

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

有機毒物對藻類光合作用之毒性研究

Toxicity study of organic chemicals using algal photosynthetic test

計畫編號：NSC 90-2211-E-009-021

執行期限：90 年 8 月 1 日至 91 年 10 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

本研究在發展 BOD 瓶密閉式藻類 (*Raphidocelis subcapitata*) 毒性試驗，並評估三類非極性麻醉有機物之毒性，包括氯苯、含氯乙烷及含氯甲苯類毒物。

在試驗終了時，量測光合作用參數即溶氧變化量 (Based On DO) 及傳統的生物質量 (Based On Biomass) 兩種試驗終點，以 Probit model 分析其 EC50 值。除了 1,1,2,2,-四氯乙烷和六氯乙烷外，以溶氧為試驗終點時皆得到較敏感之 EC50 值。在 QSAR 方面，兩種試驗終點之 R^2 為 0.8868 (Based On DO) 與 0.861 (Based On Biomass)，顯示毒性與 logP 有良好之相關性。而物種間之毒性數據的比較，亦呈現良好之相關性 (介於 0.7 到 0.9 之間)。因此，BOD 瓶藻類毒性試驗敏感性、再現性及可靠性佳。而且方法簡單、方便又經濟，並可用於偵測揮發性有機物毒性。

關鍵詞：密閉式藻類毒性試驗、非極性麻醉有機物、BOD 瓶、logP、揮發性有機物

Abstract

In this study, we use BOD bottles to perform a close-system algal (*Raphidocelis subcapitata*) test assessing the toxicity of three kinds of non-polar narcotic chemicals including chlorobenzene, chloroethane and chlorotoluene.

The toxicity endpoint was measured based on DO and Biomass Methods, then using the Probit model to estimate the values of EC50. We found the EC50 values based on DO was more sensitive except 1,1,2,2,-tetrachloroethane and hexachloroethane. As for the QSAR, the R^2 values of two endpoints are 0.8868 (based on DO) and 0.861 (based on Biomass) respectively, so the toxic values present good correlation with logP values. Between different species, we also found high correlation coefficient that R^2 values were between 0.7 and 0.9. Therefore, the toxic values have well sensitivity, reproducibility and confidence by using BOD bottle test. In addition, this method was very easy, convenient and economic to analyze high vaporizing organic chemicals.

Keyword: close-system algal test, non-polar narcotic chemicals, BOD bottle, LogP, high vaporizing organic chemicals

二、計畫緣由與目的

藻類毒性試驗常被應用於比較相對毒性。但還沒有一個標準或廣泛使用的藻類毒性試驗可應用在偵測揮發性有機物毒性[1]。主要是由於大部分試驗為開放式系統，揮發性物質濃度隨著試驗期拉長逐漸降低，故需以密閉系統進行試驗。

一個藻類毒性試驗密閉式系統，需考慮下列兩項要素：1. 要提供足夠的碳源，以避免藻類因為碳源不足而生長受到抑制。2. 確保試驗毒性物質於試驗期間維持在穩定之濃度。在先前文獻中[2,3,4]之密閉系統毒性試驗，存在過大 Head Space 或離子強度太強導致生長抑制等缺點。但本研究以 BOD 瓶為密閉系統，使用 CO₂-N₂ 曝氣來除去水中溶氧，除可提供充足碳源，而 Head Space 亦將減至最低或甚至沒有 Head Space 以防止揮發導致濃度降低。故可求得更精準之毒性試驗數據。

本研究目的在利用連續式培養下高敏感度藻類，以光合作用產氧量(DO)和傳統生物質量(biomass)參數探討下列問題。

- (1) 利用 BOD 瓶進行藻類毒性試驗，分別以溶氧和細胞密度為試驗終點，比較兩種試驗終點對毒性試驗的影響。
- (2) 將所得之毒性試驗結果和 QSAR 中之重要參數進行統計分析，討論其相關性。
- (3) 將所得之結果和其他物種之毒性試驗比較，討論相關性及本毒性試驗之可行性。

