

## 第二章、文獻回顧

### 2.1 毒性物質— 除草劑

#### 2.1.1 除草劑的分類

除草劑在台灣農業市場佔舉足輕重之地位，以數量而言，2002 年除草劑之總銷售量為 16,492 公噸，約是總農藥銷售量的 40%左右；以銷售金額而言，2002 年為 14 億新台幣，約為農藥市場 25%的總銷售金額。<sup>[14]</sup>



Table 2.1.1 2002 年國內成品農藥銷售表<sup>[14]</sup>

類 別	數量(公噸)	總銷量百分比 %	金額(千元)	總銷售百分比 %
殺蟎劑 Acaricide	391	0.93	143,970	2.6
殺菌劑 Fungicide	5,104	12.12	1,497,013	27.0
除草劑 Herbicide	16,492	39.15	1,390,531	25.0
殺蟲劑 Insecticide	18,749	44.51	2,392,922	43.1
其他 Others	1387	3.29	127,294	2.3
總計 Total	42,123	100	5,551,730	100.0

資料來源：本會農糧處依據海關通關進口成品農藥及臺灣區農藥工業公會之成品內銷統計。

一般常見的除草劑依其原理，大致上包括抑制光合作用型、生長素型、抑制脂質合成型及抑制氨基酸合成型等數種類型。<sup>[15]</sup>

HRAC (Herbicide Resistance Action Committee) 更在 2002 年將 254 種除草劑依作用目標位置分成近 21 類，再依其化學成份分為超過 70 種以上的子類。<sup>[3]</sup>

