

# 水生生物在環境毒性檢測之應用

邱彥璋

## 前 言

農藥在國內已普遍應用在農業上來防止植物遭到病害或蟲害。在現今各國所使用的農藥種類中，以化學性農藥的發展最為迅速，由於化學農藥具有使用方便、價格便宜和藥效顯著等特點，並可有效地防治昆蟲、細菌、真菌和線蟲類所引起的多種蟲害或病害，因此也最為受農民廣泛使用。

人類使用農藥來增加作物產量及提高品質的同時，可能會忽略過度地使用農藥可能引起水源污染的問題。以水耕環境為例，過量農藥會隨著降雨匯集至河流系統中，長久累積之後，對人類生存環境造成威脅，另一方面也影響到水生生物的正常生長，破壞生態平衡；除此之外，遭受農業藥劑污染的水質也會對人類健康造成傷害，並提高傳染性疾病的肇生機率，嚴重影響到國人的居住環境品質，同時也增加了社會成本的負擔。許多研究報告已經明確地指出特定的農藥對生物具有致癌性、免疫毒性、神經毒性、引起行為異常、發育遲緩以及呼吸性毒性等傷害；具有環境荷爾蒙效果的藥物也會影響到魚類正常的生殖功能。因此，過度及不正確的使用農藥對水生環境所產生出的毒性和破壞已經受到全世界各個先進國家的重視，進而制訂一套完善的水生毒性評估標準。近年來，應用水生生物(魚類、水蚤類或水生植物)進行水生環境毒性試驗已經被廣泛地被用來評定特定物質對水生生物是否具有傷害性，同時也能偵測水質是否遭受有毒物質的污染。因此，進行環境毒性試驗的主要目的，即是在輔助研究人員評估於自然環境中，特定的藥物是否會對相似的生物在短期或長期曝露下產生顯著的傷害，並提供一個數據以判斷水質的好壞。此外，於不同魚種之間所測試得到的結果相互比較，可再進一步推得出一個較為可靠的標準範圍。

本篇內容介紹現今國際間常使用的水生環境毒性檢測方法，以及簡要說明水生生物急毒性試驗原理、流程和我國在農藥對於水生生物之毒性分類。另外針對美國環保署(United States Environmental Protection Agency, USEPA)和經濟合作發展組織(Organization of Economic Cooperation and Development, OECD)所提出的急毒性試驗條件、建議事項及報告要求進行比較。此外，也介紹目前國際間常用的模式魚種斑馬魚之特點與其在環境檢測上的應用，和未來毒性試驗的研究趨勢及方向。希望藉由本篇概略性的介紹，有助於國人對於水生環境毒性試驗有初步的認識，並供相關試驗人員做為參考。

## 水生生物毒性試驗

### 一、種類

目前國際間對於水生毒性的檢測，已針對不同的毒性試驗項目(短期、長期、急毒性)及不同的試驗生物(淡水或海水魚類、水蚤、水生植物等)提出相關的參考方法，如表1.所示。

表1. 水生生物毒性試驗種類

試驗名稱	目的	試驗對象	試驗指引(年代)
魚類急毒性試驗	96小時急毒性物質檢測	淡水魚類	OECD <sup>a</sup> 203 (1992)
	96小時急毒性物質檢測	海水魚類	OSPAR <sup>b</sup> 2006 (2006)
魚類延長毒性試驗	至少14天的毒性測試，有別於急毒性物質檢測	淡水魚類	OECD204 (1984)
魚早期慢性毒性試驗	估算化學物質在魚類的慢性致死及亞致死效應	淡水或海水魚類	OECD210 (1992)
幼魚生長試驗	特定化學物質28天連日曝露後對幼魚生長之影響	淡水或海水魚類	OECD215 (2000)
魚胚胎短期毒性試驗	估算化學物質在魚類胚胎的慢性致死及亞致死效應	淡水或海水魚類	OECD212 (1998)

試驗名稱	目的	試驗對象	試驗指引(年代)
魚類內分泌障礙效應	化學物質對魚類內分泌功能之危害檢測	海水魚類	OECD230 (2009)
水蚤急毒性試驗	評估化學物質對水蚤的急毒性效應	無脊椎淡水水蚤類	OECD202 (2004)
水蚤生殖試驗	評估化學物質對水蚤的生殖能力效應	無脊椎淡水水蚤類	OECD211 (2008)
藻類生長抑制試驗	測定物質對於淡水藻類的生長效應	淡水水生藻類	OECD201 (2006)
	測定物質對於海水藻類的生長效應	海水水生藻類	ISO <sup>c</sup> 10253 (1998)
青萍生長抑制試驗	測定物質對於淡水水生植物的生長效應	淡水水生浮萍	OECD221 (2006)
甲殼動物急毒性試驗	水質對海洋橈足類(橈足亞綱、甲殼綱)致死毒性的測定	海水橈足類動物	ISO14669 (1999)

<sup>a</sup> Organization of Economic Cooperation and Development

<sup>b</sup> Oslo-Paris Commission

<sup>c</sup> International Organization for Standardization

LAB.DHIGROUP.COM, Ecotoxicological Laboratory. <http://lab.dhigroup.com/>

## 二、水生生物急毒性試驗原理

所謂的急毒性物質即是單一次且短時間的暴露、同時會伴隨著有生物體嚴重傷害或死亡的中毒效應之物質。許多的生物預測系統，包括無脊椎動物、魚類和藻類已經廣泛被使用在進行水質污染程度的評估及監控，其中又以水蚤(*Daphnia magna*)的急毒性測試最常被用來檢測水質毒性。另外，許多的魚種也能用來進行急毒性測試(表2.)，包括斑馬魚(zebrafish, *Danio rerio*)、胖頭鱮(fathead minnow, *Pimephales promelas*)、鯉魚(common carp, *Cyprinus carpio*)、青鱗魚(ricefish, *Oryzias latipes*)、孔雀魚(guppy, *Poecilia reticulata*)、藍鰓魚(bluegill, *Lepomis macrochirus*)和虹鱒(rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*)。