三、研究方法

1、實驗材料

本研究中，採用月芽藻 (*Raphidocelis*

subcapitata)。而試驗毒物為苯類、氯苯類、氯乙烷類、甲苯和氯甲苯類之有機毒物。皆為麻醉毒性之非反應性毒物。

2、實驗步驟

(1) 連續式母槽之培養

藻類於四升的連續式母槽培養，曝氣量 250ml/min，光照強度 $64.5 \pm 10\% \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 。溫度 $24 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ 。營養基質參照 U.S. EPA，但 EDTA 濃度降為原本之 10%，而氮、磷濃度降為 50%。稀釋率 0.25 day^{-1} 。每日量測母槽中細胞濃度、平均細胞體積、pH 值、溢流率等數值。連續三天之上述參數值在一定控制範圍內即達穩定態。

(2) 藻類毒性試驗

進行毒性試驗每次為七個 300ml 之 BOD 瓶，一瓶為控制組，不加毒性物質，另外六瓶則加入不同濃度毒性物質，並進行三重複。毒性試驗之前需進行 TOC 量測。營養基質參照 U.S. EPA，但不含 EDTA。加入 BOD 瓶之初始細胞密度為 $1.5 \times 10^4 \text{ cells/ml}$ 。再加入曝氣好之純水、營養基質及毒性物質以達到所需濃度。測量各瓶溶氧值是為初始溶氧值，溫度 $24 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ ，光照強度 $64.5 \pm 10\% \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ 之白冷光，震盪頻率 100rpm。於 48 個小時後量測 BOD 瓶溶氧值為最終溶氧值。接著用顆粒計數器量測 BOD 瓶的藻類細胞密度。

(3) 統計分析

使用 Probit 模式計算 EC50。以 One sample t-test 及 Dunnett's test 計算 NOEC。

四、結果與討論

1. BOD bottle 溶氧試驗分析

由表 1.及表 2.中 1,3-二氯苯之實驗結果計算 EC50 分別是 2.68 mg/l (on DO)與 3.34 mg/l (on biomass)，因此以溶氧增加量為試驗終點較敏感。

表 3.是以溶氧變化量為試驗終點時之 EC50 值及 logP，顯示氯化乙烷類毒性較低，最低的 1,2-DCE 之 EC50 值為 193.38mg/l。氯化苯類和氯化甲苯類毒性差異不大，最高為 HCB (EC50=0.37mg/l)。以 $\log(1/EC50)$ 為縱軸 LogP 為橫軸繪製相關性比較圖(圖 1)，所得之迴歸關係式為： $\log(1/EC50)=0.8014 \log P+1.6827$ ； $R^2=0.8868$ ，表 4.則是以生物質量變化量為試驗終點之 EC50 值，其中氯化乙烷類中之 1,2-DCE 毒性最低，其 EC50 值為 209.33 mg/l。氯化苯類和氯化甲苯類毒性差異不大，毒性最高的是 HCB (EC50= 0.65mg/l)。以 $\log(1/EC50)$ 為縱軸 LogP 為橫軸繪製成相關性比較圖(圖 2)，可得迴歸關係式為： $\log(1/EC50)=0.7782 \log P+1.6684$ ； $R^2=0.861$ ，故毒性數據與 Log P 具良好相關性。

除了本研究物種外，另外選了九種其他常見的物種來探討相關性。由表 6. 觀察 R^2 可知與本研究相關性最高的是和本研究同一物種的 *Raphidocelis subcapitat* 的批次式實驗，兩種試驗終點的相關性分別為 0.898 (On DO) 和 0.921 (On Biomass)。而相關性最低的為 Polytox 的 0.655 (On DO) 和 0.701 (On Biomass)。本研究所得到的 R^2 大多介於 0.7 到 0.9 之間，故本研究所得到的毒性數據值得信賴。

