

行政院國家科學委員會專題研究計畫 期中進度報告

除草劑對浮游生物藻類之毒性評估(1/2)

計畫類別：個別型計畫

計畫編號：NSC94-2211-E-009-007-

執行期間：94年08月01日至95年07月31日

執行單位：國立交通大學環境工程研究所

計畫主持人：陳重元

報告類型：精簡報告

報告附件：出席國際會議研究心得報告及發表論文

處理方式：本計畫可公開查詢

中 華 民 國 95 年 5 月 29 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 ※期中進度
報 告 ※

除草劑對浮游生物藻類之毒性評估(1/2)

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC : 94-2211-E-009 -007

執行期間：94 年 8 月 1日至 95 年 7 月 31日

計畫主持人：陳重元

共同主持人：

計畫參與人員：

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)： 精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份 (註:於期末報告一併繳交)

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權， 一年 二年後可公開查詢

執行單位：國立交通大學 環境工程研究所

中 華 民 國 95 年 5 月 29 日

以密閉式藻類毒性試驗評估除草劑之毒性

九十四學年度計畫期中進度報告

計畫編號：NSC 94-2211-E-009 -007

執行期間：94年8月1日至95年7月31日

主持人：陳重元 國立交通大學 環境工程研究所

一、中英文摘要

本研究以藻類(*Pseudokirchneriella subcapitata*)利用 BOD 瓶進行一密閉式之毒性試驗,評估除草劑之毒性,以探討除草劑對於非目標性生物可能造成的危害。本實驗主要使用三種反應終點,包含溶氧變化量及利用藻類細胞密度變化量計算所得到的最終產量及生長率。

本研究預計使用 20 種除草劑是根據 HRAC 所作的分類中,在三大不同作用機制下所含的 10 項化學上的相異結構分類選出的。

實驗的結果指出,以 desmetryne 為毒性最強者,而最低則是 tebutam。而兩者之間的 EC_{50} 差值可達到約 10^3 倍以上;而在三種不同試驗參數裡,尤以生物質量 (Final Yield) 最為敏感,其次為溶氧變化量 (ΔDO),最後才是生長率 (Growth rate)。以抑制光合作用系統 II 的除草劑毒性大多較高,但少數幾個的毒性卻低於幹擾細胞分裂型的除草劑。此外,抑制生長素類型的除草劑,在毒性上明顯是最低。

本研究至今已完成 15 種除草劑之毒性評估,接續將完成其餘除草劑之毒性評估試驗及數據分析等工作。

關鍵詞： *Pseudokirchneriella subcapitata*; Herbicides; Phytotoxicity

Abstract

The work reported here was done to examine the effect of herbicides by using a close-system BOD bottle test and to assess the phytotoxicity on non-target organisms such as algae. (*Pseudokirchneriella subcapitata*).

The toxic test was ended based on DO, final yield and growth rate. 20 herbicides in 10 different chemical structure classes embracing 3 different modes of action according to Herbicide Resistance Action Committee were tested.

The results indicate that desmetryne is the most toxic and tebutam is the least toxic to the *Pseudokirchneriella subcapitata*. EC_{50} difference between the two toxicants can be up to more than about 10^3 times; among three kinds of different experimental parameters, biomass (Final Yield) is the most sensitive particularly, secondly in order is dissolve oxygen (ΔDO), and growth rate is the last.

In addition, experimental results indicated that the acute toxicity of the photosynthesis-inhibiting II herbicides were higher, but few of them were lower than those of the cell division inhibitor. However, the like auxenic-type herbicides are very weakly phototoxic to algae, their acute toxicities were the lowest.

Keywords: *Pseudokirchneriella subcapitata*, Herbicides; Phytotoxicity

二、研究緣起

不論在生理或經濟層面，水都有著無法取代的重要性，隨著環境的變遷及時代潮流的進步，水污染的情況日趨複雜及嚴重。農業活動也是造成水體污染的來源之一，由於為了提高農作物生產而使用農藥、肥料等來增加收成量，如殺蟲劑、除草劑和殺真菌劑等。其中，除草劑在農業上通常是用來減少或破壞環境中的雜草，來避免和作物間營養及光線的競爭，但除草劑卻有相當麻煩的副作用，就是可能會經由噴灑漂流、溢流等進入生態系統，或是經雨水沖洗和溶解，由坡面逕流帶入各類水體中，農藥進入水體後不僅直接危害水中生物，而且可經由食物鏈聚集於水產品中再危害人體。除草劑於表面水體的污染會直接對水生植物產生毒性，對動物及其他生態系統的間接影響也將是可以預期的(Ma *et al.*, 2003)^[1]。