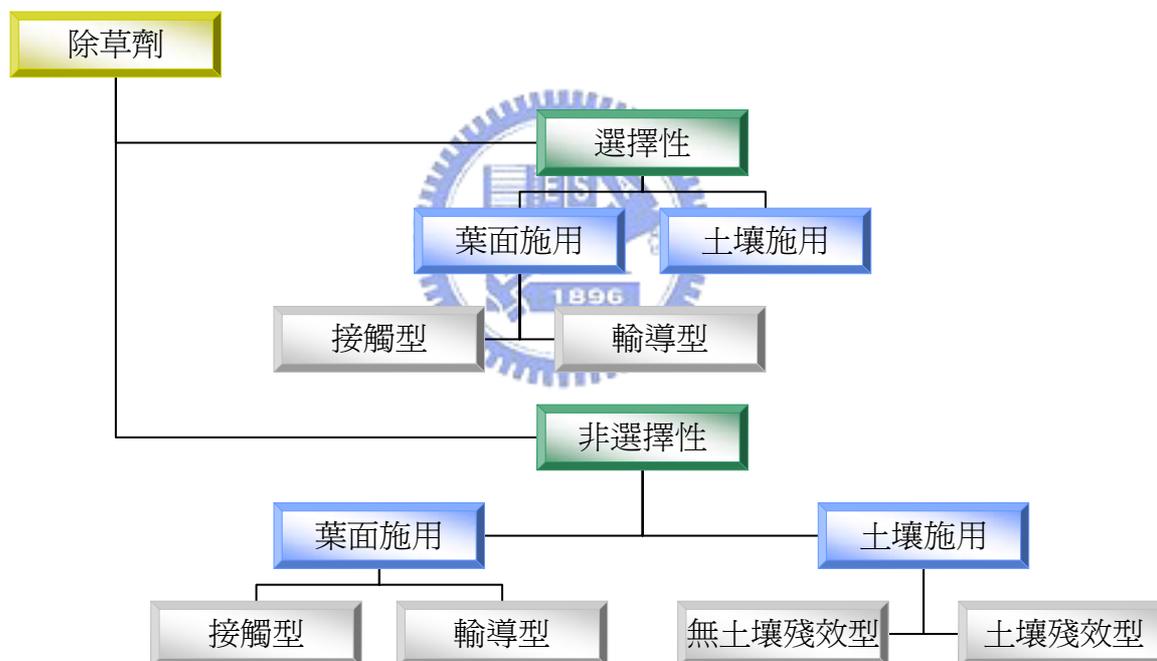


Fig. 2.1.1 除草劑的用法及生理分類

Table 2.1.2 Herbicide resistant weeds summary table <sup>(16)</sup>

<b>Herbicides Group</b>	<b>Mode of Action</b>	<b>HRAC Group</b>	<b>Example Herbicides</b>	<b>Total</b>
ACCCase inhibitors	Inhibition of acetyl CoA carboxylase (ACCCase)	A	Diclofop-methyl	27
ALS inhibitors	Inhibition of acetolactate synthase ALS (acetohydroxyacid synthase AHAS)	B	Chlorsulfuron	70
Photosystem II inhibitors	Inhibition of photosynthesis at photosystem II	C1	Atrazine	63
Ureas and amides	Inhibition of photosynthesis at photosystem II	C2	Chlorotoluron	20
Nitriles and others	Inhibition of photosynthesis at photosystem II	C3	Bromoxynil	1
Bipyridyliums	Photosystem-I-electron diversion	D	Paraquat	21
Carotenoid biosynthesis inhibitors	Bleaching: Inhibition of carotenoid biosynthesis at the phytoene desaturase step (PDS)	F1	Flurtamone	1
Triazoles, ureas, Isoxazolidinones	Bleaching: Inhibition of carotenoid biosynthesis (unknown target)	F3	Amitrole	4
Glycines	Inhibition of EPSP synthase	G	Glyphosate	4
Dinitroanilines and others	Microtubule assembly inhibition	K1	Trifluralin	10
Mitosis inhibitors	Inhibition of mitosis / microtubule organisation	K2	Propham	1
Chloroacetamides and others	Inhibition of VLCFAs (Inhibition of cell division)	K3	Butachlor	2
Thiocarbamates and others	Inhibition of lipid synthesis - not ACCase inhibition	N	Triallate	6
Synthetic auxins	Synthetic auxins (action like indole acetic acid)	O	2,4-D	21
Organoarsenicals	Unknown	Z	MSMA	1
Arylamino propionic acids	Unknown	Z	Flamprop -methyl	1
Pyrazolium	Unknown	Z	Difenzoquat	1
<b>Total Number of Unique Herbicides Resistant Biotypes</b>				<b>254</b>

Table 2.1.3 Herbicide resistant weeds of this investigation

HRAC Group	Mode of Action	Chemical Family	Herbicides	WSSA Group
C1	Inhibition of photosynthesis at photosystem II	Triazines	Desmetryne	5
		Triazinones	Hexazinone Metribuzin	
		Uracils	Bromacil	
C2	Inhibition of photosynthesis at photosystem II	Ureas	Monolinuron	7
			Ethidimuron	
			Fenuron	
			Tebuthiuron	
C3	Inhibition of photosynthesis at photosystem II	Benzothiadiazinone	Bentazon	6
K1	Microtubule assembly inhibition	Dinitroanilines Benzamides Carbamates	Oryzalin	3
			Propyzamide	
			Tebutam	
K2	Inhibition of mitosis / microtubule organisation		Carbetamide	23
K3	Inhibition of VLCFAs (Inhibition of cell division)		Dimethachlor	15
O	Action like indole acetic acid (synthetic auxins)	Benzoic acids  Pyridine carboxylic acids	Propachlor	4
			Dicamba	
			Chloramben	
			Clopyralid Picloram Triclopyr	

(1) 抑制光合作用系統 II (Inhibition of photosynthesis at photosystem II) 型：

依照不同鏈結行為可再細分為 C1、C2 和 C3 類。

C1 如 Triazines 類 (例：Desmetryne、Atrazine 等)；Triazinones 類 (如：Hexazinone、Metribuzin 等)；Uracils 類 (如：Bromacil 等)；Triazolinone 類；Pyridazinones 類；Phenyl-carbamates 類。

C2 有 Ureas 類 (例：Monolinuron、Ethidimuron、Fenuron、Tebuthiuron 等) 及 Amides 類。

C3 有 Benzothiadiazinone 類 (如：Bentazon 等)；Nitriles 類及 Phenyl-pyridazines 類。

其中 Triazines 類除草劑會藉著佔據 D1 蛋白質上的活性位置 (QB-binding niche) 來干擾植物光合作用。<sup>[17]</sup> 阻礙植物體的光合作用光反應系統 II (PS II) 中，電子傳遞鏈 (electron transport chain) 的運行，最終使得光能無法轉換成能提供植物生長足夠的能量，而造成植物體的死亡。<sup>[18,19]</sup>

此類是屬於典型的光合作用抑制型 (photosynthetic inhibitor) 的除草劑，在葉片進行光合作用時先由捕光系統吸收光能使葉綠素分子呈激發狀態，迅速光解水分子，而將取得之電子傳遞到光系統 II (PS II) 之第一個電子接受者 Q<sub>A</sub> (PS II primary electron acceptor)，接受電子依序傳遞至 PQ 粒醌 (plastoquinone)，再進入光反應系統 I (PS I)，以完成電子傳送進行光合作用。<sup>[20,21]</sup> 當施用此類除草劑於植株上，除草劑會與電子傳送過程口之 Q<sub>B</sub> (PS II secondary electron acceptor) 上的 D1 polypeptide 相結合，

