

國立臺灣大學生命科學院漁業科學研究所

碩士論文

Institute of Fisheries Science

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

靈丹，可氣丹超級柴油及廢機油

對虎斑猛水蚤之毒性研究

Toxic Effect of the Lindane, Chlordane, Super Diesel

Oil and Waste Engine Oil on the Marine Copepod

*Tigriopus japonicus*

莊倫綱

Chuang, Lun-Kang

指導教授：陳弘成 博士

Advisor : Chen Hon-Cheng, Ph.D.

中華民國 97 年 7 月

July, 2008

## 致謝

在漁業科學所待了兩年了，在這兩年之中，要謝謝的人卻說也說不完，除了家裡含辛茹苦把我拉拔長大又讓我如此幸福唸書的父母外，學校裡也有許許多多的人我都很感激他們，小綠學姐跟高事宜學長像是實驗室的守護神一樣，大大小小的事好像只要他們出馬就立刻迎刃而解，楷翔學長老是承擔著顧後的工作，不論是出遊或是出差都會隨後打紮讓我們無後顧之憂，先預祝學長博班畢業順利啊！哲文、吏院以及尚健，我們一路走來始終互相扶持...應該說是我一路依賴著你們才能夠順利的畢業，也很高興我們四個終於都順利畢業了。學弟妹也都適時的成為我們實驗室的開心果，希望學弟妹也能開開心心的都畢業。另外還要特別感謝一群從大學時代就認識的球場夥伴，在我遇到任何瓶頸的時候都會不吝於給我加油打氣，希望各位將來求學的路途上也都能過的順順利利的。當然，這篇論文的完成，最重要的就是我的指導老師陳弘成教授，老師的學識以及經驗都相當的豐富，與他討論起來每次都很佩服他的旁徵博引。而且老師和藹可親的脾氣也讓我相當的佩服，另外也要感謝丁雲源老師、李美慧老師以及黃大駿學長在百忙之中對於本論文的審查與建議，兩年的日子說長不長說短不短，但是跟實驗室的大家相處，這樣的時間還真的是太短了，很高興認識大家，我想以後的日子裡我還是會很懷念研究所的一切。

## 中文摘要

臺灣生態系統長期以來一直都曝露於農藥中，境內的河流大多短小湍急，加上一些農藥在水體的半衰期多達數個月至數年，使得受危害的不只是淡水流域體系，連沿岸海域的生態系也受到了影響。又台灣四面環海，且位於交通運輸的樞紐位置，故船運相當的發達，船上的油類使用除了本身航行時所需的燃料柴油以外，機油使用量也是相當的驚人，而這些油類可能會因為由於意外，或是人為惡意丟棄還有船體本身有漏油而洩漏至沿岸海域當中，成為了除油輪漏油污染外另一種潛在性的油類污染來源。本研究以沿岸常見的底棲橈足類虎斑猛水蚤 *Tigriopus japonicus* 為對象，測試可氣丹跟靈丹兩種有機氯農藥以及超級柴油廢機油兩種油類的水溶性萃取物(WAF)的急慢性毒性，靈丹的 24、48、72 與 96 小時的半致死濃度分別為 3.72ppm、2.56ppm、1.52ppm 與 1.19ppm，而可氣丹的 24、48、72 與 96 小時的半致死濃度則分別為 5.00ppm、2.46ppm、1.20ppm 與 0.71ppm。超級柴油 WAF 對於 *T. japonicus* 的抱卵雌性的急性毒害影響並不是很明顯，廢機油 WAF 處理的虎斑猛水蚤 24、48、72 與 96 小時的半致死濃度分別為 70.88%、53.97%、41.93% 與 32.13%。慢性毒方面，成長試驗中靈丹在 100ppb、可氣丹在 1ppb、10ppb 及 100ppb 中皆能延遲脫殼的時間，油類的 WAF 在低濃度下除了延遲脫殼時間外還會造成幼體大量死亡。生殖試驗中除了靈丹在 1ppb、超級柴油 WAF 各組以及廢機油 WAF1% 沒有顯著差異外，其餘組別第一次抱卵時間皆與控制組有顯著差異的存在。抱卵次數方面除了靈丹在 1ppb、10ppb，可氣丹在 1ppb、10ppb，超級柴油 WAF1%、5% 以及廢機油 WAF0.3%、1% 沒有顯著差異外，其餘濃度較高的各組別皆與控制組有顯著差異的存在。在孵化子代的數目方面所有的試驗組其子代數目皆少於控制組，在統計上也都顯示出有顯著差異的存在。

關鍵字：虎斑猛水蚤、可氣丹、靈丹、超級柴油、廢機油。



## Abstract

The Taiwan ecosystem continuously all exposure in the agricultural chemicals, not only causes to harm the fresh water basin system, but also influence the coast sea area ecosystem. Taiwan also is located the Ship transportation key position. On the ship is bringing the massive diesel oil as well as the engine oil. These oil classes possibly can release because of the accident, or intentional discarding, has become another kind of potentiality oil class pollution origin. This study aimed to investigate the effects of acute and chronic exposures of lindane, chlordane, the super diesel oil as well as the waste engine oil water accommodated fraction(WAF) on roosts copepoda *Tigriopus japonicus*. In the acute experiments, the 24, 48, 72 and 96 h median lethal concentration(LC50) values for lindane were 3.72ppm, 2.56ppm, 1.52ppm and 1.19ppm; chlordane were 5.00ppm, 2.46ppm, 1.20ppm and 0.71ppm respectively. The super diesel oil's acute toxicity was not obvious, and the 24, 48, 72 and 96 h LC50 values for super diesel oil were 70.88%, 53.97%, 41.93% and 32.13%. In the chronic experiments, *Tigriopus japonicus* delay the time which peels off the shell when lindane in 100ppb, chlordane in 1ppb, 10ppb and 100ppb, oil class WAF under the low concentration not only the detention peeling off the shell time but also can cause the nauplius massive deaths. In the reproduction experiment except the lindane in 1ppb, super diesel oil WAF each group of as well as the waste engine oil WAF1%, other groups first time holding the egg had the remarkable difference existence with the control. Number of bearing eggs does not have the remarkable difference by exposure to the lindane in 1ppb, 10ppb, chlordane in 1ppb, 10ppb, the super diesel oil WAF1%, 5% as well as the waste engine oil WAF0.3%, 1%. Number of brooding size in all concentrations are lower than control and had the remarkable difference existence.

Key words: *Tigriopus japonicus*; chlordane; lindane; super diesel oil; waste engine oil



# 目 錄

口試委員會審定書.....	
誌謝.....	i
中文摘要.....	ii
英文摘要.....	iv
壹、前言.....	1
一、有機氯農藥對於環境的影響.....	1
二、Lindane 及 Chlordane 對生物的影響.....	1
三、近海油類污染對於環境的影響.....	3
四、虎斑猛水蚤.....	3
貳、文獻回顧.....	5
一、毒性試驗.....	5
二、成長.....	6
三、生殖.....	7
參、研究目的.....	9
肆、材料與方法.....	10
一、試驗生物的收集與畜養.....	10
二、試驗用藥.....	10
三、試驗方法之設計.....	11
四、統計分析方法.....	16
伍、結果.....	17
一、急性毒試驗.....	17
二、成長試驗.....	18
三、生殖試驗.....	20
陸、討論.....	22
一、急性毒試驗.....	22
二、成長試驗.....	24

三、生殖試驗.....	25
四、各試驗之混合討論.....	26
柒、結論.....	28
參考文獻.....	29
圖.....	35
表.....	46



## 壹. 前言

### 一、有機氯農藥對於環境的影響

農藥的使用在現階段的農業行為中相當的廣泛，隨著耕地的減少、疾病蟲害的增加以及科技的進步，所使用的種類也就推陳出新，僅在臺灣 1999 年的時候就有多達 541 種的農藥被使用(植物保護手冊，1999)。農藥大部分在施用於田野後會經由蒸散、沉降、逕流及淋洗作用進入空氣土壤及水體中，並經由食物鏈造成的生物放大和生物累積效應危害到非目標生物，臺灣生態系統長期以來一直都曝露於農藥中，每年的農藥消耗量超過三十五噸(林 等，1995)。因此研究農藥殘留對於環境的影響近年來成為關注的議題。臺灣境內的河流大多短小湍急，加上一些農藥在水體的半衰期多達數個月至數年，使得受危害的不只是淡水流域體系，連沿岸海域的生態系也受到了影響。

### 二、Lindane 及 Chlordane 對生物的影響

Lindane 與 Chlordane 均屬於長效型的有機氯殺蟲劑。Lindane 中文名為靈丹，化學文摘社登記號碼 (CAS No.) 為 58-89-9，75~100%從土壤中消失要 3~10 年，在無氧狀態下的分解作用比有氧狀態大，在空氣中和氫氧自由基反應的半衰期約 1.63 天。靈丹在水中穩定，其半衰期至少大於 7 個月。從水中揮發掉的半衰期約 200 天。在細菌、蟬

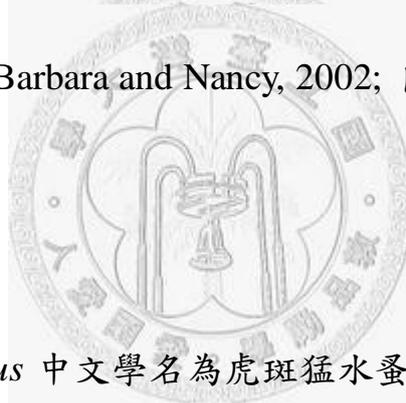
游生物(zooplankton)及魚類的生物濃縮的因子 (BCF, Bio-condense factor) 從 10 到 768 不等。

Lindane 對人體上的急毒性症狀為：嘔吐、不安、痙攣及呼吸衰竭（可能延遲數天才發生）。其蒸氣可能引起頭痛、鼻和喉的刺激感。大鼠吞食的 96h-LD50 為：76 mg/kg。慢性毒性或長期毒性方面，可能引起嚴重的血液疾病，甚至死亡。特別是有下列病況者易受危害：痙攣疾病。會導致動物肝、肺、內分泌系統癌症但人類的證據有限。會損傷懷孕中的胎兒，也會降低女性的受孕能力。長期暴露可能損傷肝臟，手腳的神經導致協調力降低(Keith, 1997; Smith,1991; Videla, 1990)。

Chlordane 中文名稱可氣丹化學文摘社登記號碼 (CAS No.) 為 57-74-9，流佈在土壤時，半生期約為 3.3 年。流佈在池塘、河流、湖泊時，其半生期為 18~26、3.6~5.2、14.4~20.6 天，生物濃縮因子 BCF 為 3200 以上。在人體上的急毒性症狀為發抖、過敏、精神錯亂、眩暈、痙攣、嚴重者死亡、視覺膜糊、噁心、嘔吐、痢疾。對肝及腎造成損害。中毒症狀多在 45 分鐘至幾小時後出現。大鼠吞食的 96h-LD50 為 200 mg/kg、貓的吸入性 96h-LC50 則為 100 mg/m<sup>3</sup>/4hr，慢性毒性或長期毒性方面，可氣丹可能引發血液病變，也曾經在實驗動物中發現有致癌性。(Keith, 1997; USEPA, 1986; 1987)

### 三、近海油類污染對於環境的影響

台灣四面環海，其地理位置位於交通運輸的樞紐，故船運相當的發達，港口密度高居世界第一。近岸遊艇旅遊觀光產業在近年來也開始蓬勃了起來，船上的油類使用除了本身航行時所需的燃料柴油以外，用於潤滑用的機油使用量也是相當的驚人，而這些油類可能會因為由於意外，或是人為惡意丟棄還有船體本身有漏油而洩漏至沿岸海域當中，造成沿岸生態系的危害成為了除油輪漏油污染外，另一種潛在性的油類污染來源(Barbara and Nancy, 2002; 陳，1979)。



### 四、虎斑猛水蚤

*Tigriopus japonicus* 中文學名為虎斑猛水蚤(圖 1)，在生物學的分類上為節肢動物門，甲殼綱，橈足亞綱，猛水蚤目。生活方式為底棲性，分布範圍遍及西太平洋沿岸，北至韓國日本、南至香港菲律賓等地的沿岸海域皆可發現，在野外的礁岩岸水池當中常能發現大量的虎斑猛水蚤族群。虎斑猛水蚤生活史共有十二期，分為無節幼體六期以及橈足幼體五期，並在第十一次脫殼完後性成熟成為成體(Hans et al., 2007)，成體體長最多不超過 2mm。雌雄異體型兩性生殖雄性具有特化的交配肢在交配時會將雌性用交配肢緊緊握住。雜食性，以藻類或是

