

國立臺灣大學生物資源暨農學院農業化學系

碩士論文

Department of Agricultural Chemistry

College of Bioresources and Agriculture

Master Thesis



混合施用農藥對水中非目標生物之毒性效應

Toxic effects of pesticide mixed application on

non-target aquatic organisms

江佩津 撰

Pei-Chin Chiang

指導教授：顏瑞泓 博士 (Dr. Jui-Hung Yen)

中華民國一〇三年七月

July, 2014

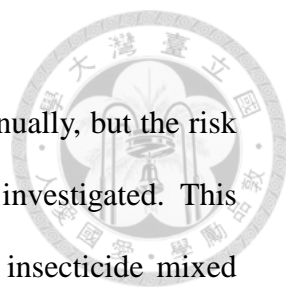
## 摘要



病蟲害防治的農藥在環境中具有延續性與重疊性，混合施用可同時防治病蟲害，但對於環境水體中非目標生物之毒害，尚未被廣泛研究。本研究探討混合施用農藥對於水中非目標生物水蚤 (*Daphnia pulex*)、端足蟲 (*Hyalella azteca*)、小球藻 (*Chlorella vulgaris*) 之毒性，並比較殺菌劑貝芬替 (Carbendazim)、甲基多保淨 (Thiophanate-methyl) 與殺蟲劑益達胺 (Imidacloprid) 對於三種水中非目標生物之毒性以及不同品種間之差異。試驗皆以急毒性試驗進行，計算半致死濃度 (Lethal Concentration 50,  $LC_{50}$ )，並進行統計與相關性分析。在水蚤毒性試驗中，單獨暴露貝芬替的  $LC_{50}$  為  $0.10 \text{ mg L}^{-1}$ 、甲基多保淨為  $17.47 \text{ mg L}^{-1}$ 、益達胺為  $62.17 \text{ mg L}^{-1}$ ，混合暴露分別將益達胺無觀察危害反應劑量與最低觀察危害反應劑量和貝芬替混合，毒性不受影響，以等毒性混合貝芬替與益達胺之毒性效應為拮抗作用；等毒性混合甲基多保淨與益達胺之毒性效應為協同作用。在端足蟲毒性試驗中，單獨暴露貝芬替的  $LC_{50}$  為  $0.41 \text{ mg L}^{-1}$ 、益達胺為  $0.053 \text{ mg L}^{-1}$ 、甲基多保淨為  $1.72 \text{ mg L}^{-1}$ ，等毒性混合甲基多保淨與益達胺以及貝芬替與益達胺在端足蟲上的毒性效應皆為協同效應。對小球藻而言，三種農藥皆不會造成明顯生長抑制的毒性效果。結果顯示，對於貝芬替水蚤較端足蟲敏感，對於益達胺端足蟲則是較水蚤來得更加敏感，而混合後的協同效應說明了低劑量下，殺菌劑與殺蟲劑的混合仍有毒性提高的風險存在。

關鍵字：貝芬替 (Carbendazim)、益達胺 (Imidacloprid)、甲基多保淨 (Thiophanate methyl)、混合毒性 (Mixture toxicity)、水蚤 (*Daphnia pulex*)、端足蟲 (*Hyalella azteca*)、小球藻 (*Chlorella vulgaris*)

## Abstract



The mixed application of pesticides can control diseases continually, but the risk of mixture toxicity on aquatic non-target organisms is still not investigated. This research is aimed to investigate the toxic effect of fungicide and insecticide mixed application to daphnia (*Daphnia pulex*), amphipod (*Hyalella azteca*), and green algae (*Chlorella vulgaris*) and compare pesticides' toxicity and aquatic organisms' sensibility to pesticides. The exposing tests are using acute toxicity tests, calculating the lethal concentration 50 and undergo static and correlation analysis. In *D. pulex*'s toxicity tests, LC<sub>50</sub> of carbendazim is 0.10 mg L<sup>-1</sup>, thiophanate methyl is 17.47 mg L<sup>-1</sup>, and imidacloprid is 62.17 mg L<sup>-1</sup>. In mixed exposing toxicity tests, toxicity of carbendazim with NOAEL and LOAEL imidacloprid is not affected. The joint toxic effect of equitoxic mixing carbendazim and imidacloprid is antagonistic effect, on the contrast, the joint effect of equitoxic mixing thiophanate methyl and imidacloprid is synergistic effect. In *H. azteca*'s toxicity tests, LC<sub>50</sub> of carbendazim is 0.41 mg L<sup>-1</sup>, thiophanate methyl is 1.72 mg L<sup>-1</sup>, and imidacloprid is 0.053 mg L<sup>-1</sup>. The joint effect of equitoxic mixing carbendazim and imidacloprid is synergistic effect, also in equitoxic mixing thiophanate methyl and imidacloprid. In *C. vulgaris*'s toxicity tests, these three pesticides show no obvious growth inhibition effect. Results show that for carbendazim *D. pulex* is more sensitive than *H. azteca*, for imidacloprid *H. azteca* is much more than *D. pulex*. *H. azteca* is generally equally sensitive towards organic xenobiotics as *D. pulex*. The synergistic effect shows that combinations resulted in greater than additive toxicity are greatest concern in ecotoxicology.

Keywords : Carbendazim, Imidacloprid, Thiophanate methyl, Mixture toxicity,

*Daphnia pulex*, *Hyalella azteca*, *Chlorella vulgaris*

## 謝辭



「他重複，他知道重複可以讓我幸福。」

——夏宇〈蒙馬特〉

從大學四年的實驗，到碩士班兩年的時光裡，最常想起的是夏宇這一首詩，在所有的日子裡，承載著的也許是世界全然的善意。有幾次都要放棄眼前這條顛簸走到的路，但都在實驗室的陪伴下，緩步走到，無論是已經畢業前去就業的學長姐，還是一起畢業的好友們、要繼續走到終點的人們，都給予了偌大的幫助，還有一位一直容忍這樣不務正業的學生的老師。

知道自己不想要什麼、知道自己想要什麼，在求學的階段裡，總是慢慢識得。在台灣環境資訊協會的採訪寫作，是我錨定自己的一個座標，提醒了自己，書寫也能夠有所力量，而非僅是為了抵抗遺忘。儘管遺忘的速度總是太快，在兩年內，被遷去的、被拆去的、逝去的生命所堆疊起來的遺憾以及憤怒，比起我們所能累積的土壤深度，是來得多。一面念書、一面運動，過往曾有的質疑是社會上的運動磨耗了學生的力量，但我卻不這麼覺得，在日夜守候的過程裡，稍事休息，眼前有了願意全心全意守護的事物，我們都會更加強壯，堅強起來，並保有溫柔。

要感謝的，是這個系所，家人朋友們，以及整個社會。

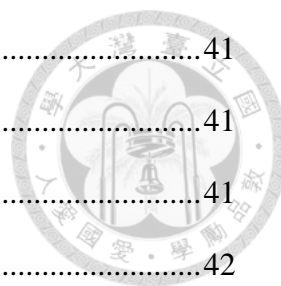
願自己能夠繼續走下去，因為這些善意，成為一個也能夠給予的人。



## 目錄

一、前言.....	1
二、文獻回顧.....	2
(一) 農藥對環境之衝擊.....	2
(二) 農藥的混合施用.....	5
(三) 荷爾蒙與環境荷爾蒙.....	9
(四) 本研究用藥簡介.....	11
1. 殺菌劑甲基多保淨.....	11
2. 殺菌劑貝芬替.....	11
3. 殺蟲劑益達胺.....	12
(五) 試驗材料簡介.....	16
三、研究目的.....	24
四、材料與方法.....	25
(一) 水中安定性試驗.....	25
1. 材料與儀器.....	25
2. 儲備標準溶液與檢量線配置.....	26
3. 水中安定性檢測.....	26
4. 安定性試驗.....	28
(二) 急毒性試驗.....	29
1. 水蚤 ( <i>D. pulex</i> ) 48 小時急毒性試驗.....	29
2. 端足蟲 ( <i>H. azteca</i> ) 72 小時急毒性試驗.....	32
3. 小球藻 ( <i>C. vulgaris</i> Beij.) 24 小時急毒性試驗.....	34
(三) 統計分析.....	40

五、結果與討論.....	41
(一) 單獨暴露之急毒性試驗結果.....	41
1. 水蚤.....	41
2. 端足蟲.....	42
3. 小球藻.....	43
4. 物種間比較.....	44
(二) 混合暴露之急毒性試驗結果.....	55
1. 水蚤.....	55
2. 端足蟲.....	63
六、結論.....	68
七、參考文獻.....	69





## 圖目錄

圖一、農藥在環境中的動態.....	4
圖二、本研究所使用之水蚤以顯微鏡拍攝之相片.....	18
圖三、本研究所使用端足蟲之相片.....	21
圖四、參考文獻中已達性成熟之端足蟲其第二性徵.....	22
圖五、三種農藥在水蚤與端足蟲的半致死濃度相關性比較.....	46
圖六、水蚤於甲基多保淨中之劑量與毒性效應.....	49
圖七、水蚤於貝芬替中之劑量與毒性效應.....	49
圖八、水蚤於益達胺中之劑量與毒性效應.....	50
圖九、端足蟲於甲基多保淨中之劑量與毒性效應.....	51
圖十、端足蟲於貝芬替中之劑量與毒性效應.....	51
圖十一、端足蟲於益達胺中之劑量與毒性效應.....	52
圖十二、小球藻受甲基多保淨抑制之生長速率圖形.....	53
圖十三、小球藻受貝芬替抑制之生長速率圖形.....	53
圖十四、小球藻受益達胺抑制之生長速率圖形.....	54
圖十五、混合暴露於貝芬替與益達胺之水蚤毒性與劑量效應.....	58
圖十六、貝芬替加上無觀察危害反應劑量的益達胺對水蚤之劑量與毒性效應..	58
圖十七、貝芬替加上最低觀察危害反應劑量的益達胺對水蚤之劑量與毒性效應 .....	59
圖十八、等毒性混合貝芬替與益達胺對水蚤之劑量與毒性效應.....	59
圖十九、混合暴露於甲基多保淨與益達胺之水蚤毒性與劑量效應.....	60
圖二十、甲基多保淨加上無觀察危害反應劑量的益達胺對水蚤之劑量與毒性效應 .....	60

圖二十一、甲基多保淨加上最低觀察危害反應劑量的益達胺對水蚤之劑量與毒性 效應.....	61
圖二十二、等毒性混合甲基多保淨與益達胺對水蚤之劑量與毒性效應.....	61
圖二十三、等毒性混合貝芬替與益達胺對端足蟲之劑量與毒性效應.....	64
圖二十四、等毒性混合甲基多保淨與益達胺對端足蟲之劑量與毒性效應.....	64
圖二十五、混合暴露的對數模型圖形比較 (空心：甲基多保淨加益達胺；實心： 貝芬替加益達胺).....	66



## 表目錄



表一、水稻病蟲害之推薦用藥.....	7
表二、濃度加成聯合作用下的四種毒性指標.....	8
表三、甲基多保淨的物化性質與毒性資料.....	13
表四、貝芬替的物化性質與毒性資料.....	14
表五、益達胺的物化性質與毒性資料.....	15
表六、以 HPLC 分析本試驗用藥之條件 .....	27
表七、本試驗用藥以分析條件測得之檢量線.....	27
表八、水中安定性試驗之偵測濃度.....	28
表九、Bold's basal medium 之組成成分.....	38
表十、不同物種之急毒性試驗半致死濃度.....	45
表十一、水蚤毒性實驗值與文獻值比較.....	47
表十二、端足蟲毒性實驗值與文獻值比較.....	48
表十三、水蚤混合暴露之半致死濃度.....	62
表十四、端足蟲混合暴露之半致死濃度.....	65
表一五、混合暴露之混合毒性作用 (等毒性).....	67

## 一、 前言



在現代的農耕社會中，慣行農法係指應用農藥、肥料以及現代機具耕犁技術的農法，可以節省人工，是為效率較高的耕作方式，只是長期以來也衍生了許多問題，農藥造成的環境污染是為一例。從過去毒性較高、劇毒的化合物逐漸禁止使用，高累積性、不易降解的化合物也逐步禁用中，如今，隨著化學分析等檢測方法的進步、偵測極限的降低，在環境水體中也時常發現各類農藥殘留的蹤跡，其中有些具有環境荷爾蒙的效應，對於環境的危害更甚。環境中的污染物不是單獨存在，而是以混合的形式存在，最直接的原因是在噴施時多種藥劑的混合，次要的原因則是在環境中以不同方式流佈，最後都還是進入地球上涵蓋最廣的水體之中。因此，在進行環境風險評估時，水體之中具有許多複雜性需要進一步討論，無論是單純的水樣，還是底泥的存在，以及多種污染物可能帶來的危害。數十年來，環境毒理學不僅是在單一毒物的作用與代謝機制上進行探討，混合形式存在的毒性效應也未曾間斷，除此之外，也極力發展出除化學分析外，更加能夠佐證污染物存在的毒性效應等檢測方法。

## 二、 文獻回顧



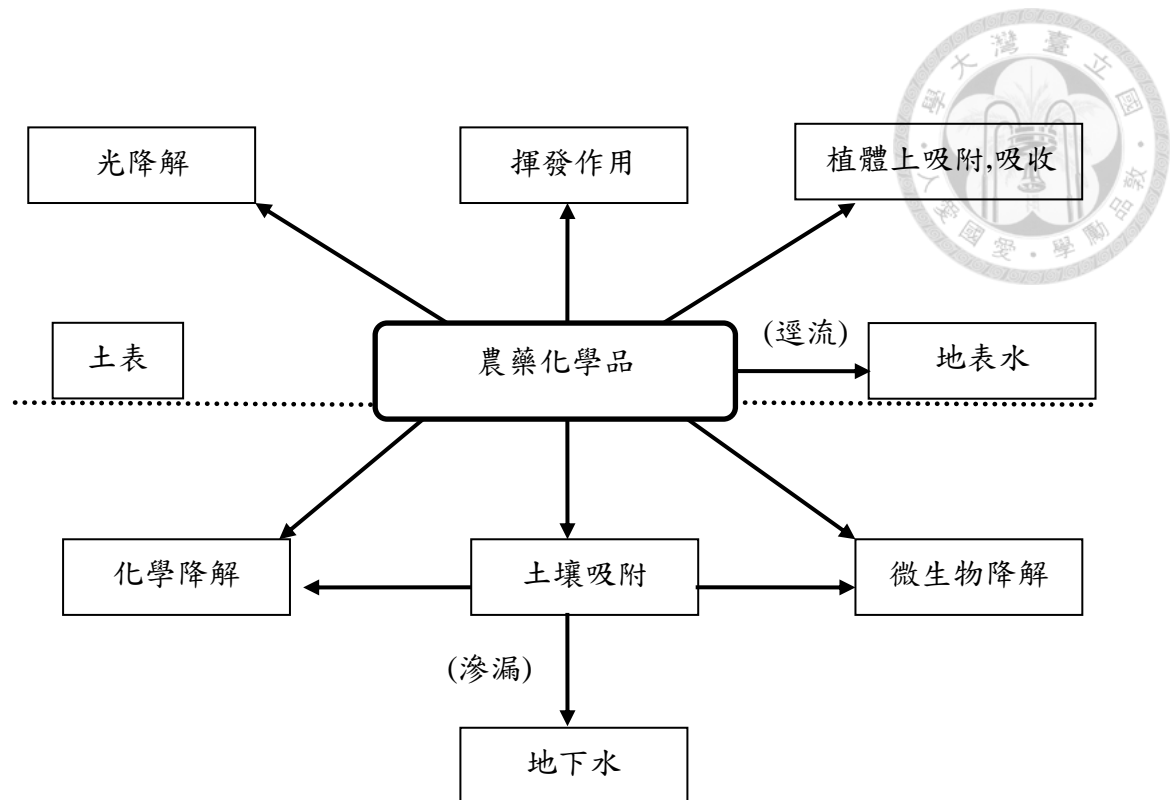
### (一) 農藥對環境之衝擊

農藥係指用以保護農作物的藥劑，在人類社會的農耕行為中，很早就用以殺蟲、除草、防治病害，以預防作物的損害。在農業發展史上，透過育種，育出較高產量、較耐病蟲害的品種，輔以化學農藥與肥料的使用，可使產量大增，稱為綠色革命，使人類社會免於因為天災而歉收的飢荒，只是同時，慣行農法的耕作方式，除了耕犁對於土壤結構的改變，使用化學肥料以及農業藥劑，也帶來了環境的隱憂。

當農藥施用在環境之中，會透過空氣、土壤、水不同的方式流佈，以及降解成不同產物，存於各種介質之中。早期所使用的各種農藥，效用雖甚佳，但也在長期的環境暴露、缺乏更深入的毒性評估之下，造成了環境的衝擊。以有機氯農藥為例，殺蟲劑 DDT 在 1942 年上市，時值第二次世界大戰，在植物保護與公共衛生上成果斐然，但是其具有高累積、不易降解之特性，而造成了在生物體內以及環境中的濃度增高，為持久性有機汙染物 (Persistent Organic Pollutants, POPs)。至 1960 年代，瑞秋卡森 (Rachel Carson) 所著的小說《寂靜的春天 (Silent Spring)》出版，書中所述農藥對於生態的衝擊，主要是針對 DDT 所造成的危害，此書使環境保護的意識受到重視，西方國家便開始著手進行 DDT 禁用之相關規定，1970 年代後，國際上紛紛禁用 DDT，1972 年美國宣布全面禁用，只是在發展中國家仍有部分施用 DDT，以避免瘧疾的擴散，在環境衛生與環境保護的意識之間，有許多值得探討之處，望有更多社會科學學者日後的研究。在環境毒理學方面，到了 2000 年以降，在水體以及水生生物的脂肪組織中依舊有 DDT 檢出 (Binelli and Provini, 2003)，顯見農藥對於環境的影響是具有持續性的，且在生物體上，仍有不可小覷之影響。

農藥在環境中的宿命及持久性是評估農藥對環境影響的指標，如圖一所示，農藥施用後會存在於大氣圈、土壤圈、生物圈等環境領域中，可經由植物吸收、光化學分解、揮發作用、逕流移動、土壤吸附、雨水淋洗、土壤微生物分解及化學分解等途徑在環境中轉變、消失與移動 (王，2004)。

而農藥進入環境的方式十分多元，除了因淋洗、排水進入水體，也可能藉由噴施藥劑後的落葉掉落於土壤與水體之中 (Schaefer et al., 2012)，而造成水體中存有農藥的殘留問題。在環境中的水體也時常被檢出混合多種農藥的形式 (Berenzen et al., 2005; Bereswill et al., 2012, 2013)，因此近年來對於混合施用農藥的探討逐漸增多，除此之外，美國曾進行全國 139 條溪流的水質偵測報告，被檢出多種藥物、環境荷爾蒙與農藥等化學品 (Kolpin et al., 2002)，其檢測值雖低於放流水與飲用水的管制標準，在化學分析上並不被認為造成水體的汙染，但是在透過以生物指標所進行的生物檢測法 (Bioassay) 中，此類有機物在低劑量、長期暴露下，對於生物體其實會具有內分泌或生殖上的影響，因此在現今的環境毒理學試驗中，生物指標的發展以及關於混合施用的研究，此兩議題是必然的趨勢。



圖一、農藥在環境中的動態 (王，2004)

Fig. 1 The fate of pesticides in the environment

## (二) 農藥的混合施用

為防治病蟲害，植物保護手冊中載有推薦用藥，防治用藥具有延續性與重複性，才可有效防治各種病蟲害，在不交互影響（如造成沉澱等作用）之情形下，混合施用的好處是可以同時防治病蟲害、減少人工，並提高用藥效率。

在環境與農業中，各種用藥繁多，而在農產品農藥殘留檢驗報告中，也可見不同農藥之檢出，可能源於所噴施的藥劑，也可能源於農藥代謝產物。其中以免賴得系殺菌劑甲基多保淨為例，其主要代謝產物為貝芬替，貝芬替也為許多種農藥的代謝產物，也因此常發生農民未噴施貝芬替，卻在檢驗時檢出貝芬替此一情形。

一般農業上使用的農藥可分為殺蟲劑、殺菌劑、除草劑、殺蟎劑等，在台灣廣泛種植的水稻上，稻熱病是對於產量而言十分重要的因素，每年各個農業改良場皆會公告稻熱病警告，並提供防治用藥之建議。因此本研究所選用的農藥，是在稻熱病防治上推薦使用的殺菌劑與殺蟲劑，同時也是台灣用量較大的藥劑，在進入環境之中，會同時存在。過往的農藥毒性資料多以單一數據存在，但在環境中的農藥多是以「雞尾酒 (Cocktail) 式」的混合，而在混合的情形下毒性的改變以及可能效應尚未被廣泛研究。

