

第二章、文獻回顧

2.1 藻類毒性試驗

藻類毒性試驗在過去幾十年來已經發展得相當迅速，至今，此種毒性試驗可以由實驗技術分成批次式及連續式[19-22]；而在於評估毒物等的毒性時，則大多使用批次式方法(U.S.EPA, OECD, ISO, APHA, AST 等)[23-25, 72]。

此類的批次式藻類毒性試驗常用的反應參數包括了有細胞密度 (cell density、biomass、growth rate)、產氧量、葉綠素量 (chl-a) 及細胞平均體積 (Mean cell volume, MCV) 或總體積 (Total cell volume, TCV) 等等；通常都會依據實驗的需求來選擇最為適合的參數及技術方式。大部分的試驗標準方法，則常以生物量來作為反應參數，但是在於這方面的試驗程序及裝置，卻又在過程上有一定的困難點；因而又發展出以產氧量作為反應參數[25]，由此來定義實驗中所用之藻類的生長情形及毒性效應。

雖然後來所發展出的這些參數更為便利，且具一定可信度，應用於無機性化學物質或重金屬實驗來看，相當的成功；但卻忽略到以往所使用的開放式系統，當在研究具揮發性的有機物試驗時，還是會因裝置上的缺點，而限制了藻類毒性試驗的使用。

曾經 Glassi and Vighi 引用 U.S.EPA 所提出的 Algal Assay Procedure Bottle Test (AAPBT)，並另外做了一些修改，實驗中針對五種氯苯類有機物以 *Selenastrum capricornutum* (*Raphidocelis subcapitata*) 為試驗物種進行試驗，以一 2 升之密閉容器內裝試驗溶液僅 100 ml，利用剩餘的大

空間沖入 CO₂ 氣體以提供足夠之碳源，最後將試驗結果與以往文獻記載的實驗數據作一比較，雖然此系統也屬密閉式系統，相對於僅 100 ml 的溶液，過大的空間(head space)仍使得有機物有揮發，逸散的可能性[26]。從此試驗之後，其他研究群逐漸正視這種系統的必要性，慢慢地也發展出一連串模擬半密閉式或密閉式的試驗；但是試驗成效與結果的再現性、敏感度卻是大異其趣。

如今，為了改善上述的缺點，本研究室進而採取完全密閉式系統設計，以產氧量及細胞密度作為反應參數；使用簡單的 BOD 瓶，一個完全密閉空間，具低成本且快速試驗方式，讓藻類毒性試驗應用變得更加廣泛，並可顯示相對的極佳敏感度及再現性之優點[27, 28]。

2.2 毒性物質--農藥

2.2.1 農藥之特性



本實驗中所使用的農藥，根據使用之目的及物化性質、結構來區分，可先略分成以下 3 類：[29-33]

(一)、 殺蟲劑 (Insecticides)

此類為農藥中使用最頻繁的一類，其中以有機磷農藥為較常出現的種類；有機磷殺蟲劑 (Organophosphorus Insecticides)，大多為磷酸 (phosphoric acid) 和硫磷酸 (thiophosphoric acid) 的酯化物，例如二氯松 (dichlorvos) 及巴拉松 (parathion) 等等。此類殺蟲劑對動物具較高的急毒性反應，主要的作用機制為抑制乙醯膽鹼酯酶 (酶) (Acetylcholinesterase, AChE) 的活性，導致乙醯膽鹼 (acetylcholine, Ach) 的堆積，使神經傳導受到阻礙，引起許多症狀，症狀的嚴重程度可由測

定血液中膽鹼酯酶 (cholinesterase) 的活性強度來判定[55, 56]。此類的殺蟲劑，除了巴拉松和大氣松外，尚有甲基巴拉松 (methyl-parathion)、大力松 (diazinon)、大滅松 (dimethoate)、馬拉松 (malathion)、美文松 (mevinphos) 和二氯松 (fenthion)、三氯松 (trichlorfon)。

在此部份，當探討到這些有機磷農藥的毒性時，則必須先了解他們在生物體內的代謝途徑，就實驗中所做的農藥毒物為例，做概略的圖示說明：如圖 2.2.1 至圖 2.2.3[78]。

