

三種殺菌劑對除草劑達有龍在茶園土壤中之降解及土壤菌相的影響

李志展¹、王詠平¹、劉濬豪¹、顏瑞泓^{1*}

摘要

李志展、王詠平、劉濬豪、顏瑞泓。2023。三種殺菌劑於茶園土壤中對除草劑達有龍之降解及土壤菌相的影響。臺灣農藥科學 15 : 37-54。

現代農業為減少人力常混合或連續施用農藥，使得田間同時殘留不同種類的農藥，其中殺菌劑的施用可能會衝擊土壤微生物族群，進而影響微生物除草劑的降解及流布。本研究為探討茶園土壤中施用三種殺菌劑，免賴得 (benomyl)、得克利 (tebuconazole) 及三泰芬 (triadimefon) 對除草劑達有龍 (diuron) 在土壤中降解及對土壤菌相之影響，因此以不同殺菌劑與除草劑達有龍混合施用於土壤中進行孵育試驗。結果顯示達有龍在滅菌土壤中的降解速率比未滅菌土壤慢，顯示達有龍是以微生物性降解為主，此為文獻中已經證實的藥劑特性，在本研究中可作為可信度的對照處理。以免賴得及達有龍 10 倍推薦施用量下之處理使達有龍的持久性略微增加 (達有龍 DT₅₀ 自 125.07 天增加為 141.59 天)。50 倍推薦施用量下，免賴得加達有龍及三泰芬加達有龍處理使達有龍在土壤中之持久性顯著的增加 (達有龍 DT₅₀ 自 166.65 天增加為 231.48 天及 238.46 天)。10 倍推薦施用量處理偵測到達有龍之代謝產物 *N'*-[3,4-di-chlorophenyl]-*N,N*-methylurea (DCPMU)，50 倍推薦施用量處理中偵測到 DCPMU 及 *N'*-3,4-dichloro-phenylure (DCPU)，而代謝產物之濃度隨孵育時間逐漸上升，顯示達有龍之代謝產物有累積的可能性。50 倍推薦施用量下免賴得施加於土壤中明顯的抑制 DCPMU 的生成，進而造成達有龍降解速率趨緩。菌相及聚類分析結果顯示在 10 倍推薦施用量下，單獨施用達有龍、得克利加達有龍及三泰芬加達有龍處理 可以促進土壤中細菌族群的豐富度。免賴得加達有龍相較其他三種處理，對土壤菌相的衝擊較大。50 倍推薦施用量下，於試驗末期可以看出免賴得加達有龍及三泰芬加達有龍處理對菌相的衝擊是比較大的，進而推論達有龍降解速率的趨緩為殺菌

接受日期：2023 年 9 月 22 日

* 通訊作者。E-mail: sonny@ntu.edu.tw

¹ 臺北市 國立臺灣大學農業化學系

劑影響菌相族群結構所造成。達有龍在土壤中與殺菌劑共同存在所產生的相互作用，可能會導致達有龍在土壤中的持久性增長。因此在施用達有龍的茶園土壤中，應審慎評估達有龍與殺菌劑間的效應，而避免達有龍於環境中的殘留。

關鍵詞：達有龍、降解、持久性、殺菌劑、土壤菌相

前言

臺灣茶園常多次、大量的施用除草劑、殺蟲劑及殺菌劑於作物雜草及病蟲害防治，因此常有各種藥劑同時存在於土壤的情形。殺菌劑及殺蟲劑的施用可能會衝擊土壤微生物族群，進而影響除草劑的降解速率與在環境中的流布。前人研究發現不同除草劑與殺蟲劑使藥劑間產生相互作用，會影響除草劑對不同種類的雜草防除效果⁽⁹⁾，另有研究發現當除草劑異丙隆 (isoproturon) 及莫多草 (metolachlor) 與殺菌劑四氯異苯腈 (chlorothalonil) 一起使用，會使異丙隆及莫多草在土壤中的持久性增加^(7, 27) 但其殘留的時間在表土與底土間有不同程度的影響，而其原因可能在於不同藥劑的施用頻率及用藥濃度對整體微生物族群綜合影響的結果。

除草劑於土壤中的持久性增加，可能造成持效性的增加或對環境衝擊時間延長的影響；除草劑持久性增長而導致藥效增加的同時，也造成除草劑藉由地表水逕流或地下水進入環境的可能性提高，進而影響環境生態。臺灣茶園多位於山坡地且通常靠近集水區，在農民過度除草，土壤失去植被保護下，使得施用之除草劑與其他

各種農藥隨之流失，而造成除草劑等土壤施用型農藥，隨流失之水土而污染到下游水源，影響人類飲用水的品質，危害到人體的健康。

本研究所選擇之藥劑皆為茶園登記用藥。達有龍 (diuron, 3-(3,4-Dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) 屬苯尿素系 (phenylurea) 且不具選擇性的移行型除草劑。達有龍主要作用機制為抑制光合作用中光反應系統 II (photosystem II) 之電子傳遞鏈而中斷光合作用，進而造成植物死亡。達有龍在土壤中的 DT₅₀ (half-degradation time) 長達一個月至一年^(2, 6)，藉由達有龍在滅菌組土壤與無滅菌土壤中的降解情形，確定達有龍主要降解途徑為微生物降解。達有龍在好氧情況下，經由生物降解的主要產物有 DCPMU, DCPU 及 3,4-dichloroaniline (DCA)。研究指出達有龍及其代謝產物 DCPMU 及 DCA 對藻類及水蚤 (*D. magna*) 有毒性^(4, 5, 10, 14)。且許多文獻指出不論是土壤、底泥及水體中偵測到達有龍的存在⁽⁶⁾，顯示達有龍移動至環境中的能力。因此了解達有龍與其代謝產物在環境中的持久性及流布是重要的議題。

免賴得 (benomyl, Methyl 1-(butyl-

carbamoyl) benzimidazole-ol-2-yl-carbamate) 為苯並咪唑系 (benzimidazole) 的系統型殺菌劑。免賴得毒害機制為抑制細胞有絲分裂，進而使真菌受到毒害。免賴得對哺乳動物急毒性低，但有研究指出免賴得對雄大鼠睪丸毒性極為明顯且雌性生殖器官如子宮亦有雄性素受體作用⁽³⁾，因此推論免賴得對大鼠生殖毒性之作用機制可能與內分泌干擾作用有關，而研究證實免賴得於生物體內的代謝產物貝芬替能模仿雄性激素與受體結合⁽¹⁾，為內分泌干擾物質 (endocrine disrupting chemicals, EDCs)。