農藥混合施用可能會因化學反應、生物反應交互作用而擁有不同的降解速率，如殺菌劑與殺蟲劑共同存在所產生之交互作用，會抑制土壤中微生物作用，使其在土壤中之持久性增長（蕭，2013）。在環境中，也會造成不同的毒性效應，部分殺蟲劑已有研究顯示會提高其他農藥對於水生生物的毒性，其中，咪唑和三唑類殺菌劑會提高合成除蟲菊精類殺蟲劑的水生生物毒性和陸生動物毒性（Cedergreen et al., 2006; Norgaard and Cedergreen, 2010），除草劑草脫淨已被證實會提高有機磷殺蟲劑之毒性（Belden and Lydy, 2000），有機磷殺蟲劑已顯示會增強其他殺蟲劑的效果（Lydy and Austin, 2004）。除毒性上升外，有機氯殺蟲劑佈

飛松與殺蟲劑安殺番組合會具有拮抗作用 (Woods et al., 2002)。

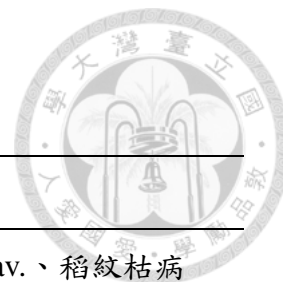
在混合毒性的判斷上，通常以濃度加成 (Concentration Addition, CA) 和獨立行為 (Independent Action, IA) 兩種方式表示。1926 年 Loewe 提出濃度加成的概念 (Loewe, 1953)，1939 年 Bliss 提出毒物聯合使用的毒性 (Bliss, 1939)，毒性資料可透過 Probit 模式得出劑量-反應曲線 (Dose-Response Curve)，判斷毒物的作用機制是相似 (Similar) 還是獨立 (Independent)，化學毒物之間存在「拮抗 (Antagonism)、獨立 (Independent)、相加 (Additive) 和協同 (Synergism)」四種作用。透過不同的毒性資料，除非已知作用機制不同的毒物混合結果才會使用獨立行為 (IA) 作為計算，濃度加成 (CA) 被認為較能夠防範毒性被低估的風險 (Belden et al., 2007; Drescher and Boedeker, 1995)，因此在本研究中，會使用濃度加成 (CA) 的方式來進行毒性效應的判別。

毒性相加 (CA) 常見的四種毒性指標有毒性單位 (Toxic Unit, TU)、加成指數 (Additive Index, AI)、混合毒性指數 (Mixture Toxicity Index, MTI)、相似參數 ( $\lambda$ )。

表一、水稻病蟲害之推薦用藥

Table 1 The recommended treatment of rice

藥劑種類	推薦用藥	病蟲害
殺菌劑	甲基多保淨、貝芬替	稻熱病 <i>Pyricularia oryzae</i> Cav.、稻紋枯病 <i>Thanatephorus cucumeris</i> (Frank) Donk (= <i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn)
殺蟲劑	益達胺	褐飛蝨、黑尾葉蟬 (黑尾浮塵子) <i>Nilaparvata lugens</i> (Stal)、斑飛蝨 <i>Laodelphax striatellus</i> (Fallen)





表二、濃度加成聯合作用下的四種毒性指標

Table 2 Four toxicity indexes of concentration additive joint effect

Toxicity Type	Identification	Index
Additive	Joint effect is equal to the	TU = 1
	sum of individual toxic	AI = 0
	effect	MTI = 0 $\lambda = 0$
Antagonism	Joint effect is less than the	TU > 1
	sum of individual toxic	AI > 0
	effect	MTI < 0 $1 > \lambda > 0$
Synergism	Joint effect is greater than	TU < 1
	the sum of individual	AI < 0
	toxic effect	MTI > 0 $\lambda > 1$


### (三) 荷爾蒙與環境荷爾蒙

荷爾蒙 (Hormones) 為內分泌系統 (Endocrine System) 的分泌產物，內分泌系統係由分泌荷爾蒙之腺體以及偵測、反應荷爾蒙之受器所組成。人類的內分泌系統有腦下垂腺體、松果體、甲狀腺、胸腺、腎上腺、性腺.....等，對於人體生理作用有不同的調控機制，荷爾蒙與受體之關係為具專一性之生理反應。

環境荷爾蒙則是指分子結構類似體內分泌產生之荷爾蒙，此類物質藉由環境介質進入動物體後，因結構相似而得以與受體結合，使體內調控機制進行反應，進而干擾動物體內的代謝作用、行為、生殖與性別分化等生理作用。環境荷爾蒙又稱內分泌干擾素 (Endocrine Disruptor Substances, EDCs)，根據美國環保署報告中所述之定義，環境荷爾蒙是指干擾負責維持生物體內恆定、生殖、發育或行為的內生荷爾蒙之外來物質，會影響荷爾蒙的合成、分泌、傳輸、結合、作用及排除。內分泌干擾物質對生物體造成危害的途徑有三種 (凌, 1999)：

- (1) 天然激素之相似物質，模仿天然激素之作用，而使生物產生反應過度或不足，或使生物在不恰當的時間產生反應等。
- (2) 天然激素之拮抗物質競爭體內激素之受器，抑制「激素-受體複合體」之形成，而阻礙生物體內激素之作用。
- (3) 促進或抑制內分泌系統的作用，造成激素之分泌過度或不足。

內分泌干擾物質種類繁雜、應用廣泛，因此在環境中廣泛分布，例如：塑化劑 (鄰苯二甲酸酯類)、雙酚 A、清潔劑之主要成分壬基苯酚 (Nonyl Phenol, NP) 與壬基酚聚氧乙烯醚 (Nonophenol ethoxylates, NPEOs)、重金屬 (鉛、汞、鎘)。此外持久性有機化合物具有不易分解與生物累積性，對人體及環境將產生不可逆的化學反應，為近年來內分泌干擾物質最常被探討的分類之一。研究顯示，這些物質可長距離傳播到其他從未使用過的地區，威脅到其他地區的生態 (Becker et al., 2011)。



本研究所挑選之殺菌劑貝芬替已被證實為環境荷爾蒙，在低劑量下對哺乳動物會造成誘導有機體突變的影響 (Holtman and Kobayashi, 1997)，且多篇研究顯示貝芬替是對雄大鼠造成生殖毒性之主要成份 (Bjorge et al., 1996; Hess and Nakai, 2000; Nakai et al., 1992)，是為內分泌干擾物質。而甲基多保淨在土壤環境中會代謝成貝芬替，以貝芬替的型式殘留在環境中。殺蟲劑益達胺在美日所列疑似環境荷爾蒙中名列其中。

#### (四) 本研究用藥簡介

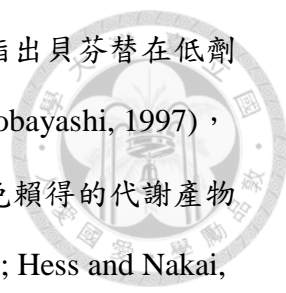
本研究所使用之藥劑分為殺菌劑與殺蟲劑，且為水稻病蟲害之推薦用藥，因此有混合施用的可能。殺菌劑選擇免苯並咪唑系的甲基多保淨與貝芬替，殺蟲劑選擇新菸鹼類的益達胺，以下為各種農藥之簡介以及其物化性質與毒性資料。

##### 1. 殺菌劑甲基多保淨

屬苯並咪唑系 (Benzimidazole) 的殺菌劑，於 1970 年 Ishii 發表其殺菌作用，為系統型殺菌劑，具預防與治療效果，作用機制是抑制真菌的有絲分裂及細胞分裂 (Mitosis and Cell division)，能抑制病斑擴大及阻止孢子之形成，速效型，長殘效性，施用於植株時可由根部及葉部吸收並轉移，除作為莖葉部灑佈外，可用於種子處理。於土壤中之持久性約 3 至 4 週，在土壤與水溶液中會有貝芬替之產生。常推薦於防治番石榴、蓮霧炭疽病、葡萄晚腐病、蘋果黑星病、柑桔的瘡痂病、瓜類蔓枯病等蔬果的病害防治。其代謝產物貝芬替被美國環保署列為人類可能致癌物質 (Possible Human Carcinogen)。

##### 2. 殺菌劑貝芬替

屬苯並咪唑系 (Benzimidazole) 的殺菌劑，於 1973 年 Hampel 等人發表，為系統型殺菌劑，具預防與治療效果，主要作用機制為抑制微管蛋白 ( $\beta$ -tubulin) 之形成，進而干擾細胞的有絲分裂，具廣效性，對於子囊菌的部分病原菌和半知菌類大多數病原真菌有效。可與多數殺菌劑混合使用。是免賴德 (可用於稻熱病稻種消毒)、甲基多保淨之主要代謝產物 (Chiba and Singh, 1986; Mazellier et al., 2002)，廣泛用於控制蔬果和水果上之病害，例如菊花莖腐病、葡萄黑痘病、菸草白星病、洋菇褐痘病，貝芬替常與不同作用機制殺菌劑形成混合劑後登記使用，因此在環境中的貝芬替來源除了農民直接施用貝芬替，同時可能來自於混合



劑型以及施用免賴得和甲基多保淨降解後之代謝產物，有研究指出貝芬替在低劑量下對哺乳動物會造成誘導有機體突變的影響 (Holtman and Kobayashi, 1997)，且多篇文獻探討免賴得與其代謝產物對大鼠的生殖毒性，認為免賴得的代謝產物貝芬替是對雄大鼠造成生殖毒性之主要成分 (Bjorge et al., 1996; Hess and Nakai, 2000; Nakai et al., 1992)，主要影響來自於貝芬替會使雄大鼠睪丸中賽透力氏細胞微管蛋白標的器官受到不可回復的傷害而導致不孕 (Carter et al., 1984; Lim and Miller, 1997; Markelewicz et al., 2004; Nakai et al., 1992; Nakai et al., 1993; Rehnberg et al., 1989)，目前已證實貝芬替可模仿雄性激素與受體結合 (呂，2006)，為內分泌干擾物質。在 1983 年所進行的台灣大甲溪流域 2131 件水樣中 (民國 72~79 年) 檢測出有 6 件含有貝芬替 (李，1983)。

### 3. 殺蟲劑益達胺

於 1990 年 Elbert 發表殺蟲作用，為系統型殺蟲劑，具接觸毒、胃毒作用，作用機制為作用於神經系統，為菸酸乙醯膽鹼酯酶受體的作用體 (Tomizawa and Casida, 2003)。新菸鹼類殺蟲劑長期以來被懷疑與蜂群崩壞症候群 (Colony Collapse Disorder, CCD) 有關，在歐盟國家，益達胺已經禁用，美國環保署則是在逐步減少益達胺的使用中。在部分研究中，也發現益達胺與其代謝產物會對蜜蜂造成毒性影響 (Iwasa et al., 2004; Nauen et al., 2001)。益達胺主要防治刺吸式危害作物之小型昆蟲，如粉蝨類、蚜蟲類、介殼蟲類、飛蝨類、薊馬類及葉蟬類等重要經濟害蟲。益達胺被美國列於疑似環境荷爾蒙之清單中，有研究指出，透過餵食  $20 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$  益達胺 90 天後會對雌性大鼠的卵巢產生病理性的變化，並造成荷爾蒙失調 (Kapoor et al., 2011)，同樣的試驗時間，在雄性大鼠上益達胺會造成氧化壓力，並使睪丸型態明顯變化、精子畸形率上升 (Bal et al., 2012)。

表三、甲基多保淨的物化性質與毒性資料

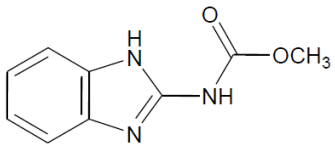
Table 3 The physicochemical properties and toxicity information of thiophanate-methyl



中文名稱	甲基多保淨
英文名稱	thiophanate-methyl
化學名稱	Dimethyl 4,4'-(o-phenylene)bis(3-thioallophanate)
CASE Number	23564-05-8
結構式	
分子式	$C_{12}H_{14}N_4O_4S_2$
分子量 ( $g\ mole^{-1}$ )	342.4
外觀 (25°C)	無色結晶體
熔點 (°C)	172
蒸氣壓 (25°C)	0.0095 mPa
水溶解度 (23°C)	難溶於水，易溶於有機溶劑
Octanol/water partition coefficient ( $K_{ow}$ )	1.50
魚毒 $LC_{50}$ (48 h) ( $mg\ L^{-1}$ )	78 (虹鱒) 110 (鯉魚)
水蚤 $LC_{50}$ (48 h) ( $mg\ L^{-1}$ )	20.2
水藻 $EC_{50}$ (96 h) ( $mg\ L^{-1}$ )	0.8

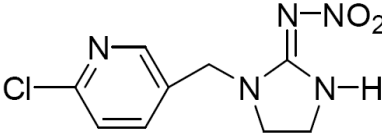
表四、貝芬替的物化性質與毒性資料

Table 4 The physicochemical properties and toxicity information of carbendazim

中文名稱	貝芬替
英文名稱	carbendazim
化學名稱	methyl benzimidazol-2-ylcarbamate
CASE Number	10605-21-7
結構式	
分子式	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>
分子量 (g mole <sup>-1</sup> )	191.19
外觀 (25°C)	無色結晶體
熔點 (°C)	302-307
蒸氣壓 (25°C)	65 nPa
水溶解度 (24°C) (mg L <sup>-1</sup> )	28 (pH=4) 8 (pH=7) 7 (pH=8)
Octanol/water partition coefficient (K <sub>ow</sub> )	0.139-0.173
比重 (kg L <sup>-1</sup> )	1.45
魚毒 LC <sub>50</sub> (96 h) (mg L <sup>-1</sup> )	0.83 (虹鱒) 0.61 (鯉魚) >8 (虹鱒) >17.25 (藍鯰)
水蚤 LC <sub>50</sub> (48 h) (mg L <sup>-1</sup> )	0.13~0.22
水藻 EC <sub>50</sub> (72 h) (mg L <sup>-1</sup> )	1.3~419


表五、益達胺的物化性質與毒性資料

Table 5 The physicochemical properties and toxicity information of imidacloprid

中文名稱	益達胺
英文名稱	imidacloprid
化學名稱	1-(6-Chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine
CASE Number	138261-41-3
結構式	
分子式	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>
分子量 (g mole <sup>-1</sup> )	255.7
外觀 (25°C)	無色結晶體
熔點 (°C)	144
蒸氣壓 (25°C)	9 x 10 <sup>-7</sup> mPa
水溶解度 (20°C) (g L <sup>-1</sup> )	0.61
Octanol/water partition coefficient (K <sub>ow</sub> )	3.71
比重 (kg L <sup>-1</sup> )	1.54
魚毒 LC <sub>50</sub> (96 h) (mg L <sup>-1</sup> )	211 (虹鱒) 237 (金色圓腹雅羅魚)
水蚤 LC <sub>50</sub> (48 h) (mg L <sup>-1</sup> )	85
水藻 EC <sub>50</sub> (72 h) (mg L <sup>-1</sup> )	>10



## (五) 試驗材料簡介



農藥在農業與社會中的使用是有其防治的目標，殺菌劑是防治造成病害的真菌，殺蟲劑則是為了防治害蟲，針對欲防治的目標藥劑具有不同的作用機制。但是，農藥並不會只影響到其作用的目標生物，在進入環境中後，會對於介質中存在的生物造成程度不一的影響，因此對於非目標生物的毒性影響，在農藥的風險評估中，也是十分重要的一環，因此會進行生物檢測法，生物檢測法係指選擇適當的生物及生理活性作為監測的對象，利用生物與環境之間的交互作用，觀察生態環境的變化情形。生物監測法中的指標生物主要是利用每一種生物對環境中的各項因子，如：水中的溫度、pH 值、鹽度及溶氧等，依其生長需求的不同，當環境改變時會導致其個體、型態、生理或行為的改變。藉著偵測上述改變之程度，推估環境污染的情形 (Rosenberg and Resh, 1993)。目前已被研究的指標生物種類相當多，其中包含了貝類、藻類、魚類及甲殼動物類。

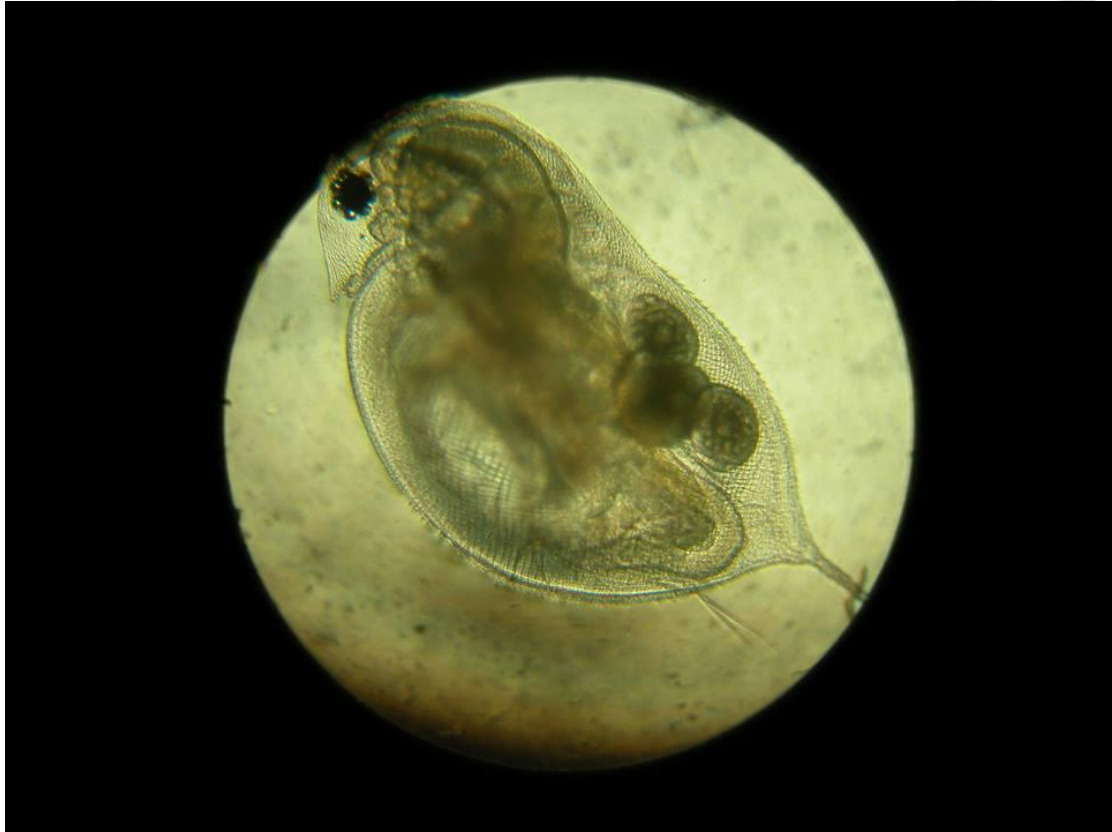
在進行環境中毒物風險評估的試驗時，有不同的試驗生物，所代表的是不同的動物分類以及環境。在進行毒性試驗時，使用大鼠進行試驗是為模擬在哺乳動物上可能的毒性效應，使用虹鱒、鯉魚等魚類是為魚毒性試驗，水蚤、綠藻等生物是代表水體中的浮游生物，端足蟲則是在水體、底泥中的底棲生物。本研究所選用的試驗生物，是浮游無脊椎動物水蚤、浮游藻類小球藻，以及底棲生物端足蟲，以瞭解水中不同代表生物對農藥之混合毒性。

試驗的方式是採急毒性試驗，因試驗生物之生長模式、生命史的不同，急毒性的試驗時間不一，急毒性試驗可以提供試驗生物對於藥劑最基本的毒性程度，以作為日後更多毒性試驗的依據。