改變  $Q_B$  氧化還原電位，降低其與電子之親和力，使  $Q_A$  降低電子傳遞效率，一旦電子傳遞受到阻礙，植株之光合作用便無法正常進行，進而影響植株之生理反應而影響植株之正常生長，以達到藥劑除草之效用。<sup>(15,22-26)</sup>

以本達隆 (Bentazon) 為例，雜草葉面噴施本達隆後，會抑制雜草光合作用的電子傳遞鏈，導致光合作用受阻，葉綠體降解 (Degradation)，<sup>(27,28)</sup> 植物的葉片會出現褐化及捲曲現象。

(2) 干擾植物體細胞分裂型，再分為 K1、K2 和 K3。

微管形成抑制型 (Microtubule assembly inhibition)，K1，有 Dinitroanilines 類 (如：Oryzalin 等)；Benzamides 類 (Propyzamide、Tebutam 等)；Pyridines 類；Phosphoramidates 類及 Benzoic acids 類。

有絲分裂和微管組織的抑制型 (Inhibition of mitosis / microtubule organisation)，K2，有 Carbamates 類 (例：Carbetamide 等)。

抑制長鏈脂肪酸型 (Inhibition of VLCFAs (Inhibition of cell division))，K3，有 Chloroacetamides 類；Acetamides 類；Oxyacetamides 類；Tetrazolinones 類及其他類 (如：Dimethachlor、Propachlor 等)。

大部分 Chloroacetamides 類除草劑的作用機制都很相似，靠著透過干擾細胞分裂與增大而產生的生長抑制，是針對植物體早期的生長，不過這類的除草劑僅對幼苗的效果較顯著，對種子的發芽作用反而起不了太大的功效。

(3) 生長素類型 (synthetic auxins)，O，有 Phenoxy-carboxylic-acids 類；Benzoic acids 類 (例：Dicamba、Chloramben 等)；Quinoline

carboxylic acids 類；Pyridine carboxylic acids 類（Clopyralid、Picloram、Triclopyr 等）及其他等。

生長素（auxins）是五大植物荷爾蒙之一，和乙烯（ethylene）、離層酸（ABA）、激勃素（GA）及細胞分裂素（cytokinin）共同調節植物的生長與發育。

主要是類似 IAA 荷爾蒙（Action like indole acetic acid）的行為，摹擬生長素的作用。此類生長素類型除草劑（Auxin-type herbicides）是最早被研究開發的除草劑，其對某些植物具有選擇性，在農業上用來防治闊葉雜草已經有五十年之久。生長素類型除草劑具有類似 auxin 的植物生長素作用，一旦進入植物體，會造成植物組織內生長素分佈失去平衡，干擾植物的正常生長。生長素類型除草劑對植物的影響，在植物生長方面包括導致異常生長，促進植物細胞分裂與分化，使體內產生快速增殖，植物各部位器官扭曲、腫大畸形，以及減少株高、產量，延遲成熟期，增加種子中蛋白質，減少種子發芽和重量等；在生化方面，包括影響酵素、氨基酸的儲存、利用及蛋白質酵素的合成等；在毒害作用上包括促使細胞質變大、分裂，植株壞死、乾燥、衰老等現象。<sup>[29]</sup>

生長素類型除草劑會藉由引誘 ACCase 的活性來刺激乙烯的生成，在易受影響的雙子葉植物中，乙烯的增加會引起離層酸（ABA）的累積；在易受影響的草本植物中，會造成組織薄膜中氰化物（HCN）量的上升，而上述的情形則會影響植物生長，產生葉的上偏性、生長妨礙及老化。<sup>[30]</sup>

## 2.1.2 除草劑之作用機制

(1) 作用模式 (mode of action) :

指除草劑進入環境中而造成植物體死亡的整個事件。

(2) 作用機制 (mechanism of action) :

導致植物死亡之主要生化或生物物理性傷害。

(3) 作用位置 (site of action) :

與植物毒性之關係決定於作用位置內部的潛在穩定性和對於作用位置的潛在活性。

## 2.1.3 除草劑對植物的毒性 (Phytotoxicity) 與藥害



除草劑施用到植物上是如何干擾正常生理作用的進行導致植株死亡？基本上一個外來化合物在發生作用前必需先進入到細胞內的目標位置 (target site)，而此目標位置通常是指對藥劑反應最敏感之生理生化作用進行時的所在部位；如葉綠體內囊膜 (thylakoid membrane) 上的 D1 protein，為許多 PS II 抑制劑之結合位置，會降低光合作用電子傳遞效率，同時產生具活性物種引起過氧化作用破壞膜完整性，其他脂質及胺基酸合成路徑所需的特定酵素，和生長素的受體 (receptor) 亦可成為除草劑的作用位置。有些除草劑需要經過生物活化作用 (bioactivation) 才具有植物毒性；如巴拉刈在光照下促使類囊膜上產生有毒的  $O_2 \cdot -$ ，MCPA 和 2,4-D 的 ester form 在感性品系內經過  $\beta$ -oxidation 後才會轉變成具生物活性的 acid form，同樣在一些禾本科除草劑 (aryloxyphenoxypropionates) 也有經水解、氧化、還原或具可逆性的共軛作用，使藥劑產生生物活性。<sup>[31]</sup>