其他有機屑劑為食物來源，日本在上個世紀的六零年代就開發出利用輪蟲或是酵母為其食物，大量培養虎斑猛水蚤作為水產養殖上的餌料生物(陳，1997)。在野外橈足類的族群被認為是仔魚重要的食物來源之一，剛剛孵化的仔魚由於有卵黃囊的緣故所以不必覓食，等到仔魚卵黃囊消失時，就必須依靠橈足類幼體所含的豐富營養來源才能順利成長，是故橈足類族群的分布興亡成為足以影響當地魚群的大小的重要因素(陳、等，1989)。而在台灣，農藥以及油類的汙染往往成為危害沿岸海域的重要汙染來源，這些有毒物質對於台灣沿海的橈足類生物族群的影響並不是十分清楚，有鑒於橈足類對於海岸生態的重要明白這些影響便成為很重要的課題。



## 貳. 文獻回顧：

### 一、毒性試驗

水中污染物的種類和毒性雖然可以經由化學分析法加以檢驗和，但是當毒性物質繁多或不明時，此法頗為需時、費力又耗錢。為解決此一問題，乃發展出以生物為指標的毒性試驗(陳 1994;李 等 2002)。根據 Mance(1987)的定義，毒性試驗指的是利用活的生物體在控制的條件下進行試驗，以評估某個物質的毒性大小。在毒性試驗中依據毒物作用生物的時間長短，可分為急性毒試驗(acute toxicity tests)和慢性毒試驗(chronic toxicity tests)。

急性毒試驗主要是評估短期曝露在高濃度污染物下對生物所造成的毒害，其中 96h-LC50(96 小時半致死濃度)為重要的數值，LC50 (median lethal concentration, 半致死濃度)是指在特定的時間點內要讓半數的受測生物死亡所需要的汙染物濃度，毒性越大，LC50 越小。而慢性毒試驗主要是評估長期曝露在低濃度污染物下對生物所造成的毒害，常藉由成長率、耗氧量、組織病變、生理生化值及生殖情形等來探討。(Rand and Petrocelli,1985;Mance,1987; 郭，2006; 陳，2007)一般認為污染物對生物最不利的慢性毒影響為死亡率的增加，除此之外還有降低成長和抑制生殖(Chaisuksant et al.,1998)。

從慢性毒試驗的結果，可以得到對生物體沒有顯著不良影響之最

高毒物濃度(no observed effect concentration, NOEC)，以及對生物體有顯著不良影響之最低毒物濃度(lowest observed effect concentration LOEC)，受測生物對此毒物的最大容許濃度(maximum acceptable toxicant concentration, MATC)即介於 NOEC 和 LOEC 之間。以往的研究發現，對水生動物而言污染物的安全濃度(safe concentration，受測生物長期曝露在此污染物濃度下並不會造成有害的影響)多為 96h-LC50 的 0.01-0.1 倍(Sqrage, 1971)，所以從急性毒試驗所得到的 96h-LC50 值可作為慢性毒試驗所採用的毒物濃度之參考。

進行毒性試驗所使用的動物往往具有對毒物敏感、分布普遍、供應充足、體型小易於在實驗室中飼養及生態價值高等特性(陳，1994)。地球上所有已知的動物當中約 95% 為無脊椎動物，其中又以節肢動物佔絕大多數，因此許多毒性研究會以甲殼類作為受測生物。(黃，2005;Verslycke et al.,2007)

## 二、成長

成長為一項評估化學物質的慢性毒中最普遍的方法，包含攝食、排泄、消化、吸收或是荷爾蒙量的改變等，生物體許多生理過程的最終表現就是成長狀態，在水生生物學中有許多指標都可以用來估算成長的情形，例如魚類的骨骼發育、耳石甚至是鱗片中的的年日輪數目，

或是計算魚肉吸收放射性標記的胺基酸含量及魚肉中之 RNA 及 DNA 比值等。都可以當作成長的指標，但是一般而言最直接簡單的方法就是計算體長和體重(Kearns and Atchison, 1979; Morales-Nin, 2000)。對於甲殼類動物來說，體型必須藉由蛻去堅硬的外骨骼後才得以成長，所以有些研究也會用脫殼的頻率及時間長短來探討外來物質對期成長的影響(Chen et al, 1996)，毒性物質主要是以抑制食物的吸收、降低生物體的食慾或是增加新陳代謝花費的能量來達到降低生物體的成長。(Heath, 1995)



### 三、生殖

一個族群的存亡最終取決於成員的生殖能力，生殖包含著幾個過程，包括配子的形成、產卵、受精、胚胎發育孵化與幼體的發育，這些過程受到荷爾蒙的控制，而荷爾蒙則會受到環境因子的調控(Heath, 1995)。毒性物質有時會改變生物體之生殖能力，繼而影響族群的大小與存亡，很多研究會從性荷爾蒙、性成熟度、性腺大小、性別特徵、抱卵數的大小、孵化率孵化時間、子代畸形及子代之性別比例等來判斷毒性物質的影響(Donaldson, 1990; Karels et al., 1999; 黃, 2005)。生物體受到緊迫時，可能會增加子代的數量，減少子代孵化時間，甚至增加雌性個體數量以確保族群的大小，但也有可能會了防止自身個體

的死亡，而將生殖能量轉移至維持生命，導致子代數量銳減(Schreck et al., 2001; Moore and Jessop, 2003; Tripathi and Singh, 2004)。



### 參. 研究目的：

本次的實驗將使用兩種農藥-靈丹 (Lindane)、可氯丹 (Chlordane) 以及市面上的超級柴油和廢機油，探討它們對於台灣沿岸常見的橈足類生物 *Tigriopus japonicus* 虎斑猛水蚤的毒性影響，先進行急性毒試驗以求出 96h-LC50，接著在進行慢性毒試驗，慢性毒試驗從成長生殖兩方面來分析上述四種化學物質對於虎斑猛水蚤的慢性毒性影響並試著與前人的研究資料結果做比較。進而求得虎斑猛水蚤的對於兩種有機氯農藥及兩種油料的最大容許濃度，希望此篇研究成果能做為政府制定污染防治與水質標準之參考依據，為台灣海岸的生態保育盡一份力量。



## 肆. 材料與方法

### 一、試驗生物的收集與畜養

*Tigriopus japonicus* 從基隆和平島岩岸採集回實驗室利用解剖顯微鏡經過外觀檢定將抱卵的雌性個體選取出來後，利用雌體尾部的剛毛數目以及頭部觸角的形狀還有抱卵時卵囊只有一個的特徵，將其與另外同時存在水體的劍水蚤分開，用 10L 的玻璃缸內裝經過高壓高溫滅菌過的海水馴養在  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  的恆溫室裡，光週期為 12h 光照 12h 黑暗，並使用打氣裝置增加水體內的溶氧量，打氣裝置連接細孔徑的塑膠玻璃管來控制打氣大小避免打氣時過度擾動水體造成損傷、pH 值維持在 8.0 左右並投食藻類 *Tetra selnus*，每三周換水一次，利用套上過濾膜的虹吸管避免將水蚤吸入(陳，1995)，每次換大約 1/2~2/3 的水體並將水中的食物殘渣用滴管去除，在取用實驗個體時則使用滴管吸取所需要的個體至實驗載台上進行實驗。

### 二、試驗用藥

#### (1) 靈丹 (Lindine) 及可氯丹 (Chlordane) 儲存溶液

本試驗所使用的兩種有機氯農藥分別是靈丹 (Lindine B4020236 AccuStandard 100ug/ml)、可氯丹 (Chlordane 390-151A ChemService 100ug/ml) 皆是用 methanol 作為溶劑配置成 50ug/ml 的儲存液，並利

用棕色的試藥瓶保存在 4°C，瓶蓋則是有鐵氟龍內襯。

(2)超級柴油和廢機油 WAF (Water accommodated fraction) 制備：

參考 Bejaranoy 等在 2006 年使用的方法，超級柴油係從中國石油公司直營的加油站中購得，而廢機油則是向一般機車行的廢機油儲存桶裡抽取而得，取 200ml 的過濾滅菌鹽度為 30ppt 海水，再用定量滴管取 50ml 的超級柴油或者是廢機油一起置入 400ml 的血清瓶中，放入攪拌子並且密封瓶口，將血清瓶放在攪拌平台上連續攪拌 36hr，使得海水水體與油類充分混和，待攪拌完畢後靜置使水層跟油層分開，所得的水層即定義為 100% 的 WAF，用分液漏斗將水層分裝置有色的玻璃瓶中密封保存在 4°C 的冰箱內等到要用的時候再取出。



### 三、試驗方法之設計

(1)急性毒試驗

選取體長 1.5~2.0mm 的抱卵之雌性 *T. japonicus* 來進行試驗，在範圍尋找試驗(range finding tests)裡使用的容器為直徑六公分的玻璃培養皿，內裝有 10ml 不同濃度的試驗水體，再放入 10 隻抱卵雌體，等 24 小時後觀察其造成全部個體死亡的濃度和全部個體不會死亡的濃度，以求得最適合的濃度範圍。接著在確定試驗(definitive tests)時選取體長 1.5~2.0mm 的抱卵之雌性 *T. japonicus*，每隻分別裝在 96 孔洞的

培養盤中，每個孔洞預先加入足夠的水體(400 $\mu$ l 的過濾滅菌鹽度 30ppt 並充份打氣的海水)，靜置過夜避免生物緊迫影響實驗。

靈丹(Lindane)、可氯丹(Chlordane)的急性毒測試裡靈丹取 0ppm、1.0ppm、1.5ppm、2.0ppm、2.5ppm 共五個濃度，可氯丹取 0ppm、0.5ppm、1.0ppm、1.5ppm、2.0ppm 共五個濃度，每個濃度 10 隻為一組，均至少進行二次重複並在第一次加入藥品後第 2h、4h、8h、12h、24h、48h、72h、96h 觀察其存活個體數，試驗期間為了維持水體中藥品的濃度在試驗中的第 48 小時換水(在不傷及動物體的情形下用 pipette 將試驗水體全部置換)，試驗中並不餵食溫度維持在  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  光週期為 12h 光照 12h 黑暗，整個試驗時間為 96 小時。

超級柴油 WAF 使用 0%、25%、50%、75%、100% 共五個濃度，廢機油 WAF 的水體濃度則是使用 0%、30%、40%、50%、60% 共五個濃度，每個濃度 10 隻為一組，均進行至少二次重複並在第一次加入藥品後第 2h、4h、8h、12h、24h、48h、72h、96h 觀察其存活個體數，為了維持水體中藥品的濃度在試驗中的第 48 小時換水(在不傷及動物體的情形下用 pipette 將試驗水體全部置換)，試驗中並不餵食溫度維持在  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  光週期為 12h 光照 12h 黑暗，整個試驗時間為 96 小時。

在判定實驗對象生物的死亡與否方面，由於 *T. japonicus* 在面對環境不佳時會出現假死的現象，故在判定個體死亡時，除了以探針觸碰

無反應為基準外，另外還要加上實驗個體的身體產生因為死亡而出現近乎直角的殭直(圖 2)，用以避免將仍然處於假死狀態的個體誤判為死亡個體(Kwok and Lung 2005)。

試驗結束後所得的各時間點累積死亡數將畫成濃度-時間的關係圖並利用 Finney(1971)所描述之 Probit analysis 而做成的 Basic Program 推估出靈丹及可氣丹、超級柴油和廢機油 WAF 對於 *T. japonicus* 24hr、48hr、72hr 以及 96hr 的  $LC_{50}$ 。

## (2)成長試驗

在長時間的水生生物毒性試驗中，生物體曝露毒性物質的方法主要有三種：靜置式(static)、間隔換水式(static with renewal)和流水式(continuous or intermittent flow)，各有其優缺點，靜置式曝露試驗最大的缺點在於隨著試驗的進行毒物會揮發或分解導致濃度的不確定性，所以為了保持毒物的濃度通常會採用間隔換水或流水的方式，然而流水式曝露試驗需昂貴的設配與操作成本，故間隔換水成為許多水生生物毒性試驗所採取的方法，本研究有二項長期的試驗及成長試驗和生殖試驗，都是採用間隔換水的方式以達到維持水中有毒物質的濃度。換水的間隔時間每 48 小時以後換水一次(黃，2005；Bejaranoy et al., 2006)。

由於先前的研究發現，污染物對水生生物的安全濃度多為 96h-LC50 的 0.01~0.1 倍(Sprague, 1971)，所以本研究將急性毒試驗所求得的 96h-LC50 值的 0.01~0.1 倍間，分別取低中高三種濃度以作為慢性毒試驗的藥品濃度。

成長試驗中無節幼體的取得方式如下：首先將已經抱卵的雌蟲收集在直徑六公分的玻璃培養皿中，給予充足食物與水體並每日觀察，一但母體孵化無節幼蟲就立刻使用 pipette 小心的吸取幼體至已經裝有測試水體的 96 孔洞培養盤上面。每個孔洞裡面接注入 200ul 的測試水體，靈丹(Lindane)的測試水體濃度有三組分別為 1ppb、10ppb、100ppb，可氯丹 (Chlordane) 三組測試水體濃度為 1ppb、10ppb、100ppb，廢機油 WAF 的三個測試濃度則為 0.3%、1%、3%，在超級柴油 WAF 的部分，由於其急性毒性不明顯故採用其在急性毒測試中無作用濃度以下三個濃度(1%、5%、10%)作為測試值。每組濃度均有五隻個體並重複兩次，同時設置純加沒有受污染的海水水體一組作為控制組，觀察時間固定為每 24 小時觀察一次記錄其脫殼的次數，並在每兩天換水的時候將脫下來的殼用 pipette 吸去避免影響水質，同時在換完水後各個孔洞再以與餵食 10ul 的 *Tetraselanus* 藻液。