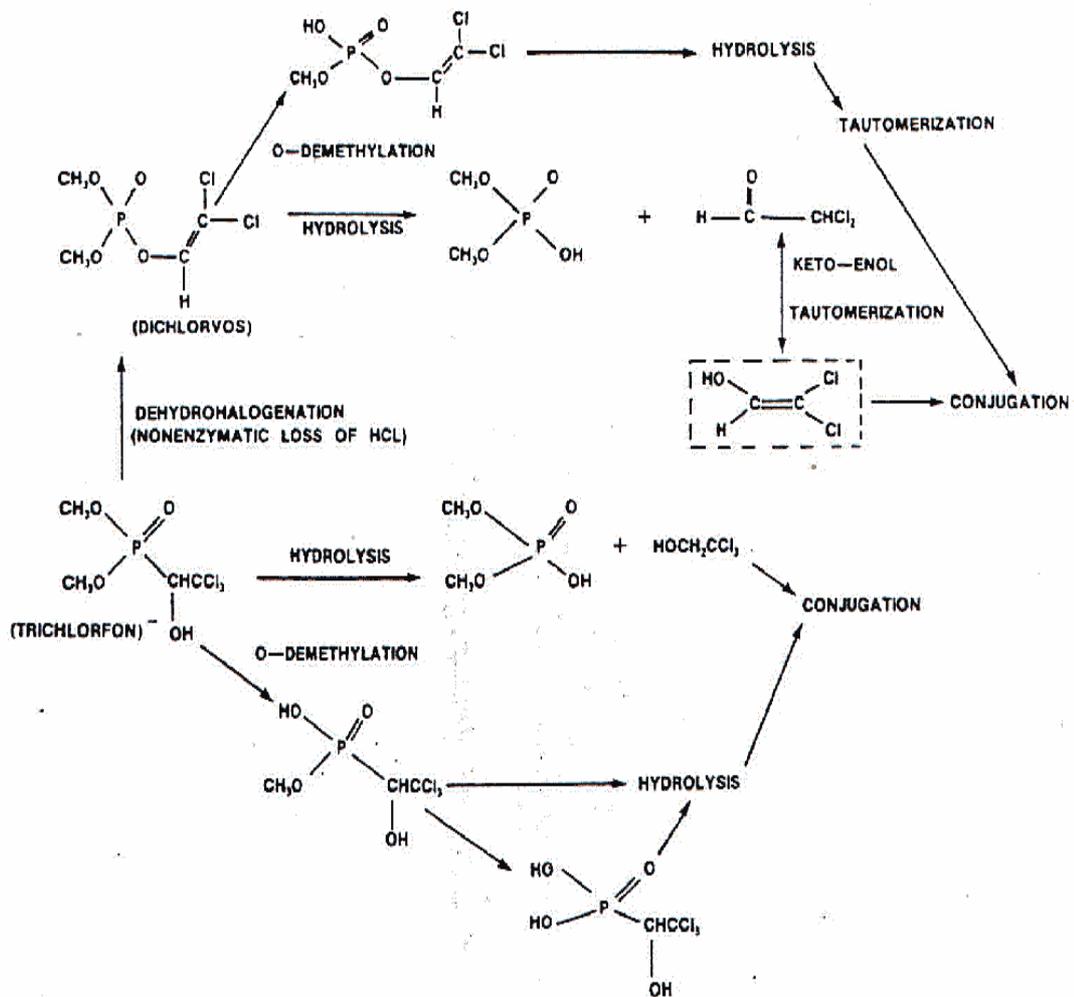


圖 2.2.1 The metabolism pathway of dichlorvos

*Source : Ho Mat H. and Dillon H.K. (1987)[78]

