

國立台灣大學生物環境系統工程學研究所

碩士論文

Thesis for Master of Science

Graduate Institute of Bioenvironmental Systems Engineering

National Taiwan University

指導教授：廖中明 博士

Adviser: Dr. Chung-Min Liao



淡水蜆暴露於砷之殼律動毒性反應及生物動力
**Biokinetics and toxicological response of valve daily
rhythms in the freshwater clam *Corbicula fluminea*
following exposure to arsenic**

研究生：趙聖峰

Advisee: Sheng-Feng Jau

中華民國九十七年六月

June 2008

中文摘要

本論文主要研究目的在於評估淡水蜆(*Corbicula fluminea*)暴露於砷之蜆殼律動毒性反應及生物動力。本研究完成實驗室 14 天之暴露試驗，並以一階單區塊模式擬合暴露試驗資料推估生物濃縮因子(bioconcentration factor, BCF)及排除速率常數(depuration rate constant, k_2)等生物動力參數。本研究以關鍵體內濃度(critical body residue, CBR)模式、關鍵濃度曲線面積(critical area under the curve, CAUC)模式及損害評估模式(damage assessment model, DAM)等三種急性毒模式模擬 7 天急性砷毒生物試驗所求得之外部半致死濃度(external median lethal concentration, LC50)與時間關係的資料。本研究亦發展一套以感應線圈為基礎之蜆殼開闔監測技術特性化淡水蜆暴露於砷之每日蜆殼律動，並以三參數Hill模式推估半數蜆殼反應之效應濃度(median effect concentration, EC50)與時間之關係。結果顯示淡水蜆暴露於砷之BCF, k_2 及 96 小時LC50 值分別為 4.38 mL g⁻¹、0.39 d⁻¹及 20.74 mg L⁻¹。本研究採四參數正弦函數擬合無砷汙染下蜆殼每日開殼律動情形，同時結合Hill反應函數建構出淡水蜆暴露於砷之蜆殼每日律動方程式。結果指出一天中蜆殼開殼機率之最佳描述式可表示為 $\psi = 58.75 + 12.89 \times \sin[2\pi(t + 0.034)/21.32]$ 。經由推估所得砷暴露下時變之EC50 值於整合時間 10、15、30、60、120 及 300 分鐘下分別為 4.65、3.48、1.38、0.60、0.38 及 0.35 mg L⁻¹。模擬結果顯示在蜆殼開殼時間為 3:00 – 8:00 時，在不同砷暴露濃度 0.3 ~ 1.0 mg L⁻¹下預測之淡水蜆每日蜆殼開殼變化與實驗結果非常穩合，其均方根誤差為 4 – 10 %。此外，本研究結合DAM模式及Hill模式建構以內部效應濃度為基礎之時變致死率模式，進而推估出淡水蜆體內砷含量與致死率之關

係。本研究指出淡水蜆暴露於砷將導致行為改變及死亡情形，於日後可提供淡水蜆養殖場一水域含砷之品質標準。

關鍵字：淡水蜆；砷；生物累積；急性毒；劑量反應；貝殼行為活動；生物監測



Abstract

The purpose of this thesis is to assess the biokinetics and toxicological response of valve daily rhythms in the freshwater clam *Corbicula fluminea* following exposure to waterborne arsenic. We carried out a laboratory 14-day exposure experiment to obtain biokinetic parameters of bioconcentration factor (BCF) and depuration rate constant (k_2). A one-compartment first-order model was used to fit the exposure data to estimate BCF and k_2 values. The three acute toxicity models, critical body residue (CBR) model, critical area under the curve (CAUC) model and damage assessment model (DAM) were verified with time-dependent external median lethal concentration (LC50) data obtained from a 7-day acute arsenic toxicity bioassay. We develop an inductance-based valvometry technique to characterize the valve daily rhythms in *C. fluminea* in response to arsenic, and use a three-parameter Hill model to estimate intergration time-specific median effect concentration (EC50) values. The resulting values of BCF, k_2 and 96-h LC50 of *C. fluminea* exposure to arsenic were 4.38 mL g^{-1} , 0.39 d^{-1} and 20.74 mg L^{-1} , respectively. We fitted valve opening daily rhythm in the absence of arsenic as the form of $\psi = 58.75 + 12.89 \times \sin[2\pi(t + 0.034)/21.32]$ by 4-parameter sine function, linking Hill response function to predict valve daily rhythm dynamics in response to arsenic. The time-varying EC50s are estimated to be 4.65, 3.48, 1.38, 0.60, 0.38 and 0.35 mg L^{-1} , respectively, at integration times of 10, 15, 30, 60, 120 and 300 min. The simulation results show that in the valve opening hours from 03:00 – 08:00 h the predicted daily rhythm changes in valve opening in response to different arsenic exposure concentrations ranging from 0.3 to 10 mg L^{-1} are notably agreed well with the observations justified by the root mean squared errors (RMSE) ranging from 4 – 10%. Moreover, we also kinetically linked a DAM model and a Hill

sigmoid model to reconstruct an internal effect concentration based time-mortality model assessing the effect of soft tissue arsenic burden on the *C. fluminea* mortality. Our study indicates that *C. fluminea* exposed to arsenic will cause behavioral changes and mortality, suggesting that our results can provide the knowledge to establish the arsenic water quality criteria to clam farm.

Keywords: Freshwater clam; *Corbicula fluminea*; Arsenic; Bioaccumulation; Acute toxicity; Dose-response; Valve movement; Biomonitor



目錄

中文摘要	I
英文摘要	III
目錄	V
表目錄	VII
圖目錄	VIII
符號說明	X
第一章 前言	1
第二章 研究背景與目的	2
2.1 研究背景	2
2.2 研究目的	3
第三章 文獻回顧	4
3.1 淡水蜆生態毒理	4
3.1.1 淡水蜆(<i>Corbicula fluminea</i>)	4
3.1.2 淡水蜆對重金屬之生物累積	7
3.1.3 重金屬對蜆殼律動行為之改變	10
3.1.4 砷對淡水蜆之影響	14
3.2 生態毒理模式	16
3.2.1 生物累積模式	16
3.2.2 急性毒模式	18
3.2.3 劑量反應模式	23
3.2.4 急毒生物實驗	24
第四章 材料與方法	26
4.1 淡水蜆之採樣及馴養	28
4.2 暴露實驗	29

4.3	急毒生物試驗	30
4.4	蜆殼每日律動試驗	31
4.4.1	實驗裝置與原理	31
4.4.2	蜆殼行為生物試驗	36
4.5	化學分析與資料處理	37
4.5.1	總砷含量與離子分析	37
4.5.2	淡水蜆體內砷含量分析	38
4.5.3	淡水蜆殼律動資料處理	39
4.6	數學模式之建構與發展	41
4.6.1	生物累積模式之應用	41
4.6.2	內部效應濃度為基礎之時變致死率模式	43
4.6.3	蜆殼律動模式	45
第五章	結果與討論	48
5.1	淡水蜆對砷之生物濃縮	48
5.2	急毒效應	54
5.3	急性毒模式應用	60
5.4	內部半致死與時變致死率	64
5.5	淡水蜆每日律動特性	69
5.6	蜆殼行為效應	77
5.7	水域環境之重金屬監測	89
5.8	溫度對蜆殼行為及重金屬累積之影響	93
第六章	結論	97
第七章	未來研究建議	99
	參考文獻	101

表目錄

表 3.1	重金屬對淡水蜆之累積能力。	9
表 5.1	淡水蜆暴露實驗組織含砷量。	49
表 5.2	淡水蜆暴露實驗之生物動力參數。	52
表 5.3	急性毒試驗各時段淡水蜆死亡情形。	55
表 5.4	急性毒試驗各時間淡水蜆對砷的半數致死濃度。	56
表 5.5	水域生物對砷(As^{3+})之 96 小時半數致死濃度。	57
表 5.6	以三種急性毒理動態模式(CBR, CAUC 及 DAM)最佳化擬合淡水 蜆暴露實驗與急毒生物試驗輸入及輸出之參數值。	61
表 5.7	以三參數 Hill 模式擬合淡水蜆暴露於不同砷濃度之劑量反應參數 值。	82
表 5.8	以三參數 Hill 模式擬合淡水蜆於不同暴露時間之劑量反應參數值。	86
表 5.9	淡水蜆暴露於重金屬下不同反應整合時間之半數閉殼效應濃度。	90
表 5.10	砷汙染疫區之養殖池水及生物體內砷含量。	91
表 5.11	淡水蜆於不同水溫下對重金屬之生物累積、蜆殼律動及金屬硫蛋 白濃度。	95

圖目錄

- 圖 3.1 淡水蜆分佈及產量。(A)2000 - 2006 及(B)2006 年貝類產量統計。 5
- 圖 3.2 淡水蜆監測原理與蜆殼律動特性。(A)電磁線圈監測技術，(B)淡水 12
蜆個體開殼程度及(C)淡水蜆每日平均開殼大小(Ortmann 與
Grieshaber, 2003)。
- 圖 3.3 淡水蜆殼律動量測裝置與量測結果。(A)自動化蜆殼量測裝置、(B) 13
蜆殼平均開殼機率，及(C)蜆殼平均閉殼機率(Tran 等, 2003)。
- 圖 3.4 急性毒模式(CRB、CAUC 與 DAM)之數學模式推導與結構。 22
- 圖 3.5 半數致死濃度(LC50)之計算流程圖(USEPA, 1991)。 25
- 圖 4.1 淡水蜆暴露於含砷水域下之研究架構。結合實驗、資料分析與模 27
式發展進而評估淡水蜆暴露於含砷水域之生化反應。
- 圖 4.2 淡水蜆行為監測之原理。(A)感測器原理，(B)二次側感應電壓與距 32
離之關係圖，及(C)電感元件固定於淡水蜆殼上。
- 圖 4.3 淡水蜆監測系統示意圖。 34
- 圖 4.4 淡水蜆行為監測系統實體示意圖。(A)淡水蜆監測系統，(B)控制儀 35
表，(C)資料與訊號擷取裝置，(D)監測系統下之淡水蜆(潛沙前)，
(E)主電路與控制迴路，(F)監測系統下之淡水蜆(潛沙後)，及(G)藻
水止回控制閥。
- 圖 4.5 淡水蜆殼律動資料處理。(A)蜆殼行為監測結果示意圖，(B)蜆殼行 40
為正規化，(C)一群蜆中每日平均閉殼程度，及(D)數學模式擬合。
- 圖 4.6 以一階單區塊生物累積模式描述淡水蜆對砷之吸收與排除。 42

圖 4.7	以內部效應濃度為基礎之時變致死率模式。	44
圖 4.8	蜆殼律動之數學模式推導與結構圖。	47
圖 5.1	淡水蜆暴露實驗體內砷濃度與時間關係圖。(A)吸收階段及(B)排除階段。	50
圖 5.2	淡水蜆急毒生物試驗。(A) 96 小時下之砷濃度與死亡率及(B)不同時間與 LC50 值之關係。	59
圖 5.3	以三種急性毒理動態模式最佳化擬合淡水蜆暴露於砷。(A)外部半致死濃度，(B)以均方根誤差法比較三模式預測與實驗結果差異及(C)內部半致死濃度。	62
圖 5.4	以損害評估模式(DAM)最佳化擬合淡水蜆暴露於砷。(A)外部半致死濃度及(B)內部半致死濃度。	65
圖 5.5	淡水蜆暴露於砷之死亡率。(A)不同水體砷濃度之時變死亡率、(B)體內砷濃度與致死率之關係及(C)內部效應濃度為基礎之時變致死率模式預測結果。	66
圖 5.6	以淡水蜆監測裝置連續量測 14 日(April 3 – 17, 2007)之蜆殼律動電位狀態圖。	70
圖 5.7	連續監測 14 日(April 3 – 17, 2007)之淡水蜆殼開殼/閉殼狀態圖。	71
圖 5.8	16 隻淡水蜆殼每日律動。(A)蜆殼每日開殼機率(%)及(B)以非線性四參數正弦函數擬合蜆殼每日開殼機率(%)。	72
圖 5.9	以蒙地卡羅模擬法評估淡水蜆每日開殼時間之機率及頻率關係圖。	74
圖 5.10	以非線性四參數正弦函數擬合蜆殼每日開殼程度。(A)淡水蜆殼開	76

殼程度，及(B)比較不同雙殼貝類開殼程度。

圖 5.11 淡水蜆暴露於砷濃度(A) 0.3，(B) 0.5，(C) 1.0，(D) 5.0，及(E) 10 mg L⁻¹下之蜆殼律動監測圖。 78

圖 5.12 以三參數Hill模式擬合砷濃度(A) 0.3，(B) 0.5，(C) 1.0，(D) 5.0，及(E) 10 mg L⁻¹下暴露時間與淡水蜆閉殼反應之關係。 81

圖 5.13 (A)不同暴露時間與砷濃度下淡水蜆閉殼比例之反應表面，及(B) 84
砷濃度、暴露時間與蜆殼閉殼反應之轉換關係圖。

圖 5.14 以三參數Hill模式擬合暴露時間(A) 10，(B) 15，(C) 30，(D) 60，(E) 85
120，及(F) 300 mg L⁻¹下暴露時間與淡水蜆閉殼反應之關係。

圖 5.15 淡水蜆暴露於砷濃度(A) 0，(B) 0.3，(C) 0.5，(D) 1.0，(E) 5.0，(F) 87
10.0 mg L⁻¹下蜆殼律動監測結果。

圖 5.16 淡水蜆暴露於砷之每日開殼機率預測。(A)不同砷濃度下蜆殼律動 88
模式預測及(B)以均方根誤差法比較模式預測與實驗監測結果之差
異。

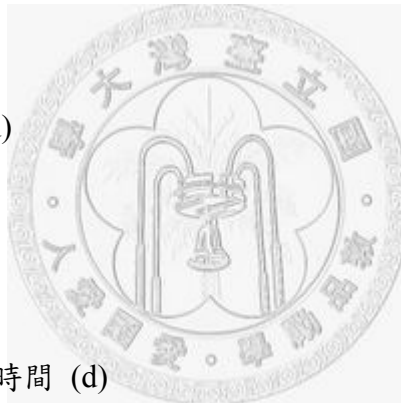
圖 5.17 淡水蜆暴露於砷之時變不同效應濃度(EC5、EC10 及 EC50)。 92

圖 5.18 (A) 2005 - 2007 年花蓮地區月均溫(中央氣象局, 2008)及(B)受季節 96
變化影響之溫度、淡水蜆殼開殼比例與生物濃縮因子變化示意。

符號說明

A	淡水蜆開殼比例之振幅 (-)
AUC	濃度曲線面積 ($\mu\text{g d g}^{-1}$)
B	淡水蜆每日平均開殼比例 (-)
BCF	生物濃縮因子 (mL g^{-1})
C_f	生物體內重金屬濃度 (mg g^{-1})
CL50	內部半致死濃度 ($\mu\text{g g}^{-1}$)
CL50(∞)	時間無限長時的內部半致死濃度 ($\mu\text{g g}^{-1}$)
C_w	外部暴露濃度 (mg L^{-1})
D	損害累積程度 (-)
DL50/ k_a	毒性物質的毒性損害程度達到半致死之係數 ($\mu\text{g d g}^{-1}$)
EC5	造成 5%最大閉殼反應時水體砷濃度 (mg L^{-1})
EC10	造成 10%最大閉殼反應時水體砷濃度 (mg L^{-1})
EC50	造成 50%最大閉殼反應時水體砷濃度 (mg L^{-1})
E_{\max}	最大效應 (%)
ET50	造成 50%最大閉殼反應之反應時間 (min)
k_0	砷緊迫下淡水蜆攝取水體砷之稀釋速率常數 (d^{-1})
k_1	吸收速率常數 ($\text{mL g}^{-1} \text{d}^{-1}$)
k_2	排除速率常數 (d^{-1})
k_a	損害累積率 ($\text{g } \mu\text{g}^{-1} \text{d}^{-1}$)
k_r	損害恢復速率常數 (d^{-1})

LC50	外部半致死濃度 (mg L^{-1})
LC50(∞)	時間無限長時的外部半致死濃度 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
M	淡水蜆暴露於砷之死亡率 (%)
M_{\max}	淡水蜆暴露於砷之最大死亡率 (%)
n	造成閉殼反應之斜率因子(Hill 係數) (-)
N	淡水蜆總數 (-)
P	淡水蜆開殼之機率 (%)
R	淡水蜆於砷緊迫下之閉殼反應 (%)
R_{\max}	最大閉殼反應 (%)
t	時間 (hr)
$t_{1/2}$	排除半衰期 (d)
t_R	反應時間 (h)
t_i	開殼時間 (h)
T	排除實驗起始時間 (d)
τ	淡水蜆每日開殼之週期 (h)
φ	淡水蜆每日開殼時間之相位差 (h)
ψ	一群蜆當中所造成之開殼比例 (-)



第一章、前言

環境汙染物處處可見，尤其以重金屬汙染最為普遍之一，追溯近年來的重金屬汙染事件：1983 年桃園觀音鎘米事件；1986 年高雄茄萣海域綠牡蠣；1994 年台南北門虱目魚含砷量過高；2001 年新竹香山牡蠣含銅量世界第一(江，2006)。由此可見，隨著自然過程、工業發展與人為排放，重金屬已然成為生活中嚴重的汙染物。環境中的重金屬會透過飲食、呼吸或接觸進入生物體，並經由血液傳輸至各器官中與蛋白質及酵素等鍵結，導致酵素反應活性減弱或消失，進而抑制標的器官功能。也因為重金屬無法被生物降解或代謝，因此容易累積在各臟器與肌肉中，嚴重者將導致生物體死亡。

台灣為四面環海的海島型國家，漁業資源相當多元且豐富，包含遠洋、沿海及淡水養殖漁業，除了結合經濟與休閒，亦提供重要的動物性蛋白質來源。倘若水域環境遭受重金屬汙染時，將累積於水生生物體內，影響其自身的存活與健康，形成重大的經濟損失，甚至經由食物鏈等轉移到更高等生物體內。例如產量豐富的虱目魚、牡蠣與淡水蜆就曾被檢測出砷、銅、汞及鎘等重金屬汙染，但因這些水域生物的營養價值相當高，近年來市面上常可見膠原蛋白、蠔精或蜆精等商品化的營養食品，如果這些魚貝類於重金屬汙染之環境下成長，當人類食用魚貝類或其相關製品時，便會連同重金屬一起攝取，造成不利人體健康之效應。

雖然水域環境具自淨的作用，生物體也有排毒的能力，但仍有一定的負荷程度，為避免重蹈覆轍重金屬汙染事件，瞭解重金屬對水域生物之影響顯得相當重要。因此本研究擬發展一套數學機制，研析重金屬對水域生物之毒性與反應，評估重金屬之累積情形，以提供養殖業者及風險管理參考之準則。

第二章、研究動機與目的

2.1 研究動機

淡水蜆為台灣最重要的淡水貽貝類之一，其產量豐富、肉質鮮美且富含營養，具有極高的經濟價值(Davenport 等，1990；林，2003；漁業署，2006；陳，2006)。因淡水蜆馴養容易且對重金屬有相當高的累積能力與靈敏度，常被用於實驗室中當作監測重金屬的生物指標(Butler 等，1971；Phillips，1977；van Hassel 及 Farris，2007)。許多研究亦指出淡水蜆的開閉殼行為可用來反應出環境中污染物的污染情形(Wildridge 等，1998；Kadar 等，2001；Newton 與 Cope，2007)。

研究指出，台灣的地下水含有相當豐富的神，其中以嘉南平原、蘭陽平原、濁水溪沖積扇與屏東平原之神污染最為嚴重(蔡，2006)。西元 1950 年，台灣西南沿海地區爆發嚴重的烏腳病疫情，經研究證實為飲用當地含有高濃度神的地下水所引起，雖 1960 年代鋪設自來水管線後當地居民已無飲用地下水，但卻大量抽取地下水從事養殖業，這些含神的地下水仍會經由生物累積作用進入魚貝類體中(Chen 及 Wu，1962；Chen 等，1995；Lin 等，2001)。由於魚貝類為人們經常使用的食物來源，如不知情下便可能攝取過量的神而不自覺，造成不利人體健康的效應(Smith 等，2002；Chiou 等，2005)。因此瞭解魚貝類體內神累積情形，做為日後的參考依據是很重要的。

一般在分析水體或魚貝類體內神累積之情形，大多需要透過毒性實驗，往往花費龐大的經費與時間，如果考慮不周或人為的誤差便會造成實驗的不準確，因此，倘若能建立一套魚貝類暴露於神之毒性機制，以數學模式充分的描述魚貝類體內神累積過程及不同神濃度造成的生理反應，瞭解魚貝類在急性毒作用下的體

內反應濃度，即可清楚的得知砷對生物體產生的影響，以提供後續毒性實驗研究中一個評估的依據。

2.2 研究目的

針對上述，本研究之目的主要為以下的四點：

- (1) 藉由一階單區塊生物累積模式評估淡水蜆對砷之吸收與排除動力。
- (2) 以急性毒模式推估淡水蜆對砷之外部及內部半數致死濃度與時間關係。
- (3) 採用三參數 Hill 模式描述淡水蜆內砷濃度與蜆殼行為反應之關係。
- (4) 以四參數正弦函數結合劑量反應模式量化淡水蜆暴露於砷之每日蜆殼律動。



第三章、文獻回顧

3.1 淡水蜆生態毒理

3.1.1 淡水蜆(*Corbicula fluminea*)

淡水蜆屬於軟體動物門(Mollusca)，雙殼綱(Bivalvia)，簾蛤目(Veneroida)，蜆科(Corbiculidae)的蜆屬(*Corbicula*)，由Muller於1774年所命名。淡水蜆廣泛分佈於全世界，但主要集中於亞洲，所以淡水蜆是亞洲相當重要的經濟種類。

淡水蜆在臺灣地區之產量僅次於文蛤(*Meretrix lusoria*)與牡蠣(*Crassostrea gigas*)，佔全國第三，於淡水物種之貽貝類中高居第一位，最高產量為2003年的13,589公噸(圖 3.1A)，從2000至2006年約佔全台貝類總產量之17%(圖 3.1B)，具有很高的經濟價值，為臺灣最重要的淡水養殖貝類(漁業署，2006)。淡水蜆養殖地區在1959年從彰化開始，續之有台中、桃園、日月潭、台南、鹿港、斗南及麥寮等地，目前較具規模的重要產地有桃園的新屋、雲林的麥寮及花蓮的壽豐等地，而花蓮地區雖興起的較晚，則為專業養殖(何，1995)。

淡水蜆形狀略近三角形，前後端均為圓形，腹側亦呈圓弧線條，顏色主要為黑褐色或黃綠色，殼內面為紫色或瓷白色，殼長約4公分。蜆為底棲性動物，具有潛沙的習性，藉由足部和肌肉的運動將殼潛藏棲息於泥沙底的淡水中，以躲避外界的敵害，透過水管(sphon)與外界接觸以濾食綠藻，其一生約可過濾一萬公升的水量，具有淨化水質等功效(張與詹，1986；賴，1998)。

因淡水蜆產量豐富且肉質鮮美，常用來製作成一道道的美食佳餚。近年來淡水蜆在市面上亦被提煉成天然高純度的蜆精、蜆錠，經過聯合國糧食組織(FAO)評定為完美蛋白價及胺基酸群、肝醣、B群、鋅、精胺酸、鳥胺酸、牛磺酸、膽

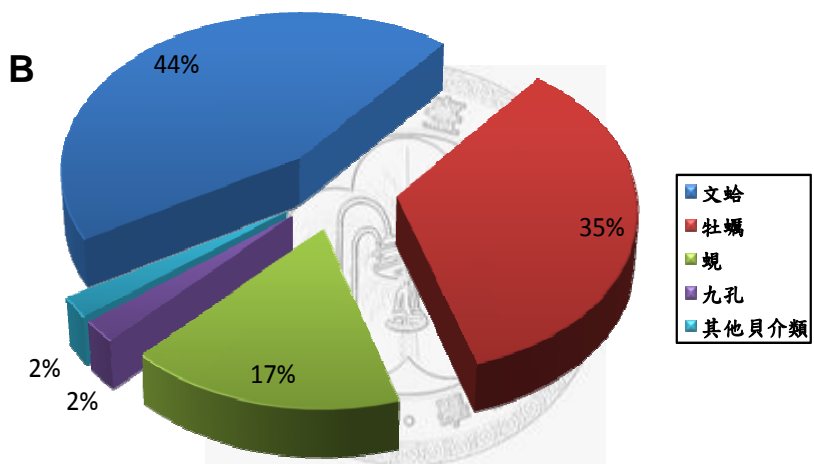
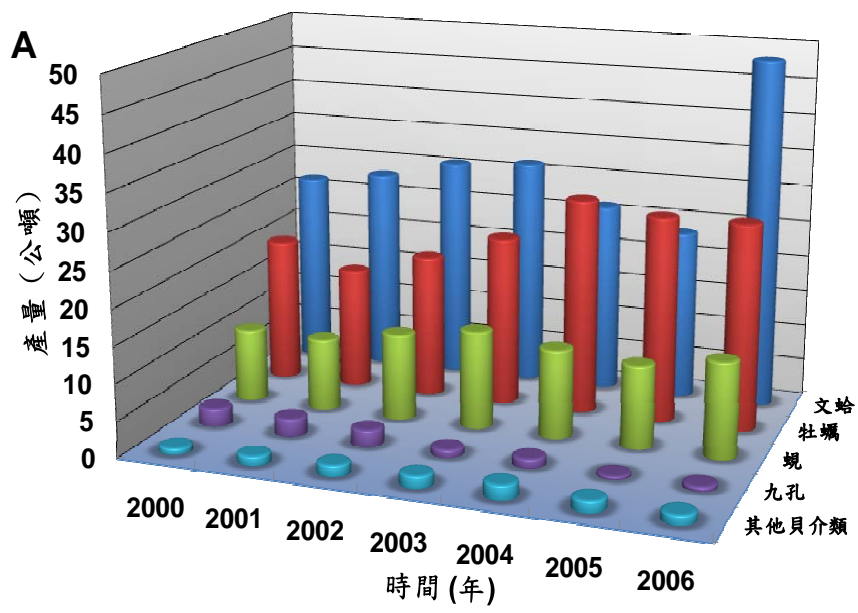


圖 3.1 淡水蜆分佈及產量。(A)2000 - 2006 及(B)2006 年貝類產量統計。

鹼、鈣、磷等礦物質，具有多種調整體質及增強體力的功效(林，2003；陳，2006)，其中的鳥胺酸也可以有效的改善生長賀爾蒙的分泌，並提供肌肉生長所需的物質(Davenport 等，1990)，更是大大提高了淡水蜆的經濟價值，可當作一種營養豐富的食品。

由此可得知蜆在台灣養殖漁業上具有重要的經濟價值與地位，倘若蜆的生長環境條件遭受到汙染，將勢必影響到其產量，也會形成市場之經濟損失，進一步的當人類攝食後更會造成健康之風險，因此如何有效的監測淡水蜆養殖場之水質汙染程度，並加以維護淡水蜆之健康已經為近年來研究的重要議題之一。

針對淡水蜆成長及所需之生態因子(溫度、鹽度、酸鹼值、餌料等)，蕭(1987)指出淡水蜆培育之最佳環境如下：(1)最適溫度：稚貝成長溫度 22 - 28°C；成貝攝食溫度 20 - 27°C；潛沙溫度 15 - 25°C，(2)最適 pH：成長 pH 值 7.5 - 8.5；潛沙 pH 值 7.0 - 8.5；成貝攝食 pH 值 7.5 - 8.5，(3)最適鹽度；稚貝成長 2%；潛沙鹽度 0 - 6%；成貝攝食 0 - 2%，(4)最適餌料：*Platymonas sp*，及(5)最適溶氧量；成貝最小安全溶氧量 3 - 4 ppm。

3.1.2 淡水蜆對重金屬之生物累積

環境中的污染物會經由生物累積(Bioaccumulation)作用進入生物體內，針對不同化學物質特性會有不同累積方式(Thorsen 等，2007)，例如重金屬容易累積在肌肉及器官中(Markich 等，2001；Marigomez 等，2002)，而有機污染物則易累積在生物體內的脂質中(Farrington 等，1983；Di Toro 等，1991)，以水域生物而言，生物累積是指生物藉由與水體接觸或攝食之途徑吸收化學物質至體內，並對此化學物質產生累積之現象，其中又以重金屬污染最為普遍(ATSDR，2003)。

重金屬污染主要影響層面包含了水體與土壤，常見的有砷(As)、鎘(Cd)、鉻(Cr)、銅(Cu)、汞(Hg)、鎳(Ni)、鉛(Pb)及鋅(Zn)等污染物，這些重金屬污染對水域生物具有生物累積作用，除了可能會造成養殖業者的損失之外，也會因人類攝食這些含有重金屬污染的魚貝類而增加病變或致癌的風險，因此如何加以瞭解與評估重金屬在生物體內之生物累積是很重要的(陸，2005；環保署，2008)(<http://www.epa.gov.tw>)。

Leblean(1995)指出，水域動物之生物累積過程可以由生物濃縮(Bioconcentration)來加以描述，生物濃縮是決定生物累積能力的主要來源，可以生物濃縮因子(Bioconcentration factor, BCF)加以量化，BCF 定義為穩定狀態下吸收與排除間速率的比值，或是魚體體內重金屬濃度及水域中重金屬濃度之比值，可用來反應重金屬在生物體內的累積情形(Marr 等，1999；Geyer 等，2001)。

Thorsen 等(2007)提出，淡水蜆具有高重金屬累積能力，這些重金屬會經由淡水蜆的鰓(Gill)進入體內，再分佈於消化道(digestive tract)、套膜(mantle)、腎臟(kidney)、足部(foot)以及胰肝腺(hepatopancreas)等各器官內，在暴露初期淡水蜆

之鰓具有快速累積重金屬的能力，同時重金屬也會累積在內臟及其它各器官中 (Inza 等，1998；Plette 等，1999)。

不同重金屬對於淡水蜆具有不同的累積能力，其中又以銅、硒及銀等最容易累積於淡水蜆內(表 3.1)，也因蜆具有累積重金屬或汙染物之特性，是一個良好的生物指標，可當作現地(*in situ*)量測之生物監測工具，以用來檢測水域環境中的重金屬汙染(Inza 等，1998；LaBrecque 等，2004；Li 等，2006)。



表 3.1 重金屬對淡水蜆之累積能力

Bivalves	Metals	BCF (mL g ⁻¹)	References
	Cd	150	Inza et al. (1997, 1998)
	Hg	300 - 500	
Asian clams	Co	530 ± 190	Frayse et al. (2002)
<i>Corbicula fluminea</i>	Ag	1860 ± 420	
	Cu	56,000	Croteau et al. (2004)
	Se	4,167	Lee et al. (2006)
Zebra mussels	Co	1100 ± 209	Frayse et al. (2002)
<i>Dreissena polymorpha</i>	Ag	1930 ± 750	
Asian clam	Se	391	Lee et al. (2006)
<i>Potamocorbula amurensis</i>			

3.1.3 重金屬對蜆殼之律動行為改變

許多研究指出，淡水蜆為良好之生物指標，可用來偵測水域污染所造成的生理及化學反應(Johns 與 Luoma, 1990; Bilos 等, 1998; Narbonne 等, 1999), Newton 與 Cope(2007)指出淡水蜆之開閉殼行為可用來反應出環境中污染物之污染情形，當外界發生污染時淡水蜆的殼可以持續的緊閉一段時間，以避開或減少暴露於污染物之中(Wildridge 等, 1998; Kadar 等, 2001)，此行為反應可以比死亡效應更快的反映出化學物質之毒性程度(Dell’Omo, 2002)。至目前為止，已有不少學者針對不同水域環境條件對淡水蜆造成之行為反應進行監測與分析，證實淡水蜆之行為反應的確會因不同水域環境條件而改變(Doherty 等, 1987; Ham 與 Peterson, 1994; Curtis 等, 2000; Ortmann 與 Grieshaber, 2003; Fournier 等, 2004; Tran 等, 2003、2004、2007)。

Doherty 等(1987)透過將蜆的一側固定，進一步去監測暴露於鎘與鋅中淡水蜆之蜆殼開閉情形，研究結果證明，蜆殼開殼的時間長短與重金屬之濃度呈現線性之關係，當暴露的重金屬濃度越高，其對應的蜆殼開殼時間也就越少。Ham 與 Peterson(1994)利用極限開關去偵測淡水蜆暴露於含氯與除氯自來水之蜆殼每日開殼時間，實驗結果顯示，淡水蜆暴露於含氯的自來水中，其閉殼的情形明顯的比暴露在除氯自來水中增加了不少。結合上述，當發生環境緊迫時，淡水蜆自我保護的閉殼反應可提供當做一個良好之生物監測工具。

Ortmann 與 Grieshaber(2003)提出一套淡水蜆律動監測技術，此技術是利用電磁線圈之原理來加以量測淡水蜆個體平均開殼大小(圖 3.2 A)，進而觀測淡水蜆每日律動之特性。實驗為期 7 日，採用循環流水系統，水溫控制在 19.1 – 22.4°C 之

間，實驗中連續計錄 8 隻淡水蜆個體開殼程度，藉由此實驗結果並將其重新分析，可推求出淡水蜆在無重金屬汙染下每日平均開殼大小(%)，該實驗於凌晨(1:00 - 5:00)達到最大閉殼，而下午(13:00 - 17:00)為最大開殼時段，淡水蜆每日開殼程度和時間之關係呈現如正弦波之特性(圖 3.2B)。

