

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

以光合作用為反應參數之藻類毒性試驗設計

Development of algal toxicity test based on inhibition of photosynthesis reaction

計畫編號：NSC 89-2211-E-009-060

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：陳重元 執行機構及單位：國立交通大學環境工程研究所

一、中文摘要

本研究利用具有密閉系統優點之 BOD 瓶針對重金屬及氯酚類之有機物進行藻類 *Raphidocelis subcapitata* 之毒性試驗，而為了得到敏感性、再現性及便利性等皆有最佳呈現之毒性試驗，對於營養基質之成分濃度、曝氣程度、初始藻類細胞密度及試驗時間等試驗參數進行探討。在毒性試驗終了，以溶氧變化量 (Based On DO) 及生物質量 (Based On Biomass) 兩種作為試驗終點，生物質量即是計算試驗終了時之藻類細胞密度，然後分別以 Probit model 分析 EC50 值。此外，本研究所得各有機物質之毒性數值與 QSAR 參數 (log P 及 pKa) 有相當好之相關性，其 R^2 值 > 0.85 。除了與 QSAR 進行相關性探討外，同時將本研究數值與其他不同受測物種之毒性數據進行比較。

關鍵詞：毒性；藻類；*Raphidocelis subcapitata*；EC50；溶氧

Abstract

The alga *Raphidocelis subcapitata* (UTEX 1648) was grown in a 4-liter transparent chemostat incubator at a dilution rate of 0.25/day. At the steady state, toxicity testing was conducted by transferring adequate amounts of algal suspension, dilution water (with growth medium), and toxicants into 300-ml BOD bottles. The bottles were completely filled up with no air space left. Water seal was provided to ensure a closed test environment. The dilution water was stripped by nitrogen gas (containing 0.5% carbon dioxide) to reduce the dissolved oxygen (DO) level. DO at the beginning of the test was approximately 3 mg/L. Cell density and oxygen evolution were selected as the test endpoints. Various chlorophenols were tested and compared with literature data. The new algal toxicity test was found to be very sensitive to organic toxicants. EC50 values from our tests showed good correlations with logP and pKa, with R^2 values greater than 0.85. The test was also found to be very sensitive compared to other test methods, e.g.; Microtox test, fish acute tests, etc.

Keyword: toxicity; algae; *Raphidocelis subcapitata*; EC50; DO

二、計畫緣由與目的

藻類毒性試驗之發展已久，大多為傳統批次式試驗技術 (ASTM,1994; ISO,1987; US EPA,1996; OECD,1984)。而為了到更加之敏感度，發展出一套連續式藻類毒性試驗。以普遍存在於自然水體中之重金屬為毒物之毒性試驗顯示，連續式反應器培養的藻類均比批次式敏感 (Chen and Lin,1997; Chao and Chen,2000)。除重金屬外，有機物質亦為環境中普遍存在之污染物質，其可經由很多的途徑到達環境之中，像是除草劑、殺菌劑及殺蟲劑的使用，還有木廠中為了防止木頭腐蝕使用之防腐劑、紡織廠以及皮革製品廠中皆會釋放酚類等揮發性有機物質進入環境之中 (Sinclair et al.,1999)。然而，由於藻類毒性試驗於試驗期間多為開放系統或加以強力之攪拌，因而造成揮發性有機物質會在試驗期間散失，進而造成毒性之低估。有研究利用許多途徑，像是利用密閉系統或提供額外碳源來解決有機物質毒性試驗之問題 (Nyholm et al.,1990; Hostetter, 1976; Ludyanskiy et al.,1992)，但仍然有實驗設計複雜之缺點，並不能有效的解決問題。本研究利用 BOD 瓶發展出一套敏感性及再現性佳之藻類毒性試驗，不僅為一密閉系統，且試驗方法簡單，再配合上連續式藻類培養系統，將可以有效應用於重金屬和有機毒物之評估。