得克利 (tebuconazole, (RS)-1-*p*-Chlorophenyl-4,4-dimethyl-3-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl methyl) pentan-3-ol) 及三泰芬 (triadimefon, (RS)-1-(4-chlorophenoxy)-3,3-dimethyl-1-(1*H*-1,2,4-triazol-1-yl) butan-2-one) 為三唑系 (triazole) 的系統型殺菌劑，其作用機制為抑制麥角固醇 (ergosterol) 的生合成，能有效抑制子囊菌 (ascomycete) 及擔子菌 (basidiomycete) 的生長。前人研究指出三唑系殺菌劑會導致老鼠的細胞增生和改變其膽固醇濃度⁽²⁶⁾，除此之外，三唑系殺菌劑也會影響動物許多細胞色素的活性和表現型^(22, 23)，且三唑系殺菌劑會抑制芳香環轉化酶 (aromatase) 而影響雄性激素轉換成雌性激素。因此三唑系之殺菌劑大部分被視為 EDCs。

而近年來利用變性梯度凝膠電泳 (denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)，藉由菌體的基因層級來探討菌相

的變化，可以了解外來物質對菌相直接的衝擊。因此本研究之目的為探討在茶園土壤中，達有龍與殺菌劑混合施用下，是否會影響達有龍在土壤中的持久性以及利用 DGGE 技術探討農藥施加對土壤菌相結構的衝擊。

材料與方法

一、土壤樣品及採集地點

本試驗所使用的土壤樣品是採自於國立臺灣大學生物暨資源學院實驗林管理處，南投縣鹿谷鄉清水溝營區第 12 林班 44 地號之茶園土壤。採集表土約 20 cm 深度之土壤樣品，於試驗前將其風乾、研磨後過 2 mm 篩網後均勻混和，以進行土壤基本性質測定及後續試驗。所測得之土壤 pH (1:1) 為 3.72 ± 0.02 ，有機質為 74.9 ± 1.4 g Kg⁻¹，田間含水量為 $22.63 \pm 0.08\%$ ，陽離子交換容量 (CEC) 為 17.4 ± 0.2 cmol Kg⁻¹，黏粒含量百分比為 $7.67 \pm 3.16\%$ ，粉粒含量百分比為 $29.232 \pm 0.05\%$ ，砂粒含量百分比為 $63.10 \pm 1.21\%$ ，為砂質黏壤土，經比對土壤調查報告，為南富系 (Nan Fu series, Naf) 之土壤。

二、土壤孵育及藥劑添加

精秤 11 g 之過篩風乾土放入 50-mL 離心管中，調整水分含量至田間含水量，放置 28°C 培養箱孵育 10 天後，始進行藥劑

處理。施用除草劑及殺菌劑皆為 10 倍 (達有龍 10 mg kg⁻¹、免賴得 5 mg kg⁻¹、得克利 2 mg kg⁻¹、三泰芬 2 mg kg⁻¹) 或 50 倍 (達有龍 50 mg kg⁻¹、免賴得 25 mg kg⁻¹、得克利 10 mg kg⁻¹、三泰芬 10 mg kg⁻¹) 的農藥推薦施用量於孵育 10 天之土壤中，施用劑型分別為達有龍 (D)、免賴得+達有龍 (B+D)、得克利+達有龍 (Te+D) 及三泰芬+達有龍 (Tr+D) 等共 8 種處理，另外添加丙酮溶劑的對照組，每種處理皆為四重複。添加藥劑後，震盪、搖晃使藥劑均勻分布後，待溶劑揮發，隨後放置 28°C 培養箱中避光孵育。於試驗的第 0, 1, 3, 7, 10, 14, 21, 35, 49, 63, 77, 91, 119 及 147 天進行土壤農藥殘量之萃取及取其中約 1.4 g 之土壤進行土壤微生物核酸萃取 (部分組別於第 105 天有取樣進行分析)，以進行菌相之分析。試驗期間定期調整水分至田間含水量。

三、農藥殘量分析

加入 5 mL 乙腈，旋緊蓋後震盪 3 分鐘。以 5,000 rpm 離心 10 分鐘，以 0.45 μm 濾膜過濾上清液，收集濾液；再加入 5 mL 乙腈重複上述步驟再萃取一次，最後以乙腈定量至 10 mL。利用 HPLC-DAD 以 18C reverse 管柱分離農藥並測定免賴得 (偵測波長：205 nm、動相：水：乙腈 (65：35，v v⁻¹)、流速：1.00 mL min⁻¹、注入體積：40 μL)，得克利 (偵測波長：205 nm、動相：水：乙腈 (50：50，v v⁻¹)、

流速：1.00 mL min⁻¹、注入體積：40 μL)，三泰芬 (偵測波長：205 nm、動相：水：乙腈 (50：50，v v⁻¹)、流速：1.00 mL min⁻¹、注入體積：40 μL) 及達有龍 (偵測波長：252 nm、動相：水：乙腈 (65：35，v v⁻¹)、流速：1.00 mL min⁻¹、注入體積：40 μL) 的殘留量及達有龍代謝產物 DCPMU (偵測波長：252 nm、動相：水：乙腈 (65：35，v v⁻¹)、流速：1.00 mL min⁻¹、注入體積：40 μL)，DCPU (偵測波長：252 nm、動相：水：乙腈 (65：35，v v⁻¹)、流速：1.00 mL min⁻¹、注入體積：40 μL) 及 DCA (偵測波長：252 nm、動相：水：乙腈 (50：50，v v⁻¹)、流速：1.00 mL min⁻¹、注入體積：40 μL)。

10 倍推薦施用量之農藥於茶園土壤中之回收率，達有龍 77.64±2.38%、免賴得 70.19±3.94%、得克利 106.8±15.6%、三泰芬 83.15±9.63%，50 倍推薦施用量之回收率，達有龍 82.42±3.64%、免賴得 72.26±7.19%、三泰芬 92.09±9.87%。

四、土壤微生物 DNA 萃取及 PCR 放大 16S rDNA 片段

土壤微生物 DNA 依照 MO BIO Laboratories 公司出品的 UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit 進行萃取。萃取出之土壤微生物 DNA 以聚合酶鏈鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR) 擴增土壤中微生物菌群 16S rRNA 基因片段。本研究使用引子 (primers) 分別為 1401R

及 968F。為了使 PCR 產物在 DGGE 實驗中不會因為完全變性而分離成兩條單股的 DNA，本研究將一段約 40 bps 的 GC-clamp^(12,19) 添加於 forward primer 的 5' 端上。PCR 以 40 個循環放大 DNA 片段。

五、變性梯度凝膠電泳 (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)

