

# 一、前言

## 1.1 研究緣起

因應現代農業於栽培管理上對作物品質及產量的需求，農藥的使用已成為一項不成或缺的利器。在世界人口不斷增加而耕作用地卻不斷減少的趨勢之下，專業化的農業制度，變得更需要依賴農藥來維持農作物的產量與其品質。如此的化學性雜草防除方法，隨著 2,4-D 等有機除草劑的問世，在雜草防除上產生劃時代的革新，開創除草劑的新紀元。因其使用方便、效果良好的優點，普遍被農民採用，大量減少除草的人力與成本的支出，已成為現代農業栽培之主要除草方法。在許多先進國家，除草劑的銷售甚至已超過殺菌劑，佔農藥銷售的第一位 [1]。

近年來，雜草的問題不斷地被廣泛研究，雜草科學早期的發展與應用重點，偏重於除草劑的研發及雜草的防除，期以助益於農業生產。後來又在納入疫病蟲害的綜合管理做法下，積極朝向建立與改進雜草管理系統。如此一來，愈來愈多的除草劑被開發與應用在環境之中，也使得土壤保護、水土品質保持等議題受到挑戰。土壤中如果農藥殘留量過高，可能被作物吸收而造成作物中農藥殘留量過高，農藥及其分解產物可能經食用後，間接影響人體健康。土壤中過高之殘留農藥也可能經由雨水或灌溉水之淋洗而進入地下水中，而地下水系為一封閉之系統，農藥在其中不易分解，會引起地下水污染。

除草劑通常是利用抑制或促進植物某些生理作用的原理，來達到阻止植物萌芽、成長或引發過度代謝而死亡等目的。其作用方式包括

直接影響原生質膜使得細胞膜的通透性或酵素活性發生改變，或抑制細胞分裂、抑制光合作用、抑制纖維素、葉酸、氨基酸、脂質、多元胺 (polyamine) 等的合成。其中對原生質膜的作用可能在細胞上的多個不同位置產生影響，且多元胺會參與動植物許多重要的細胞反應，例如 DNA 複製與細胞分裂，因此對動物也可能產生危害 [2]。

進行環境風險評估時，水生植物的毒性試驗經常被用來討論水中污染物對初級生產者的潛在衝擊。水生生物中，柵藻 (Scenedesmus sp.) 和浮萍 (Lemna sp.) 被廣泛地應用在植物毒性試驗上，因為它們的體積小、生長速率快並且在實驗室中容易培養。

本研究以連續式藻類母槽系統 (chemostat) 為基礎進行培養藻類，此容器的容量為四公升，培養期間不僅有新鮮基質流入也有代謝物的流出，此狀態與自然水體較相似，改善了「批次式培養 (batch culture)」的缺點，避免加入的營養鹽完全局限在一密閉空間，導致營養鹽的匱乏與變質的現象，並且減少了代謝物的累積情形。並且以「48 小時批次式 BOD 瓶藻類毒性試驗」的試驗方法，較傳統的批次式藻類毒性試驗更節省時間、金錢，操作方法簡單，能同時處理較大量的樣品數，也提高了實驗的再現性。

2006 年台灣地區的農藥市場，除草劑的銷售佔了 28 %，僅次於殺蟲劑的 42 % [3]。因此，在如此廣泛地使用之下，除草劑對於環境造成的影響也是應該關注的議題。本實驗根據 HRAC (Herbicide Resistance Action Committee) 之分類方法，選取其中 A、B 兩類除草劑為實驗的毒性物質。這兩類除草劑因為適用於水稻田的雜草防治，現已被農民廣泛使用在農地中。這些除草劑雖然已經被使用了二十多年，然而文獻資料對於它們的研究數據仍相當稀少，尤其是低毒性

的影響更是缺乏，本研究期望能夠由實驗數據了解這些除草劑在低毒性濃度時對環境生物的影響，另一方面也提供資訊以便後人進行相關研究。

## 1.2 研究目的

1. 選擇二十種除草劑來進行密閉式毒性試驗，以求得各毒性的物質的半數致影響濃度值（ $EC_{50}$ ）與劑量反應曲線關係圖，利用此數據來評估除草劑對生物體的危害程度。
2. 將本篇以密閉式實驗條件下所得到的結果與除草劑過去各別的文獻資料作比較，以得到利用藻類做為測試物種及密閉式的條件下，實驗的敏感性及準確度差別。
3. 從劑量反應曲線圖中得到  $NOEC$ 、 $LOEC$ 、 $EC_{10}$  值，建立對於環境可能會造成影響或是不會有影響程度的數據資料庫，提供大眾做為環境生物體危害或影響評估的參考。
4. 依據所選出的不同參數來討論實驗結果的敏感性，比較其是否和除草劑對生物體的不同作用機制呈現一致性的結果。

### 1.3 研究方法與架構

實驗先從參考資料與文獻收集開始，針對 HRAC 除草機制分類法中的 A、B 兩類，分別從這兩類中挑選出要試驗的毒性物質，再將 20 種毒性物質的物化資料及研究文獻做進一步的整理及收集，然後建立實驗方法及分析方法進而完成毒性試驗。

利用本研究所提出的密閉式方法所得到的數據，代入模式分析 (probit model) 以求得  $EC_{50}$  值及劑量反應曲線。最後，將整個實驗得到的數據結果作一步的討論及說明以完成實驗。整個實驗過程的架構如 Fig. 1.3.1 表示。



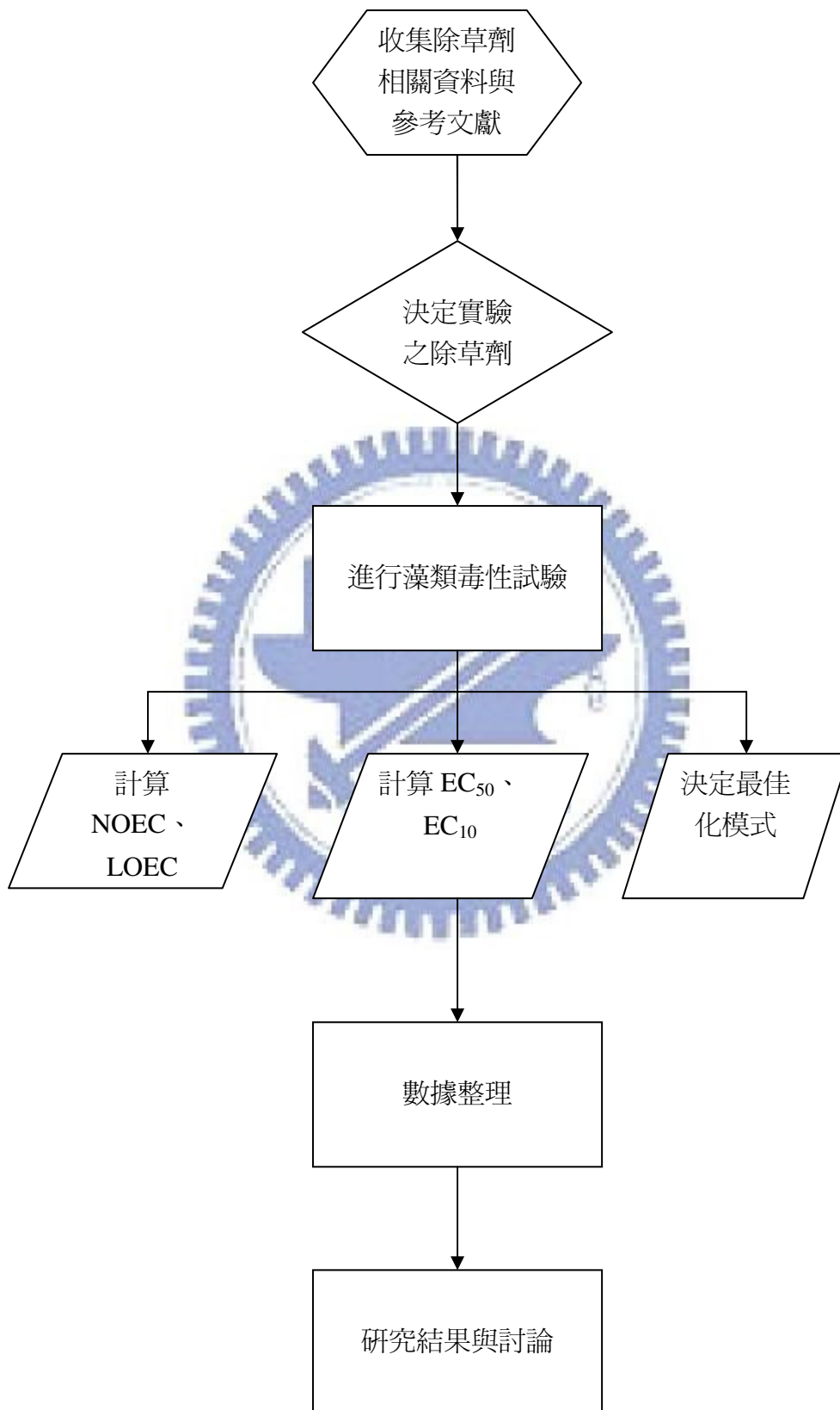


Fig 1.3.1 Flow chart of this study.



## 二、文獻回顧

### 2.1 雜草之定義

通俗用語中雜草泛指農地、庭園、居住環境附近，自然發生且多不為人所喜歡，具有負面作用之野草。中文及漢字使用地區因「草」字之出現，多半將雜草與草本植物關連，而英文對應之 weed 則無「草」之意。英語世界中，Weed 一般所指為引起問題而不受歡迎之植物(包含草及其他類別之植物)。植物之價值經常因人、時、地而有差異，同一種植物，有人視為必須除掉之雜草，也有人看中其可利用之優點，可能由於內含某項可供人類利用的特殊化學成份，而立即受到萬眾矚目在短期間內集中研發且被大規模的栽培生產成為經濟作物。

在雜草防治、檢疫、植物保護等領域中，便適合將「雜草」一詞與植物之負面特性相關連，並採取與國際相類似之「雜草」定義，包括草以外其他植物，以減少溝通上之混亂。如果涉及同種植物之優良特性時，則使用「野草」、「有用植物」、「野生植物」等詞彙。農園環境中之雜草較易區分，環境及自然區域中也可發生一些與人類管理目標不相符之植物，國外文獻也用環境雜草(environmental weeds)、自然區域雜草(natural-area weeds)來稱呼，以與其他野生植物有所區隔。近年來基於生物多樣性的考量，適當的雜草定義應該是「尚未被發覺其特殊用途且予以經濟性栽培的植物」[4]。

## 2.2 除草劑之分類

本篇研究中使用的除草劑，依作用機制可分成兩大類：

### (一) 抑制乙醯輔酶羧化酶 (acetyl CoA carboxylase, ACCase) 的活性

這類除草劑藉由抑制 ACCase 的活性，阻斷細胞合成脂肪酸；可再將其細分如下兩種：

#### (a) Aryloxyphenoxy-propionate (AOPPs)

禾草類除草劑 AOPPs 具有類似脂肪的形式,如此有助除草劑快速滲入葉肉細胞,隨即在細胞內經由去酯作用 (de-esterified) 形成可以自由轉移的酸,例如 diclofop-methyl 會變成 diclofop-acid,這種酸會在植物體內的分生組織中累積。具有抗性的植株則會藉由一部份芳香基的烴基化作用 (hydroxylation) 使這種酸變得不活性化。然而,在敏感性的植株中,除草劑形成的酸會形成酯葡萄糖甘 (ester glucoside) 並會重組形成具有植物毒性的酸(phytotoxic acid)造成植株的傷害。Beynen *et al.* [5]的研究也發現了在動物及人類體內, diclofop-methyl 會與酵素上的活性位置鍵結,具有潛在的傷害。

另一方面, diclofop-methyl 會因為土壤的物化特性而增加它在土壤中的移動能力,例如:土壤中的砂質含量及pH值下降 [6];假使再加上人為因素,例如超量灌溉、求好心切而超過建議使用劑量等,都會使得 diclofop-methyl 在土壤中的殘留量及移

動性大大增加。Grover *et al.* [7]在加拿大薩克其萬省 (Saskatchewan) 中部及南部的牧場進行農藥殘留的偵測，發現diclofop-methyl的降解產物diclofop，其濃度範圍為0.27-3.47  $\mu\text{g/L}$ ，其所佔採樣的比例由1987年的46%，至1989年時已高達95%；加拿大政府亦針對此種除草劑，訂定飲用水標準值，其最大允許濃度 (maximum acceptable concentration) 為9.0  $\mu\text{g/L}$  [8]。

#### (b) Cyclohexanedione (CHDs)

CHDs 的初期作用則和 AOPPs 有些類似，植物毒素一樣會在分生組織中累積，但具有抗性的植物則會轉由氧化作用、羥基化作用和分子的重組快速鍵結形成醣類。

Couderchet and Retzlaff [9]證實 CHDs 中的 sethoxydim 會刺激細胞膜上 ATPase 的作用，使質子從細胞質內流出造成細胞間隙 (apoplast) 酸化，而 sethoxydim 在細胞外較低 pH 的環境下會改變溶解平衡，朝不易解離的方向移動，使 sethoxydim 具有親脂性而較易經由擴散作用穿過細胞膜，當 sethoxydim 進入細胞之後，就會因為細胞內具有較高之 pH 值而分解，對植株之生理產生影響。另一個相同作用機制的除草劑 cycloxydim，Hassan *et al.* [10]將赤眼蜂 (*Trichogramma cacoeciae*) 暴露在 cycloxydim 的建議使用劑量下，實驗時間為 24 小時，發現 cycloxydim 對赤眼蜂的生長也明顯產生抑制的情形。



## (二) 抑制乙醯乳酸合成酶 (acetolactate synthase) 的活性

主要作用機制為干擾 ALS 酵素的活性，使得支鏈胺基酸 (branch-chain amino acids) 一白胺酸 (leucine)、異白胺酸 (isoleucine)、纈胺酸 (valine) 的生物合成作用受到干擾，使得植物細胞的分裂及生長快速地受到抑制而停止 [11]；依其化學結構可分為以下五種：

- 
- (a) 硫醯尿素類 (Sulfonylurea)
  - (b) 咪唑啉酮類 (Imidazolinone)
  - (c) 三唑嘧啶類 (Triazolopyrimidine)
  - (d) 嘧啶硫代苯甲酸 (Pyrimidinylthiobenzoate)
  - (e) 磺醯氨基碳醯三唑啉酮 (Sulfonylaminocarbonyl-triazolinone)

在上述的五個分類中，最具代表性的為硫醯尿素類 (sulfonylurea) 除草劑，是杜邦公司 (Du Pont) 於 1970 年代中期開發成功的除草劑，1982 年 Ciba-Geigy 公司亦投入此類除草劑的研發工作。至 1989 年，全世界已有 27 家公司參與，大約有 375 種除草劑或類似化合物被研發出來 [12]。硫醯尿素類除草劑是一種低劑量即能發揮除草效果的除草劑，可以防治許多不同種類的雜草並且對人類和哺乳類動物僅有極低的毒性 [13]，因此這類除草劑很快地受到重視。在台灣農地的使用上，此類除草劑如依速隆 (imazosulfuron)、免速隆 (bensulfuron-methyl) 及百速隆

(pyrazosulfuron-ethyl)，大部分用於水田的雜草防除。

正因為硫醯尿素類除草劑具有高效率的除草能力，它在環境中未作用的殘留藥劑也會具有毒性；許多研究報告發現玉米、向日葵、甜菜等作物會被殘留的藥劑傷害 [14, 15]。Hartnett *et al.* [16]及 Grossmann *et al.* [17]以水生植物進行毒性試驗，發現在 1.0  $\mu\text{M}$  的除草劑濃度時就會抑制浮萍、綠球藻及衣藻的生長；而許多學者在自然水體中也都發現了它們的蹤跡 [18-20]。

除草劑其他相關的物化特性如 Table 2.1.1 及 Table 2.1.2 所示。



Table 2.1.1 Classification of herbicides

HRAC group	Mode of Action	Chemical Family	Herbicide	CAS no.	
A	Inhibition of acetyl-CoA carboxylase	Aryloxyphenoxy-propionate	Clodinafop-propargyl	105512-06-9	
			Diclofop-methyl	51338-27-3	
			Fluazifop-p-butyl	79241-46-6	
		Cyclohexanedione	Propaquizafop	111479-05-1	
			Quizalofop-p-ethyl	100646-51-3	
			Clethodim	99129-21-2	
			Cycloxydim	101205-02-1	
B	Inhibition of acetolactate synthase	Sulfonylurea	Tralkoxydim	87820-88-0	
			Bensulfuron-methyl	83055-99-6	
			Chlorsulfuron	64902-72-3	
			Cinosulfuron	94593-91-6	
			Cyclosulfamuron	136849-15-5	
			Halosulfuron-methyl	100784-20-1	
			Metsulfuron-methyl	74223-64-6	
			Primisulfuron-methyl	86209-51-0	
			Rimsulfuron	122931-48-0	
			Imidazolinone	Imazamox	114311-32-9
			Trizaolopyrimidine	Imazethapyr	81335-77-5
Pyrimidinyl(thio)benzoate	Flumetsulam	98967-40-9			
	Pyrithibac-Na	123343-16-8			

Table 2.1.2 Physical and chemical properties of herbicides

HRAC group	Herbicide	Vapor Pressure* (Kpa)	Henry's Constant (atm · m <sup>3</sup> /mol)	Water Solubility* (mg/L)	Log P	M. W. (g/mol)	Molecular Formula
A	Clodinafop-propargyl	3.20E-09	2.76E-09	4.00	3.90	349.75	C17H13ClFNO4
	Diclofop-methyl	4.67E-07	1.97E-06	0.80	4.62	341.19	C16H14Cl2O4
	Fluazifop-p-butyl	3.31E-08	6.22E-07	2.00	4.50	383.37	C19H20F3NO4
	Propaquizafop	4.40E-13	3.06E-12	0.60	4.60	443.89	C22H22ClN3O5
	Quizalofop-p-ethyl	2.60E-10	7.40E-11	0.40	4.28	372.81	C19H17ClN2O4
	Clethodim	3.55E-10	1.16E-11	11.90	4.21	359.92	C17H26ClNO3S
	Cycloxydim	1.00E-08	9.52E-12	40.00	1.36	325.47	C17H27NO3S
	Tralkoxydim	3.71E-10	2.41E-10	5.00	4.46	329.44	C20H27NO3
B	Bensulfuron-methyl	2.80E-15	3.78E-15	120.00	1.80	410.41	C16H18N4O7S
	Chlorsulfuron	3.07E-12	3.90E-15	28000.00	2.00	357.78	C12H12ClN5O4S
	Cinosulfuron	9.23E-14	5.24E-15	120.00	2.04	413.41	C15H19N5O7S
	Cyclosulfamuron	2.20E-08	5.38E-07	0.20	2.05	421.43	C17H19N5O6S
	Halosulfuron-methyl	3.67E-13	9.62E-16	15.00	-0.02	436.83	C13H17ClN6O7S
	Metsulfuron-methyl	3.33E-13	1.32E-16	9500.00	2.20	381.37	C14H15N5O6S
	Primisulfuron-methyl	1.83E-12	1.39E-12	3.30	2.41	468.34	C15H12F4N4O7S
	Rimsulfuron	1.51E-09	6.42E-10	10.00	0.29	431.45	C14H17N5O7S2
	Imazamox	1.68E-12	9.15E-19	4410.00	0.73	305.34	C15H19N3O4
	Imazethapyr	2.87E-12	1.04E-16	1400.00	1.49	289.34	C15H19N3O3
	Flumetsulam	3.71E-13	2.47E-13	49.00	0.21	327.31	C12H11F2N5O2S
	Pyrithibac-Na	4.80E-12	2.27E-17	728000.00	0.60	348.74	C13H10ClN2NaO4S

\* measured at 25°C Log P : 辛醇-水分配係數

## 2.3 藻類毒性試驗

### 2.3.1 試驗物種簡介

本實驗中所使用的月芽藻 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)屬於綠藻 (Chlorophyceae)，其特徵為單細胞、成群體但不糾結、不能移動，一般細胞體積為40-60  $\mu\text{m}^3$ 。

典型的月芽藻體積約為45  $\mu\text{m}^3/\text{cell}$ 且重量介於10-20 pg/cell之間，為淡水單細胞藻類，因為體型呈半月型，所以稱為月芽藻，具備有取得容易、培養簡單、容易觀察、生長期短、可以大量生長、有地區代表性等實驗用的藻種等這些特點，並較其他微生物試驗來的敏感 [21]。

### 2.3.2 藻類毒性試驗優點

目前標準試驗方法用來進行生物毒性試驗所使用的物種，有以下四種：(一) 魚類 (二) 無脊椎動物 (三) 浮游植物 (四) 細菌，在所有的標準生物試驗中，藻類生物試驗被廣泛使用做為環境影響的研究，其理由如下：

- (1) 在水體環境中，藻類為主要的生產者且處於食物鏈底部，任何對此類生物之衝擊，將會間接地對較高營養階層之生物造成傷害，故藻類生物在生態上具有相當重要性。
- (2) 與細菌試驗相比，藻類試驗較不易因生物體內基因多樣性而產生變異。
- (3) 與魚類及無脊椎動物試驗相比，藻類試驗是相當簡單、快速且便宜的試驗方法。



