體的暴露情形等等研究，方能進行較完整的風險評估，幫助施政者對於抗藥性問題進行更完善的管理，而這也是一個環境政策推動前該有的嚴謹科研態度。
<p>委員四</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 調查 27 件沼液沼渣樣品與 28 件市售堆肥樣品抗生素抗藥性基因量(ARGs, antibiotic resistance genes)之分析結果，說明施用禽畜糞便確實是促成環境抗藥性增長的關鍵因素之一。</li> <li>2. 施灌農田土壤之沼液沼渣雖經厭氣消化程序，仍無法表現優於堆肥化程序之堆肥抗藥性消滅效率。</li> <li>3. 沼液沼渣樣品與市售堆肥樣品經土壤培養縮模試驗一個月後，指出施用沼液沼渣一個月內再次澆灌，有可能造成抗生素抗藥性基因的累積。</li> <li>4. 期末報告撰寫非常完整，提供非常詳細的分析數據與詳細討論，研究結論值得推動沼液沼渣施灌農田政策之重要參考報告。</li> </ol>	謝謝委員肯定。
<p>委員五</p> <p>本研究過程嚴謹，初步結論證明使用沼液、沼渣及禽畜糞堆肥會使土壤產生抗生素抗藥性，可供農政及醫政單位參考。</p>	感謝委員肯定。



# 行政院環境保護署「土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案」

☐申請計畫書    ☒期中報告    ☐修正計畫書    ☐期末報告    **審查意見回復對照表**

計畫年度	109 年度	計畫類型	<input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型
計畫類別	<input type="checkbox"/> 整治 <input checked="" type="checkbox"/> 調查 <input type="checkbox"/> 其它	主持人：林居慶    NO：B5	
計畫名稱	商業有機肥料與沼渣沼液作為環境抗生素抗藥性發展的潛在來源探究		
委員審查意見		計畫單位回覆	
委員一 1. 已完成 23 件市售有機肥產品之營養源、重金屬以及抗性基因分析，初步結論甚具參考價值。 2. 後續沼液、沼渣以及土壤縮模試驗，對現行推動之沼液、沼渣回田政策，具參考價值。		謝謝委員。	
委員二 1. 本計畫期中報告內容、已完成之研究工作項目及相關成果符合預定進度，其執行進度與預定進度查核表相符。 2. 本計畫期中報告內容所提出之討論與建議符合預定目標，並已說明下半年研發工作辦理方式，本計畫後續將完成剩餘有機肥料以及沼渣沼液樣品抗性基因量化的相關工作，包含重金屬以及必要的抗生素的分析。亦將啟動土壤縮模試驗，以探討堆肥及厭氧消化後的殘餘物施用在農地時，可能的降解性(含生物性以及光降解)與宿命。 3. 本研究以「商業有機肥料與沼渣沼液作為環境抗生素抗藥性發展的潛在來源探究」，為主題，目前之初步成果為：(1) 分析現有 23 件有機肥料樣品並完成營養源、重金屬以及部分抗性基因的評估，結果顯示所購得的堆肥樣品皆不含超標的重金屬濃度，研判其因重金屬所引起的共選擇此等微生物的間接壓力可先排除。(2) 初步抗性基因分析結果		謝謝委員。	