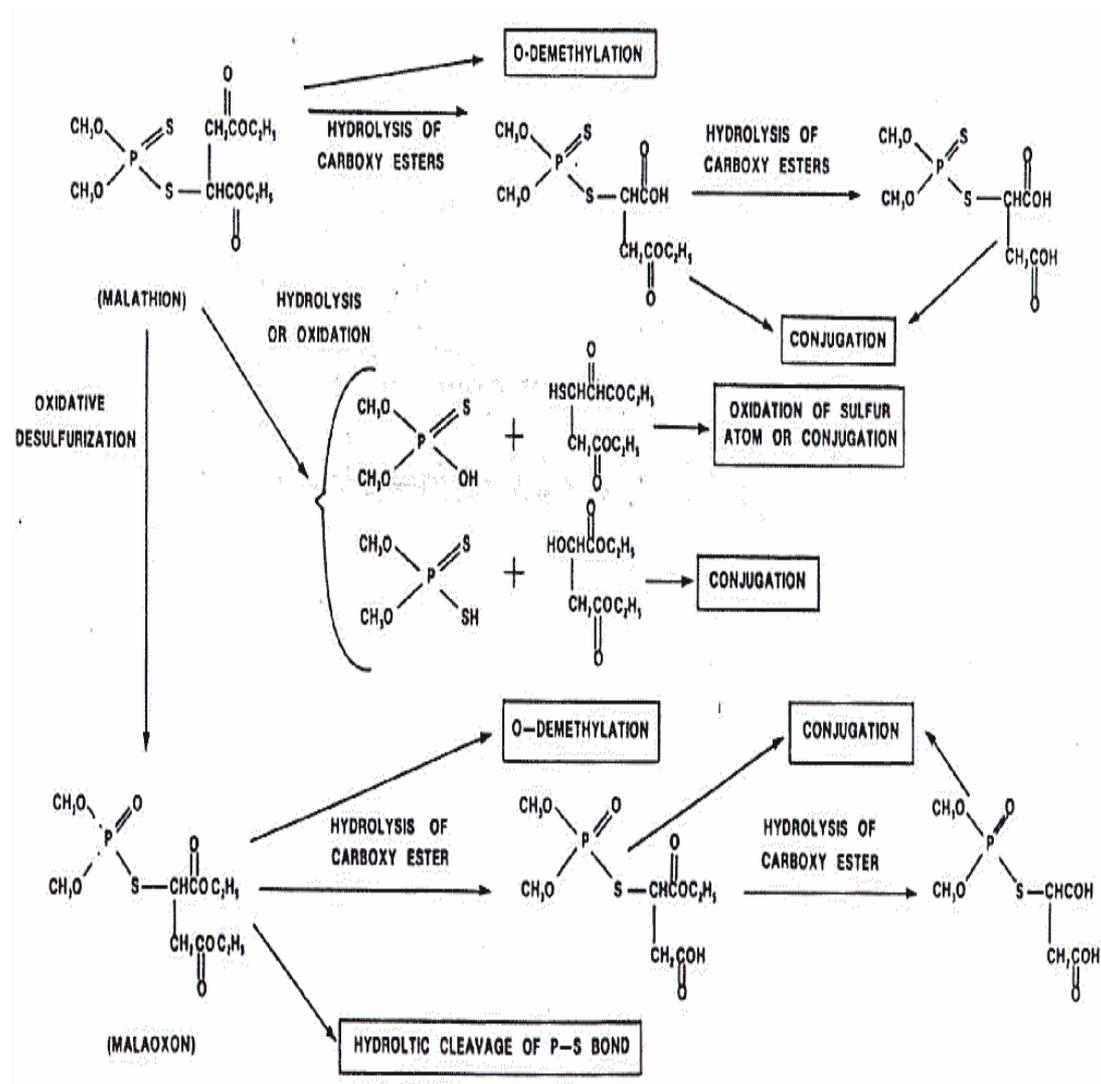


圖 2.2.2 The metabolism pathway of malathion

*Source : Ho Mat H. and Dillon H.K. (1987)[78]

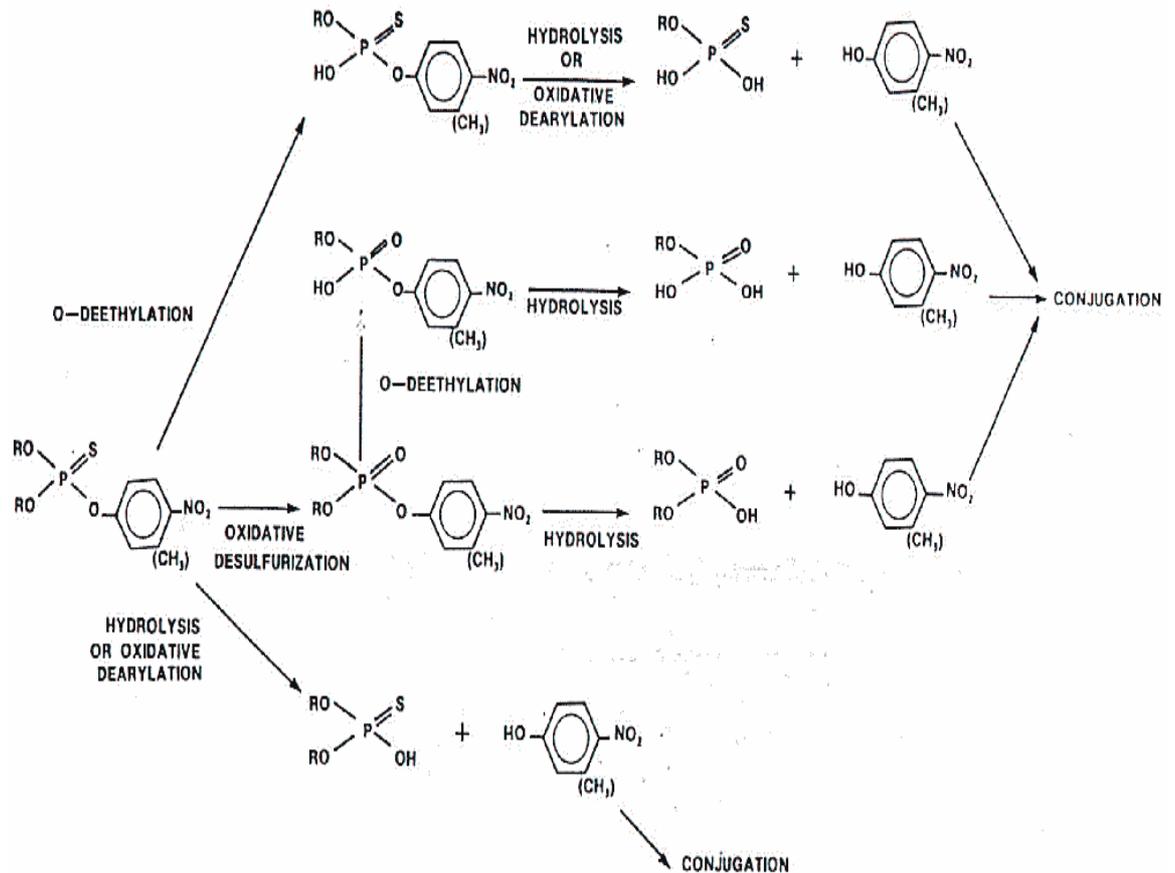


圖 2.2.3 The metabolism pathway of parathion

*Source : Ho Mat H. and Dillon H.K. (1987)[78]