- (4) 以敏感程度來講，藻類當作試驗物種比其他微生物實驗來得高。
- (5) 藻類毒性試驗過程中由於藻類繁衍迅速，雖然試驗時間短但已歷經數個生命週期，試驗較不會受到幼年期或衰老期之影響。

### 2.3.3 批次式藻類毒性試驗

藻類毒性試驗可分為批次式和連續式兩種。目前已有的標準藻類毒性試驗，大都屬於批次式的試驗方法，如以下五種：

- (a) U.S.EPA：「Fresh water algae acute toxicity test」
- (b) OECD：「Algal growth inhibition test guideline」
- (c) ISO：「Water quality-algal growth inhibition test」
- (d) APHA：「Toxicity testing with phytoplankton」
- (e) ASTM：「Standard Guide for Conducting Static 96h toxicity tests with microalgae」。

這些標準的藻類毒性試驗方法已被廣泛應用於化學物質與排放廢水的毒性評估上，雖然這些標準方法所使用的營養基質各有不同，但是都有一個共同的特點，就是營養基質中都包含了大量的氮（nitrogen）及磷（phosphate），確保實驗中的藻類被培養在營養充足的條件下。批次式毒性試驗起初提供藻類足量的生長基質，但是在後續的實驗過程中則不再添加任何基質，亦無藻類之代謝物質流出。在此條件之下，基質的消耗及代謝物的累積皆會降低藻類毒性試驗之敏感性 [22]，同時也難反應出真實水體中的情況。但由於此方法的優點為操作容易、成本低廉且可同時處理大量之樣本，到目前仍被廣泛使用。

#### 2.3.4 密閉式試驗方法

依據試驗中與外界氣體是否有接觸而進行分類，可分成「開放式」批次實驗與「密閉式」批次實驗兩種。開放式批次實驗系統雖然可以藉由震盪與外界空氣接觸，而達到提供碳源之目的，若考慮揮發性有機物於實驗期間可能發生的揮發行為，造成逸散的情形，會使得名義濃度與實際濃度天差地別。相反地，密閉式批次實驗並無毒物揮發之問題存在，但其藻類生長所需之碳源則必須提高（加入基質或增加 headspace）。

Brack and Rottler [23]設計了一個間接提供碳源的密閉系統，採用雙層構造的玻璃瓶，將藻液及有機物置放於上方，下方則注入  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$  緩衝液。Kuhn and Pattard [24, 25]以柵藻(*Scenedesmus subspicatus*)為測試物種來進行毒性試驗，使用無機碳與有機碳作為藻類生長所需碳源，並指出密閉的環境於 48 小時之內對藻類不會造成重大的衝擊。Glaassi and Vighi [26]利用一密閉式且恆溫的條件之下，可保證水中揮發性物質的濃度不變，因此發展出一套 AAPBT 的系統來測定揮發性物質的毒性。其利用一個 2 公升之密閉容器，當中試驗溶液僅 100 毫升，目的在於利用剩餘大空間提供足夠之  $\text{CO}_2$ ，以避免碳源匱乏而造成藻類敏感度改變，但實驗中毒性物質的濃度僅由亨利定律推算，並無真正測得溶液中的實際濃度。Herman *et al.* [27]為了改善此項缺點，在密封之 125 毫升試管中進行試驗，當中的 50 毫升試驗溶液中添加了 0.4%  $\text{NaHCO}_3$  以提供充份的碳源，且同時監測試驗溶液與其上空間 (headspace) 之濃度，證明濃度無顯著不同。Mayer *et al.* [28]則指出在不含 headspace 之完全密閉式批次實驗系統，是評估揮發性有機物較佳的實驗方法。

### 2.3.5 密閉式BOD瓶藻類毒性試驗

許多研究 [29-31]發現與魚類、水蚤及發光菌 (Microtox) 比較，藻類毒性試驗對重金屬具有良好的敏感度，然而對有機物的敏感度卻不佳，而揮發性有機物是造成敏感度差異的主要因素，在實驗中假如採用開放式系統，再加上曝氣等增加攪拌的頻率，都會使得揮發性有機物的毒性呈現被低估的情形。

Huang [32]利用連續式的培養方法配合使用BOD瓶，發展出「48小時的批次式BOD瓶藻類毒性試驗」的試驗方法，使用體積300 ml的BOD瓶，將藻類、營養鹽和試驗毒物加入BOD瓶內，再用蓋子密封，讓藻類暴露於毒性物質一段時間，分析實驗組與無暴露控制組的觀測終點並比較暴露組的抑制情形；該研究以鋅當作參考毒物，經過48小時的暴露時間，証實此試驗方法具有良好的穩定程度。整個實驗過程中沒有新鮮基質的加入，也沒有藻類之代謝物移出，優點是操作簡單、時間與成本的耗費大幅減少，能處理較大量的樣品數、實驗數據取得容易，所以相對提高了實驗的再現性。

本研究室利用此密閉式的藻類毒性試驗方法，對醛類 (aldehydes) [33]、氯酚類 (chlorophenols) [34]、苯胺類 (anilines) [35]、苯 (benzenes) [36]、烷類 (alkanes) [37]、醇類 (alcohols) [37]、酮類 (ketones) [37] 及腈類 (nitriles) [38]皆有良好的評估效果，敏感度都比傳統藻類毒性試驗更好，甚至在混合毒性的研究上也有不錯的結果 [36]。此外，以前學者在研究農藥的毒性時，大都使用魚類或是水蚤等水生動物 [39, 40]，本研究室以密閉式試驗方法來評估有機磷農藥 [41]及除草劑 (光合作用型、干擾植物細胞分裂型、生長素型) [42]，也都發現了月芽藻比水生動物具有更高的敏感度，因此本研究將依循同樣的試驗方法來評估A、B類

除草劑的毒性。

### 2.3.6 觀測終點之量測

一般藻類毒性試驗之標準方法，例如 U.S. EPA [43]、OECD [44]、ISO [45]、ASTM [46]、APHA [47]皆於試驗終點時，測量藻類的生物質量 (biomass)。而量測生物質量最直接的方法就是量測生物之乾重，但是直接稱重的方法，需要花費較久的時間，所以一些間接量測生物質量的方法，例如：「電子顆粒計數器」、「光學顆粒計數器」等，逐漸取代直接稱重法，因為這些方法簡單、快速，所需要的藻液量少，且與生物乾重之間有良好的相關性 [48]。另外，生長率 (growth rate) 也是一項經常被測量的反應參數，學者 [49, 50]曾經分析 ISO's ring tests 實驗數據，發現以生物質量及生長率為反應終點時，生長率的  $EC_{50}$  值高了一倍。

另外一個觀測終點是量測試驗水的溶氧，直接量測水中溶氧之變化，再依此計算出藻類生長之情形，優點是成本低、量測時間短。Hostetter發展出一套量測水中溶氧之藻類試驗方法，試驗時間僅需二十四小時，且在以 *Raphidocelis subcapitata* (月芽藻) 為試驗物種的實驗中發現，當一種或多種之營養鹽呈限制性狀態時，藻類之淨光合反應量會與限制性營養鹽呈現線性關係 [51]。

綜合以上的觀點，本研究採用以細胞密度為基礎計算出的生物最終產量 (final yield)、生長率 (growth rate) 以及溶氧產生量 ( $\Delta DO$ ) 當作整個試驗的反應終點，並比較這三種反應終點對除草劑的敏感度。



## 三、基本理論

### 3.1 單一毒性模式

#### 3.1.1 劑量反應關係

當受測試生物受到毒性物質作用時，所受影響或死亡之百分率，會隨著毒性物質濃度成 S 型曲線關係，稱之為濃度反應關係，若已知毒物進入生物體內的量，則可稱為劑量反應關係 (Dose-response relationship)，其中 X 軸為有機物濃度，Y 軸為反應百分比。美國國家科學院將劑量反應關係定義為：「一種物質給予或接受的劑量與在暴露族群中某種健康效應之發生率的關係之特性描述，並且以人類暴露到此物質來估計此效應的發生率之過程」。

#### 3.1.2 半致影響濃度

在毒性試驗中，測試物種受毒性物質影響造成百分之五十的抑制或死亡，此時的濃度則稱為  $EC_{50}$  (50% Effect Concentration) 或  $LC_{50}$  (50% Lethal Concentration)。

生物體受毒性物質影響的劑量反應關係如 Fig. 3.1.1 所示。虛線與實線分別代表受測生物體 A 與 B 的劑量反應曲線，圖中虛線的斜率大於實線的斜率，表示生物體 A 對毒性物質的容忍範圍較小，亦說明了生物體 A 對毒物濃度的變化較敏感，微量的濃度變化即可造成抑制率的明顯改變。而在抑制率為 0.5 處，延伸至兩曲線所對應的毒性物質濃度，即為毒性物質對生物體所造成的半致影響濃度( $EC_{50}$ )。



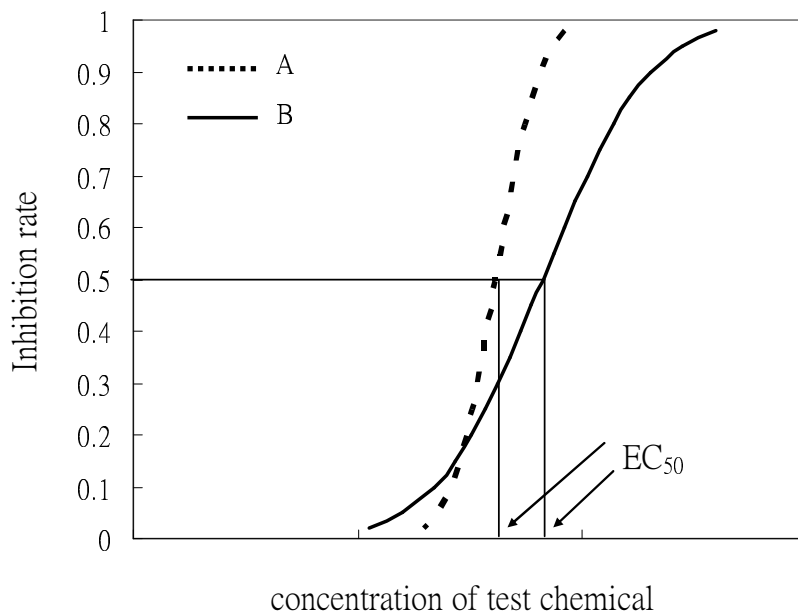


Fig. 3.1.1 Dose-response relationships of common toxicity tests.

### 3.1.3 劑量反應關係模式

欲從實驗得到的 S 型曲線求出  $EC_{50}$  或  $EC_{10}$  並不容易，因為非常容易受到實驗時濃度選擇的影響；如此一來，必須藉由數學關係式將 S 型曲線轉為直線以便求取，此種數學轉換模式便稱為「劑量反應關係模式」。不同的模式乃依據不同的理論基礎，因此同一組數據，經由各種不同模式的分析，其結果可能有所差異；以生物試驗來講，不同的生物甚至不同的反應終點（response endpoint）對毒性物質容忍度不盡相同，若以不適當之模式計算，實驗點與理論點間變異過大，這種實驗結果則可信度容易遭受質疑，又如果實驗的結果並未達到 50% 的影響（抑制或死亡），求取  $EC_{50}$  值屬於外插情況下，變異情形更加明顯，因此數據處理程序中往往需要作適合度分析，以判斷最適合之使用模式。

一般常見的毒性物質劑量反應模式為有三種，包括 Probit、Weibull 及 Logit 模式，皆是依據不同的假設發展而成；Probit 模式為假設毒性物質對於受體生物的容忍度為一常態分布，因此以常態分佈函數來表示毒物對生物抑制率  $P$  對毒物濃度（劑量） $Z$  的濃度（劑量）反應曲線。Weibull 模式

則是符合毒性物質與受體生物間產生化學鍵結的假設，為機率-反應機制基礎 (Mechanistic-Probability basis) 模式，發展根據毒性物質分子與受測試生物之受體分子間化學鍵關係所推演而來。至於 Logit 模式則與 Monod Equation 相似，由人口成長研究中發展而出的另一種模式，描述毒性反應中的某種酵素反應 (Enzyme Reaction)，適用於自催化 (autocatalysis) 之化學反應。Table 3.1.1 為三種劑量反應曲線之數學轉換關係式。

Probit 模式為毒性試驗報告中最常見的劑量反應模式，主要是由實驗經驗，再加上理論基礎所得的一個模式，其假設生物對毒性物質的容忍度分布為常態分布 (Log-normal distribution)，主要以毒性物質濃度之對數值與反應率之 NED (Normal equivalent deviation) 具有線性關係為基礎，其中反應率即測試生物對毒性物質之反應比率 (例如死亡率)。此模式將劑量反應模式之 S 型曲線，轉換成 NED scale 上的一直線。舉例來說，劑量反應曲線在抑制率於 50% 之處對應到 NED scale 上的值是 0，84.1% 反應率之處對應為 1，而 NED scale 之座標值加 5 即為 Probit 的座標，Probit 單位與反應率與毒性物質劑量間之轉換關係如下：

$$Y = A + B \log Z$$

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

Y：Probit 單位

A、B：劑量反應曲線之截距 (intercept) 與斜率 (slope)

Z：毒性物質劑量濃度 (單位：mg/L)；

P：測試物種對毒性物質之反應率 (如死亡率等)

erf：error function。

Table 3.1.1 Weibull、Probit 與 Logit 容忍度分布模式

Type	Transformation	Probability density	Probiblity of response P
<b>Weibull</b>	$u = \ln(k) + \eta \ln(z)$	$\exp(t - e^t)$	$1 - \exp(-kz^\eta) = 1 - \exp(-e^u)$
<b>Probit</b>	$Y = \alpha + \beta \log(z)$	$\frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp(-\frac{t^2}{2})$	$\int_{-\infty}^{Y-5} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp(-\frac{t^2}{2}) dt = \frac{1}{2} (1 + \operatorname{erf}(\frac{Y-5}{\sqrt{2}}))$
<b>Logit</b>	$1 = \theta + \phi \ln(z)$	$\frac{1}{4 \cosh^2(\frac{t}{2})}$	$\frac{1}{1 + e^{-\theta} z^{-\phi}} = \frac{1}{1 + e^{-t}}$

Type	Probility of no-response Q	Transform vs P	Transform vs Q
<b>Weibull</b>	$\exp(-kz^\eta) = \exp(-e^u)$	$u = \ln(-\ln(1 - P))$	$u = \ln(-\ln Q)$
<b>Probit</b>	$\int_{Y-5}^{\infty} \exp(-\frac{t^2}{2}) dt = \frac{1}{2} (1 - \operatorname{erf}(\frac{Y-5}{\sqrt{2}}))$	$Y = 5 + \sqrt{2} \operatorname{erf}^{-1}(2p - 1)$	$Y = 5 + \sqrt{2} \operatorname{erf}^{-1}(1 - 2Q)$
<b>Logit</b>	$\frac{1}{1 + e^{\theta} z^{-\phi}} = \frac{1}{1 + e^t}$	$1 = \ln(\frac{P}{1 - P})$	$1 = \ln(\frac{1 - Q}{Q})$

### 3.1.4 G test

一般毒性試驗為了具體表示實驗系統的敏感度，一般選擇以其 EC 值來表示，然而在數據的處理上，即使相同的數據選用不同的劑量反應關係模式計算也會得到不同的 EC 值，而一般常用的劑量反應關係模式如 Probit、Weibull 與 Logit 所計算出的 EC 值又以 EC<sub>50</sub> 較為接近，故實驗系統的敏感度又多以 EC<sub>50</sub> 表示之。然而超過或低於 EC<sub>50</sub> 的 EC 值例如 EC<sub>90</sub> 或 EC<sub>10</sub> 會因為信賴區間的變大而影響可信度，為了降低往後分析的不確定性，進行 G test (goodness of fit)，經由對重複試驗的每一處理組與期望值的誤差比較，所得絕對值最小之 G 值可為適合的最佳模式。G 值的計算公式如下：

$$G = 2 \sum_{i=1}^a f_i \ln \left( \frac{f_i}{\hat{f}_i} \right)$$

其中 a 是重複組次數， $f_i$  是處理組實驗值，而  $\hat{f}_i$  是對應模式之期望值。

### 3.2 NOEC、LOEC 與 Cut-off value

為了能夠對環境提供更好的保護，學者們提出 NOEC (no-observed Effect Concentration) 或 LOEC (lowest-observed effect concentration)，其分別代表毒性物質對測試物種「不具影響的最高濃度」與「最小影響濃度」。另外，EC<sub>10</sub> 也是常用來比較的參數，乃是根據劑量反應關係模式所求取的毒性物質對生物造成 10% 影響的濃度。為了計算 NOEC 及 LOEC 值，Dunnett's test 是常用來跟控制組比較的統計方法。本實驗所進行 Dunnett's test 是觀察重複組之間的差異以及控制組和處理組的差距以定義 NOEC 及 LOEC。

雖然 NOEC 值及 LOEC 值常受到實驗濃度的設定區間及實驗變異的影響，有時並未能明確表示出毒性的實際效應，在敏感度的比較上較不常使用，不過在風險評估上仍有相當的重要性。

本研究將針對  $EC_{10}$  以及 NOEC 進行討論，並提出平均中斷值 (cut-off value) 作為選擇 NOEC 或是  $EC_{10}$  之參考點。中斷值與一組試驗的組內變異之平方根成正比，因此組內變異較小的精確試驗有較小的平均中斷值，由於中斷值的濃度大於 NOEC 而小於 LOEC，故中斷值亦指出 NOEC 所能達到之保護程度的極限，其計算公式如下：

$$\text{平均中斷值}(\% \text{ reduction}) = \frac{T}{X_c} \times S_w \sqrt{\frac{1}{n_c} + \frac{1}{n_i}} \times 100$$

其中  $T$  為查表所得(以 one-tail Dunnett's test 在顯著程度為 5% 之表)， $X_c$  為控制組之平均值， $S_w$  是組內變異之平方根， $n_c$  與  $n_i$  為控制組與處理組重複試驗的次數。



## 四、實驗設備與方法

### 4.1 儀器設備與試劑

#### 4.1.1 儀器設備

##### 純水設備：

生物試驗用水，包括 RO 過濾 (0.5  $\mu\text{m}$ )，蒸餾水儲水桶 (60L container, Nalgene)；去離子水製造機 (Milli-Q Plus, Millipore, outflow conductivity 18.2  $\text{M}\Omega\text{cm}$ )。也用於藥品配製用水及實驗器皿之二次清洗用水。

##### 抽氣幫浦：

SINKU KIKO 公司，型號 ULVACG-5 及 G-50。用於過濾營養鹽及 Isoton II 時使用。

##### 恆溫室：

空調控溫室，控制溫度在  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ，藻類培養與毒性試驗皆在此進行。

##### 連續式培養母槽：

連續式藻類培養之用，體積為 5 公升，直徑 18 公分之玻璃槽。於體積 4 公升處開口作為溢流，再於體積 2 公升處開口作為取樣之用。

##### 基質儲存瓶：

容量約為 6 公升，直徑為 25 公分大小的玻璃瓶。主要用於連續式培養母槽時，入流之基質存放所用；每次使用前皆需經過清洗再滅菌才可使用。

##### 蠕動幫浦：

蠕動幫浦使用日本 EYELA 公司，型號 MP-1000 之定量幫浦，作

為輸送營養基質到連續式培養母槽之動力，並可控制其流量。

**幫浦管：**

廠牌 Materflex，用於母槽培養液輸送之型號為 H-96400-14。輸送管材質為矽膠材質，不具毒性，可避免影響毒性試驗結果。

**母槽曝氣幫浦：**

幫浦為一般水族箱所使用之曝氣裝備，氣體流量的操作範圍為 400-800 ml/min。

**氣體流量計：**

控制連續式培養母槽之曝氣量為 480 ml/min

**酸鹼測定儀：**

使用 Suntex 公司，型號 SP-7 之 pH 測定儀。其精確度為  $\pm 0.01$ 。

**比導電度計：**

CHECK MATE-90, CIBA CORNING 英國製。用於 Isoton 之導電度量測(需在 17 mmho 範圍內)。

**溶氧測定儀：**

美國 YSI 公司數字型溶氧測定儀，型號 5100；BOD 探頭為型號 YSI 5010，裝有內部電動攪拌器，可以對樣品進行自動攪拌，精準度為  $\pm 0.01$  mg/L。搭配 DO 59 軟體程式，可以連續監測與記錄水中溶氧值的變化，量測間格可為 3、5、10 及 15 分鐘四種。

**電磁攪拌器：**

隨時保持攪拌避免藻類在連續生長母槽中產生沉澱情形，另外可讓進流基質迅速均勻分佈於母槽中及增加藻液曝氣機會，提供所需 CO<sub>2</sub> 之作用。

**曝氣水桶：**

使用體積 10 公升之水桶。開口處附有一矽膠塞和塑膠管，塑膠管一頭接氣體鋼瓶，一頭接沸石並伸入純水桶底部曝氣，在水桶開口

處附近開一小洞以平衡壓力，曝氣完成後旋緊桶蓋以減少外界空氣進入。

#### **毒性試驗瓶：**

使用體積 300 毫升，直徑 8 公分之 BOD 玻璃瓶。開口處可塞入玻璃瓶塞，使實驗時達到水封狀態，讓整個試驗成為一個密閉式系統。

#### **培養箱：**

置於溫控室內，以不鏽鋼材料為架構主體，長×寬×高為 135×110×135 公分，頂面裝有 120 公分白色螢光燈管 8 支，內有迴轉式振盪混合器（WEST 公司，FIRSTEK Model S103），搖動速度可超過 100 r.p.m.，機座台面可放置體積 300 ml 之 BOD 瓶共 66 座，作為藻類 BOD 瓶試驗與藻類批次式培養之用。