### (1) 水蚤 (*Daphnia pulex*)

本研究所選用之水蚤分類上屬節肢動物門 (Arthropoda)、鰓足綱 (Crustacea)、雙甲目 (Diplostraca)、蚤科 (Daphnidae) 和蚤屬 (*Daphnia*)，此物種遍及歐洲、美洲、澳洲以及亞洲，是一模式生物，且是第一個具有基因組解序的物種。水蚤從兩側看略為圓扁，被兩片透明軟殼包住，可清楚看到內部構造，剛孵出之幼蟲體型約為 0.4 mm，成蟲體型為 1.2~5 mm (各品種大小不同)，因易於採得，為觀察心臟之最佳實驗生物。水蚤又俗稱水狗，是淡水浮游生物之重要組成部分，水蚤主要攝食水中的浮游植物、有機顆粒及細菌等，為水域生態中之初級消費者，也是魚類與水生昆蟲等次級消費者之食物來源。在水溫適當、餌料豐富且環境良好之水域，母水蚤進行無性繁殖產下夏卵，在生存條件惡劣的情況下會產生公水蚤，並進行有性生殖而產下受精的冬卵，冬卵對環境的適應力極強，即使經乾燥曝曬亦不至於死亡，冬卵所孵出之幼蟲均為雌性，此種母水蚤在孵出後經 2~7 天即可產下夏卵繼續無性繁殖。水蚤正常壽命為 9~12 週，母水蚤把夏卵背在殼上 2~3 天直到孵出幼蟲，幼蟲經 7 天左右即可變成成熟母水蚤，每隻母水蚤每次可產下 10~60 個卵，每隔 2~3 天可產卵一次，母水蚤一生約可產下 300~600 隻水蚤 (Krueger and Dodson, 1981)。

水蚤可作為輕度或中度污染之指標生物，在 5°C 的低溫下，少數品種仍能存活數天，只是活動力會稍差，40°C 以上水蚤即刻死亡；在 0.6% 以下濃度之鹽水中，水蚤仍能正常存活，濃度 0.8% 以上會有嚴重脫水現象，甚至蟲體產生變形；在水溫 20.5°C 時，1 g 水蚤所消耗的水中溶氧量約為每小時 0.7 mL，養殖密度過高時，會有氧氣不足而窒息死亡的現象，但由於在流動性太高的水中，水蚤難以存活，因此架設打氣設備時必須避免水流過劇的情形發生。在含有些許有機質稍混濁、溫度在 20~25°C、鹽分濃度 0~0.1%、溶氧多的情形下，是水蚤繁殖的最佳環境。由於水蚤生長週期短、操作容易、繁衍快速、適應不良環境能力高、生理機制也已充分了解，因此被作為許多毒性研究的重要材料。



圖二、本研究所使用之水蚤以顯微鏡拍攝之相片  
Fig 2 Microscope photography of *D. pulex*

## (2) 端足蟲 (*Hyalella azteca*)

端足蟲是一底棲生物，底泥作為污染物如農藥、重金屬、有機物的沉積庫，對於仰賴底泥生存的物種而言，底泥汙染所造成的毒害勢必十分直接，且透過食物鏈，底棲生物也會受到更高級的消費者取食，而使得底泥汙染物進入生態圈之中，透過生物累積作用 (Bioaccumulation) 存在於大型魚類、哺乳類，最後對於人類造成影響。因此底泥毒性試驗的重要性日益受到矚目，一般毒性試驗所選擇的生物可能是微生物、藻類、魚類、無脊椎動物或是浮游生物，考量到個體大小、生命週期以及試驗終點判定 (如藻類抑制效應並不明顯) 等因素，底棲無脊椎動物是一較為理想的試驗材料，因其與底泥接觸頻繁、物種種類多、生質量大，是水體環境中連結初各級消費者的重要存在，其中，端足蟲 (Amphipod) 是作為底泥毒性試驗的指標生物之一，在底泥試驗中可用來判斷立即性的毒性，也可以進行生殖毒性等試驗。

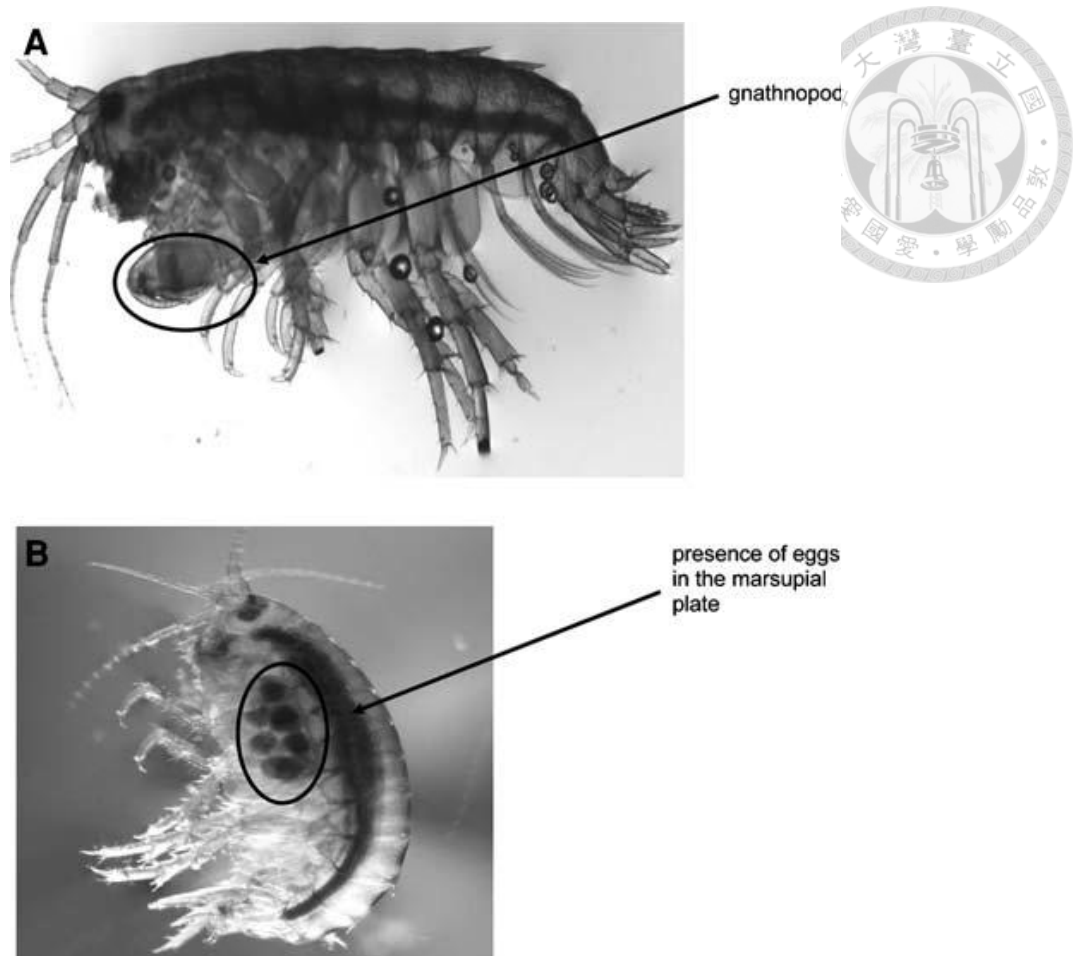
本研究所選用之端足蟲品種在分類上屬於動物界 (Animalia)、節肢動物門 (Arthropoda)、甲殼綱 (Crustacea)、軟甲亞綱 (Malacostraca)、端足目 (Amphipoda)、Dogielinotidae 科和 *Hyalella* 屬，在北美是一廣泛存在的物種，蟲為美國地質調查所 (U.S. Geological Survey, USGS) 及美國環境保護署 (Environmental Protection Agency, EPA) 的底泥標準試驗底棲生物。體型小 (約 1-0.5 cm)，對於水溫的容忍度大 (10-35°C)，水質 pH 在 7.5-8.2。雄性普遍大於雌性，行有性生殖，在生長 1 到 7 天後，雌性端足蟲會蛻殼，當雌性端足蟲蛻去外骨骼時，雄性會以顎足 (Gnathopod) 抓附在雌性端足蟲的背上，將精子產於靠近雌性育兒袋 (Marsupium, 如圖四所示) 的位置，雌性端足蟲以腹足將精子掃入育兒袋中，再將卵子從輸卵管進入育兒袋，完成受精，雌性端足蟲攜帶受精卵直到幼體孵化，卵的孵化率約 50% 至 75%，端足蟲沒有幼體階段，直接孵化幼生。經過六次脫殼後，端足蟲就會達到性成熟 (Strong, 1972)。在淡水環境如湖泊、河流中生存，在溫暖 (20-30°C，似夏季) 下生長旺盛，主要攝食為絲狀藻類

或矽藻、有機碎屑、細菌，這使得其很適宜作為底泥試驗之試驗材料。在美國環保署的放流水檢測方法中，是用以進行 10 天的底泥暴露試驗，與其他歐洲常使用的體型較大的端足蟲相較，對於毒物反應有較高的敏感度。





圖三、本研究所使用端足蟲之相片  
Fig 3 Photography of *H. azteca*



圖四、參考文獻中已達性成熟之端足蟲其第二性徵 (a) 為雄性端足蟲成蟲，其第二對腹足成扁平狀 (b) 為雌性端足蟲成蟲，具有育兒袋 (Ralston-Hooper et al., 2009)

Fig 4 The sexual discrimination of amphipod (a) Male amphipod (b) Female amphipod

### (3) 小球藻 (*Chlorella vulgaris*)

本研究所選用之小球藻分類為植物界 (Plantae)、綠藻門 (Chlorophyta)、綠球藻綱 (Chlorophyceae)、綠球藻目 (Chlorococcales)、綠球藻科 (Chlorellaceae)、綠球藻屬 (*Chlorella*) 中的綠球藻 (*Chlorella vulgaris*)，又稱小球藻。小球藻是單細胞藻類、為真核生物、形狀為圓形、直徑約 3-8  $\mu\text{m}$ ，須以顯微鏡觀察。是五億四千年前便已存在於環境之中的生物，為水生環境中生質量大的浮游植物，光合作用強，並含有豐富蛋白質、礦物質、葉綠素，除了具有營養價值、可作為保健食品、增強人體免疫外，也具有生物吸附重金屬之能力，可作為水中淨化之用，透過研究，小球藻會經由生物吸附作用吸附  $\text{Pb}^{2+}$  離子 (LI et al., 2007)。同時小球藻是急毒性試驗的試驗生物，也是作為水蚤的飼料之一。

在前人研究中，曾進行 40 種除草劑對於小球藻之毒性暴露試驗，其中以抑制 acetyl-CoA carboxylase (ACCase)、抑制脂質形成 (Lipid Synthesis Inhibitor)、Protox inhibitors 的除草劑對於小球藻的急毒性最高 (Ma et al., 2002a)。在殺菌劑對於綠藻類的毒性影響上，免賴得對於另一種綠藻 *Chlorella pyrenoidosa* 的毒性是殺菌劑中最高，相較而言，甲基多保淨的毒性較低 (Ma et al., 2002b)。



### 三、 研究目的



農藥混合施用之優點為同時防治病蟲害、提高用藥效率，以及混用不同作用機制之藥劑可提高藥效、避免抗藥性，然而，混合施用會造成不同的毒性效應，對於環境中的生物產生不同的毒性影響。本研究選擇台灣地區用量大、同時施用於水田的農藥試驗，所選用的是殺菌劑甲基多保淨、貝芬替，以及殺蟲劑益達胺，用以探討殺菌劑與殺蟲劑混合施用對於水中非目標生物之毒性影響。

本研究會進行三種非目標生物（水蚤、端足蟲及綠藻）對於殺菌劑與殺蟲劑單一的毒性試驗，以及殺菌劑與殺蟲劑混合暴露的毒性試驗，探討不同物種對於農藥的敏感度、作為適合的生物指標，並討論混合暴露所造成的毒性效應影響。

## 四、 材料與方法



### (一) 水中安定性試驗

#### 1. 材料與儀器

##### (1) 試劑

- a. 氰甲烷 (Acetonitrile) : Merck, 純度 99.5%, HPLC 級溶劑。
- b. 甲醇 (Methanol) : Merck, 純度 99.9%, LC 級溶劑。
- c. 甲基多保淨 (Thiophanate methyl) 標準品 : 購自 CHEMSERVICE, Germany, 純度 99.5%。
- d. 貝芬替 (Carbendazim) 標準品 : 購自 SIGMA-ALDRICH, Germany, 純度 99.2%。
- e. 益達胺 (Imidacloprid) 標準品 : 購自 RDH, 純度 99.9%。

##### (2) 儀器設備

- a. 高效能液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) : HITACHI Primaide 1410 pump and 1110 UV detector
- b. 層析管柱 : C-18 column (KANTO CHEMICAL Co., INC. Mightysil RP-18 GP 250-4.6, 5  $\mu$ m)。
- c. 電腦數據分析軟體
- d. 10 mL 定量瓶 : 日本 SIBATA 公司。
- e. 50 mL、250 mL 玻璃燒杯
- f. 10 mL 棕色瓶



## 2. 儲備標準溶液與檢量線配置

### (1) 甲基多保淨

稱取 5 mg 之甲基多保淨農藥標準品，裝入 10 mL 之定量瓶中，以甲醇定量至 10 mL，儲存於棕色樣品瓶，此為  $500 \text{ mgL}^{-1}$  之甲基多保淨儲備標準溶液。利用標準溶液配置 2, 10, 50, 100, 200  $\text{mgL}^{-1}$  之甲基多保淨高濃度檢量線溶液，以及 1, 2, 5, 10, 20  $\text{mgL}^{-1}$  之甲基多保淨低濃度檢量線溶液。HPLC-DAD 偵測條件及檢量線如表六與表七所示。

### (2) 貝芬替

稱取 5 mg 之貝芬替農藥標準品，裝入 10 mL 之定量瓶中，以甲醇定量至 10 mL，儲存於棕色樣品瓶，此為  $500 \text{ mgL}^{-1}$  之貝芬替儲備標準溶液。利用標準溶液配置 2, 5, 20, 50, 100  $\text{mgL}^{-1}$  之貝芬替高濃度檢量線溶液，以及 1, 2, 2.5, 5, 10, 20  $\text{mgL}^{-1}$  之貝芬替低濃度檢量線溶液。

HPLC-DAD 偵測條件及檢量線如表六與表七所示。

### (3) 益達胺

稱取 10 mg 之益達胺農藥標準品，裝入 10 mL 之定量瓶中，以甲醇定量至 10 mL，儲存於棕色樣品瓶，此為  $1000 \text{ mgL}^{-1}$  之益達胺儲備標準溶液。利用標準溶液配置 25, 50, 75, 100 之貝芬替檢量線溶液。

HPLC-DAD 偵測條件及檢量線如表六與表七所示。

## 3. 水中安定性檢測

使用與毒性試驗同樣的試驗情況，恆溫、光照下，於試驗開始前 (0 h) 與試驗終點 (24, 48 及 72 h) 以 HPLC-DAD 偵測水中農藥濃度，試驗條件同表六。因於端足蟲試驗中有進行換水，為半靜水式的暴露方式。

表六、以 HPLC 分析本試驗用藥之條件

Table 6 Pesticide detected condition by HPLC

農藥	偵測波長 (nm)	水 %	氯甲烷 %	流速 mL min <sup>-1</sup>	注入體積 μL
甲基多保淨	270	50	50	1.00	10
貝芬替	270	50	50	1.00	10
益達胺	270	80	20	1.00	10

表七、本試驗用藥以分析條件測得之檢量線

Table 7 The calibration and determination coefficient in HPLC condition

農藥	檢量線公式	R <sup>2</sup>
甲基多保淨	高濃度 $y = 43231x + 42105$	0.9954
	低濃度 $y = 149447x - 203528$	0.9772
貝芬替	高濃度 $y = 46545x - 12298$	0.9998
	低濃度 $y = 47101x + 19425$	0.9989
益達胺	高濃度 $y = 119471x + 42613$	0.9997
	低濃度 $y = 143961x - 5389$	0.9990

#### 4. 安定性試驗

透過 HPLC-DAD 分析，得到在試驗期間低、中、高濃度在水樣中農藥的濃度，試驗期間於水樣中之農藥濃度沒有大幅度地降低，因此認為所選用之農藥濃度在水中安定，無降解之疑慮。



表八、水中安定性試驗之偵測濃度

Table 8 Detected concentration of pesticides in water stability test

Pesticide	Nominal concentration (mg L <sup>-1</sup> )	Test period		
		0 h	24 h	48 h
Thiophanate-methyl	0.5	0.496±0.01	0.537±0.24	0.554±0.08
	5	6.559±0.24	8.500±1.23	10.26±1.83
	100	107.99±4.41	162.42±4.51	161.90±23.23
Carbendazim	0.2	0.285±0.0009	0.295±0.0016	0.2998±0.0131
	2.5	2.569±0.421	4.265±0.781	6.461±0.789
	15	18.241±1.083	12.310±0.521	11.842±1.685
Imidacloprid	8	6.796±0.035	8.463±0.268	9.868±1.237
	100	89.941±1.08	113.510±1.975	146.197±3.187



## (二) 急毒性試驗

### 1. 水蚤 (*D. pulex*) 48 小時急毒性試驗

(參考環保署水樣急毒性檢測方法—水蚤靜水式 NIEA B901.12B, 2005)

#### (1) 設備

溫度計 (0~50°C)、溶氧測定儀、pH 計、光學顯微鏡、比導電度計、通氣設備、廣口滴管、硼矽玻璃燒杯 (4L、500 mL 及 100 mL)、天秤 (可精秤至 0.1 mg)、4L 塑膠桶、Spearman LC<sub>50</sub> 和 EC<sub>50</sub> 估算程式。

#### (2) 試劑

稀釋水—每一公升之去離子水含下列成份 (試藥級)：

---

碳酸氫鈉	96.0 mg
硫酸鈣 (CaSO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O)	60.0 mg
硫酸鎂	60.0 mg
氯化鉀	4.0 mg

---

#### (3) 水蚤馴養

- 將試驗用水蚤放入內盛 3 L 稀釋水之 4 L 硼矽玻璃燒杯中馴養，每一燒杯內水蚤數不得超過 300 隻，以避免繁殖太快、造成擁擠死亡。
- 為避免意外造成全部水蚤死亡，馴養燒杯需 5 個。
- 馴養之水溫必須與毒性試驗溫度一致，即 25±1°C，光照時間應維持每天 16 小時。光照強度為 10~20 μmol of photons/m<sup>2</sup>/S (100-200 lux)。
- 馴養時間至少七天，水蚤死亡率不得超過 5%。
- 馴養杯內溶氧須以通氣設備通氣以維持溶氧在 5 mg L<sup>-1</sup> 以上。
- 馴養時每天清除燒杯底部沉積之食物、殘渣與水蚤排泄物，同時每兩天更

換 50% 稀釋水。

- g. 水蚤的食物為小球藻 (*Chlorella* sp.) 其餵食濃度應為每毫升十萬個細胞以上。而當小球藻生長密度太低時則輔以酵母粉溶解在水中後餵食。



#### (4) 二十四時齡水蚤之挑選


測試前 24 小時在馴養燒杯內以廣口滴管挑選成熟水蚤放入 500 mL 之燒杯，內盛 400 mL 之稀釋水，光照時間及餵食條件與馴養時期相同，培養一天即可獲得毒性試驗所需之 24 小時時齡內之水蚤。

#### (5) 篩選試驗 (Screening test)

- a. 將 6 個 100 mL 之燒杯分成兩組；一組為對照組，內盛 50 mL 之稀釋水，另一組為實驗組，內盛 50 mL 100% 原水樣或以對數方式稀釋之環境用藥濃度。
- b. 用廣口滴管將前述已培養之 24 小時時齡內之水蚤移入燒杯內，每個燒杯內各放 5 隻水蚤。
- c. 觀察 24 小時內水蚤死亡情形並記錄。
- d. 若 24 小時內對照組死亡率小或等於 10%，實驗組死亡率大於 10%，則水樣有急毒性，須做進一步確定試驗。
- e. 水溫應控制在  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ；測試期間水蚤不須餵食，光照應維持每天 16 小時。
- f. 若對照組與實驗組死亡率均小或等於 10%，則水樣無急毒性，不須做確定試驗。

#### (6) 確定試驗 (Definitive test)

- a. 確定試驗亦分為對照與實驗兩組，實驗組係將原水樣或環境用藥以稀釋水稀釋為 5 個濃度。對照組則為 100 % 稀釋水。

- 
- b. 為易於觀察水蚤活動，每個濃度使用 3 個 100 mL 燒杯做測試容器，每個燒杯內放置 5 隻水蚤，水樣體積為 50 mL。對照組與實驗組之 5 個濃度均以總數 15 隻、24 小時時齡之水蚤作為測試生物。
  - c. 先將各濃度水樣及對照組之水樣配置好後，再以廣口滴管將所培養之 24 小時時齡之水蚤置入測試容器內。
  - d. 測試期間為 48 小時，水溫應控制在  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，測試期間，水蚤不須餵食，光照仍應維持每天 16 小時。
  - e. 水蚤放入後，每天觀察並記錄水蚤死亡數目，同時每日監測及記錄水溫、溶氧、pH、導電度等水質資料。

