小球藻吸附重金屬鎘的毒性及其餵食圓水蚤的毒害研究

張時獻　盧啓元　陳品潔　王凱淞*

摘　要

目的：探討環境中微量鎘對於小球藻生長速率是否有影響，在小球藻吸附重金屬鎘後被圓水蚤食入後，是否會產生生物毒性累積的現象。

方法：採用已建立之研究生態毒理學模式，研究室自行培養五代以上之圓水蚤(*Daphnia pulex*)為測試生物，試驗之測試藥劑皆以仿自然水體溶液為稀釋水配製系列濃度測試溶液，於每次實驗前進行配製使用。檢驗重金屬鎘對小球藻及圓水蚤的毒性影響；包括試驗藥劑對圓水蚤急毒性試驗、對小球藻生長抑制現象，將吸附有試驗藥劑的小球藻餵食圓水蚤，觀察其間之相關情形，並計算試驗藥劑之半數影響濃度值(EC_{50} value)及半數致死濃度值(LC_{50} value)。

結果：氯化鎘對圓水蚤的急毒性24h-EC_{50}值為0.060mg/L，48h-EC_{50}值為0.023 mg/L。小球藻的正常生長曲線試驗顯示，實驗組隨著培養液的濃度增加，生長速度增加，其成長情形較控制組顯著(p<0.05)。生長在氯化鎘序列濃度之小球藻，隨著藥劑濃度的增加，小球藻的生長速度逐漸緩慢；相較於控制組其生長速度明顯減少(p<0.05)；且生長於氯化鎘溶液中之小球藻生長數量明顯少於正常生長試驗的數量(p<0.05)。吸附有氯化鎘之小球藻餵食圓水蚤的試驗結果在24h-LD_{50}的值為0.038 mg/L，在48h-LD_{50}的值為0.030 mg/L。

結論：本研究證實小球藻對於重金屬鎘具有吸附作用，可經由生物攝食的關係，使重金屬鎘進入生物體內，並進一步造成生物的損害受傷甚至死亡的現象。推論：小球藻吸附重金屬鎘後被圓水蚤食入會造成傷害或死亡的現象。

關鍵詞：氯化鎘、小球藻、圓水蚤、生長抑制、生物累積影響

中山醫學大學 公共衛生學系
* 通訊作者：王凱淞
通訊地址：40201台中市南區建國北路一段110號
聯絡電話：04-247300225 分機 11799
電子信件：kenwang@csmu.edu.tw

前　言

重金屬的產生主要源自於工業廢水之排放，自然界中大多只占少部份[1]。近年因爲經濟與工業的快速發展，造成一些工業廢棄物不當的排放，導致生物圈中的重金屬含量相較於過去有增加的趨勢。當工業廢棄物排放至水體時，造成水生生態的汙染，且有面積逐漸擴大的趨勢，故逐漸受到世界關注[2]。環境中常見的重金屬有汞(mercury)、鉛(lead)、鎘(cadmium)、鋅(zinc)、銅(copper)，鎘也是其中的一種有毒重金屬，且非生物體必需之元素，低劑量便會影響生物的生理活動[3]。鎘的排放主要經由發電廠、加熱系統、金屬工業、焚化爐排放之廢水、交通廢氣、水泥工廠及磷酸鹽類肥料的製造過程而被釋放到環境中[3]。當這些重金屬排放到環境中時，會對於水生環境產生污染，並造成有機生命體產生氧化壓力反應(Oxidative Stress Responses)，進一步造成生物體的傷害[4]。

鎘的汙染往往經由金屬工業排放之廢水進入水生生態，而積聚在水體、土壤、植物與水生動物中，若水中含有高濃度之鎘，對於水生植物及動物將造成損害[5]。當水生生態系統被鎘污染時，鎘可透過生物體經由食入水或食物直接造成本體危害，也可經生物表皮細胞吸收造成傷害[6]。另有文獻指出植物若暴露於被鎘汙染的環境，其體內細胞會產生過氧反應並產生大量自由基[7]，細胞內物質也因此被損壞，將對植物造成生長遲滯及組織功能損壞等影響[8]。水生環境中的魚類若暴露在含有5 mM的鎘水體中，其紅血球破裂，肌肉細胞內的粒腺體會遭到破壞，心臟組織也會受損，並且發現體內會有重金屬鎘的積聚現象[4]，因此環境中飼養的魚類若受到鎘汙染，再被人類食入會對人類之健康產生嚴重的危害。當人體內聚集高劑量鎘(10μg/L)，不僅造成腎臟及肝臟的損壞，更對生理機能器官造成慢毒性之影響，進而產生腫瘤[1]。

水生生物經由水和食物將金屬累積至體內，但個別之金屬含量對水生動物的影響卻很少被探討。近年研究皆著重於水生生物於水中攝食與直接暴露金屬後之毒性試驗，如捕食性的節肢動物經由捕食將鎘食入體內，而雙貝類透過濾嘴過濾水將鎘留滯於體內[9]，而忽略生物與生物間食物的傳遞也是生物攝入金屬的可能途徑，所以食物鏈可能造成生物金屬累積之現象[10]。文獻指出造成大水蚤(*Daphnia magna*)致死反應主要爲食入含有鎘的藻類，而非鎘的直接傷害[11]。有研究發現同時在水跟食物中加入鎘餵食大水蚤的傷害，比單獨餵食含有鎘的水或食物之傷害性大[12]。

近年來，利用無脊椎動物水蚤做爲非哺乳類動物測試系統引起許多學者高度關切，尤其水蚤被廣泛的應用於水體環境中低劑量之金屬濃度評估試驗[13-16]。無脊椎動物經常被用來測試生物毒性，其中圓水蚤是一已建立的研究生態毒理學的良好模式。水蚤具有容易飼養、世代期短、不同之齡期、透明度、容易操作及低成本等優點，它允許研究者利用眼睛觀察生理作用，並同時測量多項不同的特性，如胚胎