本研究之主要目的如下所示：

- (1) 利用 BOD 瓶進行藻類毒性試驗，針對不同參數以尋得毒性試驗最佳化之條件。
- (2) 依照所找出之條件參數進行重金屬及有機物質之毒性試驗，求其 EC50 值，並比較不同試驗終點對毒性試驗之影響。
- (3) 將所得之毒性試驗結果和 QSAR 中重要參數進行比較，討論其相關性。
- (4) 將所得之毒性試驗結果和其他不同受測物種之毒性試驗數據進行比較，探討其相關性及本方法之可行性。
- (5) 進一步的發展利用 BOD 瓶進行毒性試驗方法，使其能在較短時間內檢測出重金屬及有機物質對環境之危害性。

三、研究方法

1、實驗材料

本實驗採用之受測藻種為 *Raphidocelis subcapitata* (UTEX 1648)，由 University of Texas, Austin, Texas, USA 取得。

2、實驗步驟

A、將藻液以藻液、培養基體積比為 1:10 之比例，植入一 4 公升之連續式培養母槽中。連續式母槽置於一恆溫室中，溫度固定在 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ，其光照來源為 $64.5 \pm 10\% \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ 之白冷光燈，當藻液細胞密度約為 $1.9\text{--}2.0 \times 10^6 \text{cells}/\text{mL}$ 時，利用蠕動幫浦將營養基質以稀釋率為 0.25day^{-1} 之態流入，此時之營養基質成分參考 U. S. EPA，並將其氮、磷之濃度降為 50%，而適當的空氣進流可以幫助攪拌。每天以電子顆粒計數器測量其細胞密度，待其達穩定狀態，往後之試驗受測藻液皆由此取得。

B、毒性試驗進行時，每次為六個 300ml 之 BOD 瓶，一瓶為控制組，即不加入任何毒性物質，另五瓶則加入適量之儲備溶液，以得不同濃度之毒性物質，並進行三重複。進行藻類毒性呼吸試驗時，採用藻類細胞密度為 $1.5 \times 10^4 \text{cells}/\text{ml}$ ，在實驗進行起點，以含 0.5% CO_2 之氮氣對營養基質進行曝氣，然後依序將藻液、營養基質及毒性物質加入 BOD 瓶中，以溶氧測定儀測量每個 BOD 瓶中之初始溶氧值，在 48 小時之毒性試驗終了後，測量最終溶氧值及藻類細胞密度。整個試驗過程，溫度控制在 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ，光照強度為 $64.5 \pm 10\% \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ 並至於迴轉式震盪混合器上以 100rpm 之轉速震盪。

C、藉由溶氧增加量及藻類細胞密度之變化量，即為兩種試驗終點，再利用電腦程式 Probit 模式分析求其 EC50 值。而其他如平均值、標準偏差、相關性等皆以 Microsoft Excel 2000 進行計算求得。

四、結果與討論

營養基質強度在整個毒性試驗過程中扮演著極為重要的角色，而其中氮、磷濃度更是關鍵，本試驗中氮、磷比維持在 22.5:1。為了解氮、磷濃度對藻類產氧量之影響，分別以 100%（氮為 4.20mg/l；磷為 0.186mg/l）及 50% 氮、磷濃度之營養基質強度，不加毒性物質， $10^5 \text{cells}/\text{ml}$ 之初始細胞密度，觀察其溶氧量之改變。在 24 小時後，100% 及 50% 營養基質之溶氧增加量分別為 6.20 mg/l 及 4.96mg/l，此外，在 Huang (2000) 的初步結果中顯示，在 50%、100% 及 200% 三種不同之營養基質氮、磷濃度下，200% 氮、磷濃度下毒性試驗之敏感度最低，而 100% 氮、磷濃度下之 C.V. 值最小。因此，為使試驗最佳化，仍使用 100% 氮、磷濃度之營養基質。

表 1. 為營養基質中不同碳酸根濃度對毒性試驗之影響。由表中可見，以溶氧變化量為試驗終點時，在加入兩倍 HCO_3^- 之後，鋅所反應之毒性效果較原營養基質敏感，鎘及酚則是原營養基質下有較敏