在本研究中使用 DGGE 來觀察除草劑與殺菌劑混和施用下，於降解過程中微生物菌相的改變。先以推膠器製造出 40-60% 變性梯度凝膠。取經過 PCR 擴增的 16S rDNA 產物 20 μ L，注入變性凝膠片中，於 7 L TAE 緩衝溶液水槽中以固定電壓 60 V、60°C 下進行電泳 12 小時。電泳結束後，將膠片置於含 SYBR Green I 之染色盒中，避光緩慢搖晃染色 30 分鐘，染色結束後在 UV 燈下以數位相機拍攝取得電泳結果。

六、統計及聚類分析

利用一級動力方程式計算除草劑及殺菌劑的 DT₅₀，並利用 SAS learning edition 4.1 統計程式，以 t 檢定判斷除草劑降解速率之差異。DGGE 指紋圖譜上各電泳欄間亮帶之比對乃採用 Bio-Rad 公司所提供之 Quantity one 統計分析軟體，並以 UPGMA 演算法 (Unweighted pair-group method using arithmetic averages) 進行聚

類分析，建立親緣關係樹狀圖 (dendrogram)，以瞭解其中微生物族群結構的相似程度。

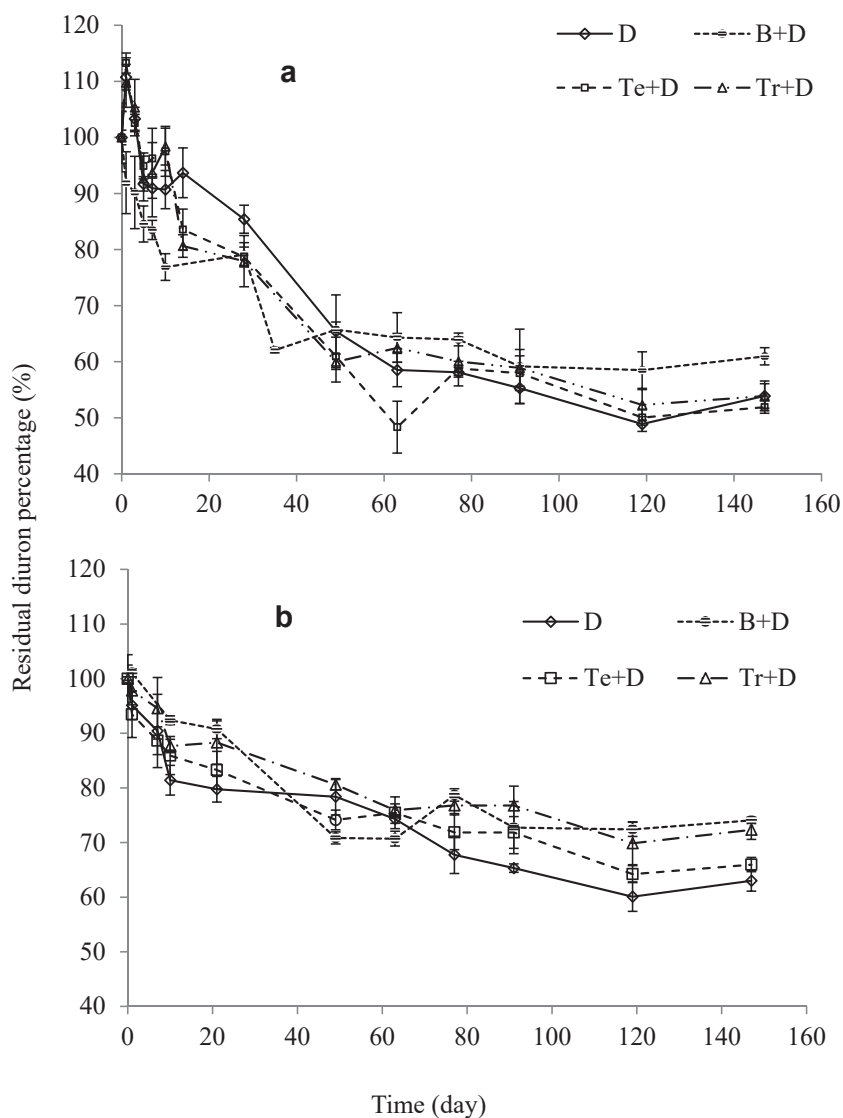
結果與討論

一、達有龍在土壤中的降解

10 倍推薦施用量之農藥混合施用下 (圖一 a)，於試驗前期達有龍在各處理中的降解速率並沒有明顯的差異，直至試驗末期 (第 119 及 147 天)，各處理間的達有龍殘留百分比有所差異，達有龍在土壤孵育的第 119 天之殘留百分比分別為 48.9 (D), 58.5 (B+D), 50.0 (Te+D) 及 53.9 % (Tr+D)，免賴得與除草劑混合施用下，達有龍的殘留量是相對較高的，因此推斷免賴得會造成達有龍降解速率減緩的趨勢。

50 倍推薦施用量之農藥混合施用下 (圖一 b)，孵育的第 63 天開始，達有龍於 B+D, Te+D 及 Tr+D 的處理下降解速率有減緩的現象。而至試驗末期，達有龍於 B+D 及 Tr+D 處理中殘留百分比為 68.9 及 72.3%，高於單獨達有龍之處理。因此在高劑量的情況下，可以推論免賴得及三泰芬會造成達有龍降於土壤中的持久性延長。

將殘留百分比之數據套用一級動力方程式，計算各種處理下達有龍於土壤中之降解速率常數 (K)、DT₅₀ 及決定系數 (R²) (表一)。於 10 倍推薦施用量處理下，達有龍的 DT₅₀ 分別為 125.07 (D)、122.20



圖一、達有龍於茶園土壤中之降解，(a) 10 倍推薦施用量及 (b) 50 倍推薦施用量；D 為達有龍、B+D 為免賴得+達有龍、Te+D 為得克利+達有龍、Tr+D 為三泰芬+達有龍

Fig. 1. Diuron degradation rate in all treatments, (a) 10-fold fieldrate and (b) 50-fold field rate; D is diuron, B+D is benomyl+diuron, Te+D is tebuconazole+diuron, and Tr+D is triadimefon+diuron treatment.

表一、以一級反應方程式計算各種處理下達有龍在土壤中之降解速率常數 (K)、DT₅₀、決定係數 (R²)；D 為達有龍、B+D 為免賴得+達有龍、Te+D 為得克利+達有龍、Tr+D 為三泰芬+達有龍

Table 1. The first order degradation rate constant, DT₅₀, and determination coefficient of diuron for all treatments; D is diuron, B+D is benomyl+diuron, Te+D is tebuconazole+diuron, and Tr+D is triadimefon+diuron treatment

treatment	10-fold field rate			50-fold field rate		
	K	DT ₅₀	R ²	K	DT ₅₀	R ²
	----Day ⁻¹ ----	---Day---		----Day ⁻¹ ----	---Day---	
D	5.54 x 10 ⁻³	125.07	0.92	-4.13 x 10 ⁻³	166.65	0.92
B+D	4.90 x 10 ⁻³	141.59	0.86	-2.99 x 10 ⁻³	231.48*	0.81
Te+D	5.67 x 10 ⁻³	122.20	0.93	-3.65 x 10 ⁻³	189.68	0.91
Tr+D	5.45 x 10 ⁻³	127.15	0.92	-2.93 x 10 ⁻³	238.46*	0.92

*T test, $p < 0.05$.

