

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

紙漿/造紙廠廢水對青魚將魚(*Oryzias latipes*)體內 P4501A 酵素之誘導性及其於毒性鑑定評估之應用性的探討

Investigation of P4501A induction in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) by pulp and paper mill effluents and its application in toxicity identification evaluation process

計畫編號: NSC 89-2621-B-041-001

計劃執行時間: 民國 88 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日。

主持人: 陳健民 嘉南藥理科技大學環境工程衛生系

協同主持人: 施明良 嘉南藥理科技大學環境工程衛生系

EROD 試驗工作人員: 鄭雪雅、陳蕙瑛、蘇子菁、洪翠雲、蔡銘洲

化學分析工作人員: 廖苑秀、李詩琴、張琴佩

## 一. 中文摘要

利用生物體內之生化及生理特性可做為環境污染偵測。此生物指標(biomarker)乃生物產生毒性反應前之初期預警參考。其中生物體內複合功能氧化酵素(mix-function oxygenase, MFO)受多種污染物之誘導最環境毒理學者重視。我們將青將魚及吳郭魚暴露於紙漿廠廢水，並量測其體內 EROD 的活性，以做為此類生物對水中有機污染物的反應指標。

結果顯示暴露於兩紙漿廠廢水的吳郭魚肝臟 EROD 活性可被提昇至對照組的數倍以上，但青將魚的反應卻不明顯。部分吳郭魚的肝臟/體重比(LSI)明顯的受紙漿廢水的影響而增加，而青將魚亦無明顯的受改變。兩廠的紙漿廢水僅含極微量或無法測到的樹脂酸類化合物，而因為技術上的問題，氯酚類物質的含量目前仍無法確定。

關鍵字: 吳郭魚、青魚將魚、複合功能氧化酵素、紙漿/造紙廢水、EROD

## Abstract

Considerable attention has been given to the concept of biomarker. Mixed-function oxygenase (MFO) system in invertebrates or fish is one such parameter that has been used

frequently due to its sensitivity responding to environmental alteration, and it has also been proposed as an early-warning system for identification of environmental contamination. In this study, Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and tilapia (*Oreochromis mossambicus*) were exposed to two different bleached-kraft pulp mill effluents (BKMEs), and their hepatic EROD activity were measured, as well as the liver somatic index (LSI).

The results show that the EROD activity in tilapia was induced several-fold by BKME, while such response was not observed in medaka exposed to the same effluent. LSI values in some of the tilapia, but not medaka were also altered by BKME. Resin acids in the effluents were detected either at very low levels or not detectable. Chlorophenolic compounds cannot be determined at this time due to technical difficulties.

**Keywords:** tilapia, medaka, MFO, pulp/paper effluent, EROD

## 二. 緯由與目的

近年來，利用生物體內之生化及生理特性作為環境污染偵測之觀念已被普遍的被國外環境學者或決策者所接受。此生物指標(biomarker)之概念除可補足傳統之化學/物理指標或參數對生物反應之缺乏直接關聯性及不確

生物反應之缺乏直接關聯性及不確定性外，並可作為生物產生毒性反應前之初期預警參考。生物體內複合功能氧化酵素(mix-function oxygenase，MFO)為多數生物體內祛毒系統(detoxication system)的主力，並可受多種污染物之誘導，而已應用於環境污染的研究。

許多研究皆指出經漂白(bleached-kraft pulp mill effluent，BKME)或未漂白之牛皮紙漿廠廢水具有對魚體內之MFO產生誘導作用。例如 Ahokas 等人[1]即指出暴露於經相當程度處理後之 BKME，歐洲鯉魚(*Cyprinus carpio*)體內之EROD活性與參考點之魚類比較後，有明顯之增高；針對加拿大境內數個紙漿廠之詳盡調查後，Martel 等人(1996)指出 33%紙漿廠之二級處理排放水僅須原濃度之 10%即可提升彩虹鱒(rainbow trout)體內之EROD活性高達兩倍[2]。

國內利用魚類MFO系統作為生化污染指標目前尚未普遍，而相關之研究報告則相當有限。翁祖輝等人曾指出暴露於淡水河底泥萃取物之吳郭魚體內之EROD 及 B[a]PH(benzo[a]pyrene hydroxylase)活性被明顯之提高[3]；而取自嚴重污染二仁溪下游之吳郭魚體內的EROD 及 B[a]PH亦被提高，如與未受污染水域魚類比較，則有將近 10 倍之差異[4]。然而，並無有關 BKME 方面的調查。本計劃之主要目的為：

