

多環芳香烴化合物對藻類之光毒效應研究

學生：徐宏博

指導教授：陳重元

國立交通大學環境工程研究所

摘要

本研究利用 BOD 瓶進行密閉式藻類 (*Raphidocelis subcapitata*) 毒性試驗評估 PAHs 光變化產物之毒性，且分析月芽藻對 Anthracene 光誘導毒性的光合作用機制。

本實驗主要量測三種反應終點，包括溶氧變化量(ΔDO)，以藻類細胞密度變化量計算所得的最終產量(Final yield)及生長率(Growth rate)。ANT 的光產物毒性較原 ANT 毒性更毒，其中以 1,8-dhATQ 為最毒，而 ISO 則毒性最低。ANT 經 UV-A 照射後會迅速光變化，形成較具水溶性產物且對藻類毒性更毒。比較 ANT 光誘導毒性，毒性可在生長率上增加 10 倍，此外 ANT 經 6 小時光 UV-A 曝露後，會轉變為 ATQ、1-hATQ 與單環芳香族。而 ANT 經 24 與 48 小時 UV-A 後，ANT 會進一步光變化產生 1,8-dhAT 與 1,4-dhATQ。在物種之間的敏感度比較上，藻類毒性試驗比浮萍敏感。本研究發現藻類敏感度會受一些因素的影響，這對以後藻類抑制反應提供寶貴資料。

此外本研究以平均中斷值 (cut-off value) 作為選擇 NOEC 或 EC10 的客觀參考點，結果顯示 NOEC 比 EC10 提供生物更嚴謹的保護標準。

The phototoxicity effects of polycyclic aromatic hydrocarbons to algae

Student : Hsu Hung-Po

Advisor : Dr. Chen Chung-Yuan

Institute of Environmental Engineering

Nation Chiao Tung University

ABSTRACT

In this study, we use BOD bottles to perform a close-system algal(*Raphidocelis subcapitata*) test to assess the toxicity of PAHs photomodification products. we also analyze the photosynthesis mechanisms associated with photoinduced toxicity of anthracene to *R.subcapitata*

The toxic test was ended based on DO, final yield and growth rate methods. The cell density difference was used to calculate the final yield and growth rate. ANT photoproducts those were more toxic than the parent compound. The most toxic was 1,8-dhATQ. In contrast, ISO was the least toxic. ANT are rapidly photomodified in UV-A to products that are more water soluble and toxic to *R. subcapitata*. Compared to ANT photo-induced toxicity, toxicity was increased 10 times on GR. Furthermore, ANT was converted to ATQ, 1-hATQ, and one-ring aromatics after 6 h of UV-A exposure. After 24 and 48 h UV-A, photomodification of ANT had further generated of 1,8-dhATQ and 1,4-dhATQ. When compare with other species, BOD bottle test shows a higher sensitivity and a good correlation with the Duckweed assays. This study derives that sensitivity of the algae can be influenced with different major factors, and show precious data about the algae inhibition toxicity test.

In addition, a cut-off value approach is proposed to determine whether NOEC or EC10 should be chosen for estimating low toxic effects. The results indicate that NOEC offers better protection to test organisms than EC10.

誌 謝

經歷兩年充實的研究生活，讓我體會研究工作的態度及樂趣所在，研究期間謝謝恩師陳重元教授細心地導引與修正實驗，使論文可順利完成，承蒙蘇銘千教授、林志高教授對論文給予寶貴建議及指正，提升論文的嚴謹與價值，在此至上謝意。感謝交大應用化學系刁維光教授及研究生張智煒幫助計算 Elumo，有助於論文結果分析與討論。

在研究的實驗部份，感謝智雄、柏逸及俊評學長，安佩與詩嵐學姊提供實驗技巧，博士班耕彥學長解決煩人的電腦問題，合作多年的同儕適鴻使我在研究生活中充滿歡笑，昌衡及徽君分享生活中的點點滴滴，認真的素華學妹、國沛學弟及承凱學弟協助解決實驗上困擾。小杜、乾崙、協志、仕音、揚根、憲昌等常談心互相傾訴，使研究生生活感溫馨。

在生活中的好朋友黃家聖，他的肺腑之言常讓我深刻的感受，另外陳維欣及小魚讓我在緊湊的作息中，適當的休息補充能量，感謝大學同學瑞齡、曉芳及明月在精神上加油。每當清晨與夜晚我徒步環伺校區，清新感覺真讓人難以忘記，心中留下這段美好的回憶。

最後感謝親愛的父親、母親及弟弟常鼓勵及安慰，讓我可以克服種種困難及挫折，誠心謝謝他們。

目錄

表次	頁次
中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
誌謝.....	III
目錄.....	IV
表目錄.....	VII
圖目錄.....	VIII
符號表.....	XI