(Te+D)、127.15 (Tr+D) 及 141.59 天 (B+D)。依 DT₅₀ 結果顯示，免賴得在低劑量下對達有龍的降解已經有抑制的情形發生。而當藥劑的劑量提高至 50 倍之田間施用量下，各種處理下達有龍的 DT₅₀ 則分別為 166.65 (D), 189.68 (Te+D), 238.46 (Tr+D) 及 231.48 天 (B+D)。結果顯示在高劑量下，免賴得及三泰芬都會顯著的影響達有龍在土壤中的降解速率，證實特定的除草劑與殺菌劑的混合施用，確實會造成藥劑持久性上升的可能。而前人研究中提及，長期施用達有龍之土壤，其達有龍的降解速率會逐年增加⁽¹⁸⁾，顯示達有龍的降解與土壤菌相相關性很高。

結果與討論

一、達有龍在土壤中的降解

10 倍推薦施用量之農藥混合施用下 (圖一 a)，於試驗前期達有龍在各處理中的降解速率並沒有明顯的差異，直至試驗末期 (第 119 及 147 天)，各處理間的達有龍殘留百分比有所差異，達有龍在土壤孵育的第 119 天之殘留百分比分別為 48.9 (D), 58.5 (B+D), 50.0 (Te+D) 及 53.9% (Tr+D)，免賴得與除草劑混合施用下，達有龍的殘留量是相對較高的，因此推斷免賴得會造成達有龍降解速率減緩的趨勢。

50 倍推薦施用量之農藥混合施用下 (圖一 b)，孵育的第 63 天開始，達有龍於 B+D, Te+D 及 Tr+D 的處理下降解速率有減緩的現象。而至試驗末期，達有龍於 B+D 及 Tr+D 處理中殘留百分比為 68.9 及 72.3%，高於單獨達有龍之處理。因此，在高劑量的情況下，可以推論免賴得及三泰芬會造成達有龍降於土壤中的持久性延長。

將殘留百分比之數據套用一級動力方程式，計算各種處理下達有龍於土壤中之降解速率常數 (K)、DT₅₀ 及決定系數 (R²) (表一)。於 10 倍推薦施用量處理下，達有龍的 DT₅₀ 分別為 125.07 (D)、122.20 (Te+D)、127.15 (Tr+D) 及 141.59 天 (B+D)。依 DT₅₀ 結果顯示，免賴得在低劑量下對達有龍的降解已經有抑制的情形發生。而當藥劑的劑量提高至 50 倍之田間施用量下，各種處理下達有龍的 DT₅₀ 則分別為 166.65 (D), 189.68 (Te+D), 238.46 (Tr+D) 及 231.48 天 (B+D)。結果顯示在高劑量下，免賴得及三泰芬都會顯著的影響達有龍在土壤中的降解速率，證實特定的除草劑與殺菌劑的混合施用，確實會造成藥劑持久性上升的可能。而前人研究中提及，長期施用達有龍之土壤，其達有龍的降解速率會逐年增加⁽¹⁸⁾，顯示達有龍的降解與土壤菌相相關性很高。

二、達有龍之代謝產物

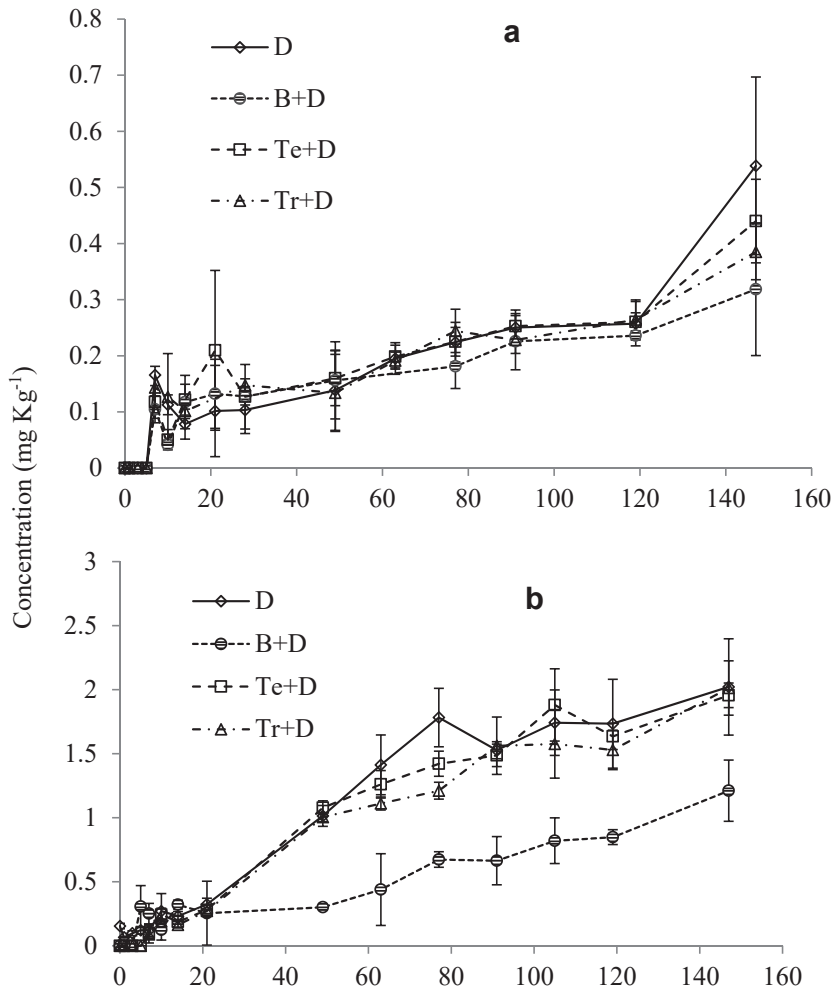
達有龍的主要代謝產物有 (1) DCPMU, (2) DCPU 及 (3) DCA，以 10 倍推薦施用量處理中並未偵測到代謝產物 DCPU 與 DCA，僅有微量的 DCPMU 產生。以 50 倍推薦施用量的處理下偵測到 DCPMU 及 DCPU 等降解產物，但沒有偵測到代謝產物 DCA。然而 DCPMU 及 DCPU 的產生量與達有龍的降解量一樣沒有達到質量平衡，因此推測，達有龍的代謝產物並非只有本試驗偵測的三種