除草劑會抑制敏感性植物生長或引起構造上改變，最後導致死亡，其病徵主要為：<sup>(32)</sup>

(1) 抑制細胞分裂或有絲分裂，使得紡錘絲不正常而形成多核型、液胞化或巨大化之細胞，此病徵常發生於根尖生長點，但有些除草劑如 2,4-D 是抑制位於頂端分生組織之成熟的薄壁細胞。

(2) 改變組織分化作用，通常是由於不正常細胞分裂或細胞巨大所造成，會導致闊葉植物接近地表的莖之木質部的分化受到干擾而形成脆弱的莖。

(3) 下垂生長 (epinasty)：包括有彎曲、旋轉及捲曲等莖葉生長方式，通常是伴隨著細胞分裂、細胞巨大及組織分化等改變而出現，一般荷爾蒙型除草劑 (auxin-like herbicide) 等處理後會出現上述病徵。



(4) 葉片黃化、白化：為光合作用抑制型 (photosynthesis-inhibiting)，通常是葉綠體發育不正常或膜遭破壞所致。

(5) 葉片壞疽，一般為接觸型 (contact-type) 除草劑如 diquat、paraquat、bromoxynil 等處理後 1-3 天，由於細胞膜瓦解而造成。

除草劑或有毒的衍生物等皆會干擾植物正常代謝作用，導致自由基的產生，使細胞膜上不飽和脂肪酸發生過氧化作用，若植物無法適時利用抗氧化物 (如 glutathione、vitamin C、vitamin E) 來清除自由基，則會傷害細胞膜，破壞細胞膜的完整性，造成細胞結構瓦解，而使葉片發生白化、壞疽等現象。<sup>(32)</sup>

## 2.2 農藥對環境的影響

### 2.2.1 農藥污染環境之途徑<sup>[33]</sup>

關於農藥的污染問題，已成為近年來人們十分注意的重要環境污染源之一。農藥對環境的影響，是由於直接污染了空氣、水系、土壤與作物，然後經由生物濃縮及食物鏈造成生態系統的變化。

