

# 六種重金屬之浮萍毒性試驗

吳純宜 莊雅雲 李貽華 徐慈鴻\*

臺中縣霧峰鄉 農委會農業藥物毒物試驗所

(接受日期：2009年11月30日)

## 摘 要

吳純宜、莊雅雲、李貽華、徐慈鴻\* 2009 六種重金屬之浮萍毒性試驗 植保會刊 51(3-4): 69-82

浮萍科 (*Lemnaceae*) 植物為分佈廣泛、生長快速、形態簡單且易培養之水生維管束漂浮植物，這些特點使其適用於水域或溼地之環境污染物監測。本研究選擇兩種臺灣常見浮萍科植物青萍 (*Lemna aequinoctialis* Welwitsch) 及紫萍 (*Spirodela punctata* (G. F. W. Meyer) Thompson)，進行鎘 (Cd)、鉻 (Cr)、銅 (Cu)、鎳 (Ni)、鉛 (Pb) 及鋅 (Zn) 等六種重金屬之植物毒性試驗 (phytotoxic test)，包括建立試驗條件、觀察受害徵狀並計算 4 天及 7 天的 50% 生長抑制濃度 ( $IC_{50}$ , 50% growth inhibitory concentration) 評估兩種浮萍科植物對重金屬的敏感性。試驗結果顯示，重金屬對青萍之 4 天及 7 天的  $IC_{50}$  值分別為銅 0.34、0.20 mg/L，鎘 0.63、0.23 mg/L，鉻 2.99、2.00 mg/L，鎳 1.24、0.98 mg/L，鋅 30.1、20.0 mg/L；重金屬對紫萍之 4 天及 7 天的  $IC_{50}$  值分別為銅 0.16、0.11 mg/L，鎘 0.17、0.09 mg/L，鉻 1.24、1.08 mg/L，鎳 3.00、1.82 mg/L，鋅 20.4、12.2 mg/L；由於鉛於培養液中會出現沈澱的現象，因此鉛是以去離子水配製進行實驗，對青萍及紫萍 4 天的  $IC_{50}$  值分別為 0.30、0.14 mg/L。重金屬對浮萍葉狀體 (fronds) 造成的為害徵狀類型包括葉狀體黃化、白化、組織壞死、變形、葉狀體分離及失去浮性等，浮萍根部受重金屬影響會出現生長受抑制或斷裂的現象。根據  $IC_{50}$  值，重金屬對青萍的植物毒性依序為銅 > 鎘 > 鎳 > 鉻 > 鋅；重金屬對紫萍的植物毒性為銅  $\approx$  鎘 > 鉻 > 鎳 > 鋅。由青萍及紫萍對不同重金屬毒性反應之高低及所呈現之受害徵狀，顯示本土浮萍科植物具有應用為放流水及工業廢水中重金屬監測指標之潛力。

(關鍵詞：重金屬、浮萍科植物、青萍、紫萍、植物毒性試驗)

\* 通訊作者。E-mail: ths@tactri.gov.tw

## 緒 言

台灣由於地狹人稠，工業及農業區比鄰而處，常出現上游農田排水渠道有工業申請搭排至下游，又作為農業迴歸水引用於灌溉之情形，且工業放流水質標準對重金屬限值較灌溉水質標準寬鬆，加上工業廢水偷排情形難以杜絕，因此使農地有重金屬污染之虞，監測水體重金屬含量有其重要性。常用於水體中重金屬生態毒性評估之生物包括細菌、動物(如水蚤、魚)及藻類，由於不同物種敏感度之差異，無法完全代表高等水生維管束植物所受之影響<sup>(6, 11, 15, 18)</sup>。浮萍科植物(*Lemnaceae*，俗稱 duckweed) 分布廣，是水域或濕地常見的漂浮性維管束植物，形態簡單，僅具有葉狀體(frond)及根部(root)，葉狀體以分裂方式進行個體增殖，具生長快速、累積高生質量及營養生長期長等特性。浮萍科植物目前已被應用於工業廢水水質監測<sup>(1, 4)</sup>、污染物如重金屬、農藥和多環芳烴化合物(PAHs)之生態毒理評估<sup>(3, 12, 19, 21, 24, 27, 28)</sup> (ecotoxicological assessment)、都市及畜牧廢污水淨化<sup>(7, 9)</sup>等。包括不同的試驗條件、培養液組成、培養液酸鹼值及受測浮萍科植物種類等皆會對浮萍科植物的重金屬生態毒理試驗結果產生影響，Li 等<sup>(17)</sup>以不同稀釋倍數之 Hoagland 培養液與蒸餾水配製重金屬溶液進行青萍 *Lemna paucicostata* Hegelm. 之毒性試驗，顯示使用稀釋 2 倍的 Hoagland 培養液配製的鉻、鎳、鋅對 *L. paucicostata* 試驗所得的 50% 為害濃度值約為蒸餾水的 10 倍；Saadi 等<sup>(23)</sup>比較水萍 *Spirodela polyrhiza* 在 Homes modified 培養液與蒸餾水中對銅的毒性反應，結果顯示

使用培養液所得 IC<sub>50</sub> 值約為蒸餾水的 2 倍；比較 Drost<sup>(10)</sup>使用 Steinberg medium 與 Ince 等<sup>(15)</sup>使用 Jacob culture medium 培養下，*Lemna minor* 對銅 7 天的 IC<sub>50</sub> 值相差 2.4 倍，對鎳則相差 3.2 倍。由於文獻研究常使用之 *L. minor* 為溫帶地區常見品種，在台灣無發現記錄<sup>(2)</sup>，為了解台灣本土浮萍科植物對不同重金屬之敏感度，選擇台灣田野水域常見之浮萍科植物青萍 (*Lemna aequinoctialis* Welwitsch) 及紫萍 (*Spirodela punctata* (G. F. W. Meyer) Thompson)，進行鉻、鎳、鋅、銅、鋅及鉛等六種重金屬之植物毒性試驗，觀察受害徵狀並計算 4 天及 7 天的 IC<sub>50</sub> 值 (50% inhibitory concentration)。