生長發育、心跳、馬氏管功能、雌成蟲抱卵數、器官發育情形、觸角、體壁及尾刺等生長現象；在生理學上，屬非侵入性的研究[17]。近年來，許多研究發現小球藻對於環境中的重金屬、磷酸鹽類等物質具有吸附作用的特性，使得小球藻對於金屬的吸附試驗逐漸受到關注[18]。在毒性試驗評估中常被使用的水生生物，如小球藻，是一種單細胞生物，直徑大小約5-10μm，適合用於測量暴露於藥劑後的生長反應，常被應用於觀察試驗藥劑對於藻類的生長抑制試驗[19]。應用生態系中食物鏈之關係，以觀察水體環境中的初級消費者，如水蚤在食入含有試驗藥劑之藻類，在其體內會積聚試驗藥劑之劑量[20]。以上被證實對於水中許多化學物質和有機物質具有敏感性，因此被廣泛應用在偵測水中有害物質。本研究主要爲探討小球藻暴露在氯化鎘序列濃度下，與正常培養情形時之生長速度與生長數量是否產生差異，並觀察重金屬鎘在不同濃度序列下，是否會對小球藻的生長有抑制現象。再進一步，探討含有氯化鎘的小球藻餵食圓水蚤稚蟲後，是否會造成圓水蚤稚蟲攝食重金屬後造成生物毒性的影響。

材料與方法

材料

1. 小球藻之培育：

秤取花寶二號肥料(HYPONeX$_2$, The HYPONeX Corp., OH, USA)或同級品1.0 g，溶解於1000 mL蒸餾水中。分裝培養液400 mL於500 mL錐形瓶，再於121℃下，加熱滅菌15分鐘，待冷卻後，保存於4℃備用[21]。

採用本研究室自行培養之小球藻(*Chlorella vulgaris*)，將要培養之小球藻接種於含400 mL培養液(銨態氮14%、檸檬酸溶性磷酐15%、水溶性磷酐13.5%、水溶性氧化鉀10%)之500 mL錐形瓶中，通氣培養並以白色日光燈(40W)於上方(距離約20 cm)加以照光，強度爲10-20 μmol m^{-2} s^{-1}。培養溫度爲27±1℃，培養7天後小球藻之濃度即可達到1.0×10^6 cells/mL，此時之培養液呈綠色。小球藻之實際細胞濃度，在光學顯微鏡下使用血球計數器(counting chamber)計數得知[21]。

2. 圓水蚤之培養：

由中山醫學大學病媒傳染病研究室自行培養五代以上之圓水蚤(*Daphnia pulex*)。於4L玻璃燒杯中馴養，每一燒杯內水蚤數不得超過300隻，以避免繁殖太快，造成擁擠。爲避免水蚤意外造成全部死亡，需5個馴養燒杯。馴養之水溫必須與毒性試驗溫度一致，即25±1℃，光照時間維持每天16小時，光照強度爲10-20 μmol m^{-2} s^{-1}。馴養時間至少7天，馴養杯內溶氧須以通氣設備通氣以維持溶氧5 mg/L以上，水蚤死亡率不得超過5%。馴養時每天清除燒杯底部沉積之食物、殘渣與水蚤排泄物，同時每兩天更換50%稀釋水。水蚤的食物爲小球藻，其餵食濃度爲1.0×10^5 cells/mL以上[22]。

圓水蚤培養液主要成分爲0.77 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$，0.46 mM $MgSO_4$，0.01 mM K_2HPO_4，0.20 mM $NaNO_3$，1.50 mM $NaHCO_3$，0.11 mM $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$，0.39 mM H_3BO_3，0.08 mM KCl，pH 7.0；使用

二次水(deionized and distilled water)配製而成，pH值調整使用1N HCl 或1N NaOH水溶液[22]。

方　法

1. 試驗藥劑

氯化鎘(Cadmium Chloride)，CAS. NO:10108-64-2，分子式:$CdCl_2$，無色固體結晶，無味，可溶於水(140 g/L，20℃) (Merck Index, 2001)。本試驗對於急毒性試驗採用之序列濃度爲0.020, 0.024, 0.026, 0.028, 0.030 mg/L；小球藻生長抑制試驗使用之序列濃度爲0.020, 0.024, 0.026, 0.028, 0.030 mg/L，胚胎毒性試驗序列濃度則依據急毒性試驗結果。

2. 圓水蚤急毒性試驗

本研究以仿自然水體溶液爲稀釋水配置藥劑之序列濃度0.020, 0.024, 0.026, 0.028, 0.030 mg/L各20 mL，隨機選取實驗室培養之水蚤的稚蟲(出生未滿24小時)，每50 mL燒杯中放入5隻水蚤稚蟲及調配好的序列試驗濃度各50 mL，於其上蓋上表玻璃，並進行4重複試驗；再放入25±1℃、RH(相對濕度)＝50%之生長培養箱，且光週期明暗比=16:8 (hr)。本研究實驗期間爲48小時，利用D.C.C. (Digital Computed Camera system)數位攝影系統觀察(50 ×)每24小時死亡數，直至第48小時止。再利用PROBIT生物毒性統計軟體(US EPA, 1996)計算其24小時、48小時之EC_{50}值。水蚤死亡判定：水蚤運動主要靠第二觸角、橈足、及後腹部等，當這些器官或部位，有明顯不活動，並經過輕敲燒杯亦無反應，即可認定爲死亡[23,24]。

3. 小球藻正常生長曲線與培養液濃度相關試驗

本研究首先量測在不同濃度的培養液下，小球藻的生長情形；在控制組方面，以逆滲透水(Reverses Osmosis water)培養做爲對照組，生長培養液的序列濃度爲200, 400, 600, 800, 1000 mg/L，隨機選取實驗室培養小球藻溶液1.0×10^6 cells/mL，各取1 mL藻液及調配好的序列試驗濃度各50 mL放入50 mL燒杯中，進行3重複試驗。打氣並維持光照強度30 μmol m^{-2} s^{-1}，溫度25±1℃，pH值6.5，光週期明暗比=16:8 (hr)。本研究實驗期間每24小時使用血球計數器下計數，並觀察一次小球藻生長數量 (小球藻死亡之判斷；小球藻顏色鮮綠色爲存活，黃褐色爲呈現死亡狀態)，至72小時止[25]。