急毒性試驗一般的作法會將水生植物、水蚤或魚類直接曝露在含有不同濃度藥劑的藥浴中，持續一段時間(通常水蚤會進行48小時而魚類則會進行96小時)後，觀察水蚤或魚類的死亡情形，同時也將試驗生物不正常的行為記錄下來。以魚類急毒性測試為例，分別於24、48、72、96小時的時間點紀錄下魚的死亡率同時推算出半致死濃度(LC<sub>50</sub>)(圖1)。而水蚤急毒性試驗則是在24和48小時觀察水蚤是否呈現無法行動(immobilization)的狀態，並加以推出半效應濃度(EC<sub>50</sub>)。

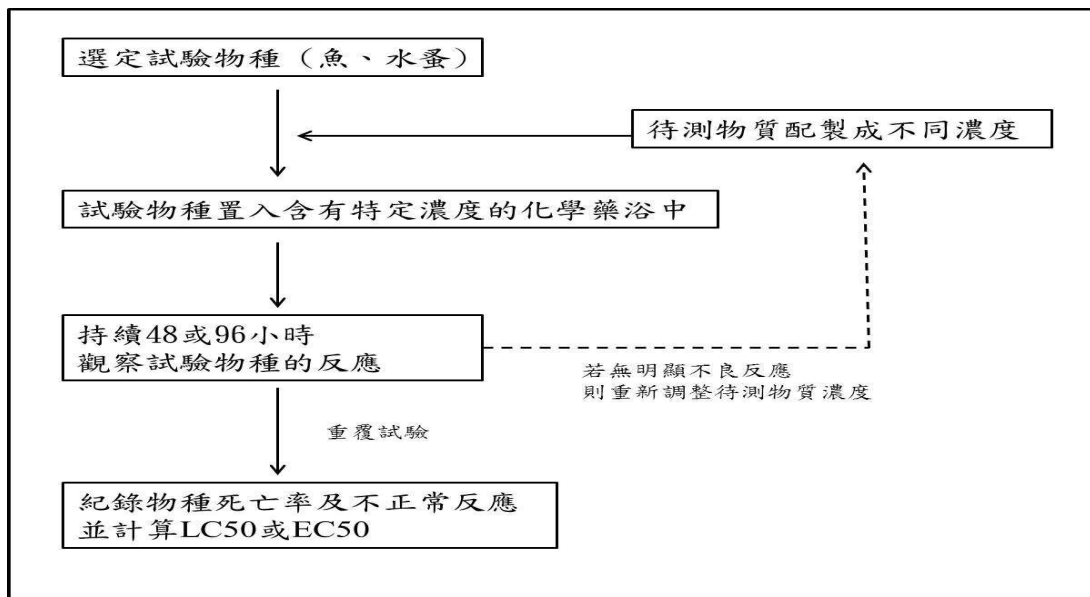


圖1. 水生生物急毒性試驗流程圖。

根據我國農藥對水生生物毒性規範，可將物質依據其水生生物毒性強弱分成四大類(表2)。

表2. 農藥對水生生物毒性分類表

水生生物毒性分類	淡水魚類急毒性	淡水無脊椎生物急毒性
	LC <sub>50</sub> (96hr) (單位：mg/L)	EC <sub>50</sub> (48hr) (單位：mg/L)
I 劇毒	≤ 1	≤ 1
II 中等毒	1 < ~ ≤ 10	1 < ~ ≤ 10
III 輕毒	10 ~ ≤ 100	10 ~ ≤ 100
IV 低毒	> 100	> 100

\*淡水魚類：以虹鱒(Rainbow trout)，藍鯽(Bluegill)或鯉魚(Carp) 為主。淡水無脊椎生物：以 *Daphnidae* 科水蚤為主。

## USEPA及OECD對魚急毒性試驗的建議及要求事項

根據USEPA及OECD針對水生毒性物質試驗的規範，對相關的試驗方法、試驗內容及試驗報告等項目，皆有提出具體的建議和指引，其常選用魚種，依據受檢測水質之含鹽量不同，可採用淡水或海水魚種(表3、表4)；相關試驗條件可參考表5；試驗數據報告內容要求可參考表6。

表3. 常用淡水魚種種類及部份試驗條件

	溫度(°C)	體長(cm)
斑馬魚(zebrafish) <i>Brachydanio rerio</i>	21~25	2.0±1.0
胖頭鰱(fathead minnow) <i>Pimephales promelas</i>	21~25	2.0±1.0
鯉魚(common carp) <i>Cyprinus carpio</i>	20~24	3.0±1.0
青鱒魚(ricefish) <i>Oryzias latipes</i>	21~25	2.0±1.0
孔雀魚(guppy) <i>Poecilia reticulata</i>	21~25	2.0±1.0
藍鰓魚(bluegill) <i>Lepomis macrochirus</i>	21~25	2.0±1.0
虹鱒(rainbow trout) <i>Oncorhynchus mykiss</i>	13~17	5.0±1.0

OECD guideline for testing of chemicals 203, 1992

表4. 常用海水魚種種類及部份試驗條件

	溫度(°C)	鹽度(‰)
潮間美洲原銀漢魚(Tidewater silverside) <i>Menidia peninsulae</i>	22~25	15~22
鯷魚(Herring) <i>Clupea harengus</i>	10±1	8~15
鱈魚(Cod) <i>Gadus morhua</i>	5±1	5~30
綿羊頭鱒魚(Sheepshead minnow) <i>Cyprinodon variegatus</i>	25±2	15~30

OECD guideline for testing of chemicals 212, 1998.