代謝產物。

以 10 倍推薦施用量處理下，於試驗的第 14 天開始偵測到 DCPMU 的出現，隨著孵育時間的增加，DCPMU 的產生量也逐漸的提高 (圖二 a)。單獨施用達有龍處理的情況下，孵育 147 天有最高的 DCPMU 產量，為 0.54 mg Kg⁻¹，而在 B+D 處理中，DCPMU 的產生量明顯較低，於 147 天時的產量為 0.32 mg Kg⁻¹。因此可以推估在免賴得與達有龍混合施用的情況下，免賴得會影響達有龍的 demethylation，而使得達有龍在土壤中的持久性上升。50 倍推薦施用量處理下，於孵育的第 7 天起，即可偵測到 DCPMU 的產生 (圖二 b)，且各處理間之濃度相近。但在第 49 天時，B+D 處理與其他處理之 DCPMU 濃度即有明顯的差異，在 D, Te+D 及 Tr+D 處理偵測到的 DCPMU 濃度為 1.00-1.07 mg Kg⁻¹，而 B+D 處理僅有 0.32 mg Kg⁻¹，可以看出在達有龍與免賴得混合處理之下，會抑制達有龍進行 demethylation，而至孵育第 147 天，B+D 處理之 DCPMU 的濃度僅有 1.21 mg Kg⁻¹，而其他處理組的濃度約為 1.95-2.01 mg Kg⁻¹。

代謝產物 DCPMU 產生的濃度可以應證在免賴得處理，達有龍的 DT₅₀ 會明顯得上升，主要因為達有龍無法進行 demethylation，形成代謝產物 DCPMU。P450 cytochrome monooxygenase 是促進達有龍的 demethylation 的酵素之一，前人文獻中提其能分泌該酵素降解農藥的菌種有

Streptomyces grivoleus, *Rhodococcus* sp. 以及 *Rhodococcus* sp. strain NI86/21^(13, 15, 24)。因此造成達有龍降解受到抑制可能是免賴得抑制了菌相中能幫助達有龍 demethylation 的菌種，進而使達有龍在土壤中的降解速率變緩慢。



圖二、達有龍代謝產物 DCPMU 於茶園土壤中之產生情形，(a) 10 倍推薦施用量及 (b) 50 倍推薦施用量；D 為達有龍、B+D 為免賴得+達有龍、Te+D 為得克利+達有龍、Tr+D 為三泰芬+達有龍。

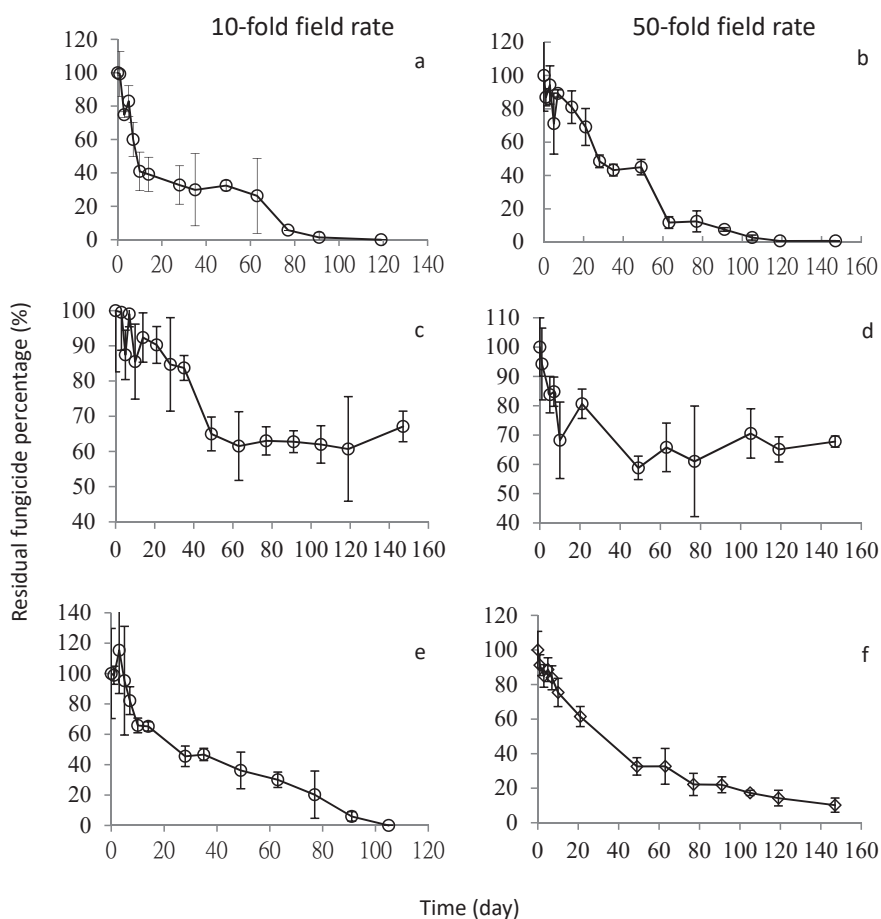
Fig. 2. The diuron metabolite DCPMU production rate in all treatments. (a) 10-fold field rate and (b) 50-fold field rate; D is diuron, B+D is benomyl+diuron, Te+D is tebuconazole+diuron, and Tr+D is triadimefon+diuron treatment.

三、殺菌劑於土壤中的降解

1. 免賴得

以 10 倍推薦施用量處理下，免賴得於孵育的前 14 天降解速率較快 (圖三 a)，於 14 天即使 60% 之免賴得降解，14 天後，免賴得的降解速率有趨緩的現象，

低劑量之免賴得在試驗土壤孵育 119 天後偵測不到。以 50 倍推薦施用量下免賴得於試驗前期降解快速 (圖三 b)，但與 10 倍推薦施用量之降解速率相比，高劑量之降解速率比較慢，而免賴得於 21 天也有降解遲緩的情形發生。高劑量之免賴得於試驗的第 147 天降解濃度偵測不到。



圖三、三種殺菌劑與達有龍混合施用下，於茶園土壤中之降解 (a) 及 (b) 為免賴得，(c) 及 (d) 為得克利，(e) 及 (f) 為三泰芬。

Fig. 3. The degradation rate of three fungicides when applied with diuron, (a) and (b) are benomyl, (c) and (d) are tebuconazole, (e) and (f) are triadimefon.