在敏感性方面，觀察表 5.和表 6.，可知批次式的 *R. subcapitat* 和 *D. magna* 與本試驗敏感度差異不大；而 *S. ambiguum* 和 *C.cf. dubia* 的敏感則優於 *R. subcapitat*。此外，其它物種敏感度皆不如 *R. subcapitat*，因本研究與 *S. ambiguum* 的試驗皆為密閉系統，皆可獲得相當高敏感性。證明本試驗非常適合用在揮發性毒物之毒性試驗。

2. NOEC 的比較

表 1.與表 2.以 1,3-DCB 為例，兩試驗終點以 One-sample t test 得到的 NOEC 皆為

1.40mg/l，而 Dunnett's test 得到的 NOEC 皆為 0.70mg/l。故 Dunnett's test 可以準確決定出較低的 NOEC 值。

3. 重複試驗

表 7.對 benzene 和 4-chlorotoluene 進行五次和四次重複試驗，EC50 的部分，所求得最大 C.V.值為 benzene 以溶氧增加量為試驗終點的 10.91%，最小為 4-chlorotoluene 以生物質量為試驗終點的 6.77%；EC10 的部分 C.V.值較大，最大的是 benzene 以生物質量為試驗終點的 41.19%，最小為 4-chlorotoluene 以生物質量為試驗終點的 7.45%，其變異性較 EC50 結果增加許多。

五、計畫成果自評

本研究所得之毒性數據與 Log P 有良好之相關性，也證明了兩種試驗終點之間具有良好之相關性。在物種間相關性研究所得的 R^2 大多介於 0.7 到 0.9 之間，故實驗毒性數據值得信賴。在敏感度方面，亦證明本研究敏感度高，C.V.值的結果則顯示本研究再現性高，由此可知本試驗非常適合應用在揮發性毒物的毒性試驗上。整個試驗方法之量測簡單、方便又經濟，對於試驗時間過長、試驗過程繁瑣之生物毒性試驗方法，本研究方法不失為一可替代之試驗方法。研究成果基本上完全達成預期目標，研究內容與計畫亦符合，應用價值高，將於近期內投稿至國際學術期刊。

六、參考文獻

1. **Brack, W. and Rottler, H.** (1994), In: Environmental Science and Pollution Research, 4:23-228.
2. **R. Kuhn and M. Pattard** (1990), In: Water Research, 24:31-38.

3. S. Galassi and M. Vighi (1981), In: Chemosphere, 10:1123-1126.
4. D.C. Herman, W.E. Inniss and C.I. Mayfield (1990), In: Aquatic Toxicology, 18:87-100.

七、圖表

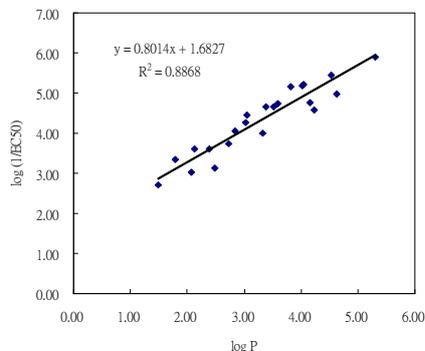


圖 1.以溶氧增加量為試驗終點與 log P 之相關性

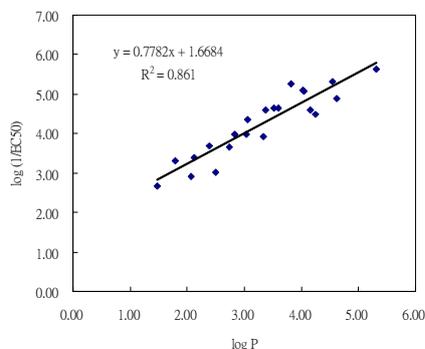


圖 2.以生物質量增加量為試驗終點與 log P 之相關性

表 1. 1,3-二氯苯以溶氧為試驗終點之實驗數據

Conc. (mg/l)	Initial DO (mg/l)	Final DO (mg/l)	Delta DO (mg/l)	inhibition rate On DO
Control	1.15	7.48	6.33	0.000
7.00	2.48	2.83	0.35 ^{☆*}	0.945
4.20	2.00	2.67	0.67 ^{☆*}	0.895
2.80	1.69	4.62	2.92 ^{☆*}	0.538
2.10	1.49	6.33	4.85 ^{☆*}	0.234
1.40	1.43	6.95	5.52 [*]	0.128
0.70	1.36	7.24	5.88	0.072
EC50=		2.68		