除草劑抗性執行委員會 (Herbicide Resistance Action Committee) 在 2002 年時將除草劑針對所作用的機制及化學上的不同而做了分類，本篇所含的 20 種除草劑主要是包括抑制光合作用型、干擾植物體細胞分裂型和生長素類型(Table 1)。(HRAC, 2002)^[2]

在C類當中的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。(WSSA, 1994)^[3] 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。(Wright and Corbett, 1979; Pfister and Arntzen, 1979)^[4,5] 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_B(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。(Dodge, 1989; Fuerst and Norman, 1991; Fuks *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 2003; Follak and Hurlle, 2003;)^[6-10]

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。

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。(Ma, 2002)^[11]

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；(Nygaard *et al.*, 1986; Herman *et al.*, 1990; Oya and Alec, 1996; Piere-Yves *et al.*, 1996)^[12-15] 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。Lewis (Lewis, 1992 and 1995)^[16,17] 曾對於藻類試驗與魚毒、植物做比較性研究，發現藻類試驗可判定為較敏感的物種，且反應的時間可以更為縮短；加上有成本上的考量，也較為經濟。

藻類是水生生態系統中的初級生產者，也是其他水生食物鏈的基本，在在顯示了以藻類來做為生物指標的重要性。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。有機物則是水生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。(Fairchild *et al.*, 1998)^[18]

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。(Amblard *et al.*, 1990; Havens and Health, 1990)^[19,20] 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(Thomas *et al.*, 1986)^[21]、工業有機物(Klaine and Lewis, 1995)^[22]、金屬(Bartlett *et al.*, 1974; Greene *et al.*, 1988)^[23,24]等。Thomas *et al.* (Thomas *et al.*, 1986)^[21]所做的評估試驗中發現，月牙藻相對於其他物種，如水蚤、蚯蚓或 Microtox 等生物試驗來的較敏感。Klaine and Lewis(Klaine and Lewis, 1995)^[22]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。

以往，利用藻類做為生物指標的監測方法中，大多是批次式開放培養的實驗系統來做為實驗方法；(Galassi and Vighi, 1981; Herman *et al.*, 1990)^[25,26]傳統的批次式的試驗 (U. S. EPA, OECD, ASTM, ISO等)(U. S. EPA, 1996; OECD, 1984; Versteeg, 1990; ISO, 1987)^[27-30]，在這樣的環境條件之下，假使所要檢測的化學物品或是製劑具有相當的揮發能力，在試驗的期間則可能會因為毒性物質的散失而造成實驗的誤差，影響結果。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。(OECD, 2000)^[31]

針對此項缺失，本研究做了進一步的改善，利用BOD瓶來製造出密閉環境系統的毒性試驗方法，用以評估具有揮發性或半揮發性的化學物質或製劑，利用量測藻類的溶氧變化量 (ΔDO) 及細胞密度 (Cell Density) 來做為反應參數，求得各毒性物質的 EC_{50} 值與劑量反應曲線關係圖以瞭解化學物質對藻類所產生的影響與毒性關係。然而在提供所需的碳源的部分，事先將去離子水以 CO_2-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.*,(Lin *et al.*, 2005)^[32] Chen and Lin,(Chen and Lin, 2005)^[33] and Chen *et al.*(Chen *et al.*, 2005)^[34]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。並將所顯現出的結果

與除草劑過去各別的文獻資料做比較，得到以利用此新的測試方法和以藻類做為測試物種時，實驗的敏感性及準確度差別。

三、材料與方法

毒性試驗

經由每天更換新鮮的進流基質，並量測槽中細胞數量、溢流率、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、MCV等參數皆在控制的範圍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。範圍約在：細胞數量 ($1.7 \times 10^6 \sim 1.9 \times 10^6$ cells/mL) 及粒徑分析儀中藻類細胞之分佈情形 (MCV 在 $39 \sim 46 \mu m^3$ 之間) 即可。

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% CO_2 的 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 CO_2 含量，再以0.1N的NaOH 和HCl將營養鹽的pH值調整至 7.5 ± 0.1 ，完成營養鹽的配製。

從培養母槽 (steady state 狀態) 取出之藻液與上述之營養鹽混合成所需濃度，接下來再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，一組實驗做三重複組；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，進行毒性試驗，且另外再量測開始之溶氧值 (Initial DO，在此要注意曝氣的時間及狀況，盡量讓初始溶氧降為最低)。