#### **電子顆粒計數器：**

使用 Coulter Counter，型號 MULTISIZER II（Coulter Electronics 公司），計數細胞數。使用前後需用 ISOTON 潤濕（rinse）清理。採用 50  $\mu\text{m}$  孔徑之玻璃管，適用顆粒直徑範圍為 1-30  $\mu\text{m}$ ，測試時間約在 12-13 秒間。

#### **電腦：**

使用中央處理器為 PIII - 650 之桌上型電腦，視窗 XP（Windows XP）之程式並配合電子顆粒計數器所需之軟體（Multisizer Accucomp V. 2.01）來進行顆粒計數之分析。使用時可直接將電子顆粒計數器之訊號傳送至電腦中進行分析。

#### **光度計：**

TES 數位式光度計，型號 IM-2D，量測範圍 20-20,000 lux。用於每天母槽及震盪培養箱之台面光度量測。

**曝氣氣體：**

購於大明行及洽隆，高壓氮氣中含 0.5 % CO<sub>2</sub>，純粹氮氣的純度達 99.9 %，氣體體積為 6 立方公尺。用於實驗中稀釋水之曝氣，以降低營養基中的 DO 值，且能提供藻類在實驗期間足夠量的碳源。

**滅菌釜：**

使用 HIRAYAMA 公司，型號 HA-300M 的滅菌釜在 1.1 kg/cm<sup>2</sup>，121 °C 下對實驗器皿滅菌 15 分鐘。

**定量吸管：**

使用 SOCOREX 可調式移液器，大小為 100-1000 µl 及 1-5 ml 兩種。以及 NICHIRO，Nichipet EX，20-200 µl、10-100 µl 以及 2-20 µl 等 3 種。

**操作台：**

使用造鑫公司製造的 Laminar Flow 操作台，以防止植種過程及配製營養基時受到污染。內部裝置有紫外線燈管，可在使用操作台之前先行滅菌。

**分析天平：**

德國 Sartorius 公司，型號 TE124S，量測範圍 0.1 mg-120.0 g。

**藻種及營養基質之保存：**

使用 Whirpool 冰箱將藻、藥品以及營養基質保存於 4 °C 以下。

**烘箱：**

購自 Memmet 公司，做為烘乾玻璃器皿用，溫度保持約在 50 °C。

**分析儀器：**

高效能液相層析儀（High Performance Liquid Chromatography），購自 Waters 公司，型號 2996。其裝置設定如 Table 4.1.1。

Table 4.1.1 The analysis conditions and apparatuses of HPLC

Item	Model and Condition
HPLC	Waters 2996
	Photodiode Array Detector
Detector	UV
Pump	Pump Control Module
	Waters HPLC 515 × 2
Column	Waters Bondapak, C <sub>18</sub> , 4.6 mm × 150 mm
Injection volume	20-50 μl
Mobile Phase	Acetonitrile : H <sub>2</sub> O = 60% : 40%
Mobile Phase Flow Rate	1.0 ml/ min

#### 4.1.2 試劑及耗材

##### 濾紙：

使用 Gelman Science 型號 66191 之 0.45μm (過濾營養基及水樣前處理) 及型號 60301 之 0.2μm (過濾 Isoton II) 兩種孔徑之濾紙。

##### 藥品：

1. HPLC 分析用藥：ChemService 公司，Acetonitrile，純度



99.97% HPLC grade。

2. 毒性物質：農藥標準品，純度皆大於 99%，物化特性（水溶性、揮發性、分子量等）如 Table 4.1.2 所示。

3. 其他試驗中所需藥品使用 ChemService、Merck 或 Riedel-deHaen 公司 G. R.級以上之化學藥品。



Table 4.1.2 Physical and chemical properties of herbicides

HRAC group	Herbicide	Vapor Pressure (Kpa)	Henry's Constant (atm · m <sup>3</sup> /mol)	Water Solubility (mg/L)	Log P	M. W. (g/mol)	Molecular Formula
A	Clodinafop-propargyl	3.20E-09	2.76E-09	4.00	3.90	349.75	C17H13ClFNO4
	Diclofop-methyl	4.67E-07	1.97E-06	0.80	4.62	341.19	C16H14Cl2O4
	Fluazifop-p-butyl	3.31E-08	6.22E-07	2.00	4.50	383.37	C19H20F3NO4
	Propaquizafop	4.40E-13	3.06E-12	0.60	4.60	443.89	C22H22ClN3O5
	Quizalofop-p-ethyl	2.60E-10	7.40E-11	0.40	4.28	372.81	C19H17ClN2O4
	Clethodim	3.55E-10	1.16E-11	11.90	4.21	359.92	C17H26ClNO3S
	Cycloxydim	1.00E-08	9.52E-12	40.00	1.36	325.47	C17H27NO3S
	Tralkoxydim	3.71E-10	2.41E-10	5.00	4.46	329.44	C20H27NO3
B	Bensulfuron-methyl	2.80E-15	3.78E-15	120.00	1.80	410.41	C16H18N4O7S
	Chlorsulfuron	3.07E-12	3.90E-15	28000.00	2.00	357.78	C12H12ClN5O4S
	Cinosulfuron	9.23E-14	5.24E-15	120.00	2.04	413.41	C15H19N5O7S
	Cyclosulfamuron	2.20E-08	5.38E-07	0.20	2.05	421.43	C17H19N5O6S
	Halosulfuron-methyl	3.67E-13	9.62E-16	15.00	-0.02	436.83	C13H17ClN6O7S
	Metsulfuron-methyl	3.33E-13	1.32E-16	9500.00	2.20	381.37	C14H15N5O6S
	Primisulfuron-methyl	1.83E-12	1.39E-12	3.30	2.41	468.34	C15H12F4N4O7S
	Rimsulfuron	1.51E-09	6.42E-10	10.00	0.29	431.45	C14H17N5O7S2
	Imazamox	1.68E-12	9.15E-19	4410.00	0.73	305.34	C15H19N3O4
	Imazethapyr	2.87E-12	1.04E-16	1400.00	1.49	289.34	C15H19N3O3
	Flumetsulam	3.71E-13	2.47E-13	49.00	0.21	327.31	C12H11F2N5O2S
	Pyrithiac-Na	4.80E-12	2.27E-17	728000.00	0.60	348.74	C13H10ClN2NaO4S

## 4.2 實驗方法

### 4.2.1 藻類毒性試驗

整個實驗架構主要以生長率 (final yield 和 growth rate) 與溶氧變化量 ( $\Delta DO$ ) 為參數之改良後密閉式 BOD 瓶試驗。

#### (一) 試驗藻種

本實驗所選用的藻種為月芽藻，*Pseudokirchneriella subcapitata* (舊名為 *Selenastrum capricornutum*)，現今被廣泛用於藻類生物試驗研究之實驗物種，U.S. EPA、ISO、OECD 及 APHA 等單位之藻類毒性試驗法，皆以此物種為標準試驗種之一。實驗藻種購自 University of Texas, Austin, United States, 2006 年 8 月。

#### (二) 培養基質配製

本研究是採用 U.S. EPA “The *Selenastrum capricornutum* printz algal assay bottle test: Experimental design, Application, and Data interpretation protocol” 所使用的營養鹽組成，再以此營養鹽為基礎，對其組成加以研究而用於連續式母槽與光合抑制藻類毒性試驗中。其中 U.S. EPA 營養鹽的配製方法如下：將下列 (a) - (g) 的貯備液 (stock solution) 各加 1 ml 至去離子水中，再稀釋至 1 升。接著以 0.1 N 當量濃度的 NaOH 或 HCl 將營養鹽之 pH 值調至  $7.50 \pm 0.10$  並立即以孔徑 0.20  $\mu\text{m}$  的濾膜加以過濾。

以下為營養鹽之配置：

- (a) 硝酸鈉貯備液：溶解 12.750g  $\text{NaNO}_3$  於 500 ml 去離子水。
- (b) 氯化鎂貯備液：溶解 6.082 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  於 500 ml 去離子水。
- (c) 氯化鈣貯備液：溶解 2.205 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  於 500 ml 去離子水。
- (d) 微營養鹽貯備液：溶解下列所有藥品於 500 ml 去離子水。

92.760 mg H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.714 mg CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O
207.690 mg MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	3.630 mg Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O
1.635 mg ZnCl <sub>2</sub>	0.006 mg CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O
79.880 mg FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	150 mg Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O

(e) 硫酸鎂貯備液：溶解 7.350 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 於 500 ml 去離子水中。

(f) 磷酸氫二鉀貯備液：溶解 0.522 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 於 500 ml 去離子水中。

(g) 碳酸氫鈉貯備液：溶解 7.5 g NaHCO<sub>3</sub> 於 500 ml 去離子水中。

最後配成的營養鹽其巨量及微量營養素濃度列於 Table 4.2.1 及 Table 4.2.2。表中之“最終濃度”表示各元素在水溶液中所存在之實際濃度。營養鹽的滅菌是以孔徑 0.20 μm 的濾膜過濾，過濾滅菌後的營養鹽保存在 4°C 冰箱且置於陰暗無光線照射處（容器會以鋁箔紙完全包覆），避免產生光化學反應。

Table 4.2.1 The composition of macro-algal medium

Chemicals	Concentration (mg/L)	Element	Final conc. (mg/L)
NaNO <sub>3</sub>	25.5	N	4.2
NaHCO <sub>3</sub>	15.0	Na	11.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.04	C	2.14
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	14.7	K	0.649
MgCl <sub>2</sub>	5.7	P	0.186
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	4.41	S	1.91
		Mg	2.9
		Ca	1.20

Table 4.2.2 The composition of micro-algal medium

Chemicals	Concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	Element	Final conc. ( $\mu\text{g/L}$ )
$\text{H}_3\text{BO}_3$	186	B	32.5
$\text{MnCl}_2$	264	Mn	115
$\text{ZnCl}_2$	3.27	Zn	1.57
$\text{CoCl}_2$	0.780	Co	0.354
$\text{CuCl}_2$	0.009	Cu	0.04
$\text{Na}_2\text{MnO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7.26	Mo	2.88
$\text{FeCl}_3$	96.0	Fe	30.0
$\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	300		

### (三) 實驗條件的控制

- 溫度：在恆溫室中進行實驗，控制溫度在  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 。
- 光度：利用白冷光從系統的一方平行連續照射，使培養槽及試驗瓶中間段之光度在  $4,300 \pm 5\%$  lux。
- 曝氣：以 480 ml/min 之空氣流速將培養母槽做曝氣動作。
- pH 值：毒性試驗之 pH 值控制在  $7.50 \pm 0.10$  之間。

以上各個參數皆每天量測，確保實驗的穩定度。

### (四) 實驗前的準備

#### (a) 玻璃器皿：

先經不含磷的清潔劑清洗後再用自來水沖洗數次，接著以 10 % HCl 溶液浸泡至少 1 小時，取出後以  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  溶液中和。再用自來水沖洗約 5-6 次，並以去離子水沖洗 3-4 次後放入烘箱中加以烘乾（溫度保持於  $50 \pm 5^\circ\text{C}$ ）。使用前通口處封上鋁箔，然後置於設定為  $1.1 \text{ kg/cm}^2$ ， $121^\circ\text{C}$  的滅菌釜中滅菌 15 分鐘。



(b) 培養用母槽：

先用不含磷的清潔劑清洗後再用自來水沖洗數次，直到不見泡沫為止；然後以去離子水清洗，瀝乾後在母槽上的各個開口覆上錫箔紙，放入滅菌釜中滅菌 15 分鐘後，取出後待回復至室溫才使用。

(c) 藻類的保存

開始時先進行固態培養基的培養，固態培養基組成和液態營養鹽相同；但加 1% 之洋菜膠 (Agar)，通常可保存六個月 (在 4 °C 下)。藻類每四個星期移植至新的培養皿以保持菌種的健康。另外也做液態營養鹽的培養，通常可保存四個星期 (4 °C)，四個星期後繼續做移植以保存菌種。

(五) ISOTON II 溶液的配製

加入 10 g NaCl 於 1 公升的超純水中完全混合，並以電導計測其導電度，其導電度應為 17 mmho。若超過 17 mmho，則以超純水稀釋直到導電度為 17 mmho，若低於 17 mmho，則加入少量 NaCl 直到導電度為 17 mmho。此溶液以 0.2 $\mu$ m 濾紙過濾即得 Isoton II 溶液。其主要作用在於當作電子顆粒計數器之導電溶液。

(六) 電子顆粒計數法及操作原理

電子顆粒計數器內有一根玻璃管，操作中需浸入含有 Isoton II 稀釋樣品的燒杯中，水樣在量測的過程須加以攪拌以使顆粒均勻分佈。

在玻璃管近底端的側面有一小圓孔，藉以吸取水樣。在玻璃管內外各有一電極片通以直流電，當水樣中所含之顆粒經過圓孔時，會暫時性地干擾到電流，形成某特定量的電阻。而電阻訊號透過示波器的波峰顯示，其高度正比於顆粒的大小，且脈衝數即是溶液內顆粒的數目，直接由電子計數器記錄顯示。電子顆粒計數器主要條件設定如 Table 4.2.3。

本實驗採用 100  $\mu\text{m}$  孔徑之毛細玻璃管，其設定之量測粒徑上下限為 2.177 – 6.975  $\mu\text{m}$ 。量測時，取 1 ml 的藻液置入 50 ml 之量瓶內，再加入 Isoton II 至 50 ml。將定量好的溶液倒入燒杯，放進顆粒計數器內量測。以顯示之讀數值扣除空白顆粒數之數值（純 Isoton II 之背景值），連續三次其值相差在 2% 者之平均值為量測值。

Table 4.2.3 Operational parameters of Coulter Counter

Parameter	values
Full scale	10mA
Polarity	+
Currents , I	100
Diameter Lower Threshold , Tl	2.622 $\mu\text{m}$
Diameter Lower Threshold , Tu	30 $\mu\text{m}$
Attenuation , A	1
Preset Gain	1
Alarm Threshold	OFF
Analysis amount	500 $\mu\text{L}$

### (七) 溶氧測定器的校正

一般溶氧測定器可使用飽和空氣於水中校正與空氣校正兩種，但因前者須將水曝氣至 100%相當困難，因此建議採用空氣校正法。本實驗使用美國 YSI 公司數字型溶氧測定器 (Model 5100)，空氣校正法介紹如下：

1. 將溶氧電極準備好。
2. 連接溶氧電極。
3. 注入 1 英吋高的水於 BOD 瓶中，將電極置入 BOD 瓶，形成相對濕度 100%的環境。
4. 啟動溶氧測定儀。
5. 待經過 15 分鐘以上，使系統達平衡。
6. 按下校正按鍵。
7. 確認氣壓讀數。
8. 當讀值穩定後，按 AUTO CAL 校正溶氧值，螢幕將出現”D.O. CALIBRATION SAVED”。
9. 按 MODE 回主畫面，即校正完畢。

### (八) 實驗步驟

先將欲移植的藻類由 4°C 的冰箱中取出，進行批次式培養三天，以活化藻細胞，使其達到對數生長期。然後以藻液：培養基為 1：3（體積比）之比例植入 4 L 之連續式培養槽中。

將連續式培養槽培養於恆溫室中，槽底放置磁石攪拌器，轉動的磁石可讓藻類與培養基均勻混合，避免藻類沉澱及少量供應 CO<sub>2</sub> 之作用，另外經由曝氣裝置之進流氣體則供應 CO<sub>2</sub> 及均勻混合之作用。連續式白冷光從培養槽一邊照射，讓培養槽中段之光照強度介於 4,300 ± 5 % lux 之間。

當培養槽的藻類數達到相當的數量(約最大可能藻類數之 80-90%)，即以蠕動幫浦進流營養液。由於培養槽體積固定(母槽設有溢流口)，故可直接由流量控制所需之稀釋率(0.25/day)，控制培養槽內藻類之生長率。

經由每天更換新鮮的進流基質，並量測槽中細胞數量、pH 值、及觀察粒徑分析儀中藻類細胞之分佈情形(細胞平均體積，MCV)，以判定連續式培養槽是否達到穩定狀態。以連續 3 天之細胞數量、pH 值、MCV 等參數皆在控制的範圍內且粒徑分析儀中藻類細胞之分佈為一常態分佈，即可認定為系統達到穩定狀態。參數範圍：細胞數量 ( $1.7 \times 10^4$ - $1.9 \times 10^4$  cells/ml)、pH 值 (7.3-7.8) 及粒徑分析儀中藻類細胞之分佈情形 (MCV 在  $39$ - $46 \mu\text{m}^3$  之間)。

毒性試驗的營養鹽參考 U.S. EPA 建議配製，適當地修正濃度作為本試驗的營養鹽；以含 0.5 %  $\text{CO}_2$  的  $\text{N}_2$  氣體(流量為 600 ml/min) 對營養鹽進行曝氣，降低水中的溶氧值並提高其  $\text{CO}_2$  含量，再以 0.1N 的 NaOH 和 HCl 將營養鹽的 pH 值調整至  $7.5 \pm 0.1$ ，完成營養鹽的配製。

從培養母槽(steady state) 取出之藻液與上述之營養鹽混合成所需濃度，接下來加入不同之毒物濃度(含一組控制組及六組處理組)的試驗瓶，每組實驗進行三重複；此時須注意各瓶中的營養鹽濃度與初始細胞密度應該相同，本實驗之初始細胞密度設定在 15,000 cells/ml。另外，本實驗會量測初始之溶氧值(initial DO)，在此要注意曝氣的時間及狀況，盡量讓初始溶氧值降到最低，減少實驗可能的誤差。

經過 48 小時的毒性物質曝露後，量測各加入不同毒物濃度後的試驗瓶之溶氧值(final DO)，扣除起始之溶氧值可得淨溶氧值( $\Delta\text{DO}$ )，接著測量瓶中細胞密度以求得藻類生長率。利用水樣濃度與上述參數，透過 Probit 模式分析，求出毒性物質之  $\text{EC}_{50}$  值與劑量曲線圖。整個實驗的程序，可由 Fig. 4.2.1 表示。

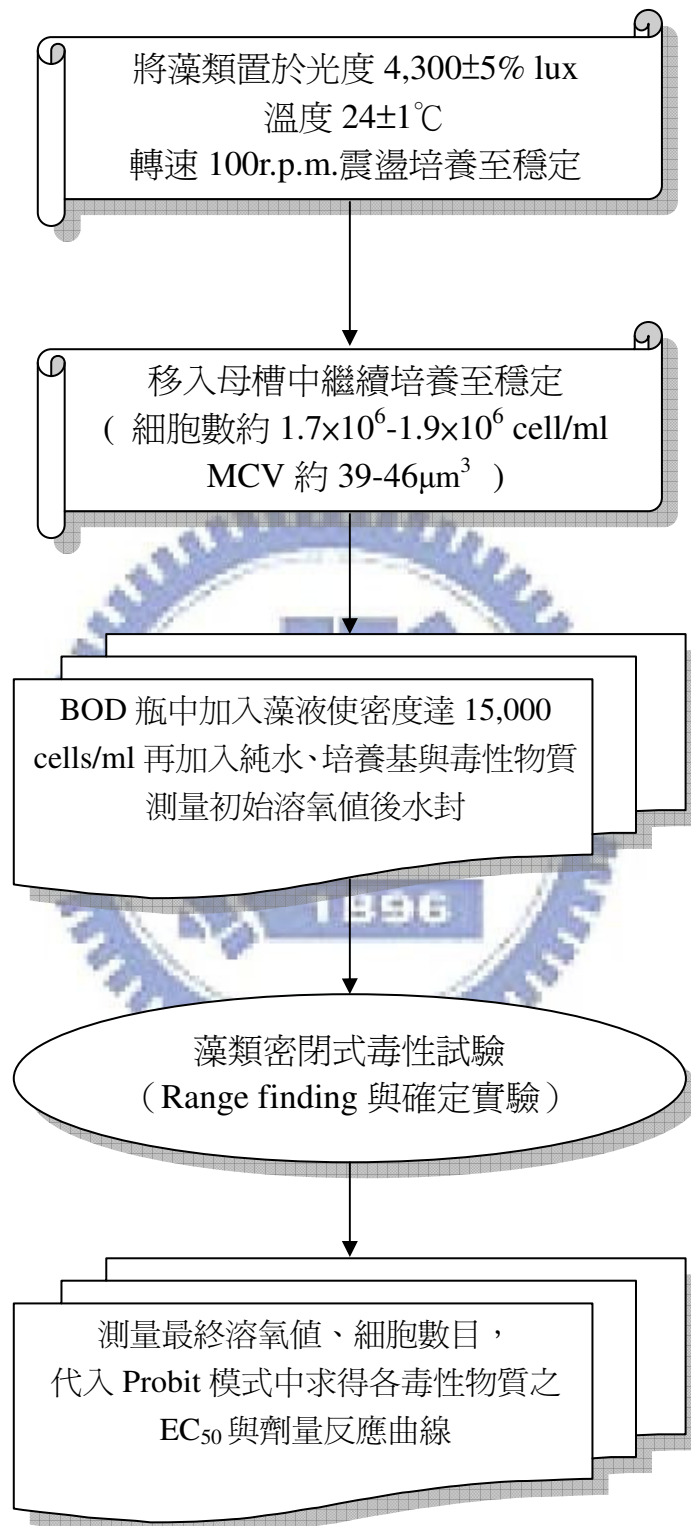


Fig. 4.2.1 Flow chart of algal toxicity tests.