1. 評估青將魚(*Japanese medaka*，*Oryzias latipes*)體內 MFO 之誘導做為本土性之生物/生化污染指標之可行性；
2. 探討國內紙漿/造紙廠廢水對魚類(青將魚及雄性吳郭魚)MFO 誘導性及生理影響(肝臟重量的變化，肝臟/體重比)；
3. 以魚類 MFO 誘導作為紙漿/造紙廠廢水毒性鑑定評估(TIE)之參

考，以做為後續毒性來源評估(TSE)及毒性控制評估(TCE)的依據。

4. 建立紙漿廢水中樹脂酸及氯酚類有機物含量分析方法。

### 三.結果與討論

在青將魚的 EROD 活性方面，在不同季節所調查的結果，顯示其基礎活性(basal activity)介於 3.41 至 31.01 pmol/min/mg 蛋白質(平均為 14.26 ± 10.7, n=9)，而吳郭魚則為 4.55~16.70 pmol/min/mg 蛋白質(平均為 9.39 ± 5.51, n=4)。另外，體形較小(體重小於 20g)的吳郭魚體內肝臟 EROD 活性則較小，皆低於 2.32 pmol/min/mg 蛋白質(平均為 1.12 ± 1.14, n=3)。青將魚的 EROD 活性有明顯的季節變化情形；在冬季較高而在夏季較低。這也是其 EROD 活性差異範圍較大的原因(coefficient variation 可達 75%)。吳郭魚亦有類似的季節性變化現象，但由數據較不足以及個體成熟度的差異較大之故，此現象並不明顯。本實驗使用混 合 於 其 飼 料 中 的 BNF(β-naphthoflavone)做為正對照組(positive control)的誘導化合物。BNF(濃度為 25% v/v 飼料)可明顯的提升青將魚的 EROD 活性最高達 17 倍。BNF 對吳郭魚的誘導作用在之前的研究結果顯示可達約 5 倍(若以腹腔注射，劑量為 50 µg/g 體重)[5]。

我們在不同的月份採集國內兩紙漿/造紙廠(A 及 B 廠)的放流水進行測試。青將魚對兩種廢水並無明顯的反應；其 EROD 活性未如預期的被提升，有時反而被抑制。另外，暴露於不同稀釋濃度廢水(10%、50% 及 100%)的青將魚，其肝臟的 EROD 活性亦無明確的劑量-反應關係。Western Blot 的結果則與 EROD 相符(圖 1)。

除 EROD 活性外，我們亦量測肝臟 / 體重比 (liver somatic index,

$LSI=1000 \times liver\ weight\ /body\ weight$ )。暴露於廢水及對照組(包括 BNF)的青將魚，其 LSI 值並無明顯的差異。

在吳郭魚方面，第一次的實驗結果顯示不論是放養於 A 紙漿廠的池塘或於實驗室中暴露於 100% 廢水的吳郭魚，其體內肝臟的 EROD 活性皆有明顯的提升，其中 100% 廢水的吳郭魚最高約可提升至對照組的 5 倍(92.9 vs. 16.7 pmol/min/mg protein)，而放養的吳郭魚則最高可提升至對照組的約 22 倍(361.0 vs. 16.7 pmol/min/mg protein)。另外，在此次實驗的 LSI 比值，我們也發現雖然暴露於 100% 廢水吳郭魚與對照組無差異(11.5 vs. 15.0 及 11.2)，但於紙漿廠的吳郭魚，其 LSI 却有明顯的較高的現象，約有兩倍的差異(11.5 vs. 21.2~23.6)。

在第二次的實驗當中，我們亦觀察到與前次相當類似的結果：100% 廢水(A 廠)吳郭魚的 EROD 活性約為對照組的 7 倍左右(10.5 vs. 76.2 及 76.9 pmol/min/mg protein)，而紙漿廠的吳郭魚則最高提升至 15 倍(10.5 vs. 160.5 pmol/min/mg protein)；另外，在這次實驗中，我們加入一組放養於本校內一清澈池塘的吳郭魚對照組，而其體內的 EROD 活性，僅略高於實驗室中對照組。LSI 比值結果顯示暴露於 100% 廢水的其中一隻吳郭魚有較高的 LSI 值(7.0 vs. 15.9)，而另一隻則與實驗室對照組相當(7.0 vs. 5.8)。與第一次實驗結果相同的是放養於紙漿廠池塘的吳郭魚皆有高於實驗室對照組約 2~3 倍的 LSI 值(7.0 vs. 15.8~23.4)，然而於本次實驗新加入的池塘對照組，其個別的 LSI 比值則皆略高於實驗室對照組(7.0 vs. 8.8~13.5)，但皆低於紙漿廠池塘的吳郭魚。