## 材料與方法

### 一、受試浮萍科植物培育

受試浮萍自臺灣中部及南部野外水域採集而得，根據台灣維管束植物簡誌<sup>(2)</sup>之分類檢索及其他相關參考資料<sup>(5, 8)</sup>，鑑定所採集之浮萍科植物品種分別為青萍屬之青萍 (*L. aequinoctialis*) 及紫萍屬之紫萍 (*S. punctata*)，皆為台灣水域常見之品種。採回之浮萍先以清水濾洗數次除去雜質，並以 1000 倍稀釋之次氯酸溶液快速濾洗消毒，再的去離子水濾洗數次後，移至培養液中，於溫度 24 ± 1°C、光強度 3,500-5,000 lux、每日光照 12 小時的生長環境下進行馴養，培養液組成採用 1/2 Hoagland-E 配方<sup>(8)</sup> (表一)。受試浮萍每星期更新一次培養液，並在試驗用培養液中經過至少 1 個月之馴養後方可進行試驗；依據美國 APHA<sup>(4)</sup>之規範，以浮萍科植物進行水質生物毒

表一、培養液組成

Table 1. Composition of growth nutrient solution<sup>1)</sup>

Composition	Stock solution conc.	Used in nutrient solution
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	24.6 g/100 mL	0.50 mL/L
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	23.6 g/100 mL	1.15 mL/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13.6 g/100 mL	0.25 mL/L
KNO <sub>3</sub>	10.1 g/100 mL	1.25 mL/L
Fe solution		
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.484 g/L	10 mL/L
EDTA <sup>2)</sup>	1.5 g/L	
Micronutrients		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86 g/L	0.25 mL/L
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1.82 g/L	
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.22 g/L	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.09 g/L	
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.09 g/L	

<sup>1)</sup> Adjust the pH to 5.50-5.53 with KOH or HCl.

<sup>2)</sup> EDTA was replaced by tartaric acid as chelator in the heavy metal test medium. The stock concentration of tartaric acid is 0.448 g/L

性試驗，對照組浮萍在 4 天內葉狀體數目需增加達 2 倍以上，且白化 (chlorosis) 之葉狀體數目佔總葉狀體數目之比例必須小於 10%，此二項是評估受測浮萍是否健康以及浮萍生長試驗結果可接受性的重要依據，符合上述二項指標，表示試驗過程中浮萍未受到病、蟲害等逆境之影響，若否，則當次試驗結果不予採納。

## 二、重金屬對浮萍之植物毒性試驗

### (一) 試驗用培養液測試

參考 OECD<sup>(22)</sup>(Organization for Economic Cooperation Development)及徐等<sup>(1)</sup>的文獻資料建立標準試驗步驟，包括：培養液的選擇、培養液的體積、試驗浮萍的數目及選擇試驗評估指標等，由於 1/2 Hoagland-E 培養液配方中使用 EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) 為螯合劑

(chelator) 以幫助植物對鐵的吸收，但相關文獻<sup>(13, 14, 25)</sup>顯示 EDTA 會影響重金屬對浮萍之毒性，因此在進行重金屬對浮萍生長的毒性試驗前，需先測試螯合劑的種類對浮萍生長及對重金屬離子的影響，以得到適當的試驗用培養液，並調整浮萍繼代培養液與試驗用相同。

### (二) 試驗藥品來源與配製

培養液使用藥品 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、KNO<sub>3</sub>、FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O、Tartaric acid、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>、MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 及 CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 購自默克公司 (MERCK & Co., Inc)；EDTA (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) 及 ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 購自 Sigma 公司 (Sigma-Aldrich Co.)。

毒性試驗用之重金屬試藥 CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O、K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>、Pb (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> 及已知濃度的 ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 標準溶液 (0.1 mole/L)、

Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 標準溶液(1000 mg/L)皆購自默克公司，而 NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 及 Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 則購自 Sigma 公司。

重金屬試驗培養液的配製，首先以去離子水分別配製高濃度重金屬溶液包括 100 mg/L 銅、1000 mg/L 鉻、100 mg/L 銅、1000 mg/L 鎳、2500 mg/L 鋅及 1000 mg/L 鉛，之後按最終試驗濃度，分別取適量高濃度重金屬溶液添加入以去離子水所配製的培養液中混合均勻，培養液成分見表一，再以 KOH 及 HCl 溶液調整重金屬試驗培養液 pH 值為 5.50-5.53，配製完成的重金屬試驗培養液以誘導式耦合電漿放射光譜儀 (Inductively coupled plasma spec-trophotometer, JOBIN YVON 138 ULTRACE ICP-AES) 進行分析，確認試驗培養液中的重金屬濃度。

### (三)浮萍生長植物毒性試驗方法

採靜態更換 (static renewal) 批次試驗，

每批次選擇單一種浮萍測試一種重金屬，配製 6 種(含對照組)不同濃度的重金屬試驗培養液，每種濃度有四重複試驗，試驗條件設定如表二所示，試驗第 4 天 (96 小時) 記錄浮萍葉狀體數目並更換培養液，繼續培養至第 7 天試驗結束後，紀錄浮萍之葉狀體數目及觀察受害徵狀。試驗結果以葉狀體增加數計算不同濃度重金屬對浮萍生長之抑制率，抑制率之公式<sup>(4)</sup>如下：

$$\text{抑制百分率 (inhibition \%)} \\ = (C - F) / C \times 100 \%$$

C：對照組浮萍增加之葉狀體數目

F：試驗組浮萍增加之葉狀體數目

抑制率以標準常態累積分配函數的反函數轉換後與重金屬濃度對數值進行線性迴歸分析(信賴水準 95 %)，得到劑量—反應曲線(dose-response curve)及 IC<sub>50</sub> 值(50% inhibitory concentration)。