4. 小球藻生長抑制試驗

從上述試驗結果發現，在1000 mg/L的濃度下小球藻的生長情形最爲良好(Fig.1)，因此，在氯化鎘的試驗中，使用培養液濃度1000 mg/L爲控制組，並以此濃度的小球藻培養液爲稀釋水配置藥劑之序列濃度0.020, 0.024, 0.026, 0.028, 0.030 mg/L各50 mL。隨機選取實驗室培養小球藻溶液1.0×10^6 cells/mL，各取1 mL藻液及調配好的序列試驗濃度各50 mL放入50 mL燒杯中，進行3重複試驗。打氣並維持光照強度30 μmol m^{-2} s^{-1}，溫度25±1℃，pH值6.5，光週期明暗比=16:8 (hr)。本研究實驗期間，每24小時使用血球計數器下計數，並觀察一次小球藻存活與死亡數量與比例，至72小時止[25, 26]。

5. **吸附氯化鎘之小球藻餵食圓水蚤稚蟲之毒性試驗**

本研究於每次試驗時，將小球藻置於含有鎘的序列濃度0.020, 0.024, 0.026, 0.028, 0.030 mg/L溶液中72小時，之後將其離心並使用仿自然水體清洗三次，再置於含仿自然水體的燒杯中稀釋，使其濃度爲1.0×10^6 cells/mL。將調配好100 mL的試驗溶液加入250 mL燒杯中，隨機選取實驗室培養之圓水蚤的稚蟲(出生未滿24小時)，每杯燒杯中放入5隻水蚤稚蟲，於其上蓋上表玻璃，並進行4重複試驗。再置於25±1℃、RH＝50%之生長培養箱，光週期明暗比=16:8 (hr)。本研究實驗期間爲48小時，利用數位攝影系統觀察(50 x)，計數每24小時圓水蚤死亡數，至第48小時止。再利用PROBIT生物毒性統計軟體[27]，計算其24小時、48小時之LD_{50}值。水蚤死亡判定：水蚤運動主要靠第二觸角、橈足、及後腹部等，當這些器官或部位，有明顯不活動，並經過輕敲燒杯亦無反應，即可認定爲死亡，並觀察其是否會造成致畸的情形。

6. **統計方法與分析**

氯化鎘對圓水蚤之急毒性試驗，和含有氯化鎘之小球藻餵食圓水蚤稚蟲之毒性試驗的數據皆以Probit program version 1.3進行影響樣本半數影響濃度值(Effective Median Concentration; EC_{50} value)及半數致死濃度值(Median Lethal Concentration; LC_{50} value)之分析[27]。小球藻正常生長曲線與培養液濃度相關試驗，及小球藻生長抑制試驗的數據皆以卡方雙尾檢定(*Chi-Square test*)；分析比較培養液濃度與小球藻生長濃度的相關性，及氯化鎘濃度與小球藻生長抑制率的相關性，當$p<0.05$表示達到顯著差異。

結　果

氯化鎘對於圓水蚤的急毒性實驗結果，在24小時EC_{50}值爲0.060 mg/L，48小時的EC_{50}值爲0.023 mg/L。小球藻的正常生長曲線試驗結果發現，控制組在逆滲透水未添加培養液的情形下生長速度最爲緩慢；實驗組隨著培養液的濃度增加，其生長速度也增加，成長情形較控制組顯著($p<0.05$)。含有氯化鎘序列濃度之小球藻生長抑制試驗顯示，隨著藥劑濃度的增加，小球藻的生長速度逐漸緩慢；相較於控制組，含氯化鎘之實驗組生長數量明顯減少($p<0.05$)。比較正常生長曲線與培養在氯化鎘溶液中之小球藻，在氯化鎘溶液中之小球藻比正常生長曲線的小球藻生長速度緩慢；在生長數量的比較上，兩者皆達到1.0×10^6 cells/mL，但培養於氯化鎘之小球藻的生長數量明顯少於正常生長曲線的小球藻生長的數量($p<0.05$)。因此推測氯化鎘對於小球藻的生長有抑制的作用。由培養於氯化鎘之小球藻餵食圓水蚤的試驗結果得知，在24小時的LD_{50}值爲0.038 mg/L，48小時的LD_{50}值爲0.030 mg/L，與氯化鎘溶液對圓水蚤24h-EC_{50}及48h-EC_{50}值比較，推測小球藻對於氯化鎘具有吸附作用，且對於圓水蚤具有影響。

圓水蚤急毒性試驗

由急毒性試驗結果發現，氯化鎘對

圓水蚤的毒性影響在24小時的EC_{50}值爲0.060 mg/L，48小時的EC_{50}值爲0.023 mg/L。在24小時與48小時的EC_{50}比值中，發現呈現倍數的關係(24h/48h toxicity ratio＝2.61)，數據顯示氯化鎘並不會因爲時間的增加而減少毒性，在硬水中毒性呈穩定的現象(表一)。

表一： 氯化鎘對圓水蚤(*D. pulex*) 的半數影響濃度值(EC_{50} value)及吸附氯化鎘的小球藻餵食圓水蚤後的半數致死濃度值(LD_{50} value)

Time exposed (hour)	Toxicity (mg/L)	
	EC_{50} value	LD_{50} value
24	0.060±0.039[a]	0.038±0.001[b]
48	0.023±0.004	0.030±0.001
24h/48h toxicity ratio	2.61[c]	1.27