在第三次實驗中，我們增加實驗室對照組的魚體數至三隻。此次結果顯示 A 紙漿廠廢水對吳郭魚仍具有

EROD 活性的誘發特性。暴露於 100% 廢水及放養於紙漿廠池塘的吳郭魚體內肝臟 EROD 活性皆遠高於對照組的三隻吳郭魚(平均活性  $5.8 \pm 1.99$  pmol/min/mg protein)，其中以 13 倍的差距最大(5.8 vs. 76.0 pmol/min/mg protein)。然而，此次校內池塘對照組的 EROD 活性卻有相當高的活性，其中一隻吳郭魚居然可達 331.6 pmol/min/mg protein，但其原因則不明。LSI 比值數據分析的結果則與前兩次實驗相同，既紙漿廠池塘吳郭魚有較高的 LSI。另外校內池塘對照組的 LSI 比值約與實驗室對照組相同。

在第四次的 A 廠廢水測試中，對照組的平均 EROD 活性為 10.96 pmol/min/mg protein(n=2)，但暴露於 100% 廢水的吳郭魚 EROD 活性卻被提升至 2 倍(19.6 pmol/min/mg protein, n=2)，而放養於紙漿廠的魚體活性更高達 6 倍(64.3 19.6 pmol/min/mg protein, n=2)。另外，紙漿廠池塘吳郭魚的 LSI 比值也高於對照組及暴露於 100% 廢水組。

B 紙廠廢水對吳郭魚 EROD 活性同樣的具有誘導作用。在兩次的水樣測試中，暴露於 10% 廢水的吳郭魚 EROD 活性分別被提高至對照組平均活性 1.23 pmol/min/mg protein 的 5.23 及 3.39 倍，而 100% 廢水的吳郭魚分別為 4.47 及 6.78 倍。因此，B 紙廠廢水的誘導作用是略低於 A 紙廠的廢水。不過，由於使用於測試 B 紙廠廢水的吳郭魚體型及魚齡較小且暴露時間也較短(A 廠為 7 日而 B 廠為 4 日)，因此，有可能是此原因而造成誘導程度的不同。另外在 LSI 的比較上，在兩次的廢水測試中，對照組及暴露組皆有明顯的差異，但數據也顯示 LSI 值有較大的變異性。例如在其中一次的實驗中，兩組暴露於 100% 廢水吳郭魚的 LSI 值分別為 57.4 及 45.8，而對照

組為 47.1(n=1)，但是一組暴露於 10% 廢水的吳郭魚卻僅有 20.4。然而，在另一次的廢水測試中，雖然暴露於 100% 廢水吳郭魚的 LSI 值仍高於對照組，但暴露於 10% 廢水的一組吳郭魚，其 LSI 值卻高於 100% 廢水組達 1.5 倍。

最後，在化學分析方面，樹脂酸的濃度皆低於檢測極限(0.01 mg/L)，僅在兩次的水樣中測出含 palmitic acid (0.03 及 0.01 mg/L)。氯酚類的濃度目前尚無法定量。主要原因因為原計畫所提出廢水前處理方法，不論是空白水樣或原水樣所加入內標準品的回收率皆未能達到 QA/QC 所要求的範圍(70~130%)。目前我們正試用其他的前處理方法，以提昇回收率。圖 2 為 6 種氯酚及內標準品 2,4,6-三溴酚的層析圖譜。

總結我們的結果，可得下列幾點結論：

1. 青將魚對紙漿廢水的反應度不佳，且 EROD 活性變異性頗高。吳郭魚的 EROD 活性相對較具有再造性(reproducibility)，且紙漿廢水對其的誘導作用相當明顯。
2. 魚齡較大的吳郭魚的 LSI 值變異性較小。放養於紙廠吳郭魚的 LSI 值有明顯的增高，但在實驗室中暴露於 100% 廢水吳郭魚的 LSI 值與對照組並差異。
3. 原計畫使用萃取氯酚類化合物的方法，無法達到 QA/QC 要求的回收率，而未定量，目前正修正前處理方法。樹脂酸類則大都未檢測到，此結果與 Hewitt 的報告相符[6]。