表5. OECD和EPA對魚急毒性試驗操作條件指引

	OECD	EPA
試驗期間	96小時	至少96小時
魚缸負載量	①靜置(static)及半靜置(semi-static)試驗為每公升的水含1克的魚 ②流通式(flow through)試驗可以提高負載量	①靜置(static)及半靜置(semi-static)試驗為每公升的水不超過0.8克的魚 ②流通式(flow through)試驗為每公升的水不超過0.5克的魚
光照	每天12~16小時的光照	每天12~16小時的光照
溫度	根據試驗魚種的不同提供適合的生長溫度，溫度變化在正負2°C之間	根據試驗魚種的不同提供適合的生長溫度，溫度變化在正負2°C之間
溶氧量	不得低於大氣飽和值的60%	不得低於大氣飽和值的60%
水質硬度	CaCO <sub>3</sub> 含量應介於 10 ~ 250 mg/L	CaCO <sub>3</sub> 含量應介於 40 ~ 180 mg/L
pH值	6.0~8.5	6.0~8.0
餵食	試驗過程中不需餵食	試驗過程中不需餵食；於試驗前48小時便停止餵食
魚隻數量	每種濃度至少7尾	每種濃度至少7尾
測試濃度	至少有5種不同濃度同時進行測試，濃度間倍數不得高於2.2倍	至少有5種不同濃度同時進行測試，濃度間倍數介於1.5~2.2倍
控制組	包含一個空白值(即養殖水)組和溶劑組	包含一個空白值(即養殖水)組和溶劑組
觀察	於試驗後第24、48、72和96小時觀察，記錄死亡率和不正常的現象	於試驗後第6、24、48、72和96小時觀察，記錄死亡率和不正常的現象

OECD guideline for testing of chemicals 203, 1992 ; USEPA OPPTS 850.1075

表6. OECD和EPA對魚急毒性試驗報告內容的要求

	OECD	EPA
試驗物質	外觀描述、藥物純度、理化性質	外觀描述、藥物純度、理化性質
試驗魚種	學名、品系、大小及其他相關資料	無具體要求
試驗條件	①測試方法及流程 ②水質特性 (pH值、硬度、溫度) ③每隔24小時紀錄試驗溶液的溶氧量、pH值及溫度 ④藥劑配製方式及所使用的濃度 ⑤使用動物數量	①試驗設備、試驗人員和試驗日期 ②藥劑配製方式及所使用的濃度 ③使用動物數量 ④每隔24小時紀錄試驗溶液的溶氧量、pH值及溫度
試驗結果	①最高不致死濃度 ②最低致死濃度 ③各濃度的累積死亡率 ④半致死濃度(LC <sub>50</sub> ) ⑤藥劑濃度和死亡率曲線圖 ⑥使用的統計方法 ⑦控制組的死亡率 ⑧試驗中所產生足以影響試驗結果的突發狀況 ⑨魚類的不正常反應	①無顯著反應的最低劑量(NOEL) ②藥劑濃度和死亡率曲線圖 ③魚類的不正常反應 ④試驗中任何可能會造成偏差或影響試驗結果的因素 ⑤使用的統計方法 ⑥數據準確性 ⑦半致死濃度(LC <sub>50</sub> )

OECD guideline for testing of chemicals 203, 1992 ; USEPA OPPTS 850.1075

## 目前世界各地區應用魚類毒性試驗範圍及試驗指引

許多國家常利用毒性試驗來做為監測水質的方法之一，各國政府機關和工業上對於使用生物模式來檢測化學物質及排放物的毒性也越來越受到重視。全球各主要地區應用魚急毒性試驗做為檢測依據如表7.所示。

表7. 全球各地區魚類毒性試驗參考指引及應用範圍(Embry et al. 2010)

地區	試驗指引	適用範圍	常用魚種
歐盟 European Union	OECD 203	工業製品、殺蟲劑、藥物、生物藥劑、新研發及現有化學物品。	參照OECD建議魚種
美國 United States	OECD203 ; USEPA OPPTS 850.1075	製造前申報(PMN)、新藥申請(NDA)；聯邦殺蟲劑、殺菌劑、滅鼠劑法案(FIFRA)登記。	胖頭鰻(Fathead minnow)
	USEPA OW 2000.0	排出物檢測；工業及都市污水	

地區	試驗指引	適用範圍	常用魚種
加拿大 Canada	EPS <sup>a</sup> /IRM//13	排出物檢測；工業及都市 污水	虹鱒(Rainbow trout)
英國 United Kingdom	無明確指定。由英國 內政部及環保署准許 後進行。	排出物檢測；工業及都市 污水	無明確指定。
德國 Germany	ISO 15088:2007	化學物質	無明確指定。
	DIN <sup>b</sup> 38415-6	汗水排放	
日本 Japan	OECD 203	化學物質	青鱒魚(medaka)

