

## 第五章、 結果討論

### 5.1 單一毒物毒性試驗

實驗中主要是針對具揮發性農藥，以密閉式的藻類毒性試驗方法，分別量測實驗前後的溶氧量及細胞數作為反應終點；並利用所得的數據，以淨溶氧量 (DO)、生物質量 (Biomass, Final Yield) 和生長率 (Growth rate) 作為實驗參數，求得 EC50 值和劑量曲線。表 5.1.1 為以 MCPA 為實驗毒物之毒性原始數據表示，表格的前半部為實驗使用溶氧測定儀與顆粒計數器所測得的溶氧值與細胞數；後半部則是經過公式所計算求得各參數之抑制率。在將經過計算後所求得的數值代入 Probit 模式中，求得劑量反應曲線之斜率 ( $\beta$ ) 與截距 ( $\alpha$ )，另外還可求得個參數之 EC50 值。最後將此二值 ( $\alpha$ 、 $\beta$ ) 代入程式中，畫出劑量反應曲線，如圖 5.1.1。由圖中的曲線顯示可以檢查實驗的數據是否為一個良好、準確的劑量反應。至於 NOEC 的計算，本實驗是利用 Dunnett's test 所計算求得，這部分的結果在之後還會再做討論。

接下來的表 5.1.2 至表 5.1.3 為實驗農藥以 Probit 模式分析藻類毒性試驗所得到的數據。就得到的結果而言，先以溶氧量作為參數來看，屬於殺藻劑的 PCP (Pentachlorophenol) 為較毒的毒物 ( $EC_{50}=3.54 \times 10^{-3}$  mg/L)；最不具毒性的則為 MCPA ( $EC_{50}=3.39$  mg/L)。同樣的毒性反應趨勢也出現在以 Final Yield 及 Growth rate 為參數的數據中，這些值則分別為  $3.42 \times 10^{-3}$  和 3.12，與  $1.23 \times 10^{-2}$  及 5.01 mg/L。且從其中不同參數的數據可查覺到，普遍以 Final Yield 為參數時所得到 EC50 值較為敏感 (佔 85%)，其次才是 DO，而 Growth rate 的數據所呈現出來的，則屬最不敏感的參數。

從實驗中也觀察到 MCPA 結果與同為除草劑的 atrazine 卻差距約有 30 倍。最大的差異在於 MCPA 對藻類所反應出的是種 algistatic-type 的毒性模式，而

atrazine 則是呈現 algicidal-type 的毒性反應；那是類似一種類環境荷爾蒙的刺激，會刺激生物的生長情形，故使得兩者間的結果相差很大[47]。其他如有機磷農藥的 EC50，則表現出沒有多大的差距，這也表示這幾種農藥對於藻類的影響是大同小異的反應；過去文獻中也有針對這幾者之間的些許差異作更細部解釋。像是於數據中，可發現到 malathion 和 fenthion 所表現出的 EC50 值在同是有機磷農藥類的互相比較下，它們的值來的較小，原因可能是由化學結構方面的差異所造成的[76]。

圖 5.1.2 至圖 5.1.9 則為選擇農藥所作出之劑量反應曲線圖。從曲線圖中，也可發覺部分的劑量反應曲線，如 malathion 及 fenthion，曲線中最低濃度的部分，有表現出抑制率上升的情況，這在研究反應上稱作 Hormesis[79]。這個反應主要是與外在物質對生物體的刺激有關，像這樣的情況主要發生在短或中長時間上的接觸實驗裡。

另外，由反應方程式跟曲線圖中發現到反應曲線的斜率約分布在 0.89-3.81 間，差距約相差有 2 到 3 倍。在此表示出斜率高表示生物體所能忍受的最高濃度到完全抑制濃度只存在狹小範圍內；在此情況下，若濃度上有稍加變化，生物受體的反應就會大幅增加，這樣的情形在實驗中數據處理方面則需要多加注意。

表 5.1.1 The raw data of algal toxicity test about MCPA

Conc mg/L	Initial DO mg/L	Final DO mg/L	Final cells cells/ml	Delta DO			IR (growth rate)	IR (Biomass)	IR (DO)
				mg/L	$\mu_{\text{specific}}$	$\mu_{\text{relative}}$			
Control	1.21	9.75	330500	8.54	1.55	1	0	0	0
7	2.15	3.60	36633*	1.45*	0.45	0.29	0.71	0.93	0.83
5	1.91	4.95	73733*	3.04*	0.80	0.52	0.49	0.81	0.64
2.5	1.80	7.31	268200*	5.51*	1.44	0.93	0.068	0.20	0.35
2	1.59	7.02	275967*	5.43*	1.46	0.94	0.058	0.17	0.36
1	1.41	8.31	339733*	6.90*	1.56	1.01	-0.009	-0.029	0.19
0.5	1.26	8.82	351067*	7.56*	1.58	1.02	-0.020	-0.065	0.12

EC50=3.397(DO)

EC50=3.115(Final Yield)

EC50=5.009(Growth rate)

NOEC<0.500(DO)

NOEC=1.000(Final Yield)

\* : statistically different from the control ; The chemical in the data is MCPA

EC50 value is conducted by Probit model; NOEC values is conducted by Dunnett's test(one-trial)

IR : Inhibition rate

Biomass : Yield f (Final yield based on cell density)

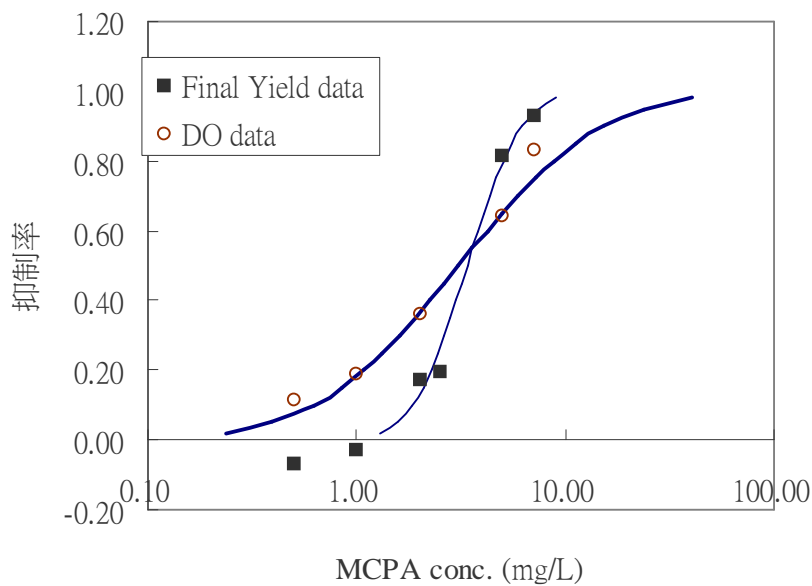


圖 5.1.1 The Dose-response Curve about MCPA

表 5.1.2 The data in algal toxicity test ( DO )

Toxicants ( mg / L )	Response based on DO			
	EC50	95% Confidence Limit	$\alpha$	$\beta$
Atrazine	0.089	0.086~0.095	8.03	2.89
MCPA	3.39	2.13~8.88	4.09	1.84
Parathion	1.16	1.10~1.22	4.88	1.79
Dichlorvos	0.74	0.698~0.77	5.13	0.96
Malathion	2.04	1.24~4.86	4.37	2.05
Fenthion	1.29	1.02~2.15	4.69	2.77
PCP	3.54E-3	3.03E-3~3.79E-3	11.73	2.72
Acetonitrile	5844.0	5551.80~6136.20	-7.78	3.39

$\alpha$  : The intercept of the Dose-response Curve

$\beta$  : The slope of The Dose-response Curve

\*Acetonitrile is used as a solvent

表 5.1.3 The data in algal toxicity test ( Final Yield )

Toxicants ( mg / L )	Response based on Final Yield			
	EC50	95% Confidence Limit	$\alpha$	$\beta$
Atrazine	0.078	0.075~0.082	7.21	1.99
MCPA	3.12	2.68~3.69	3.14	3.76
Parathion	0.93	0.88~0.97	5.08	2.29
Dichlorvos	1.62	1.54~1.69	5.52	2.38
Malathion	1.73	1.47~1.94	4.20	3.36
Fenthion	1.05	0.64~1.53	4.94	2.76
PCP	3.42E-3	7.29E-6~6.90E-3	8.95	1.60
Acetonitrile*	5509.10	5233.60~5784.60	-14.78	5.29

$\alpha$  : The intercept of the Dose-response Curve

$\beta$  : The slope of The Dose-response Curve

\*Acetonitrile is used as a solvent

表 5.1.4 The data in algal toxicity test ( Growth rate )

Toxicants	Response based on Growth rate			
	EC50 ( mg / L )	95% Confidence Limit	$\alpha$	$\beta$
Atrazine	0.162	0.154~0.170	6.004	1.270
MCPA	5.009	4.515~5.664	5.332	3.813
Parathion	2.094	1.981~2.198	4.514	1.514
Dichlorvos	1.206	1.146~1.266	4.839	1.979
Malathion	3.014	2.272~3.683	3.585	2.953
Fenthion	2.286	1.449~4.443	4.375	1.739
PCP	1.229E-2	2.453E-3~2.854E-2	6.719	0.899
Acetonitrile*	8067.9	7664.5~8471.3	-13.022	4.613

$\alpha$  : The intercept of the Dose-response Curve

$\beta$  : The slope of The Dose-response Curve

\*Acetonitrile is used as a solvent

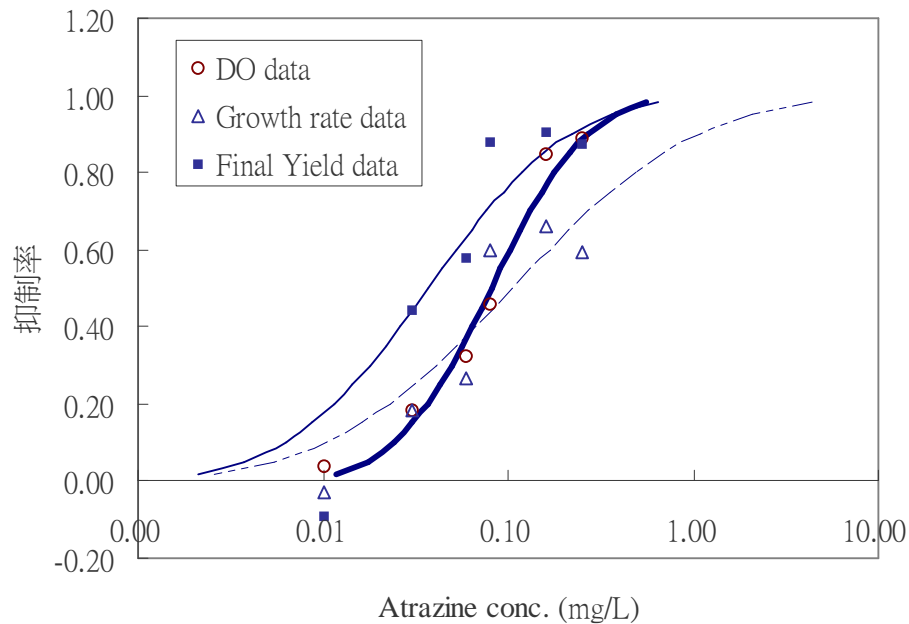


圖 5.1.2 The Dose-response Curve of atrazine (including of three parameters)

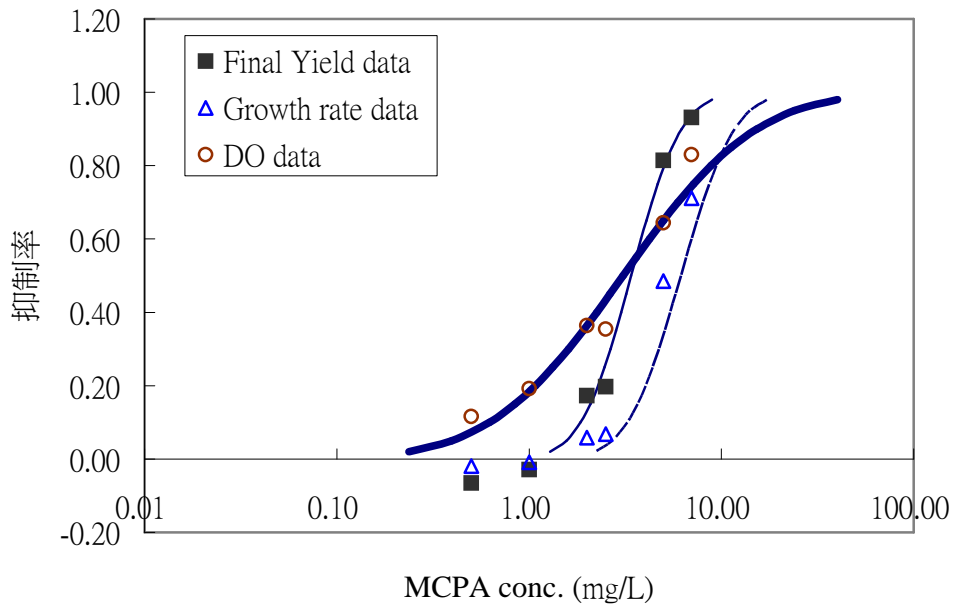


圖 5.1.3 The Dose-response Curve of MCPA (including of three parameters)