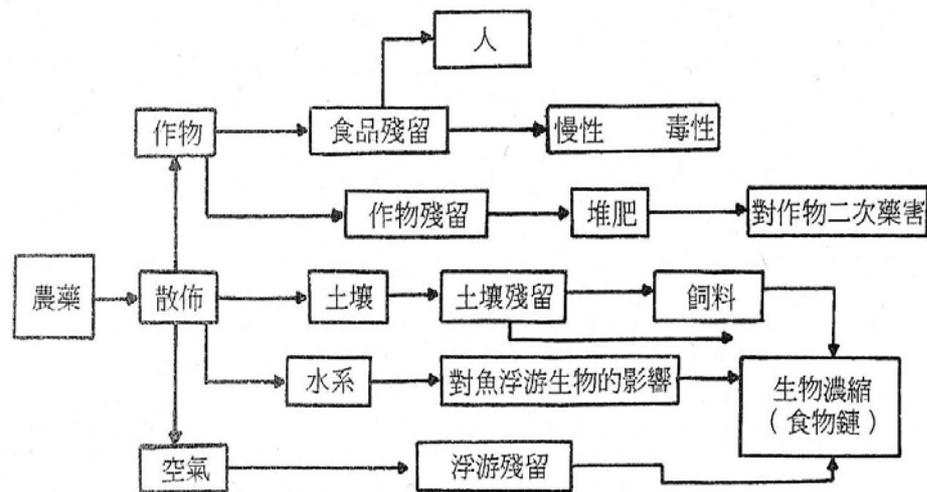


Fig. 2.2.1 The pathway of pesticides pollution<sup>[33]</sup>

### 2.2.2 農藥污染的特點<sup>[33]</sup>

- (1) 生物產生抗性：由於大量使用農藥的事實證明，長期連續使用農藥，特別是單一使用某種農藥，常使一些有害生物，例如昆蟲產生對化學藥品的抗性。

(2) 長期積累環境：由於一些農藥不易生物降解，在環境中可存留若干年。雖然這種特性對防治某些病蟲害可能是有利的，但當化合物轉移到環境的其它部份時，便是一種危害。

(3) 傷害了天敵：使用農藥傷害天敵的事例很多。一般之農牧區鼠害嚴重，鳥類減少，生態平衡失調，重要原因之一是農藥的影響。

(4) 對其它生物的傷害：長期使用農藥除殺死害蟲外，對其它生物，例如魚、野生動物、土壤與植物區系帶來影響。

除草劑的使用可使某些雜草減少，有利於作物生長，但亦有副作用，雜草減少使某些以雜草為食的昆蟲轉而以作物為食，因而增加了危害作物害蟲之種類。由此可知，使用農藥雖然為增產帶來巨大好處，但也給一般農業生態環境產生極大的破壞作用。由於自然界的農藥積累，必然會影響到生活在其中的各種動物，經由食物鏈及藥劑殘留，而引起生物各種生理習性之變化，因而導致種群組成與群體數的變化，破壞所謂的生態平衡。

農藥在環境中分解 (Degradation) 途徑的研究包括水解 (Hydrolysis)，水中光分解 (Photolysis in the water)，土壤中光分解 (Photolysis in the soil) 和生物分解 (Biodegradation in the soil)，空氣中光分解 (Photolysis in the air)。

農藥進入水生生態系中，可能會經由水解變成新化合物，依種類性質的不同、有的在酸性條件下水解，有些在鹼性條件下水解。評估農藥之光分解，通常這些反應是在自然水中 [34] 和氣相中 [35] 都會發生的，利用直接光分解與間接光分解反應，直接光分解係農藥吸收輻射線產生化學反應質 (Photosensitizers) 吸收陽光，引起農藥分子產生化學反應，進而改

變化合物成分；影響光分解的因素有光強度，波長分布，日夜與季節性、陽光中紫外光成分的變化，強烈陽光中的紫外線會使農藥分解，至於落在地表上的農藥，一部份可能為植物根部吸收，但絕大部份還是存在土壤裡。

農藥在土壤光分解 (Photolysis in the soil) 是由於農藥在土壤環境是被吸附在腐植質表面，這些腐植質含酮及 Quinoid 可將吸收紫外光能轉移到農藥分子上導致農藥光解速率增加。另外，農藥在環境中也可能經由生物間分解、代謝而消失。生物分解速率，途徑與程度隨著水的酸鹼度，化學性質，氧氣，有機質含量以及沈積物的型式而異。

農藥在生物體內的累積量是經由吸收、分佈、代謝與排泄過程互相競爭的結果。另外，農藥本身的脂溶性、溶解度、解離程度、化學穩定性、分子大小與形狀等都是影響農藥進入生物體的條件因素之一。<sup>[36]</sup>



## 2.3 農藥之毒理特性<sup>[14]</sup>

凡物質過量導致人體、生物之負面健康效應時即具有毒性，大部分農藥適量使用對人、畜及環境並不具毒性，亦不會造成不良影響。農藥對人畜的毒性 (toxicity) 高低常受接觸農藥的時間、次數與數量而定，即使微量的低毒性農藥，如果是長時間接觸，累積下來的劑量必定很高，就會造成人畜中毒的現象。同樣的道理，短時間偶爾接觸較毒的農藥，所接觸到農藥劑量不一定很高，也就不一定會發生中毒。

毒物進入人體的途徑為經口、呼吸及皮膚，因此農藥急毒性分類包括口服毒、呼吸毒及皮膚毒。而各種農藥因進入人體的途徑不同，其所顯現的毒性有時是一致的，有時是有相當大的不同，因此要看一種藥劑對人類毒性的高低如何，就得比較是經由口服或皮膚，或是呼吸系統的毒性，才是比較正確的一種研判方法。農藥進入人體必須轉移至作用的部位如肝、肺、腎或神經系統，且達一定的量才会有中毒現象。

農藥依其毒性不同，會造成環境或人體可復原或不可復原的毒害現象，一些能對環境或人類造成不可恢復毒害的農藥，如 DDT 等有機氯烴劑，在土壤的殘留期甚長，不易分解，且能經由食物鏈累積於動物的脂肪中；除草劑中的「Nitrofen」則會造成胚胎畸型；有機汞劑累積於人體，嚴重危害人類健康等。

農藥之毒性廣義可分為對哺乳動物急性、慢性毒性及對生態環境之影響（包括對水生物、鳥類之急性、慢性毒性、蜜蜂蚯蚓等有益生物毒性等）。

農藥之急性毒性係以農藥對哺乳動物（大鼠）之經口服、皮膚、呼吸毒性試驗之半數致死劑量（LD<sub>50</sub>）或半數致死濃度（LC<sub>50</sub>）來判定毒性大小，此外亦需考量農藥對哺乳動物之眼刺激性試驗、皮膚刺激性及過敏性試驗，以作為其殘留對使用者之急性暴露風險評估。農委會參考國際農藥毒性分類規定，將農藥依其對哺乳動物之口服及皮膚急性毒性分為四級：極劇毒、劇毒、中等毒、輕毒（含低毒）農藥。劇毒農藥中以有機磷劑居多，其次為氨基甲酸鹽劑及薰蒸劑；巴拉刈因無解毒劑且易誤食中毒死亡，亦列入劇毒農藥管理。