#### (7) 結果處理

水蚤死亡之判斷：水蚤運動主要倚靠第二觸角、胸腳及後腹部等。當這些器官或部位有明顯不活動，並經過輕敲燒杯亦無反應，即可認定為死亡。

#### (8) 品質管制

- a. 水蚤之品種必須在光學顯微鏡下經過鑑定或由已確定為本種之飼養單位獲得，不可混合不同品種之水蚤。
- b. 做水樣毒性試驗前，應先以參考毒物做確定試驗，以檢測水蚤之靈敏度，每一參考物至少須連續做 10 次確定試驗，以求取其平均  $\text{LC}_{50}$  值。
- c. 如果對照組死亡率超過 10%，則試驗結果不可採用，必須重做。
- d. 確定試驗水蚤之時齡不得超過 24 小時。

#### (9) $\text{LC}_{50}$ 計算

所添加之藥劑先以指數濃度進行急毒性試驗，接著再由致死率變動較大的區間進行進一步濃度試驗，最後以 SPEARMAN 程式，運用 Trimmed



Spearman-Kärber Method 估計  $LC_{50}$  數值。



#### (10) 標準毒物試驗結果

使用參考毒物  $CdCl_2$  做預實驗，測試所選用之水蚤的敏感度，所得之  $EC_{50}$  值為  $0.10 \pm 0.305 \text{ mg L}^{-1}$ ，與檢驗方法中之參考質相近 ( $LC_{50} = 0.105 \text{ mg L}^{-1}$ )，因此確認所使用之水蚤準確性無疑。

### 2. 端足蟲 (*H. azteca*) 72 小時急毒性試驗

#### (1) 設備

玻璃燒杯 (250 mL、1 L)、PEODAC CRYSTALCIL SINTERED GLASS CYLINDER MEDIA 高溫燒結玻璃圓柱型濾材玻璃生物環 (簡稱石英磚)、塑膠滴管、玻璃盤、不鏽鋼篩網 (0.5 m/m、1 m/m、2.0 m/m)、烘箱 ( $40^\circ\text{C}$ )、天秤。

#### (2) 試劑

TAYAGI Ocean Life NO.1 Sun-Flower 水晶蝦增艷專用飼料

#### (3) 端足蟲馴養

- a. 所使用之端足蟲取自環檢所，於恆溫、光照下，加入曝氣後的水與洗淨烘乾之石英磚，石英磚用以模擬底棲環境、使端足蟲躲避。
- b. 於春夏時，端足蟲繁衍速率較快，適宜實驗。每一缸密度不宜超過 200 隻，使端足蟲生長狀況良好。

- c. 使用水晶蝦增艷專用飼料餵食，每缸一次餵食三粒飼料，不宜過多，以避免水質受影響。



#### (4) 端足蟲之挑選

- a. 於暴露試驗中所使用之端足蟲，體長須一致。挑選數量較多之缸，取出石英磚，於 10 L 玻璃燒杯中置入三層不鏽鋼篩網，由上至下分別為 2 m/m、1 m/g、0.5 m/m，將端足蟲放入燒杯中，使其按照篩網孔徑分群，分群過程中燒杯須打氣，不宜放置超過兩天。
- b. 暴露試驗中所使用的端足蟲體長為 0.5 至 1 公分，且未進行交配行為之端足蟲。

#### (5) 急毒性暴露試驗

- a. 設置控制組（純水）與溶劑控制組，並選擇五個試驗水樣濃度，各三重複。每一試驗中水樣體積均為 200 mL，會先以 600 mL 進行混樣，使添加之溶劑量與毒物量均勻分布，再分別以 200 mL 裝入 250 mL 之燒杯中。
- b. 每一燒杯中加入等重的石英磚。
- c. 以塑膠滴管選擇體長一致的端足蟲 10 隻置入燒杯中。
- d. 每日換水樣 10%，以 10 mL 微量滴管吸出水樣，再加入新的水樣於燒杯中。
- e. 試驗結束（72 小時）後，計算每一燒杯中存活數與死亡數，存活依據腳是否泳動，同時死亡的端足蟲會呈現白色、紅色的透明狀。
- f. 為避免溶劑影響，暴露水樣會於添加藥劑後靜置一晚使溶劑揮發。

#### (6) LC<sub>50</sub> 計算

所添加之藥劑先以指數濃度進行急毒性試驗，接著再由致死率變動較大的區

間進行進一步濃度試驗，最後以 SPEARMAN 程式，運用 Trimmed Spearman-Kärber Method 估計  $LC_{50}$  數值。



### 3. 小球藻 (*C. vulgaris* Beij.) 24 小時急毒性試驗

(參考環保署水樣急毒性檢測方法—藻類靜水式 NIEA B906.10B, 2004  
與環保署水中葉綠素 a 檢測方法—乙醇萃取法 NIEA E508.00B, 2002)

#### (1) 設備

溫度計 ( $0\sim 50^{\circ}\text{C}$ )、pH 計、迴旋搖盪培養器、恆溫培養室 ( $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ )、分光光度計 (使用 Infinite® 200 PRO + i-control 1.8.20.0)、天秤 (可精秤至 0.1 mg)、照明設備 (可達  $100\sim 200\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )、三角錐瓶 (125 mL 與 250 mL)、玻璃燒杯 (1 L)、無菌過濾裝置、光學顯微鏡、水浴槽 (可維持在  $60\pm 1^{\circ}\text{C}$ )、離心機 (轉速可達 3000 g 以上)、離心管 (10 mL)、微量吸管、冰箱 ( $4^{\circ}\text{C}$ )

#### (2) 試劑

葉綠素 a 標準品、稀釋水 (二次去離子水)、10% 硝酸溶液、丙酮、參考毒物氯化鎘 ( $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )、90% (v/v) 乙醇 (分析級)、1 M HCl (量取 82.9 mL HCl (37%, 比重 1.19), 添加於 1 L 去離子水中)。繼代培養使用花寶二號 (添加濃度  $0.1\ \text{mg}\ \text{L}^{-1}$ )。用於藻類培養急毒性測試之基礎培養液，使用 Bold's basal medium (10X) (HIMEDIA)，其組成如表九所示。



### (3) 小球藻馴養

- a. 採用自本地分離之綠藻類單細胞小球藻 (*C. vulgaris* Beij.)，品系編號 #3001。
- b. 將藻細胞培養於 1 L 玻璃燒杯之中，加入 0.8 g 花寶二號，以去離子水稀釋，使其濃度為  $0.1 \text{ mgL}^{-1}$ ，於光照下、打氣，做為保種之用。
- c. 將藻細胞移植於基礎培養液中，然後在與毒性測試相同之條件下培養三天以上，進行馴養活化，至其生長速率能維持在  $0.03 \text{ h}^{-1}$  以上，才能進行毒性試驗。馴化時間之光照採光暗比 14:10 小時。

### (4) 藻細胞生長速率 ( $\mu'$ ) 之計算

- a. 以藻液之葉綠素 a 濃度在 24 小時內增加之數量作為生長速率之計算依據，其計算公式如下： $\mu' = \ln(A_i/A_o) / 24$ 。A<sub>o</sub>：初始之藻液葉綠素 a 濃度，單位為 ppb ( $\mu\text{gL}^{-1}$ )；A<sub>i</sub>：測試終時之藻液葉綠素 a 濃度。
- b. 葉綠素 a 檢測使用水中葉綠素 a 檢測方法——乙醇萃取法。藻液以微量吸管全數吸出置於離心管內，並以 3000-5000 g 離心機離心 10 分鐘，將上清液吸出，取 10 mL 乙醇加入有藻體沉澱的離心管內，置於 60°C 水浴槽中，終止葉綠素行光合作用，在黑暗下萃取 30 分鐘，萃取期間須每 10 分鐘搖混一次，使萃取完全。
- c. 小心取出離心管，避免震動，準備冰水將離心管降溫，再離心 10 分鐘使雜質沉降。用微量吸管將 200  $\mu\text{L}$  上清液吸入 96 孔盤中，用微盤偵測分光光度計測其在波長 750 nm 與 665 nm 之吸光值，分別為 E<sub>665a</sub> 和 E<sub>750a</sub>。
- d. 添加 2  $\mu\text{L}$  1 M HCl 溶液於 96 孔盤中，搖混後靜置 30 分鐘，重新測量其在 750 nm 與 665 nm 之吸光值，此分別為 E<sub>665b</sub> 和 E<sub>750b</sub>。
- e. 濁度校正：樣品在 665 nm 之吸光值扣除在 750 nm 之吸光值即為校正後的吸光值。


校正後的吸光值  $C_{665a}=E_{665a}-E_{750a}$

校正後的吸光值  $C_{665b}=E_{665b}-E_{750b}$

- f. 水樣之葉綠素 a 濃度：經濁度校正後，用下列公式計算水樣之葉綠素 a 濃度 ( $C_a, \mu\text{gL}^{-1}$ )。  $C_a=29.62 (C_{665a}-C_{665b}) \times V_e/V_s$ 。(  $V_e$ ：所用之乙醇體積；  $V_s$ ：水樣體積)
- g. 每一樣本須至少測量三次，求其平均值，單位以 ppb 表示之。

#### (5) 毒性試驗

- a. 測試初始之藻液葉綠素 a 應維持在 0.15~0.30 ppb 之間（每毫升藻細胞數  $(1.2\sim 2.4) \times 10^4$ ）。測試培養時間為 24 小時。培養條件為：
1. 光照強度：100~200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 。
  2. 光照週期：在測試期間採用全光照。
  3. 培養溫度： $27\pm 1^\circ\text{C}$ 。
  4. 搖盪：70 $\pm$ 10 rpm/min 之迴旋搖盪器上培養。
- b. 以 0.2  $\mu\text{m}$  孔徑之濾膜，將水樣中之微生物和顆粒物質去除，並以稀釋水稀釋成適當濃度，再進行毒性試驗。對照組為 100% 稀釋水。
- c. 對照組和各稀釋濃度之待測水樣分別各取 8 mL，置於三角錐瓶中，分別添加 1 mL 10 倍濃度之基礎培養液，混合均勻。
- d. 於前項之待測液各添加 1 mL 之藻原液（藻原液為含  $10\pm 2.5$  ppb 葉綠素 a 之種藻培養液），混勻後，分別測定植藻後之各培養液之初始葉綠素 a 含量，然後進行 24 小時之培養測試。
- e. 先進行濃度範圍試驗，找出可能造成藻細胞生長抑制之大致濃度範圍，然後再進行確定試驗。
1. 濃度範圍試驗：每次測試濃度以五種稀釋濃度為原則，藉以找出可能導致藻細胞生長有明顯抑制之粗略濃度範圍。

- 
2. 確定試驗：在前項有明顯抑制之粗略濃度範圍內，以較密集之稀釋濃度範圍，測試出稀釋濃度與藻細胞生長反應間之關係，以求出造成藻細胞生長速率受抑制之確實濃度。每個濃度稀釋比例不得低於較高濃度之 50% 為原則。

#### (6) EC<sub>50</sub> 之計算

- a. 根據測試之稀釋水樣濃度與藻細胞生長速率關係，求出藻細胞在 24 小時培養後其生長速率受 50% 抑制之濃度 (Median inhibition effect concentration, EC<sub>50</sub>) 及最高無抑制濃度 (No observed effect concentration, NOEC)。EC<sub>50</sub> 之求法以圖解法 (Graphic method) 為之，NOEC 則以統計或圖解內插法求之，以生長速率達對照組之 95% 為基準。一般水樣之 EC<sub>50</sub> 和 NOEC 以百分率 (%) 稀釋濃度表示之。
- b. 每組測試之稀釋水樣應各有三個重複試驗組，確定試驗須至少重複三次，以平均值表示之。
- c. 藻細胞進行測試前，會先以參考毒物氯化鎘做確定試驗，以確定藻種之敏感度。

#### (7) 標準毒物試驗結果

使用參考毒物 CdCl<sub>2</sub> 做預實驗，測試小球藻的敏感度，所得之 EC<sub>50</sub> 值為 0.089 mg L<sup>-1</sup>，與檢驗方法中之參考質相近 (EC<sub>50</sub> = 0.090 mg L<sup>-1</sup>)，因此確認所使用之藻種準確性無疑。

表九、Bold's basal medium 之組成成分

Table 8 The ingredients of Bold's basal medium

Ingredients	mg/100 mL
Sodium nitrate	0.00025
Calcium chloride • 2H <sub>2</sub> O	0.000025
Magnesium sulphate	0.000075
Potassium phosphate dibasic	0.000075
Potassium phosphate monobasic	0.000175
Sodium chloride	0.000025
EDTA	0.000050
Potassium hydroxide	0.000031
Ferrous sulphate • 7H <sub>2</sub> O	0.000005
Sulphuric acid	0.000001
Boric acid	0.000011
Zinc sulphate • 7H <sub>2</sub> O	0.000009
Manganese chloride • 4H <sub>2</sub> O	0.0000014
Molybdenum trioxide	0.0000007
Copper sulphate • 5H <sub>2</sub> O	0.0000016
Cobalt nitrate • 6H <sub>2</sub> O	0.00000049
<b>TOTAL</b>	<b>1.02</b>



### (三) 混合毒性計算

本研究使用三種藥劑，進行殺菌劑與殺蟲劑的混合暴露，因此有殺菌劑貝芬替與殺蟲劑益達胺混合、殺菌劑甲基多保淨與殺蟲劑益達胺混合兩種組合。混合時的農藥濃度會以毒性單位來表示，毒性單位的表示方法有許多種，皆是用以表示該毒物可給予多少毒性效應之量值。

$$TU = \frac{d_i}{LC_{50}}$$

$d_i$ ：毒性物質的濃度

$LC_{50}$ ：半致死濃度

在評估毒性效應時，使用的是混合毒性單位 (Mixture Toxic Unit)：

$$\sum TU = \frac{d_1}{LC_{50_1}} + \frac{d_2}{LC_{50_2}}$$

$\Sigma TU$ ：總毒性相加單位

$d_1$ ：毒性物質 1 的濃度

$d_2$ ：毒性物質 2 的濃度

$LC_{50_1}$ ：毒性物質 1 的半致死濃度

$LC_{50_2}$ ：毒性物質 2 的半致死濃度

當 $\Sigma TU > 1$ 則表示兩種毒物是拮抗作用，表毒性減弱， $\Sigma TU = 1$ 則是毒性相加作用， $\Sigma TU < 1$ 則是協同作用，表毒性增強。透過毒性相加單位來判斷混合之後的毒性效應。



#### (四) 統計分析

半致死濃度  $LC_{50}$  以 SPEARMAN 程式，運用 Trimmed Spearman-Kärber Method 估計。濃度與致死率之間的比較使用 t-test 進行分析，具顯著性差異者會以\*與\*\*號表示 (\*： $p < 0.1$ ；\*\*： $p < 0.05$ )。在等毒性混合時，使用 R software 套用 dose-response curve (drc) 套件，利用 three-logistic model 函數繪製對數圖形 (Ritz and Streibig, 2005)。

## 五、 結果與討論



### (一) 單獨暴露之急毒性試驗結果

#### 1. 水蚤

在水蚤的急毒性試驗結果中，在甲基多保淨的劑量與毒性關係中（圖六），呈現良好線性的劑量與毒性關係，隨濃度上升、致死率上升。在貝芬替中（圖七），在低濃度  $0.04 \text{ mg L}^{-1}$  下，即造成了近一半的致死率，在  $2 \text{ mg L}^{-1}$ ，水蚤全數死亡。在益達胺中（圖八），可以發現要近  $80 \text{ mg L}^{-1}$ ，才有一半的水蚤死亡。經計算後，甲基多保淨的  $\text{LC}_{50}$  為  $17.47 \text{ mg L}^{-1}$ ，貝芬替的  $\text{LC}_{50}$  為  $0.10 \text{ mg L}^{-1}$ ，益達胺的  $\text{LC}_{50}$  為  $62.17 \text{ mg L}^{-1}$ 。可得知對於水蚤而言，殺菌劑貝芬替的毒性最高、甲基多保淨次之，殺蟲劑益達胺毒性最低。

與他種水蚤的急毒性試驗結果相比（表十一），使用巨水蚤 (*D. magna*) 作為試驗生物所得的  $\text{LC}_{50}$ ，貝芬替為  $0.13\text{-}0.22 \text{ mg L}^{-1}$ 、甲基多保淨為  $20.2 \text{ mg L}^{-1}$ 、益達胺為  $85 \text{ mg L}^{-1}$ ，呈現相同的趨勢。在過去研究中，貝芬替對於水蚤 (*D. magna*) 的毒性較甲基多保淨高 100 倍以上 (Canton, 1976)，顯示了甲基多保淨若在環境中分解成貝芬替，對於水生生物的毒性衝擊會更大。本研究所選用的物種較巨水蚤的  $\text{LC}_{50}$  來得低，可能因為來自於水蚤本身體型的差異，*D. pulex* 的體型較小，對於毒物的耐受性較低。

而甲基多保淨會降解成貝芬替，因此甲基多保淨若進入到環境中，會產生對於水蚤更高的毒性危害。

## 2. 端足蟲

在以端足蟲作為試驗生物的急毒性試驗中，端足蟲顯示出較其他兩種試驗生物高的敏感度。在在甲基多保淨的劑量與毒性關係中（圖九），端足蟲較沒有良好的劑量與毒性關係。在貝芬替中（圖十），則是有良好的劑量與毒性關係。在暴露益達胺濃度大於  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  時，端足蟲全數死亡（圖十一），經計算後，益達胺的  $\text{LC}_{50}$  為  $0.053 \text{ mg L}^{-1}$ ，說明益達胺對於端足蟲具有較高的毒性。由結果可知，對於端足蟲而言，殺蟲劑益達胺毒性最高、殺菌劑貝芬替次之，殺菌劑甲基多保淨最低。

與他種端足蟲的益達胺暴露結果比較（表十二），益達胺的  $\text{LC}_{50}$  值都較其他兩種端足蟲來得低，*Gammarus fossarum* 暴露於益達胺的  $\text{EC}_{50}$  (24h)(effect=癱瘓) 為  $0.07 \text{ mg L}^{-1}$ 、 $\text{LC}_{50}$  (48h) 為  $0.8 \text{ mg L}^{-1}$  (Lukancic et al., 2010)，*Gammarus pulex* 的  $\text{LC}_{50}$  (72h) 為  $0.405 \text{ mg L}^{-1}$  (Ashauer et al., 2011)，此兩種端足蟲為歐洲時常使用的物種、體型較大，相較之下，顯示出本研究所選用的端足蟲在益達胺上較他種具有較高的敏感度。

在關於益達胺對端足蟲的毒性影響之中，其他品種的端足蟲暴露於益達胺時，其降解產物 6-氯菸鹼酸 (6-chloronicotinic acid, 6CNA) 會使端足蟲 *G. fossarum* 有快速泳動 (rapid swimming)、反應過度 (hyperactivity)、失去方向感 (disorientation) 的情況產生 (Malev et al., 2012)，此類情形在節肢動物糠蝦目 *Neomysis integer* 暴露於有機磷殺蟲劑中時所產生的迴避性反應 (avoidance response) 相似 (Roast et al., 2000)，這些活動上的反應的產生也被視為生物受到毒性影響的指標，作為毒性暴露試驗數據的輔助。而此類實驗結果被認為是因為新菸鹼類的化合物本身的作用機制會對於節肢動物的神經傳導受體造成抑制，而使神經不間斷地傳導，興奮而死。同時，發生在節肢動物上的失去方向感，也被認為與蜂群崩壞症候群有所關聯，因此端足蟲對於益達胺的毒性作用很值得再多做探討。

在殺菌劑貝芬替上，本研究所選用的物種則是具有較高的 $LC_{50}$ 值。在 *G. pulex* 上， $LC_{50}$  為  $0.403 \text{ nmol L}^{-1}$  ( $0.077 \text{ mg L}^{-1}$ ) (van Wijngaarden et al., 1998)，*G. fassarum* 的  $EC_{50}$  (7d) 為  $0.075 \text{ mg L}^{-1}$ 、 $LC_{50}$  (7d) 為  $0.051 \text{ mg L}^{-1}$  (Zubrod et al., 2014)。貝芬替在大於  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  的濃度下，被發現對於端足蟲具有致死性的毒性危害 (Cuppen et al., 2000)，說明了貝芬替對於底棲生物端足蟲依舊具有潛在的毒性危害可能。