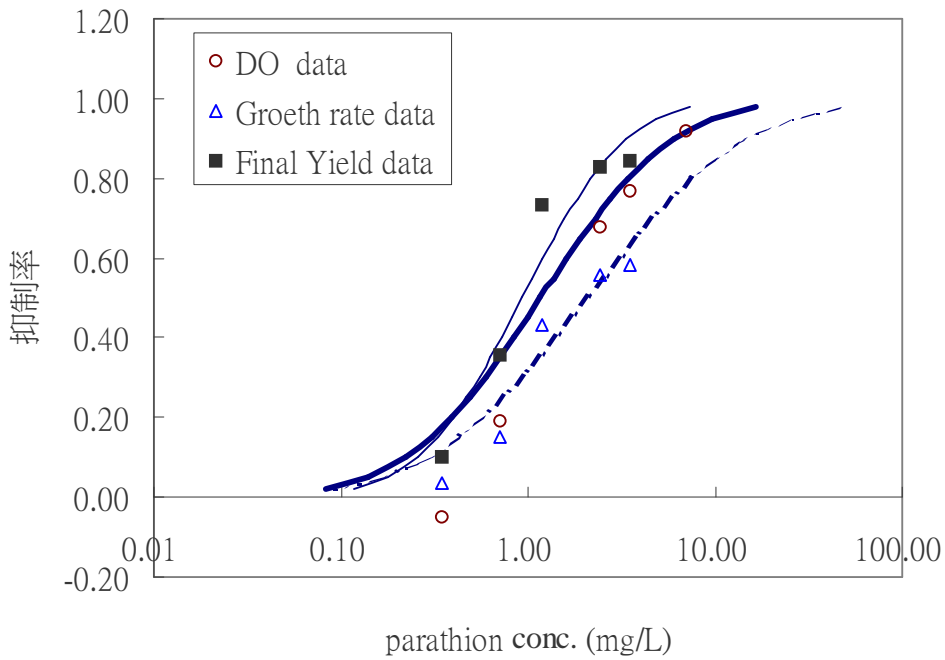
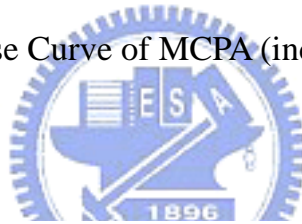


圖 5.1.4 The Dose-response Curve of parathion (including of three parameters)

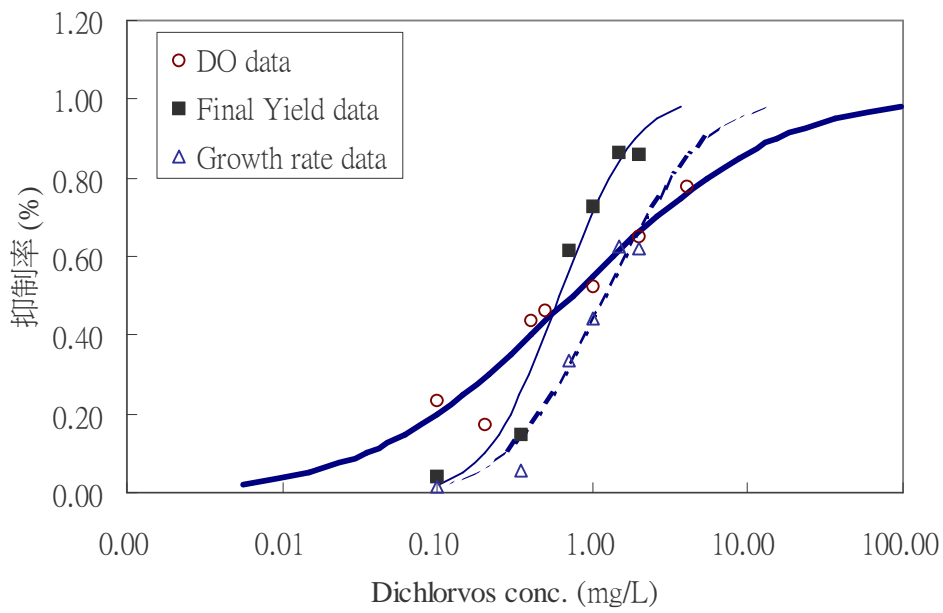


圖 5.1.5 The Dose-response Curve of Dichlorvos (including of three parameters)

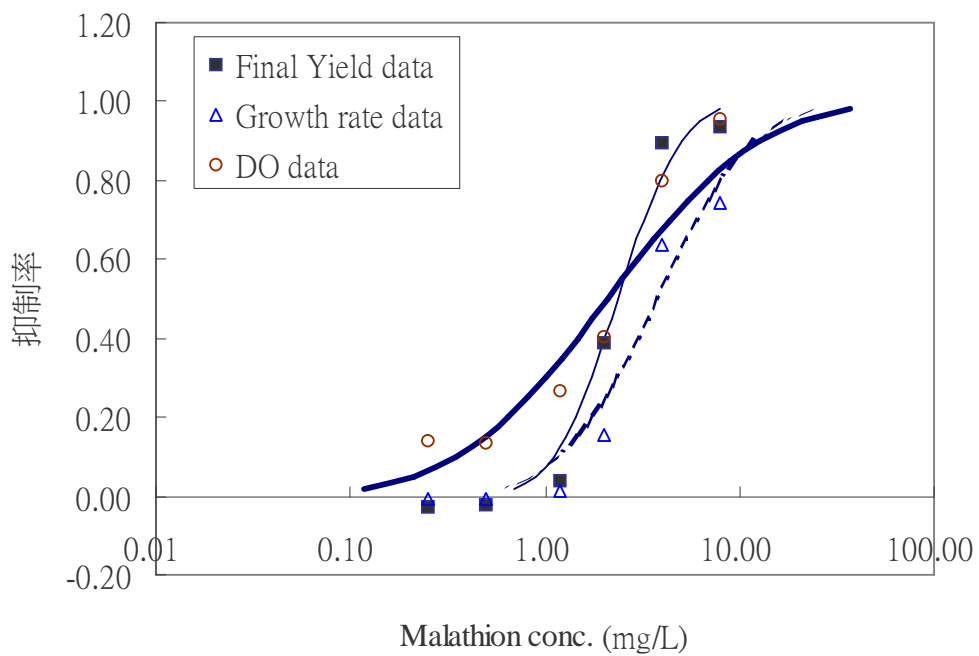


圖 5.1.6 The Dose-response Curve of malathion (including of three parameters)

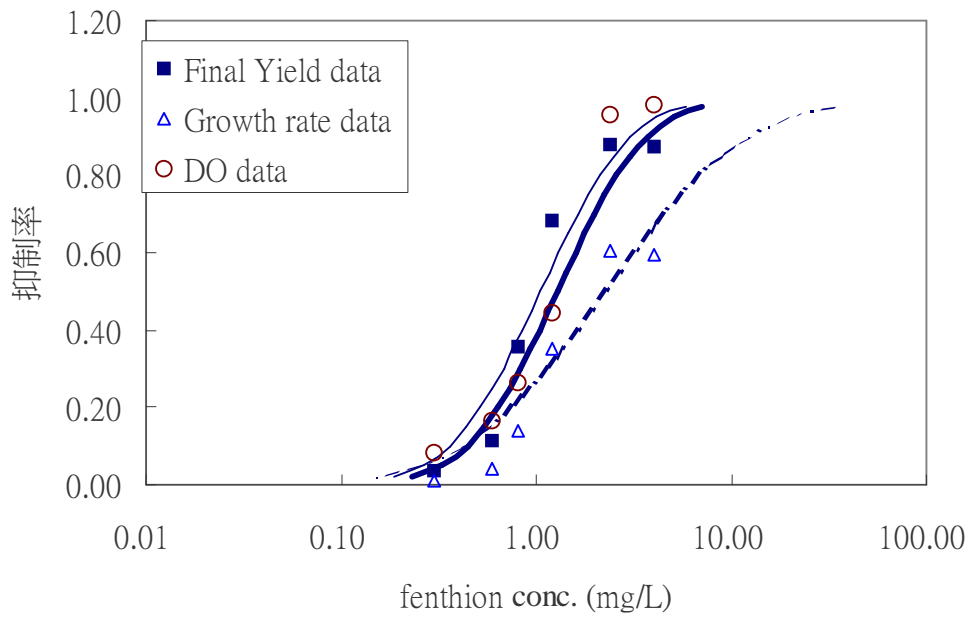


圖 5.1.7 The Dose-response Curve of fenthion (including of three parameters)

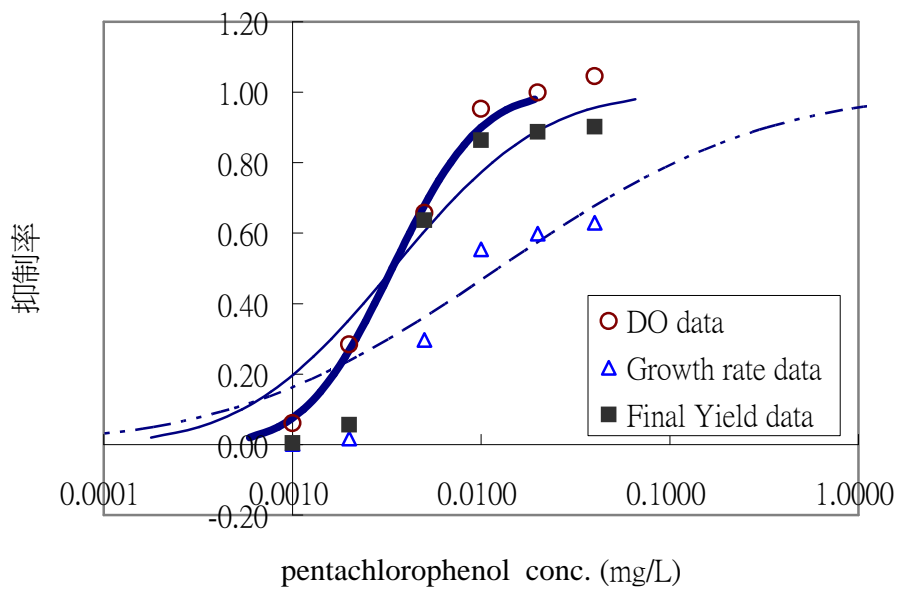


圖 5.1.8 The Dose-response Curve of PCP (including of three parameters)



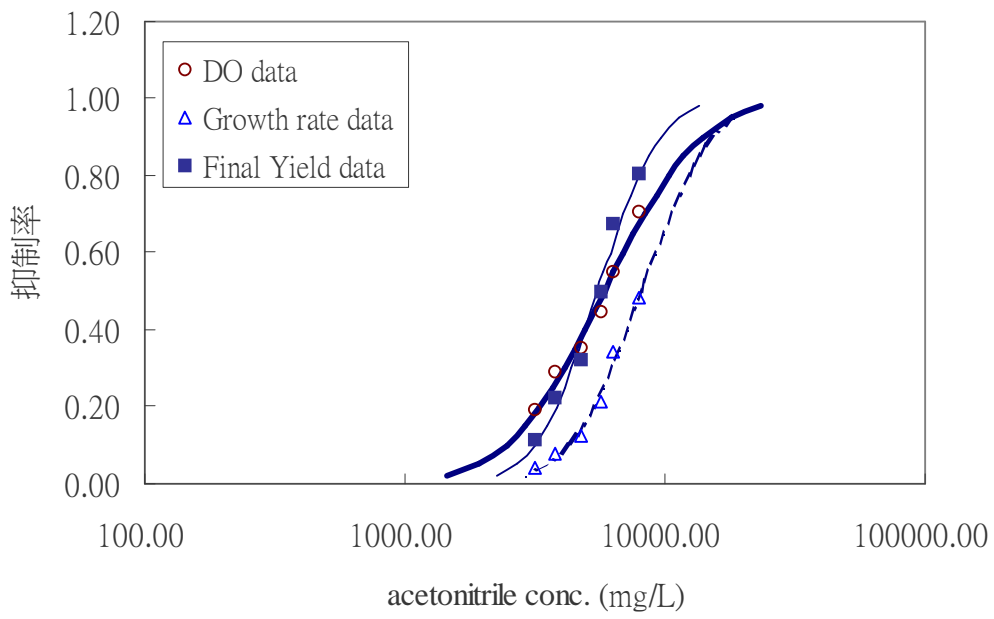


圖 5.1.9 The Dose-response Curve of Acetonitrile (including of three parameters)



