

報告單位：五組（林哲雄）

報告事項：底泥生物慢毒性檢測技術最新發展

說 明：

- 一、本文為本所 101 年度委託研究計畫「底泥生物慢毒性檢測技術開發計畫」相關研究文獻回顧，回顧內容包括：
 - （一）以淡水小型藻 *Pseudokirchneriella subcapitata* 進行全底泥毒性測試方法之建立及應用。
 - （二）利用端足目 *Melita plumulosa* 和橈足類 *Nitocra spinipes* 進行快速非致死底泥毒性之敏感度及成效探討。
 - （三）以空間狀態及時間變化趨勢探討美國華盛頓州 Puget 灣底泥孔隙水毒性
 - （四）以 Pyrene 含量預估受氣相影響底泥中孔隙水中 EPA-34PAH 濃度和毒性。
 - （五）美國中部大陸河流底泥毒性。
 - （六）兩個南加州海岸集水區水體及底泥中三大類殺蟲劑分布及毒性。
 - （七）慢毒性餵食鎘之累積及毒性模擬－從附著水生生物到 *Hyaella azteca*。
 - （八）利用 *Lumbriculus variegatus* 和 *Chironomus riparius* 評估德國 Hessian 州水體底泥毒性。
- 二、本文業經彙整撰述如附，擬於所務會議提報後，投稿「環境分析評論」第 4 期。

底泥生物慢毒性檢測技術最新發展

謝季吟¹ 林哲雄²

1.國立屏東科技大學環境工程與科學系

2.行政院環保署環境檢驗所第五組

摘要

底泥生物毒性試驗已廣泛被各國採用為探討底泥污染物所導致之生物效應。一般而言，僅有少部份底泥樣品足以引起存活等急毒性效應，因此在評估中低污染等級底泥生物效應時，係以生物完整生命周期的慢毒性試驗為較佳評估工具。目前被用在底泥慢毒性檢測之物種包括端足類動物 (Amphipods)、多毛類 (Polychaetes)、寡毛類 (Oligochaetes) 等物種，而主要的測試終點則包括存活、生長發育與繁殖或生物累積效應。如將受測物種對於底泥不同物化特性的容忍度、測試終點結果判斷與代表性及生態相關性列入考量，則以端足類 *Hyaella azteca* 為最廣泛當作底泥生物慢毒性之測試物種，不但較其他測試物種靈敏，也已成功被用在添加殺蟲劑、多環芳香烴及重金屬底泥之相關研究。

前言

底泥為污染物如除草劑、農藥、多氯聯苯、多環芳香烴及重金屬的沉積庫。其對水域生態系統所造成威脅儼然成為世界各國重要的環境議題。受污染的底泥可能直接對存活於水體或底泥的生物體造成毒性影響，亦或經由食物鏈而導致污染物累積於生物體之來源。又當水域因受擾動或因底泥與水體重新平衡分配時，污染物會再度被釋回水體，易造成污染物重新累積於水域生物體內，或改變為其它形態而重新沉積。

傳統利用化學分析方法檢測污染物時，由於污染物種類繁多且性質差異性大，除了耗時費力外，還會造成判讀不易，無法反應全底泥(whole sediment)對生物可能造成的不利影響及導致生態風險。為釐清化學物質與生物反應之相關性，尤其當生物體長期暴露於微量化學物質時，如何利用底泥毒性測試來評估所存在污染物質對生物體的危害，並提供潛在毒性相關資訊，已成為國內對了解底泥潛在關切化學物質(chemicals of potential concern, COPCs)濃度之測定及是否足夠評估所衍生之生態風險的必要手段。

近年來，底泥慢毒性測試物種的適用性及其搭配化學分析數據，對於污染物質所造成的生物效應已備受廣泛的重視與探討。其相關研究主要是針對不同物種對底泥污染物的敏感性與底泥物化特性之相關性進行研討，尤其在受測生物慢性暴露過程中，污染物對於生物繁殖或生長發育的影響。近期被採用做為毒性測試之物種包括 Oligochaete (*Lumbriculus variegatus*), Midges (*Chironomus riparius*) , Green alga (*Pseudokirchneriella subcapitata*), Copepod (*Nitocra spinipes*), Amphipod (*Melita plumulosa*, *Hyaella azteca*, *Hyaella curvispina*, *Leptocheirus plumulosus*), Urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*)等。本篇文章將探討底泥檢測方法的演進與代表物種，再擇其中幾種底泥慢毒性檢測試驗進行說明。

