

骨藻分泌物對銅之錯合能力測定

謝介士·蔡雪貞·葉瑾瑜·蘇茂森

Measurement of Copper Complexing Capacity of the Exudates of *Skeletonema costatum*

Chieh-Shih Hsieh, Hsueh-Jen Tsai, Jin-Yu Yeh and Mao-Sen Su

Based on the measurement of labile copper by differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV) after a number of ionic copper spikes are allowed to equilibrate with the complexing material in the water sample. Based on DPASV data, the copper complexing capacities of dissolved organic compounds produced by *Skeletonema costatum* in each culture day was studied. The complexing capacities (CL) of the exudates were found to vary from 2.41 to 6.37 $\mu\text{g/l}$. The values of CL did not increase as passed culture time, but it was dependent on the concentration of *S. costatum*. The value of the conditional stability constants (K') was found to vary from $10^{6.33}$ to $10^{6.66}$. All of these results show that the copper complexing ligands in the exudates have different properties at different culture days of *S. costatum*.

關鍵字：骨藻、銅、錯合能力

Key words: *Skeletonema costatum*, Copper, Complexing capacity.

前 言

自然水體中微量金屬元素以各種不同的化學形態與物種存在，例如，自由離子、無機與有機化合物形態，以及其被生物細胞吸收（吸附）或與顆粒物結合成懸浮物質等（Stumm and Bauner, 1975）⁽¹⁾，而有資料指出這些金屬離子對水生生物的毒性與自由離子之活性有關，例如，Engel 和 Sunda（1979, 1980）⁽²⁾⁽³⁾發表有關銅、鎳的自由離子活性對大西洋 Silversides, *Menidia menidia* 的卵及幼苗的毒性有關；Sunda 和 Guillard（1976）⁽⁴⁾研究銅對河口矽藻（*Thalassiosira pseudonana*）的毒性，發現其毒性大小與銅離子活性有關，而與總銅濃度關係不顯著；Anderson 和 Morel（1978）⁽⁵⁾研究銅對渦鞭毛藻（*Gonyaulax tamarensis*）的毒性；Sunda 等（1978）⁽⁶⁾研究鎳對美國草蝦（*Palaemonetes pugio*）的毒性及 Anderson 等（1978）⁽⁷⁾研究鋅對沿岸矽藻的毒性均有相同的結果。由這些研究可知，在自然水體中，微量金屬被水生生物利用或對水生生物產生毒性，就決定於金屬元素在水中的物化形式，其中自然水體中微量金屬離子之錯合能力（Complexing capacity），亦即水體中微量金屬離子能被有機物錯合形成不活潑（Nonlabile）錯化合物之濃度最為重

要，而其中最常被研究的就是銅 (Kramer, 1986) (8)。

在自然水體中有很多種溶解性的有機物質，是來自植物性浮游生物 (Anderson 和 Zeutschel, 1970) (9) 而這些有機物質就有一部份可以與微量金屬產生螯合作用 (Chelating reaction) 而形成錯化合物。例如 McKnight 和 Morel (1979) (10) 指出有 21 種藻類可以分泌有機物質，而與銅產生錯合；Van den Berg 等 (1979) (11) 指出藍綠藻 (*Anabaena cylindrica*, *Navicula pelliculosa* 和 *Scenedsmus quadricauda*) 所能提供的螯合配位鍵分別是 6.73、2.86 和 0.66 $\mu\text{mol/l}$ ；而 Ogiwara 和 Kodaira (1989) (12) 指出藍綠藻 (*Microcystis areugionsa*) 在人工培養過程中，其分泌物對銅的錯合能力，從 0.12 至 0.75 $\mu\text{mol/dm}^3$ 之間變化。

本省目前蝦苗繁殖戶大量人工培養骨藻 (*Skeletonema costatum*) 做為海水蝦苗繁殖的初期餌料，效果良好，但目前繁殖戶均只濃縮取得骨藻來餵食蝦苗，而拋棄其培養液，但事實上，培養液內除含有少量的營養鹽外，尚可能含有大量骨藻所分泌的溶解性有機物質，對海水中的重金屬具有錯合能力，可以降低重金屬對蝦苗之毒性，則不需在繁殖過程中再加 EDTA-2Na 鹽，以降低重金屬之毒性。因此，本報告將探討在骨藻的培養過程中，骨藻的分泌物對銅之錯合能力，以作為蝦苗繁殖業者之參考。