## 4.2.2 除草劑藥品之配置與定量

藥品之配置分成標準品及測試溶液。

### (一) 標準品之配置

取 10 mg 的藥品，溶於裝有有機溶劑(如 Acetonitrile)之 250 mL 錐形瓶中，再加以定量至 0.1 L (濃度為 100 mg/L)，待完全溶解後，當作標準儲備液；此部份所配置的樣品做為 HPLC 標準品校正定量用。

### (二) 儲備液之配置

待至標準品校正後，再取適量儲備液加入裝有去離子水的血清瓶中稀釋，迅速蓋上瓶蓋封緊，快速混合約 30 秒，並馬上用於毒性試驗中。

在每次實驗前，皆利用 HPLC 將樣品定量分析，測得溶液中確實的藥品溶解量 (nominal concentration)，確保實驗的準確度。必須注意因為有機溶劑的揮發性極高，所以每次實驗用的儲備液皆是在實驗前 1 小時才配製，避免揮發造成影響。

### (三) HPLC 之操作

#### (a) 前處理

在定量前，要先對 HPLC 做校正程序：去除氣泡，以減少誤差。

#### (b) HPLC 操作步驟

開機後先將偵測器之燈關掉，然後用乙腈 (acetonitrile) 以流速 1.0 ml/min 流洗 30 分鐘。將偵測器 (此為紫外光偵測器) 之燈打開，儀器歸零。設定操作條件：波長 ( $\lambda$ ) 為 220-254 nm (依照各個除草

劑之分析條件)，滯留時間 (retention time) 為 10 分鐘 (滯留時間亦隨不同的分析物質而改變)，樣品注射量為 20  $\mu\text{l}$ ，mobile phase 流速為 1.0 ml/min。

以專用注入針頭取樣品打進注入孔中，開始分析。當分析結束之後，即可在電腦螢幕上觀察脈衝 (peak) 之變化情形，並可進一步求得樣本中所含物質之種類及濃度。

儀器關閉前，需再用乙腈以 1 ml/min 之流速流洗 30 分鐘始可關閉。待流洗完畢，關掉儀器及電腦。整個操作流程圖如 Fig. 4.2.2。



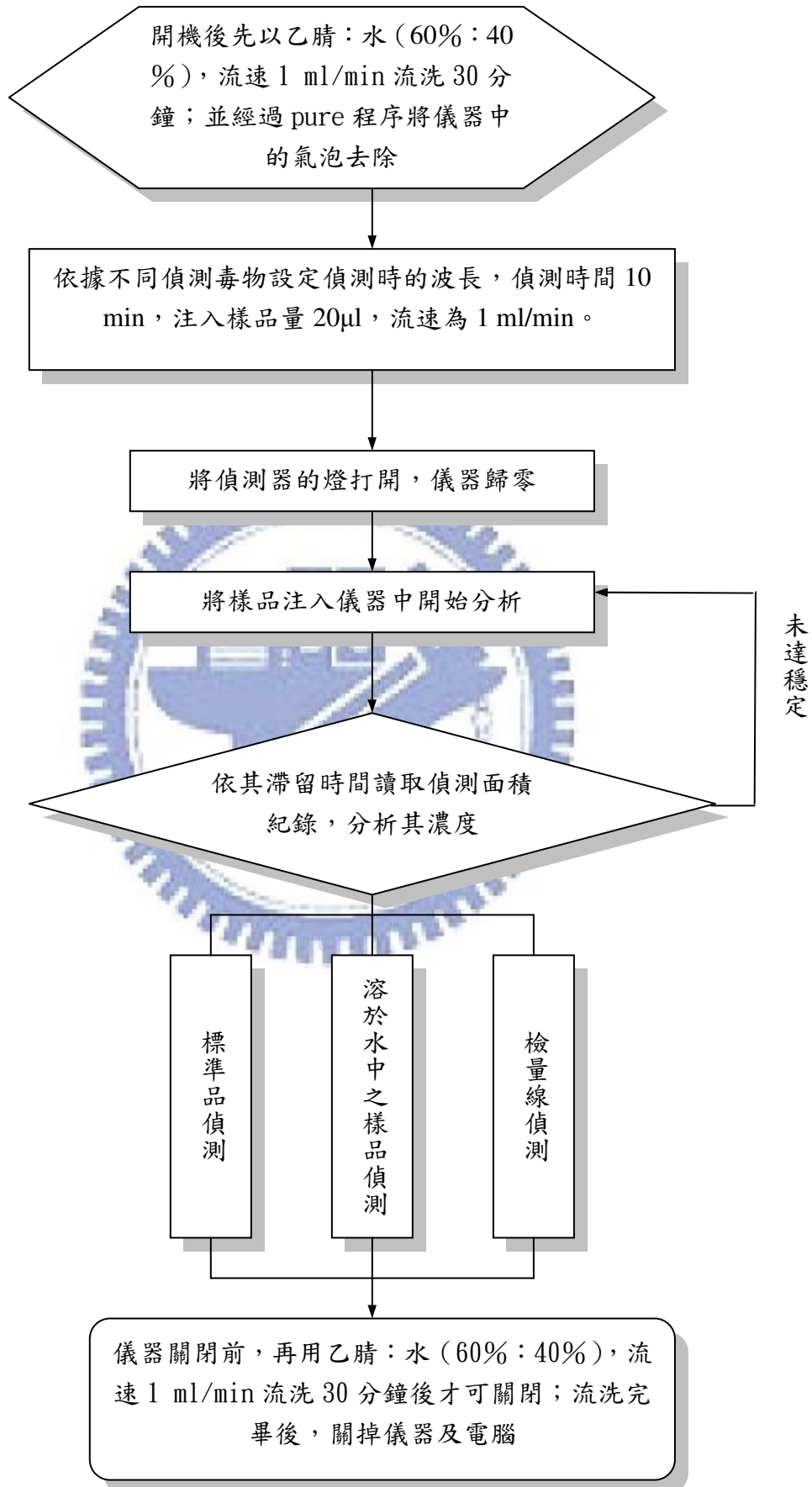


Fig. 4.2.2 Flow chart of HPLC analysis.

## 4.3 實驗數據之處理

### 4.3.1 試驗濃度的產生

實驗一開始先進行 range finding 的測試，濃度範圍會參考文獻中的數據，再將範圍擴大至少橫跨 3 個 order，再逐步縮小至確定的試驗濃度值，當濃度確定後，至少進行 2 次的藻類密閉式毒性試驗，當實驗結果的差距在 10 % 內才算完成實驗，以求得更準確的實驗數據。

### 4.3.2 模式的運用

將實驗所測出之各參數值（如淨生長細胞數及淨產氧量）與對應之有機物濃度帶入模式（Probit）中計算，得到各模式的劑量反應曲線及  $EC_{50}$  值；並且由圖中求得生長曲線斜率，作為日後討論。



## 4.4 實驗之 QA/QC

### 4.4.1 定量之再現性

為了整個實驗的準確度，對於 HPLC 定量所呈現的再現性需做探討。其中可分成以積分面積及滯留時間兩種來評量。每一個毒性物質都會做標準品定量，重複十次分析過程，得到的積分面積和滯留時間做統計上的整理。

### 4.4.2 檢量線配置

利用於 HPLC 定量時的標準品濃度及積分面積做線性迴歸製作檢量線方程式，供日後濃度定量時使用。製作的檢量線線性關係迴歸值 ( $r^2$ ) 必須大於 0.95 以上方為良好的相關度，這樣的分析品質才能讓實驗過程的誤差值減少，增加實驗的準確度。

### 4.4.3 實驗條件之控制

本研究除了在整個實驗期間的溫度約維持在  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  情況下，其他的操作條件皆須依據 Lin<sup>[52]</sup> 所訂制出的範圍內；另外需注意的是 48 小時間過程中震盪檯面上的光度變化影響；基本上我們都將暴露的光度維持在約  $4300 \pm 5\% \text{ lux}$  ( $64.5 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ )，約 1 個禮拜的時間測量一次各個試驗位置的光度，以確保整個實驗過程前後的一致性。



## 五、結果與討論

### 5.1 藻類毒性試驗數據

本研究以兩類不同作用機制的除草劑作為毒性物質，以密閉式的藻類毒性試驗方法，反應終點分別為：溶氧變化量 ( $\Delta DO$ )、生物質量 (Final Yield) 及生長率 (Growth Rate)；實驗得到的數據進一步去計算  $EC_{50}$  值並繪製劑量反應曲線。

Table 5.1.1-5.1.3 是經由 Probit 模式計算出的  $EC_{50}$  值、截距 ( $\alpha$ )、斜率 ( $\beta$ ) 及 95 % 信賴區間。在二十種除草劑當中，首先以溶氧變化量為反應終點，cyclosulfamuron 具有最高毒性 ( $EC_{50} = 0.002 \text{ mg/L}$ )，其次是 halosulfuron-methyl ( $EC_{50} = 0.003 \text{ mg/L}$ )，兩者皆為 B 類的除草劑，而毒性最低則是 A 類的 clodinafop-propargyl ( $EC_{50} = 6.987 \text{ mg/L}$ )；再來以 final yield 為反應終點作比較，毒性最強的除草劑是 cyclosulfamuron ( $EC_{50} = 0.0008 \text{ mg/L}$ )，其次是 halosulfuron-methyl ( $EC_{50} = 0.002 \text{ mg/L}$ )，毒性最低的仍是 clodinafop-propargyl ( $EC_{50} = 8.264 \text{ mg/L}$ )；最後以 growth rate 為反應終點，毒性最高為 halosulfuro-methyl ( $EC_{50} = 0.0034 \text{ mg/L}$ )，其次才是 cyclosulfamuron ( $EC_{50} = 0.0037 \text{ mg/L}$ )，最不毒的仍是 clodinafop-propargyl ( $EC_{50} = 28.855 \text{ mg/L}$ )。觀察以上三參數得到的結果，發現雖然 cyclosulfamuron 和 halosulfuron-methyl 毒性互有高低，就數據本身而言，兩者之間的毒性可以認為是相同的。

在反應終點敏感度方面，以 final yield 為最敏感的反應終點 (佔 70%)，其次是  $\Delta DO$  (佔 30%)，growth rate 的敏感度最低。若以作用機制分類來看，A 類除草劑反而以  $\Delta DO$  為最敏感的反應終點 (佔 63%)，B 類除草劑則仍以 final yield 為最敏感的反應終點 (佔 83%)。A 類除草劑

產生這樣的實驗結果，其實是令人出乎意料的，原本預期的結果是 A 類除草劑也對反應終點 final yield 同樣敏感；A 類除草劑的作用機制主要是抑制乙醯輔酶 A 羧化酶的活性，而乙醯輔酶 A 羧化酶的功用即在於幫助細胞本身合成脂肪酸，構成細胞膜等脂質成份，巨觀來看，這樣的作用機制直接影響的就是細胞本身，因為知識及技術上的限制，這部份需要有對藻類細胞了解更深的人員去進一步研究。

Fig. 5.1.21 的三個方程式是依 Russom *et al.*<sup>[53]</sup>、Aker *et al.*<sup>[54]</sup>及 Ramos *et al.*<sup>[55]</sup>對毒性機制所做出的分類以及經由密閉式藻類毒性試驗所得到的方程式<sup>[56]</sup>，將本研究除草劑的毒性試驗數據描繪於圖上（Fig. 5.1.21 的實心數據點），發現 A、B 兩類除草劑多落於迴歸線的上方，且這二十種除草劑的毒性遠高於基線毒性

Fig.5.1.1- 5.1.20 為本研究除草劑對藻類毒性試驗的劑量反應曲線。



Table 5.1.1 Median effective concentration ( $EC_{50}$ ) based on dissolved oxygen production.

Toxicants	Response based on DO			
	$EC_{50}$ (mg/L)	$\alpha$	$\beta$	95% Confidence interval
<b>Group A</b>				
Clodinafop-propargyl	6.99	4.27	0.862	5.72 – 8.60
Diclofop-methyl	0.192	6.08	1.51	0.169 – 0.219
Fluazifop-p-butyl	0.074	5.94	0.830	0.045 – 0.115
Propaquizafop	0.347	5.84	1.82	0.308 – 0.394
Quizalofop-p-ethyl	0.045	5.89	0.660	0.025 – 0.081
Clethodim	0.471	5.24	0.722	0.237 – 0.950
Cycloxydim	0.474	5.44	1.35	0.387 – 0.580
Tralkoxydim	3.83	4.12	1.51	3.13 – 4.69
<b>Group B</b>				
Bensulfuron-methyl	0.089	5.60	0.565	0.032 – 0.196
Chlorsulfuron	0.277	5.47	0.833	0.132 – 0.816
Cinosulfuron	0.395	5.43	1.07	0.208 – 0.685
Cyclosulfamuron	0.002	6.68	0.632	0.001 – 0.009
Halosulfuron-methyl	0.003	7.20	0.897	0.003 – 0.004
Metsulfuron-methyl	0.810	5.08	0.893	0.453 – 1.616
Primisulfuron-methyl	0.149	5.98	1.18	0.130 – 0.173
Rimsulfuron	0.144	6.02	1.22	0.106 – 0.196
Imazamox	0.172	5.48	0.623	0.124 – 0.239
Imazethapyr	5.66	4.11	1.18	4.95 – 6.53
Flumetsulam	0.015	6.94	1.06	0.009 – 0.024
Pyrithibac-Na	0.111	5.56	0.589	0.058 – 0.219

Table 5.1.2 Median effective concentration (EC<sub>50</sub>) based on final yield.

Toxicants	Response based on FY			
	EC <sub>50</sub> (mg/L)	$\alpha$	$\beta$	95% Confidence interval
<b>Group A</b>				
Clodinafop-propargyl	8.26	3.90	1.20	4.17 – 20.5
Diclofop-methyl	0.260	5.99	1.69	0.242 – 0.280
Fluazifop-p-butyl	0.069	6.08	0.931	0.063 – 0.077
Propaquizafop	0.504	5.57	1.90	0.366 – 0.729
Quizalofop-p-ethyl	0.038	5.96	0.675	0.013 – 0.099
Clethodim	1.06	4.98	0.788	0.636 – 1.748
Cycloxydim	0.347	5.69	1.50	0.283 – 0.426
Tralkoxydim	4.66	3.94	1.58	3.72 – 5.80
<b>Group B</b>				
Bensulfuron-methyl	0.052	5.76	0.593	0.026 – 0.098
Chlorsulfuron	0.075	6.80	1.60	0.039 – 0.135
Cinosulfuron	0.255	5.62	1.05	0.144 – 0.471
Cyclosulfamuron	0.001	6.97	0.631	3.8E-06 – 0.005
Halosulfuron-methyl	0.002	7.23	0.857	0.001 – 0.005
Metsulfuron-methyl	0.534	5.35	1.29	0.388 – 0.728
Primisulfuron-methyl	0.085	6.73	1.61	0.080 – 0.090
Rimsulfuron	0.090	6.45	1.39	0.065 – 0.127
Imazamox	0.190	5.56	0.782	0.169 – 0.214
Imazethapyr	4.38	4.06	1.46	3.27 – 5.82
Flumetsulam	0.018	6.59	0.914	0.014 – 0.024
Pyriithibac-Na	0.023	6.61	0.801	0.013 – 0.040

Table 5.1.3 Median effective concentration (EC<sub>50</sub>) based on growth rate.

Toxicants	Response based on GR			
	EC <sub>50</sub> (mg/L)	$\alpha$	$\beta$	95% Confidence interval
<b>Group A</b>				
Clodinafop-propargyl	28.9	3.00	1.37	17.4 – 103.7
Diclofop-methyl	0.836	5.11	1.42	0.777 – 0.908
Fluazifop-p-butyl	0.536	5.23	0.840	0.475 – 0.606
Propaquizafop	1.44	4.73	1.70	1.18 – 1.91
Quizalofop-p-ethyl	0.667	5.10	0.540	0.372 – 1.436
Clethodim	9.31	4.21	0.820	5.46 – 19.9
Cycloxydim	1.10	4.94	1.53	0.793 – 1.58
Tralkoxydim	17.4	3.49	1.21	13.9 – 23.8
<b>Group B</b>				
Bensulfuron-methyl	1.63	4.90	0.495	0.883 – 3.26
Chlorsulfuron	0.320	5.52	1.06	0.203 – 0.533
Cinosulfuron	1.70	4.82	0.804	0.808 – 3.42
Cyclosulfamuron	0.037	5.56	0.393	0.010 – 1.82
Halosulfuron-methyl	0.034	5.89	0.604	0.018 – 0.105
Metsulfuron-methyl	3.16	4.48	1.03	2.22 – 5.65
Primisulfuron-methyl	0.306	5.72	1.41	0.277 – 0.344
Rimsulfuron	0.325	5.66	1.36	0.256 – 0.432
Imazamox	2.93	4.69	0.661	2.61 – 3.33
Imazethapyr	22.0	3.55	1.08	17.7 – 29.1
Flumetsulam	0.205	5.52	0.760	0.168 – 0.259
Pyriithibac-Na	0.243	5.44	0.719	0.156 – 0.399



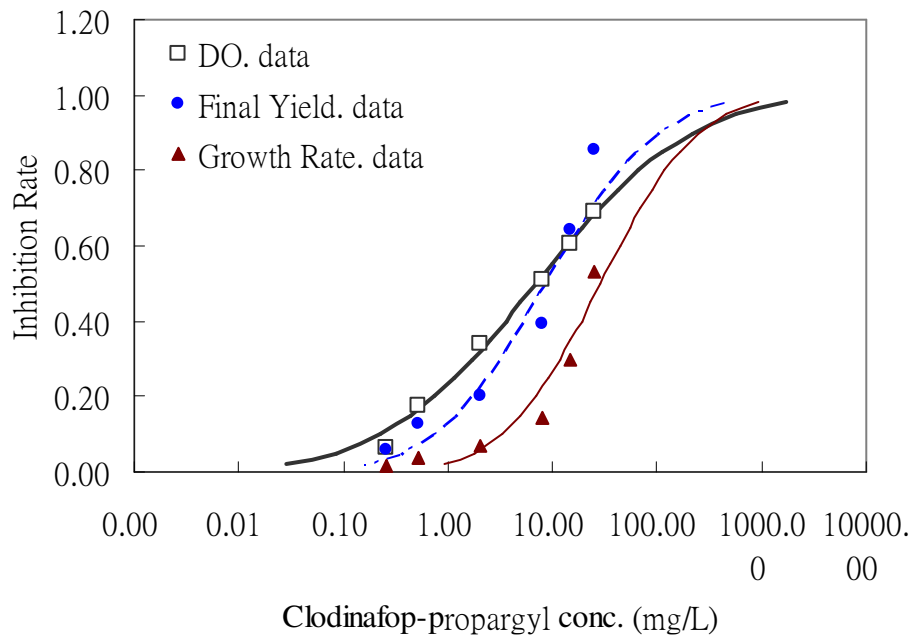


Fig. 5.1.1 Dose-response curves of clodinafop-propargyl.