<p>顯示不含禽畜糞便或非以禽畜糞便為主的堆肥其抗性基因與轉座子基因的濃度相對較少。相關成果可作為後續研究工作之重要參考。</p>	
<p>委員三</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 建議分析肥料項目應包含「液態雜項有機質肥料(品目編號 5-14)」，分析數量、項目應有明確規劃。</li> <li>2. 建議分析項目應同時應用於分析土壤滲出水的抗藥性累積，作為評估及環境衝擊與影響之依據。</li> <li>3. 初步結果與討論請分析討論說明，目前應用現況，而非僅止於方法可行性。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 本計畫主要是針對禽畜糞尿經「堆肥 (composting)」與「常/中溫厭氧消化 (ambient / mesophilic anaerobic digestion)」兩程序處理後的產物，比較其抗性基因的含量。如果液態有機質肥料指的是 liquid compost，或是俗稱 compost tea，其本質仍是堆肥。</li> <li>2. 謝謝委員建議。土壤孔隙水的部分如經費許可，可納入本期的分析。</li> <li>3. 謝謝委員建議，期末報告將依建議呈現。</li> </ol>
<p>委員四</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 已完成市售有機肥料之重金屬含量均屬合格，低於管制值。另其抗性基因量均屬微量，此顯示一般市售有機肥料品質好，重金屬含量均低於污染管制值。</li> <li>2. 初步結果顯示堆肥中抗生素之抗性基因量屬微量，建議提出達成期末報告成果之因應對策或評估。</li> <li>3. 沼液沼渣之重金屬含量一般比堆肥還低，建議提出施灌量、施灌濃度影響之策略與影響評估，做為未來執行工作項目之依據。</li> </ol>	<p>謝謝委員建議，期末報告將依建議呈現。</p>
<p>委員五</p> <p>至期中尚未完成所有樣品分析及整體的評估討論，但請注意試驗樣品之代表性問題。</p>	<p>謝謝委員提醒，將依照處理。</p>
<p>委員六</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 對各養殖戶所使用之肥料及施打禽畜之抗生素，是否有一併掌握?是否能有掌握養殖戶之沼渣沼液處理方式有無因區域性而有不同。</li> <li>2. 第 30 頁表 4-1 之分類基準?</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 養殖戶的相關資訊將盡可能的收集，但如報告所述，除非是有機養殖，否則只要是集約式的養殖方式，農友或多或少會在飼料中添加亞治療劑量的抗生素。期末報告會針對有機飼養與</li> </ol>



<p>3. 第 31 頁至 36 頁圖示與文字不符。</p>	<p>抗生素抗藥性兩者間的關聯性收集相關文獻資料並論述。謝謝委員。</p> <p>2. 分類的基準如報告 4.1 節第一段所述，主要是以有無禽畜糞便、禽畜糞便含量多寡，以及何種禽畜所產生的糞便做分類。</p> <p>3. 謝謝委員，已修正。</p>
--------------------------------	--

專案主持人： 林居茂 (簽名及蓋章)



**行政院環境保護署**  
**土壤及地下水污染整治基金補助研究與模場試驗專案**

☒申請計畫書    ☐期中報告  
☐修正計畫書    ☐期末報告

**審查意見回覆對照表**

計畫年度	109 年度	計畫類型	<input checked="" type="checkbox"/> 研究型 <input type="checkbox"/> 模場型
計畫類別	<input checked="" type="checkbox"/> 調查 <input type="checkbox"/> 整治 <input type="checkbox"/> 其他	主持人：林居慶	
計畫名稱	商業有機肥料與沼渣沼液作為環境抗生素抗藥性發展的潛在來源探究		
<b>委員審查意見</b>		<b>計畫單位回覆</b>	
委員一 1. 主持人與計畫執行團隊 (1) 主持人的學術研究能力與技術發展能力均佳，其專業能力足以勝任本專案計畫。 (2) 主持人近五年的研究成效與(或)土水污染技術發展績效佳。 (3) 主持人與計畫執行團隊的學術研究能力與(或)土水污染技術發展能力佳，其專業能力足以勝任本計畫。 2. 送審的專案計畫價值、意義與專案計畫的可行性 (1) 本專案對未來土壤及地下水污染調查及整治等相關工作之推動具有貢獻。 (2) 由計畫申請書內的成果績效自評表可推知，本專案所預估的成果與績效對土水污染整治具有貢獻，但確切的成果仍有待於未來的執行成果中加以詳細說明。 (3) 本專案計畫書撰寫具體，所研擬的研究方法(流程)可行。研究成果於未來實場的實際可能應用性則未具體說明(確切的應用性有待執行成果中加以明確說明)(原計畫書中說明：“…傳統經由中溫厭氧消化方式處理後的禽畜糞便，其所含的抗生素抗性基因濃度無法被有效削		1. 謝謝委員肯定。 2. 謝謝委員提醒，有關確切成果、對於未來實場的實際可能應用性、以及本計畫執行成果對土污基金在土壤地下水領域的應用等，都將於期中與期末報告時詳細具體說明。	