表二、浮萍毒性試驗條件

Table 2. Conditions of duckweed toxicity test

Test parameter	Duckweed test conditions
Species	<i>Lemna aequinoctialis</i> <i>Spirodela punctata</i>
Type	Static renewal
Temperature (°C)	24 ± 1
Light intensity (lux)	3,500-5,000
Photoperiod (hr)	12
Vessel	250 mL Beaker
Solution /vessel	120 mL
Duration (days)	4 and 7
End point of test	Fronds increase / vessel
Replicates	4
Specimens /vessel	<i>L. aequinoctialis</i> - 12 fronds <i>S. punctata</i> - 24 fronds
Medium	Heavy metal was prepared in nutrient solution (except Pb which was prepared in deionized water)

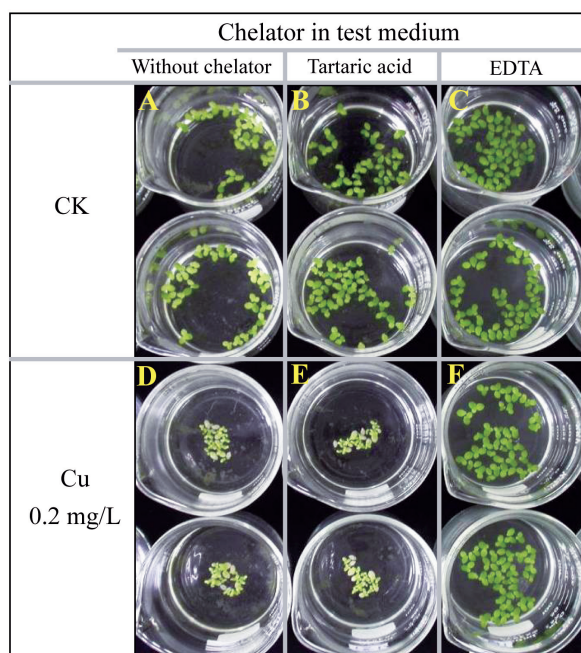
## 結 果

### 一、培養液中螯合劑之測試

培養液如含有螯合劑，重金屬離子可能與螯合劑作用而影響對浮萍之毒性，Huebert 等<sup>(14)</sup>以含不同濃度 EDTA 培養液測試銅對 *Lemna trisulca* 之毒性，結果顯示 EDTA 濃度由 9  $\mu\text{M}$  提高至 81  $\mu\text{M}$  時，對 *L. trisulca* 之  $\text{IC}_{50}$  值由 3.6  $\mu\text{M}$  提高至 55  $\mu\text{M}$ ；Nasu 等<sup>(20)</sup>以含 EDTA 及不含 EDTA 之培養液進行銅對 *L. paucicostata* 的敏感性試驗，發現在濃度 1 mg/L 銅處理下，含 EDTA 之

培養液中，浮萍生長受抑制率 ( $\text{IC}_{50}$  值) 小於 20%，在不含 EDTA 之培養液中浮萍生長受抑制率則大於 50%。

以酒石酸 (tartaric acid) 為螯合劑取代培養液中 EDTA<sup>(13, 14, 20, 25)</sup>，並比較在無螯合劑、分別以 EDTA 及酒石酸為螯合劑的培養液中，對照組及銅濃度 0.2 mg/L 處理下青萍 (*L. aequinoctialis*) 的生長情形，如圖一，顯示在不添加螯合劑的培養液中對照組青萍出現黃化及生長不良的情形，而以 EDTA 為螯合劑的培養液中，對照組及銅處理組之青萍無生長差異，顯示銅被 EDTA



圖一、培養液中不使用螯合劑對照組之青萍生長不良，銅處理組青萍呈現銅為害徵狀 (A, D)；使用 EDTA 為螯合劑對照組生長正常，銅處理組青萍不受重金屬影響與對照組無差異 (C, F)；以酒石酸為螯合劑對照組青萍生長正常，銅處理組青萍呈現銅為害徵狀 (B, E)。

Fig. 1 Without the chelator, obvious inhibition can be observed in *Lemna aequinoctialis*'s growth in 0.2 mg/L Cu, but the control (CK) also expresses yellowing (A, D). Using EDTA as the chelator, the Cu-treated duckweed's growth as well as the control (C, F). Using tartaric acid as chelator, the control expresses normal growth but the Cu-treated duckweed expresses the toxic influence of Cu (B, E).