檢測方法演進與優劣比較

實驗室底泥毒性試驗主要是用來評估人為添加污染物或野外採集底泥中污染物的生物有效性(bioavailability)，快速

提供受污染底泥對生物體潛在毒性的相關資訊。受試生物暴露在野外採集底泥的反應常被用來與物種暴露在對照組底泥(reference sediment)反應做比較。一般毒性檢測方法所選擇的受試生物可能為微生物、藻類、無脊椎生物及魚類，其中微生物酵素活性(enzyme activity)、藻類的生長(growth)或魚類胚胎存活(embryo-larval survival)等試驗則因測試終點敏感度及個體較大需要較大空間等因素，在底泥之生物毒性評估上不常被選用，而底棲無脊椎生物因為是生產者和較高營養階層間重要的連結者，再者為普遍存在及直接與底泥接觸，且物種種類亦最多，因此為底泥毒性測試中常見的物種。

底泥毒性測試期程長短可能會影響毒性測試物種反應，可依試驗時間長短分為急性(幾小時到幾天暴露)及慢性(10天或更長時間暴露)毒性試驗，主要以受測生物之生命週期為考量。而除了全底泥會被用來評估底泥污染的生物相關性(biological significance)外，亦可經由懸浮固體(suspended solid)、溶出液(elutriate)及孔隙水(pore water)等不同直接或間接底泥相來評估污染物綜合效應，但仍以全底泥測試結果最能反映污染物整體短期及長期生物效應而較佳。目前美國材料試驗協會(American Society for Testing and Materials, ASTM)與美國環保署(U.S. EPA)已相繼發展出一系列底泥慢毒性測試方法，評估受試生物經長時間暴露所造成之影響；經濟合作與發展組織(OECD)也建立以 *Chironomus riparius* 為測試物種，評估幼蟲成長(長度或重量)、死亡率、蟲體鑽出時間(emergence time)或性別比及繁殖(子代數目)等測試終點的毒性測試方法。另外，美國地質調查局(USGS)或美國國家海洋與大氣管理局(NOAA)等機構或各州政府

(state government) 也開始利用這些毒性測試方法做為海灣河口監測計畫或轄區內管理水域底泥整治之篩選工具。

測試物種評估指標意義

試驗物種的選擇對於慢毒性測試的相關性、成功與否及數據的完整詮釋有很大的影響。然而，對所有底泥毒性測試而言，沒有”最適宜”物種。通常選擇測試物種時需考慮下列因素：(1) 有毒性儲存資料說明對所關切底泥化學物質有相當的靈敏性及區別性；(2) 有不同實驗室對於試驗流程比對的相關資料庫；(3) 可以直接與底泥接觸(水層與底棲生物)；(4) 易於培養或野外採集獲得；(5) 易於實驗室中養護；(6) 易確認生物型態；(7) 具重要生態或經濟價值；(8) 分佈於廣泛地理區域及可反應評估場址本土種之生態；(9) 可容忍底泥不同物化特性(eg. 粒徑)；(10) 與選擇的暴露方法及測試終點相容。

在執行底泥毒性試驗時，通常會至少選擇不同物種多種測試終點(如存活、成長或繁殖)進行評估，以期能較完整的評估底泥污染情形。1977 年美國在以海洋棄置規範及標準(Ocean Dumping Regulations and Criteria, ODRC)要求進行浚挖工程前，必須以不同物種進行現場底泥對於生物不利影響之評估，在不同物種靈敏度的比較方面，最後評估結果係以端足目動物(Amphipoda)最為敏感。在慢毒性測試終點的評估上，主要是將生物體完整生命週期暴露在樣品後，與控制組進行存活率(survival)、成長抑制(growth inhibitory)、子代數量(number of young produced)之比較，各測試終點如顯著($P<0.05$)低於控制組則為具毒性效應，亦是常被用來評估中

低污染底泥所導致生物效應的手段。

另外在評估底泥添加污染物對生物體慢性效應或累積效應上，也常會利用影響濃度(Effect Concentration)、無可見效應濃度(No Observed Effect Concentration)及最低可見效應濃度(Lowest Observed Effect Concentration)來進行探討。