<p>減，…如要推動經過厭氧處理後的畜牧糞尿沼渣沼液作為農地肥分的使用時，應先審慎調查評估並排除是否會因此而導致施作土壤環境的抗藥性增長的問題。…本計畫擬針對市售的有機肥料(包括用於農用作物栽培與家用盆栽種植)，以及…沼渣沼液進行有系統的抗生素、抗性基因、抗性菌、重金屬和營養源等的含量分析,藉此了解何種來源與何種程序所得的有機肥料具有相對較高的抗藥性發展及累積潛勢；此外，也將進行肥料及沼渣沼液添加的短期(一至二個月)土壤縮模試驗，藉由不同土壤深度的抗性基因濃度分析，以了解源自於國內市售的肥料及沼渣沼液中的抗性基因…”)(本計畫執行成果對土污基金在土壤地下水領域的應用宜多加說明)。</p> <p>(4) 本專案計畫書中對相關文獻蒐集與整理尚完整。主持人對國內外本研究領域的發展現況了解。</p> <p>(5) 本專案計畫的執行期限合理，計畫書中對執行的預期成果也已說明。</p> <p>(6) 本專案計畫非屬延續性計畫。</p>	
<p>委員二</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 計畫書內容完整，研究方法、實驗設計與執行期程明確，若獲補助應可順利啟動相關工作。</li> <li>2. 前期審查意見已補充說明。</li> <li>3. 研究團隊具備本研究主題所需相關專業背景。</li> </ol>	<p>謝謝委員肯定。</p>





<p>委員三</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 測試標的物(有機肥、沼渣沼液)數目待釐清(可能差異達 4-5 倍，工作負荷變化大)</li> <li>2. 測試程序說明具體。</li> <li>3. 土壤濃度實驗，有關有機肥/沼渣沼液增加施用之關鍵程序未具體說明，後續結果之代表性待釐清。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 謝謝委員提醒。關於有機肥與沼液沼渣的數目，目前的規劃是各自至少 20 個樣品數：有機肥的部分將區分為有/無禽畜糞便，而沼液沼渣的部分則會將處理料源區分為豬/牛糞尿。</li> <li>2. 謝謝委員。</li> <li>3. 施肥的部分主要將依照氮肥為基準點，設法讓所添加的有機肥及沼渣沼液的總含氮量相同，然確切的程序將在期中/期末報告中呈述。</li> </ol>
<p>委員四</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 沼液沼渣之樣品取用，應注意其代表性。</li> <li>2. 除定性檢測(出)，是否能定量以及評估可能風險。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 謝謝委員提醒。如同回覆委員三的意見說明所示，沼液沼渣之樣品取用由於經訪查得知現階段農友的厭氧處理皆以常溫方式為主(即無法以處理溫度的不同做調查)，因此目前樣品的分類主要將以料源的不同(豬或牛)做區分，且沼渣與沼液將分別探究；另外，由於國內養豬戶多於牧牛場，因此豬糞尿處理後之沼液沼渣樣品數將會較多(約兩倍)。各畜養/畜牧場的背景資訊也將詳加記載。</li> <li>2. 有關初步的風險評估將會於期末報告論述說明。</li> </ol>
<p>委員五</p> <p>已就本人初審意見回復，無進一步之意見。</p>	<p>謝謝委員。</p>



<p>委員六</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 缺少績效自評表，請補充於修正稿。</li> <li>2. (五)雜項費用-報告書印刷建議編列以12,000 元為限。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 謝謝委員提醒，已補充。</li> <li>2. 已修正。</li> </ol>
--	---