以上的這些圖示皆表示出二氯松 (dichlorvos)、馬拉松 (malathion) 與巴拉松 (parathion) 在生物體中代謝，水解氧化的過程。有機磷劑在人體內的生物轉換相當複雜，某些可經由去硫磺基氧化 (oxidative desulfurization of thiophosphoryl group)、去硫氧化 (oxidation of the sulfide moiety)、氨基氧化 (oxidation of amides)、烷基氫氧化 (hydroxylation of alkyl group) 等作用，使得代謝產物比原化合物的毒性更大；某些有機磷劑則可經由 phosphatases、phosphoramidases、carboxyesterase 及 amidases 的降解作用或結合反應之生物轉換等。而大部分之有機磷劑於生物體內會代謝為 dimethyl phosphate、diethyl thiophosphate、diethylthiophosphate 等代謝物後

由尿液中排出體外。[82]

圖中顯示出這些化學物質的變化過程，相當複雜且多樣；但這些皆為總括的說法，確切地在生物體內的反應並無法了解；這樣的結果，則使得在針對於這類有機磷農藥所進行的毒性試驗更難以評估，必須要多方面的輔助試驗，才能完整的探討其間反應造成的影響。

(二)、 除草劑 (Herbicides)

除草劑的種類相當的多，但是大多對動物的毒理反應卻不太明瞭，且大多試驗是以植物及藻類為主。

其中如 atrazine，主要是抑制光合作用反應；此類的化合物會抑制稱之為 D1 的蛋白質，這種蛋白質與光合作用時的電子傳遞有很大的關聯性，故這樣的干擾行為即會牽涉到 PS II (光合作用系統 II) 的抑制情形[61, 64, 73]。而另一種的酚氧系除草劑，如 MCPA 等化合物，對植物來說，為一種反生長激素，會抑制生長；主要是細胞中電子傳遞受到抑制反應，進而影響到生物的生長情形。

總而言之，除草劑的毒性反應機構仍與有機磷農藥一樣相當複雜，並隨除草劑的種類，使用方法及濃度而異；大體上可歸納下列因素使植物生理機能攪亂：如化學作用使細胞質破壞、物理作用使細胞質破壞、土壤反應的變更使生長發生阻礙、新陳代謝及光合作用的機構發生阻礙等[18]。

(三)、 殺菌劑 (Fungicides)

其中一種，五氯酚（pentachlorophenol, PCP），大多廣用於木材的保存，為一種芳香族取代物，但此類的化物也常被當作除草劑來使用。五氯酚會增加氧化磷酸化去偶合作用（uncoupling of oxidative phosphorylation）的代謝速率，通常會造成生物的降解限制；偵測到的半致死劑量（LD50）大多較低，即使市面上的工業級成品因製造不純，但仍相對地具有較高的毒性。

2.2.2 農藥之毒性評估

一般過去的研究都依循於農藥應定量化再行風險評估。而定量化第一步即是建立定量指標。在農藥的毒性試驗方面，大部分常用的是 LD50 及 LC50 兩種指標；實驗物種大都為實驗白鼠、細菌及原生動物或植物、無脊椎動物等。過去許多研究中曾以鼠類做毒性試驗反應，針對農藥對生物體中的神經系統所產生的急毒性試驗做討論[17, 34-36]。另外，植物也是過去實驗中常見的物種，主要也都是根據其植物體對毒物的被抑制生長情形或葉綠素量作反應參數，了解毒物對生物體的抑制情況[2, 37, 38]。

在常用農藥部分，可發覺到其中大部分農藥為不可溶於水的化學物，屬疏水性（hydrophobic）的物質，只有少數相對可溶於水的毒物；而具這些物化特性的化合物極可能因為降雨、滲漏的方式或經噴灑過程，污染地面水及地下水體，再經由水體的流佈，使得污染擴大，危害性也為之增加。流入水體的農藥毒物不只對於水體中的水生生物間接造成了傷害，且經由食物鏈系統，對於環境及人類更具有潛在性的危險，像是魚類、甲殼類、軟體動物、及藻類等都可能成為是被直接危害的物種之一。而毒性試驗即為連接這些環境中存在的毒物及負面的生態影響之間關係的研究。

其中較為過去報告注重的物種大多為水蚤，魚類或無脊椎動物[4-6, 16, 40-42]；這些試驗皆假設這些水中生物較為植物來的敏感的前提之下所提出的，其中不乏為許多建立在不同水體區域，以不同魚種作為試驗物種的急毒性試驗研究，由試驗中毒物對魚體的致死情況，來決定測試毒物的毒性效應，其中尤以有機磷及有機氯的農藥毒物試驗最為常見[38, 39]。