### (3) 生殖試驗

本生殖試驗主要在探討雌蟲的生殖表現，觀察期遇到所測試的有毒物質時其影響程度為何，試驗的時間為三十天，所觀測的項目為交配完後至第一次抱卵所花費的時間、抱卵的次數、抱卵到排卵的間隔時間、以及子代的孵化數目。

*T. japonicus* 在雌性尚未性成熟時，外觀即使尚未能用肉眼觀察出與雄性的差異，成年的雄性也能從中分別並加以用前端的附肢抓住雌體(圖 3)，以便能在雌性在最後一次蛻殼性成熟後馬上於其交配(Ting and Snell, 2003; Ting et al., 2000)，故在選取試驗對象時，先將已經成對的雌性與雄性選到 96 孔洞培養盤上中，由於被雄性抓住的雌性可能尚未性成熟，故試驗開始的時間是在確定雄性與雌性已經成功交配完畢時，才將雌性置換入測試水樣以及將雄性分離，每個孔洞裡面接注入 400ul 的測試水體，靈丹(Lindane)的測試水體濃度有三組分別為 1ppb、10ppb、100ppb，可氯丹(Chlordane)三組測試水體濃度為 1ppb、10ppb、100ppb，廢機油 WAF 的三個測試濃度則為 0.3%、1%、3%，在超級柴油 WAF 的部分，由於其急性毒性不明顯故採用其在急性毒測試中無作用濃度以下三個濃度(1%、5%、10%)作為測試值。每組濃度均有三隻個體，同時設置純加沒有受污染的海水水體一組作為控制組，包括控制組在內各組都每兩天換一次水，利用 pipette 儘量在不傷及雌蟲體的情況下將孔洞內的水體全部置換，並且將孔洞內的無節幼體全數

移除，用以確保試驗化學物在水體的濃度和避免影響下代孵化幼體的計算。

#### 四、統計分析方法

所有試驗結果均先以變方分析(analysis of variance)測定各處理組織間是否有顯著差異( $\alpha=0.05$ )若有顯著差異的話再用學生式 t 檢定 (Student's t test paired assay,  $p<0.05$ )來做進一步的分析以判斷試驗組與控制組之間是否達到顯著差異水準。



## 伍. 結果

### 一、急性毒試驗

抱卵雌性的 *T. japonicus* 在四種不同污染物下的存活率列於表 1、表 2、表 3 與表 4，而存活率的圖則如圖 4、圖 5、圖 6、與圖 7，從試驗結果，可以觀察到在同一污染物的處理下，污染物的濃度越高的組別，其死亡率也就越高，另外在同一個試驗濃度下死亡率會隨著曝露時間的增加而增加，各組污染物的濃度與各時間點之累積死亡率利用 Basic program 計算出 LC50 值結果，如表 5 並將其製成圖 8、圖 9。

對於抱卵雌性的 *T. japonicus* 來說靈丹的 24、48、72 與 96 小時的半致死濃度，分別為 3.72ppm、2.56ppm、1.52ppm 與 1.19ppm，而可氣丹的 24、48、72 與 96 小時的半致死濃度，則分別為 5.00ppm、2.46ppm、1.20ppm 與 0.71ppm。

超級柴油 WAF 對於 *T. japonicus* 的抱卵雌性的急性毒害影響並不是很明顯，在 50% 以下的濃度沒有任何的急性毒性，在 100% 的濃度下仍然有超過八成的存活率，受到廢機油 WAF 處理的虎斑猛水蚤的抱卵雌性死亡率明顯的比超級柴油 WAF 還要來的大，其 24、48、72 與 96 小時的半致死濃度，分別為 70.88%、53.97%、41.93% 與 32.13%。

從試驗的結果可以看出：(1) 就有機氣農藥及廢機油 WAF 而言，隨著曝露時間的增加，半致死濃度逐漸減少，但曝露時間越久半致死濃

度下降的情形越趨平緩；(2)從各個時間點來看，靈丹的半致死濃度在 24 小時是低於可氣丹的濃度，但是在、48、72 與 96 小時的半致死濃度則是變成可氣丹的半致死濃度低於靈丹；(3)相同的濃度下超級柴油 WAF 以及廢機油 WAF 的毒性效果完全不同，在 100% 的超級柴油 WAF 濃度中 *T. japonicus* 的抱卵雌性仍然有超過八成的存活率，相較之下 60% 廢機油 WAF 處理中全部的個體都在 72 小時後則是全部死亡。

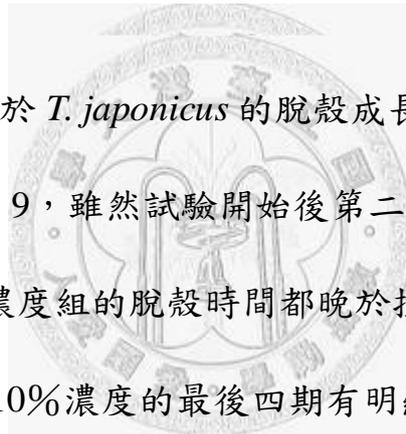
## 二、成長試驗

*T. japonicus* 的成長試驗一共進行 16 天，控制組與加入靈丹在中低濃度(1ppb、10ppb)兩個組別皆無個體死亡，在高濃度下的存活率則為 60%，可氣丹在中低濃度(1ppb、10ppb)兩個組別也沒有個體死亡，但是在 100ppb 的濃度裡卻沒有個體存活到成體的階段，甚至只有一隻存活到橈足幼體的階段。在油類 WAF 污染測試的部份，超級柴油 WAF 中低濃度下(1%、5%)皆無個體存活到成體階段，在高濃度下的存活率則為 70%，廢機油 WAF 則是沒有任何個體存活到成體階段。

靈丹對於 *T. japonicus* 的脫殼成長影響之數據如表 6 與表 7，並將其製成圖 7，由圖可知各組隨著曝露時間的增加而增加脫殼的次數，試驗開始後的前五次脫殼時間各組間均無顯著差異存在，但從第六次脫殼進入橈足幼體第一期的時候開始 100ppb 濃度組的脫殼時間明顯晚於

控制組，但是到了第 11 次脫殼的時候 100ppb 組的脫殼時間因為死亡個體影響的關係而無法表現出與控制組的不同。

可氣丹對於 *T. japonicus* 的脫殼成長影響之數據如表 8 與表 9，並將其製成圖 8，由圖可知各組隨著曝露時間的增加而增加脫殼的次數，試驗開始後的從第二次脫殼進入無節幼體第三期的時候開始三個濃度組的脫殼時間明顯晚於控制組(無節幼體第六期除外)，100ppb 濃度的組別則是沒有個體存活到第八次脫殼以後，這樣的情形一直持續到試驗結束。



超級柴油 WAF 對於 *T. japonicus* 的脫殼成長影響之數據如表 10 與表 11，並將其製成圖 9，雖然試驗開始後第二次脫殼進入無節幼體第三期的時候開始三個濃度組的脫殼時間都晚於控制組，但是只有 1%濃度無節幼體第四期和 10%濃度的最後四期有明顯的差異，1%濃度的組別沒有個體存活到橈足幼體時期，5%濃度的組別則只有一隻存活到橈足幼體二期，這樣的情形一直持續到試驗結束。

廢機油 WAF 對於 *T. japonicus* 的脫殼成長影響之數據如表 12 與表 13，並將其製成圖 10，0.3%濃度處理組中沒有個體存活到無節幼體第四期，1%與 3%濃度下的個體也沒有個體存活到橈足幼體四期，全部試驗的個體沒有存活到成體階段，雖然只有 1%濃度下無節幼體第六期橈足幼體第一期以及 3%濃度下，無節幼體第六期有表現出明顯的差

異，但是由圖可知試驗開始後的從第三次脫殼進入無節幼體第四期的時候無論是哪一組中存活的個體的脫殼時間都明顯晚於控制組，0.3%濃度下的個體甚至但二次的脫殼延遲到了第 10 天左右，這樣的情形一直持續到試驗個體完全死亡為止。

### 三、生殖試驗

生殖試驗一共進行 30 天，所有的試驗雌性個體除了 100% 的超級柴油 WAF 組中有個體在試驗一開始便死亡外，其餘的試驗個體都存活到試驗結束。

各組雌性蟲體的生殖表現如表 14、15、16、17，各組在試驗過程中皆有抱卵的現象，所有試驗組的第一次抱卵時間皆晚於控制組，利用統計方法分析控制組於其他試驗組中發現，除了靈丹在 1ppb、超級柴油 WAF 各組以及廢機油 WAF1% 沒有顯著差異外，其餘組別皆與控制組有顯著差異的存在。而在抱卵次數方面除了靈丹在 1ppb、10ppb，可氣丹在 1ppb、10ppb，超級柴油 WAF1%、5% 以及廢機油 WAF0.3%、1% 沒有顯著差異外，其餘濃度較高的各組別皆與控制組有顯著差異的存在。在孵化子代的數目方面所有的試驗組其子代數目皆少於控制組，在統計上也都顯示出有顯著差異的存在，值得注意的是，相較於有機氯農藥的測試中常觀察到幼體經常在孵化前便死於卵囊之中，

油類污染的試驗組中比較常觀察到，即使已經抱卵卻沒有任何子代孵化出來所抱的卵囊就已經消失的情況，*T. japonicus* 剛抱的卵呈現透明感的青綠色，在快要孵化的時候卵殼則是呈現出透明，且看的到內部胡蘿蔔色的無節幼體。



## 陸. 討論

### 一、急性毒試驗

由靈丹對於 *T. japonicus* 的濃度-時間關係圖，可以清楚的看到在相同的時間下隨著毒物濃度的增加對於生物體的毒性也會增加，得到的 96hr LC<sub>50</sub> 為 1.19ppm。可氣丹對於 *T. japonicus* 的濃度-時間關係圖同樣的也可以觀察到跟靈丹類似的結果，得到的 96hr LC<sub>50</sub> 為 0.71ppm，在 96hr LC<sub>50</sub> 的毒性大小比較中，可氣丹對於 *T. japonicus* 是大於靈丹的。

而利用這些數據去跟以往的資料作比較可以發現，兩者對 *T. japonicus* 的毒性是大於跟其他同樣是有機氯農藥如 Endosulfan (96hr LC<sub>50</sub>=0.07ppm)但是小於 Alachlor(96hr LC<sub>50</sub>=7.3ppm)、Molinate(96hr LC<sub>50</sub>=35.5ppm)，我們也可以觀察出相較於其他化學物而言 *T. japonicus* 對於有機氯是比較敏感的(Young et al., 2007)。

另外，在與其他的無脊椎生物例如多齒新米蝦 (96hr LC<sub>50</sub> 靈丹 9.36ppb、可氣丹 0.13ppb) 或是白蝦 (48hr LC<sub>50</sub> 靈丹 3.9ppb、可氣丹 63.2ppb) 比較可以發現到，*T. japonicus* 對於有機氯農藥的耐受性是比其他的無脊椎動物還要來的高，而相同類似的結果也可以在豐年蝦觀察到 (24hr LC<sub>50</sub> 靈丹 10.5ppm) (黃，2005)。

超級柴油 WAF 對於 *T. japonicus* 的急性毒害影響並不是很明顯，在 50%以下的濃度沒有任何的急性毒性，在 100%的濃度下仍然有超

過八成的存活率，*T. japonicus* 在 100% 的急性原油污染下其死亡率依然甚低(陳，1979)這點在其他的橈足類也有類似的現象：*Amphiascus tenuiremis* 在 100% 原油的 WAF 處理下仍然保持了超過九成的存活率，這可能意味著原油或是較低燃點的油類混合物對於橈足類的急毒性不是很大(Adriana et al., 2006)。

受到廢機油 WAF 處理的 *T. japonicus* 死亡率明顯的比超級柴油 WAF 還要來的大，除了極低濃度(25%，急性毒前測試)不受影響外，其他濃度的死亡率皆在 72hr 以前便達到 100%，其 96hr  $LC_{50}=32.13\%$  顯示出了廢機油 WAF 對於 *T. japonicus* 的毒性是完全不同於超級柴油 WAF。一般市售的機油通常內部會有添加其他的介面活性劑，而這些介面活性劑的毒性有的時候會遠大於被添加的油類本身，K.Ara 等在 2002 年的研究中在船用燃料油中添加了介面活性劑，結果同樣是針對於抱卵的雌性 *T. japonicus* 其 96hr  $LC_{50}$  高達 0.14ppm，遠高於其他文獻及本實驗中的超級柴油 WAF 的記錄，這或許是一個可以解釋的方向，另外機油在使用後會把一些重金屬給溶出來，同時也會產生一些酸性物質，甚至可能會含有多氯聯苯或是戴奧辛，這些都是有可能造成廢機油之所以擁有如此高毒性的原因(NRC, 1985)。

