

## 硫酸銅對微細藻的毒性試驗

高炳昫

### The toxicity of copper sulfate to the marine microalgae

Ping-Yun Kao

Five species of marine microalgae have different tolerance to the toxicity of copper sulfate. The growth of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros gracilis* was retarded when the concentrations of copper sulfate were above 1 ppm if the medium didn't contain EDTA. *Chlorella sp.* and *Tetraselmis sp.* were 2 ppm and 4 ppm, respectively. The growth of *Dunaliella sp.* was not influenced by copper sulfate at 4 ppm. The medium with EDTA can reduce the toxicity of copper sulfate and enhance the growth of microalgae. The difference in copper tolerance of algae makes it possible to recommend a method of purification of the algae.

### 前 言

銅為藻類生長所必需的微量元素之1，其所需之量極微，而銅之濃度太高反而會對藻類造成毒害<sup>(1)(2)</sup>。二價銅離子為銅之毒性形態，可抑制藻類之呼吸及光合作用<sup>(3)</sup>。在養殖上常用硫酸銅(CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O)做為除藻劑(Algicides)以抑制魚池中一些有害的植物性浮游生物的生長。然各種藻類對硫酸銅的忍耐程度不同，所以使用的劑量不同，就會有不同的藻類相出現，因此對於各種藻類對硫酸銅的耐性應有所瞭解，才能正確的使用硫酸銅來控制藻類的生長。

本實驗選定5種海水種微細藻類，試驗其對硫酸銅的忍耐程度，以做為在養殖上使用硫酸銅控制植物性浮游生物生長的參考，以及利用各種藻類對硫酸銅的耐性不同，做為分離及純化藻類的方法之一。

### 材料與方法

本實驗所使用的海水種微細藻其學名為 *Isochrysis galbana*, *Chlorella sp.*, *Tetraselmis sp.*, *Chaetoceros gracilis*, *Dunaliella sp.* 等5種，均為取自實驗室內純種保存的品種。每種微細藻於硫酸銅(CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O) 0、0.125、0.25、0.50、1.0、2.0、4.0 ppm 等7種濃度下培養，分別試驗各種藻類對硫酸銅之耐性。本實驗所用之培養液之組成成份如表1所示，其中Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O只加入屬於矽藻類的 *Chaetoceros*，其他4種藻類之培養液均不添加Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O。另因硫酸銅對藻類的毒性會受到培養液中EDTA(ethylene diamine tetraacetic acid)的影響，所以實驗時培養液分2種，1種不加EDTA，另1種加入EDTA，以便比較EDTA對硫酸銅毒性的影響。因此試驗時每種藻類共分14組，2重覆。

在試驗中所用之海水均為過濾後經高溫高壓(120°C, 5分鐘)滅菌，培養瓶為250ml的三角燒瓶，培養時在溫度25°C，照度3500 lux的植物生長箱(Growth chamber)內進行，每日光照16

小時，培養時並予以打氣。培養液之塩度爲 25‰，pH 爲 7.6 ~ 8.0 之間，總鹼度在 95 ~ 105 之間。

各種微細藻的生長情形以 CE 292 型之分光光度計 ( Spectrophotometer ) 測定在 460 nm 之吸光度，以吸光度的大小來代表微細藻之密度，以其生長的優劣來判斷硫酸銅毒性之強弱。

表 1 培養液之成份

Table 1 The composition of synthetic medium

NaNO <sub>3</sub>	100 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 mg
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	0.3 mg
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1.0 mg
MgSO <sub>4</sub>	20 mg
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	10 mg
Thiamin HCl	0.1 mg
Cyanocobalamin	0.01 mg
Na <sub>2</sub> EDTA	4.5 mg
Sea water	1000 ml

## 結 果

5 種微細藻經過 7 天的培養，其生長情形如圖 1 ~ 5 所示。在不同濃度的硫酸銅中，培養液中無 EDTA 時，5 種藻類對硫酸銅均有不同程度的忍耐性。而培養液中有 EDTA 可使硫酸銅的毒性大爲減弱。

