

國立交通大學
環境工程研究所
碩士論文

三種人類常用抗生素之環境風險評估

Environmental risk assessment of three commonly
used human antibiotics



研究生：王騏璋

指導教授：陳重元教授

中華民國 一百零二年 七月

摘要

抗生素是人類最常用的藥物之一，在水體環境檢測出的頻率相當高，因此需要評估是否會對生態環境造成危害。本研究選擇三種在台灣河川中偵測濃度高的抗生素：lincomycin、sulfamethoxazole 和 flumequine，使用月芽藻和水蚤進行單一毒性試驗。抗生素對月芽藻的毒性由高至低為 lincomycin > flumequine > sulfamethoxazole，而對水蚤則是 sulfamethoxazole > flumequine > lincomycin。根據歐洲藥物管理局制定的準則，對抗生素進行初步環境風險評估。預測無效應濃度之計算使用本研究月芽藻以及文獻中最敏感物種的急慢毒性數據。使用月芽藻 EC₅₀ 計算的 lincomycin 的風險商數為 1.82，而用低 NOEC 計算的 sulfamethoxazole 之風險商數為 1.102，表示具有潛在環境風險。本研究以月芽藻測試抗生素兩兩混合之毒性效應，發現 lincomycin 和 sulfamethoxazole 混合產生簡單相加作用，其餘兩組混合則為拮抗作用。考慮最壞情況，將三個抗生素依測得最高濃度混合，分別以月芽藻、水蚤和鯉魚進行試驗，結果顯示沒有生物死亡或抑制情形發生。



Abstract

Antibiotics are one of the most widely used pharmaceuticals and can be frequently detected in aquatic environment. Therefore, it is necessary to evaluate the potential risks of antibiotics to the environment. Lincomycin, sulfamethoxazole and flumequine are three antibiotics found in Taiwan's river with considerably high concentrations. Based on toxicity tests using *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Daphnia magna*, the relative toxicity relationships were: lincomycin>flumequine>sulfamethoxazole for *P. subcapitata* and sulfamethoxazole>flumequine>lincomycin for *D. magna*. The preliminary environmental risk assessment was conducted following the European Medicines Agency Guideline. Predicted no effect concentrations (PNECs) were derived from the acute and chronic toxicity data obtained from *P. subcapitata* in this study and from the literatures. Risk quotient for lincomycin was 1.82 calculated by EC_{50} of *P. subcapitata* and 1.102 for sulfamethoxazole based on the NOEC of *S. leopolensi*. The observed results suggest that, for lincomycin and sulfamethoxazole, potential risks still exist to the aquatic environment. The toxicity of binary mixtures was based on the effects on *P. subcapitata*. Simple addition effect was observed with the combination of lincomycin and sulfamethoxazole. On the other hand, the mixture effects of three antibiotics tested in the present study at the maximal MEC levels displayed no adverse effect or inhibition to *P. subcapitata*, *D. magna* and *C. carpio*.

致謝

在兩年的碩士班生活中，除了學到新知識和實驗方法，也因為承擔許多事情，覺得自己有些微成長。

首先，非常感謝我的指導教授—陳重元老師，引領我進入環境毒物學領域，並且給予許多建議和啟發，使我能確立研究題目並將其順利完成。也感謝其他兩位口試委員—張玉明老師和林志高老師，提供論文撰寫的指導及建議，讓我的論文能更完善、有條理。如果沒有以前實驗室學長姐辛苦建立的研究基礎，我也無法順利進行實驗，特此感謝。另外，非常感激孫鼎立先生不厭其煩地解決儀器問題，而且指導儀器的操作與保養。

感謝實驗室的詔茶學姊，總是熱心協助我處理實驗室的大小事情。感謝家祥學長，自我進實驗室以來，總是樂意回答我眾多的疑問，甚至畢業後仍願意和我討論實驗，而且無私地傳承經驗以及觀念，讓我從中獲得許多啟發，也順利解決不少困難。感謝萱芳學姊和思宏學長改進培養條件，讓我有穩定的系統進行實驗。感謝我的同學姵如和宜君，協助我解決課業問題和處理實驗室的事務。感謝學弟明彰、宗翰及昱辰，為實驗室帶來熱鬧氣氛，也幫忙處理許多瑣事。感謝林老師實驗室的同學和學妹，願意借我實驗藥品及儀器。另外，感謝清大的同學和朋友們，不論是一起打球、吃飯聊天、看電影或出遊，都讓我的生活增添許多樂趣。

最後，非常感謝父母的支持和體諒。從上大學以來，我一直投入在追求自己的目標而鮮少回家，然而父母卻不曾為此抱怨，總是支持我做的每個決定。非常謝謝你們！

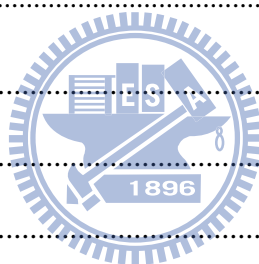
目錄

| | |
|--------------------------|-----|
| 摘要 | i |
| Abstract..... | ii |
| 致謝 | iii |
| 圖目錄 | vii |
| 表目錄 | ix |
| 第一章 前言 | 1 |
| 1.1 研究緣起..... | 1 |
| 1.2 研究內容..... | 3 |
| 1.3 研究目的..... | 3 |
| 第二章 文獻回顧 | 4 |
| 2.1 抗生素介紹..... | 4 |
| 2.2 環境風險評估..... | 7 |
| 2.2.1 人用藥物之環境風險評估流程..... | 7 |
| 2.2.2 抗生素之環境風險評估..... | 11 |
| 2.3 月芽藻毒性試驗..... | 13 |
| 2.3.1 試驗物種介紹..... | 13 |
| 2.3.2 密閉式藻類毒性試驗..... | 13 |
| 2.3.3 藻類試驗終點..... | 14 |
| 2.3.4 藻類毒性試驗之影響因子..... | 15 |
| 2.4 水蚤急毒性試驗..... | 18 |
| 2.4.1 物種介紹..... | 18 |
| 2.4.2 水蚤急毒性試驗方法..... | 19 |
| 2.5 鯉魚急毒性試驗..... | 19 |

| | | |
|-------|------------------------------------|----|
| 2.5.1 | 物種介紹..... | 19 |
| 2.5.2 | 鯉魚急毒性試驗方法..... | 20 |
| 2.6 | 混合毒性..... | 20 |
| 2.6.1 | 聯合效應..... | 20 |
| 2.6.2 | 混合毒性預測模式..... | 21 |
| 2.6.3 | 抗生素之混合毒性效應..... | 22 |
| 第三章 | 基本理論..... | 24 |
| 3.1 | 劑量反應模式..... | 24 |
| 3.2 | 混合毒性理論..... | 27 |
| 3.2.1 | 混毒效應判別方式..... | 27 |
| 3.2.2 | 非交互作用混合毒性模式..... | 29 |
| 3.2.3 | 混合毒性效應參數 ρ 和 λ 值..... | 30 |
| 第四章 | 實驗材料與方法..... | 33 |
| 4.1 | 實驗藥品與儀器..... | 33 |
| 4.1.1 | 實驗藥品..... | 33 |
| 4.1.2 | 儀器..... | 34 |
| 4.2 | 藻類培養..... | 34 |
| 4.2.1 | 生長基質..... | 34 |
| 4.2.2 | 連續式藻類培養..... | 37 |
| 4.3 | 密閉式藻類毒性試驗..... | 37 |
| 4.4 | 水蚤急毒性試驗..... | 39 |
| 4.5 | 鯉魚急毒性試驗..... | 39 |
| 4.6 | 混合毒性試驗..... | 40 |
| 第五章 | 結果與討論..... | 41 |



| | |
|----------------------------|----|
| 5.1 單一抗生素之毒性試驗..... | 41 |
| 5.1.1 月芽藻毒性試驗..... | 41 |
| 5.1.2 水蚤急毒性試驗..... | 43 |
| 5.1.3 月芽藻、水蚤和魚類敏感性之比較..... | 45 |
| 5.2 抗生素之環境風險評估..... | 45 |
| 5.3 抗生素之混合毒性..... | 53 |
| 5.3.1 抗生素兩兩混合..... | 53 |
| 5.3.2 三個抗生素混合..... | 57 |
| 第六章 結論與建議..... | 60 |
| 6.1 結論..... | 60 |
| 6.2 建議..... | 61 |
| 參考文獻..... | 62 |
| 附錄一 單一毒性數據..... | 67 |
| 附錄二 混合毒性數據..... | 71 |



圖目錄

| | |
|---|----|
| 圖 1.1.1 抗生素進入水體環境的可能途徑(Kumar et al., 2005)..... | 2 |
| 圖 2.1.1 抗生素作用位置(Neu, 1992)..... | 4 |
| 圖 2.1.2 乙內醯胺的作用機制(Kohanski et al., 2010) | 5 |
| 圖 2.1.3 胺基糖苷的作用機制(Kohanski et al., 2010) | 6 |
| 圖 2.1.4 喹諾酮的作用機制(Kohanski et al., 2010) | 6 |
| 圖 2.1.5 抑制葉酸代謝之作用機制 | 7 |
| 圖 2.2.1 環境風險評估流程 | 10 |
| 圖 2.3.1 光學顯微鏡下的月芽藻外觀 | 13 |
| 圖 2.3.2 藻類培養之二氧化碳傳輸途徑(Nyholm and Källqvist, 1989)..... | 15 |
| 圖 2.4.1 水蚤之雌性成蚤(環境檢驗所, 2011a)..... | 18 |
| 圖 2.5.1 鯉魚幼魚(環境檢驗所, 2011b)..... | 19 |
| 圖 3.1.1 劑量反應曲線 | 24 |
| 圖 3.2.1 isobologram 示意圖 | 29 |
| 圖 3.2.2 兩化學物毒性容忍度之相關係數之示意圖。 | 30 |
| 圖 4.3.1 連續式藻類培養系統簡圖 | 38 |
| 圖 5.1.1 lincomycin 之劑量反應曲線。(■) Δ DO, (●) yield, (▲) growth rate..... | 42 |
| 圖 5.1.2 sulfamethoxazole 之劑量反應曲線。(■) Δ DO, (●) yield, (▲) growth rate..... | 42 |
| 圖 5.1.3 flumequine 之劑量反應曲線。(■) Δ DO, (●) yield, (▲) growth rate..... | 43 |
| 圖 5.1.4 sulfamethoxazole 對水蚤之劑量反應曲線 | 44 |
| 圖 5.1.5 flumequine 對水蚤之劑量反應曲線 | 44 |
| 圖 5.2.1 以本研究月芽藻計算三個抗生素之 RQ..... | 48 |
| 圖 5.2.2 以最敏感物種數據計算三個抗生素之 RQ..... | 49 |
| 圖 5.3.1 lincomycin + flumequine 之 isobologram (試驗終點 growth rate) | 55 |

圖 5.3.2 lincomycin + sulfamethoxazole 之 isobologram (試驗終點 growth rate)55

圖 5.3.3 flumequine + sulfamethoxazole 之 isobologram (試驗終點 growth rate)56

圖 5.3.4 以月芽藻進行三個抗生素混毒試驗。(a) Δ DO, (b) yield, (c) growth rate58

圖 5.3.5 以水蚤進行三個抗生素混毒試驗59

圖 5.3.6 以鯉魚進行三個抗生素混毒試驗59



表目錄

| | |
|--|----|
| 表 2.2.1 第二階段階層 A 中物化特性、宿命和毒性試驗的研究方法 | 11 |
| 表 2.2.2 第二階段階層 B 中宿命和毒性試驗的研究方法 | 11 |
| 表 2.6.1 四種聯合效應型式 | 21 |
| 表 3.1.1 Probit、Logit 和 Weibull 模式轉換 | 26 |
| 表 3.2.1 聯合效應指標(Altenburger et al., 2003) | 28 |
| 表 3.2.2 四種混合毒性效應模式 | 32 |
| 表 4.1.1 三種抗生素的物化性質、代謝率、半生期和河川檢測最高濃度 | 34 |
| 表 4.2.1 月芽藻生長所需之微量營養鹽成份 | 36 |
| 表 4.2.2 月芽藻生長所需之微量營養鹽成份 | 36 |
| 表 5.1.1 月芽藻單一抗生素之毒性試驗結果(試驗終點為 ΔDO) | 41 |
| 表 5.1.2 月芽藻單一抗生素之毒性試驗結果(試驗終點為 yield) | 41 |
| 表 5.1.3 月芽藻單一抗生素之毒性試驗結果(試驗終點為 growth rate) | 42 |
| 表 5.1.4 水蚤單一抗生素之急毒性試驗結果 | 43 |
| 表 5.1.5 月芽藻、水蚤以及斑馬魚 EC_{50} 之比較 | 45 |
| 表 5.2.1 計算水體 PNEC 之評估因子(European Chemicals Bureau, 2003) | 47 |
| 表 5.2.2 以本研究月芽藻數據計算三個抗生素之 RQ | 48 |
| 表 5.2.3 以最敏感物種數據計算三個抗生素之 RQ | 49 |
| 表 5.2.4 lincomycin、sulfamethoxazole 和 flumequine 的急毒性數據 (EC_{50} 或 LC_{50}) .. | 50 |
| 表 5.2.5 lincomycin、sulfamethoxazole 和 flumequine 的慢毒性數據 (NOEC) | 52 |
| 表 5.3.1 抗生素以毒性單位 1:1 混合之毒性效應(試驗終點為 growth rate) | 53 |
| 表 5.3.2 以生長率為試驗終點之混合毒性模式預測(毒性單位比 1:1) | 54 |
| 表 5.3.3 月芽藻三個試驗終點的 NOEC 與抗生素的環境最高濃度 | 57 |

第一章 前言

1.1 研究緣起

新興污染物 (Emerging contaminants) 包括化學物質和微生物之代謝物，為新認定或已存在於環境中、但近期才被發現的污染物，由於分析儀器的進步，能夠偵測到水中微量的化學物質。大多數的新興污染物無法經由傳統生物處理程序完全去除，因此對生態環境及人體健康的影響不容忽視。藥物和個人保健用品 (pharmaceutical and personal care products, PPCPs) 屬於新興污染物中的一大類化學物質，包含處方藥、診斷劑、動物用藥、營養素、香水和防曬產品等等。這些化合物和其代謝產物持續排入水體環境中，造成水中生物整個生命週期、多代的長時間暴露，產生潛在危害(Daughton and Ternes, 1999)。

抗生素廣泛用於人類和動物的醫療，也是畜牧和水產養殖常用的生長促進劑。圖 1.1.1 說明抗生素的來源和進入環境中的可能途徑。許多抗生素進入人體和動物後並無法完全代謝，腸道吸收的效率極低，最後以原化合物 (parent compounds) 的形式經由尿液和糞便排出體外(Hirsch et al., 1999; Chee-Sanford et al., 2001)，污染土壤或隨著地表逕流至地表水或滲濾至地下水層。養殖漁業使用的抗生素直接投入水中或在飼料添加，殘留在水體環境或底泥中。根據許多研究發現，在廢水處理廠的放流水和水體環境中測得抗生素濃度介於 ng - µg/L 範圍(Kolpin et al., 2002; Calamari et al., 2003; Miao et al., 2004; Wiegel et al., 2004; Karthikeyan and Meyer, 2006; Watkinson et al., 2009)，雖然如此低的濃度不至於威脅人類健康，但是對於水中的敏感生物，在長期暴露下，可能會產生毒性效應，因此必須對這類藥物進行環境風險評估(environmental risk assessment, ERA)。另外，在環境中通常含有多種抗生素，並非只有單一藥物存在，所以須要考慮混毒效應對水體生物的影響。

水體生態食物鏈三種代表性生物為藻類、甲殼類 (水蚤) 和魚類，因此環境風險評估須包含此三種生物之急慢毒性數據。其中，藻類為水體生態系的主要生產者，是食物

鏈的基礎，在水體環境中物質的循環中扮演重要的角色。一些文獻的毒性數據顯示，藻類對抗生素的敏感性高於甲殼類和魚類，例如 ofloxacin、sulfamethoxazole、triclosan 和 ciprofloxacin (Orvos et al., 2002; Ferrari et al., 2004; Isidori et al., 2005; Robinson et al., 2005; Martins et al., 2012)。由於在真實環境中，同時存在多種抗生素，因此不能忽略藥物混合後產生的毒性變化，尤其是當協同作用發生時，會提高對水體生物的毒性。另外，目前文獻甚少討論作用機制不同抗生素之混毒效應，所以在本篇研究中，選擇三種機制不同而且在台灣河川檢測濃度較高(林郁真, 2010)的抗生素: lincomycin、sulfamethoxazole 和 flumequine，其濃度分別為 1640、650 和 198 ng/L，並且使用涵蓋三個營養階層的物種：月芽藻、水蚤和鯉魚，測試抗生素的毒性、評估對台灣河川環境的風險性以及探討混合毒性效應。

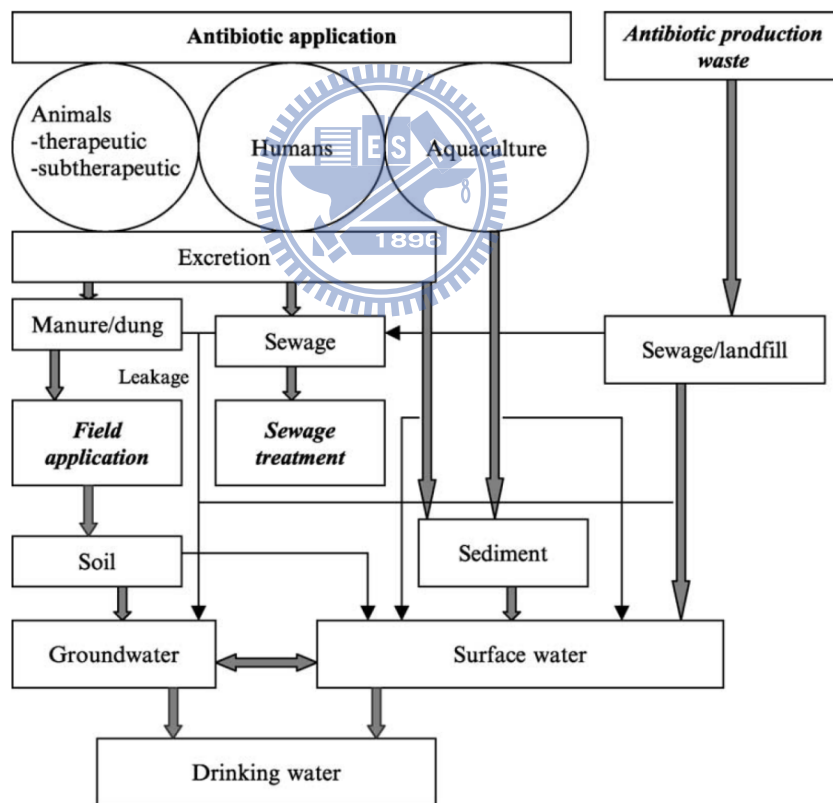


圖 1.1.1 抗生素進入水體環境的可能途徑(Kumar et al., 2005)

1.2 研究內容

1. 以月芽藻、水蚤和鯉魚測試三種抗生素之生物毒性。月芽藻試驗是以溶氧變化量 (ΔDO)、生物質量產量 (yield) 和比生長率 (specific growth rate) 作為試驗終點 (endpoint)。水蚤急毒性試驗之終點為判斷水蚤是否具有游泳能力。鯉魚急毒性試驗則是根據鯉魚死亡情形做為試驗終點。將得到的實驗數據用 Probit 模式計算抗生素的 EC_{50} 。
2. 使用歐洲藥物管理局制定的環境風險評估流程，計算抗生素的風險商數 (risk quotient, RQ)，藉此判斷是否具有潛在風險。依據抗生素在台灣河川的檢測濃度以及毒性資料計算風險商數。毒性數據是使用本研究之月芽藻和參考文獻中最敏感物種的數據。
3. 抗生素兩兩混合毒性試驗使用月芽藻作為試驗生物。混合比例是依毒性單位 (toxicity unit, TU) 計算，進行 1:1、1:3 和 3:1 三個混合比例的毒性試驗。用總毒性單位 (sum of toxic units) 指標判斷抗生素 1:1 混合所產生的毒性效應。並且將實驗結果和混毒預測模式 Multox 之預測值進行比較，藉此討論模式的預測能力。另外，將 1:1、1:3 和 3:1 三個混合比例之毒性數據繪製成 isobologram，探討不同比例所產生的混毒作用，並藉此判斷不符合模式預測的原因。
4. 將三種抗生素依其在台灣河川測得的最高濃度混合，以月芽藻、水蚤和鯉魚進行毒性試驗，評估在最壞情況下是否會對三個階層的水中生物產生危害。

1.3 研究目的

1. 了解 lincomycin、sulfamethoxazole 和 flumequine 對月芽藻、水蚤和鯉魚，三個階層的水體生物之毒性。
2. 以風險商數判斷三個抗生素對台灣河川是否具有潛在風險性。
3. 了解抗生素兩兩混合後是否會對月芽藻產生更高的毒性以及探討混合毒性作用。
4. 了解三個抗生素以最高濃度混合下，是否會對三個階層的物種產生急毒性的危害。

第二章 文獻回顧

2.1 抗生素介紹

抗生素 (antibiotics) 是由細菌、真菌和放射菌產生的代謝產物，能殺死或抑制微生物生長。目前臨床上用的抗生素來自微生物培養液提取或化學合成。抗生素依作用機制可分五大類：抑制細胞壁合成、破壞細胞膜或抑制其合成、抑制蛋白質合成、抑制核酸合成和抑制葉酸代謝，如圖 2.3.1 所示。

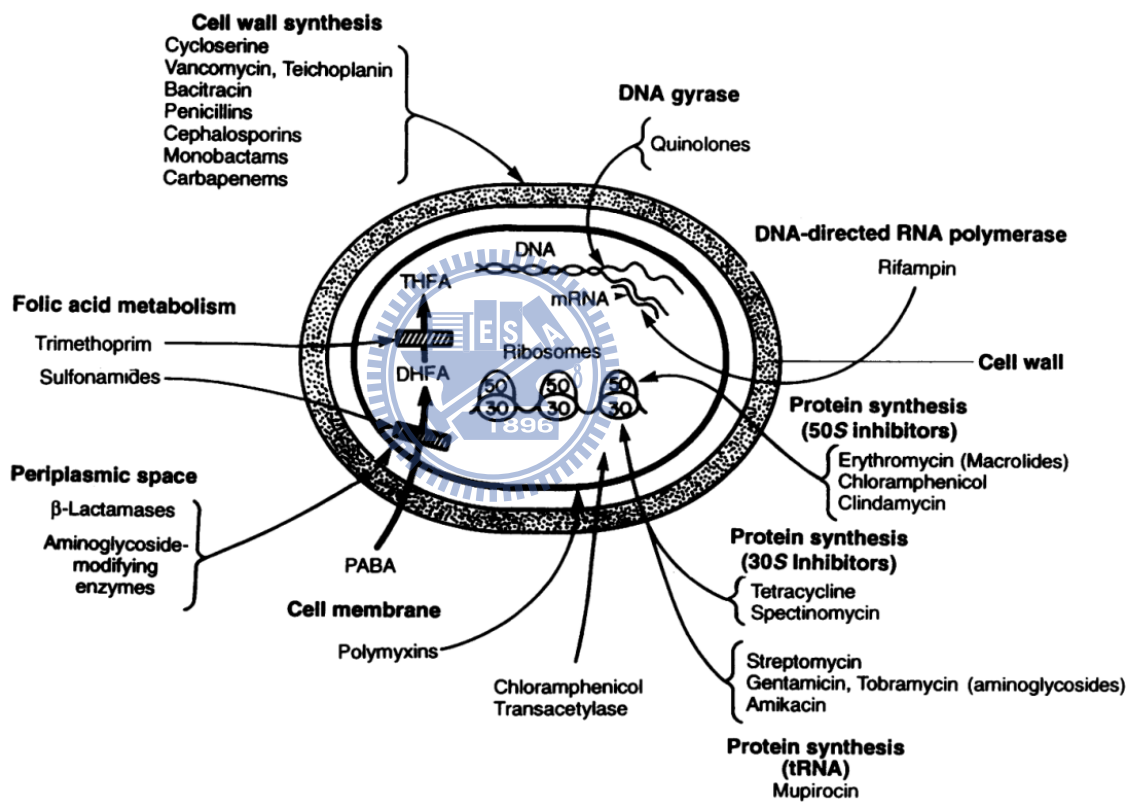


圖 2.1.1 抗生素作用位置(Neu, 1992)

1. 抑制細胞壁合成

細菌的細胞壁成分為肽聚糖，它是由多醣類骨架彼此經由短的多肽類交聯形成的網狀結構。盤尼西林 (penicillin) 會和許多參與細胞壁合成的酵素鍵結，這些酵素通稱為盤尼西林結合蛋白 (penicillin-binding proteins, PBP)。其中，轉肽酶 (transpeptidase) 的作用是讓多醣類產生交聯 (cross-linking)，使細胞壁穩固，因此為最重要的酵素。乙內醯胺 (β -lactam) 類藥物會和轉肽酶結合，抑制其作用，進而活化細菌的自溶解酵素

(autolysin)，使細菌死亡(Tuomanen, 1986)。另一種抑制肽聚醣合成的抗生素為萬古黴素 (vancomycin)，其作用機制是透過和肽聚醣末端結合，阻止轉肽酶繼續延長網狀結構，影響細胞壁的合成。

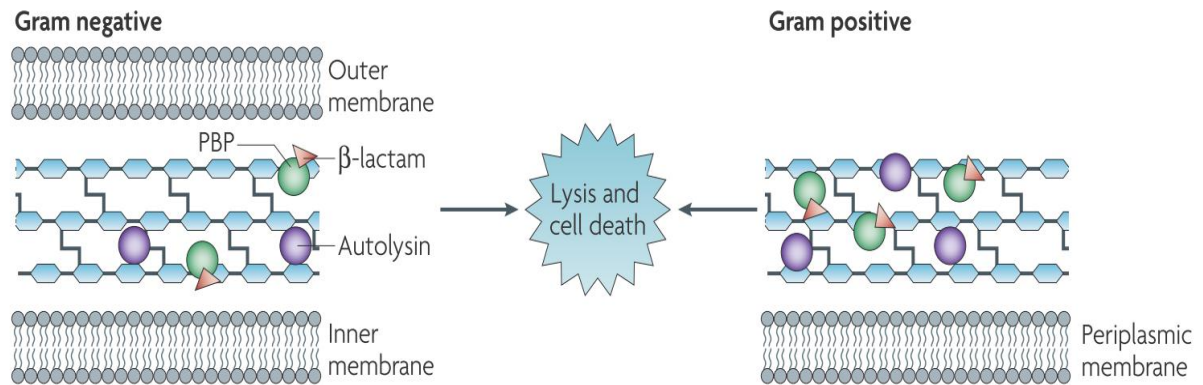


圖 2.1.2 乙內醯胺的作用機制(Kohanski et al., 2010)