<sup>a</sup> Environment Protection Series

<sup>b</sup> Deutsches Institut für Normung

## 斑馬魚在環境毒理檢測的應用

斑馬魚(圖2.) 近年來已經被大量地應用在發育生物學及分子遺傳學的研究上，成為魚類研究的模式動物(model animal)之一員。而斑馬魚同時也能使用在環境毒理學的研究，Hill等人在2005年曾列舉出使用斑馬魚可進行的毒性試驗之範疇(Hill et al., 2005)，如下所示。

- 生殖毒性(reproductive toxicity)
- 發育毒性(developmental toxicity)
- 急毒性(acute toxicity)
- 神經毒性(neurotoxicity)
- 心臟毒性(cardiotoxicity)
- 視覺毒性(ocular toxicity)
- 內分泌失常(endocrine disruption)
- 神經行為毒性(neurobehavioral toxicity)
- 肌肉毒性(vascular toxicity)
- 致癌性(carcinogenicity)

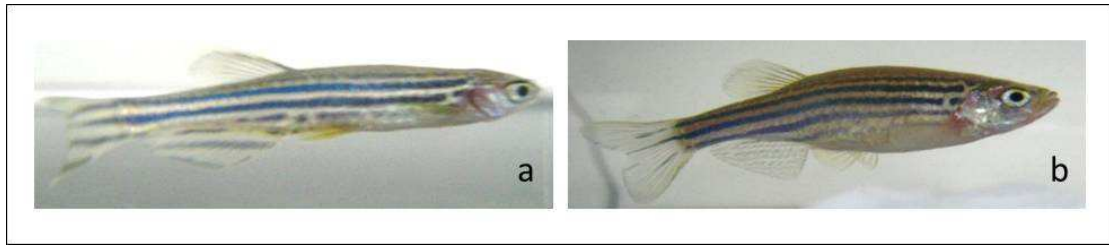


圖2. 模式魚種斑馬魚(a)雄魚，(b)雌魚。

由於在實驗室中，斑馬魚具有容易飼養及保持一定數量的特色，許多研究人員也喜歡利用斑馬魚做為研究材料。近來有報告指出在毒理學的研究上，斑馬魚也具有許多優點，能便於研究人員進行試驗；利用斑馬魚做為環境毒理研究的模式生物所發表的論文篇數也明顯增加。舉例來看，斑馬魚的體型小，長度大約介在1~1.5英吋之間，能夠有效地減少飼育空間及飼養花費。也因為斑馬魚的體型較小，可以降低許多試驗上所需要的化學藥劑數量，可減少實驗室的經費支出。除此之外，斑馬魚的生育量高，一對的成魚交配後，雌魚可產下100~200顆卵，若環境適宜，雌魚仍可維持該產卵量5~7天。另一方面，斑馬魚的受精卵呈現透明無色的外觀，很容易和未受精的卵做區別(圖3.)；也有研究報告認為可以利用斑馬魚的胚胎做為毒性測試的材料，取代使用已久的魚急毒性測試。近來的報告表示出，針對許多的化學物質的毒性測試，以斑馬魚作為急毒性試驗材料所得出的結果和利用水蚤所得到的結果相仿。而其中某些化學物質，像是丙烯醛(Acrolein), 硫酸銅(Copper Sulfate)，鄰甲酚(o-Cresol)和靈丹(Lindane)，斑馬魚則是較水蚤更具有敏感性。因此，可應用斑馬魚做為一種脊椎動物模式，應用在水生環境毒理學的研究上。

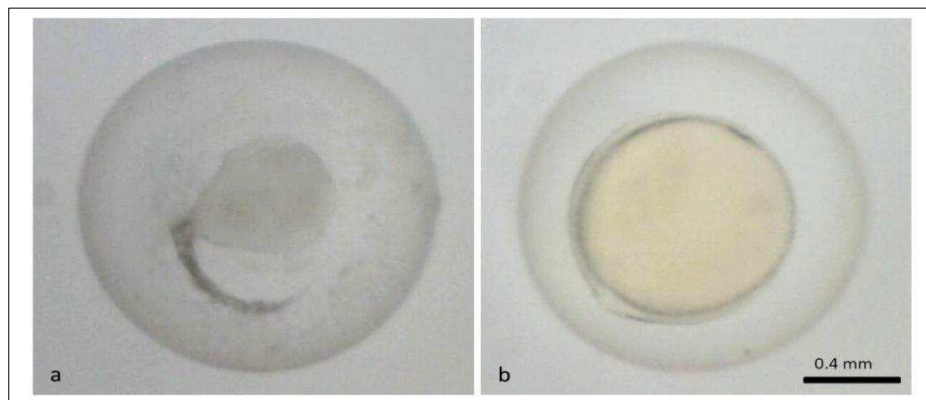


圖3. 斑馬魚(a)未授精卵與(b)授精卵(授精後8小時)。

目前以斑馬魚做為魚急毒性試驗的魚種，應用在許多化學物質的檢測上，已有相關的數據資料可供參考，如表8.所示。

表8. 斑馬魚96小時急毒性數值表(Martins *et al.* 2007)

