

# 賽達松標準品與 50% 乳劑對斑馬魚幼魚及胚胎之急毒性比較

陳淑娟<sup>1</sup>、林芳妘<sup>1</sup>、王凱平<sup>1</sup>、蔡韋任<sup>1</sup>、謝玉貞<sup>1\*</sup>

## 摘要

陳淑娟、林芳妘、王凱平、蔡韋任、謝玉貞。2023。賽達松標準品與 50% 乳劑對斑馬魚幼魚及胚胎之急毒性比較。臺灣農藥科學 15 : 19-36。

賽達松 (phenthoate) 是一種抑制乙醯膽鹼酯酶 (Acetylcholinesterase) 之殺蟲劑。它主要防治水稻二化螟蟲 (*Chilo suppressalis* Walker)，為水稻耕作高使用率與高使用量之農藥。本研究以賽達松標準品與 50% 乳劑分別對斑馬魚幼魚與胚胎急毒性進行比較，在斑馬魚急毒性試驗，賽達松標準品配製濃度為溶劑對照組 (丙酮)、0.907、1.353、2.020、3.015 與 4.5 mg/L，及 50% 乳劑配製濃度為空白對照組 (養殖水)、0.625、1.25、2.5、5、10 mg/L，連續對幼魚暴露 96 小時之半數致死濃度 (LC<sub>50</sub>)，結果賽達松標準品為 3.016 mg/L (水樣分析濃度 2.706 mg a.i./L)，50% 乳劑為 2.95 mg/L (水樣分析濃度 1.41 mg a.i./L)。另在斑馬魚胚胎急毒性試驗，標準品配製濃度為空白對照組 (養殖水)、溶劑對照組 (丙酮)、1.897、2.875、4.356、6.6 與 10 mg/L 及正對照組 (氯化鈉，4.5 g/L)，及 50 % 乳劑配製濃度為空白對照組 (養殖水)、1、2、4、8 與 16 mg/L 及正對照組 (氯化鈉，5.0 g/L)，連續對斑馬魚胚胎暴露 96 小時之半數致死濃度 (LC<sub>50</sub>) 結果，賽達松標準品為 3.827 mg/L (水樣分析濃度 4.250 mg a.i./L)，50% 乳劑為 8.615 mg/L (水樣分析濃度 3.670 mg a.i./L)，並可見胚胎具明顯的延遲孵化、魚體不筆直、心囊與卵黃囊浮腫、無心跳、出血、魚體短小及活動力不佳等形態改變。由以上 4 種試驗結果 LC<sub>50</sub> 數值其危害等級分類皆為中等毒性 (1-10 mg/L)，具有相似性的毒性敏感度，此研究可提供國內針對水生毒性之數據參考。

**關鍵詞：**賽達松、斑馬魚、胚胎、急毒性

---

接受日期：2023 年 9 月 26 日

\* 通訊作者。E-mail: ych@acri.gov.tw

<sup>1</sup> 臺中市 農業部農業藥物試驗所

## 前言

賽達松 (phenthoate) 為有機磷殺蟲劑，常廣泛使用於農業病蟲害 (二化螟蟲、小菜蛾、蚜蟲類與薊馬類) 與環境衛生之害蟲 (蚊子、麗蠅與家蠅) 之防治<sup>(3)</sup>，同一類的有機磷殺蟲劑農藥如大利松 (diazinon)、芬殺松 (fenthion)、撲滅松 (sumithion) 與賽達松也廣泛被使用在臺灣水域作物，這些殺蟲劑農藥可藉由地表逕流、飄移、降水或直接沉積污染水生環境<sup>(27)</sup>，進而造成水生生物之神經系統與其他生理機制影響，導致魚類族群數量急劇下降<sup>(21)</sup>，研究報告皆強調有機磷殺蟲劑農藥對魚類等水生生物的毒性研究極為重要。由於魚胚胎 (embryos, 0-3 天) 和仔魚 (larva fish, 體長為 < 1 公分) 階段對環境污染物極為敏感，容易受到其作用影響導致發育過程之形態發生變化，適合作為指標生物以評估殺蟲劑農藥污染物對水生生物早期發育毒性評估<sup>(21)</sup>。利用相同農藥對幼魚 (juvenile fish, 體長為 1-2 公分) 與胚胎毒性相關的研究如布芬淨 (buprofezin) (5-100 mg/L) 和安殺番 (endosulfan) (96 h LC<sub>50</sub> 0.22 mg/L)，造成非洲鯰魚 (*Clarias gariepinus*) 胚胎的孵化率降低，對魚類早期仔魚階段造成尾部變曲或短尾之影響<sup>(6, 17)</sup>。同樣地，賽滅寧 (cypermethrin) (400 µg/L) 會對斑馬魚 (Zebrafish, *Danio rerio*) 的胚胎和仔魚 (larva fish) 造成畸形<sup>(25)</sup>。斑馬魚由於飼育容易、胚胎透明、體外受精、突變種多

及遺傳學研究等優點，早已成為研究脊椎動物發育與人類遺傳疾病的新興模式生物。Ahmed 等人 (2015, 2016) 研究結果顯示撲滅松 (sumithion) 1.0 mg/L 會影響成年斑馬魚的血糖和腸道組織結構<sup>(7, 8)</sup>。近幾年的多項研究也提到作為動物模型進行環境威脅影響<sup>(22, 26, 29)</sup>。

經濟合作暨發展組織 (Organisation for Economic Cooperation and Development, OECD) 於 1992 年 07 月 17 日發佈水生生物毒性之化學品測試方法，主要以魚類急毒性測試操作指引 203 (fish, acute toxicity test, Test Guideline 203) 為化學品環境危害評估的重要項目，後續亦成為農藥登記所需具備審查項目資料。因魚胚胎替代斑馬魚，可減少 60 % 以上斑馬魚使用量，基於現有已建立之農藥毒理試驗技術平台基礎上，審慎考量新替代方法對生態毒理安全性評估具效性之原則，建立相關替代試驗研究模式與方法，並需以共同之試驗物與原方法進行試驗結果準確性之驗證與確效。自 2019 年以來，國際上已經提出斑馬魚胚胎作為幼魚 (juvenile fish, 體長為 1-2 公分) 或成魚 (adult fish, 體長為 > 2 公分) 進行的急毒性試驗 (OECD Fish, acute toxicity test, Test Guideline 203, 2019) 的替代方法可行性<sup>(1)</sup>。歐盟替代方法確效中心 (The European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing, EURL-ECVAM) 在 2008-2012 年期間協助 OECD 於 2013 年 7 月 26 日所發佈的斑馬魚胚胎