但是研究中的因子變數影響相當的多，所需時間也太過長久，為求實驗的快速及經濟性，有另外的報告則是利用螢光菌（Microtox 或 Biotox）進行毒性試驗，並根據結果再與過去齧齒類或魚類、無脊椎動物等數據作比較，進一步證實實驗的可信度[13-15, 43, 44]。

以上這些文章所討論的幾乎是以動物界為試驗物種當作探討的對象，其實以往報告中也有不少主要針對各類藻種作實驗物種所進行的研究，如 green algae (*Selenastrum capricornutum* 或 *Scenedesmus subspicatus*) 或 diatom, diatomophyta (*Navicula accommoda*)、cyanophyta (*Oscillatoria limnetica*)等，做較為常見的農藥毒性試驗報告[45-48]；可是對於這方面的實驗實例還是相當缺乏，無法完善的表達出確實的反應結論。因為如此，根據 Julia 和 Thomas (2000) [49]兩位學者後來的調查，就對多種不同藻類與植物於農藥及有機毒物、重金屬間的毒性反應試驗，由實驗中找出較敏感物種，以訂立毒物的資料庫；Lewis (1992,1995) [36, 37]也曾對於藻類試驗與魚毒、植物做比較性研究，發現藻類試驗可判定為較敏感的物種，且反應的時間可以更為縮短；加上有成本上的考量，也較為經濟。但綜觀至今，所有的實驗方法還是相當的分歧，需要長時間作整合。

一般來說，這些毒性試驗只能針對物種的反應來表示出可能對環境的危害程度；若需要再深入了解更細部的情況時，對於它們所呈現的特定 (specific) 毒理特性方面，則就須有所必定的了解。一般大概可分成下列幾種效應：[58]

(一) 對神經系統的毒性 (Toxicity on the Nervous system)

有機磷和胺基甲酸鹽殺蟲劑會抑制乙醯膽鹼酯酶的活性。在正常的情况下，神經在受到刺激後，神經傳導物質如乙醯膽鹼會釋放到突觸 (synapse) 中，將刺激傳給下一個神經元，然後再經乙醯膽鹼酯酶將之水解成乙酸和膽鹼。(圖 2.2.4) 但是若暴露在有機磷或胺基甲酸鹽殺蟲劑的情况下，乙醯膽鹼酯酶的活性被抑制，使得乙醯膽鹼無法被分解而累積。其中胺基甲酸鹽類的毒性是可逆的，而有機磷殺蟲劑的毒性則較不可逆 [52-54]。(圖 2.2.5)

其作用機制如下圖所示：

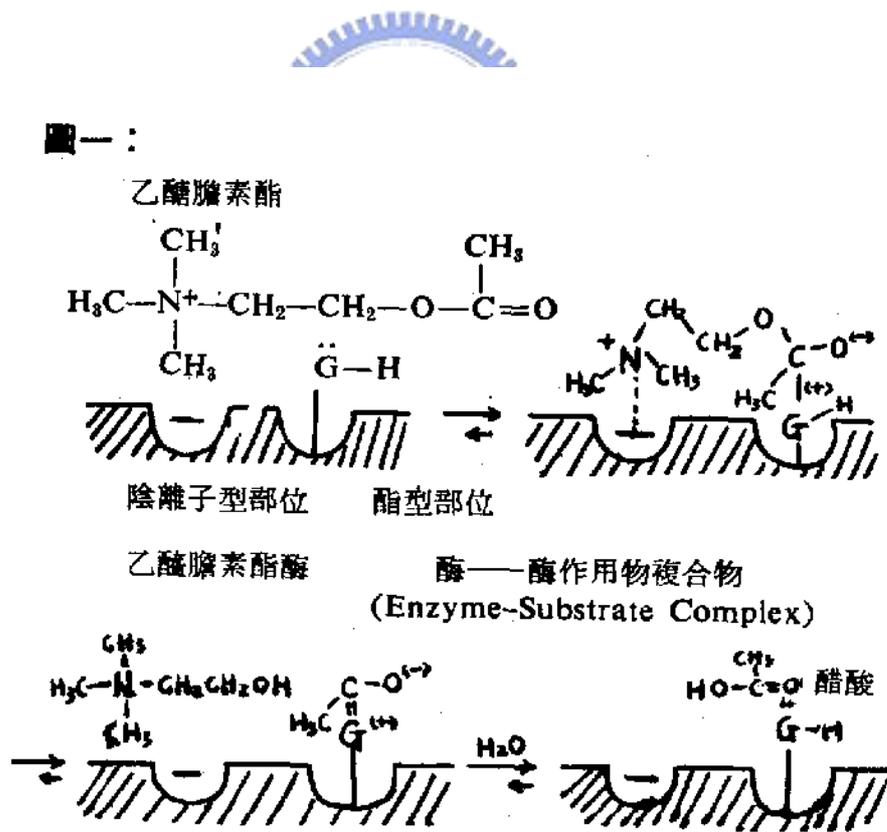


圖 2.2.4 Mechanism of enzyme

*Source : the Journal of Science(1973)[86]