經過 48 hr 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)，扣除起始之溶氧值得淨溶氧值 (ΔDO)，同時測量瓶中細胞密度以求得藻類生長率。

數據分析

實驗一開始先進行range finding的測試，濃度範圍須至少橫跨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。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。NOEC 是使用 Dunnett's test (one-tail) 所得到的。

四、結果與討論

本實驗主要是針對具有不同程度揮發性的除草劑，經由密閉式的藻類毒性試驗的方法，分別量測實驗前後的溶氧與細胞密度變化量，作為反應終點，並利用求得的數據，以溶氧增加量 (ΔDO)、生物質量 (Biomass, Final Yield) 及生長率 (Growth rate) 作為實驗參數，求得毒性物質的 EC_{50} 值和劑量反應曲線。

由於試驗所選擇的毒性物質多為半揮發性有機物，在實驗時為了避免於儲存階段經由揮發所造成的誤差，因此，在進行毒性試驗之前必須先以 HPLC 進行濃度的定量分析。本研究的每一毒性試驗皆是設定 1 個控制組及 6 個不同濃度的處理組（除了 monolinuron 之外），隨著濃度增加，毒性物質對於藻類的生長抑制情況也愈趨明顯。將經過計算後的數值代入 Probit 模式中，求得描繪劑量反應曲線圖所需之斜率 (β) 與截距 (α)，另外還可求得各個參數的 EC_{50} 值。最後將此二值 (α , β) 代入程式中，即可畫出以毒物濃度為橫軸，抑制率為縱軸的劑量反應曲線，由圖中的曲線顯示狀況可以檢查實驗的數據是否為一良好、準確的劑量反應關係。

Table 2 是以不同除草劑經由 Probit 模式分析藻類毒性試驗所得到的數據。就所得到的結果來看，先以溶氧變化量作為反應參數來比較的話，屬於 C1 類的 desmetryne 為毒性最強的毒物 ($EC_{50} = 0.0056$ mg/L)，毒性最弱的除草劑為 O 類的 tebutam ($EC_{50} = 6.183$ mg/L)；若以 Final Yield 為反應參數時，毒性最強的除草劑為 C1 類的 bromacil ($EC_{50} = 0.0065$ mg/L)，而 tebutam 仍為較不毒的除草劑 ($EC_{50} = 4.575$ mg/L)；當以 Growth rate 為反應參數的情況下，K3 類的 dimethachlor 為毒性最高的化合物 (EC_{50}

= 0.0176 mg/L)，tebutam 的毒性仍是最底的 ($EC_{50} = 8.359$ mg/L)。可以發現到，不同參數下所表現出的敏感度在毒性濃度愈低時，差異性愈大，對於毒性較弱，濃度較高的除草劑，三種反應參數的敏感性之間反而沒有明顯的差別。

將不同參數的數據比較之後，可察覺到普遍以 Final Yield 為參數時所得到的 EC_{50} 值較為敏感（佔 67%），其次是 ΔDO （佔 33%），而由 Growth rate 所得到數據呈現出來的，則是屬於敏感性最低的參數。

Fig 1 (Based on DO)、Fig 2 (Based on Final yield and Growth rate) 是經由模式所描繪出的劑量反應曲線關係圖，Table 2 中斜率高者，表示生物體所能忍受的最高濃度到完全抑制濃度只存在狹小的區間內；這個情況當中，若濃度上有稍加變化，生物受體的反應就會大幅的增加，在進行這類毒性物質實驗濃度數據的處理方面則需多加注意。

若是以不同類別的除草劑來觀察結果，針對三種不同的參數來比較，C 類和 K 類的除草劑分別有 1/3 的毒性物質是呈現 ΔDO 參數比較敏感，有 2/3 是以 Final Yield 為參數得到的敏感性最高。

這個結果和當初選擇 C、K、O 三類除草劑的假設並不相同。C 類是抑制光合作用系統型的作用機制，起初假設可能和溶氧的變化關係較為明顯，但是實驗結果卻僅有三分之一的除草劑在 ΔDO 這個參數所呈現出的敏感性較高；其餘的毒性物質仍是以 Final Yield 參數較好。顯示 C 類除草劑雖是抑制光合作用為主，產生的氧氣量的確會受到明顯的影響。但是，無法行完整的光合作用將會導致植物生長所需的能量不足，也可能是造成細胞分裂無法完全的原因。於是，在細胞密度變化量的反應參數上表現出特殊的敏感性，比起原本假設中的情況高出了許多。