### 3. 小球藻

在小球藻的毒性暴露試驗中，殺菌劑甲基多保淨在濃度為  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  時，促進了 50% 的生長速率，隨著濃度上升，生長速率逐漸受到抑制，在水中溶解度最大值  $50 \text{ mg L}^{-1}$  (有加入溶劑助溶) 時，生長速率有些微的上升，促進了 10% 的生長速率。顯現甲基多保淨對於小球藻而言，毒性並不大。

殺菌劑貝芬替在濃度  $10 \text{ mg L}^{-1}$  時，達到近 40% 的生長抑制，在水中溶解度最大值  $50 \text{ mg L}^{-1}$  (有加入溶劑助溶) 時，仍僅有 30% 的生長抑制效果，顯見對於小球藻而言，貝芬替的毒性抑制效果並不明顯。

在環境中的殺菌劑殘留量約以  $\mu\text{g L}^{-1}$  的環境濃度為基本，因此環境中小球藻受到此兩種殺菌劑毒害的可能性並不大。

在殺蟲劑益達胺的毒性暴露試驗中，在  $0.1, 1 \text{ mg L}^{-1}$  的濃度下，對於小球藻有生長促進的影響，而後隨著濃度上升，生長速率受到抑制，其  $EC_{50}$  值以圖解法計算，為  $77 \text{ mg L}^{-1}$ 。

綜合小球藻暴露於三種農藥之中的結果，所選用的殺菌劑與殺蟲劑對於小球藻的毒性效應並不明顯，到遠大於推薦施用量的濃度才会有明顯的生長抑制作用，可能因所選用的藥劑之作用機制並不是同除草劑的作用機制是直接抑制光合作用，因此對於環境中的浮游藻類並不會有藥害之情形發生，在環境中流佈時，

也對於此類非目標生物之毒性影響並不大。

而在低濃度下，三種藥劑皆對小球藻有生長促進的效果，推論是因為屬單胞藻的小球藻得以利用、或代謝此三種藥劑，在過去的研究中也不乏會使用農藥等化合物作為生長碳源的微生物，例如會利用除草劑丁基拉草的固氮菌 (Chen et al., 2009)，會將丁基拉草代謝，並產生分解後的產物。而也有研究指出，在不同的優勢藻類水生環境中，農藥的混合存在也會造成藻類的生長速率不同，對於水生生物毒性較高的合成除蟲菊精類殺蟲劑卻對部分藻類有生長促進的效果，進一步改變水體的生態環境 (Wendt-Rasch et al., 2004)。也因此，儘管在本研究中所選用的三種藥劑對於小球藻並不會有直接的毒性影響，但考量到在環境中的生態平衡，水質中的農藥殘留、管制仍是不可忽略的一環。

#### 4. 物種間比較

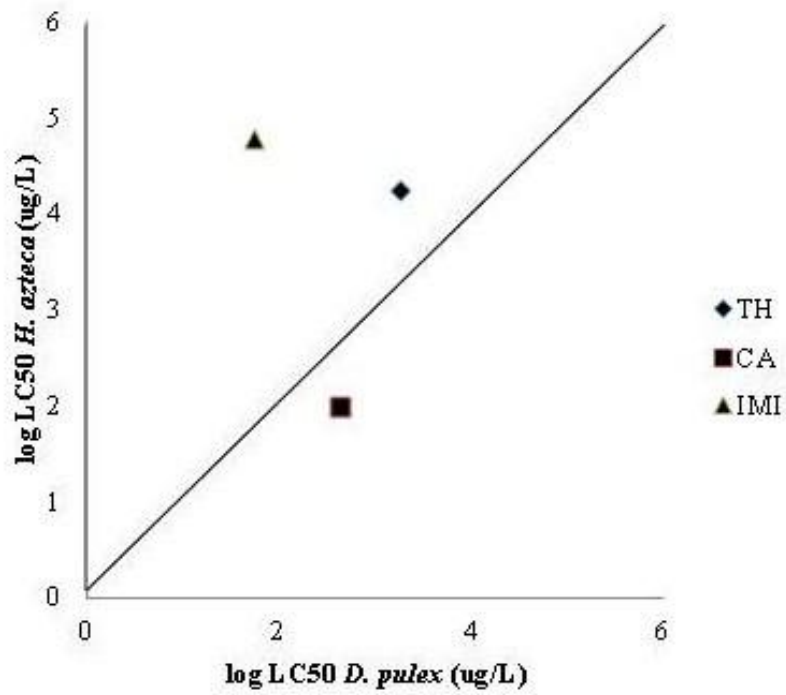
本研究所選用的三種水中非目標生物，分別代表了不同的水中生態圈。在殺菌劑甲基多保淨上，端足蟲較水蚤與小球藻來得敏感；在殺菌劑貝芬替上，水蚤與端足蟲都較綠藻來得敏感，其中水蚤又稍比端足蟲敏感；在殺蟲劑益達胺上，端足蟲則是較水蚤來得敏感， $LC_{50}$  低超過千倍。使用水蚤與端足蟲的  $\log LC_{50}$  值做相關性比較 (圖五)，端足蟲對益達胺與甲基多保淨較為敏感，水蚤對貝芬替較為敏感。這與前人文獻相符，透過 *D. magna* 與 *G. pulex* 對於不同作用機制的農藥的急毒性數值比較，在新菸鹼類的化物 (Neonicotinoids) 上，端足蟲是較水蚤敏感三到四倍，水蚤相較之下對於新菸鹼類化物的敏感性並不高 (Ashauer et al., 2011)。在殺菌劑貝芬替的部分，則是在本研究中發現，水蚤對於貝芬替較端足蟲來得敏感。

表十、不同物種之急毒性試驗半致死濃度

Table 9 Lethal concentration 50 of acute toxicity tests in different species

Pesticide (mg L <sup>-1</sup> )	Species		
	<i>D. pulex</i> LC <sub>50</sub> (48h)	<i>H. azteca</i> LC <sub>50</sub> (72h)	<i>C. vulgaris</i> EC <sub>50</sub> (24h)
Thiophanate-methyl	17.47 (13.14-23.22) <sup>a</sup>	1.72 (0.76-3.89) <sup>a</sup>	>50
Carbendazim	0.10 (0.07-0.16) <sup>a</sup>	0.41 (0.3-0.56) <sup>a</sup>	>50
Imidacloprid	62.17 (37.15-104.03) <sup>a</sup>	0.053 (0.0356-0.0773) <sup>a</sup>	77

a: 95% confidence interval (95% CI)



圖五、三種農藥在水蚤與端足蟲的半致死濃度相關性比較

Fig. 3 Correlation plot with 1:1 line. Plots indicate lethal concentration 50 of *D. pulex* and *H. azteca* exposed to three pesticides.

表十一、水蚤毒性實驗值與文獻值比較

Table 10 Laboratory data compared to literature data

Pesticide (mg L <sup>-1</sup> )	This research	Literature
	<i>D. pulex</i>	<i>D. magna</i>
Thiophanate-methyl	17.47	20.2 <sup>a</sup>
		25.1 <sup>b</sup>
Carbendazim	0.10	0.13-0.22 <sup>a</sup>
		0.23 <sup>b</sup>
Imidacloprid	62.17	85 <sup>a</sup>
		39.387 <sup>b</sup>

a: Pesticide manual

b: US EPA



表十二、端足蟲毒性實驗值與文獻值比較

Table 11 Laboratory data compared to literature data

Pesticide (mg L <sup>-1</sup> )	This research			Literature	
	<i>H. azteca</i>	<i>G. fossarum</i>	<i>G. pulex</i>		
Thiophanate-methyl	1.72				
Carbendazim	0.41	0.075 <sup>a</sup>	0.077		
		0.051 <sup>b</sup>			
Imidacloprid	0.053	0.07 <sup>c</sup>	0.405 <sup>e</sup>		
		0.8 <sup>d</sup>			

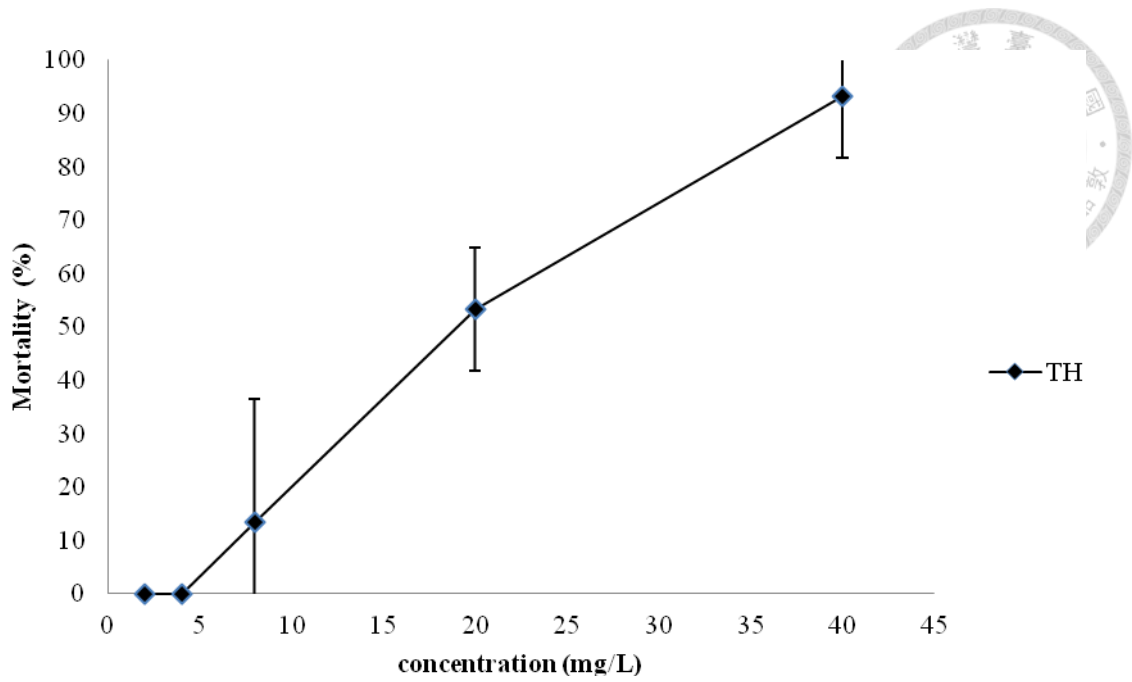
a: EC<sub>50</sub> (7d)

d: LC<sub>50</sub> (48h)

b: LC<sub>50</sub> (7d)

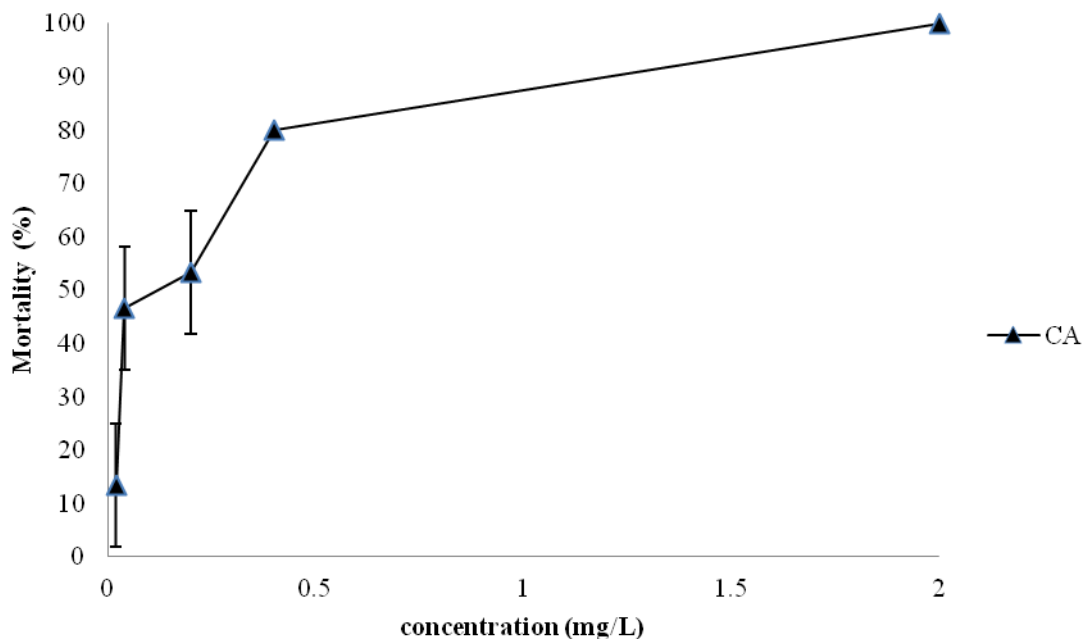
e: LC<sub>50</sub> (72h)

c: EC<sub>50</sub> (E=effect, paralyzed)