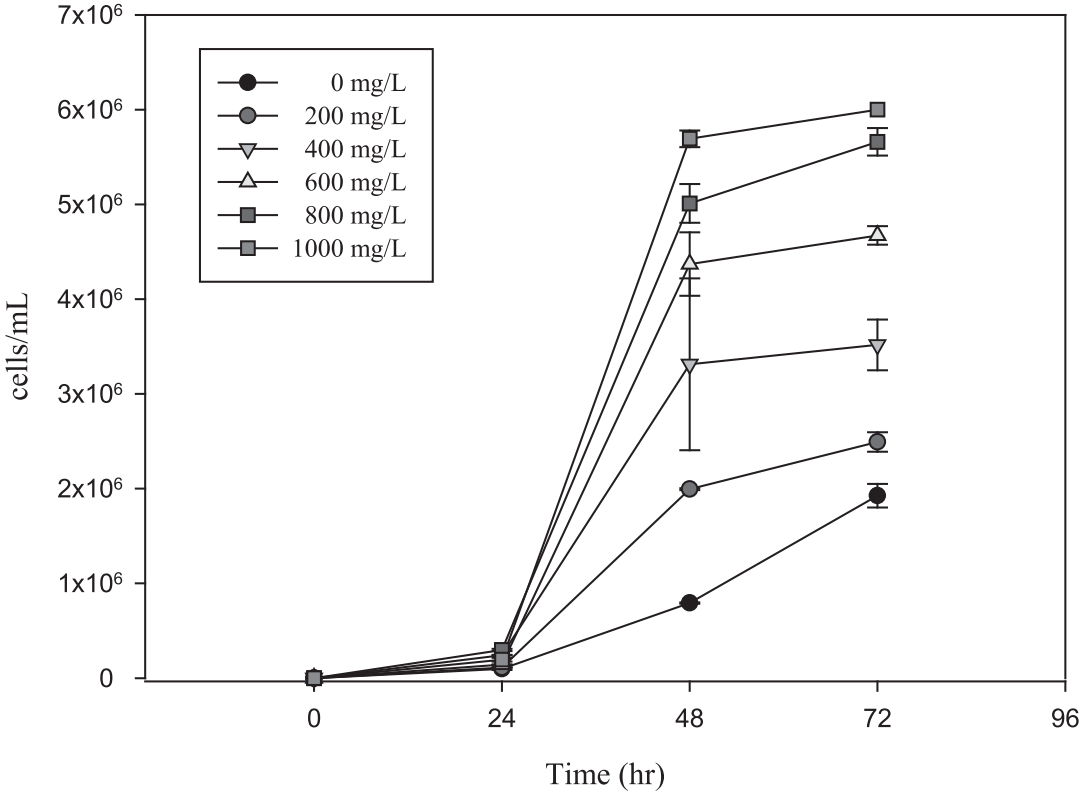
a: significance, $p<0.05$
b: non-significance, $p>0.05$
c: biotoxic accumulation

小球藻的正常生長曲線

小球藻的正常生長曲線的試驗結果顯示，控制組生長在逆滲透水未添加培養液的情形下，生長速度最爲緩慢(小球藻之濃度爲0.098×10^6 cells/mL/24h，0.793×10^6 cells/mL/48h，和1.925×10^6 cells/mL/72h)。試驗組中隨著培養液的濃度增加，其生長速度也增加，在培養液濃度200 mg/L下，小球藻之濃度爲0.113×10^6 cells/mL/24h，1.995×10^6 cells/mL/48h，和2.493×10^6 cells/mL/72h。在培養液濃度提升爲400 mg/L，小球藻濃度爲0.243×10^6 cells/mL/24h，3.313×10^6 cells/mL/48h，和3.518×10^6 cells/mL/72h。在培養液濃度提升爲600 mg/L，小球藻之濃度爲0.143×10^6 cells/mL/24h，4.370×10^6 cells/mL/48h，和4.673×10^6 cells/mL/72h。在培養液濃度提升爲800 mg/L，小球藻之濃度爲0.298×10^6 cells/mL/24h，5.010×10^6 cells/mL/48h，和5.661×10^6 cells/mL/72h。在培養液濃度提升爲1000 mg/L，小球藻之濃度爲0.195×10^6 cells/mL/24h，5.693×10^6 cells/mL/48h，和6.000×10^6 cells/mL/72h (表二、圖一)。

表二： 小球藻在營養培養液序列濃度與時間序列下之生長數量(×106 cells/mL)

Time (hr)	Conc. (mg/L)					
	0	200	400	600	800	1000
0	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
24	0.098	0.113	0.243	0.143	0.298	0.195
48	0.793	1.995	3.313	4.370	5.010	5.693
72	1.925	2.493	3.518	4.673	5.661	6.000



圖一：小球藻在培養液系列濃度下培養0到72小時的正常生長曲線

從以上數據得知，在小球藻濃度隨著培養液序列濃度之提升(200 mg/L、400 mg/L、600 mg/L、800 mg/L、1000 mg/L)，小球藻濃度有顯著上升的現象，小球藻成長情形與控制組比較結果呈現顯著差異(p<0.05)。小球藻在序列濃度之培養液中24小時，其生長濃度皆未達到1×10^6 cells/mL；至48小時，其數量皆有增加的現象；至72小時，小球藻之生長濃度皆超過1×10^6 cells/mL。

小球藻生長抑制試驗

含有氯化鎘序列濃度之小球藻生長抑制試驗結果發現，氯化鎘濃度0.020 mg/L，小球藻之濃度爲0.105×10^6 cells/mL/24h，4.138×10^6 cells/mL/48h，和4.610×10^6 cells/mL/72h。氯化鎘濃度提升至0.024 mg/L，小球藻之濃度爲0.115×10^6 cells/mL/24h，3.298×10^6 cells/mL/48h，和3.970×10^6 cells/mL/72h。氯化鎘濃度提升爲0.026 mg/L，小球藻之濃度爲0.083×10^6 cells/mL/24h，2.643×10^6 cells/mL/48h，和2.998×10^6 cells/mL/72h。在氯化鎘濃度提升爲0.028 mg/L，小球藻之濃度爲0.098×10^6 cells/mL/24h，2.358×10^6 cells/mL/48h，和2.308×10^6 cells/mL/72h。在氯化鎘濃度提升爲0.030 mg/L，小球藻之濃度爲0.080×10^6 cells/mL/24h，1.778×10^6 cells/mL/48h，和2.053×10^6 cells/mL/72h(表三)。以上結果發現小球藻濃度隨著藥劑濃度的增加(0.020 mg/L，0.024 mg/L，0.026 mg/L，0.028 mg/L，0.030 mg/L)，小球藻的生長速度變爲緩慢，可發現含氯化鎘之試驗組與控制組比較結果；小球藻的生長情形呈現出顯著差異(p<0.05)。在氯化鎘序列濃度暴露試驗中，小球藻的生長濃度在24小時皆未達到1×10^6 cells/mL，試驗在48小時，小球藻濃度有略微增加的現象，試驗持續至72小時，小球藻濃度皆超過1×10^6 cells/mL。與控制組比較發現：含氯化鎘之小球藻在48與72小時的生長速度與生長濃度相對緩慢許多，因此得知隨著氯化鎘的濃度提升，與暴露時間的增加，小球藻的生長情形有顯著的抑制現象(p<0.05)。比較小球藻正常生長曲線與含氯化鎘之小球藻生長曲線，發現含氯化鎘之小球藻生長速度比正常生長曲線緩慢許多(表三、圖二)。