☆ : The value is over control level of control chart (between 4.96 to 6.97)

* : Statistically different (P<0.05) from controls using one-tail Dunnett's test

表 2. 1,3-二氯苯以生物質量為試驗終點之實驗數據

Conc. (mg/l)	Initial (cells/ml)	Final (cells/ml)	Delta Biomass (cells/ml)	inhibition rate On Biomass
Control	15000.00	361400.00	346400.00	0.000
7.00	15000.00	31666.67	16666.67 ^{☆*}	0.765
4.20	15000.00	37833.33	22833.33 ^{☆*}	0.709
2.80	15000.00	91800.00	76800.00 ^{☆*}	0.431
2.10	15000.00	176766.67	161766.67 ^{☆*}	0.225
1.40	15000.00	254500.00	239500.00 [*]	0.110
0.70	15000.00	324566.67	309566.67	0.034
EC50=		3.34		

☆ : The value is over control level of control chart (between 2.31×10^5 to 3.82×10^5)

* : Statistically different (P<0.05) from controls using one-tail Dunnett's test

表 3. BOD bottle test 以溶氧變化量為試驗終點之數據

Chemicals	EC50 (mg/l)	95% Confidence Limit	Molecular Weight	logP	Log (1/EC50)*
Benzene	20.86	16.17 - 34.74	78.11	2.13 ^a	3.59
Chlorobenzene	9.80	7.90 - 14.67	112.56	2.84 ^a	4.06
1,2-DCB	3.28	2.89 - 4.02	147.00	3.38 ^a	4.65
1,3- DCB	2.68	2.71 - 4.16	147.00	3.6 ^a	4.74
1,4- DCB	3.17	2.68 - 3.83	147.00	3.52 ^a	4.67
1,2,3- TCB	1.15	0.69 - 4.49	181.45	4.05 ^c	5.20
1,2,4- TCB	1.19	0.99 - 1.56	181.45	4.02 ^a	5.18
1,3,5- TCB	3.11	3.01 - 3.21	181.45	4.15 ^c	4.77
1,2,3,4- TCB	0.76	0.46 - 1.59	215.89	4.54 ^c	5.45
1,2,4,5- TCB	2.26	2.12 - 2.41	215.89	4.63 ^c	4.98
HCB	0.37	0.29 - 0.47	284.78	5.31 ^a	5.89
1,1-DCE	44.83	43.31 - 46.25	98.96	1.79 ^c	3.34
1,2- DCE	193.38	170.13 - 218.73	98.96	1.48 ^a	2.71
1,1,1- TCE	96.40	74.03 - 124.50	133.40	2.49 ^a	3.14
1,1,2- TCE	129.28	111.95 - 149.19	133.40	2.07 ^b	3.01
1,1,1,2- TCE	9.00	7.38 - 10.61	167.85	3.03 ^b	4.27
1,1,2,2- TCE	41.88	39.05 - 45.36	167.85	2.39 ^a	3.60
PCE	7.22	6.02 - 8.73	202.30	3.05 ^b	4.45
HCE	1.66	1.12 - 3.52	236.74	3.82 ^a	5.15
Toluene	16.45	9.81 - 28.76	92.14	2.73 ^a	3.75
4-CT	12.45	9.59 - 15.54	126.58	3.33 ^c	4.00
2,4-DCT	4.16	3.81 - 4.61	161.03	4.24 ^c	4.59