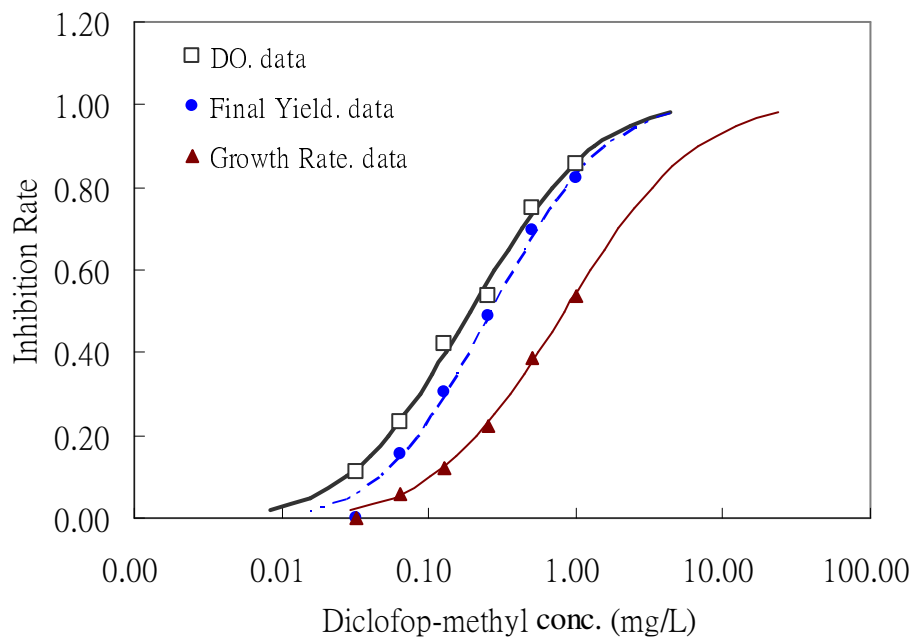


Fig. 5.1.2 Dose-response curves of diclofop-methyl

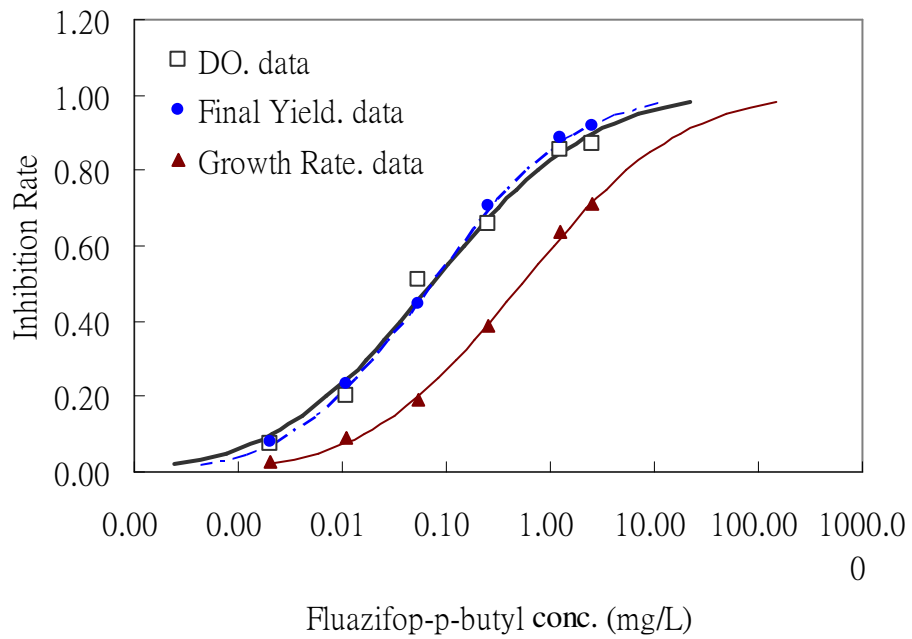


Fig. 5.1.3 Dose-response curves of fluazifop-p-butyl

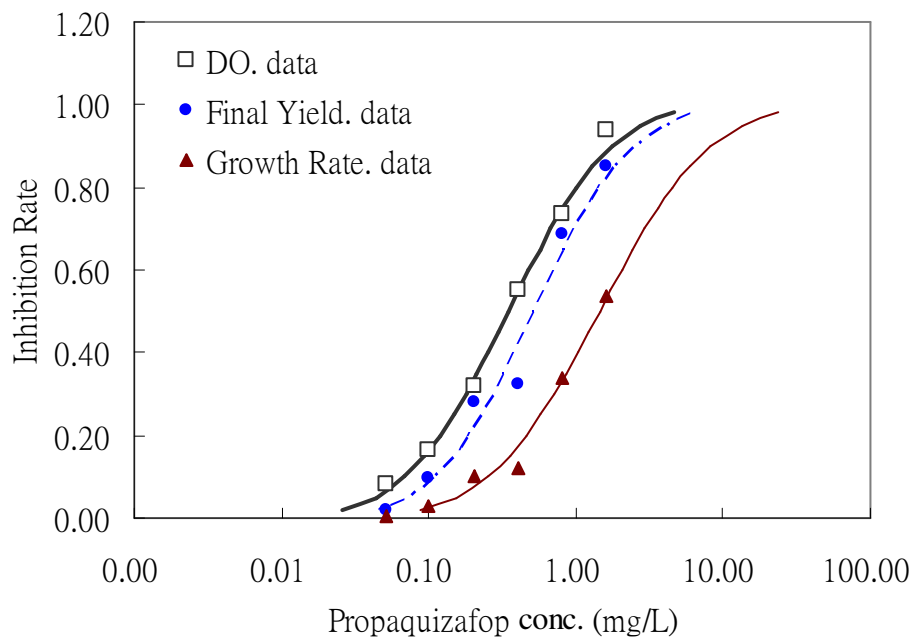


Fig. 5.1.4 Dose-response curves of propaquizafop

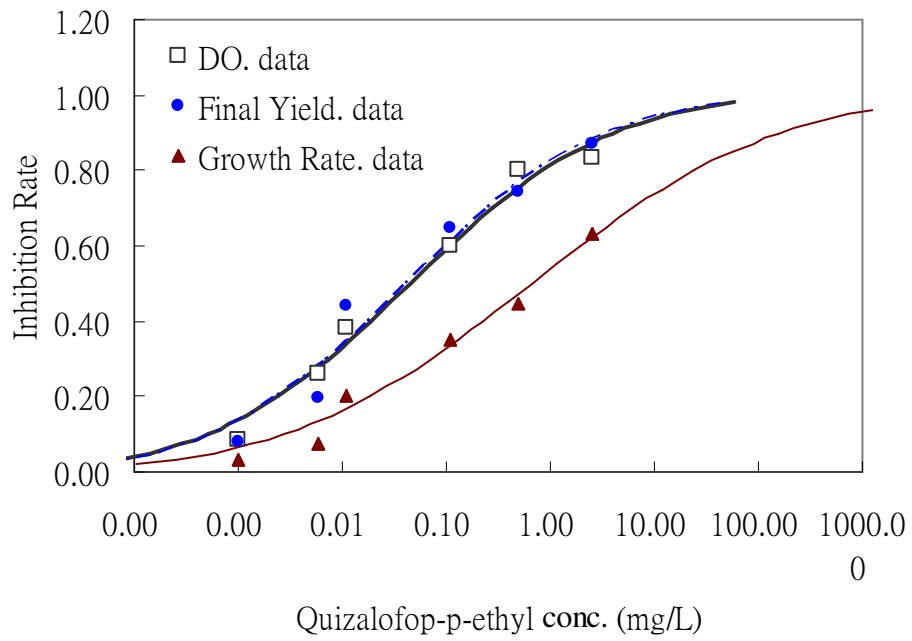


Fig. 5.1.5 Dose-response curves of quizalofop-p-ethyl

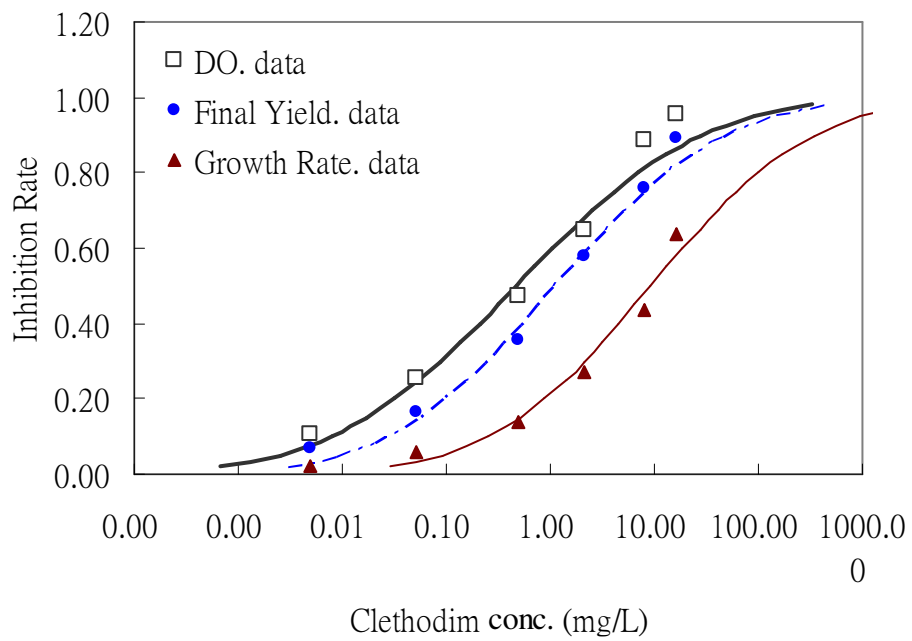


Fig. 5.1.6 Dose-response curves of clethodim

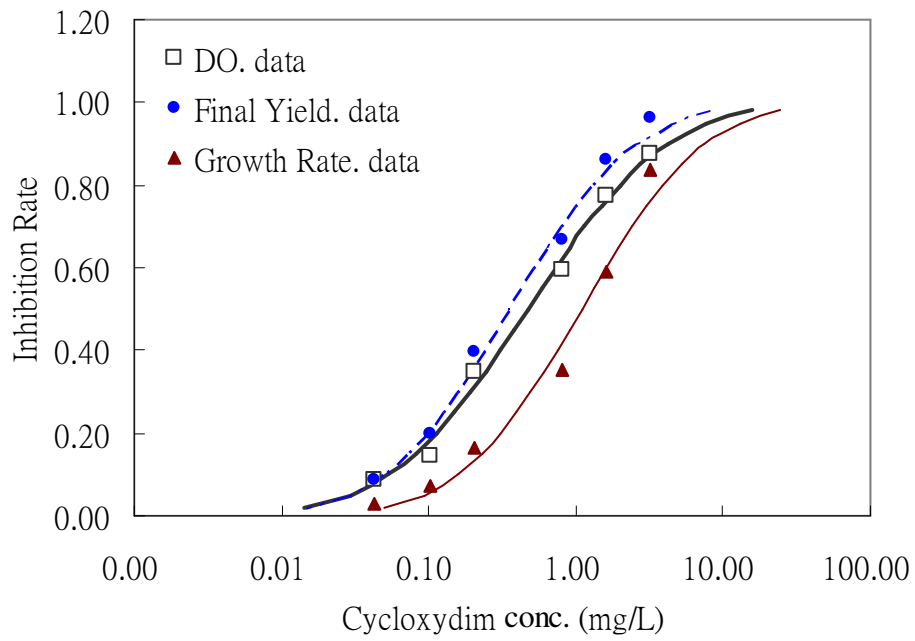


Fig. 5.1.7 Dose-response curves of cycloxydim

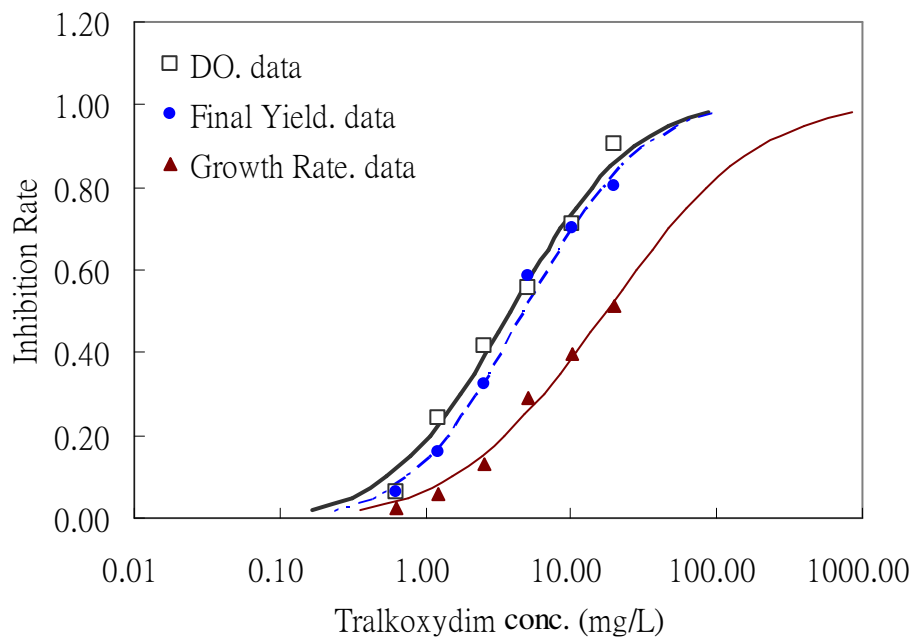


Fig. 5.1.8 Dose-response curves of tralkoxydim

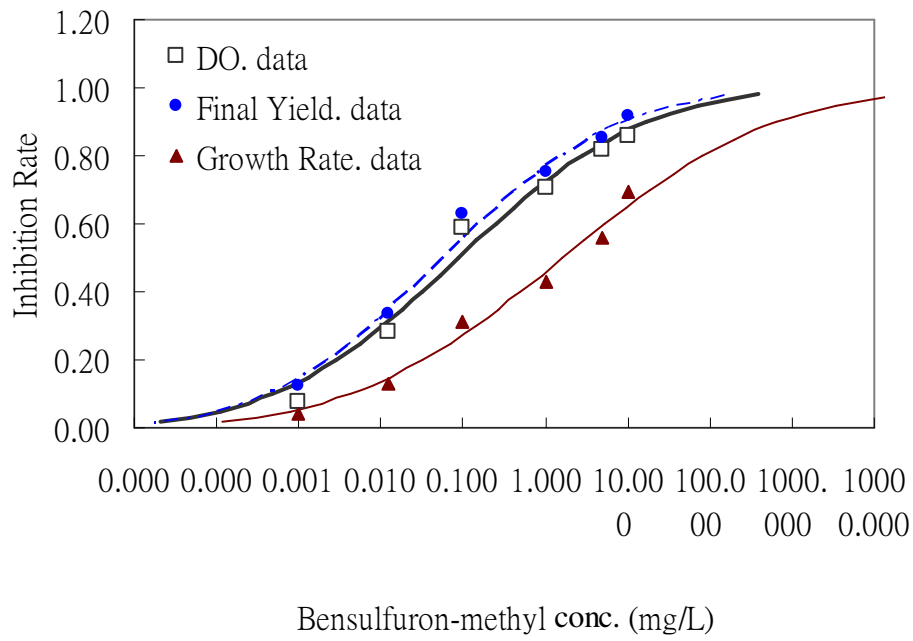


Fig. 5.1.9 Dose-response curves of bensulfuron-methyl

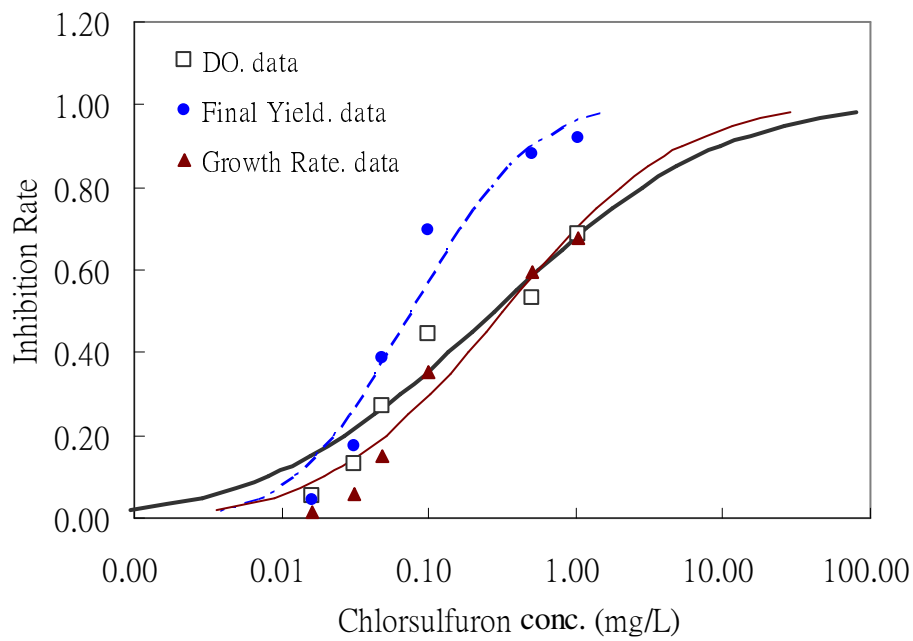


Fig. 5.1.10 Dose-response curves of chlorsulfuron



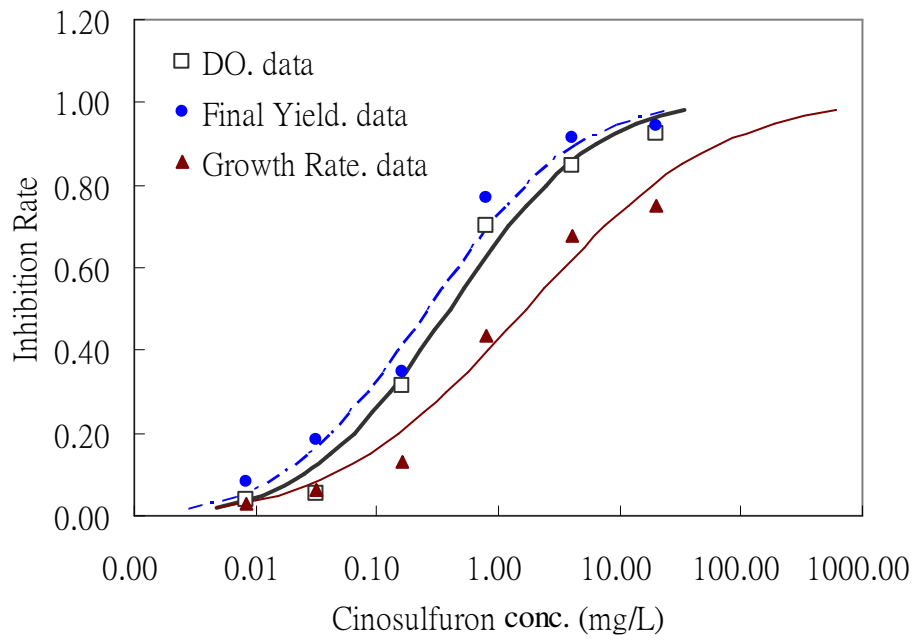


Fig. 5.1.11 Dose-response curves of cinosulfuron

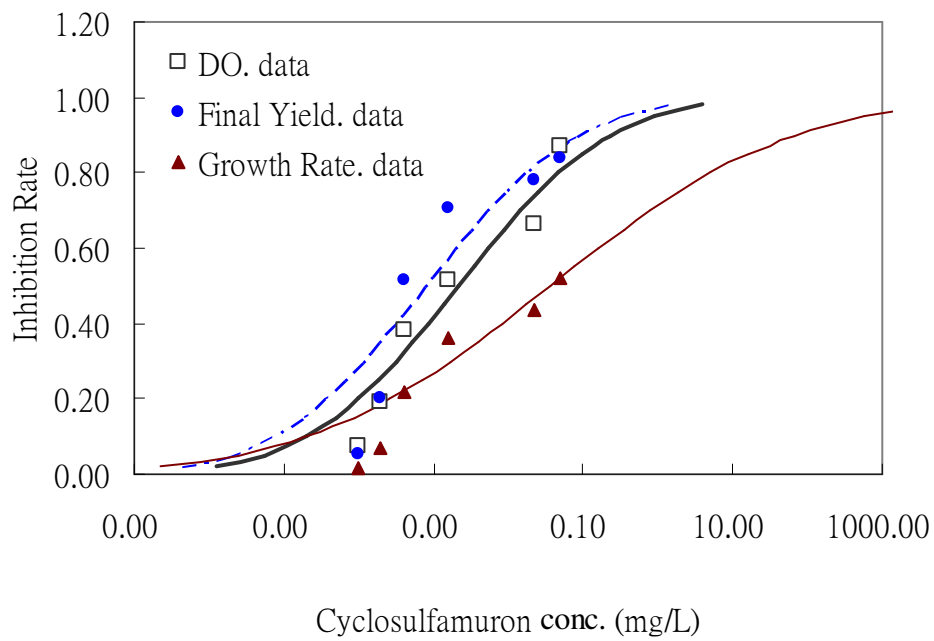


Fig. 5.1.12 Dose-response curves of cyclosulfamuron

