

私立東海大學生命科學系
碩士論文

指導教授：關永才 博士

Dr. Yeong-Choy Kam

王慶裕 博士

Dr. Ching-Yuh Wang

除草劑丁拉免速隆對澤蛙蝌蚪的影響

Effects of a herbicide (butachlor-bensulfuron) on

Rana limnocharis tadpoles



研究生：劉宛宜

Wan-Yi Liu

中華民國九十七年一月

目錄

誌謝	-----?
目錄	-----?
中文摘要	-----?
英文摘要	-----?
前言	-----1
文獻探討	-----3
材料與方法	-----9
結果	-----18
討論	-----26
參考文獻	-----37
圖目錄	-----45
圖	-----47
附錄	-----68
個人資料	-----72

中文摘要

農業水域常是兩棲類的棲地，使用水田除草劑可能對兩棲類成體與幼體的生態與生理造成影響。本研究在於了解目前台灣常用的除草劑丁拉免速隆對於澤蛙蝌蚪存活、生長、發育與變態特徵的影響。將蝌蚪處理在不同濃度的丁拉免速隆四天，發現其存活率隨濃度增加而下降，而且在田間推薦用量下會造成蝌蚪於兩天內全數死亡。由於丁拉免速隆是一種混合劑型，係由丁基拉草與免速隆兩種除草劑混合，本研究再單獨以不同濃度免速隆與丁基拉草處理，結果顯示免速隆不會造成蝌蚪死亡，而丁基拉草則會造成蝌蚪死亡。生長發育試驗中發現蝌蚪處理在高濃度的丁拉免速隆與丁基拉草都無法存活達到變態，在低濃度下存活的蝌蚪其達到變態的時間與體型則大致相似，而免速隆對蝌蚪的存活、成長、發育與達到變態的體型及時間都沒有造成影響。以上結果顯示丁基拉草可能是造成蝌蚪致死的主要因素，本研究進一步進行試驗找出丁基拉草造成蝌蚪死亡的機制。前人研究指出丁基拉草是造成神經毒物質，本研究檢測其對蝌蚪乙醯膽鹼酯酶活性的影響，但是結果顯示丁基拉草對乙醯膽鹼酯酶活性並無影響，似乎沒有神經毒性的效果。接下來以鹼性單細胞膠體電泳(彗星試驗)檢測丁基拉草對蝌蚪的基因毒性，結果顯示其造成蝌蚪顯著的 DNA 損傷。本研究結果證實除草劑對澤蛙蝌蚪生理有負面的影響；在台灣還有許多其他兩生類物種都以農業區域作為生殖場所，除草劑對成體與蝌蚪在生理與生態上更深入的研究不僅非常有趣，而且對台灣產兩生

類保育也是極為重要。

英文摘要

Agricultural areas are important habitats for amphibians, but the use of herbicides potentially affect the ecology and physiology of amphibian adults and larvae. I evaluated the effects of a herbicide, butachlor-bensulfuron, on the survival, growth, development, and metamorphosis of *Rana limnocharis* tadpoles. Tadpoles were treated with different concentrations of butachlor-bensulfuron for four days, and the survival of tadpoles was dose response. Recommended concentration of the herbicide caused 100% mortality in just two days. Butachlor-bensulfuron is a mix of butachlor and bensulfuron. The separate effects of bensulfuron and butachlor were evaluated by treating tadpoles with different concentration of each herbicide, and results showed bensulfuron did not but butachlor did cause tadpole mortality. In the growth and development experiments, tadpoles under high concentrations of butachlor-bensulfuron and butachlor were dead, and the survived tadpoles at the lower concentrations have reached metamorphosis at similar time and size. There was no effect of bensulfuron on tadpole survival, growth, development, size, or time at metamorphosis. From these results, butachlor was the most possible reason for differences in survival on tadpoles. Because butachlor is a neurotoxic compound, I measured the acetylcholinesterase (AChE) activity of tadpoles that treated with herbicides. The results showed that butachlor had no effects on AChE activity, suggesting neurotoxic effects of butachlor is absent. I then used the alkaline single cell gel electrophoresis assay (Comet assay) to measure the genotoxicity of butachlor on tadpoles. Results showed that butachlor caused significant DNA damages in tadpoles. In summary, results of this study confirmed the effects of

herbicides on the physiology of anuran tadpoles in Taiwan. There are many other anuran species also breed in the agricultural areas, thus further studies of the effects of herbicides on adults and tadpoles are not only ecological and physiological interesting, but also important for anuran conservation in Taiwan.

前言

全球兩棲類物種與族群數量在過去三十年有大幅減少的趨勢，有許多原因曾被探討(Houlahan, *et al.*, 2000, 2001; Collins and Storfer, 2003; Stuart, *et al.*, 2004)，其中農藥使用可能為主要因素之一(Sparling, *et al.*, 2001; Davidson, *et al.*, 2001, 2002; Blaustein, *et al.*, 2003)。農業水域經常是各種動物重要的棲地，其中兩棲類生物會利用水稻田作為生殖場所，於水田中產卵，蝌蚪在此水域中孵化、生長、發育直到變態成小蛙。兩棲類擁有高度通透性的皮膚，化學物質可由表皮進入動物體內，使用農藥會對成體與幼體造成重大影響，且因為蝌蚪尚無法離開水域，受到的影響更為劇烈。農藥對兩棲類造成的影響可分為致死影響與未達致死的(sublethal)影響，農藥經過各種因素直接造成青蛙或蝌蚪死亡，如果沒有致死，可能會對其生理特徵、型態特徵、行為特徵造成影響(Bridges, 1997; Hayes, *et al.*, 2002; Wojtaszek, *et al.*, 2004)。

在過去探討農藥對兩棲類生物所造成的影響，大多著重於殺蟲劑，然而除草劑影響兩棲類的相關研究卻相對較少。丁拉免速隆(butachlor-bensulfuron)為台灣水稻田使用最多的除草劑之一，是一種複合型藥劑。本試驗以澤蛙(*Rana limocharis*)蝌蚪為對象，探討除草劑-丁拉免速隆對於兩棲類蝌蚪所造成的影響。本研究先了解除草劑丁拉免速隆、免速隆及丁基拉草對澤蛙蝌蚪存活的影响，其次研究生長、發育與變態特徵的影響。另外，過去研究指出丁基拉草是一種神經毒物質(Rajyalakshmi *et al.*, 1996)，造成蝸牛的乙醯膽鹼酯

？ (acetylcholinesterase, AChE)活性降低,亦有研究指出丁基拉草對動物有遺傳毒性,可損傷鯰魚與白領樹蛙之 DNA (Ateeq, *et al.*, 2005, 2006; Geng, *et al.*, 2005),因此,本試驗進一步了解丁基拉草對澤蛙蝌蚪乙酰膽鹼酯?活性的影響,以及探討丁基拉草對澤蛙蝌蚪造成的遺傳毒性,了解除草劑對澤蛙蝌蚪所造成影響的生理機制。