由圖 1 中可看出，*Isochrysis galbana* 在培養液中無 EDTA 存在時，在硫酸銅 1 ppm 以上生長即受到阻礙，隨著硫酸銅濃度的增加，*I. galbana* 所受的抑制也愈大，至 4 ppm 時幾乎不成長。在 0 ~ 0.5 ppm 之各組，培養液中有加入 EDTA 和無 EDTA 分別以變方分析 *I. galbana* 之成長和硫酸銅濃度之關係，得出  $F = 4.405 \times 10^{-3} < F ( \frac{V_1=1}{V_2=2} P = 0.05 ) = 18.51$  和  $F = 0.4124 < F ( \frac{V_1=1}{V_2=2} P = 0.05 ) = 18.51$ ，均不顯著，顯示硫酸銅之濃度在 0 ~ 0.5 ppm 間對 *I. galbana* 之成長無影響。而加 EDTA 與不加其成長有無差異，經 t 值測驗， $t = 24.13 > t ( \frac{V=14}{P=0.05} ) = 2.145$ ，有顯著的差異，即 EDTA 對 *I. galbana* 的成長有較好的效果。而在 1.0 ~ 4.0 ppm 之各組，培養液中有無 EDTA 之存在，兩者之差異極爲明顯，顯然由於 EDTA 的存在使硫酸銅的毒性大爲降低。

由圖 2 可得知，*Chlorella sp.* 在硫酸銅 2 ppm 以上，培養液中無 EDTA 時有明顯成長不良的現象，而培養液中有 EDTA 之各組均能成長良好。在 0 ~ 1 ppm 培養液中無 EDTA 之各組，與培養液中有加入 EDTA 之各組，分別以變方分析 *Chlorella sp.* 的成長與硫酸銅濃度的關係，得出  $F = 0.20065 < F ( \frac{V_1=1}{V_2=5} P = 0.05 ) = 6.61$  及  $F = 1.9652 < F ( \frac{V_1=1}{V_2=3} P = 0.05 ) = 10.128$ ，均不顯著。即硫酸銅在低濃度對 *Chlorella* 成長無影響，而兩者之間經  $t = 15.53 < t ( \frac{V=22}{P=0.05} ) = 2.074$ ，有顯著差異，亦即加入 EDTA 成長較有利。

在圖 3 中，*Tetraselmis sp.* 僅在硫酸銅 4 ppm 培養液中無 EDTA 時，成長稍受抑制，其他各組成長則相差不多顯然 *Tetraselmis sp.* 對硫酸銅的耐性較強，而加入 EDTA 之各組與 0 ~ 2 ppm 間不加 EDTA 之各組，以變方分析結果，分別爲  $F = 1.454 < F ( \frac{V_1=1}{V_2=5} P = 0.05 ) = 6.61$  和  $F = 5.1251 < F ( \frac{V_1=1}{V_2=4} P = 0.05 ) = 7.71$ ，均不顯著，以 t 值測驗兩者之差異，得出  $t =$

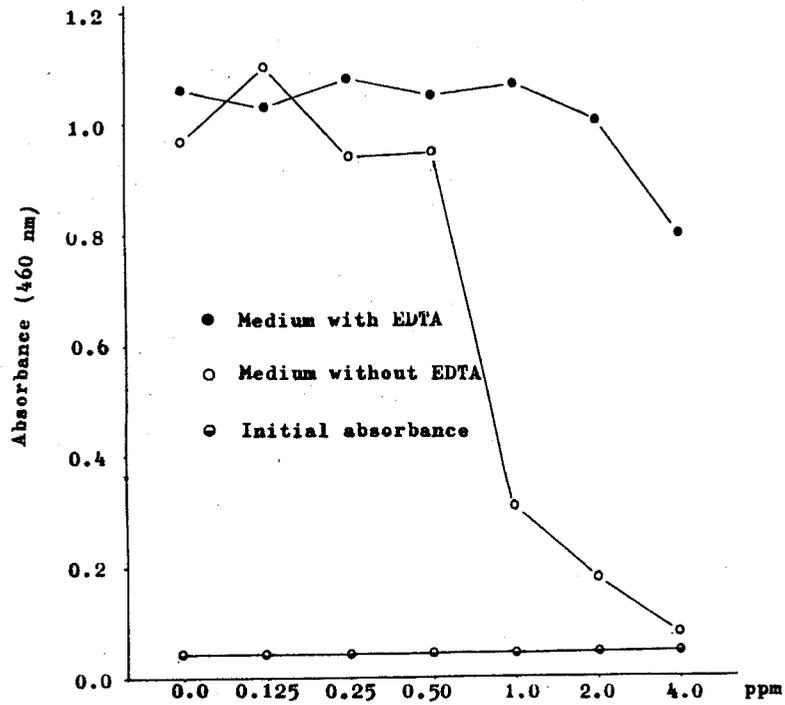


圖 1 在不同濃度的硫酸銅下，*Isochrysis galbana* 7天後的生長情形  
 Fig. 1 Growth of *Isochrysis galbana* after 7-day cultivation in different concentrations of copper sulfate