感之表現，但酚所表現出之差異不大；以生物質量為試驗終點時，鋅及酚皆在加入兩倍 HCO_3^- 時表現較敏感之反應。 HCO_3^- 加倍後對毒性試驗敏感度之影響並沒有一定之趨勢，可能是因為在毒性試驗進行時， HCO_3^- 和毒性物質產生了螯合作用，且此螯合作用會因為毒性物質之種類及 HCO_3^- 量的多寡而有所差異。

圖 1. 為試驗開始前對營養基質進行不同曝氣時間，即不同曝氣氣量下鎘對藻類毒性試驗之影響。隨著初始溶氧的增加，敏感度有逐漸降低之趨勢，但是差距不大，其 EC50 值最小為 0.140mg/l，最大則為 0.190mg/l。為了有較佳之敏感度及使溶氧值有更大之變化空間，即距飽和溶氧之差距更大之考慮下，爾後試驗之初始溶氧值控制在 2.00mg/l 以下。

圖 2. 為六個不同初始細胞密度不加入毒性物質之試驗，每個情況同時進行三瓶，然後計算其 C.V. 值。由圖中可知，隨初始細胞密度減少及試驗時間之簡短，其變異數 (C.V. 值) 增加，即表示重複組間之變異性增加，變異數最大者為試驗時間 12 小時、初始藻類細胞密度 $1.5 \times 10^4 \text{cells}/\text{ml}$ 時之 15.8%；最小者為 48 小時、 $1.0 \times 10^5 \text{cells}/\text{ml}$ 下之 1.70%。圖 3. 為重金屬鋅在兩個不同濃度 (0.150 mg/l 和 0.300 mg/l) 下對四種初始細胞密度之抑制效果，當初始細胞越少，其抑制效果越好，但如果初始細胞繼續降低，則會造成試驗量測分析上之困難而增加誤差，因此本研究最低初始細胞密度至 $1.5 \times 10^4 \text{cells}/\text{ml}$ 為止。由於越低之初始細胞密度有越敏感之毒性反應，再加上其 C.V. 值仍低於一般傳統藻類毒性試驗之 C.V. 值 (20-30% 左右)，因此，本研究決定採用 $1.5 \times 10^4 \text{cells}/\text{ml}$ 之初始細胞密度。試驗時間為 48 小時，則是考慮其溶氧變化量較大，方便觀察之因。

選出最佳試驗參數之後，將以十種毒性物質進行 BOD 瓶之藻類毒性試驗，包括兩個重金屬及八個有機物質。表 2. 為十種毒性物質之 EC50 值和 NOEC，EC50 值由 Probit 模式求得，而 NOEC 則是參考 Chao (2000) 之方法來判斷，將所有試驗控制組之試驗終點值製成一控制圖，取上下控制範圍 (Control Level) 分別為其平均值加減三倍標準偏差值，當處理組之終點值位於上下控制範圍內時，即判斷其和控制組沒有明顯的差異，而位於控制範圍內之最高濃度則推斷為 NOEC 值。

圖 4. 為本研究之毒性數值與 QSARs 參數之相關性。在 log P 方面，以溶氧變化量及生物質量為試驗終點時，其 R^2 值分別為 0.90 及 0.94；而 pKa 在方面，以溶氧變化量及生物質量為試驗終點時，其 R^2 值分別為 0.85 及 0.95。由此可見，本研究方法在氣酚類有機物方面，和 QSARs 有良好之相關性，將可有效且迅速的預測其毒性。

由表 3. 中可見，除與藻類 *C. vulgaris* 之試驗相關性不佳外 (R^2 為 0.59 Based on DO 及 0.61 Based on Biomass)，其他試驗物種與本研究之毒性反應，無論是以溶氧變化量或是以生物質量為試驗終點

皆有不錯的相關性 ($R^2 > 0.83$)，由此可知，本方法可以有效的評估毒性物質所造成之影響。

五、計畫成果自評

本研究中利用 BOD 瓶進行藻類毒性試驗之技術與其他試驗方法相較之下，除了有良好之相關性外，本方法亦呈現傑出的敏感度和再現性，因為本方法在試驗進行過程中為一密閉系統，能有效的防止揮發性有機物之揮散，且試驗設計簡單、時間也比傳統藻類試驗短。綜合以上種種優點，本研究利用 BOD 瓶之試驗實為評估重金屬和有機毒物毒性影響之最佳方法。