文獻探討

一、 全球兩棲類衰減

過去三十年之間，全球兩棲類生物的種類與族群數量有大量銳減的趨勢 (Houlahan, *et al.*, 2000, 2001; Collins and Storfer, 2003; Stuart, *et al.*, 2004), 可能的原因包括外來種入侵、棲地過度開發、土地利用改變、全球變遷(輻射、氣候)、化學污染物、疾病等(Collins and Storfer, 2003), 其中農藥也是主要原因之一 (Sparling, *et al.*, 2001; Davidson, *et al.*, 2001, 2002; Blaustein, *et al.*, 2003), 農藥的使用可以增加作物收成帶來經濟利益, 但是對生態環境可能有害。農業水域常是兩棲類生物的生殖場所, 亦是其幼體在變態之前的生活棲地, 農藥對兩棲類在生理、生態有莫大的影響。

二、 殺蟲劑對兩棲類的影響

殺蟲劑在農藥用量中重佔有很大部分, 過去也有許多殺蟲劑對兩棲類的毒性之研究報告, 其中包括有機氯殺蟲劑像是 dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT)及 endosulfan (Clark, *et al.*, 1998; Broomhall and Shine, 2003)。因為有機氯殺蟲劑會在動植物體內與環境中殘存很久, 對動物的影響深遠, 許多有機氯殺蟲劑包括 DDT 現在已被禁止使用。目前最普遍使用的是有機磷殺蟲劑, 其具有神經毒性, 藉由抑制昆蟲乙醯膽鹼酯? (acetylcholinesterase, AChE)活性造成昆蟲死亡, 當其作用在兩棲類生物體內也會有相同的傷害產生。有機磷

殺蟲劑 chlorpyrifos 能抑制 *Xenopus laevis* 蝌蚪 AChE 活性，影響神經傳導，並且影響蝌蚪骨骼肌的發育，造成肌肉完整性受損害(Colombo, *et al.*, 2005)。另一種 AChE 抑制型殺蟲劑 carbaryl 對兩棲類幼體也有嚴重的影響，施用 carbaryl 會造成蝌蚪死亡(Relyea and Mills, 2001; Bridges, *et al.*, 2002)，也會影響蝌蚪的游泳表現，大幅降低蝌蚪的活動力(Bridges, 1997)，並且改變其和掠食者之間的互動關係，造成掠食者的掠食能力或者蝌蚪的躲避能力降低，而影響蝌蚪被捕食的狀況(Bridges, 1999)。掠食者與殺蟲劑 carbaryl 會形成雙重壓力，造成蝌蚪的存活率更低(Relyea and Mills, 2001)。Carbaryl 也會影響蝌蚪的成長發育，提早啟動蝌蚪變態(Boone, *et al.*, 2001)。其他 AChE 抑制型殺蟲劑像是 malathion 及 dichlorvos 對蝌蚪的存活也會具有負面的影響(Geng, *et al.*, 2005; Relyea, 2005)，dichlorvos 對 *Rhacophorus megacephalus* 蝌蚪有遺傳毒性(Geng, *et al.*, 2005)。除此之外，其他類型的殺蟲劑像是 metoxychlor 會降低 *Rana esculenta* 成蛙肝細胞的抗氧化酵素活性，破壞其肝臟保護功能(Czarniewska, *et al.*, 2003)。Amitraz, 2,4-dimethylaniline 會使 *X. laevis* 蝌蚪在發育過程中產生畸形(Osano, *et al.*, 2002)。

三、 除草劑對兩棲類的影響

相較於殺蟲劑而言，除草劑對兩棲類生物的影響研究相對較少。除草劑是依照植物的生理特性來設計以達到除草的功效，對動物造成的影響層面與機制非常需要深入研究與了解。除草劑對兩棲類可能造成的影響如下所述：

(一) 致死影響

許多除草劑對兩棲類蝌蚪都會有致死的影響，蝌蚪活動侷限在水域中，受到影響的程度往往會比成體大，像是達有隆(diuron) (Schuytema and Nebeker, 1998)、嘉磷塞(glyphosate) (Howe, *et al.*, 2004; Wojtaszek, *et al.*, 2004; Relyea, 2005)、草脫淨(atrazine) (Storrs and Kiesecker, 2004)、巴拉刈(paraquat) (Osano, *et al.*, 2002)、sulfometuron-methyl 及 nicosulfuron (Fort, *et al.*, 1999)等除草劑，均能造成蝌蚪個體的死亡。此外，除草劑可能會和水域環境中的其他因子產生交互作用，對蝌蚪的存活產生更大的危害(Relyea, 2005a, b, c)，嘉磷塞和掠食者(蠓蟻與甲蟲)同時存在於水域時會造成 *Hyla versicolor*、*Bufo americanus*、*R. pipiens* 蝌蚪的存活率比只有嘉磷塞存在時大幅降低(Relyea, *et al.*, 2005b)。

(二) 未達致死的(sublethal)影響：

如果除草劑未直接造成兩棲類生物成體或幼體的死亡，可能仍會對其生理、型態、行為方面產生負面影響。

1. 生理

除草劑對兩棲類生物成體或幼體會造成內分泌擾亂機制，草脫淨會大幅減少 *X. laevis* 雄蛙的血液中睪固酮(testosterone)含量，造成雄蛙和雌蛙的睪固酮含量相近(Hayes, *et al.*, 2002)。除草劑對甲狀腺產生影響，可能會改變蝌蚪的變態，加速蝌蚪的發育，並且以比較小的體型、比較短的時間達成變態，像是乙草胺(acetochlor)能促進 3,5,3'-triiodothyronine (T3)

導致 *X. laevis* 和 *R. pipiens* 蝌蚪提早變態(Cheek, *et al.*, 1999; Crump, *et al.*, 2002), 並且影響 *R. catesbeiana* 蝌蚪腦部甲狀腺荷爾蒙的訊號路徑, 影響其接收器的基因表現(Helbing, *et al.*, 2006)。除此之外乙草胺也會藉由活化氧族(reactive oxygen species, ROS)導致 *B. raddei* 蝌蚪肝細胞 DNA 單股斷裂(Liu, *et al.*, 2006)。巴拉刈會降低 *R. esculenta* 成蛙肝細胞的抗氧化酵素活性, 破壞肝臟保護功能(Czarniewska, *et al.*, 2003)。丁基拉草對 *Rhacophorus megacephalus* 蝌蚪也有遺傳毒性, 亦會造成 DNA 的損傷(Geng, *et al.*, 2005)。

2. 型態

除草劑經由各種途徑對蝌蚪造成的生理傷害, 可能會導致型態上或行為上的影響, 產生結構或器官發育上的異常表現。當蝌蚪的內分泌系統受到干擾, 會導致其型態發育上出現異常現象, Hayes *et al.* (2002, 2003, 2006)指出草脫淨會導致 *X. laevis* 變態個體出現雌雄同體的狀況, 蝌蚪體內同時擁有數個精巢與卵巢, 另外也會減少雄蛙喉部肌肉尺寸, 但並不影響雌蛙的喉部肌肉, 這些結果指出其他蛙類在性發育上也可能受到草脫淨的擾亂。但是有其他學者認為草脫淨對兩棲類生物性腺發育可能並無負面影響, 目前仍有爭議尚未得到定論(Carr, *et al.*, 2003; Coady, *et al.*, 2005; Hecker, *et al.*, 2005)。另一個影響蝌蚪發育的除草劑是使用也非常普遍的巴拉刈, 它會導致 *R. pipiens* 和 *X. laevis* 蝌蚪產生畸形, 像是肌動蛋白束的流失, 影響骨骼肌肌動蛋白結構的組成, 導致蝌蚪尾部肌肉減少,