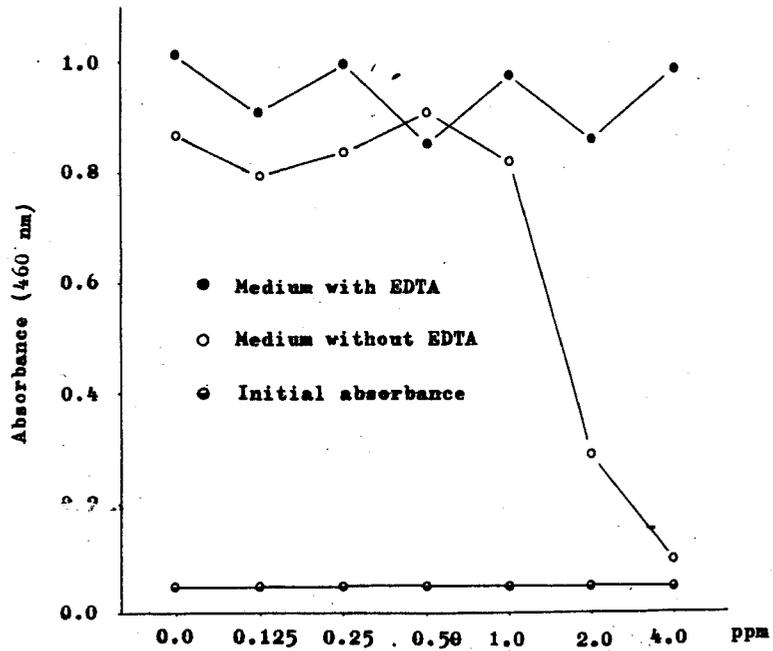


圖 2 在不同濃度的硫酸銅下，*Chlorella* sp. 7天後的生長情形  
 Fig. 2 Growth of *Chlorella* sp. after 7-day cultivation in different concentrations of copper sulfate

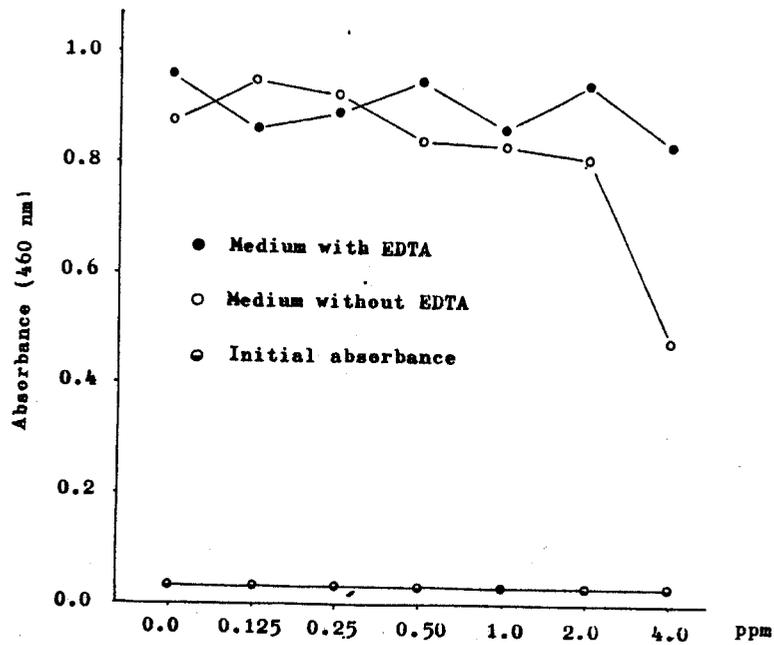


圖 4 在不同濃度的硫酸銅下，*Chaetoceros gracilis* 7天後的生長情形  
 Fig. 4 Growth of *Chaetoceros gracilis* after 7- day cultivation  
 in different concentrations of copper sulfate