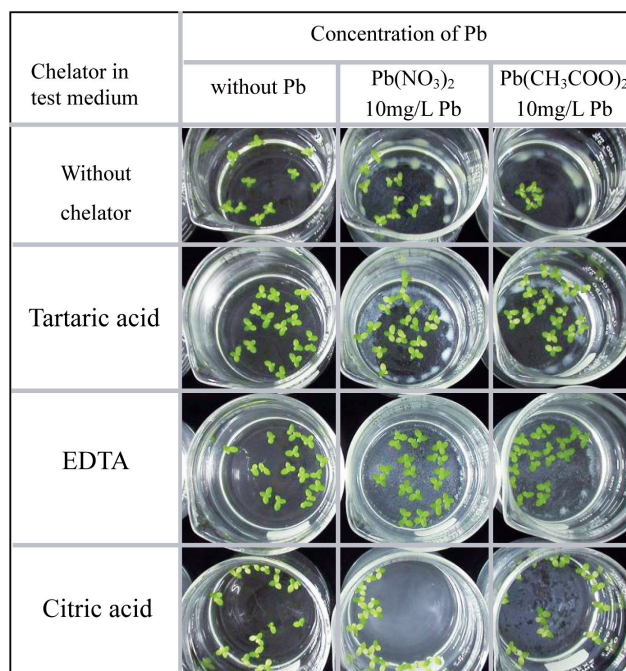
螯合而不會對青萍產生影響。在以酒石酸為螯合劑的培養液中，對照組浮萍生長良好，且不影響青萍對銅的反應，顯示酒石酸可取代 EDTA 成為培養液的螯合劑且不影響重金屬對浮萍的毒性反應；唯一例外的為鉛，圖二顯示不論是無螯合劑的培養液或使用不同螯合劑的培養液，加入醋酸鉛或硝酸鉛皆會產生白色的沈澱，ICP-AES 分析結果亦顯示以酒石酸為螯合劑之培養液配製的鉛濃度與儀器實測濃度差異大（配製 0.2 及 5 mg/L 的鉛溶液，實測值分別為 0.002 及 0.011 mg/L），即使以去離子水配製的硝酸鉛溶液在 pH5.5 的條件下，以 ICP-AES 檢測溶液中的鉛濃度仍有偏低情形（配製 0.2 及 5 mg/L 的鉛溶液，實測值分別為 0.02 及 3.33 mg/L），考慮鉛於培養液中出現沈澱的現象及在無營養液添加不利浮萍正常生長等因素，鉛的浮萍毒性試驗

以去離子水配製之硝酸鉛溶液調整 pH 為 5.5 後進行 4 天的試驗觀察，並以溶液中鉛的實際檢測濃度計算  $IC_{50}$  值。

## 二、重金屬之浮萍毒性試驗結果

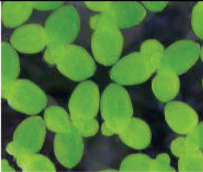
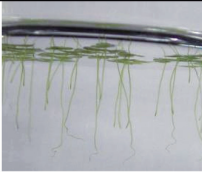



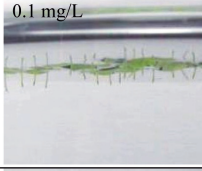

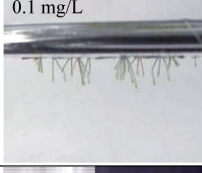

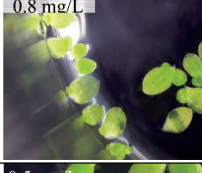
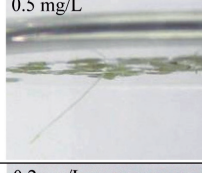
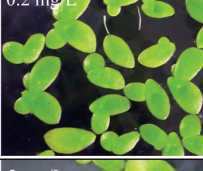

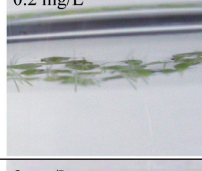

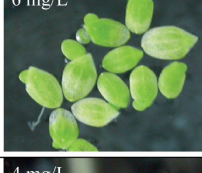
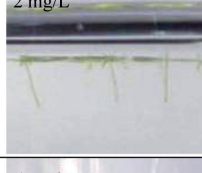
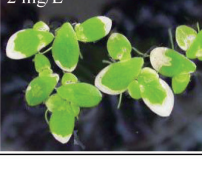

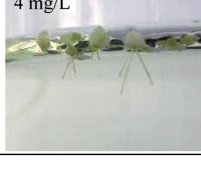
由對照組青萍 (*L. aequinoctialis*) 及紫萍 (*S. punctata*) 之倍增時間 (doubling time) 分別為  $2.5 \pm 0.04$  天、 $3.3 \pm 0.09$  天，葉狀體數目均可達在 4 天內增加 2 倍以上之要求，且葉狀體無白化異常的情形出現，顯示試驗前後浮萍生長狀況正常穩定。表三為重金屬對青萍及紫萍的 4 天、7 天之  $IC_{50}$  值及線性迴歸分析結果，結果顯示不論 4 天或 7 天的劑量-反應曲線其  $R^2$  均大於 0.90 且  $p$  值  $< 0.05$ ，顯示重金屬濃度與浮萍毒性試驗反應間具有良好的線性關係。

圖三為青萍及紫萍在不同重金屬處理後的為害徵狀比較，徵狀類型包括一黃化



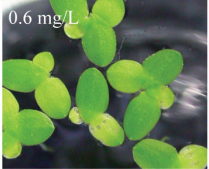
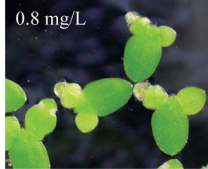
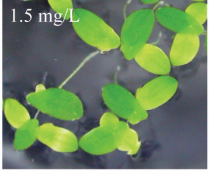
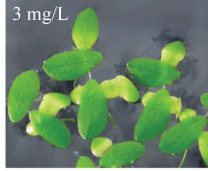
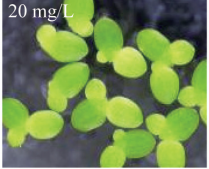
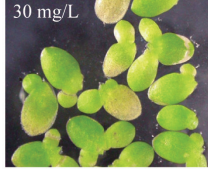
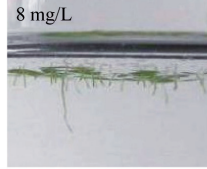

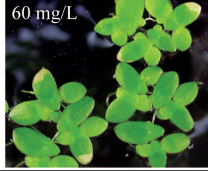
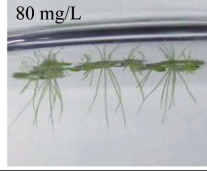

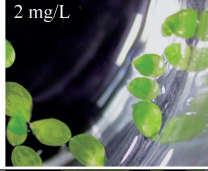


圖二、重金屬鉛在不含螯合劑或是在含不同螯合劑的培養液中皆出現沉澱的情形。

Fig. 2 Without or with different chelators, precipitates occurred in the Pb-toxicity testing mediums.