*:EC50 unit : mol/l

a: CRC Chemistry Handbook (1996) [9]

b: Howard PH (1991) [10]

c: Mark T.D. Cronin, T. Wayne Schultz (1997) [6]

表 4. BOD bottle test 以生物質量變化量為試驗終點之數據

Based on Biomass						
Chemicals	EC50	95% Confidence		Molecular	Log logP	Log (1/EC50)*
	(mg / l)	Limit		Weight		
Benzene	28.70	24.63	- 32.98	78.11	2.13 ^a	3.40
Chlorobenzene	11.88	6.97	- 21.20	112.56	2.84 ^a	3.98
1,2-DCB	3.77	3.55	- 4.08	147.00	3.38 ^a	4.59
1,3- DCB	3.34	2.07	- 3.83	147.00	3.6 ^a	4.64
1,4- DCB	3.34	3.20	- 3.49	147.00	3.52 ^a	4.64
1,2,3- TCB	1.49	1.27	- 1.83	181.45	4.05 ^c	5.09
1,2,4- TCB	1.41	1.30	- 1.54	181.45	4.02 ^a	5.11
1,3,5- TCB	4.64	4.08	- 5.63	181.45	4.15 ^c	4.59
1,2,3,4- TCB	1.04	0.90	- 1.18	215.89	4.54 ^c	5.32
1,2,4,5- TCB	2.71	2.43	- 3.10	215.89	4.63 ^c	4.90
HCB	0.65	0.59	- 0.72	284.78	5.31 ^a	5.64
1,1-DCE	47.40	45.31	- 49.35	98.96	1.79 ^c	3.32
1,2- DCE	209.33	182.82	- 233.76	98.96	1.48 ^a	2.67
1,1,1- TCE	126.16	114.74	- 139.07	133.40	2.49 ^a	3.02
1,1,2- TCE	160.35	146.78	- 177.48	133.40	2.07 ^b	2.92
1,1,1,2- TCE	17.72	15.22	- 20.42	167.85	3.03 ^b	3.98
1,1,2,2- TCE	33.79	27.08	- 45.95	167.85	2.39 ^a	3.70
PCE	8.86	7.84	- 10.13	202.30	3.05 ^b	4.36
HCE	1.30	1.20	- 1.41	236.74	3.82 ^a	5.26
Toluene	20.50	16.07	- 26.28	92.14	2.73 ^a	3.65
4-CT	14.94	13.28	- 16.44	126.58	3.33 ^c	3.92
2,4-DCT	5.29	3.96	- 7.36	161.03	4.24 ^c	4.48

*:EC50 unit : mol/l

a: CRC Chemistry Handbook (1996) [9]

b: Howard PH (1991) [10]

c: Mark T.D. Cronin, T. Wayne Schultz (1997) [6]