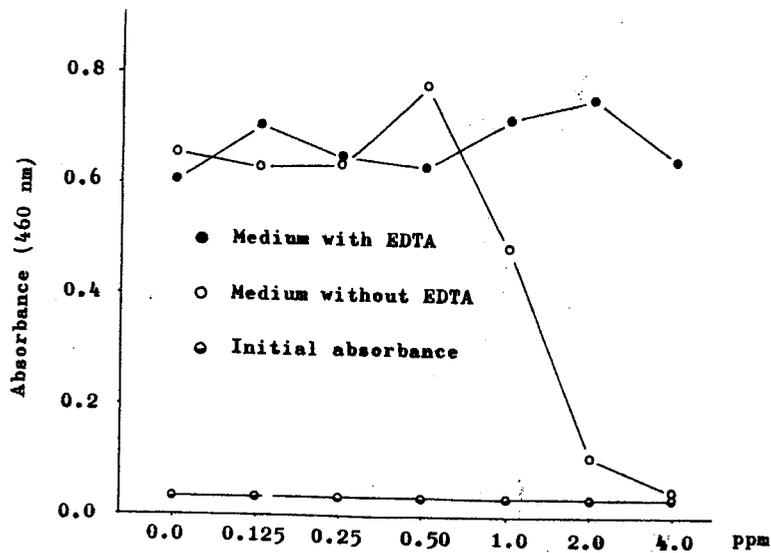


圖 3 在不同濃度的硫酸銅下，*Tetraselmis sp.* 7天後的生長情形  
 Fig. 3 Growth of *Tetraselmis sp.* after 7- day cultivation  
 in different concentrations of copper sulfate

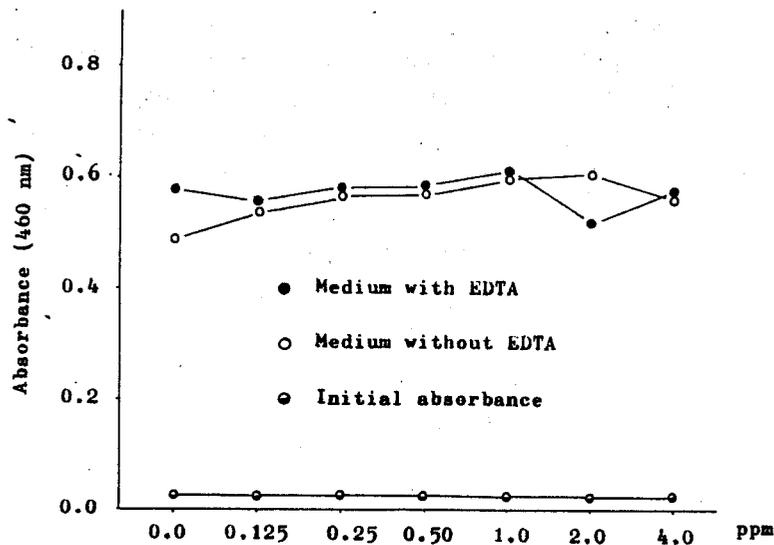


圖 5 在不同濃度的硫酸銅下，*Dunaliella sp.* 7天後的生長情形

Fig. 5 Growth of *Dunaliella sp.* after 7-day cultivation in different concentrations of copper sulfate

$17.52 > t \left( \frac{V=24}{P=0.05} \right) = 2.064$ ，培養液中加入EDTA對 *Tetraselmis sp.* 亦有顯著之影響。

*Chaetoceros gracilis* 對硫酸銅的忍耐性如圖 4 所示。培養液中無 EDTA 存在時，在硫酸銅 1 ppm 生長受部份抑制，2 ppm 時只有極少部份的成長，4 ppm 時幾乎不成長。而在 0 ~ 0.5 ppm 間之各組與加入 EDTA 之各組，成長相差不大，以變方分析結果，各為  $F = 12.6886 < F \left( \frac{V_1=1}{V_2=2}, P=0.05 \right) = 18.51$  和  $F = 0.11538 < F \left( \frac{V_1=1}{V_2=5}, P=0.05 \right) = 6.61$ ，均不顯著。以 t 值測驗兩者之差異， $t = 1.029 < t \left( \frac{V=20}{P=0.05} \right) = 2.086$ ，無顯著之差異，即在硫酸銅濃度 0 ~ 1 ppm 時，培養液中加入 EDTA 無顯著之影響。