Metal	Species	Symptoms discription	Pictures of symptoms		
CK	LA				
	SP				
Cu	LA	Chlorosis Root destruction	 0.2 mg/L	 0.1 mg/L	
	SP	Chlorosis Root destruction	 0.2 mg/L	 0.1 mg/L	
Cd	LA	Chlorosis Necrosis Colony breakup Root destruction	 0.4 mg/L	 0.8 mg/L	 0.5 mg/L
	SP	Chlorosis Deformation Root destruction	 0.2 mg/L	 0.5 mg/L	 0.2 mg/L
Cr	LA	Chlorosis Necrosis Colony breakup Root destruction	 2 mg/L	 6 mg/L	 2 mg/L
	SP	Whitening Necrosis Root destruction	 2 mg/L	 4 mg/L	 4 mg/L

圖三、青萍 *Lemna aequinoctialis* 及紫萍 *Spirodela punctata* 受重金屬為害之典型徵狀。

Fig. 3 Typical heavy-metal toxicity symptoms for *Lemna. aequinoctialis* and *Spirodela punctata*.  
( LA : *Lemna aequinoctialis* ; SP : *Spirodela punctata* )

Metal	Species	Symptoms discription	The pictures of symptoms		
Ni	LA	Chlorosis Necrosis Deformation			
	SP	Chlorosis Necrosis Deformation			
Zn	LA	Chlorosis Necrosis Root destruction			
	SP	Chlorosis Necrosis			
Pb	LA	Chlorosis Necrosis Colony breakup Loss of buoyancy			
	SP	Whitening Necrosis			

圖三、青萍 *Lemna aquinoctialis* 及紫萍 *Spirodela punctata* 受重金屬為害之典型徵狀。(續)  
Fig. 3 Typical heavy-metal toxicity symptoms for *Lemna aquinoctialis* and *Spirodela punctata*.  
(LA : *Lemna aquinoctialis* ; SP : *Spirodela punctata*) (continued)

(chlorosis)、白化(whitening)、組織壞死(necrosis)、變形(deformation)、葉狀體分離(colony breakup)及失去浮性(loss of buoyancy)等；銅處理下青萍及紫萍之 4 天  $IC_{50}$  值分別為 0.34 mg/L 及 0.16 mg/L，而 7 天  $IC_{50}$  值分別為 0.20 mg/L 及 0.11 mg/L (表三)，可看出紫萍對銅敏感度比青萍高；在

徵狀方面，銅對青萍及紫萍均會造成黃化，黃化現象由葉緣開始，成熟葉較嚴重，新葉可維持綠色但較正常新葉面積小。

鎘處理下青萍及紫萍之 4 天  $IC_{50}$  值分別為 0.63 mg/L 及 0.17 mg/L，7 天  $IC_{50}$  值分別為 0.23 mg/L 及 0.09 mg/L (表三)，顯示紫萍對鎘的反應較青萍敏感；在徵狀方面，

表三、青萍 *Lemna aequinoctialis* 及紫萍 *Spirodela punctata* 對重金屬之劑量-反應曲線及 IC<sub>50</sub> 值  
Table. 3 Dose-response curve and IC<sub>50</sub> of six metals for *Lemna aequinoctialis* and *Spirodela punctata*

Metal	species	duration (days)	IC <sub>50</sub> (95% FI) (mg/L)	Dose-response curve <sup>1)</sup>	R <sup>2</sup>
Cu	<i>L. aequinoctialis</i>	4	0.34 (0.29-0.40)	Y = Φ (1.401 X + 0.618)	0.91
	<i>S. punctata</i>	4	0.16 (0.15-0.18)	Y = Φ (1.648 X + 1.277)	0.94
	<i>L. aequinoctialis</i>	7	0.20 (0.18-0.22)	Y = Φ (1.542 X + 1.073)	0.95
	<i>S. punctata</i>	7	0.11 (0.10-0.12)	Y = Φ (1.508 X + 1.443)	0.95
Cd	<i>L. aequinoctialis</i>	4	0.63 (0.53-0.74)	Y = Φ (0.675 X + 0.118)	0.91
	<i>S. punctata</i>	4	0.17 (0.15-0.19)	Y = Φ (1.163 X + 0.918)	0.92
	<i>L. aequinoctialis</i>	7	0.23 (0.20-0.26)	Y = Φ (0.750 X + 0.492)	0.92
	<i>S. punctata</i>	7	0.09 (0.08-0.10)	Y = Φ (1.061 X + 1.133)	0.94
Cr	<i>L. aequinoctialis</i>	4	2.99 (2.75-3.25)	Y = Φ (1.984 X - 0.983)	0.90
	<i>S. punctata</i>	4	1.24 (1.13-1.36)	Y = Φ (3.652 X - 0.324)	0.91
	<i>L. aequinoctialis</i>	7	2.00 (1.88-2.13)	Y = Φ (2.116 X - 0.641)	0.93
	<i>S. punctata</i>	7	1.08 (1.03-1.14)	Y = Φ (4.046 X - 0.124)	0.97
Ni	<i>L. aequinoctialis</i>	4	1.24 (1.13-1.37)	Y = Φ (1.565 X - 0.142)	0.93
	<i>S. punctata</i>	4	3.00 (2.48-3.63)	Y = Φ (1.059 X - 0.550)	0.90
	<i>L. aequinoctialis</i>	7	0.98 (0.90-1.06)	Y = Φ (2.481 X + 0.042)	0.96
	<i>S. punctata</i>	7	1.82 (1.63-2.04)	Y = Φ (1.548 X - 0.421)	0.93
Zn	<i>L. aequinoctialis</i>	4	30.1 (27.7-32.7)	Y = Φ (1.536 X - 2.286)	0.92
	<i>S. punctata</i>	4	20.4 (17.1-24.3)	Y = Φ (0.801 X - 1.066)	0.92
	<i>L. aequinoctialis</i>	7	20.0 (18.5-21.5)	Y = Φ (1.929 X - 2.500)	0.92
	<i>S. punctata</i>	7	12.2 (11.0-13.5)	Y = Φ (1.025 X - 1.116)	0.96
Pb	<i>L. aequinoctialis</i>	4	0.30 (0.21-0.43)	Y = Φ (0.923 X + 0.448)	0.90
	<i>S. punctata</i>	4	0.14 (0.10-0.20)	Y = Φ (0.980 X + 0.833)	0.91