並且導致脊索彎曲、發育遲緩等(Dial and Bauer, 1984; Bauer and Dial, 1995; Vismara, *et al.*, 2000; Osano, *et al.*, 2002)。

3. 行為

當蝌蚪的肌肉構造受損，可能會造成其活動力降低，影響其和掠食者之間的關係。巴拉刈造成 *R. pipiens* 蝌蚪尾部肌肉畸型，導致蝌蚪游泳能力受損，這可能會使其躲避掠食者的能力降低(Bauer and Dial, 1995)。嘉磷塞也會降低蝌蚪的活動力，造成 *R. clamitans* 和 *R. pipiens* 蝌蚪的躲避反應受影響，並且有劑量反應效應(Wojtaszek, *et al.*, 2004)。

(三) 變態特徵的影響

在水域環境中的各種生物與非生物因子都有可能影響蝌蚪的生長、發育與變態特徵，Wilbur and Collins (1973)提出的變態模型(metamorphic model)中指出，蝌蚪在變態體型上有最小變態體型(b)及最大變態體型($b+c$)的限制，其中 c 代表變態體型可塑性的範圍大小。當水域環境中有不利生長發育的因子存在的時候，如掠食者、食物量低、水域乾涸，蝌蚪在到達最小變態體型(b)時則以較小的體型、較短的蝌蚪期達成變態並離開水域，如此其可及早脫離條件較差的水域環境。當水域環境中沒有這些壓力存在的時候，蝌蚪在達到最小變態體型(b)之後仍可以繼續生活在水域環境中，以最大變態體型($b+c$)與較長的蝌蚪期達成變態，如此可獲得較大的變態體型，其有利於運動與掠食能力，並且可以較早達到性成熟而提高生產力(Semlitsch, *et al.*, 1988; Berven,

1990)。蝌蚪可能可以因應環境中除草劑壓力的存在與否而調整提變態時間與體型。

材料與方法

試驗樣區

研究採樣地點為台中縣梧棲鎮中棲路旁的農業區域，主要耕種水稻，其他還有零星的芋田及菜園。該地區水稻每年耕作兩次，於二到四月及八到九月為水稻插秧時期，在此期間田水高約 3-5 公分深，其他耕作階段田中皆無積水。

物種介紹

澤蛙(*Rana limocharis*)(圖 1A)屬於赤蛙科(Ranidae)，普遍分布於全台灣平地及低海拔山區的稻田、溝渠、水池、草澤等靜止水域。繁殖期為三到十月，但以春夏為主。雄蛙體長約 4-5 公分，雌蛙約 5-6 公分。卵粒小，卵塊成一大片漂浮在水面上(圖 1B)，每次產 700 至 1600 粒卵，雌蛙一年可多次產卵。蝌蚪小型，背面呈橄欖綠色，有棕色斑點，尾部細長有深色細斑，尾長為體長兩倍。

採集時間與方法

由於水稻田積水時間受到耕作限制，本試驗採集於 2005 年到 2007 年間的三、四月與八、九月間進行，每次採集採回 3-4 團受精卵，帶回實驗室待其孵化，孵化後將其混合飼養，並馴化以待進行處理。

除草劑的選用與分析

一、本試驗採用的三種除草劑

丁拉免速隆 (butachlor-bensulfuron methyl) 為台灣最常使用的水稻田除草劑之一，是一種複合型藥劑。本試驗採用的丁拉免速隆粒劑係含有 2.583% 有效成分之商品，由杜邦公司經銷授權台灣大勝化學工業所製造。分別含有 0.083% 的免速隆與 2.5% 的丁基拉草。

免速隆 (bensulfuron-methyl) 可濕性粉劑係含 10% 有效成分之商品，為美國杜邦公司 (DuPont Co.) 製造。免速隆有效成分 (a. i.) 之化學式為 $-\text{[[}(4,6\text{-dimethoxy-2-pyrimidinyl)carbamoyl]sulfamoyl]}-\text{-toluic acid}$ 。

丁基拉草 (butachlor) 乳劑係含有 60% 有效成分之商品，由美國孟山都公司授權億豐農化廠製造。丁基拉草有效成分 (a. i.) 之化學式為 N-butoxymethyl-2-chloro-2', 6'-diethylactanilide。

二、HPLC 分析

(一) 建立免速隆與丁基拉草的標準檢量線

免速隆標準液濃度配製為 2.07、6.09、18.51、56.04、168 及 504 pmole/ml；丁基拉草標準液濃度配製為 40.1、80.2、160、160、320、641、1282 pmole/ml 分別取 10 μL 注入各不同條件的 HPLC 系統(附錄一)中，以製作兩種除草劑之標準檢量線(圖 2)。

(二) 水樣之固相萃取

1. 免速隆水樣

定量的水樣以 ADVANTEC 5C (90 mm, Toyo Roshi Kaisha, Ltd. Japan)濾紙過濾兩次。將 C₁₈ cartridge [1g/6 ml, Strata C18-E (55 μm, 70A), Phenomenex, U.S.A]先以 5 mL 甲醇及以 5 mL 二次蒸餾水活化。過濾後之水樣利用真空抽氣幫浦(150 mm Hg)控制水樣流經 C₁₈ cartridge 之流速為 3 ml/min , 待完全抽乾後, 再以 5 ml 甲醇將吸附在 cartridge 之除草劑沖提出來, 以試管收集沖提物。之後取 10 μL 注入 HPLC 分析(Galletti, *et al.*, 1995)。

2. 丁基拉草水樣

定量的水樣以 ADVANTEC 5C (90 mm, Toyo Roshi Kaisha, Ltd. Japan)濾紙過濾兩次。將 cartridge [1 g/6 ml, Strata florisil (140 μm, 83A), Phenomenex, U.S.A]以 20 mL n-hexane 活化。過濾後之水樣利用真空抽氣幫浦(150 mm Hg)控制水樣流經 cartridge 之流速為 3 ml/min , 待完全抽乾後, 再以 4 ml 的 ethylacetate/n-hexane (v/v, 2:3)將吸附在 cartridge 之除草劑沖提出來, 以試管收集沖提物, 並以氮氣將其吹乾, 最後以 1 ml 甲醇混合均勻, 取 10 μL 注入 HPLC 分析(Buono, *et al.*, 2005.)。欲檢測的水樣經過萃取之後注入 HPLC 系統, 並以得到的 peak area 注入之樣本體積, 利用檢量線計算出水樣中之除草劑濃度。

試驗一、除草劑對澤蛙蝌蚪存活(96 小時)的影響

本研究從梧棲的水稻田中採集澤蛙卵團, 將其帶回實驗室, 於室溫下以曝氣水馴養待其孵化, 蝌蚪孵化後以蒸餾水馴養在 26 的控溫箱中, 調控光暗週期 12 小時, 並餵食煮熟的菠菜或者白莧菜。當蝌蚪發育至 Gosner 26 期