2. 破壞細胞膜

多黏菌素 (Polymyxin) 為多肽類抗生素，包含五種化合物，其中用於臨床的只有 Polymyxin B 和 Polymyxin E，因為此兩個藥物對腎臟的毒性較低。多黏菌素和細胞膜的脂多醣 (lipopolysaccharide) 鍵結，改變細胞膜通透性，使胞內物質流出，造成細菌死亡(Newton, 1956)。

3. 抑制蛋白質合成

細菌的核糖體 (ribosome) 包含 30 S 和 50 S 兩個次單元 (subunit)。30 S 讀取 mRNA 的密碼子，攜帶胺基酸的 tRNA 附著至核糖體，將胺基酸連結形成多肽鏈。有些抗生素即是干擾上述轉譯過程來抑制細菌蛋白質合成。例如胺基糖苷 (aminoglycosides) 類藥物和 30 S 次單元結合，使其誤讀 (misreading) 密碼子，讓錯誤的胺基酸接上多肽鏈(Davies et al., 1965)。另外，也會抑制核糖體轉位 (translocation)，終止多肽鏈的形成。四環素 (tetracycline)、巨內脂環 (macrolide) 和林可黴素 (lincosamide) 這三類的抗生素則是和核糖體 50 S 結合，干擾胺基酸的鍵結。

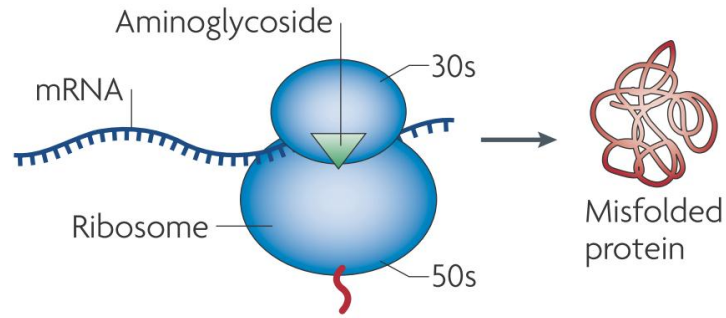


圖 2.1.3 胺基糖苷的作用機制(Kohanski et al., 2010)

4. 抑制核酸合成

細菌的 DNA 旋轉酶 (gyrase) 能引入負超螺旋至 DNA，減少 DNA 複製和轉錄時產生的張力。喹諾酮 (quinolone) 類抗生素能和 DNA 旋轉酶結合，干擾 DNA 複製 (Drlica and Zhao, 1997)。立汎黴素 (rifampin) 抑制 DNA-依賴性 RNA 聚合酶 (DNA-dependent RNA polymerase)，導致細菌無法進行轉錄，影響 RNA 合成。

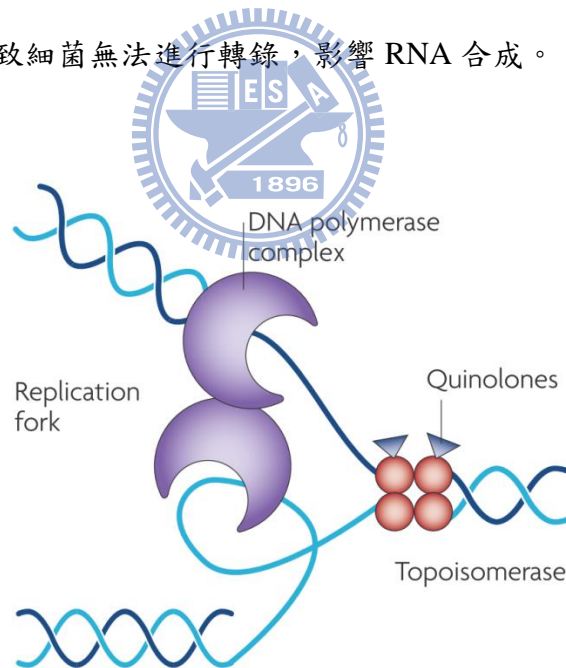


圖 2.1.4 喹諾酮的作用機制(Kohanski et al., 2010)

5. 抑制葉酸代謝

細菌的葉酸代謝受到抑制會影響去氧核苷酸的製造，使得 DNA 合成受阻。對胺基安息香酸 (para - aminobenzoic acid, PABA) 是合成葉酸的重要受質，而磺胺類

(sulfonamide) 類藥物的結構和 PABA 相似，因此會和 PABA 競爭 Dihydropteroate synthase 的結合位置，抑制二氫葉酸合成。另一種磺胺類抗生素 Trimethoprim，與 dihydrofolate reductase 的親和力極強，因此抑制四氫葉酸合成。

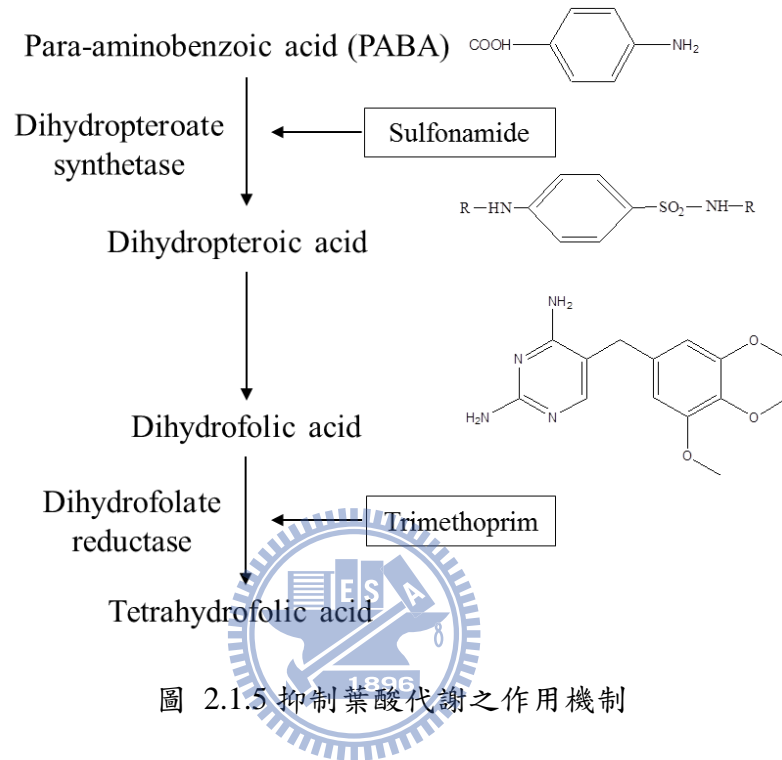


圖 2.1.5 抑制葉酸代謝之作用機制

2.2 環境風險評估

2.2.1 人用藥物之環境風險評估流程

過去二十年間，許多國家的水體環境中都檢測出多種的藥物，而且由於大量地使用，不斷排放到環境中，持續對水體生物產生危害，因此已經是受到矚目的環境議題。歐洲藥物管理局 (European Medicines Agency, EMA) 針對人用的藥物訂定環境風險評估的準則(EMA, 2006)，藉此管制對生態環境有危害的藥物。評估方式採取逐步階層的流程，分為兩個階段 (Phase I 和 Phase II)，第二階段又再分成兩個階層 (Tier A 和 Tier B)，如圖 2.2.1 所示。

在第一階段，目的是預測藥物在環境中的濃度。若藥物的辛醇-水分配係數(logarithm of the octanol-water partitioning coefficient, $\log K_{ow}$)大於 4.5，不適用此流程，而是採用持

久性累積毒性物質 (persistence, bioaccumulation and toxicity, PBT) 的風險評估(European Chemicals Bureau, 2003)。藥物在表體水中的預測環境濃度 (predicted environmental concentration, PEC) 是依下列公式計算：

$$PEC_{SW} = \frac{Dose_{ai} \cdot F_{pen}}{WasteW_{inhab} \cdot dilution}$$

PEC_{SW} ：預測在表體水中的濃度

$Dose_{ai}$ ：每人每天消耗最大劑量

F_{pen} ：市場滲透比例

$WasteW_{inhab}$ ：每人每天排放的廢水體積

$dilution$ ：污水處理廠的出流水排放至承受水體之稀釋因子

若 PEC_{SW} 小於 $0.01 \mu\text{g/L}$ ，表示不會對環境造成影響； PEC_{SW} 等於或大於 $0.01 \mu\text{g/L}$ ，則須進行第二階段。

在第二階段階層 A，也稱為初步風險評估 (initial risk assessment)，進行藥物的物化性質和環境宿命的測試，以及水體生物（藻類、水蚤和魚類）的毒性試驗（表 2.2.1）。將實驗得到的無效應濃度 (no observed effect concentration, NOEC)，並參考技術指導文件 (technical guidance document, TGD) 提供的評估因子 (assessment factor, AF)，可計算出預估無效應濃度 (predicted no effect concentration, PNEC)，公式如下：

$$PNEC = \frac{NOEC}{AF}$$

最後，計算 PEC_{SW} 和 PNEC 的比值，藉此判斷藥物是否對水體生態具有風險性。許多文獻將 $PEC_{SW}/PNEC$ 稱作風險商數 (risk quotient, RQ)。當 RQ 大於 1，意即預測藥物在表體水中的濃度高於預測無效應濃度，表示具有潛在風險性，此時須進行階層 B 的評估。

在初步的風險評估時，由於 EMEA 準則中 PEC 的計算比較保守且考慮的是最壞情況，所以通常和實際檢測的環境濃度 (measured environmental concentration, MEC) 產生落差，而且若缺少可靠的數據會不利於 PEC 的計算。因此有些研究是以 MEC 取代 PEC，認為 MEC 能反映藥物實際在水體的濃度(Grung et al., 2008)。

第二階段階層 B 為精確風險評估 (refined risk assessment)。首先計算精確 PEC (refined PEC)，公式如下：

$$PEC_{sw} = \frac{E_{local\ water} \cdot f_{stp\ water}}{WasteW_{inhab} \cdot Capacity_{stp} \cdot Factor \cdot dilution}$$

$E_{local\ water}$ ：每天當地的藥物排放量

$f_{stp\ water}$ ：處理場出流水直接排放至表體水的比例

$WasteW_{inhab}$ ：每人每天排放的廢水體積

$Capacity_{stp}$ ：污水處理廠之容量，單位為居民人數

$Factor$ ：污泥之吸附性

$dilution$ ：污水處理廠的出流水排放至承受水體之稀釋因子

另外，在此階層，進行藥物在土壤中的宿命研究，並且將毒性試驗的物種延伸至底泥生物、土壤中的微生物和陸地的動植物，如表 2.2.2 所示，並計算其 PNEC。若 refined PEC 和 PNEC 比值仍高於 1，表示須要管制藥物的使用量。



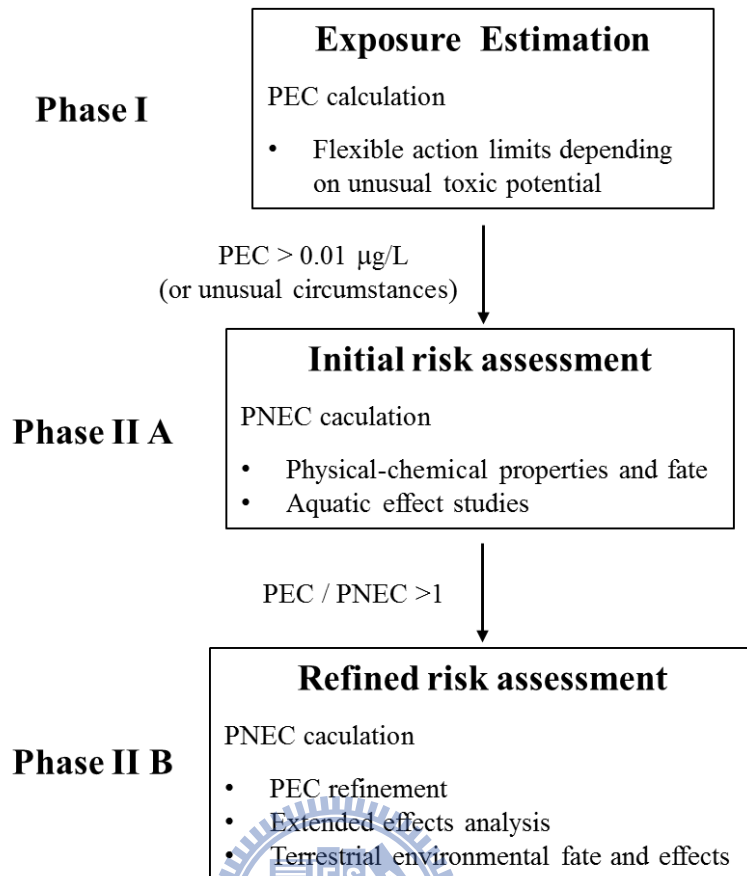


圖 2.2.1 環境風險評估流程

表 2.2.1 第二階段階層 A 中物化特性、宿命和毒性試驗的研究方法

| Study Type |
|--|
| Adsorption – Desorption Using a Batch Equilibrium Method |
| Ready Biodegradability Test |
| Aerobic and Anaerobic Transformation in Aquatic Sediment Systems |
| Algae, Growth Inhibition Test |
| <i>Daphnia sp.</i> Reproduction Test |
| Fish, Early Life Stage Toxicity Test |
| Activated Sludge, Respiration Inhibition Test |

表 2.2.2 第二階段階層 B 中宿命和毒性試驗的研究方法

| Study Type |
|---|
| Aerobic and anaerobic transformation in soil |
| Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test |
| Terrestrial Plants, Growth Test |
| Earthworm, Acute Toxicity Test |
| <i>Collembola</i> , Reproduction Test |

2.2.2 抗生素之環境風險評估

Halling-Sørensen et al. (2000)對 mecillinam、trimethoprim 和 ciprofloxacin 三種廣泛用於治療尿道感染的抗生素，進行初步風險計算。假設污水處理廠的移除率為零，也就是計算最壞情況下的 PEC。以最敏感物種（藍綠藻）的 NOEC 計算 PNEC。ciprofloxacin 的 PEC/PNEC 為 12.7，其餘兩個抗生素不具風險性。Isidori et al. (2005)計算 erythromycin、oxytetracyclin、sulfamethoxazole、ofloxacin、lincomycin 和 clarithromycin 六種抗生素之風險商數。將 MEC 除以月芽藻的 PNEC，發現 erythromycin、lincomycin 和

clarithromycin 的 RQ 高於 1。Hernando et al. (2006) 評估多種藥物在污水處理廠放流水、表體水和底泥的風險性。其中，erythromycin 在放流水中的濃度相當高，因此 RQ 大於 1，其餘抗生素皆無風險性。Kim et al. (2007) 使用海洋螢光菌 (*V. fischeri*)、水蚤 (*D. magna*) 和青鱈魚 (*O. latipes*) 對六種磺胺類藥物進行毒性試驗，並且參考文獻數據，選出最敏感物種的 EC₅₀ 計算風險商數。結果發現 sulfamethoxazole 的 RQ 為 6.3，有很高的潛在風險。Park et al. (2008) 挑選 11 種抗生素，以 *V. fischeri*、兩種水蚤 (*D. magna* 和 *M. macrocopa*) 和 *O. latipes* 作為試驗生物。將實驗數據和文獻比較後選出最低的 EC₅₀ 和 NOEC，並且用 MEC 取代 PEC 來計算 RQ。其中有五個抗生素具有風險性。作者認為根據慢毒性計算得到的 RQ 比較有意義，而且能觀察到生物受到抗生素影響所產生的慢毒性效應。Martins et al. (2012) 針對 ciprofloxacin 進行廣泛探討。使用六種試驗生物：海洋螢光菌、月芽藻、浮萍、水蚤和食蚊魚 (*G. holbrooki*)。計算醫院放流水、污水處理廠放流水和河川表體水的 PEC，並分別用急毒性和慢毒性數據的 PNEC，計算 RQ。結果顯示，以慢毒性評估皆無風險性。然而，以急毒性數據計算三種水體的 RQ 極大，尤其是醫院放流水 (RQ 為 2192.6)，因此作者仍認為有必要進行精確風險評估。

2.3 月芽藻毒性試驗

2.3.1 試驗物種介紹

本實驗中所使用的月芽藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*, 舊名 *Selenastrum capricornutum*), 外型呈半月型, 為成群體但不糾結、不能移動之淡水綠藻(Chlorophyceae)。其優點為：取得容易、培養簡單、容易觀察、生長期短、可以大量生長、具有本土代表性而且比大部分生物試驗來的敏感(Rojíčková-Padrťová et al., 1998)。當培養過程中缺少營養鹽或溫度、光照、pH、有毒物質侵害或細菌滋生等環境條件不佳時, 月芽藻會逐漸呈現明顯的黃綠色, 故從外觀可以容易地去判斷生長情形。另外也可透過顆粒計數器觀察其粒徑的分佈, 若發現顆粒數變少、聚集成團的藻類數量變多時, 表示藻的生長狀況不佳。

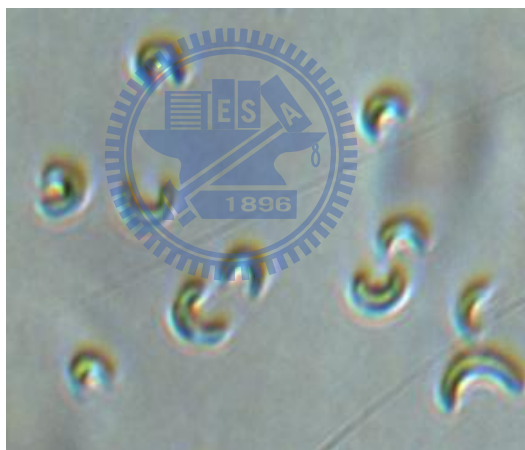


圖 2.3.1 光學顯微鏡下的月芽藻外觀

2.3.2 密閉式藻類毒性試驗

月芽藻毒性試驗的標準方法有很多種, 例如: U.S. EPA (1996)、OECD (2006)、ISO (2012b)、APHA (1995)和 ASTM (2012b), 都是使用錐形瓶作為試驗容器進行實驗, 為開放式系統。其優點在於實驗期間能和外界空氣接觸, 提供生長基質二氧化碳, 給予藻類生長所需的碳源, 而且能維持生長基質的 pH 值。但是, 若試驗毒物具有揮發性, 則會因為毒物散失, 影響實驗結果。因此, 使用密閉式試驗方法可解決此問題, 然而, 在實

驗初期需要提高生長基質中的碳源，避免影響藻類生長。本研究使用 Lin et al. (2005)建立的密閉式藻類毒性試驗，以 BOD 瓶做為實驗容器，在試驗前用含 0.5 % 二氧化碳之氮氣對生長基質曝氣，提供溶解性二氧化碳。

2.3.3 藻類試驗終點

目前藻類毒性試驗的標準方法皆是以藻類的生物質量 (biomass)，評估毒物抑制藻類生長現象。量測生物質量最直接的方法是秤乾重，但是需要花費較久的時間，所以用電子顆粒計數器、UV/Vis 光譜儀和螢光光譜儀等間接測量方法取代之，由於這些方法操作簡單、快速、只需少量藻液而且與乾重有良好的相關性。

在本研究中，藻類的試驗終點 (endpoint) 有三種：溶氧變化量 (ΔDO)、產量 (yield) 和比生長率 (specific growth rate)。抑制率的計算公式如下：

(1) 以溶氧變化量計算抑制率：

$$\text{Inhibition rate} = \frac{\Delta DO_C - \Delta DO_T}{\Delta DO_C} \times 100\%$$

ΔDO_C 和 ΔDO_T 分別為控制組和實驗組的產氧量之平均值。

(2) 產量的計算為生物質量在暴露時間內的改變量，其抑制率算法如下：

$$\text{Inhibition rate} = \frac{Y_C - Y_T}{Y_C} \times 100\%$$

Y_C 和 Y_T 分別為控制組和實驗組的產量之平均值。

(3) 平均比生長率的計算公式如下：

$$\mu = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{day}^{-1})$$

μ_{i-j} 為第 i 天到第 j 天的平均比生長率。 X_i 和 X_j 分別為第 i 天和第 j 天的生物質量。

以平均比生長率計算抑制率：

$$\text{Inhibition rate} = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100\%$$

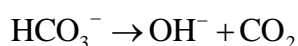
μ_C 和 μ_T 分別為控制組和實驗組的平均比生長率。

2.3.4 藻類毒性試驗之影響因子

1. pH 和碳源

根據 U.S. EPA 標準方法製備的培養基 pH 值為 7.5 ± 0.1 ，而 OECD 和 ISO 方法使用的培養基 pH 值約為 8.1。另外，OECD 和 ISO 規定試驗期間 pH 的變化不可超過 1.5。

圖 2.3.2 為氣相中二氧化碳傳輸至藻類細胞的示意圖。藻類的生長主要利用水中溶解的二氧化碳，其次是碳酸氫根離子。當藻類消耗二氧化碳的速率高於二氧化碳從氣相傳輸至液相的速率時，則開始利用培養基 (medium) 中的碳酸氫根離子，使得氫氧根離子濃度增加，導致 pH 上升。其反應式及 pH 計算公式如下：



$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{HCO}_3^-]}{[\text{CO}_2]}$$

為了實驗的再現性，必須控制試驗期間培養基的 pH 值。尤其當試驗毒物為重金屬或是弱有機酸、弱有機鹼時，容易因為 pH 改變而影響毒性強弱。可以透過減少初始的生物質量、縮短試驗時間(Arensberg et al., 1995)或連續震盪試驗容器提高二氧化碳質傳效率等方法來減少 pH 的增加。

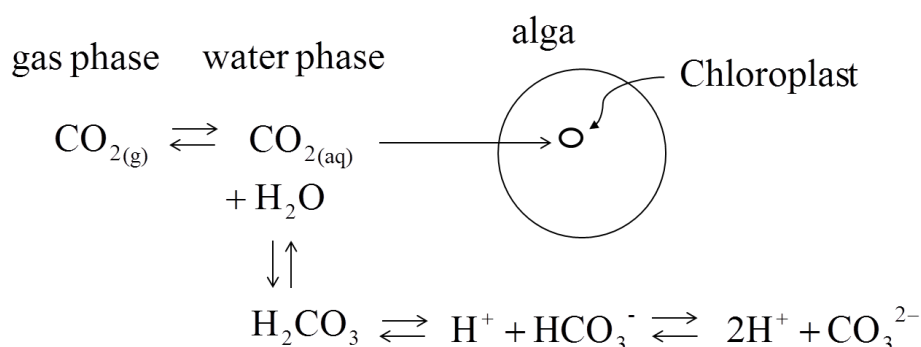


圖 2.3.2 藻類培養之二氧化碳傳輸途徑(Nyholm and Källqvist, 1989)

若毒物具有揮發性，會採用密閉式的試驗方法，避免毒物濃度改變而影響實驗結果。許多文獻的密閉式系統都是將開放式的錐形瓶密封，然後在實驗初期透過不同的方式給予足夠的二氧化碳。Kühn and Pattard (1990)用蓋子塞住錐形瓶口，並且將 72 小時試驗

時間縮短為 48 小時，pH 約上升 1.5。Galassi and Vighi (1981)使用 2 L 錐形瓶，僅裝入 100 mL 培養基，來增加液面上密閉空間 (headspace) 的體積，避免二氧化碳缺乏。但是此方法仍會讓部分有機物揮發至氣相，所以必須用亨利常數計算或用分析儀器定量液相中的剩餘有機物濃度。Hermann et al. (1990)額外加入 0.4 % (w/v) 的 NaHCO_3 至培養基中，作為碳源，並且將初始 pH 調至中性。但是作者並沒有量測實驗結束的 pH 值，因此無從得知 pH 的改變為何。Brack and Rottler (1994)認為提高培養基質中 NaHCO_3 濃度雖然可以增加碳源，但是離子強度上升反而會抑制藻類生長，因此設計出一種特殊試驗容器：下方錐形瓶裝 $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ 緩衝溶液，可提供氣相 1.14 % 二氧化碳；上方容器含有 30 mL 培養基。兩者以 headspace 連接，液相並無接觸，如此可防止離子強度增加。pH 介於 6.5 和 7.5 之間。Hailing-Sørensen et al. (1996)加入 0.19 mmol NaHCO_3 至培養基，並且將 headspace 充滿 1 % 的二氧化碳，試驗時間改成 48 小時，pH 僅略微增加，從 7 上升至 7.3。Mayer et al. (2000)研究結果指出保留 headspace 仍會使大量的有機物揮發至氣相，因此將容器裝滿培養基，使其完全密閉。將 NaHCO_3 濃度提高為 300 mg/L，並將 pH 調至 7，兩天試驗時間後 pH 變動小於 0.5。Lin et al. (2005)用 BOD 瓶進行實驗，同樣採用完全密閉不保留 headspace，試驗前用含 0.5 % 二氧化碳之氮氣對培養基進行曝氣，增加碳源。48 小時後 pH 約增加 1.5。

2. 光照強度

光照強度會影響藻類行光合作用的速率，而且生長速率沿著光飽和曲線 (light saturation curve) 增加，因此培養時必需有足夠的攪拌，生物質量不可過高、培養體積不可太大，以免透光不足影響藻類細胞的生長(Nyholm and Källqvist, 1989)。目前沒有文獻指出光照強度是否會影響藻類對毒物的敏感性。U.S. EPA 和 OECD 規定光照強度為 4300 lux，ISO 則是 8000 lux。大部分的研究使用連續照光，其優點為穩定控制藻類的生長，若用光暗交替的照光方式容易讓生物質量產生很大的變異。

3. 溫度

因為溫度的變化會影響藻類的代謝作用，所以也可能會影響毒物的抑制效應。U.S. EPA 規定 24°C。OECD 是 21 至 24°C，ISO 則是 23°C，溫度變動必須小於 2。