急毒性試驗操作指引 236 (Zebrafish embryo acute toxicity test TG236, ZFET) 的驗證，以評估其再現性，用以支持制定 OECD 試驗準則。Belanger 等人 (2013) 亦繼續收集急性魚胚胎毒性和魚類毒性數據，以評估其相關性、預測能力和適用性<sup>(12)</sup>。已有相關研究利用斑馬魚胚胎作為幼魚或成魚的急毒性試驗的替代方法<sup>(13, 18, 23, 24)</sup>。Lammer 等人在 2009 年研究報告指出，使用斑馬魚胚胎對 143 種化學品進行毒性試驗，所得到的結果和使用斑馬魚進行毒性試驗結果有正相關<sup>(16)</sup>。Rahman 等人在 2020 年發表有機磷殺蟲劑撲滅松對斑馬魚胚胎及仔魚 (larva fish) 的毒性試驗，其結果顯示撲滅松對胚胎在 24 小時 LC<sub>50</sub> 值為 0.235 (0.079-0.428) mg/L 與對仔魚 72 小時 LC<sub>50</sub> 值為 0.341 (0.177-0.617) mg/L，撲滅松造成胚胎的死亡率高於仔魚，表示斑馬魚胚胎比仔魚對撲滅松毒性更敏感<sup>(21)</sup>。在德國進行了廢水對斑馬魚胚胎試驗之驗證，並於 2005 年取代了成魚毒性試驗<sup>(13)</sup>。本研究參考農糧署 2019 年彰化地區水稻高用量之農藥調查結果<sup>(5)</sup>，選取賽達松 (phenthoate) 標準品與 50 % 乳劑分別進行對斑馬魚幼魚及胚胎之急毒性試驗，並觀察藥劑暴露期間對胚胎形態的影響。急毒性數值以農藥對幼魚及胚胎死亡的半致死濃度為指標，並參考國際標準評估農藥對水生生物之毒性劃分等級，這項研究的結果將有助於建立國內之國際認可農藥對水生生物短期毒性評估之替代試驗模式，並提供相關試驗資料用

於法規與管理層面之修訂。

## 材料與方法

### 一、試驗方法

1. 參考經濟合作暨發展組織 (OECD) 2019 年公佈修訂之第 4 版魚類急毒性試驗指引 (Test Guideline No. 203, Fish, Acute Toxicity Testing)<sup>(20)</sup>，以符合替代 (Replacement)、減量 (Reduction) 及精緻化 (Refinement) 之 3R 精神，配合美國環境保護署 (US Environmental Protection Agency, US EPA) 2016 年公佈之試驗指引「Freshwater and saltwater fish acute toxicity test, OCSPP 850.1075」<sup>(28)</sup> 以靜水式方式 (static test) 進行魚類急毒性試驗。
2. 參考 OECD 2013 年公佈斑馬魚胚胎急毒性試驗指引 (Test Guideline No. 236, Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test)<sup>(19)</sup>，配合行政院環境保護署環署於 2017 年公告「生物急毒性檢測方法－斑馬魚胚胎半靜水式法 (NIEA B909.10C)」<sup>(4)</sup> 以半靜水式方式 (semi-static test) 進行胚胎急毒性試驗。

### 二、試驗物來源

本研究參考農糧署 2019 年彰化地區水稻高用量之農藥調查結果<sup>(5)</sup>，選擇以賽達松 (phenthoate) 標準品與 50 % 乳劑為

試驗農藥，進行毒理試驗方法之測試。

1. 賽達松標準品購自友和貿易股份有限公司 (廠牌：Chem Service，含量：95.6%，批號：11082500，製造日期：2020.11.18)。
2. 賽達松 50% 乳劑 (益農產-台灣日產化工股份有限公司，批號 0812201，製造日期：2019.05.13)，含量為 53.29% (以液相層析串聯質譜儀分析，LC-MS/MS 分析)。

### 三、試驗生物體系來源

所有實驗動物之使用與操作均依據「實驗動物照護及使用指引」(2018)<sup>(2)</sup>之規範進行，且經本所實驗動物照護及使用小組 (Institutional Animal Care and Use Committee, ACRI) 審查通過。實驗過程使用之斑馬魚 (zebrafish, *Danio rerio*) AB 品系為一基因型穩定且無基因重組魚種，斑馬魚與其胚胎於本所應用毒理組水生實驗室自行繁殖配種。斑馬魚成長週期：0-3 天為胚胎 (embryo)；4-29 天為仔魚 (larva fish, 體長約 0.37-1.0 公分)；30-90 天為幼魚 (juvenile fish, 體長約 > 1.0 公分)；90 天以上為成魚 (adult fish, 體長約 > 2.0 公分)<sup>(15)</sup>。

1. 斑馬魚幼魚毒性試驗開始前 7 天進行斑馬魚投予試驗物前觀察並記錄是否有病理現象，每一處理組別之試驗魚數量為 7 隻，試驗前兩天和試驗期間不投餵魚飼料。
2. 胚胎毒性試驗之胚胎準備，則使用至少

3-6 月齡之性成熟 AB 品系斑馬魚交配，體長約 1.0 至 2.0 公分 (上顎前端至尾鰭後端的長度)，將雌魚與雄魚以 1：2 之比例進行配對，蒐集交配後所生產之受精卵進行胚胎毒性試驗，每一處理組別之試驗胚胎數量為 20 顆。

### 四、試驗容器與試驗濃度設置

斑馬魚毒性試驗使用容積  $\geq 5.0$  L 之玻璃材質試驗缸。斑馬魚胚胎毒性試驗使用直徑約 90 mm 玻璃培養皿，每皿容量約 40 mL。本研究試驗先以濃度範圍尋找試驗 (range-finding test) 結果後，以比值 < 2.2 倍的等比序列設置確定試驗濃度，進行毒性測試。

1. 賽達松標準品：

- (1) 斑馬魚毒性：濃度範圍尋找試驗設定濃度為 0.1、1.0 與 10.0 mg/L 死亡率分別為 0、0 與 100%，故以 4.096、5.12、6.4、8.0 與 10.0 mg/L 進行確定試驗，4.096 mg/L 死亡率為 0%，5.12 至 10.0 mg/L 死亡率皆為 100%，無法求得  $LC_{50}$  值，故重新進行第 2 次確定試驗，配製分別為溶劑對照組 (solvent control, sC, 丙酮(Acetone)，0.1 mL/L)、0.907、1.353、2.02、3.015 與 4.5 mg/L 等 6 組處理組別。
- (2) 斑馬魚胚胎毒性：濃度範圍尋找試驗設定濃度為 0.2、1.0 與 5.0 mg/L 死亡率分別為 5、10 與 65%，依據以上試驗結果設定配製濃度進行確定試驗，