(Gosner, 1960)時進行處理。

三種除草劑分別以蒸餾水配製，濃度的設計依照各種除草劑在田間建議施用的濃度，增加一至二倍作為最高濃度處理，並依次降低濃度。所設計濃度分別如下：丁拉免速隆處理濃度 3.10×10^0 、 1.55×10^0 、 7.75×10^{-1} 、 3.87×10^{-1} 、 2.58×10^{-1} 、 1.29×10^{-1} 、 6.46×10^{-2} 、 2.58×10^{-2} 與 0 ai mg/L，其中田間推薦用量為 1.55×10^0 ai mg/L；免速隆處理濃度 3.6×10^{-1} 、 1.80×10^{-1} 、 9.00×10^{-2} 、 4.50×10^{-2} 、 2.25×10^{-2} 、 1.13×10^{-2} 、 5.63×10^{-3} 與 0 ai mg/L，其中田間推薦用量為 9.00×10^{-2} ai mg/L；丁基拉草處理濃度 3.21×10^0 、 1.61×10^0 、 8.03×10^{-1} 、 4.01×10^{-1} 、 2.01×10^{-1} 、 1.00×10^{-1} 、 5.01×10^{-2} 與 0 ai mg/L，其中田間推薦用量為 4.82×10^0 ai mg/L。其中因為在計算濃度的過程出現錯誤，所以並未設計到丁基拉草的田間推薦用量濃度。

每個濃度處理有三個重複，每個重複有 10 隻蝌蚪。將蝌蚪飼養在 500 ml 的處理溶液中，每天記錄蝌蚪存活數量、移除死亡個體，並置換處理溶液，於 96 小時後以 Log-logistic model 來計算蝌蚪的半數致死濃度(LC₅₀)。

試驗二、除草劑對澤蛙蝌蚪長期存活、生長、發育及變態的影響

蝌蚪取得方式同試驗一，藥劑處理濃度分別如下：丁拉免速隆處理濃度 7.75×10^{-1} 、 3.87×10^{-1} 、 2.58×10^{-1} 、 1.29×10^{-1} 、 6.46×10^{-2} 、 2.58×10^{-2} 與 0 ai mg/L；免速隆處理濃度 3.6×10^{-1} 、 1.80×10^{-1} 、 9.00×10^{-2} 、 4.50×10^{-2} 、 2.25×10^{-2} 、 1.13×10^{-2} 、 5.63×10^{-3} 與 0 ai mg/L；丁基拉草處理濃度 8.03×10^{-1} 、 4.01×10^{-1} 、 2.01×10^{-1} 、 1.00×10^{-1} 、 5.01×10^{-2} 、 2.5×10^{-2} 與 0 ai

mg/L，並每週重新配製處理溶液。

每組濃度處理有 15 隻蝌蚪，每一隻蝌蚪獨立飼養於有 150 ml 處理溶液塑膠盒中，避免個體之間產生食物或者空間競爭而影響數據，蓋上有打洞的盒蓋以避免溶液蒸發過快，餵食蝌蚪煮熟的菠菜或白莧菜。試驗進行過程中每週紀錄蝌蚪的存活數量、發育期數(Gosner, 1960)，以電子秤測量體重，每三至四天更換處理溶液，移除死亡個體。當蝌蚪達到 Gosner 42 期時，記錄其體重與時間作為變態特徵資料。試驗結果以 ANOVA 來檢測不同濃度之下的蝌蚪成長與發育是否有所差異。

試驗三、丁基拉草對蝌蚪乙醯膽鹼酯？(acetylcholinesterase, AChE)活性影響

本研究選取 26-28 期的蝌蚪分別處理在控制組(蒸餾水)及丁基拉草 0.8 ai mg/L，並在處理後 0、3、6、9、12、24 小時各取 5 隻蝌蚪，使用光電比色計檢測乙醯膽鹼酯？之活性(Ellman, *et al.*, 1961)。除了丁基拉草之外，另外選用一種抑制乙醯膽鹼酯？活性之殺蟲劑-陶斯松(Chlorpyrifos)，濃度為 0.12 mg/L 作為對照。陶斯松是一種有機磷殺蟲劑，其透過抑制昆蟲乙醯膽鹼酯？的機制殺蟲，以得到除蟲的功效。步驟如下：(藥劑配置如附錄二)

1. 將蝌蚪表面以蒸餾水潤洗並秤重，加入適量的液態氮並研磨蝌蚪，再加入緩衝液(20 mg 組織/mL phosphate buffer)研磨均質化。
2. 以 1000 g 離心 5 分鐘，吸出上清液，取 0.4 ml 滴入含有 0.35 ml 緩衝液的石英管，再加入 25 μ L 的 DTNB reagent，混合均勻。

3. Blank 管為 0.75 ml 的緩衝液(pH 8.0, 0.1 M), 加入 25 μ L 的 DTNB reagent, 再加入 5 μ L 的 substrate。
4. 兩管皆混合均勻並放入光電比色計中, 以波長 412 nm 測吸收值, 待其停止增加達穩定時, 將其歸零。
5. 取出樣本的石英管, 加入 5 μ L 的 substrate, 快速混合均勻後放回光電比色計中, 開始讀取吸收值。
6. 每分鐘紀錄吸收值, 並計算每分鐘吸收值的變化量, 連續紀錄兩分鐘。
7. 採用前兩分鐘吸收值變化量的平均值代入下列公式, 計算乙醯膽鹼? 活性。

$$R = \frac{A}{1.36(10^4)} \times \frac{1}{(400/3120) Co} = 5.74 (10^{-4}) \frac{A}{Co}$$

R= rate, in moles **substrate** hydrolyzed per min/g tissue

A= change in absorbance/min

Co= original concentration of tissue (mg/mL)

最後以 ANOVA 分析處理在控制組、丁基拉草、陶斯松下澤蛙蝌蚪的乙醯膽鹼酯? 活性是否有所差異。

試驗四、丁基拉草對澤蛙蝌蚪的遺傳毒性

本研究選取 Gosner 37-38 期的蝌蚪, 將其處理在控制組(蒸餾水)、0.4 及 0.8 mg/L 的丁基拉草, 每組有八隻蝌蚪, 處理時間為期 96 小時, 並隨即採集蝌蚪血液進行鹼性單細胞膠體電泳(Ralph, *et al.*, 1996; Ralph and Petras,

1997)。

遺傳毒性檢測步驟如下(配方見附錄三)：首先，將 low melting agarose (LMA)與 normal melting agarose (NMA)加熱溶化置於 40 備用，在毛玻片上滴第一層膠(125 μ l 的 1% NMA)，並蓋上蓋玻片，置於冰上五分鐘待其凝固。將蓋玻片取下滴 75 μ l 第二層膠，並蓋上蓋玻片、置於冰上五分鐘。第二層膠為 0.7% LMA 與細胞溶液的混合溶液，將蝌蚪斬首後隨即浸入 5 ml 的 phosphate buffered saline (PBS)中讓血液釋放出來，經過五分鐘後將蝌蚪取出，即獲得細胞溶液。將蓋玻片取下滴 75 μ l 的第三層膠(與第二層等比例的 LMA 加上 PBS)，蓋上蓋玻片並置於冰上。將完成的玻片移除蓋玻片，浸置在 lysing solution 中一個小時，隨後移至電泳槽中浸泡電泳液 20 分鐘，接著在電泳條件 25V、300 mA 之下進行電泳 20 分鐘，最後將玻片取出沖洗五次 neutralization buffer，並滴 5 滴 EtBr 染色，蓋上蓋玻片，放進玻片盒中置於 4 下反應 20 分鐘，並在一個禮拜內以螢光顯微鏡觀察玻片完畢(步驟見附錄四)。