4. 藻液初始密度和試驗時間

在批次式實驗中，若藻液初始密度過低，些微細胞數量變動會大幅影響生長率，因此數據的 EC_{50} 變異性太高，再現性很差。反之若初始密度過高，會由於藻類細胞大量增加造成代謝物累積及碳源耗盡，而影響毒性試驗結果。

試驗時間會影響物種對毒物的敏感性。時間太長，營養不足會影響藻類生長；時間太短，毒物和藻類的接觸時間不足，無法反映出實際的抑制情形。

U.S. EPA 規定月芽藻初始細胞密度為 1×10^4 cells/mL，試驗時間 96 小時。OECD 則是 $5 \times 10^3 - 10^4$ cells/mL，試驗時間 72 小時。

5. 生長基質

培養基的成份會影響藻類生長，其中氮、磷和螯合劑 (chelator) 最為重要。氮和磷為藻類生長的限制性因子 (limiting factor)。在水中只有 PO_4^{3-} -P 形態能夠直接被藻類吸收，所以標準方法皆是用正磷酸鹽，如 ISO 和 OECD 是用 KH_2PO_4 ，U.S. EPA 是 K_2HPO_4 。氮源可用 NO_3^- -N 或 NH_4^+ -N，ISO 和 OECD 使用 NH_4Cl ，U.S. EPA 則是 $NaNO_3$ 。為了使讓藻類有效利用微量元素，會在培養基中加入螯合劑。螯合劑扮演緩衝微量元素濃度的角色，除了維持離子濃度的恆定，也能避免鐵元素沉澱和減低重金屬的毒性。

2.4 水蚤急毒性試驗

2.4.1 物種介紹

本研究使用的水蚤 (*Daphnia magna*)，屬於甲殼綱 (crustacea) 之淡水浮游動物，廣泛分布於北半球。水蚤族群是由雌蚤組成，並且進行孤雌生殖，產生的子代皆為雌性。當水溫較低、族群密度高、代謝廢物累積過多和食物不足時，雌蚤會產生受精卵，也稱為卵鞍 (ephippium)，會在脫殼的時候排出，並且產生雄性子代。數量會增加。雄蚤相對於雌蚤，其體型較小、觸角大而且前腳彎曲成魚鈎狀。水蚤生命週期包含四個階段：卵 (egg)、幼年期 (juvenile)、青年期 (adolescence) 和成年期 (adult)。通常水蚤約兩天脫一次殼，意即齡期 (instar) 為兩天。幼年期約 3 至 5 個齡期。青年期非常短，只有 1 個齡期，期間第一代的卵在育兒室發育成熟，並在齡期結束前產生第一子代的小蚤。成蚤則有 6 至 22 個齡期。齡期通常隨著水蚤年紀增加，但是也會受到環境情況影響。在 25°C 時，平均壽命為 40 天。每一代約有 6 至 10 個卵進到育兒室 (food chamber)，最多 30 個左右，當小蚤在育兒室孵化並排出後，成蚤會脫殼並同時將新的卵移至育兒室。水蚤對環境變化以及化學物的敏感性高，所以常用來檢測放流水的毒性。



圖 2.4.1 水蚤之雌性成蚤(環境檢驗所, 2011a)

2.4.2 水蚤急毒性試驗方法

水蚤急毒性試驗的標準方法都是靜水式 (static test)，例如 U.S. EPA (2002)、OECD (2004)、ISO (2012a)和 ASTM (2012a)，試驗期間不換水也不餵食。使用時零 24 小時的水蚤進行實驗，暴露時間皆為 48 小時，試驗終點是 immobilization，觀察水蚤是否具有游泳的能力。其作法是輕輕晃動燒杯後，觀察水蚤於 15 秒內是否由游動情形。另外，有些文獻開發新的試驗終點，依據水蚤的生理功能變化，例如趨光游泳行為或進食效率 (Barata et al., 2008)，而且比標準方法更具敏感性。

2.5 鯉魚急毒性試驗

2.5.1 物種介紹

鯉魚學名為 *Cyprinus carpio*，俗稱 Common carp，為淡水食用魚類，分布於台灣河川中下游及池塘。魚體側扁略呈紡錘型，具鬚 2 對，魚背部黃綠色，腹部淡黃色，體長可達 120 公分，有集體群游習性，為雜食性魚類，以小型無脊椎動物與底棲動物為主。雌魚兩年達性成熟，在 3 到 8 月可開始產卵，受精卵 3 至 5 天即可孵化。



圖 2.5.1 鯉魚幼魚(環境檢驗所, 2011b)

2.5.2 鯉魚急毒性試驗方法

本研究使用環境檢驗所制定的鯉魚急毒性試驗方法，為靜水式試驗。使用體長 2 至 3 公分的鯉魚進行實驗，暴露時間 96 小時，試驗終點為鯉魚死亡情形發生。試驗期間須將死亡移除，避免影響結果。由於死亡率終點敏感性低，所以有學者以魚類的游泳能力作為試驗終點(Beggel et al., 2010)，得到較敏感的數據。

2.6 混合毒性

2.6.1 聯合效應

混合毒性理論的發展已有數十年的時間，研究者致力於開發預測化學物混毒效應的方法。最早在 1939 年，Bliss 以 Probit 模式畫出毒物的劑量反應曲線(dose-response curve)，並且依兩毒物之曲線平行與否，首先提出混合毒性作用所產生的兩種基本聯合效應(joint effect)：相似作用(similar action)和獨立作用(independent joint action)。兩個化學物混合若為相似作用，表示兩者有相同作用機制，不會影響彼此的毒性；若是獨立作用，意即兩者有不同的作用機制，但是並不會干擾彼此在生物反應位置(reaction site)的作用。

在 1952 年，Plackett and Hewlitt (1952)擴展 Bliss 的理論，根據混合毒性作用的相似性和獨立性與化學物之間交互作用的關係，提出四種聯合效應的型式(表 2.6.1)。以兩化學物影響相同生理系統與否分為相似(similar)和不相似(dissimilar)。若兩化學物為相似作用，混合後的效應來自兩者貢獻的毒性相加(additive)。以一化學物會改變另一個在其生化反應位置的作用與否，分為交互作用(interactive)和非交互作用(non-interactive)。若兩化學物有交互作用，使得混合效應大於毒性相加，則稱為協同作用(synergism)，反之，則稱為拮抗作用(antagonism)。

之後於 1985 年，Christensen and Chen (1985)延伸 Plackett 和 Hewlitt 的理論，使其可應用於探討多種化學物的非交互作用混合效應，並可使用 Probit、Logit 和 Weibull 三種劑量反應模式。

表 2.6.1 四種聯合效應型式

| | Similar | Dissimilar |
|-----------------|-----------------|-------------|
| Non-interactive | Simple similar | Independent |
| Interactive | Complex similar | Dependent |

2.6.2 混合毒性預測模式

預測非交互作用混合物毒性的兩個常用參考模式（reference model）為 Loewe 和 Muischnek 提出的濃度相加（concentration addition, CA）模式以及 Bliss 提出的獨立作用（independent action, IA）模式。CA 表示毒物機制相同，有相同的作用位置，可用數學式表示：

$$\sum_{i=1}^n \frac{c_i}{ECx_i} = 1$$

其中，n 為混合物中化學物的數量， ECx_i 表示第 i 個成分單獨存在能產生 x % 效應的濃度， c_i 是混合物中第 i 個化學物的濃度。IA 則是作用機制不同且毒性物質在生物體上之作用位置不同，以數學式表示：

$$E(c_{mix}) = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - E(c_i)]$$

其中， c_{mix} 是混合物總濃度， $E(c_{mix})$ 表示預測混合後產生的效應， $E(c_i)$ 為第 i 個成分以此濃度單獨存在時產生的效應。

許多研究者認為 CA 具有較好的預測能力，比 IA 更適合當作參考模式 (Greco et al., 1995)。Broderius (2005) 以鱒魚（fathead minnow）作為有機物混合毒性試驗物種，比較 CA 與 IA 的預測能力。結果顯示相同機制的毒性物質混合時，CA 有很好的預測效果，而不同作用機制相混時，雖然不完全符合 CA，但仍優於 IA 的預測。Backhaus (2004) 用綠藻 (*Scenedesmus vacuolatus*) 進行作用機制相同的除草劑之混合毒性試驗，發現 CA 及 IA 都有很好的預測效果。然而，Olmstead and LeBlanc (2005) 用水蚤 (*Daphnia magna*) 對機制相同的多環芳香烴的混合毒性試驗，卻發現 CA 高估混合毒性效應，反而 IA 預

測效果較佳。因此大部分的研究都會同時使用 CA 和 IA 兩個模式，來預測化學物的混合毒性效應並比較兩模式的預測能力。Cedergreen et al. (2006)選四種試驗生物評估抗真菌劑和八種殺蟲劑的混合毒性效應，並且比較 CA 及 IA 模式的預測能力。結果發現，當毒物的劑量反應曲線的斜率為 1.25 時，CA 與 IA 模式的預測能力幾乎相同；若斜率小於 1.25，IA 預測力較佳；反之，CA 則為較適當的預測模式。

Chen and Chiou (1995)以 Microtox 對非反應性及反應性有機物進行混合毒性試驗。結果發現，當兩非反應性有機物的斜率相近，意即兩劑量反應曲線平行，則混合後大多數產生相加作用。若劑量反應曲線非平行，則會產生 complex joint action 現象，也就是斜率大的毒物會大幅減弱另一個斜率較小的毒物之毒性。當混合物含有反應性有機物時，混合毒性效應多為拮抗作用，而且由於作用機制不同，導致預測效果不佳。Chen and Yeh (1996)用 Microtox 研究反應性有機物的混合毒性，並且根據作用機制將有機物分為四類：親電型毒性、前親電型毒性、具氰基型毒性和多機制型毒性。結果顯示，機制相同的有機物混合時，產生相加作用或拮抗。不同機制且兩種有機物的劑量反應曲線斜率甚小時，發生協同的機率很高。若兩種有機物斜率為一高一低時（斜率比大於 1.5），明顯產生拮抗效應。

2.6.3 抗生素之混合毒性效應

近年來，水體環境中殘留的抗生素對生態造成的影響已受到重視，許多文獻研究這類藥物對水體生物的急慢性毒性。然而，環境中同時存在多種抗生素，混合後可能產生更強的毒性效應，因此評估風險時不可忽視混合毒性。

目前探討抗生素混合對水體生物影響之研究極少，而且大部分是以作用機制相同的藥物相混。Backhaus et al. (2000)將十種喹諾酮（quinolone）類藥物混合，對海洋螢光菌（*V. fischeri*）進行 24 小時試驗，結果顯示符合 CA 模式預測。另外，作者也發現以 NOEC 濃度混合下仍會嚴重抑制螢光菌生長。Zou et al. (2012)使用另一種海洋螢光菌（*P. phosphoreum*），並將七種磺胺（sulfonamide）類抗生素分別和增效劑 TMP（trimethoprim）

混合，發現急毒試驗結果都是拮抗作用，而慢毒試驗卻產生協同作用。作者利用定量活性關係 (QSAR) 和分子對接 (molecule docking) 方法證明這是由於磺胺類抗生素在急毒和慢毒混合時，和不同的受體蛋白質 (receptor protein) 結合所致，因為暴露時間長短的作用機制不同，所以產生不同混毒效應。De Liguoro et al. (2009; 2010) 用水蚤 (*D. magna*) 探討磺胺類抗生素兩兩混合之毒性效應，透過 isobologram 可發現皆為拮抗作用。Christensen et al. (2006) 研究養殖漁業使用的五種抗生素之混合毒性，其中三種藥物的機制為抑制蛋白質合成，其餘兩種為抑制 DNA 複製，並且以月芽藻和活性污泥微生物進行試驗。從 isobologram 可知大多數不符合 CA 或 IA 模式的預測，而且月芽藻的混毒能產生協同、相加和拮抗三種不同的作用，無法歸納出機制和混毒效應的相關性，因此認為生物利用度 (bioavailability) 可能是影響的因素。另外，活性污泥微生物的混毒則皆是協同作用。Hagenbuch et al. (2012) 選擇三種廣泛使用的抗生素，對兩種海洋矽藻 *C. closteriumc* 和 *N. ramosissima* 進行混毒試驗。結果發現對 *C. closteriumc* 皆為協同，而對 *N. ramosissima* 則是相加作用，但是並沒有探討作用機制的影響。Yang et al. (2008) 選十二種抗生素，試驗物種為月芽藻。抗生素依照同類別、不同類別和常用的藥物分成三組，將同組的藥物兩兩混合，並使用總毒性單位判斷混毒效應。同類別和常用抗生素的混合毒性幾乎都是協同作用，只有磺胺類相混產生相加作用，而不同類別混合，多數為相加，拮抗和協同則占少部分。若以作用機制相同與否分類，相同機制抗生素大部分產生協同，僅兩組為相加作用。不同機制混合，則是出現三種效應，其中大部分為相加作用。另外，十二種抗生素以同濃度混合，其毒性單位接近 20，為強烈拮抗作用。

第三章 基本理論

3.1 劑量反應模式

當毒性物質和生物發生作用時，產生的毒性效應和化學物的濃度會呈現 S 型曲線，稱之為劑量反應曲線 (dose-response curve)。在毒性試驗中，使 50 % 的生物產生抑制情況的毒物濃度，稱為半數效應濃度 EC_{50} (median effect concentration)；若抑制現象為死亡，則稱為半數致死濃度 LC_{50} (median lethal concentration)。由於直接從原始數據求得 EC_{50} 非常困難，因此必須藉由劑量反應模式，將曲線轉換成線性。Probit、Logit 和 Weibull 是三種常見的模式。

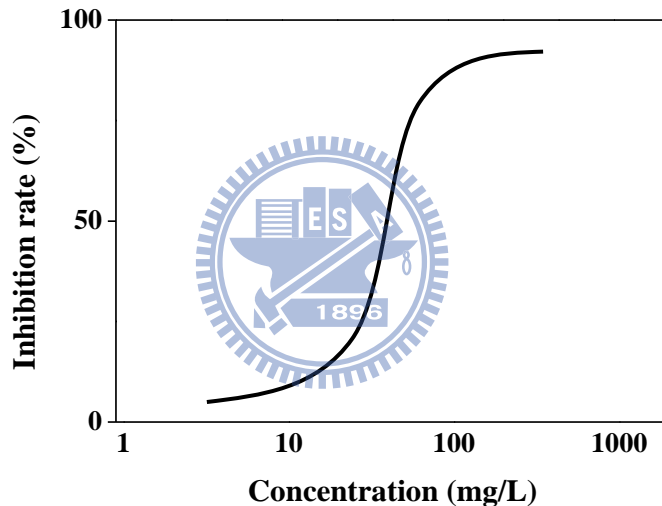


圖 3.1.1 劑量反應曲線

1. Probit 模式：

由 Gaddum(1933)和 Bliss(1934a, b)建立。假設生物的死亡率和毒性物質的濃度為對數常態分布。轉換方式為先將抑制率轉變為常態對等離差 (normal equivalent deviation, NED)，NED 加上 5 為 Probit 單位，再由 Probit 和取 log 的濃度形成之線性關係，可算出半致死濃度。轉換公式如下：

$$P = 0.5 \left[1 + \operatorname{erf} \left(\frac{Y - 5}{\sqrt{2}} \right) \right]$$

$$Y = a + b \log(z)$$

P 代表抑制率，erf 為 error function，Y 是 Probit 單位，z 是化學物的濃度。

2. Logit 模式：

最早用於描述人口的成長曲線，也用來計算自催化的反應速率。之後，Berkson (1944) 認為羅吉斯函數 (logistic function) 計算簡單而且有理論基礎，因此提出將此函數應用在劑量反應曲線的轉換上。

3. Weibull 模式：

在生物醫學上，此模式用來預測動物體內的腫瘤發生時間。Christensen (1984) 使用 Weibull、Probit 和 Logit 三種模式分析藻類毒性試驗數據，發現 Weibull 模式同樣能符合劑量反應曲線，然而計算出的 EC_{10} 和 EC_{90} 通常偏低。

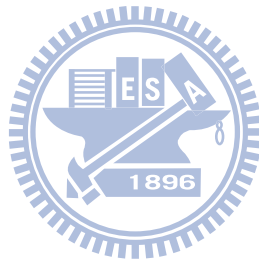


表 3.1.1 Probit、Logit 和 Weibull 模式轉換

| Type | Probit | Logit | Weibull |
|---------------------------|--|--|---------------------------------------|
| Transformation* | $Y = \alpha + \beta \log(z)$ | $l = \theta + \phi \ln(z)$ | $u = \ln(k) + \eta \ln(z)$ |
| Probability density | $\frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{t^2}{2}\right)$ | $\frac{\frac{1}{4}}{\cosh^2\left(\frac{t}{2}\right)}$ | $\exp(t - e^t)$ |
| Probability of response P | $\int_{-\infty}^{Y-5} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{t^2}{2}\right) dt = \frac{1}{2} \left[1 + \operatorname{erf}\left(\frac{Y-5}{\sqrt{2}}\right) \right]$ | $\frac{1}{1 - e^{-\theta} z^{-\phi}} = \frac{1}{1 + e^{-t}}$ | $1 - \exp(-kz^\eta) = 1 - \exp(-e^u)$ |
| Transformation vs P | $Y = 5 + \sqrt{2} \operatorname{erf}^{-1}(2P - 1)$ | $l = \ln\left(\frac{P}{1-P}\right)$ | $u = \ln(-\ln(1-P))$ |

* z 為毒物濃度。α、β、θ、φ、k 和 η 是常數。

3.2 混合毒性理論

3.2.1 混毒效應判別方式

常用於分析和闡述混毒效應的方法分為兩類：指標 (index) 和圖解法 (graphical method)。

1. 指標

(1) 毒性單位 (toxic unit, TU) (J. B. Sprague, 1965)

$$M = \sum TU_i = \frac{z_1}{EC_{50,1}} + \frac{z_2}{EC_{50,2}} + \dots$$

M 代表毒性單位總和， z_i 是毒性物質的濃度。當 $M < 1$ 為協同作用， $M > 1$ 為拮抗作用， $M = 1$ 為相加作用。

(2) 相加指標 (additive index, AI)

Marking (1977) 為了將參考點定為零，並且使指標和混毒效應呈線性關係，將毒性單位修正：當 $M \leq 1$ ，則 $AI = 1/M - 1$ ；當 $M > 1$ ，則 $AI = 1 - M$ 。若 $AI > 0$ ，為協同作用， $AI < 0$ ，為拮抗作用， $AI = 0$ ，為相加作用。

(3) 混合毒性指標 (mixture toxicity index, MTI)

Könemann (1981) 認為不論混合物中的化合物數量或是混合比例，濃度相加 (concentration addition) 和沒有相加 (no addition) 這兩個參考點必須為定值。而且，因為半致死濃度是由對數常態分佈轉換而求得，所以毒性單位要以對數形式表示。故定義：

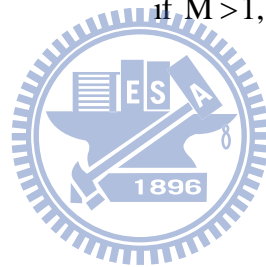
$$MTI = \frac{\log M_0 - \log M}{\log M_0}$$

其中， $M_0 = \frac{M}{\max(TU_i)}$ 。 $\max(TU_i)$ 為混合物中最大的毒性單位。當 $MTI < 1$ ，為

協同作用， $MTI > 0$ ，為拮抗作用， $MTI = 1$ ，為相加作用。

表 3.2.1 聯合效應指標(Altenburger et al., 2003)

| Type of index and type of interaction | Joint effect index | | |
|---------------------------------------|---|--|--|
| | Toxic unit (TU) | Additive index (AI) | Mixture toxicity index (MTI) |
| Mathematical definition | $TU_i = \frac{z_i}{EC50_i}$ <p>where z_i = concentration of component i, $EC50_i$ = EC50 of component i</p> $M = \sum TU_i$ | <p>If $M \leq 1$, then $AI = \frac{1}{M} - 1$; if $M > 1$, then $AI = 1 - M$</p> | $MTI = \frac{\log M_0 - \log M}{\log M_0}$ <p>where $M_0 = \frac{M}{\max(TU_i)}$</p> |
| Additive | $M = 1$ | $AI = 0$ | $MTI = 1$ |
| Synergism | $M < 1$ | $AI > 0$ | $MTI < 1$ |
| Antagonism | $M > 1$ | $AI < 0$ | $MTI > 1$ |
| No addition | $M = M_0$ | - | $MTI = 0$ |



2. 圖解法

最常用的方法是繪製 isobologram，如圖 3.3.1。isobologram 是以 CA 為參考模式，即圖中的直線，表示兩化學物的毒性單位相加恆為 1，為相加作用。向外彎曲的曲線 (isobole) 表示拮抗作用，向原點彎曲則是協同作用。因此，將不同混合比例之實驗數據點描繪在圖上，透過和 CA 模式預測線比較，可判斷混合毒性效應。若實驗數據點落在 NA 預測線內，表示兩毒物混合屬於非交互作用 (non-interactive)，可以用本研究的非交互作用模式 Multox 預測。若落在範圍外，則表示毒物發生交互作用，產生強烈的拮抗效應，Chen 和 Chiou (1995) 稱此為 complex joint action，此時無法用模式去預測。

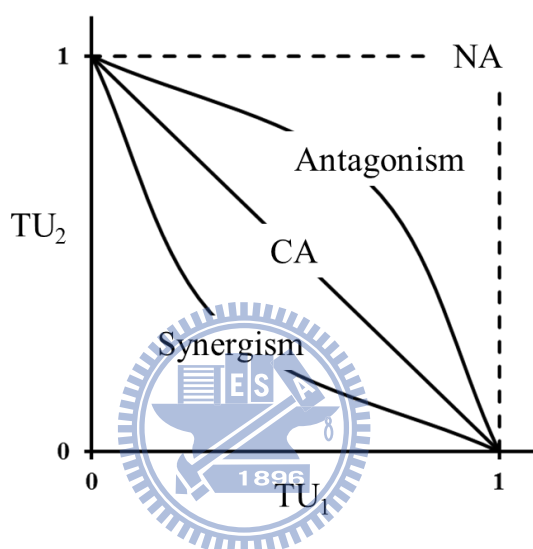


圖 3.2.1 isobologram 示意圖

3.2.2 非交互作用混合毒性模式

Hewlett 和 Plackett 於 1959 年提出二維非交互作用混合毒性模式，假設生物和毒物接觸後產生全或無反應 (quantal response or all-or-non response)，以下列數學式表示：

$$Q = \Pr\left(\delta_1^{\frac{1}{\lambda}} + \delta_2^{\frac{1}{\lambda}} \leq 1\right), \quad 0 < \lambda < 1$$

Q 表示不反應率 (non-response fraction)，即存活率。Pr 為機率分布函數，可為常態分布或其他機率分佈。 λ 為相似係數 (similarity coefficient)。 $\delta_i = z_i / \bar{Z}_i$ ， z_i 為毒性物質的濃度， \bar{Z}_i 為毒物單獨作用產生抑制的濃度。

Christensen 和 Chen 於 1985 年擴充此理論，發展出可選用 Probit、Logit 或 Weibull 三種劑量反應模式來分析，並且能多種毒物混合的預測混合毒性之應用程式 Multox。

3.2.3 混合毒性效應參數 ρ 和 λ 值

Christensen 和 Chen 開發的 Multox 考慮相關係數 (correlation coefficient, ρ) 和相似係數 (similarity coefficient, λ) 兩參數來預測混合毒性效應。

1. 相關係數：

由 Hewlett 和 Plackett 於 1959 年提出。假設兩毒性物質的機率分佈函數為二維常態分佈 (bivariate normal distribution)，以毒性容忍度的相關係數 ρ ，代表單一生物對兩毒性物質之毒性容忍濃度的相關性，意即 $EC_{50,1}$ 和 $EC_{50,2}$ 的相關性。 ρ 值範圍為 $-1 \leq \rho \leq 1$ ， $\rho = 1$ 表示兩毒性物質容忍分布為完全正相關， $\rho = -1$ 為完全負相關， $\rho = 0$ 則為無相關性，如圖 3.3.2 所示。

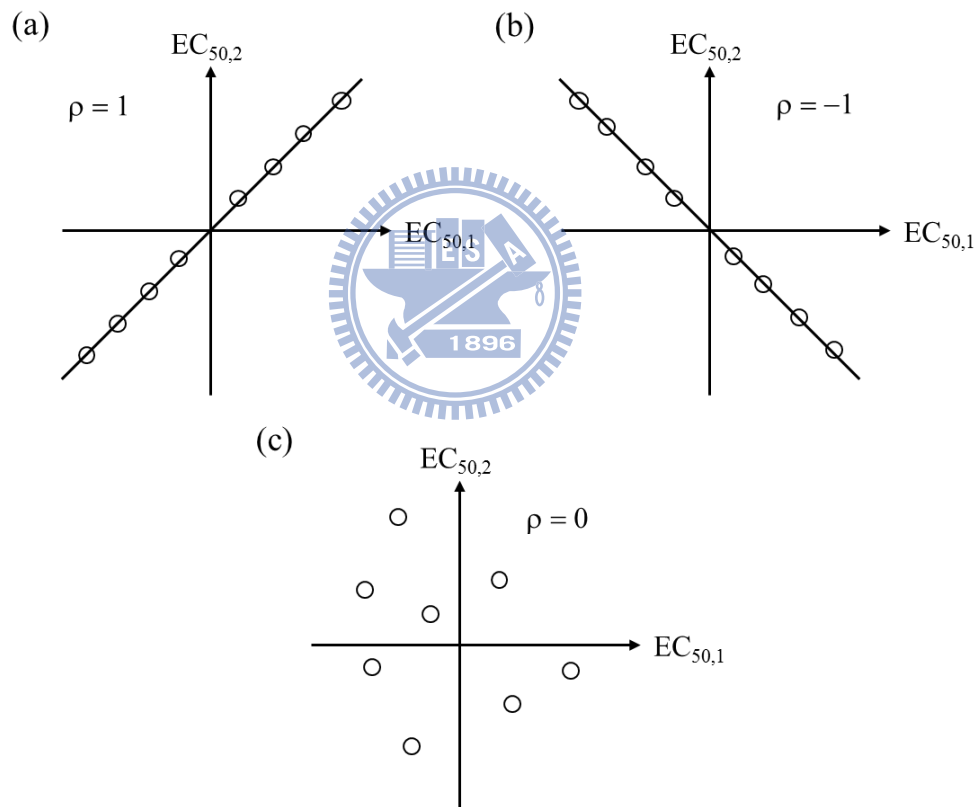


圖 3.2.2 兩化學物毒性容忍度之相關係數之示意圖。(a) 完全正相關， $\rho = 1$ (b) 完全負相關， $\rho = -1$ (c) 無相關性， $\rho = 0$