## 5.2 最佳化模式--G test

實驗中為了了解試驗系統對毒物的敏感程度，一般來說，大多是取數據中的 EC 值或 LC 值來判定或比較。但是這些 EC 值或 LC 值的求得，卻會因不同迴歸模式而也有所不同。其中，在毒性研究裡常用的數學模式有 Probit、Weibul、與 Logit 三種模式。大多以這三類所計算求得的 EC50 值為較穩定，具代表性。但卻不能決定何者為最適用於實驗的模式型態。故以下試驗即針對實驗所求得的結果利用 G test 進行最佳化分析，以此選擇出最適合的計算模式。經由對重複組實驗中，每一組處理組與期望值的誤差作比較，最小絕對值之 G 值則為最佳的模式選擇。表 5.2.1 為 G test 分析結果。

表 5.2.1 G values of different test parameters in three models

(A) DO				
toxicants	G of Probit	G of Logit	G of Weibul	best fit
atrazine	258.23	85.754	16.773*	
MCPA	52.185	53.072	23.534*	
dichlorvos	230.051	235.653	87.259*	
parathion	59.931	54.512	39.969*	weibul(100%)
malathion	193.185	187.667	76.846*	
fenthion	186.635	192.12	60.3857*	
PCP	65.639	84.761	21.368*	
(B) Final Yield				
toxicants	G of Probit	G of Logit	G of Weibul	best fit
atrazine	1224.94*	-	-	
MCPA	51.91*	152.26	709.98	
dichlorvos	90.31*	98.88	112.40	
parathion	244.62	546.72	117.65*	Probit(71.43%)
malathion	720.32	188.42	79.41*	
fenthion	89.04*	157.17	140.35	
PCP	108.10*	119.60	135.81	

(C) Growth rate				
toxicants	G of Probit	G of Logit	G of Weibul	best fit
atrazine	1385.18	824.59*	1456.73	
MCPA	627.71*	776.89	701.93	
dichlorvos	552.89*	639.12	597.96	
parathion	533.56	515.58*	620.79	Logit(42.86%)
malathion	452.89	627.80	272.50*	
fenthion	705.60	593.09*	617.26	
PCP	742.79	733.44	703.47*	

\* : The lowest absolute G value in three models is the optimum values

- : shows no data

由表 5.2.1 可觀察到，在以溶氧為測試終點時，皆是以 weibul 模式所回歸出的值為最佳化的表現。而在以 Final Yield 為試驗參數時，則是顯示出 probit 為最佳模式；以 Growth rate 為參數時，則是 Logit 為最佳值。這樣的結果顯示出使用不同參數時，呈現出最佳化的數學模式也會不一樣。而這樣的結果與 Chao[84]顯示出批次式的實驗結果分析是以 logit 最適合，這與本次實驗用 Growth rate 作為參數時所呈現的結果是一致的。而也曾有許多的研究則是顯示出是使用微生物或同樣的藻類，所求出的結果也以 weibul 的數據為最佳的狀況，像這同樣的趨勢，於本實驗以溶氧作為測定終點時，所測結果也是呈現出一樣的情形。[10, 85]

### 5.3 試驗物種數據收集與比較

本實驗主要只針對月芽藻來進行實驗，但基於毒物對物種的影響力、成本或便利性不盡相同，幾十年來也發展出不同實驗裝置，無論是開放式或半密閉式、密閉式設備，其中更包括了許多各式各樣的實驗物種。雖然無法在這麼多的生物中判定其中哪個為最為敏感物種，所以毒性數據與其他物種研究結果之間的比較則略顯得必要；這樣的比較可以提供出較為明確且完整評估毒性物質的方法。

故本研究另外也收集了許多標準方法與以往文獻裡以不同物種所做的毒性試驗結果，數據表列於表 5.3.1、表 5.3.3、表 5.3.4。這些表格主要將它分成藻類（表 5.3.1）、無脊椎動物或昆蟲（表 5.3.3），魚類（表 5.3.4）等的毒性數據。仔細的觀察到其中呈現的結果，本實驗中的數據比大部分的其他實驗物種的數據都來的敏感，只除了有機磷農藥在水蚤部分的數據。主要因為這些有機磷對 *Daphnia magna* 具有較為明顯的抑制作用，故敏感度相對地較高。

在藻類數據的部份，大致上來說本實驗的數據相對的具敏感性；其中如 *R. subcapitata* 及 *S. subspicatus* 等，都是許多研究所常用的藻類物種。與其他不同藻類物種資料的比較下，月芽藻明顯表現出較為靈敏的情況，有時還可相差到約 2 至 4 倍。但在有關有機磷農藥方面的藻類數據在比較下則較為少量，這與它對植物或藻類物種具較小毒性效應，且所反應出的結果並無太大的敏感度關係。

在這要特別注意的是在同樣是月芽藻的部份，雖然在此次數據中所收集到的結果只有其中 3 種農藥的資料；但是數據皆呈現出本實驗的敏感度比過去的研究高。由此我們推論出，主要是因為實驗裝置差異所造成的；於前，我們改良的密閉式系統，即是為了避免像這樣具揮發性物質於實驗過程中產生逸散的

缺失，所發展出來的。

依目前收集到的資料更能對應到毒性結果與裝置有一定的相關性表現。故為了印證本研究結果與過去的數據之間有這樣的明顯差異，實驗再針對揮發性與 EC50 做線性迴歸，來了解之間的關聯度。表 5.3.2、圖 5.3.1 為迴歸出的結果；Y 軸是過去的數據與本實驗作出之數據的比值，X 軸則為蒸汽壓的對數值。發現到最後迴歸出  $R^2$  達到 0.898，表示兩者間的關係相當密切；這也可初步推論出過去的研究是因為實驗的裝置問題，造成實驗期間毒物的揮發，這樣的實驗數據可能有低估的情形產生。但此部份因為收集到數據較少，說服力也略顯不足，所以這方面的研究則需要在未來的實驗中再多作一些確認的工作。

而針對水中微生物部分，可以觀察到農藥中以有機磷農藥對這些微生物的影響較為顯著，而除草劑部份則相對較不敏感，之間差別可達到約 1000 倍以上。若就本研究作出的結果來對照，除了有機磷農藥外，本研究的敏感度仍約可高達 10~1000 倍以上。

魚類數據中所呈現的結果即可馬上可發現與水中微生物所呈現的情況是比較不一致的。除了 rainbow trout 外，其他的魚種在有機磷農藥方面則出現靈敏度較低的情況；與本實驗的數據相較下，也呈現較不敏感的情形。即使在 rainbow trout 中也只約有 4 種毒物（有機磷農藥）的數據之 EC50 有較低情形產生。

以上的數據雖然都證明本實驗有一定程度的敏感性，但存在於其中少許的差異反應則需要再作進一步的探討，這可能要再深入了解到毒物進入生物體中所造成的代謝反應或轉化過程有關。

圖 5.3.2 為上述其中 5 種毒性試驗物種與本實驗的密閉式系統毒性數據，各別兩種參數作相關性的分析，表 5.3.3 則為迴歸方程式與迴歸值 ( $R^2$ )。由圖表中我們可發現過去以月芽藻為物種之實驗所求得的數據，雖然明顯與本實驗數據比較起來是較為不具敏感性，但兩者間的關聯性仍在 0.85~0.89 間。除了此項的物種外，其他實驗物種之關聯度的分析，顯示出與 feather minnow 和 *C. tentans*

兩物種所呈現的  $R^2$  最好，可達到 0.89~0.96 間。而以 *D. magna* 為相關性最低的生物種， $R^2$  只有 0.038（以 Final Yield 作為反應參數）。其中若考慮到前部分所提到的，因此類的物種為水蚤或昆蟲時，主要反應是針對這些物種體內的特定酵素作用，故除草劑類農藥對這些類的生物體，反應並不如預期敏感，所以於此再另外針對除去除草劑類農藥的部分的數據，作另一次的分析，則可得到  $R^2$  可升高至 0.842；在溶氧部分也可由 0.063 升高至 0.129，這樣明顯的改變情形更證明了這些農藥對生物體的作用機制是呈現不一樣的反應。同樣的，一樣的反应也出現在以 Rainbow trout 為實驗物種的結果之中。

而憑藉著這些相關性分析結果，可以推導出藻類毒性試驗可以有相當程度上可用以預測毒性物質對其他物種所造成的毒性。

#### 5.4 NOEC 之數據收集與比較 (EC10 與 NOEC)



NOEC 值的判定取決於實驗毒物濃度的取決、重複組的數量和變異情形。通常 NOEC 值的取得是利用統計方法中的 Dunnett's test 方法做分析，若重複組間的差異變小，與處理組的差異的差距就會變得較為明顯，這樣所得的 NOEC 值也會較為準確。過去也有許多研究則是 EC10 來替代 NOEC，故於此研究中也針對這兩者來做討論。

表 5.4.1 列出以 probit 模式所跑出的 EC10、用 Dunnett's test 所統計得到的 NOEC 和兩者之間的比值。先討論以溶氧增加量為終點的比值，約由 0.051 至 1.62，其中大於 1 的佔了約 71.4%，表現出當我們以溶氧量為反應終點時，NOEC 會比 EC10 來的敏感，能在評估中提供較好的保護；而在以生物質量為反應終點的結果中，則顯示完全相反的比例。這數據可提供在今後做評估時，可依不同參數的使用，而選擇其中較為嚴謹的 NOEC 或 EC10，進一步保護環境生物。



然而上述分析方法無法明確描述 NOEC 與 EC10 何者較為嚴謹，為了更加深入的比較 EC10 與 NOEC，本實驗將更進一步利用 ANOVA (analysis of variance) 檢定的兩項重要參數，Sw、F ration 以及中斷值 (cut-off value)。Sw 代表試驗的組內變異，而 F ration 為組間變異與組內變異的比值，用以表示組間變異與組內變異的差異程度。由表 5.4.1 發現兩種反應終點的 Sw 值差異極大，主要是因為以溶氧量的單位是 mg/L 而細胞密度的單位是 cells/ml，因為使用不同的單位，使得 Sw 不能用以直接比較兩反應終點的組內變異，也因此 F ration 基於相同的理由，同樣無法判斷哪一觀測參數較為精確。為了能夠比較參數的準確度，本研究使用了一判斷參數中斷值，此中斷值與 Sw 成比例關係且介於 NOEC 與 LOEC 之間，能夠更嚴謹的判斷藻類受到抑制的顯著性，並使之包含單位的複雜參數與控制組的平均值比較並以抑制的百分率作為單位，使其能夠用於不同單位的試驗終點間的比較。

由表 5.4.1 以溶氧量和細胞密度為反應終點的平均中斷值分別為 14.63 與 9.9，而全部的試驗中以細胞密度為反應終點所得到的中斷值較溶氧小的共佔了全部的 71.4%，顯示以細胞密度作為反應終點比產氧量要好許多。

因中斷值位於 NOEC 與 LOEC 之間，但高於 NOEC，故當中斷值大於 10% 時，生物受到 NOEC 的影響濃度會比 10% 的抑制濃度要低，換言之，此時以 NOEC 能夠比 EC10 提供更加嚴謹的保護標準。表 5.4.2 中，以溶氧量为反應終點的中斷值大於 10% 的有五組，分別為 atrazine (11.08%)、MCPA (10.85%)、dichlorvos (25.47%)、parathion (25.41%)、malathion (16.01%)；而以細胞密度為試驗終點的中斷值大於 10% 的僅有三組，分別為 atrazine (11.83%)、dichlorvos (15.71%)、parathion (14.32%)，由此知以對於本研究的毒性物質而言，NOEC 值比 EC10 能提供更好的保護標準。而在整個分析中，可能會導致高變異性的原因可能來自於所使用的藻類來源未達穩定狀態、或試驗過程不夠嚴謹以及毒性物質濃度設定不理想也會導致分析產生偏差。綜合上述討論可知 NOEC 比起 EC10 能提供對生物較好的保護，而比較兩種反應終點可以發現以