而 K 類除草劑的作用機制原本就和細胞分裂有關，因此在以 Final Yield 為反應參數時會呈現較高的敏感度是可以預期的，本實驗研究

結果也証實了這項假設。

若是以組別間的毒性來討論的話，C1 類組間的毒性差異並不大，不過C2 類間確有了明顯的不同（以 Δ DO來說，fenuron 和 ethidimuron 差了 20 倍）。C3 類的 bentazone 並不高，是所有C類中毒性最低的，和Fairchild *et al.*(Fairchild *et al.*, 1997)⁽³⁵⁾、Ma *et al.*(Ma *et al.*, 2003)⁽¹⁾、Reboud(Reboud, 2002)⁽³⁶⁾，等利用不同藻種所做出來的研究結果是相同的。K1 及K2 類的毒性明顯較K3 類來的低，其中dimethachlor的毒性更是比tebutam要高出 500 倍以上。

在本篇研究中分別以三種不同的試驗參數（溶氧產生量、細胞密度變化量及生長率）來討論 BOD 瓶藻類毒性試驗的 NOEC 值（No Observed Effect Concentration）。NOEC 值的判定通常和實驗濃度的取決、重複組的數量和選定參數有所關聯。一般 NOEC 值是由統計方法中的 Dunnett's test 方法來做分析的，若重複組間的差異變小，與處理組的差距便較為明顯，所求得的 NOEC 值也較為準確，通常較不嚴謹的實驗易出現較高的 NOEC 值。Table 3 列出了由 Dunnett's test 所得到的 NOEC 值，在 NOEC 值的比較方面，三種不同參數有著相同 NOEC 值的毒性物質僅有三種，其他數據不是無法比較就是溶氧產生量和細胞密度的變化量較生長率要來得敏感，而溶氧產生量和細胞密度變化量兩種參數的敏感度是差不多的，在生長率方面僅有三種毒性物質的 NOEC 值小於實驗濃度的最小值，而溶氧產生量和細胞密度變化皆都有 70% 的 NOEC 值較實驗時的最低濃度還要來得低。以對於本研究的毒性物質而言，

NOEC 值能提供更佳的保護標準。而整個分析中，可能會導致高變異性的原因可能來自於所使用的藻類未達穩定狀態、或試驗過程不夠嚴謹以及毒性物質濃度設定不理想，都會產生分析上的偏差。

在本實驗的數據結果可觀察到，其中以 desmetryne 為毒性最強者，而最低則是 tebutam。而兩者之間的 EC50 差值可達到約 1,000 倍以上；而在三種不同試驗參數裡，尤以生物質量（Final Yield）最為敏感，其次為溶氧變化量（ Δ DO），最後才是生長率（Growth rate）。和細胞分裂有關的除草劑不論在動物或植物上皆產生了相當的抑制效果，但是對植物的毒性仍是較強的。而在抑制光合作用型的除草劑上即可明顯的比較出，這類型的除草劑主要是針對植物光合作用的干擾，因此對於動物類的毒性試驗敏感度較差，比起本實驗所使用的綠藻類更是低了有 10^5 倍之多。將本實驗的除草劑和眾多物種比較上來看，整體上，月芽藻明顯表現出較為靈敏的情況；這也證明瞭本實驗物種在對於水體毒性研究上，具有被選擇的優越性。另外本研究的實驗方法只要以往二分之一的試驗時間以及較少量測試物種就可以得到良好的實驗結果再現性與敏感度。