2. 相似係數：

描述兩毒性物質作用在生物體的位置或生化系統的相似程度，範圍為 $0 \leq \lambda \leq 1$ ，當 λ 愈接近 1，表示毒性物質的作用位置愈相近，當 $\lambda = 1$ 時，代表兩種毒性物質作用在同

一個生物系統，即相似作用。當 $\lambda=0$ 時，則表示作用位置不同，為獨立作用。在混合效應判別方面，當 λ 介於 0 和 1 之間，為拮抗作用， λ 等於 1 為毒性相加作用。

同時考慮 ρ 與 λ ，可得到四種混合毒性效應模式，如表 3.3.2 所示。

1. 當兩毒物容忍度無相關性 ($\rho=0$)，作用位置不同 ($\lambda=0$)，混毒效應稱為 response multiplication。

$$\begin{aligned} Q_1 &= P_1\left(\frac{z_1}{Z_1}\right); Q_2 = P_2\left(\frac{z_2}{Z_2}\right) \\ \therefore \rho(z_1, z_2) &= 0; \lambda(P_1, P_2) = 0 \\ \therefore Q_{12} &= Q_1 \times Q_2 \end{aligned}$$

2. 當兩毒物容忍度完全正相關 ($\rho=1$)，作用位置不同 ($\lambda=0$)，混毒效應稱為 no addition。

$$\begin{aligned} Q_1 &= P_1\left(\frac{z_1}{Z_1}\right); Q_2 = P_2\left(\frac{z_2}{Z_2}\right) \\ \therefore \rho(z_1, z_2) &= 1; \lambda(P_1, P_2) = 0 \\ \therefore Q_{12} &= \text{Min}(Q_1, Q_2) \end{aligned}$$

3. 當兩毒物容忍度完全正相關 ($\rho=1$)，作用位置相同 ($\lambda=1$)，混毒效應稱為 concentration addition。

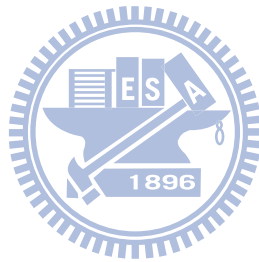
$$\begin{aligned} Q_1 &= P_1\left(\frac{z_1}{Z_1}\right); Q_2 = P_2\left(\frac{z_2}{Z_2}\right) \\ \therefore P_1 = P_2 &= P[\rho(z_1, z_2) = 1; \lambda(P_1, P_2) = 1] \\ \therefore Q_{12} &= P\left(\frac{z_1}{Z_1} + \frac{z_2}{Z_2}\right) \end{aligned}$$

4. 當兩毒物容忍度完全負相關 ($\rho=-1$)，作用位置不同 ($\lambda=0$)，混毒效應稱為 response addition。

$$\begin{aligned} Q_1 &= P_1\left(\frac{z_1}{Z_1}\right); Q_2 = P_2\left(\frac{z_2}{Z_2}\right) \\ \therefore \rho(z_1, z_2) &= -1; \lambda(P_1, P_2) = 0 \\ \therefore Q_{12} &= 1 - (1 - Q_1) - (1 - Q_2) \end{aligned}$$

表 3.2.2 四種混合毒性效應模式

| Parameter values | | Type of action | Abbreviation | Response |
|------------------|-----------|-------------------------|--------------|--------------------------|
| ρ | λ | | | |
| 0 | 0 | Response multiplication | RM | $1 - (1 - P_1)(1 - P_2)$ |
| 1 | 0 | No addition | NA | $\max(P_1, P_2)$ |
| 1 | 1 | Concentration addition | CA | - |
| -1 | 0 | Response addition | RA | $\min(1, P_1 + P_2)$ |



第四章 實驗材料與方法

4.1 實驗藥品與儀器

4.1.1 實驗藥品

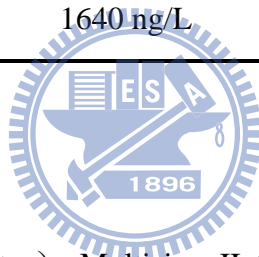
1. 氯化鈉 (Sodium chloride), 99.8 %, Sigma-Aldrich
2. 碳酸氫鈉 (Sodium bicarbonate), 100.3 %, J.T.Baker
3. 硫酸鎂 (Magnesium Sulfate), 100.2 %, J.T.Baker
4. 氯化鉀 (Potassium chloride), 99.5 %, Sigma-Aldrich
5. 硫酸鈣 (Calcium sulfate), 99.5 %, J.T.Baker
6. 氫氧化鈉 (Sodium hydroxide), 99 %, Sigma-Aldrich
7. 硝酸鈉 (Sodium nitrate), 99 %, Sigma-Aldrich
8. 磷酸氫二鉀 (Dipotassium phosphate), 100 %, J.T.Baker
9. 氯化鎂 (Magnesium chloride), 100 %, J.T.Baker
10. 氯化鈣 (Calcium chloride), 94 %, Merck
11. 硼酸 (Boric acid), 100 %, Riedel-deHaen
12. 氯化錳 (Manganese chloride), 100 %, Riedel-deHaen
13. 氯化鋅 (Zinc chloride), Fluka
14. 氯化鈷 (Cobaltous chloride), Alfa Aesar
15. 氯化銅 (Copper chloride), 100 %, J.T.Baker
16. 鉬酸鈉 (Sodium molybdate), 100 %, Riedel-deHaen
17. 氯化鐵 (Ferric Chloride), 100 %, Riedel-deHaen
18. 乙二胺四乙酸二鈉 (Disodium ethylenediaminetetraacetate), 100 %, J.T.Baker
19. 鹽酸林絲菌素 (Lincomycin hydrochloride), 95 %, Fluka
20. 磺胺甲噁唑 (Sulfamethoxazole), Sigma-Aldrich
21. 氟滅菌 (Flumequine), Fluka

本研究中使用的抗生素作用機制分別為：lincomycin 和細菌核糖體的 50S 次單元結合，阻止肽鏈形成；sulfamethoxazole 和對氨基安息香酸競爭二氫葉酸還原的結合位置，抑制二氫葉酸合成；flumequine 抑制 DNA 旋轉酶，干擾細菌 DNA 複製和轉錄。

表 4.1.1 三種抗生素的物化性質、代謝率、半生期和河川檢測最高濃度

| | Lincomycin | Sulfamethoxazole | Flumequine |
|--------------------------------|------------|---------------------------|-----------------|
| Therapeutic class | Macrolide | Sulfonamide | Fluoroquinolone |
| CAS | 859-18-7 | 723-46-6 | 42835-25-6 |
| Molecule weight (g/mol) | 443.0 | 253.3 | 261.25 |
| Solubility (mg/L) | 927 | 510 | 71 |
| logKow | 0.56 | 0.89 | 1.6 |
| pKa | 7.6 | 5.7 | 6.4 |
| % excretion as parent compound | 50 | 15 | - |
| Half-life in environment | - | No degradation after 40 d | - |
| Occurrence in surface water | 1640 ng/L | 650 ng/L | 198 ng/L |

- : no data



4.1.2 儀器

1. 庫爾特計數器 (Coulter counter), Multisizer II (Coulter Electronics, USA)
2. 溶氧測定儀 (Dissolved oxygen meter), Model 5100 (YSI, USA)
3. 酸鹼測定計 (pH meter), SP-2200 (Suntex instrument, Taiwan)
4. 總有機碳分析儀 (TOC analyzer), Aurora Model 1030W (O. I. Analytical, USA)

4.2 藻類培養

4.2.1 生長基質

製備方法參考 U.S EPA。使用 0.45 μm 濾膜過濾去離子水配置下列七個 500 mL 的 stock solution :

1. 12.750 g NaNO_3
2. 6.082 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
3. 2.205 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
4. 微營養鹽 (micronutrient) 包含下列藥品：

- (1) 92.760 mg H_3BO_3
 - (2) 0.714 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
 - (3) 207.690 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
 - (4) 3.630 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - (5) 1.635 mg ZnCl_2
 - (6) 0.006 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - (7) 79.880 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
 - (8) 150 mg $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
5. 7.35 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 6. 0.522 g K_2HPO_4
 7. 7.5 g NaHCO_3

從 stock solution 各取 1 ml 到約 900 ml 已過濾的去離子水中，再稀釋至 1 L。接著用 0.1 N 的 NaOH 或 HCl 將 pH 調至 7.5 ± 0.1 。另外配置不含 EDTA 的微營養鹽做為毒性試驗時使用。裝生長基質的血清瓶使用前先經過高壓滅菌釜滅菌，之後用鋁箔紙包覆避免照光，放在 4°C 冰箱中保存。所有營養鹽一個月更換一次，防止變質對培養造成影響。

表 4.2.1 月芽藻生長所需之微量營養鹽成份

| 化合物 | 濃度 (µg/L) | 元素 | 各元素濃度 (µg/L) |
|---------------------------------------|-----------|----|--------------|
| NaNO ₃ | 25.5 | N | 4.2 |
| NaHCO ₃ | 15.0 | C | 2.14 |
| | | Na | 11.0 |
| K ₂ HPO ₄ | 1.04 | P | 0.186 |
| | | K | 0.649 |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 14.7 | S | 1.91 |
| MgCl ₂ | 5.7 | Mg | 2.9 |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O | 4.41 | Ca | 1.20 |

表 4.2.2 月芽藻生長所需之微量營養鹽成份

| 化合物 | 濃度 (µg/L) | 元素 | 各元素濃度 (µg/L) |
|--|-----------|----|--------------|
| H ₃ BO ₃ | 186 | B | 32.5 |
| MnCl ₂ | 264 | Mn | 115 |
| ZnCl ₂ | 3.27 | Zn | 1.57 |
| CoCl ₂ | 0.780 | Co | 0.354 |
| CuCl ₂ | 0.009 | Cu | 0.04 |
| Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O | 7.26 | Mo | 2.88 |
| FeCl ₃ | 96.0 | Fe | 30.0 |
| Na ₂ EDTA · 2H ₂ O | 300 | | |

4.2.2 連續式藻類培養

本研究使用的藻種為月芽藻，購買自德州大學 The Culture Collection of Algae (UTEX 1648)。將藻種取至 250 mL 的錐形瓶中，並加入 100 mL 含 EDTA 生長基質後，放在轉速 100 rpm 的迴轉式震盪器上，開始培養。當藻類生長達到對數期時，取 2 mL 藻液至裝有 100 mL 生長基質的錐形瓶中，繼續培養。重複幾次上述批次方式的培養後，可將藻液移至 4 L 的培養槽中，進行連續式培養。以磁石攪拌，避免藻細胞聚集。用蠕動幫浦控制營養鹽的入流率，即控制稀釋率 (dilution rate, D)：

$$D = \frac{F}{V}$$

F 代表入流率，V 為培養槽的體積。藉由入流率的調控，讓藻類生長維持在對數期和穩定期。空氣會先經過潤濕並通過 0.45 μm 濾膜去除雜質才通入培養槽。待系統達到平衡後，即可進行毒性試驗。連續式培養能讓新鮮營養鹽不斷流入、代謝廢物不斷排出，使藻類生長環境長時間維持穩定。另外，連續式培養的藻類比起批次式培養，在毒性試驗結有較佳的敏感性和再現性(Chen and Lin, 1997)。

培養控制條件如下：

- (1) 溫度： $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 。
- (2) 照度： $4300 \pm 10\%$ lux，冷白光。
- (3) 曝氣：400 mL/day。
- (4) 溢流率： $1300 \pm 10\%$ mL/day (稀釋率為 0.3 /day)。



每日量測培養槽中藻細胞的細胞密度 (cell density)、平均細胞體積 (mean cell volume, MCV) 和溢流率，來判斷是否已經達到穩定狀態 (steady state)。當上述參數值連續三天皆在一定範圍內，即認為系統達到穩定狀態，可以進行實驗。

4.3 密閉式藻類毒性試驗

實驗的稀釋水 (dilution water) 使用不含 EDTA 的生長基質。因為密閉式試驗是以 BOD 瓶作為實驗容器，不會和外界空氣接觸，所以為了避免碳源不足影響藻類生長，使用含 0.5 % 二氧化碳的氮氣將稀釋水曝氣。由於二氧化碳溶於水時會降低 pH，因此曝氣前會先加入些許 0.1 N 的氫氧化鈉，使曝氣後之 pH 在 7.5 ± 0.1 的範圍內。

從培養母槽中取出適量之藻液，分別加入 BOD 瓶中使藻類初始細胞密度為 1.5×10^4 cells/ml。之後加入曝氣過的稀釋水至八分滿，再加入試驗藥品，最後補滿稀釋水至磨砂

口一半，加蓋完成水封，放在轉速 100 rpm 的迴轉式震盪器上。每次實驗一組八瓶，包含一個控制組和七個實驗組，每組做三次重複，共 24 個 BOD 瓶。48 小時後測量各瓶的溶氧量和細胞密度，並根據試驗前後溶氧變化量 (ΔDO)、產量和比生長率三個試驗終點去計算抑制率。公式如下：

(1) 以溶氧變化量計算抑制率：

$$\text{Inhibition rate} = \frac{\Delta DO_C - \Delta DO_T}{\Delta DO_C} \times 100\%$$

ΔDO_C 和 ΔDO_T 分別為控制組和實驗組的產氧量之平均值。

(2) 產量的計算為生物質量在暴露時間內的改變量，其抑制率算法如下：

$$\text{Inhibition rate} = \frac{Y_C - Y_T}{Y_C} \times 100\%$$

Y_C 和 Y_T 分別為控制組和實驗組的產量之平均值。

(3) 平均比生長率的計算公式如下：

$$\mu = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} (\text{day}^{-1})$$

$\mu_{i,j}$ 為第 i 天到第 j 天的平均比生長率。 X_i 和 X_j 分別為第 i 天和第 j 天的生物質量。

以平均比生長率計算抑制率：

$$\text{Inhibition rate} = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100\%$$

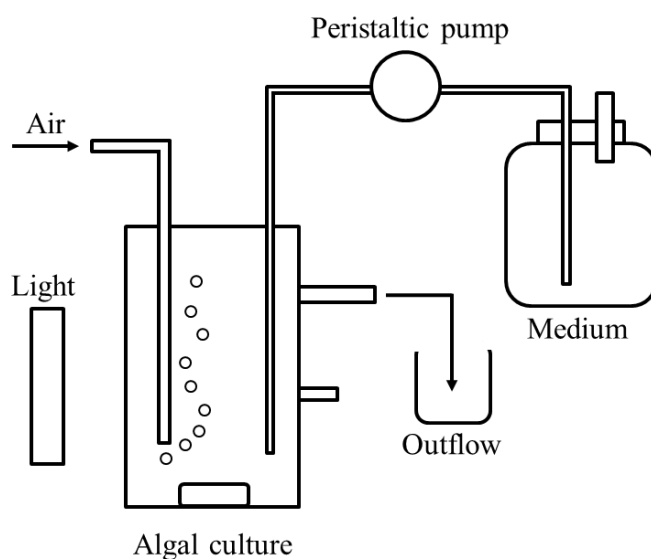


圖 4.3.1 連續式藻類培養系統簡圖

4.4 水蚤急毒性試驗

本研究使用的水蚤品種為 *Daphnia magna*。馴養與試驗方法是依照環境檢驗所公告的水蚤靜水式法。以高硬度稀釋水（硬度約為 168 mg CaCO₃/L）為馴養水，溫度控制在 25 ± 2°C，光照時間 16 ± 1 小時。每天餵食飼料和月芽藻液。水蚤飼料的配製是將魚飼料、乾酵母粉和葉草粉，以稀釋水溶解並均質攪拌，靜置 1 小時後取其上清液。月芽藻液的製備方式為，將培養的月芽藻離心去除培養基質，再用稀釋水回溶，調整濃度為 3 × 10⁷ cells/mL。

以時齡 24 小時內的水蚤進行毒性試驗。其做法為在實驗 24 小時前，將母蚤自馴養容器移至裝有稀釋水的燒杯中，24 小時內生出的水蚤即可用於實驗。在試驗 2 小時前，需先餵食，而試驗期間不餵食也不換水，溫度和光照時間與培養的條件相同。試驗容器為裝有 25 mL 試驗溶液之 50 mL 小燒杯，每個燒杯放入 5 隻水蚤。暴露時間為 48 小時。毒性試驗之控制組死亡率若超過 10%，則該次實驗數據不得採用。

若不確定毒物的 EC₅₀ 落在哪個濃度範圍內，則需要先進行範圍尋找試驗（range-finding test），用較高的倍率，例如 5 或 10 倍，做毒物濃度的序列稀釋。每個濃度水蚤總數為 5 隻，意即只做 1 重複的試驗。找到 EC₅₀ 的區間後，即可進行確定試驗（definitive test）。使用不超過 2 倍的濃度稀釋序列，並且每個濃度做 4 重複，共 20 隻水蚤。試驗終點是水蚤失去游泳的能力（immobilization），判定方法為輕輕晃動燒杯後，水蚤於 15 秒內沒有游動。EC₅₀ 的計算是使用 Probit 模式。

4.5 鯉魚急毒性試驗

本研究是依照環境檢驗所制定的鯉魚靜水式法。鯉魚（*Cyprinus carpio*）購買自彰化某魚場。馴養水為中硬度稀釋水（硬度為 80-100mg CaCO₃/L），溫度控制在 25 ± 2°C，光照時間 16 ± 1 小時。馴養時間為 7 天，若死亡率低於 10% 始可進行試驗。

以全長（上顎前端至尾鰭後端的長度）2.0 至 3.0 公分之鯉魚幼魚進行試驗。實驗前 24 小時不餵食，而試驗期間不餵食也不換水，溫度和光照時間與培養的條件相同。試驗容器為裝有 1.5 L 試驗溶液之 2 L 燒杯。暴露時間為 96 小時，期間須將死亡的鯉魚移出。毒性試驗之控制組死亡率若超過 10%，則該次實驗數據不得採用。

若不確定毒物的 LC₅₀ 落在哪個濃度範圍內，同樣需要先進行範圍尋找試驗（range-finding test），用較高的倍率，例如 5 或 10 倍，做毒物濃度的序列稀釋。每一個濃度的鯉魚總數為 5 隻，每個燒杯各放 5 隻。找到 EC₅₀ 的區間後，即可進行確定試驗

(definitive test)。使用不超過 2 倍的濃度稀釋序列，而且每個濃度共 20 隻鯉魚，每個燒杯裝 10 隻，做 2 重複的試驗。試驗終點為鯉魚死亡，死亡判定須符合兩條件：鰭及鰓的活動停止以及魚體輕輕觸沒反應。LC₅₀ 的計算是使用 Probit 模式。

4.6 混合毒性試驗

本研究對三個抗生素進行二元混合 (binary mixture) 和三元混合 (tertiary mixture) 毒性試驗。二元混合比例是依據月芽藻的生長率之 EC₅₀，計算抗生素的毒性單位比，公式如下：

$$TU_1 : TU_2 = \frac{z_1}{EC_{50,1}} : \frac{z_2}{EC_{50,2}}$$

其中，z₁ 和 z₂ 為抗生素之濃度。使用毒性單位判斷混合毒性效應時，是用等毒性去計算，意即毒性單位比 1:1，並且和 Multox 預測的混合效應做比較。繪製 isobologram 時則是用毒性單位 3:1、1:1 和 1:3 三個實驗數據描點，再加上 Multox 四個預測模式的預測線。三元混合比例是依照檢測出的環境最高濃度混合，試驗生物為月芽藻、水蚤和鯉魚。以變異數分析 (ANOVA) 和杜納法 (Dunnett's test) 比較控制組和實驗組是否有顯著差異。若有差異表示在此試驗濃度，會明顯對生物造成影響。



第五章 結果與討論

5.1 單一抗生素之毒性試驗

5.1.1 月芽藻毒性試驗

本研究使用密閉式藻類毒性試驗，對三個作用機制不相同的抗生素進行實驗。表 5.1.1 至表 5.1.3 分別為三種試驗終點的結果。圖 5.1.1 至圖 5.1.3 為劑量反應曲線。三個試驗終點以生長率 (growth rate) 的敏感度最低，溶氧變化量 (ΔDO) 和產量 (yield) 得到的 EC_{50} 相近，唯一例外的是 sulfamethoxazole， ΔDO 的敏感性較產量差，可能原因為此藥物不會抑制藻類的光合作用。以三種試驗終點比較抗生素對藻類的毒性強弱，可知依據 ΔDO 和生長率的毒性大小為 lincomycin > flumequine > sulfamethoxazole；以產量得到的趨勢則是 lincomycin > sulfamethoxazole > flumequine。

從表 5.2.4，可以發現部分研究 EC_{50} 和本實驗結果相近，例如 sulfamethoxazole 1.53 mg/L 和 flumequine 2.6 mg/L。然而也有文獻得到極低的 EC_{50} ，例如 lincomycin 0.07 mg/L 和 sulfamethoxazole 0.146 mg/L，相差十倍以上，原因應是試驗條件不同所致，例如照度或生長培養基。

表 5.1.1 月芽藻單一抗生素之毒性試驗結果 (試驗終點為 ΔDO)

| Antibiotic | EC_{50} (mg/L) | 95% CI | A | B |
|------------------|------------------|-------------|-------|-------|
| Lincomycin | 0.656 | 0.612-0.699 | 5.374 | 1.657 |
| Sulfamethoxazole | 5.535 | 4.218-7.937 | 4.242 | 1.015 |
| Flumequine | 2.319 | 1.079-3.560 | 4.251 | 2.103 |

95% CI : 95% confidence interval。A、B 分別為 Probit 模式之截距和斜率。

表 5.1.2 月芽藻單一抗生素之毒性試驗結果 (試驗終點為 yield)

| Antibiotic | EC_{50} (mg/L) | 95% CI | A | B |
|------------------|------------------|-------------|-------|-------|
| Lincomycin | 0.902 | 0.712-1.091 | 5.085 | 1.917 |
| Sulfamethoxazole | 1.423 | 0.663-2.182 | 4.786 | 1.341 |
| Flumequine | 2.041 | 1.799-2.284 | 4.091 | 2.936 |

95% CI : 95% confidence interval。A、B 分別為 Probit 模式之截距和斜率。

表 5.1.3 月芽藻單一抗生素之毒性試驗結果 (試驗終點為 growth rate)

| Antibiotic | EC ₅₀ (mg/L) | 95% CI | A | B |
|------------------|-------------------------|-------------|-------|-------|
| Lincomycin | 2.669 | 2.301-3.036 | 4.375 | 1.458 |
| Sulfamethoxazole | 6.493 | 5.521-7.464 | 4.176 | 0.913 |
| Flumequine | 3.215 | 1.760-4.670 | 4.193 | 1.469 |

95% CI : 95% confidence interval。A、B 分別為 Probit 模式之截距和斜率。

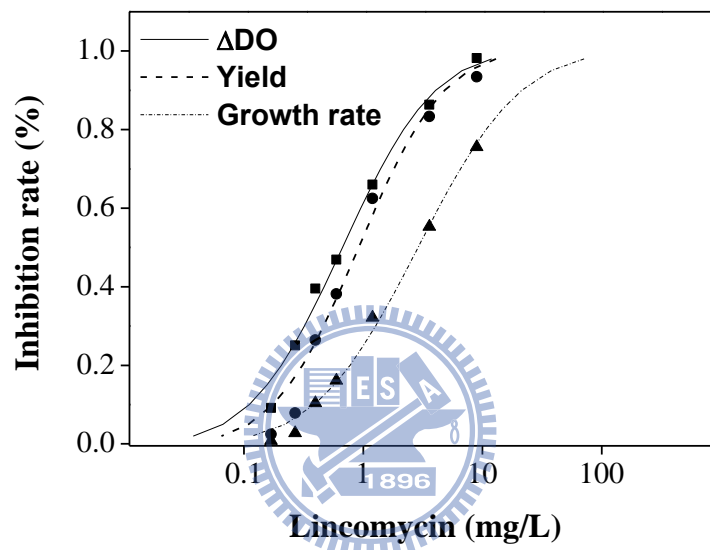


圖 5.1.1 lincomycin 之劑量反應曲線。(■) Δ DO，(●) yield，(▲) growth rate

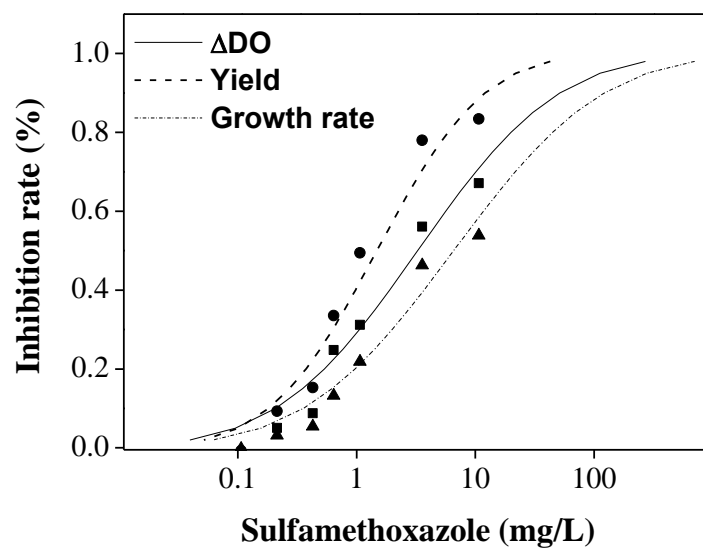


圖 5.1.2 sulfamethoxazole 之劑量反應曲線。(■) Δ DO，(●) yield，(▲) growth rate

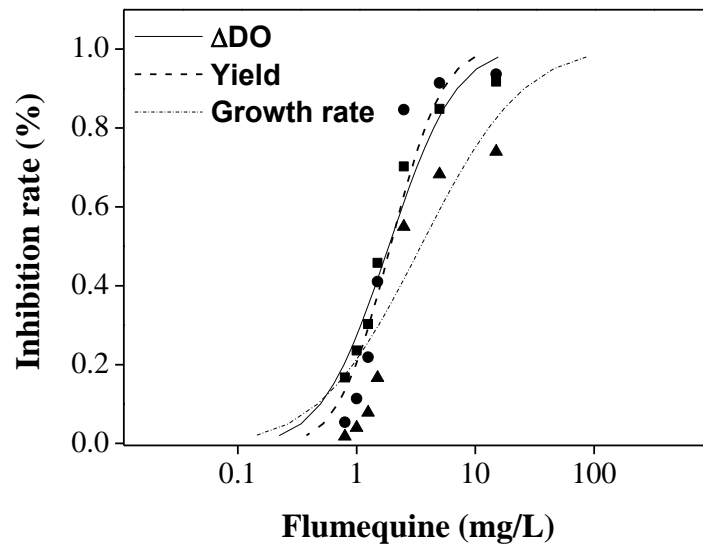


圖 5.1.3 flumequine 之劑量反應曲線。(■) Δ DO，(●) yield，(▲) growth rate

5.1.2 水蚤急毒性試驗

水蚤試驗結果如表 5.1.4 所示。圖 5.1.4 和 5.1.5 分別為 sulfamethoxazole 和 flumequine 的劑量反應曲線。三個抗生素對水蚤的毒性強弱為 sulfamethoxazole > flumequine > lincomycin。其中，lincomycin 對月芽藻的毒性最高，但是在水蚤毒性試驗，lincomycin 濃度達 116 mg/L 仍無抑制水蚤的情形發生。參考部分文獻的結果（表 5.2.4），可知，在更高的暴露濃度下，lincomycin 對水蚤仍不具毒性。然而，Isidori et al.(2005)使用 ISO 標準方法，於黑暗中進行 24 小時的毒性試驗可得到極高的敏感性， EC_{50} 為 25.2 mg/L。本研究中水蚤對 sulfamethoxazole 較敏感，其 EC_{50} 和文獻相差約 4 到 6 倍。flumequine 之 EC_{50} 則是和文獻數據相近。