細胞密度為試驗終點具有較小的組內變異，

另外，為了再驗證實驗的再現性及敏感度，表 5.4.3 更收集了以其他物種所得到的 NOEC 或 EC10。發現本實驗所測出的 NOEC 比起綠藻、纖毛蟲、及魚類文獻數據來的低，這也表示在本實驗的敏感性表現出對生物會有較好的保護作用。而在水生生物方面所收集的資料裡，仍發現出與之前 EC50 文獻資料一樣的情形：在有機磷農藥中皆具有較低的 NOEC 值；而在除草劑或殺菌劑的數據較少，也較為不敏感。

表 5.3.1 Sensitivity to pesticides on different algal species

Pesticides	EC50 (mg/l)		Reference EC50 (mg/l)			
	DO	Yield <sub>final</sub>	<i>R. subcapitata</i> <sup>a</sup>	<i>C. reinhardtii</i> <sup>b</sup>	<i>S. quadricauda</i> <sup>c</sup>	<i>S. subspicatus</i> <sup>d</sup>
Atrazine	0.089	0.078	0.23-0.34 0.79-0.93(24h) 0.11-0.96(72h) 0.12-0.28(96h)	0.37-0.66 0.350(72h) 0.145-0.207(96h) 0.352(3d)	0.13-0.20(96h) 0.17-0.33(7d) 0.124(14d)	0.092(72h)
MCPA	3.39	3.12	18.4(96h)-IC50 17.8(96h)-EC50	-	79.8-96.5(20d)	-
Dichlorvos	0.74	1.62	-	-	-	-
Malathion	2.10	1.73	-	1-40(8d)	-	-
Parathion	1.16	0.93	-	-	-	1.2-10(72h)
Fenthion	1.29	1.05	-	-	-	-
PCP	3.54E-3	3.42E-3	0.19(24h)-IC50 0.11-0.42(96h)	0.36(10d) 0.22(72h)	0.08(96h) 0.266(14d)	0.18(72h) 1.1(7d)

<sup>a</sup> *R. subcapitata* = *Raphidocelis subcapitata* = *Selenastrum capricornutum*

<sup>b</sup> *C. reinhardtii* = *Chlamydomonas reinhardtii*, <sup>c</sup> *S. quadricauda* = *Scenedesmus quadricauda*,

<sup>d</sup> *S. subspicatus* = *Scenedesmus subspicatus*

-: shows no data



表 5.3.2 Comparison between conventional and closed-system algal toxicity tests

toxigants	EC50	EC50 <sub>ref</sub>	EC50 ratio	Log(V.P.)
atrazine	0.0899	0.232	2.579	-0.635
	0.0899	0.335	3.724	-0.475
	0.0899	0.110	1.223	-0.959
	0.0899	0.119	1.323	-0.924
	0.0899	0.281	3.124	-0.551
MCPA	3.084	18.4	5.967	1.265
	3.084	17.8	5.772	1.250
PCP	3.54E-3	0.42	118.644	1.166

V.P : Vapour Pressure , the unit is mPa

EC50<sub>ref</sub> is referred to Table 5.1.5

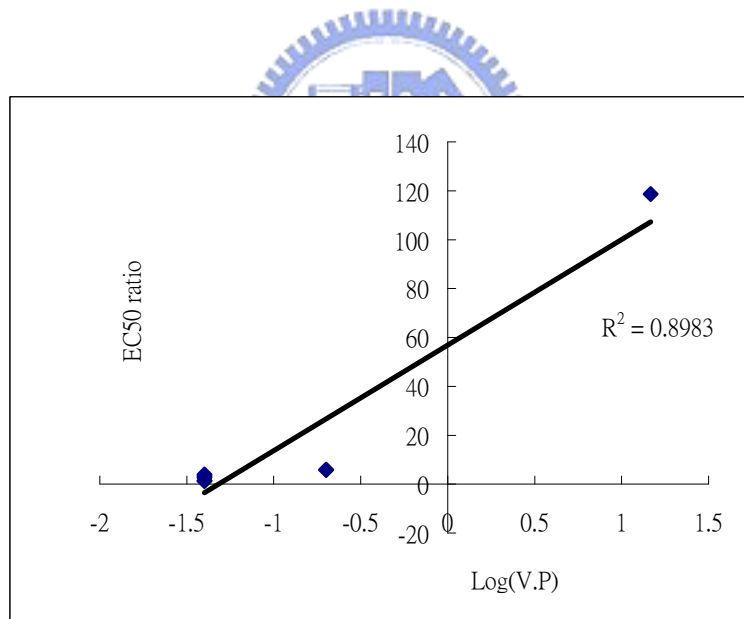


圖 5.3.1 Correlation between EC50 ratio and vapour pressure

表 5.3.3 Sensitivity to pesticides on different water-microorganism species

Pesticides	EC50 (mg/l)		Reference EC50 (mg/l)			
	DO	Yield <sub>final</sub>	<i>D. magna</i> <sup>a</sup>	<i>C. dubia</i> <sup>b</sup>	<i>C. tentans</i> <sup>c</sup>	<i>T. pyriformis</i> <sup>d</sup>
Atrazine	0.089	0.078	>50(24h) >39(48h) -EC50 5.2-8.1(48h)-LC50	>30(48h)-LC50 3.5-4.2(7d)-IC50	>20(96h)-EC50 0.36-1.44(48h) -LC50 0.2-2(24h)	96(48h) 74(96h)-EC50 5.8(24h) -LC50
MCPA	3.39	3.12	>180(48h)-EC50 >40(48h)-LC50	-	-	-
Dichlorvos	0.74	1.62	1-3.5(24h) 0.8-1.4(48h)	-	0.0176(96h)	15.6(6h) 3.91(24h) -LD50
Malathion	2.10	1.73	0.012-0.0340(96h) 0.00033-0.0006(21d)	0.0024-0.0043(24h) 0.00212(48h)	-	-
Parathion	1.16	0.93	0.002-0.0028(24h) 0.0023(24h) 0.00072-0.0014(48h) -EC50 0.00192-0.00253 (48h)-LC50	0.00023(48h)	0.0023-0.0037 -(14d) 0.022-0.043(4d)	-
Fenthion	1.29	1.05	0.0045-0.006(48h)	0.00131-0.00223 (48h)	-	>5(24h)
PCP	3.54E-3	3.42E-3	0.4-0.76(24h) 1.5-2.5(48h)	>3(48h) 0.3-0.347(48h) -LC50	-	0.15(24h) 0.25(25h) 0.64(96h)

<sup>a</sup> *D. magna* = *Daphia magna*, <sup>b</sup> *C. dubia* = *Ceriodaphnia dubia*, IC50, <sup>c</sup> *C.tentans* = *Chironomus tentans*, (Midge), <sup>d</sup> *T. pyriformis* = *Tetrahymena pyriformis*, (Ciliate), LD50

-: shows no data

表 5.3.4 Sensitivity to pesticides on different fish species

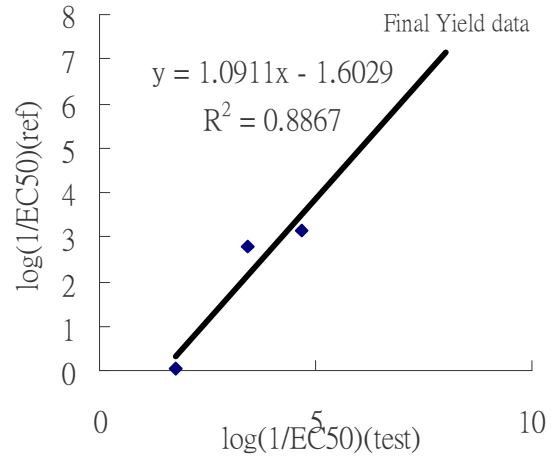
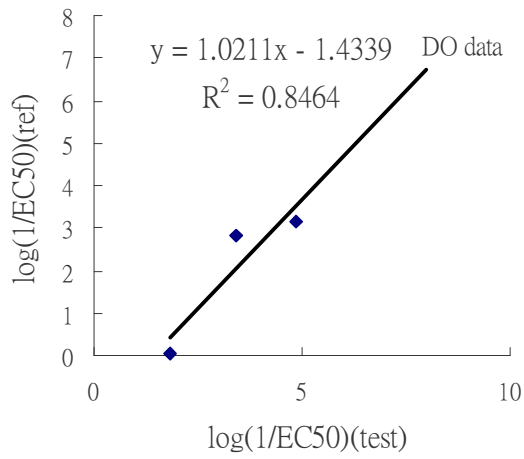
Pesticides	EC50 (mg/l)		Reference EC50 (mg/l)				
	DO	Yield <sub>final</sub>	Rainbow Trout	Goldfish	Sheepshead minnow	Guppy	Father minnow
Atrazine	0.089	0.078	0.2(24h) 0.736-0.888(23d) 0.696(sac fry)	>10(48h) 25-102(96h)	11.2-16.6 (96h)	10-71(48h)	72-110(96h)
MCPA	3.39	3.12	0.53-1.51(48h)	>40(48h)	-	-	-
Dichlorvos	0.74	1.62	0.5(24h) 0.6-0.9(96h)		5.39-8.7 (96h)	5.81(24h) 3.3(48h)	2.5-3.7(96h)
Malathion	2.10	1.73	0.15-0.36(24h) 0.16-0.24(96h)	17.9-21.6(24h) 10.6-11.9(96h)	-	-	10.3-16(24h) 6.45-11.5(96h)
Parathion	1.16	0.93	1.39-2.98(24h) 1.2-1.6(96h)	3-5.14(24h) 1.35-2.47(96h)	-	-	1.77-4.87(24h)
Fenthion	1.29	1.05	1.19-2.05(24h)	1.96-6.92(24h) 1.78-6.54(96h)	1.69-2.25 1.9-2.2(96h)	5.8-6.6(24h) 1.37-3.8(96h)	2.48-4.87(24h)
PCP	3.54E-3	3.42E-3	0.13-0.296(24h) 0.164-0.235(24h) 0.35-0.66(96h)	0.264(96h) 0.082-2.2(24h) 0.112-0.203 (48h)	0.266(96h)	1.08-1.479 (12h) 1.04-1.32 (24h) 0.82-1.7 (48h)	0.19-0.274(24h) 0.21-0.286(48h) 0.42-0.55(96h) 0.05-0.23(5d)

Rainbow trout= *Oncorhynchus mykiss* Gold fish = *Carassius auratus* Sheepshead minnow = *Cyprinodon variegates* Guppy = *Poecilia reticulata* Fathead minnow = *Pimephales promelas*

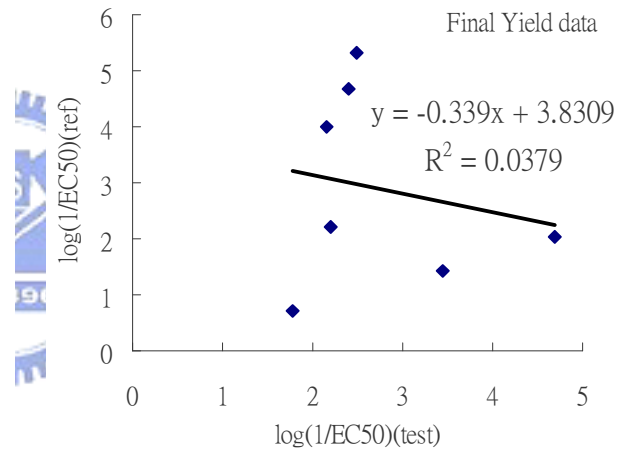
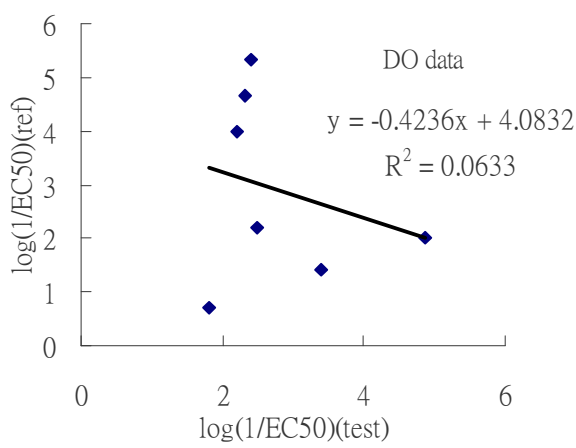
- : shows no data