由圖 5 可看出，*Dunaliella sp.* 的成長，不論是硫酸銅濃度的大小，或者是培養液中有無 EDTA，各組間的成長均無多大的差距，顯示 *Dunaliella sp.* 對硫酸銅的耐性很強。而加入 EDTA 之各組和不加 EDTA 之各組成長很接近，分別以變方分析結果，得出  $F = 0.1948 < F \left( \frac{V_1=1}{V_2=5}, P=0.05 \right) = 6.61$  和  $F = 0.828 < F \left( \frac{V_1=1}{V_2=5}, P=0.05 \right) = 6.61$ ，均不顯著。以 t 值測驗 2 者之差異， $t = 12.95 > t \left( \frac{V=26}{P=0.05} \right) = 2.05$ ，即培養液中加入 EDTA 對 *Dunaliella sp.* 的成長有影響。

## 討 論

由本實驗的結果可以看出，五種微細藻對硫酸銅都有不同程度的耐性，其中以 *I. galbana* 及 *Chaetoceros gracilis* 較為敏感，在 1 ppm 時生長即受到部份抑制，隨著硫酸銅濃度的增加所受的抑制也愈大。其次為 *Chlorella sp.* 在 2 ppm 以上生長不良，*Tetraselmis* 則在 4 ppm 時生長開始受抑制，而 5 種微細藻中忍耐性最強的是 *Dunaliella*，因其在 4 ppm 之濃度下仍不受影響。

利用各種藻類對硫酸銅不同的忍耐性，可以選擇適當的濃度來控制那些對硫酸銅較敏感的藻類的生長，同時也可利用這種特性做為分離藻類的方法之一<sup>(2)</sup>。為了進一步證實其可行性，將含有 *Dunaliella* 及 *Chlorella sp.* 藻種之培養液，接至 4 ppm 不含 EDTA 的培養液中，重新培養，結果數天後正如所預期的，只有 *Dunaliella* 長出來。此外，在純種保存或純種培養方面，亦可利用藻類對硫酸銅的安全

濃度來防止其他藻類的污染，或控制其生長的速度。

EDTA在水溶液中形成塩類比其自由酸還穩定，所以易與金屬離子結合<sup>(4)</sup>。Hunter ( 1949 ) 認為金屬螯狀化合物不能被藻類吸收，且EDTA不參與藻類的代謝作用<sup>(2)</sup>。而Krauss & Specht ( 1958 ) 用 *Scenedesmus* 和用 C<sup>14</sup> 標示 EDTA，得到的結果認為金屬螯狀化合物能被破壞，有些藻類能從金屬螯狀化合物中獲得金屬離子<sup>(2)</sup>。Johnston ( 1963 ) 亦認為 EDTA 在海水中形成的金屬螯狀化合物能被藻類所利用，生物在海水中同化微量金屬元素被認為是在細胞的表面自螯狀化合物中獲得，金屬螯狀化合物在細胞表面被破壞，而微量元素被運送穿過細胞膜，穿過細胞膜後再形成其他化合物，被運送至產生輔酶的位置<sup>(5)</sup>。在本實驗中，培養液中加入 EDTA 均能有效降低硫酸銅的毒性，顯然是 EDTA 與 Cu<sup>2+</sup> 形成螯狀化合物，使 Cu<sup>2+</sup> 不具毒性，此種情形在硫酸銅的濃度較高時非常明顯。而在硫酸銅的濃度較低時，即使對藻類本身沒有影響，此時若培養液中有 EDTA，仍稍具有促進藻類生長的效果。由此亦可推測，培養液中加入 EDTA，不會造成微量元素之缺乏，藻類亦可從金屬螯狀化合物中吸收微量元素。