依 OECD TG 236 需多組對照組分別為空白對照組 (negative control, nC, 養殖水)、溶劑對照組 (sC, 丙酮, 0.1 mL/L)、正對照組 (positive control, pC, 氯化鈉 (Sodium chloride), 4.5 g/L) 及配製濃度 1.897、2.875、4.356、6.6 與 10 mg/L 等 8 組處理組別。

## 2. 賽達松 50% 乳劑：

- (1) 斑馬魚毒性：濃度範圍尋找試驗設定濃度為 1.0、10 與 30 mg/L 死亡率分別為 0、100 與 100%，依據以上試驗結果，故設定配製濃度進行確定試驗，分別為空白對照組 (養殖水)、0.625、1.25、2.5、5 與 10 mg/L 等 6 組處理組別。
- (2) 斑馬魚胚胎毒性：濃度範圍尋找試驗設定濃度為 1.0、10 與 30 mg/L 死亡率分別為 5、100 與 100%，依據以上試驗結果，故設定配製濃度進行確定試驗，分別為空白對照組 (nC, 養殖水)、1、2、4、8 與 16 mg/L 及正對照組 (pC, 氯化鈉, 5.0 g/L) 等 7 組處理組別。

## 五、斑馬魚幼魚與胚胎毒性試驗水質條件

於毒性試驗進行前一週檢測水質，確保水質符合試驗條件，溫度 (temperature) 範圍為  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  (胚胎  $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ )，硬度 (hardness, 以  $\text{CaCO}_3$  濃度為指標) 範圍為

40-250 mg/L (胚胎 100-300 mg/L)，電導度 (conductivity) 為  $< 600 \mu\text{S}/\text{cm}$ ，酸鹼值 (pH) 範圍為 pH 6.0-8.5，溶氧量 (dissolved oxygen)  $\geq 80\%$ ，光照週期 16 小時光照/8 小時黑暗。試驗物處理後每天進行水質測定，各取約 50 mL 試驗液，偵測水中溶氧量、溫度和酸鹼度。

## 六、試驗過程

1. 斑馬魚毒性試驗 (靜水式)：依試驗設計之濃度要求，秤取需要試驗物重量，標準品試驗物以少量丙酮助溶，成品試驗物則以少量養殖水溶解，再加入養殖水定量至總體積 4 L 並攪拌均勻，後續再放入每個處理別所需斑馬魚，進行連續暴露 96 小時急毒性試驗，試驗期間不換水。在投予試驗物後第 3、24、48、72 和 96 小時觀察與記錄各處理組之斑馬魚死亡數與存活魚隻之臨床症狀，將觀察記錄結果。
2. 斑馬魚胚胎毒性試驗 (半靜水式)：標準品試驗物以少量丙酮助溶，成品試驗物直接溶於養殖水，依試驗設計之濃度配製完成後，再各取 40 mL 試驗液注入 9 公分培養皿中 (20 顆胚胎/培養皿)，試驗期間每隔  $24\pm 1$  小時須更換試驗液 (須於觀察胚胎後執行)，開始試驗後，於第 24、48、72 及 96 小時，觀察胚胎形態並記錄死亡數量。

## 七、水中試驗物前處理及有效成分濃度分析

斑馬魚急毒性於當日投予試驗物後第 0 小時、第 48 小時與試驗結束 (第 96 小時或魚隻死亡率已達 100% 的某一觀察時間點, 如第 3、24、48、72 小時) 取水樣。另胚胎急毒性試驗於開始後每天配製之新鮮試驗液 (第 0、24、48 小時) 及試驗結束後 (第 96 小時) 取水樣, 每個濃度處理組皆取 50 mL 水樣進行水中有效成分 (active ingredient, a.i.) 濃度分析。試驗物前處理取 50 mL 離心管中加入 10 mL 水樣及 2 mL 乙腈與 8 mL 乙酸乙酯後, 加入陶瓷均質子石與萃取粉劑後, 立即快速上下震盪 30 秒, 結束後打開瓶蓋排氣。震盪機震盪 50 mL 離心管 1 分鐘後, 靜置 5 分鐘。取上層有機層, 過 0.2  $\mu\text{m}$  PTFE 過濾膜後上機。以液相層析串聯質譜儀 (LC-MS/MS) 分析並參考 AOAC 公告方法 (official method)<sup>(11)</sup> 進行有效成分濃度分析。液相層析串聯質譜儀分析條件為層析管柱: SunShell C8 (250 $\times$ 3 mm, 2.6

$\mu\text{m}$ ), 層析管柱溫度: 40 $^{\circ}\text{C}$ , 流速: 0.4 mL/min, 注射量: 1  $\mu\text{L}$ , 移動相: A 液為 100% 超純水; B 液為 100% 甲醇。移動相為梯度沖提, 分析條件 (表一)。

## 八、統計分析

以投予試驗物後第 96 小時觀察與記錄各處理組之斑馬魚或斑馬魚胚胎之死亡數, 以 Probit 分析方法 (ToxRat 及 EcoTox 統計軟體) 來估算 LC<sub>50</sub> 值 (Lethal Concentration 50%) 及 95% 可信賴區間 (Confidence Limit, CL)。

## 結果

### 一、斑馬魚幼魚及胚胎毒性試驗前及試驗過程水質檢測結果

其水質檢測結果 (表二), 顯示各個濃度處理組其水溫、酸鹼值、溶氧量、硬度與電導度其範圍皆符合試驗水質條件。

表一、液相層析串聯質譜儀移動相梯度條件

Table 1. LC-MS/MS gradient conditions used in phenthoate separation

Run Time (min)	A (%)	B (%)	Flow Rate (ml/min)
0	30	70	0.4
2	10	90	0.4
6	10	90	0.4
6.3	40	60	0.4
8.3	40	60	0.4
9	30	70	0.4
11	30	70	0.4

表二、斑馬魚幼魚及胚胎毒性試驗水質檢測之結果

Table 2. Properties of aquaculture water used in juvenile and embryotic zebrafish toxicity tests