\*These data were revealed in U.S.EPA ECOTOX Database

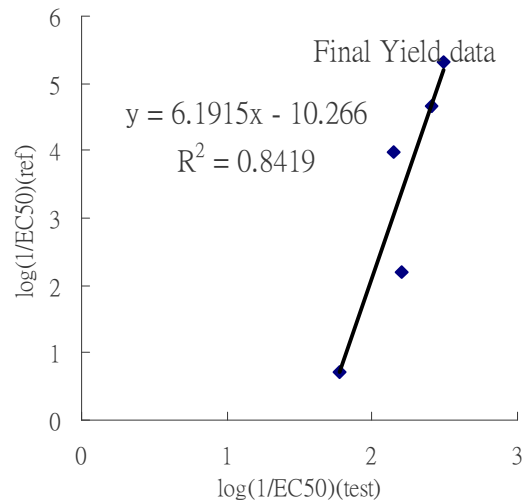
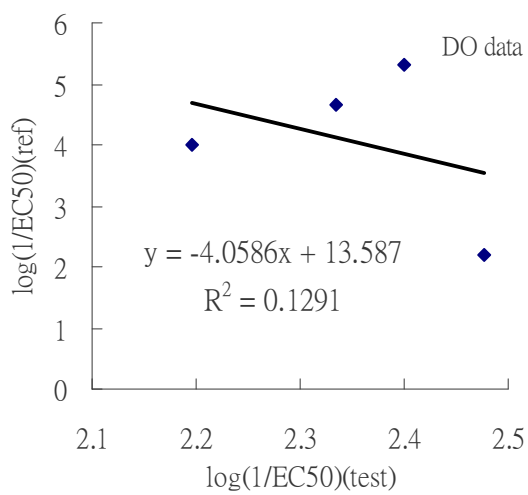
(a)



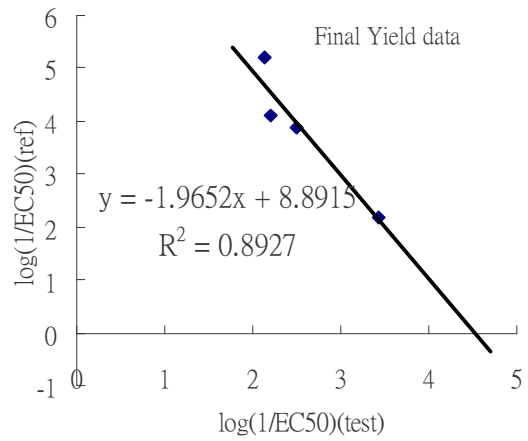
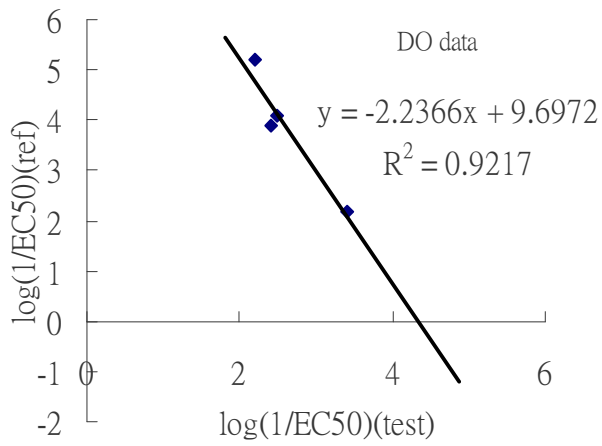
(b)



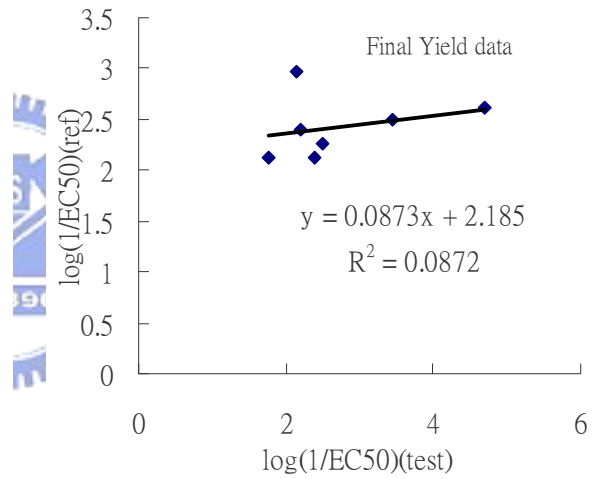
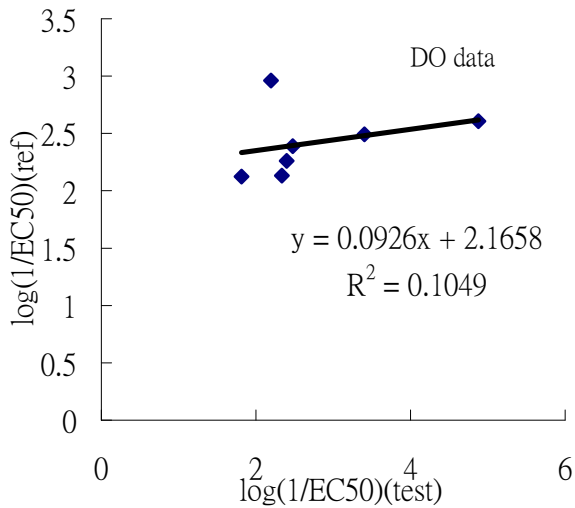
(c)



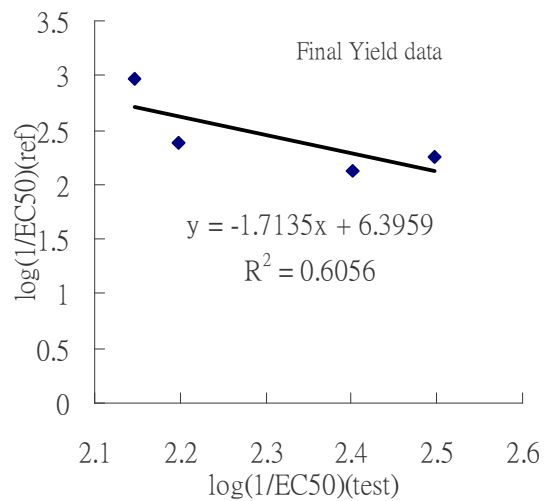
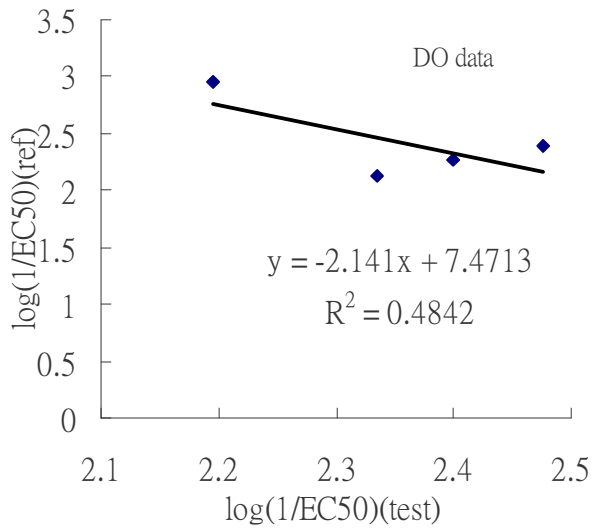
(d)



(e)



(f)



(g)

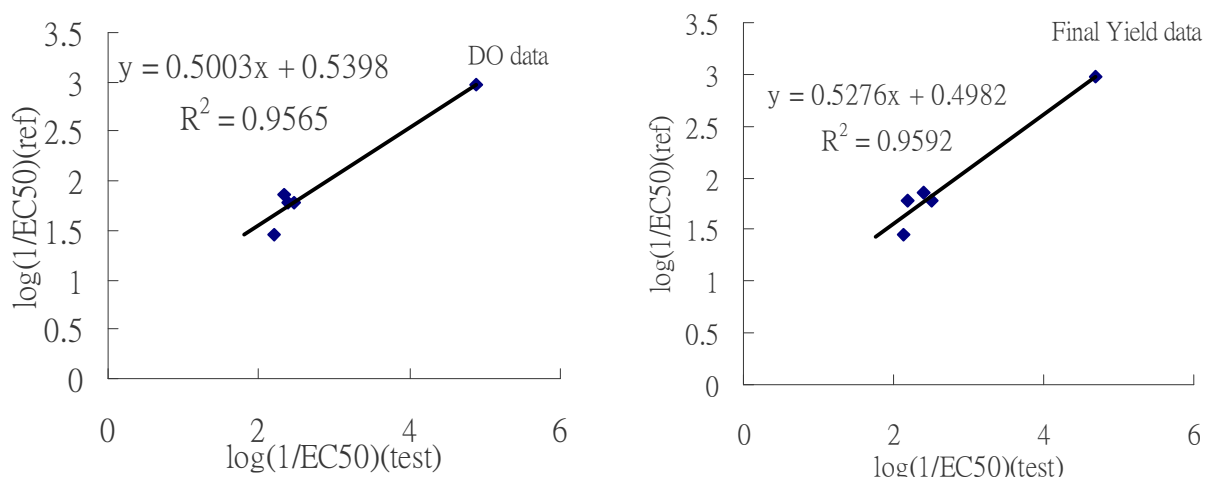


圖 5.3.3 Relationship between this toxicity test and other literature data

\*(a):The species is *Raphidocelis subcapitata*; (b): The species is *Daphia magna*; (c): The species is *Daphia magna*, except herbicides; (d): The species is *Chironomus tentans*; (e): The species is rainbow trout; (f): The species is rainbow trout, except herbicides; (g): The species is feather minnow

\*\*The unit of EC50 is mol/L ; These literature data is referred to Table 5.1.6 、 Table 5.1.8 、 Table 5.1.9

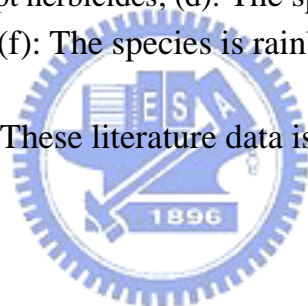


表 5.3.5 The regressive data between the closed-system toxicity test and other species data

species		DO		Final Yield	
		Regress equation	R <sup>2</sup>	Regress equation	R <sup>2</sup>
<i>R. subcapitata</i>	(a)	Y=1.021X-1.434	0.846	Y=1.091X-1.603	0.887
<i>D. magna</i>	(b)	Y=-0.424X+4.083	0.063	Y=0.339X+3.831	0.038
	(c)	Y=-4.059X+13.59	0.129	Y=6.192X-10.27	0.842
<i>C. tentans</i>	(d)	Y=-2.237X+9.697	0.922	Y=-1.965X+8.892	0.893
rainbow trout	(e)	Y=0.093X+2.166	0.105	Y=0.087X+2.185	0.087
	(f)	Y=-2.141X+7.471	0.484	Y=-1.314X+6.396	0.606
feather minnow	(g)	Y=0.500X+0.540	0.957	Y=0.528X+0.498	0.959

X: the closed-system toxicity test data

Y: other species data

表 5.4.1 The relationship of NOEC and EC10

toxicants	NOEC (mg/L)		EC10 (mg/L)		EC10/NOEC	
	DO	Yield <sub>final</sub>	DO	Yield <sub>final</sub>	DO	Yield <sub>final</sub>
atrazine	0.02	0.02	0.033	0.018	1.62	0.89
MCPA	<0.50	1.00	0.62	1.85	>1.24	1.85
parathion	0.70	0.35	0.26	0.079	0.36	0.23
dichlorvos	<1.06	<1.06	0.054	0.22	>0.051	>0.21
malathion	<0.25	1.20	0.35	1.10	>1.39	0.92
fenthion	<0.30	0.30	0.4434	0.36	>1.48	1.19
PCP	<0.001	0.001	1.14E-3	5.46E-4	>1.14	0.55