Tran 等(2003)發展出一套新穎的淡水蜆監測技術，使用非固定式輕量白金電極並用樹脂黏貼於淡水蜆殼之兩側，利用阻抗電極之原理，量測不同開殼程度所造成電壓之變化，並透過訊號放大器、資料擷取介面卡等將訊號傳送至電腦，以圖控式程式語言軟體 LabVIEW (Laboratory Virtual Instrument Engineering Workbench)進行資料紀錄、處理與運算(圖 3.3A)。該監測技術有別於以往之研究，提供淡水蜆一個不受約束與低壓迫的環境，讓淡水蜆可以自由活動之時，也能達到監測淡水蜆每日開、閉殼之目的。Tran 等(2003)透過該實驗裝置，在水溫 $15 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、pH 7.8 - 8.0 下連續紀錄 15 隻淡水蜆於 135 天內每日自然開、閉殼之情形。實驗結果可由一群蜆當中每日平均閉殼之機率分佈表示(圖 3.3 B, C)。圖 3.3B 及 C 顯示每日平均閉殼機率，在未受汙染與緊迫下其自發性閉殼行為在 10:00 - 16:00 為最小，若是能於此時段進行劑量反應之毒性試驗，必能減少蜆殼自發性閉殼反應產生之不確定性。

伴隨著淡水蜆非固定式輕量白金電極技術之成功研發與應用(Tran 等，2003)，Tran 等(2003、2004、2007)與 Fournier 等(2004)利用該裝置進行一連串淡水蜆暴露於重金屬(鎘、銅、汞及鈾)汙染下之行為反應實驗，分別在不同重金屬汙染濃度紀錄一群蜆當中所造成的開、閉殼比率(%)，藉此找出不同的反應整合時間(Integration time of response, ITR)下重金屬劑量與蜆殼閉殼反應之關係，進而推求造成不同閉殼效應之水中重金屬濃度(EC20、EC50 及 EC80)的時變關係。

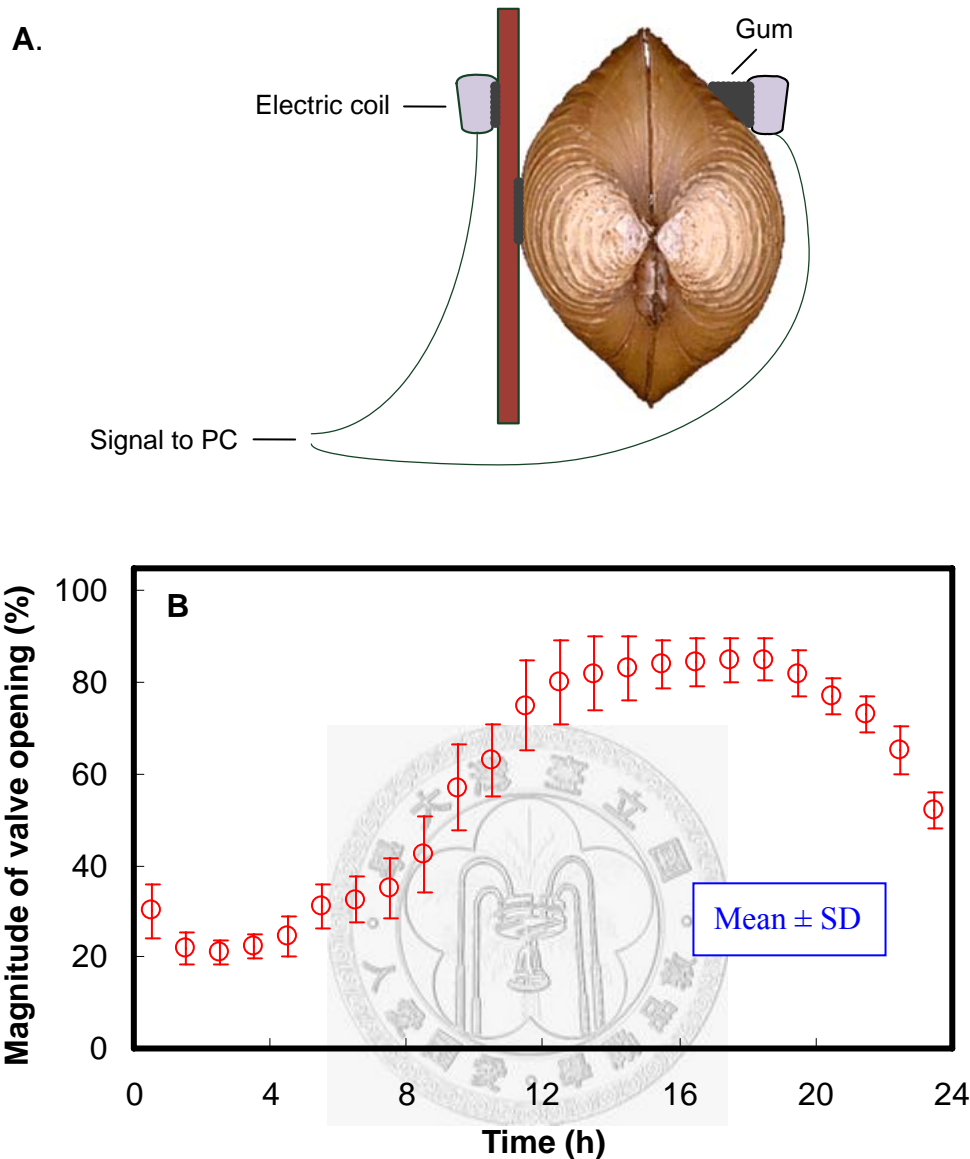


圖 3.2 淡水蜆監測原理與蜆殼律動特性。(A)電磁線圈監測技術及(B)淡水蜆每日平均開殼距離(Ortmann 與 Grieshaber, 2003)。

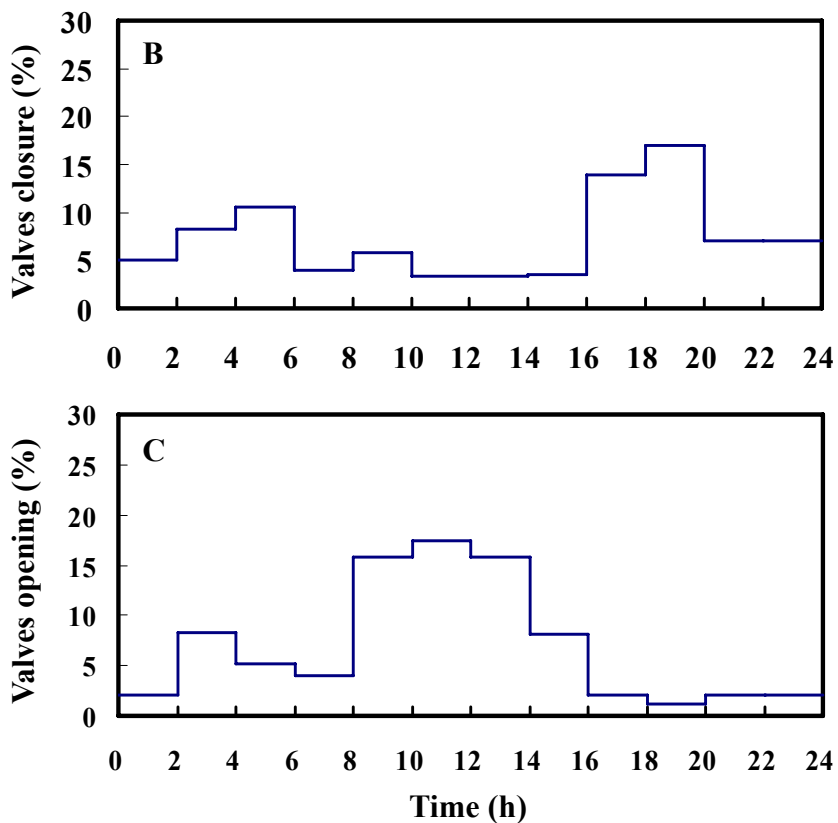
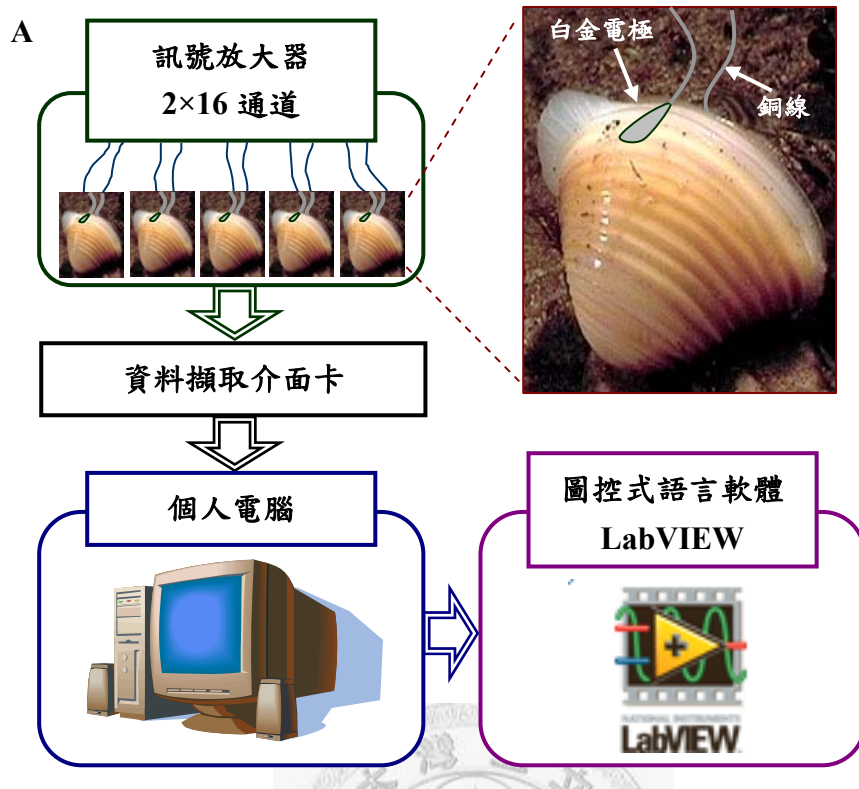


圖 3.3 淡水蜆殼律動量測裝置與量測結果。(A)自動化蜆殼量測裝置、(B)蜆殼平均開殼機率，及(C)蜆殼平均閉殼機率(Tran 等，2003)。

3.1.4 砷對淡水蜆之影響

環境中的無機砷主要以五價的砷酸鹽(HAsO_4^{2-})及三價的亞砷酸鹽(H_2AsO_3^-)存在於水體中，砷對水域生態的影響及毒性會受到水體溫度、pH值、Eh值、生物體數量、磷酸鹽濃度、懸浮固形物、暴露時間及砷的型態等因素影響(沈，2001)。對一般水域生物而言，無機砷比有機砷更具毒性，而無機砷中的三價砷As(III)比五價砷As(V)對生物體影響更是劇烈。Fowler及Unlu (1979)提出雙殼貝類(Mussel, *Mytilus galloprovincialis*)體內累積的砷會因不同的水體砷濃度、組織、貝類年齡與溫度有所改變，且體積較小的雙殼貝類體內累積之砷含量濃度較高。Sebesvari等(2005)亦指出環境中的淡水蜆具有高砷累積能力。當淡水蜆暴露於砷污染水體中會產生不利的毒性效應，同時會加速淡水蜆體內金屬硫蛋白(Metallothionein, MT)的合成(Diniz等，2007；Santos等，2007)。金屬硫蛋白具有儲存、運輸微量金屬元素、重金屬解毒、抗氧化和清除自由基等多種重要生物學功能，可當作評估體內重金屬之依據，為組織學及組織化學中重要的生物指標(Santos等 2007)。

以台灣地區而言因淡水水資源取得不易下，魚貝類養殖戶常常直接抽取地下水充當養殖水使用，同時台灣之特殊地理環境關係，地下水具有高濃度砷污染。這些水體砷可經由生物累積作用累積至魚貝類體內，無論是對魚貝類或是食用這些魚貝類的人類，都有著潛在之風險與危害(Lin 等，2001；Chou 等，2006)。

根據 Lin 等(2001)研究團隊長期監測台灣西南及東北砷污染疫區魚貝類養殖場砷污染情形之結果顯示，該地區養殖池水與魚貝類體內皆含有砷(Chen 等，2001；Liao 等，2003；Huang 等，2003；Liu 等，2005、2006、2007)。若長期飲

用這些含砷之地下水或食用含砷之魚貝類，將導致不利人體健康效應，有如皮膚損害、烏腳病及癌症等(Smith 等，2002；Chiou 等，2005)。

雖然淡水蜆監測技術已有初步之發展，但此技術尚未普及化，對重金屬毒性反應之資料庫也明顯不足，加上台灣淡水養殖地區長期飽受砷污染之迫害。綜合上述，本論文採用淡水蜆為指標生物，針對重金屬 - 砷與其導致之生物累積、毒性效應與行為反應進行實驗與評估，並發展一套新穎的淡水蜆生物監測系統，提供一低成本且即時之量測方法以檢測水域中之砷污染。



3.2 生態毒理模式

在水域生態系統中，毒理模式已被廣泛的應用，這些模式可用來描述毒性物質如何進入到生物體內，以及對生物體產生之不利效應，其中包含了生物累積模式(Bioaccumulation model)及急性毒模式(Acute toxicity model)。生物累積模式考慮了水體中之毒性物質經過吸收(Uptake)、分佈(Distribution)、代謝(Metabolism)與排除(Excretion)等進入到生物體的機制。急性毒模式則延伸了生物累積模式，用來描述生物體暴露於毒性物質下之毒性作用模態，探討外部毒性物質造成體內半致死之關係。



3.2.1 生物累積模式

水域生物之生物累積是指生物從周遭的水體中或攝食等途徑吸收化學物質至生物體內之過程，並對此化學物質產生累積於體內之現象，為了描述該現象，Moriarty (1975)提出環境中的汙染物可由吸收與排除動力學加以論述，並以單一區塊與雙區塊系統描繪生物體各處之化學物質累積情形。

區塊之定義為將生物體視為一獨立系統，利用簡化的數學模式描述標的化學物質在生物體內的行為與動態，但不考慮生理或生物構造上所造成之差異，其基本假設為(1)當化學物質進入一區塊時，會迅速且均勻的分布在區塊中，及(2)區塊內各組織化學物質的濃度與化學物質含量成正比，亦即任意組織內化學濃度改變時，其餘組織化學濃度也會同時改變(Barron 等，1990)。

Tas 等(1991)提出一階單區塊模式(First - order one - compartment model)，此模式提出後被廣泛的應用於水域生態毒理，用以求得魚體體內重金屬濃度與暴露

時間之關係(Tas 等，1996；Lin 與 Liao，1999；Barber，2003；Arnot 與 Gobas，2006；Ashauer 等，2006)。其方程式可表示如下：

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 C_w - k_2 C_f, \quad [3.1]$$

其中 k_1 為吸收速率常數($\text{mL g}^{-1} \text{d}^{-1}$)， k_2 為排除速率常數(d^{-1})， C_f 為生物體內重金屬濃度(mg g^{-1})， C_w 為外部暴露濃度(mg L^{-1})，及時間 t (hr)。假設重金屬之濃度 C_w 為常數，則方程式[3.1]之解如下，

$$C_f(t) = C_f(t=0)e^{-k_2 t} + \frac{k_1}{k_2} C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad [3.2]$$

穩定狀態下之生物濃縮因子(BCF)可用 k_1/k_2 來表示，為吸收與排除速率常數之比值(mL g^{-1})，此方程式又稱為一階單區塊生物濃縮模式，吸收部分僅考慮呼吸作用(如魚貝類的鰓)和皮膚接觸等作用，而化學物質的排除則包含了呼吸交換、廢物排泄、代謝的生物轉化以及成長稀釋等，成長稀釋雖然並沒有真的將化學物質排出生物體外，卻可因生物質量的增加而達到稀釋化學物質濃度等作用 (Arnot與Gobas，2006；Ashauer等，2006)。

3.2.2 急性毒模式

急性毒模式為描述生物體暴露於毒性物質下之毒性作用模態，可將外部毒性物質透過此模式來推估在實驗室內無法直接量測出來的體內半致死濃度(Internal median lethal concentration, CL50)，其主要三種急性毒理動態模式如下：

關鍵體內濃度(Critical body residue, CBR)：此模式由 McCarty 與 Mackay (1993)提出，利用整個魚體概念，以可逆的觀點去探討魚體本身所能承受的重金屬程度，當魚體發生死亡時，其體內重金屬之濃度稱之為關鍵體內濃度，在不考慮暴露的濃度、條件以及時間下，當體內的濃度累積到一定的門檻值，將造成魚隻的死亡，而此濃度於該模式下假設為一常數。

方程式[3.2]為一階單區塊生物濃縮模式，考慮在未暴露重金屬前，其體內沒有重金屬殘留情形下($C_f(t=0) = 0$)，欲評估水域環境中及魚體內重金屬造成魚隻致死一半之濃度，可將式中之 C_f 視為內部半致死濃度(CL50) ($\mu\text{g g}^{-1}$)， C_w 視為外部半致死濃度(External lethal concentration, LC50) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)，經重新整理後，可得到時變之外部半致死濃度和內部半致死濃度的關係式：

$$\text{LC50}(t) = \frac{\text{CL50}}{\text{BCF}(1 - e^{-k_2 t})} \quad [3.3]$$

在內部半致死濃度(CL50)不變下，當時間趨近於無限大時，方程式[3.3]可改寫為：

$$\text{CL50} = \text{LC50}(\infty)\text{BCF} \quad [3.4]$$

式中 $\text{LC50}(\infty)$ 為時間無限大之外部半致死濃度(Incipient LC50 value) ($\mu\text{g mL}^{-1}$)。由此模式可得知，考慮內部半致死濃度不變下，暴露濃度、條件以及時間與死亡無關。而該模式也於水蚤(*Daphnia magna*)、孔雀魚(*Poecilia reticulata*)、靜水椎實螺(*Lymnaea stagnalis*)以及吳郭魚(*Oreochromis mossambicus*)等水生物種加以驗

證與應用(Ramos等, 1998; Liao等, 2004)。

關鍵濃度曲線面積(Critical area under the curve, CAUC)：此模式由 Legierse 等(1993)提出，利用受體和基質之間不可逆之關係，來解釋當毒性物質進入生物體後會與標的器官相互結合，阻斷酵素之訊息傳遞，使受體無法作用，進而使標的器官之組織產生致死現象。

Legierse等(1993)進一步以單區塊模式說明水域生物體內之毒性物質於標的器官內的關係，並以濃度曲線面積(Area under the curve, AUC) ($\mu\text{g d g}^{-1}$)來考慮標的器官受到抑制之現象，該模式假設當發生暴露時，生物體內毒性物質濃度會隨著時間與暴露濃度累積到一定的濃度曲線面積，將導致生物體發生死亡情形，亦即代表著當生物體死亡時，其所累積的濃度曲線面積為定值：

$$\text{AUC} = \int_0^t C_f(t) dt = \text{constant} \quad [3.5]$$

式中時變之生物體內重金屬濃度 C_f 可由方程式[3.2]加以取代：

$$\text{AUC} = \int_0^t C_f(t) dt = \int_0^t \frac{k_1}{k_2} C_w (1 - e^{-k_2 t}) dt = \frac{k_1}{k_2} C_w \left(t - \frac{1 - e^{-k_2 t}}{k_2} \right) \quad [3.6]$$

將方程式[3.6]中之 C_w 視為 $\text{LC50}(t)$ ，經重新整理該式後可得到時變的外部半致死濃度($\text{LC50}(t)$)：

$$\text{LC50}(t) = \text{AUC} \frac{k_2}{k_1} \left(\frac{k_2}{k_2 t + e^{-k_2 t} - 1} \right) \quad [3.7]$$

式中之 $\text{LC50}(t)$ 雖可藉由此模式加以推求出，但考慮時間趨近於無限大時 LC50 會收斂於一定值，可將此方程式加以修正如下：

$$\text{LC50}(t) = \text{AUC} \frac{k_2}{k_1} \left(\frac{k_2}{k_2 t + e^{-k_2 t} - 1} \right) + \text{LC50}(\infty) \quad [3.8]$$

由方程式[3.8]，除可推求出隨時變的外部半致死濃度($\text{LC50}(t)$)，當暴露時間無限

延伸時，亦可推求出時間無限大之外部半致死濃度(LC50(∞))。若將CL50 與LC50 分別取代方程式[3.2]中之 C_f 與 C_w 並代入方程式[3.8]，經重新整理可得到隨時變之內部半致死濃度(CL50(t))。

$$CL50(t) = AUC \left(\frac{k_2(1 - e^{-k_2 t})}{k_2 t + e^{-k_2 t} - 1} \right) + \frac{k_1}{k_2} (1 - e^{-k_2 t}) LC50(\infty) \quad [3.9]$$

因此濃度曲線面積模式可用來預測暴露時間及生物被抑制後體內毒性物質之變化關係。Liao 與 Lin(2001)及 Liao 等(2005)也建議該模式可應用在水域生物暴露於重金屬之毒性描述。

損害評估模式(Damage assessment model, DAM)：DAM 由 Lee 等(2002)提出，利用生物體內毒性物質累積及損害程度與時間之關係，考慮毒性物質於標的器官中可逆到不可逆的鍵結作用模態，以一階單區塊損害累積模式來表示累積之程度：

$$\frac{dD}{dt} = k_a C_f(t) - k_r D(t) \quad [3.10]$$

式中之 D 為損害累積程度(-)， k_a 為損害累積率($\text{g } \mu\text{g}^{-1} \text{d}^{-1}$)， k_r 為損害恢復速率常數(d^{-1})，當 $k_r = 0$ 時表示毒性物質與生物體之鍵結為不可逆的反應， $k_r = \infty$ 則代表有極快速可逆的反應。

將方程式[3.2]式代入[3.10]式中，則方程式[3.10]之解為：

$$D(t) = k_a \frac{k_1}{k_2} C_w \left(\frac{e^{-k_r t} - e^{-k_2 t}}{k_r - k_2} + \frac{1 - e^{-k_r t}}{k_r} \right) \quad [3.11]$$

當生物體發生半數死亡情形時，可將 $D(t)$ 用DL50 取代之，同時此時的外部暴露濃度 C_w 可視為LC50(t)，則方程式可改寫為：

$$LC50(t) = \frac{DL50/k_a}{\left(\frac{e^{-k_r t} - e^{-k_2 t}}{k_r - k_2} + \frac{1 - e^{-k_r t}}{k_r} \right)} \frac{k_2}{k_1} \quad [3.12]$$

式中之 $DL50/k_a$ 為化學物質的毒性損害程度達到半致死之係數($\mu\text{g d g}^{-1}$)。而 $LC50(t)$ 於此模式中稱為以 $DL50$ 為基礎的時變外部半致死濃度。

若將方程式[3.2]式代入[3.12]式中，以 $CL50(t)$ 取代 $C_f(t)$ 及 $LC50(t)$ 還原為 C_w ，經重新整理過後，可得以 $DL50$ 為基礎的時變內部半致死濃度($CL50(t)$)：

$$CL50(t) = \frac{DL50/k_a}{\left(\frac{e^{-k_r t} - e^{-k_2 t}}{k_r - k_2} + \frac{1 - e^{-k_r t}}{k_r} \right)} (1 - e^{-k_2 t}) \quad [3.13]$$

由此得知，無論是 CBR、CAUC 或 DAM 等急性毒模式，皆由一階單區塊生物累積模式之應用或延伸，其主要模式結構如圖 3.4 所示。



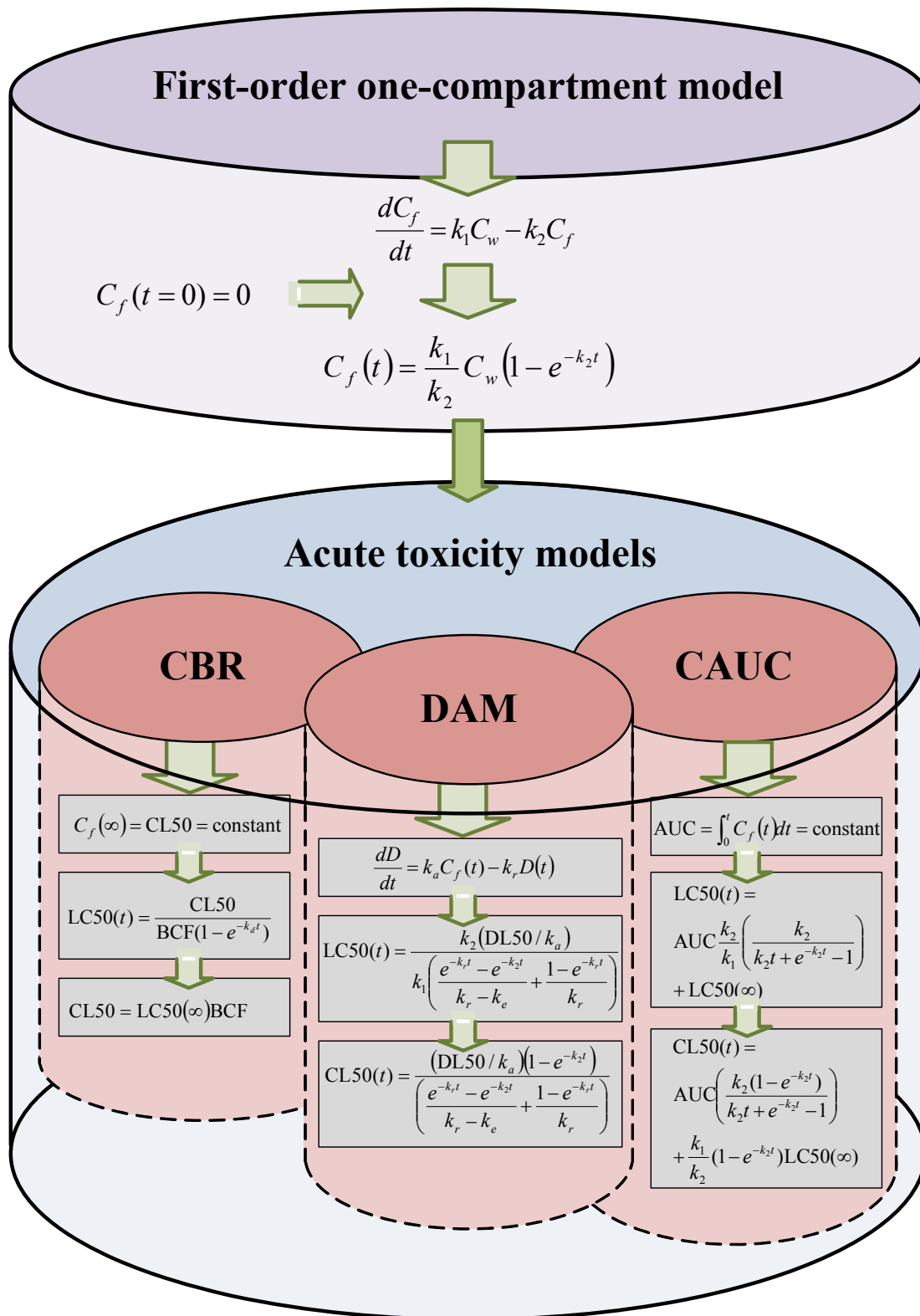


圖 3.4 急性毒模式(CRB、CAUC 與 DAM)之數學模式推導與結構。

3.2.3 劑量反應模式

劑量反應模式(Dose - response model)主要描述當受體或標的器官暴露於化學物質時所產生效應之比率，此受體可為酵素、標的器官、生物體等，而效應可為死亡率、成長抑制、生理反應等各種欲評估之現象。根據不同的化學物質與暴露對象，劑量反應模式又可稱為藥理動態模式(Pharmacodynamic model)或毒理動態模式(Toxicodynamic model)，其基本假設為受體上化學劑量和效應有相關性，考慮作用區塊為一均值系統，當毒性物質進入作用區塊內會迅速且均勻的分佈，而標的位置之毒性物質濃度增加，毒理效應也隨之增加(Kavlock 與 Plaab, 1995; Bellissant 等, 1998; Heinrich - Hirsch 等, 2001)。

一般毒理動態的模式裡，線性模式雖較為簡單，但只能評估小範圍的片段線性反應，而非線性模式則因具有較多項的參數，除了能評估毒性物質對生物體造成影響之斜率，同時也考慮到低毒性濃度下毒性反應不明顯，以及高毒性濃度下毒性反應達到飽和之情形，故利用非線性模式來描述毒性物質與生物體之劑量反應關係較為合適 (Hill, 1910; Wagner, 1968; Venitz, 1995; Bellissant等, 1998)。Hill(1910)首先提出非線性S型 E_{\max} 模式，主要描述氧基紅血球素之鍵結，隨後廣泛被應用於評估化學物質與生物反應，此模式又稱為Hill模式，其表示如下：

$$E = \frac{E_{\max} \cdot C^n}{EC50^n + C^n} \quad [3.14]$$

其中 n 為 Hill 係數(又稱為斜率因子)， n 越大代表每單位受體能鍵結較多之毒性物質，亦即相同毒性物質濃度下，對生物體造成之毒性反應較靈敏。

3.2.4 急毒生物實驗

評估毒性物質對生物造成之致死情形，除了上述之劑量反應模式之外，美國環保署(U.S. Environmental Protection Agency, USEPA)也於 1991 年訂定四種測量水域生物死亡率之方法，包含(1)圖解法(Graphic method)，(2)機率單位法(Probit method)，(3)史丕曼 - 卡伯法(Spearman - karber method)，以及(4)史丕曼 - 卡伯修正法(Trimmed spearman - karber method)。在毒理學的領域內，一般的毒理實驗常藉由這四種方法來計算與測試水域生物之死亡率，並可推求出半數致死濃度(LC50)，目前已有商業化軟體可運用，其判斷方式如圖 3.5 所示。

本論文為觀測淡水蜆於不同砷濃度下之生化反應(閉殼效應及死亡率)，於淡水蜆對砷之行為反應上採用三參數 Hill 模式來加以描述，同時以數組砷濃度進行急毒生物試驗，故依據圖 3.5 之流程，將採用 Finney(1971)提出之機率單位模式來評估重金屬 - 砷對淡水蜆於不同時間下之 LC50，。



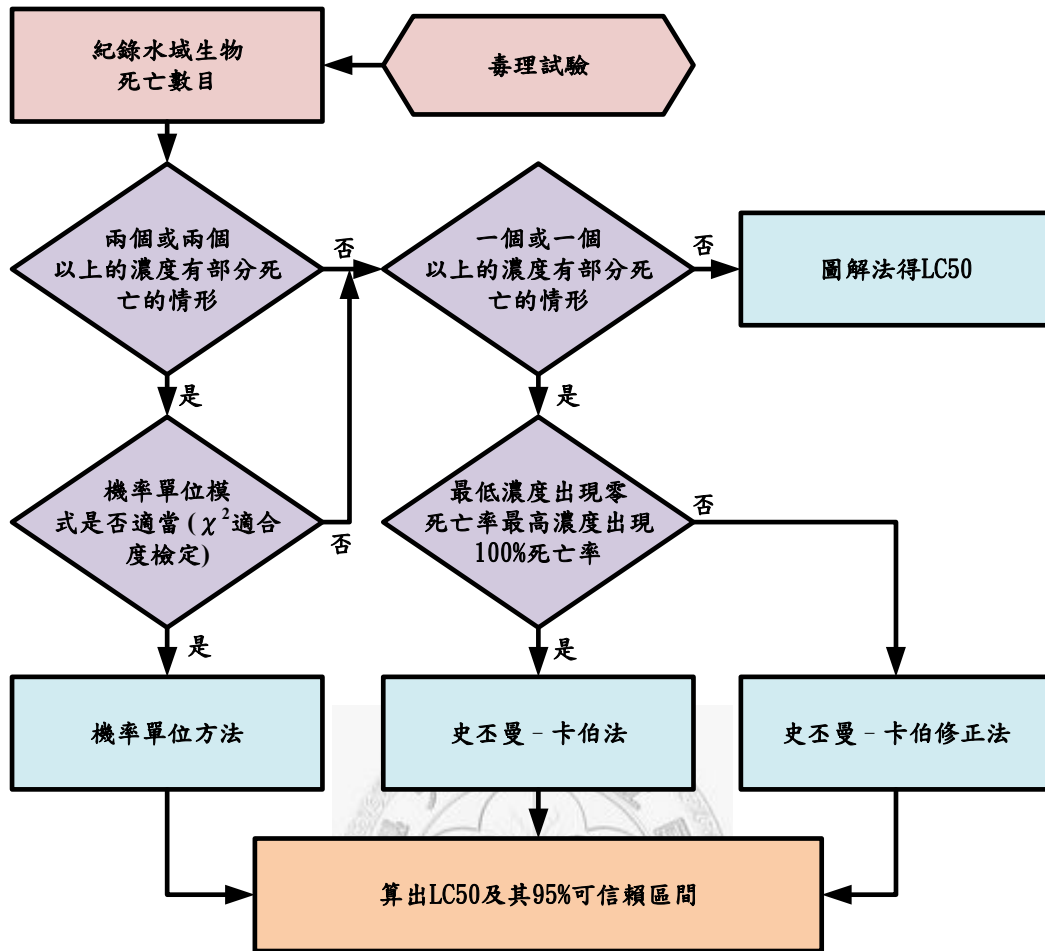
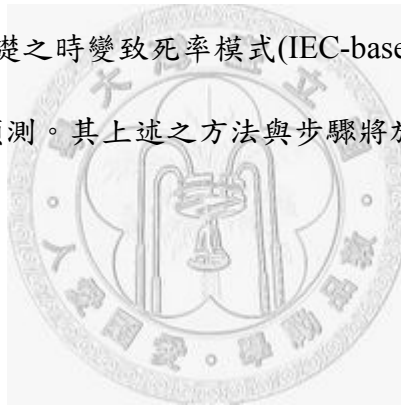