材料與方法

本研究所使用之骨藻 *S. costatum*，係由高雄港以植物性浮游生物網採集而得。在 2 噸的玻璃纖維桶內打氣培養。其培養時之水溫 22 ~ 26 $^{\circ}\text{C}$ ，光線以自然日光培養，其光線強度約 1500 lux，培養液的配方如表 1 所示。培養期間每天採水測定其葉綠素 A 之含量 (Parsons 等, 1989) (13)，並用 Advantec 牌 0.45 μm 薄膜濾紙過濾，取其濾液以 EG & G 264 A 型極譜儀，測定其對銅的錯合能力 (Chen 等, 1988) (14)，其測定方法如下：

1. 取過濾之水樣 10 ml 置於電解槽，並通入純氮 (99.99%) 8 分鐘，去除水中之溶氧。
 2. 以微量吸管添加已知濃度的銅離子到電解槽，平衡時間為 10 分鐘。
 3. 實驗參數的設定：最初電位 (Initial potential) - 0.42 v，最後電位 (Final potential) + 0.04 v，通氣時間 1 分鐘，析出時間 (Deposition time) 120 秒，攪拌磁石之轉速為低速，掃描速率 (Scan rate) 為 10 mv/sec，汞滴大小選用小粒。
 4. 以 Differential pulse anodic stripping voltammetry 進行分析，重覆(2)、(3)步驟 12 次，使添加之銅離子濃度一直增加，記錄每一過程之波峰電位及電流。
 5. 依據 Shuman 和 Woodward (1977) (15) 所發表之方法，計算其錯合能力。
- 若依據 Chau 等 (1974) (16) 的研究，認為銅離子與水中溶解性有機物發生錯合作用，可以用

表 1 骨藻培養液之化學成份

Table 1 Chemical composition of *S. costatum* culture medium.

Component		Concentration (g/m ³)
CO(NH ₂) ₂	(Urea)	60
Ca(H ₂ PO ₄) ₂ + 2 CaSO ₄	(Calcium superphosphate)	30
Na ₂ SiO ₃	(Sodium silicate)	10

$\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuL}$ 表示，則其條件穩定常數 (Conditional stability constants) $K' = [\text{CuL}] / [\text{Cu}][\text{L}]$ ，而 Martincic 等 (1986)⁽¹⁸⁾ 認為將水樣過濾並調 pH 至 2 以下，再以 DPASV 測定，所得的是總溶解性銅 (Total dissolved Cu)，若以原水樣的 pH 測定所得，為不穩定性銅 (Labile Cu) (Duinker 和 Kramer, 1977)⁽¹⁷⁾，兩者之差為穩定性銅 (Nonlabile Cu)⁽¹⁸⁾。若假設 DPASV 所測得的不穩定性銅即為無機態銅。而根據 Hanson 等 (1988)⁽¹⁹⁾ 之無機態銅物種模式，估算自由銅離子之濃度，即 $[\text{Cu}^{2+}] / [\text{Inorg. Cu}] = 0.017$ ，則

$$K' = [\text{nonlabile Cu}] / [\text{labile Cu} \times 0.017][\text{L}]$$

結果與討論

骨藻 *S. costatum* 的成長曲線如圖 1 所示，在接種後的第二天增殖仍不多，還是屬於藻類成長的遲滯期 (Lag phase)，接著連續二天的對數成長期 (Exponential phase)，然後就只有短暫的成長靜止期 (Stationary phase)，最後就是衰退期 (Declining phase)。