**行政院環境保護署土壤及地下水污染整治基金管理會**  
**108 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**

**構想書審查意見表**

<b>專案類型</b>	■研究型   □模場型	<b>申請經費</b>	1,500,000	NO：B8
<b>專案主持人</b>	林居慶 副教授	<b>專案主題</b>	□整治■調查□其它	
<b>服務單位</b>	國立中央大學 環境工程研究所			
<b>專案名稱</b>	商業有機肥料與沼渣沼液作為環境抗生素抗藥性發展的潛在來源探究			
<b>委員一：</b> 欲對商業化產品為對象時，可能會招致爭議與糾紛必須審慎。		感謝委員提醒。此計畫的動機主要在於調查與比較市售或一般可得的有機肥料其抗性基因含量，以測試「與中溫厭氧消化相比，經堆肥而得的肥料將含有較低的抗性基因」此假說，並希望能藉由所得的數據予以推薦合適與恰當的有機肥生產及施用方式。由於基因的多寡目前尚無法規範，因此計畫的執行結果將會謹慎論述說明。		
<b>委員二：</b> 1. 本研究案從 106 年開始已陸續於中壢工業區及臺北/桃園等地區作調查，且土壤之抗藥性與土壤污染場址整治調查，調性似不盡相符。 2. 計畫分二階段進行，但看不出時程。 3. 本案屬公衛與環境領域，與市售之有機肥及沼液為研究對象，不推薦。		1. 這部分應是委員對於構想書的誤解。本團隊尚未針對農用肥料進行過任何調查，構想書中所提及的僅是本團隊之前曾進行與抗性基因相關的流佈調查，但之前的調查對象是生活污水處理廠與受重金屬污染的稻田。 2. 研究時程將於計畫書詳明。 3. 本研究案呼應政府政策，擬探討及釐清沼渣沼液於農地再利用的風險，雖非技術性類的研究，但應有符合徵求書中所列之重點。		
<b>委員三：</b> 1. 目標主題「抗藥性」，具獨特性。 2. 議題設定，研究方法單純，具研究價值，也很有參考性。		謝謝委員肯定。		
<b>委員四：</b> 1. 本研究係以抗生素於農牧用途導致環境污染殘留為具抗生素抗性基因(ARG5)之微生物所引發之公衛為環境風險調查目標，有助於建立本土化數據資料。 2. 除了有機肥、沼渣、沼液以外，建議考慮納入農業廢水處理系統，排放水作為調查研究標的。 3. 抗生素及 ARG5 歐美是否已納入環境管制物質及其相關管制標準，建請蒐集。		1. 謝謝委員。 2. 謝謝委員意見。本期計畫因經費與人力考量，將先以構想書/計畫書所提之項目進行調查與探討，未來必將針對畜牧廢水調查。 3. 抗生素抗性基因(ARGs)據了解尚未納入管制標準，但會持續關注與搜集相關資訊。		



<b>專案類型</b>	■研究型 □模場型		<b>申請經費</b>	1,500,000	<b>NO : B8</b>
<b>專案主持人</b>	林居慶 副教授	<b>專案主題</b>	□整治■調查□其它		
<b>服務單位</b>	國立中央大學 環境工程研究所				
<b>專案名稱</b>	商業有機肥料與沼渣沼液作為環境抗生素抗藥性發展的潛在來源探究				
<b>委員五：</b> 1. 本計畫屬於研究型，國內無相關研究(以商業有機肥料與沼渣沼液為對象而言)。 2. 本計畫屬於研究型的探討，對現行國內土水污染技術的突破性有待說明。但是就實務上的沼渣沼液的潛在風險而言，具有意義。 3. 本計畫是否有專利之價值目前不易評估，待有具體的研究成果後，再加以完整的說明。 4. 本計畫的研究成果在技術轉移與實場應用的可能性仍有待說明。 5. 本計畫書中對研究工作的構想與規劃的說明完整。 6. 本計畫對研究方法的說明具體，研究工作與執行流程具可執行性。			謝謝委員。本研究案屬於調查類，並非整治技術類的建立與確定，因此較無法有專利的產生。至於實場應用的可能性將於計畫書中說明。		
<b>委員六：</b> 1. 核心技術掌握明確；相關文獻掌握。 2. 影響參數待釐清。			謝謝委員。影響參數部分未來將逐步釐清。		