圖 3.5 半數致死濃度(LC50)之計算流程圖(USEPA, 1991)。

第四章、材料與方法

本研究主要為探討亞洲蜆暴露於含砷水域下之生化反應，主要包含實驗、資料分析與模式發展。如圖 4.1 所示，在實驗部分有暴露實驗(Exposure experiment)、急毒生物試驗(Acute toxicity bioassay)、蜆殼每日律動實驗(Valve daily rhythm experiment)及不同砷濃度下之蜆殼行為反應試驗(Valve behavior bioassay)。接著針對上述幾個實驗之結果，利用一階單區塊模式、機率單位法(Probit method)與毒理動態(Toxicodynami)為基礎之 Hill 模式(TD-based Hill model)進行資料處理與分析。最後再將模式應用與發展，推導出以內部效應濃度(Internal effect concentration)為基礎之時變致死率模式(IEC-based time-mortality model)以及蜆殼每日律動特性之預測。其上述之方法與步驟將於本章依序呈現。



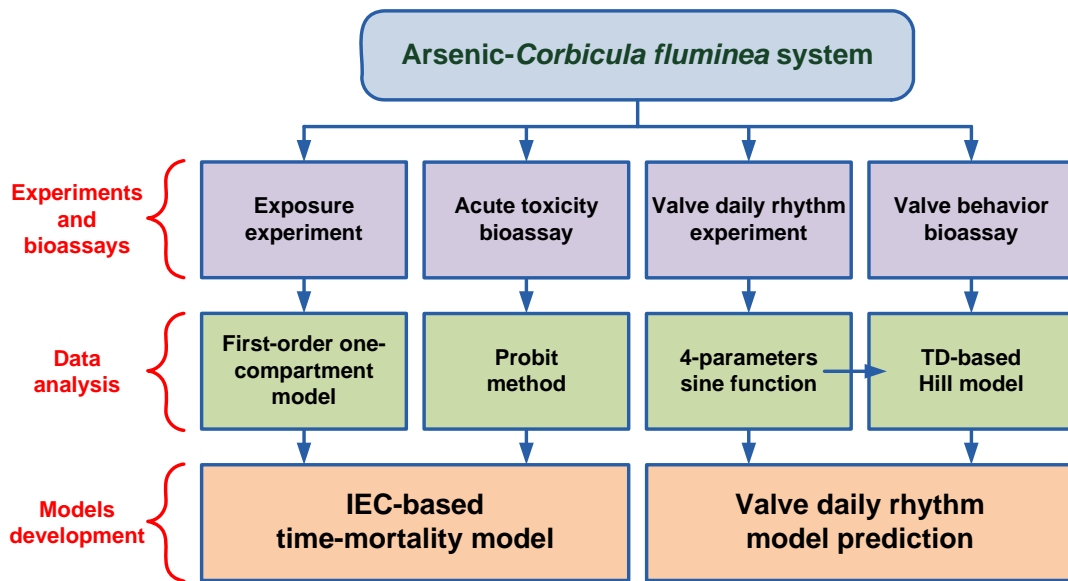


圖 4.1 淡水蜆暴露於含砷水域下之研究架構。結合實驗、資料分析與模式發展進而評估淡水蜆暴露於含砷水域之生化反應。



4.1 淡水蜆之採樣及馴養

本研究由台灣東部花蓮地區淡水蜆養殖場取得 320 隻活動力強的淡水蜆進行相關實驗與分析，其平均殼長為 28.4 ± 1.8 mm (medn \pm sd)，平均重量為 6.32 ± 0.71 g wet wt。因淡水蜆飼養具有一定之難度，故淡水蜆樣本取得之前，必須先建立適合的成長環境，其流程如下：

- (1) 藻水之培養：將含有微藻(*Platymonas sp.*)之溶液模擬每日 12 小時光照(色溫 7200K)，並添加培養基(液肥)進行藻水之培養。
- (2) 水族缸設置：採用矩形高透光、高強度之水族缸($60 \times 36 \times 31$ cm³)，平鋪約 5 公分高之美國矽砂(中性底沙)與 50 公升事先培養之藻水，使用溫度控制器將水溫控制於 20~24°C，並透過外掛過濾器、氣泵與氣石提供循環水系統與高溶氧量，同時模擬每日 12 小時自然光照。
- (3) 硝化系統建立：利用外掛式過濾器內之陶瓷環以及循環水系統培養硝化菌(Nitrifying bacteria)，硝化菌包含亞硝酸菌及硝酸菌，主要功用為分解水中之氨再經轉化為毒性較低之亞硝酸，硝化系統建立初期可由氨水或腐敗的生物充當營養來源，等待硝化系統之建立大約需要循環水系統持續運轉兩週，此為養殖淡水蜆最重要之一環，若無建立此系統，將導致大量淡水蜆發生被排泄物毒死之情形。

等待硝化系統建立完畢後，即可蒐集並置入淡水蜆進行馴養，本研究將 320 隻淡水蜆平均分配於四水族缸內，使其自由潛沙及適應環境，依照上述條件，至少馴養兩週後，待蜆隻健康狀況良好，且已適應環境後，可進行後續相關實驗。

4.2 暴露實驗

準備 0, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 200, 500 以及 1000 mg L⁻¹ 利用 NaAsO₂ 粉末 (Sodium m-Arsenite, purity 96.3%) 調配出 As³⁺ 的砷溶液，之藻水進行毒性試驗，以得知淡水蜆對砷的耐受極限 (Median lethal tolerance, LT50)。經初步試驗發現，淡水蜆對 5 mg L⁻¹ 砷之耐受極限可達 21 天，因此本研究採用以砷濃度 5 mg L⁻¹ 進行 7 天之砷暴露實驗，以及乾淨的藻水中進行 7 天的排除實驗，藉此推估淡水蜆對砷之吸收與排除能力。

設置 4 組水族缸 (45 × 21 × 26 cm³)，每缸置入 20 公升之藻水，打氣與照明設備比照馴養之條件，實驗過程中水溫控制於 22.14 ± 1.11°C，pH 值為 8.12 ± 0.06，溶氧量 8.6 ± 0.16 mg L⁻¹，電導度 184.07 ± 1.59 μS⁻¹，鹽度 1.00 ± 0.00%，濁度則為 23.08 ± 0.04 NTU。

進行砷暴露實驗時，將其中兩組水族缸各置入 40 隻淡水蜆，待淡水蜆適應環境後 (正常潛沙與開闔)，注入此兩缸並稀釋成 5 mg L⁻¹ 砷汙染環境，另外尚未置入淡水蜆的兩缸則控制為 0 mg L⁻¹ 無汙染環境。待暴露於含砷環境 7 日後，將所有蜆隻移至無砷汙染之兩缸進行 7 日排除實驗。實驗過程中隨時補充蒸發之水量，並於每日從水族缸中任意取出 5 隻蜆，以封口袋密封保存於 -20°C 之冷凍庫中直至分析。

4.3 急毒生物試驗

急毒生物試驗主要之目的為探討不同砷濃度對淡水蜆造成之死亡效應，以及推求時變之半致死砷濃度。首先設置 8 座水族缸($22 \times 15 \times 18 \text{ cm}^3$)，每缸置入 5 公升之藻水，每缸皆具備有過濾系統、打氣設備以及照明裝置，水質條件控制比照如同暴露實驗，當完成上述條件後，於每水族缸各置入 10 隻淡水蜆。待蜆隻適應缸內環境後，利用 NaAsO_2 粉末調配出 As^{3+} 的砷溶液，分別注入其中 7 缸並稀釋成 2, 5, 10, 25, 50, 100 及 200 mg L^{-1} 砷汙染環境，另一缸則為對照組，在實驗期間無汙染源砷的加入。

蜆隻致死時間之測定由砷溶液注入各缸中開始計算，實驗前 12 小時於每半小時觀測紀錄一次死亡情形，第 12~24 小時採用每一小時觀測一次死亡情形，24 小時後則改為每 2 小時觀測一次死亡情形直到 96 小時，當發現蜆隻異常，如不正常開、閉殼或反應遲緩時需密切觀察，一判定為死亡立刻從水族缸中取出，以避免因蜆隻屍體敗壞影響實驗結果。

蜆隻死亡情形判斷如下：蜆隻即將死亡時控制縮放之肌肉會失去力量，導致不能正常開、閉殼，故發現不正常開殼或軟組織露出等異常生理反應時，可透過外部刺激碰觸其外殼或軟組織，正常蜆隻會有快速的閉殼反應，若閉殼反應不明顯或緩慢，則代表此蜆隻即將死亡，如刺激後無任何反應則判定蜆隻為死亡。

實驗期間隨時補充其蒸發之水分，同時於實驗前後每天採取 200 mL 水樣，以監測水中砷濃度之變化。

4.4 蜆殼每日律動試驗

淡水蜆主要由進、出水管與肌肉的收縮和外界接觸，其特殊的開、閉殼活動是雙殼貝類最主要的特徵，這些雙殼貝類面對汙染物或掠食者的侵入時會將雙殼緊閉，這自發性的閉殼反應除了為淡水蜆自我保護的機制外，也成為了論文內探討的觀點之一。本節將分成實驗裝置與原理以及蜆殼行為生物試驗，來加以探討不同重金屬-砷濃度下所造成蜆殼閉殼的程度。

4.4.1 實驗裝置與原理

本研究發展出一套淡水蜆行為反應監測系統，藉此以自動化的方式量測淡水蜆之開、閉殼反應。利用感測器的原理，當空間中有兩個線圈，若第一個線圈(一次側)通過交流訊號，則會影響第二個線圈(二次側)的磁通量，使第二個線圈會受到感應而有電壓產生(圖 4.2 A)，兩線圈之距離(L)和第二線圈產生之感應電壓成反比，當距離遠時其感應電壓較小，而距離近時則有較強之感應電壓，此稱為互感(圖 4.2 B)。而線圈在磁場中活動時，所能感應到的電流強度，又稱電感。

本研究採用 50 mH 之輕量色碼電感，先以漆包線(#40)做為導線連接電感，並使用電氣絕緣漆包覆整個電感及導線與電感之接觸面，以避免水氣進入而影響量測的結果，經測試無異常後將兩枚電感元件用環氧樹脂接著劑(Epoxy resin)黏貼於淡水蜆殼之左右兩側(圖 4.2 C)，透過互感原理，當淡水蜆有開、閉殼之動作時，隨即產生與距離相對應之二次感應電壓，可藉由此來量化淡水蜆之開、閉殼程度。

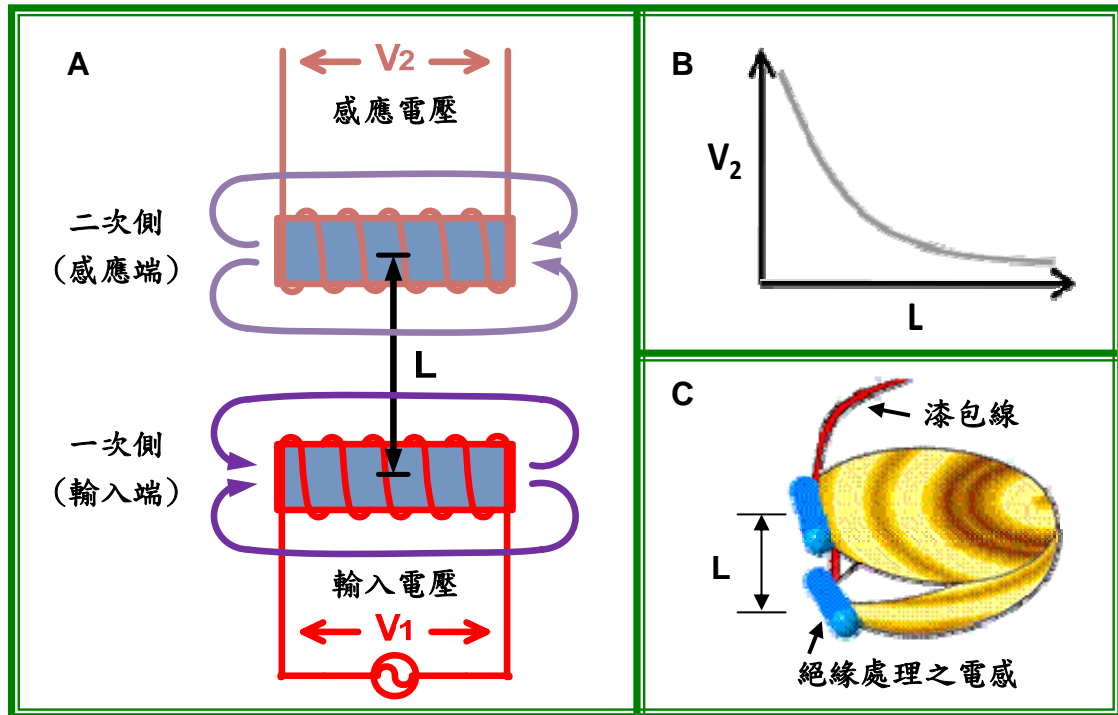


圖 4.2 淡水蜆行為監測之原理。(A)感測器原理，(B)二次側感應電壓與距離之關係圖，及(C)電感元件固定於淡水蜆殼上。

圖 4.3 所示為淡水蜆監測系統示意圖，將已黏貼電感元件之待測蜆一次側由訊號產生器(Function generator)輸入高頻(4 kHz)正弦穩態電壓(2000 mV)，此時蜆殼二次側會產生一感應電壓訊號，該訊號可經由運算放大器(741 Operational amplifier)差動放大到資料擷取卡(NI DAQPad-6259)，再透過資料擷取卡將此訊號傳輸至電腦，整個電腦內部操作界面由 LabVIEW 8.0 撰寫而成，採用每 5 分鐘擷取一筆蜆殼訊號做資料處理。

如圖 4.3 所示，淡水蜆監測時採用循環水系統養殖，首先將微藻(*Platymonas sp.*)置於藻水培養缸內培養，利用抽水馬達將富含微藻之藻水抽至淡水蜆養殖缸內做為蜆之食物來源，接著可由虹吸重力原理或抽水馬達將淡水蜆缸的水抽回藻水培養缸內，藉不斷循環可提供淡水蜆充足之食物，如藻水中含藻量過低也可於藻水培養缸中添加，此方式可模擬自然環境中藻類不匱乏的情形。圖 4.4 A 為本系統之實體配置圖，包含了訊號產生器、自動照明設備、防震橡皮墊、控制儀表(圖 4.4 B)、主電路與控制迴路(圖 4.4 E)、資料與訊號擷取裝置(圖 4.4 C)、藻水止回控制閥(圖 4.4 G)等，而圖 4.4 D 及圖 4.4 F 則為該系統下之淡水蜆。

當蜆殼行為監測系統建立完畢後，隨即開始進行系統下之馴養，除了淡水蜆殼上多了感測器之差異外，其蜆隻馴養方法與水質之控制完全比照 4.1 節之過程，同時每日固定照明 12 小時，模擬自然晝夜(10:00 - 22:00 白天、22:00 - 10:00 夜間)。待蜆隻適應環境後(約需 2~3 週)，開始進行蜆殼律動實驗，並藉由 LabVIEW 圖控式程式語言將蜆殼律動資料分析並儲存至少兩周，以求得無砷緊迫下之淡水蜆律動情形。

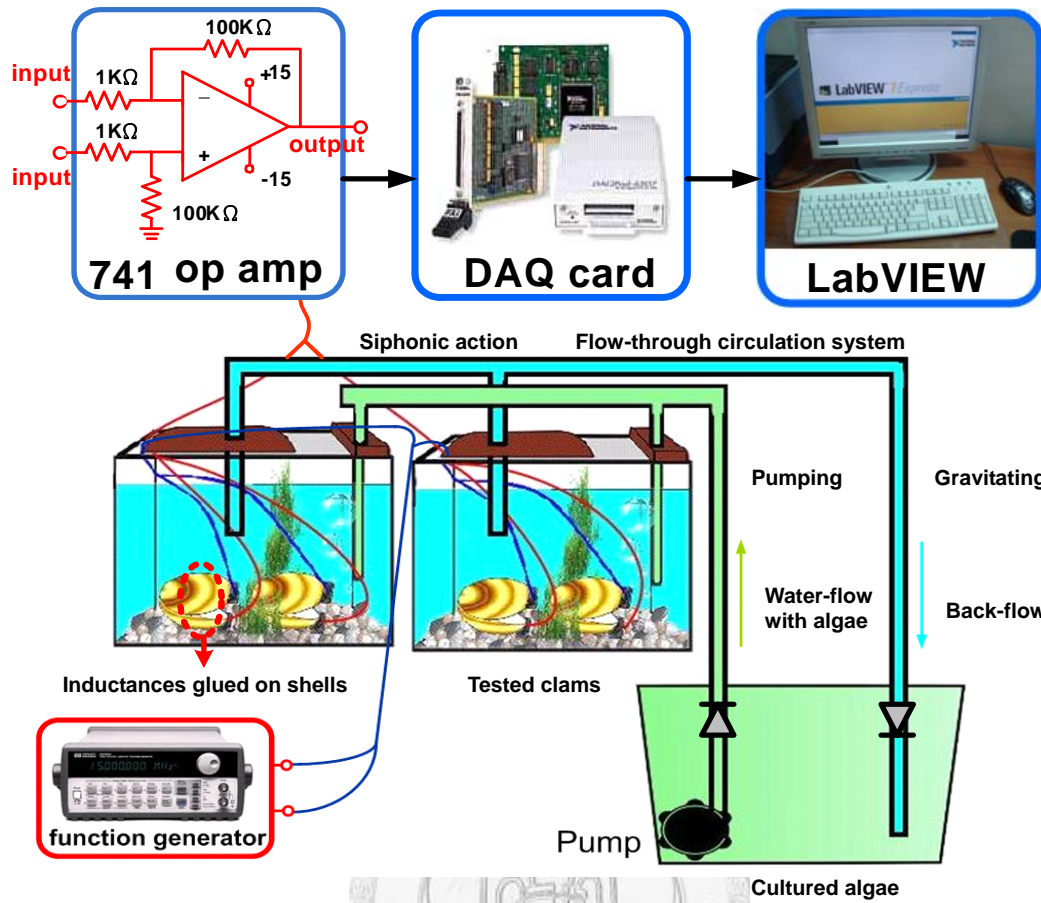


圖 4.3 淡水蜆監測系統示意圖。

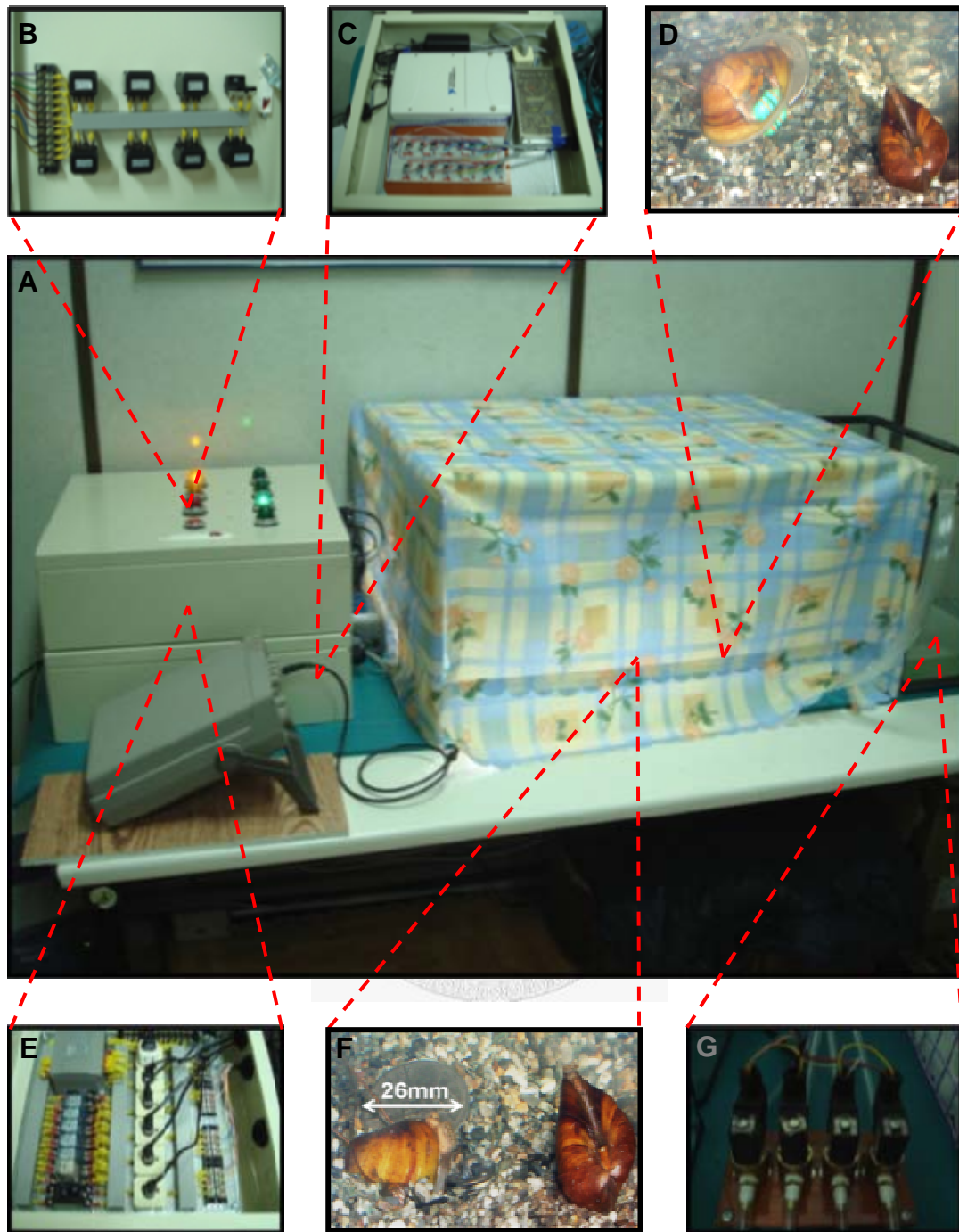


圖 4.4 淡水蜆行為監測系統實體示意圖。(A)淡水蜆監測系統，(B)控制儀表，(C)資料與訊號擷取裝置，(D)監測系統下之淡水蜆(潛沙前)，(E)主電路與控制迴路，(F)監測系統下之淡水蜆(潛沙後)，及(G)藻水止回控制閥。

4.4.2 蜆殼行為生物試驗

藉由蜆殼律動實驗之結果，尋找出每日當中最小自發性閉殼時段，進行蜆殼行為生物試驗，以瞭解在不同水體砷濃度下對淡水蜆造成之行為改變。

首先準備 10 組水族缸($45 \times 21 \times 26 \text{ cm}^3$)，於每缸置入 4 公分高之美國矽砂以及 20 公升之藻水，利用照明設備及打氣馬達提供充足之光線和氧氣來源，水質條件控制完全比照暴露實驗與蜆殼律動實驗。待水質達到穩定狀態後，每缸各放入 8 隻含有感測器之淡水蜆進行馴養，使其自由活動(移動、潛沙)並適應環境，約適應兩週後可開始進行生物試驗。

進行砷毒性試驗時，採用每兩個水族缸一組，利用 NaAsO_2 粉末調配出 As^{3+} 的砷溶液，於最小閉殼時段注入此五組缸中並分別稀釋成 0.3, 0.5, 1.0, 5.0 及 10.0 mg L^{-1} 砷汙染環境，實驗過程中應避免震動或其它干擾淡水蜆律動之因素，同時採取每 5 分鐘擷取一筆蜆殼開殼程度資料，並經由LabVIEW軟體分析與儲存於電腦中直到 300 分鐘實驗結束。

4.5 化學分析與資料處理

4.5.1 總砷含量與離子分析

將待測之水樣裝入 200 mL 聚丙烯瓶內，存放於 4°C 冰箱中密封冷藏等待分析，其分析方法遵循中華民國行政院環境保護署環境檢驗所(National Institute of Environmental Analysis, NIEA)與美國公衛學會(American Public Health Association, APHA)之標準檢測方法。

總砷含量分析採用石墨爐式原子吸收光譜法(NIEA W303.51A, APHA 3113)。利用石墨爐將樣品中的砷原子化後測定之，以通過石墨爐的電流大小來控制加熱溫度的高低，使樣品進行乾燥、灰化、原子化溫度等步驟，最後藉由測量氣態原子在特定波長光線的吸光度，求出砷的濃度。

除總砷含量外，本研究亦分析鈣(Ca^{2+})、鎂(Mg^{2+})、鈉(Na^+)、鉀(K^+)、氫(H^+)、氨氮(NH_3)、鹼度(CaCO_3)、氯鹽(Cl^-)、亞硝酸鹽氮(NO_2^-)、硝酸鹽氮(NO_3^-)、及硫酸鹽(SO_4^{2-})等水量離子，其分析皆遵循NIEA與APHA之標準檢測方法。

4.5.2 淡水蜆體內砷含量分析

待測之淡水蜆以烘箱低溫烘烤 60 分鐘分離其蜆殼與軟組織，將軟組織取出後予以 24 小時冷凍乾燥，裝入封口袋與外界隔絕並置入 4°C 冰箱密封冷藏等待含砷量分析。

先將該組織以烘箱加熱至 105°C 乾燥 24 小時進行脫水，利用研磨機 (Tai-Hsiang S36-89, Taiwan) 研磨成粉末狀，取出 100 mg 軟組織置入 250 mL 燒瓶中並加入 10 mL 硝酸(HNO₃)，以 95°C 加熱蒸發至 3 mL，送到抽氣櫃內冷卻至 55°C 時加入 10 mL 硝酸搖晃均勻，加入 1 mL 過氧化氫(Hydrogen peroxide)於室溫蒸發至剩下 3 mL，以二次去離子水(Double deionized water, DDIW)稀釋至 25 mL 後送至原子吸收光譜儀(Atomic absorption spectrometer, AAS)分析 Walsh 等 (1994)。

以上之藻水水樣及淡水蜆樣本均送往國立宜蘭大學檢驗中心(環化實驗室)進行離子成分與總砷含量分析。

4.5.3 淡水蜆殼律動資料處理

淡水蜆殼之開、閉殼程度可透過感測器以微電壓方式輸出至運算放大器，當訊號放大至資料擷取卡可接收之範圍時，可經由資料擷取卡將這些電壓訊號傳輸到 LabVIEW 圖控式軟體內部進行初步分析與儲存，再透過電子試算表(Microsoft Office Excel 2003)進行深入分析。

本研究將 16 隻淡水蜆以每 5 分鐘紀錄一筆開、閉殼程度所對應的電壓資料。**圖 4.5 A** 為蜆殼行為監測結果之示意圖，其中 Clam 1 及 Clam 2 代表兩隻量測中的淡水蜆，由圖中可看出，淡水蜆殼之活動會直接影響到相對應之電壓大小，當淡水蜆打開外殼時，其背負之感測器因距離增加而電壓減少，反之當淡水蜆閉殼時，則會因感測器距離拉近而使電壓增加。經初步實驗也顯示淡水蜆殼之行為有非開即關之特性，為簡化其分析過程乃將其予以正規化(Normalize)，採用量測所得最大電壓值與最小電壓值之平均，如大於此平均值則為 1，反之小於平均則為 0，亦即閉殼為 1、開殼為 0 (**圖 4.5 B**)。

利用此 16 隻蜆正規化後之數據，即可推求出一群蜆中閉殼之機率(%)，如 16 隻蜆中有 4 隻閉殼則可表示為 25%閉殼反應，因本研究之淡水蜆律動實驗為期 14 天，可求得每日相同時段淡水蜆閉殼反應之平均值(Mean)與標準偏差(Standard deviation, SD) (**圖 4.5**)。最後將此一群蜆中每日平均閉殼機率資料利用數學模式擬合(**圖 4.5**)，可求得相關參數，即可做為日後淡水蜆律動特性之預測。

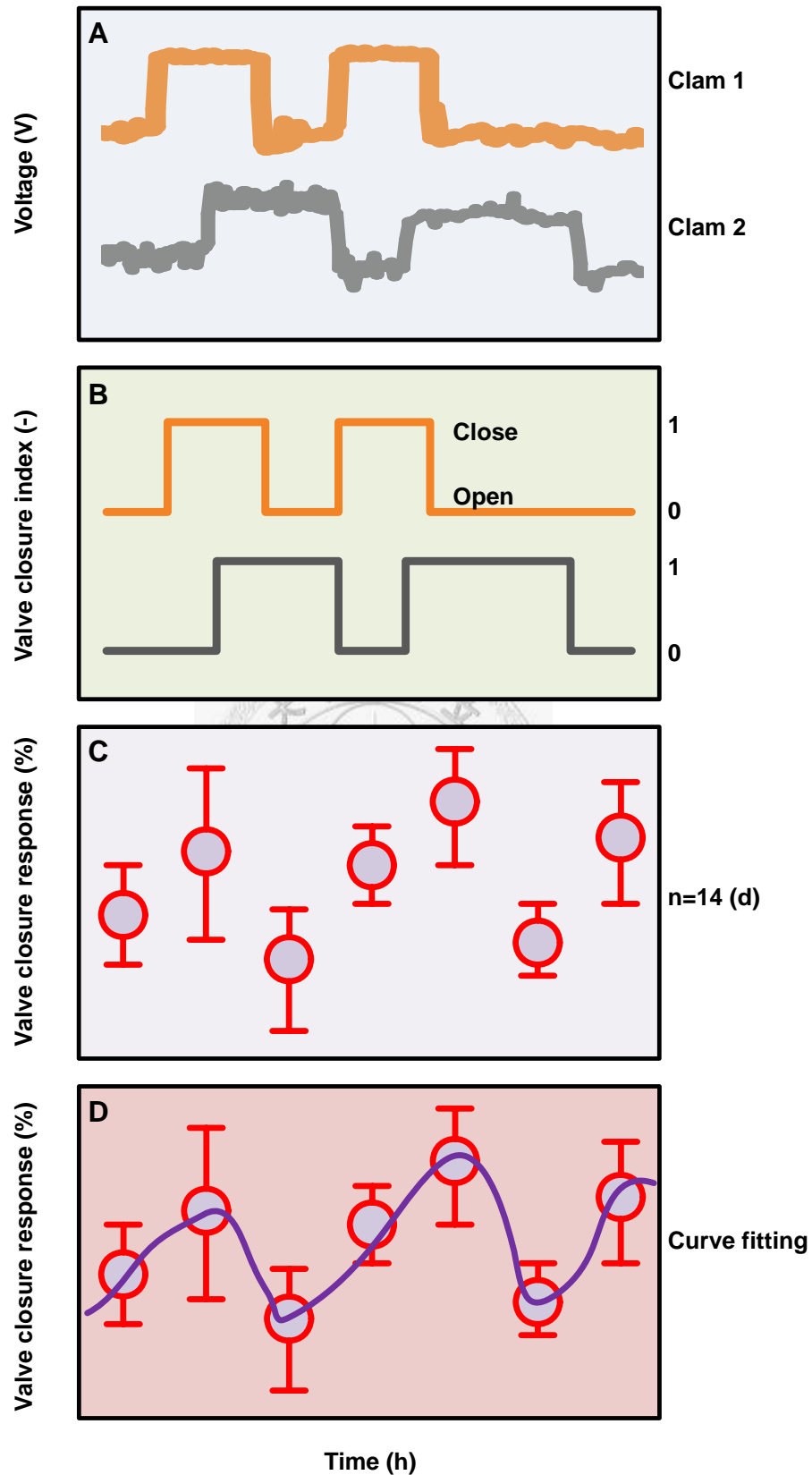


圖 4.5 淡水蜆殼律動資料處理。(A)蜆殼行為監測結果示意圖，(B)蜆殼行為正規化，(C)一群蜆中每日平均閉殼程度，及(D)數學模式擬合。

4.6 數學模式之建構與發展

4.6.1 生物累積模式之應用

本研究使用生物累積模式描述淡水蜆暴露於含砷藻水之吸收與排除過程，若水體中之砷濃度(C_w)不變下，則淡水蜆體內含砷量可由一階單區塊模式加以描述此過程(方程式[3.2])。考慮在吸收階段淡水蜆受砷緊迫時會產生自發性閉殼反應減少與水體接觸，因此可將方程式[3.2]可表示為：

$$C_f(t) = C_f(t=0)e^{-k_2t} + \frac{k_1}{k_2} C_w e^{-k_0t} (1 - e^{-k_2t}), \quad [4.1]$$

其中 k_0 為砷緊迫下淡水蜆攝取水體砷之稀釋速率常數(d^{-1})，當 $k_0=0$ 時代表淡水蜆閉殼反應完全不影響對水體砷之攝取， $k_0>0$ 時代表淡水蜆閉殼反應將減少對水體砷之攝取，而 $k_0=\infty$ 則表示淡水蜆閉殼反應將完全隔絕對砷之攝取。