單細胞膠體電泳又稱為彗星分析，其原理為細胞 DNA 損傷後其結構受到改變而鬆散，於試驗過程中經過解旋(unwinding)，電泳時受損的 DNA 從核中移出，朝正極方向泳動，產生一條尾狀如彗星的形狀，而未受損的 DNA 部分則保持球型，兩者共同形成“彗星”。彗星經過螢光染色後可在螢光顯微鏡 (Olympus BX51, Japan)下觀察，並以彗星的長度(DNA 移動距離)、彗星螢光強度(DNA 含量)、彗星頭長、尾長等各項電腦軟體判讀出的數據來定量檢測單一細胞中的 DNA 損傷。本試驗以軟體 Comet Assay 進行分析，並以 tail

moment 作為分析指標。試驗結果以 ANOVA 檢驗丁基拉草對澤蛙蝌蚪是否有遺傳毒性，並進一步了解不同濃度造成的傷害是否有所不同。

統計分析方法

在丁拉免速隆、丁基拉草、免速隆處理後 96 小時的蝌蚪存活率以 Log-logistic model 來計算蝌蚪的半致死濃度(LC₅₀)。三種除草劑對蝌蚪在成長上的影響以單因子變異數分析(ANOVA)每週進行檢驗，在發育上的影響以 Kruskal-Wallis test 每週進行檢驗，若處理間有顯著差異，再以 Tukey 檢定法進行事後比較，而對蝌蚪變態率的影響則以卡方分析檢驗。除草劑對變態時間、變態體重、乙醯膽鹼酯? 活性、DNA 損傷的影響則以單因子變異數分析(ANOVA)進行檢驗，若處理間有顯著差異，再以 Tukey 檢定法進行事後比較。資料的統計分析使用 SAS 軟體(SAS Institute 1996)，統計顯著水準 $\alpha = 0.05$ 。本文中的統計敘述與圖表均以平均值 \pm 標準誤差(mean \pm SE)表示之。

結果

一、丁拉免速隆對澤蛙蝌蚪存活(96小時)的影響

蝌蚪在不同濃度丁拉免速隆處理下 96 小時的存活率明顯受到濃度的影響 (圖 3), 高濃度組 3.1 mg/L 的蝌蚪在 24 小時全數死亡, 1.55 mg/L(田間建議濃度)在 48 小時造成蝌蚪全數死亡, 中濃度組 0.775 mg/L 的蝌蚪在處理後 96 小時的存活率約為 50%, 低於 0.387 mg/L 的所有組別(0.387、0.258、0.129、0.065、0.026 及對照組)的蝌蚪其在處理後 96 小時的存活率均為 100%。

蝌蚪在不同濃度免速隆處理下 96 小時的存活率全部均達 100% (圖 4), 無論是高於田間建議濃度的 0.36 與 0.18 mg/L, 或者是建議濃度 0.09 mg/L, 以及所有中低濃度組別 0.045、0.0225、0.0113、0.0056 mg/L 與對照組的蝌蚪存活率都是 100%。所有濃度的免速隆在 96 小時內對澤蛙蝌蚪的存活沒有負面影響。

蝌蚪在不同濃度丁基拉草處理下 96 小時的存活率明顯受到濃度的影響 (圖 5), 和丁拉免速隆有相似的模式。丁基拉草的田間建議濃度為 4.8 mg/L, 然而 3.21 mg/L 濃度處理後 24 小時即會造成蝌蚪全數死亡, 1.6 mg/L 處理的蝌蚪在 72 小時則全數死亡, 而 0.8、0.4、0.2、0.1、0.05 mg/L 及對照組的蝌蚪在 96 小時的存活率分別為 53.3、73.3、80.0、86.7、100.0 與 100.0 %。

由於丁拉免速隆的蝌蚪存活率呈現 100% 或 0%, 雖然以此數據無法使用 log-logistic model 算出 96 小時的半數致死濃度, 但從存活情形中(圖 3)仍可看

出 0.775 mg/L 濃度處理下的存活率約為 50%。而免速隆處理下的蝌蚪全數存活，也無法得到 96 小時的半致死濃度。丁基拉草處理下的蝌蚪其 96 小時的半數致死濃度為 0.87 mg/L (圖 6)。

二、丁拉免速隆對澤蛙蝌蚪存活、成長、發育及變態的影響

試驗進一步了解丁拉免速隆及其組成份丁基拉草與免速隆這三種除草劑對澤蛙蝌蚪長期(五週)的存活、成長、發育與變態的影響，結果如下：

(一)、丁拉免速隆

(1) 蝌蚪存活

不同濃度丁拉免速隆處理下蝌蚪的存活率呈線性關係(圖 7)，中高濃度處理下的蝌蚪存活率較低，其中 0.775、0.387、0.258 與 0.129 mg/L 濃度處理四組的蝌蚪其存活率也都隨著處理時間而下降，最後全數死亡。

此外有三組處理之蝌蚪在五週之試驗後仍存活，分別是 0.065、0.026 與 0 mg/L 處理組，其存活率分別為 60、100 及 93.3 %。

(2) 蝌蚪成長

不同濃度丁拉免速隆處理下蝌蚪的成長情況如圖 8(A)所示，大致看來各組蝌蚪的體重和處理濃度並無明顯關係，處理後一週($F_{6,94} = 4.44, p < 0.001$)與兩週($F_{6,72} = 3.31, p < 0.01$)蝌蚪的體重都各呈現差異，但是也沒有和處理濃度有關的趨勢，在處理四週後低濃度的三組(0.065、0.026 mg/L 及對照組)蝌蚪存活超過 50%，其他組別蝌蚪存活率都非常低(圖 7)，低濃

度的這三組存活的蝌蚪其體重出現明顯不同，其中 0.065 mg/L 組的蝌蚪顯著大於其他兩組，在第五週也有同樣的結果($F_{2,33} = 7.92, p < 0.01$)，而 0.026 mg/L 和對照組蝌蚪的體重則沒有明顯不同。從處理後第四週時的成長數據看來，雖然 0.258 mg/L 組蝌蚪的體重明顯較大，但是此處理組只有一隻蝌蚪存活，另外 0.129 mg/L 組蝌蚪也只有 5 隻存活，並且這兩組蝌蚪在處理後第五週時已經全數死亡。

(3) 蝌蚪發育

不同濃度丁拉免速隆處理下蝌蚪的發育情況如圖 8(B)所示，幾乎所有的處理組別在五週內的發育都相同，以第四週為例，雖然很多組別蝌蚪存活率都很低，但是存活下來的蝌蚪其發育期數和其他存活率高的組別都沒有顯著差異($F_{4,41} = 0.6825, p = 0.6081$)。

(4) 蝌蚪變態

不同濃度丁拉免速隆處理下蝌蚪的變態率如圖 9 所示，變態率受到濃度顯著影響($\chi^2_5 = 207.89, p < 0.0001$)，中高濃度處理下的蝌蚪，如 0.129、0.258、0.387 與 0.775 mg/L 組別的蝌蚪在達到變態前就已經死亡，所以變態率都是 0%，而低濃度(0.026 mg/L)與對照組處理下的蝌蚪都有高變態率，分別為 93.3 與 86.7%，另外 0.065 mg/L 組蝌蚪的變態率為 40%，其他 60%的蝌蚪未達變態就已經死亡。