<sup>1)</sup> Dose response curve is determined by Probit model. X = logarithm of heavy metal concentration, Y = Probit ( inhibition % ).

鎘會使青萍葉狀體呈現白化，成熟葉較嚴重，黃化現象由葉緣開始持續破壞，最後呈現透明狀，部份葉狀體分離，無法正常漂浮在液面，易黏覆於燒杯杯壁；而紫萍的葉狀體呈現黃化，部份葉狀體分離且略微變形。

鉻處理下青萍及紫萍之 4 天 IC<sub>50</sub> 值分別為 2.99 mg/L、1.24 mg/L，7 天 IC<sub>50</sub> 值分

別為 2.00 mg/L、1.08 mg/L (表三)，紫萍對鉻的反應同樣較青萍敏感；在徵狀方面，鉻處理下青萍葉狀體出現黃化及葉狀體分離；而紫萍則出現如同表面組織被刮除般的白化損傷現象。

鎳處理下青萍及紫萍之 4 天 IC<sub>50</sub> 值分別為 1.24 mg/L、3.00 mg/L，7 天 IC<sub>50</sub> 值分別為 0.98 mg/L、1.82 mg/L (表三)，鎳是六

種重金屬中唯一對青萍毒性較紫萍高者；在徵狀方面，鎳主要為害浮科植物的新葉，新葉會呈現黃化及葉狀體兩側凹陷變形的徵狀，但對成熟葉狀體卻未出現為害的情形，當鎳處理濃度達 3 mg/L 時，新生葉狀體皆出現異常，而成熟葉之葉狀體仍維持綠色且無葉狀體分離的現象。

鋅處理下青萍及紫萍之 4 天  $IC_{50}$  值分別為 30.1 mg/L、20.4 mg/L，7 天  $IC_{50}$  值分別為 20.0 mg/L、12.2 mg/L (表三)；由徵狀觀察，鋅處理使青萍葉狀體黃化，部份出現損傷、壞死、變形等徵狀，但對紫萍則以葉狀體黃化為主要徵狀，當處理濃度高達 60 mg/L 時，葉狀體會出現邊緣白化及表面損傷等徵狀。

鉛處理下青萍及紫萍之 4 天  $IC_{50}$  值分別為 0.30 mg/L 及 0.14 mg/L (表三)。研究鉛對浮萍影響之相關文獻少，且數據差異極大，在 Mohan 與 Hosetti<sup>(18)</sup>彙整之數據顯示 *L. minor* 對鉛 8 天  $IC_{50}$  值高達 160 mg/L，在 Wang<sup>(26)</sup> 所得之 4 天  $IC_{50}$  值則為 8 mg/L，由於本研究試驗過程發現鉛極易與培養液之組成份產生沉澱而影響試驗結果，取培養液進行重金屬分析結果顯示鉛濃度遠低於配製濃度，故鉛之毒性試驗數據可能受培養液種類影響極大。在徵狀方面，鉛會使青萍出現葉狀體黃化及受損分離，部分葉狀體壞死呈水漬狀，無法正常漂浮於液面而黏覆於燒杯杯壁；鉛處理使紫萍葉狀體表面出現特殊的白色斑痕，新生葉狀體徵狀較明顯。

比較青萍與國外文獻中常用青萍 *L. minor*<sup>(10, 15, 16, 21, 26)</sup> 對銅、鎘、鉻、鎳、鋅之毒性反應 (表四)，由  $IC_{50}$  或  $EC_{50}$  值之高低顯示青萍對銅、鉻的反應較 *L. minor* 敏感，

對鎳、鋅的反應則以 *L. minor* 較敏感，對鎘的毒性反應則無一致性。

除葉狀體出現受害徵狀外，亦可發現銅、鎘、鉻會使青萍及紫萍的根部生長受抑制或斷裂；鋅在 8 mg/L 時即抑制青萍根部生長，但在 80 mg/L 的高濃度下卻不影響紫萍根部的生長；而鎳及鉛皆不會影響二種浮萍根部之生長。