## 二、成長試驗

動物體若是受到污染物質或毒性物質影響後會抑制生長，甚至造成死亡，其主要原因為動物體曝露到毒性物質後，往往加速生理機能以排除毒物使得能量消耗大於能量堆積，造成生物體的生理平衡失調，消耗過大的能量也有可能使得動物體休克死亡，另一方面亦有可能直接破壞生理構造或重要器官使成長停滯，或是因為重要器官損害而直接造成死亡(Helen et al.,2003)。

甲殼類動物體表接觸到毒性物質時，為了防止異物入侵往往加快脫殼速度以排除異物(Schweer, 2002)，但是也有可能為了抵抗外界帶來的壓力造成能量的轉移，使得脫殼的時間延遲，而這兩種截然不同的反應會隨著生物面對不同的污染物質發生，也可能面對同一毒物但是不同濃度下發生，在本研究裡無論是面對有機氯農藥的汙染或是油類的汙染，都會延遲 *T. japonicus* 脫殼而且即使是在最低的濃度測試裡都可以觀察的到，顯示出 *T. japonicus* 成長的階段對於這四種污染物都是相當的敏感的。

橈足類的成長過程裡大致上可以分為兩個時期，前期為無節幼體時期，*T. japonicus* 一共有六個無節幼體時期，在第六次脫殼後進入了橈足幼體時期，*T. japonicus* 一共有五期，在第十一次脫殼後才正式成為成體，一般認為幼體時期中無節幼體對於毒物的比敏感度橈足幼體

還要高，而最敏感的時期則是在無節幼體進入橈足幼體階段，也就是第六次脫殼的時候(Sheikh et al., 2007)，在本成長試驗中若有個體死亡的現象發生時，大部分都是無節幼體時期，或是在進入橈足幼體一期後就死亡，這也顯示出了 *T. japonicus* 的無節幼生在面對污染時特別的敏感，試驗過程中也觀察到若是存活到橈足幼生則其死亡率比無節幼生低了許多。符合之前前人的觀察報告，也顯示出即使是同一物種，在成長的不同階段對於有毒物質的耐受性也都不相同。在油類污染的成長試驗中，低濃度組別個體脫殼延遲的現象比高濃度組別個體來的嚴重且死亡的速度也比較快，由於生物在感受到毒性物質的時候，會將體內能量轉移至對抗毒物的方面，但是在低濃度中，生物體內可能無法對這些毒害產生保護的機制反映，因此對生物造成的危害可能會比在高濃度下還來的高。

### 三、生殖試驗

生殖能力或生殖表現為影響族群數量的重要生物指標(Fingerman et al., 1998)，生物體為了抵抗污染物質所產生的毒性會將其生殖能量去除或者轉移以維持生命(Klaassen, 2001)。

本次的試驗中除了超級柴油 WAF 以外，含有有毒物質的組別在高劑量下(靈丹 10ppb、100ppb、可氣丹 1ppb、10ppb、100ppb、廢機油

WAF3%)，第一次抱卵的時間發生了延遲以及孵化子代的數目上有減少的現象，抱卵次數方面，靈丹、可氣丹以及廢機油 WAF 在高劑量的處理下有明顯減少的情形，由於靈丹與可氣丹皆屬於有機氯農藥，而有機氯農藥則是被認為具有外因性內分泌干擾的作用，也就是所謂的環境荷爾蒙的功能，再進入動物體後會破壞體內荷爾蒙的恒定，影響其生長發育以及外型，或是更近一步的影響到子代的性別比例(colborn et al., 2002)，而在廢油類中含有酚、萘、多氯聯苯或是戴奧辛，這些也都是所謂的環境荷爾蒙因子(NRC, 1985)。

本次試驗中雌性的 *T. japonicus* 在面對油類的污染物時，會觀察到常常已經抱卵的個體，其卵囊會在隔幾天後消失於水體之中，而沒有任何子代的產生，由於並沒有在水體發現脫落的卵囊，因此推測很有可能是被母體為了維持本身的生命，自行吸收以應付外在有毒環境的壓力。

#### 四、各試驗之綜合討論

毒性試驗的目的是為了找出對生物體沒有不良影響的最大污染物濃度(NOEC)，以作為制定水質標準之參考與依據，本研究分別對靈丹、可氣丹、超級柴油 WAF 以及廢機油 WAF 進行了急毒性、成長、與生殖的試驗，從急性毒試驗結果可以求得 96h-LC50，從慢性毒試驗

則是可以得到安全濃度以及 MATC(受測生物對此毒物的最大容許濃度)，根據 Sprague(1971)指出，對水生生物而言污染物的安全濃度大多為急性毒 96h-LC50 的 0.01-0.1 倍，但是在本研究中，無論是有機氯農藥或是油類的污染測試中，急毒性 96h-LC50 的 0.01 倍濃度下，仍然對 *T. japonicus* 成長以及生殖造成了影響，顯示出有機氯農藥和油類污染物與其他一般污染物不同，在低劑量下仍然會對生物體造成重大的影響。*T. japonicus* 被認為是對環境容忍度相當高的物種，在高鹽度以及溫度的變化下依然仍夠生存(Sheikh et al., 2006)，這可能要歸功於擁有相當好的抗氧化系統(Jung et al., 2006)，但是在無節幼體時期可能抗氧化系統可能未發育完全，導致在解毒功能上並沒有比成體還來的完善，使得無節幼體的時期對於污染物會比成體更加的敏感。由實驗的數據我們可以知道，靈丹及可氯丹對於虎斑猛水蚤的 MATC 應該是在 1ppb 濃度以下，而超級柴油及廢機油 WAF 的 MATC 則是分別在 1% 及 0.3% 以下。

## 柒. 結論

從本試驗證實靈丹、可氣丹、超級柴油 WAF 及廢機油 WAF 確實會對虎斑猛水蚤造成顯著的毒性，影響包括增加死亡率、減緩成長能力與降低繁殖力。在急性毒方面，可氣丹的 96h-LC50 毒性比靈丹的還要來的大，廢機油 WAF 對於虎斑猛水蚤的毒性相當的大，而超級柴油的急性毒則甚不明顯。在成長試驗中，靈丹在較高濃度(100ppb)中會延緩脫殼的時間，可氣丹即使在最低測試濃度(1ppb)下也會發生延緩的現象，油類的 WAF 在低濃度(0.3%~10%)下，除了有延緩成長的效果外還會造成無節幼體的大量死亡，生殖毒性試驗中四種污染物都會明顯降低孵化子代數以及第一次抱卵時間，抱卵數也在最高的濃度組別中有所下降。



## 參考文獻

李俊宏、王漢泉、吳嘉玲、王正雄，2002。新竹縣地區事業廢水生物  
毒性試驗研究。環境檢驗所環境調查研究年報，9，157-186。

林明松、周淑媛、郭乃文、賴明亮與郭昱良，1995。果農的農藥曝露  
與神經系統的變化套討。中華衛誌 14(5):392-399。

陳弘成，1979。除油劑對海中生物之影響。布拉格油災漁業調查小組  
研究報告。中央研究院動物研究所專刊第五號。

陳弘成，1989。花蓮溪河口域生態環境調查及紙漿廢水的毒性試驗。  
行政院環境保護署。

陳弘成，1994。魚類毒性試驗標準方法之研究。行政院環境保護署。

陳弘成，1995。魚類毒性試驗標準方法之研究(二)。行政院環境保護  
署。

陳明耀，1997。生物餌料培養。水產出版社。

陳富美，2007。氮對多齒新米蝦之毒性研究。台灣大學漁業科學研究所碩士論文。

郭恩展，2006，氮對白蝦之毒性影響研究。台灣大學漁業科學研究所碩士論文。

黃大駿，2005。外因性內分泌干擾物質可氣丹及靈丹對多齒新米蝦之毒性研究。台灣大學動物學研究所博士論文。

植物保護手冊，1999。台灣省政府農林廳頒行。



Ara K., Nojima K., Hiromi, J. 2002. Acute toxicity of bunker A and C refined oils to the marine harpacticoid copepod *Tigriopus Japonicus* mori. Bull. Environ. Contam. Toxicol, 69, 104-110.

Barbara L. Suderman, Nancy H. Marcus, 2002. The effects of orimulsion and fuel oil #6 on the hatching success of copepod resting eggs in the seabed of Tampa Bay, Florida. Environmental Pollution, 120, 787-795.

Bejarano A.C., Chandler G.T., He L., Coull B.C., 2006. Individual to population level effects of South Louisiana crude oil water accommodated hydrocarbon fraction (WAF) on a marine meiobenthic copepod. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 332, 49-59.

Colborn, T. 2002. Impact of endocrine disruptors on brain development and behavior-preface. *Environmental Health Perspectives Supplements*, 110, 335-335.

Chen J. C., Chen K. W., Chen J. M., 1996. Effects of saponin on survival, growth, molting and feeding of *Penaeus japonicus* juveniles. *Aquaculture*, 144, 165-175.

Donaldson E. M., 1990. Reproductive indices as measures of the effects of environmental stressors in fish. In: *Biological indicators of stress in fish*(Ed. By Adams, S. M. ), pp. 109-122. Bethesda, Md: American Fisheries Society.

Fingerman M., Jackson, N. C., Nagabhushanam R.,1998. Hormonally regulated functions in crustaceans as biomarkers of environmental pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*, 120, 343-350.

Hans U. Dahms, Supawadee Chullasorn, Pawana Kangtia, Frank D. Ferrari, Jiang Shiou Hwang, 2007. Naupliar development of *Tigriopus Japonicus mori*, 1932(Copepoda: Harpacticidae). *Zoological Studies*, 46, 746-759.

Health A. G., 1995. *Water pollution and fish physiology*. Boca Raton: Lewis Publishers.

Helen S. Marcial, Atsushi Hagiwara, Terry W. Snell, 2003. Estrogenic compounds affect development of harpacticoid copepod *Tigriopus Japonicus*. *Environmental Toxicology and chemistry*, Vol. 22 No. 22, 3025-3030.

Jung S. S., Kyun W. L., Jae S. R., Dae S. H., Young M. L., Heum G. P., In Y. A., Jae S. L.. 2006.Environmental stressor(salinity, heavy metals, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) modulate expression of glutathione reductase(GR) gene from the intertidal copepod *Tigriopus Japonicus*. *Aquatic Toxicology*, 80, 281-289.

- Karels A., Soimasuo M., Oilari A., 1999. Effects of pulp and paper mill effluents on reproduction, bile conjugates and liver MFO(mixed function oxygenase) activity in fish at Southern Lake Saimaa, Finland. *Wat. Sci. Tech*, 40, 109-114.
- Keith L. H., 1997. Environmental endocrine disruptors. New York: John Wiley & Sons.
- Kerns P. K., Atchison G. J. 1979. Effects of trace metals on growth of yellow perch (*Perca flavescens*) as measured by RNA-DNA ratios. *Env. Biol. Fish*, 4, 383-387.
- Kevin W. H. K., Kenneth M. Y. Leung., Toxicity of antifouling biocides to the intertidal harpacticoid copepod *Tigriopus Japonicus* (Crustacea, Copepoda): Effects of temperature and salinity. *Marine Pollution Bulletin*, 51, 830-837.
- Klaassen D. E., 2001. Casarett and Doull's Toxicology. New York: McGraw-Hill.
- Lee K. W., Raisuddin S., Hwang D. S., Park H. G., Lee J. S.. 2007. Acute toxicities of trace metals and common xenobiotics to the marine copepod *Tigriopus Japonicus* : Evaluation of its use as a benchmark species for routine ecotoxicity tests in western pacific coastal regions. *Envieonmantal Toxicity*, DOI 10, 1002.
- Mance G., 1987 Toxicity testing techniques. In: Pollution threat of heavy metals in aquatic environments(Ed. By Mellanby, K. ), pp. 9-21. London: Elsevier Applied Science.
- Moore I. T., Jessop T. S., 2003. Stress, reproduction, and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. *Horm. Behav*, 43, 39-47.
- Morales-Nin B., 2000. Review of the growth regulation processes of otolith daily increment formation. *Fish Res*, 46, 53-67.

National Research Council(NRC), 1985. Oil in the sea: Inputs, Fates, and Effects. National Academy Press, Washington D. C.

Rand G. M., Petrocelli S. R., 1985. Introduction. In: Fundamentals of aquatic toxicity: methods and applications(Ed. By Rand G. M., Petrocelli S. R. ), pp. 1-28. Washington: Hemisphere Publishing Corporation.

Schreck C. B., Contreras-Sanchez W., Fitzpatrick M. S., 2001. Effects of stress on fish reproduction, gamete quality and progeny. *Aquaculture*, 197, 3-24.