#### 四. 計劃成果自評

以下幾點說明本計劃執行上與原計劃出入或缺失之處以及原因的探討：

1. 青將魚 EROD 活性並不如預期的對紙漿廢水有明顯的反應，且數據再造

性不佳。經探究其原因可能為原酵素受高溫影響或含量過低之故。目前(第二年計畫)，我們仍繼續採用青將魚及吳郭魚同時進行的方式，來測試廢水的 EROD 誘導性。

2. 吳郭魚成魚需長時間培養，若實驗所需魚體之數量較多，將無法在預訂的時間，順利的進行試驗。在此也感謝嘉義大學水產養殖系吳淑美老師提供額外的魚體，讓本計畫能如期完成。
3. 一般工作尚能按計畫時間表進行，但在氯酚類化合物的分析方面，卻因儀器穩定度、前處理方法和測試耗時等因素，而未能如期獲得成果。
4. 吳郭魚的 EROD 活性實驗的成果已在期刊發表(Chen et al., 2000)。
5. 在第二年的計畫中，我們將分離出廢水中產生 EROD 活性誘導作用的部分(fraction)，並測試其毒性。

#### 五. 參考文獻

- [1] Ahokas JT, Holdway DA, Brennan SE, Goudey RW, Bibrowska HB (1993) MFO activity in carp (*Cyprinus caprio*) exposed to treated pulp and paper mill effluent in Lake Coleman, Victoria, Australia, in relation to AOX, EOX, and muscle PCDD/PCDF. *Environ. Toxicol. Chem.* 13:41-50.
- [2] Martel PH, Kovacs TG, and Voss RH (1996) Effluents from Canadian pulp and paper mills: A recent investigation of their potential to induced mixed function oxygenase activity in fish. In Servos ME, Munkittrick KR, Carey JH, and Van Der Kraak GJ, eds, *Environmental fate and effects of pulp and paper mill effluents*. St. Lucie Press, Boca Raton, FL, USA, pp401-412.
- [3] Ueng Y-F, Liu T-Y, Ueng T-H (1995) Induction of cytochrome P450 1A1 and monooxygenase activity in tilapia by sediment extract. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54: 60-67.

- [4] 賴瓊芳、黃雲雲、叢皓、王漢泉、王正雄 (1993) 台灣水域污染與魚體肝臟單氧酵素-cytochrome P-450 monooxygenase 活性之研究-(一)二仁溪魚種肝臟單氧酵素-cytochrome P-450 monooxygenase 活性之調查。環保署環境檢驗所環境調查研究年報 1:93-102。
- [5] Chen, C-M, Shih ML, Yu S-H, Yeh C-C, Lee ST, Yang T-Y, Hung SJ, Lee SZ Microsomal monooxygenase activity in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) exposed to a bleached kraft mill effluent using different exposure systems. *Chemosphere*, (accepted).
- [6] Hewitt LM, Carey JH, Dixon DG, and Munkittrick KR (1996) Examination of bleached kraft mill effluent fractions for potential inducers of mixed function oxygenase activity in rainbow trout. In Servos ME, Munkittrick KR, Carey JH, and Van Der Kraak GJ, eds, *Environmental fate and effects of pulp and paper mill effluents*. St. Lucie Press, Boca Raton, FL, USA, pp79-94.

圖 1.暴露於 BNF 及紙漿廢水青將魚體內 P4501AI 蛋白質含量的 Western Blot 圖(兩次不同分析的結果)。各行由右算起為分別為 standard(老鼠)、BNF、100%廢水、100%廢水、對照組、BNF、100%廢水、100%廢水、對照組、marker。

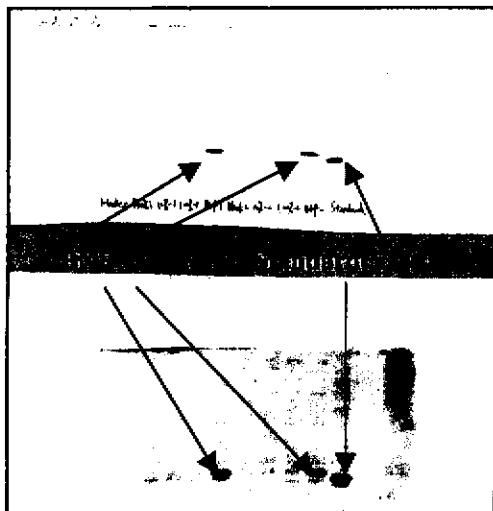


圖 2.不同氯酚類標準品的層析圖譜。

- (a) 為 4,5-dichloroguaiacol  
4,5,6-trichloroguaiacol  
tetrachlorocatechol.  
(b) 2,4,6-trichlorophenol  
2,4,6-tribromophenol  
tetrachloroguaiacol  
(c) pentachlorophenol。