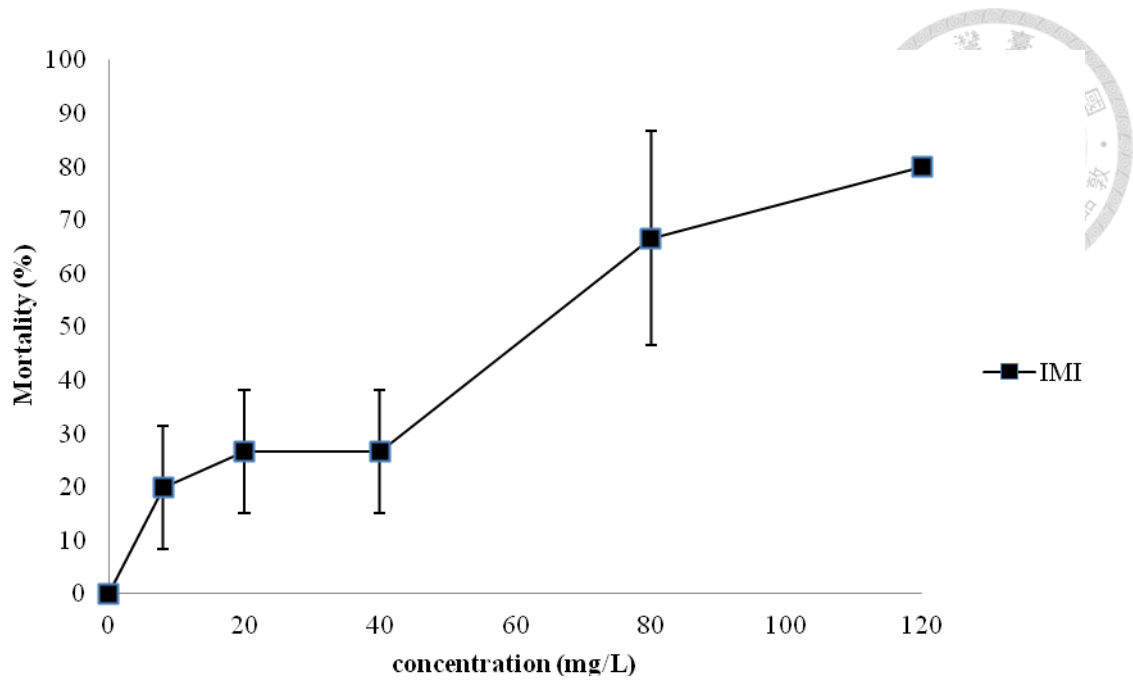
圖六、水蚤於甲基多保淨中之劑量與毒性效應

Fig. 4 Mortality after *D. pulex* exposed to thiophanate-methyl



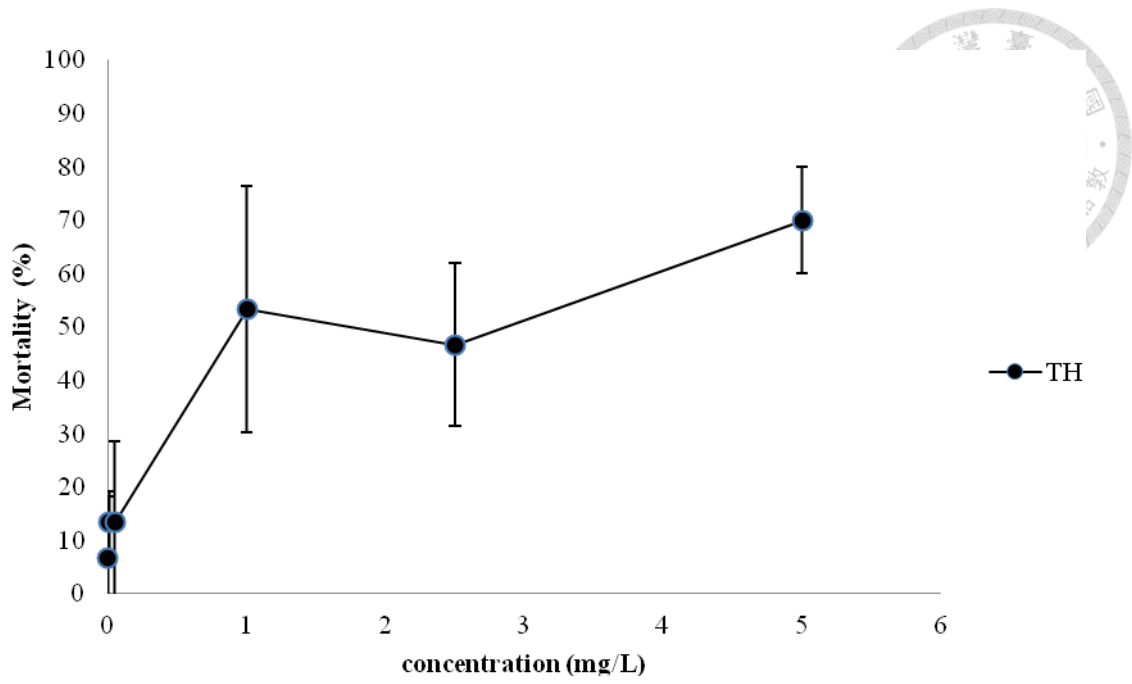
圖七、水蚤於貝芬替中之劑量與毒性效應

Fig. 5 Mortality after *D. pulex* exposed to carbendazim



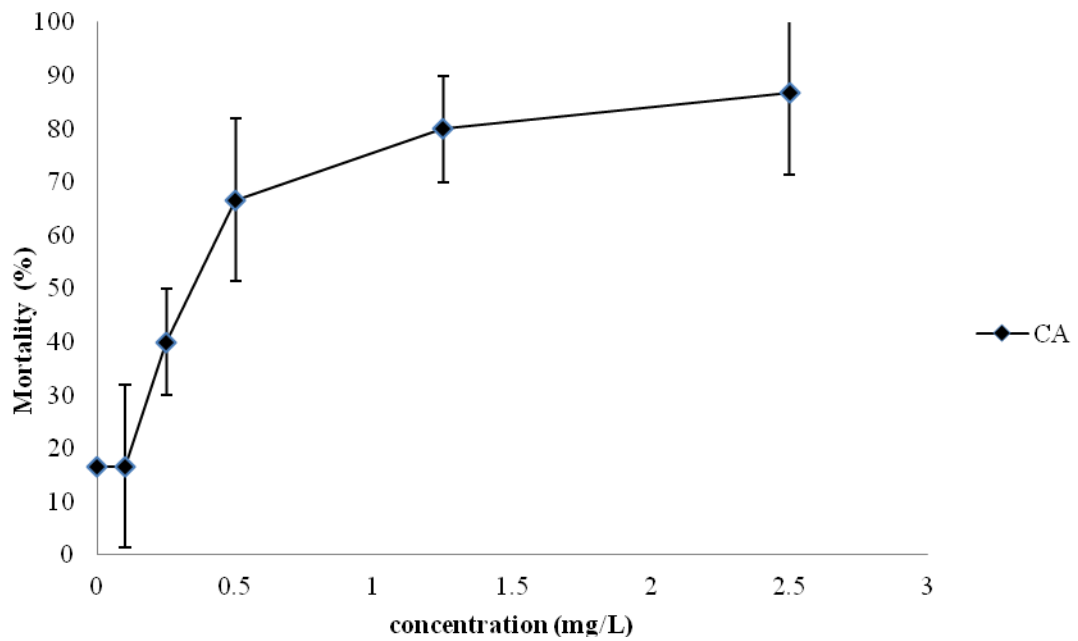
圖八、水蚤於益達胺中之劑量與毒性效應

Fig. 6 Mortality after *D. pulex* exposed to imidacloprid



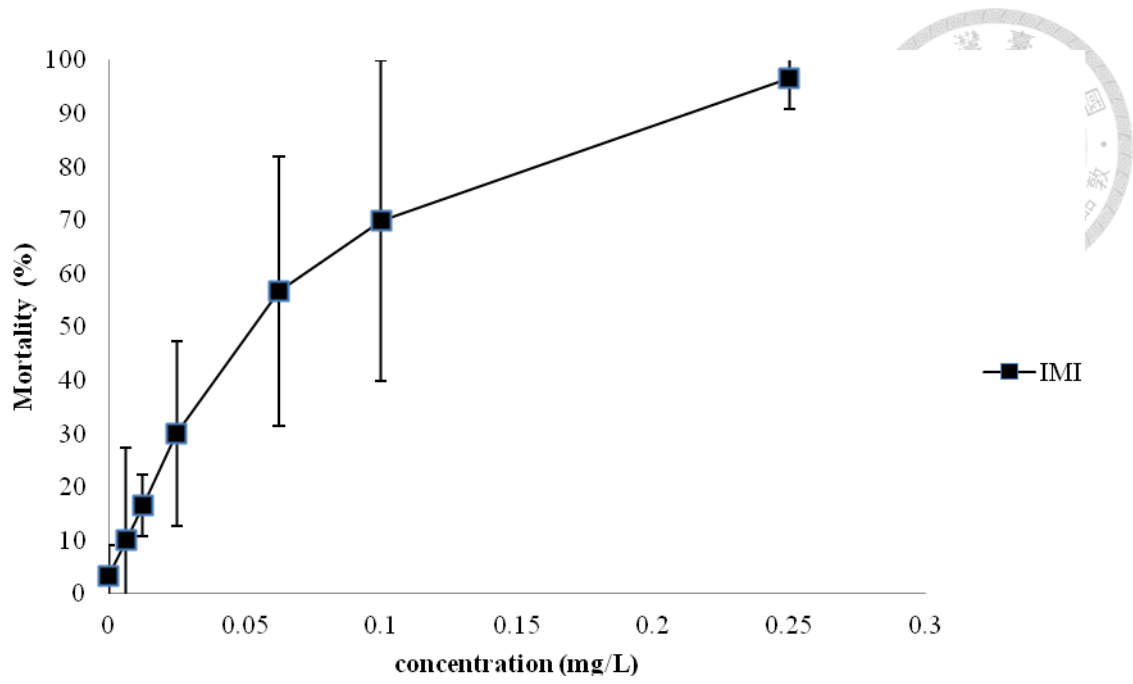
圖九、端足蟲於甲基多保淨中之劑量與毒性效應

Fig. 7 Mortality after *H. azteca* exposed to thiophanate-methyl



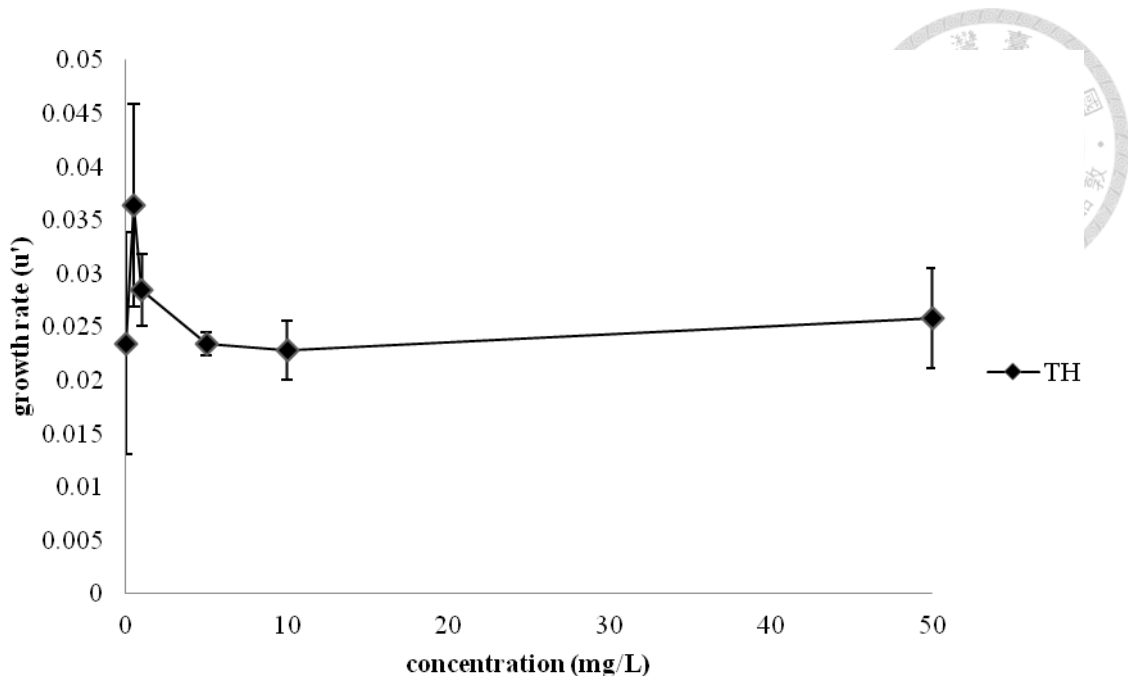
圖十、端足蟲於貝芬替中之劑量與毒性效應

Fig. 8 Mortality after *H. azteca* exposed to carbendazim



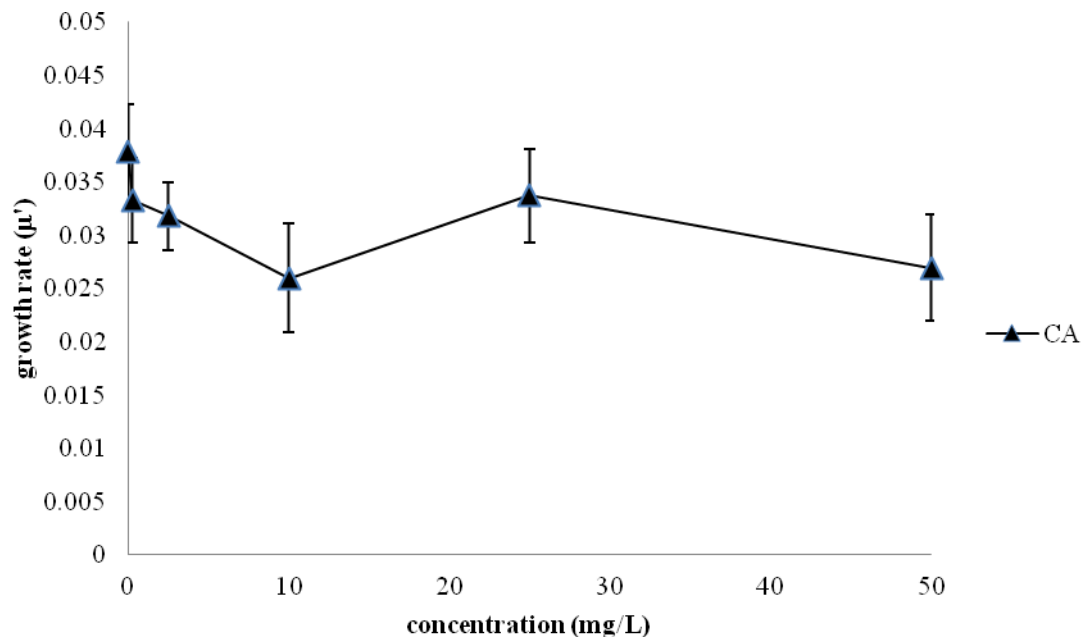
圖十一、端足蟲於益達胺中之劑量與毒性效應

Fig. 9 Mortality after *H. azteca* exposed to imidacloprid



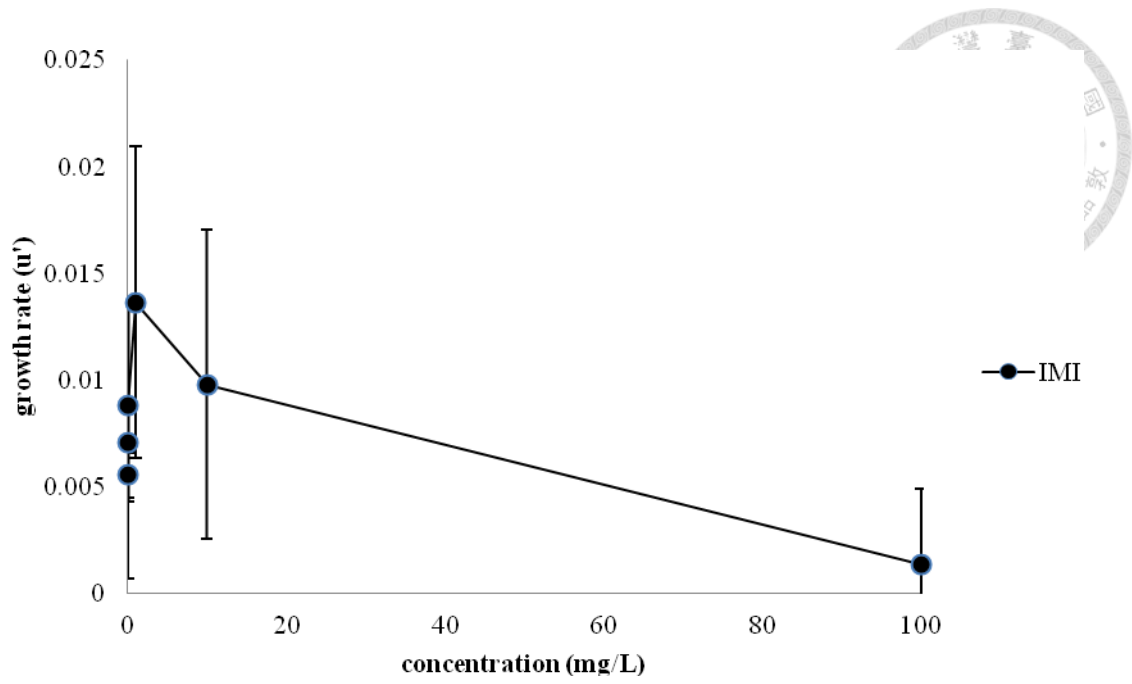
圖十二、小球藻受甲基多保淨抑制之生長速率圖形

Fig. 10 Growth inhibition after *C. vulgaris* exposed to thiophanate-methyl



圖十三、小球藻受貝芬替抑制之生長速率圖形

Fig. 11 Growth inhibition after *C. vulgaris* exposed to carbendazim



圖十四、小球藻受益達胺抑制之生長速率圖形

Fig. 12 Growth inhibition after *C. vulgaris* exposed to imidacloprid

## (二) 混合暴露之急毒性試驗結果

在混合暴露的毒性試驗中，水蚤會進行兩種殺菌劑分別加上低劑量（視為不造成毒性效應）的殺蟲劑益達胺混合暴露，以及等毒性混合殺菌劑與殺蟲劑的暴露試驗。在端足蟲的部分，會進行等毒性混合殺菌劑與殺蟲劑的暴露試驗。試驗後，透過等毒性暴露試驗的結果，使用毒性指標中的毒性相加單位，用以判別混合暴露的毒性效應。小球藻因無明顯生長抑制之濃度值，因此不進行混合暴露試驗。

### 1. 水蚤

在混合暴露的毒性試驗之中，在殺菌劑貝芬替 (CA) 與殺蟲劑益達胺 (IMI) 混合的組合中，透過貝芬替與無觀察危害反應劑量 (No-observed-adverse-effect level, NOAEL) 的益達胺混合 (圖十六) 與貝芬替與最低觀察危害反應劑量 (Lowest-observed-adverse-effect level, LOAEL) 的益達胺混合暴露 (圖十七)，與控制組 (單獨暴露貝芬替) 相比，致死率並沒有顯著性的差異。顯示益達胺的存在對於貝芬替而言，並不具備有增效劑 (synergist) 的作用。

而透過毒性相加單位計算，在貝芬替與益達胺等毒性混合暴露試驗中 (圖十八)，造成 50% 致死效應的總毒性單位大於 1 ( $\Sigma TU=2.62$ )，因此推論兩者混合的毒性效應為拮抗作用，貝芬替與益達胺混合後毒性減弱。造成拮抗作用有四種主要的可能作用機制 (Marking, 1985)：功能性的 (functional)、化學性的 (chemical)、方向上的 (dispositional)、受器 (receptor) 拮抗作用。功能性的拮抗作用是源自於兩種化學物在同樣的生理機制上，兩者的反應會達到平衡，意即其一的反應會呈現出相反的作用，造成毒性作用減少。化學性的拮抗作用是指兩種化合物間具有化學反應，會產生毒性較低的反應物。方向上的拮抗作用是指化合物會受到吸附作用 (adsorption)、生物轉化作用 (biotransformation)、流佈作

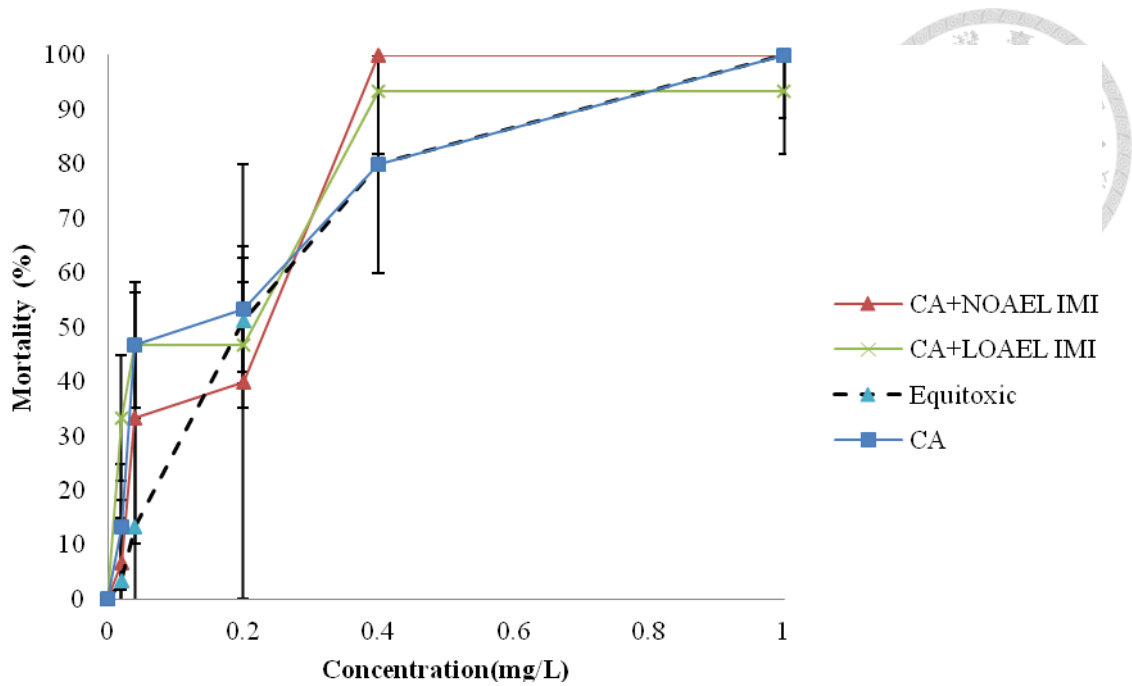


用 (distribution) 、排泄作用 (excretion) 等作用使化物作用於目標物時濃度減少。受器拮抗作用是指兩種化物作用於同一個接受器上，當受器被其一化物佔據時，另一化物無法再造成更多的毒性影響，因此所呈現出來的毒性作用會小於兩者的毒性單位相加。在貝芬替與益達胺對於非目標生物水蚤的拮抗作用，需要其他實驗來證明是屬於何種作用機制，已知的是兩者主要的作用機制不同，貝芬替主要抑制微管蛋白的形成，因此會干擾細胞的有絲分裂，益達胺則是作用於神經系統，分屬不同的系統，較有可能的原因僅存其餘三者，功能性、化學性、方向性，可能使貝芬替與益達胺混合後的毒性效應降低。

殺菌劑甲基多保淨 (TH) 與殺蟲劑益達胺 (IMI) 混合的組合中，甲基多保淨與 NOAEL 的益達胺混合暴露，在甲基多保淨濃度為 4 和 20 mg L<sup>-1</sup> 的暴露下，益達胺的添加造成了死亡率顯著上升 (p<0.05) (圖二十)。甲基多保淨與 LOAEL 的益達胺混合暴露中，在甲基多保淨濃度為 4, 8 和 20 mg L<sup>-1</sup> 的暴露下，益達胺的添加也造成了死亡率顯著上升 (p<0.05) (圖二十一)。

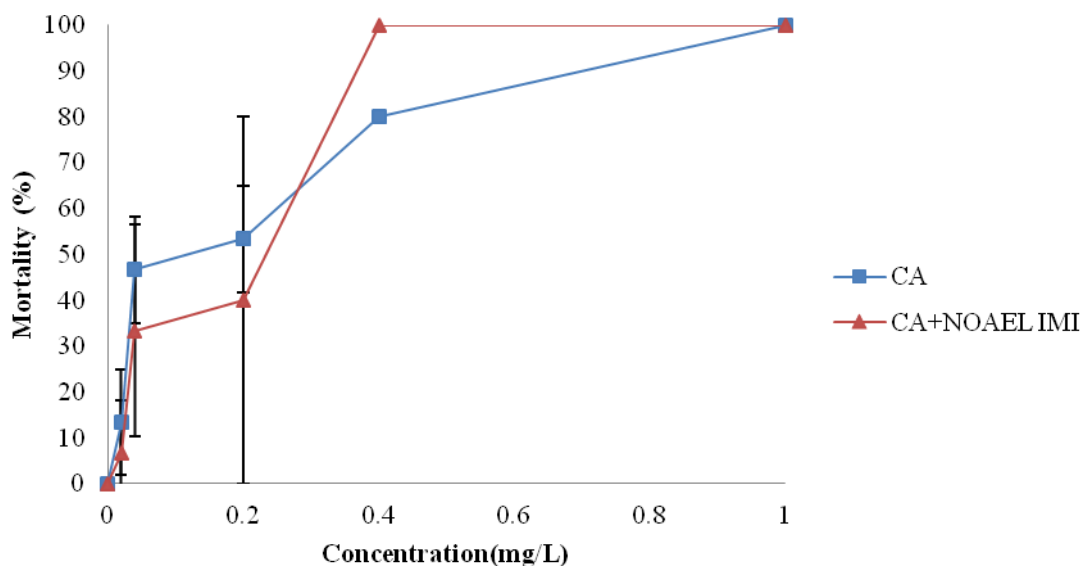
透過毒性相加單位計算，在甲基多保淨與益達胺等毒性混合暴露試驗中 (圖二十二)，總毒性單位遠小於 1 ( $\Sigma TU=0.27$ )，兩者混合的毒性效應為協同作用。而透過低劑量混合與等毒性混合的結果，甲基多保淨與益達胺混合的毒性會上升，也因此確認甲基多保淨與益達胺混合會造成協同作用。協同作用發生的原因可能源自於其一化物影響另一化物的運輸 (transportation)、活化 (activation)、解毒機制 (detoxication)。原因是減少了非專一性 (白蛋白, albumin) 或專一性 (酯酶, esterase) 的蛋白質作用，直接影響到解毒作用的機制與效率，或是首先接觸到其一化物時就作用在解毒的受體上，使其受到的毒性影響更大。最主要的協同效應是來自於代謝農藥的酵素反應，如單加氧酶 (monooxygenases, P450s)、穀胱甘肽 S 轉移酶 (glutathione-S-transferases, GST)、酯酶 (esterase) 被另一化物抑制或誘導。在已知的文獻研究之中，具有確定的協同作用的殺菌劑以二氯苯胺類 (Dichloroaniline) 與咪唑系 (Imidazole) 誘導 P450 為主，殺蟲劑以有機氣

類 (Organochlorines) 誘導 P450、GST、esterase 為主，有機磷類 (Organophosphorus) 抑制前述三種酵素為主 (Cabras et al., 1995)。本研究中，對於免賴得系殺菌劑甲基多保淨與新菸鹼類殺蟲劑益達胺的協同作用，是首次知悉兩種藥劑所造成的協同作用，推測可能原因是其中一種藥劑影響到水蚤的代謝解毒機制，而使得另一種藥劑造成的毒性提高，造成更強的毒性效應。