免賴得於環境中會快速地分解為貝芬替及 BIC^(11, 17)，可以解釋在試驗初期，免賴得快速降解的原因。前人研究指出，免賴得與 BIC 共同存在時，其分解為貝芬替及 BIC 的反應會有所趨緩，且可能使貝芬替還原為免賴得^(21, 25)。這可能是造成免賴得於試驗前期及後期降解速率不同的原因。

2. 得克利

以 10 倍推薦施用量劑量處理之得克利於試驗的 49 天前濃度以穩定的降解速率逐漸下降 (圖三 c)，在 63 天後濃度有持平的現象，直至試驗的第 147 天，得克利的降解百分比僅有 35-40%。以 50 倍推薦施用量處理下之得克利在試驗前期一樣是緩慢但穩定的降解 (圖三 d)，直至第 49 天，得克利的降解幾乎停擺。

而利用一級動力方程式換算得克利的 DT_{50} ，發現得克利需要 154-168 天才能達降解量的一半。得克利於土壤中的降解速率緩慢， DT_{50} 最長有一年，在 Strickland et al. (2004) 的文獻中指出，其研究中得克利於土壤中的 DT_{50} 為 49 天⁽²⁰⁾，降解速率是前人文獻的 6-12 倍，作者解釋其實驗土壤中有機碳含量很低，約 0.41%，因此導致其降解速率的增加；Herrero-Hernández et al. (2011) 的文獻中也提及有機質含量會影響得克利在土壤中的降解⁽⁸⁾。而本試驗土壤的有機質含量為 7.5%，為富含有機質的土壤，因此得克利的降解較為緩慢。

3. 三泰芬

以 10 倍推薦施用量處理之三泰芬於試驗初期 (第 14 天前) 降解速率快速 (圖三 e)，第 14 天後，三泰芬之降解速率有略微下降，而至試驗的第 119 天時偵測不到三泰芬的殘留。在 50 倍推薦施用量處理之得克利濃度也分為兩階段的降解速率 (圖三 f)，於試驗 49 天前降解速率較快，降解已達 60%；第 49 天時，得克利的降解速率趨於平緩，至實驗第 147 天三泰芬的降解百分率為 89.8%。

以一級動力方程式計算得克利的 DT_{50} 分別為 28 (10 倍推薦施用量) 及 41 天 (50 倍推薦施用量)。三泰芬於土壤的 DT_{50} 約為一個月⁽¹⁶⁾，與本實驗數據相符。然三泰芬主要降解產物為三泰隆，同樣是具有殺菌能力的三唑系殺菌劑，且三泰隆於土壤中 DT_{50} 約為 137-250 天，與三泰芬相比，三泰隆在環境中的持久性明顯的高出 4-8 倍，因此在討論三泰芬對生態環境影響時，應同時考慮三泰隆對環境的衝擊。

四、農藥對土壤菌相的影響

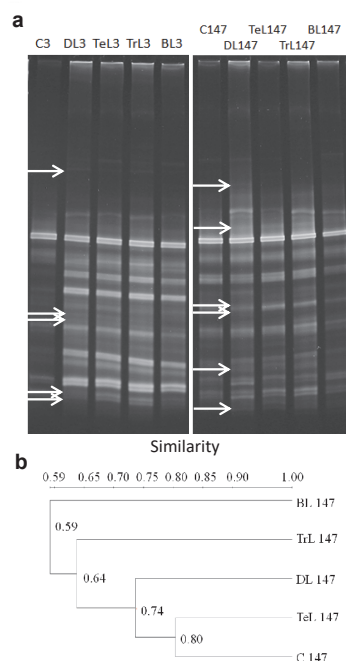
以 10 倍推薦施用量處理孵育第 3 天時之菌相 DGGE 圖譜 (圖四 a)，加入藥劑的處理亮帶數明顯的比對照組來的多，可以推論施用農藥免賴得、得克利、三泰芬及達有龍於試驗初期能增加土壤菌相的豐富度。而觀察亮帶可以發現，孵育初期各處理之菌相即有差異，如圖中之白色箭頭所表示的即為在單獨施用達有龍處理中

出現，但在 B 處理中並沒有出現的亮帶，進而推斷這些菌群之生長會受免賴得所抑制。

以 10 倍推薦施用量處理孵育第 147 天時的菌相在免賴得+達有龍與其他三種處理間有明顯的差異 (圖四 a)，以亮帶之數量及亮度顯示施用免賴得處理之細菌族群的豐富度較另外三種處理低。聚類分析結果顯示 (圖四 b)，對照組與各處理之相似程度為 $Te > Tr > D > B$ 。反觀可以解釋為各處理對菌相之衝擊大小為 $B > D > Tr > Te$ 。而此結果可以印證在達有龍混合施用免賴得的處理中，達有龍降解速率較其他處理緩慢，主要是菌相受殺菌劑免賴得之衝擊所造成。

以 50 倍推薦施用量處理第 3 天菌相之 DGGE 圖譜中，加入藥劑處理的亮帶數皆明顯多於對照組，可解釋為加入農藥等有機物質在試驗初期，有助於增加茶園土壤細菌族群之豐富度。但免賴得+達有龍處理與另外三種處理相比，豐富度是相對較低的，代表免賴得的添加會抑制許多菌群之生長。如圖五 a 中白色箭頭所示即是在施用達有龍處理偵測到之亮帶，但在混合添加免賴得處理中被抑制之菌群。

試驗第 147 天聚類分析樹狀圖顯示 D 及 Te 與對照組之相似度較高 (圖五 b)，而 B 及 Tr 處理與對照組之相似度較低，然而分成兩群的主要原因為殺菌劑免賴得及三泰芬對菌相之衝擊較大，而導致此兩種處理與對照組之相似度較低。然菌相分析之結果再次應證免賴得及三泰芬與達有



圖四、10 倍推薦施用量處理 (L) 之細菌族群結構，(a) 孵育第 3 及 147 天時之 PCR-DGGE 指紋圖譜及 (b) 以 UPGMA 法進行聚類分析第 147 天細菌族群結構；C 為對照組、D 為達有龍、B 為免賴得+達有龍、Te 為得克利+達有龍、Tr 為三泰芬+達有龍處理，白色箭頭為達有龍處理出現但在 B 處理中被抑制之亮帶。

Fig. 4. The bacterial community observed under 10-fold field application rate, (a) PCR-DGGE analysis of 16S rDNA sequence fragments with sample incubated for 3 and 147 day and (b) UPGMA cluster analysis of bacterial community structures obtained from all low dosage treatment.