圖 2 表示典型的滴定曲線，圖 3 及表 2 顯示錯合能力由 2.41 至 6.37 $\mu\text{g}/\text{l}$ 之變化與葉綠素 A 含量由 1.03 至 7.44 $\mu\text{g}/\text{l}$ 之變化有很顯著的正相關存在； $y = 1.31 + 0.66x$ ， $r = 0.93$ ，此結果與 Ogiwara 和 Kodaira (1989)⁽¹²⁾ 研究藍綠藻 *Microcystis aeruginosa* 的分泌物與銅的錯合能力和其葉綠素 A 的含量關係不顯著，而隨著培養時間的延長，增加其錯合能力不同，此可能因骨藻老化後沉澱於桶底，溶解於水中的分泌物亦可能沉澱，因此在水域中能與銅錯合的溶解性有機物質減少，故在骨藻培養池中培養液的錯合能力與骨藻的濃度有正相關存在。而由圖 3 及表 2 亦可知在骨藻培養時，在對數成長期時，在一天之內，其對銅的錯合能力增加 3.96 $\mu\text{g}/\text{l}$ ，在衰退老化時，則一天之內，對銅的錯合能力減少 2.48 $\mu\text{g}/\text{l}$ ，因此在利用骨藻分泌物來錯合重金屬以降低重金屬對蝦苗之毒性時，則必須掌握最適當的時間，才能發揮最大的功能。

另外，在一般海水中以 DPASV 測定銅時的半波電位 (Half-wave potential) 是一 0.06 v，但在測定含骨藻分泌物的試水，則其半波電位則有明顯轉移的現象，此亦表示其水樣中有不同型式的配

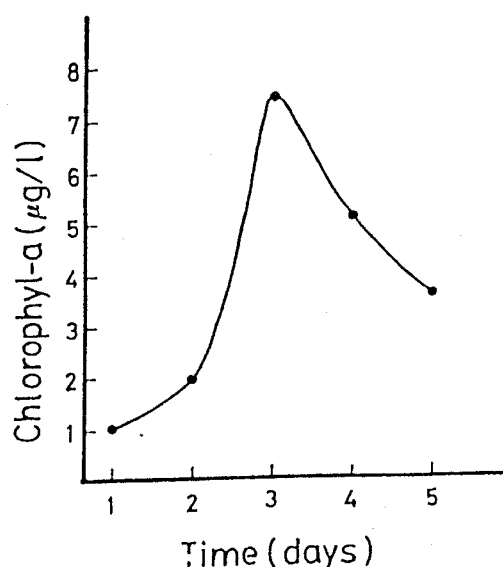


圖 1 骨藻的成長曲線

Fig.1 Change in chlorophyll-a with culture time.

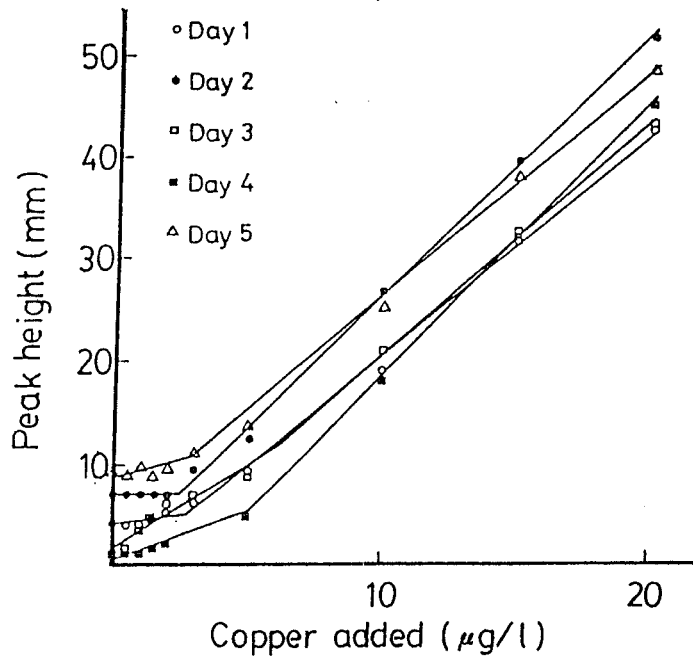


圖 2 骨藻分泌物對銅的滴定曲線

Fig.2 Copper titration of exudates of *S. costatum* from each culture time.