相關檢測實例數據探討

在底泥慢毒性檢測技術最新發展的探討上，有些測試物種適用性較廣，可適用於不同物化性質之底泥，但大多數測試物種僅適用在淡水底泥或河口區的底泥，或只能間接(間隙水)評估底泥毒性效應。Zhang 等學者^{<1>}提到一種利用混入褐藻膠之固定化微藻 *pseudokirchneriella subcapitata* 製成藻珠(algal beads)進行添加底泥及野外底泥樣品之 72hr 成長抑制試驗全底泥毒性方法，以改善傳統使用藻類進行底泥毒性試驗時具潛在藻類生長速率不佳及藻細胞計數不易等問題，雖然在利用微藻進行毒性試驗有所突破，不過於培養過程中會牽涉藻珠穩定性等問題，且成長試驗抑制效應所能提供底泥毒性之資訊仍較有限。Long 等學者^{<2>}以太平洋紫海膽 *Strongylocentrotus purpuratus* 配子受精成功率評估底泥間隙水毒性效應與空間狀態及時間變化趨勢之相關性時，提到利用不同前處理提高了配子受精率，雖可以比較性的看出不同區域底泥毒性效應之差異，但其中可能牽涉許多底泥樣品的操弄，亦有可能改變其毒性效應。

雖然在利用微藻進行毒性試驗有所突破，不過於培養過程中會牽涉藻珠穩定性等問題，且成長試驗抑制效應所能提供底泥毒性之資訊仍較有限。Simpson 等學者^{<3>} 利用河口

底棲物種端足目 *Melita plumulosa* 及橈足類 *Nitocra spinipes* 進行評估十天存活及繁殖效應的底泥毒性試驗。其中以 *M. plumulosa* 的繁殖率顯著(t-test, $P < 0.05$)低於對照組 15%或 *N. spinipes* 的繁殖率低於對照組 25%時，即被歸納為具有毒性之樣品。學者認為由於端足目 *Melita plumulosa* 雖然在利用微藻進行毒性試驗有所突破，不過於培養過程中會牽涉藻珠穩定性等問題，且成長試驗抑制效應所能提供底泥毒性之資訊仍較有限。在顯微鏡下記錄測定總幼體數後，發現繁殖效應比存活效應更能反應底泥污染情形。再加上 *Nitocra spinipes* 控制組變動情形較 *Melita plumulosa* 明顯，而且馴養過程會有動物蟲害的問題，所以 *Melita plumulosa* 應為更適合之物種。另還有利用海洋端足目 *Leptocheirus plumulosus* 則與淡水端足目 *Hyaella azteca* 兩物種 28 天慢毒性存活結果與藉由 pyrene 含量來評估底泥孔隙水中 34 種多環芳香烴化合物濃度及毒性時，因為 88%以上的間隙水及 98%以上的底泥樣品中均測出 pyrene，因此藉由混合液中指標污染物存在的情形評估整體毒性是有可能且為較經濟的方法^{<4>}。

其它端足目常被當作底泥慢毒性測試物種還包括 *Diporeia spp.*, *Hyaella curvispina* 等，但仍以 *Hyaella azteca* 為最普遍使用的物種，曾有不同的研究提出此物種測試時間的長短會干擾測試終點的反應。不同研究之 *Hyaella azteca* 暴露時間可分為 7 天、10 天、28 天及 42 天，例如 *H.azteca* 暴露在底泥 28 天後，呈現毒性反應，但卻在 2-14 天的暴露期中顯示無毒性效應。Haring 等學者^{<5>}在 7 天的底泥毒性試驗中雖然增加了暴露生物數量，但是所得毒性測試結果

(存活及成長)並無法解釋化學分析結果，顯示測試終點選擇的重要性。目前 *H.azteca* 暴露 42 天觀察其存活、生長發育及繁殖效應，雖然在利用微藻進行毒性試驗有所突破，不過於培養過程中會牽涉藻珠穩定性等問題，且成長試驗抑制效應所能提供底泥毒性之資訊仍較有限；亦有更深度的探討週遭介質及所給予的食物可能造成 *H.azteca* 體內重金屬負荷之貢獻度，或用來進行殺蟲劑分布與其毒性效應之相關性探討^{<6><7>}。