蝌蚪的變態特徵以達到變態的時間(圖 10A)與體重(圖 10B)來代表，共有三組處理之蝌蚪存活達到變態，而這三組達到變態的時間都沒有顯著

差異($F_{2, 29} = 0.67, p = 0.5212$)，但是達到變態的體重則有不同($F_{2, 29} = 3.78, p = 0.034$)，0.065 mg/L 組的蝌蚪其變態體重顯著大於其他兩組(0 與 0.026 mg/L)，這可能是因為在 0.065 mg/L 處理下的蝌蚪中，個體較小的蝌蚪較早死亡，而體型較大的蝌蚪存活較久，以致其變態率只有 40%，並造成較大的變態體型。

(二)、免速隆

(1) 蝌蚪存活

免速隆不同濃度處理對蝌蚪的存活率都沒有影響(圖 11)，所有處理下的蝌蚪存活率均為 100%，即使是在高於田間建議施用濃度(0.09 mg/L)的兩組高濃度組別(0.18 與 0.36 mg/L)之下，蝌蚪的存活率也是 100%。

(2) 蝌蚪成長

不同濃度免速隆處理下蝌蚪的成長情況如圖 12(A)所示，各組蝌蚪的體重並沒有呈現劑量反應關係，在處理後第一週($F_{6, 97} = 6.16, p < 0.001$)與第二週與呈現差異($F_{6, 97} = 3.02, p < 0.01$)，但是此差異和免速隆濃度沒有明顯關係，而在處理後第三週、第四週與第五週蝌蚪的體重則沒有顯著差異。

(3) 蝌蚪發育

不同濃度免速隆處理下蝌蚪的發育情況如圖 12(B)所示，各組蝌蚪的發育期數整體看來沒有和處理濃度呈現線性關係，在處理後第一週($F_{6, 98}$

= 5.31, $p < 0.001$)與第二週($F_{6, 98} = 4.60, p < 0.01$)蝌蚪的發育有顯著差異，但在第三週後所有組別蝌蚪的體重則全無顯著差異。

(4) 蝌蚪變態

不同濃度免速隆處理下蝌蚪的變態率如圖 13 所示，所有組別蝌蚪的蝌蚪都能夠存活達成變態，其中 0.18 mg/L 組蝌蚪的變態率較低並非導因於蝌蚪死亡，而是有 7 隻蝌蚪在試驗結束時尚未變態，維持在 41 期數，所以無法算進變態個數之內，因此在進行卡方分析時不將此組數據納入計算。免速隆處理下蝌蚪的變態率都很高，幾乎都高達 80% 以上，並無顯著差異($\chi^2_4 = 1.2741, p = 0.8658$)。

蝌蚪在免速隆處理下的變態特徵如圖 14 所示，變態特徵和濃度都未呈現劑量反應關係，其中蝌蚪達到變態的時間(圖 14A)與體重(圖 14B)都沒有顯著差異。

(三)、丁基拉草

(1) 蝌蚪存活

不同濃度丁基拉草處理下蝌蚪的存活情況和濃度有明顯關係(圖 15)，0.8 mg/L(接近 96 小時的半數致死濃度 0.87 mg/L)在處理後兩週造成蝌蚪全數死亡，而 0.4 與 0.2 mg/L 處理五週後存活率也接近於 0%，存活下來的有四組，分別為 0.1、0.05、0.025 與 0 mg/L，其存活率都在 93.3% 以上。

(2) 蝌蚪成長

不同濃度丁基拉草處理下蝌蚪的成長情況如圖 16(A)所示，整體的體重和濃度並無明顯關係，雖在處理後第一週($F_{6,87} = 4.80, p < 0.001$)、第二週($F_{5,68} = 2.72, p < 0.05$)與第三週($F_{4,65} = 4.17, p < 0.01$)時出現顯著差異，但亦未呈現和濃度有關的結果，在處理後第四週與第五週時則全部濃度組別的體重都沒有顯著差異。

(3) 蝌蚪發育

不同濃度丁基拉草處理下蝌蚪的發育情況如圖 16(B)所示，和成長的結果相似。處理後第三週($F_{4,65} = 3.65, p < 0.01$)與第五週($F_{4,26} = 6.46, p < 0.01$)出現顯著差異，但是沒有產生和處理濃度有關的結果，而在處理後第一、二與四週時的發育期數沒有顯著差異。

比較值得注意的是，在試驗進行的過程中，存活率逐漸降低的中高濃度組別，其在成長與發育的情況並沒有明顯的比其他高存活率的低濃度組別來的差，這項結果和丁拉免速隆有類似的情形。

(4) 在變態上的影響

不同濃度丁基拉草處理下蝌蚪的變態率呈現顯著差異($\chi^2 = 206.81, p < 0.0001$)如圖 17 所示，變態率隨著濃度增加而降低，共有四組達到變態，分別為 0.025、0.05 與 0.1 mg/L，其變態率都在 80% 以上，分別為 93.33、100、93.33 與 80%，而另外三組 0.2、0.4 與 0.2 mg/L 都在變態前就已經死亡，未能達成變態。

在變態特徵方面，達到變態的時間(圖 18A)顯示略有不同($F_{3,51} = 6.34$, $p < 0.01$)，0.025 與 0.1 mg/L 組達到變態的時間比對照組和 0.05 mg/L 組久，而達到變態的體重(圖 18B)在各組之間都沒有顯著不同。

三、丁基拉草對蝌蚪乙醯膽鹼酯？(acetylcholinesterase, AChE)活性影響

丁基拉草在處理 24 小時內對澤蛙蝌蚪乙醯膽鹼酯？活性影響的結果如圖 19 所示，本研究以陶斯松(乙醯膽鹼酯？抑制殺蟲劑)作為對照，結果顯示陶斯松對乙醯膽鹼酯？確實有顯著的抑制情形，隨著處理時間其活性越來越低(於 9 小時之後 p 值都小於 0.0001)，但是丁基拉草則沒有顯示出抑制的反應，其和控制組的結果沒有顯著差異，在處理的 24 小時內，丁基拉草沒有抑制乙醯膽鹼酯？活性。

四、丁基拉草對澤蛙蝌蚪的遺傳毒性

經過彗星試驗後，紅血球細胞核與受損傷裸露出的 DNA 可從圖 20 看到，控制組的細胞核圖形呈圓球狀，沒有拖尾的狀況產生，表示沒有 DNA 斷裂而移出細胞核區的情形(圖 20A)，而在 0.4 mg/L 處理組蝌蚪的紅血球細胞核 DNA 有斷裂，呈現彗星形狀(圖 20B)，在 0.8 mg/L 處理組則更為明顯，彗星拖尾更長(圖 20C)。根據彗星拖尾的狀況利用電腦軟體 Comet Assay ？可計算出彗星尾動量(tail moment)參數，以此作為 DNA 損傷的程度來了解丁基拉草對澤蛙蝌蚪的遺傳毒性，結果顯示出丁基拉草對澤蛙蝌蚪有明顯的遺傳毒性

($F_{2,57} = 103.82, p < 0.0001$)(圖 21), 並且和處理濃度有明顯關係, 濃度越高的丁基拉草(0.8 mg/L)造成最大的彗星尾動量, 而 0.4 mg/L 丁基拉草造成的傷害則稍微較低, 對照組(0 mg/L)則影響最小。0.8 mg/L 接近於丁基拉草對澤蛙蝌蚪在 96 小時的半致死濃度(0.87 mg/L), 這表示這樣的濃度對澤蛙蝌蚪的確會造成傷害, 不僅造成 DNA 損傷, 也會造成蝌蚪的死亡。