測試物質	LC <sub>50</sub> (96h) (單位：mg/L)	毒性分類	資料來源
1,2,3-Trichlorobenzene	1.85	中等毒	[30]
2,4-Dicholophenol* (二氯酚)	3.9	中等毒	[25]
2,4-Dinitrophenol* (2,4-二硝基酚)	11	輕毒	[25]
2,3-Dinitrophenol (2,3-二硝基酚)	7.364	中等毒	[18]
2-Nitroanisole	214.382	低毒	[18]
3,4-Dichloroaniline* (3,4-二氯苯胺)	8.5	中等毒	[9]
3,4-Dichloroaniline*	9.8	中等毒	[9]
3,4-Dichloroaniline*	7	中等毒	[25]
3,4-Dichloroaniline*	8.101	中等毒	[18]
Acetone	8100	低毒	[25]
Acrolein	0.014	劇毒	[25]
Aldicarb* (得滅克)	10.064	輕毒	[12]
Allylamine	22.1	輕毒	[25]
Aniline	32	輕毒	[25]
Butanol	1730	低毒	[25]
Butyl lactate	75	輕毒	[6]
Cadmium (-chloride)	2.2	中等毒	[25]
Carbaryl* (加保利)	6.037	中等毒	[18]
Carbaryl*	9.256	中等毒	[12]
Copper	0.121	劇毒	[24]
Copper	0.127	劇毒	[24]
Copper	0.102	劇毒	[24]
Copper ( II ) Carbonate cation	0.049	劇毒	[24]
Copper ( II ) Carbonate cation	0.05	劇毒	[24]
Copper ( II ) Carbonate cation	0.04	劇毒	[24]

測試物質	LC <sub>50</sub> (96h) (單位：mg/L)	毒性分類	資料來源
Copper ( II ) Carbonate	0.075	劇毒	[24]
Copper ( II ) Carbonate	0.079	劇毒	[24]
Copper ( II ) Carbonate	0.064	劇毒	[24]
Copper ( II ) Sulfate	0.006	劇毒	[24]
Copper ( II ) Sulfate	0.006	劇毒	[24]
Copper ( II ) Sulfate	0.005	劇毒	[24]
Copper Hydroxide cation	0.004	劇毒	[24]
Copper Hydroxide cation	0.004	劇毒	[24]
Copper Hydroxide cation	0.003	劇毒	[24]
Copper Hydroxide	0.03	劇毒	[24]
Copper Hydroxide	0.031	劇毒	[24]
Copper Hydroxide	0.025	劇毒	[24]
Copper total	0.21	劇毒	[24]
Copper total	0.298	劇毒	[24]
Copper total	0.262	劇毒	[24]
Diethanolamine	3700	低毒	[25]
Diethanolamine	3700	低毒	[25]
Di-n-butylphthalate	1.3	中等毒	[25]
DNOC	1.981	中等毒	[18]
Ethanol	14200	輕毒	[25]
Ethyl lactate	320	低毒	[6]
Ethylene glycol	50000	輕毒	[25]
Lactic acid	320	低毒	[6]
Lindane* (靈丹)	0.1	劇毒	[9]
Lindane*	0.11	劇毒	[9]
Lindane*	0.12	劇毒	[25]
Malathion* (馬拉松)	19.822	輕毒	[18]
Mercury (-chloride)	0.05	劇毒	[25]
Methyl-ethyl-ketone	3200	低毒	[25]
Parathion-methyl* (甲基巴拉松)	5.4	中等毒	[25]
n-Heptanol	34	輕毒	[25]
n-Propanol	5000	低毒	[25]
o-Cresol	24	輕毒	[25]

測試物質	LC <sub>50</sub> (96h) (單位: mg/L)	毒性分類	資料來源
Parathion* (巴拉松)	1.94	中等毒	[30]
Pentachlorophenol* (五氯酚)	0.2	劇毒	[25]
Pentachlorophenol Sodium Salt* (五氯酚鈉)	0.2	劇毒	[25]
Phenol	28.233	輕毒	[18]
tributyltin oxide	0.0027	劇毒	[25]
Triethanolamine	11800	低毒	[25]
Triphenyltin acetate (TPTA)* (三苯醋錫)	0.04	劇毒	[33]
Triphenyltin acetate (TPTA)*	0.015	劇毒	[33]
Zinc lactate	23.1	輕毒	[6][9]

\*為農藥成份

## 魚類毒性試驗研究趨勢

### 一、利用魚胚胎做為急毒性試驗的替代材料

近年來在許多歐洲的動物保護組織及人道團體的呼籲下，認為直接以活體魚類進行急毒性試驗，會使得試驗魚種承受痛苦與折磨；此外也有研究報告指出，硬骨魚類(bony fish)對於某些的痛楚感知型式和哺乳動物相似，因此將成魚(adult fish)曝露在各種濃度的化學藥劑中進行急毒性試驗會讓魚類受到相當嚴重的痛苦。另一方面，魚類胚胎相較於成體魚類的生理複雜程度較低，學者也認為其對於痛苦的感知程度也相對較少。因此，為了保護實驗動物的福祉及遵循二十世紀中所提倡的3R理念(Reduction, Refinement and Replacement)，許多的研究人員正積極地測試以魚類胚胎來取代成魚進行急毒性試驗的可能性，並探討利用魚類胚胎所得到的結果是否可靠及其應用範圍。以往在進行魚急毒性試驗時，是直接觀察魚類的死亡現象來推算半致死濃度，而在魚胚胎毒性試驗中，則是改以觀察胚胎的發育現象是否正常來推算半效應濃度。觀察的現象包括受精卵是否有凝結、體節是否形成、尾部是否脫離和是否出現心跳。Lammer等人在2009年的研究報告中指出，使用斑馬魚胚胎對21種化學藥劑進行毒性試驗，所得到的結果和使用斑馬魚進行急毒性試驗的結果具高度正相關性(圖4.)，並推崇使用魚胚胎毒性試

驗取代目前魚急毒性試驗。在國際上，經濟合作暨發展組織(OECD)也於2006年提出魚胚胎毒性試驗(Fish Embryo Toxicity Test, 簡稱FET)的草稿指引(draft guideline)供全球各國家參考。