表 5.1.4 水蚤單一抗生素之急毒性試驗結果

| Antibiotic | EC_{50} (mg/L) | 95% CI | A | B |
|------------------|------------------|---------------|-------|-------|
| Lincomycin | > 116 | NA | NA | NA |
| Sulfamethoxazole | 30.042 | 22.798-37.287 | 0.497 | 3.003 |
| Flumequine | 60.540 | 49.208-71.872 | 1.631 | 1.861 |

95% CI : 95% confidence interval。NA : not available。

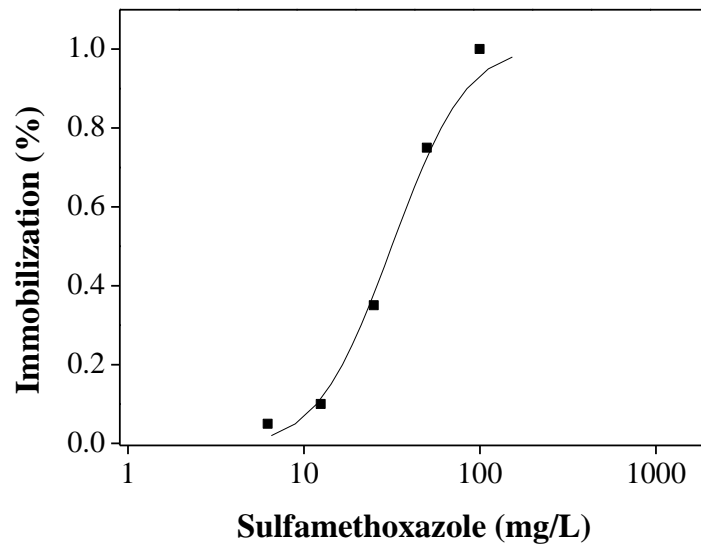


圖 5.1.4 sulfamethoxazole 對水蚤之劑量反應曲線

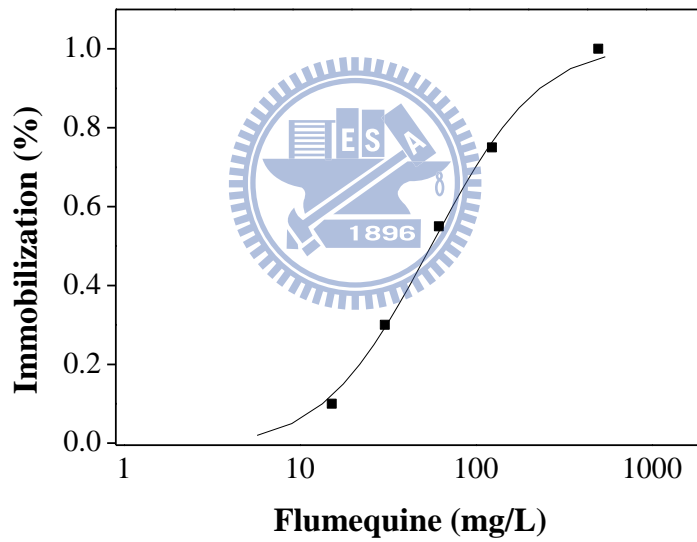


圖 5.1.5 flumequine 對水蚤之劑量反應曲線

5.1.3 月芽藻、水蚤和魚類敏感性之比較

藻類、水蚤和魚類為三種水體環境之代表物種，也代表三個營養階層，因此完整的環境風險評估需要包含這些物種之毒性數據。表 5.1.5 為本研究月芽藻和水蚤急毒性數據以及文獻中斑馬魚急毒性數據。由於月芽藻之生物分類層級與細菌較接近，所以對抗生素敏感性最高，水蚤次之，魚類敏感性最低。水蚤非抗生素的目標作用生物，但是 sulfamethoxazole 會使水蚤死亡，而在實驗中發現 flumequine 明顯抑制水蚤的游泳能力。雖然抗生素對魚類沒有急毒性危害，然而從文獻數據可知，魚類慢毒性的 NOEC 會和急毒性 LC₅₀ 相差達 2 至 4 個級數 (order)。其中，flumequine 除了治療人類泌尿道的感染，也廣泛用於養殖漁業的魚病治療，所以對魚類的毒性極低。

表 5.1.5 月芽藻、水蚤以及斑馬魚 EC₅₀ 之比較

| Antibiotic | <i>P. subcapitata</i> | | | <i>D. magna</i> | <i>D. rerio</i> |
|------------------|-----------------------|-------|-------------|-----------------|--------------------|
| | DO | Yield | Growth rate | | |
| Lincomycin | 0.656 | 0.902 | 2.669 | > 116 | >1000 ^a |
| Sulfamethoxazole | 5.535 | 1.423 | 6.493 | 30.04 | >1000 ^a |
| Flumequine | 2.319 | 2.041 | 3.215 | 60.54 | - |

單位皆為 mg/L

^a : Isidori et al. (2005)

- : no data

5.2 抗生素之環境風險評估

依據歐洲藥物管理局 (EMA) 訂定的評估流程，當藥物的預測環境濃度 (PEC) 高於 0.01 µg/L 時，須進行初步風險評估。經過計算其預測無效應濃度 (PNEC) 後，以 PEC 和 PNEC 的比值，也就是風險商數 (RQ)，來代表此藥物對生態環境的潛在風險性。在本研究中，為了考慮最壞的情況，以台灣河川中抗生素檢測出的最高濃度 (MEC_{max}) (林郁真, 2010)，取代 PEC，計算風險商數。lincomycin、sulfamethoxazole 和 flumequine 的 MEC_{max} 分別為 1.64、0.65 和 0.198 µg/L。因為濃度皆大於 0.01 µg/L，所以必須進行初步環境風險評估。

PNEC 之計算是根據毒性數據和評估因子 (AF)。評估因子的使用規範如表 5.2.1 所示。以急毒性數據 EC_{50} 或 LC_{50} 計算 $PNEC_{acute}$ 的評估因子為 1000。從表 5.2.4 和表 5.2.5，可以知道三個營養階層之物種，藻類對抗生素的敏感性最高，尤其是藍綠藻 (cyanobacteria)。在本研究中，分別以月芽藻和最敏感物種之 EC_{50} ，計算 $PNEC_{acute}$ ；在計算慢毒性 $PNEC_{chronic}$ 方面，因為包含三個物種的 NOEC，所以評估因子選用 10，同樣以本研究之月芽藻以及最敏感的 NOEC 計算風險商數。

表 5.2.2 為以本研究之月芽藻 EC_{50} 計算的結果，試驗終點為產量。以 $PNEC_{acute}$ 計算 lincomycin 的 RQ 為 1.82，表示具有潛在風險，然而用 $PNEC_{chronic}$ 計算則是 0.138，不具風險性。因此，進行風險評估時若只考慮急毒性數據，可能會高估 RQ，使用慢毒性數據能提升評估的可信度。sulfamethoxazole 和 flumequine 的 MEC_{max} 較低，因此計算得到的 RQ 皆小於 1。

表 5.2.3 是以最敏感物種計算的結果。根據文獻的急毒性數據可知，月芽藻對 lincomycin 最敏感，另外兩個抗生素則是藍綠藻。在慢毒性數據方面，由於目前文獻沒有 flumequine 對藍綠藻的 NOEC，因此用月芽藻代替，其餘是以藍綠藻去計算。結果發現分別用急毒性和慢毒性數據評估之環境風險差異極大。以 $PNEC_{acute}$ 計算的 RQ 皆大於 1，尤其是 lincomycin 和 sulfamethoxazole 的 RQ 為 20.86 和 24.25。但是若根據 $PNEC_{chronic}$ ，則只有 sulfamethoxazole 之 RQ 略高於 1，而 lincomycin 和 flumequine 沒有潛在風險。因此三個抗生素中，只有 sulfamethoxazole 需要進行第二階段階層 B 的精確風險評估 (refined risk assessment)。在階層 B，加入新的參數計算精確 PEC，例如考慮懸浮固體對藥物的吸附性。然後進行底泥生物或陸生動植物的毒性試驗，並計算 PNEC 來進一步評估風險。因為此部分的相關文獻數據不足，所以本研究只討論初步的風險計算。

風險商數的可信度取決於 PNEC，其值和毒性數據以及評估因子有關。毒性試驗方法若符合 Klimisch et al. (1997) 提出的標準或是 OECD 制定的優良實驗室操作規範 (Good laboratory practice, GLP)，表示此毒性數據品質較佳，具有參考性。評估因子是用來反映實驗室的毒性試驗結果和真實環境下的差異，由於我們是以極小的試驗生物數量去推估整個群體毒性資料。當因子愈小代表對數據的信心程度愈高。從本研究結果可知，急毒性數據使用 1000 會高估風險性，所以此因子仍不適用。對於慢毒性數據之評估因子 50 和 10，在歐盟制定的技術參考文件有詳細規範使用條件。其中，評估因子 10 必須涵蓋三個階層物種之急慢毒性數據才可使用。由於數據品質屬於主觀判斷，許多研究計算同一藥物的 PNEC 會產生極大的差異，因此必須藉由廣泛蒐集數據，並且確認是否採用

標準方法，然後選擇合適的評估因子，才能提高 PNEC 的可信度。

人類使用的藥物，會經過污水處理廠不斷排放至水體環境，因此水中生物長期接觸這些藥物，所以 EMEA 認為急毒性試驗不適合評估人用藥物的風險，故使用 NOEC 計算 PNEC。另外，由於藍綠藻對抗生素的敏感性優於綠藻，EMEA 建議使用藍綠藻做為評估抗生素毒性的試驗物種。

表 5.2.1 計算水體 PNEC 之評估因子(European Chemicals Bureau, 2003)

| Available data | Assessment factor |
|--|-------------------|
| At least one short-term E(L)C50 from each of three trophic levels (fish, Daphnia and algae) | 1000 |
| One long-term NOEC (either fish or Daphnia) | 100 |
| Two long-term NOECs from species representing two trophic levels (fish and/or Daphnia and/or algae) | 50 |
| Long-term NOECs from at least three species (normally fish, Daphnia and algae) representing three trophic levels | 10 |

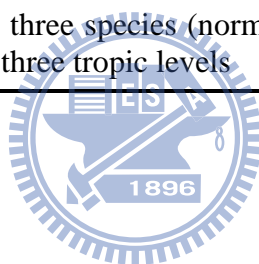


表 5.2.2 以本研究月芽藻數據計算三個抗生素之 RQ

| Antibiotic | Lincomycin | Sulfamethoxazole | Flumequine |
|---|------------|------------------|------------|
| MEC _{max} (µg/L) | 1.64 | 0.65 | 0.198 |
| PNEC _{acute} (µg/L) | | | |
| Algal EC ₅₀ (µg/L) | 902 | 1423 | 2041 |
| AF used | 1000 | 1000 | 1000 |
| PNEC _{acute} | 0.902 | 1.423 | 2.041 |
| PNEC _{chronic} (µg/L) | | | |
| Algal NOEC (µg/L) | 119 | 89 | 500 |
| AF used | 10 | 10 | 10 |
| PNEC _{chronic} | 11.9 | 8.9 | 50 |
| Risk quotient (RQ) | | | |
| MEC _{max} /PNEC _{acute} | 1.82 | 0.457 | 0.097 |
| MEC _{max} /PNEC _{chronic} | 0.138 | 0.073 | 0.004 |

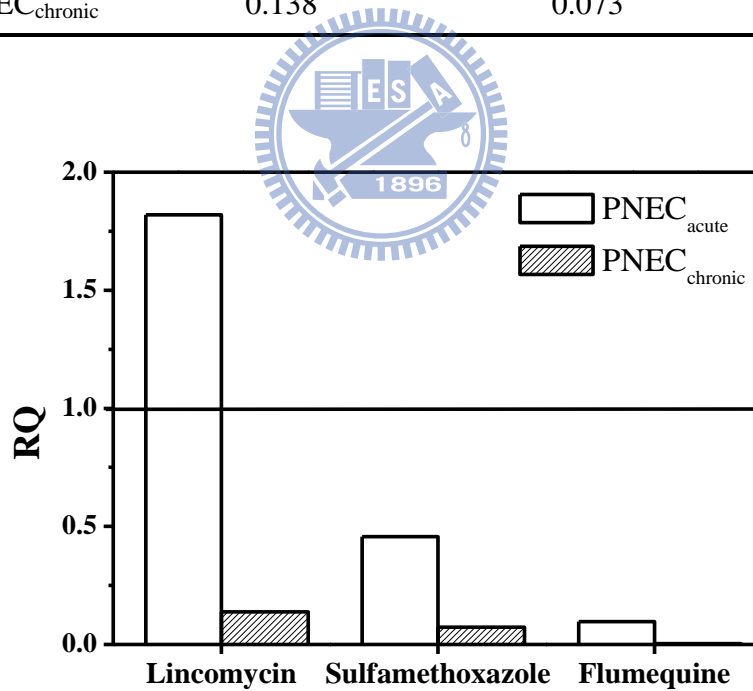


圖 5.2.1 以本研究月芽藻計算三個抗生素之 RQ

表 5.2.3 以最敏感物種數據計算三個抗生素之 RQ

| Antibiotic | Lincomycin | Sulfamethoxazole | Flumequine |
|---|---------------|------------------|---------------|
| MEC _{max} (µg/L) | 1.64 | 0.65 | 0.198 |
| PNEC _{acute} (µg/L) | | | |
| Most sensitive taxa | Green algae | Cyanobacteria | Cyanobacteria |
| EC50 (µg/L) | 70 | 26.8 | 159 |
| AF used | 1000 | 1000 | 1000 |
| PNEC _{acute} | 0.07 | 0.0268 | 0.159 |
| PNEC _{chronic} (µg/L) | | | |
| Most sensitive taxa | Cyanobacteria | Cyanobacteria | Green algae |
| NOEC (µg/L) | 76 | 5.9 | 500 |
| AF used | 10 | 10 | 10 |
| PNEC _{chronic} | 7.6 | 0.59 | 50 |
| Risk quotient (RQ) | | | |
| MEC _{max} /PNEC _{acute} | 23.43 | 24.25 | 1.25 |
| MEC _{max} /PNEC _{chronic} | 0.216 | 1.102 | 0.004 |

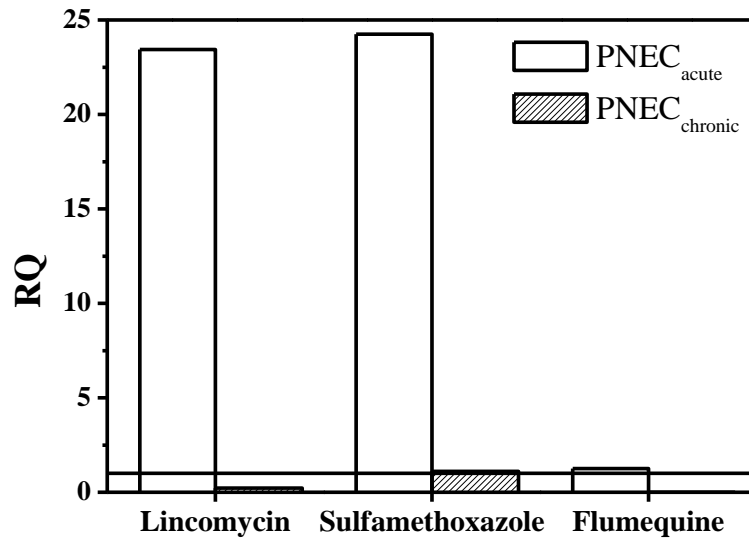


圖 5.2.2 以最敏感物種數據計算三個抗生素之 RQ

表 5.2.4 lincomycin、sulfamethoxazole 和 flumequine 的急毒性數據 (EC₅₀ 或 LC₅₀)

| Compound | Organism | Species | Exposure duration | Endpoint | E(L)C ₅₀ (mg/L) | Reference |
|------------------|---------------|-----------------------|-------------------|----------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Lincomycin | Green algae | <i>P. subcapitata</i> | 72 h | Yield | 0.07 | Isidori et al. (2005) |
| | Cyanobacteria | <i>S. leopolensis</i> | 96 h | Yield | 0.195 | Andreozzi et al. (2006) |
| | Green algae | <i>P. subcapitata</i> | 72 h | Yield | 0.439 | Kim et al. (2009) |
| | Green algae | <i>P. subcapitata</i> | 48 h | Yield | 0.902 | This study |
| | Green algae | <i>P. subcapitata</i> | 96 h | Yield | 1.51 | Andreozzi et al. (2006) |
| | Crustacean | <i>D. magna</i> | 24 h | Immobilization | 23.18 | Isidori et al. (2005) |
| | Crustacean | <i>D. magna</i> | 48 h | Immobilization | >116 | This study |
| | Crustacean | <i>D. magna</i> | 48 h | Immobilization | >382.5 | Kim et al. (2012) |
| | Crustacean | <i>D. magna</i> | 48 h | Immobilization | >500 | Kim et al. (2010) |
| | Crustacean | <i>D. magna</i> | 72 h | Mortality | 379.39 | Dojmi di Delupis et al. (1992) |
| Sulfamethoxazole | Fish | <i>D. rerio</i> | 96 h | Mortality | >1000 | Isidori et al. (2005) |
| | Cyanobacteria | <i>S. leopolensis</i> | 96 h | Yield | 0.0268 | Ferrari et al. (2004) |
| | Green algae | <i>P. subcapitata</i> | 96 h | Yield | 0.146 | Ferrari et al. (2004) |
| | Green algae | <i>P. subcapitata</i> | 72 h | Yield | 0.52 | Isidori et al. (2005) |
| | Green algae | <i>P. subcapitata</i> | 72 h | Yield | 1.53 | Eguchi et al. (2004) |
| | Green algae | <i>P. subcapitata</i> | 48 h | Yield | 1.423 | This study |
| | Crustacean | <i>D. magna</i> | 24 h | Immobilization | 25.20 | Isidori et al. (2005) |
| | Crustacean | <i>D. magna</i> | 48 h | Immobilization | 30.04 | This study |

| | | | | | | |
|------------|---------------|-----------------------|------|----------------|-------|---------------------------|
| | Crustacean | <i>D. magna</i> | 48 h | Immobilization | 123.1 | Park and Choi (2008) |
| | Crustacean | <i>D. magna</i> | 48 h | Immobilization | 189.2 | Kim et al. (2007) |
| | Fish | <i>D. rerio</i> | 96 h | Mortality | >1000 | Isidori et al. (2005) |
| | Fish | <i>O. latipes</i> | 96 h | Mortality | 562.5 | Kim et al. (2007) |
| Flumequine | Cyanobacteria | <i>M. aeruginosa</i> | 7 d | Growth rate | 0.159 | Lützhøft et al. (1999) |
| | Cyanobacteria | <i>M. aeruginosa</i> | 5 d | Growth rate | 1.96 | Robinson et al. (2005) |
| | Green algae | <i>P. subcapitata</i> | 96 h | Yield | 2.041 | This study |
| | Green algae | <i>P. subcapitata</i> | 96 h | Yield | 2.6 | Zounková et al. (2011) |
| | Green algae | <i>P. subcapitata</i> | 72 h | Growth rate | 3.327 | This study |
| | Green algae | <i>P. subcapitata</i> | 72 h | Growth rate | 5 | Robinson et al.(2005) |
| | Green algae | <i>P. subcapitata</i> | 72 h | Growth rate | 5 | Lützhøft et al. (1999) |
| | Green algae | <i>P. subcapitata</i> | 48 h | Growth rate | 9.3 | Christensen et al. (2006) |
| | Crustacean | <i>D. magna</i> | 48 h | Immobilization | 59 | Zounková et al. (2011) |
| | Crustacean | <i>D. magna</i> | 48 h | Immobilization | 60.54 | This study |

表 5.2.5 lincomycin、sulfamethoxazole 和 flumequine 的慢毒性數據 (NOEC)

| Compound | Organism | Species | Exposure duration | Endpoint | NOEC (mg/L) | Reference |
|------------------|---------------|-----------------------|-------------------|--------------|-------------|-------------------------|
| Lincomycin | Cyanobacteria | <i>S. leopolensis</i> | 96 h | Yield | 0.078 | Andreozzi et al. (2006) |
| | Green algae | <i>P. subcapitata</i> | 48 h | Yield | 0.119 | This study |
| | Green algae | <i>P. subcapitata</i> | 96 h | Yield | 0.156 | Andreozzi et al. (2006) |
| | Crustacean | <i>D. magna</i> | 21 d | Reproduction | 5.72 | Kim et al. (2012) |
| | Fish | <i>O. latipes</i> | 30 d | Survival | 0.42 | Kim et al. (2012) |
| Sulfamethoxazole | Cyanobacteria | <i>S. leopolensis</i> | 96 h | Yield | 0.0059 | Ferrari et al. (2004) |
| | Green algae | <i>P. subcapitata</i> | 96 h | Yield | 0.009 | Ferrari et al. (2004) |
| | Green algae | <i>P. subcapitata</i> | 48 h | Yield | 0.089 | This study |
| | Green algae | <i>P. subcapitata</i> | 96 h | Yield | 0.614 | Eguchi et al. (2004) |
| | Crustacean | <i>C. dubia</i> | 7 d | Reproduction | 0.25 | Ferrari et al. (2004) |
| | Fish embryo | <i>D. rerio</i> | 10 d | Mortality | >8 | Ferrari et al. (2004) |
| Flumequine | Green algae | <i>P. subcapitata</i> | 96 h | Yield | <1.6 | Zounková et al. (2011) |
| | Green algae | <i>P. subcapitata</i> | 48 h | Yield | 0.5 | This study |
| | Crustacean | <i>D. magna</i> | 21 d | Reproduction | <0.75 | Zounková et al. (2011) |
| | Fish | <i>P. promelas</i> | 7 d | Survival | 10 | Robinson et al. (2005) |

5.3 抗生素之混合毒性

5.3.1 抗生素兩兩混合

由於三個營養階層（藻類、水蚤和魚類）中，藻類對抗生素的敏感性最高，因此本研究以月芽藻進行抗生素兩兩混合的毒性試驗。混合方式是根據月芽藻生長率的 EC₅₀，來計算抗生素之毒性單位，雖然由單一毒性試驗結果可知，生長率的敏感性較差，然而它是具有生態和科學意義的參數，故選此試驗終點。

本研究是以總毒性單位（sum of toxic units）來判斷混合毒性效應。當毒性單位小於 1 時，為協同作用；大於 1 時，則為拮抗作用。若毒性單位之 95 % 信賴區間包含 1，則為相加作用。另外，繪製 isobologram 來分析不同混合比例的毒性效應。

毒性單位是以抗生素之毒性單位比 1:1 混合，並進行試驗後，計算出使 50 % 藻類生長受到抑制的毒性單位。結果如表 5.3.1。由於 lincomycin 和 sulfamethoxazole 的毒性單位之 95 % 信賴區間包含 1，因此判定為相加作用。另外兩組則是明顯呈現拮抗作用。

表 5.3.1 抗生素以毒性單位 1:1 混合之毒性效應（試驗終點為 growth rate）

| Binary mixture | Σ TU | 95% CI | Combined effect |
|-------------------------------|-------------|-------------|-----------------|
| Lincomycin + Flumequine | 2.481 | 2.066-3.007 | Antagonism |
| Lincomycin + Sulfamethoxazole | 1.109 | 0.876-1.387 | Simple addition |
| Flumequine + Sulfamethoxazole | 2.011 | 1.671-2.458 | Antagonism |