## 討 論

相較於魚類、水蚤及藻類試驗等生物毒性測試法，浮萍生長試驗法具有操作簡單且不需額外儀器設備或複雜培養系統等優點，本試驗結果顯示，經由浮萍科植物葉狀體的數目變化及受害徵狀的類型，浮萍科植物可作為生物指標以評估水體中重金屬對維管束植物之影響，根據  $IC_{50}$  值大小判斷，重金屬對青萍 (*L. aequinoctialis*) 的植物毒性依序為 銅 > 鎘 > 鎳 > 鉻 > 鋅；重金屬對紫萍 (*S. punctata*) 的植物毒性則依序為 銅 ≈ 鎘 > 鉻 > 鎳 > 鋅，除重金屬鎳對青萍的毒性比紫萍高之外，其他重金屬對紫萍的毒性較青萍高，而重金屬銅對青萍及紫萍的  $IC_{50}$  值遠低於放流水標準 (3.0 mg/L)，重金屬鎳處理下青萍的  $IC_{50}$  值接近放流水標準 (1.0 mg/L) 且會呈現對新生葉狀體為害的特殊徵狀，有應用於放流水及工業廢水監測之潛力。

## 謝 辭

本研究承蒙本所殘毒管制組協助水樣之重金屬分析，謹此致謝。

表四、本土青萍 *Lemna aequinoctialis* 與國外常用青萍 *Lemna minor* 之重金屬毒性試驗結果比較Table. 4 Comparison of heavy metal toxicity data of *Lemna aequinoctialis* and *Lemna minor*

Heavy metal	Species	Test duration (day)	IC <sub>50</sub> or EC <sub>50</sub> (mg/L)	Ref. <sup>1)</sup>
Cu	<i>L. minor</i>	4	1.10	26
	<i>L. minor</i>	4	0.47	16
	<i>L. aequinoctialis</i>	4	0.34	*
	<i>L. minor</i>	7	1.50	15
	<i>L. minor</i>	7	0.62 (9.70 μM) <sup>2)</sup>	10
	<i>L. minor</i>	7	0.33	21
	<i>L. aequinoctialis</i>	7	0.20	*
Cd	<i>L. minor</i>	4	0.20	26
	<i>L. minor</i>	4	0.91	16
	<i>L. aequinoctialis</i>	4	0.63	*
	<i>L. minor</i>	7	0.21 (1.90 μM) <sup>2)</sup>	10
	<i>L. minor</i>	7	0.32	21
	<i>L. aequinoctialis</i>	7	0.23	*
	Cr	<i>L. minor</i>	4	35.00
<i>L. aequinoctialis</i>		4	2.99	*
<i>L. minor</i>		7	8.50	15
<i>L. minor</i>		7	2.30	21
<i>L. aequinoctialis</i>		7	2.00	*
Ni	<i>L. minor</i>	4	0.45	26
	<i>L. aequinoctialis</i>	4	1.24	*
	<i>L. minor</i>	7	3.30 (56.30 μM) <sup>2)</sup>	10
	<i>L. minor</i>	7	0.37	21
	<i>L. aequinoctialis</i>	7	0.98	*
Zn	<i>L. minor</i>	4	10.00	26
	<i>L. minor</i>	4	5.64	16
	<i>L. aequinoctialis</i>	4	30.1	*
	<i>L. minor</i>	7	3.00 (46.10 μM) <sup>2)</sup>	10
	<i>L. minor</i>	7	9.60	15
	<i>L. aequinoctialis</i>	7	20.0	*

<sup>1)</sup> The sign of \* means the result in this study.<sup>2)</sup> The unit in original literature is μM.

## 引用文獻

1. 徐慈鴻、李貽華、蔣慕琰。2002。工業區周邊水質調查及其對水生植物青萍之毒性評估。植物保護學會會刊 44：157-169。
2. 楊遠波、劉和義、林讚標。2001。台灣維管束植物簡誌第五卷。行政院農業委員會。台北。378頁。
3. Aida, M., Itoh, K., Ikeda, H., Harada, N., Ishii, Y., and Usui, K. 2004. Susceptibilities of some aquatic ferns to a paddy herbicide bensulfuron methyl. *Weed Biol. Manag.* 4: 127-135.
4. American Public Health Association (APHA), American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation. 2005. Standard methods for the examination of water and wastewater, 21st ed. American Public Health Association, Washington, DC, USA.
5. Armstrong, W. P. 2002. Wayne Armstrong's On-line Description of *Lemna aequinoctialis* (Lemnaceae). From <http://waynesword.palomar.edu/1wayindx.htm>
6. Blinova, I. 2004. Use of freshwater algae and duckweeds for phytotoxicity testing. *Environ. Toxicol.* 19:425-428.
7. Cheng, J., Bergmann, B. A., Classen, J. J., Stomp, A. M., and Howard, J. W. 2002. Nutrient recovery from swine lagoon water by *Spirodela punctata*. *Bioresource Technology* 81:81-85.
8. Cross, J. W. 2002. Duckweed geography and environmental adaptation. Available at <http://www.mobot.org/jwccross/duckweed/duckweed-charms.htm>.
9. Dalu, J. M., and Ndamba, J. 2003. Duckweed based wastewater stabilization ponds for wastewater treatment (a low cost technology for small urban areas in Zimbabwe). *Physics and Chemistry of the Earth* 28:1147-1160.
10. Drost, W., Matzke, M., and Backhaus, T. 2007. Heavy metal toxicity to *Lemna minor*: studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure. *Chemosphere.* 67: 36-43.
11. Fenske, C., Daeschlein, G., Gunther, B., Knauer, A., and Rudolph, P. 2006. Comparison of different biological methods for the assessment of ecotoxicological risks. *Int. J. Hyg. Environ.-Health.* 209: 275-284.
12. Hou, W. H., Chen, X., Song, G. L., Wang, Q. H., and Chang, C. C. 2007. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant Physiol. Biochem.* 45: 62-69.
13. Huebert, D. B., and Shay, J. M. 1992. The effect of EDTA on cadmium and zinc uptake and toxicity in *Lemna trisulca* L. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22: 313-318.
14. Huebert, D. B., and Shay, J. M. 1993. The effect of EDTA on the assessment of Cu toxicity in the submerged aquatic macrophyte *Lemna trisulca*. *Aquatic Toxicol.* 24: 183-194.