討論

一、 丁拉免速隆對澤蛙蝌蚪存活與變態率的影響

本研究探討除草劑丁拉免速隆對澤蛙蝌蚪的影響，將蝌蚪處理在丁拉免速隆與其組成份免速隆及丁基拉草三種除草劑之下，澤蛙蝌蚪對三種除草劑在存活上的反應不同，無論在短期(圖 3、4、5)或長期(圖 7、11、15)之下，丁拉免速隆與丁基拉草都會造成蝌蚪死亡，但是免速隆對蝌蚪沒有致死影響，這表示丁基拉草應該是造成此影響的主要原因。依照丁拉免速隆與丁基拉草的田間建議施用量換算田水中濃度分別為 1.55 mg/L 與 4.815 mg/L，都會在 24 小時內造成蝌蚪大量死亡，並且在 48 小時造成全部死亡(圖 3、5)，這顯示出田間施用的丁基拉草推薦濃度對蝌蚪有極高的毒性，對存活具有極大的威脅。

但是除草劑在田間並不會一直以施用時的濃度存在於環境中，除了藥劑本身的半衰期之外，也會隨著降雨、生物降解等各種因子而降低其濃度。丁基拉草在水田中的半衰期約為兩天(Yu, *et al.*, 1993)，以建議用量(4.815 mg/L)施用 8 天後其濃度應降為 0.3 mg/L，但是根據試驗結果(圖 15)，丁基拉草在很低濃度(0.2 mg/L)的情況下對蝌蚪的存活仍有威脅。丁基拉草除了對澤蛙蝌蚪的存活有極大影響之外，對於其他兩棲類蝌蚪的也可能同樣會產生負面影響。本試驗結果顯示在丁基拉草處理下，澤蛙蝌蚪 96 小時的半致死濃度為 0.87 mg/L(圖 6)，而其他物種的毒性研究中顯示 *Fejervarya multistriata*、

Polypedates megacephalus, *Microhyla ornata* 與 *Rana guentheri* 在 96 小時的半數致死濃度分別為 1.3、1.52、0.53 與 0.74 mg/L (Geng, *et al.*, 2005a; Geng, *et al.*, 2005b), 以及 *Bufo melanostictus* 在 48 小時的半數致死濃度為 1.18 mg/L (Geng, *et al.*, 2005a), 這些物種對丁基拉草的半致死濃度也都很低。Geng *et al.* (2005a, b) 所研究的種類除了 *F. multistriata* 外, 其他物種也經常出現在台灣農業環境, 像是 *R. guentheri* 與 *B. melanostictus* 會在水稻田水域進行生殖活動, 而 *P. megacephalus* 在果園也有穩定的族群, 因此我推測丁基拉草的施用對台灣的兩棲類族群可能也會產生威脅。

不同除草劑處理下的蝌蚪變態率結果顯示, 蝌蚪的存活決定了變態成功率, 意即只要是能存活下來的個體生理上似乎不受影響, 進而都能達成變態。澤蛙蝌蚪在三種除草劑下的變態率有所不同(圖 9、13、17), 在丁拉免速隆與丁基拉草處理下, 高濃度處理的蝌蚪變態前就會死亡, 無法達成變態, 中低濃度組的蝌蚪才能存活達成變態, 變態率和濃度有關; 而免速隆則不影響變態率, 所有濃度處理下的蝌蚪都能存活並達成變態。這項結果也再次顯示丁拉免速隆與丁基拉草對澤蛙蝌蚪的存活具有極大的影響, 而且也決定了蝌蚪是否能夠順利達成變態。

二、丁拉免速隆對澤蛙蝌蚪在成長、發育與變態特徵的影響

在丁拉免速隆及其組成份除草劑中, 蝌蚪處理在各濃度下的生長、發育表現有些微不同, 但是和濃度沒有呈現明顯關係(圖 8、12、16), 並未產生高

濃度處理下表現較差，而低濃度處理下表現較好的結果，顯示丁基拉草及免速隆除草劑對蝌蚪成長發育的影響不明顯。以整體趨勢來看，在三種除草劑處理下的蝌蚪，只要是存活下來的個體，其成長和發育都無明顯差異，而且在丁拉免速隆與丁基拉草處理下的蝌蚪中，最後無法存活達到變態的組別，以及在死亡前的成長與發育表現並無差異。這可能表示丁拉免速隆與丁基拉草對蝌蚪的影響層面在於存活，只要能存活下來的個體其成長與發育則差異不大。除草劑對兩棲類蝌蚪的成長發育有各種不同的影響，過去有研究將 *Xenopus laevis* 蝌蚪處理在不同濃度的除草劑草脫淨之下，觀察其成長發育與變態型值，結果發現在高濃度(320 $\mu\text{g/L}$)除草劑草脫淨處理下的蝌蚪，其達到變態所需的時間比較長，變態體重比較小(Sullivan and Spence, 2003)，而在低濃度(0、1、10、25 $\mu\text{g/L}$)之下的蝌蚪其變態則不受影響(Carr, *et al.*, 2003)。這和本試驗的結果有所差異。這可能表示不同的除草劑對蝌蚪變態過程有不同的影響，本試驗中的丁拉免速隆與丁基拉草對蝌蚪的成長發育與變態特徵並沒有明顯的影響。

除此之外，過去研究發現除草劑 acetochlor (ACETO)和誘發蝌蚪提早變態有關，其會透過影響甲狀腺素(3,3',5 triiodothyronine, T3)的機制來影響蝌蚪的成長發育與變態型值(Cheek, *et al.*, 1999; Crump, *et al.*, 2002; Helbing, *et al.*, 2006)。Cheek *et al.* (1999)進行研究檢測除草劑 ACETO 對 *Rana pipiens* 蝌蚪其成長發育與變態的影響，為了解 ACETO 是否會改變變態，研究者將還未變態且體內 T3 濃度仍低的蝌蚪置於四種處理，分別為對照組、ACETO 組、T3

組與 ACETO 加 T3 組，試驗進行七天，結果發現在 ACETO 加 T3 的組別中 67% 的蝌蚪達成變態，而其他三組的蝌蚪都沒有達到變態，證實 ACETO 會和 T3 產生交互作用改變蝌蚪的變態，顯著加速了蝌蚪的發育使其提早變態。另外 Helbing et al (2006) 也證實 acetochlor 會和 T3 產生交互作用，進而對蝌蚪造成影響。作者將 *R. catesbeiana* 蝌蚪(Gosner 30 期)處理在對照組 T3 組 ACETO 組以及 T3 加 ACETO 組，於四天後檢測蝌蚪腦部甲狀腺激素受體(thyroid hormone receptors, TR α and TR β)的基因表現。結果發現三個處理組蝌蚪腦部 TR α 與 TR β 的 transcript level 都有顯著增加，其中 T3 加 ACETO 處理組甚至大量增加了 TR β 的基因表現，改變了 TR α 與 TR β 的比例，這樣的結果指出腦部的基因表現受到改變可能會造成腦部功能受到影響，也可能進而影響其它的生理與行為功能。相較於本試驗的結果，雖然丁拉免速隆與丁基拉草都未影響蝌蚪的成長與發育，也未明顯改變其變態特徵(圖 10, 14, 18)，對蝌蚪的成長發育與變態特徵可能沒有直接的影響，但是是否會和其他激素產生交互作用進而造成影響，? 得進一步研究探討。