本研究至今已完成 15 種除草劑之毒性評估，接續將完成其餘 5 種除草劑之毒性評估試驗、數據分析及結果討論等工作。

五、結論

Table 1. Herbicide resistant weeds of this investigation

HRAC Group	Mode of Action	Chemical Family	Herbicides	CAS NO.	HPLC λ value (nm)
C1	Inhibition of photosynthesis at photosystem II	Triazines	Desmetryne	1014-69-3	200
		Triazinones	Hexazinone	51235-0402	206
			Metribuzin	21087-64-9	207
C2	Inhibition of photosynthesis at photosystem II	Uracils	Bromacil	314-40-9	201
		Ureas	Monolinuron	1746-81-2	200
			Ethidimuron	30043-49-3	202
			Fenuron	101-42-8	253
			Tebuthiuron	34014-18-1	218
C3	Inhibition of photosynthesis at photosystem II	Benzothiadiazinone	Bentazon	25057-89-0	236
K1	Microtubule assembly inhibition	Dinitroanilines	Oryzalin	19044-88-3	208
		Benzamides	Propyzamide	23950-58-5	200
K2	Inhibition of mitosis / microtubule organisation		Carbamates	Tebutam	35256-85-0
		Carbetamide		16118-49-3	200
K3	Inhibition of VLCFAs (Inhibition of cell division)		Dimethachlor	50563-36-5	203
O	Action like indole acetic acid (synthetic auxins)	Benzoic acids	Propachlor	1918-16-7	215
			Dicamba	1918-00-9	200
			Chloramben	133-90-4	200
		Pyridine carboxylic acids	Clopyralid	1702-17-6	212
			Picloram	1918-02-1	203
			Triclopyr	55335-06-3	200

Table 2. Median effective concentration value (EC₅₀) in three endpoints

Toxicants	Response based on Δ DO			Response based on Final yield			Response based on Growth Rate		
	EC ₅₀ (mg/L)	intercept	slope	EC ₅₀ (mg/L)	intercept	slope	EC ₅₀ (mg/L)	intercept	slope
desmetryne	0.0056	10.45	2.415	0.0080	9.561	2.174	0.0191	8.056	1.777
hexazinone	0.0135	10.27	2.820	0.0158	9.972	2.762	0.0240	11.16	3.802
metribuzin	0.0148	9.222	2.308	0.0125	8.854	2.024	0.0327	7.303	1.550
bromacil	0.0082	8.993	1.916	0.0065	8.147	1.438	0.0244	7.005	1.244
monolinuron	0.2102	6.317	1.945	0.3233	5.846	1.726	0.9406	5.041	1.538
ethidimuron	0.0502	7.851	2.195	0.0454	8.398	2.531	0.0930	7.532	2.454
fenuron	0.9697	5.031	2.315	0.6648	5.401	2.259	1.5833	4.601	1.999
tebuthiuron	0.0538	6.837	1.447	0.0305	7.332	1.538	0.0889	6.722	1.639
bentazon	1.0010	4.999	1.709	0.5628	5.378	1.514	2.0791	4.587	1.298
oryzalin	0.0581	6.865	1.509	0.0371	7.060	1.441	0.1451	6.121	1.337
propyzamide	0.8226	5.127	1.500	0.2817	2.787	1.429	0.9324	5.046	1.502
tebutam	6.1828	3.161	2.324	4.5749	3.550	2.195	8.3594	2.545	2.662
carbetamide	0.2239	5.794	1.222	0.9348	5.043	1.475	3.0223	4.317	1.422
dimethachlor	0.0090	8.638	1.780	0.0083	9.841	2.328	0.0176	8.691	2.105
propachlor	—	—	—	—	—	—	—	—	—
dicamba	—	—	—	—	—	—	—	—	—
chloramben	—	—	—	—	—	—	—	—	—
clopyralid	—	—	—	—	—	—	—	—	—
picloram	—	—	—	—	—	—	—	—	—
triclopyr	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Acetonitrile*	6115.7	-4.938	2.625	5371.4	-7.699	3.404	8592.8	-7.163	3.092