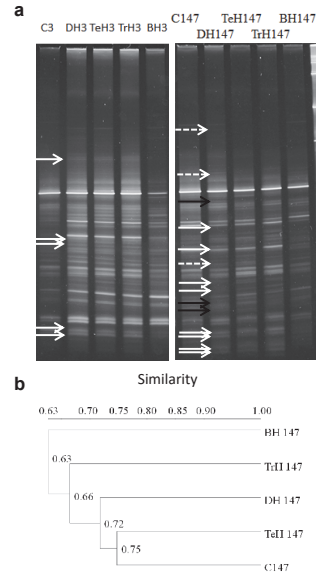
龍混合施用處理中，達有龍降解速率較慢的原因主要為菌相差異所導致。然在 DGGE 圖譜中之黑色箭頭 (圖五 a)，為在免賴得及三泰芬處理中皆被抑制的菌群，推測此三個亮帶有可能為能代謝達有龍之特殊菌群，因此在生長受到抑制的情況下，導致達有龍降解速率下降。

結論

達有龍在滅菌土壤中的降解速率比未滅菌土壤慢，可證實達有龍於本試驗土壤中的主要降解途徑為生物性降解。在達有龍混合三種殺菌劑時，可能會造成達有龍在土壤中的持久性增長；低劑量的免賴得與達有龍混合施用已會使達有龍的 DT_{50} 上升。在 50 倍推薦施用量的免賴得及得克利與達有龍混合使用的情況下，明顯的抑制達有龍的降解。

達有龍在試驗土壤中偵測到的代謝產物有 DCPMU 及 DCPU，但兩種代謝產物的總量與達有龍降解的量未達質量平衡，因此認為達有龍於本試驗土壤中還有其他代謝產物的產生。在混合施用高劑量免賴得與達有龍的處理中可以看出，免賴得的施加明顯的抑制 DCPMU 的生成，進而推測其為造成達有龍降解速率趨緩的原因。

DGGE 圖譜及聚類分析結果顯示，在 10 倍推薦施用量處理下，達有龍、得克利+達有龍及三泰芬+達有龍可以促進土壤中細菌族群的豐富度。免賴得+達有龍處理相較其他三種處理來說，對土壤菌相的衝



圖五、50 倍推薦施用量處理 (H) 之細菌族群結構，(a) 孵育第 3 及 147 天時之 PCR-DGGE 指紋圖譜及 (b) 以 UPGMA 法進行聚類分析第 147 天細菌族群結構；C 為對照組、D 為達有龍、B 為免賴得+達有龍、Te 為得克利+達有龍、Tr 為三泰芬+達有龍處理，白色箭頭為達有龍處理出現但在 B 處理中被抑制之亮帶，虛線箭頭為 Tr 處理中被抑制之亮帶，黑色箭頭為 B 及 Tr 處理中皆被抑制之亮帶。

Fig. 5. The bacterial community observed under 50-fold field application rate, (a) PCR-DGGE analysis of 16S rDNA sequence fragments after samples were incubated for 3 and 147 day and (b) UPGMA cluster analysis of bacterial community structures observed under all low dosage treatment.

擊較大。以 50 倍推薦施用量處理下，於試驗末期結果顯示免賴得+達有龍及三泰芬+達有龍對菌相的衝擊是比較大的，進而推論達有龍於免賴得+達有龍及三泰芬+達有龍處理中持久性增加的原因為殺菌劑對菌相之衝擊而使達有龍的生物性降解受到抑制所造成。

由以上結果可得知，在土壤中達有龍與殺菌劑共同存在所產生的相互作用，可能會導致達有龍在土壤中的持久性增長。因此在施用達有龍的茶園土壤中，應審慎評估達有龍與殺菌劑間的相互作用而避免達有龍於環境中的殘留。

謝辭

本研究由農業部「110 農科-16.1.1-藥-P1」研究計畫經費補助，謹此致謝。

引用文獻

1. 呂水淵。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。臺北。155 頁。
2. Cabrera, A., Cox, L., Velarde, P., Koskinen, W. C., and Cornejo, J. 2007. Fate of diuron and terbuthylazine in soils amended with two-phase olive mill waste. *J. Agric. Food Chem.* 55: 4828-4834.
3. Cheng, G., Weihua, Z., Mäkinen, S., Mäkelä, S., Saji, S., Warner, M., Gustafsson, J. A., and Hovatta, O. 2002. A role for the androgen receptor in follicular atresia of estrogen receptor beta knockout mouse ovary. *Biol. Reprod.* 66: 77-84.
4. Escher, B. I., Baumgartner, R., Lienert, J., and Fenner, K. 2008. Predicting the ecotoxicological effects of transformation products, pp. 205-244. *In: Boxall, A.B.A. [ed.] Transformation products of synthetic chemicals in the environment. The handbook of environmental chemistry, vol 2P.* Springer, Berlin, Germany. 249 pp.
5. Fernández-Alba, A. R., Hernando, M. D., Piedra, L., and Chisti, Y. 2002. Toxicity evaluation of single and mixed antifouling biocides measured with acute toxicity bioassays. *Anal. Chim. Acta* 456: 303-312.
6. Field, J. A., Reed, R. L., Sawyer, T. E., Griffith, S. M., and Wigington Jr., P. J. 2003. Diuron occurrence and distribution in soil and surface and ground water associated with grass seed production. *J. Environ. Qual.* 32: 171-179.
7. Fogg, P., Boxall, A.B.A., and Walker, A. 2003. Degradation of pesticides in biobeds: the effect of concentration and pesticide mixtures. *J. Agric. Food Chem.* 51: 5344-5349.
8. Herrero-Hernández, E., Andrades, M. S., Marín-Benito, J. M., Sánchez-Martín, M. J., and Rodríguez-Cruz, M. S. 2011. Field-