六、參考文獻

1. **Chen, C.Y. and K.C. Lin.** (1997), *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 1337-1344.
2. **Chao, M.R. and C.Y. Chen.** (2000), *Environ. Toxicol. Chem.* **19**, 1589-1596.
3. **Chen, C.Y. and M.R. Chao.**(2000), *Environmental Toxicology and Chemistry.* **19**:1589-1596.
4. **Mingazzini M., M.E. Saenz, F.G. Albergoni and M.T. Marre.**(1997), *Fresenius Envir Bull.* **6**:308-313
5. **Sinclair, G.M., G.I. Paton, A.A. Meharg and K. Killham.** (1999), *FEMS Microbiology Letters.* **174**:273-278.
6. **Boyd, E.M., K. Killham and A.A. Meharg** (2001), *Chemosphere.* **43**:157-166.

七、圖表

表 1. 不同 HCO_3^- 濃度下各毒性物質所表現出之毒性數值

Toxicant	EC50 (mg/l)			
	100% HCO_3^-		200% HCO_3^-	
	Based on DO	Based on Biomass	Based on DO	Based on Biomass
Zn ^a	0.35	-	0.23	-
Cd ^a	0.046	-	0.26	-
Zn ^b	0.10	0.051	0.041	0.03
Phenol ^b	25.9	22.9	26.1	20.7

a : test condition : 1×10^5 cells/ml ; 12-hr .

b : test condition : 1.5×10^4 cells/ml ; 48-hr .