* Acetonitrile is used as a solvent

— Experiments have not been finished yet

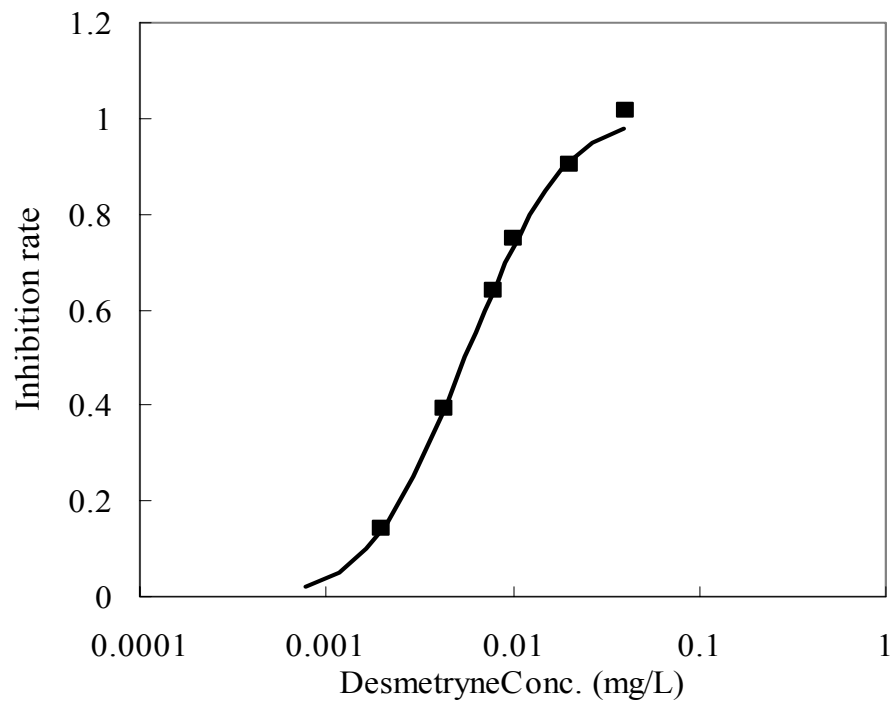


Fig 1. The dose-response of desmetryne on *P. subcapitata*. (based on DO)

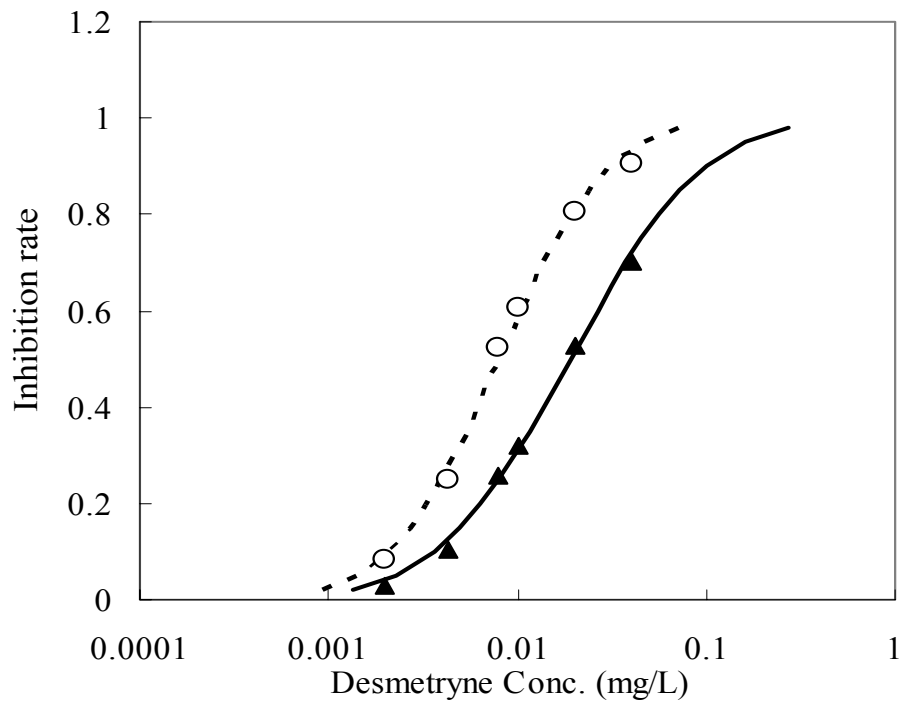


Fig 2. The dose-response of desmetryne on *P. subcapitata*. (based on Final yield O and Growth rate ▲)