15. Ince, N. H., Dirilgen, N., Apikyan, I. Tezcanli, G., and Ustun, B. 1998. Assessment of toxic interactions of heavy metals in binary mixtures: A statistical approach. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36: 365-372
16. Khellaf, N., and Zerdaoui, M. 2009. Growth response of the duckweed *Lemna minor* to heavy metal. *Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng.* 6: 161-166.
17. Li, T. Y., and Xiong, Z. T. 2004. A novel response of wild-type duckweed (*Lemna paucicostata* Hegelm.) to heavy metals, *Environ. Toxicol.* 19: 95-102.
18. Mohan, B. S., and Hosetti, B. B. 1999. Aquatic plants for toxicity assessment. *Environ. Res.* 81: 259-274.
19. Mukherjee S., Bhattacharyya P., and Duttagupta A. K. 2004. Heavy metal levels and esterase variations between metal-exposed and unexposed duckweed *Lemna minor*: field and laboratory studies. *Env. Int.* 30: 811-814.
20. Nasu, Y., and Kugimoto, M. 1981. *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 10: 159-169.
21. Naumann, B., Eberius, M., and Appenroth, K.-J. 2007. Growth rate based dose-response relationships and EC-values of ten heavy metals using the duckweed growth inhibition test (ISO 20079) with *Lemna minor* L. clone St. *J Plant Physiol.* 164: 1656-1664.
22. Organization for Economic Cooperation Development (OECD). 2002. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Revised Proposal for a New Guideline for 221. Draft guideline 221, July 2002. OECD, Paris.
23. Saadi, A., Guerbet, M., and Garnier, J. 2002. Influence of diethyldithiocarbamate on cadmium and copper toxicity to freshwater macrophyte *Spirodela polyrhiza*. *Water SA.* 28: 107-110.
24. Sallenave, R., and Fomin, A. 1997. Some advantages of the duckweed test to assess the toxicity of environmental samples. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 25: 135-140.
25. Srivastava, A., and Appenroth, K.-J. 1995. Interaction of EDTA and iron on the accumulation of Cd<sup>2+</sup> in duckweeds (Lemnaceae). *Journal of plant physiology.* 146: 173-176.
26. Wang, W. 1986. Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. *Environ. Pollut.* 11: 1-14.
27. Wang, W. 1990. Literature review on duckweed toxicity testing. *Environ. Res.* 52: 7-22.
28. Verdisson, S., M. Couderchety, M., and Vernet, G. 2001. Effects of procymidone, fludioxonil and pyrimethanil on two non-target aquatic plants, *Chemosphere* 44 (3): 467-474.

## ABSTRACT

**Wu, C. I., Juang, Y. Y., Lee, Y. H., and Shyu, T. H.\* 2009. Toxicity tests of six heavy metals using two common duckweeds in Taiwan.** Plant Prot. Bull. 51(3, 4): 69-82. (Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute, Council of Agriculture, Wufeng, Taichung, Taiwan 413, ROC)

Duckweeds (family Lemnaceae) are widely distributed, floating vascular plants. Their small size, structural simplicity, rapid reproductive rate, and ease of culture have allowed them to be used as test species when monitoring aquatic and wetland pollution. In this study, *Lemna aequinoctialis* Welwitsch and *Spirodela punctata* (G. F. W. Meyer) Thompson, two common duckweed species in Taiwan, were used in a phytotoxic assessment of six heavy metals: cadmium (Cd), chromium (Cr), nickel (Ni), copper (Cu), zinc (Zn), and lead (Pb). To evaluate the duckweeds' response to heavy metals, static renewal toxicity tests were performed, and frond number was used to calculate IC<sub>50</sub> (50% inhibitory concentration) values after 4 d and 7 d of exposure. The IC<sub>50</sub> values for *L. aequinoctialis* at days 4 and 7 were, respectively, 0.34 and 0.20 mg/L for Cu, 0.63 and 0.23 mg/L for Cd, 2.99 and 2.00 mg/L for Cr, 1.24 and 0.98 mg/L for Ni, and 30.1 and 20.0 mg/L for Zn. The IC<sub>50</sub> values for *S. punctata* at days 4 and 7 were, respectively, 0.16 and 0.11 mg/L for Cu, 0.17 and 0.09 mg/L for Cd, 1.24 and 1.08 mg/L for Cr, 3.00 and 1.82 mg/L for Ni, and 20.4 and 12.2 mg/L for Zn. Because Pb in the culture medium will precipitate, Pb was prepared in deionized water. The 4 d Pb IC<sub>50</sub> values for *L. aequinoctialis* and *S. punctata* in deionized water were 0.30 and 0.14 mg/L, respectively. The symptoms of toxic injury included chlorosis, whitening, necrosis, deformation, colony breakup, and loss of buoyancy. In addition, some metals resulted in growth inhibition or destruction of duckweed roots. Based on the IC<sub>50</sub> values, the toxicity to *L. aequinoctialis* was Cu > Cd > Ni > Cr > Zn and the toxicity to *S. punctata* was Cu ≈ Cd > Cr > Ni > Zn. The results suggest that *L. aequinoctialis* and *S. punctata* are suitable as bio-indicators when monitoring effluent and industrial wastewater and are useful for studying the phytotoxic effects of heavy metals.

(Key words: heavy metal, duckweed, *Lemna aequinoctialis*, *Spirodela punctata*, phytotoxic test)

\*Corresponding author. E-mail: ths@tactri.gov.tw