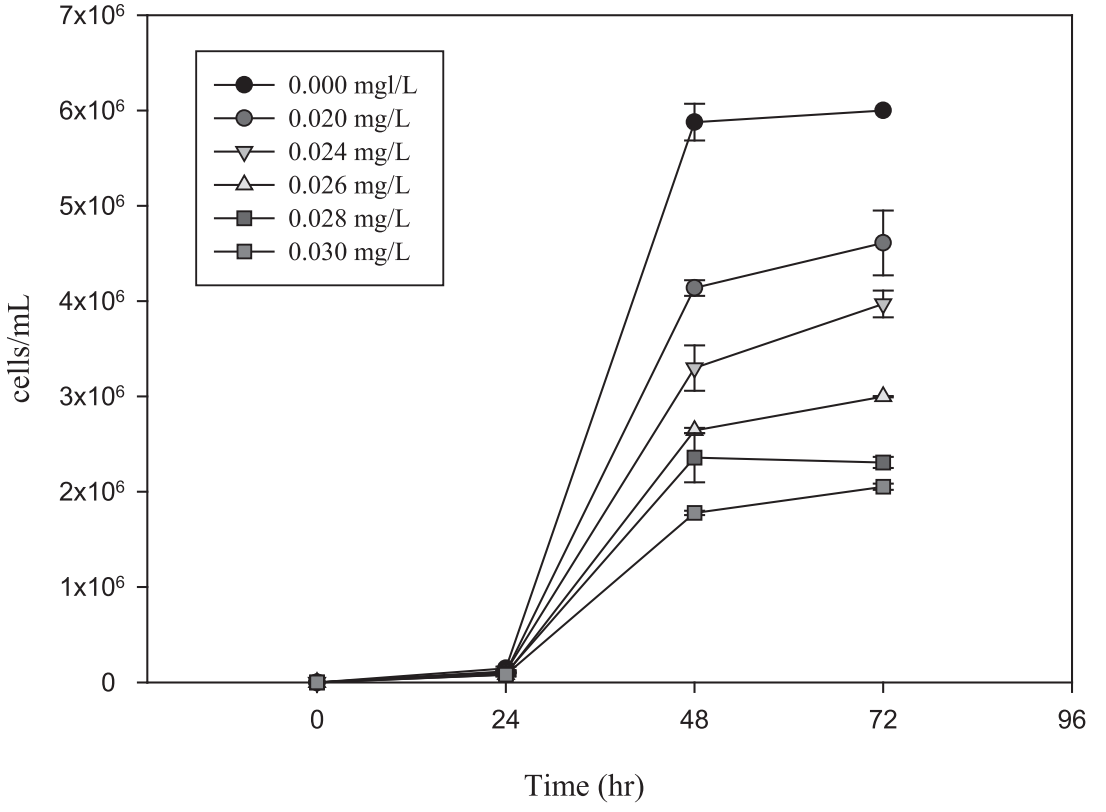
吸附氯化鎘之小球藻餵食圓水蚤稚蟲之毒性試驗

研究結果顯示，吸附氯化鎘之小球藻餵食圓水蚤稚蟲之毒性試驗，在24小時的LD_{50}值爲0.038 mg/L，在48小時的LD_{50}值爲0.030 mg/L(表一)。試驗結果發現圓水蚤餵食吸附高濃度氯化鎘的小球藻，圓水蚤的死亡率顯著高於低濃度者。顯示小球藻對於氯化鎘具有吸附作用，當吸附有氯化鎘系列濃度(0.020 mg/L、0.024 mg/L、0.026 mg/L、0.028 mg/L、0.030 mg/L)的小球藻(濃度約1.0×10^6 cells/mL)餵食圓水蚤稚蟲，在24小時後，發現圓水蚤尚有活動力，相較於控制組其活動力不明顯；至48小時後，發現氯化鎘濃度愈高時圓水蚤死亡數愈高，低濃度下水蚤則活動現象低落，與控制組成顯著差異。由上述結果得知，吸附有氯化鎘之小球藻在餵食圓水蚤後，會造成圓水蚤失去活性或死亡；從

表三：小球藻在氯化鎘序列濃度與時間序列下之生長數量(×10⁶ cells/mL)及生長抑制率(%)

Time (hr)	Conc. (mg/L)					
	0.00	0.020	0.024	0.026	0.028	0.030
0	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
0h-GIR	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
24	0.148	0.105	0.115	0.083	0.098	0.080
24h-GIR	0.00	28.81	22.20	44.07	33.90	45.76
48	5.878	4.138	3.298	2.643	2.358	1.778
48h-GIR	0.00	29.60	43.89	55.04	59.88	69.75
72	6.000	4.610	3.970	2.998	2.378	2.053
72h-GIR	0.00	23.17	33.83	50.03	60.04	65.78

GIR: Growth inhibition rate (%)



圖二： 小球藻培養在氯化鎘序列濃度下0到72小時的生長曲線

急毒性試驗與吸附有氯化鎘之小球藻餵食圓水蚤的試驗數據比較發現，餵食吸附有氯化鎘的小球藻試驗結果的毒性濃度值小於急毒性試驗的結果(0.030 mg/L＜0.023 mg/L)。

討　論

本研究發現隨著小球藻培養液的濃度提升，培養時間的增加，小球藻的生長情形有顯著的增加。小球藻生長在含有氯化鎘溶液中的濃度明顯低於生長在未含有氯化鎘溶液者，推測氯化鎘對於小球藻的生長具有抑制的作用。圓水蚤暴露在氯化鎘的系列濃度中，其EC_{50}值大於相同濃度下吸附有氯化鎘之小球藻餵食圓水蚤的LD_{50}值，因此推論氯化鎘經由圓水蚤體表的直接接觸下，其毒性影響最大。因此也間接證明小球藻有吸附氯化鎘的能力，經由餵食圓水蚤後其LD_{50}值小於EC_{50}值。本研究發現在急毒性試驗與吸附有氯化鎘之小球藻餵食圓水蚤的試驗中，兩試驗24h-EC_{50}、48h-EC_{50}值與24h-LD_{50}值、48h-LD_{50}的比值比較，發現兩者的比值分別爲24h-EC50/48h-EC50比值爲2.61，24h-LD50/48h-LD50比值爲1.27，皆大於1(表一)。由此結果得知重金屬氯化鎘的濃度在水體中不會因爲時間的增加而分解或減少毒性，反而呈現毒性穩定的狀態，本研究證實重金屬氯化鎘在自然界存在的毒性屬於穩定性。