Test group	Water quality test time	pH	Temperature °C	Dissolved oxygen %	Hardness mg/L	Conductivity µs/cm
Standard-juvenile	Before the test	7.02	26.8	99.9	203	446
	During the test	7.98-8.08	26.7-27.2	96.7-98.6	-	-
Standard-embryos	Before the test	7.53	26.8	98.8	212	426
	During the test	7.78-7.99	26.2-26.5	98.9-100.9	204-231	421-425
50 % EC-juvenile	Before the test	7.53	27.3	98.3	178	454
	During the test	8.05-8.14	26.2-26.3	99.8-100.9	-	-
50 % EC-embryos	Before the test	7.52	27.3	99.2	201	481
	During the test	7.74-7.87	26.2-26.5	99.9-100.4	198-206	446-450

## 二、賽達松標準品對斑馬魚幼魚與胚胎急毒性試驗結果

1. 在斑馬魚急毒性試驗，幼魚暴露於溶劑對照組（丙酮）、0.907、1.353、2.02、3.015 與 4.5 mg/L 等 6 個濃度，連續暴露 96 小時之半數致死濃度 (LC<sub>50</sub>) 結果為 3.016 mg/L (水樣分析濃度 2.706 mg a.i./L)，95% 信賴區間 (CL) 為 0.961-9.46 mg/L (水樣分析濃度 0.361-20.28 mg a.i./L)，因試驗斑馬魚死亡隻數差異較大，導致經統計分析軟體估算值範圍較大)，斑馬魚經賽達松標準品連續暴露 96 小時確定試驗之結果，無造成魚隻死亡之濃度，推估其無毒害濃度 (NOEC, no observed effect concentration) 為 0.907 mg/L (0.94 mg a.i./L) (表三)。依試驗結果顯示處理組

別 0.907-4.5 mg/L 在授予標準品後第 3 小時開始出現脊柱側彎、不活潑、激動性增加、呼吸不正常、沈於魚缸底部、浮於魚缸上方、腹部上翻游動、側面向上游動、翻轉游動、側面朝上平躺於底部、腹部上翻平躺於底部、頭重尾輕的浮游、尾重頭輕的仰游、魚受驚後不自主的快速環游、不規則且不協調的游動及部分魚隻死亡等臨床症狀 (表四)。

2. 在斑馬魚胚胎急毒性試驗，受精卵暴露於空白對照組 (nC, 養殖水)、正對照組 (pC, 氯化鈉)、溶劑對照組 (sC, 丙酮)、1.897、2.875、4.356、6.6 與 10 mg/L 等 8 個濃度，連續暴露 96 小時之半數致死濃度 (LC<sub>50</sub>) 結果為 3.827 mg/L (水樣分析濃度 4.250 mg a.i./L)，95 % 信賴區間 (CL) 為 3.574-4.056 mg/L (水樣分析濃度 3.958-4.564 mg a.i./L)，斑馬魚胚胎經賽達松標準品連

表三、賽達松標準品對斑馬魚幼魚及胚胎 96 小時急毒性試驗之結果

**Table 3.** Results of 96-hour acute toxicity tests investigating the effects of standard phenthoate on juvenile and embryotic zebrafish

Item	Zebrafish juveniles	Zebrafish embryos
LC <sub>50</sub> mg/L (mg a.i./L)	3.016 (2.706)	3.827 (4.250)
95 % Confidence Intervals mg/L (mg a.i./L)	0.961-9.460 (0.361-20.28)	3.574-4.056 (3.958-4.564)
No Observed Effect Concentration (NOEC) mg/L (mg a.i./L)	0.907 (0.94)	2.875 (3.53)

LC<sub>50</sub> : Lethal Concentration 50%.

表四、斑馬魚幼魚經賽達松標準品連續暴露 96 小時之臨床症狀

**Table 4.** Clinical symptoms observed in juvenile zebrafish exposed to standard phenthoate for 96 hours

Test group	Nominal concentrations (mg/L)	Active ingredient concentrations (mg a.i./L)	Clinical signs code* (Number of fish)				
			3 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
A	0-acetone Solvent Control	ND	1 (7)	1 (7)	1 (7)	1 (7)	1 (7)
B	0.907	0.94	1 (4) 6 (3)	1 (6) 6 (1)	1 (6) 10 (1)	1 (7)	1 (7)
C	1.353	1.03	1 (2), 6 (3) 11 (2)	10 (7)	2 (1), 5 (2) 7 (3), 11 (3)	2 (1), 5 (1) 9 (1), 10 (1), 11 (4)	2 (1), 5 (1) 11 (4)
D	2.020	1.7	2 (1) 10 (6)	2 (1), 10 (1) 11 (1), 13 (3)	2 (1), 5 (2) 11 (1), 13 (2)	2 (2), 5 (2) 11 (2)	2 (2)
E	3.015	2.22	10 (7)	11 (6), 13 (1)	10 (1), 11 (6) 12 (1)	2 (2), 11 (5) 19 (1), 20 (1)	6 (5), 11 (5) 19 (3)
F	4.5	3.83	2 (2), 10 (3) 21 (2)	4 (2), 10 (1) 11 (4), 19 (1)	2 (1), 4 (2) 11 (4), 19 (1)	9 (1), 10 (1) 11 (3), 18 (1)	9 (1), 10 (1) 11 (3), 14 (1) 18 (1)

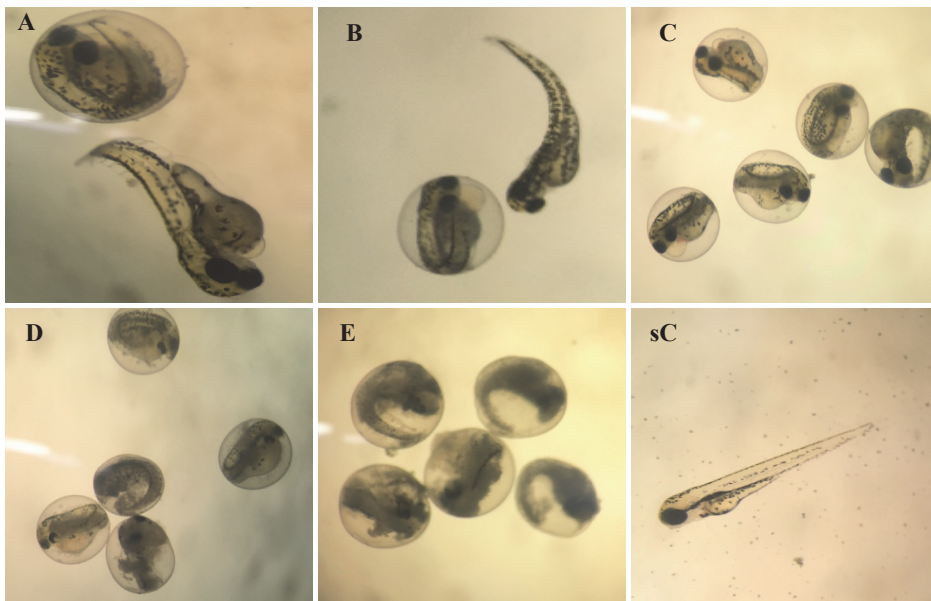
ND : Indicates that the analytical result of the sample was below the quantitative limit of 0.01 mg/L.