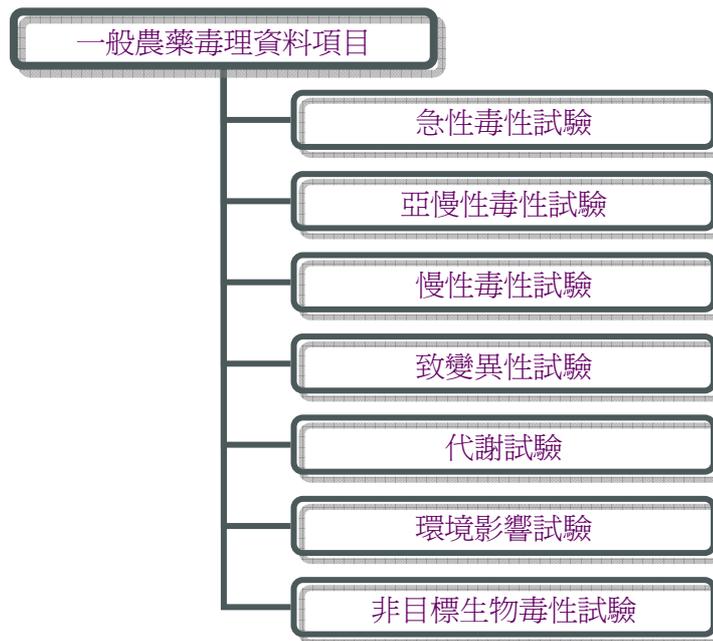


Fig. 2.3.1 Toxicology data requirement for pesticide registration <sup>(14)</sup>



農藥之慢性毒性一般係指農藥長期使用對哺乳動物之毒性及影響。目前新農藥登記均需嚴格審核其急性毒性及慢性毒理資料如長期餵食毒性、致癌性、致畸胎性及生育毒性等，一般以大鼠及狗進行長期餵食毒性，以大鼠及小鼠進行致癌性試驗，以大鼠及白兔進行致畸胎性試驗，並以大鼠進行至少二代之生育毒性試驗。主要即審查該農藥長期使用或餵食哺乳動物之毒性、症狀或不良影響，並確定其無毒害藥量 (NOEL)，以作為其殘留對消費者長期暴露之風險評估，並訂定殘留安全容許量。

農藥水生物毒性係依農藥對水生物毒性試驗之半數致死濃度 ( $LC_{50}$ ) 或半數效應濃度 ( $EC_{50}$ ) 來判定毒性大小，毒性試驗一般以原體進行，藥劑使用於水域 (包括水稻田) 或原體魚毒高時 ( $LC_{50} < 0.5\text{mg/L}$ ) 應以成品進行魚毒試驗，試驗魚應包括一種冷水魚 (如虹鱒) 及一種溫水魚類 (如鯉魚)。試驗項目包括：淡水魚類急毒性 (Freshwater fish  $LC_{50}$ ) 淡水無脊

椎生物急毒性 (Freshwater invertebrate EC<sub>50</sub>)，農藥對水生物毒性分類如下表：

Table 2.3.1 Classification of pesticides in aquatic toxicity<sup>(14)</sup>

水生物毒性分類	淡水魚類急毒性 LC <sub>50</sub> (96hr) (mg/l)	淡水無脊椎生物急毒性 EC <sub>50</sub> (48hr) (mg/l)
劇毒 I	≤ 1	≤ 1
中等毒 II	> 1-≤ 10	> 1-≤ 10
輕毒 III	> 10-≤ 100	> 10-≤ 100
低毒 IV	> 100	> 100

註：淡水魚類：以虹鱒 (Rainbow trout)，藍鰭 (Bluegil l) 或鯉魚 (carp) 為主。  
淡水無脊椎生物：以 Daphnidae 科之水蚤為主。