本研究氯化鎘對圓水蚤急毒性試驗結果，在48小時的EC_{50}值爲0.023 mg/L，與Barata等[12]於2002年所發表的重金屬鎘、鋅對於大水蚤在不同的金屬濃度下致死的結果相似，他們指出大水蚤的鎘急毒性試驗在48小時的EC_{50}值爲0.025 mg/L，此結果與本研究者相近。因此，證明本實驗的急毒性濃度值具有參考價值。Anita等(2008)[28]與Wu等(2008)[29]分別指出，利用各種不同濃度序列的重金屬鎘來觀察水蚤(*D. magna*、*D. carinata*)的死亡情形，皆證明重金屬鎘在低濃度的情形下，對於水中無脊椎動物具有影響，其毒性影響的情形造成水中生物失去活動力或是死亡，本實驗亦觀察到此現象。比較相關文獻(2002~2008年)發現，本研究所測得對水生無脊椎動物急毒性試驗濃度值爲最敏感，可用來證明重金屬鎘對於水體環境中水生無脊椎動物影響的最低濃度值(表四)。

在小球藻生長抑制試驗中，本研究發現重金屬鎘對於小球藻的生長情形具有抑制的作用，隨著重金屬鎘的濃度增加，生長的情形逐漸緩慢。Scrag等(2003)[19]指出微藻類因飼養方便且易於觀察，對於環境中有毒物質具有高度的敏感性，適合用來測量環境水體重金屬含量；利用其快速生長的優勢，觀察在不同濃度各種重金屬溶液中微藻類生長的數量，發現高濃度的重金屬溶液對於微藻類的生長皆有抑制的現象，低濃度下則反之；此則證明重金屬鎘對小球藻的生長具有抑制作用。Sanitá di Toppi等(2007)[8]亦發現鎘會造成植物生長遲滯的現象，在高濃度鎘的劑量下，植物除了生長受到抑制，其體表細胞也產生破裂損壞的情形，最後導致植物枯萎死亡；此現象與本研究結果所發現小球藻的死亡現象一致，因此，可推論重金屬鎘水溶液

表四： 歷年有關重金屬鎘研究之文獻整理與本研究結果之比較

Year	*Author*	*Heavy metal*	EC_{50} *or* LD_{50} *value*	**Test organism**
2002a	Barata et al.[11]	Cd	LD_{50}: 0.032 mg/L	*C. vulgaris* *D. magna*
2002b	Barata et al.[12]	Cd、Zn	EC_{50}: 0.025 mg/L	*D. magna*
2005	Ruangsomboon & Wongrat [5]	Cd	EC_{50}: 0.061 mg/L LD_{50}: 1.94 mg/L	*C. vulgaris* *M. macrocopa* Predatory catfish
2006	Tsui et al.[33]	Cd、Cu	LD_{50}: 0.75 mg/L	*Sargassum* *D. magna*
2007	James et al. [30]	Cd	LD_{50}: 0.060 mg/L	Rainbow trout
2007	Croteau et al. [31]	Cd、Cr	LD_{50}: 0.07 mg/L	Freshwater snails
2008	Soares et al. [4]	Cd、Va	LD_{50}: 14.67 g/L	Toadfish
2008	Anita et al. [28]	Cd、Cr	EC_{50}: 0.32 mg/L	*D. magna*
2010	This study	Cd	EC_{50}: 0.023 mg/L LD_{50}: 0.030 mg/L	*C. vulgaris* *D. pulex*

C. vulgaris: Chlorella vulgaris

D. magna: Daphnia magna

M. macrocopa: Moina macrocopa

對於微藻類與水生無脊椎動物會造成死亡或生長遲緩的現象。上述研究皆是爲進一步探討水生生態環境中食物鏈之關係的前置步驟，對於小球藻的生長抑制試驗方面，未來將進一步使用影像錄影分析系統來統計0至72小時間，小球藻的生長情形與反應，其數據將更具有可信力。

淡水生態環境中若水體被重金屬污染時，生活於淡水中魚類的體內重金屬含量會升高[30]，水中浮游生物與微藻類皆會將重金屬吸附至體內或附著於體表，再經由食物鏈的循環，重金屬慢慢累積至高級消費者體內[4]。Croteau等(2007)觀察淡水蝸牛(Freshwater snails)攝食含重金屬的微藻類後，亦發現蝸牛體內有重金屬的積聚[31]。小球藻對於重金屬錳(manganese)、鉻(chromium)、鎳(nickel)、鋅、銅溶液具有吸附作用，且對於鋅、銅、鎘等各類重金屬的吸附力達90%[18,32]，故本研究將小球藻浸泡於含氯化鎘的序列濃度72小時後再餵食圓水蚤稚蟲，發現圓水蚤活動力有下降或死亡情形，此項結果與Barata等(2002a)[11]食物與水中含有不同濃度重金屬鎘餵食大水蚤

的觀察結果類似。但是，兩研究不同處在於本試驗並沒有另外探討食物與水體中皆含有重金屬鎘的雙重污染下對水蚤的影響，只針對單一條件下小球藻吸附鎘後餵食圓水蚤的死亡情形。另外，有學者使用大型藻類(Sargassum)衍生的有機碳吸附重金屬鎘與銅後再餵食大水蚤[33]，亦有相同結果，試驗的大水蚤體內亦有重金屬鎘與鋅的累積[12]。Ruangsomboon和Wongrat (2006)進一步利用生態食物鏈的關係，使用小球藻、水中浮游生物(*M. macrocopa*)、魚(predatory catfish)三者進行研究，當小球藻暴露於不同濃度的鎘序列濃度後，經由浮游生物攝食，接著再讓魚攝入浮游生物後，觀察其體內重金屬鎘含量情形，發現魚的生長發育受到影響[5]。因此，本研究在含有氯化鎘之小球藻餵食圓水蚤稚蟲毒性試驗中證實，小球藻對於重金屬鎘具有吸附作用，可經由生物攝食的關係，使重金屬鎘進入生物體內，並進一步造成生物的損害受傷甚至死亡的現象，由上述文獻可支持本研究之結果。