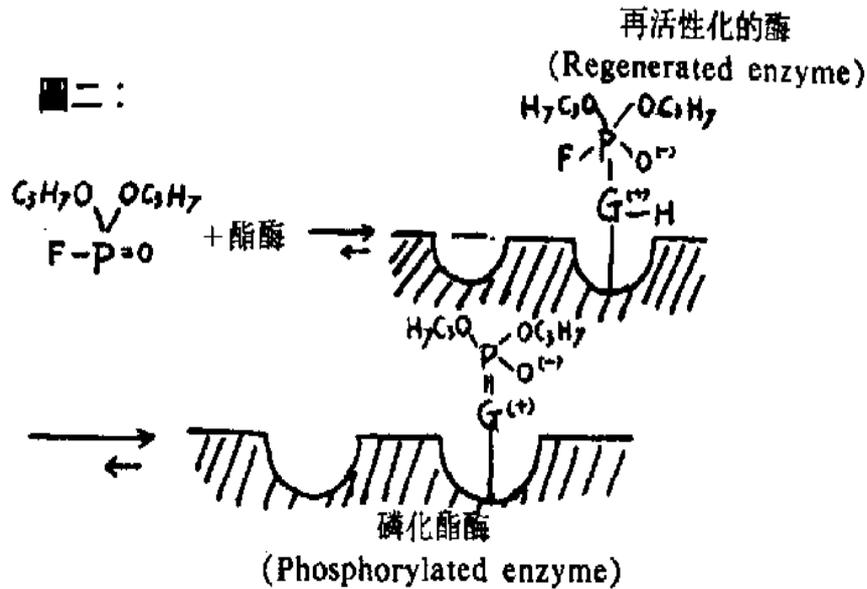


圖 2.2.5 Reactive mechanism of toxicants entering the human body

* Source : the Journal of Science(1973)[86]

此外，某些有機磷殺蟲劑及醯胺類殺蟲劑，譬如大利松 (Diazinon) 和三氯松 (trichlorofon)、或 Carbaryl 和 Aldicarb (carbomate) 則是會引起延遲性及慢性的神經毒性 (delayed neurotoxicity) [35, 50, 51]。

(二) 交互作用 (Interactions)

最常見的交互作用是增強作用 (potentiation)。Norment 和其同僚曾提出將 EPN (O-thyl-o- (4-nitrophenyl) phenylphosphonothioate) 和馬拉松 (malathion) 一起使用，具有明顯的增強作用[57]。此類的增強作用常見於有機磷殺蟲劑，有些效應是加成性 (additive)，有些是非加成性 (less than additive) 另外，有些則具有協同性 (synergistic)。最有名的例子為馬拉松和 TOCP (tri-o-dresylphosphate) 聯合使用，其毒性可增加 100 倍。增強作用的產生主要為抑制酵素的活性，譬如梭 (羧) 酸酯酶 (carboxylesterase)

和醯胺酶 (amidases)，這類酵素參與了某些有機磷殺蟲劑的解毒作用 (detoxication)，例如巴拉松和其代謝物巴拉奧克松 (paraoxon) [59, 60]。

(三) 致癌性 (carcinogenicity)

一般而言，有機磷殺蟲劑不具致癌性，但是含有鹵素的有機磷殺蟲劑卻具有致癌性，例如四氯文松 (tetrachlorvinphos)。大多發生在有機氯殺蟲劑中，其中爭議最大的是 DDT。DDT 殺蟲劑對小鼠或其他動物均無致癌性，在流行病學調查和短期致突變性試驗中，亦呈陰性反應。然而卻由於 DDT 的累積性和持久性形成對人類健康和生態環境潛在的危害，所以遭到禁用[63]。

胺基三唑 (aminotriazole) 是種除草劑，會間接導致甲狀腺腫瘤。甲狀腺過氧化酶 (thyroid peroxidase) 在正常的情況下會將碘氧化，氧化態的碘會和酪胺酸 (tyrosine) 結合，形成甲狀腺素 (thyroxine)，執行正常的生理功能。胺基三唑會抑制甲狀腺過氧化酶的活性，因而降低體內甲狀腺素的含量。經由回饋機制 (feedback mechanism)，血中甲狀腺素過低會刺激腦下垂體分泌更多的促甲狀腺刺激素 (thyrotropic hormone)。甲狀腺在此種刺激素長期的刺激下，導致過度增生，終究形成腫瘤。因此胺基三唑又有『二級致癌物』(secondary carcinogen) 之稱，只允許使用在非食物性的農作物上[81]。

(四) 致畸胎性和對生殖功能的影響 (Teratogenicity and Effects on Reproductive Functions)