95% CI : 95% confidence interval

Multox 程式可進行四種模式預測。其中，CA 為化學物作用機制相同的預測模式。而作用機制不同的預測模式，根據兩化學物的毒性容忍度分布之相關性，可分為三種：RA（負相關性）、RM（無相關性）以及 NA（正相關性）。另外，此四種模式是建立在化學物不會彼此產生交互作用的基礎上，所以有交互作用產生時，無法用模式預測。以毒性單位 1:1 混毒實驗結果與模式預測之比較如表 5.3.2 所示。lincomycin 和 flumequine 明顯不符預測。lincomycin 和 sulfamethoxazole 的結果卻是接近 CA 模式，但是由 95 % 信賴區間可發現也很接近 NA 預測值。flumequine 和 sulfamethoxazole 則是符合 NA 模式。由於本研究選擇三種機制不同的抗生素，因此在此前提之下，只有 flumequine 和 sulfamethoxazole 符合 Multox 的預測。

isobologram 由 1:1、1:3 和 3:1 三種比例繪製。實驗所繪的點若落在 NA 之方形範圍內，表示兩化學物混合屬於非交互作用 (non-interactive join action)；反之，則是交互作用 (interactive join action)，Chen and Chiou(1995)定義此現象為 complex joint action。因為 complex joint action 歸類於交互作用模式，所以無法用非交互作用模式予以分析，而且兩化學物發生作用時，可能會產生新的化學物或是互相干擾對生物系統的作用，因此毒性效應會大幅減低。從圖 5.3.1 可看到 lincomycin 和 flumequine 三種混合比例都在 NA 界線外，產生強烈的拮抗作用，所以無法用模式預測。在圖 5.3.2 中，lincomycin 和 sulfamethoxazole 以毒性單位 1:1 混合時，接近 CA 模式預測，屬於非交互作用。在 3:1 則是符合 NA，而當以 1:3 混合時，兩個抗生素會發生交互作用，毒性減弱，表示當混合物中 sulfamethoxazole 佔的比例較大時，會減弱混合毒性。在圖 5.3.3 中，flumequine 和 sulfamethoxazole 以 3:1 和 1:3 混合都是交互作用模式，而且同樣 sulfamethoxazole 所占成分愈大，毒性會明顯減弱。

表 5.3.2 以生長率為試驗終點之混合毒性模式預測 (毒性單位比 1:1)

| Binary mixture | Observed | RA | RM | CA | NA |
|---------------------------------|------------------------|-------|-------|----|-------|
| Lincomycin / Flumequine | 2.481 (2.066-3.007) | 0.640 | 0.769 | 1 | 1.379 |
| Lincomycin/ Sulfamethoxazole | 1.109 (0.876-1.387) | 0.460 | 0.580 | 1 | 1.389 |
| Flumequine/ Sulfamethoxazole | 2.011 (1.671-2.458) | 0.625 | 0.784 | 1 | 2.000 |

括號內為 95 % 信賴區間；RA = response addition；RM = response multiplication；CA = concentration addition；NA = no addition

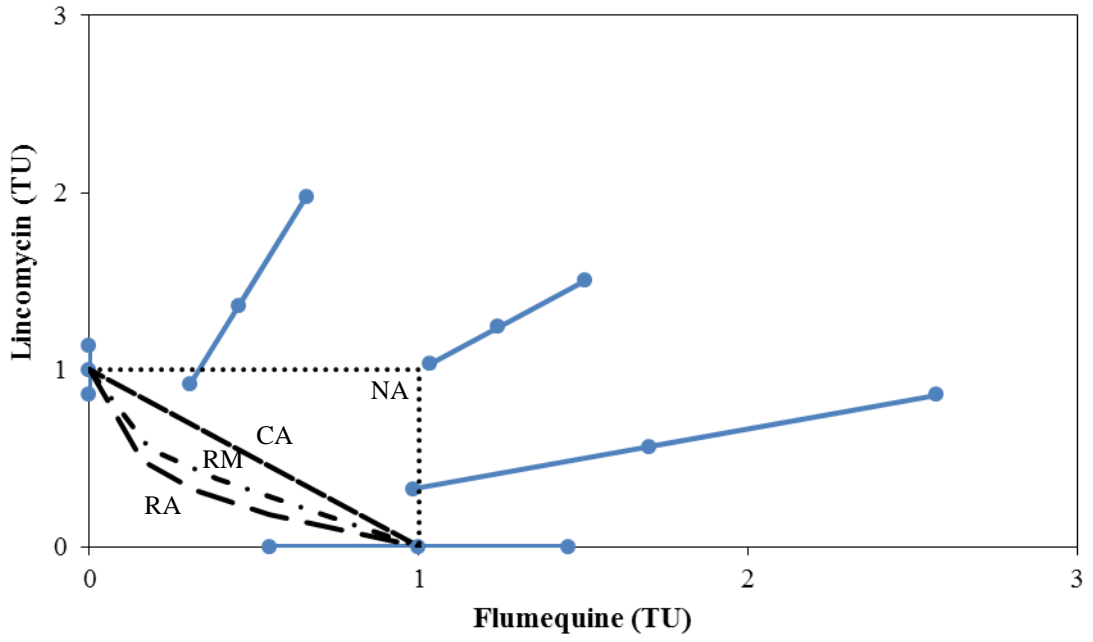


圖 5.3.1 lincomycin + flumequine 之 isobologram (試驗終點 growth rate)

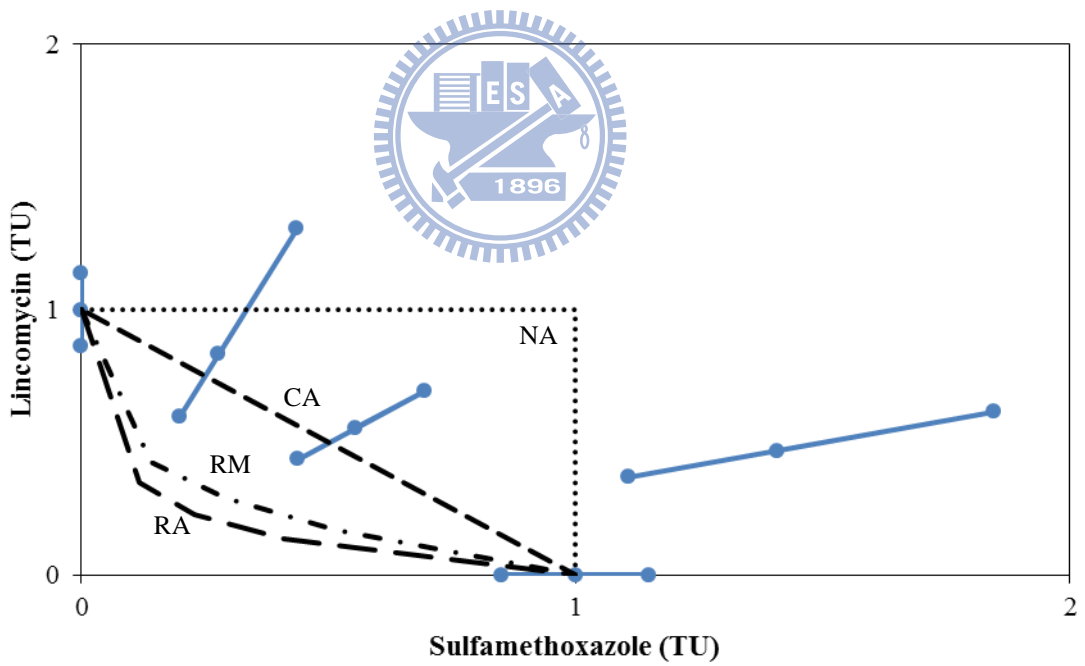


圖 5.3.2 lincomycin + sulfamethoxazole 之 isobologram (試驗終點 growth rate)

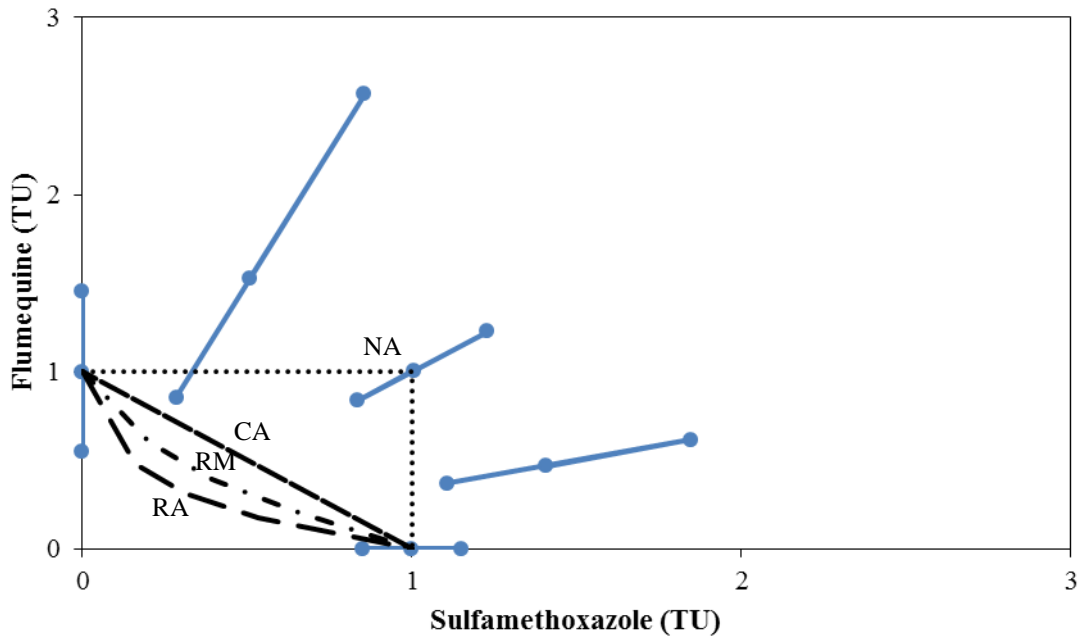
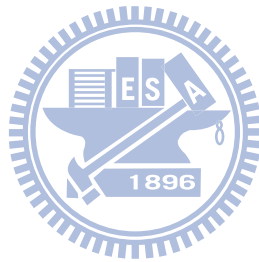


圖 5.3.3 flumequine + sulfamethoxazole 之 isobologram (試驗終點 growth rate)



5.3.2 三個抗生素混合

將三個抗生素依在台灣河川中測得最高濃度混合，使用月芽藻、水蚤和鯉魚進行毒性試驗。利用 ANOVA 和 Dunnett's test 比較試驗濃度和控制組的結果是否有明顯差異。圖 5.3.1 為月芽藻的實驗結果。 Δ DO、產量和生長率三個試驗終點皆顯示與控制組無明顯差異，表示當月芽藻暴露在最高濃度混合的條件下，沒有生長抑制情形發生。從表 5.3.3 可知，抗生素的環境最高濃度低於三個試驗終點的 NOEC 約 2 至 3 級數，因此不會影響月芽藻的生長。

表 5.3.3 月芽藻三個試驗終點的 NOEC 與抗生素的環境最高濃度

| Antibiotic | Δ DO | Yield | Growth rate | MEC _{max} |
|------------------|-------------|-------|-------------|--------------------|
| Lincomycin | 0.119 | 0.119 | 0.180 | 0.0015 |
| Sulfamethoxazole | 0.355 | 0.107 | 0.355 | 0.0007 |
| Flumequine | <0.800 | 0.500 | 1.000 | 0.0002 |

單位皆為 mg/L

圖 5.3.5 和圖 5.3.6 分別為水蚤和鯉魚之試驗結果，在環境濃度下與控制組之存活率無明顯差異。因此，若三個抗生素同時以最高濃度存在，不會對三個營養階層的水體生物產生急毒性。

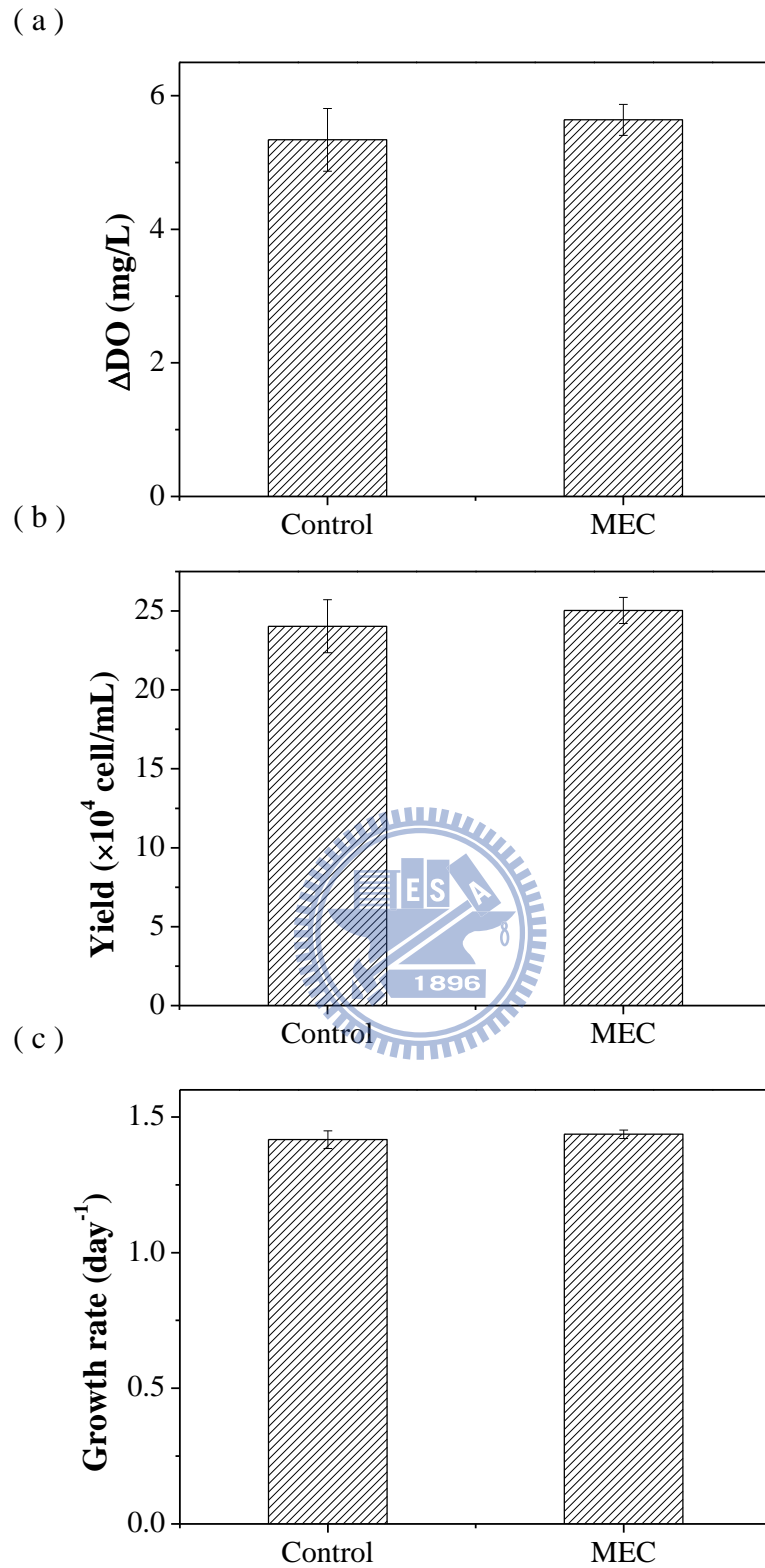


圖 5.3.4 以月芽藻進行三個抗生素混毒試驗。(a) ΔDO ，(b) yield，(c) growth rate

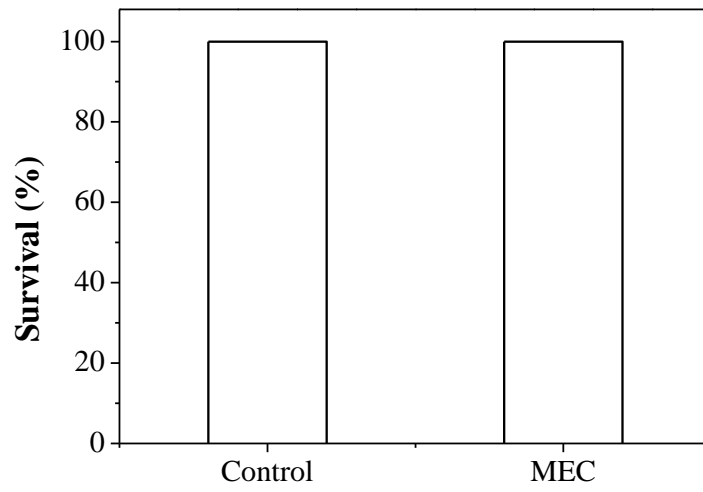


圖 5.3.5 以水蚤進行三個抗生素混毒試驗

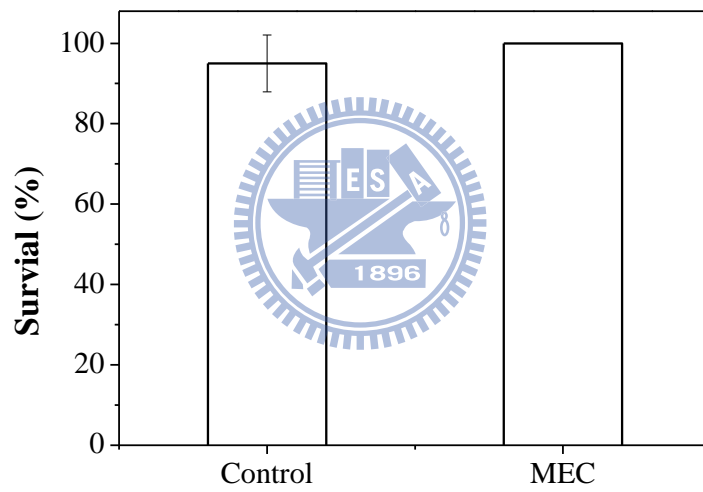


圖 5.3.6 以鯉魚進行三個抗生素混毒試驗

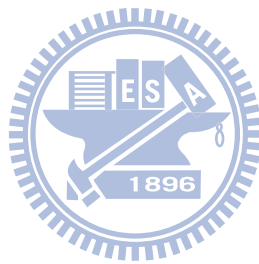
第六章 結論與建議

6.1 結論

1. 單一抗生素試驗中，對月芽藻的毒性由高至低為 lincomycin > flumequine > sulfamethoxazole，而對水蚤則是 sulfamethoxazole > flumequine > lincomycin。根據文獻，抗生素不會對魚類產生急毒性影響。
2. 歐洲藥物管理局認為使用慢毒性數據評估風險比較具有可信度。因此若只考慮 NOEC，以藍綠藻數據計算 sulfamethoxazole 的風險商數為 1.102，有潛在風險性，其餘皆無風險。此藥物須要使用階層 B 的評估方法來確認其是否對生態具有風險。雖然此三個抗生素對月芽藻皆無慢毒性的風險，但是以 EC₅₀ 計算 lincomycin 的風險商數為 1.82，表示可能有急毒性的危害，仍然不可忽略。
3. 以總毒性單位指標判斷抗生素 1:1 的混合毒性效應。lincomycin / sulfamethoxazole 混合為簡單相加作用，lincomycin / flumequine 和 sulfamethoxazole / flumequine 則是拮抗作用。根據抗生素之作用機制不同，使用 Multox 所進行混合毒性預測，只有 sulfamethoxazole / flumequine 符合，屬於 NA 模式。
4. 從 isobologram 可知，lincomycin / flumequine 三個混合比例皆落在 NA 界線外，表示混合產生交互作用，因此無法用非交互作用模式預測其混毒效應。lincomycin / sulfamethoxazole 和 sulfamethoxazole / flumequine 之混合除了 1:1 之外，其餘皆屬於交互作用型式，而且當 sulfamethoxazole 所佔的比例較高時，毒性效應會明顯減弱。
5. 考慮最壞情況，將三個抗生素以最高環境濃度混合進行試驗，結果顯示不會月芽藻、水蚤和鯉魚產生抑制或造成死亡，所以無急毒性的危害。
6. 本研究結果顯示 lincomycin、sulfamethoxazole 和 flumequine 不會對台灣河川的生態環境造成嚴重危害。

6.2 建議

1. 在計算 PNEC 時，若參考文獻的毒性數據並非使用標準毒性試驗方法求得，則不宜使用。而且必須根據歐盟制定的評估因子使用規範，選擇適當的數值，如此才能避免風險商數的計算產生偏差，而影響對風險性的判斷。
2. 污水處理廠為人用藥物進入水體環境的主要途徑，然而目前在台灣關於放流水中抗生素的檢測數據極少，因此未來可對此進行風險評估，並且藉此了解藥物的移除率。另外，醫院放流水以及魚蝦和家禽家畜養殖排入的承受水體可能含有較高的抗生素濃度，因此有研究其環境風險性之必要。



參考文獻

- Altenburger, R., Nendza, M., Schüürmann, G., 2003. Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 1900-1915.
- Andreozzi, R., Canterino, M., Giudice, R.L., Marotta, R., Pinto, G., Pollio, A., 2006. Lincomycin solar photodegradation, algal toxicity and removal from wastewaters by means of ozonation. *Water Research* 40, 630-638.
- APHA, 1995. Toxicity testing with phytoplankton, in *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*, 19th edn, APHA, Washington, DC.
- Arensberg, P., Hemmingsen, V.H., Nyholm, N., 1995. A miniscale algal toxicity test. *Chemosphere* 30, 2103-2115.
- ASTM, 2012a. Standard guide for conducting acute toxicity tests on aqueous ambient samples and effluents with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. ASTM E1192-97(2008).
- ASTM, 2012b. Standard guide for conducting static 96h toxicity tests with microalgae. ASTM E1218-04(2012).
- Backhaus, T., Faust, M., Scholze, M., Gramatica, P., Vighi, M., Grimme, L.H., 2004. Joint algal toxicity of phenylurea herbicides is equally predictable by concentration addition and independent action. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 258-264.
- Backhaus, T., Scholze, M., Grimme, L.H., 2000. The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Aquatic Toxicology* 49, 49-61.
- Barata, C., Alañon, P., Gutierrez-Alonso, S., Riva, M.C., Fernández, C., Tarazona, J.V., 2008. A *Daphnia magna* feeding bioassay as a cost effective and ecological relevant sublethal toxicity test for Environmental Risk Assessment of toxic effluents. *Science of The Total Environment* 405, 78-86.
- Beggel, S., Werner, I., Connon, R.E., Geist, J.P., 2010. Sublethal toxicity of commercial insecticide formulations and their active ingredients to larval fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Science of The Total Environment* 408, 3169-3175.
- Berkson, J., 1944. Application of the Logistic Function to Bio-Assay. *Journal of the American Statistical Association* 39, 357-365.
- Bliss, C.I., 1934a. The method of probits. *Science* 79, 38-39.
- Bliss, C.I., 1934b. The method of probits - a correction. *Science* 79, 409-410.
- Brack, W., Rottler, H., 1994. Toxicity testing of highly volatile chemicals with green algae. *Environ Sci & Pollut Res* 1, 223-228.
- Broderius, S.J., Kahl, M.D., Elonen, G.E., Hammermeister, D.E., Hoglund, M.D., 2005. A comparison of the lethal and sublethal toxicity of organic chemical mixtures to the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 3117-3127.
- Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R., Fanelli, R., 2003. Strategic survey of therapeutic drugs in the rivers Po and Lambro in northern Italy. *Environmental Science & Technology* 37, 1241-1248.
- Cedergreen, N., Kamper, A., Streibig, J.C., 2006. Is prochloraz a potent synergist across aquatic species? A study on bacteria, daphnia, algae and higher plants. *Aquatic Toxicology* 78, 243-252.
- Chee-Sanford, J.C., Aminov, R.I., Krapac, I.J., Garrigues-Jeanjean, N., Mackie, R.I., 2001. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater

- underlying two swine production facilities. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1494-1502.
- Chen, C.-Y., Chiou, Y.-S., 1995. Toxicity of binary mixtures of organic chemicals. *Environmental Toxicology and Water Quality* 10, 97-106.
- Chen, C.-Y., Lin, K.-C., 1997. Optimization and performance evaluation of the continuous algal toxicity test. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 1337-1344.
- Chen, C.-Y., Yeh, J.-T., 1996. Toxicity of binary mixtures of reactive toxicants. *Environmental Toxicology and Water Quality* 11, 83-90.
- Christensen, A.M., Ingerslev, F., Baun, A., 2006. Ecotoxicity of mixtures of antibiotics used in aquacultures. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 2208-2215.
- Christensen, E.R., Chen, C.-Y., 1985. A general noninteractive multiple toxicity model including Probit, Logit, and Weibull transformations. *Biometrics* 41, 711-725.
- Christensen, E.R., Nyholm, N., 1984. Ecotoxicological assays with algae: Weibull dose-response curves. *Environmental Science & Technology* 18, 713-718.
- Daughton, C.G., Ternes, T.A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives* 107, 907-938.
- Davies, J., Gorini, L., Davis, B.D., 1965. Misreading of RNA Codewords Induced by Aminoglycoside Antibiotics. *Molecular Pharmacology* 1, 93-106.
- De Liguoro, M., Di Leva, V., Gallina, G., Faccio, E., Pinto, G., Pollio, A., 2010. Evaluation of the aquatic toxicity of two veterinary sulfonamides using five test organisms. *Chemosphere* 81, 788-793.
- De Liguoro, M., Fioretto, B., Poltronieri, C., Gallina, G., 2009. The toxicity of sulfamethazine to *Daphnia magna* and its additivity to other veterinary sulfonamides and trimethoprim. *Chemosphere* 75, 1519-1524.
- Dojmi di Delupis, G., Macrí, A., Civitareale, C., Migliore, L., 1992. Antibiotics of zootechnical use: Effects of acute high and low dose contamination on *Daphnia magna* Straus. *Aquatic Toxicology* 22, 53-59.
- Drlica, K., Zhao, X., 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61, 377-392.
- Eguchi, K., Nagase, H., Ozawa, M., Endoh, Y.S., Goto, K., Hirata, K., Miyamoto, K., Yoshimura, H., 2004. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. *Chemosphere* 57, 1733-1738.
- EMEA, 2006. Guideline on environmental risk assessment of medicinal products for human use. Doc Ref EMEA/CHMP/SWP/4447/00. London (UK): European Medicines Agency.
- European Chemicals Bureau, 2003. Technical guidance document on risk assessment, part II, Commission Directive 93/67/EEC, Commission Regulation (EC) No. 1488/94 and Directive 98/8/EC.
- Ferrari, B., Mons, R., Vollat, B., Fraysse, B., Paxéaus, N., Giudice, R.L., Pollio, A., Garric, J., 2004. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1344-1354.
- Gaddum, J.H., 1933. Reports on biological standard III. Methods of biological assay depending on a quantal response. London: Medical Research Council. Special report series of the Medical Research Council, no. 183.
- Galassi, S., Vighi, M., 1981. Testing toxicity of volatile substances with algae. *Chemosphere* 10, 1123-1126.
- Greco, W.R., Bravo, G., Parsons, J.C., 1995. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacological Reviews* 47, 331-385.