除此之外，仍有其它以不同底棲無脊椎生物進行底泥生物慢毒性試驗，如雙翅目 *Lumbriculus variegatus* (Diptera) 及 *Chironomus riparius* (Midges)，由於兩種底棲無脊椎生物食性不同，*Lumbriculus variegatus* 傾向於較深底層攝取底泥及附著微粒物質，但是 *Chironomus riparius* 幼體則選擇藻類及底泥表層攝食，再加上生活史也不同，所以當暴露在不同污染物質時的反應程度亦不同。舉例來說，蟲體鑽出時間對 *Chironomus riparius* 試驗是常見的測試終點，當有多種環境化學污染物質存在時會導致物種出現時間延緩，但是學者也曾經觀察到低濃度的雙酚 A (bisphenol A, BPA) 會導致 *C. riparius* 幼體孵出時間變快，但高濃度的 BPA 又導致出現時間變得很慢，也就是說同樣的污染物質在不同濃度時出現衝突效應 (conflicting effect)，所以對於污染物質在不同濃度時，所引起的生物效應在數據解釋上具有很大的挑戰^{<8>}。

未來發展與結論

在過去幾十年來，國內環境污染物質檢測以化學分析為主，但是以化學方法分析所需之成本甚高且耗時過長，再加

上分析樣品日趨繁雜，如果僅針對規範化合物進行檢測，難免會有無法掌握其它可能存在污染物對環境影響之疏漏，因此快速、有效且低成本且能反映實際環境生態體系生物效應的檢測方法之建立實有其必要性及其迫切性。

環保署環境檢驗所從民國 94 年起就開始嘗試利用包括紅蟲 (*Tubifex sp.*)、台灣蜆 (*Corbicula fluminea*)、朱文錦 (*Carassius carassius*)、文蛤 (*Meretrix lusoria*)、雙齒圍沙蠶 (*Perinereis aibuhitensis*)、多齒新米蝦 (*Neocaridina denticulata*) 及斑馬魚 (*Brachydanio rerio*)、端足蟲 (*Hyaella azteca*) 等 8 種物種進行 27 條河川流域採集底泥樣品之急毒性效應，並持續監測各樣站之底泥污染物質之化學濃度變化。目前亦積極開發底泥生物慢毒性檢測技術，嘗試建立不同物種受中低污染程度之底泥，其污染物質對受試生物生長、發育及繁殖效應之影響。以利未來進行生態風險評估之參考。

參考資料

1. Zhang, L. J., Ying, G. G., Chen, F., Zhao, J. L., Wang, L., and Fang, Y. X., 2012. Development and application of whole-sediment toxicity test using immobilized freshwater microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 31(2), pp.377-386.
2. Long, E. R., Carr, R. S., Biedenbach, J. M., Weakland, S., Partridge, V., and Dutch, M., 2012. Toxicity of sediment pore water in Puget Sound (Washington, USA): a review of spatial status and temporal trends. *Environmental Monitoring and Assessment*.

3. Simpson, S. L., and Spadaro, D. A., 2011. Performance and sensitivity of rapid sublethal sediment toxicity tests with the amphipod *Melita plumulosa* and copepod *Nitocra spinipes*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 30(10), pp.2326-2334.
4. Arp, H. P. H., Azzolina, N. A., Cornelissen, G., and Hawthorne, S. B., 2011. Predicting Pore Water EPA-34 PAH Concentrations and Toxicity in Pyrogenic-Impacted Sediments Using *Pyrene Content*. *Environmental Science and Technology*, 45(12), pp.5139-5146.
5. Haring, H.J. Blocksom, K.A. Smith, M.E. Angradi, T. Wratschko, M.C. Armstrong, B. Bolgrien, D. Lazorchak, J.M. , 2011. Sediment toxicity in mid-continent great rivers (USA). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 60(1), pp.57-67.
6. Delgado-Moreno, L., Lin, K., Veiga, R., and Gan, J., 2011. Occurrence and Toxicity of Three Classes of Insecticides in Water and Sediment in Two Southern California Coastal Watersheds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(17), pp.9448-9456.
7. Golding, L. A., Borgmann, U., and Dixon, D. G., 2011. Modeling chronic dietary cadmium bioaccumulation and toxicity from periphyton to *Hyalella azteca*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 30(7), pp.1709-1720.
8. Galluba, S., Oetken, M., and Oehlmann, J., 2012. Comprehensive sediment toxicity assessment of Hessian

surface waters using *Lumbriculus variegatus* and *Chironomus riparius*. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 47(4), pp.507-521.