進行排除階段時，因水體砷濃度 $C_w=0$ ，將方程式[4.1]重新整理並經由線性對數回歸後可表示成：

$$\ln C_f(t) = \ln C_f(t=T) - k_2t, \quad [4.2]$$

其中 T (d)為排除實驗起始時間， $C_f(t=T)$ 則為排除實驗起始時間之淡水蜆體內砷濃度($\mu\text{g g}^{-1}$)。

如圖 4.6 所示，藉由一階單區塊非線性模式擬合吸收與排除實驗數據，可得淡水蜆暴露於砷之毒理動力參數，進而預測時變之淡水蜆體內砷濃度($CL50(t)$)。

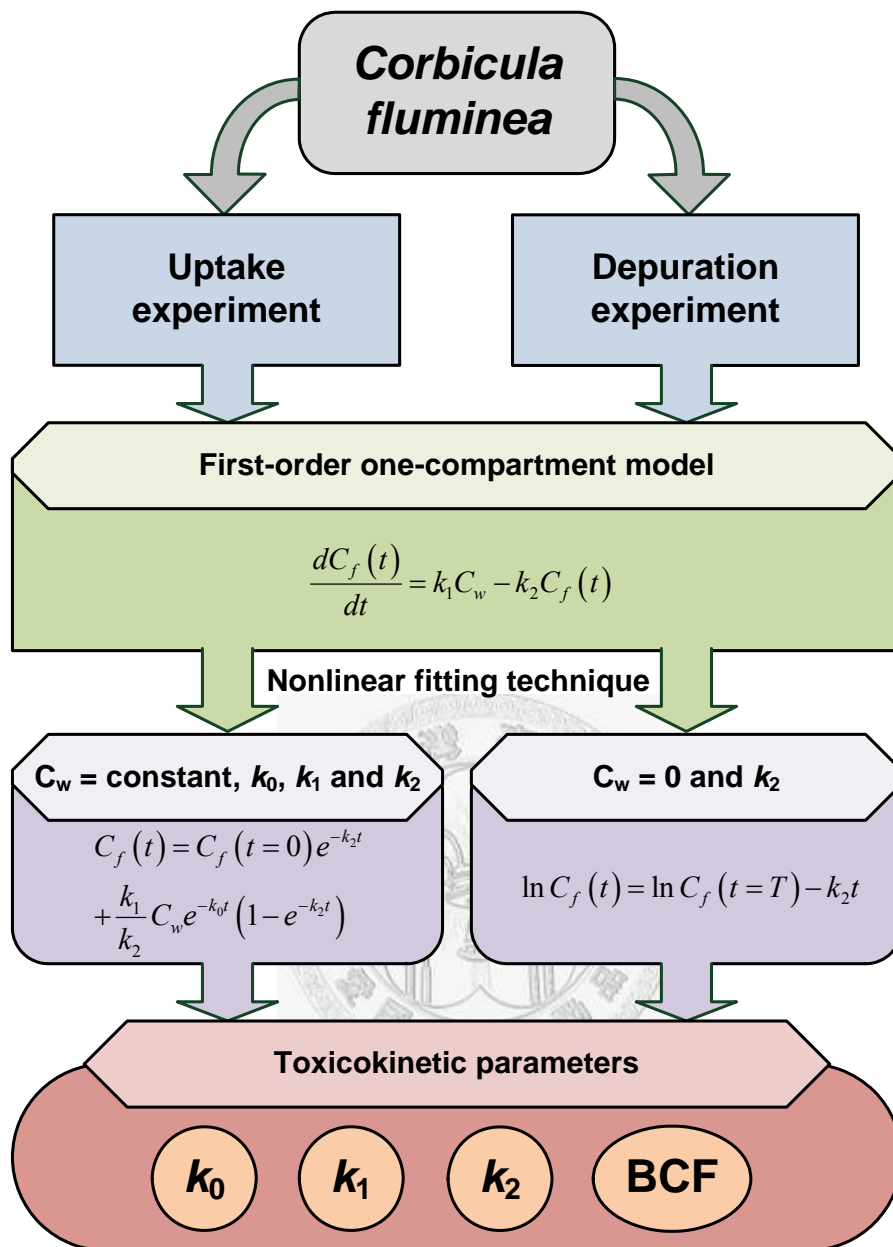


圖 4.6 以一階單區塊生物累積模式描述淡水蜆對砷之吸收與排除。

4.6.2 內部效應濃度為基礎之時變致死率模式

結合暴露實驗與急毒生物試驗之結果，以三種急性毒理動態模式擬合，藉此描述淡水蜆暴露於水體砷下之毒性作用模態，探討外部砷汙染造成體內、外半致死之關係，並評估體內累積濃度之時變死亡率。

如圖 4.7 所示，利用一階單區塊模式與機率單位模式(USEPA Probit Analysis Program, Version 1.5) 計算出生物動力參數(k_1 , k_2 及 BCF)與劑量反應參數(LC50)，將此參數帶入三種急性毒理動態模式(CBR, CAUC及DAM)中，評估最適合描述本實驗結果之模式。接著以Hill模式進一步推求淡水蜆暴露於水體砷之時變死亡率，其方程式如下：

$$M(t_R, C_w) = \frac{M_{\max}}{1 + \left(\frac{\text{LC50}(t)}{C_w} \right)^n} \quad [4.3]$$

式中 M 為淡水蜆暴露於砷之死亡率(%), M_{\max} 為最大死亡率(%). 將方程式[4.3]重新建構為以內部效應為基礎之劑量反應模式，描述體內砷濃度與致死率關係：

$$M(C_f) = \frac{M_{\max}}{1 + \left(\frac{\text{CL50}(\infty)}{C_f} \right)^n} \quad [4.4]$$

其中 $\text{CL50}(\infty)$ 為時間無限長時的內部致死濃度(mg g^{-1})。將方程式[4.1]與急性毒模式所求得之時變內部半致死濃度($\text{CL50}(t)$)帶入方程式[4.4]，可進一步推評估出以內部效應濃度為基礎之時變致死率模式，其方程式表示如下：

$$M(t_R, C_f) = \frac{M_{\max}}{1 + \left(\frac{\text{CL50}(t)}{C_f(t)} \right)^n} \quad [4.5]$$

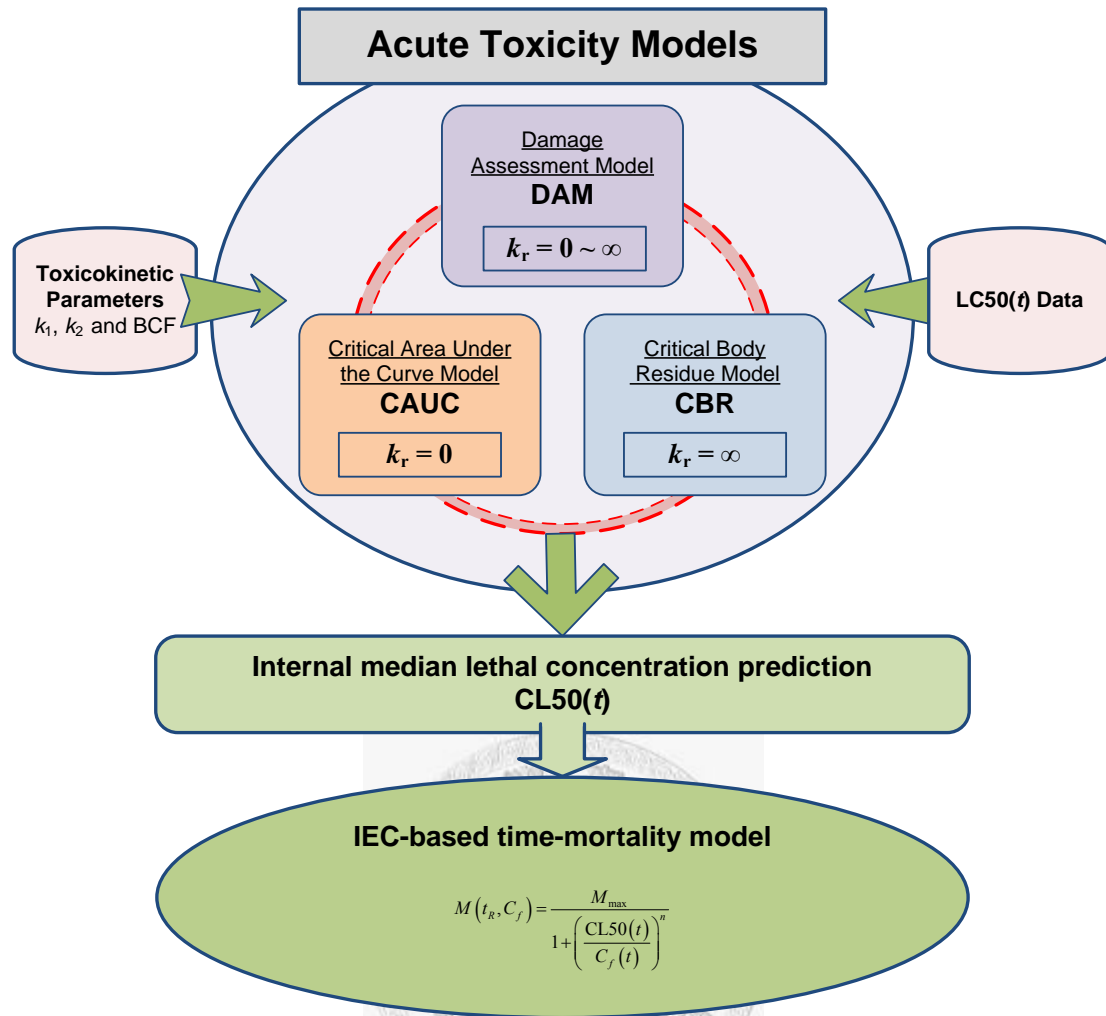


圖 4.7 以內部效應濃度為基礎之時變致死率模式。

4.6.3 蜆殼律動模式

蜆殼律動模式主要為評估淡水蜆暴露於水體砷所造成之行為反應的動態系統方程式，藉由蜆殼律動實驗及蜆殼行為生物試驗之結果，以探討不同砷濃度對淡水蜆之閉殼效應。圖 4.8 為蜆殼律動之數學模式推導與結構圖，本研究採用一非線性四參數正弦函數來描述無砷暴露下時變之淡水蜆開殼情形：

$$\psi(t_R, 0) = B + A \times \sin\left(\frac{2\pi(t + \varphi)}{\tau}\right) \quad [4.6]$$

其中 ψ 為一群蜆當中所造成之開殼比例(-)， t_R 為反應時間(h)， B 為淡水蜆每日平均開殼比例(-)， A 為開殼比例之振幅(-)， φ 為開殼時間之相位差(h)， τ 則為開殼之週期(h)。

當淡水蜆暴露於砷時會產生一自發性閉殼反應，於本研究中以三參數 Hill 模式描述砷對蜆造成之閉殼反應，其方程式如下：

$$R(t_R, As) = \frac{R_{\max}(t_R) \times As^{n(t_R)}}{[EC50(t_R)]^{n(t_R)} + As^{n(t_R)}} \quad [4.7]$$

式中 R 為淡水蜆於砷緊迫下之閉殼反應(%), R_{\max} 為最大閉殼反應， n 為造成閉殼反應之斜率因子(Hill係數) (-)， $EC50$ 為造成半數最大閉殼效應時水體砷濃度(mg L⁻¹)。

考慮每日閉殼反應為自發性閉殼與砷緊迫造成的閉殼反應累加之結果，將蜆殼生物試驗之結果帶入方程式[4.7]所求得時變的 $EC50$, R_{\max} 以及 n ，可用來預測不同砷濃度下任意時間點之淡水蜆開殼比例(%)：

$$\psi(t_R, As) = \psi(t_R, 0)(1 - R(t_R, As)) \quad [4.8]$$

結合方程式[4.6]及方程式[4.8]，將此重新整理並簡化後可得不同砷濃度對蜆造成之閉殼反應(%)：

$$R(t_R, As) = [\psi(t_R, 0) - \psi(t_R, As)] / \psi(t_R, 0) \quad [4.9]$$

本研究之非線性方程式皆以 TableCurve 2D (Version5, AISN Software Inc., Mapleton, OR, USA)中之最小平方法擬合實驗數據以求得各項參數。



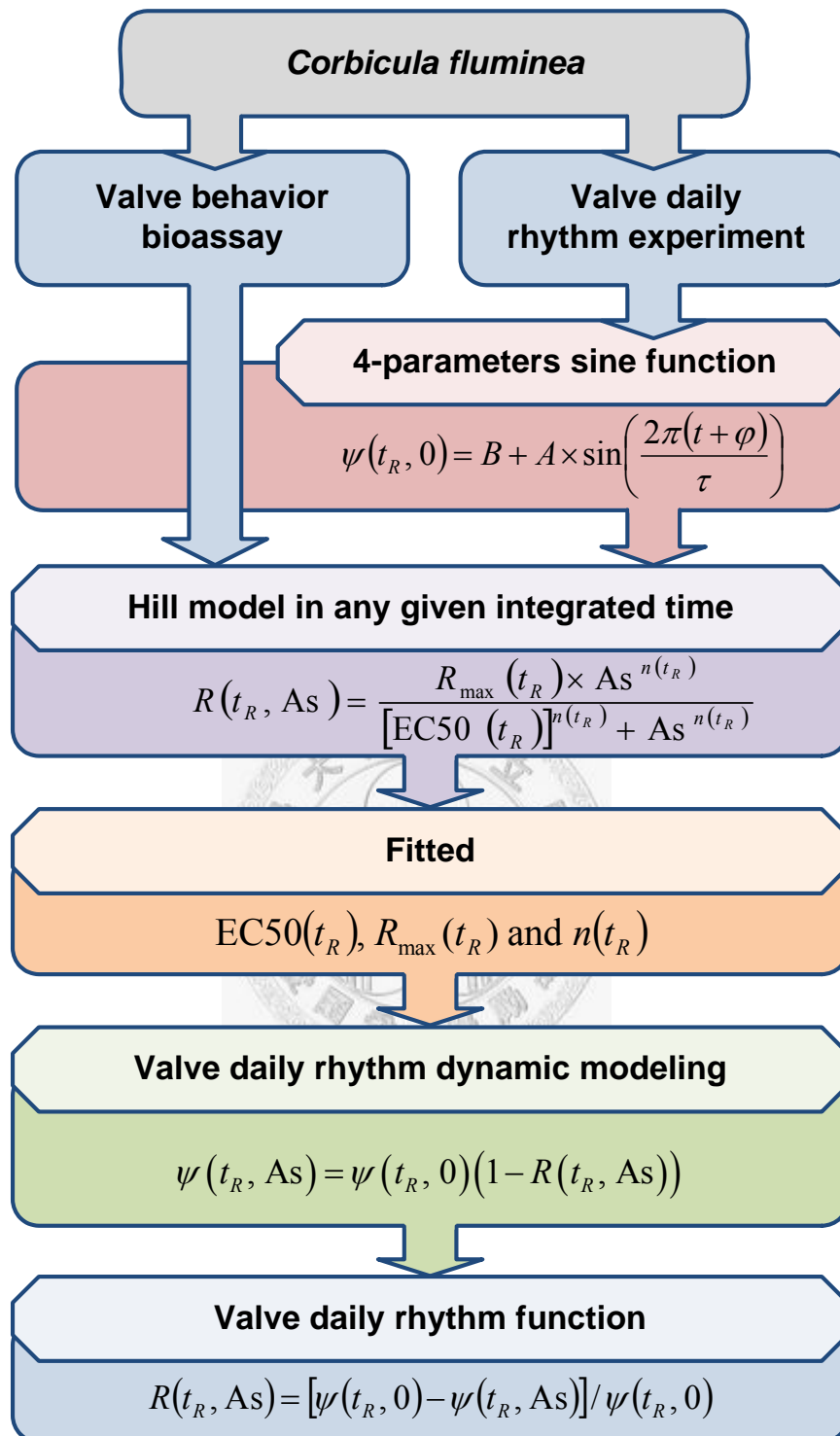


圖 4.8 蜆殼律動之數學模式推導與結構圖。

第五章、結果與討論

5.1 淡水蜆對砷之生物濃縮

本研究探討不同砷濃度下對淡水蜆造成的生理與化學反應，其馴養與實驗的藻水條件經量測與分析結果如下：

- (1) 水質條件：水溫 = 24.26 ± 1.26 °C，pH值 = 7.96 ± 0.14 ，溶氧 = 8.3 ± 0.28 mg L⁻¹，鹽度 = 0.10 及濁度 = 22.88 ± 0.13 NTU。
- (2) 離子組成：Ca²⁺ = 24.8 mg L⁻¹，Mg²⁺ = 1.0 mg L⁻¹，Na⁺ = 4.9 mg L⁻¹，K⁺ = 2.7 mg L⁻¹，H⁺ = 7.21 mg L⁻¹，NH₄⁺ = 0.26 mg L⁻¹，Cl⁻ = 7.6 mg L⁻¹，NO₂⁻ = 0.047 mg L⁻¹ 及 NO₃⁻ = 0.318 mg L⁻¹。
- (3) 光照週期：使用定時器控制燈具(PL-36W-7200K)，照明時間模擬 12 小時(10:00 – 22:00)白天及 12 小時(22:00 – 10:00)夜間。

將淡水蜆進行為期 14 天暴露試驗(June 10 – 23, 2007)，於每日監測淡水蜆體內總砷濃度，藉此瞭解蜆隻體內時變砷濃度關係。表 5.1 為實驗期間每日蜆隻體內砷含量化驗結果，可得淡水蜆於砷濃度 5 mg L⁻¹下暴露 72 小時達到體內砷濃度累積之最大值 12.10 µg g⁻¹ dry wt，而排除實驗初始砷濃度為淡水蜆暴露 168 小時後之體內砷濃度 4.71 µg g⁻¹ dry wt。

本研究利用一階單區塊生物累積模式擬合暴露試驗數據，以得最佳擬合曲線，並求出此最佳曲線下之生物動力參數，圖 5.1 A 為吸收階段淡水蜆體內砷濃度與時間之關係圖。以方程式[4.1]計算受砷緊迫時淡水蜆自發性閉殼反應對砷攝取之影響程度，並評估淡水蜆暴露於砷中之吸收與排除速率常數，其 k_0 , k_1 及 k_2

表 5.1 淡水蜆暴露實驗組織含砷量 (Mean \pm SD)

Time (h)	Arsenic concentrations in tissues ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt)	
	Uptake phase	Depuration phase
0	0	4.71 \pm 1.95
24	6.75 \pm 1.22	3.64 \pm 0.82
48	11.91 \pm 5.27	3.41 \pm 1.26
72	12.10 \pm 6.65	3.35 \pm 1.04
96	6.63 \pm 1.24	3.31 \pm 0.80
120	6.50 \pm 2.86	2.90 \pm 0.54
144	8.08 \pm 4.61	2.46 \pm 0.87
168	4.71 \pm 1.95	2.44 \pm 0.97

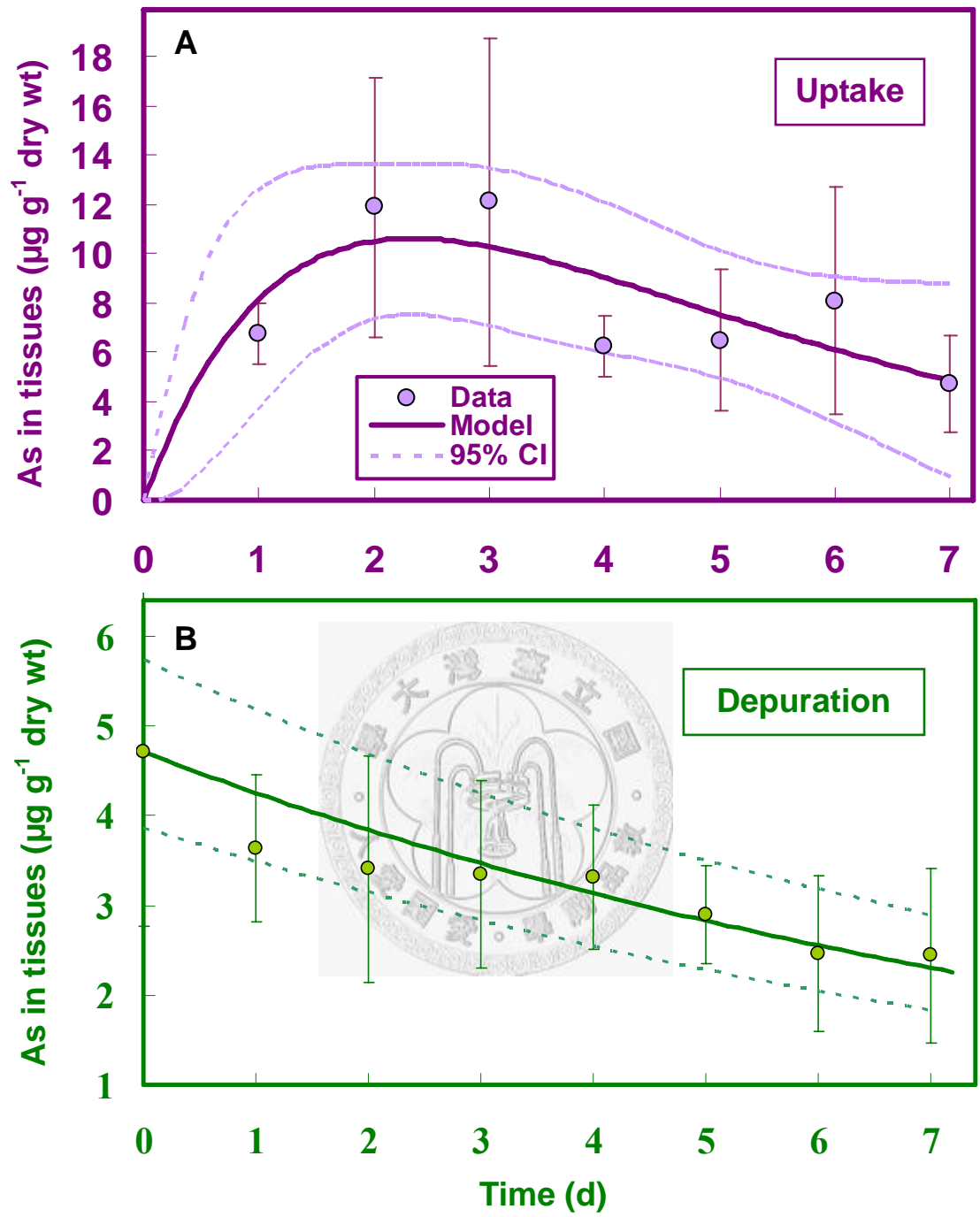


圖 5.1 淡水蜆暴露實驗體內砷濃度與時間關係圖。(A)吸收階段及(B)排除階段。

值分別為 $0.263 \pm 0.33 \text{ d}^{-1}$, $1.718 \pm 6.70 \text{ mL g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ 及 $0.392 \pm 1.76 \text{ d}^{-1}$ (表 5.2)。圖 5.1 B 則為排除階段淡水蜆體內砷濃度與時間之關係圖，將暴露於砷中 7 天後之淡水蜆置入無砷汙染環境進行排毒試驗，經由方程式[4.2]可推求出無砷汙染下淡水蜆之 k_2 值為 $0.102 \pm 0.007 \text{ d}^{-1}$ (表 5.2)。根據圖 5.1 實驗結果顯示，利用一階單區塊模式來描述短期砷暴露試驗，無論是吸收或排除階段， r^2 值皆大於 0.8，故對本實驗而言，一階單區塊模式之適用性頗佳，可用來進一步預測淡水蜆隨時變體內砷累積之情形。

Thorsen 等(2007)指出，雙殼貝類暴露於汙染物初期具有快速累積的能力，根據圖 5.1 A 之實驗結果可得到相同趨勢，淡水蜆於 48 小時內便達到很高的砷累積量，當累積一段時間(72 小時)後，可看到淡水蜆體內砷含量有逐漸下降之趨勢，其可能原因為淡水蜆組織器官的累積量漸達臨界值，蜆隻開始產生強烈排毒作用，將體內的砷加速排出體外，使得排除速率大於吸收速率(鄭，2003)。

Wildridge 等(1998)與 Kadar 等(2001)提出淡水蜆自發性閉殼反應為一自我保護機制，以減少與外界汙染物接觸。本論文中採用一速率常數 k_0 來描述此觀點，亦可得較佳之擬合，證實淡水蜆之外殼的確具有隔絕汙染物之能力。Walsh 等(1994)研究中也指出，生物可藉由堆積外骨骼之過程，將體內的重金屬轉移至外殼，以降低重金屬對生物體之毒害。因此淡水蜆殼是否具有累積重金屬之能力，以及是否能反應出當時環境之汙染狀況，未來仍需更加深入研究。

考慮不同階段排除數率常數之差異，可發現吸收階段之 k_2 值為排除階段的 3.84 倍，其原因可能為當淡水蜆受到砷緊迫下體內調控之結果，使其產生較高的排毒作用，同時因生物濃縮為考慮吸收與排除之競爭結果，若是以吸收階段之排除數率常數會較為準確，故本研究採用此階段之 k_2 值進行更進一步評估生物濃

表 5.2 淡水蜆暴露實驗之生物動力參數

As-clam system	Uptake phase	Depuration phase
k_0 (d ⁻¹) ^a	0.263 ± 0.33	–
k_1 (mL g ⁻¹ d ⁻¹) ^a	1.718 ± 6.70	–
k_2 (d ⁻¹) ^{a,b}	0.392 ± 1.76	0.102 ± 0.007
BCF (mL g ⁻¹) ^c	4.38	–
$t_{1/2}$ (d) ^d	1.78	6.80
r^2	0.81	0.85

^a吸收階段之吸收速率常數(k_1)及排除速率常數(k_2)，可由方程式[4.1]求得。

^b排除階段之排除速率常數(k_2)，可由方程式[4.2]求得。

^c平衡時之生物濃縮因子(BCF)，可由 $BCF = k_1/k_2$ 求得。

^d排除半衰期($t_{1/2}$)，可由 $\ln 2/k_2$ 求得。

縮因子。由式 $BCF = k_1/k_2$ 可得知淡水蜆暴露於砷之BCF值為 4.38 mL g^{-1} ，比較其他水域生物對砷之BCF，Tsai與Liao (2006)利用吳郭魚(*Tilapia, Oreochromis mossambicus*)進行短期砷暴露實驗，其BCF為 $2.68 \pm 1.12 \text{ mL g}^{-1}$ ；而Chou等(2006)研究中亦得知虱目魚(*Milkfish, Chanos chanos*)對砷之BCF為 1.24 mL g^{-1} ，其BCF分別為淡水蜆的 0.61 及 0.28 倍，顯示淡水蜆對水域中的砷有極高之累積能力。



5.2 急毒效應

將淡水蜆進行 96 小時急性砷毒試驗(February 5 – 9, 2007)，監測其不同時間(0, 12, 24, 48, 72 及 96 h)下蜆隻死亡數量(表 5.3)。由表 5.3 可得知淡水蜆暴露於砷濃度 5 mg L^{-1} 以下時，經過 96 小時未見蜆隻有死亡情形，與暴露實驗結果相符；當砷濃度大於 200 mg L^{-1} 時，蜆隻於 24 小時內全部死亡，而砷濃度大於 1000 mg L^{-1} 時 12 小時內蜆隻將全部死亡。

本研究採用機率單位分析軟體(USEPA Probit Analysis Program, Version 1.5)中最大概似推估法(Maximum likelihood estimates)以線性函數的方式對砷濃度取對數計算 12, 24, 48, 72 及 96 小時等時間的半數致死濃度(LC50) (Finney, 1971)。將表 5.3 中蜆隻於不同砷濃度下之時變死亡率代入，可得各時間淡水蜆對砷的半數致死濃度(表 5.4)。如表 5.4 所示，淡水蜆對砷之 24 小時 LC50 為 104.10 (77.45 – 140.84) mg L^{-1} ，而 96 小時之 LC50 為 20.74 (11.74 – 30.79) mg L^{-1} 。

魏等(1985)以汞、銅、鎘、鉛、鎳、錳、鐵等七種重金屬進行淡水蜆急毒試驗，經研究報告顯示 96 小時之 LC50 分別為 1.50, 4.98, 173, 1632, 1124, 199, 2213 mg L^{-1} ，與本論文比較可得知重金屬 – 砷對淡水蜆之毒性僅次於汞與銅，其毒性強弱依序為汞 > 銅 > 砷 > 鎘 > 錳 > 鎳 > 鉛 > 鐵。比較不同水域生物對砷之半數致死濃度，淡水蜆 96 小時 LC50 值介於美國旗魚(Flagfish, *Jordanella floridae*) 14.4 mg L^{-1} 及虹鱒魚(Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*) 23 – 26.6 mg L^{-1} 之間且與其他魚類(如：虱目魚及吳郭魚等) 96 小時 LC50 值相當接近，表示魚貝類有著比水蚤(Cladoceran, *Daphnia pulex*) 等無脊椎動物更高之對砷忍受能力(表 5.5)。

表 5.3 急性毒試驗各時段淡水蜆死亡情形

As nominal concentration (mg L ⁻¹)	Exposure time (h)					
	0	12	24	48	72	96
	Observed mortality numbers (<i>n</i> =10)					
0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	1	1	2
25	0	0	0	3	5	6
50	0	0	1	6	8	8
100	0	0	3	9	9	10
200	0	6	10	10	10	10
500	0	9	10	10	10	10
1000	0	10	10	10	10	10

表 5.4 急性毒試驗各時間淡水蜆對砷的半數致死濃度 (Mean with 95% CI)

Time (h)	LC50 (mg L ⁻¹)
12	215.15 (156.34 – 309.92)
24	104.10 (77.45 – 140.84)
48	35.79 (22.72 – 52.78)
72	26.79 (16.11 – 39.74)
96	20.74 (11.74 – 30.79)



表 5.5 水域生物對砷(As^{3+})之 96 小時半數致死濃度^a

Species	96-hr LC50 (mg L ⁻¹)
Cladoceran, <i>D. pulex</i>	1.3
Cladoceran, <i>S. serrulatus</i>	0.81
Flagfish, <i>J. floridae</i>	14.4
Zebrafish, <i>B. rerio</i>	28.1
Rainbow trout, <i>O. mykiss</i>	23 – 26.6
Milkfish, <i>C. chanos</i> ^b	7.29
Tilapia, <i>O. mossambicus</i> ^c	28.68
Asiatic clam, <i>C. fluminea</i> ^d	20.7

^a 蔡(2005).

^b Chou et al. (2006).

^c Liao et al. (2004).

^d This study.