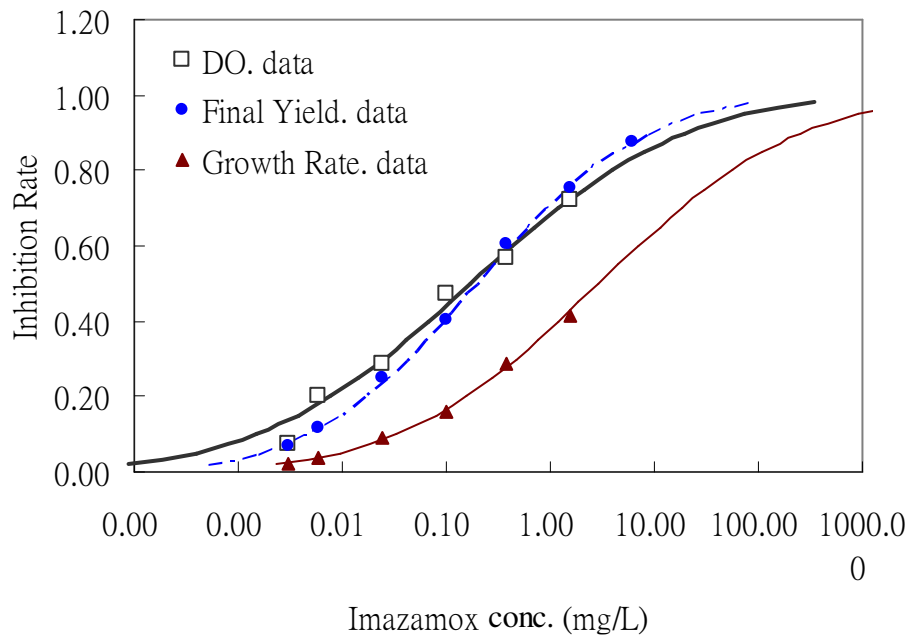


Fig. 5.1.13 Dose-response curves of imazamox

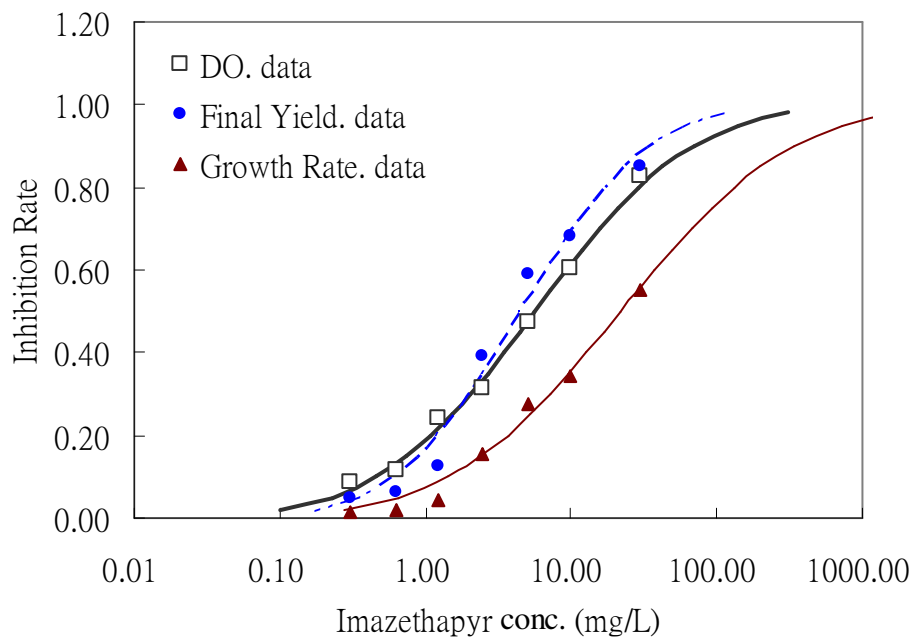


Fig. 5.1.14 Dose-response curves of imazethapyr

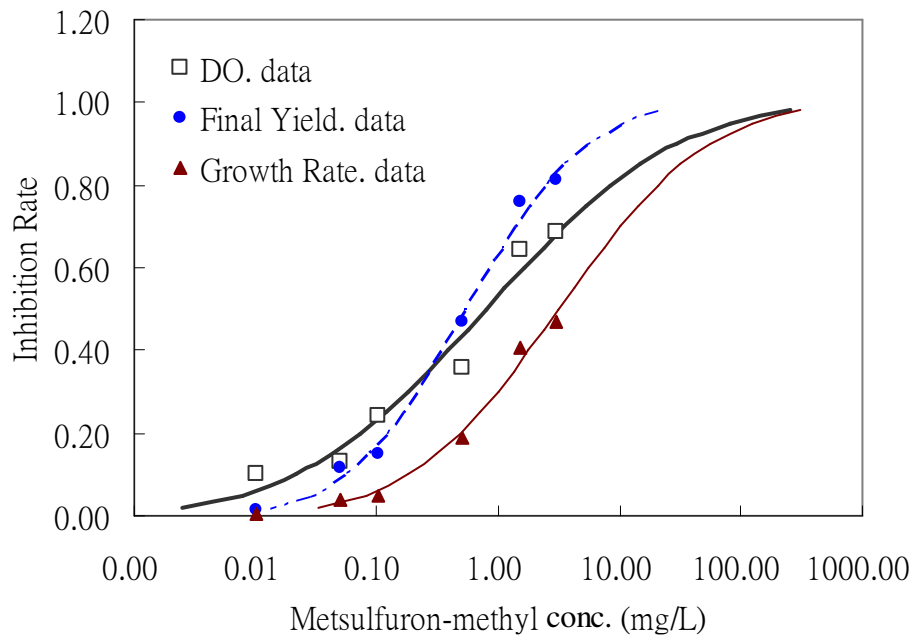


Fig. 5.1.15 Dose-response curves of metsulfuron-methyl

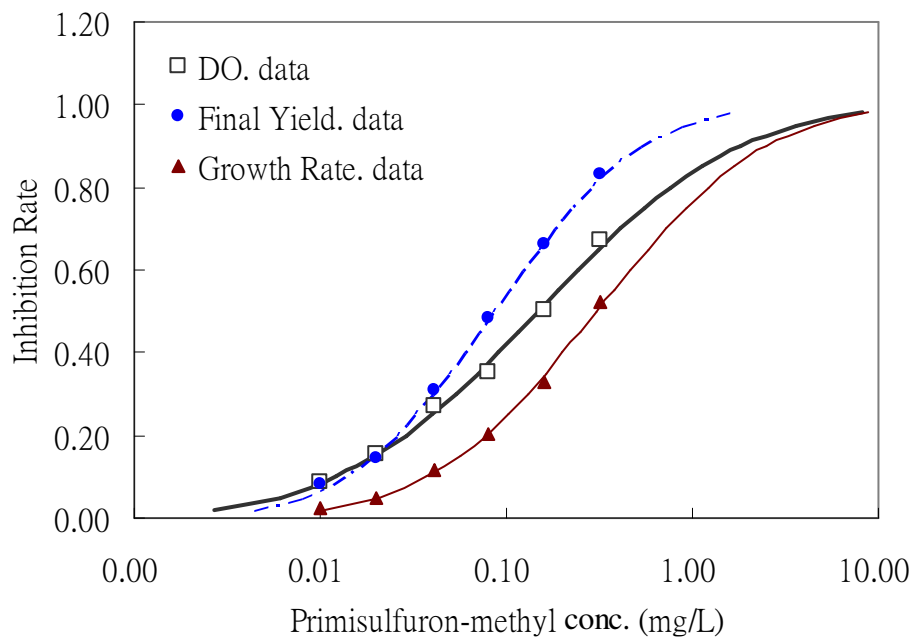


Fig. 5.1.16 Dose-response curves of primisulfuron-methyl

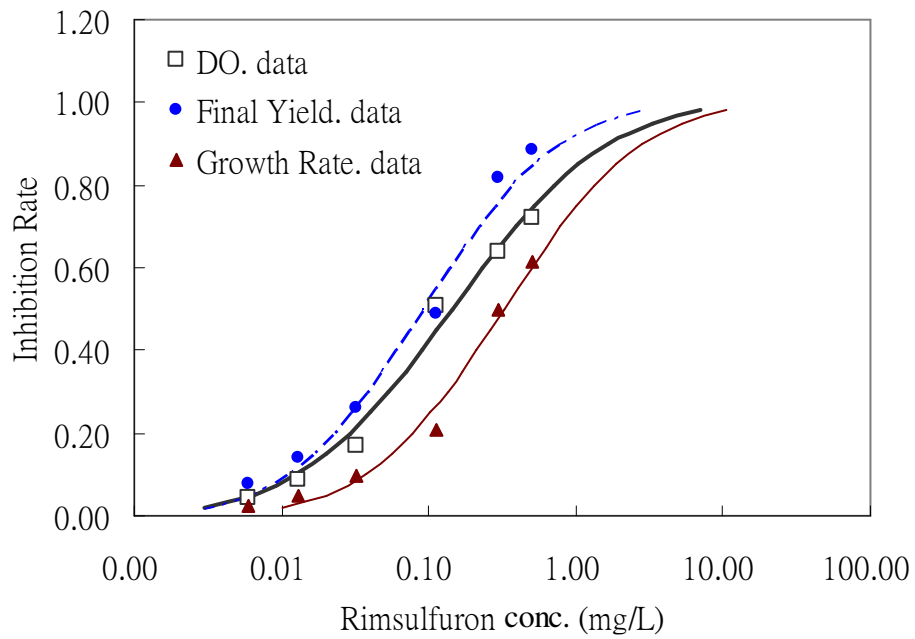


Fig. 5.1.17 Dose-response curves of rimsulfuron

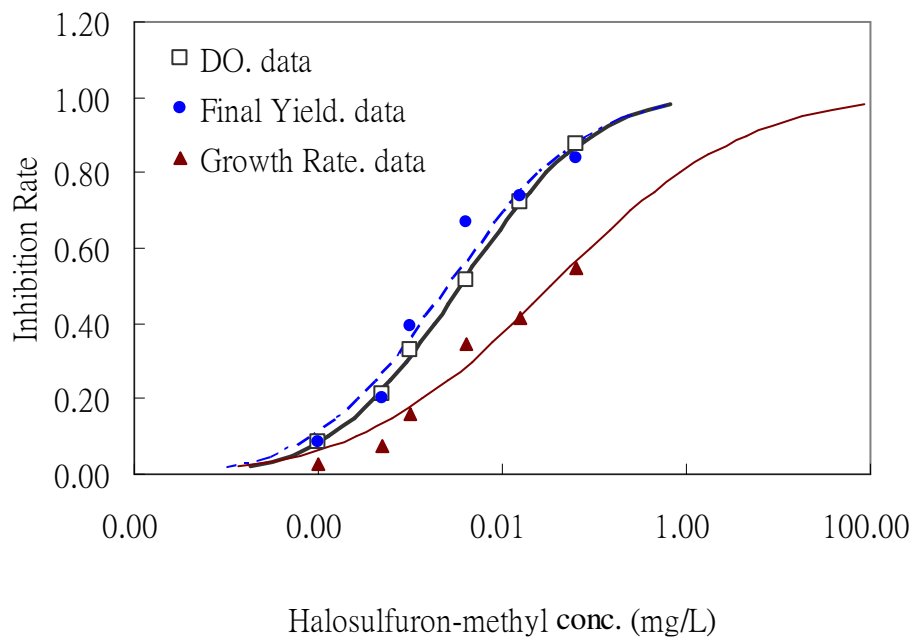


Fig. 5.1.18 Dose-response curves of halosulfuron-methyl

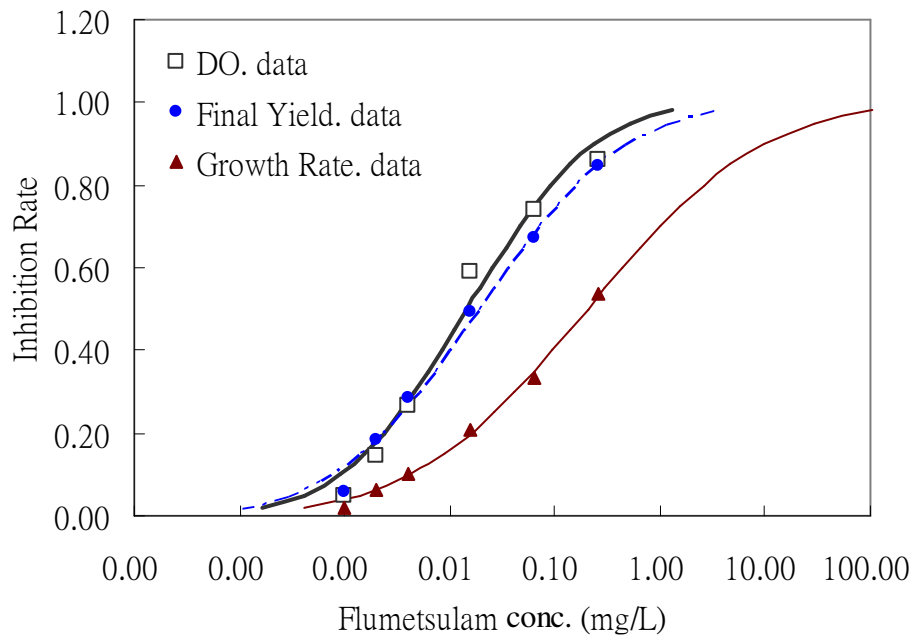


Fig. 5.1.19 Dose-response curves of flumetsulam

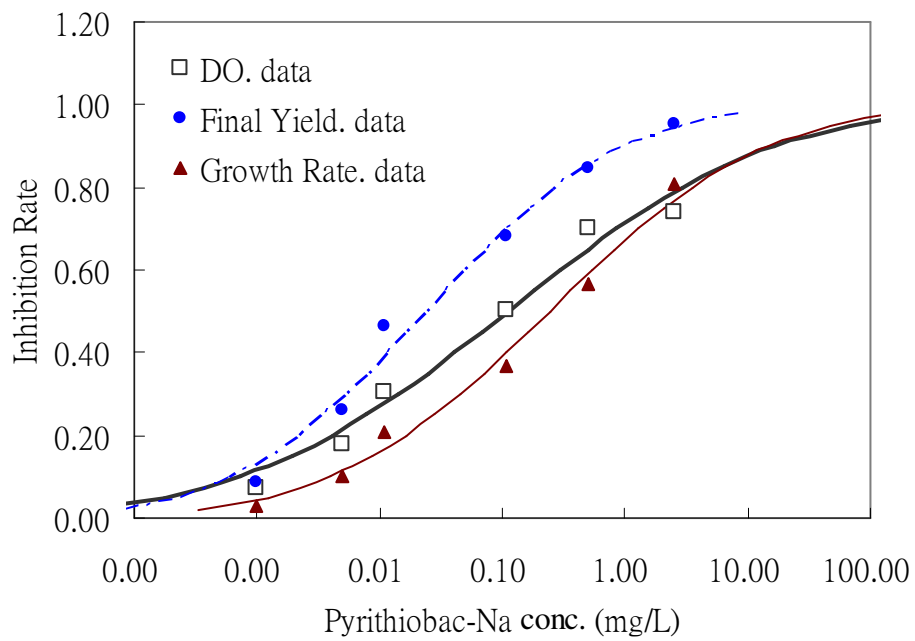


Fig. 5.1.20 Dose-response curves of pyrithiobac-Na



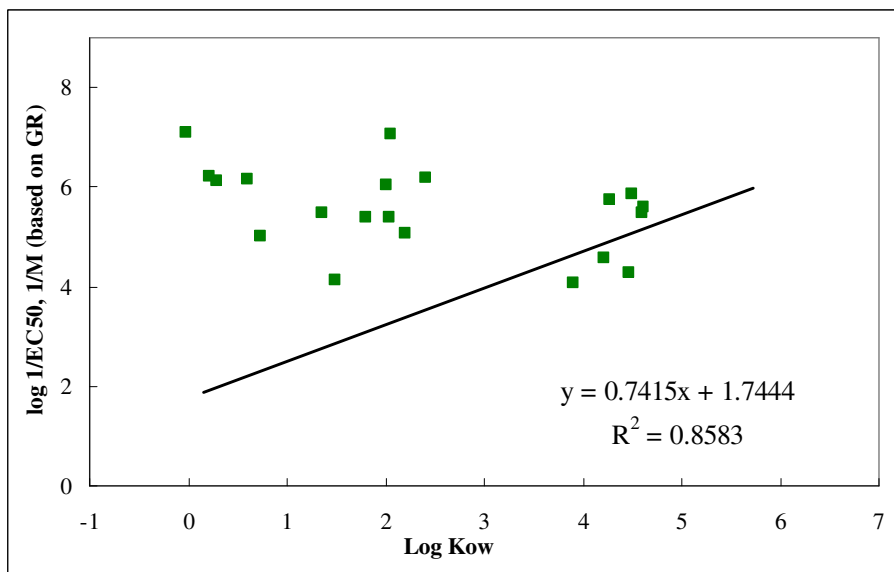
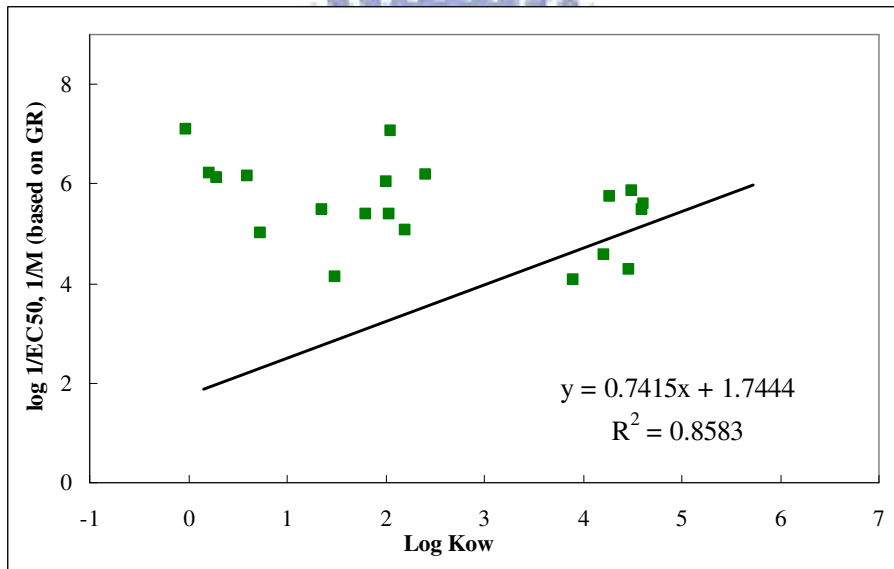
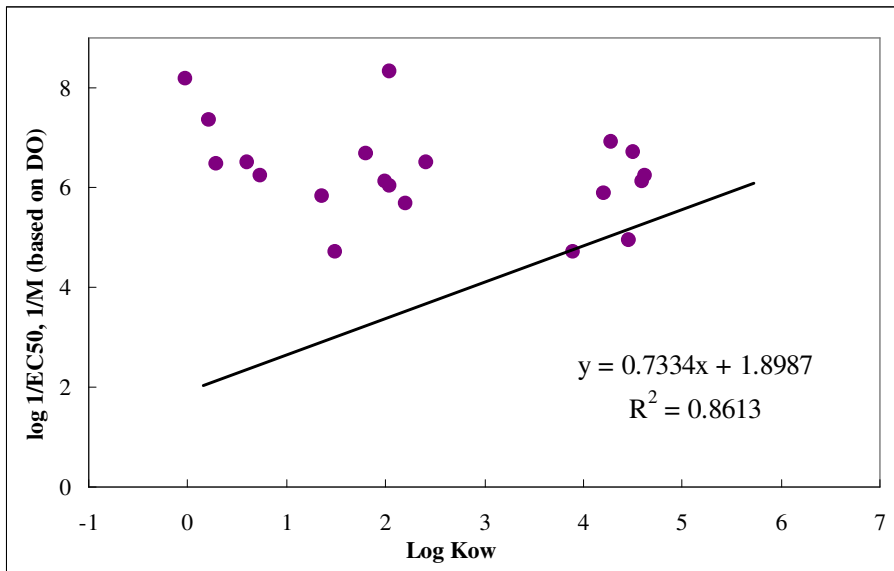


Fig. 5.1.21 Herbicide toxicities and baseline toxicities based on  $\Delta DO$  ( $\bullet$ ), final yield ( $\blacktriangle$ ), and growth rate ( $\blacksquare$ ).