- Grung, M., Källqvist, T., Sakshaug, S., Skurtveit, S., Thomas, K.V., 2008. Environmental assessment of Norwegian priority pharmaceuticals based on the EMEA guideline. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 328-340.
- Hagenbuch, I.M., Pinckney, J.L., 2012. Toxic effect of the combined antibiotics ciprofloxacin, lincomycin, and tylosin on two species of marine diatoms. *Water Research* 46, 5028-5036.
- Hailing-Sørensen, B., Nyhohn, N., Baun, A., 1996. Algal toxicity tests with volatile and hazardous compounds in air-tight test flasks with CO₂ enriched headspace. *Chemosphere* 32, 1513-1526.
- Halling-Sørensen, B., Lützhøft, H.-C.H., Andersen, H.R., Ingerslev, F., 2000. Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46, 53-58.
- Herman, D.C., Inniss, W.E., Mayfield, C.I., 1990. Impact of volatile aromatic hydrocarbons, alone and in combination, on growth of the freshwater alga *Selenastrum capricornutum*. *Aquatic Toxicology* 18, 87-100.
- Hernando, M.D., Mezcuca, M., Fernández-Alba, A.R., Barceló, D., 2006. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta* 69, 334-342.
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.-L., 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science of The Total Environment* 225, 109-118.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L., Parrella, A., 2005. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Science of The Total Environment* 346, 87-98.
- ISO, 2012a. Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test. ISO 6341:2012.
- ISO, 2012b. Water quality - Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae. ISO 8692:2012.
- J. B. Sprague, B.A.R., 1965. Lethal Levels of Mixed Copper-Zinc Solutions for Juvenile Salmon. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 22, 425-432.
- Kühn, R., Pattard, M., 1990. Results of the harmful effects of water pollutants to green algae (*Scenedesmus subspicatus*) in the cell multiplication inhibition test. *Water Research* 24, 31-38.
- Könemann, H., 1981. Fish toxicity tests with mixtures of more than two chemicals: A proposal for a quantitative approach and experimental results. *Toxicology* 19, 229-238.
- Karthikeyan, K.G., Meyer, M.T., 2006. Occurrence of antibiotics in wastewater treatment facilities in Wisconsin, USA. *Science of The Total Environment* 361, 196-207.
- Kim, H.Y., Yu, S.H., Lee, M.J., Kim, T.H., Kim, S.D., 2009. Radiolysis of selected antibiotics and their toxic effects on various aquatic organisms. *Radiation Physics and Chemistry* 78, 267-272.
- Kim, J., Park, J., Kim, P.-G., Lee, C., Choi, K., Choi, K., 2010. Implication of global environmental changes on chemical toxicity-effect of water temperature, pH, and ultraviolet B irradiation on acute toxicity of several pharmaceuticals in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* 19, 662-669.
- Kim, P., Park, Y., Ji, K., Seo, J., Lee, S., Choi, K., Kho, Y., Park, J., Choi, K., 2012. Effect of chronic exposure to acetaminophen and lincomycin on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and freshwater cladocerans *Daphnia magna* and *Moina macrocopa*, and potential mechanisms of endocrine disruption. *Chemosphere* 89, 10-18.

- Kim, Y., Choi, K., Jung, J., Park, S., Kim, P.-G., Park, J., 2007. Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. *Environment International* 33, 370-375.
- Klimisch, H.J., Andreae, M., Tillmann, U., 1997. A systematic approach for evaluating the quality of experimental toxicological and ecotoxicological data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 25, 1-5.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Collins, J.J., 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology* 8, 423-435.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: A national reconnaissance. *Environmental Science & Technology* 36, 1202-1211.
- Kumar, K., C. Gupta, S., Chander, Y., Singh, A.K., 2005. Antibiotic Use in Agriculture and Its Impact on the Terrestrial Environment. *Advances in Agronomy* 87, 1-54.
- Lützhøft, H.C.H., Halling-Sørensen, B., Jørgensen, S.E., 1999. Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 36, 1-6.
- Lin, J.-H., Kao, W.-C., Tsai, K.-P., Chen, C.-Y., 2005. A novel algal toxicity testing technique for assessing the toxicity of both metallic and organic toxicants. *Water Research* 39, 1869-1877.
- Marking, L.L., 1977. Method for assessing additive toxicity of chemical mixtures. In Mayer FL, Hamelink JL, eds. *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, pp 99–108.
- Martins, N., Pereira, R., Abrantes, N., Pereira, J., Gonçalves, F., Marques, C., 2012. Ecotoxicological effects of ciprofloxacin on freshwater species: data integration and derivation of toxicity thresholds for risk assessment. *Ecotoxicology* 21, 1167-1176.
- Mayer, P., Nyholm, N., Verbruggen, E.M.J., Hermens, J.L.M., Tolls, J., 2000. Algal growth inhibition test in filled, closed bottles for volatile and sorptive materials. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 2551-2556.
- Miao, X.-S., Bishay, F., Chen, M., Metcalfe, C.D., 2004. Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. *Environmental Science & Technology* 38, 3533-3541.
- Neu, H.C., 1992. The crisis in antibiotic resistance. *Science* 257, 1064-1073.
- Newton, B.A., 1956. The properties and mode of action of the polymyxins. *Bacteriological Reviews* 20, 14-27.
- Nyholm, N., Källqvist, T., 1989. Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8, 689-703.
- OECD, 2004. Guideline for testing of chemicals. No. 202. *Daphnia sp.* acute immobilisation test.
- OECD, 2006. Guideline for testing of chemicals. No. 201. Alga growth inhibition test.
- Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2005. Joint action of polycyclic aromatic hydrocarbons: Predictive modeling of sublethal toxicity. *Aquatic Toxicology* 75, 253-262.
- Orvos, D.R., Versteeg, D.J., Inauen, J., Capdevielle, M., Rothenstein, A., Cunningham, V., 2002. Aquatic toxicity of triclosan. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 1338-1349.
- Park, S., Choi, K., 2008. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. *Ecotoxicology* 17, 526-538.
- Plackett, R.L., Hewlett, P.S., 1952. Quantal responses to mixtures of poisons. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 14, 141-163.

- Robinson, A.A., Belden, J.B., Lydy, M.J., 2005. Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 423-430.
- Rojíčková-Padrťová, R., Maršálek, B., Holoubek, I., 1998. Evaluation of alternative and standard toxicity assays for screening of environmental samples: Selection of an optimal test battery. *Chemosphere* 37, 495-507.
- Tuomanen, E., 1986. Phenotypic tolerance: The search for β -Lactam antibiotics that kill nongrowing bacteria. *Review of Infectious Diseases* 8, S279-S291.
- U.S. EPA, 1996. Ecological effects test guidelines. Algal Toxicity, Tiers I and II. EPA /712C/96/164.
- U.S. EPA, 2002. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms.
- Watkinson, A.J., Murby, E.J., Kolpin, D.W., Costanzo, S.D., 2009. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Science of The Total Environment* 407, 2711-2723.
- Wiegel, S., Aulinger, A., Brockmeyer, R., Harms, H., Löffler, J., Reincke, H., Schmidt, R., Stachel, B., von Tümpling, W., Wanke, A., 2004. Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. *Chemosphere* 57, 107-126.
- Yang, L.-H., Ying, G.-G., Su, H.-C., Stauber, J.L., Adams, M.S., Binet, M.T., 2008. Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1201-1208.
- Zou, X., Lin, Z., Deng, Z., Yin, D., Zhang, Y., 2012. The joint effects of sulfonamides and their potentiator on *Photobacterium phosphoreum*: Differences between the acute and chronic mixture toxicity mechanisms. *Chemosphere* 86, 30-35.
- Zounková, R., Klimešová, Z., Nepejchalová, L., Hilscherová, K., Bláha, L., 2011. Complex evaluation of ecotoxicity and genotoxicity of antimicrobials oxytetracycline and flumequine used in aquaculture. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 1184-1189.
- 林郁真, 2010. 水中醫藥類及其代謝之殘留化學物質之檢測技術建立研究期末報告. 行政院環境保護署環境檢驗所.
- 環境檢驗所, 2011a. 生物急毒性檢測方法—水蚤靜水式法 NIEA B901.13B.
- 環境檢驗所, 2011b. 生物急毒性檢測方法—鯉魚靜水式法 NIEA B904.12B.

附錄一 單一毒性數據

實驗物種：月芽藻；MCV = 39.139

實驗毒物：Lincomycin

| Conc. (mg/L) | DO _i (mg/L) | DO _f (mg/L) | Final cells (cells/mL) | ΔDO (mg/L) | μ _{specific} | IR (growth rate) | IR (yield) | IR (DO) |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------|-----------------------|------------------------|---------------|------------|
| Control | 1.81 | 5.38 | 233313 | 3.57 | 1.372 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 8.97 | 1.87 | 1.86 | 28950 | -0.01 | 0.329 | 0.760 | 0.936 | 1.003 |
| 3.59 | 1.62 | 2.38 | 59000 | 0.76 | 0.685 | 0.501 | 0.798 | 0.787 |
| 1.20 | 1.49 | 2.88 | 112550 | 1.39 | 1.008 | 0.266 | 0.553 | 0.611 |
| 0.60 | 1.44 | 3.45 | 155800 | 2.01 | 1.170 | 0.147 | 0.207 | 0.437 |
| 0.40 | 1.52 | 3.81 | 188040 | 2.29 | 1.264 | 0.079 | 0.082 | 0.359 |
| 0.27 | 1.61 | 4.33 | 215450 | 2.72 | 1.332 | 0.029 | 0.082 | 0.238 |
| 0.17 | 1.79 | 4.73 | 226488 | 2.94 | 1.357 | 0.011 | 0.031 | 0.176 |
| Control | 1.71 | 5.15 | 232540 | 3.44 | 1.371 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 8.97 | 1.97 | 2.25 | 30775 | 0.28 | 0.359 | 0.738 | 0.927 | 0.919 |
| 3.59 | 1.69 | 1.95 | 46925 | 0.26 | 0.570 | 0.584 | 0.853 | 0.924 |
| 1.20 | 1.67 | 2.84 | 93040 | 1.17 | 0.912 | 0.334 | 0.641 | 0.660 |
| 0.60 | 1.39 | 3.17 | 144025 | 1.78 | 1.131 | 0.175 | 0.407 | 0.483 |
| 0.40 | 1.58 | 3.59 | 165820 | 2.01 | 1.201 | 0.123 | 0.307 | 0.416 |
| 0.27 | 1.52 | 4.34 | 217700 | 2.82 | 1.338 | 0.024 | 0.068 | 0.180 |
| 0.17 | 1.70 | 5.16 | 229200 | 3.46 | 1.363 | 0.005 | 0.015 | -0.006 |
| Control | 1.54 | 5.15 | 238414 | 3.61 | 1.383 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 8.97 | 2.35 | 2.27 | 28400 | -0.08 | 0.319 | 0.769 | 0.940 | 1.022 |
| 3.59 | 1.64 | 2.07 | 48767 | 0.43 | 0.590 | 0.574 | 0.849 | 0.881 |
| 1.20 | 1.67 | 2.72 | 86700 | 1.05 | 0.877 | 0.366 | 0.679 | 0.709 |
| 0.60 | 1.42 | 3.27 | 152775 | 1.85 | 1.160 | 0.161 | 0.383 | 0.488 |
| 0.40 | 1.51 | 3.63 | 176280 | 2.12 | 1.232 | 0.109 | 0.278 | 0.413 |
| 0.27 | 1.51 | 3.93 | 219360 | 2.42 | 1.341 | 0.030 | 0.085 | 0.330 |
| 0.17 | 1.60 | 4.85 | 232663 | 3.25 | 1.371 | 0.009 | 0.026 | 0.100 |
| Control | 1.687 | 5.227 | 234755.667 | 3.540 | 1.375 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 8.97 | 2.063 | 2.127 | 29375.000 | 0.063 | 0.336 | 0.756 | 0.935 | 0.982 |
| 3.59 | 1.650 | 2.133 | 51564.000 | 0.483 | 0.615 | 0.553 | 0.834 | 0.863 |
| 1.20 | 1.610 | 2.813 | 97430.000 | 1.203 | 0.932 | 0.322 | 0.625 | 0.660 |
| 0.60 | 1.417 | 3.297 | 150866.667 | 1.880 | 1.154 | 0.161 | 0.382 | 0.469 |
| 0.40 | 1.537 | 3.677 | 176713.333 | 2.140 | 1.233 | 0.104 | 0.264 | 0.395 |
| 0.27 | 1.547 | 4.200 | 217503.333 | 2.653 | 1.337 | 0.028 | 0.079 | 0.250 |
| 0.17 | 1.697 | 4.913 | 229450.333 | 3.217 | 1.364 | 0.008 | 0.024 | 0.091 |

DO_i = initial DO; DO_f = final DO; μ_{specific} = specific growth rate; IR = inhibition rate

實驗物種：月芽藻；MCV = 37.623 μm^3

實驗毒物：Sulfamethoxazole

| Conc. (mg/L) | DO _i (mg/L) | DO _f (mg/L) | Final cells (cells/mL) | ΔDO (mg/L) | μ_{specific} | IR (growth rate) | IR (yield) | IR (DO) |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------|---------------|------------|
| Control | 1.74 | 7.82 | 281920 | 6.08 | 1.467 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 10.70 | 1.94 | 3.75 | 50940 | 1.81 | 0.611 | 0.583 | 0.865 | 0.702 |
| 3.57 | 1.78 | 4.24 | 71284 | 2.46 | 0.779 | 0.469 | 0.789 | 0.595 |
| 1.07 | 1.85 | 5.73 | 137725 | 3.88 | 1.109 | 0.244 | 0.540 | 0.362 |
| 0.64 | 1.7 | 6.11 | 183577 | 4.41 | 1.252 | 0.146 | 0.368 | 0.275 |
| 0.43 | 1.62 | 6.86 | 234500 | 5.24 | 1.375 | 0.063 | 0.178 | 0.138 |
| 0.21 | 1.65 | 6.6 | 242660 | 4.95 | 1.392 | 0.051 | 0.147 | 0.186 |
| 0.11 | 1.53 | 7.42 | 268120 | 5.89 | 1.442 | 0.017 | 0.052 | 0.031 |
| Control | 1.6 | 7.51 | 258784 | 5.91 | 1.424 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 10.70 | 1.88 | 3.84 | 60613 | 1.96 | 0.698 | 0.510 | 0.813 | 0.668 |
| 3.57 | 1.69 | 4.34 | 70550 | 2.65 | 0.774 | 0.456 | 0.772 | 0.552 |
| 1.07 | 1.78 | 5.45 | 139420 | 3.67 | 1.115 | 0.217 | 0.490 | 0.379 |
| 0.64 | 1.69 | 5.9 | 166580 | 4.21 | 1.204 | 0.155 | 0.378 | 0.288 |
| 0.43 | 1.57 | 6.76 | 230767 | 5.19 | 1.367 | 0.040 | 0.115 | 0.122 |
| 0.21 | 1.64 | 6.99 | 235440 | 5.35 | 1.377 | 0.033 | 0.096 | 0.095 |
| 0.11 | 1.44 | 7.88 | 279700 | 6.44 | 1.463 | -0.027 | -0.086 | -0.090 |
| Control | 1.61 | 6.79 | 255888 | 5.18 | 1.418 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 10.70 | 2.51 | 4.39 | 58100 | 1.88 | 0.677 | 0.523 | 0.821 | 0.637 |
| 3.57 | 1.73 | 4.16 | 68700 | 2.43 | 0.761 | 0.464 | 0.777 | 0.531 |
| 1.07 | 1.83 | 6.1 | 147660 | 4.27 | 1.143 | 0.194 | 0.449 | 0.176 |
| 0.64 | 1.76 | 6.05 | 194625 | 4.29 | 1.282 | 0.096 | 0.254 | 0.172 |
| 0.43 | 1.75 | 6.99 | 216400 | 5.24 | 1.335 | 0.059 | 0.164 | -0.012 |
| 0.21 | 1.56 | 7.56 | 248630 | 6.00 | 1.404 | 0.010 | 0.030 | -0.158 |
| 0.11 | 1.58 | 8.09 | 254360 | 6.51 | 1.415 | 0.002 | 0.006 | -0.257 |
| Control | 1.650 | 7.373 | 265530.667 | 5.723 | 1.436 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 10.70 | 2.110 | 3.993 | 56551.000 | 1.883 | 0.662 | 0.539 | 0.834 | 0.671 |
| 3.57 | 1.733 | 4.247 | 70178.000 | 2.513 | 0.771 | 0.463 | 0.780 | 0.561 |
| 1.07 | 1.820 | 5.760 | 141601.667 | 3.940 | 1.122 | 0.218 | 0.495 | 0.312 |
| 0.64 | 1.717 | 6.020 | 181594.000 | 4.303 | 1.246 | 0.132 | 0.335 | 0.248 |
| 0.43 | 1.647 | 6.870 | 227222.333 | 5.223 | 1.359 | 0.054 | 0.153 | 0.087 |
| 0.21 | 1.617 | 7.050 | 242243.333 | 5.433 | 1.391 | 0.031 | 0.093 | 0.051 |
| 0.11 | 1.517 | 7.797 | 267393.333 | 6.280 | 1.440 | -0.003 | -0.007 | -0.097 |

實驗物種：月芽藻；MCV = 36.916 μm^3

實驗毒物：Flumequine

| Conc. (mg/L) | DO _i (mg/L) | DO _f (mg/L) | Final cells (cells/mL) | ΔDO (mg/L) | μ_{specific} | IR (growth rate) | IR (yield) | IR (DO) |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------|---------------|------------|
| Control | 1.62 | 7.7 | 279340 | 6.08 | 1.462 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 15 | 2.17 | 2.78 | 31867 | 0.61 | 0.377 | 0.742 | 0.936 | 0.900 |
| 5 | 1.83 | 2.78 | 43400 | 0.95 | 0.531 | 0.637 | 0.893 | 0.844 |
| 2.5 | 1.95 | 3.73 | 60800 | 1.78 | 0.700 | 0.521 | 0.827 | 0.707 |
| 1.5 | 1.51 | 5.12 | 184700 | 3.61 | 1.255 | 0.141 | 0.358 | 0.406 |
| 1.25 | 1.49 | 5.76 | 224700 | 4.27 | 1.353 | 0.074 | 0.207 | 0.298 |
| 1 | 1.49 | 5.63 | 227417 | 4.14 | 1.359 | 0.070 | 0.196 | 0.319 |
| 0.8 | 1.59 | 6.6 | 264725 | 5.01 | 1.435 | 0.018 | 0.055 | 0.176 |
| Control | 1.53 | 8.15 | 299825 | 6.62 | 1.498 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 15 | 2.34 | 2.8 | 36534 | 0.46 | 0.445 | 0.703 | 0.924 | 0.931 |
| 5 | 1.77 | 2.66 | 35300 | 0.89 | 0.428 | 0.714 | 0.929 | 0.866 |
| 2.5 | 1.84 | 3.93 | 58867 | 2.09 | 0.684 | 0.544 | 0.846 | 0.684 |
| 1.5 | 1.53 | 4.75 | 168372 | 3.22 | 1.209 | 0.193 | 0.462 | 0.514 |
| 1.25 | 1.56 | 5.82 | 235867 | 4.26 | 1.378 | 0.080 | 0.225 | 0.356 |
| 1 | 1.56 | 6.78 | 271900 | 5.22 | 1.449 | 0.033 | 0.098 | 0.211 |
| 0.8 | 1.51 | 6.52 | 269400 | 5.01 | 1.444 | 0.036 | 0.107 | 0.243 |
| Control | 1.6 | 7.62 | 285800 | 6.02 | 1.474 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 15 | 2.44 | 2.91 | 29040 | 0.47 | 0.330 | 0.776 | 0.948 | 0.922 |
| 5 | 1.72 | 2.72 | 36500 | 1 | 0.445 | 0.698 | 0.921 | 0.834 |
| 2.5 | 1.87 | 3.57 | 51034 | 1.7 | 0.612 | 0.585 | 0.867 | 0.718 |
| 1.5 | 1.48 | 4.8 | 175250 | 3.32 | 1.229 | 0.166 | 0.408 | 0.449 |
| 1.25 | 1.45 | 5.97 | 224917 | 4.52 | 1.354 | 0.081 | 0.225 | 0.249 |
| 1 | 1.53 | 6.48 | 272299 | 4.95 | 1.449 | 0.016 | 0.050 | 0.178 |
| 0.8 | 1.59 | 7.16 | 286820 | 5.57 | 1.475 | -0.001 | -0.004 | 0.075 |
| Control | 1.583 | 7.823 | 288321.667 | 6.240 | 1.478 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 15 | 2.317 | 2.830 | 32480.333 | 0.513 | 0.384 | 0.740 | 0.936 | 0.918 |
| 5 | 1.773 | 2.720 | 38400.000 | 0.947 | 0.468 | 0.683 | 0.914 | 0.848 |
| 2.5 | 1.887 | 3.743 | 56900.333 | 1.857 | 0.665 | 0.550 | 0.847 | 0.702 |
| 1.5 | 1.507 | 4.890 | 176107.333 | 3.383 | 1.231 | 0.167 | 0.411 | 0.458 |
| 1.25 | 1.500 | 5.850 | 228494.667 | 4.350 | 1.362 | 0.079 | 0.219 | 0.303 |
| 1 | 1.527 | 6.297 | 257205.333 | 4.770 | 1.419 | 0.040 | 0.114 | 0.236 |
| 0.8 | 1.563 | 6.760 | 273648.333 | 5.197 | 1.452 | 0.018 | 0.054 | 0.167 |

實驗物種：水蚤

實驗毒物：Lincomycin

| Conc. (mg/L) | Number of live organisms | Immobilization (%) |
|--------------|--------------------------|--------------------|
| Control | 20 | 0 |
| 149.70 | 0 | 100 |
| 99.80 | 0 | 100 |
| 49.90 | 5 | 75 |
| 24.95 | 13 | 35 |
| 12.48 | 18 | 10 |
| 6.24 | 19 | 5 |

實驗物種：水蚤

實驗毒物：Sufamethoxazole

| Conc. (mg/L) | Number of live organisms | Immobilization (%) |
|--------------|--------------------------|--------------------|
| Control | 20 | 0 |
| 149.70 | 0 | 100 |
| 99.80 | 0 | 100 |
| 49.90 | 5 | 75 |
| 24.95 | 13 | 35 |
| 12.48 | 18 | 10 |
| 6.24 | 19 | 5 |

實驗物種：水蚤

實驗毒物：Flumequine

| Conc. (mg/L) | Number of live organisms | Immobilization (%) |
|--------------|--------------------------|--------------------|
| Control | 20 | 0 |
| 496 | 0 | 100 |
| 123.2 | 5 | 75 |
| 61.6 | 9 | 55 |
| 30.4 | 14 | 30 |
| 15.2 | 18 | 10 |

附錄二 混合毒性數據

實驗物種：月芽藻；MCV = 35.558 μm^3

實驗毒物：Lincomycin + Flumequine (TU ratio = 1 : 1)

| Lincomycin (mg/L) | Flumequine (mg/L) | ΣTU | Final cells (cells/mL) | μ_{specific} | IR (growth rate) |
|----------------------|----------------------|-------------------|---------------------------|-------------------------|----------------------|
| Control | Control | Control | 216567 | 1.335 | 0.000 |
| 14.60 | 18.47 | 11.22 | 24200 | 0.239 | 0.821 |
| 5.84 | 7.39 | 4.49 | 37867 | 0.463 | 0.653 |
| 2.92 | 3.69 | 2.24 | 56634 | 0.664 | 0.502 |
| 1.46 | 1.85 | 1.12 | 104960 | 1.031 | 0.228 |
| 1.17 | 1.48 | 0.90 | 117900 | 1.230 | 0.078 |
| 0.58 | 0.74 | 0.45 | 175634 | 1.230 | 0.078 |
| 0.29 | 0.37 | 0.22 | 205550 | 1.309 | 0.020 |
| Control | Control | Control | 224880 | 1.354 | 0.000 |
| 14.60 | 18.47 | 11.22 | 25834 | 0.272 | 0.799 |
| 5.84 | 7.39 | 4.49 | 33500 | 0.402 | 0.703 |
| 2.92 | 3.69 | 2.24 | 55267 | 0.652 | 0.518 |
| 1.46 | 1.85 | 1.12 | 86934 | 0.879 | 0.351 |
| 1.17 | 1.48 | 0.90 | 102934 | 0.963 | 0.289 |
| 0.58 | 0.74 | 0.45 | 176400 | 1.232 | 0.090 |
| 0.29 | 0.37 | 0.22 | 199575 | 1.294 | 0.044 |
| Control | Control | Control | 230440 | 1.366 | 0.000 |
| 14.60 | 18.47 | 11.22 | 25900 | 0.273 | 0.800 |
| 5.84 | 7.39 | 4.49 | 33417 | 0.401 | 0.707 |
| 2.92 | 3.69 | 2.24 | 56850 | 0.666 | 0.512 |
| 1.46 | 1.85 | 1.12 | 93934 | 0.917 | 0.328 |
| 1.17 | 1.48 | 0.90 | 123200 | 1.053 | 0.229 |
| 0.58 | 0.74 | 0.45 | 175620 | 1.230 | 0.099 |
| 0.29 | 0.37 | 0.22 | 205425 | 1.309 | 0.042 |
| Control | Control | Control | 223962.333 | 1.352 | 0.000 |
| 14.60 | 18.47 | 11.22 | 25311.333 | 0.261 | 0.807 |
| 5.84 | 7.39 | 4.49 | 34928.000 | 0.422 | 0.688 |
| 2.92 | 3.69 | 2.24 | 56250.333 | 0.661 | 0.511 |
| 1.46 | 1.85 | 1.12 | 99589.333 | 0.942 | 0.302 |
| 1.17 | 1.48 | 0.90 | 133922.667 | 1.082 | 0.199 |
| 0.58 | 0.74 | 0.45 | 175884.667 | 1.231 | 0.089 |
| 0.29 | 0.37 | 0.22 | 203516.667 | 1.304 | 0.035 |