在 1960 年代，有文獻報告加保利 (Carbaryl) 對狗有致畸胎性

(teratogenicity)，同時也影響生殖系統的功能。並經由不同的代謝途徑，不同生物對加保利的毒性有不同的感受性[62]。

(五) 其他有害影響 (Other Adverse Effects)

有機磷、有機氯和胺基甲酸鹽類殺蟲劑，二硫代氨基甲酸鹽殺蟲劑和除草劑亦會改變免疫系統功能。例如馬拉松 (malathion)、甲基巴拉松 (parathion-methyl)、加保利 (Carbaryl)、DDT、巴拉刈 (paraquat) 和地刈 (diquat) 等，都會降低抗體的產生，和抑制脾、胸腺、淋巴結中胚胎生發中心 (germinal center) 的速率[62]。

(六) 生物累積性和生物擴大性 (Bioaccumulation and Biomagnification)

農藥的累積性和生物擴大性、親脂性 (lipophilic) 和抗分解性有關。一般而言，有機氯殺蟲劑在環境中的持久性較長，且易儲存在脂肪中[58, 63]。農藥的持久性對生態環境也造成許多問題。這些農藥在生物體內的存
在，雖然不至於會明顯危害生物體，但微量的殘留則會造成干擾。成為生物體中的假性荷爾蒙 (environmental hormone)。這種荷爾蒙的擾亂對生物體會有不良的影[58]響。

生物擴大效應 (Biomagnification) 是生物累積效應 (Bioaccumulation) 的結果。另外，生物擴大效應也常見於肉食性動物中。例如 DDT 和甲基汞會經由浮游生物、小魚、大魚和鳥類食物鏈而累積達好幾百倍，對生態環境造成嚴重衝擊[63]。

2.3 混合毒性試驗

現今環境中的水體常包括了工業，農業，或者是都市廢棄的出流水，其中包含許多大量且多樣的化合物（例如：重金屬、農藥、或是其他有機物等）。單單針對這些單一毒性作討論，已經沒有辦法表現出真實的危害性，這讓評估並預測這些複雜的化學混合物可能的毒性結合效應視為一件相當棘手的部分；過去幾十年來，在於農藥方面的混合毒性研究，儼然已逐漸成為注重的課題之一，這也是由於它的分佈及使用相當的廣泛，故這方面試驗才會如此受到關注。

在混合毒性的試驗上，主要觀察的是這些混合物的聯合作用（joint action 或 combined effect）。聯合作用指的是兩種或兩種以上的毒物同時或前後相繼作用而產生的交互毒性作用。人們在生活上和工作環境中經常同時或相繼接觸數種毒物，這些毒物再機體內所產生的毒性作用與一種毒物所產生的毒性作用，並不完全相同；所以我們必須討論這些化學物質混合的作用情形。通常混合狀的化學物質對有機體產生的聯合作用可分成下幾種類型：

（一）、 相加作用

相加作用（additive effect）指多種化學物的聯合作用等於每一種化學物單獨作用的總合。化學結構較為相近或同系物、或毒性作用目標器官相同、作用機理相類似的作用；具有麻醉作用的毒物，在麻醉作用方面也多表現為相加作用。

例如有機磷農藥 Diazinon 與 Chlorpyrifos[65]及 Fenthion[66]利用無脊椎動物及魚類以不同劑量配比所作出來的實驗結果，均呈現出相加作

用。但非所有的有機磷農藥都會呈現像這樣的相加作用，像是 Azinophos 與 parathion 即呈現出相加作用，但是 Azinophos 與 DDT 之間的聯合作用則會呈現毒性加大約 1.5 倍。因此，同系衍生物，甚至是主要的目標作用酶完全相同，也會不一定表現出相加的作用。

再者，兩個化學物的配比不同，聯合作用的結果也可能不相同。例如 Ketamine（卡門，麻醉用藥）與 Xylazine（賽拉嗪，治療癲癇藥物）若以 1：1 配置，對於鼠類會呈現相加作用，但是若以 3：1 的方式配比則會出現毒性增強的反應[82]。

其他像在國外常用的農藥 Atrazine 來說，過去有研究針對此類化合物與同時存在的異化物，會有毒理上的影響方面作討論，所使用的實驗物種為昆蟲幼蟲（*Chironomus tentans*），對大部分有機磷農藥來說，如 parathion，chlorpyrifos 等，則常出現協同的作用[67, 68]。

但是也並非為所有與 Atrazine 混合的混合物都是呈現這樣的毒性反應：1993 年 Douglas 等人利用昆蟲幼蟲對 Atrazine 及 Carbofuran 所作的一個毒性試驗，則是反應出一相加作用[68]。