第一章 緒論

1.1 研究緣起.....	1
1.2 研究目的.....	3
1.3 研究架構.....	3

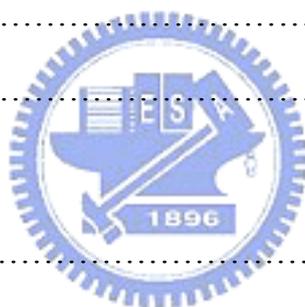


第二章 文獻回顧

2.1 多環芳香族(PAHs)之特性.....	5
2.1.1 PAHs 之來源及種類.....	5
2.1.2 PAHs 之物理性質.....	6
2.1.3 PAHs 之化學性質.....	6
2.1.4 PAHs 之光降解機制.....	8
2.1.5 PAHs 之光變化.....	10
2.2 PAHs 毒理特性及光誘導毒性.....	13
2.2.1 PAHs 毒理特性.....	13
2.2.2 PAHs 光誘導毒性.....	13
2.3 QSARs 及毒性機制.....	17

2.3.1 基本介紹.....	17
2.3.2 QSAR 分析 PAHs 光毒.....	17
2.4 藻類毒性試驗.....	19
2.4 毒性試驗參數.....	20
2.4 密閉式系統藻類毒性試驗.....	22
 第三章 基本理論	
3.1 基本生長動力學.....	25
3.2 毒性物質之劑量反應關係模式.....	27
3.2 數據分析.....	29
3.3 QSAR 分析方法.....	30
 第四章 實驗設備與實驗方法	
4.1 實驗設備及方法.....	31
4.2 試驗藻種.....	35
4.3 培養基質的配製.....	35
4.4 試驗毒物.....	38
4.5 實驗前準備.....	39
4.6 藻類與毒性物質之品質保證.....	44
4.7 照光實驗.....	45
4.8 實驗步驟.....	46
4.8.1 連續式母槽之培養.....	46
4.8.2 毒性試驗.....	47
4.8.3 HPLC 之分析流程.....	48
4.8.4 HPLC 之分析步驟.....	50
 第五章 結果與討論	
5.1 藻類毒性數據.....	51

5.2	光誘導毒性.....	63
5.2.1	Anthracene 光誘導毒性.....	63
5.2.2	Naphthalene 光誘導毒性.....	70
5.3	最佳化模式之選擇.....	73
5.4	EC10 與 NOEC 值之比較.....	75
5.5	Anthracene 與 Naphthalene 之 QSAR.....	81
5.6	藻類與其他毒性試驗之敏感度比較.....	88
5.6.1	未照 UV 藻類毒性數據與其他試驗物種毒性數據之比較	88
5.6.2	照 UV 後藻類毒性數據與其他試驗物種毒性數據之比較	90
 第六章 結論與建議		
6.1	結論.....	92
6.2	建議.....	94
 參考文獻		
		95
 附錄一		
		102
 附錄二		
		124



表目錄

表 2.1.1 Naphthalene 及 Anthracene 特性.....	7
表 2.2.1 Anthracene 光誘導毒性之相關研究.....	15
表 2.5.1 藻類毒性試驗參數.....	21
表 3.2.1 Weibull、Probit 與 Logit 容忍度分布模式.....	28
表 4.1.1 HPLC 設備與分析條件.....	34
表 4.3.1 藻類營養基質之巨量營養組成份.....	36
表 4.3.2 藻類營養基質之微量營養組成份.....	37
表 4.5.1 電子計數器設定之條件.....	41
表 5.1.1 1,8-二昆茵之實驗數據.....	54
表 5.1.2 試試驗毒物之藻類毒性試驗數據.....	55
表 5.2.1 ANT 在不同 UV 光照時間下對藻類之毒性比較.....	68
表 5.2.2 NAP 在不同 UV 光照時間下對藻類之毒性比較.....	71
表 5.3.1 以 DO 為試驗終點之三種模式 G value.....	74
表 5.3.2 以 FY 為試驗終點之三種模式 G value.....	74
表 5.3.3 以 GR 為試驗終點之三種模式 G value.....	75
表 5.4.1 以 One-sample t test 分析兩種試驗終點之 NOEC 與 EC10 及其比 值.....	79
表 5.4.2 以 Dunnett's test 分析之 NOEC 值.....	79
表 5.4.3 兩種試驗終點之重要統計參數.....	80
表 5.5.1 QSAR 分析參數.....	82
表 5.6.1 未照 UV 之藻類毒性數據與其他試驗物種毒性數據.....	89
表 5.6.2 照 UV 之藻類毒性數據與其他試驗物種毒性數據.....	91