以硫酸銅控制植物性浮游生物的生長，Galloway & Krauss ( 1959 ) 認為大部份的藻類對硫酸銅產生敏感的濃度為 1 ~ 2 ppm，而此種濃度對大部份的魚和其他動物都不造成傷害<sup>(6)</sup>。Bartsch ( 1954 ) 發現 0.33mg/ℓ 濃度之硫酸銅可有效控制一美國中西部總鹼度低於 50mg/ℓ 的湖泊，而當總鹼度超過 50mg/ℓ 時所需濃度為 2 mg / ℓ<sup>(7)</sup>。Fitzgerald & Faust ( 1963 ) 報告硫酸銅對藻類之毒性因所使用之培養液而不同。毒性隨著培養液之鹼度及 pH 之不同而不同，在酸性與軟水中比於鹼性水中毒性較強<sup>(8)</sup>。根據本實驗得到的結果，5 種微細藻中有 3 種 (*Isochrysis*, *Chaetoceros*, *Chlorella*) 對硫酸銅產生敏感的濃度為 1 ~ 2 ppm，而另兩種 (*Tetraselmis Dunaliella*) 對硫酸銅敏感的濃度為 4 ppm 及 4 ppm 以上，所得之結果似乎比 Krauss 及 Bartsch 等人所用之濃度還高，這可能是由於本實驗所用的海水培養液 pH 值為 7.6 ~ 8.0，屬弱鹼性，培養液鹼度為 95 ~ 105 mg / ℓ，因此稍為降低了硫酸銅的毒性，而提高藻類對硫酸銅的耐性。

一般之重金屬可抑制酵素的活性，而銅可和蛋白質的硫氫基 ( Sulfhydryl groups ) 緊密結合在一起，而造成對藻類的毒害<sup>(9)</sup>。硫酸銅溶解在水溶液中產生二價銅離子 ( Cu<sup>2+</sup> ) 而 Cu<sup>2+</sup> 可抑制藻類之呼吸及光合作用<sup>(3)</sup>，使藻類的生長受阻礙，甚至因而致死。為了探討在本實驗中硫酸銅是否能完全殺死藻類，將 *Chaetoceros* 及 *Chlorella* 在硫酸銅 4 ppm 下受抑制且幾乎不成長之組，於實驗完後加入 EDTA，以消除硫酸銅的毒性，結果數天後仍可長出 *Chaetoceros* 及 *Chlorella*，顯示硫酸銅在 4 ppm 時只能抑制此兩種藻類的生長，還不能將其完全殺死。這可能是使用硫酸銅為除藻劑時，植物性浮游生物之光合作用會顯著下降，當銅離子消失後，植物性浮游生物之光合作用能力很快恢復至處理前水準之原因。

銅為藻類生長所必需的微量元素之一，然而在本實驗中，不加入硫酸銅藻類亦能生長良好，那是由於本實驗是以海水為培養基，而海水本身已含有多種微量元素存在，其中含有極少量的銅 (約 3ppb) <sup>(6)</sup>。由此亦可知，藻類生長所需的銅是極微量的。

## 摘 要

5 種微細藻對硫酸銅各有其不同程度的忍耐性，其中 *Isochrysis galbana* 與 *Chaetoceros gracilis* 對硫酸銅較為敏感，若培養液中不含 EDTA 在 1 ppm 以上生長即受抑制，*Chlorella sp.* 和 *Tetraselmis sp.* 則各在 2 ppm 及 4 ppm 生長受抑制，而 *Dunaliella sp.* 在 4 ppm 時生長仍不受影響。若培養液中含 EDTA，則可大為降低硫酸銅的毒性，且具有促進藻類生長的效果。利用各種藻類對硫酸銅的忍耐性不同，可選擇適當的濃度，做為分離或純化藻類的方法。

## 參考文獻

1. F. E. Round ( 1973 ). *The Biology of the Algae*, 147 - 160.

- 2 Ralph A. Lewin ( 1962 ). *Physiology and Biochemistry of Algae*. 267- 279, 673 683.
3. 陳建初 ( 1983 ). 水質管理, 150 - 167.
4. Martha Windholz ( 1976 ). *The Merck Index*, 463.
5. J. R. Riley and R. Chester ( 1971 ). *Introduction to Marine Chemistry*. 64- 67 , 244 - 247.
6. Galloway, R. A. and Krauss, R. W. ( 1959 ). The differential action of chemical agents, especially polymyxin B, on certain algae, bacteria, and fungi. *Am. J. Botany*, **46**, 40 - 49.
7. Bartsch, A. F. ( 1954 ). Practical methods for control of Algae and Water Weeds . U. S. Public Health Rep., **69**, 749 - 757.
8. Fitzgerald, G. P. and S. L. Faust. ( 1963 ). Factors Affecting the Algicidal and Algistatic Properties of copper. *Appl. Microbiol.*, **11**, 345 - 351.
9. R. E. Gross, P. Pugno, and W. M. Dugger ( 1970 ). Observations on the Mechanism of copper Damage in *Chlorella*. *Plant Physiol.*, **46**, 183 - 185.