\*NOEC is conducted by Dunnett's test, EC10 is conducted by Probit model

表 5.4.2 The important statistical parameters in two test end-points

toxicants	DO			Final Yield		
	Sw	F-ratio	cut-off value(%)	Sw	F-ratio	cut-off value(%)
atrazine	0.26	197.99	11.08	9635.93	181.94	11.83
MCPA	0.44	83.78	10.85	11400.34	424.17	7.27
dichlorvos	0.74	18.17	25.47	19116.46	77.50	15.71
parathion	0.91	29.11	25.41	13880.02	50.54	14.32
malathion	0.47	78.91	16.01	11159.67	382.96	7.98
fenthion	0.25	378.38	7.43	10758.54	280.21	7.74
PCP	0.25	591.59	6.19	7533.40	1102.33	4.43
mean	0.47	196.85	14.63	11926.34	357.09	9.90

\*Sw: Variation between columns

\*\*F ratio : The ratio of variation within columns to variation between columns

表 5.4.3 The list of NOEC

Toxicants	NOEC (mg/L)		Reference NOEC (mg/L)			
	DO	Yield <sub>final</sub>	Green algae	Ciliate <sup>g</sup>	Water flea	Fish
atrazine	0.02	0.02	0.054(48h) <sup>a</sup> 0.004-0.01(24h) <sup>b</sup> 0.0037(10d) <sup>b</sup> 0.005(96h) <sup>c</sup> 0.003-0.063(96h) <sup>d</sup> 0.005-0.02(24h) <sup>e</sup> 0.022(72h) <sup>e</sup> 0.075(96h) <sup>f</sup>	14.5(48h) 21.5(96h)	2.5(6d) <sup>i</sup>	2(96h) <sup>j</sup>
MCPA	<0.50	1.00	-	-	-	117 <sup>k</sup>
dichlorvos	0.70	0.35	-	-	0.000109 -0.000206(21d) <sup>h</sup>	0.07-0.19(28d) <sup>k</sup>
parathion	<1.06	<1.06	1.2(72h)-EC10 <sup>e</sup> 0.1(96h) <sup>f</sup>	-	0.000002(21d) <sup>h</sup>	<0.2(48h) <sup>l</sup>
malathion	<0.25	1.20	-	-	0.00015 -0.0003(22d) <sup>h</sup>	<15.6 <sup>j</sup>
Fenthion	<0.30	0.30	-	-	0.6(14d) <sup>h</sup>	-
PCP	<0.001	0.001	0.0027(48h) <sup>a</sup> 0.3(4d)b 0.36(7d) <sup>b</sup> 0.03(72h) <sup>b</sup> 0.14-0.154(24h) <sup>c</sup> 0.135(72h) <sup>c</sup> 0.005-0.04(96h) <sup>f</sup>	0.25(48h) 10.1(96h)	50-250(14d) <sup>h</sup> 0.5(1h) <sup>i</sup>	0.056-0.11(28d) <sup>j</sup>

<sup>a</sup> *C. zofingiensis* = *Chlorella zofingiensis*; <sup>b</sup>*C.reinhardtii* = *Chlamydomonas reinhardtii*; <sup>c</sup>*C. saccharophila* = *Chlorella saccharophil.*; <sup>d</sup>*S. acutus* = *Scenedesmus acutus*; <sup>e</sup>*S. subspicatus* = *Scenedesmus subspicatus*; <sup>f</sup>*R. subcapitata* = *Raphidocelis subcapitata* = *Selenastrum caprocornutum*; <sup>g</sup>*T. pyriformis* = *Tetrahymena pyriformis*, Ciliate; <sup>h</sup>*D. magna* = *Daphia magna*; <sup>i</sup>*C. dubia* = *Ceriodaphnia dubia*; <sup>j</sup>Rainbow Trout = *Oncorhynchus mykiss*; <sup>k</sup>Fathead minnow = *Pimephales promelas*; <sup>l</sup> Gold fish= *Poecilia reticulata*

-: shows no data



## 5.5 QSAR

QSAR 最初用於製藥及醫藥部份。在 70 年代時，QSAR 才被引入環境工程學中應用。所謂 QSAR，是以有機物的物理特性，化學特性及結構間的性質與毒性建立起統計上的關係，環境學者可以由化學物質的物理特性，預測其毒性，以運用在環境影響評估的範疇。儘管製藥及醫學工業早已經使用 QSAR 於許多特殊生化機制，而在環工領域，QSAR 的應用尚侷限在非反應性有機物麻醉作用上，少數反應性有機物實驗結果亦不佳。

本實驗主要即是針對農藥部分毒物之毒性與辛醇水係數 (n-Octanol/Water Partition Coefficient, LogP) 間的關係做探討，因過去這部份的資料文獻較少，故這類毒物之 QSAR 建立之必要性也相對地提高。因此本實驗室之毒性數據也以 LogP 建立 QSAR。表 5.5.1 為兩種試驗中點之毒性數據與 LogP 值，圖 5.5.1 及圖 5.5.2 是依據表 5.5.1 繪製而成的相關性比較圖。

以溶氧 (DO) 為試驗終點時，所得之迴歸關係式為：

$$\text{Log} (1/\text{EC}_{50}) = 0.391 \log P + 1.6175, R^2 = 0.2632$$

以生物質量 (Final Yield) 為反應終點時，所得之迴歸關係式為：

$$\text{Log} (1/\text{EC}_{50}) = 0.4758 \log P + 1.3701, R^2 = 0.3795$$

兩種試驗終點之  $R^2$  分別為 0.2632 及 0.3795，顯示出毒性數據與  $\log P$  之間的相關性較小，所建立的 QSAR 並不足以可以應用在其他相同的毒性機制毒物上。這可能是因本實驗所選擇的毒性物質並非為同類型之物質，且所做的毒物數量並不多，所以也無法達到統計上的準確性。

但若在此部份，考慮到所做毒物中有四種為有機磷農藥部分。分析時主要是將數據中其他種農藥去除掉，則可得到下列的關係式。

以溶氧 (DO) 為試驗終點時，所得之迴歸關係式為：

$$\text{Log} ( 1/\text{EC50} ) = -0.0237 \log P + 2.4185 \quad , R^2 = 0.1107$$

以生物質量 (Final Yield) 為反應終點時，所得之迴歸關係式為：

$$\text{Log} ( 1/\text{EC50} ) = 0.0993 \log P + 2.0686 \quad , R^2 = 0.9953$$

圖 5.5.3 及圖 5.5.4 是依據表 5.5.1 中數據去除非有機磷農藥之數據，所繪製而成的相關性比較圖。根據以上的數據發現到，雖然在溶氧部份，兩者間的關係式反而降低到 0.1107；但若是以生物質量部分來看，則可以查覺到其關係式可升高到 0.9953。而過去 QSAR 用於生化機制方面之討論，這裡所呈現的數據也對應到這方面的反應：表示出農藥間的反應機制是不一樣的情況，所以在 QSAR 分析時，同樣的呈現出不同的相關性。

表 5.5.1 The EC50 and log (Kow) of pesticides about two endpoints

toxicants	log(Kow)	log(1/EC50)	
		DO	Final Yield
MCPA	2.52	1.771	1.809
atrazine	2.82	3.380	3.439
dichlorvos	0.6	2.477	2.136
fenthion	4.08	2.335	2.477
malathion	2.29	2.210	2.280
parathion	3.73	2.399	2.443
PCP	4.74	4.877	4.892

\*EC50 unit is mol/L

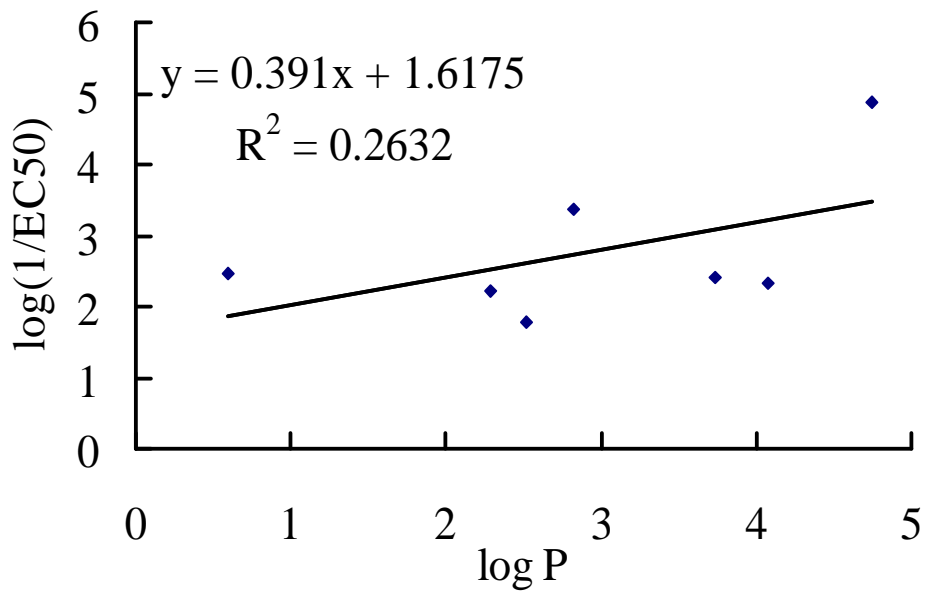


圖 5.5.1 Relationship between the toxicity data and  $\log P$  (about DO)

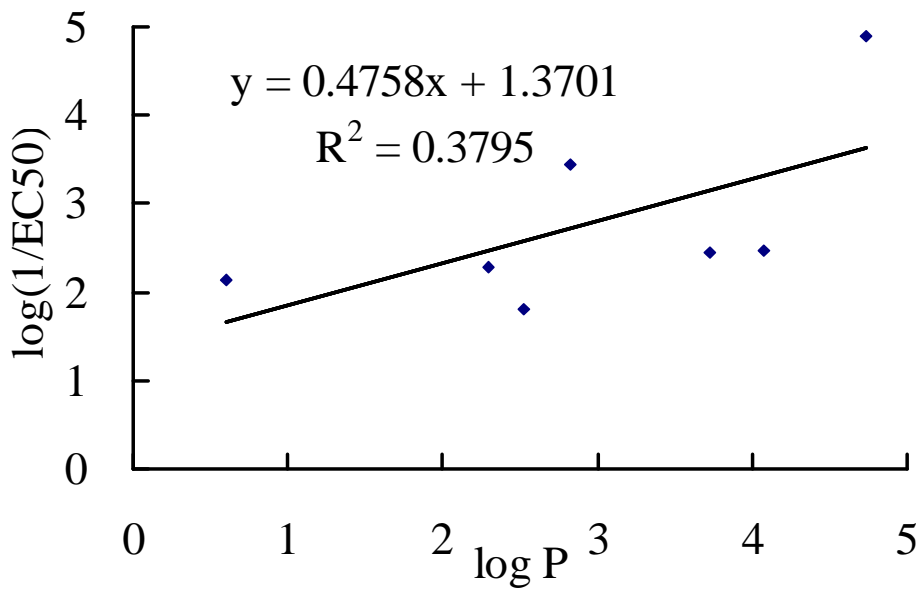


圖 5.5.2 Relationship between the toxicity data and  $\log P$  (about Final Yield)

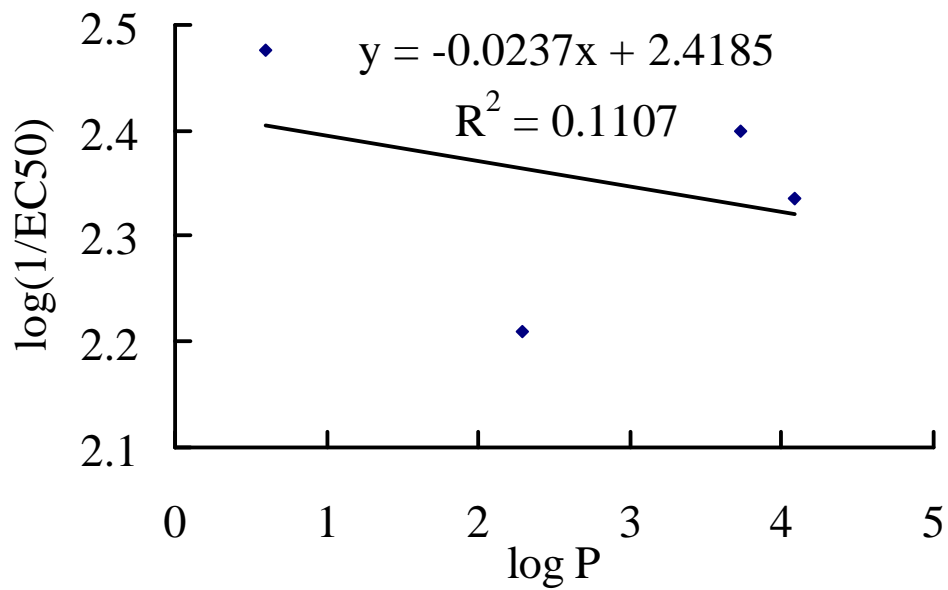


圖 5.5.3 Relationship between the toxicity data and log P (about DO)