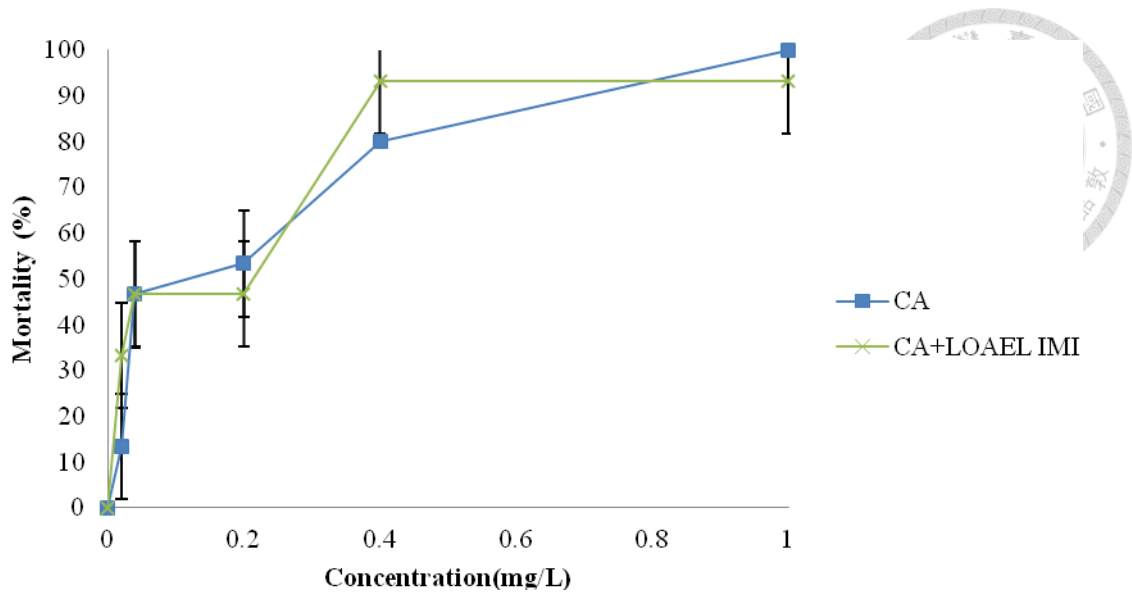
圖十五、混合暴露於貝芬替與益達胺之水蚤毒性與劑量效應

Fig. 13 Mortality after *D. pulex* exposed to carbendazim and imidacloprid



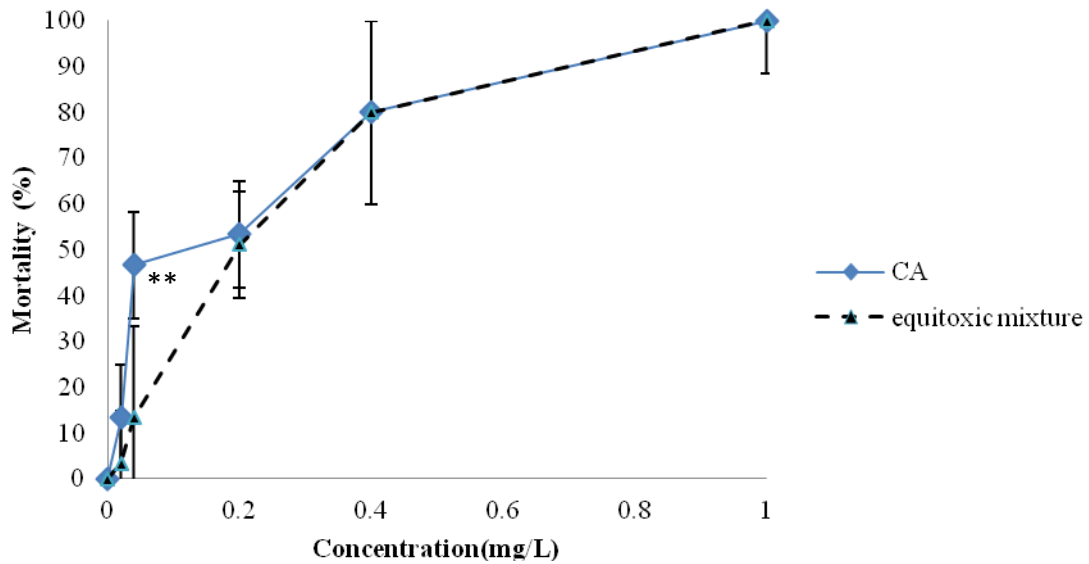
圖十六、貝芬替加上無觀察危害反應劑量的益達胺對水蚤之劑量與毒性效應

Fig. 14 Mortality after *D. pulex* exposed to carbendazim with NOAEL imidacloprid



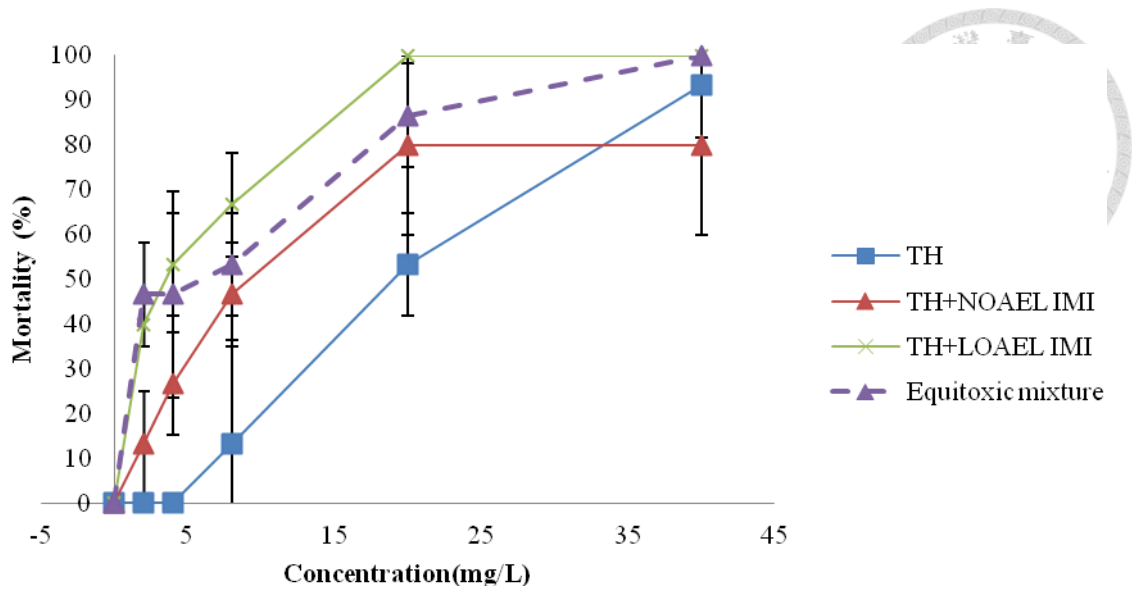
圖十七、貝芬替加上最低觀察危害反應劑量的益達胺對水蚤之劑量與毒性效應

Fig. 15 Mortality after *D. pulex* exposed to carbendazim with LOAEL imidacloprid



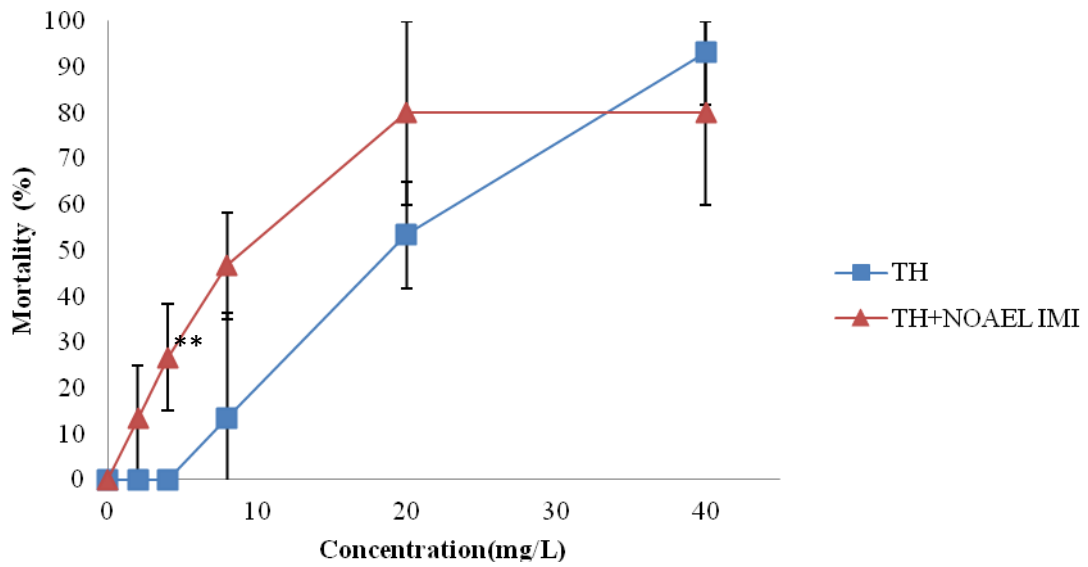
圖十八、等毒性混合貝芬替與益達胺對水蚤之劑量與毒性效應

Fig. 16 Mortality after *D. pulex* exposed to equitoxic mixture of carbendazim and imidacloprid (\*\*:  $p < 0.05$ )



圖十九、混合暴露於甲基多保淨與益達胺之水蚤毒性與劑量效應

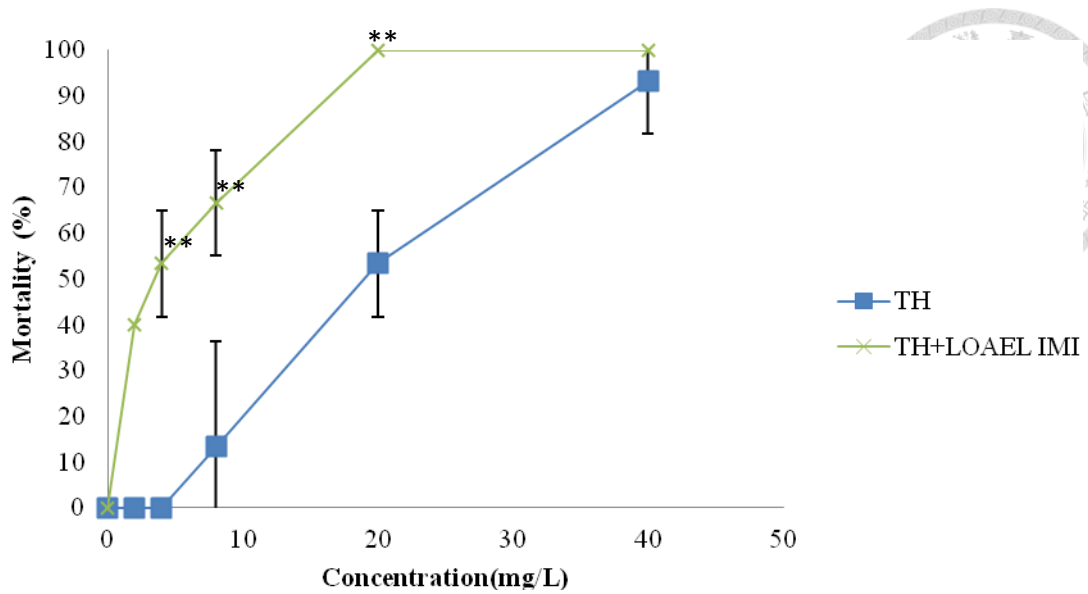
Fig. 17 Mortality after *D. pulex* exposed to thiophanate-methyl and imidacloprid



圖二十、甲基多保淨加上無觀察危害反應劑量的益達胺對水蚤之劑量與毒性效應

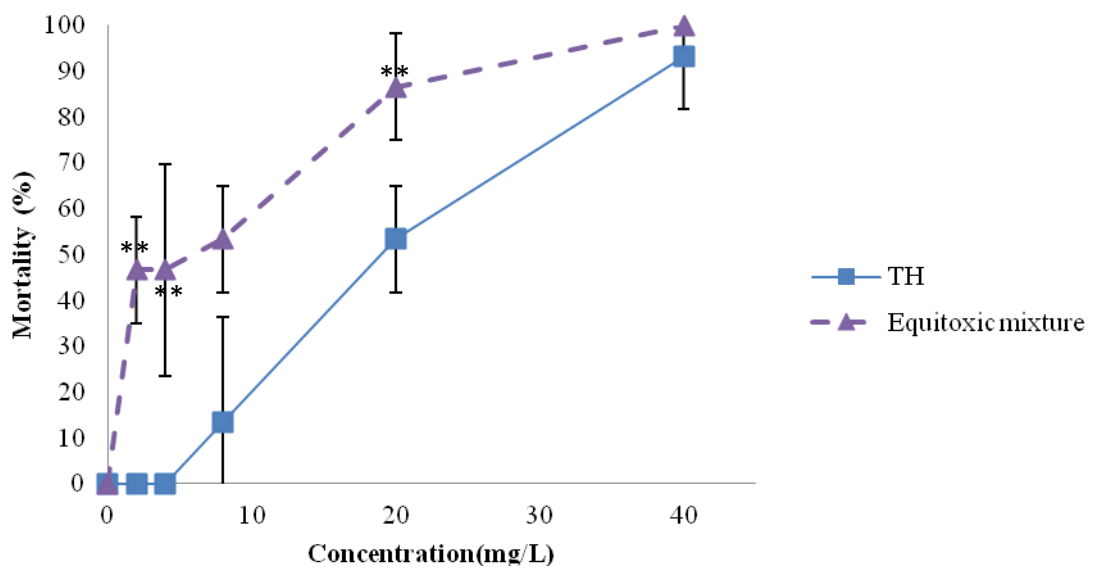
Fig. 18 Mortality after *D. pulex* exposed to thiophanate-methyl with NOAEL

imidacloprid (\*\*:  $P < 0.05$ )



圖二十一、甲基多保淨加上最低觀察危害反應劑量的益達胺對水蚤之劑量與毒性效應

Fig. 19 Mortality after *D. pulex* exposed to thiophanate-methyl with LOAEL imidacloprid (\*\*: P<0.05)



圖二十二、等毒性混合甲基多保淨與益達胺對水蚤之劑量與毒性效應

Fig. 20 Mortality after *D. pulex* exposed to equitoxic mixture of thiophanate-methyl and imidacloprid (\*\*: P<0.05)

表十三、水蚤混合暴露之半致死濃度

Table 12 LC<sub>50</sub> of mixture pesticide in *D. pulex*

Treatment (mg L <sup>-1</sup> )	LC <sub>50</sub> (48h)	ΣTU
Thiophanate-methyl	17.47	
Carbendazim	0.10	
Imidacloprid	62.17	
Carbendazim with 1.8 mg L <sup>-1</sup> (NOAEL) imidacloprid	0.12	
Carbendazim with 3.6 mg L <sup>-1</sup> (LOAEL) imidacloprid	0.08	
Equitoxic mixture (carbendazim+imidacloprid)		2.62 <sup>a</sup>
Thiophanate-methyl with 1.8 mg L <sup>-1</sup> (NOAEL) imidacloprid	8.35	
Thiophanate-methyl with 3.6 mg L <sup>-1</sup> (NOAEL) imidacloprid	4.16	
Equitoxic mixture (thiophanate-methyl+imidacloprid)		0.27 <sup>b</sup>

a: ΣTU>1, antagonism

b: ΣTU<1, synergism

## 2. 端足蟲

在端足蟲的部分，是直接進行等毒性混合暴露試驗。在殺菌劑貝芬替與殺蟲劑益達胺的等毒性混合暴露試驗中，在端足蟲的毒性效應為協同作用，較原本單獨暴露於兩者的毒性上升。在總毒性單位為 1 時，死亡率已達到 60%，在總毒性單位為 2.5 時，端足蟲全數死亡。

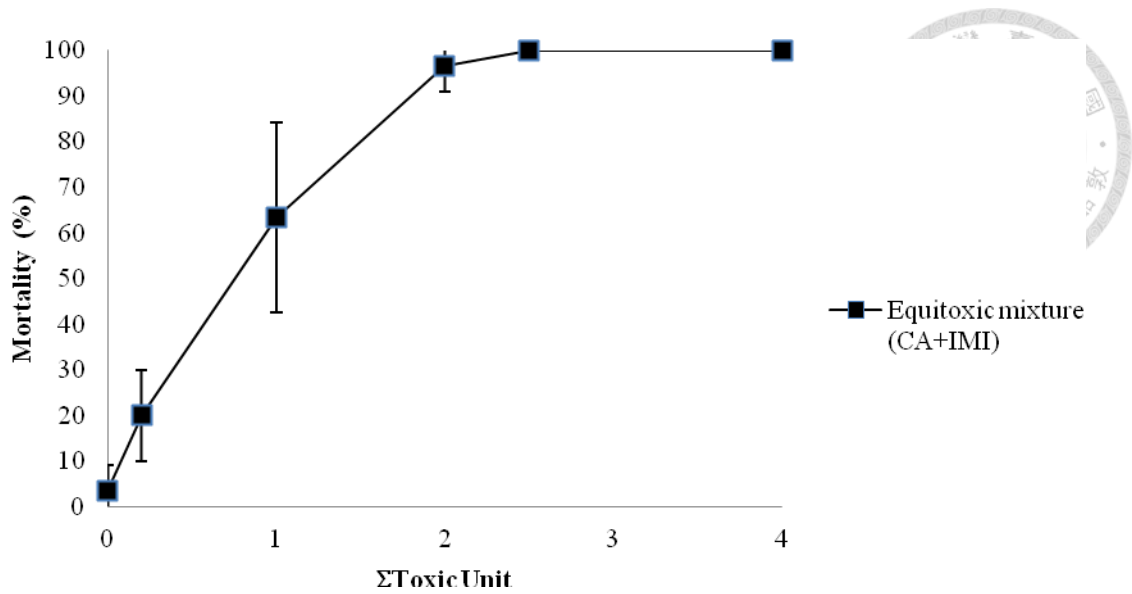
在殺菌劑甲基多保淨與殺蟲劑益達胺的等毒性混合暴露試驗中，在端足蟲的毒性效應為協同作用，較原本單獨暴露於兩者的毒性上升。在總毒性單位為 1 時，死亡率已達到 80%，在總毒性單位為 2 時，端足蟲全數死亡。

以總毒性單位計算後的結果，甲基多保淨混合益達胺的總毒性單位 ( $\Sigma TU=0.22$ ) 小於貝芬替混合益達胺 ( $\Sigma TU=0.62$ )，說明甲基多保淨與益達胺混合的協同作用較強，造成的毒性較大。透過對數模型模擬，如圖二十五所示，可以發現甲基多保淨混合益達胺較貝芬替混合益達胺的毒性協同作用較大。

此結果顯示出，在低劑量時，殺菌劑貝芬替、甲基多保淨分別與殺蟲劑益達胺混合暴露時，對於端足蟲會呈現出較原本預期高的毒性、造成致死率上升，因此對於環境的毒性影響需再做評估，很可能會產生較原本單一毒物存在時高的環境風險。

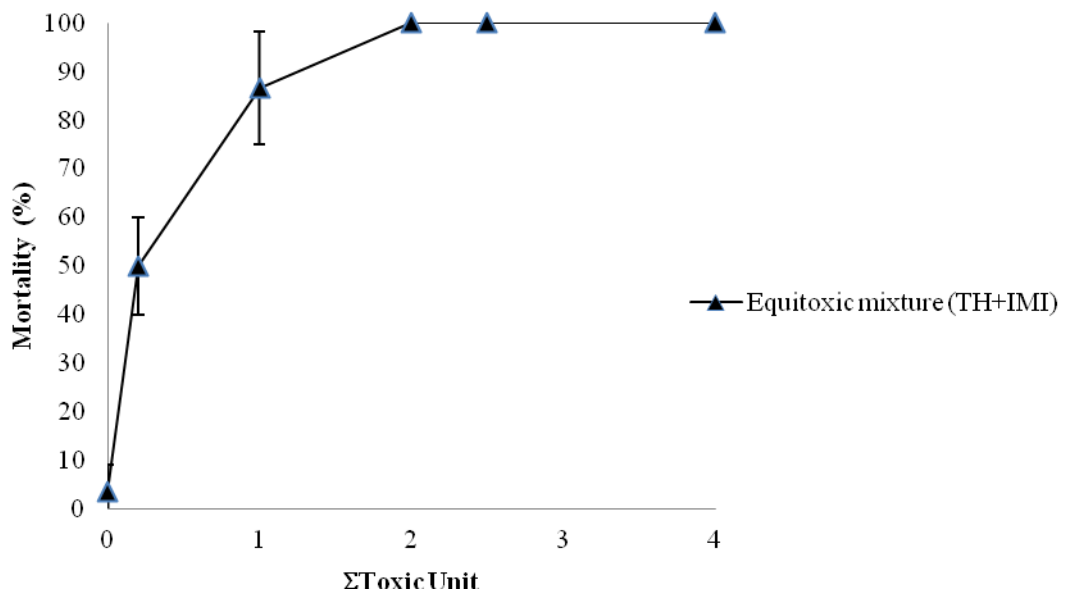
端足蟲與水蚤雖同為水中無脊椎生物，但因生活型態不同、體型也具有差異性，從單獨暴露的毒性試驗結果可知，端足蟲普遍對於毒性化物質具有較水蚤來得高的敏感性，因此在評估混合藥劑的毒性效應時，所呈現出的協同效應會更加明顯，對於日後的毒性評估、環境風險評估，端足蟲是為十分理想的生物試驗物種。