## 5.2 最佳化模式

要了解實驗系統對不同毒性物質的敏感度，經常利用不同的數學模式來轉換實驗數據為  $EC_x$  值或  $LC_x$  值，成為方便比較或判定不同條件下的敏感度高低。在毒理學中常見的數學模式有 Probit、Weibull 與 Logit 三種，分別是不同的分析理論所發展出的模式，同一組數據經由不同模式所計算出的結果當然也會不一樣；不過這三種模式計算出的  $EC_{50}$  值較為穩定，彼此之間差距不大是主要的優點。

然而，應用濃度關係模式於計算低影響濃度時（例如： $EC_{10}$ ），不同模式之間的信賴區間及差異性會產生變化而造成分析上之誤差。為了避免上述情況發生，本研究之毒性試驗結果經由三種模式之分析所得之  $EC_{50}$  值進行 G-test 最佳化優選（Goodness of fit），如 Table 5.2.1-5.1.3 所示。選定最佳計算模式之後即可進一步計算出低影響濃度（ $EC_{10}$ ）。最佳化模式之選定法為經由對重覆試驗的每一處理組與期望值的誤差比較，計算後的 G 值取絕對值，絕對值最小的即為最佳模式。

本研究計算出來的 G 值在  $\Delta DO$ 、final yield 及 growth rate 三個反應終點下，皆呈現了以 Probit 模式為最佳，分別佔 55 %、75 % 及 45 %，以 final yield 為反應終點時呈現最明顯的趨勢，葉徽君 [57] 以 7 種常用農藥，包含除草劑、殺蟲劑及殺菌劑來進行藻類毒性試驗，也發現當反應終點為 final yield 時，Probit 模式是最適合的；王韻如 [58] 分析 23 種反應性（reactive）化學物質，亦發現以 Probit 模式最適合。

Table 5.2.1 G values based on dissolved oxygen production in three models

Toxicants	G of Probit	G of Logit	G of Weibull	Best fit
<b>Group A</b>				
Clodinafop-propargyl	-7.731*	-12.364	-20.208	
Diclofop-methyl	6.243	5.348*	-14.898	
Fluazifop-p-butyl	-13.678*	-18.656	-45.701	
Propaquizafop	74.905	77.244	34.523*	
Quizalofop-p-ethyl	-7.293*	-11.991	-27.920	
Clethodim	91.488	104.519	30.064*	
Cycloxydim	7.898	5.025*	-21.158	
Tralkoxydim	17.475	18.643	-8.865*	
<b>Group B</b>				
Bensulfuron-methyl	-13.926*	-19.696	-40.882	Probit (55%)
Chlorsulfuron	-27.952*	-40.843	-59.496	
Cinosulfuron	-20.898*	-195.808	-191.701	
Cyclosulfamuron	-1.790*	-6.359	-37.618	
Halosulfuron-methyl	3.777	2.004*	-20.822	
Metsulfuron-methyl	18.600	17.375	6.988*	
Primisulfuron-methyl	12.254	9.493	1.170*	
Rimsulfuron	-9.828*	-20.857	-45.779	
Imazamox	-12.061*	-16.145	-34.194	
Imazethapyr	18.619	15.379	-9.250*	
Flumetsulam	-10.368*	-18.661	-47.009	
Pyrithiobac-Na	-7.660*	-14.082	-30.796	
Percentage (%)	55	15	30	

\* best fit

Table 5.2.2 G values based on final yield in three models

Toxicants	G of Probit	G of Logit	G of Weibull	Best fit
<b>Group A</b>				
Clodinafop-propargyl	31.005	33.067	-12.744*	
Diclofop-methyl	-99.104*	-103.826	-121.965	
Fluazifop-p-butyl	-107.803	-106.549*	-137.165	
Propaquizafop	-38.206*	-43.826	-74.897	
Quizalofop-p-ethyl	-146.499*	-156.187	-180.036	
Clethodim	-38.007*	-38.975	-76.270	
Cycloxydim	-85.856	-80.180*	-123.801	
Tralkoxydim	-113.090*	-119.671	-141.641	
<b>Group B</b>				
Bensulfuron-methyl	-119.778*	-120.645	-144.042	Probit (75%)
Chlorsulfuron	-110.833*	-122.510	-152.334	
Cinosulfuron	-59.728*	-310.757	-310.639	
Cyclosulfamuron	-108.303*	-125.424	-160.895	
Halosulfuron-methyl	-104.140*	-112.120	-140.136	
Metsulfuron-methyl	-47.428*	-48.729	-67.418	
Primisulfuron-methyl	-63.451*	-66.656	-87.641	
Rimsulfuron	-35.595	-32.746*	-71.764	
Imazamox	-87.504*	-91.273	-119.001	
Imazethapyr	-100.395*	-115.034	-154.628	
Flumetsulam	-75.358*	-79.156	-95.725	
Pyrithiobac-Na	-108.345	-107.861*	-136.228	
Percentage (%)	75	20	5	

\* best fit

Table 5.2.3 G values based on growth rate in three models

Toxicants	G of Probit	G of Logit	G of Weibull	Best fit
<b>Group A</b>				
Clodinafop-propargyl	53.983	46.666	38.307*	
Diclofop-methyl	0.018*	-7.620	-15.655	
Fluazifop-p-butyl	7.767	-0.277*	-14.961	
Propaquizafop	6.846	-2.535*	-10.895	
Quizalofop-p-ethyl	-7.175*	-15.514	-24.093	
Clethodim	42.409	33.176	20.312*	
Cycloxydim	48.254	43.699	11.199*	
Tralkoxydim	-10.356*	-20.501	-29.377	
<b>Group B</b>				
Bensulfuron-methyl	7.770	2.189*	-10.524	Probit (45%)
Chlorsulfuron	-30.097*	-42.629	-55.024	
Cinosulfuron	-11.331*	-37.305	-47.651	
Cyclosulfamuron	-37.998*	-48.907	-56.532	
Halosulfuron-methyl	-8.128*	-20.317	-31.456	
Metsulfuron-methyl	-1.146*	-8.954	-17.865	
Primisulfuron-methyl	12.617	5.731	-0.780*	
Rimsulfuron	23.079	14.910	2.894*	
Imazamox	9.412	-0.089*	-11.016	
Imazethapyr	-17.041*	-29.732	-39.084	
Flumetsulam	10.077	4.384	-1.615*	
Pyriithiobac-Na	26.336	22.561	1.562*	
Percentage (%)	45	20	35	

\* best fit



### 5.3 Low Toxic Effects

當談論到化學物質對生物體的低毒性效應時，除了經由劑量反應曲線來計算  $EC_{10}$  的值，還會運用統計方法計算 NOEC 及 LOEC。本研究的 NOEC 及 LOEC 值是利用變異數分析法 Dunnett's test 計算，經由比較處理組與控制組之間是否具有統計上的差異而得，分析的結果列於 Table 5.3.1。

Table 5.3.1 中的 NOEC 及 LOEC 值皆根據該除草劑最敏感的反應終點進行統計分析，NOEC 值前方若有一小於 ( $<$ ) 符號，代表該除草劑在此實驗最低濃度下對處理組的影響和控制組仍有顯著差異。 $EC_{10}$  則根據前節的最佳化模式判定後，由該除草劑最適合的模式計算而得。

Table 5.3.1 中的後三欄代表急慢性毒性的比值 (Acute to chronic toxicity ratio, ACR)，在毒性試驗中由於慢性試驗的時間較長，且較花費金錢，於是學者研究以一外插因子來當作保護環境品質的標準，較常使用的安全因子為 10、100 或 1000，假設環境中某毒性物質的濃度小於安全因子所求出的濃度，則視該項毒性物質不具危害性。本研究的慢性參數為 NOEC、LOEC 及  $EC_{10}$ ，計算出來的 ACR 值分別是 52.9、15.3 與 38.2。

回顧本實驗室先前的研究 [42]，以其他作用機制的除草劑所做的密閉式藻類毒性試驗，發現以同樣參數計算出的 ACR 值分別為 6.06、4.69 與 7.20，與本研究相差 8.73、3.26 及 5.31 倍；會有如此大的差異有三個可能的因素，首先是因為先前的研究並沒有求出實際的 NOEC 值，僅以實驗時的最低濃度當作 NOEC，造成計算上的盲點；其次是先前的研究有幾個除草劑的最低濃度對反應終點仍產生了超過 10% 的影響，在作劑量反應曲線時， $EC_{10}$  的值是以公式外插求得，造成誤差；最後一個因素

是實驗濃度的選取，即使已透過最佳化模式判定，並未與模式計算出的劑量反應曲線十分符合，也就是實驗值與理論值有差距，在本研究也觀察到同樣的情形，如 Fig.5.1.12，這樣的情形會使得 EC<sub>10</sub> 的值比 NOEC 高。

Roex *et al.* [59] 收集魚類的毒性數據，發現以 LOEC 為慢毒性參數計算出反應性化學物質的 ACR 值約為 17.3，與本研究的實驗結果 15.3 非常接近，若以本研究的 NOEC 及 EC<sub>10</sub> 來比較，則是相差了 2-3 倍。造成這種結果的原因可能是實驗物種上的差異，文獻中的實驗天數不一致，而反應終點亦不同，都有可能產生如此的差異。

雖然有些學者 [60-65] 認為運用變異數分析法所求的 NOEC 值並不可靠，因為它會受到實驗時的濃度選擇、重複組組數及實驗的設計所影響，不足以當作毒性評估的最低限值。不過，Chao *et al.* [66] 針對密閉式藻類毒性試驗研究，發現 NOEC 比 EC<sub>10</sub> 可對藻類提供更高的保護層級；該研究也提出可以利用中斷值 (cut-off value) 來判斷 NOEC 或 EC<sub>10</sub> 作為低毒性的影響。

Table 5.3.2 是 ANOVA (analysis of variance) 方法得到的中斷值及參數，三個反應終點得到的平均中斷值分別是 11.3 % ( $\Delta$ DO)、8.36 % (final yield) 與 6.75 % (growth rate)，雖然以溶氧變化量為反應終點的平均中斷值高於 10 %，但以二十種除草劑來看，有十三種 (65 %) 除草劑是以 final yield 為最敏感的反應終點，因此建議仍是以 NOEC 值來提供更嚴謹的保護標準。NOEC、LOEC 與 EC<sub>10</sub> 之間的關係，由 Table 5.3.1 可以看到 EC<sub>10</sub> 與 NOEC 的平均比值及 EC<sub>10</sub> 與 LOEC 的平均比值分別為 1.60 及 0.666，三個參數之間的大小關係：NOEC < EC<sub>10</sub> < LOEC。

Table 5.3.1 Relationship of NOEC, LOEC, EC<sub>10</sub>, and EC<sub>50</sub>.

Chemicals	Endpoint	NOEC	LOEC	EC <sub>10</sub>	EC <sub>50</sub>	EC <sub>10</sub> /NOEC	EC <sub>10</sub> /LOEC	EC <sub>50</sub> /NOEC	EC <sub>50</sub> /LOEC	EC <sub>50</sub> /EC <sub>10</sub>
<b>Group A</b>		(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)					
Clodinafop-propargyl	DO	0.2570	0.5140	0.2280 <sup>P</sup>	6.987	0.887	0.444	27.2	13.6	30.6
Diclofop-methyl	DO	0.0320	0.0650	0.0250 <sup>L</sup>	0.1920	0.781	0.385	6.00	2.95	7.68
Fluazifop-p-butyl	FY	0.0010	0.0020	0.0027 <sup>L</sup>	0.0690	2.70	1.35	69.0	34.5	25.6
Propaquizafop	DO	0.0510	0.0980	0.0520 <sup>W</sup>	0.3470	1.02	0.531	6.80	3.54	6.67
Quizalofop-ethyl	FY	0.0010	0.0060	0.0005 <sup>P</sup>	0.0380	0.500	0.083	38.0	6.33	76.0
Clethodim	DO	0.0050	0.0520	0.0049 <sup>W</sup>	0.4710	0.980	0.094	94.2	9.06	96.1
Cycloxydim	FY	<0.043	0.0430	0.0440 <sup>L</sup>	0.3470	> 1.14	1.023	> 8.07	8.07	7.89
Tralkoxydim	DO	0.6300	1.240	0.3130 <sup>W</sup>	3.832	0.497	0.252	6.08	3.09	12.2
<b>Group B</b>										
Bensulfuron-methyl	FY	0.0001	0.0010	0.0004 <sup>P</sup>	0.0520	4.00	0.400	520.0	52.0	130.0
Chlorsulfuron	FY	<0.016	0.0160	0.0120 <sup>P</sup>	0.0750	> 0.750	0.750	> 4.69	4.69	6.25
Cinosulfuron	FY	0.0040	0.0080	0.0150 <sup>P</sup>	0.2550	3.75	1.88	63.8	31.9	17.0
Cyclosulfamuron	FY	<0.0001	0.0001	0.00001 <sup>P</sup>	0.0008	> 0.070	0.070	> 8.00	8.00	114.3
Halosulfuron-methyl	FY	0.0001	0.0005	0.0001 <sup>P</sup>	0.0020	0.800	0.160	20.0	4.00	25.0
Metsulfuron-methyl	FY	0.0100	0.0500	0.0540 <sup>P</sup>	0.5340	5.40	1.08	53.4	10.7	9.89
Primisulfuron-methyl	FY	0.0100	0.0200	0.0135 <sup>P</sup>	0.0850	1.35	0.676	8.50	4.25	6.29
Rimsulfuron	FY	0.0060	0.0130	0.0104 <sup>L</sup>	0.0900	1.73	0.800	15.0	6.92	8.65
Imazamox	DO	<0.0030	0.0030	0.0015 <sup>P</sup>	0.1720	> 0.500	0.503	> 57.3	57.3	113.9
Imazethapyr	FY	<0.3060	0.3060	0.5810 <sup>P</sup>	4.384	> 1.90	1.90	> 14.3	14.3	7.55
Flumetsulam	DO	0.0010	0.0020	0.0009 <sup>P</sup>	0.0150	0.900	0.450	15.0	7.50	16.7
Pyrithiobac-Na	FY	<0.0010	0.0010	0.0005 <sup>L</sup>	0.0230	> 0.600	0.500	> 23.0	23.0	46.0
Average						1.60	0.666	52.9	15.3	38.2

Endpoint: the most sensitive response endpoint.

P, W, and L represent the best fitted model: Probit, Weibull, and Logit, respectively.

Table 5.3.2 Statistical parameters based on three endpoints

Toxicants	DO			Final Yield			Growth Rate		
	Sw	F-ration	cut-off value(%)	Sw	F-ration	cut-off value(%)	Sw	F-ration	cut-off value (%)
Clodinafop-propargyl	0.30	198.4	6.42	11734.2	287.6	6.50	0.08	49.61	10.6
Diclofop-methyl	0.39	24.83	21.2	9080.81	152.3	8.44	0.03	213.7	5.06
Fluazifop-p-butyl	0.21	240.8	8.33	8344.77	343.5	6.85	0.03	551.3	4.48
Propaquizafop	0.57	22.25	26.0	12918.3	210.6	7.90	0.04	183.9	5.60
Quizalofop-p-ethyl	0.31	52.42	15.2	11382.4	86.19	11.5	0.06	67.64	10.3
Clethodim	0.35	87.76	13.2	12989.1	138.1	9.71	0.05	156.8	6.99
Cycloxydim	0.29	131.2	10.5	8011.17	345.5	6.62	0.03	691.2	4.41
Tralkoxydim	0.54	31.66	19.9	8493.95	167.8	7.95	0.04	119.2	6.57
Bensulfuron-methyl	0.40	127.9	11.3	13433.8	139.0	10.3	0.05	156.6	7.67
Chlorsulfuron	0.16	212.2	6.14	12015.1	278.1	7.71	0.05	209.1	7.09
Cinosulfuron	0.07	5606.2	1.96	9938.21	426.1	6.70	0.04	385.3	5.90
Cyclosulfamuron	0.27	151.7	8.79	21754.3	70.47	13.4	0.05	126.9	6.59
Halosulfuron-methyl	0.29	106.6	10.8	11820.7	129.0	9.34	0.08	43.45	11.6
Metsulfuron-methyl	0.34	94.93	9.47	10516.4	419.3	5.90	0.03	288.6	4.33
Primisulfuron-methyl	0.33	45.58	11.9	10889.8	189.8	7.46	0.04	160.3	5.48
Rimsulfuron	0.20	549.9	4.62	13974.6	152.7	9.68	0.04	225.3	6.08
Imazamox	0.23	199.3	7.16	9593.13	286.6	6.49	0.05	136.0	6.69
Imazethapyr	0.32	155.1	7.93	8739.78	358.5	5.98	0.03	314.7	4.16
Flumetsulam	0.37	52.09	17.0	13759.8	143.5	8.80	0.06	70.45	8.63
Pyriithiobac-Na	0.16	189.9	7.30	11342.5	135.4	9.95	0.05	250.8	6.84
Average	0.30	414.0	11.3	11536.6	223.0	8.36	0.05	220.0	6.75

Sw: variation between columns.

F-ration: the ratio of variation within columns to variation between columns.



## 5.4 試驗物種數據收集與比較

Table 5.4.1 是本研究的實驗數據與文獻數據的整理比較，文獻收集以水生生物為試驗物種，包括水蚤 (*D. magna*)、月芽藻 (*P. subcapitata*)、魚類 (*R. trout* and bluegill) 及浮萍 (*L. gibba*)。

以水蚤為試驗物種與本研究的月芽藻比較，發現除了除草劑 diclofop-methyl 以外，水蚤對於所有的除草劑的敏感度皆不高，毒性差異 ( $EC_{50}$ ) 最高可達 53,500 倍 (halosulfuron-methyl)。而同樣以月芽藻為試驗物種，本研究所使用的試驗方法明顯地比 Ma *et al.* [67] 所使用的試驗方法較為敏感，毒性之間的差異最大可達 1,500 倍 (flumetsulam)；這麼大的毒性差距可能與實驗時的植種量、碳源及暴露時間有關，兩個研究中月芽藻的植種量為 15,000 : 50,000 (cells/ml)，碳源的含量為 15 : 200 (mg/L)，除草劑暴露時間則為 48 : 96 (hours)。雖然 Ma *et al.* 隨著植種量的增加而提高碳源含量，但是 Lin *et al.* [37] 以酚類 (phenol) 為毒性物質進行密閉式藻類毒性試驗中，當基質中之碳源 ( $NaHCO_3$ ) 由 15 mg/L 提高到 300 mg/L 後進行實驗，結果發現藻類對毒性物質的敏感度大為降低，證實了營養基質的組成對藻類毒性試驗會造成敏感度上的干擾，Brack and Rottler [23] 以揮發性化學物進行藻類毒性試驗時，也觀察到同樣干擾的情形。

比較本研究與 U.S. EPA database [68] 的實驗數據，發現到在同樣的實驗條件，使用相同的物種，暴露在相同作用機制的除草劑的毒性仍會出現明顯的差距，甚至高達三個 order；而相同的情況也被 Blanck [69]、Cedergreen *et al.* [70] 及 Battaglin *et al.* [20] 發表在他們的研究中。

由 Table 5.4.1 的魚類毒性試驗數據發現，A 類除草劑對於 *R. trout* 和 bluegill 的毒性皆很高（除了 clethodim），其  $EC_{50}$  值都小於 1.0 mg/L；而 B 類除草劑則明顯地對魚類是毒性不高的情形，其  $EC_{50}$  都大於 100.0 mg/L。造成 A 類除草劑比 B 類除草劑毒性較高的原因，可能與作用機制有關，A 類除草劑抑制生物體內乙醯輔酶 A 羧化酶(ACCase)的活性，Beynen *et al.* [5]指出，在人體及動物體內已發現了會與 A 類除草劑結合的酵素活性位置，証實這類除草劑對植物及動物皆具有毒性；而 B 類除草劑抑制生物體內乙醯乳酸合成酶（ALS）的活性，Bodlt *et al.* [13]認為此種酵素只存在於植物及某些微生物的體內，因此對於魚類的毒性較低。

文獻收集到的毒性數據也發現 B 類除草劑對 *L. gibba* 具有很高的毒性，而 A 類除草劑則呈現與月芽藻相似的毒性（毒性差異在 3 倍以內）。尤其是 B 類除草劑，使用不同的實驗方法都得到比其他物種敏感的結果，本研究也建議在進行 B 類除草劑的毒性評估時，可以考慮使用 *L. gibba*。



Table 5.4.1 EC<sub>50</sub>/LC<sub>50</sub> values of this study and literatures.

Toxicants	<i>P. subcapitata</i> BOD test, 48h EC <sub>50</sub>			<i>D. magna</i>	<i>P. subcapitata</i>	<i>R. trout</i>	Bluegill	<i>L. gibba</i>
	DO	FY	GR	48h EC <sub>50</sub>	96h EC <sub>50</sub>	96h LC <sub>50</sub>	96h LC <sub>50</sub>	14d EC <sub>50</sub>
<b>Group A</b>								
clodinafop-propargyl	6.99	8.26	28.9	59.5 <sup>[68]</sup>	30.6 <sup>[68]</sup>	0.390 <sup>[68]</sup>	0.240 <sup>[68]</sup>	2.40 <sup>[68]</sup>
Diclofop-methyl	0.201	0.464	0.999	0.230 <sup>[68]</sup>		0.540 <sup>[68]</sup>	0.540 <sup>[68]</sup>	
Clethodim	0.471	1.06	9.31	20.2 <sup>[68]</sup>	22.9 <sup>[67]</sup>	19.0 <sup>[68]</sup>	33.0 <sup>[68]</sup>	1.34 <sup>[68]</sup>
Tralkoxydim	3.83	4.66	17.4		7.70 <sup>[68]</sup>			2.60 <sup>[68]</sup>
<b>Group B</b>								
Metsulfuron-methyl	0.800	0.534	3.16	150.0 <sup>[68]</sup>	24.7 <sup>[67]</sup>			0.0004 <sup>[70]</sup>
Chlorsulfuron	0.277	0.075	0.320	370.0 <sup>[68]</sup>	0.135 <sup>[68]</sup>	250.0 <sup>[68]</sup>	300.0 <sup>[68]</sup>	0.0007 <sup>[70]</sup>
Cinosulfuron	0.395	0.255	1.70					
Bensulfuron-methyl	0.089	0.052	1.63		13.6 <sup>[67]</sup>			
Halosulfuron-methyl	0.003	0.002	0.034	107.0 <sup>[68]</sup>	0.004 <sup>[68]</sup>	131.0 <sup>[68]</sup>	118.0 <sup>[68]</sup>	0.00004 <sup>[68]</sup>
Primisulfuron-methyl	0.149	0.085	0.306	142.0 <sup>[68]</sup>	0.024 <sup>[68]</sup>	210.0 <sup>[68]</sup>	180.0 <sup>[68]</sup>	0.0003 <sup>[68]</sup>
Imazamox	0.172	0.190	2.93	122.0 <sup>[68]</sup>		112.0 <sup>[68]</sup>	119.0 <sup>[68]</sup>	0.011 <sup>[68]</sup>
Imazethapyr	5.66	4.38	22.0	1000.0 <sup>[68]</sup>	59.2 <sup>[68]</sup>	344.0 <sup>[68]</sup>	423.0 <sup>[68]</sup>	0.067 <sup>[71]</sup>
Flumetsulam	0.015	0.018	0.205	254.0 <sup>[68]</sup>	23.9 <sup>[67]</sup>	300.0 <sup>[68]</sup>	300.0 <sup>[68]</sup>	0.003 <sup>[68]</sup>
Pyriithiobac-Na	0.111	0.023	0.243		0.095 <sup>[68]</sup>	1000.0 <sup>[68]</sup>	930.0 <sup>[68]</sup>	0.001 <sup>[68]</sup>

Unit: mg/L

[ ]: reference number

## 5.5 毒性試驗數據與環境中除草劑濃度比較

本研究收集了有關於二十種除草劑在環境中真實存在或可能存在的濃度數值，與本研究的毒性試驗數據作一比較，目的在於探討除草劑對於環境所造成的影響。

Kulshrestha *et al.* [72]研究在大豆田 (soybean) 施用除草劑 fluazifop-p-butyl 之後的除草劑殘留情形，發現在 100% 建議使用劑量下，經過了 90 天仍可以在土壤中偵測到 0.01 mg/L 的殘留量，Peterson *et al.* [71]認為使用 100 % 建議使用劑量，仍有 10 % 會隨著空氣傳播到流動的水體中 (lotic system)。根據這樣的想法，本研究將土壤中的殘留值除以 10 倍當作 fluazifop-p-butyl 在自然水體中的濃度，等於 0.001 mg/L，與本研究的毒性數據比較之後，發現與月芽藻的 NOEC 值同一層級，顯示 fluazifop-p-butyl 對自然水體具有潛在的危害。

Aida *et al.* [73]調查一條流過日本東京的河川—荒川 (Arakawa River) 及它的支流，發現在耕作季節時，河川中除草劑 bensulfuron-methyl 的濃度最高可達到 0.003 mg/L，為本研究 NOEC 值的 30 倍；該研究的採樣點總共有 16 處，與本研究的 NOEC 值相比仍有 8 處的最小濃度值超過 NOEC，顯示影響的範圍很廣，而 Aida *et al.*以日本當地的蕨類當作毒性試驗物種，也認為河川中除草劑 bensulfuron-methyl 的含量對河川中的生物會造成負面的影響。

在美國及加拿大，農業部門常以農藥的毒性試驗數據 (例如  $EC_{50}$ 、 $LC_{50}$ ) 及預期環境濃度 (expected environmental concentration, EEC) 作為環境風險評估的依據。所謂預期環境濃度，是將農藥依它的最大建議使用劑量噴灑在裝有水的實驗容器上方，模擬實際農地中操作的情形，

最後測量這個實驗容器中的水深 15 cm 處的農藥濃度，即為預期環境濃度。

Metsulfuron-methyl 是一種被廣泛使用在水稻田的除草劑，中文名稱是甲磺隆，在台灣地區的農地中也經常被使用。本研究的 NOEC 值為 0.010 mg/L，根據 Environment Canada 的文獻資料 [74]，metsulfuron-methyl 的 EEC 為 0.024 mg/L，是 NOEC 的 2.4 倍，約為 LOEC 的 0.5 倍。另一種除草劑 primisulfuron-methyl 的 NOEC 值為 0.01 mg/L，EEC 為 0.02-0.05 mg/L，至少是 NOEC 值的 2 倍。而 cinosulfuron 的環境濃度為 0.003-0.03 mg/L [75]，最低濃度約等於本研究的 NOEC。從以上的濃度比較，判斷這三種除草劑對環境水體中的藻類會有慢毒性的危害。

Battaglin *et al.* [20]於 1998 年也調查了美國中西部的自然水體中所含硫醯尿素類除草劑的含量，發現 imazethapyr 和 flumetsulam 這兩種除草劑的平均含量皆為 0.00001 mg/L，都遠小於本研究的 NOEC 值，因此判斷這兩種除草劑對於自然水體中的生物不會有負面的影響。

整體而言，以上所討論的七種除草劑中有五種對於環境水體中的藻類具有潛在危害，分別是 fluazifop-p-butyl、bensulfuron-methyl、metsulfuron-methyl、cinosulfuron 及 primisulfuron-methyl，這些除草劑現今仍然被廣泛地使用，建議農業單位與環保部門應該對這些除草劑作更深入的研究，並且能在主要使用的區域進行濃度監測的調查，確保除草劑被安全地使用，也不會並環境及生物造成負擔。

Table 5.5.1 Comparison of herbicide toxicities and environmental concentrations.