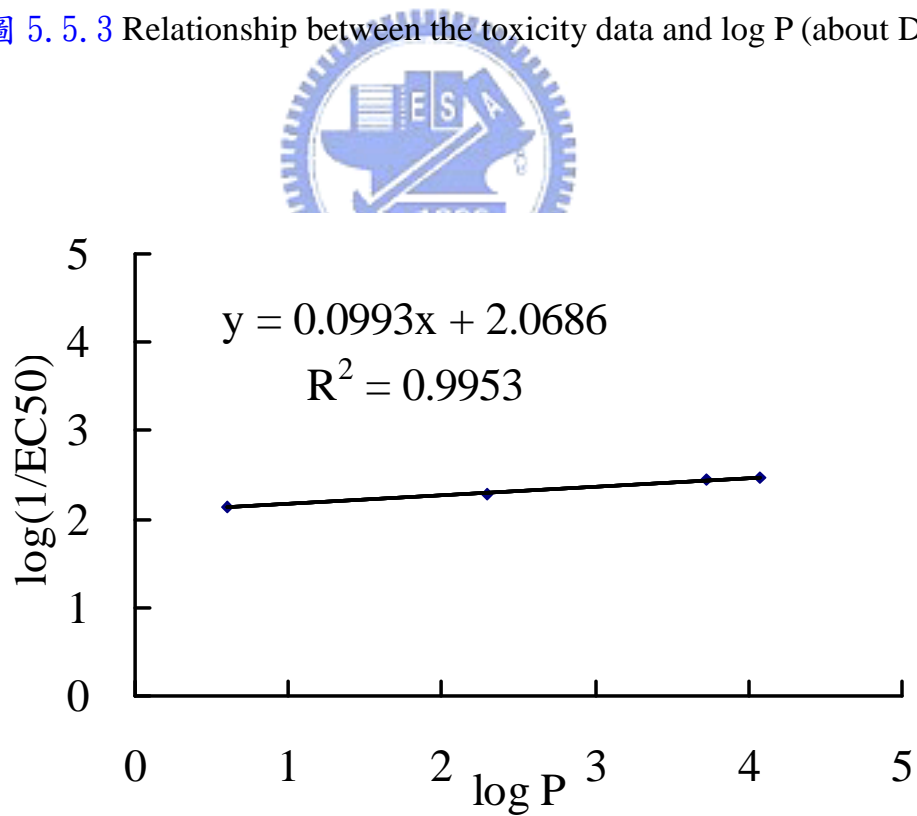


圖 5.5.4 Relationship between the toxicity data and log P (about Final Yield)

## 5.6 混合毒物毒性試驗

依據本實驗前半部份已決定的農藥之 EC50 為基準，主要大多針對 atrazine 和其他多種毒物混合，另外也加入其它化學物質間互相混合；但因為在實驗中所偵測的參數值不同，而也會得到不同的 EC50 值，故主要選擇各毒物以 DO 為試驗終點時所做出的 EC50 為選擇，並應用 additive index 原理進行混合研究；最後，大部分得到有明顯的協同作用（Synergistic），約佔 46.7%，相加作用（Additive effect）佔了約 26.7%，拮抗作用（Antagonism）也佔了 26.65%。關於這部分的實驗數據一起列於表 5.6.1。

為了使混合的結果更加的清楚顯現，因此實驗中也以 isobologram 圖來描述混合毒性效應；圖 5.6.1 至圖 5.6.6 即為各個混合作用之 isobolograms。由各圖中我們可以明顯的觀察到在圖 5.6.1 atrazine 與 dichlorvos 之混合物、圖 5.6.2 atrazine 與 fenthion 之混合物、圖 5.6.3 atrazine 與 PCP 之混合物所表現出來的效應為協同作用（圖形迴歸曲線明顯向原點部分內凹，示意圖請參照第三章）；圖 5.6.4 atrazine 與 parathion 之混合物、圖 5.6.5 atrazine 與 malathion 之混合物則表現出相加作用。圖 5.6.6 atrazine 與 MCPA 之混合物則出現出拮抗作用（圖形迴歸曲線明顯向遠離原點部分彎曲，示意圖請參照第三章）。其中的拮抗效應都是與 MCPA 混合時候所造成，這可能與 MCPA 所屬的化學特性有所關聯[79]。

以上實驗的數據皆以 DO 為參數所做出來的結果；另外也針對以其他不同參數（Final Yield 及 Growth rate）利用 additive index 的原理，來製做另一部分的 isobolograms 來做討論。於此，主要選擇 atrazine 與 parathion 作為混合的選擇；圖 5.6.7 至圖 5.6.8 為以另外兩種不同的參數所做出來的 isobolograms。這兩張圖都表現出明顯的拮抗效應，這結果與之前使用 DO 為參數所迴歸出的結果（相加作用）並不一致。這可能與這農藥在藻類受體內作用機制有關，可能主要反應在光合作用系統中被抑制，而較強烈地表現在以 DO 作為實驗終點的

反應上。

表 5.6.2 則列出每組混合的數據，分別在同組實驗中以三個不同參數所得到的結果。在表中，可發現到不同參數所呈現出來的效應並不相同；在 DO 數據部份，協同作用佔了約一半（46.6%）；相加作用與拮抗作用則約各佔了最後的一半。Final Yield 數據則開始有明顯不同：協同作用只佔了 20.0%，拮抗作用在此時更是佔了其中絕大部分（46.7%）；更別說是以 Growth rate 為參數的數據，其中拮抗作用更是達到了 80%，反而沒有任何協同作用產生。但必須注意到的是這裡的數據，除了溶氧參數的混合模式為 1 比 1 的情形，其他另外兩個參數則皆不符合混合原理（非 1：1 混合），所以呈現出的效應也大大的不同。

過去部分學者也曾指出實驗中使用不同的參數會呈現出不一樣的反應，這與本實驗所得到的結果是相呼應的情形。這更提醒在往後的實驗中參數的選擇很有可能會影響到最後的結果，對於整個研究的架構與設計都有很重要的影響，需要較為注意。

並且在此所描繪出的 isobolograms 發現到，曲線並沒有落在兩軸毒性單位等於 1 時所圍成的範圍內，而呈現不規則之等效應曲線，此時的混和毒性效應定義為 complex joint action。而 complex joint action 的主要特性如下：  
(1) 在任何毒性單位比例下，均會有混合毒性減弱現象發生。  
(2) 不同毒性單位比例，其毒性效應減弱現象之強度會不相同，即在某一毒性單位比例下會有較強之毒性減弱效應產生。  
(3) 對於劑量-反應曲線斜率較大之毒性物質，其在毒性單位較小時，對另一種毒性物質有解毒作用[84]。這樣的反應在農藥的混合中出現的相當頻繁，有待更進一步的研究。

表 5.6.1 The data of toxicity test in mixtures

Toxicants	Malathion	MCPA	Dichlorovs	Parathion	Fenthion	PCP
Atrazine	1.049[+] (0.986-1.118)	1.308[A] (1.140-1.490)	0.554[S] (0.391-0.782)	0.775[+] (0.43-1.23)	0.735[S] (0.576-0.998)	0.551[S] (0.477-0.632)
MCPA	-	-	-	2.961[A] (1.504-4.705)	2.455[A] (1.968-3.021)	4.802[A] (3.496-8.122)
Dichlorovs	-	-	-	1.565[+] (0.760-3.630)	0.455[S] (0.423-0.488)	0.506[S] (0.365-0.660)
Parathion	-	-	-	-	0.265[S] (0.143-0.355)	1.362[+] (0.975-2.504)
Fenthion	-	-	-	-	-	0.477[S] (0.352-0.714)

\*These data is conducted using Additive index theorem (mixture ratio is 1:1) (TU) , the main parameter is DO; S:

Synergism; + : additive effect; A: Antagonism

\* ( ) : The 95% confidence interval

-: shows no data



表 5.6.2 The results about different parameters in each set of mixture

Mixtures		DO				Final Yield				Growth rate			
toxicant1	toxicant2	TU	95% CI*	Effect	Toxic ratio	TU	95% CI	Effect	Toxic ratio	TU	95% CI	Effect	Toxic ratio
atrazine	fenthion	0.672	0.529 ~ 0.886	S	1:1	0.755	0.0711 ~ 1.800	S	1.07:1	1.289	0.552 ~ 3.947	+	1.01:1
atrazine	malathion	1.049	0.986 ~ 1.118	+	1:1	1.511	1.077 ~ 2.008	A	1.06:1	2.835	2.073 ~ 4.859	A	1.26:1
MCPA	atrazine	1.308	1.140 ~ 1.450	A	1:1	1.752	1.209 ~ 2.374	A	1.06:1	2.027	1.595 ~ 2.618	A	1.61:1
atrazine	parathion	0.701	0.428 ~ 1.232	+	1:1	2.113	1.805 ~ 2.422	A	1.10:1	2.380	2.019 ~ 2.913	A	1:1
dichlorvos	atrazine	0.553	0.391 ~ 0.783	S	1:1	0.465	0.0754 ~ 0.841	S	1.25:1	1.659	0.870 ~ 2.726	A	1:1.10
PCP	atrazine	0.551	0.477 ~ 0.632	S	1:1	0.549	0.171 ~ 1.027	+	1.11:1	1.859	1.272 ~ 3.527	A	1.93:1
parathion	dichlorvo	1.565	0.768 ~ 3.627	+	1:1	2.283	1.608 ~ 3.471	A	2.26:1	23.236	11.463 ~ 121.39	A	1:1.10
fenthion	parathion	0.265	0.143 ~ 0.355	S	1:1	2.121	1.231 ~ 4.388	A	1.03:1	2.642	1.801 ~ 4.972	A	1:1.10
dichlorvos	fenthion	0.455	0.423 ~ 0.488	S	1:1	0.424	0.305 ~ 0.553	S	2.70:1	1.028	0.642 ~ 1.645	+	1:1.09
dichlorvos	parathion	0.506	0.365 ~ 0.660	S	1:1	2.149	1.607 ~ 2.790	A	2.77:1	2.668	2.026 ~ 6.184	A	1:1.10
MCPA	fenthion	2.455	1.968 ~ 3.021	A	1:1	3.757	2.585 ~ 4.693	A	1.14:1	4.773	3.623 ~ 21.642	A	1.63:1
PCP	MCPA	4.802	3.496 ~ 8.122	A	1:1	5.927	0.515 ~ 4.562	+	1.05:1	33.085	14.713 ~ 1243.1	A	1.20:1
PCP	fenthion	0.477	0.352 ~ 0.714	S	1:1	1.161	0.783 ~ 1.494	+	1.20:1	10.076	6.877 ~ 18.954	A	1.95:1
PCP	parathion	1.362	0.975 ~ 2.504	+	1:1	-	- ~ -	-	-	-	- ~ -	-	-
MCPA	parathion	2.961	1.504 ~ 4.705	A	1:1	3.917	1.689 ~ 5.472	A	1.16:1	4.8425	3.6143 ~ 41.812	A	1.61:1
Synergism: 7 (46.7%)						Synergism: 3 (20.0%)				Synergism: 0 (0%)			
additive effect : 4 (26.7%)						additive effect : 4 (30.8%)				additive effect : 2 (13.3%)			
Antagonism: 4 (26.7%)						Antagonism: 7 (46.7%)				Antagonism: 12 (80%)			

\*95% CI : 95% confidence interval; S: Synergism; +: additive effect; A: Antagonism