分析不同時間下之LC50除了可用機率單位法外，亦可採用Hill於1910年所提出的劑量反應模式(方程式[3.14])來加以驗證。圖 5.2 A所示為以Hill模式擬合淡水蜆暴露於砷 96 小時下不同砷濃度與死亡率之關係圖，經最佳擬合結果得知最大死亡率、96 小時之LC50 及斜率因子分別為 100 %、20.74 mg L⁻¹及 1.89。此結果與機率單位法所求得之 96 小時LC50 相同，表示此兩種分析方法皆能計算出不同時間下之淡水蜆半數致死濃度。

將機率單位法評估之不同時段LC50 值以指數函數分析，可得其關係式為 $LC50(t) = 21.83 e^{6.12-0.07t}$ ($r^2 = 0.99$)，藉由此式即可粗略推估當淡水蜆暴露於砷汙染下時變之LC50，並得知當時間無限大之半數致死濃度LC50(∞)值為 21.83 mg L⁻¹(圖 5.2 B)。



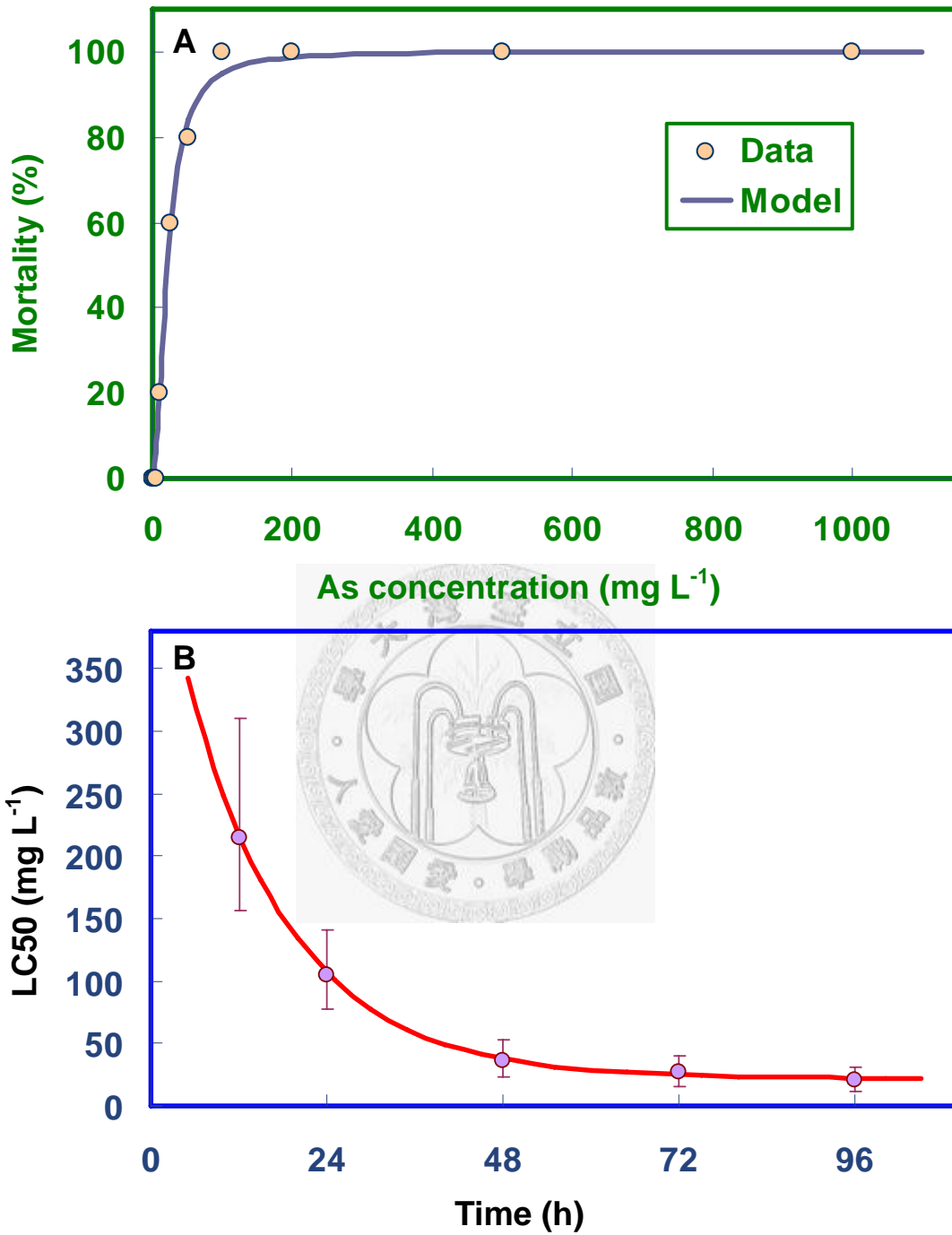


圖 5.2 淡水蜆急毒生物試驗。(A) 96 小時下之砷濃度與死亡率及(B)不同時間與 LC50 值之關係。

5.3 急性毒模式應用

以三種急性毒理動態模式(關鍵體內濃度(CBR)、關鍵濃度曲線面積(CAUC)及損害評估模式(DAM))探討砷緊迫對淡水蜆之急性毒，擬合不同時間外部半致死濃度實驗資料(LC50)，進而推求不同暴露時間下外部砷緊迫對淡水蜆造成之內部半致死濃度(CL50)，並比較三者差異並找出最適合描述此實驗結果之模式。

將暴露實驗之生物動力參數(k_1 , k_2 及BCF)與急毒生物試驗之劑量反應參數(LC50)的結果分別帶入三急性毒模式(方程式[3.3]、[3.8]及[3.12])，經曲線配套軟體(TableCurve 2D)最佳化擬合，可得淡水蜆之初始半致死濃度(LC50(∞))、濃度曲線面積(AUC)、半致死損害程度係數(DL50/ k_a)及損害恢復率常數(k_r)等各項參數，其評估之參數值如表 5.6 所示。

各項輸入與評估出來之參數(k_1 , k_2 , BCF, LC50(∞), AUC, DL50/ k_a 及 k_r)分別帶回方程式[3.3]、[3.8]及[3.12]，即可得到以三種急性毒理動態模式下之時變外部半致死濃度(LC50(t)) (圖 5.3A)，而時變之內部半致死濃度(CL50(t))則可透過將各項毒理參數代入方程式[3.4]、[3.9]及[3.13]後求得，其結果如同圖 5.3C所示。

比較三種急性毒模式之LC50 資料與模式預測結果，透過均方根誤差法(Root mean square error, RMSE)計算得知DAM為最佳擬合之模式($r^2 = 0.98$, RMSE = 9.47 mg L⁻¹)，其次為CAUC模式($r^2 = 0.97$, RMSE = 17.76 mg L⁻¹)，而CBR模式可能因模式較為簡單，只能做粗略估計，擬合度為三者最差($r^2 = 0.86$, RMSE = 44.70 mg L⁻¹) (圖 5.3B)。

以 CBR、CAUC 及 DAM 模式來評估化學物質對水域生物之急性毒於近來年被廣泛應用於環境毒理學領域(McCarty 等，1992、1993；Legierse 等，1993；

表 5.6 以三種急性毒理動態模式(CBR, CAUC 及 DAM)最佳化擬合淡水蜆暴露實驗與急毒生物試驗輸入及輸出之參數值

Parameter	CBR	CAUC	DAM
Input parameters			
k_1 (mL g ⁻¹ d ⁻¹)	1.72	1.72	1.72
k_2 (d ⁻¹)	0.39	0.39	0.39
BCF (mL g ⁻¹)	4.38	4.38	4.38
Parameter estimates			
LC50(∞) (mg L ⁻¹)	21.83	26.83	21.41
AUC ($\mu\text{g d}^{-1} \text{g}^{-1}$)	-	38.95	-
DL50/ k_a ($\mu\text{g d}^{-1} \text{g}^{-1}$)	-	-	25.94
k_r (d ⁻¹)	-	-	3.62
CL50(∞) ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt)	95.62	95.74	93.65
r^2	0.86	0.97	0.98

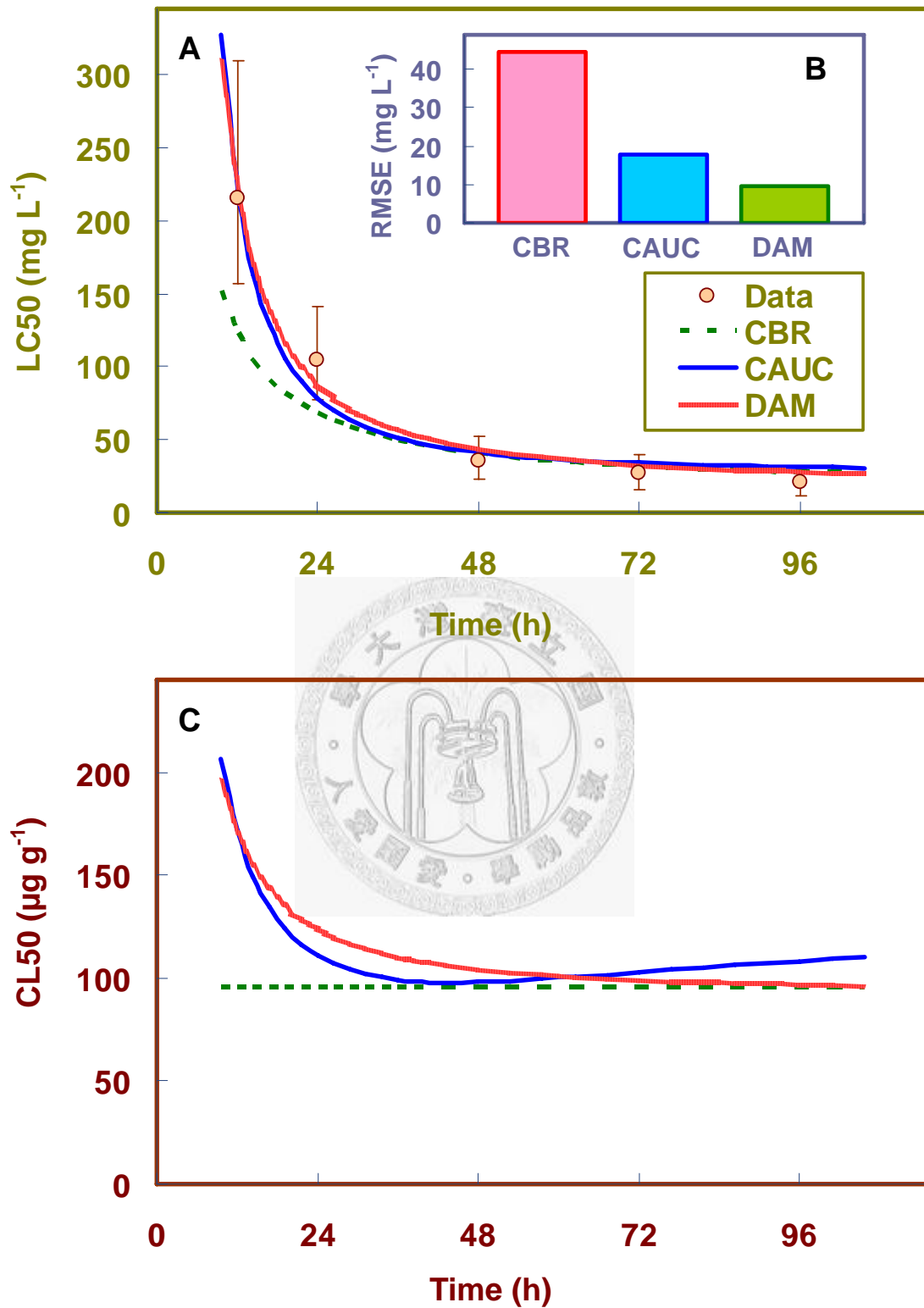


圖 5.3 以三種急性毒理動態模式最佳化擬合淡水蜆暴露於砷。(A)外部半致死濃度，(B)以均方根誤差法比較三模式預測與實驗結果差異及(C)內部半致死濃度。

Lee 等，2002；Liao 等，2004、2005、2007a；Schuler 等，2004、2007；Tsai 等，2005、2006；Vigano 等，2007；Mehler 等，2008)。本研究探討此三種急性毒模式並應用於淡水蜆－砷之系統，CBR 模式主要以可逆觀點考慮生物體內部所能承受之毒性物質關鍵濃度，CAUC 模式則以完全不可逆之觀點指出關鍵濃度曲線面積與毒性物質佔據總量有關，而 DAM 模式則敘述毒性物質於生物體內可逆與不可逆之作用模態。Schuler 等(2004)指出 DAM 模式較能完整解釋時變之毒理行為，並以毒理動力及動態觀點去描述影響之關係。同時 DAM 模式亦說明了生物體內的化學物質排除機制並非唯一的過程，當化學物質排除生物體後還須透過體內修補機制修復器官功能(Lee 等，2002；Schuler 等，2004)。



5.4 內部半致死與時變致死率

Lee 等(2002、2006)指出損害評估模式(DAM)為一結合毒理動力及動態之模式，可用來評估時變之毒性效應，其真正決定毒性強度的除了生物體內污染物的濃度外，還包過生物體累積損害之程度。比較三種急性毒模式(CBR、CAUC 及 DAM)得知 DAM 模式無論毒理機制或擬合結果皆為描述淡水蜆暴露於砷之最佳急性毒模式，其時變之外部與內部半致死濃度如圖 5.4 A 及 B 所示。

因此本研究考慮以損害評估模式為基礎，採用三參數Hill模式(方程式[3.14])描述淡水蜆暴露於砷緊迫下之死亡率。將表 5.3 不同時間下水體砷濃度對淡水蜆死亡率資料，及表 5.4 不同時間下外部半致死濃度(LC50($t = 12, 24, 48, 72$ 及 96 h))代入方程式[4.3]，經由最佳化擬合後可得不同時段之 n 值為 1.89 - 3.19，而 96 h 之 $n = 1.89$ ($r^2 = 0.99, p < 0.05$) (圖 5.5 A)。根據最佳化擬合得到之 r^2 值為 0.99 且Hill係數皆大於 1，此結果說明以DAM為基礎之Hill模式來描述半致死濃度與死亡率關係具有相當高的擬合程度。

經由損害評估模式(方程式[3.13])得知時間無限長時的內部半致死濃度(CL50(∞))值為 93.65 (95% CI 32.97 - 154.33) $\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt，將CL50(∞)值結合方程式[4.3]計算出之 n 值代入以內部效應為基礎之劑量反應模式(方程式[4.4])，即可推求淡水蜆體內砷濃度與致死率之間的關係(圖 5.5 B)。如圖 5.5 B所示，當淡水蜆體內之砷濃度為 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt時，所對應之死亡率為 80.75 (95% CI 62.01 - 96.79) %，顯示淡水蜆體內砷濃度若高於 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt時，將有八成以上蜆隻發生死亡情形。由圖 5.5 B亦可得知當淡水蜆死亡率為 20 %時，所對應之體內砷濃度為 44.98 (95% CI 15.84 - 74.12) $\mu\text{g g}^{-1}$ dry wt，表示如要將淡水蜆之死亡率控制在

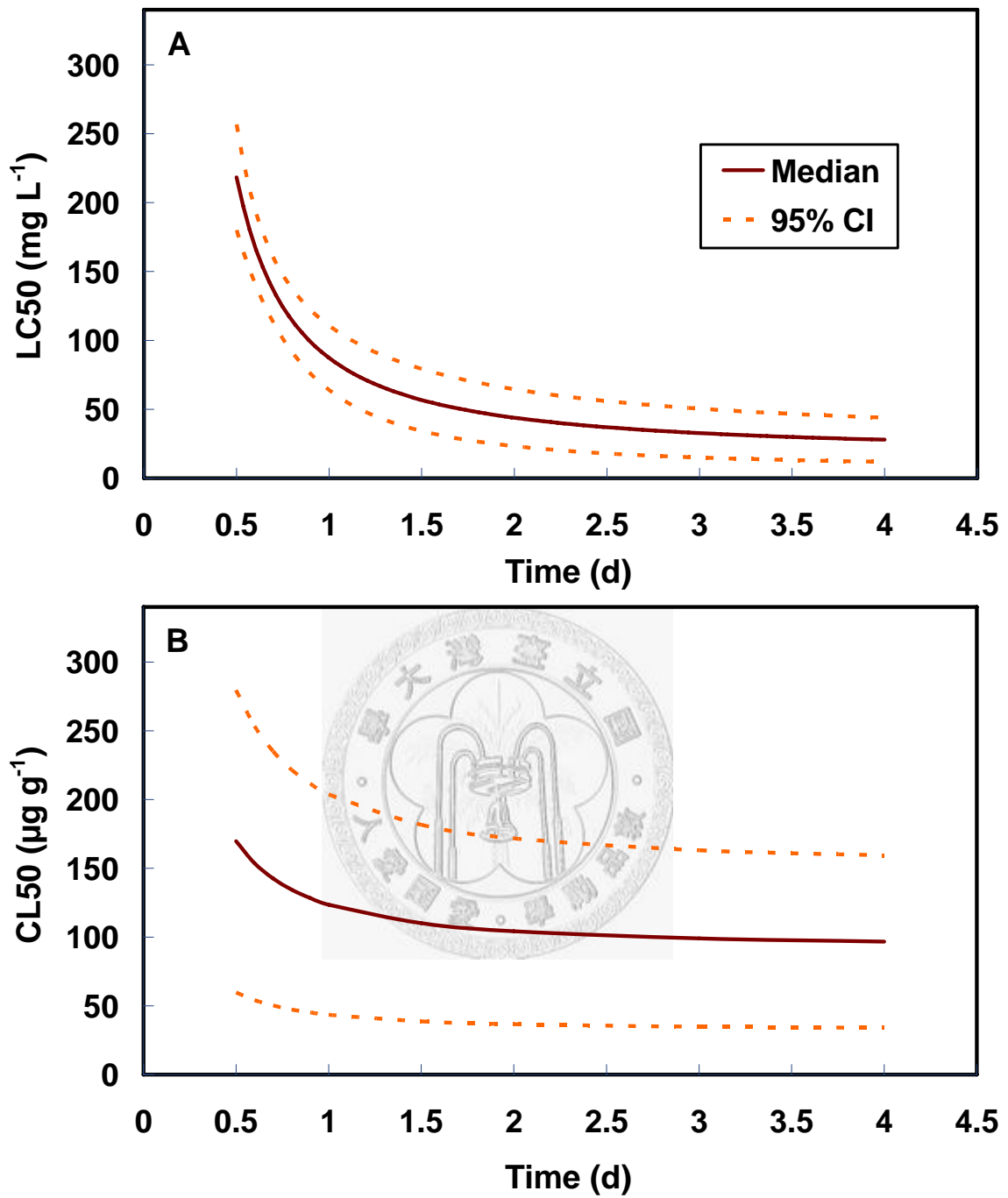


圖 5.4 以損害評估模式(DAM)最佳化擬合淡水蜆暴露於砷。(A)外部半致死濃度及(B)內部半致死濃度。

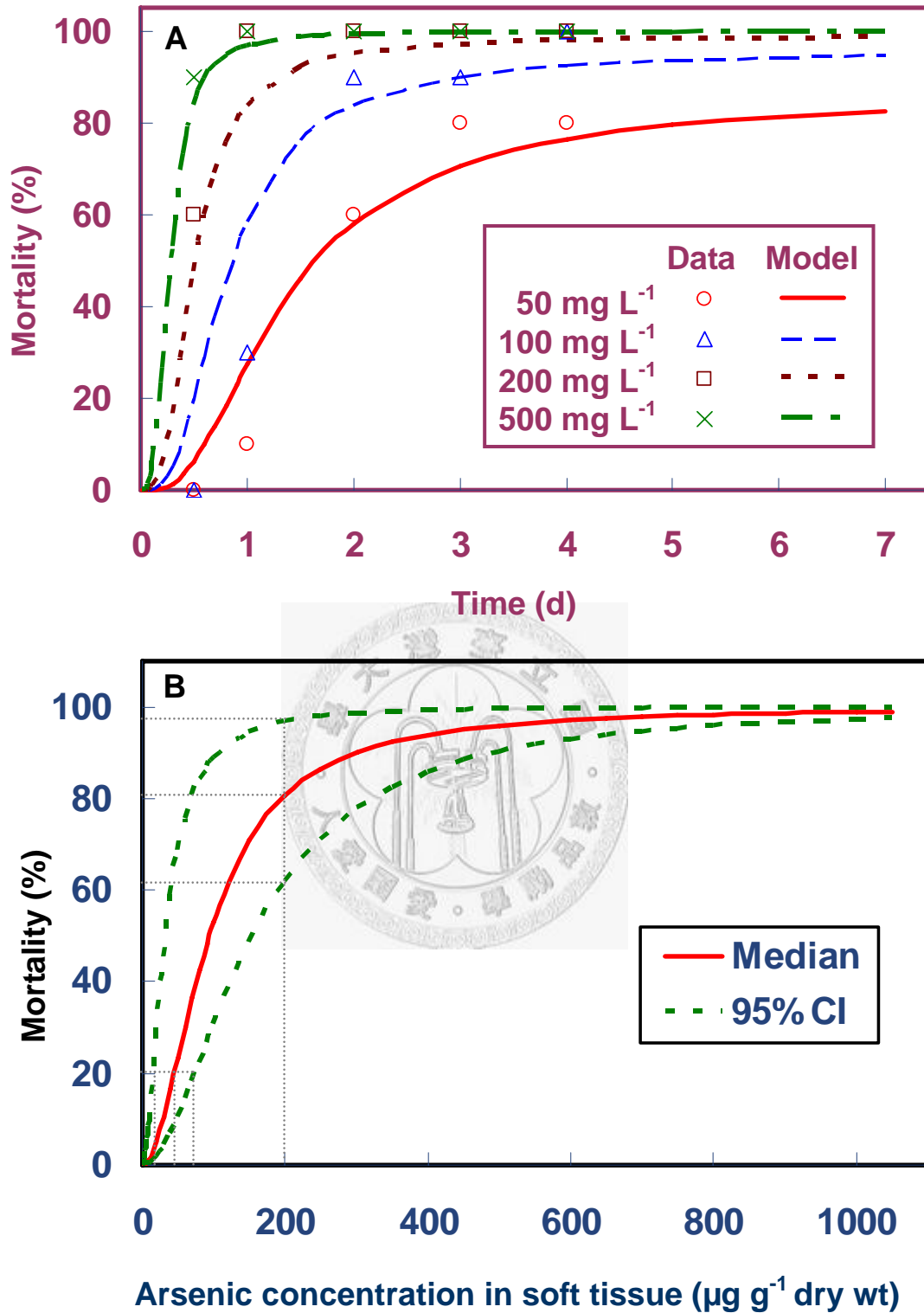


圖 5.5 淡水蜆暴露於砷之死亡率。(A)不同水體砷濃度之時變死亡率、(B)體內砷濃度與致死率之關係及(C)內部效應濃度為基礎之時變致死率模式預測結果。

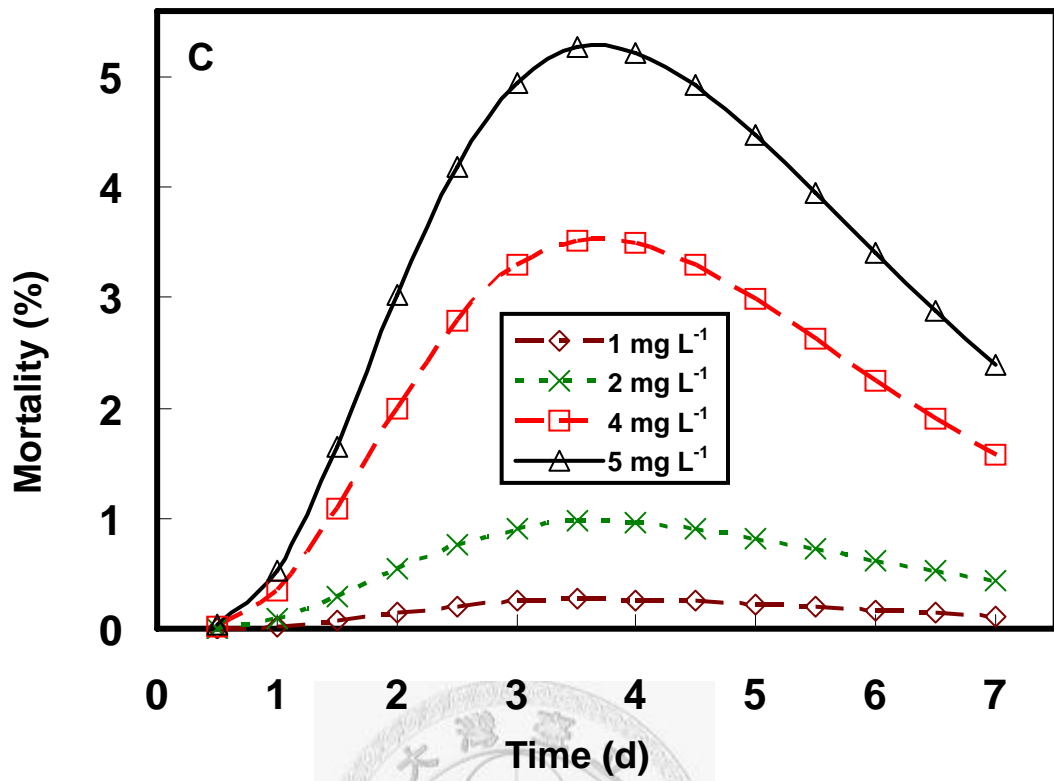


圖 5.5 續。

20%以內，其體內砷濃度將不得超過 $44.98 \mu\text{g g}^{-1}$ dry wt。將時變內部半致死濃度

($CL50(t)$)及時變體內砷濃度($C_f(t)$)代入方程式[4.5]則可進一步評估出以內部效應濃度為基礎之時變致死率(IEC-based time-mortality) (圖 5.5 C)。如圖 5.5 C所示，當淡水蜆暴露於砷濃度 $1-5 \text{ mg L}^{-1}$ 時，隨著時間的改變會有不同的砷累積情形與外部半致死濃度，造成不同的淡水蜆死亡率，同時因淡水蜆暴露於砷受到收緊迫下自發性閉殼反應將導致減少與水體砷接觸，因此約暴露三日後淡水蜆體內累積的砷含量與死亡率逐漸下降。

本論文中以內部效應濃度為基礎之時變致死率模式(方程式[4.5])成功應用於淡水蜆暴露於砷之急慢性毒模擬，可將砷暴露時間(t)、死亡率(M)、水體砷濃度(C_w)及蜆隻體內砷濃度(C_f)之間互相轉換並套用至養殖管理上，藉由養殖池內淡水蜆死亡情形判斷水體砷汙染程度及淡水蜆體內砷含量，進而評估攝食這些蜆隻是否造成風險與危害，也可使養殖業者估算欲控制之淡水蜆死亡率或產量所對應的水質條件，並提供更多環境品質標準與管理政策上的發展機會。



5.5 淡水蜆每日律動特性

本論文以淡水蜆殼量測裝置進行為期 14 天蜆殼每日律動實驗(April 3 – 17, 2007)，監測無污染物暴露下淡水蜆每日開、閉殼律動之狀態並記錄與分析。將 16 隻架設感測器代測之淡水蜆透過差動放大電路及資料擷取卡讀取蜆殼狀態電壓訊號，並將此電壓訊號傳輸至個人電腦內部以 LabVIEW 圖控式程式語言軟體即時呈現與記錄。

圖 5.6 為 16 隻淡水蜆殼律動監測記錄的電位狀態圖，當淡水蜆閉殼時會將蜆殼兩側之感測器距離拉近，進而得到較高之電位差；反之，淡水蜆開殼時將得到一較低之電位差，藉由此電位之改變即可瞭解相對應之蜆殼開、閉情形。由圖 5.6 中可得知淡水蜆殼律動具有非開即關之特性，並隨著時間有著週期性的變化，該結果與 Ortmann 等(2003)觀測出來之蜆殼律動結果極為相似(圖 3.2 B)。本研究將此監測電壓記錄予以正規化，採取每隻淡水蜆量測最高與最低電壓值之平均，如大於此平均值則判定為閉殼(0)，小於平均值為開殼(1)，其開、閉殼狀態如圖 5.7 所示。

欲將圖 5.7 中 16 隻正規化的淡水蜆狀態進行開殼機率分析，可採每日各時段之開殼機率取平均值，以觀察到 14 天內平均每 5 分鐘蜆殼開殼機率之變化(圖 5.8 A)。如圖 5.8 A 所示，此方法雖可描繪出蜆殼律動之趨勢，但卻無法看出淡水蜆每日同時段間律動之差異性；有鑑於此，本論文採取逐時為單位，將一日中每小時內 12 筆數據平均，可得平均每小時內蜆殼開殼機率，並利用 14 天的每小時蜆殼開殼機率求出每日同一時段淡水蜆開殼機率之平均(Mean)與標準偏差(SD)，其結果如圖 5.8 B 所示。

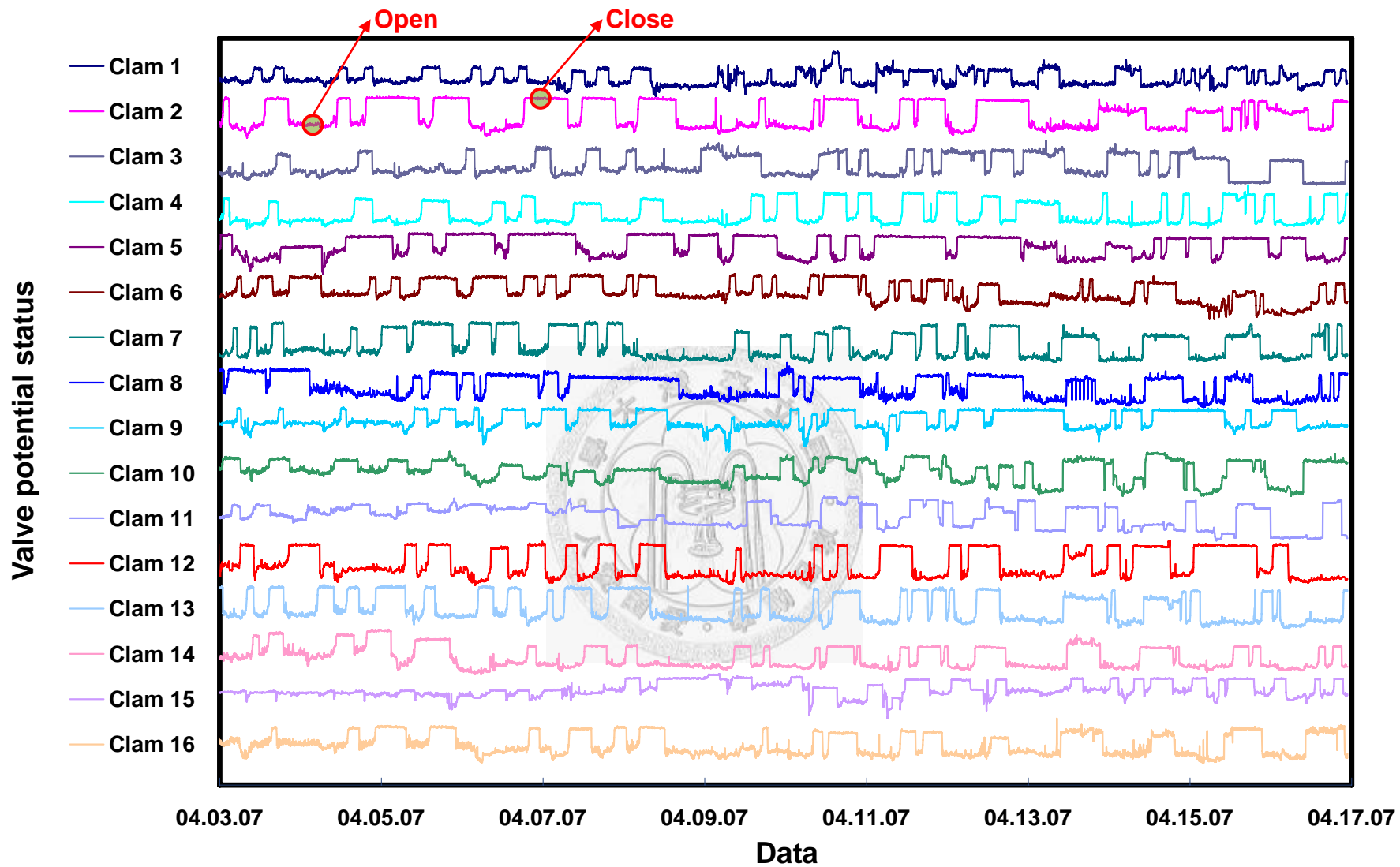


圖 5.6 以淡水蜆監測裝置連續量測 14 日(April 3 – 17, 2007)之蜆殼律動電位狀態圖。

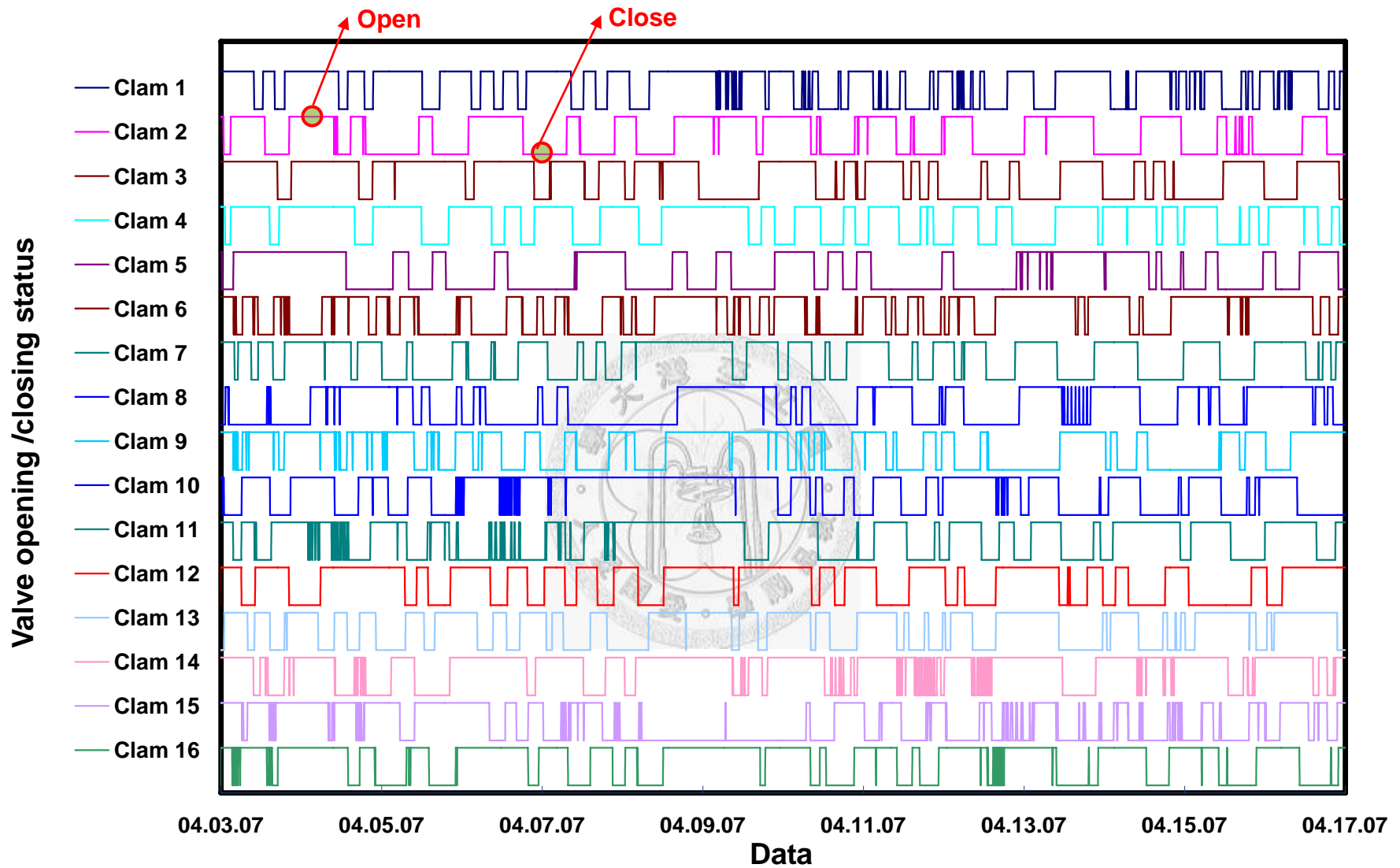


圖 5.7 連續監測 14 日 (April 3 – 17, 2007) 之淡水蜆殼開殼/閉殼狀態圖。

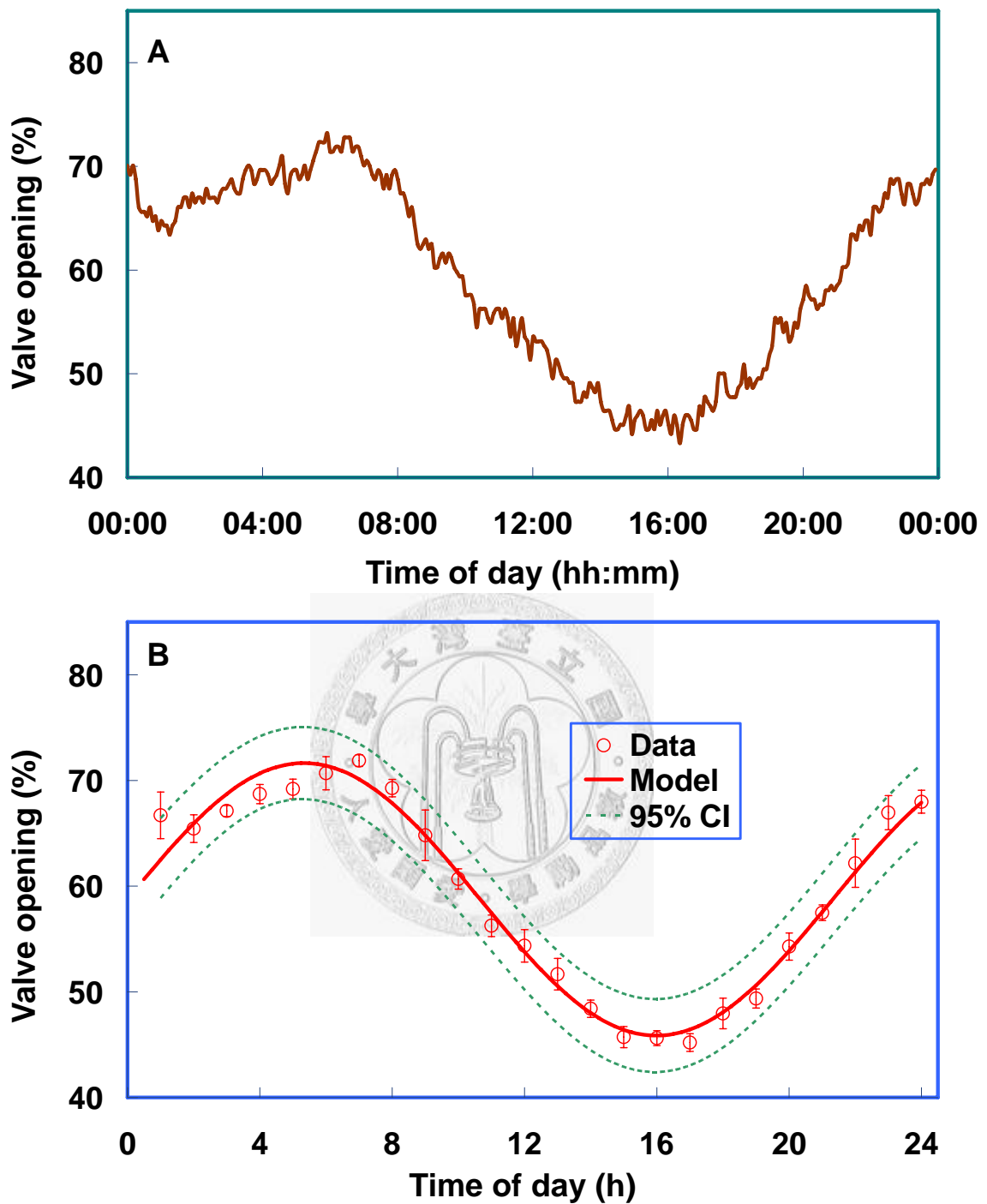


圖 5.8 16 隻淡水蜆殼每日律動。(A)蜆殼每日開殼機率(%)及(B)以非線性四參數正弦函數擬合蜆殼每日開殼機率(%)。

本研究以非線性四參數正弦函數(方程式[4.6])擬合淡水蜆每日逐時開殼機率之數據，可求得淡水蜆每日平均開殼比例(B)、振幅(A)、相位差(ϕ)及週期(τ)分別為 58.75 %、12.89 %、0.034 h 及 21.32 h (圖 5.8 B)。將上述各項淡水蜆殼律動參數代回方程式[4.6]，可預測出隨時變之淡水蜆開殼比例(ψ)。根據模式預測結果顯示，淡水蜆於 3:00 – 8:00 達到最大開殼反應，而一日中最大閉殼反應則發生於 14:00 – 19:00，(圖 5.8 B)。