Herbicides	NOEC	LOEC	EC10	EC50	Environmental concentration
Fluazifop-p-butyl	0.0010	0.002	0.0027	0.069	0.010 <sup>A</sup>
Bensulfuron-methyl	0.0001	0.001	0.0004	0.052	0-0.003 <sup>B</sup>
Metsulfuron-methyl	0.0100	0.050	0.0540	0.534	0.024 <sup>C</sup>
Primisulfuron-methyl	0.0100	0.020	0.0135	0.085	0.020-0.050 <sup>D</sup>
Cinosulfuron	0.0040	0.008	0.0150	0.255	0.003-0.030 <sup>E</sup>
Imazethapyr	<0.3060	0.306	0.5810	4.38	0.00001 <sup>F</sup>
Flumetsulam	0.0010	0.002	0.0009	0.015	0.00001 <sup>F</sup>

Unit: mg/L

A: Residual concentration in soil at the time of harvest due to spray of fluazifop-p-butyl to soybean crop in the 90<sup>th</sup> day. [72]

B: Concentration of bensulfuron-methyl in the Arakawa River and its tributary rivers and drainages during 14 days in 1991. [73]

C: Expected environmental concentration. [76]

D: Expected environmental concentration. [74]

E: Environmental concentration in paddy fields. [75]

F: Median concentration in 25 samples of Midwestern ground waters, United States.[20]

## 六、結論與建議

由單一毒性物質的實驗結果發現，以 B 類除草劑 cyclosulfamuron 對藻類的毒性最高，而 A 類除草劑對藻類的毒性最低，兩者之間的差距可達 1,000 倍。比較溶氧變化量、最終生物量與生長率三種反應終點，A 類除草劑以溶氧變化量最敏感，B 類除草劑則以最終生物量最敏感，二十種除草劑整體而言，仍是以最終生物量為最敏感的反應終點。在二十種除草劑當中，只有 clodinafop-propargyl、tralkoxydim 與 imazethapyr 三者的  $EC_{50}$  值大於 1.0 mg/L，其餘的十七種除草劑在歐盟 (EU) 的毒性物質的分類上，屬於具有極高的毒性 (very toxic)。

本研究將月芽藻與其他物種敏感度比較的結果，發現水蚤是最不敏感的物種；魚類對 A 類除草劑具有較高的敏感度，對 B 類除草劑則是與水蚤呈現相似的敏感度。浮萍對 A 類除草劑的敏感度與本研究的月芽藻差異不大，對 B 類除草劑則是非常敏感。

經由 G-test 選擇出以 Probit 為本研究二十種除草劑的最適合模式，並且以統計方法 Dunnett's test 分析二十種除草劑的 NOEC 與 LOEC，而以變異數分析 (ANOVA) 計算出的 cut-off value 則說明了 NOEC 比  $EC_{10}$  更適合當作低影響濃度的指標，提供環境更嚴謹的保護。而低毒性數據也提供後人對這些除草劑有更多的資訊。

將除草劑最敏感的 NOEC 與環境中的除草劑濃度作比較，fluazifop-p-butyl、bensulfuron-methyl、metsulfuron-methyl、cinosulfuron 及 primisulfuron-methyl 是對水體植物具有危害性的除草劑，這些除草劑現今仍然被廣泛地使用，建議農業單位與環保部門應該對這些除草劑作更深入的研究，並且能在主要使用的區域進行濃度監測的調查，確保除



草劑被安全地使用，也不會並環境及生物造成負擔。





## 參考文獻

- [1] 邱建中, 鍾維榮. 1996. 除草劑與雜草防除. 中華民國雜草學會出版.
- [2] 朱錦忠. 2003. 水田常用農藥對蓋斑鬥魚之毒性研究. 國立台灣海洋大學環境生物與漁業科學學系碩士學位論文.
- [3] 行政院農業委員會. 2006. [http://www.coa.gov.tw/show\\_index.php](http://www.coa.gov.tw/show_index.php).
- [4] 楊純明, 王慶裕, 林俊義. 2004. 雜草學與雜草管理. 行政院農業委員會農業試驗所.
- [5] Beynen A. C., Geelen M. J. H. 1982. Short-term inhibition of fatty acid biosynthesis in isolated hepatocytes by mono-aromatic compounds. *Toxicology* **24**:184-197.
- [6] Cai X. Y., Liu W. P., Jin M. Q., Lin D. 2007. Relation of diclofop-methyl toxicity and degradation in algae cultures. *Environ Toxicol Chem* **26**:970-975.
- [7] Grover R., Waite D. T., Cessna A. J., Nicholaichuk W., Irvin D. G., Kerr L. A., Best K. 1997. Magnitude and persistence of herbicide residues in farm dugouts and ponds in the Canadian prairies. *Environ Toxicol Chem* **16**:638-643.
- [8] Health and Welfare Canada. 1993. Guidelines for Canadian drinking water quality. *Federal-provincial Subcommittee on Drinking Water, Ottawa, ON, Canada*.
- [9] 韓岳麒, 王慶裕. 1997. 禾草類除草劑抑制雜草生長的作用機制. 中華民國雜草學會簡訊 **5**.
- [10] Hassan S. A., Hafes B., Degrande P. E., Herai K. 1998. The side-effect of pesticides on the egg parasitoid *Trichogramma cacoeciae* Marchal (Hym., Trichogrammatidae), acute dose-response and persistence tests. *J Appl Ent* **122**:569-573.
- [11] Vulliet E., Emmelin C., Chovelon J. M., Chouteau C., Clement B. 2004. Assessment of the toxicity of triasulfuron and its photoproducts using aquatic organisms. *Environ Toxicol Chem* **12**:2837-2843.
- [12] 黃怡娟. 1999. 水稻幼苗對硫醯尿素族除草劑的反應與有機磷殺蟲劑之相互作用. 國立台灣大學農藝學研究所碩士論文.
- [13] Boldt T. S., Jacobsen C. S. 1998. Different toxic effects of the sulfonylurea herbicides metsulfuron methyl, chlorsulfuron and thifensulfuron methyl on fluorescent *pseudomonas* isolated from an agricultural soil. *FEMS micro biol lett* **161**:29-35.
- [14] Anderson R. L., Humburg N. E. 1987. Field duration of chlorsulfuron

- bioactivity in the central great plain. *J Environ Qual* **16**:263-266.
- [15] **Curran W. S., Knake E. L., Liebl R. A.** 1991. Corn (*Zea mays*) injury following use of clomazone, chlorimuron, imazaquin, and imazethapyr. *Weed Technol* **5**:539-544.
- [16] **Hartnett M. E., Newcomb J. R., Hodson R. C.** 1987. Mutations in *Chlamydomonas reinhardtii* conferring resistance to the herbicide sulfometuron methyl. *Plant Physiol* **85**:898-901.
- [17] **Grossmann K., Berghaus R., Retzlaff G.** 1992. Heterotrophic plant cell suspension cultures for monitoring biological activity in agrochemical research. Comparison with screens using algae, germinating seeds and whole plants. *Pestic Sci* **35**:283-289.
- [18] **Nilsen H. G.** 1989. Investigations of the occurrence of pesticides in drainage water, ground water, and surface water. *Present knowledge and planned projects in Norway Proc Conf Nordic Plant Protection*.
- [19] **Thompson D. G., Holmes S. B., Thomas D., MacDonald L., Solomon K. R.** 1993. Impact of hexazinone and metsulfuron methyl on the phytoplankton community of a mixed-wood/boreal forest lake. *Environ Toxicol Chem* **12**:1695-1707.
- [20] **Battaglin W. A., Furlong E. T., Burkhardt M. R., Peter C. J.** 2000. Occurrence of sulfonylurea, sulfonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs, and ground water in the Midwestern United States, 1998. *Sci total environ* **248**:123-133.
- [21] **Padrtova R. R., Marsalek 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.
- [22] **Chen CY.** 1994. Theoretical evaluation of the inhibitory effects of mercury on algal growth at various orthophosphate levels. *Water Res* **28**:931-937.
- [23] **Brack W., Rottler H.** 1994. Toxicity testing of highly volatile chemicals with green algae- a new assay. *Environ Sci Pollut Res* **4**:223-228.
- [24] **Kuhn R., Pattard M., Pernak K., Winter A.** 1989. Results of the Harmful Effects of Selected Water Pollutants (Anilines, Phenols, Aliphatic Compounds) to *Daphnia magna*. *Water Res* **23**:495-499.
- [25] **Kuhn R., M. Pattard.** 1990. Results of the harmful effects of water pollutants to green algae (*Scenedesmus subspicatus*) in the cell multiplication inhibition test. . *Water Res* **24**:31-38.
- [26] **Galassi S., Vighi M.** 1981. Testing toxicity of volatile substances with algae. . *Chemosphere* **10**:1123-1126.

- [27] **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 Toxicol* **18**:87-100.
- [28] **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. *Environ Toxicol Chem* **19**:2551-2556.
- [29] **Munkittrick K. R., Power E. A., Sergy G. A.** 1991. The relative sensitivity of Microtox, daphnia, rainbow trout, and fathead minnow acute lethality test. *Environ Toxicol Chem* **6**:35-62.
- [30] **Peterson F., Peterson G. I.** 1996. Variability of species sensitivity to complex mixtures. *Water Sci Technol* **33**:109-119.
- [31] **Toussaint M. W., Shedd T. R., Schalie W. H., Leather G. R.** 1995. A comparison of standard acute toxicity tests with rapid-screening toxicity tests. *Environ Toxicol Chem* **14**:907-915.
- [32] **Huang H.J.** 2000. Experimental design of the algal toxicity test based on photosynthetic response *A Thesis Submitted to Institute of Environmental Engineering of National Chiao Tung University.*
- [33] **Chen C.Y., Chen S. L., Christensen E. R.** 2005. Individual and combined toxicity of nitriles and aldehydes to *Raphidocelis subcapitata*. *Environ Toxicol Chem* **24**:1067-1073.
- [34] **Chen C.Y., Lin J. H.** 2006. Toxicity of chlorophenols to *Pseudokirchneriella subcapitata* under air-tight test environment. *Water Res* **40**:1957-1964.
- [35] **Chen C.Y., Ko C. W., Lee P. I.** 2007. Toxicity of substituted anilines to *Pseudokirchneriella subcapitata* and quantitative structure-activity relationship analysis for polar narcotics. *Environ Toxicol Chem* **26**:1158-1164.
- [36] **Hsieh S. H., Tsai K. P., Chen C. Y.** 2006. The combined toxic effects of nonpolar narcotic chemicals to *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Wat Res* **40**:1957-1964.
- [37] **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. *Wat Res* **39**:1869-1877.
- [38] **Huang C. P., Wang Y. J., Chen C.Y.** 2007. Toxicity and quantitative structure-activity relationships of nitriles based on *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Ecotoxicol environ saf* **67**:439-446.
- [39] **Forget J., Pavillon J. F., Menasria M. R., Bocquene G.** 1998. Mortality and LC50 values for several stages of the marine copepod *Tigriopus brevicornis* (Muller) exposed to the metals arsenic and cadmium and the

pesticides atrazine, carbofuran, dichlorvos, and malathion. *Ecotoxicol environ saf* **40**:239-244.

[40] **Sappington L. C., Mayer F. L., Dwyer F. J., Buckler D. R., Jones J. R., Eilersieck M. R.** 2001. Contaminant sensitivity of threatened and endangered fishes compared to standard surrogate species. *Environ Toxicol Chem* **20**:2869-2876.

[41] **Yeh H. J., Chen C.Y.** 2006. Toxicity assessment of pesticides to *Pseudokirchneriella subcapitata* under air-tight test environment. *J hazard mater* **A131**:6-12.

[42] **胡素華.** 2005. 利用密閉式藻類毒性試驗評估除草劑之毒性. 國立交通大學環境工程研究所碩士論文.

[43] **U. S. Environmental Protection Agency.** 1996. Ecological Effect Test Guidelines. OPPTS 850.5400. Algal Toxicity. Tiers I and II.

[44] **Organization for Economic Cooperation and Development (OECD).** 1984. Algal growth inhibition test. OECD-Guideline No.201; 07/06/1984 and Official Journal of European Communities, 92/69/EEC: C.3.

[45] **International Organization for Standardization (ISO).** 1987. Water quality - Algal growth inhibition test. Draft International Standard ISO/DIS 8692. Geneva, Switzerland. .

[46] **American Society for Testing and Materials.** 1991. Standard guide for conducting static 96h toxicity tests with microalgae. E1218-90. In *Annual Book of ASTM Standards*, Vol 11.04. Philadelphia, PA, pp. 956-967.

[47] **American Public Health Association (APHA), American Water Works Association and Water Pollution Control Federation.** 1995. Toxicity testing with phytoplankton, in *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*, 19th ed., APHA, Washington, DC.

[48] **Chen C. Y., Chao M. R.** 2000. No-observed-effect concentrations in batch and continuous algal toxicity tests. *Environ Toxicol Chem* **19**:1589-1596.

[49] **Hanstveit A. O.** 1982. Evaluation of the results of the third ISO-interlaboratory study with an algal toxicity test. ISO/TC147/SC5/WG5. Netherlands Normalisatie Institute, Delft, Netherlands.

[50] **Hanstveit A. O., Oldersma H.** 1981. Evaluation of the results of the second ISO-interlaboratory study with an algal toxicity test. ISO/TC147/SC5/WG5. Netherlands Normalisatie Institute, Delft, Netherlands.

[51] **Newman M. C., McIntosh A. W.** 1991. *Metal Ecotoxicology*. pp.1-26. Lewis, Michigan.



- [52] **Lin JH.** 2001. Experimental design of the algal toxicity test based on BOD bottle. *A Thesis Submitted to Institute of Environmental Engineering of National Chiao Tung University.*
- [53] **Russom C. L., Bradbury S. P., Broderius S. J., Hammermeister D. E., Drummond R. A.** 1997. Predicting modes of toxic action from chemical structure: acute toxicity in the fathead minnow (*pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* **16**:948-967.
- [54] **Akers S. K., Sinks G. D., Schultz T. W.** 1999. Structure-toxicity relationships for selected halogenated aliphatic chemicals. *Environ Toxicol Pharm* **7**:33-39.
- [55] **Ramos E. U., Vaal M. A., Hermens J. L. M.** 2002. Interspecies sensitivity in the aquatic toxicity of aromatic amines. *Environ Toxicol Pharm* **11**:149-158.
- [56] **蔡國沛.** 2005. 以密閉式藻類毒性試驗方法評估有機物之毒性與結構—活性關係之研究. 國立交通大學環境工程研究所碩士論文.
- [57] **葉徽君.** 2004. 以密閉式藻類毒性試驗評估農藥之單一及混合效應. 國立交通大學環境工程研究所碩士論文.
- [58] **王韻如.** 2006. 毒性化學物質對月芽藻低影響抑制濃度 NOEC、LOEC、EC<sub>10</sub> 及 NEC 之研究. 國立交通大學環境工程研究所碩士論文.
- [59] **Roex E. W. M., Van Gestel C. A. M., Van Wezel A. P., Van Straalen N. M.** 2000. Ratios between acute aquatic toxicity and effects on population growth rate in relation to toxicant mode of action. *Environ Toxicol Chem* **19**:685-693.
- [60] **Moore D. R. J., Caux P. Y.** 1997. Estimating low toxic effects. *Environ Toxicol Chem* **16**:794-801.
- [61] **Organization for Economic Cooperation and Development (OECD).** 1997. Report of the Final Ring Test of the Daphnia magna Reproduction Test. *OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, n° 6, OECD/GD(97)19: Paris.*
- [62] **Organization for Economic Cooperation and Development (OECD).** 1998. Report of the OECD workshop on Statistical Analysis of Aquatic Toxicity Data. *OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, n° 10, OECD/GD(98)18: Paris.*
- [63] **Laskowski R.** 1995. Some good reasons to ban the use of NOEC, LOEC and related concepts in ecotoxicology. *Oikos* **73**:40-144.
- [64] **Kooijman S. A. L. M., Hanstveit A. O., Hynolmn N.** 1996. No-effect-concentration in algal growth inhibition test. *Wat Res* **30**:1625-1632.

- [65] **Chapman P. M., Caldwell R. S., Chapman P. F.** 1996. A warning: NOECs are inappropriate for regulatory use. *Environ Toxicol Chem* **15**:77-79.
- [66] **Chao M. R., Shieh J. N., Chen C. Y.** 2001. Statistical comparisons of the no-observed-effect concentration and the effective concentration at 10% inhibition (EC10) in algal toxicity tests. *Water Sci Technol* **43**:141-146.
- [67] **Ma J. Y., Wang S. F., Wang P. W., Ma L. J., Chen X. L., Xu R. F.** 2006. Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicol environ saf* **63**:456-462.
- [68] **Office of Pesticide Programs.** 2000. Pesticide Ecotoxicity Database (Formerly: Environmental Effects Database (EEDB)). Environmental Fate and Effects Division, U.S.EPA, Washington, D.C.
- [69] **Blanck H.** 1984. Species dependent variation among aquatic organisms in their sensitivity to chemicals. *Ecol Bull* **36**:107-119.
- [70] **Cedergreen N., Streibig J. C.** 2005. The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae: assessment of predictive factors and hazard. *Pest Manag Sci* **61**:1152-1160.
- [71] **Peterson H. G., Boutin C., Martin P. A., Freemark K. E., Ruecker N. J., Moody M. J.** 1994. Aquatic phyto-toxicity of 23 pesticides applied at expected environmental concentration. *Aquat toxicol* **28**:275-292.
- [72] **Kulshrestha G., Singh S. B., Gautam K. C.** 1995. Residues of fluazifop-p-butyl following application to soybean. *Bull Environ Contam Toxicol* **55**:276-282.
- [73] **Aida M., Ikeda H., Itoh K., Usui K.** 2006. Effects of five rice herbicides on the growth of two threatened aquatic ferns. *Ecotoxicol environ saf* **63**:463-468.
- [74] **Pest Management Regulatory Agency.** 2001. <http://wwwwhc-scgcca/pmra-arla/>.
- [75] **Allievi L.** 1996. The influence of herbicides on soil microorganisms and the case for sulfonylureas. *Biol Ital* **26**:20-24.
- [76] **Chang F. Y.** 1987. Agriculture Canada - Discussion document - Metsulfuron methyl. NO. 87-04. Information Secretariat of the Pesticides Directorate, Ottawa, Ontario.