\* Clinical symptom codes:

- |                                      |   |   |
|--------------------------------------|---|---|
| 1 : Normal                           | 2 : Found dead  | 4 : Hemorrhage  |
| 5 : Abnormal spinal curvature        | 6 : Lethargy  | 7 : Increase Excitability                                   |
| 9 : Abnormal Breathing               | 10 : Sink in the bottom of the tank                   | 11 : Float at the surface of the tank                       |
| 12 : Swim pattern is a slant         | 13 : Swim pattern is swirly                           | 14 : Lie on the bottom of the tank with with side facing up |
| 18 : Twitch of the fish body or fins | 19 : Swims in a fast, circular pattern when disturbed | 20 : Swim pattern is irregularly and uncoordinated          |
| 21 : Swimming with the belly up      |   |   |

續暴露 96 小時確定試驗之結果，無造成魚胚胎死亡之濃度，推估其無毒害濃度 (NOEC) 為 2.875 mg/L (3.53 mg a.i./L) (表三)。處理濃度在 1.897 mg/L 與 2.875 mg/L 於 96 小時其孵化率分別為 10 %及 15 %，且死亡率不高，推測

賽達松標準品會延遲孵化作用，其孵化後的仔魚出現畸形，仔魚畸形外觀有心囊浮腫、卵黃囊浮腫、脊椎彎曲及魚體不筆直異常形態等 (圖一)。另賽達松標準品濃度在 4.356 mg/L 以上之濃度，於 96 小時造成胚胎之死亡率為 100%。



圖一、賽達松標準品對斑馬魚胚胎連續暴露 96 小時之畸形形態。A：1.897 mg/L 出現延遲孵化、魚體不筆直、心囊與卵黃囊浮腫及出血；B：2.875 mg/L 出現延遲孵化、魚體不筆直、及心囊與卵黃囊浮腫；C：4.356 mg/L 出現延遲孵化、無心跳、心囊與卵黃囊浮腫及出血；D：6.6 mg/L 出現心囊與卵黃囊浮腫、出血及無心跳；E：10 mg/L 出現無心跳，sC 溶劑對照組：正常形態斑馬魚仔魚。

**Fig. 1.** Deformities in zebrafish embryos exposed to standard phenthoate for 96 hours. A: Exposure to 1.897 mg/L phenthoate led to delayed hatching, abnormal spinal curvature, pericardial edema, yolk sac edema, and hemorrhage; B: Exposure to 2.875 mg/L phenoate led to delayed hatching, spinal curvature, pericardial edema, and yolk sac edema; C: Exposure to 4.356 mg/L phenoate led to delayed hatching, lack of heartbeat, pericardial edema, yolk sac edema, and hemorrhage; D: Exposure to 6.6 mg/L phenoate led to pericardial edema, yolk sac edema, hemorrhage, and lack of heartbeat; E: Exposure to 10 mg/L phenoate led to lack of heartbeat; sC: normal larvae.

### 三、賽達松 50% 乳劑對斑馬魚幼魚與胚胎急毒性試驗結果

1. 在斑馬魚急毒性試驗，幼魚暴露於空白對照組 (養殖水)、0.625、1.25、2.5、5 與 10 mg/L 等 6 個濃度，連續暴露 96 小時之半數致死濃度 (LC<sub>50</sub>) 結果為 2.95 mg/L (水樣分析濃度 1.41 mg a.i./L)，95% 信賴區間 (CL) 為 1.95-4.47 mg/L (水樣分析濃度 0.91-2.29 mg a.i./L)。依斑馬魚幼魚經連續暴露 96 小時之結果，無造成魚隻死亡之濃度，推估其無毒害濃度 (NOEC) 為 1.25 mg/L (水樣分析濃度 0.54 mg a.i./L) (表五)。依試驗結果顯示 0.625-10 mg/L 在投予後第 3 小時開始出現脊柱側彎、不活潑、激動性增加、沈於魚缸底部、浮於魚缸上方、側面向上游動、翻轉游動、側面朝上平躺於底部、腹部上翻平躺於底部、頭重尾輕的浮游、尾重頭輕的仰游、身體或鰭發生抽搐、魚受驚後不自主的快速環游、不規則且不協調的游動及部分魚隻死亡等臨床症狀 (表六)。
2. 在斑馬魚胚胎急毒性試驗，受精卵暴露於空白對照組 (nC, 養殖水)、正對照組 (pC, 氯化鈉)、1、2、4、8 與 16 mg/L 等 7 個濃度，連續暴露 96 小時之半數致死濃度 (LC<sub>50</sub>) 結果為 8.615 mg/L (水樣分析濃度 3.670 mg a.i./L)，95% 信賴區間 (CL) 為 6.192-11.99 mg/L (水樣分析濃度 2.616-5.150 mg a.i./L)。依斑馬魚胚胎經連續暴露 96 小時試驗之結果，無造成斑馬魚胚胎死亡之濃度，推估其無毒害濃度 (NOEC) 為 < 1 mg/L (水樣分析濃度 < 0.41 mg a.i./L) (表五)。試驗結果顯示 1-8 mg/L 於 96 小時死亡率不高，其孵化後的仔魚出現畸形，仔魚畸形外觀有心囊浮腫、卵黃囊浮腫、出血、體色變淡、魚體短小及魚體不筆直等異常形態 (圖二)。

表五、賽達松 50% 乳劑對斑馬魚幼魚與胚胎 96 小時急毒性試驗之結果

Table 5. Results of 96-hour acute toxicity tests investigating the effects of a 50% phenthoate emulsion product on juvenile and embryonic zebrafish

Item	Zebrafish juveniles	Zebrafish embryos
LC <sub>50</sub> mg/L (mg a.i./L)	2.95 (1.41)	8.615 (3.670)
95% Confidence Intervals mg/L (mg a.i./L)	1.95-4.47 (0.91-2.29)	6.192-11.99 (2.616-5.150)
No Observed Effect Concentration (NOEC) mg/L (mg a.i./L)	1.25 (0.54)	< 1 (< 0.41)

LC<sub>50</sub>: Lethal Concentration 50%.