本論文以淡水蜆殼平均開殼機率為基礎，根據實驗結果得知平均每日平均蜆殼開殼時間為 14.87 h，其中標準偏差為 1.85 h，假設每日蜆殼開殼時間之分佈遵循常態分佈，藉由大數法則實證方法，以蒙地卡羅模擬法(Monte Carlo Simulation)透過電腦模擬產生 10000 次可能之蜆殼開殼時間，可得到 14 天中蜆殼平均每日開殼時間之機率分佈圖(圖 5.9)。圖 5.9 中採用將開殼時間分割為 15 個區間，每一區間之間距為：

$$\Delta t_i = (19.24 - 10.55)/15 = 0.579 \text{ h} \quad [5-1]$$

其中每一開殼時間之發生機率可表示如下：

$$P(t_i) = n_i / N, \quad N = \sum_{i=1}^{15} n_i, \quad i = 1-15 \quad [5-2]$$

式中 t_i 為開殼時間(h)， $P(t_i)$ 為開殼時間之發生機率(%)， n_i 為開殼時間狀態下淡水蜆之開殼數目(-)及 N 為淡水蜆之總數(-)。

經由方程式[5-1]之評估結果顯示 $P(t_i)$ 為 $61.97 \pm 7.69\%$ (Mean \pm SD)。Tran 等 (2003) 亦以淡水蜆殼開殼機率為基礎，評估 15 隻淡水蜆於 30 天之平均每日開殼時間之發生機率為 $44.3 \pm 8.5\%$ ，等同於每日平均開殼時間為 $10.66 \pm 2.04 \text{ h}$ (Mean \pm SD)，此結果略低於本研究之 14.87 h，其原因可能為地域之不同或淡水蜆較能適應本研究所提供之成長環境所導致。

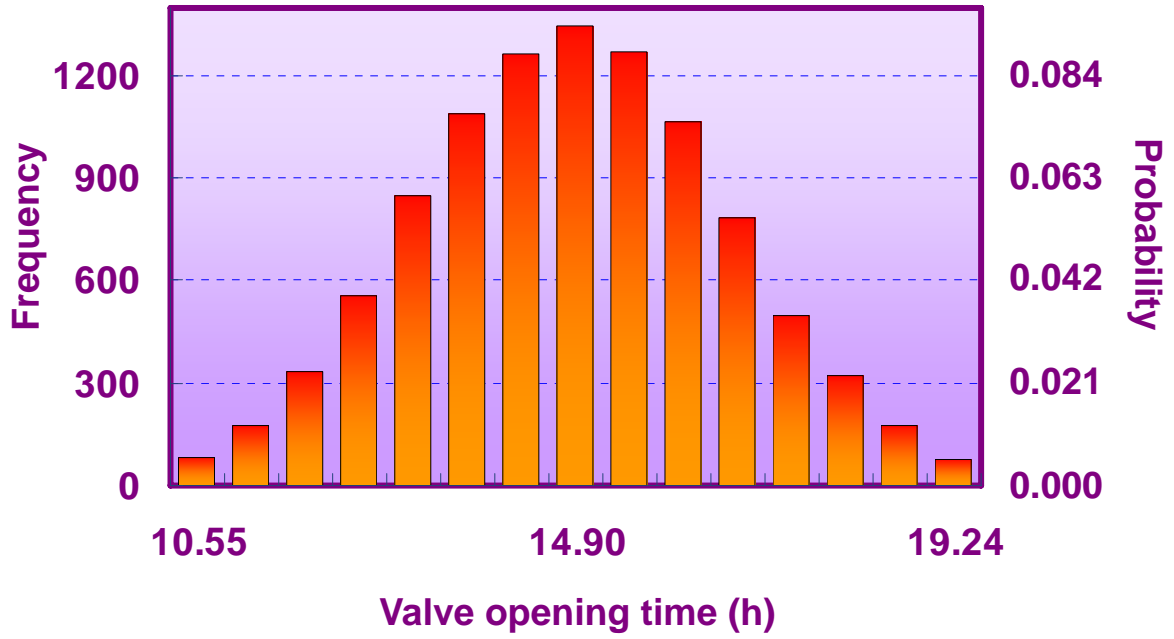


圖 5.9 以蒙地卡羅模擬法評估淡水蜆每日開殼時間之機率及頻率關係圖。



圖 3.2 C 為 Ortmann 與 Grieshaber 於 2003 年針對 8 隻淡水蜆進行開殼程度量測之結果與本研究所量測之淡水蜆開殼機率(圖 5.8 B)兩者研究皆以淡水蜆(*C. fluminea*)為研究對象，其研究成果皆顯示淡水蜆殼於每日各時段律動具有週期性變化，並同樣呈現正弦函數之律動趨勢等。Sluyts 等(1996)以淡水貽貝(*D. polymorpha*)為研究物種，監測 8 隻貝殼平均開殼位置之變化，亦顯示出雙殼貝類具有週期性律動情形。Ortmann 與 Grieshaber (2003)稱此接近 24 小時之週期性蜆殼行為變化為晝夜節率(Circadian rhythm)，亦即生物體內自行產生之調控機制，又稱為生物體內的生理時鐘。

圖 5.10 A 為淡水蜆每日開殼程度圖，採用 16 隻淡水蜆於 14 天內各時段中每隻蜆開殼距離之平均，以方程式[4.6]擬合此數據可得週期(τ)與相位差(ϕ)分別為 20.57 h 及 19.78 h ($r^2 = 0.92$)。比較其他雙殼貝類開殼程度，本研究針對 Ortmann 與 Grieshaber (2003)量測蜆殼開殼距離之結果以方程式[4.6]進行資料重新分析求得 $\tau = 27.12$ 及 $\phi = 17.40$ ($r^2 = 0.99$)，而 Sluyts 等(1996)研究成果經方程式[4.6]分析亦可得 $\tau = 23.85$ 及 $\phi = 12.76$ ($r^2 = 0.95$) (圖 5.10 B)。綜合上述，雙殼貝類之律動為接近 24 小時週期性之變化($\tau = 20.57 - 27.12$ h)，此自發性產生之生理時鐘可能和光照週期有關。根據研究成果顯示，以非線性四參數正弦函數擬合蜆殼之律動具有相當高的判定係數($r^2 = 0.92 - 0.99$)，代表該模式能成功的模擬與預測一日中蜆殼律動趨勢，可做為後續蜆殼行為效應研究之依據。

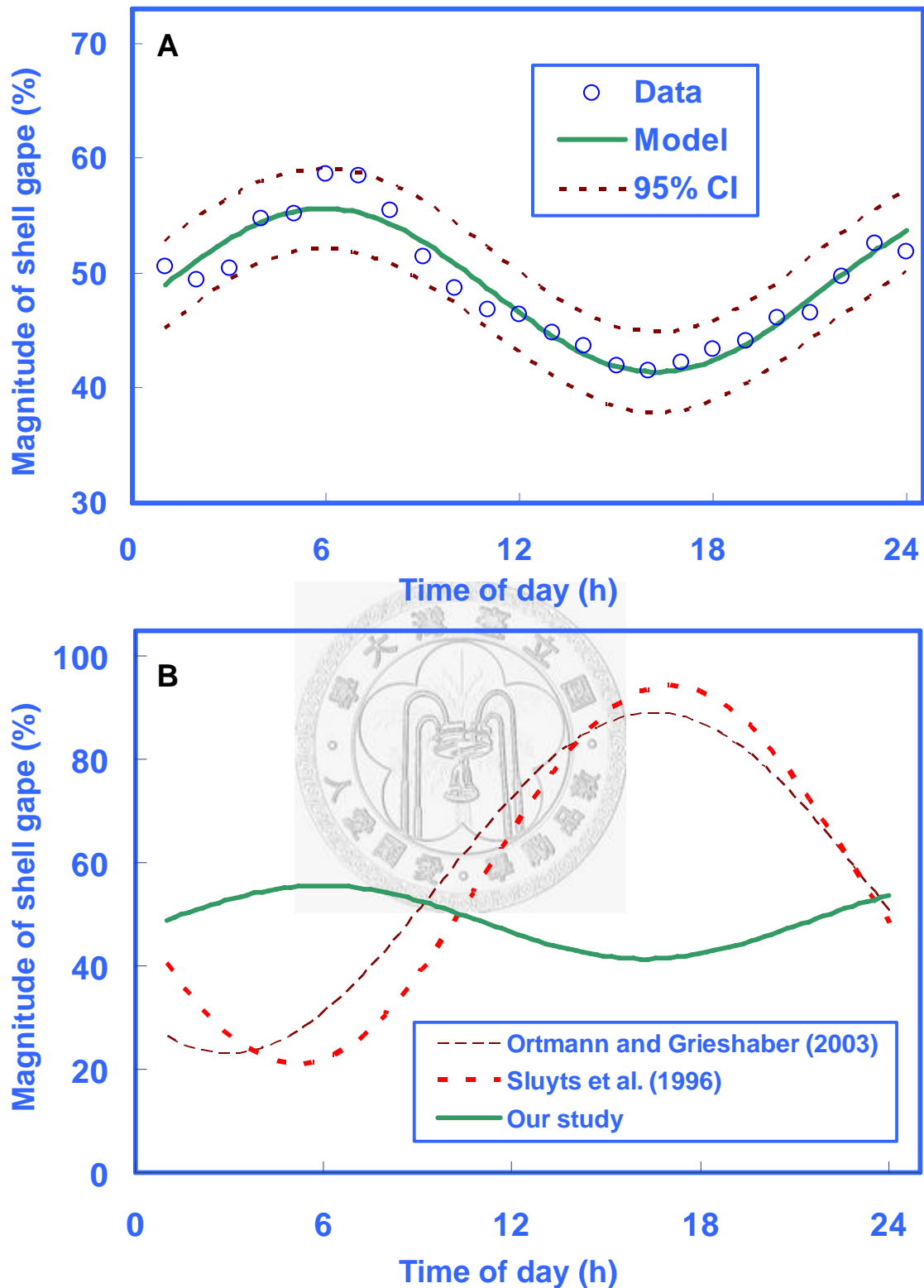


圖 5.10 以非線性四參數正弦函數擬合蜆殼每日開殼程度。(A)淡水蜆殼開殼程度，及(B)比較不同雙殼貝類開殼程度。

5.6 蜆殼行為效應

以淡水蜆殼量測裝置進行 300 分鐘蜆殼行為效應實驗(April 3 – May 9, 2007)，監測不同砷濃度暴露下淡水蜆開、閉殼律動之狀態並記錄與分析。根據每日律動特性實驗之結果，淡水蜆殼最小閉殼行為發生於每日 3:00 – 8:00 h，因此本研究於此時間下監測不同砷濃度下淡水蜆之行為，並提供充足之藻類、含氧量及正常的日照週期，使淡水蜆於最舒適環境下注入不同砷濃度，藉此觀測砷汙染下之蜆殼律動改變情形。實驗之砷濃度分別為 0 (April 3 – 17), 0.3 (May 5 – 6), 0.5 (May 1 – 2), 1.0 (April 26 – 27), 5.0 (May 8 – 9)及 10.0 (April 29 – 30) mg L^{-1} 。

將已適應感測器的淡水蜆置入本試驗之水族缸內，經兩週適應無異狀後，於 3:00 時注入不同的砷濃度，圖 5.11 為 16 隻淡水蜆分別暴露於 0.3, 0.5, 1.0, 5.0 及 10.0 mg L^{-1} 砷濃度前後連續監測蜆殼律動之結果。由圖 5.11 中可觀測出當砷注入後將影響蜆殼原本之律動，使蜆殼閉殼反應會明顯增加，砷濃度越高閉殼反應增加之趨勢越明顯速度也越快。本論文為量化此不同砷濃度下時間與閉殼反應之關係，可將圖 5.11 砷暴露下蜆殼律動結果減去無砷暴露下蜆殼閉殼機率，並以三參數Hill模式加以描述。圖 5.12 為以Hill模式(方程式[3.14])分別評估砷濃度 0.3, 0.5, 1.0, 5.0 及 10.0 mg L^{-1} 下時間與閉殼反應之關係，經最佳化擬合後可得到各濃度之最大閉殼反應(R_{\max} , %)、半數閉殼效應時間(ET50, mg L^{-1})、Hill係數(n)及 r^2 (表 5.7)。由圖 5.12 及表 5.7 中可觀測出砷濃度與Hill參數之關係，當暴露的砷濃度越高其相對應之最大閉殼反應(R_{\max})越大，達到半數閉殼效應的時間(ET50)也越小。此結果量化了蜆殼閉殼反應、暴露濃度及暴露時間之關係，亦證明淡水蜆之開、閉殼律動行為的確受到砷汙染而有所改變。

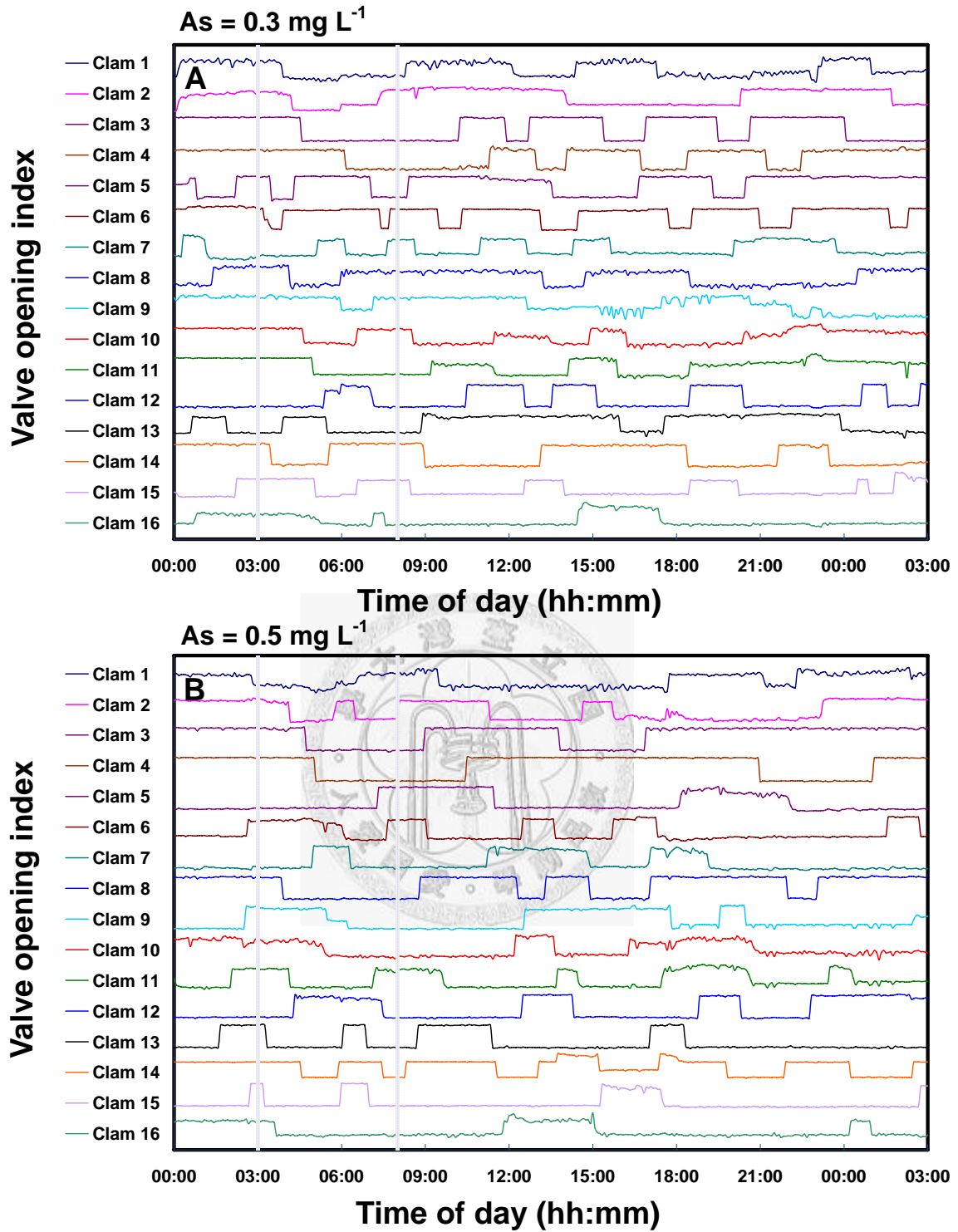


圖 5.11 淡水蜆暴露於砷濃度(A) 0.3，(B) 0.5，(C) 1.0，(D) 5.0，及(E) 10 mg L⁻¹下之蜆殼律動監測圖。

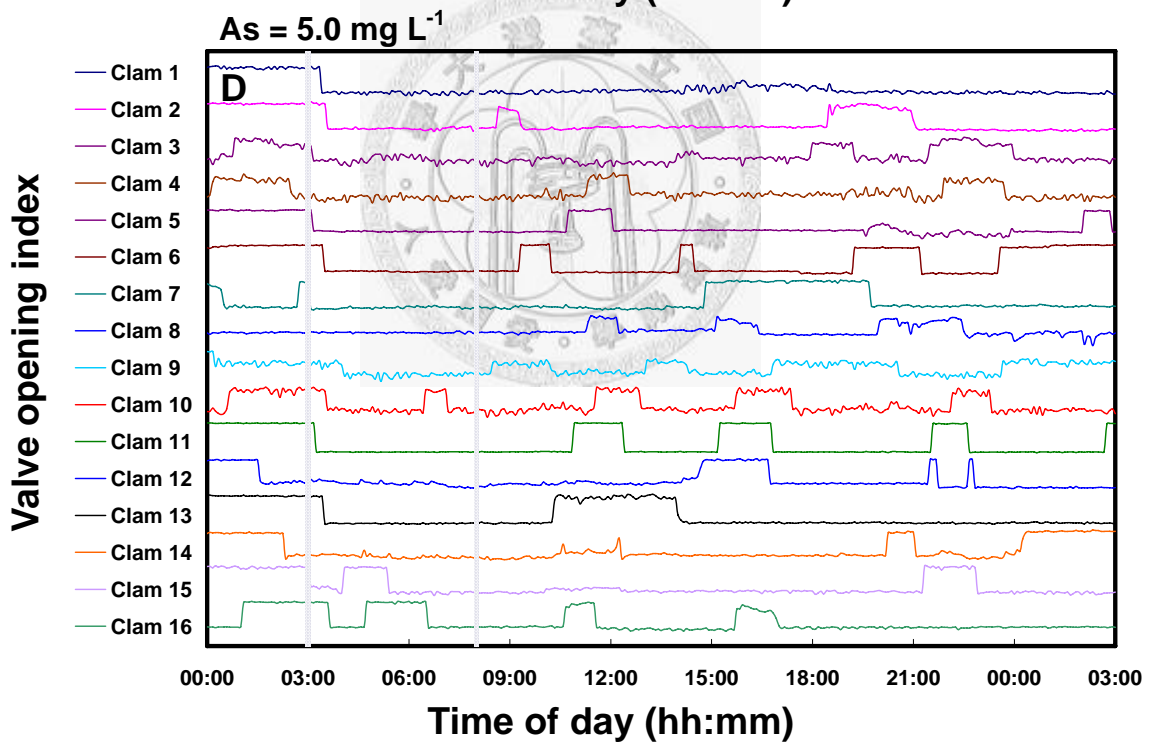
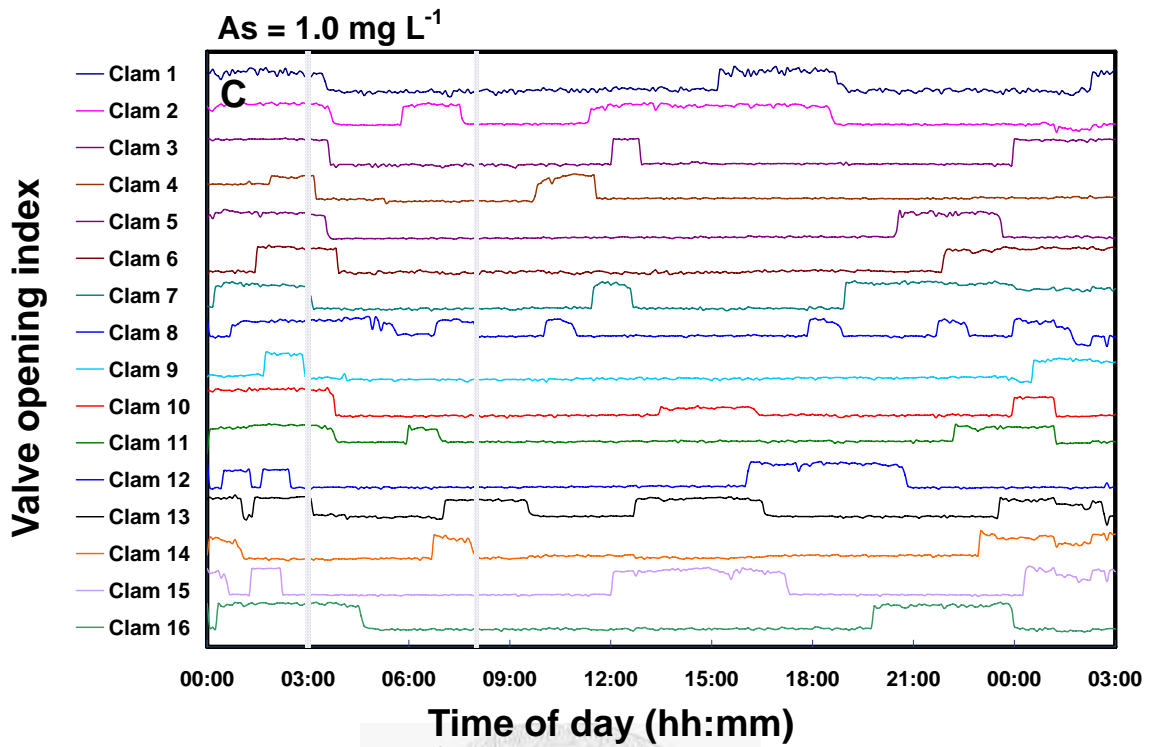


圖 5.11 續。

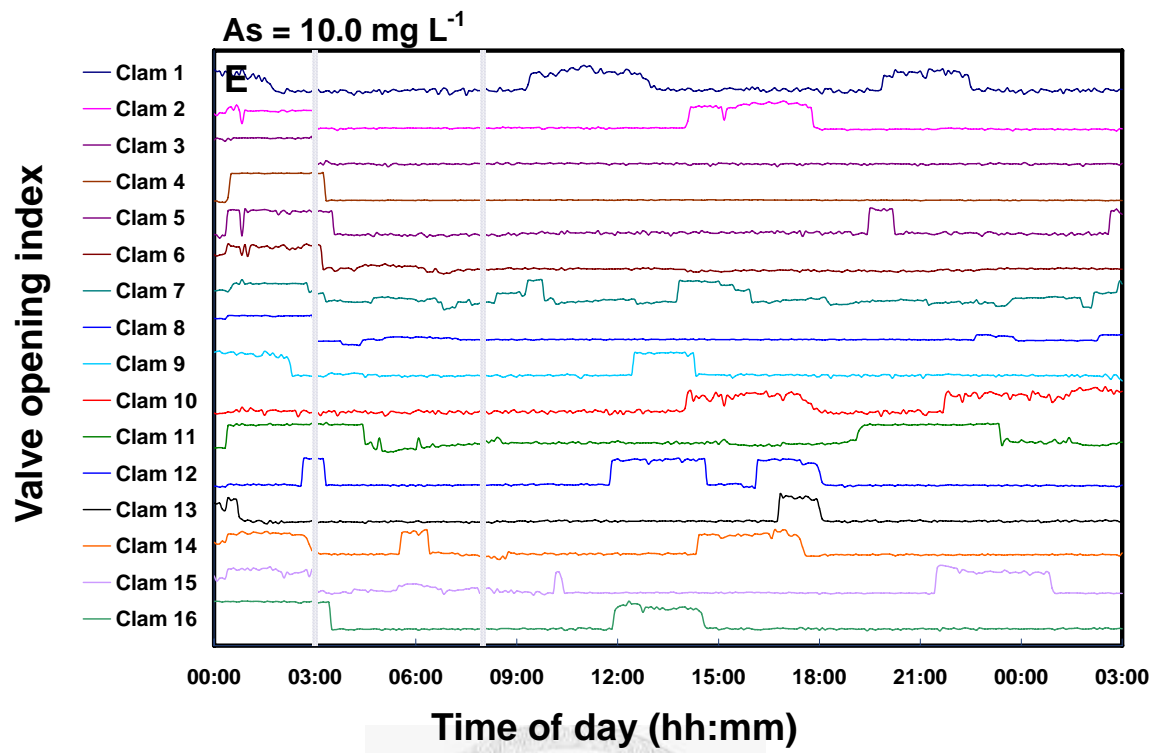


圖 5.11 續。



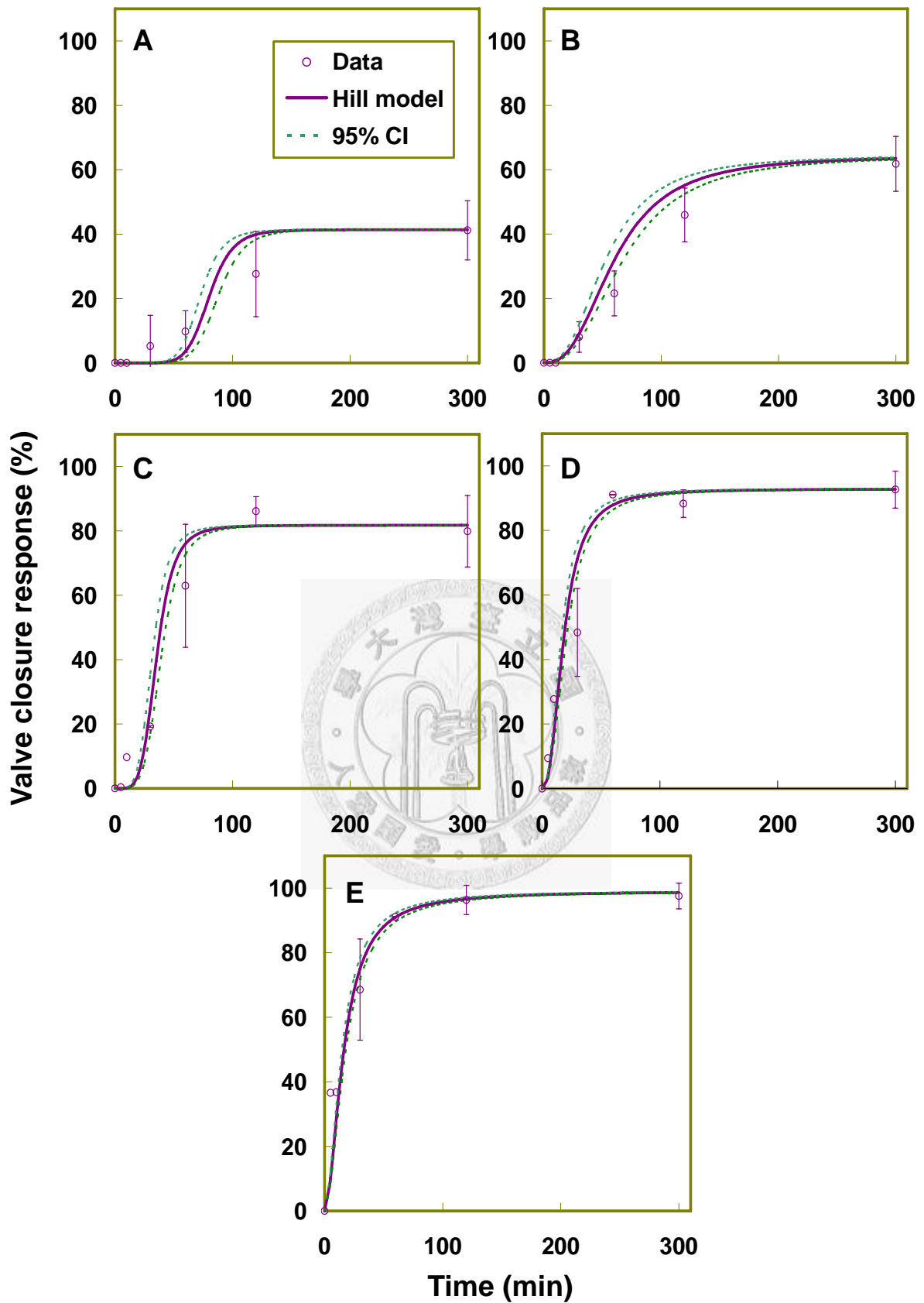


圖 5.12 以三參數Hill模式擬合砷濃度(A) 0.3，(B) 0.5，(C) 1.0，(D) 5.0，及(E) 10 mg L⁻¹下暴露時間與淡水蜆閉殼反應之關係。