結　論

氯化鎘對圓水蚤的急毒性24h-EC_{50}值爲0.060 mg/L，48h-EC_{50}值爲0.023 mg/L。小球藻的正常生長曲線試驗顯示；實驗組隨著培養液的濃度增加，生長速度增加，其成長情形較控制組顯著(p<0.05)。含有氯化鎘序列濃度之小球藻隨著藥劑濃度的增加，小球藻的生長速度愈爲緩慢；相較於控制組其生長速度明顯減少(p<0.05)；且含氯化鎘之小球藻的生長數量明顯少於正常生長的數量(p<0.05)。含氯化鎘之小球藻餵食圓水蚤的試驗結果24h-LD_{50}值爲0.038 mg/L，48h-LD_{50}值爲0.030 mg/L，與氯化鎘溶液對圓水蚤24h-EC_{50}及48h-EC_{50}值比較，推測小球藻對於氯化鎘具有吸附作用，且吸附氯化鎘之小球藻對圓水蚤具有毒性影響。

工業的迅速發展提升了社會的經濟，但是對環境造成的傷害卻是不容小覷。工業廢水的不當排放，汙染了自然水體，造成無數水生生物的死亡與變異。重金屬鎘在臺灣也曾發生過鎘米事件[34]，對於人體的傷害眾皆所知，但是對於環境水生生物的影響，卻甚少重視。本研究爲臺灣地區目前唯一探討重金屬鎘對於水生生物影響的試驗，但本試驗爲生物攝入重金屬的初步過程，無法完整套用於環境生態食物鏈中，將來可朝較精密的試驗發展，如探討小球藻吸附重金屬鎘劑量的檢定及利用水生食物鏈的關係，探討重金屬生物毒性影響及致畸反應，進一步由水生生態環境推展至哺乳動物的影響，期許可建構一完整的重金屬鎘對生物毒性影響的研究系統。

參考文獻

1. Mansour SA, Sidky MM: Ecotoxicological Studies 3 Heavy metals contaminating water and fish from Fayoum Governorate, Egypt. Food Chem 2002; 78: 15-22.
2. Wiener JG, Giesy JP: Concentration of Cd, Cu, Mn, Pb, Zn, in fishes in highly organic soft ware pond. J Fish Res Board Can 1979; 36: 270-8.
3. Pemokowiak J, Kosakowska A:

Accumulation of cadmium by green algae *Chlorella vulgaris* in the presence of marine humic substances. Environ Int 1998; 24: 583-8.

4. Soares SS, Martins H, Gutiérrez-Merino C, Aureliano M: Vanadium and cadmium in vivo effects in teleost cardiac muscle: Metal accumulation and oxidative stress markers. Comp Biochem Physiol 2008; 147C: 168-78.
5. Ruangsomboon S, Wongrat L: Bioaccumulation of cadmium in an experimental aquatic food chain involving phytoplankton (*Chlorella vulgaris*), zooplankton (*Moina macrocopa*), and the predatory catfish *Clarias macrocephalus* × *C. gariepinus*. Aquat Toxicol 2006; 78: 15-20.
6. Handy RD: The effect of acute exposure to dietary Cd and Cu on organ toxicant concentrations in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquat Toxicol 1993; 27: 1-14.
7. Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomez M, Romero-Puertas MC, del Rio LA: Cadmium-unduced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. J Exp Bot 2001; 52: 2115-26.
8. Sanita di Toppi L, Vurro E, Rossi L, Marabittini R, Musetti R, Careri M, Maffini M, Mucchino C, Corradini C, Badiani M: Different compensatory mechanisms in two metal-accumulating aquatic macrophytes exposed to acute cadmium stress in outdoor artificial lakes. Chemosphere 2007; 68: 769-80.
9. Luoma SN, Ho YB, Bryan GW: The effect of phenol on the growth of *Chlorella vulgaris* and Chlorella VT-1. Enzyme Microb Technol 2006; 39: 796-9.
10. Baird DJ, Brock TCM, de Ruiter PC, Boxall ABA, Culp JM, Eldridge P, Nommen U, Jak RG, Kidd KA, Dewitt T: The food web approach in the environmental management of toxic substances. In: Baird DJ, Burton GA (Eds), Ecological Variability: Separating Natural from Anthropogenic causes of Ecosystem Impairment. SETAC Press, Pensacola, 2001; 83-122.
11. Barata C, Markich SJ, Baird DJ, Soares AMVM: The relative importance of water and food as cadmium sources to *Daphnia magna* Straus. Aquat Toxicol 2002; 61: 143-54.
12. Barata C, Markich SJ, Baird DJ, Taylor G, Soares AMVM: Genetic variability in sublethal tolerance to mixtures of cadmium and zinc in clones of *Daphnia magna* Straus. Aquat Toxicol 2002; 60: 85-99.
13. Barata C, Baird DJ: Determining the ecotoxicological mode of action of chemicals from measurements made on individuals: results from instar-based tests with *Daphnia magna* Straus. Aquat Toxicol 2000; 48: 195-209.
14. Keddy CJ, Greene JC, Bonnell MA:

Review of whole-organism bioassays: soil, freshwater sediment and freshwater assessment in Canada. Ecotoxicol Environ Saf 1995; 30: 221-51.