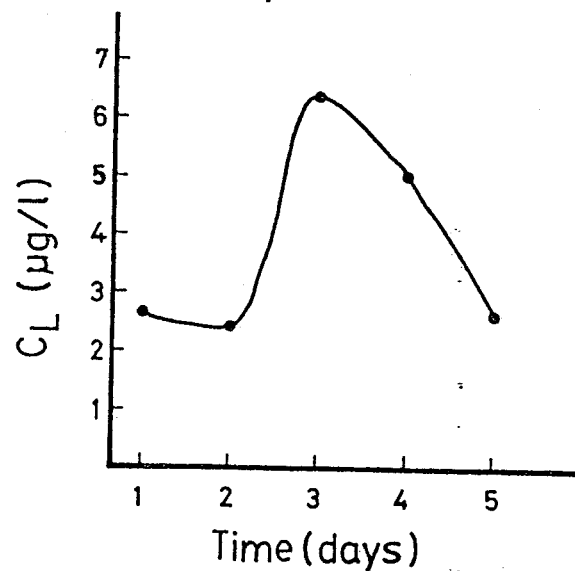


圖 3 骨藻在每一成長階段的分泌物所產生之錯合能力

Fig.3 Change in complexing capacities of exudates of *S. costatum* with culture time.

位根存在。

因為無法直接測得海水中自由金屬離子，而有機配位根之濃度低且組成又複雜，所以金屬離子與有機物交互作用之平衡常數更無法以熱力學公式推導，而依據儀器、理論與錯合能力，推導出所謂的條件穩定常數，此常數與錯合能力值均可描述海水中有機物之特性 (Hanson 等, 1988) ⁽¹⁹⁾。而本報告以 DPASV 方法分析穩定性銅、不穩定性銅及分析得知的錯合能力值去計算條件穩定常數，而條件穩定常數則是直接表示其錯合穩定強度 (The strength of complexing capacities) 的方法，由表 2 可知，骨藻分泌物對銅錯合之條件穩定常數介於 $10^{6.33}$ 至 $10^{6.66}$ 之間，其變化不大，僅顯示在對數

表2 骨藻在每一成長階段所產生的錯合配位量

Table 2 Production of complexing agents by *S. costatum* in each growth phase.

Growth phase	Incubation time (days)	Complexing capacities ($\mu\text{g}/\text{l}$)	Conditional stability constants (log K')
Lag	1	2.63	6.48
Exponential	2	2.41	6.58
	3	6.37	6.42
Stationary	4	5.10	6.33
Declining	5	2.62	6.66

成長初期及老化時期，其條件穩定常數值較高，亦可顯示在此二期骨藻所分泌的溶解性有機物質能與銅形成較穩定的錯化合物。

以上的結果，除了顯示在不同的成長階段，骨藻所分泌的溶解性有機物質的配位根不同外，亦可提供進一步研究骨藻的細胞外代謝以及對銅的生物利用能力上之參考。至於在不同的培養液及不同的環境下，骨藻所分泌的溶解性有機物質對銅之錯合能力及條件穩定常數是否不同，則有待進一步的探討。

摘 要

利用微分脈波陽極剝除伏安法 (DPASV) 測定銅離子添加於水樣中，和溶解性有機物達成錯合平衡後之活潑態銅之方法，來測定骨藻分泌物對銅之錯合能力以及其條件穩定常數。結果骨藻分泌物對銅之錯合能力在不同培養階段均不同，其錯合能力介於 2.41 至 6.37 $\mu\text{g}/\text{l}$ 之間，與培養時間長短無關，而與骨藻的濃度有顯著的正相關存在，而其條件穩定常數介於 $10^{6.33}$ 至 $10^{6.66}$ 之間。由其錯合能力與條件穩定常數的不同，亦可知在不同的培養時間內，骨藻分泌物含有不同的錯合配位根。