Schweer L. G., 2002. Draft detailed review paper on mysid life cycle toxicity test. (68-W-01-023). Washington D.C.: U. S. Environmental protection agency.

Sheikh R., Kevin W. H. K., Kenneth M. Y. Leung., Daniel S., Jae S.L., 2007. The copepod *Tigriopus Japonicus*: A promising marine model organism for ecotoxicology and environmental genomics. *Aquatic Toxicology*, 83, 161-173.

Smith A. G., 1991. Chlorinated Hydrocarbon Insecticides. In: Handbook of Pesticide Toxicology-Classes of Pesticides(Ed. By Hayes, W. J. & Laws, E. R. ). New York: Academic Press.

Sprague J. B., 1971. Measurement of pollutant toxicity to fish-III sublethal effects and “safe” concentrations. *Water Res.* 5. 245-266

Ting J. H., Kelly L. S., Snell T. W., 2000. Identification of sex, age and species-specific proteins on the surface of the harpacticoid copepod *Tigriopus Japonicus*. *Marine Biology*, 137, 31-37.

Ting J. H., Snell T. W., 2003. Purification and sequencing of a mate-recognition protein from the copepod *Tigriopus Japonicus*. *Marine Biology*, 143, 1-8.

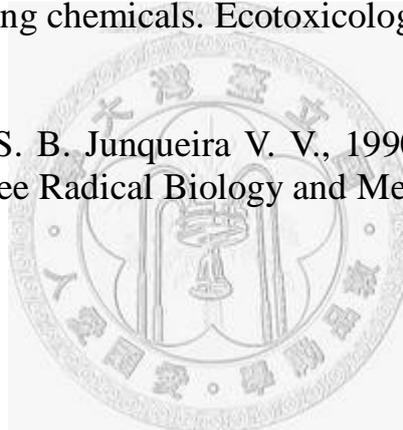
Tripathi P. K., Singh A., 2004. Toxic effects of cypermethrin and alphamethrin on reproduction and oxidative metabolism of the freshwater snail, *Lymnaea acuminata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, 58, 227-235.

USEPA. 1986. Chemical Fact Sheet for Chlordane. Washington D. C. : 109. Office of Pesticide Program, U. S. Environmental Protection Agency.

USEPA. 1987. Chlordane: Health Advisory. Washington D. C. : Office of Drinking Water, U. S. Environmental Protection Agency.

Verslycke T., Ghekiere A., Raimondo S., Janssen C., 2007. Mysid crustaceans as standard models for the screening and testing of endocrine-disrupting chemicals. *Ecotoxicology*, 16, 205-219.

Videla L. A., Barrors S. B., Junqueira V. V., 1990. Lindane-induced liver oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 9, 169-179.