在大部分毒性研究中，幾乎是以動物界為試驗物種當作探討的對象，其實以往報告中也有不少主要針對各類藻種作實驗物種所進行的研究，如 green algae (*Selenastrum capricornutum* 或 *Scenedesmus subspicatus*) 或 diatom, diatomophyta (*Navicula accommoda*)、cyanophyta (*Oscillatoria limnetica*)等，乃是較為常見的農藥毒性試驗物種；<sup>(37-40)</sup>可是對於這方面的實驗實例還是相當缺乏，無法完善的表達出確實的反應結論。因為如此，根據 Julia 和 Thomas<sup>(41)</sup>兩位學者後來的調查，就對多種不同藻類與植物於農藥及有機毒物、重金屬間的毒性反應試驗，由實驗中找出較敏感物種，以訂立毒物的資料庫；Lewis<sup>(42,43)</sup>也曾對於藻類試驗與魚毒、植物做比較性研究，發現藻類試驗可判定為較敏感物種，且反應的時間可以更為縮短；加上有成本上的考量，也較為經濟。但綜觀至今，所有的實驗方法還是相當的分歧，需要長時間作整合。

## 2.4 藻類毒性試驗

在生態系統中，水生植物扮演著非常重要的角色，可以藉由轉換太陽能及二氧化碳為有機物來維持生長。有機物則是水中生態系統中像食草動物或雜食動物的食物來源之一。除此之外，水生植物在養份的攝取、儲存、釋放及沈澱上也相當重要。<sup>[44]</sup>

來自人類活動的干擾，像是將毒性物質帶入水生生態系中，會改變水中植物群落的結構及功能。<sup>[45,46]</sup> 藻類也已經在各個實驗中顯示其對污染物的不同敏感性，像是有機氯殺蟲劑<sup>[47]</sup>、工業有機物<sup>[48]</sup>、金屬<sup>[49,50]</sup> 等及除草劑<sup>[51,52]</sup>。

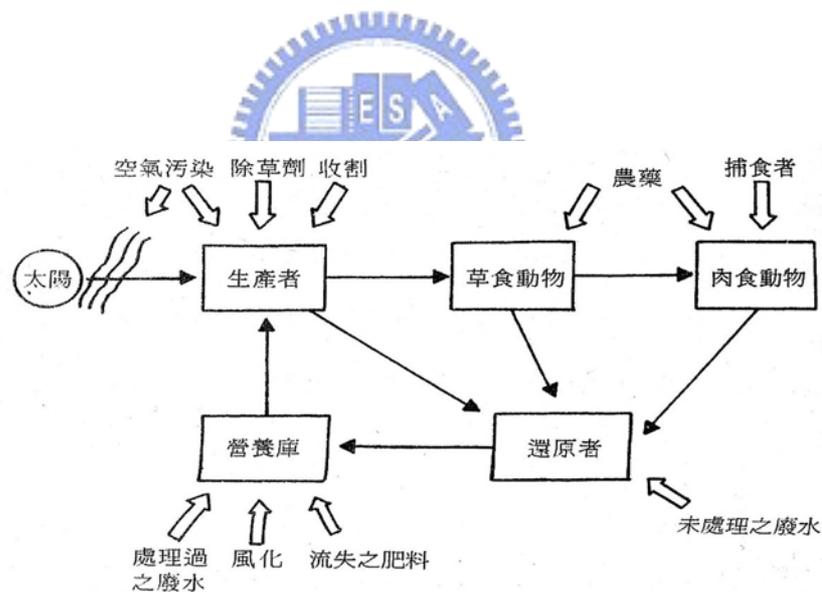


Fig. 2.4.1 The pathway of the interrupted balance in ecosystem by human's activities<sup>[34]</sup>

Thomas JM, *et al.*<sup>[47]</sup> 所做的評估試驗中發現，月芽藻相對於其他物種，如水蚤、蚯蚓或 Microtox 等生物試驗來的較敏感。Klaine and Lewis<sup>[48]</sup> 兩位學者也指出水生植物比其他動物系的生物來的敏感性較佳。

藻類毒性試驗在近幾十年來已經發展的相當完善，依實驗技術可以分為批次式及連續式。但批次式的實驗比較無法表現出自然水體的真實狀況，pH 值也較不容易穩定，一開始所加入的飽和基質更是降低了試驗的敏感度。但若是在基質受限的條件下，藻類對毒性物質的容忍度會下降。<sup>[53]</sup>而連續式的實驗方法是指基質能持續的入流，而代謝物也能不斷地排出，較符合自然水體的情況，也少了批次式受基質影響而產生的誤差，連續式的實驗條件就顯得較困難且麻煩了。因此，評估化學物質的毒性時的實驗大多屬於批次式的方法 (U. S. EPA, OECD, ASTM, ISO 等)。<sup>[54-57]</sup>