15. Ekwall B: overview of the final MEIC results: II. The in vitro-in vivo evaluation, including the selection of a practical battery of cell tests for prediction of acute lethal blood concentrations in humans. Toxicol Vitro 1999; 13: 665-73.
16. Yeoman MS, Faragher RGA: Ageing and the nervous system: insights from studies on invertebrates. Biogerontology 2001; 2: 85-97.
17. Villegas-Navarro A, Rosas-LE, Reyes JL: The heart of *Daphnia magna*: effects of four cardioactive drugs. Comp Biochem Physiol 2003; 136 C: 127-34.
18. López-Suárez CE, Castro-Romero JM, González-Rodríguez MV, González-Soto E, Pérez-Iglesias J, Seco-Lago HM, Fernández-Solís JM: Study of the parameters affecting the binding of metals in solution by *Chlorella vulgaris*. Talanta 2000; 50: 1313-8.
19. Scargg AH, Morrison J, Shales SW: The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine. Enzyme Microbl Technol 2003; 33: 884-9.
20. Zurita JL, Jos A, del Peso A, Salguero M, Cameán AM, López-Artíguez M, Repetto G: Toxicological assessment of indium nitrate on aquatic organisms and investigation of the effects on the PLHC-1 fish cell line. Sci Total Environ 2007; 387: 155-65.
21. 張時獻、盧啟元、李宣信、李明偉、黃筑誼、王凱淞：市售常用染髮劑中成分：對苯二胺(*p*-phenylenediamine)及對胺基酚(4-aminophenol)對圓水蚤(*Daphnia pulex*)及其胚胎之影響。中山醫誌 2010; 21: 1-17。
22. 張時獻、盧啟元、李明偉、李宣信、徐 萍、王凱淞：探討兩種常用植物生長調節劑 (Gibberellic acid, Paclobutrazol)對水生蚤類(*Daphnia pulex*)之影響。中山醫誌 2009; 20: 143-59。
23. 行政院環保署：水樣急毒性檢測方法-水蚤靜水式法。2005; NIEA B901.12B
24. 張時獻、盧啟元、李明偉、李宣信、許晉誠、王凱淞：應用水蚤急毒性試驗及行為反應模式評估界面活性劑及殺蟲劑。中山醫誌 2009; 20: 125-42。
25. McEvoy E, Wright PC, Bustard MT: The effect of high concentration isopropanol on the growth of a solvent-tolerant strain of Chlorella vulgaris. Enzyme Microb Technol 2004; 35: 140-6.
26. 行政院環保署：水樣急毒性檢測方法-藻類靜水式法。1999; NIEA B906.10B
27. US EPA: Probit Analysis Software, ver. 1.3. EPA 2001.
28. Anita J, Tatjana T, Damjana D, Kristina S, Polona J, Milenko R: Biochemical biomarkers in chronically metal-stressed daphnids. Comp Biochem Physiol 2008;

147 C: 61-8.

29. Wu Y, Lin C, Yuan L: Phototaxis index of *Daphnia carinata* as an indicator of joint toxicity of copper, cadmium, zinc, nitrogen and phosphorus in aqueous solutions. Ecological Indicators 2008; 8: 69-74.
30. James CM, Sunita N, Derek HA, Lydia H, Lisa NT, Gordon M, Chris MW: Influence of acclimation and cross-acclimation of metals on acute Cd toxicity and Cd uptake and distribution in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat Toxicol 2007; 84: 190-7.
31. Croteau MN, Luoma SN, Pellet B: Determining metal assimilation efficiency in aquatic invertebrates using enriched stable metal isotope tracers. Aquat Toxicol 2007; 83: 116-25.
32. Al-Qunaibit M, Khalil M, Al-Wassil A: The effect of solvents on metal ion adsorption by the alga *Chlorella vulgaris*. Chemosphere 2005; 60: 412-8.
33. Tsui MTK, Wang WX, Wong MH: Influences of macroalga-derived dissolved organic carbon on the aquatic toxicity of copper and cadmium. Chemosphere 2006; 65: 1831-5.
34. 翁震炘：農作物重金屬污染監測與管制措施。行政院農業委員會：農政與農情 95年；169期（http://www.coa.gov.tw/view.php?catid=11397）。

Toxicity of Cadmium Adsorbed by *Chlorella vulgaris* and its Feeding Relation with *Daphnia pulex*

Shih-Hsien Chang, Chi-Yuan Lu, Pin-Jae Chen, Kai-Sung Wang*

Abstract

Purpose:The present study evaluated whether the environmental trace element, cadmium, could have bioaccumulation effects on both phytoplankton *C. vulgaris* and zooplankton *D. pulex*.

Methods:We developed an *in vitro* assay system to detect toxic compounds in the aquatic environment using the 5th generation water flea (cladoceran) eggs. The eggs were placed in a culture medium containing nature-imitating water (hard water). Then, cadmium chloride was added at various doses in a series of experiments in which we performed acute toxicity tests for EC_{50} values, LC_{50} values, growth inhibition, accumulation of $CdCl_2$ in the *C. vulgaris* and *D. pulex*. We then estimate the relationship among the test results.

Results:We found 24h-EC_{50} and 48h-EC_{50} of Cadmium chloride on *D. pulex* neonate to be 0.060 mg/L and 0.023 mg/L, respectively. The normal growth curve of *Chlorella vulgaris* showed that the growth rate increased with the concentration of the culture medium, and the growth rate was significantly better than that of the control group (p<0.05). On the other hand, the effects of $CdCl_2$ on *C. vulgaris* showed that the growth rate decreased with the concentration of $CdCl_2$, and was significantly less than the control group (p<0.05). The result showed that the 24h-LD_{50} and 48h-LD_{50} of $CdCl_2$ adsorbed with *C. vulgaris* and feed with *D. pulex* were 0.038 mg/L and 0.030 mg/L, respectively.

Conclusion:From the results, we conclude that $CdCl_2$ could be adsorbed by *C. vulgaris* which was consumed by the primary consumer *D. pulex.* The accumulation of $CdCl_2$ is related to aquatic food relation. It can be inferred that the accumulation of $CdCl_2$ is in *D. pulex* leads to hurt or death, depending on $CdCl_2$ concentration.

Keywords: Cadimium chloride, *Chlorella vulgaris*, *Daphnia pulex*, Growth inhibition, Bioaccumulating effect

School of Public Health, Chung Shan Medical University, Taichung, Taiwan

* Reprints and Corresponding Author: Dr. Kai-Sung Wang
Address: No. 110, Sec. 1, Jianguo N. Rd, Taichung City 40201, Taiwan
Tel: 886-4-24730022 ext 11799
E-mail: kenwang@csmu.edu.tw