（二）、 協同作用與增強作用

協同作用（synergistic effect）指幾種化學物的聯合作用大於各種化學物的單獨作用之和。若是一種物質本身存有毒性，但與另一有毒物質同時存在時可使該毒物的毒性增加時，我們稱這種作用為增強作用（potentiation）。像是在 1996 年 Khru 等人利用 Biotox 的試驗方式對 Coumarin、Pentachlorophenol（PCP）、Glyphosate 所作的混合毒性顯示其三者相混合所得到的結果為一個相加的作用情形；但若是個別針對其中的化合物作探討，則會發現 Coumarin 在混合反映中所呈現的是協同反應，而 PCP 及 Glyphosate 則皆呈現拮抗的作用，這也表示當混合組成即

使一樣，仍可能會有無法預測的反應會產生[69]。

化學物質生成協同作用與增強作用的機理相當的複雜。有的是某個化學物質在機體中作用產生新的物質，使毒性增強；像是亞硝酸鹽和某些胺化合物在人體內會反應生成亞硝胺，而使毒性增加。其他有的是化學物間的交互作用則是因為引起作用物種的代謝酶系統產生變化，如 malathion 及 parathion 所產生的協同作用[68]。

在前部分中，我們大致上提過 Atrazine 與有機磷農藥混合呈現大多為一協同效應，像這樣的反應在此被解釋說明為：因兩者間的作用機制為 Atrazine 會增加有機磷農藥的生物轉化作用（Biotransformation）而形成；除此之外，也有報告驗證出 Atrazine 會誘導異化物的代謝酵素，而呈現出更大的毒性效應[74, 75]。

另外，我們可能需探討到一個化學結構異同所可能造成的影響；像是 Atrazine 與 Malathion 混合所呈現的效果就不如與其他有機磷農藥的反應一樣，有顯著協同的效應情形；作者注意到 Malathion 的化學結構與其他的 OPs 有著明顯不同，那些會產生協同作用的有機磷農藥皆含有芳香族鏈（Aromatic side），Malathion 則為一個磷酸硫鍵結的支鏈加上脂芳族鏈，即使再這之前，有報告曾結論出為一協同效應，但是因結構不同，只有造成輕微的生物轉化情形，與其他的有機磷農藥表現大為不同，除非在高濃度的 Atrazine 下才能再呈現[76]。

另外的研究也有結果則是利用水蚤試驗（*Daphnia magna*）對 Carbofuran 及 Formetanate、Cyromazine 以不同比例所配置出的毒性試驗結果。[5]在對於 Carbofuran 及 Formetanate 所作的結果中所呈現的毒性效應，除了其中一組混合出的結果為拮抗作用外，其餘所呈現的皆為類似的相加毒性反應。可在對 Carbofuran 及 Formetanate、Cyromazine 三者一

同混合或是 Carbofuran 及 Cyromzine 兩者以不同比例混合來看，結果都明顯表示出呈現的是協同效應。這也呼應出之前所提到的：混合毒性會依照混合的組成情形或特性不同，而呈現不一定的毒性反應。

(三)、拮抗作用

拮抗作用 (antagonistic effect) 指的是幾種化學物質的聯合作用小於化學物單獨作用的總合。凡是能使另一種化學物質的生物學作用減弱的物質稱為拮抗物 (antagonist)。在毒理學及藥理學中，常以一種物質抑制另一種物質的毒性或生物學效應，這種作用也可稱為抑制作用。

拮抗作用的機理也是相當的複雜的，可能是各化學物間均作用於相同的系統、受體或酶，但之間發生競爭，例如 Atropine 與有機磷化合物之間的拮抗效應是為一生理拮抗作用，故藥理學上將此反應應用在有機磷中毒時的解毒作用原理。而 Pralidoxime (PAM) 與有機磷化合物之間的競爭性與 AchE 結合，則是生化性質的一種拮抗反應。另外，某些有機磷農藥 (Diazinon) 與水體或土壤中的氨氮 (Ammonia) 也會作用而呈現拮抗的作用，這可能與他們對生物體所產生的作用機制不同的關係 [77]。同樣的像這樣的作用情形也出現在 Atrazine 及 Mevinophos (OPs) 及 Methoxychlor (organochlorine) [29] 的混合情況中。

以上我們大部分都是在於探討農藥之間交互作用關係，但因為環境中所存在的化學物質並非只是簡單的同類物質之間的作用，所以另外也有其他的一些研究是針對農藥與重金屬等無機物之間的反應作探討。像是 Diazinon 與 copper 之間會呈現拮抗的效應 [71]；或 malathion 與 copper 則會呈現協同的效應 [72]。這些都定義是因 copper 作用與代謝途徑不一致有關。

根據過去的研究，皆屬於一般傳統的批次試驗，且這些實驗系統都屬於開放空間，像這樣的實驗方式對於具有揮發性的農藥試驗來說，相對有效性則需要被質疑；所以本實驗目的即在於利用所發展出的密閉空間試驗，對於揮發性農藥之試驗呈現的實驗結果再現性的特點來改善過去研究裝置上所呈現出的缺點。實驗主體上，我們主要針對於國內外常用的一般農藥來做研究，期望能由此發展出較完整的資料，以供為參考與應用。