Table 3. NOECs and EC₅₀ for herbicides

Toxicants	Response based on Δ DO		Response based on Final Yield		Response based on Growth Rate	
	EC ₅₀ (95%C.I.)	NOEC	EC ₅₀ (95%C.I.)	NOEC	EC ₅₀ (95%C.I.)	NOEC
desmetryne	0.0056 (0.005~0.006)	<0.002	0.0080 (0.007~0.009)	<0.002	0.0191 (0.018~0.021)	0.002
hexazinone	0.0135 (0.107~0.018)	<0.00486	0.0158 (0.014~0.019)	<0.00486	0.0240 (0.019~0.039)	0.00486
metribuzin	0.0148 (0.013~0.017)	<0.003	0.0125 (0.010~0.015)	<0.003	0.0327 (0.025~0.043)	0.003
bromacil	0.0082 (0.007~0.010)	<0.003	0.0065 (0.005~0.008)	<0.003	0.0244 (0.019~0.031)	<0.003
monolinuron	0.2102 (0.190~0.232)	<0.06	0.3233 (0.278~0.369)	0.06	0.9406 (0.858~1.042)	0.15
ethidimuron	0.0502 (0.043~0.059)	<0.008	0.0454 (0.040~0.052)	<0.008	0.0930 (0.082~0.108)	0.008
fenuron	0.9697 (0.777~1.203)	<0.2	0.6648 (0.529~0.800)	0.2	1.5833 (1.272~2.027)	0.2
tebuthiuron	0.0538 (0.035~0.082)	<0.003	0.0305 (0.024~0.039)	<0.003	0.0889 (0.068~0.118)	0.0085
bentazon	1.001 (0.0769~1.367)	<0.125	0.5628 (0.459~0.689)	<0.125	2.0791 (1.881~2.304)	<0.125
oryzalin	0.0581 (0.027~0.112)	<0.003	0.0371 (0.027~0.048)	<0.003	0.1451 (0.108~0.195)	0.005
propyzamide	0.8226 (0.661~1.032)	0.054	0.2817 (0.179~0.406)	<0.054	0.9324 (0.652~1.339)	0.054
tebutam	6.1828 (4.394~9.439)	<0.73	4.5749 (2.519~8.730)	<0.73	8.3594 (6.351~13.27)	<0.73
carbetamide	0.2239 (0.182~0.268)	<0.1	0.9348 (0.778~1.119)	<0.1	3.0223 (2.542~3.696)	0.1
dimethachlor	0.0090 (0.007~0.012)	<0.001	0.0083 (0.007~0.010)	<0.001	0.0176 (0.015~0.021)	0.001
propachlor	—	—	—	—	—	—
dicamba	—	—	—	—	—	—
chloramben	—	—	—	—	—	—
clopyralid	—	—	—	—	—	—
picloram	—	—	—	—	—	—
triclopyr	—	—	—	—	—	—

* the unit is mg/L; NOEC is conducted by Dunnett's test; C.I.=confidence interval

— Experiments have not been finished yet

六、參考資料

1. **Ma, J., Lin, F., Wang, S., Xu, L., 2003.** Toxicity of 21 Herbicides to the Green Alga *Scenedesmus quadricauda*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 71, 594–601.
2. **Herbicide Resistance Action Committee (HRAC), 2002.** Classification of Herbicides According to Mode of Action. <http://www.plantprotection.org/HRAC>
3. **Weed Society of America., 1994.** *Herbicide Handbook*, 6th ed. Champaign, IL, USA.
4. **Wright, K., Corbett, J.R., 1979.** Biochemistry of herbicides affecting photosynthesis. Z. Naturforsch C. 34, 966-972.
5. **Pfister, K., Arntzen, C.J., 1979.** The mode of action of photosystem II –specific inhibitors in herbicide-resistant weed biotypes. Z. Naturforsch C. 34, 996-1009.
6. **Dodge, A.D., 1989.** Herbicides and plant metabolism: Herbicides interacting with photosystem II. Cambridge University Press. Cambridge.
7. **Fuerst, E.P., Norman, M.A., 1991.** Interactions of herbicides with photosynthetic electron transport. Weed Sci 39, 458-464.
8. **Fuks, B., Homble, F., Eycken, F.V., Figeys, H., Lannoye, R.L., 1992.** Photoacoustic spectroscopy as a tool for monitoring herbicide effects on triazine-resistant and –susceptible biotypes of black nightshade (*Solanum nigrum*). Weed Sci 40, 371-377.
9. **Nakamura, C., Hasegawa, M., Nakamura, N., Miyake, J., 2003.** Rapid and specific detection of herbicides using a self-assembled photosynthetic reaction center from purple bacterium on an SPR chip. Biosens. Bioelectron. 18, 599-603.
10. **Follak, S., Hurle, K., 2003.** Effect of airborne bromoxynil–octanoate and metribuzin on non-target plants. Environ. Pollut. 126, 139–146.
11. **Ma, J., 2002.** Differential Sensitivity to 30 Herbicides Among Populations of Two Green Algae *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 68, 275–281.
12. **Nygaard, G., Komarek, T., Kristiase, J., Skulberg, O.M., 1986.** Taxonomic designation of the bioassay alga NIVA-Chll (*Selenastrum capricornutum*) and some related strains. Opera Botanica. 90, 5-46.
13. **Oya, S.O., Alec, G., 1996.** Toxicity of 2,4-D Acid to Phytoplakton. Water Res. 30, 688-696.
14. **Piere-Yves, C., Lucie, M., Rober, AK., 1996.** Comparative study of effects of MCPA, Butylate, Atrazine, and Cyanazine on *Selenastrum capricornutum*. Environ. Pollut. 92, 219-225.
15. **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*. Aquat. Toxicol. 18, 87-100.
16. **Lewis, M.A., 1992.** Periphyton photosynthesis as an indicator of effluent toxicity: Relationship to effects on animal test species. Aquat. Toxicol. 23, 279-288
17. **Lewis, M.A., 1995.** Use of freshwater plants for phytotoxicity testing : A review. Environ. Pollut. 87, 319-336
18. **Fairchild, J.F., Ruessler, D.S.,**