表 5.7 以三參數 Hill 模式擬合淡水蜆暴露於不同砷濃度之劑量反應參數值

As concentration (mg L ⁻¹)	R _{max} (%)	ET50 (min)	n (-)	r ²
0.3	42.39	80.27 (72.73 – 87.82)	8.12	0.75
0.5	64.46	60.49 (52.97 – 68.01)	2.60	0.88
1.0	81.74	35.51 (31.64 – 39.38)	4.92	0.83
5.0	92.89	18.33 (16.15 – 20.51)	2.41	0.91
10.0	99.11	16.24 (14.64 – 17.84)	1.85	0.95



圖 5.13 A 為不同暴露時間與砷濃度下淡水蜆閉殼比例之反應表面，顯示相同暴露時間下，砷濃度越高所對應之蜆殼閉殼反應也越大。欲求得不同時間下的砷濃度與淡水蜆之劑量反應關係，可將圖 5.12 固定砷濃度下時變蜆殼閉殼比例進行轉換，進而求得固定時間下不同砷濃度對蜆殼閉殼比例之關係(圖 5.13 B)。圖 5.14 為暴露時間於 10, 15, 30, 60, 180 及 300 min 下砷濃度與淡水蜆閉殼比例之關係圖，以三參數Hill模式(方程式[3.14])重新擬合此數據，其評估出之參數值如同表 5.8 所示。由表 5.7 及 5.8 之結果可知，利用三參數Hill模式模擬淡水蜆暴露於砷之劑量反應關係 r^2 值皆大於 0.75，顯示此模式對於蜆殼行為實驗而言具有足夠之描述能力，而淡水蜆之最大閉殼反應亦隨著暴露時間與濃度影響。

圖 5.15 為水體砷濃度 0, 0.3, 0.5, 1.0, 5.0 及 10.0 mg L⁻¹下蜆殼律動之監測結果，將表 5.8 淡水蜆於不同暴露時間之劑量反應參數值帶入方程式[4.8]，即可預測出不同砷濃度下任意時間點之淡水蜆開殼比例(圖 5.16 A)。比較模式預測與實驗結果的差異性可代入均方根誤差法(Root mean square error, RMSE)計算之。由圖 5.16 B 評估結果得知水體砷濃度 0.3, 0.5, 1.0, 5.0 及 10.0 mg L⁻¹下閉殼反應之 RMSE 分別為 10.22, 7.92, 5.91, 4.55 及 4.61 %，可推測出當淡水蜆暴露於低砷濃度時，因個體間對砷之靈敏度差異造成閉殼反應偏差較大；反之高砷濃度下淡水蜆閉殼反應則較為一致。

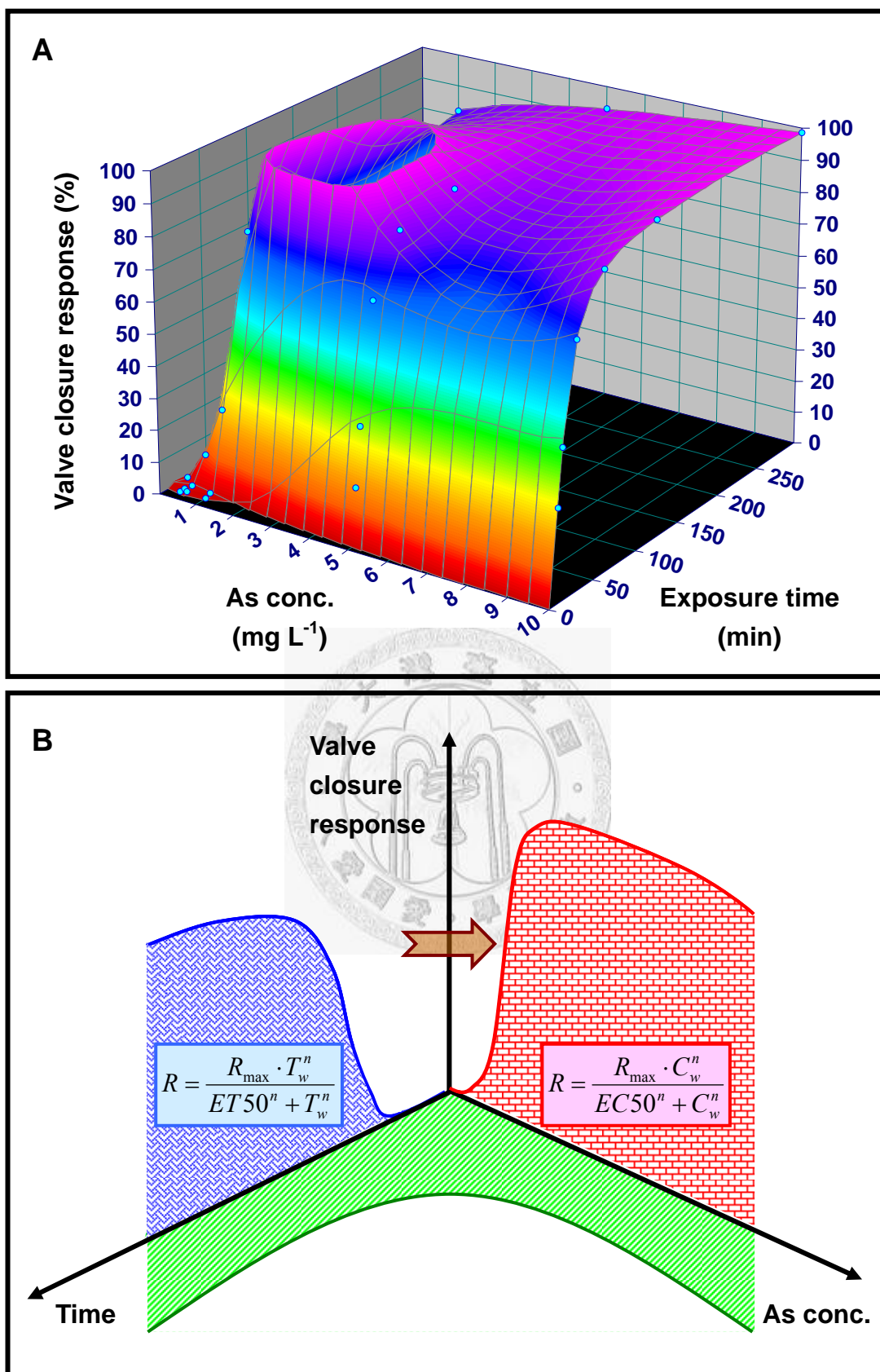


圖 5.13 (A)不同暴露時間與砷濃度下淡水蜆閉殼比例之反應表面，及(B)砷濃度、暴露時間與蜆殼閉殼反應之轉換關係圖。

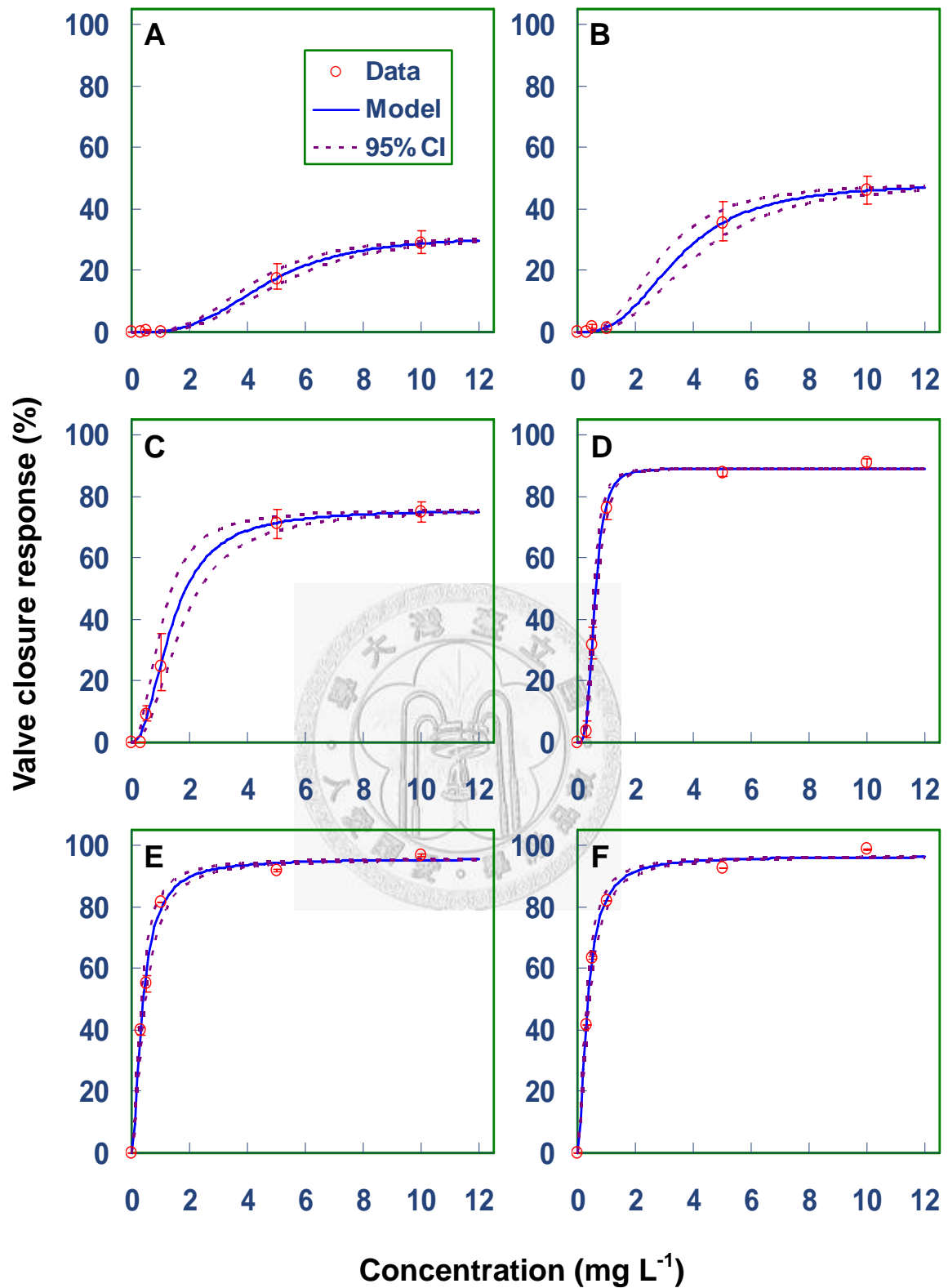


圖 5.14 以三參數Hill模式擬合暴露時間(A) 10，(B) 15，(C) 30，(D) 60，(E) 120，及(F) 300 mg L^{-1} 下暴露時間與淡水蜆閉殼反應之關係。

表 5.8 以三參數 Hill 模式擬合淡水蜆於不同暴露時間之劑量反應參數值

Time (min)	R_{\max} (%)	EC50 (mg L ⁻¹)	n (-)	r^2
10	31.38	4.65 (4.18 – 5.12)	3.13	0.99
15	48.43	3.48 (2.90 – 4.07)	2.77	0.99
30	75.77	1.38 (1.02 – 1.74)	2.17	0.99
60	89.02	0.60 (0.53 – 0.66)	3.67	0.99
120	95.71	0.38 (0.31 – 0.46)	1.63	0.99
300	96.42	0.35 (0.30 – 0.40)	1.68	0.99



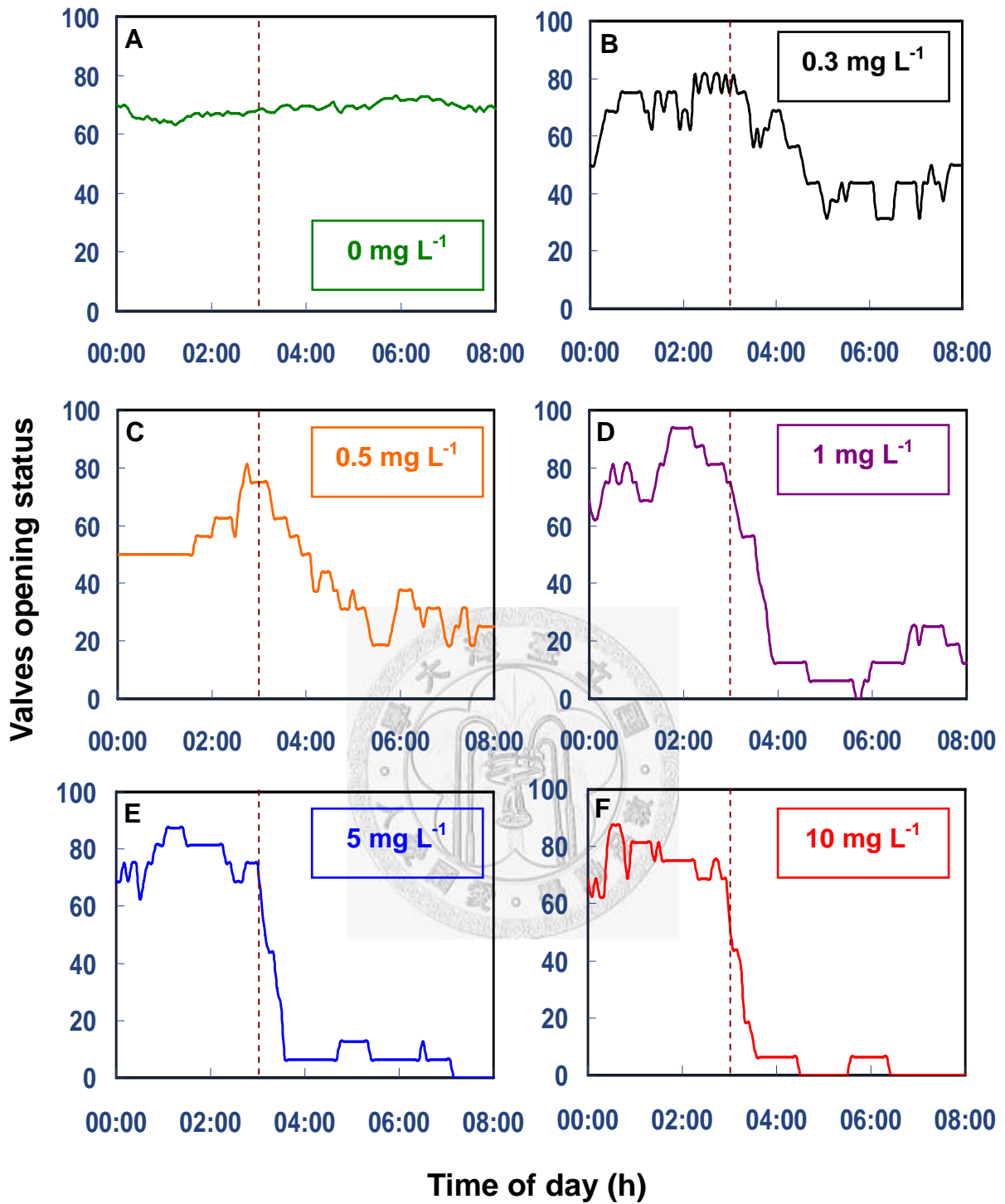


圖 5.15 淡水蜆暴露於砷濃度(A) 0, (B) 0.3, (C) 0.5, (D) 1.0, (E) 5.0, (F) 10.0 mg

L^{-1} 下蜆殼律動監測結果。(-----為注入砷濃度之起始時間)

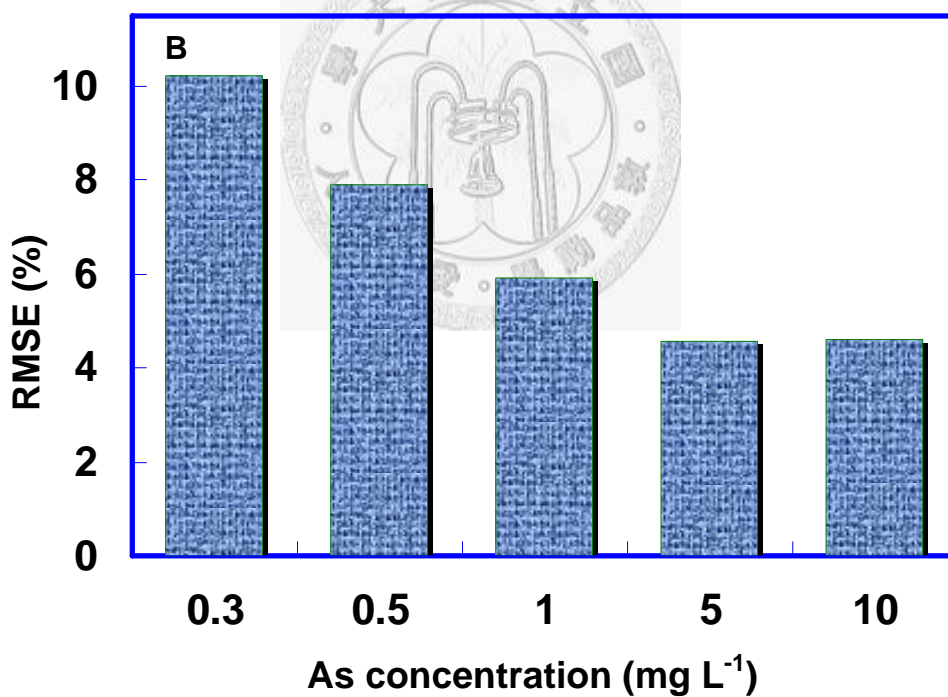
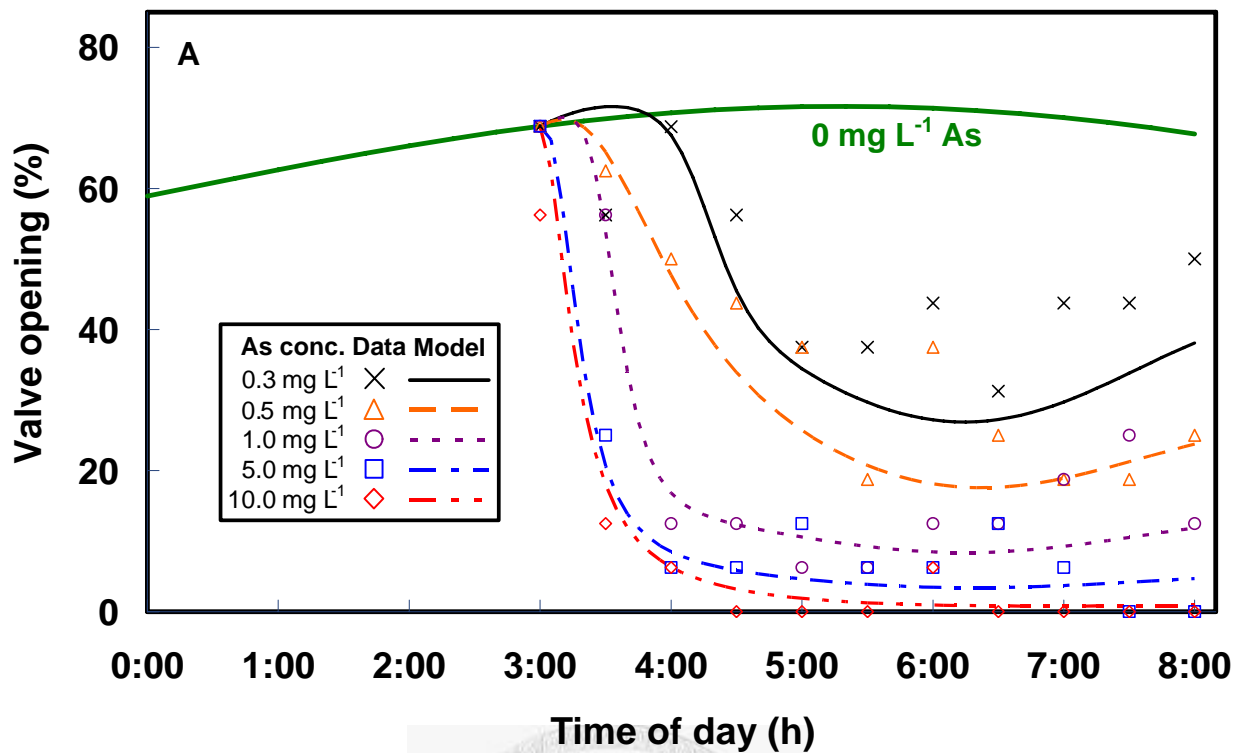


圖 5.16 淡水蜆暴露於砷之每日開殼機率預測。(A)不同砷濃度下蜆殼律動模式預測及(B)以均方根誤差法比較模式預測與實驗監測結果之差異。

5.7 水域環境之重金屬監測

本論文結合感測器原理及行為毒理學發展出一套淡水蜆殼律動量測技術，成功的量化不同砷濃度下蜆殼行為反應，可經由每日各時段蜆殼之律動推測水域環境之砷污染情形(圖 5.16 A)。許多研究亦指出淡水蜆之開閉殼反應可應用於生態毒理上做為水域污染監測之依據(Sluyt, 1996; Wildridge 等, 1998; Curtis, 2000; Heinonen, 2001; Kadar, 2001; Tran 等, 2003、2004、2007)。

將蜆殼行為效應評估之淡水蜆對砷的半數效應濃度(EC50)和其他重金屬毒性比較，可得知汞與銅之EC50 接近，而鎘與砷之EC50 則明顯高於汞與銅約 10 - 100 倍，其結果之差異乃為化學物質對淡水蜆之毒性強弱、不同水質條件及實驗設計所導致(表 5.9)。表 5.9 中亦可得知，若要以EC50 為污染檢測指標，其汞、銅、鎘與砷偵測極限之分別為 3.1, 4.2, 16 及 350 $\mu\text{g L}^{-1}$ ，且至少需要 5 個小時的監測時間。以台灣西南養殖地區而言，根據 1994 - 2007 年學者的研究調查指出，水體砷污染濃度約為 40 - 900 $\mu\text{g L}^{-1}$ ，於此砷濃度下的貝類體內砷濃度可達 22.9 $\mu\text{g g}^{-1}$ ，而魚體砷濃度最高更高達約 330 $\mu\text{g g}^{-1}$ ，如食用這些含有高砷的魚貝類將可能導致不利人類健康之風險(表 5.10)。因此，為了確保水質安全與水域生物之存活，可訂定較嚴苛之風險標準值 (USEPA, 1995)。故本論文亦求出造成淡水蜆 10 %及 5 %蜆殼閉殼效應之最佳化關係式為：

$$\text{EC10}(t_R) = 0.18 + 10.43 \exp(-t_R / 9.06) \quad [5.3]$$

$$\text{EC5}(t_R) = 0.13 + 8.03 \exp(-t_R / 8.85) \quad [5.4]$$

以 5 %蜆殼閉殼效應為例，經由方程式[5.3]可得知 5 個小時的偵測門檻值為 130 $\mu\text{g L}^{-1}$ ，相較於原本 50 %蜆殼閉殼效應的 350 $\mu\text{g L}^{-1}$ 而言更具有偵測低砷濃度之能力(圖 5.17)。

表 5.9 淡水蜆暴露於重金屬下不同反應整合時間之半數閉殼效應濃度

Metal	Integrated response time (min)			
	30	60	120	300
	EC50 value ($\mu\text{g L}^{-1}$) (mean with 95 % CI)			
Mercury ^a	20.3 (11.9 – 32.1)	8.9 (5.1 – 15.8)	5.8 (3.4 – 10.3)	3.1 (2.0 – 5.4)
Copper ^b	21.4 (8.9 – 34.2)	10.9 (5.5 – 21.2)	8.1 (4.2 – 16.0)	4.2 (2.3 – 8.8)
Cadmium ^c	155	45	35	16
Arsenic ^d	1380 (1020 – 1740)	600 (530 – 660)	380 (310 – 460)	350 (300 – 400)

^a Tran et al. (2007).

^b Tran et al. (2004).

^c Tran et al. (2003).

^d This study.

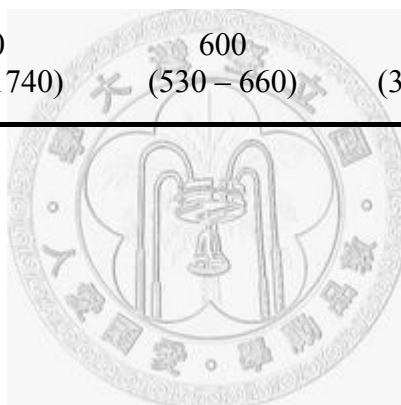


表 5.10 砷汙染疫區之養殖池水及生物體內砷含量

Taxonomic group, species	As in pond water ($\mu\text{g L}^{-1}$)	As in aquatic biota ($\mu\text{g g}^{-1}$)	References
Tilapia ^a (<i>O. mossambicus</i>)	NR ^a	0.847 ± 0.825 (0.512 – 1.682)	Liu et al. (2005)
Tilapia ^b (<i>O. mossambicus</i>)	48.93 ± 18.4 ^b (14.4 – 221.0) ^c	84.72 ± 80.37 (18.4 – 329.1)	Huang et al. (2003)
Milkfish ^c (<i>C. chanos</i>)	65.5 ± 76.4 (20.3 – 345.2)	0.7 ± 0.7 (0.2 – 3.4)	Lin et al. (2005)
Large-scale mullet ^d (<i>L. macrolepis</i>)	79.9 ± 60.2 (13.0 – 169.7)	2.35 ± 0.93 (1.35 – 4.34)	Lin et al. (2001)
Hard clam ^e (<i>M. lusoria</i>)	NR (40 – 97)	8.48 ± 4.87 (7.62 – 10.71)	Liu et al. (2007)
Oyster ^f (<i>C. gigas</i>)	NR (470 – 897)	9.09 ± 3.08 (4.22 – 22.90)	Liu et al. (2006)

^a NR: not reported

^b Mean \pm SD

^c Range

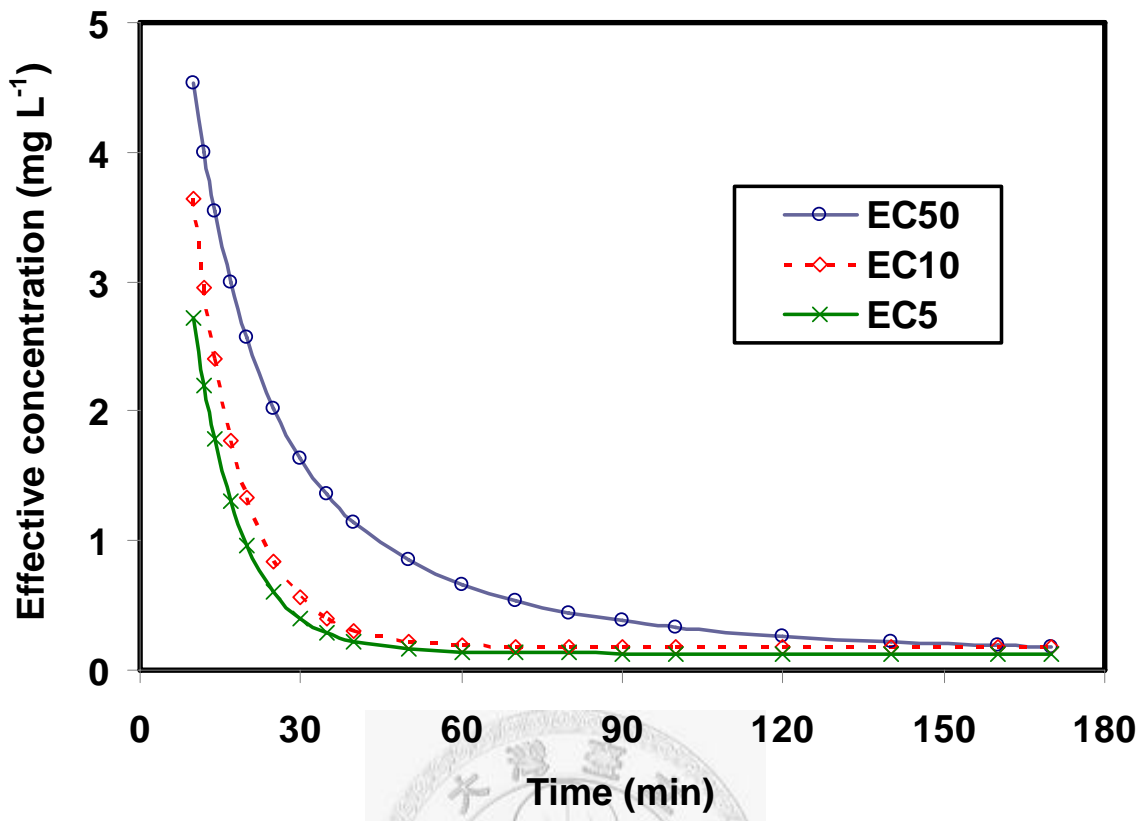


圖 5.17 淡水蜆暴露於砷之時變不同效應濃度(EC5、EC10 及 EC50)。

5.8 溫度對蜆殼行為及重金屬累積之影響

雙殼貝類的開殼活動和生理過程息息相關，例如呼吸及外在環境的刺激皆會對其造成影響，儘管日夜週期的改變為貝類律動之主要因素，但研究室內之實驗條件亦可能影響並阻礙蜆殼自然的律動行為，因此現地量測為較佳之選擇 (Garcia-March 等，2008)。有鑑於此，本論文於實驗設計時採循環水養殖系統並控制光照週期模擬室外養殖場之自然條件，同時固定溫度與水質條件以減少實驗室與野外之差異性。

許多研究指出溫度及 pH 值的變化會影響淡水蜆生理及化學上的反應，如改變存活率、濾食能力、金屬累積程度、律動情形及體內酵素活性等 (Inza 等，1998；Matthews 與 McMahon，1999；Fraysse 等，2000；Tran 等，2002；Vidal 等，2002；Han 等，2008)。Baines 與 Fisher (2008) 針對貽貝 (*Mytilus edulis*) 進行研究，以生物動力模式探討局部或季節性的水溫變化是否會影響雙殼貝類對重金屬的累積情形；經研究結果顯示，溫度的變化將導致貝類對水藻的吸收能力改變，進而影響其成長與對重金屬累積之程度。Mubiana 與 Blust (2007) 更進一步指出不同重金屬會對水域生物造成不同的累積特性，如貽貝對鎘、鈷、鉛等重金屬之生物累積能力會隨著溫度升高會增加；而對銅則有相反的趨勢，當溫度升高時生物累積能力反而有大幅降低的情形。

由此可知，水溫改變對雙殼貝類的影響是不容忽視的問題。Tran 等 (2002) 也指出水溫與藻類濃度會直接影響淡水蜆過濾水體的速率，當溫度高時過濾水體的流速增加，而相同溫度下藻類濃度越低流速亦越快。然而淡水蜆中的重金屬來源主要為濾食藻類時所攝取進入並累積於體內，當濾食速率增加則

累積能力也會隨之增加，故水溫與藻類濃度將間接影響到其累積水體重金屬之程度，同時高溫與低藻類濃度時淡水蜆也有較快累積重金屬之趨勢(Tran 等, 2001、2002)。Inza 等(1998)與 Fraysse 等(2000)亦探討不同水溫(12–24 °C)及 pH 值(6–8.2)下淡水蜆對重金屬鎘與汞之生物累積，證實水溫及 pH 值改變下將影響淡水蜆之吸收與排除能力。

近年來已有許多專家學者研究重金屬對淡水蜆造成之生化反應(生物累積、蜆殼律動及金屬硫蛋白濃度)，其實驗水溫約控制在 15 – 25 °C (表 5.11)。本論文亦探討於實驗水溫 24.26 ± 1.26 °C 下淡水蜆對砷之生物累積試驗與蜆殼行為生物試驗，由表 5.11 中可得知與 Doherty 等(1987)之實驗水溫最為接近。Lee 等(2006)及 Marie 等(2006)研究中亦指出不同水溫將影響淡水蜆有不同的重金屬累積情形。圖 5.18 A 為台灣花蓮淡水蜆專業養殖區之 2005 – 2007 年每月溫度紀錄與時變月均溫分佈圖，其中一年溫度最低的月份為 1 月，而最高溫度之月份為 7 月。根據上述論點可得知淡水蜆於不同溫度下會有不同的蜆殼開殼情形，以及不同的累積能力。因此日後進行相關研究探討生物體內砷的動態行為時，除了需儘量增加樣本數降低實驗誤差外，更應該將溫度及 pH 值的變化考慮進實驗設計中，以探討不同溫度或季節改變下淡水蜆開殼情形及 BCF 值是否有所改變，建立出每日或每月時變之不同水溫下蜆殼律動曲線，並以此律動下進行淡水蜆暴露於重金屬之蜆殼行為生物試驗，方可增加實驗之可信度(圖 5.18 B)。