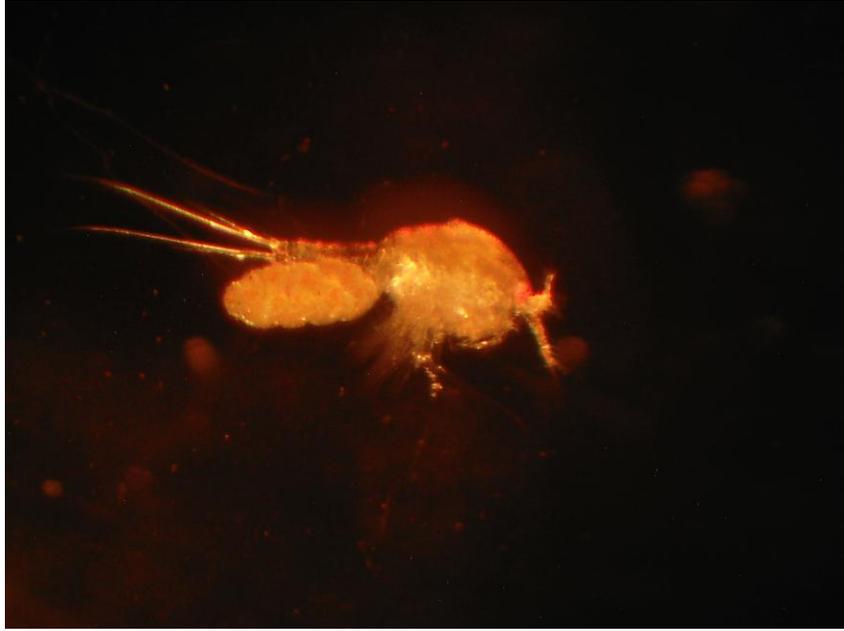


圖 1 虎斑猛水蚤抱卵的雌性個體





圖 2 死亡的虎斑猛水蚤身體呈現近乎直角的角度

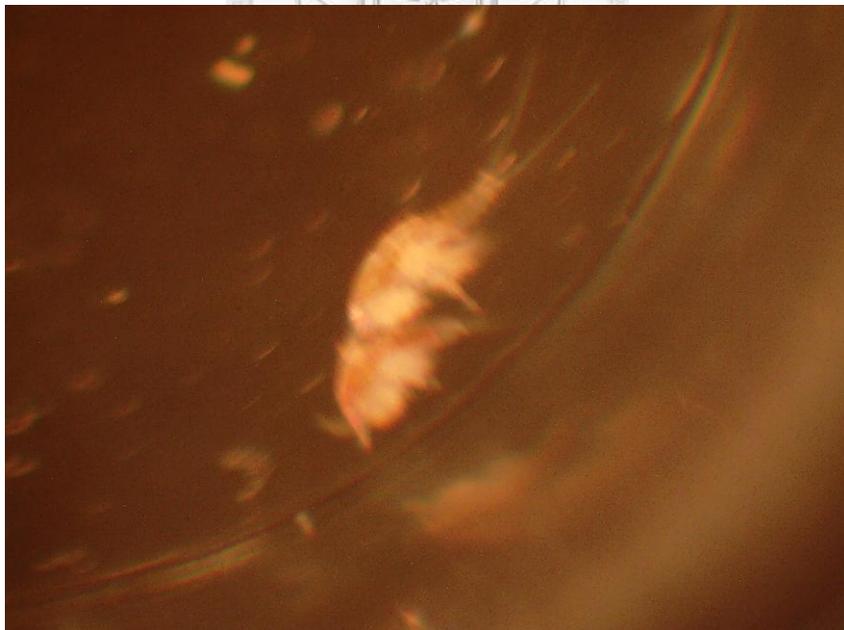


圖 3 交配中的虎斑猛水蚤 雄性利用特化的交尾觸角緊抓住雌性個體

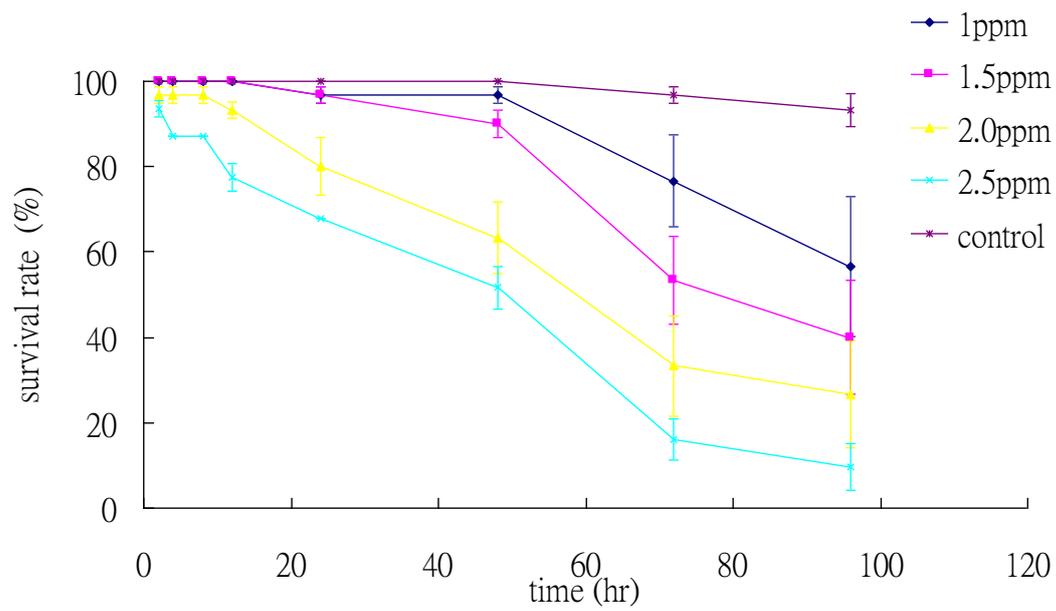


圖 4 急性毒試驗中，抱卵的雌性虎斑猛水蚤於不同靈丹濃度下之存活率。



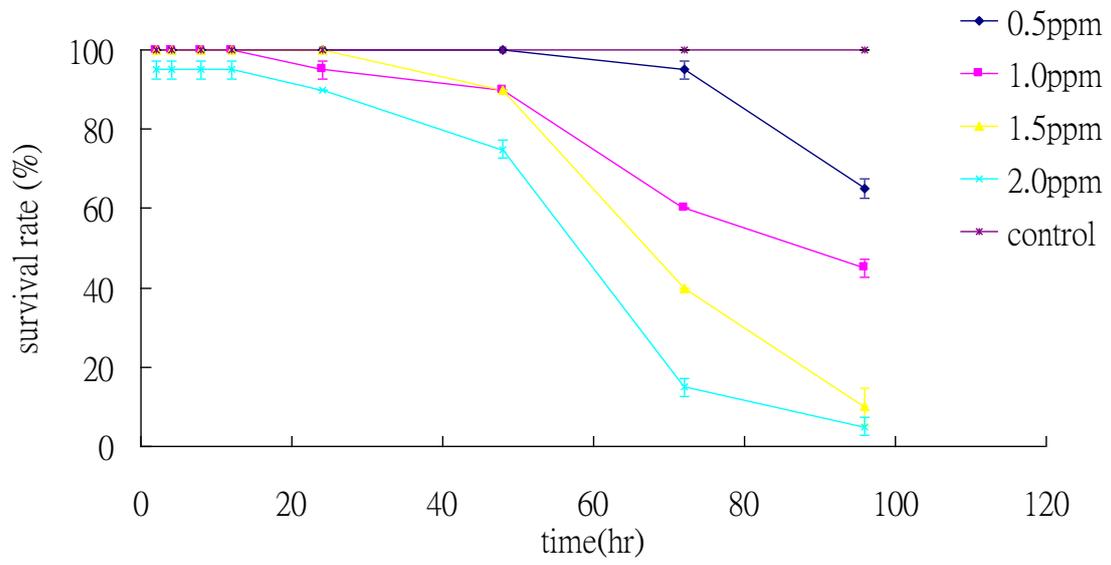


圖 5 急性毒試驗中，抱卵的雌性虎斑猛水蚤於不同可氣丹濃度下之存活率。



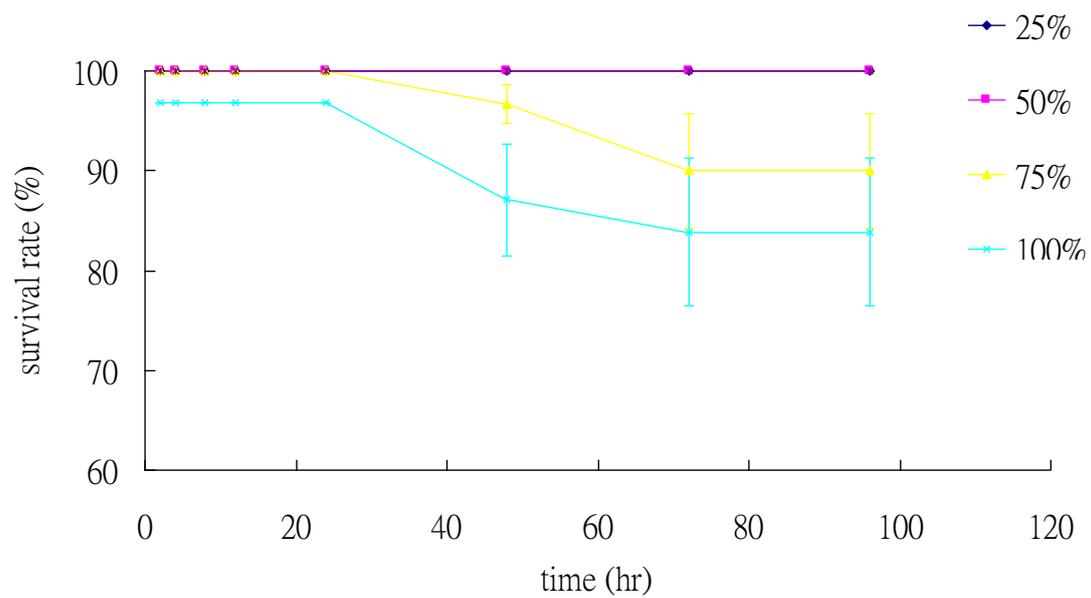


圖 6 急性毒試驗中，抱卵的雌性虎斑猛水蚤於不同超級柴油 WAF 濃度下之存活率。



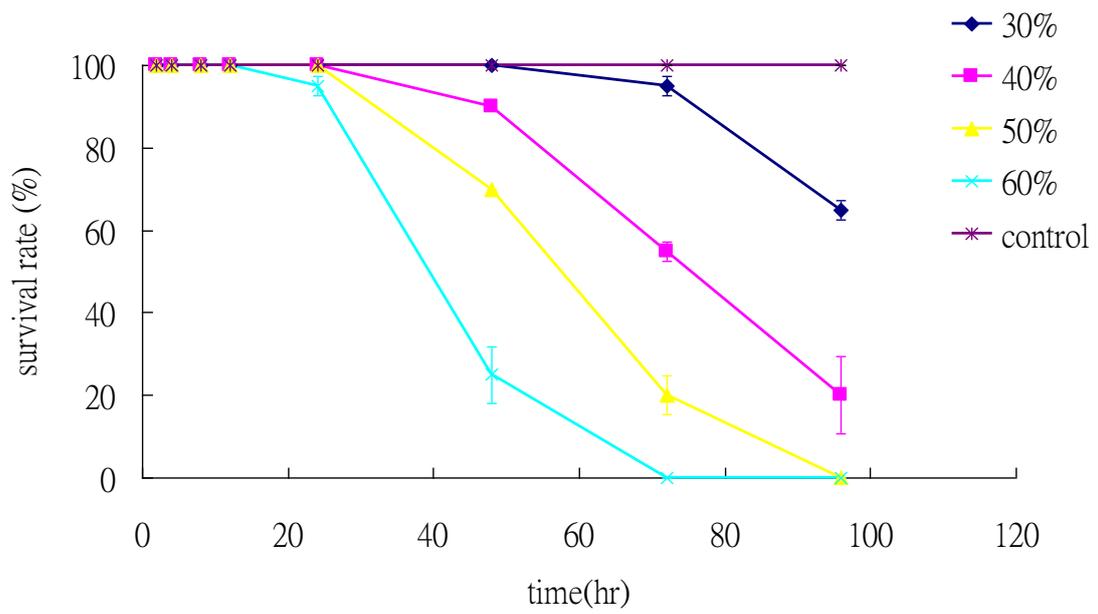


圖 7 急性毒試驗中抱卵的雌性虎斑猛水蚤於不同廢機油 WAF 濃度下之存活率。



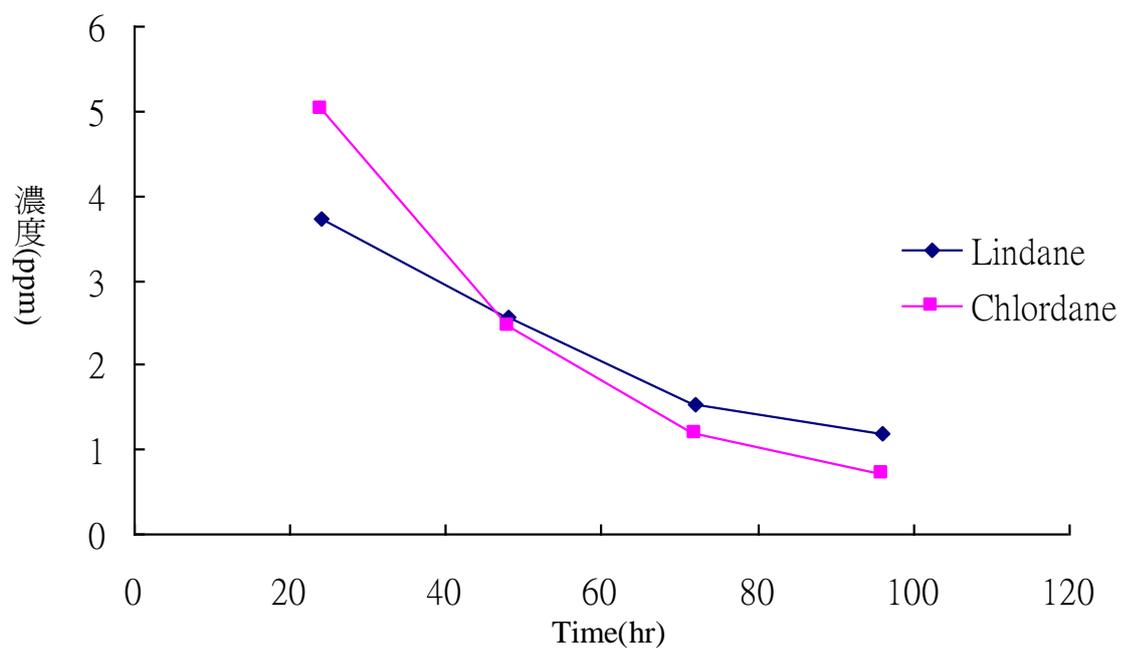


圖 8 急性毒試驗中，虎斑猛水蚤在不同時間點的半致死靈丹及可氣丹濃度。

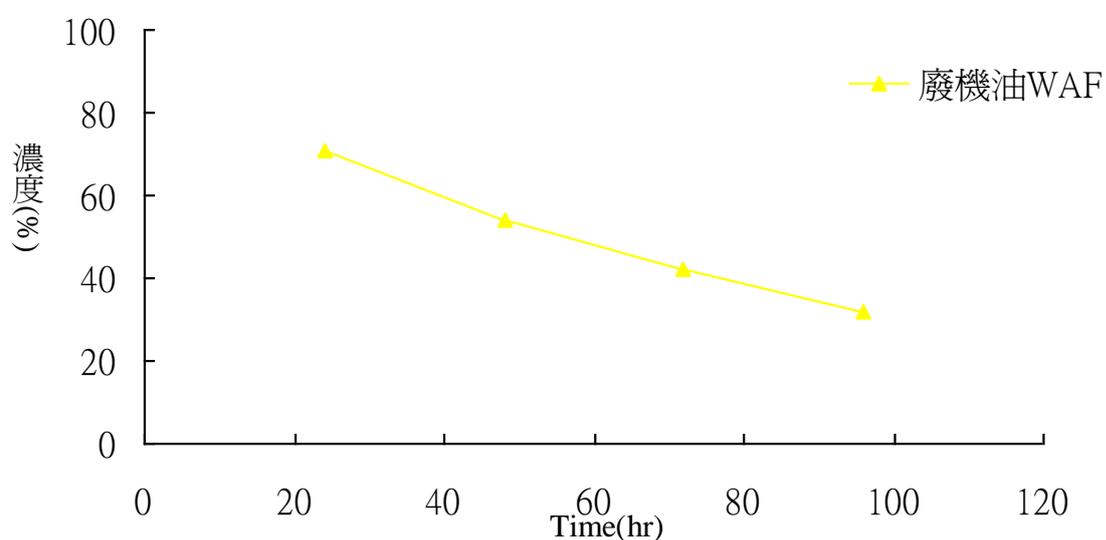


圖 9 急性毒試驗中，虎斑猛水蚤在不同時間點的半致死廢機油 WAF 濃度。

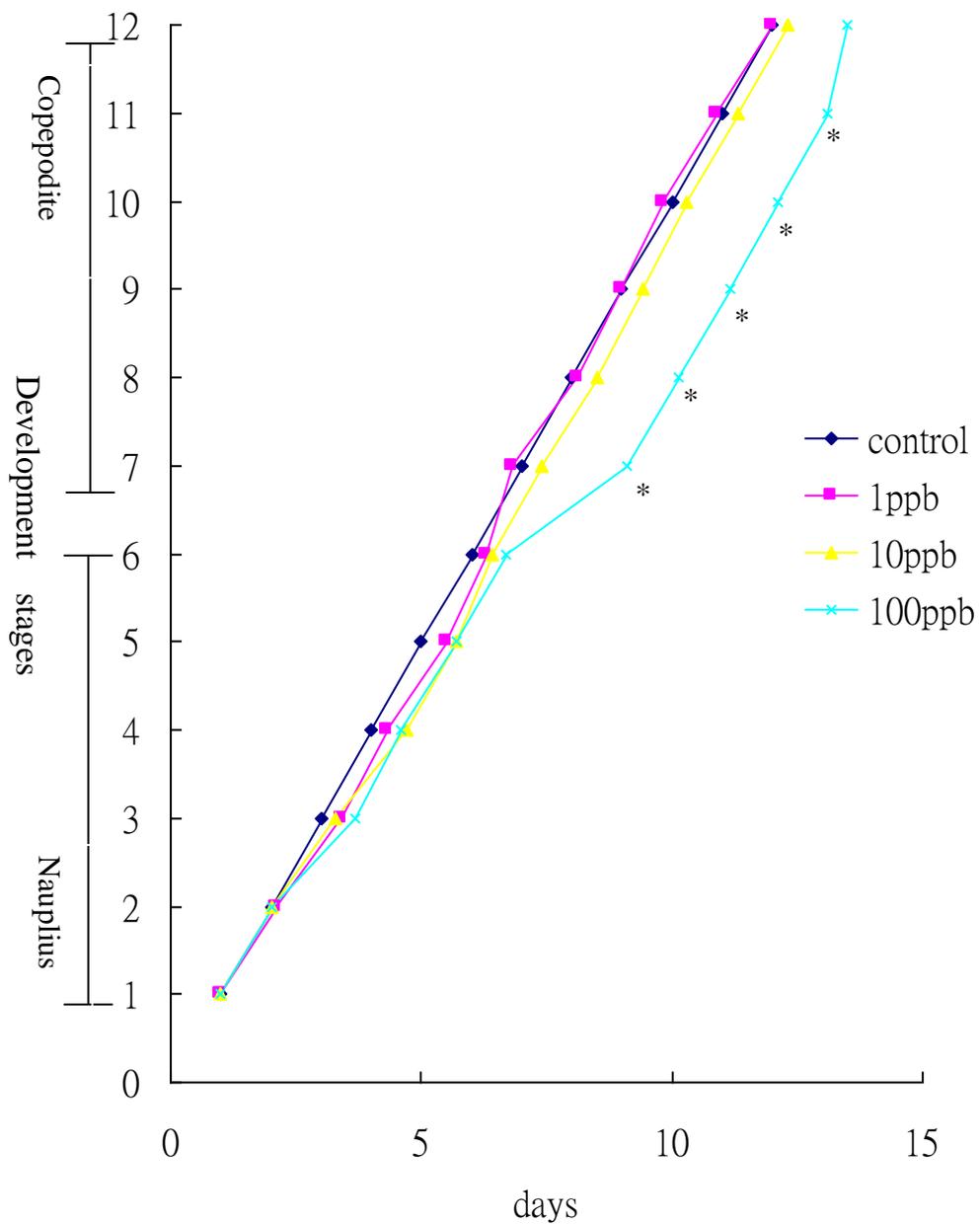


圖 10 成長試驗中，虎斑猛水蚤曝露於不同靈丹濃度下之脫殼時間，標示\*的組別表示與控制組有顯著差異存在( $p < 0.05$ )。

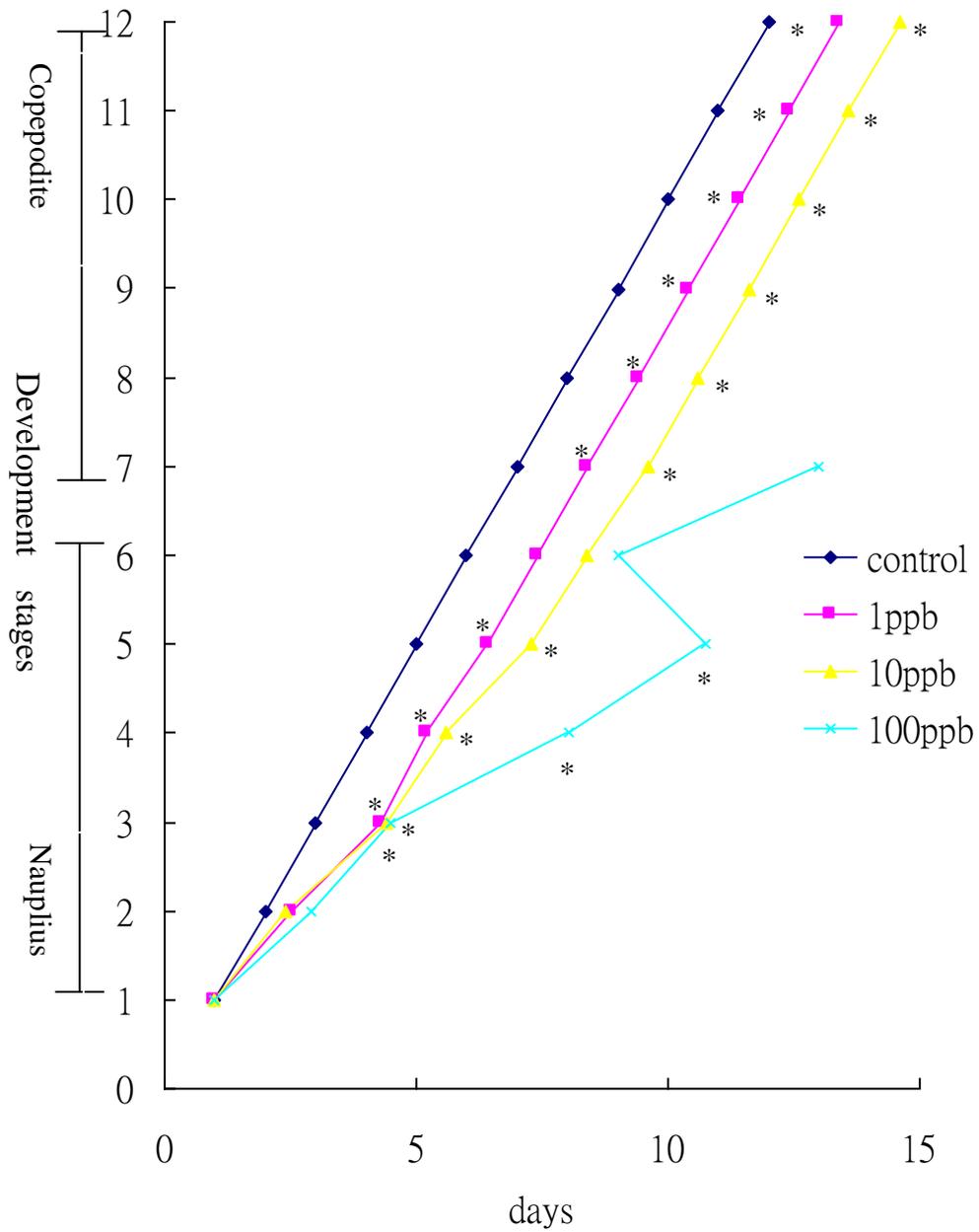


圖 11 成長試驗中，虎斑猛水蚤曝露於不同可氣丹濃度下之脫殼時間，標示\*的組別表示與控制組有顯著差異存在( $p < 0.05$ )，圖中 100ppb 的轉折係因為是驗個體的死亡所造成。

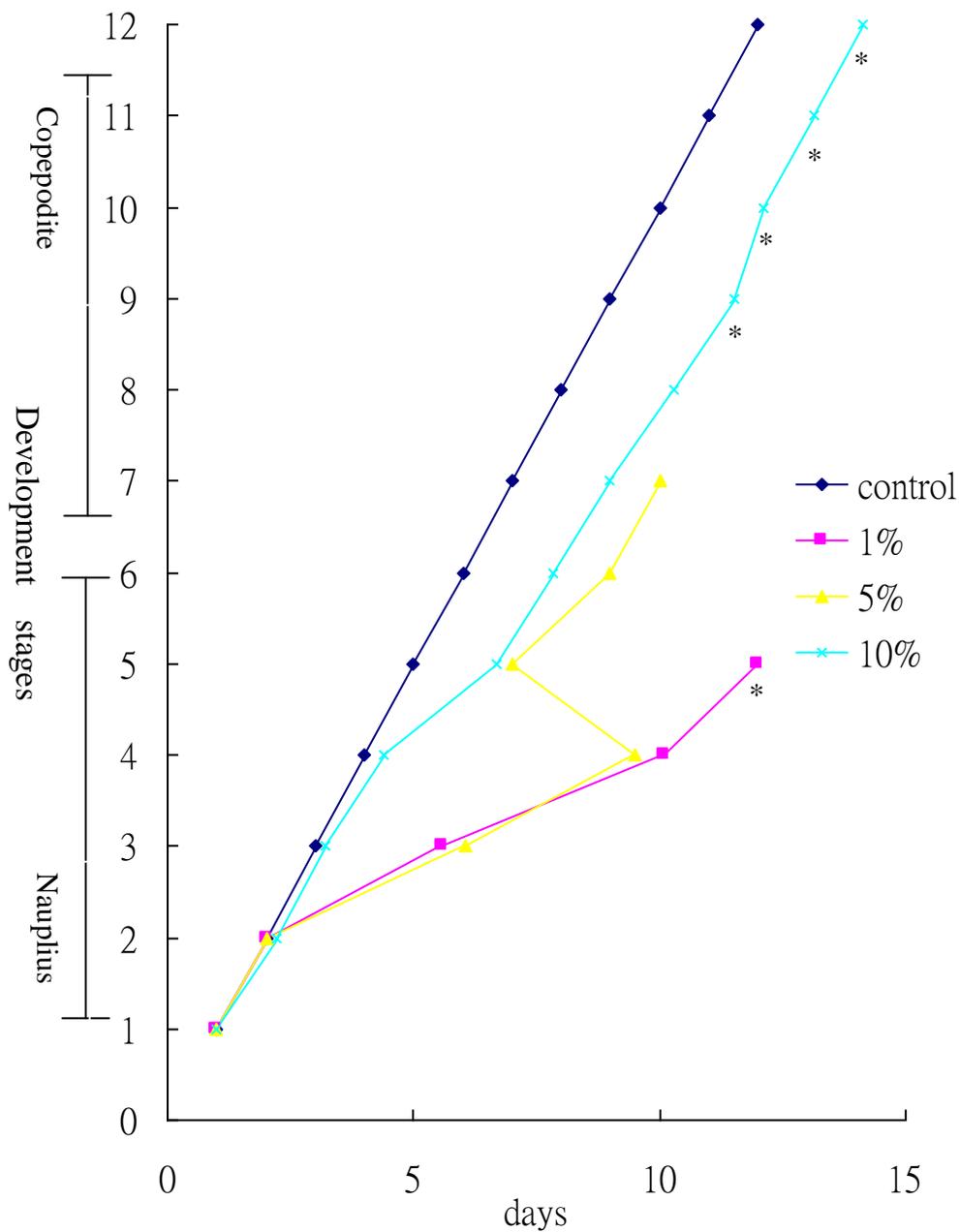


圖 12 成長試驗中，虎斑猛水蚤曝露於不同超級柴油 WAF 濃度下之脫殼時間，標示\*的組別表示與控制組有顯著差異存在( $p < 0.05$ )，圖中 5% 的轉折係因為是驗個體的死亡所造成。

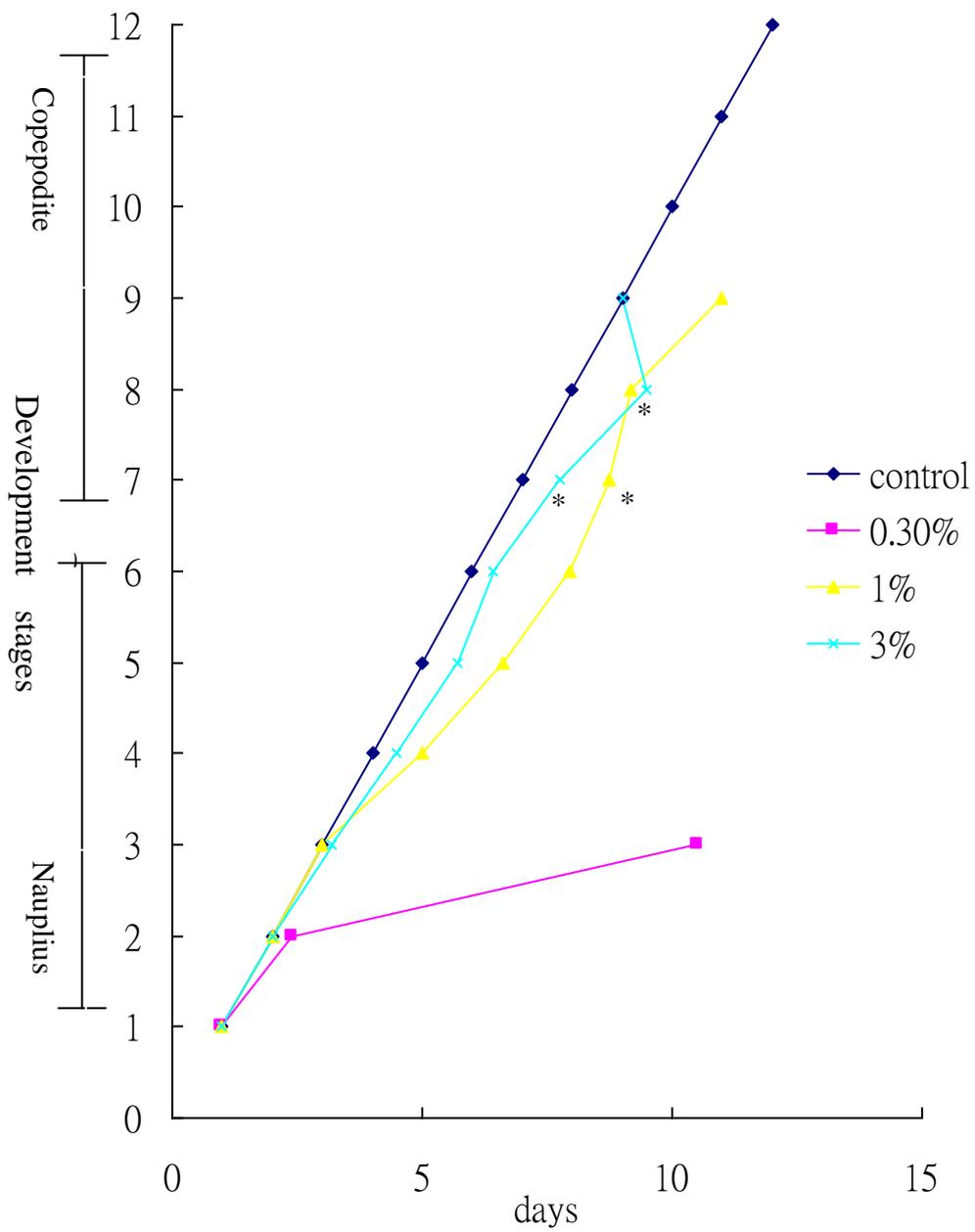


圖 13 成長試驗中，虎斑猛水蚤曝露於不同廢機油 WAF 濃度下之脫殼時間，標示\*的組別表示與控制組有顯著差異存在( $p < 0.05$ )。

表 1 急性毒試驗中，抱卵的雌性之虎斑猛水蚤於不同靈丹濃度下之存活數。

靈丹濃度 (Lindane)	重複	開始隻數	各時間點之存活隻數			