表六、斑馬魚幼魚經賽達松 50% 乳劑連續暴露 96 小時之臨床症狀

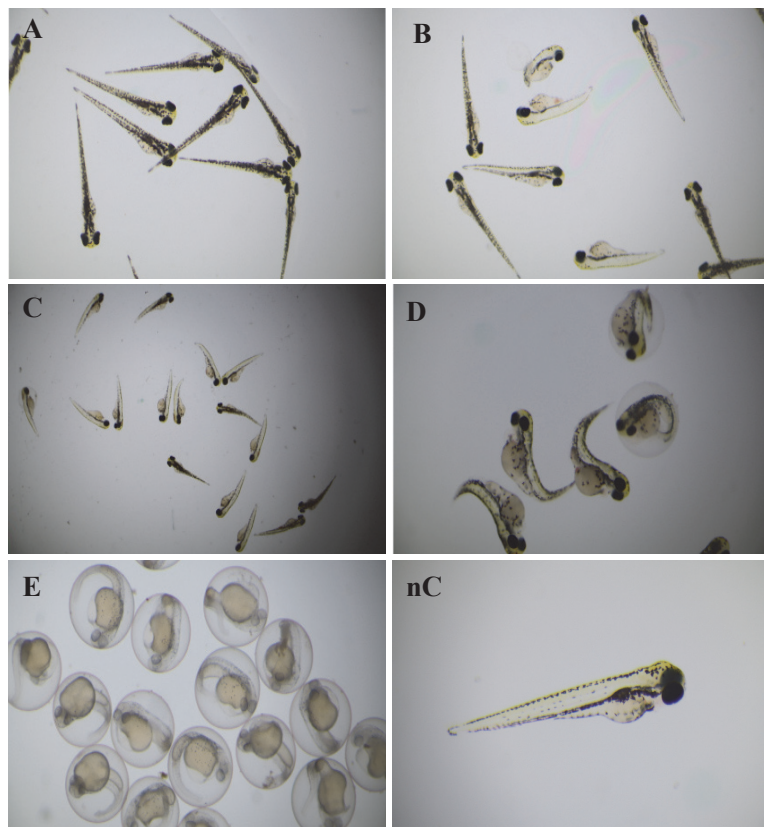
**Table 6.** Clinical signs observed of zebrafish juveniles exposed to phenthoate 50% emulsifiable concentrate (EC) products for 96 hours

Test group	Nominal concentrations (mg/L)	Active ingredient concentrations (mg a.i./L)	Clinical signs code* (Number of fish)				
			3 hr	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
A	0-water Control	ND	1 (7)	1 (7)	1 (7)	1 (7)	1 (7)
B	0.625	0.32	1 (1)	6 (7)	6 (7)	1 (5)	6 (7)
			6 (1)	7 (1)	10 (1)	11 (2)	10 (3)
			7 (1)	11 (1)	11 (2)		11 (4)
C	1.25	0.54	6 (6)	6 (7)	6 (7)	6 (7)	5 (1)
			10 (1)	10 (2)	10 (1)	11 (7)	6 (7)
			11 (6)	11 (5)	11 (6)		11 (7)
D	2.5	1.10	16 (1)	5 (3)	5 (4)	2 (2)	2 (2)
			11 (7)	6 (7)	7 (1)	5 (5)	5 (3)
			20 (7)	10 (1)	10 (1)	10 (2)	11 (3)
E	5	2.75	11 (6)	11 (6)	11 (6)	14 (1)	18 (3)
			16 (1)	10 (1)	2 (1)	3 (1)	2 (2)
			12 (1)	2 (1)	5 (4)	5 (2)	5 (2)
			13 (2)	5 (2)	10 (3)	6 (4)	11 (2)
			14 (1)	10 (3)	11 (2)	10 (1)	
			17 (1)	12 (2)	14 (1)	11 (3)	
20 (7)	15 (1)	19 (3)	18 (1)				
F	10	5.39	16 (1)	8 (1)	2 (7)	-	-
			14 (5)	14 (5)			
			15 (1)				

ND : Indicates that the analytical result of the sample was below the quantitative limit of 0.02 mg/L.

\* Clinical symptom codes:

1 : Normal	2 : Found dead	3 : Discoloration
5 : Abnormal spinal curvature	6 : Lethargy	7 : Increase Excitability
8 : Atxia	10 : Sink in the bottom of the tank	11 : Float at the surface of the tank
12 : pattern is a slant	13 : Swim pattern is swirly	14 : Lie on the bottom of the tank with side facing up
15 : Lie on the bottom of the tank with belly up	16 : Swim with the head down and tail up	17 : Swim with the head up and tail down
18 : Twitch of the fish body or fins	19 : Swims in a fast, circular pattern when disturbed	20 : Swim pattern is irregular and uncoordinated



圖二、暴露於賽達松 50% 乳劑各處理濃度第 96 小時的斑馬魚胚胎及仔魚之畸形形態。A：1 mg/L 出現部份仔魚卵黃囊浮腫及體色變淡；B：2 mg/L 卵黃囊浮腫、出血、魚體短小及活動力不佳；C：4 mg/L 出現心囊與卵黃囊浮腫、出血、魚體短小及活動力不佳；D：8 mg/L 出現心囊與卵黃囊浮腫、出血及魚體不筆直；E：16 mg/L 出現心囊與卵黃囊浮腫變形及無心跳，nC 空白對照組：正常形態斑馬魚仔魚。

**Fig. 2.** Deformities in zebrafish embryos and larvae exposed to phenthoate 50% emulsion products for 96 hours. A: Exposure to 1mg/L led to yolk sac edema and lack of pigmentation; B: Exposure to 2 mg/L led to yolk sac edema, hemorrhage, short body, and poor activity; C: Exposure to 4 mg/L led to pericardial edema, yolk sac edema, hemorrhage, short body, and poor activity; D: Exposure to 8 mg/L led to pericardial edema, yolk sac edema, hemorrhage, abnormal spinal curvature, and spinal deformities; E: Exposure to 16 mg/L led to pericardial edema, yolk sac edema, and lack of heartbeat; nC: normal larvae.