-: the TU is not on the 95% confidence interval, so shows no data



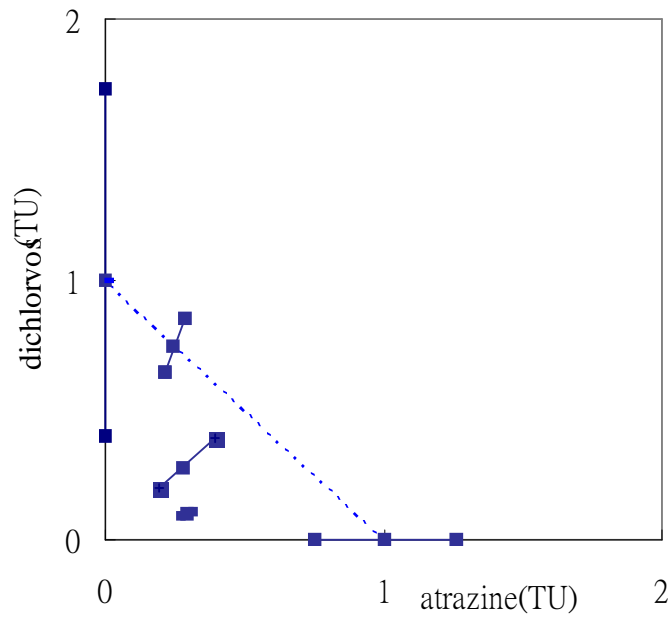


圖 5.6.1 Isobologram of mixture in atrazine and dichlorvos

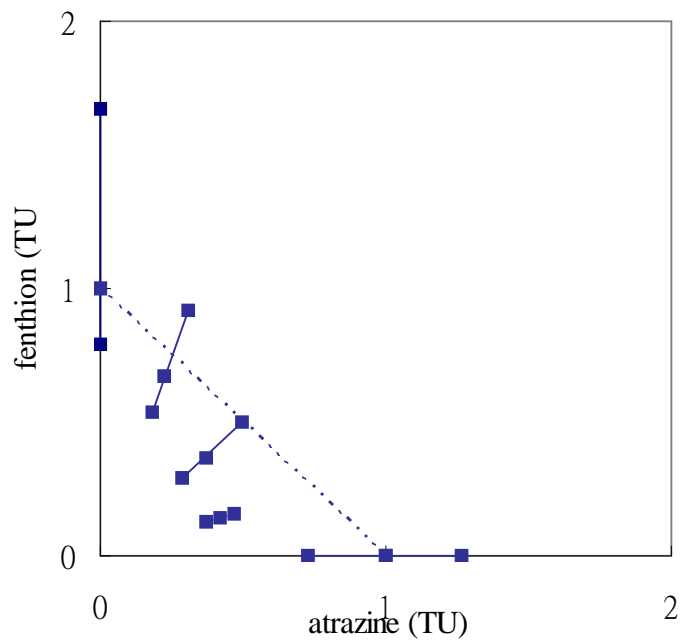


圖 5.6.2 Isobologram of mixture in atrazine and fenthion

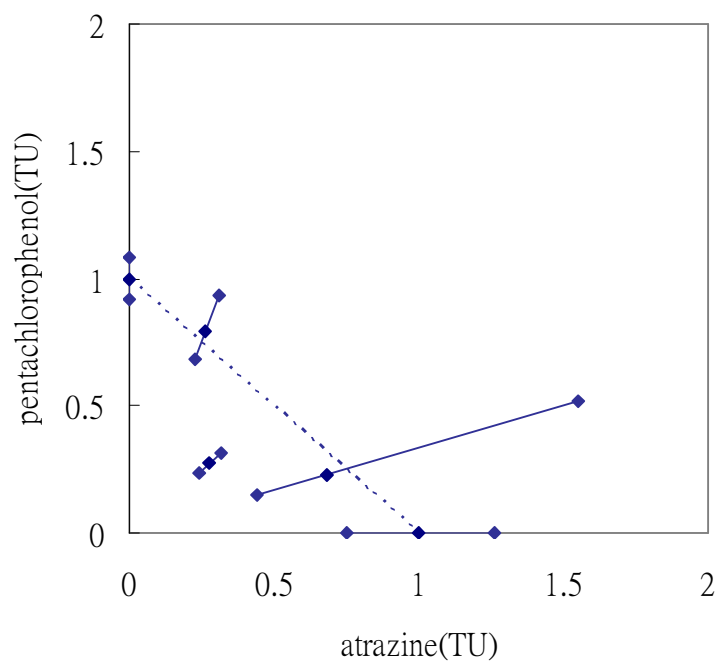


圖 5.6.3 Isobologram of mixture in atrazine and PCP

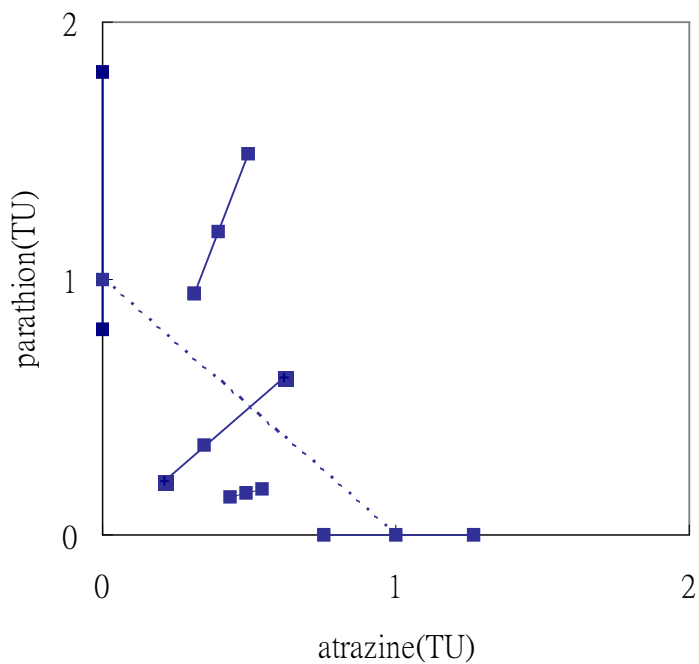


圖 5.6.4 Isobologram of mixture in atrazine and parathion

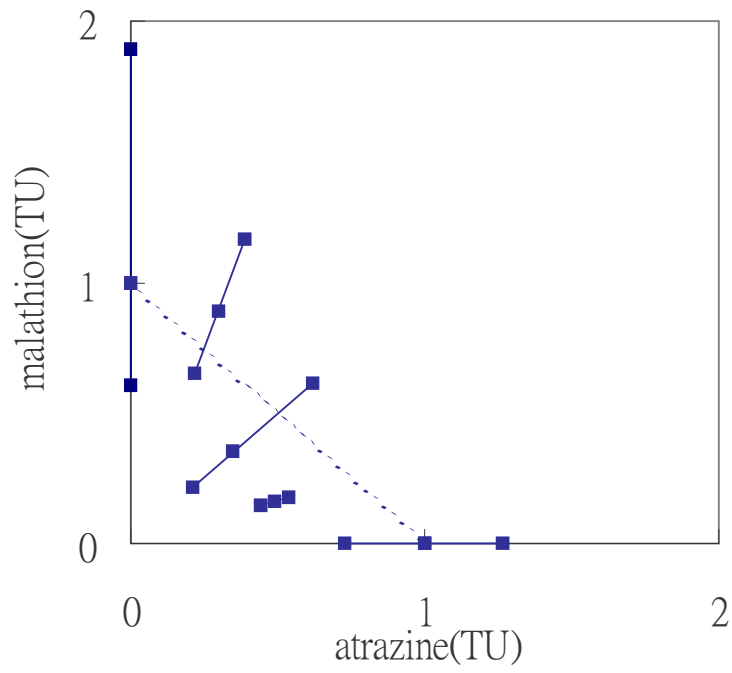


圖 5.6.5 Isobologram of mixture in atrazine and malathion

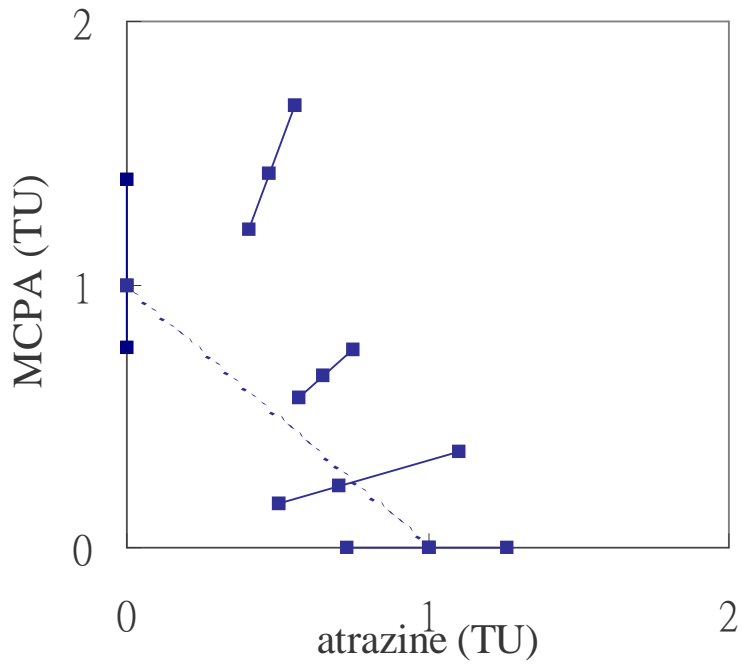


圖 5.6.6 Isobologram of mixture in atrazine and MCPA

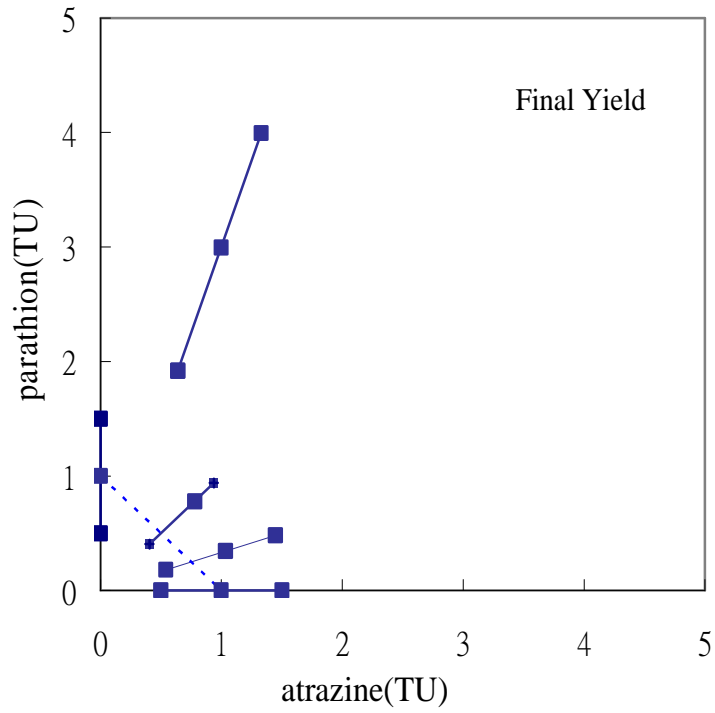


圖 5.6.7 Isobologram of mixtures in atrazine and parathion (Final Yield)

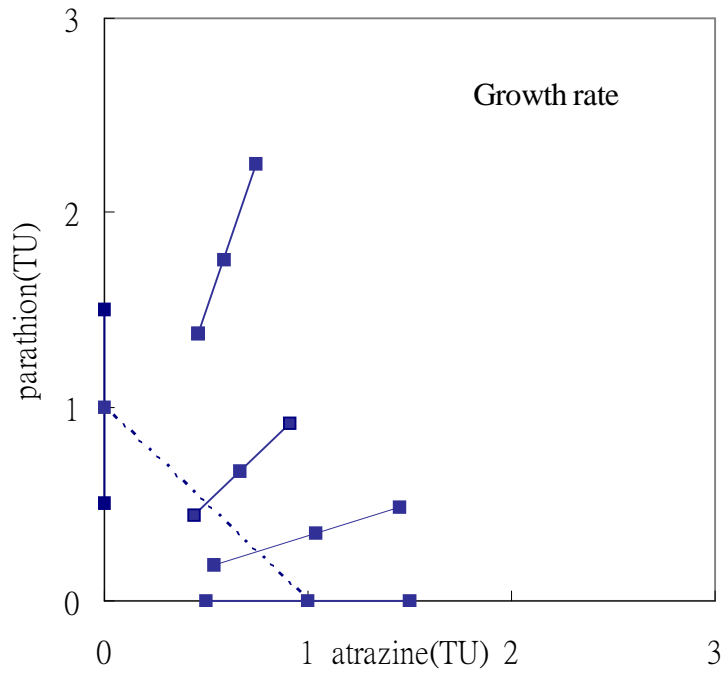


圖 5.6.8 Isobologram of mixtures in atrazine and parathion (Growth rate)