圖目錄

圖 1.3.1 研究流程圖.....	4
圖 2.1.1 光化學過程.....	9
圖 2.1.2 定義 Type I and Type II 光敏氧化反應.....	10
圖 2.1.3 在模擬太陽光下 Anthracene 光氧化途徑及光變化產物.....	11
圖 2.1.4 在模擬太陽光下 Naphthalene 光氧化途徑及光變化產物.....	12
圖 2.3.1 由基態分子的 HOMO-LUMO gap 定義光毒鐘型曲線.....	19
圖 4.4.1 試驗毒物之結構式.....	38
圖 4.5.1 配製儲備溶液流程.....	43
圖 4.8.1 連續式母槽之培養.....	46
圖 4.8.2 藻類毒性試驗流程圖.....	47
圖 4.8.3 HPLC 分析流程圖.....	49
圖 4.8.4 HPLC 操作流程圖.....	50
圖 5.1.1 三種試驗終點下 ANT 之劑量反應曲線.....	55
圖 5.1.2 三種試驗終點下 ATQ 之劑量反應曲線.....	56
圖 5.1.3 三種試驗終點下 1-hANT 之劑量反應曲線.....	56
圖 5.1.4 三種試驗終點下 2-hATQ 之劑量反應曲線.....	57
圖 5.1.5 三種試驗終點下 1,2-dhATQ 之劑量反應曲線.....	57
圖 5.1.6 三種試驗終點下 1,4-dhATQ 之劑量反應曲線.....	58
圖 5.1.7 三種試驗終點下 1,8-dhATQ 之劑量反應曲線.....	58
圖 5.1.8 三種試驗終點下 1,2,4-trihATQ 之劑量反應曲線.....	59
圖 5.1.9 三種試驗終點下 NAP 之劑量反應曲線.....	59

圖 5.1.10 三種試驗終點下 ISO 之劑量反應曲線.....	60
圖 5.1.11 三種試驗終點下 2-OH-1,4-Nap 之劑量反應曲線.....	60
圖 5.1.12 三種試驗終點下 1-NAP 之劑量反應曲線.....	61
圖 5.1.13 三種試驗終點下 1,4-NAP 之劑量反應曲線.....	61
圖 5.1.14 DO 與 FY 試驗終點之 EC50 相關性分析.....	62
圖 5.1.15 FY 與 GR 試驗終點之 EC50 相關性分析.....	62
圖 5.1.16 GR 與 DO 試驗終點之 EC50 相關性分析.....	63
圖 5.2.1 ANT 於不同 UV 光照時間下化合物之波峰變化.....	66
圖 5.2.2 ANT 在不同 UV 光照時間下對藻類氧氣增加量的劑量反應曲 線.....	69
圖 5.2.3 ANT 在不同 UV 光照時間下對藻類最終產量的劑量反應曲 線.....	69
圖 5.2.4 ANT 在不同 UV 光照時間下對藻類生長率的劑量反應曲線	70
圖 5.2.5 ANT 在不同 UV 光照時間下對藻類氧氣增加量的劑量反應曲 線.....	71
圖 5.2.6 ANT 在不同 UV 光照時間下對藻類最終產量的劑量反應曲 線.....	72
圖 5.2.7 ANT 在不同 UV 光照時間下對藻類生長率的劑量反應曲線	72
圖 5.4.1 控制組溶氧增加量之控制圖.....	78
圖 5.4.2 控制組藻類細胞密度增加量之控制.....	78
圖 5.5.1 去除 outlier 後 Log P 值對 Log (1/EC ₅₀) on DO 關係圖.....	83
圖 5.5.2 去除 outlier 後 Log P 值對 Log (1/EC ₅₀) on FY 關係圖.....	83
圖 5.5.3 去除 outlier 後 Log P 值對 Log (1/EC ₅₀) on GR 關係圖.....	84
圖 5.5.4 多環芳香烴化合物 E _{LUMO} 值對 Log (1/EC ₅₀) on DO 關係圖..	84
圖 5.5.5 多環芳香烴化合物 E _{LUMO} 值對 Log (1/EC ₅₀) on FY 關係圖....	85
圖 5.5.6 多環芳香烴化合物 E _{LUMO} 值對 Log (1/EC ₅₀) on GR 關係圖...	85
圖 5.5.7 多環芳香烴化合物 log P 值和 E _{LUMO} 值對 log(1/EC ₅₀) on DO 迴 歸關係圖.....	86

圖 5.5.8 多環芳香烴化合物 $\log P$ 值和 E_{LUMO} 值對 $\log(1/EC_{50})$ on FY 迴歸關係圖..... 86

圖 5.5.9 多環芳香烴化合物 $\log P$ 值和 E_{LUMO} 值對 $\log(1/EC_{50})$ on GR 迴歸關係圖..... 87



符號表

符號	英文說明	中文說明	單位
C.V.	Coefficient of Variation	變異係數	%
DO	Dissolve Oxygen	溶液中之溶氧量	mg/l
Δ DO	Delta Dissolve Oxygen	溶液中溶氧之增加量	mg/l
EC X	X % Effect Concentration	引起 X % 半致死效應之濃度	mg/l
Log P	n-Octanol/Water Partition Coefficient	辛醇-水係數之 log 值	-
MCV	Mean Cell Volume	藻類細胞之平均細胞體積	$\mu\text{m}^3/\text{cell}$
NOEC	No Observation Effect Concentration	對受測物種未造成明顯毒性反應之最高濃度	mg/l
-	No Data	沒有數據	-
Elumo	Energy of lowest unoccupied molecular orbit	分子的最低空軌道能量	hartree