## 結果與討論

賽達松為有機磷殺蟲劑，常廣泛使用於農業與環境衛生害蟲的防治。本研究參考農糧署 2019 年彰化地區水稻高用量之農藥調查資料作為試驗農藥選擇依據，選取賽達松標準品與 50% 乳劑作為比較斑馬魚幼魚與胚胎急毒性差異之試驗物。由試驗結果得知賽達松標準品對斑馬魚幼魚急毒性 ( $LC_{50}$ : 3.016 mg/L) 與胚胎急毒性 ( $LC_{50}$ : 3.827 mg/L) 及賽達松 50% 乳劑對斑馬魚幼魚急毒性 ( $LC_{50}$ : 2.95 mg/L) 與胚胎急毒性 ( $LC_{50}$ : 8.615 mg/L) 以上 4 種試驗結果，依 GHS 化學品分類及標示全球調和制度 (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals) 危害等級分類 (<1 mg/L 為劇毒；1-10 mg/L 為中等毒；10-100 mg/L 為輕毒；>100 mg/L 為低毒) 皆為中等毒性。由本實驗結果得知，賽達松標準品與 50% 乳劑對斑馬魚幼魚與胚胎急毒性有差異。賽達松標準品對斑馬魚幼魚急毒性只些微略高於胚胎急毒性，但是，賽達松 50% 乳劑對斑馬魚幼魚急毒性卻明顯高於胚胎急毒性。在 Karra 等人在 2015 年發表文獻中，提到賽達松 (50% EC) 對 *Labeo rohita* 幼魚毒性之 96 小時  $LC_{50}$  值為 2.1 mg/L，與本研究對斑馬魚幼魚急毒性 ( $LC_{50}$ : 2.95 mg/L) 雖為不同魚種，但毒性結果相近<sup>(14)</sup>。參考 Rahman 等人在 2020 年發表有機磷殺蟲劑

撲滅松 50% 乳劑對斑馬魚胚胎及仔魚 (24 日齡) 的毒性試驗結果，撲滅松對胚胎 24 小時的  $LC_{50}$  值為 0.235 mg/L，而對仔魚在 24、48 和 72 小時的  $LC_{50}$  值分別為 0.620、0.475 和 0.341 mg/L<sup>(21)</sup>。撲滅松劑量毒性對斑馬魚胚胎的孵化率、存活和孵育期是有很大的影響，且對斑馬魚胚胎和仔魚在暴露於不同濃度時會出現明顯的畸形，尤其是在較高濃度時。撲滅松原體對胚胎致死率明顯高於仔魚，而隨著撲滅松濃度的增加，斑馬魚胚胎和仔魚的死亡率也顯著增加，胚胎致死率皆高於仔魚致死率，證明斑馬魚胚胎較仔魚對撲滅松更敏感，觀察到孵化期延長可能是負責孵化的蛋白酶的結構和功能因毒物質而被破壞阻塞絨毛膜的通道，導致胚胎發育過程中缺氧<sup>(21)</sup>。

本報告以賽達松標準品與 50% 乳劑進行斑馬魚胚胎和幼魚毒性試驗比較結果，賽達松 50% 乳劑則對胚胎毒性較對幼魚毒性低，造成此一差異的原因有待進一步探討。雖然兩者毒性危害等級皆為中等毒性，但是藉由本實驗結果證實運用斑馬魚胚胎毒性試驗 (OECD TG236) 進行賽達松農藥毒性評估深具必要性，可在有機磷殺蟲劑農藥登記時做為增項評估資料之一。胚胎和幼魚對毒物的敏感性通常因毒物種類而異<sup>(9, 10)</sup>，因此，未來對於其它農藥進行毒性試驗時，應該同時進行斑馬魚胚胎和幼魚毒性試驗，其雙重毒性數據可以更加準確呈現有機磷農藥標準品與成品農藥毒性影響結果。

## 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. 王應然。2020。動物替代測試：斑馬魚胚胎在化學物質生態毒性的現況與展望。科學報導 461：4-8。
2. 行政院農業委員會。2018。實驗動物照護及使用指引。農牧字第 1070043010A 號令。
3. 農業部動植物防疫檢疫署。2022。農藥資訊服務網。檢自 <https://pesticide.baphiq.gov.tw/information/> (Jan. 03, 2022)
4. 行政院環境保護署。2017。生物急毒性檢測方法－斑馬魚胚胎半靜水式法 (NIEA B909.10C)。環署檢字第 1060021982。檢自 <https://www.epa.gov.tw/DisplayFile.aspx?FileID=59AD7F6450A3845A> (May 22, 2023)
5. 農糧署。2019。彰化地區水稻高用量之農藥調查結果報告〔未出版之調查報告〕。
6. Agbohessi, P. T., Imorou Toko, I., Houndji, A., Gillardin, V., Mandiki, S. N. M., and Kestemont, P. 2013. Acute toxicity of agricultural pesticides to embryo-larval and juvenile African catfish *Clarias gariepinus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 64: 692-700.
7. Ahmed, S. I., Ahmmed, M. K., Ghosh, S. K., Islam, M. M., and Shahjahan, M. 2015. Histo-architectural changes of intestinal morphology in Zebra fish (*Danio rerio*) exposed to Sumithion. Res. Agric. Livest. Fish. 2: 499-506.
8. Ahmed, S. I., Zahangir, M. M., Haque, F., Ahmmed, M. K., and Shahjahan, M. 2016. Alteration of blood glucose and hemoglobin levels in zebrafish exposed to sumithion. Progress. Agric. 27: 216-221.
9. Ansari, S., and Ansari, B. A. 2012. Alphamethrin toxicity: Effect on the reproductive ability and the activities of phosphatases in the tissues of zebrafish, *Danio rerio*. Int. J. Life Sci. Pharma. Res. 2: 89-100.
10. Arufe, M. I., Arellano, J. M., Albendín, G., and Sarasquete, C. 2010. Toxicity of parathion on embryo and yolk-sac larvae of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): effects on survival, cholinesterase, and carboxylesterase activity. Environ. Toxicol. 25: 601-607.
11. Association of Official Agricultural Chemists (AOAC) International. 2007. AOAC Official Method 2007.01 Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate. Retrieved from [https://nucleus.iaea.org/sites/fcris/Shared%20Documents/SOP/AOAC\\_2007\\_01.pdf](https://nucleus.iaea.org/sites/fcris/Shared%20Documents/SOP/AOAC_2007_01.pdf) (Jan 03, 2022)