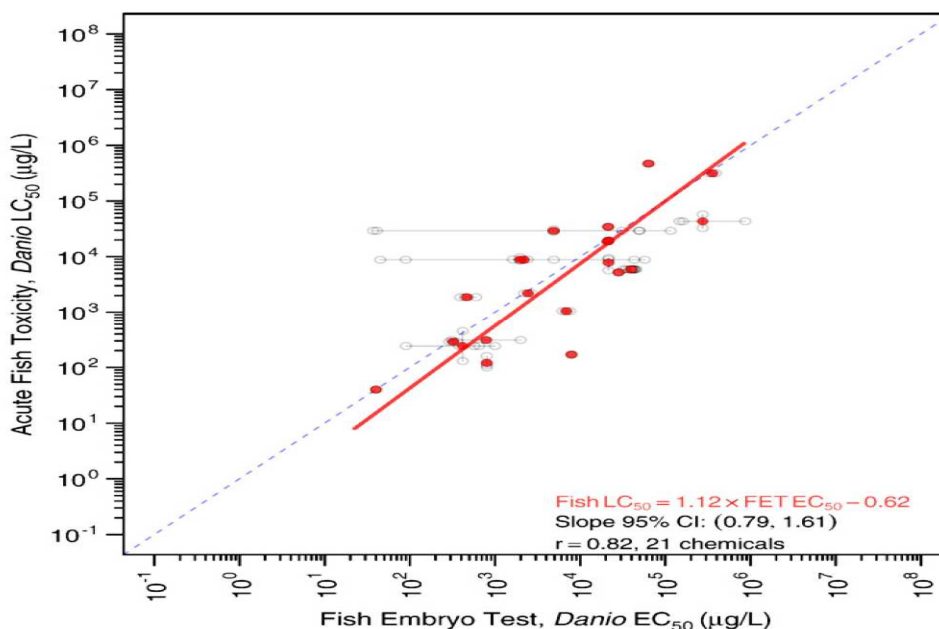


圖4. 斑馬魚胚胎毒性試驗與斑馬魚苗急毒性試驗對21種化學藥劑數據相關性。  
Lammer *et al.*(2009)

## 二、逆境基因檢測

魚類受到環境中任何的逆境時，包括物理性、化學性或生物性的逆境因子，會使得魚類在生理反應及基因表現上有所改變，可區分為三個級數，第一級反應為逆境荷爾蒙會快速釋放至循環系統中，這些荷爾蒙包括兒茶酚胺(catecholamines)及可體松(cortisol)。第二級反應為特定蛋白質的表現量有所改變，包括熱休克蛋白(heat shock protein)及熱休克因子(heat shock factor)。第三級反應則是包括細胞壞死(cell necrosis)、細胞構型改變、細胞內總酵素含量改變及整體魚類族群數量改變。就分子層面來看，當魚類面臨環境壓力時，會大量地增加熱休克蛋白的表現量來保護細胞內蛋白質的正常功能、維持正確的蛋白質折疊(protein folding)以及蛋白質在細胞內的運送，確保個體生存能力。因此熱休克蛋白質已經被視為一個分子標誌，廣泛地應用在魚類面臨環境逆境壓力下，分子層級的初步檢測對象。此大量增加表現的現象，可以利用逆轉錄聚合酶鏈鎖反應(reverse transcription-polymerase chain reaction, 簡稱RT-PCR)或西方墨點法

(Western blotting)偵測。除了熱休克蛋白質之外，許多參與抗氧化作用的酵素，包括超氧歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、觸酶(catalase, CAT)、麩胱甘肽過氧化酶(glutathione peroxidase, GPx)、麩胱甘肽還原酶(glutathione reductase, GRd)和麩胱甘肽S-轉移酶(glutathione S-transferase, GST)等酵素，也有研究報告發現魚類在逆境下這些抗氧化酵素會大量表現，以對抗或清除因外界壓力刺激下細胞所產生的過氧化物，像是超氧自由基( $O_2^{\cdot-}$ )、氫氧自由基( $OH\cdot$ )和過氧化氫( $H_2O_2$ )等。故偵測抗氧化酵素的表現量多寡也可以作為另一個魚類在逆境下的分子訊號。

### 三、魚類早期胚胎發育異常探討

大多數的魚類為卵生動物(oviparity，例如鯉魚、鰱魚)，少部份則為卵胎生(ovoviviparity，例如鯊魚、魴魚、孔雀魚)，極少部份甚至出現類似哺乳動物的胎生方式(viviparity，例如灰星鯊)。無論是哪種生殖方式，水生環境遭受農藥的污染對魚類受精卵或剛孵化的魚苗而言皆是一種生存上的逆境，可能影響到其整體的生長和發育過程。因此，許多的研究也陸續地探討常用農藥對於魚類胚胎發育過程所造成的影響及所導致魚類的發育毒性(圖5.)。以斑馬魚為例，文獻中常利用幾個觀察重點項目，對受精卵做直接觀察來檢視農藥對魚胚胎發育的影響，像是死亡率、孵化成功率、胚胎體長、胚胎形狀、心臟發育、色素產生、心跳次數等。