圖 1. 不同初始溶氧下重金屬鎘對藻類毒性反應之關係圖

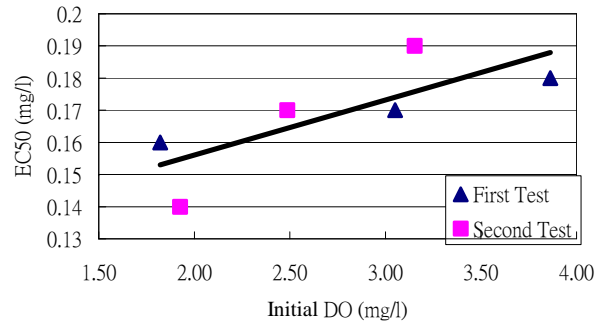


圖 2. 不同初始藻類細胞密度及不同試驗時間與變異數之關係圖

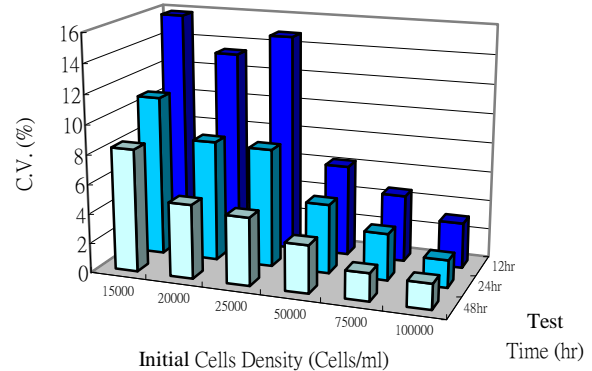


圖 3. 重金屬鋅對不同初始藻液細胞密度之抑制

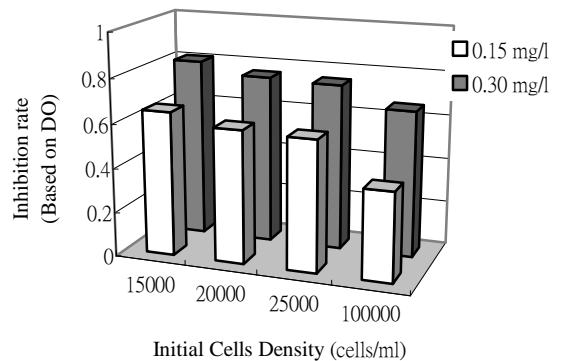


表 2. BOD 瓶藻類毒性試驗之 EC50 值及 NOEC 值

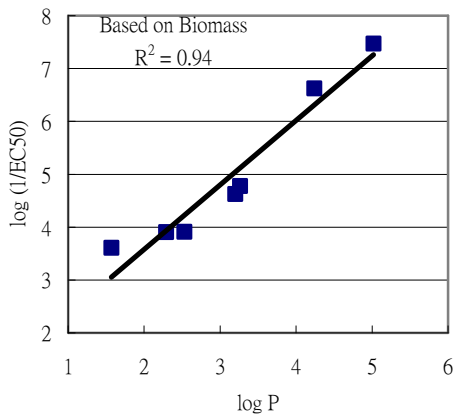
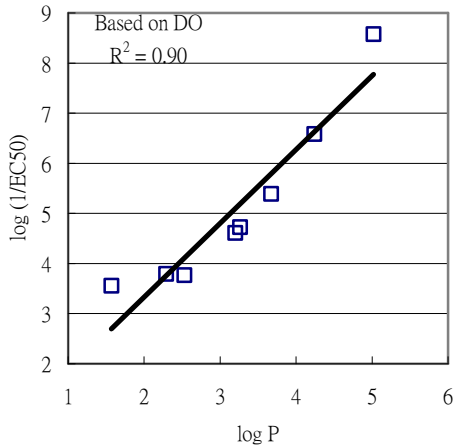
Toxicant	EC50 (mg/l)		NOEC (mg/l)*	
	Based on DO	Based on Biomass	Based on DO	Based on Biomass
	Zn	0.100	0.051	0.01
Cd	0.077	0.031	0.01	<0.01
Phenol	25.9	22.9	<8.19	<8.19
2-CP	20.6	15.8	4.93	4.93
4-CP	21.8	15.6	5.00	5.00
2,3-DCP	3.03	2.68	0.5	0.5
2,4-DCP	3.99	3.84	0.97	0.97
2,4,6-TCP	0.801	-	<0.5	<0.5
2,3,4,6-TTP	0.060	0.055	<0.1	<0.1
PCP	0.007	0.009	0.005	0.005

* : No Observed Effect Concentration °

表 5. BOD 瓶試驗 log (EC50) 值與其他試驗毒性數據之相關性

Toxicity Test	Based on DO	
	Linear equation	R ²
Algae (<i>R. subcapitata</i>)	Y=1.352X - 0.7395	0.92
Algae (<i>C. vulgaris</i>)	Y=1.469X - 0.4671	0.59
Microtox	Y=1.316X - 0.1008	0.89
Daphnia magna	Y=1.921X - 3.7813	0.87
Fishes (<i>Rainbow trout</i>)	Y=1.335X - 1.8020	0.95
Fishes (<i>P. reiculata</i>)	Y=1.779X - 3.0840	0.92
Fishes (<i>C. auratus</i>)	Y=1.358X - 0.7634	0.96
Bacteria (<i>Bacillus sp.</i>)	Y=1.405X + 0.7204	0.83
Bacteria(<i>Activated sludge</i>)	Y=4.245X - 9.8548	0.92

圖 4. 八種有機物質與 QSARs 參數之相關性



Toxicity Test	Based on Biomass	
	Linear equation	R ²
Algae (<i>R. subcapitata</i>)	Y=1.323X - 0.5299	0.93
Algae (<i>C. vulgaris</i>)	Y=1.498X - 0.4537	0.61
Microtox	Y=1.272X - 0.8488	0.92
Daphnia magna	Y=1.822X - 3.3287	0.87
Fishes (<i>Rainbow trout</i>)	-	-
Fishes (<i>P. reiculata</i>)	Y=1.742X - 2.8281	0.93
Fishes (<i>C. auratus</i>)	Y=1.310X - 0.4998	0.97
Bacteria (<i>Bacillus sp.</i>)	Y=1.332X + 0.8803	0.86
Bacteria(<i>Activated sludge</i>)	Y=4.096X - 9.2293	0.92

Y : BOD bottle test's toxicity values °

X : Other toxicity tests' data °