謝 辭

本試驗之進行承臺灣省水產試驗所東港分所同仁之協助，在此謹申謝忱。

參 考 文 獻

1. Stumm, W. and P.A. Brauner (1975). Chemical speciation. In: Chemical Oceanography. Vol. 1, 2nd Ed, J.P. Riley and G. Skirrow (Eds.) Academic Press, London, 173-239.
2. Engel, D.W. and W.G. Sunda (1979). Toxicity of cupric ion to egg of the spot *Leiostomus xanthurus* and the Atlantic silverside *Menidia menidia*. Mar. Biol., 50, 121-126.
3. Engel, D.W., W.G. Sunda and B.A. Fowler (1980). Factors affecting trace metal uptake and toxicity to estuarine organisms. I. Environmental parameters. In: Biological Monitoring of Marine Pollutants. F.J. Vernberg, A. Calabrese, F.P. Thurberg and W.B. Vernberg (eds.) Academic Press, New York, 127-144.
4. Sunda, W.G. and R.R.L. Guillard (1976). The relationship between cupric ion activity and the toxicity of copper to phytoplankton. J. Mar. Res., 34, 511-529.
5. Anderson, D.M. and F.M.M. Morel (1973). Copper sensitivity of *Gonyaulax tamarensis*. Limnol. Oceanogr., 23, 283-295.
6. Sunda, W. G., D.W. Engel and R.M. Thuotte (1978). Effect of chemical speciation on toxicity of cadmium to grass shrimp, *Palaemonetes pugio*: Importance of free cadmium ion. Environ. Sci. Technol., 12, 409-413.

7. Anderson, M.A., F.M.M. Morel and R.R.L. Guillard (1978). Growth limitation of a coastal diatom by low zinc ion activity. *Nature, Lond.*, 276, 70-71.
8. Kramer, C.J.M. (1986). Apparent copper complexation capacity and conditional stability constants in north Atlantic water. *Mar. Chem.*, 18, 335-349.
9. Anderson, D.M. and R.P. Zeutschel (1970). Release of dissolved organic matter by marine phytoplankton in coastal and offshore areas of the Northeast Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr.*, 15, 402-407.
10. McKnight, D.M. and F.M.M. Morel (1978). Release of weak and strong copper-complexing agents by algae. *Limnol. Oceanogr.*, 24, 823-837.
11. Van den Berg, C.M.G., P.T.S. Wong and Y.K. Chau (1979). Measurement of complexing materials excreted from algae and their ability to ameliorate copper toxicity. *J. Fish. Res. Board Can.*, 36, 901-905.
12. Ogiwara, T. and K. Kodaira (1989). Measurement of copper complexing ability of the exudates of a *Microcystis*. *Wat. Res.*, 23, 23-27.
13. Parsons, T.R., Y. Maita and C.M. Lalli (1984). *A Manual of Chemical and Biological methods for Seawater Analysis*. Pergamon Press, New York, U.S.A., 101-104.
14. Chen, C.H., B.C. Han and T.C. Hung (1988). Copper complexing capacity in the coastal water of Taiwan. *Bull Inst. Chem., Academia Sinica*, 35, 71-78.
15. Shuman, M.S. and G.P. Woodward, Jr. (1977). Stability constants of copper-organic chelates in aquatic samples. *Environ. Sci. Technol.*, 11, 809-813.
16. Chau, Y.K., R. Gachter and K. Lum-Shue-Chan (1974). Determination of the apparent complexing capacity of lake water. *J. Fish. Res. Board Can.*, 31, 1515-1519.
17. Duinker, J.C. and C.J.M. Kramer, (1977). An experimental study on the speciation of dissolved zinc, cadmium, lead and copper in river Rhine and North Sea water by differential pulsed anodic stripping voltammetry. *Mar. Chem.*, 5, 207-228.
18. Martincic, D., H.W. Nurnberg and M. Branica (1986). Bioaccumulation of heavy metals by bivalves from Limski Kanal (North Adriatic Sea). II. Copper distribution between oysters, *Ostrea edulis*, and ambient water. *Mar. Chem.*, 18, 299-319.
19. Hanson, A.K. Jr., C.M. Sakamoto, Arnold, D.L. Huizenga and D.R. Kester (1988) Copper complexation in Sargasso Sea and Gulf Stream Warmcore ring waters. *Mar. Chem.*, 23, 181-203.