			24 小時	48 小時	72 小時	96 小時
0ppm	1	10	10	10	10	10
	2	10	10	10	9	8
	3	10	10	10	10	10
1.5ppm	1	10	10	10	9	8
	2	10	9	9	4	0
	3	10	10	10	10	9
1.5ppm	1	10	9	9	6	4
	2	10	10	8	2	0
	3	10	10	10	8	8
2.0ppm	1	10	6	4	3	1
	2	10	8	6	0	0
	3	10	10	9	7	7
2.5ppm	1	10	7	5	2	0
	2	10	7	7	0	0
	3	10	7	4	3	3

表 2 急性毒試驗中，抱卵的雌性之虎斑猛水蚤於不同可氣丹濃度下之存活數。

可氣丹濃度 (Chlordane)	重複	開始隻數	各時間點之存活隻數			
			24 小時	48 小時	72 小時	96 小時
0ppm	1	10	10	10	10	10
	2	10	10	10	10	10
0.5ppm	1	10	10	10	9	6
	2	10	10	10	10	7
1.0ppm	1	10	9	9	6	4
	2	10	10	9	6	5
1.5ppm	1	10	10	9	4	2
	2	10	10	9	4	0
2.0ppm	1	10	9	8	2	1
	2	10	9	7	1	0

表 3 急性毒試驗中，抱卵的雌性之虎斑猛水蚤於不同超級柴油 WAF 濃度下之存活數。

超級柴油 WAF 濃度	重複	開始隻數	各時間點之存活隻數			
			24 小時	48 小時	72 小時	96 小時
0%	1	10	10	10	10	10
	2	10	10	10	10	10
	3	10	10	10	10	10
25%	1	10	10	10	10	10
	2	10	10	10	10	10
	3	10	10	10	10	10
50%	1	10	10	10	10	10
	2	10	10	10	10	10
	3	10	10	10	10	10
75%	1	10	10	10	10	10
	2	10	10	10	10	10
	3	10	10	9	7	7
100%	1	10	10	10	10	10
	2	10	10	10	10	10
	3	10	10	7	6	6

表 4 急性毒試驗中，抱卵的雌性之虎斑猛水蚤於不同廢機油 WAF 濃度下之存活數。

廢機油 WAF 濃度	重複	開始隻數	各時間點之存活隻數			
			24 小時	48 小時	72 小時	96 小時
0%	1	10	10	10	10	10
	2	10	10	10	10	10
30%	1	10	10	10	9	7
	2	10	10	10	10	6
40%	1	10	10	9	6	0
	2	10	10	9	5	4
50%	1	10	10	7	3	0
	2	10	10	7	1	0
60%	1	10	10	1	0	0
	2	10	9	4	0	0