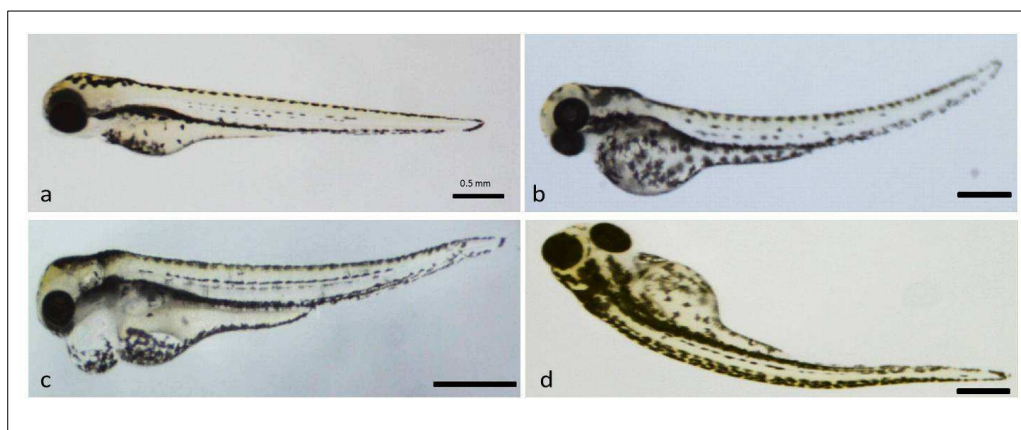


圖5. (a)孵化後正常斑馬魚胚胎(授精後72小時)。

(b)(c)(d)孵化後型態異常之斑馬魚胚胎(授精後72小時)。

Scale bar = 0.5 mm

此外，也可進一步做酵素及荷爾蒙的生化分析、基因層級的表現量高低等等。其中近年來常被研究人員所探討的蛋白質為vitellogenin(VTG，卵黃生成蛋白)，此蛋白質本身是一種磷脂醣蛋白(phospholipoglycoprotein)，由雌性的卵生脊

椎動物肝臟所分泌，是一種卵黃蛋白的前驅物質，會受到雌激素(estrogen)的刺激而誘導其表現，在未成熟的魚苗及成熟的雄魚體內含量偏低。藉由該蛋白質的特性，當水生環境中具有雌性激素或類雌激素的物質時，vitellogenin的表現量便會有明顯的上升，同時雌性激素也會促使魚苗發育成為雌魚，造成雌魚對於雄魚在數量上比率增加。因此，可針對vitellogenin的含量及魚類性別上的比率這兩個因子來檢視農藥是否具有環境荷爾蒙的能力，而影響到水生環境中魚體內正常的荷爾蒙含量及性別發育。以畢芬寧(bifenthrin)此種殺蟲劑為例，Jin等人在2009年的研究中指出(Jin *et al.*, 2009)，畢芬寧隨著試驗濃度的增加會提高授精卵的孵化率、胚胎體型彎曲、泳動速率、心臟周圍的浮腫以及具有促進Vtg1基因的表現(Vtg1基因會受到雌激素的刺激而誘導表現)，代表畢芬寧除了會影響正常的魚胚胎發育之外，可能也具有環境荷爾蒙的能力而影響魚體內vitellogenin的濃度。另一種殺蟲劑百滅寧(permethrin)也具有同樣的結果，會在魚類胚胎發育階段促使Vtg1基因的表現。

## 結 論

水生環境安全評估長久以來一直是世界上各個國家所關注的重點項目之一，許多的試驗指引也陸續提出。當人類在使用農藥防治作物的病蟲害時，也應該謹慎考量農藥是否對生態環境造成傷害，而產生對非目標性生物毒性。除了農藥之外，日常生活中人們使用的任何物質皆有其潛在的毒性，包括有機物質、無機物質、含重金屬物質、抗生素及生物酵素等製品，倘若使用不當或過度使用皆會對環境及身心健康造成傷害，唯有適當地、合法地使用，才能發揮物質應有的功效同時也能保護環境及人類健康。正確使用合法登記的農藥，除了可以有效降低農作物的病蟲害之外，也能維護環境生態以及保護施藥人員的身心健康，達到三贏的局面，免於有環境污染或危害人類健康的疑慮。

## 參考文獻

1. 孫斐，水生生物農藥毒性測試手冊。台灣省農業藥物毒物試驗所。中華民國85年9月30日。
2. 黃貴民，魚類學概論。水產出版社。中華民國86年1月。
3. 農藥管理法規彙編。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局。中華民國95年12月。
4. Abdullah, A., Kumar, A., and Chapman, J.(1994).Inhibition of acetylcholinesterase in the australian freshwater shrimp(*Paratya australiensis*) by profenofos. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 1861-1866.
5. ASTM.(1987). American Society for Testing and Materials. Standard guide for conducting renewal life-cycle toxicity tests with *D. magna*. Annual book of ASTM standards E 1193, 765-781.
6. Bowmer C.T., Hooftman R.N., Hanstveit A.O., Venderbosch P.W.M., and van der Hoeven, N. (1998). The ecotoxicity and the biodegradability of lactic acid, alkyl lactate esters and lactate salts. *Chemosphere* 37, 1317–33.
7. Calleja, M.C., Persoone, G., and Geladi, P.(1994). Comparative acute toxicity of the first 50 Multicentre Evaluation of *In Vitro* Cytotoxicity chemicals to aquatic non-vertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 26, 69-78.
8. Deane, E., and Woo, N.(2010). Advances and perspectives on the regulation and expression of piscine heat shock proteins. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 1-33.
9. Ensenbach U, Nagel R(1995). Toxicity of complex chemical mixtures: acute and longterm effects on different life stages of Zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Ecotoxicol Environ Saf* 30, 151–7.
10. Embry, M.R., Belanger S.E., Braunbeck, T.A., Galy-Burgos, M., Halder, M., Hinton, D.E., Léonard, M.A., Lillicrap, A., Norberg-King, T., and Whale, G.(2010). The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquatic Toxicology* 97, 79-87.
11. EPA.(1996). OPPTS 850.1075 Fish Acute Toxicity test, Freshwater and Marine. *Ecological Effects Test Guidelines*.
12. Gallo D, Merendino A, Keizer J, Vittozzi L (1995). Acute toxicity of two carbamates to the Guppy(*Poecilia reticulata*) and the Zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Sci Total Environ* 171, 131–6.
13. Goss, L.B., and Sabourin, T.D.(1985). Utilization of alternative species for toxicity testing: an overview. *J Appl Toxicol* 5, 193-219.
14. Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., and Peterson, R.E.(2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol Sci* 86, 6-19.
15. Laale, H.W.(1977). The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. *Journal of Fish Biology* 10, 121-173.
16. Jin, M., Zhang, X., Wang, L., Huang, C., Zhang, Y., and Zhao, M.(2009). Developmental toxicity of bifenthrin in embryo-larval stages of zebrafish. *Aquatic Toxicology* 95, 347-354.