表 5.11 淡水蜆於不同水溫下對重金屬之生物累積、蜆殼律動及金屬硫蛋白濃度

Metal	Temperature (°C)	References
Bioaccumulation		
As	24.26 ± 1.26	This study
Cd	21 ± 0.2	Inza et al. (1997)
	9.6, 10.7, 11.6 and 15.4	Marie et al. (2006)
Cu	15	Croteau et al. (2004)
	15	Croteau and Luoma (2005)
Hg	21 ± 0.2	Inza et al. (1997)
Se	5, 13 and 21	Lee et al. (2006)
Zn	9.6, 10.7, 11.6 and 15.4	Marie et al. (2006)
Valve movement		
As	24.26 ± 1.26	This study
Cd	25	Doherty et al. (1987)
	15 ± 0.5	Tran et al. (2003)
Cu	15 ± 0.5	Tran et al. (2004)
Hg	15 ± 0.5	Tran et al. (2007)
U	20	Fournier et al. (2004)
Zn	25	Doherty et al. (1987)
Metallothionein concentration in tissues		
As	20 ± 1	Diniz et al. (2007)
	20 ± 1	Santos et al. (2007)
Cd	9.6, 10.7, 11.6 and 15.4	Marie et al. (2006)
Zn	9.6, 10.7, 11.6 and 15.4	Marie et al. (2006)

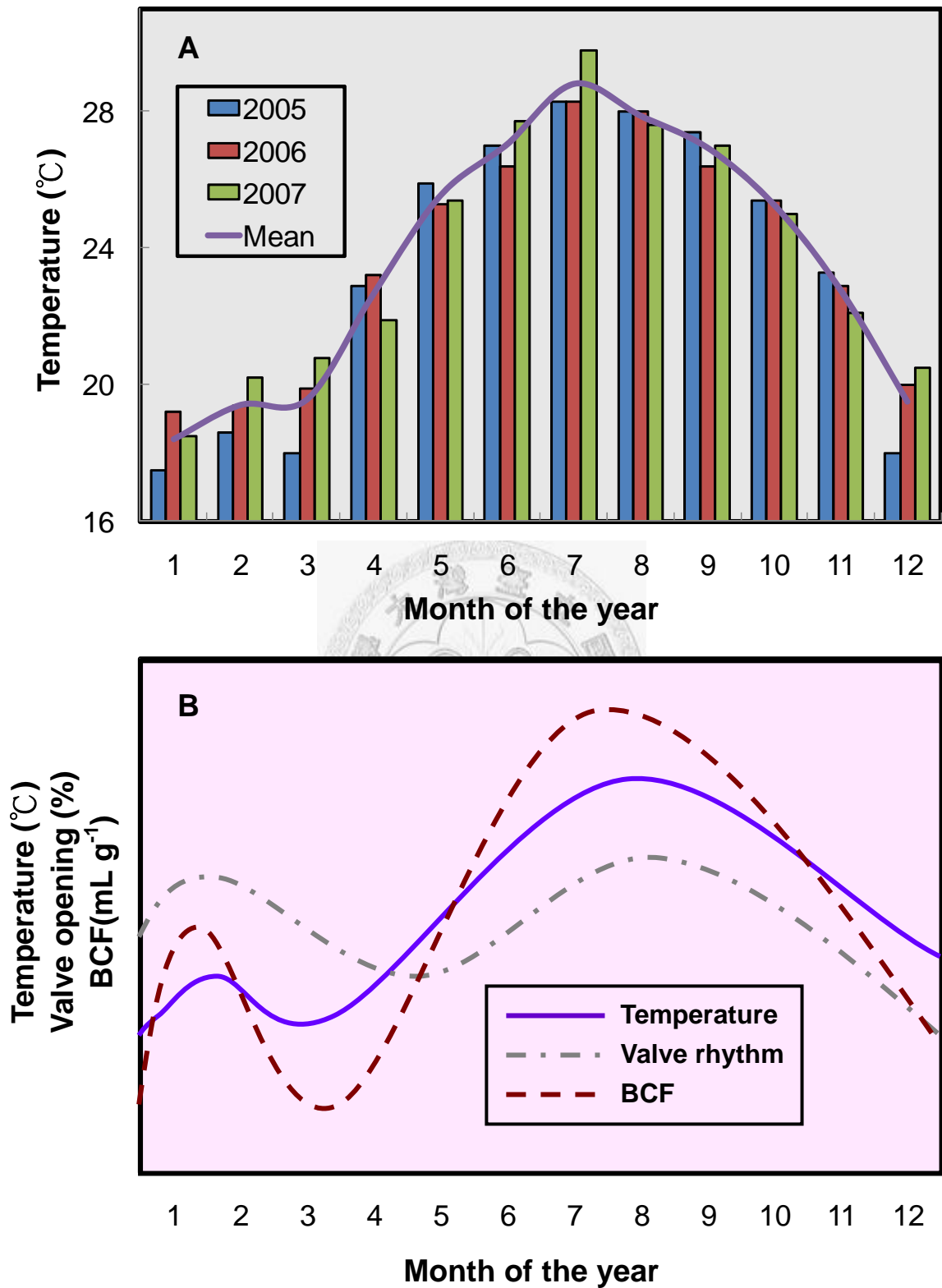


圖 5.18 (A) 2005 - 2007 年花蓮地區月均溫(中央氣象局, 2008)及(B)受季節

變化影響之溫度、淡水蜆殼開殼比例與生物濃縮因子變化示意。

第六章、結論

本論文以淡水蜆為指標生物，發展一套嶄新的淡水蜆殼律動監測技術，結合生態毒理學與行為毒理學之觀點，針對重金屬 - 砷所造成的生物累積及毒性效應進行探討，瞭解淡水蜆於砷緊迫下之生理與化學反應，並利用生態毒理模式描述此生物現象與動態，藉以評估水域環境砷汙染及其造成之危害，提出有效的管理策略供養殖業者做為參考之依據。綜合上述之評估，本研究有以下九點結論：

1. 根據 5 mg L^{-1} 砷濃度暴露試驗結果，淡水蜆暴露初期具有極快速砷累積能力，後期則因自發性閉殼反應隔絕與外界水體之接觸作用使得排除速率大於吸收速率，經生物累積模式推估其BCF值為 4.38 mL g^{-1} 。
2. 實驗室急性毒試驗所求得之LC50 可瞭解淡水蜆對砷之耐受極限，以單位機率法推估 12, 24, 48, 72 及 96 小時的LC50 分別為 215.15, 104.10, 35.79, 26.79 及 20.74 mg L^{-1} 。將不同時段LC50 值以指數函數分析，可得其關係式為 $\text{LC50}(t) = 21.83 e^{6.12-0.07t}$ 。
3. 急性毒模式可用以瞭解淡水蜆暴露於砷之水體半致死濃度與時間關係，並成功預測時變之體內半致死濃度。比較三種急性毒理動態模式(CBR、CAUC及DAM)描述急毒試驗之結果可得DAM為擬合之最佳模式，其推估之 $\text{LC50}(\infty)$ 與 $\text{CL50}(\infty)$ 值分別為 21.41 mg L^{-1} 及 $93.65 \text{ } \mu\text{g g}^{-1} \text{ dry wt}$ 。
4. 內部效應濃度為基礎之時變致死率模式成功被應用於急毒生物試驗之結果，可以淡水蜆死亡情形預測水域之砷濃度，並可提供養殖業者評估淡水蜆死亡率之重要依據。其推估造成 50 %及 10 %之內部效應濃度分別為 95.65 及 $22.28 \text{ } \mu\text{g g}^{-1} \text{ dry wt}$ ，亦即欲控制死亡率 10 %以內則淡水蜆體內之砷累積濃度不得超

過 $22.28 \mu\text{g g}^{-1}$ dry wt。

5. 本論文以感測器原理為基礎研發之淡水蜆殼律動量測裝置，成功的將蜆殼開殼距離及平均開殼機率得以量化，並經由資料擷取卡傳輸至電腦內部進行分析，可連續且同時監測 16 隻淡水蜆之開、閉殼情形，其最大經度可達每 30 秒紀錄一筆蜆殼律動數據。
6. 以淡水蜆殼量測裝置記錄為期 14 日之蜆殼每日律動實驗，經評估可得時變蜆殼開殼機率最佳關係式為 $\psi(t_R, 0) = 58.75 + 12.89 \times \sin[2\pi(t + 0.034)/21.32]\%$ 。表示每日蜆殼平均開殼機率為 58.75%，其最大與最小開殼機率分別為 71.64 及 45.86%，於每日 3:00 – 8:00 達到最大開殼，而每日之最大閉殼時間則為 14:00 – 19:00，並以 21.32 h 之週期性變化為循環。
7. 經由蜆殼行為生物試驗得知淡水蜆受砷緊迫下會影響其原有之律動，暴露之砷濃度與閉殼之反應及時間成正比，高砷濃度將導致淡水蜆最大閉殼反應增加且半數閉殼效應時間縮短。
8. 為確保水質安全及水域生物之存活，應訂定較嚴苛之風險標準值，如將 EC50 之門檻值提高為 EC10 或 EC5，其中以 EC50、EC10 及 EC5 為污染檢測指標下，淡水蜆對砷之 5 小時偵測極限分別為 350、180 及 $130 \mu\text{g L}^{-1}$ 。
9. 局部或季節性溫度與 pH 值之變化將導致不同的淡水蜆律動、攝食率及生物累積能力等，因此於日後相關研究方面，考慮溫度對淡水蜆之影響層面是必需的。

第七章、未來研究建議

本論文結合生態毒理與感測器原理發展一套機制模式，成功的描述淡水蜆暴露於砷之生物動力與殼律動毒性反應，可供後續相關研究之依據。於未來研究之建議與可發展之方向包含下列五項：

1. 於時間、成本及初次進行淡水蜆暴露於砷之實驗考量下，本研究尚無進行重覆試驗，建議於未來研究時應增加樣本數與實驗重複次數，並對淡水蜆的年齡、體型、殼長與重量進行篩選，以降低實驗之誤差。
2. 淡水蜆個體平均重量為 6.32 ± 0.71 g，而單一電感平均重量為 0.41 ± 0.04 g，因此架設一組感測器(雙電感組成)之淡水蜆總重為 7.14 g，其中感測器約佔總重的 10 %。於本研究中所架設之感測器雖可能會影響淡水蜆律動與潛沙能力，但考慮水中的浮力與其他因素，且控制組與對照組皆有架設情形下，感測器造成之影響可忽略。為減少技術上的不足而干擾蜆殼正常律動，建議於後續研究可朝晶片型感測器方向考量，並結合無線量測技術，使外在的因素造成之誤差降至最低。
3. 在生態毒理模式驗證與推估砷於淡水蜆之累積與毒性反應時，應增加溫度、pH 值、離子狀態、有機物、無機物、硬度、鹼度、藻類濃度、水體含氧量與光照週期等因子，使模式考慮更加完善，如結合生物配體模式(Biotic ligand model, BLM)方可更精確的描述水域中陰/陽離子、重金屬與生物體之間的交互作用。
4. 蜆殼律動監測技術已能成功的紀錄淡水蜆暴露於砷之行為反應，於未來可建立更龐大的毒理資料庫，針對不同貝類與多種污染物，並可發展成線上即時

監測系統，提供養殖業場作為水質管理的工具，減低污染物之風險，提高貝類養殖存活率與經濟價值。

5. 本研究以一階單區塊模式評估砷進入淡水蜆體內，並藉由急性毒模式模擬體內半致死濃度，於未來研究上建議可加入以生理為基礎之藥理動力學 (Physiologically-based pharmacokinetic, PBPK) 模式，探討重金屬進入生物體內於各器官之吸收、分佈、代謝及排除等機制。



參考文獻

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2003. Public Health Statement for zinc. CAS#7440-66-6 U.S. Public Health Service. Department of Health and Human Services.
- Arnot JA, Gobas FAPC. 2006. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organism. *Environmental Review* 14: 257 – 297.
- Ashauer R, Boxall A, Brown C. 2006. Predicting effects on aquatic organisms from fluctuating or pulsed exposure to pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 1899 – 1912.
- Baines SB, Fisher NS. 2008. Modeling the effect of temperature on bioaccumulation of metals by a marine bioindicator organism, *Mytilus edulis*. *Environmental Science and Technology* 42: 3277 – 3282.
- Barber MC. 2003. A review and comparison models for predicting dynamic chemical bioconcentration in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 1963 – 1992.
- Barron MG. 1990. Bioconcentration. *Environmental Science and Technology* 24: 1612 – 1618.
- Bellissant E, Sebillé V, Paintaud G. 1998. Methodological issues in pharmacokinetic – pharmacodynamic modeling. *Clinical Pharmacokinetics* 35: 151 – 166.
- Bilos C, Colombo JC, Presa MJR. 1998. Trace metals in suspended particles, sediments and Asiatic clams (*C. fluminea*) of the Rio de la Plata Estuary,

- Argentina. *Environmental Pollution* 99: 1 – 11.
- Chen CJ, Chen CL, Hsu LY, Chou WL, Lin YC, Tseng MP, Chiou HY, Hsueh YM. 2001. Biological gradient between long-term arsenic exposure and cancer risk in Taiwan. *Toxicology* 164: 17 – 18.
- Chen KP, Wu HY. 1962. A study of source of drinking water in relation to the disease. *Journal of the Formosan Medical Association* 61: 611 – 618.
- Chou BYH, Liao CM, Lin MC, Cheng HH. 2006. Toxicokinetics/toxicodynamics of arsenic for fanned juvenile milkfish *Chanos chanos* and human consumption risk in BFD-endemic area of Taiwan. *Environment International* 32: 545 – 553.
- Croteau MN, Luoma SN, Topping BR, Lopez CB. 2004. Stable metal isotopes reveal copper accumulation and less dynamics in the freshwater bivalve *Corbicula*. *Environmental Science and Technology* 38: 5002 – 5009.
- Curtis TM, Williamson R, Depledge MH. 2000. Simultaneous, long – term monitoring of valve and cardiac activity in the blue mussel *Mytilus edulis* exposed to copper. *Marine Biology* 136: 837 – 846.
- Davenport GM, Boling JA, Schillo KK, Aaron DK. 1990. Nitrogen – metabolism and somatotropin secretion in lambs receiving arginine and ornithine via abomasal infusion. *Journal of Animal Science* 68: 222 – 232.
- Dell’Omo M. 2002. Behavioural ecotoxicology. Chichester, New York., pp. 463.
- Di Toro DM, Zarba CS, Hansen DJ, Berry WJ, Swartz RC, Cowan CE, Pavlou SP, Allen HE, Thomas NA, Paquin PR. 1991. Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. *Environmental Toxicology Chemistry* 10: 1541 – 1583.

- Diniz MS, Santos HM, Costa PM, Peres I, Costa MH, Capelo JL. 2007. Metallothionein responses in the Asiatic clam (*Cubicula alumina*) after exposure to trivalent arsenic. *Biomarkers* 12: 589 – 598.
- Doherty FG, Cherry DS, Cairns J. 1987. Valve closure responses of the Asiatic clam *C. fluminea* exposure to cadmium and zinc. *Hydrobiologia* 153: 159 – 167.
- Farrington JW, Goldberg ED, Risebrough RW, Martin JH, Bower VT. 1983. U.S. “Mussel Watch” 1976 – 1978: An overview of the trace – metal, DDE, PCB, hydrocarbon and artificial radionuclide data. *Environmental Science and Technology* 17: 490 – 496.
- Finney DJ. 1971. Probit analysis, 3rd ed, Cambridge University Press. London.
- Fournier E, Tran D, Denison F, Massabuau JC, Garnier–Laplace J. 2004. Valve closure response to uranium exposure for a freshwater bivalve (*Corbicula fluminea*): quantification of the influence of pH. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 1108 – 1114.
- Fraysse B, Baudin JP, Garnier – Laplace J, Adam C, Boudou A. 2002. Effects of Cd and Zn waterborne exposure on the uptake and depuration of ⁵⁷Co, ^{110m}Ag and ¹³⁴Cs by the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) and the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) – whole organism study. *Environmental Pollution* 118: 297 – 306.
- Fraysse B, Baudin JP, Garnier-Laplace J, Boudou A, Ribeyre F, Adam C. 2000. Cadmium uptake by *Cubicula flumina* and *Dreissena polymorpha*: Effects of pH and temperature. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 65: 638 – 645.
- Garcia-March JR, Solsona MAS, Garcia-Carrascosa AM. 2008. Shell gaping

- behaviour of *Pinna nobilis* L., 1758; circadian and circalunar rhythms revealed by in situ monitoring. *Marine Biology* 153: 689 – 698.
- Geyer HJ, Rimkus GG, Scheunert I, Kaune A, Kettrup KWSA, Zeeman M, Muir DCG, Hansen LG, Mackay D. 2001. Bioaccumulation and occurrence of endocrine – disrupting chemicals (EDCs), persistent organic pollutants (POPs), and other organic compounds in fish and other organisms including humans. In: Beek B (Ed), *The handbook of environmental chemistry*. Springer – Verlag. Berlin., pp. 1 – 166.
- Ham KD, Peterson MJ. 1994. Effect of fluctuating low – level chlorine concentration on valve movement behaviour of the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 13: 493 – 498.
- Han KN, Lee SW, Wang SY. 2008. The effect of temperature on the energy budget of the Manila clam, *Ruditaper philippinarum*. *Aquaculture International* 16: 143 – 152.
- Heininen J, Kukkonen JVK, Holopainen IJ. 2001. Temperature- and parasite-induced change in toxicity and lethal body burdens of pentachlorophenol in the freshwater clam *Pisidium amnicum*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2778 – 2784.
- Heinrich – Hirsch B, Madle S, Oberemm A, Gundert – Remy U. 2001. The use of toxicodynamics in risk assessment. *Toxicology Letters* 120: 131 – 141.
- Hill AV, 1910. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *Journal of Physiology* 4: 4 – 7.
- Huang YK, Lin KH, Chen HW, Chang CC, Liu CW, Yang MH, Hsueh YM. 2003. Arsenic species contents at aquaculture farm and in farmed mouthbreeder

- (*Oreochromis mossambicus*) in blackfoot disease hyperendemic areas. *Food and Chemical Toxicology* 41: 1491 – 1500.
- Inza B, Ribeyre F, Boudou A. 1998. Dynamics of cadmium and mercury compounds (inorganic mercury or methylmercury): Uptake and depuration in *Corbicula fluminea*. Effects of temperature and pH. *Aquatic Toxicology* 43: 273 – 285.
- Inza B, Ribeyre F, Maury – Brachet R, Boudou A. 1997. Tissue distribution of inorganic mercury, methylmercury and cadmium in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) in relation to the contamination levels of the water column and sediment. *Chemosphere* 35: 2817 – 2836.
- Johns C, Luoma SN. 1990. Arsenic in benthic bivalves of San Francisco Bay and the Sacramento San Joaquin River delta. *Science of the Total Environment* 97 – 98: 673 – 684.
- Kadar E, Salanki J, Jugdaohsingh R, Powell JJ, McCrohan CR, White KN. 2001. Avoidance response to aluminium in the freshwater bivalve *Andonta cygnea*. *Aquatic Toxicology* 55:137 – 148.
- Kavlock RJ, Plaab GL. 1995. Session summary: toxicodynamic interactive mechanisms. *Toxicology* 105: 235 – 236.
- LaBrecque JJ, Benzo Z, Alfonso JA, Cordoves – Manuelita – Quintal PR, Gomez CV, Marcano E. 2004. The concentrations of selected trace elements in clams, *Trivela mactroidea* along the Venezuelan coast in the state of Miranda. *Marine Pollution Bulletin* 49: 659 – 667.
- Leblanc GA. 1995. Trophic-level differences in the bioconcentration of chemicals: implications in assessing environmental biomagnifications. *Environmental Science and Technology* 29: 154 – 160.

- Lee BG, Lee JS, Luoma SN. 2006. Comparison of selenium bioaccumulation in the clams *Corbicula fluminea* and *Potamocorbula amurensis*: A bioenergetic modeling approach. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 1933 – 1940.
- Lee JH, Peter FL, Koh CH. 2002. Prediction of time – dependent PAH toxicity in *Hyalella azteca* using a damage assessment model. *Environment Science and Technology* 36: 3131 – 3138.
- Legierse KCHM, Verhaar HJM, de Bruijn JHM, Herman JLM. 1999. Analysis of the time – dependent acute aquatic toxicity of organophosphorus pesticides: the critical target occupation model. *Environmental Science and Technology* 33: 917 – 925.
- Li Y, YU ZM, Song XX, Mu QL. 2006. Trace metal concentrations in suspended particles, sediments and clams (*Ruditapes philippinarum*) from Jiaozhou Bay of China. *Environmental Monitoring and Assessment* 121: 149–501.
- Liao CM, Chen BC, Singh S, Lin MC, Han BC. 2003. Acute toxicity and bioaccumulation of arsenic in tilapia *Oreochromis mossambicus* from blackfoot disease area in Taiwan. *Environmental Toxicology* 18: 252 – 259.
- Liao CM, Liang HM, Chen BC, Singh S, Tsai JW, Chou YH, Lin WT. 2005. Dynamical coupling of PBPK/PD and AUC–based toxicity models for arsenic in tilapia *Oreochromis mossambicus* from blackfoot disease area in Taiwan. *Environmental Pollution* 135: 221–233.
- Liao CM, Lin MC. 2001. Acute toxicity modeling of rainbow trout and silver sea bream exposed to waterborne metals. *Environmental Toxicology* 16: 349 – 360.

- Liao CM, Tsai JW, Ling MP, Liang HM, Chou YH, Yang PT. 2004. Organ-specific toxicokinetics and dose-response of arsenic in tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 47: 502–510.
- Liao CM, Yeh CH. 2007. Hard clam *Meretrix lusoria* to Hg-stressed birnavirus susceptibility revealed through stage-structured disease transmission dynamics. *Aquaculture* 264: 101 – 118.
- Lin MC, Liao CM, Liu CW, Singh S. 2001. Bioaccumulation of arsenic in aquacultural large-scale mullet *Liza macrolepis* from blackfoot disease area in Taiwan. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 67: 91 – 97.
- Lin MC, Liao CM. 1999. ⁶⁵Zn(II) accumulation in the soft tissue and shell of abalone *Haliotis diversicolor supertexta* via the alga *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* and the ambient water. *Aquaculture* 178: 89 – 101.
- Lin MC, Lin YH, Cheng HH, Chen YC, Liao CM, Shao KT. 2005. Risk assessment of arsenic exposure from consumption of cultured milkfish, *Chamos chanos* (Forsskål), from the arsenic-contaminated area in southwestern Taiwan. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 75: 637–644.
- Liu CW, Huang FM, Hsueh YM. 2005. Revised cancer risk assessment of inorganic arsenic upon consumption of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) from blackfoot disease hyperendemic areas. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 74: 1037 – 1044.
- Liu CW, Liang CP, Huang FM, Hsueh YM. 2006. Assessing the human health risks from exposure of inorganic arsenic through oyster (*Crassostrea gigas*) consumption in Taiwan. *Science of the Total Environment* 361: 57 – 66.
- Liu CW, Liang CP, Lin KH, Jang CS, Wang SW, Huang YK, Hsueh YM. 2007.

- Bioaccumulation of arsenic compounds in aquacultural clams (*Meretrix lusoria*) and assessment of potential carcinogenic risk to human health by ingestion. *Chemosphere* 69: 128 – 134.
- Marie V, Baudrimont M, Boudou A. 2006. Cadmium and Zinc bioaccumulation and metallothionein response in two freshwater bivalves (*Cubicula alumina* and *Dreissena polymorpha*) transplanted along a polymetallic gradient. *Chemosphere* 65: 609 – 617.
- Marigomez I, Soto M, Cajaraville MP, Angulo E, Giamberini L. 2002. Cellular and subcellular distribution of metals in mollusks. *Microscopy Research and Technique* 56: 358 – 392.
- Markich SJ, Brown PL, Jeffree RA. 2001. Divalent metal accumulation in freshwater bivalves: An inverse relationship with metal phosphate solubility. *Science of the Total Environment* 275: 27 – 41.
- Marr JCA, Hansen JA, Meyer JS, Cacela D, Podrabsky T, Lopton J, Berman HL. 1998. Toxicity of cobalt and copper to rainbow trout: application of a mechanistic model for predicting survival. *Aquatic Toxicology* 43: 225 – 238.
- Matthews MA, McMahon RF. 1999. Effects of temperature and temperature acclimation on survival of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian clams (*Corbicula fluminea*) under extreme hypoxia. *Journal of Molluscan Studies* 65: 317–325.
- McCarty LS, Mackay D. 1993. Enhancing ecotoxicological modeling and assessment. *Environmental Science and Technology* 27: 1717 – 1728.
- Mehler WT, Schuler LJ, Lydy MJ. 2008. Examining the joint toxicity of chlorpyrifos and atrazine in the aquatic species: *Lepomis macrochirus*, *Pimephales*

- promelas* and *Chironomus tentans*. *Environmental Pollution* 152: 217 – 224.
- Moriarty F. 1975. “Exposure and residues” in organochlorine insecticides: persistent organic pollutants. Moriarty F (Ed), Academic Press. UK. Pp. 29 – 72.
- Mubiana VK, Blust R. 2007. Effects of temperature on scope for growth and accumulation of Cd, Co, Cu and Pb by the marine bivalve *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research* 63: 219 – 235.
- Narbonne JF, Djomo JE, Ribeira FV, Garrigues P. 1999. Accumulation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed to sediment by the mollusk *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicology and Environment Safety* 42: 1 – 8.
- Newton TJ, Cope WG. 2007. Biomarker responses of unionid mussels to environmental contaminants. In: Farris JL, van Hassel JH (Eds.), *Freshwater Bivalve Ecotoxicology*. SETAC, CRC press Inc., Boca Raton., pp. 169 – 213.
- Ortmann , Grieshaber MK. 2003. Energy metabolism and valve closure behaviour in the Asian clam *Corbicula fluminea*. *Journal of Experimental Biology* 206, 4167 – 4178.
- Plette ACC, Nederlof MM, Temminghoff EJM, van Riemsdijk WH. 1999. Bioavailability of heavy metals in terrestrial and aquatic systems: A quantitative approach. *Environment Toxicology and Chemistry* 18: 1882 – 1890.
- Ramos EU, Vermeer C, Vaes WHJ, Hermens JLM. 1998. Acute toxicity of polar narcotics to three aquatic species (*Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* and *Lymnaea stagnalis*) and its relation to hydrophobicity. *Chemosphere* 37: 633 – 650.
- Santos HM, Diniz MS, Costa PM, Peres I, Costa MH, Alves S, Capelo JL. 2007.

- Toxicological effects and bioaccumulation in the freshwater clam (*Cubicula alumina*) following exposure to trivalent arsenic. *Environmental Toxicology* 22: 502 – 509.
- Schuler LJ, Landrum PF, Lydy MJ. 2004. Time-dependent toxicity of fluoranthene to freshwater invertebrates and the role of biotransformation on lethal body residues. *Environmental Science and Technology* 38: 6247 – 6255.
- Schuler LJ, Landrum PF, Lydy MJ. 2007. Response spectrum of fluoranthene and pentachlorobenzene for the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 26: 139 – 148.
- Sebesvari Z, Ettwig KF, Emons H. 2005. Biomonitoring of tin and arsenic in different compartments of a limnic ecosystem with emphasis on *Cubicula alumina* and *Dikerogammarus villosus*. *Journal of Environmental Monitoring* 7: 203 – 207.
- Sluys H, van Hoof F, Cornet A, Paulussen J. 1996. A dynamic new alarm system for use in biological early warning systems. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 1317 – 1323.
- Smith AH, Lopipero PA, Bates MN, Steinmaus CM. 2002. Arsenic epidemiology and drinking water standards. *Science* 296: 2145 – 2146.
- Tas JW, Keizer A, Opperhuizen A. 1996. Bioaccumulation and lethal body burden of four triorganotin compounds. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 57: 146 – 154.
- Tas JW, Seinen W, Opperhuizen A. 1991. Lethal body burden of triphenyltin chloride In fish: preliminary results. *Comparative Biochemistry and Physiology. C, Comparative Pharmacology and Toxicology* 100: 59 – 60.
- Thorsen WA, Cope WG, Shea D. 2007. Toxicokinetics of environmental contaminants

- in freshwater bivalves. In: Farris JL, van Hassel JH (Eds.), *Freshwater Bivalve Ecotoxicology*. SETAC, CRC press Inc., Boca Raton., pp. 169 – 213.
- Tran D, Boudou A, Massabuau JC. 2001. How water oxygenation level influences cadmium accumulation pattern in the Asiatic clam *Cubicula fluminea*: a laboratory and field study. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2073 – 2080.
- Tran D, Boudou A, Massabuau JC. 2002. Relationship between feeding-induced ventilatory activity and bioaccumulation of dissolved and algal-bound cadmium in the Asiatic clam *Cubicula fluminea*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 327 – 333.
- Tran D, Ciret P, Ciutat A, Durrieu G, Massabuau JC. 2003. Estimation of potential and limits of bivalve closure response to detect contaminants: application to cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 914 – 920.
- Tran D, Fournier E, Durrieu G, Massabuau JC. 2004. Copper detection in the Asiatic clam *Corbicula fluminea*: optimum valve closure response. *Aquatic Toxicology* 66: 333 – 343.
- Tran D, Fournier E, Durrieu G, Massabuau JC. 2007. Inorganic mercury detection by valve closure response in the freshwater clam *Corbicula fluminea*: integration of time and water metal concentration changes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26: 1545 – 1551.
- Tsai JW, Liao CM. 2006. A dose-based modeling approach for accumulation and toxicity of arsenic in tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Environmental Toxicology* 21: 8-21.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). 1991. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving water to freshwater and marine

- organism. EPA 600 – 4 – 90 – 027. Publication, Cincinnati, OH.
- U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). 1995. Water quality criteria documents for the protection of aquatic life in ambient water. EPA 820 – B – 96 – 001. Office of Water, Washington, DC.
- Unlu MY, Fowler SW. 1979. Factors affecting the flux of arsenic through the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Biology* 51: 209 – 219.
- Venitz J. 1995. Pharmacokinetic – pharmacodynamic modeling of reversible drug effect. In: Derendorf H, Hochhaus G (Eds.), Handbook of pharmacokinetic/pharmacodynamic correlation, CRC Press. FL., pp. 1 – 34.
- Vidal ML, Basseres A, Narbonne JF. 2002. Influence of temperature, pH, oxygenation, water-type and substrate on biomarker responses in the freshwater clam *Cubicula alumina* (Muller). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 132: 93 – 104.
- Vigano L, Farkas A, Guzzella L, Roscioli C, Erratico C. 2007. The accumulation levels of PAHs, PCBs and DDTs are related in an inverse way to the size of a benthic amphipod (*Echinogammarus stammeri* Karaman) in the River Po. *Science of the Total Environment* 373: 131 – 145.
- Wagner JG. 1968. Kinetics of pharmacologic response. I. Proposed relationships between response and drug concentration in the intact animal and man. *Journal of Theoretical Biology* 20: 173 – 201.
- Walsh K, Dunstan RH, Murdoch RN, Conroy BA, Roberts TK, Lake P. 1994. Bioaccumulation of pollutants and changes in population parameters in the gastropod mollusk *Austrocochlea constricta*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 26: 367-373.

Wildridge PJ, Werner RG, Doherty FG, Neuhauser EF. 1998. Acute effects of potassium on filtration rates of adult zebra mussels, *Dreissena polymorpha*. *Journal of Great Lakes Research* 24: 629 – 636.

中央氣象局全球資訊網。2008。 <http://www.cwb.gov.tw>。

江守山。2006。重金屬汙染事件頻傳有害國人健康：如何檢查及治療重金屬汙染。
新光醫訊 173: 2.

行政院農委會漁業署。2006。 <http://www.fa.gov.tw>。

行政院環境保護署。2008。 <http://www.epa.gov.tw>。

何雲達。1995。貝類養殖(三)蜆。台灣農家要覽漁業篇，第 252 – 255 頁。豐年社，台北。

沈林琥。2001。生理為基礎之藥理動力及動態模式研析台灣烏腳病地區養殖魚類
砷累積。台灣大學農業工程學研究所博士論文。195pp.

林志生。2003。飲用蜆萃出物對酒精性肝臟損傷之影響。中華民國營養學會雜誌，
第 28 卷，第一期，第 26 – 33 頁。

林玠明。2007。結合銅可獲取率與淡水蜆之電生理反應模擬鰓膜介面交互作用。
台灣大學生物環境系統工程學系碩士論文。113pp.

張崑雄，詹榮桂。1986。海域無脊椎動物。墾丁國家公園管理處。屏東。95pp.

陳立欣。2006。人工淡水蜆養殖的蜆貝與產於花蓮的黃金蜆。養魚世界，第一期，
第 104–107 頁。

陸運嫻。2005。台灣地區土壤重金屬汙染調查方法之相關性研究。逢甲大學環境
工程與科學學系碩士論文。103pp.

蔡正偉。2005。以生物能量及生理為基礎之觀點探討砷毒性對吳郭魚之毒理動力
/動態及作用模態。台灣大學生物環境系統工程學系博士論文。150pp.

蔡正勝。2006。95 年度台灣地下水水質檢驗分析與評估。經濟部水利署水利規劃試驗所。649pp.

鄭旭惠。2003。台灣西南沿海地區地下水養殖虱目魚之砷累積研究。南華大學環境管理研究所碩士論文。46pp.

蕭一鵬。1987。台灣蜆(*Corbicula fluminea*)幼生之培育研究。輔仁大學生物學研究所碩士論文。77pp.

賴景陽。1988。台灣自然觀察圖鑑 13 貝類。渡假出版社有限公司。

魏彰郁，林晏熙，劉嘉剛。1985。重金屬毒性對淡水蝦及蜆的半致死濃度。行政院農委會水產試驗所試驗報告 38: 75-81。