表 5. 其它物種毒性試驗數據

Chemicals	Algae ^a	Fish ^b	Bacteria ^a	Bacteria ^a	Bacteria ^b	Microtox ^d	Protozoan ^e	Cladoceran ^f	Cladoceran ^f
	(<i>R. rubropictus</i>)	(<i>F. minnow</i>)	(<i>AS</i>)	(<i>Polytox</i>)	(<i>Methanogens</i>)	(<i>V. fischeri</i>)	(<i>S. ambigua</i>)	(<i>C. dubia</i>)	(<i>D. magna</i>)
	log(1/EC50)	log(1/LC50)	log(1/EC50)	log(1/EC50)	log(1/EC50)	log(1/EC50)	log(1/LC50)	log(1/EC50)	log(1/LC50)
Benzene	-	3.49	1.90	2.06	1.81	3.34	3.94	3.89	3.54
Chlorobenzene	3.95	-	2.86	2.51	2.62	3.86	4.69	4.33	4.26
1,2-DCB	4.82	3.94	3.48	3.04	2.99	4.38	5.64	5.35	4.83
1,3- DCB	-	4.19	3.37	3.57	2.75	4.24	5.44	-	4.41
1,4- DCB	4.96	4.26	4.02	4.39	3.23	4.39	5.36	5.06	4.58
1,2,3- TCB	5.30	-	-	-	3.88	4.53	-	-	5.13
1,2,4- TCB	5.11	4.78	3.71	3.90	3.18	4.50	-	5.41	4.70
1,3,5- TCB	-	-	-	-	2.38	-	-	-	-
1,2,3,4- TCB	-	-	-	-	4.03	-	6.81	6.22	-
1,2,4,5- TCB	-	-	-	-	-	5.51	-	-	-
HCB	-	-	-	-	-	6.32	-	-	-
1,1-DCE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,2- DCE	-	2.85	1.85	2.16	-	2.43	4.14	-	2.60
1,1,1- TCE	-	-	2.31	2.51	-	-	-	-	-
1,1,2- TCE	-	3.21	-	-	-	-	4.62	-	-
1,1,1,2- TCE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,1,2,2- TCE	-	3.92	2.93	2.97	-	3.70	-	-	3.97
PCE	-	4.43	-	-	-	-	-	-	-
HCE	-	5.23	-	-	-	5.52	-	-	-
Toluene	-	3.43	2.50	2.65	2.20	3.08	4.96	-	3.57
4-CT	-	-	-	-	-	3.88	5.12	4.89	4.70
2,4-DCT	-	-	-	-	-	-	-	5.20	-

EC50 , IC50 and LC50 unit : mol / l

a : Galassi et al. (1981) [3]

b : Blum et al. (1991) [14]

c : Xu et al. (1998) [15]

d : Zhao et al. (1998) [16]

e : Jawecki et al. (2002) [17]

f : Rose et al. (1998) [18]

表 6. BOD bottle 毒性試驗與其他物種毒性試驗之關係

試驗物種	Base ON DO		Base On Biomass	
	迴歸方程式	R ²	迴歸方程式	R ²
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	Y = 0.8522X + 0.6340	0.898	Y = 0.8494X + 0.5769	0.921
Fathead minnow	Y = 1.1114X - 0.2827	0.851	Y = 1.1640X - 0.5427	0.887
Activated sludge	Y = 0.9408X + 1.2878	0.803	Y = 0.9751X + 1.1202	0.856
Polytox	Y = 0.8364X + 1.5220	0.655	Y = 0.8687X + 1.3577	0.701
<i>Spirostomum ambiguum</i>	Y = 0.9002X - 0.5032	0.776	Y = 0.9035X - 0.6085	0.787
<i>Ceriodaphnia cf. dubia</i>	Y = 0.8192X + 0.3938	0.873	Y = 0.8396X + 0.1974	0.870
Methanogens	Y = 0.7770X + 2.3458	0.769	Y = 0.8029X + 2.1657	0.791
Microtox	Y = 0.7659X + 1.1758	0.855	Y = 0.7542X + 1.1561	0.861
<i>Daphnia magna</i>	Y = 0.9434X + 0.2253	0.816	Y = 0.9395X + 0.1734	0.829

表 7. 苯和 4-氯甲苯之重複實驗數據

chemicals	based on DO				based on Biomass			
	EC50	C.V.	EC10 ^a	C.V.	EC50	C.V.	EC10 ^a	C.V.
	19.23		7.50		31.52		14.01	
	20.69		7.45		30.88		13.01	
Benzene	23.27	10.91%	9.04	27.09%	27.49	9.00%	8.51	41.19%
	23.02		8.15		28.46		8.71	
	18.11		3.91		25.17		4.09	
mean	20.86		7.21		28.70		9.67	
	12.91		7.01		15.40		6.19	
4-chlorotoluene	12.66	9.00%	6.80	14.51%	14.76	6.77%	6.50	7.45%
	10.83		5.05		13.62		5.43	
	13.39		6.93		15.98		6.13	
mean	12.45		6.45		14.94		6.06	

A: by Weibul model

The unit of EC50 and EC10 is mg/l