17. Lammer, E., Carr, G.J., Wendler, K., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T., 2009a. Is the fish toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test ? *Comp. Biochem. Physiol.* 149C, 196-209.
18. Lange M, Gebauer W, Markl J, Nagel R. Comparison of testing acute toxicity on embryo of Zebrafish, *Brachydanio rerio* and RTG-2 Cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test(1995). *Chemosphere* 30, 2087–102.
19. Martins, J., Oliva Teles, L., and Vasconcelos, V.(2007). Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic toxicology. *Environ Int* 33, 414-425.
20. OECD.(1992). Organization of Economic Cooperation and Development, OECD Guideline for testing of Chemicals, Guideline 203 "Fish Toxicity Test."
21. OECD.(1998). Organization of Economic Cooperation and Development, OECD Guideline for testing of Chemicals, Guideline 212 "Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages."
22. OECD.(2004). Organization of Economic Cooperation and Development, OECD Guideline for testing of Chemicals, Guideline 202 "*Daphnia sp.*, Acute Immobilisation Test."
23. OECD.(2006). Organization of Economic Cooperation and Development, OECD Guideline for testing of Chemicals, Draft proposal for a new guideline. "Fish Embryo Toxicity(FET) Test."
24. Palmer FB, Butler C, Timperley MH, Evans CW(1998). Toxicity to embryo and adult zebrafish of copper complexes with two malonic acids as models for dissolved organic matter. *Environ Toxicol Chem* 17, 1538–45.
25. Pedersen F, Petersen GI(1996). Variability of species sensitivity to complex mixtures. *Water Sci Technol* 33, 109-19.
26. Phyu, Y.L., Warne, M.S., and Lim, R.P.(2004). Toxicity of atrazine and molinate to the cladoceran *Daphnia carinata* and the effect of river water and bottom sediment on their bioavailability. *Arch Environ Contam Toxicol* 46, 308-315.
27. Phyu, Y.L., Warne, M.S., and Lim, R.P.(2005). Toxicity and bioavailability of atrazine and molinate to the freshwater shrimp(*Paratya australiensis*) under laboratory and simulated field conditions. *Ecotoxicol Environ Saf* 60, 113-122.
28. Raina, R., Wayne, B., and Keith, J.(2009). Atmospheric Concentrations of Captan and Folpet in the Lower Fraser Valley Agricultural Region of Canada (Libertas Academica).
29. Roex, E.W., Giovannangelo, M., and van Gestel, C.A.(2001). Reproductive impairment in the zebrafish, *Danio rerio*, upon chronic exposure to 1,2,3-trichlorobenzene. *Ecotoxicol Environ Saf* 48, 196-201.
30. Roex EWM, Langen MCT, Gestel CAM(2000). Acute toxicity of two compounds with different modes of action to the Zebrafish, *Danio rerio*. *Bull Environ Contam Toxicol* 2002(68), 269–74.
31. Scholz, S., Fischer, S., Gundel, U., Kuster, E., Luckenbach, T., and Voelker, D.(2008). The zebrafish embryo model in environmental risk assessment--applications beyond acute toxicity testing. *Environ Sci Pollut Res Int* 15, 394-404.
32. Spitsbergen, J.M., and Kent, M.L.(2003). The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research--advantages and current limitations. *Toxicol Pathol* 31 Suppl, 62-87.

33. Strmac M, Braunbeck T(1999). Effects of Triphenyltin acetate on survival, hatching success, and liver ultrastructure of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol Environ Saf* 44, 25–39.
34. Teraoka, H., Dong, W., and Hiraga, T.(2003). Zebrafish as a novel experimental model for developmental toxicology. *Congenital Anomalies* 43, 123-132.
35. Vittozzi, L., and De Angelis, G.(1991). A critical review of comparative acute toxicity data on freshwater fish. *Aquatic Toxicology* 19, 167-204.
36. Whitacre, D.M.M., and Padmini, E.(2010). Physiological Adaptations of Stressed Fish to Polluted Environments: Role of Heat Shock Proteins. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 206*, L.A. Albert, C.P. Gerba, J. Giesy, O. Hutzinger, J.B. Knaak, J.T. Stevens, R.S. Tjeerdema, P. Voogt, and G.W. Ware, eds (Springer New York), pp. 1-27.
37. Zhang, Z.Y., Yu, X.Y., Wang, D.L., Yan, H.J., and Liu, X.J.(2009). Acute toxicity to zebrafish of two organophosphates and four pyrethroids and their binary mixtures. *Pest Manag Sci* 66, 84-89.