12. Belanger, S. E., Rawlings, J. M., and Carr, G. J. 2013. Use of fish embryo toxicity tests for the prediction of acute toxicity to chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 32: 1768-1783.
13. Braunbeck, T., Boettcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M., and Seitz, N. 2005. Towards an alternative for the acute fish LC<sub>50</sub> Test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species - An update. *ALTEX* 22: 87-102.
14. Karra, S., Pothula, S. V. V., Naladi, B. J., and Kanikaram, S. 2015. Acute toxicity of Phenthoate (50% EC) on survival and behavioral pattern of freshwater fish *Labeo rohita* (Hamilton, 1822). *Intl. J. Fish. Aquat. Stud.* 2: 38-42.
15. Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., Schilling, T. F. 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203: 253-310.
16. Lammer, E., Carr, G. J., Wendler, K., Rawlings, J. M., Belanger, S. E., and Braunbeck, T. 2009. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 149: 196-209.
17. Marimuthu, K., Muthu, N., Xavier, R., Arockiaraj, J., Rahman, M. A., and Subramaniam S. 2013. Toxicity of buprofezin on the survival of embryo and larvae of African catfish, *Clarias gariepinus* (Bloch). *PLoS One.* 8: e75545.
18. Nagel, R. 2002. DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio*- A general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX* 19: 38-48.
19. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). 2013. Test guideline no. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test. OECD test guidelines for the testing of chemicals, section 2. OECD publishing. Retrieved from <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en> (Jan. 03, 2022)
20. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). 2019. Test guideline no. 203: Fish, acute toxicity testing. OECD test guidelines for the testing of chemicals, section 2. OECD publishing. Retrieved from <https://doi.org/10.1787/20745761> (Jan. 03, 2022)
21. Rahman, M. S., Islam, S. M., Haque, A., and Shahjahan, M. 2020. Toxicity of the organophosphate insecticide sumithion to embryo and larvae of zebrafish. *Toxicol. Rep.* 7: 317-323.
22. Renieri, E. A., Sfakianakis, D. G., Alegakis, A. A., Safenkova, I. V., Buha, A., Matović, V., Tzardi, M., Dzantiev, B. B., Divanach, P., Kentouri, M., and

- Tsatsakis, A. M. 2017. Nonlinear responses to waterborne cadmium exposure in zebrafish. An *in vivo* study. *Environ. Res.* 157: 173-181.
23. Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E., Luckenbach, T., and Voelker, D. 2008. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment - applications beyond acute toxicity testing. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 15: 394-404.
24. Schulte, C., and Nagel, R. 1994. Testing acute toxicity in the embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio*, as an alternative to the acute fish test: Preliminary results. *ATLA* 22: 12-19.
25. Shi, X., Gu, A., Ji, G., Li, Y., Di, J., Jin, J., Hu, F., Long, Y., Xia, Y., Lu, C., Song, L., Wang, S., and Wang, X. 2011. Developmental toxicity of cypermethrin in embryolarval stages of zebrafish. *Chemosphere.* 85: 1010-1016.
26. Shukla, S., Jhamtani, R. C., Dahiya, M. S., and Agarwal, R. 2017. Oxidative injury caused by individual and combined exposure of neonicotinoid, organophosphate and herbicide in zebrafish. *Toxicol. Rep.* 4: 240-244.
27. Tsuda, T., Nakamura, T., Inoue, A., and Tanaka, K. 2009. Pesticides in water and sediment from littoral area of Lake Biwa. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82: 683-689.
28. United States Environmental Protection Agency (USEPA). 2016. Ecological effects test guidelines. OCSPP 850.1075: Freshwater and saltwater fish acute toxicity test. EPA 712-C-16-007.
29. Vargas, R., and Ponce-Canchihuamán, J. 2017. Emerging various environmental threats to brain and overview of surveillance system with zebrafish model. *Toxicol. Rep.* 4: 467-473.

# Acute Toxicity of Standard Phenthoate and 50% Emulsion on Juvenile and Embryotic Zebrafish

Shu-Chuan Chen<sup>1</sup>, Fang-Yun Lin<sup>1</sup>, Kai-Ping Wang<sup>1</sup>, Wei-Ren Tsai<sup>1</sup>, Yu-Chen Hsieh<sup>1\*</sup>

## Abstract

Chen, S. C., Lin, F. Y., Wang, K. P., Tsai W. R., and Hsieh, Y. C. 2023. Acute Toxicity of Standard Phenthoate and 50% Emulsion on Juvenile and Embryotic Zebrafish. *Taiwan Pestic. Sci.* 15: 19-36.

Phenthoate is a type of acetylcholinesterase inhibitor and insecticide frequently used to prevent *Chilo suppressalis* (Walker) infections in rice. In this study, the acute toxicity of standard phenthoate and a 50% emulsion product was assessed in juvenile and embryotic zebrafish. For acute toxicity tests (zebrafish exposure time: 96 hours), the concentrations of standard products across different treatment groups were 0.907, 1.353, 2.020, 3.015, and 4.5 mg/L (acetone was used as a solvent control), and the concentrations of 50% emulsion products were 0.625, 1.25, 2.5, 5, and 10 mg/L (aquaculture water was used as a blank control). Lethal concentration (LC<sub>50</sub>) values for the standard and 50% emulsion products were found to be 3.016 mg/L (2.706 mg a.i./L) and 2.95 mg/L (1.41 mg a.i./L), respectively. For acute toxicity tests on zebrafish embryos, the concentrations of standard product in different treatment groups were 1.897, 2.875, 4.356, 6.6, and 10 mg/L, in which aquaculture water was used as a blank control, acetone was used as a solvent control, and sodium chloride (4.5 g/L) was used as a positive control. The concentrations of 50% emulsion products in different treatment groups were 1, 2, 4, 8, and 16 mg/L, in which aquaculture water and sodium chloride (5.0 g/L) were used as blank and positive controls, respectively. After exposure for 96 hours, LC<sub>50</sub> values for the standard and 50% emulsion products were 3.827 mg/L (4.250 mg a.i./L) and 8.615 mg/L (3.670 mg a.i./L),

---

Accepted: September 26, 2023.

\* Corresponding author, E-mail: ych@acri.gov.tw

<sup>1</sup> Agricultural Chemicals Research Institute, Ministry of Agriculture, Taichung

respectively. Moreover, embryos showed obvious developmental defects and morphological changes, including delayed hatching, spinal curvature, pericardial edema, yolk sac edema, lack of heartbeat, hemorrhage, short body, and poor activity. In the four toxicity tests performed, hazard classifications associated with  $LC_{50}$  values were all moderately toxic (1-10 mg/L), indicating that standard phenthoate and the 50% emulsion product have similar toxicity levels. The findings from this study can serve as a reference in alternative assessments of aquatic toxicity tests in Taiwan.

**Key words:** phenthoate, zebrafish, embryo, acute toxicity