表 5 急性毒試驗中，抱卵的雌性之虎斑猛水蚤於不同時間點的靈丹、可氣丹、超級柴油 WAF 以及廢機油 WAF 之 LC50(95%信賴區間)。

曝露時間 (小時)	24	48	72	96
靈丹 (Lindane)	3.72ppm (2.33-5.93)	2.56ppm (2.11-3.10)	1.52ppm (1.33-1.75)	1.19ppm (0.96-1.46)
可氣丹 (Cholrdane)	5.00ppm (3.54-7.08)	2.46ppm (1.96-3.10)	1.20ppm (1.01-1.42)	0.71ppm (0.56-0.91)
超級柴油 WAF	無	無	無	無
廢機油 WAF	70.88% (65.90-76.23)	53.97% (47.84-60.88)	41.93% (28.89-45.21)	32.13% (27.77-37.17)

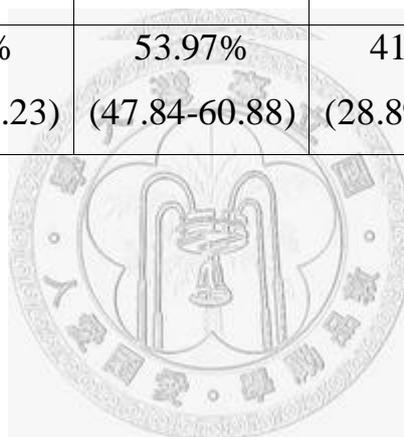


表 6 虎斑猛水蚤曝露於不同靈丹濃度下之脫殼時間(第幾天數)。每個濃度有 2 重複。

濃度		0ppb		1ppb		10ppb		100ppb	
重複		1	2	1	2	1	2	1	2
脫殼次數	1	2.00	2.00	2.20	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
	2	3.00	3.00	3.60	3.20	3.40	3.20	3.80	3.60
	3	4.00	4.00	4.40	4.20	5.00	4.20	4.60	4.60
	4	5.00	5.00	5.80	5.20	6.00	5.40	5.80	5.60
	5	6.00	6.00	6.60	6.00	6.80	6.00	6.80	6.60
	6	7.00	7.00	7.00	6.60	7.80	7.00	8.60	9.60
	7	8.00	8.00	8.20	8.00	8.80	8.20	9.80	10.50
	8	9.00	9.00	9.00	9.00	9.80	9.00	10.80	11.50
	9	10.00	10.00	9.80	9.80	10.80	9.80	11.70	12.50
	10	11.00	11.00	11.00	10.80	11.80	10.80	12.67	13.50
	11	12.00	12.00	12.00	12.00	12.80	11.80	12.50	14.50

表 7 虎斑猛水蚤曝露於不同靈丹濃度下之平均脫殼時間(第幾天數)。

標示\*的組別表示與控制組有顯著差異存在( $p < 0.05$ )。

濃度	0ppb	1ppb	10ppb	100ppb	P 值	
脫殼次數	1	2.00±0	2.00±0	2.10±0.02	2.00±0	0.4789
	2	3.00±0	3.40±0.08	3.30±0.02	3.70±0.02	0.0655
	3	4.00±0	4.30±0.02	4.70±0.18	4.60±0	0.1069
	4	5.00±0	5.50±0.18	5.70±0.18	5.70±0.02	0.2193
	5	6.00±0	6.30±0.18	6.40±0.32	6.70±0.02	0.3943
	6	7.00±0	6.80±0.08	7.40±0.32	9.10±0.50*	0.0260
	7	8.00±0	8.10±0.02	8.50±0.18	10.50±0.25*	0.0088
	8	9.00±0	9.00±0	9.40±0.32	11.15±0.25*	0.0123
	9	10.00±0	9.80±0	10.30±0.50	12.13±0.28*	0.0191
	10	11.00±0	10.90±0.02	11.30±0.50	13.08±0.35*	0.0265
	11	12.00±0	12.00±0	12.30±0.50	13.50±2.00	0.3163

表 8 虎斑猛水蚤曝露於不同可氣丹濃度下之脫殼時間(第幾天數)。每個濃度有 2 重複，該組無任何個體存活則以--表示。

濃度 重複		0ppb		1ppb		10ppb		100ppb	
		1	2	1	2	1	2	1	2
脫殼 次數	1	2.00	2.00	2.20	2.20	2.00	2.80	3.00	2.80
	2	3.00	3.00	4.20	4.40	4.00	4.80	4.80	4.20
	3	4.00	4.00	5.20	5.20	5.40	5.80	7.60	8.50
	4	5.00	5.00	6.00	6.80	6.80	7.80	10.50	11.00
	5	6.00	6.00	6.80	8.00	7.80	9.00	9.00	--
	6	7.00	7.00	7.80	9.00	9.20	10.00	13.00	--
	7	8.00	8.00	8.80	10.00	10.20	11.00	--	--
	8	9.00	9.00	9.80	11.00	11.20	12.00	--	--
	9	10.00	10.00	10.80	12.00	12.20	13.00	--	--
	10	11.00	11.00	11.80	13.00	13.20	14.00	--	--
	11	12.00	12.00	12.80	14.00	14.20	15.00	--	--

表 9 虎斑猛水蚤曝露於不同可氣丹濃度下之平均脫殼時間(第幾天數)，標示\*的組別表示與控制組有顯著差異存在( $p < 0.05$ )，該組無任何個體存活則以--表示。

濃度	0ppb	1ppb	10ppb	100ppb	P 值	
脫殼次數	1	2.00±0	2.50±0.18	2.40±0.32	2.90±0.02	0.2427
	2	3.00±0	4.30±0.02*	4.40±0.32*	4.50±0.18*	0.0392
	3	4.00±0	5.20±0*	5.60±0.08*	8.50±04*	0.0014
	4	5.00±0	6.40±0.32*	7.30±0.5*	10.750±0.13*	0.0012
	5	6.00±0	7.40±0.72	8.40±0.72	9.00	0.0909
	6	7.00±0	8.40±0.72*	9.60±0.32*	13.00	0.0131
	7	8.00±0	9.40±0.72*	10.60±0.32*	--	0.0486
	8	9.00±0	10.40±0.72*	11.60±0.32*	--	0.0486
	9	10.00±0	11.40±0.72*	12.60±0.32*	--	0.0486
	10	11.00±0	12.40±0.72*	12.60±0.32*	--	0.0486
	11	12.00±0	13.40±0.72*	12.60±0.32*	--	0.0486

表 10 虎斑猛水蚤曝露於不同超級柴油 WAF 濃度下之脫殼時間(第幾天數)。每個濃度有 2 重複，該組無任何個體存活則以--表示。

濃度		0%		1%		5%		10%	
重複		1	2	1	2	1	2	1	2
脫殼次數	1	2.00	2.00	2.00	2.00	6.40	2.00	2.20	2.20
	2	3.00	3.00	3.75	7.40	9.50	5.75	3.20	3.20
	3	4.00	4.00	9.50	10.67	7.00	--	4.60	4.20
	4	5.00	5.00	12.00	--	9.00	--	5.60	7.75
	5	6.00	6.00	--	--	10.00	--	7.20	8.50
	6	7.00	7.00	--	--	--	--	8.00	10.00
	7	8.00	8.00	--	--	--	--	9.60	11.00
	8	9.00	9.00	--	--	--	--	11.00	12.00
	9	10.00	10.00	--	--	--	--	11.25	13.00
	10	11.00	11.00	--	--	--	--	12.25	14.00
	11	12.00	12.00	--	--	--	--	13.25	15.00

表 11 虎斑猛水蚤曝露於不同超級柴油 WAF 濃度下之平均脫殼時間(第幾天數)，標示\*的組別表示與控制組有顯著差異存在( $p < 0.05$ )，該組無任何個體存活則以--表示。

濃度		0%	1%	5%	10%	P 值
脫殼次數	1	2.00±0	2.00±0	2.10±0	2.20±0	#NUM!
	2	3.00±0	5.56±6.66	6.08±0.21	3.20±0	0.1624
	3	4.00±0	10.08±0.68*	9.50	4.40±0.49	0.0026
	4	5.00±0	12.00	7.00	6.68±2.31	0.0960
	5	6.00±0	--	9.00	7.85±0.85	0.1096
	6	7.00±0	--	10.00	9.00±2	0.2174
	7	8.00±0	--	--	10.30±0.98	0.1881
	8	9.00±0	--	--	11.50±0.5*	0.0003
	9	10.00±0	--	--	12.13±1.53*	0.0003
	10	11.00±0	--	--	13.13±1.53*	0.0003
	11	12.00±0	--	--	14.13±1.53*	0.0003

表 12 虎斑猛水蚤曝露於不同廢機油 WAF 濃度下之脫殼時間(第幾天數)。每個濃度有 2 重複，該組無任何個體存活則以--表示。

濃度		0%		0.3%		1%		3%	
重複		1	2	1	2	1	2	1	2
脫殼次數	1	2.00	2.00	2.40	2.40	2.00	2.00	2.00	2.00
	2	3.00	3.00	10.50	--	3.00	3.00	3.20	3.20
	3	4.00	4.00	--	--	5.80	4.20	4.40	4.60
	4	5.00	5.00	--	--	7.67	5.60	5.80	5.60
	5	6.00	6.00	--	--	8.67	7.20	6.25	6.60
	6	7.00	7.00	--	--	9.0	8.50	7.50	8.00
	7	8.00	8.00	--	--	9.00	9.33	9.50	--
	8	9.00	9.00	--	--	--	11.00	9.00	--
	9	10.00	10.00	--	--	--	--	--	--
	10	11.00	11.00	--	--	--	--	--	--
	11	12.00	12.00	--	--	--	--	--	--

表 13 虎斑猛水蚤曝露於不同廢機油 WAF 濃度下之平均脫殼時間(第幾天數)，標示\*的組別表示與控制組有顯著差異存在( $p<0.05$ )，該組無任何個體存活則以--表示。

濃度	0%	0.3%	1%	3%	P 值	
脫殼次數	1	2.00±0	2.40±0	2.00±0	2.00±0	#NUM!
	2	3.00±0	10.50	3.00±0	3.20±0	#NUM!
	3	4.00±0	--	5.00±1.28	4.50±0.02	0.4249
	4	5.00±0	--	6.63±2.14	5.70±0.02	0.2971
	5	6.00±0	--	7.93±1.08	6.43±0.06	0.1003
	6	7.00±0	--	8.75±0.16*	7.75±0.16*	0.0205
	7	8.00±0	--	9.17±0.05*	9.5	0.0266
	8	9.00±0	--	11	9	#NUM!
	9	10.00±0	--	--	--	#NUM!
	10	11.00±0	--	--	--	#NUM!
	11	12.00±0	--	--	--	#NUM!

表 14 雌性虎斑猛水蚤曝露於不同靈丹濃度下之生殖表現，標示\*的組別表示與控制組有顯著差異存在(p<0.05)。

靈丹濃度 (Lindane)	第一次 抱卵時間	30 天內 抱卵數	孵化幼體數
0	3.33±0.33	6.33±0.33	12.38±0.07
1ppb	8.33±26.33	5±1	3.43±0.67*
10ppb	6.33±0.33*	6±0	5.22±0.26*
100ppb	16.33±8.33*	3.33±2.33*	4.56±2.96*

表 15 雌性虎斑猛水蚤曝露於不同可氣丹濃度下之生殖表現，標示\*的組別表示與控制組有顯著差異存在(p<0.05)。

可氣丹濃度 (Chlordane)	第一次 抱卵時間	30 天內 抱卵數	孵化幼體數
0	3.33±0.33	6.33±0.33	12.38±0.07
1ppb	10±12*	5±1	6.84±1.19*
10ppb	7.33±1.33*	5±4	5.34±8.03*
100ppb	7±0*	4±1*	3.44±0.04*

表 16 雌性虎斑猛水蚤曝露於不同超級柴油 WAF 濃度下之生殖表現，標示\*的組別表示與控制組有顯著差異存在(p<0.05)。

超級柴油 WAF 濃度	第一次抱卵時間	30 天內抱卵數	孵化幼體數
0%	3.33±0.33	6.33±0.33	12.38±0.07
1%	7.5±0.5	5±2	4.42±0.35*
5%	10.67±30.33	6±1	2.08±8.59*
10%	9.33±10.33	4.33±0.33*	2.18±3.85*

表 17 雌性虎斑猛水蚤曝露於不同廢機油 WAF 濃度下之生殖表現，標示\*的組別表示與控制組有顯著差異存在(p<0.05)。

廢機油 WAF 濃度	第一次抱卵時間	30 天內抱卵數	孵化幼體數
0	3.33±0.33	6.33±0.33	12.38±0.07
0.3%	10±12*	5±1	1.07±3.41*
1%	5.67±2.33	6±0	2.58±10.65*
3%	6.67±0.33*	3.33±2.33*	4.31±1.78*