- scale dissipation of tebuconazole in a vineyard soil amended with spent mushroom substrate and its potential environmental impact. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74: 1480-1488.
9. Jordan, D. L., Lancaster, S. H., Lanier, J. E., Lassiter, B. R., and Johnson, P. D. 2009. Weed management in peanut with herbicide combinations containing imazapic and other pesticides. *Weed Technol.* 23: 6-10.
 10. Lienert, J., Güdel, K., and Escher, B. I. 2007. Screening method for ecotoxicological hazard assessment of 42 pharmaceuticals considering human metabolism and excretory routes. *Environ. Sci. Technol.* 41: 4471-4478.
 11. Moye, H. A., Shilling, D. G., Aldrich, H. C., Gander, J. E., Buszko, M., Toth, J. P., Brey, W. S., Bechtel, B., and Tolson, J. K. 1994. *N, N'*-Dibutylurea from n-butyl isocyanate, a degradation product of benomyl. 1. Formation in Benlate formulations and on plants. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1204-1208.
 12. Muyzer, G., de Waal, E. C., and Uitterlinden, A. G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 695-700.
 13. Nagy, I., Schoofs, G., Compernelle, F., Proost, P., Vanderleyden, J., and de Mot, R. 1995. Degradation of the thiocarbamate herbicide EPTC (S-ethyl dipropylcarbamothioate) and biosafening by *Rhodococcus* sp. strain NI86/21 involve an inducible cytochrome P-450 system and aldehyde dehydrogenase. *J. Bacteriol.* 177: 676-687.
 14. Neuwoehner, J., Zilberman, T., Fenner, K., and Escher, B. I. 2010. QSAR-analysis and mixture toxicity as diagnostic tools: Influence of degradation on the toxicity and mode of action of diuron in algae and daphnids. *Aquat. Toxicol.* 97: 58-67.
 15. Omer, C. A., Lenstra, R., Litle, P. J., Dean, C., Tepperman, J. M., Leto, K. J., Romesser, J. A., and O'Keefe, D. P. 1990. Genes for two herbicide-inducible cytochrome P-450 from *Streptomyces griseolus*. *J. Bacteriol.* 172: 3335-3345.
 16. Pesticide Properties DataBase (PPDB). 2006. Retrieved from <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/648.htm#1> (Oct. 20, 2022)
 17. Querns, R., MacDonald, G. E., Gaffney, J. F., Chase, C. A., Moye, H. A., Shilling, D. G., and Bewick, T. A. 1998. Effects of *N, N'*-dibutylurea on photosynthetic electron transport reactions in isolated chloroplasts. *Pest. Biochem. Physiol.* 59: 129-135.
 18. Rouchaud, J., Neus, O., Bulcke, R., Cools, K., Eelen, H., and Dekkers, T. 2000. Soil

- dissipation of diuron, chlorotoluron, simazine, propyzamide and diflufenican herbicides after repeated applications in fruit tree orchards. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39: 60-65.
19. Sheffield, V. C., Cox, D. R., Lerman, L. S., and Myers, R. M. 1989. Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 232-236.
 20. Strickland, T. C., Potter, T. L., and Joo, H. 2004. Tebuconazole dissipation and metabolism in Tifton loamy sand during laboratory incubation. *Pest Manag. Sci.* 60: 703-709.
 21. Stringham, R. W., and Teubert, W. E. 1984. Liquid chromatographic determination of benomyl in wettable powders. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67: 302-303.
 22. Sun, G., Thai, S. F., Tully, D. B., Lambert, G. R., Goetz, A. K., Wolf, D. C., Dix, D. J., and Nesnow, S. 2005. Propiconazole-induced cytochrome P450 gene expression and enzymatic activities in rat and mouse liver. *Toxicol. Lett.* 155: 277-287.
 23. Sun, G., Thai, S. F., Lambert, G. R., Wolf, D. C., Tully, D. B., Goetz, A. K., George, M. H., Grindstaff, R. D., Dix, D. J., and Nesnow, S. 2006. Fluconazole-induced hepatic cytochrome P450 gene expression and enzymatic activities in rats and mice. *Toxicol. Lett.* 164: 44-53.
 24. Warhurst, A. M., and Fewson, C. A. 1994. Biotransformation catalyzed by the genus *Rhodococcus*. *Crit. Rev. Biotechnol.* 14: 29-73.
 25. Teubert, W. E., and Stringham, R. W. 1984. Liquid chromatographic determination of benomyl in wettable powders: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67: 303-305.
 26. Van Cauteren, H., Lampo, A., Vandenberghe, J., Vanparys, P., Coussement, W., De Coster, R., and Marsboom, R. 1989. Toxicological profile and safety evaluation of antifungal azole derivatives. *Mycoses* 32: 60-66.
 27. White, P. M., Potter, T. L., and Culbreath, A. K. 2010. Fungicide dissipation and impact on metolachlor aerobic soil degradation and soil microbial dynamics. *Sci. Total Environ.* 408: 1393-1402.

Effects of Three Fungicides on the Degradation of Diuron and Bacterial Community in the Tea Field Soil

Zhi-Zhan Li¹, Yung-Ping Wang¹, Jum-Hao Liu¹ and Jui-Hung Yen^{1*}

Abstract

Li, Z. Z., Wang, Y. P., Liu, J. H., and Yen J. H. 2023. Effects of three fungicides on the degradation of diuron and bacterial community in the tea field soil. *Taiwan Pestic. Sci.* 15: 37-54.

To reduce costs associated with pesticide application, mixed or sequential pesticides application strategies are often employed in agricultural fields. Under these strategies insecticides, herbicides, and fungicides are applied simultaneously or sequentially. Tea is one of the most important economic agricultural products in Taiwan. Many pesticides are used to control weeds, diseases, and insects in tea fields, thereby ensuring high tea quality and good yield. In this study, we investigated the effects of various mixed pesticide application treatments. Specifically, three fungicides, benomyl (B), tebuconazole (Te) and triadimefon (Tr), were respectively combined with a herbicide, diuron (D), and the persistence of the various pesticide combinations in soil was investigated. We also investigated the effects of the pesticide treatments on soil bacterial communities. Our results revealed that, diuron degraded more slowly in sterilized soil than in unsterilized soil, which suggests that microbial biodegradation sped up the breakdown of diuron in tea field soil. In applying pesticides at a 10-fold field rate, the B+D treatment led to a slight decrease in the diuron degradation rate. In applying pesticides at a 50-fold field rate, the B+D and Tr+D treatments led to a significant decrease in the diuron degradation rate. During the experimental period, the diuron metabolite N'-[3,4-dichloro-phenyl]-N,N-methylurea (DCPMU) was detected in 10-fold field rate treatments; the DCPMU and N'-3,4-dichloro-

Accepted: September 12, 2023.

* Corresponding author, E-mail: sonny@ntu.edu.tw

¹ Department of Agricultural Chemistry, National Taiwan University, No. 1, Sec. 4, Roosevelt Road, Taipei 10617, Taiwan

phenylurea (DCPU) metabolites were detected in 50-fold field rate treatments. However, the quantity of these metabolites was less than the quantity of degraded diuron. This indicates that diuron degradation may have produced other metabolites as well. Benomyl may inhibit the degradation of diuron and we observed less DCPMU in the B+D treatment compared to other treatments when applied at a 50-fold field rate. DGGE fingerprint and cluster analysis results indicate that D, Te+D and Tr+D 10-fold field rate treatments may increase the richness of bacterial communities in tea fields, Tr+D and B+D impacted the bacterial communities at a 50-fold field rate. Impacts on bacterial communities may lead to the inhibition of diuron degradation and thereby increase the persistence of diuron in the environment. Therefore, assessments are required when diuron is simultaneously applied with the fungicides benomyl and triadimefon in tea field soil.

Key words: diuron, degradation, persistence, fungicide, soil bacterial community