圖二十三、等毒性混合貝芬替與益達胺對端足蟲之劑量與毒性效應

Fig. 21 Mortality after *H. azteca* exposed to equitoxic mixture of cabendazim and imidacloprid



圖二十四、等毒性混合甲基多保淨與益達胺對端足蟲之劑量與毒性效應

Fig. 22 Mortality after *H. azteca* exposed to equitoxic mixture of thiophanate-methyl and imidacloprid

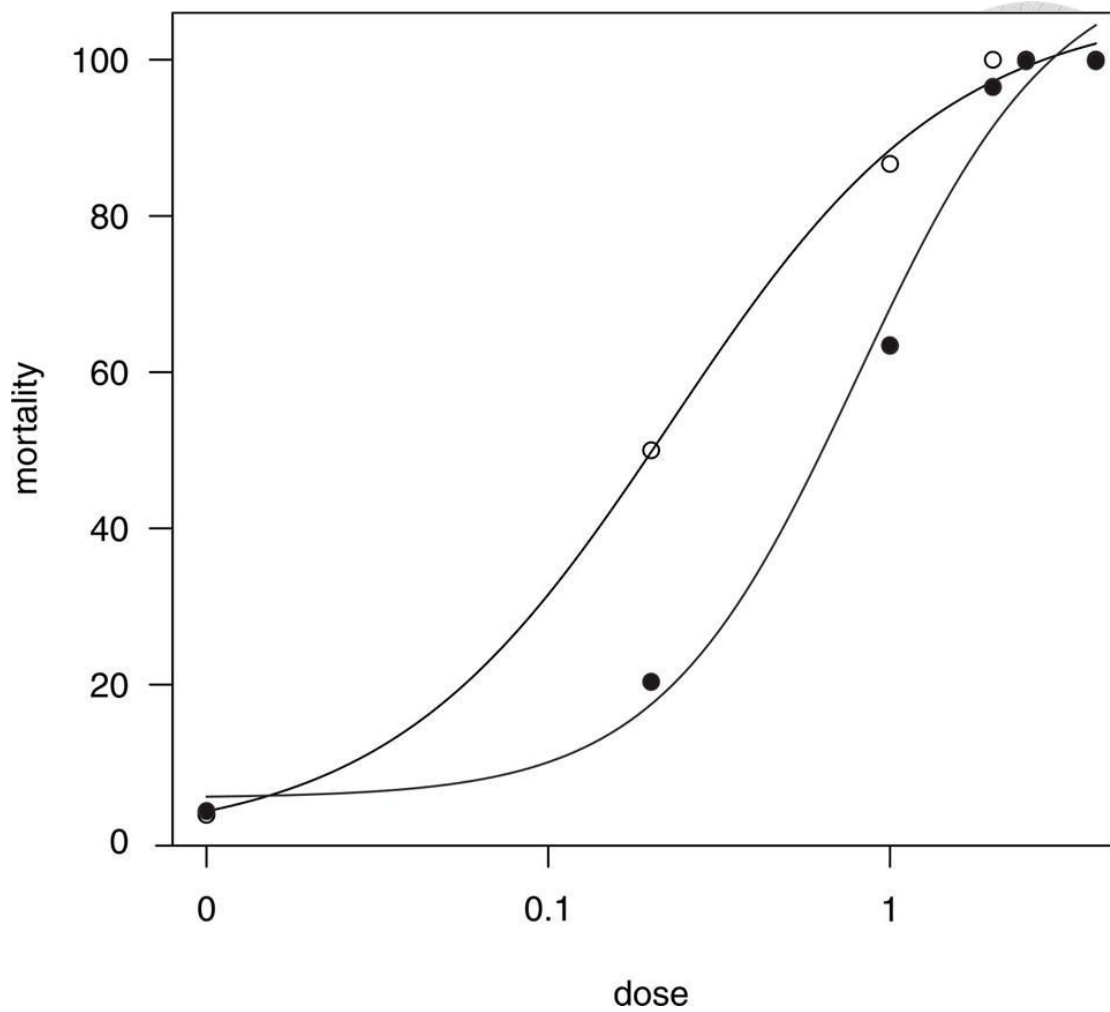
表十四、端足蟲混合暴露之半致死濃度

Table 13 LC<sub>50</sub> of mixture pesticide in *H. azteca*

Treatment (mg L <sup>-1</sup> )	LC <sub>50</sub> (72h)	ΣTU
Thiophanate-methyl	1.72	
Carbendazim	0.41	
Imidacloprid	0.053	
Equitoxic mixture (carbendazim+imidacloprid)		0.62 <sup>a</sup>
Equitoxic mixture (thiophanate-methyl+imidacloprid)		0.22 <sup>b</sup>

a: ΣTU<1, synergism

b: ΣTU<1, synergism



圖二十五、混合暴露的對數模型圖形比較 (空心：甲基多保淨加益達胺；實心：貝芬替加益達胺)

Fig. 23 Three-logistic model of mixture exposing tests (empty : thiophanate-methyl + imidacloprid ; solid : carbendazim + imidacloprid)

表一五、混合暴露之混合毒性作用 (等毒性)

Table 14 Mixture toxicity effect of mixture exposing (TU=1:1)

Treatment	<i>D. pulex</i>	<i>H. azteca</i>
Thiophanate-methyl		
+	Synergism	Synergism
Imidacloprid		
Carbendazim		
+	Antagonism	Synergism
Imidacloprid		



## 六、 結論



1. 在三種非目標生物上，所選用的三種農藥呈現不同的毒性趨勢。對水蚤 (*D. pulex*) 而言，殺菌劑貝芬替毒性最高、甲基多保淨次之，殺蟲劑益達胺最低；對端足蟲 (*H. azteca*) 而言，益達胺最高、貝芬替次之，甲基多保淨最低；對小球藻 (*C. vulgaris*) 而言，因貝芬替與甲基多保淨到達最高溶解量時仍無法達成生長速率半抑制，因此認為受此三者農藥毒害可能性較小。
2. 在貝芬替的毒性影響上，水蚤 (*D. pulex*) 較端足蟲 (*H. azteca*) 敏感；在益達胺上，端足蟲 (*H. azteca*) 則是較水蚤 (*D. pulex*) 敏感兩個尺度。在新菸鹼類殺蟲劑上，端足蟲 (*H. azteca*) 是較水蚤 (*D. pulex*) 具有較高的敏感性。
3. 在混合暴露試驗中，對水蚤 (*D. pulex*) 而言，貝芬替與益達胺混合的毒性效應是拮抗作用，甲基多保淨與益達胺混合則是協同作用。對端足蟲 (*H. azteca*) 而言，兩種混合暴露皆是協同作用，其中以甲基多保淨與益達胺混合的協同效應為最大。

由以上結果可得，在進行生態環境影響評估時，底棲生物、例如本研究所選用的端足蟲 (*H. azteca*) 的毒性試驗結果是必須的，因其生活型態、與環境中毒物接觸頻仍，也顯現出較常用的試驗生物高的敏感度。而混合暴露的毒性試驗結果也顯現，殺菌劑與殺蟲劑同時存在會造成比原先預期來得大的毒性效應，以混合形式存在的農藥毒性對於水體中的生物影響仍需持續關注。

## 七、 參考文獻



王一雄。2004 年。農藥汙染對作物的影響。植物重要防疫檢疫病害診斷鑑定技術研習會專刊 (三) 。p. 73-96。

呂永淵。2006 年。農藥貝芬替與其前驅物免賴得誘發大鼠生殖與發育毒性作用機制之研究。國立臺灣大學醫學院毒理學研究所博士論文。

李國欽、李泰林。1983。台灣常用農藥對水源污染之實況調查研究結果總報告，水污染防治所報告。

凌永健。1999 年。環境荷爾蒙的化學分析。環檢雙月刊第 32 期。

蕭郁樺。2013 年。殺菌劑與殺蟲劑的混合施用對藥劑在土壤中降解之影響。國立臺灣大學生物資源暨農學院農業化學系碩士論文。

Ashauer, R., Hintermeister, A., Potthoff, E., Escher, B.I., 2011. Acute toxicity of organic chemicals to *Gammarus pulex* correlates with sensitivity of *Daphnia magna* across most modes of action. *Aquatic Toxicology* 103, 38-45.

Bal, R., Naziroglu, M., Turk, G., Yilmaz, O., Kuloglu, T., Etem, E., Baydas, G., 2012. Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. *Cell Biochemistry and Function* 30, 492-499.

Becker, L., Scheringer, M., Schenker, U., Hungerbuehler, K., 2011. Assessment of the environmental persistence and long-range transport of endosulfan. *Environmental Pollution* 159, 1737-1743.

Belden, J.B., Gilliom, R.J., Lydy, M.J., 2007. How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life? *Integrated Environmental Assessment and Management* 3, 364-372.

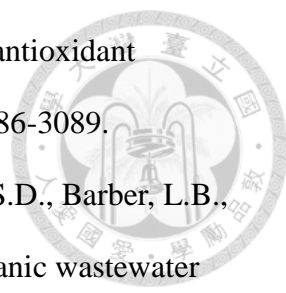
Belden, J.B., Lydy, M.J., 2000. Impact of atrazine on organophosphate insecticide

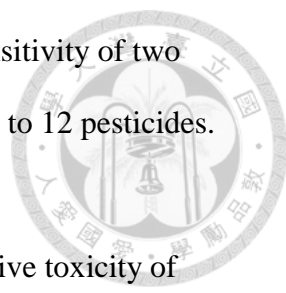
- toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 2266-2274.
- Berenzen, N., Lentzen-Godding, A., Probst, M., Schulz, H., Schulz, R., Liess, M., 2005. A comparison of predicted and measured levels of runoff-related pesticide concentrations in small lowland streams on a landscape level. *Chemosphere* 58, 683-691.
- Bereswill, R., Golla, B., Streloke, M., Schulz, R., 2012. Entry and toxicity of organic pesticides and copper in vineyard streams: Erosion rills jeopardise the efficiency of riparian buffer strips. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 146, 81-92.
- Bereswill, R., Golla, B., Streloke, M., Schulz, R., 2013. Entry and toxicity of organic pesticides and copper in vineyard streams: Erosion rills jeopardise the efficiency of riparian buffer strips. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 172, 49-50.
- Binelli, A., Provini, A., 2003. DDT is still a problem in developed countries: the heavy pollution of Lake Maggiore. *Chemosphere* 52, 717-723.
- Bjorge, C., Brunborg, G., Wiger, R., Holme, J.A., Scholz, T., Dybing, E., Soderlund, E.J., 1996. A comparative study of chemically induced DNA damage in isolated human and rat testicular cells. *Reproductive Toxicology* 10, 509-519.
- Bliss, C.I., 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology* 26, 585-615.
- Cabras, P., Garau, V.L., Angioni, A., Farris, G.A., Budroni, M., Spanedda, L., 1995. Interactions during Fermentation between Pesticides and Enological Yeasts Producing H<sub>2</sub>S and SO<sub>2</sub>. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43, 370-373.
- Canton, J.H., 1976. The toxicity of benomyl, thiophanate-methyl, and BCM to four freshwater organisms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 16, 214-224.
- Carter, S.D., Hein, J.F., Rehnberg, G.L., Laskey, J.W., 1984. Effect of benomyl on the reproductive development of male-rats. *Journal of Toxicology and*

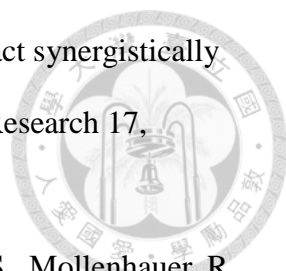


- Environmental Health 13, 53-68.
- Cedergreen, N., Kamper, A., Streibig, J.C., 2006. Is prochloraz a potent synergist across aquatic species? A study on bacteria, daphnia, algae and higher plants. Aquatic Toxicology 78, 243-252.
- Chen, W.C., Yen, J.H., Chang, C.S., Wang, Y.S., 2009. Effects of herbicide butachlor on soil microorganisms and on nitrogen-fixing abilities in paddy soil. Ecotoxicology and Environmental Safety 72, 120-127.
- Chiba, M., Singh, R.P., 1986. High-performance liquid-chromatographic method for simultaneous determination of benomyl and carbendazim in aqueous-media. Journal of Agricultural and Food Chemistry 34, 108-112.
- Cuppen, J.G.M., Van den Brink, P.J., Camps, E., Uil, K.F., Brock, T.C.M., 2000. Impact of the fungicide carbendazim in freshwater microcosms. I. Water quality, breakdown of particulate organic matter and responses of macroinvertebrates. Aquatic Toxicology 48, 233-250.
- Drescher, K., Boedeker, W., 1995. Assessment of the combined effects of substances - the relationship between concentration addition and independent action. Biometrics 51, 716-730.
- Hess, R.A., Nakai, M., 2000. Histopathology of the male reproductive system induced by the fungicide benomyl. Histology and Histopathology 15, 207-224.
- Holtman, M.A., Kobayashi, D.Y., 1997. Identification of *Rhodococcus erythropolis* isolates capable of degrading the fungicide carbendazim. Applied Microbiology and Biotechnology 47, 578-582.
- Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J.T., Roe, R.M., 2004. Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. Crop Protection 23, 371-378.
- Kapoor, U., Srivastava, M.K., Srivastava, L.P., 2011. Toxicological impact of



- 
- technical imidacloprid on ovarian morphology, hormones and antioxidant enzymes in female rats. *Food and Chemical Toxicology* 49, 3086-3089.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environmental Science & Technology* 36, 1202-1211.
- Krueger, D.A., Dodson, S.I., 1981. Embryological induction and predation ecology in *Daphnia pulex*. *Association for the Sciences of Limnology and Oceanography* 26, 219-223.
- Li, Y., Yang, H.-, Zhang, X., Yu, Y., Li, J., 2007. Characteristics of adsorption and desorption of lead on live *Chlorella vulgaris*. *Biotechnology* 6, 029.
- Lim, J.H., Miller, M.G., 1997. The role of the benomyl metabolite carbendazim in benomyl-induced testicular toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 142, 401-410.
- Loewe, S., 1953. The problem of synergism and antagonism of combined drugs. *Arzneimittel Forschung* 3, 285-290.
- Lukancic, S., Zibrat, U., Mezek, T., Jerebic, A., Simcic, T., Brancelj, A., 2010. Effects of exposing two non-target crustacean species, *Asellus aquaticus* L., and *Gammarus fossarum* Koch., to atrazine and imidacloprid. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 84, 85-90.
- Lydy, M.J., Austin, K.R., 2004. Toxicity assessment of pesticide mixtures typical of the Sacramento-San Joaquin Delta using *Chironomus tentans*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 48, 49-55.
- Ma, J.Y., Xu, L.G., Wang, S.F., Zheng, R.Q., Jin, S.H., Huang, S.Q., Huang, Y.J., 2002a. Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 51, 128-132.

- 
- Ma, J.Y., Zheng, R.Q., Xu, L.G., Wang, S.F., 2002b. Differential sensitivity of two green algae, *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*, to 12 pesticides. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 52, 57-61.
- Malev, O., Klobucar, R.S., Fabbretti, E., Trebse, P., 2012. Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6-chloronicotinic acid to non-target aquatic organisms: Microalgae *Desmodesmus subspicatus* and amphipod *Gammarus fossarum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 104, 178-186.
- Markelewicz, R.J., Hall, S.J., Boekelheide, K., 2004. 2,5-hexanedione and carbendazim coexposure synergistically disrupts rat spermatogenesis despite opposing molecular effects on microtubules. *Toxicological Sciences* 80, 92-100.
- Marking, L., 1985. Toxicity of chemical mixtures. *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications*. Hemisphere Publishing Corporation Washington DC. 1985. p 164-176, 2 fig, 3 tab, 67 ref.
- Mazellier, P., Leroy, E., Legube, B., 2002. Photochemical behavior of the fungicide carbendazim in dilute aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* 153, 221-227.
- Nakai, M., Hess, R.A., Moore, B.J., Guttroff, R.F., Strader, L.F., Linder, R.E., 1992. Acute and long-term effects of a single dose of the fungicide carbendazim (methyl 2-benzimidazole carbamate) on the male reproductive-system in the rat. *Journal of Andrology* 13, 507-518.
- Nakai, M., Moore, B.J., Hess, R.A., 1993. Epithelial reorganization and irregular growth following carbendazim-induced injury of the efferent ductules of the rat testis. *Anatomical Record* 235, 51-60.
- Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Schmuck, R., 2001. Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera : *Apidae*). *Pest Management Science* 57, 577-586.

- 
- Norgaard, K.B., Cedergreen, N., 2010. Pesticide cocktails can interact synergistically on aquatic crustaceans. *Environmental Science and Pollution Research* 17, 957-967.
- Ralston-Hooper, K., Hardy, J., Hahn, L., Ochoa-Acuna, H., Lee, L.S., Mollenhauer, R., Sepulveda, M.S., 2009. Acute and chronic toxicity of atrazine and its metabolites deethylatrazine and deisopropylatrazine on aquatic organisms. *Ecotoxicology* 18, 899-905.
- Rehnberg, G.L., Cooper, R.L., Goldman, J.M., Gray, L.E., Hein, J.F., McElroy, W.K., 1989. Serum and testicular testosterone and androgen binding-protein profiles following subchronic treatment with carbendazim. *Toxicology and Applied Pharmacology* 101, 55-61.
- Ritz, C., Streibig, J.C., 2005. Bioassay analysis using R. *Journal of Statistical Software* 12, 1-22.
- Roast, S.D., Widdows, J., Jones, M.B., 2000. Disruption of swimming in the hyperbenthic mysid *Neomysis integer* (Peracarida : *Mysidacea*) by the organophosphate pesticide chlorpyrifos. *Aquatic Toxicology* 47, 227-241.
- Rosenberg, D.M., Resh, V.H., 1993. *Introduction To Freshwater Biomonitoring And Benthic Macroinvertebrates*.
- Schaefer, R.B., von der Ohe, P.C., Rasmussen, J., Kefford, B.J., Beketov, M.A., Schulz, R., Liess, M., 2012. Thresholds for the Effects of Pesticides on Invertebrate Communities and Leaf Breakdown in Stream Ecosystems. *Environmental Science & Technology* 46, 5134-5142.
- Strong, D.R., 1972. Life-history variation among populations of an amphipod (*Hyalella azteca*). *Ecology* 53, 1103-1111.
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual Review of*

Entomology 48, 339-364.

van Wijngaarden, R.P.A., Crum, S.J.H., Decraene, K., Hattink, J., van Kammen, A.,

1998. Toxicity of Derosal (active ingredient carbendazim) to aquatic invertebrates. *Chemosphere* 37, 673-683.

Wendt-Rasch, L., Van den Brink, P.J., Crum, S.J.H., Woin, P., 2004. The effects of a pesticide mixture on aquatic ecosystems differing in trophic status: responses of the macrophyte *Myriophyllum spicatum* and the periphytic algal community. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 383-398.

Woods, M., Kumar, A., Correll, R., 2002. Acute toxicity of mixtures of chlorpyrifos, profenofos, and endosulfan to *Ceriodaphnia dubia*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 68, 801-808.

Zubrod, J.P., Baudy, P., Schulz, R., Bundschuh, M., 2014. Effects of current-use fungicides and their mixtures on the feeding and survival of the key shredder *Gammarus fossarum*. *Aquatic Toxicology* 150, 133-143.