在進行藻類毒性評估時，需考慮能正確反應藻類生長的參數，才能以此訂出實驗的觀測終點 (end-point) 反應出藻類受毒物抑制情形。一般批次式實驗量測藻類生長的參數有下列幾種：細胞密度 (cell density、biomass、growth rate)、乾重、細胞總體積 (total cell volume)、葉綠素 (chl-a)、活體內螢光值、營養基濁度、產氧量、碳源攝取量、ATP 及 DNA 等，而選擇量測藻類生長情況之方法的考慮有精密度、敏感度、偵測極限、量測時間、所需樣品量及儀器設備之需求等等，研究人員基於實驗室器材設備的可用性和研究問題的性質來選擇適當的實驗參數和方法，且在達到觀測終點時，測定生物質量 (biomass) 以瞭解生長狀況。所謂生物質量，最直接的測定方法就是量測生物乾重和數目。在 Christensen *et al.*<sup>[58]</sup> 提到以生物質量 (biomass) 求得的抑制率定為實驗參數較其它參數如總細胞數目和細胞體積為佳。但直接量測生物乾重十分費時且程序繁瑣，於是間接量測生物乾重的方法便因應而生，例如利用電子顆粒計數器、光學顆粒計數器等，而這些方法不僅簡單、快速，需要的藻液量也比較少，且與生物乾重間有良好的相關性。此外溶氧測定也擁有成本低廉、量測時間較短等優點。

但是當傳統批次式的試驗在遇到屬於揮發性的化學物質時，卻有可能因實驗過程中的散失而造成毒物濃度上的誤差。主要的原因在於上述之試驗方法皆屬於一個開放式系統 (Open System) 或非完全密閉的試驗空間。一般開放式之藻類毒性試驗，提供激烈的振盪以利氣體之交換，並同時提供無機碳源(CO<sub>2</sub>)。但揮發性化學物質濃度伴隨著試驗期間拉長及震盪試驗瓶過程中逐漸消失以致低估其毒性，因此造成各個實驗室測試出的毒性有所變異。例如 Hoda *et al.* <sup>[59]</sup> 的實驗中可以發現，過程中雖有用鋁箔紙將燒瓶覆蓋，來改善開放式系統的狀態，但仍有保留 2 個小孔來進行氣體交換，而 Hexazinone 是屬於揮發性的除草劑，並無法確保沒有逸散的情形，且實驗結果也顯示了長時間的試驗條件下的毒性結果較低。因此針對這項缺失，而發展出了開放式但有 headspace 的實驗系統。

有 headspace 密閉式的燒瓶實驗已經應用在避免此類揮發誤差的研究上 <sup>[60-63]</sup>。Halling-Sorensen *et al.* <sup>[11]</sup> 在 1996 年所作的實驗當中，將 250ml 的燒杯中放入測試物種 *Selenastrum capricornutum* 及基質後，以封口膜覆蓋瓶口，並測試了在不同實驗時間和碳源的比較，以及開放式和密閉式不同的差別，比較了許多不同條件後，實驗結果以 48hr 的試驗條件為最佳，而密閉式比開放式的敏感度更差了 10 倍之多。此外，Mayer *et al.* <sup>[64]</sup> 的實驗中也發現，相同條件下，完全密閉時，藻類的抑制率可達 84%，瓶口留有 headspace 者，抑制率達 19%；開放式實驗的抑制率僅 14%；留有 headspace 的試驗雖然減少了揮發性的誤差，但物質也有可能會跑到 headspace 中，和水相達到氣液相平衡，此外，完全密閉式的實驗設計相當的繁複。含有大量的 CO<sub>2</sub> 緩衝液也可能會導致離子強度的減弱和降低實驗的敏感性。<sup>[60,65]</sup> OECD 也建議當在測試揮發性有機物的實驗時，應該使用密封的暴露系統。<sup>[66]</sup>

為了改進上述的缺點，不讓揮發性物質的濃度會因為試驗容器的上方留有未裝滿液體的空間（head space）而有揮發、濃度減少的情形，本研究使用了 BOD 瓶來做一完全密閉式的毒性試驗，以改善之前開放式或非完全密閉式所產生的缺點；然而在提供所需的碳源的部分，事先將去離子水以  $\text{CO}_2\text{-N}_2$  混合氣體曝氣，一方面除去水中溶氧，另一方面便是增加碳源，讓營養液中能含有足夠的碳源使藻類生長不會受到抑制。此種方法能大大降低測試物質因揮發性而可能產生的誤差，大大的提升實驗的準確性。Lin *et al.*,<sup>[65]</sup> Chen and Lin,<sup>[67]</sup> and Chen *et al.*<sup>[68]</sup> 等以金屬及有機物，如：氯酚、腈類、醛類等所得到的研究結果皆都表現出密閉式藻類毒性試驗和其他傳統試驗方法比較之後所呈現出的高度敏感性，另外，簡易的實驗設計、步驟以及較短的實驗時間也都是本方法的優點之一。