實驗物種：月芽藻； $MCV = 36.817 \mu\text{m}^3$

實驗毒物：Lincomycin + Flumequine (TU ratio = 1 : 3)

| Lincomycin (mg/L) | Flumequine (mg/L) | Σ TU | Final cells (cells/mL) | μ_{specific} | IR (growth rate) |
|----------------------|----------------------|-------------|---------------------------|-------------------------|----------------------|
| Control | Control | Control | 210600 | 1.321 | 0.000 |
| 5.40 | 19.93 | 7.99 | 26267 | 0.280 | 0.788 |
| 2.70 | 9.97 | 3.99 | 39100 | 0.479 | 0.637 |
| 1.35 | 4.98 | 2.00 | 48400 | 0.586 | 0.557 |
| 0.68 | 2.49 | 1.00 | 104850 | 1.174 | 0.111 |
| 0.54 | 1.99 | 0.80 | 156867 | 1.276 | 0.034 |
| 0.27 | 1.00 | 0.40 | 192450 | 1.276 | 0.034 |
| 0.14 | 0.50 | 0.20 | 207517 | 1.314 | 0.006 |
| Control | Control | Control | 200250 | 1.296 | 0.000 |
| 5.40 | 19.93 | 7.99 | 30600 | 0.356 | 0.725 |
| 2.70 | 9.97 | 3.99 | 35900 | 0.436 | 0.663 |
| 1.35 | 4.98 | 2.00 | 42300 | 0.518 | 0.600 |
| 0.68 | 2.49 | 1.00 | 98334 | 0.940 | 0.274 |
| 0.54 | 1.99 | 0.80 | 158750 | 1.180 | 0.090 |
| 0.27 | 1.00 | 0.40 | 198840 | 1.292 | 0.003 |
| 0.14 | 0.50 | 0.20 | 214700 | 1.331 | -0.027 |
| Control | Control | Control | 197267 | 1.288 | 0.000 |
| 5.40 | 19.93 | 7.99 | 25675 | 0.269 | 0.791 |
| 2.70 | 9.97 | 3.99 | 35600 | 0.432 | 0.665 |
| 1.35 | 4.98 | 2.00 | 42734 | 0.523 | 0.594 |
| 0.68 | 2.49 | 1.00 | 92500 | 0.910 | 0.294 |
| 0.54 | 1.99 | 0.80 | 164850 | 1.198 | 0.070 |
| 0.27 | 1.00 | 0.40 | 190267 | 1.270 | 0.014 |
| 0.14 | 0.50 | 0.20 | 200334 | 1.296 | -0.006 |
| Control | Control | Control | 202705.667 | 1.302 | 0.000 |
| 5.40 | 19.93 | 7.99 | 27514.000 | 0.302 | 0.768 |
| 2.70 | 9.97 | 3.99 | 36866.667 | 0.449 | 0.655 |
| 1.35 | 4.98 | 2.00 | 44478.000 | 0.543 | 0.583 |
| 0.68 | 2.49 | 1.00 | 115900.333 | 1.008 | 0.227 |
| 0.54 | 1.99 | 0.80 | 172016.667 | 1.218 | 0.064 |
| 0.27 | 1.00 | 0.40 | 193852.333 | 1.279 | 0.017 |
| 0.14 | 0.50 | 0.20 | 207517.000 | 1.313 | -0.009 |

實驗物種：月芽藻； $MCV = 36.529 \mu\text{m}^3$

實驗毒物：Lincomycin + Flumequine (TU ratio = 3 : 1)

| Lincomycin (mg/L) | Flumequine (mg/L) | ΣTU | Final cells (cells/mL) | μ_{specific} | IR (growth rate) |
|----------------------|----------------------|-------------------|---------------------------|-------------------------|----------------------|
| Control | Control | Control | 205900 | 1.310 | 0.000 |
| 16.20 | 6.60 | 7.97 | 29350 | 0.336 | 0.744 |
| 8.10 | 3.30 | 3.98 | 35967 | 0.437 | 0.666 |
| 4.05 | 1.65 | 1.99 | 47267 | 0.574 | 0.562 |
| 2.03 | 0.83 | 1.00 | 63200 | 0.719 | 0.451 |
| 1.01 | 0.41 | 0.50 | 110067 | 0.997 | 0.239 |
| 0.51 | 0.21 | 0.25 | 165140 | 1.199 | 0.084 |
| 0.25 | 0.10 | 0.12 | 192800 | 1.277 | 0.025 |
| Control | Control | Control | 205375 | 1.308 | 0.000 |
| 16.20 | 6.60 | 7.97 | 32600 | 0.388 | 0.703 |
| 8.10 | 3.30 | 3.98 | 40800 | 0.500 | 0.618 |
| 4.05 | 1.65 | 1.99 | 44450 | 0.543 | 0.585 |
| 2.03 | 0.83 | 1.00 | 64100 | 0.726 | 0.445 |
| 1.01 | 0.41 | 0.50 | 113250 | 1.011 | 0.227 |
| 0.51 | 0.21 | 0.25 | 179020 | 1.240 | 0.052 |
| 0.25 | 0.10 | 0.12 | 200800 | 1.297 | 0.009 |
| Control | Control | Control | 209800 | 1.319 | 0.000 |
| 16.20 | 6.60 | 7.97 | 34700 | 0.419 | 0.682 |
| 8.10 | 3.30 | 3.98 | 34629 | 0.418 | 0.683 |
| 4.05 | 1.65 | 1.99 | 51367 | 0.615 | 0.533 |
| 2.03 | 0.83 | 1.00 | 67934 | 0.755 | 0.427 |
| 1.01 | 0.41 | 0.50 | 116234 | 1.024 | 0.224 |
| 0.51 | 0.21 | 0.25 | 170000 | 1.214 | 0.080 |
| 0.25 | 0.10 | 0.12 | 197000 | 1.288 | 0.024 |
| Control | Control | Control | 207025.000 | 1.312 | 0.000 |
| 16.20 | 6.60 | 7.97 | 32216.667 | 0.381 | 0.710 |
| 8.10 | 3.30 | 3.98 | 37132.000 | 0.452 | 0.656 |
| 4.05 | 1.65 | 1.99 | 47694.667 | 0.578 | 0.560 |
| 2.03 | 0.83 | 1.00 | 80700.333 | 0.734 | 0.441 |
| 1.01 | 0.41 | 0.50 | 131541.333 | 1.010 | 0.230 |
| 0.51 | 0.21 | 0.25 | 171386.667 | 1.218 | 0.072 |
| 0.25 | 0.10 | 0.12 | 196866.667 | 1.287 | 0.019 |

實驗物種：月芽藻； $MCV = 35.507 \mu\text{m}^3$

實驗毒物：Lincomycin + Sulfamethoxazole (TU ratio = 1 : 1)

| Lincomycin (mg/L) | Sulfamethoxazole (mg/L) | Σ TU | Final cells (cells/mL) | μ_{specific} | IR (growth rate) |
|----------------------|----------------------------|-------------|---------------------------|-------------------------|----------------------|
| Control | Control | Control | 211220 | 1.322 | 0.000 |
| 11.20 | 25.87 | 8.18 | 29500 | 0.338 | 0.744 |
| 5.60 | 12.93 | 4.09 | 33267 | 0.398 | 0.699 |
| 2.80 | 6.47 | 2.05 | 42225 | 0.517 | 0.609 |
| 1.40 | 3.23 | 1.02 | 55200 | 0.651 | 0.507 |
| 1.12 | 2.59 | 0.82 | 62667 | 0.715 | 0.459 |
| 0.56 | 1.29 | 0.41 | 81850 | 0.848 | 0.358 |
| 0.28 | 0.65 | 0.21 | 136134 | 1.103 | 0.166 |
| Control | Control | Control | 227934 | 1.361 | 0.000 |
| 11.20 | 25.87 | 8.18 | 30550 | 0.356 | 0.739 |
| 5.60 | 12.93 | 4.09 | 34300 | 0.414 | 0.696 |
| 2.80 | 6.47 | 2.05 | 50600 | 0.608 | 0.553 |
| 1.40 | 3.23 | 1.02 | 58767 | 0.683 | 0.498 |
| 1.12 | 2.59 | 0.82 | 60800 | 0.700 | 0.486 |
| 0.56 | 1.29 | 0.41 | 84667 | 0.865 | 0.364 |
| 0.28 | 0.65 | 0.21 | 138600 | 1.112 | 0.183 |
| Control | Control | Control | 220520 | 1.344 | 0.000 |
| 11.20 | 25.87 | 8.18 | 26667 | 0.288 | 0.786 |
| 5.60 | 12.93 | 4.09 | 27250 | 0.299 | 0.778 |
| 2.80 | 6.47 | 2.05 | 38000 | 0.465 | 0.654 |
| 1.40 | 3.23 | 1.02 | 59034 | 0.685 | 0.490 |
| 1.12 | 2.59 | 0.82 | 64675 | 0.731 | 0.456 |
| 0.56 | 1.29 | 0.41 | 85567 | 0.871 | 0.352 |
| 0.28 | 0.65 | 0.21 | 126720 | 1.067 | 0.206 |
| Control | Control | Control | 219891.333 | 1.342 | 0.000 |
| 11.20 | 25.87 | 8.18 | 28905.667 | 0.327 | 0.756 |
| 5.60 | 12.93 | 4.09 | 31605.667 | 0.370 | 0.724 |
| 2.80 | 6.47 | 2.05 | 43608.333 | 0.530 | 0.605 |
| 1.40 | 3.23 | 1.02 | 60156.000 | 0.673 | 0.499 |
| 1.12 | 2.59 | 0.82 | 69108.333 | 0.715 | 0.467 |
| 0.56 | 1.29 | 0.41 | 84028.000 | 0.861 | 0.358 |
| 0.28 | 0.65 | 0.21 | 133818.000 | 1.094 | 0.185 |

實驗物種：月芽藻； $MCV = 36.632 \mu\text{m}^3$

實驗毒物：Lincomycin + Sulfamethoxazole (TU ratio = 1 : 3)

| Lincomycin (mg/L) | Sulfamethoxazole (mg/L) | Σ TU | Final cells (cells/mL) | μ_{specific} | IR (growth rate) |
|----------------------|----------------------------|-------------|---------------------------|-------------------------|----------------------|
| Control | Control | Control | 200340 | 1.296 | 0.000 |
| 3.73 | 25.37 | 5.29 | 36550 | 0.445 | 0.656 |
| 2.87 | 19.53 | 4.07 | 33800 | 0.406 | 0.687 |
| 1.46 | 9.89 | 2.06 | 62934 | 0.717 | 0.447 |
| 0.75 | 5.07 | 1.06 | 65360 | 0.736 | 0.432 |
| 0.37 | 2.54 | 0.53 | 78967 | 0.830 | 0.359 |
| 0.19 | 1.27 | 0.26 | 107567 | 0.985 | 0.240 |
| 0.09 | 0.63 | 0.13 | 169000 | 1.211 | 0.066 |
| Control | Control | Control | 188434 | 1.265 | 0.000 |
| 3.73 | 25.37 | 5.29 | 33450 | 0.401 | 0.683 |
| 2.87 | 19.53 | 4.07 | 36475 | 0.444 | 0.649 |
| 1.46 | 9.89 | 2.06 | 55634 | 0.655 | 0.482 |
| 0.75 | 5.07 | 1.06 | 62125 | 0.711 | 0.438 |
| 0.37 | 2.54 | 0.53 | 63734 | 0.723 | 0.428 |
| 0.19 | 1.27 | 0.26 | 124234 | 1.057 | 0.165 |
| 0.09 | 0.63 | 0.13 | 161700 | 1.189 | 0.060 |
| Control | Control | Control | 199760 | 1.295 | 0.000 |
| 3.73 | 25.37 | 5.29 | 34350 | 0.414 | 0.680 |
| 2.87 | 19.53 | 4.07 | 41280 | 0.506 | 0.609 |
| 1.46 | 9.89 | 2.06 | 58825 | 0.683 | 0.472 |
| 0.75 | 5.07 | 1.06 | 65567 | 0.738 | 0.430 |
| 0.37 | 2.54 | 0.53 | 83800 | 0.860 | 0.336 |
| 0.19 | 1.27 | 0.26 | 118580 | 1.034 | 0.201 |
| 0.09 | 0.63 | 0.13 | 157100 | 1.174 | 0.093 |
| Control | Control | Control | 196178.000 | 1.285 | 0.000 |
| 3.73 | 25.37 | 5.29 | 34783.333 | 0.420 | 0.673 |
| 2.87 | 19.53 | 4.07 | 37185.000 | 0.452 | 0.648 |
| 1.46 | 9.89 | 2.06 | 59131.000 | 0.685 | 0.467 |
| 0.75 | 5.07 | 1.06 | 68886.333 | 0.728 | 0.434 |
| 0.37 | 2.54 | 0.53 | 85033.667 | 0.805 | 0.374 |
| 0.19 | 1.27 | 0.26 | 116793.667 | 1.025 | 0.202 |
| 0.09 | 0.63 | 0.13 | 162600.000 | 1.191 | 0.073 |

實驗物種：月芽藻； $MCV = 36.806 \mu\text{m}^3$

實驗毒物：Lincomycin + Sulfamethoxazole (TU ratio = 3 : 1)

| Lincomycin (mg/L) | Sulfamethoxazole (mg/L) | Σ TU | Final cells (cells/mL) | μ_{specific} | IR (growth rate) |
|----------------------|----------------------------|-------------|---------------------------|-------------------------|----------------------|
| Control | Control | Control | 241667 | 1.390 | 0.000 |
| 16.23 | 13.00 | 8.00 | 32112 | 0.381 | 0.726 |
| 8.12 | 6.50 | 4.00 | 33880 | 0.407 | 0.707 |
| 4.06 | 3.25 | 2.00 | 45067 | 0.550 | 0.604 |
| 2.03 | 1.63 | 1.00 | 65900 | 0.740 | 0.468 |
| 1.01 | 0.81 | 0.50 | 77800 | 0.823 | 0.408 |
| 0.51 | 0.41 | 0.25 | 131367 | 1.085 | 0.219 |
| 0.25 | 0.20 | 0.12 | 195667 | 1.284 | 0.076 |
| Control | Control | Control | 240480 | 1.387 | 0.000 |
| 16.23 | 13.00 | 8.00 | 33750 | 0.405 | 0.708 |
| 8.12 | 6.50 | 4.00 | 32500 | 0.387 | 0.721 |
| 4.06 | 3.25 | 2.00 | 46167 | 0.562 | 0.595 |
| 2.03 | 1.63 | 1.00 | 60867 | 0.700 | 0.495 |
| 1.01 | 0.81 | 0.50 | 77775 | 0.823 | 0.407 |
| 0.51 | 0.41 | 0.25 | 123600 | 1.055 | 0.240 |
| 0.25 | 0.20 | 0.12 | 206000 | 1.310 | 0.056 |
| Control | Control | Control | 232980 | 1.371 | 0.000 |
| 16.23 | 13.00 | 8.00 | 30600 | 0.356 | 0.740 |
| 8.12 | 6.50 | 4.00 | 31900 | 0.377 | 0.725 |
| 4.06 | 3.25 | 2.00 | 41580 | 0.510 | 0.628 |
| 2.03 | 1.63 | 1.00 | 64800 | 0.732 | 0.467 |
| 1.01 | 0.81 | 0.50 | 80200 | 0.838 | 0.389 |
| 0.51 | 0.41 | 0.25 | 122200 | 1.049 | 0.235 |
| 0.25 | 0.20 | 0.12 | 203525 | 1.304 | 0.049 |
| Control | Control | Control | 238375.667 | 1.383 | 0.000 |
| 16.23 | 13.00 | 8.00 | 32154.000 | 0.381 | 0.725 |
| 8.12 | 6.50 | 4.00 | 32760.000 | 0.390 | 0.718 |
| 4.06 | 3.25 | 2.00 | 44271.333 | 0.541 | 0.609 |
| 2.03 | 1.63 | 1.00 | 67822.333 | 0.724 | 0.476 |
| 1.01 | 0.81 | 0.50 | 96447.333 | 0.828 | 0.401 |
| 0.51 | 0.41 | 0.25 | 125722.333 | 1.063 | 0.231 |
| 0.25 | 0.20 | 0.12 | 201730.667 | 1.299 | 0.060 |

實驗物種：月芽藻；MCV = 36.616 μm^3

實驗毒物：Flumequine + Sulfamethoxazole (TU ratio = 1 : 1)

| Flumequine (mg/L) | Sulfamethoxazole (mg/L) | ΣTU | Final cells (cells/mL) | μ_{specific} | IR (growth rate) |
|----------------------|----------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------|
| Control | Control | Control | 220500 | 1.344 | 0.000 |
| 13.30 | 26.17 | 8.17 | 35450 | 0.430 | 0.680 |
| 6.65 | 13.08 | 4.08 | 37900 | 0.463 | 0.655 |
| 3.33 | 6.54 | 2.04 | 57334 | 0.670 | 0.501 |
| 1.66 | 3.27 | 1.02 | 75025 | 0.805 | 0.401 |
| 1.33 | 2.62 | 0.82 | 86167 | 0.874 | 0.350 |
| 0.67 | 1.31 | 0.41 | 109100 | 0.992 | 0.262 |
| 0.33 | 0.65 | 0.20 | 169600 | 1.213 | 0.098 |
| Control | Control | Control | 222000 | 1.347 | 0.000 |
| 13.30 | 26.17 | 8.17 | 33934 | 0.408 | 0.697 |
| 6.65 | 13.08 | 4.08 | 36760 | 0.448 | 0.667 |
| 3.33 | 6.54 | 2.04 | 55367 | 0.653 | 0.515 |
| 1.66 | 3.27 | 1.02 | 78925 | 0.830 | 0.384 |
| 1.33 | 2.62 | 0.82 | 88067 | 0.885 | 0.343 |
| 0.67 | 1.31 | 0.41 | 115234 | 1.019 | 0.243 |
| 0.33 | 0.65 | 0.20 | 166440 | 1.203 | 0.107 |
| Control | Control | Control | 218080 | 1.338 | 0.000 |
| 13.30 | 26.17 | 8.17 | 32434 | 0.386 | 0.712 |
| 6.65 | 13.08 | 4.08 | 36534 | 0.445 | 0.667 |
| 3.33 | 6.54 | 2.04 | 55434 | 0.654 | 0.512 |
| 1.66 | 3.27 | 1.02 | 83334 | 0.857 | 0.359 |
| 1.33 | 2.62 | 0.82 | 84300 | 0.863 | 0.355 |
| 0.67 | 1.31 | 0.41 | 120725 | 1.043 | 0.221 |
| 0.33 | 0.65 | 0.20 | 150934 | 1.154 | 0.137 |
| Control | Control | Control | 220193.333 | 1.343 | 0.000 |
| 13.30 | 26.17 | 8.17 | 33939.333 | 0.408 | 0.696 |
| 6.65 | 13.08 | 4.08 | 37064.667 | 0.452 | 0.663 |
| 3.33 | 6.54 | 2.04 | 56045.000 | 0.659 | 0.509 |
| 1.66 | 3.27 | 1.02 | 82808.667 | 0.831 | 0.381 |
| 1.33 | 2.62 | 0.82 | 93822.333 | 0.874 | 0.349 |
| 0.67 | 1.31 | 0.41 | 115019.667 | 1.018 | 0.242 |
| 0.33 | 0.65 | 0.20 | 162324.667 | 1.190 | 0.114 |

實驗物種：月芽藻； $MCV = 37.683\mu\text{m}^3$

實驗毒物：Flumequine + Sulfamethoxazole (TU ratio = 1 : 3)

| Flumequine (mg/L) | Sulfamethoxazole (mg/L) | ΣTU | Final cells (cells/mL) | μ_{specific} | IR (growth rate) |
|----------------------|----------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------|
| Control | Control | Control | 237000 | 1.380 | 0.000 |
| 4.37 | 25.37 | 5.22 | 41167 | 0.505 | 0.634 |
| 2.18 | 12.68 | 2.61 | 67134 | 0.749 | 0.457 |
| 1.09 | 6.34 | 1.30 | 69950 | 0.770 | 0.442 |
| 0.55 | 3.17 | 0.65 | 83734 | 0.860 | 0.377 |
| 0.27 | 1.58 | 0.33 | 99300 | 0.945 | 0.315 |
| 0.14 | 0.79 | 0.16 | 138467 | 1.111 | 0.195 |
| 0.07 | 0.40 | 0.08 | 190467 | 1.271 | 0.079 |
| Control | Control | Control | 217467 | 1.337 | 0.000 |
| 4.37 | 25.37 | 5.22 | 40734 | 0.500 | 0.626 |
| 2.18 | 12.68 | 2.61 | 66667 | 0.746 | 0.442 |
| 1.09 | 6.34 | 1.30 | 69675 | 0.768 | 0.426 |
| 0.55 | 3.17 | 0.65 | 79000 | 0.831 | 0.379 |
| 0.27 | 1.58 | 0.33 | 119060 | 1.036 | 0.225 |
| 0.14 | 0.79 | 0.16 | 154634 | 1.167 | 0.128 |
| 0.07 | 0.40 | 0.08 | 188134 | 1.265 | 0.054 |
| Control | Control | Control | 222834 | 1.349 | 0.000 |
| 4.37 | 25.37 | 5.22 | 47700 | 0.578 | 0.571 |
| 2.18 | 12.68 | 2.61 | 65900 | 0.740 | 0.451 |
| 1.09 | 6.34 | 1.30 | 70334 | 0.773 | 0.427 |
| 0.55 | 3.17 | 0.65 | 82475 | 0.852 | 0.368 |
| 0.27 | 1.58 | 0.33 | 104700 | 0.972 | 0.280 |
| 0.14 | 0.79 | 0.16 | 154167 | 1.165 | 0.137 |
| 0.07 | 0.40 | 0.08 | 170125 | 1.214 | 0.100 |
| Control | Control | Control | 225767.000 | 1.355 | 0.000 |
| 4.37 | 25.37 | 5.22 | 43200.333 | 0.528 | 0.611 |
| 2.18 | 12.68 | 2.61 | 66567.000 | 0.745 | 0.450 |
| 1.09 | 6.34 | 1.30 | 69986.333 | 0.770 | 0.432 |
| 0.55 | 3.17 | 0.65 | 86925.000 | 0.848 | 0.375 |
| 0.27 | 1.58 | 0.33 | 120742.333 | 0.984 | 0.273 |
| 0.14 | 0.79 | 0.16 | 149089.333 | 1.148 | 0.153 |
| 0.07 | 0.40 | 0.08 | 182908.667 | 1.250 | 0.078 |

實驗物種：月芽藻；MCV = 36.936 μm^3

實驗毒物：Flumequine + Sulfamethoxazole (TU ratio = 3 : 1)

| Flumequine (mg/L) | Sulfamethoxazole (mg/L) | ΣTU | Final cells (cells/mL) | μ_{specific} | IR (growth rate) |
|----------------------|----------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------|
| Control | Control | Control | 202620 | 1.302 | 0.000 |
| 20.00 | 13.03 | 8.02 | 30200 | 0.350 | 0.731 |
| 10.00 | 6.52 | 4.01 | 37634 | 0.460 | 0.647 |
| 5.00 | 3.26 | 2.00 | 38400 | 0.470 | 0.639 |
| 2.50 | 1.63 | 1.00 | 61834 | 0.708 | 0.456 |
| 1.25 | 0.81 | 0.50 | 134467 | 1.097 | 0.157 |
| 0.62 | 0.41 | 0.25 | 168160 | 1.208 | 0.072 |
| 0.31 | 0.20 | 0.13 | 201700 | 1.299 | 0.002 |
| Control | Control | Control | 204080 | 1.305 | 0.000 |
| 20.00 | 13.03 | 8.02 | 35334 | 0.428 | 0.672 |
| 10.00 | 6.52 | 4.01 | 36050 | 0.438 | 0.664 |
| 5.00 | 3.26 | 2.00 | 43734 | 0.535 | 0.590 |
| 2.50 | 1.63 | 1.00 | 58200 | 0.678 | 0.481 |
| 1.25 | 0.81 | 0.50 | 134650 | 1.097 | 0.159 |
| 0.62 | 0.41 | 0.25 | 167705 | 1.207 | 0.075 |
| 0.31 | 0.20 | 0.13 | 210400 | 1.320 | -0.012 |
| Control | Control | Control | 214950 | 1.331 | 0.000 |
| 20.00 | 13.03 | 8.02 | 35234 | 0.427 | 0.679 |
| 10.00 | 6.52 | 4.01 | 38725 | 0.474 | 0.644 |
| 5.00 | 3.26 | 2.00 | 39900 | 0.489 | 0.633 |
| 2.50 | 1.63 | 1.00 | 67334 | 0.751 | 0.436 |
| 1.25 | 0.81 | 0.50 | 144667 | 1.133 | 0.149 |
| 0.62 | 0.41 | 0.25 | 167250 | 1.206 | 0.094 |
| 0.31 | 0.20 | 0.13 | 202000 | 1.300 | 0.023 |
| Control | Control | Control | 207216.667 | 1.313 | 0.000 |
| 20.00 | 13.03 | 8.02 | 33589.333 | 0.402 | 0.694 |
| 10.00 | 6.52 | 4.01 | 37469.667 | 0.458 | 0.652 |
| 5.00 | 3.26 | 2.00 | 40678.000 | 0.498 | 0.621 |
| 2.50 | 1.63 | 1.00 | 86667.000 | 0.712 | 0.458 |
| 1.25 | 0.81 | 0.50 | 149159.000 | 1.109 | 0.155 |
| 0.62 | 0.41 | 0.25 | 167705.000 | 1.207 | 0.080 |
| 0.31 | 0.20 | 0.13 | 204700.000 | 1.307 | 0.004 |

實驗物種：月芽藻； $MCV = 40.142 \mu\text{m}^3$

實驗毒物：Lincomycin + Sulfamethoxazole + Flumequine

| Conc, (mg/L) | Final cells (cells/mL) | μ_{specific} |
|--------------|------------------------|-------------------------|
| Control | 242225 | 1.391 |
| MEC | 274900 | 1.454 |
| Control | 274350 | 1.453 |
| MEC | 260767 | 1.428 |
| Control | 249480 | 1.406 |
| MEC | 260400 | 1.427 |
| Control | 255351.667 | 1.417 |
| MEC | 265355.667 | 1.436 |

MEC = measured environmental concentration

實驗物種：水蚤

實驗毒物：Lincomycin + Sulfamethoxazole + Flumequine

| Conc. | Number of live organisms | Survival (%) |
|---------|--------------------------|--------------|
| Control | 20 | 100 |
| MEC | 20 | 100 |

實驗物種：鯉魚

實驗毒物：Lincomycin + Sulfamethoxazole + Flumequine

| Conc. (mg/L) | Number of live organisms | Survival (%) |
|--------------|--------------------------|--------------|
| Control | 8 | 80 |
| MEC | 10 | 100 |
| Control | 10 | 100 |
| MEC | 10 | 100 |