- Carlson, A.R., 1998.** Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor, and metolachlor. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1830–1834.
19. **Amblard, C., Couture, P., Bourdier, G., 1990.** Effects of a pulp and paper mill effluent on the structure and metabolism of periphytic algae in experimental streams. *Aquat. Toxicol.* 18, 137–162.
20. **Havens, K.E., Heath, R.T., 1990.** Phytoplankton succession during acidification with and without increasing aluminum levels. *Environ. Pollut.* 68, 129–145.
21. **Thomas, J.M., Skalski, J.R., Cline, J.F., McShane, M.C., Simpson, J.C., 1986.** Characterization of chemical waste site contamination and determination of its extent using bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 5, 487–501.
22. **Klaine, S.J., Lewis, M.A., 1995.** Algal and plant toxicity testing. In Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GA Jr, Cairns J Jr, eds, *Handbook of Ecotoxicology*. CRC, Boca Raton, FL, USA, pp 163–184.
23. **Bartlett, L., Rabe, R.W., Funk, W.H., 1974.** Effects of copper, zinc, and cadmium on *Selenastrum capricornutum*. *Water Res.* 8, 179–185.
24. **Greene, J.C., Miller, W.E., Debacon, M., Long, M.A., Bartels, C.L., 1988.** Use of *Selenastrum capricornutum* to assess the toxicity potential of surface and ground water contamination caused by chromium waste. *Environ. Toxicol. Chem.* 7, 35–39.
25. **Galassi, S., Vighi, M., 1981.** Testing toxicity of volatile substances with algae. *Chemosphere* 10, 1123–1126.
26. **Halling-Sorensen, B., Nyholm, 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.
27. **U.S. Environmental Protection Agency, 1996.** Ecological Effect Test Guidelines. OPPTS 850.5400. *Algal Toxicity*, Tiers II and I.
28. **Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 1984.** Alga, growth inhibition test. OECD-Guideline No. 201; 07/06/1984 and Official Journal of European Communities, 92/69/EEC: C.3.
29. **Versteeg, D.J., 1990.** Comparison of short- and long-term toxicity test results for the green alga, *Selenastrum capricornutum*. *ASTM STP* 1091: 40-48.
30. **International Organization for Standardization (ISO), 1987.** Water quality- Algal growth inhibition test. Draft International Standard ISO/DIS 8692. Geneva, Switzerland.
31. **Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 2000.** Guidance document on aquatic toxic testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment, No. 23. Paris, France.
32. **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 Res.* 39, 1869-1877.
33. **Chen, C.Y., Lin, J.H., 2005.** Toxicity of chlorophenols to *Pseudokirchneriella subcapitata* under Air-Tight test environment. *Chemosphere* (accepted).
34. **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.
35. **Fairchild, J.F., Ruessler, D.S., Haverland, P.S., Carlson, A.R., 1997.** Comparative Sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to Sixteen Herbicides. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 32, 353-357.
36. **Reboud, X., 2002.** Response of *Chlamydomonas reinhardtii* to Herbicides: Negative Relationship Between Toxicity and Water Solubility Across Several Herbicide Families. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 69, 554-561.
37. **Moreno-Garrido, I., Lubián, L.M., Soares, A.M.V.M., 2000.** Influence of cellular density on determination of EC₅₀ in microalgal growth inhibition tests. Ecotox. Environ. Safe. 47, 112-116.
38. **U.S. Environmental Protection Agency, 2005.** http://www.epa.gov/cgi-bin/ecotox_quick_search.
39. **St-Laurent, D., Blaise, C., MacQuarrie, P., Scroggins, R., Trottier, B., 1992.** Comparative assessment of herbicide phytotoxicity to *Selenastrum capricornutum* using microplate and flask bioassay procedures. Environ. Toxicol. Water Qual. 7, 35-48.
40. **Hickey, C.W., 1991.** Microtesting appraisal of ATP and cell recovery toxicity end points after acute exposure of *Selenastrum capricornutum* to selected chemicals. Environ. Toxicol. Water Qual. 6, 383-403.