三、 丁基拉草對澤蛙蝌蚪的遺傳毒性

依據彗星試驗的結果發現，丁基拉草對澤蛙蝌蚪具有明顯的遺傳毒性，會造成蝌蚪 DNA 損傷(圖 20、21)。DNA 損傷可能會導致細胞週期、轉錄、轉譯受到影響，因此動物體內的蛋白質、酵素與生理機能也可能因此受到影響。過去研究曾報導丁基拉草對兩棲類生物的遺傳毒性，Geng et al.(2005)以

白領樹蛙(*Rhacophorus megacephalus*) 蝌蚪作為對象，將蝌蚪處理在不同濃度的丁基拉草(0.10、0.21、0.41、0.82、1.23 mg/L)之下，在處理後的 24 小時以彗星試驗檢測蝌蚪紅血球細胞核的彗星尾長，作為 DNA 損傷的指標，結果顯示 DNA 損傷程度和處理時間與濃度呈現正相關，表示丁基拉草確實造成蝌蚪 DNA 損傷。本試驗也有相同的結果產生，澤蛙蝌蚪處理在 0.4 mg/L 與 0.8 mg/L 的丁基拉草下，並在處理後 96 小時，利用彗星試驗檢測其紅血球細胞核的 DNA 損傷情形，結果發現丁基拉草確實造成澤蛙蝌蚪 DNA 損傷，而且和濃度有明顯關係，如此再次證明丁基拉草對兩棲類蝌蚪也存在著明顯的遺傳毒性。

除了兩棲類生物之外，丁基拉草對其他動物也有遺傳毒性，低濃度的丁基拉草(1 mg/L)就會造成鯰魚(*Clarias batrachus*) DNA 損傷(Ateeq *et al.*, 2005)，而且其遺傳毒性會造成 micronuclei 的現象產生(Ateeq *et al.*, 2002)。丁基拉草會造成中國大頰鼠的卵巢細胞 DNA 雙股斷裂，並產生細胞毒性(cytotoxic)導致細胞凋亡(apoptosis)的現象(Panneerselvam, *et al.*, 1999)。丁基拉草對人類的淋巴細胞也有遺傳毒性，並且隨著濃度及時間的增加，其反應更加顯著，它會造成細胞染色體產生變異(chromosome aberration)，發生染色體斷裂(chromatid breaks)、同型染色體斷裂(isochromatid breaks)等現象(Sinha, *et al.*, 1995)。甚至，也有研究指出丁基拉草對大白鼠有致癌性，引起胃腫瘤，其經由複雜之代謝活化路徑，而產生 DNA-reactive dialkylbenzoquinone imine，此路徑中 butachlor 會產生重要的中間代謝物

2-chloro-N-(2, 6-diethyl phenyl) acetamide (CDEPA) , 之後代謝為 2, 6-diethylaniline (DZA) , 再經由 para-hydroxylation 及 oxidation 成為致癌物 DNA-reactive dialkylbenzoquinone imine , 並且經由肝臟代謝 CDEPA 而對肝細胞也有致癌性的疑慮(Coleman, *et al.*, 2000)。這些研究除了顯示丁基拉草對動物存有遺傳毒性的影響之外 , 也指出其會導致染色體異常 , 甚至可能會導致癌症。而丁基拉草對澤蛙蝌蚪所造成的影響除了 DNA 斷裂傷害之外 , 更進一步的試驗確定其對 DNA 是否造成其他特殊型式的損傷 , 如此才能更深入了解丁基拉草對澤蛙蝌蚪所造成傷害的影響。

本試驗除了確定丁基拉草具有遺傳毒性之外 , 也顯示出在短時間內 , 低濃度的丁基拉草處理下即會造成明顯的損傷。本試驗處理時間只有四天 , 而且濃度很低 , 但是對蝌蚪遺傳毒性仍非常顯著(圖21) , 也有其他研究顯示兩棲類蝌蚪對於短期暴露於低濃度的遺傳毒性藥劑之下 , 就會非常敏感地產生遺傳物質的傷害反應。Clemments *et al.*(1997)檢測除草劑草脫淨(建議施用濃度為2.5到29.3 g/L)、metalochlor(建議施用濃度為6.3到20.5 g/L)、嘉磷塞(建議施用濃度為8.8到234.0 g/L)與metribuzin(建議施用濃度為2.1到52.2 g/L)對*R. catesbeiana*蝌蚪的遺傳毒性 , 研究者將蝌蚪處理在不同濃度的各種除草劑中 , 並在處理後24小時以彗星試驗檢測其紅血球細胞核DNA損傷程度 , 結果發現這些除草劑在24小時的處理過後 , 均造成顯著的DNA損傷 , 而在非常低的濃度之下就有明顯的損傷產生。本試驗結果也有相同的狀況產生 , 丁基拉草在水稻田中的建議施用濃度為4.8 mg/L , 相較於本試驗的處理濃度0.4 mg/L

與0.8 mg/L，此造成明顯DNA損傷的濃度非常低，顯示澤蛙蝌蚪對丁基拉草此遺傳毒性藥劑非常的敏感，很低的濃度就會導致顯著的影響。

包括本試驗結果，以上這些研究都顯示兩棲類蝌蚪對於遺傳毒性物質非常敏感，短時間與低濃度的暴露就會產生明顯的DNA損傷結果，甚至可能在離開藥劑暴露環境之後，仍會對蝌蚪持續造成影響。除草劑隨著降雨、降解、生物分解等，田間藥劑濃度會隨著時間越來越低，但是這並不表示對於蝌蚪沒有影響，如同其他研究結果所示，本試驗證實低濃度與短時間暴露於丁基拉草之下，澤蛙蝌蚪就會產生明顯的DNA損傷現象。

四、 丁基拉草對澤蛙蝌蚪乙醯膽鹼酯？ 酵素活性的影響

在本試驗結果中(圖 19)丁基拉草在處理 24 小時內並未造成澤蛙蝌蚪乙醯膽鹼酯？ 活性降低，和前人研究有相似的結果(Panda and Sahu, 2004)。過去研究顯示丁基拉草並不會抑制動物乙醯膽鹼酯？ 的活性，Panda and Sahu (2004) 將不同濃度的丁基拉草(0、 1.1、 2.2 mg/kg)施用在土壤中，並在處理後 1、 3、 6、 9、 12、 15、 30、 45、 60、 75、 90 與 105 天檢測蚯蚓(*Drawida willsi*)體內乙醯膽鹼酯？ 活性，結果顯示其活性均未降低。另外，本研究以陶斯松(乙醯膽鹼酯？ 抑制型除草劑)作為對照，蝌蚪在處理後 3 小時即有顯著的乙醯膽鹼酯？ 活性下降，並在 24 小時時降至最低，表示蝌蚪在處理 24 小時之內就會受到明顯影響，所以本試驗處理 24 小時的處理時間，應該可以清楚表示丁基拉草對澤蛙蝌蚪乙醯膽鹼酯？ 活性的抑制影響，結果證實丁基拉草並沒有抑

制反應。

但是，過去也有研究指出丁基拉草會降低動物乙醯膽鹼酯？活性。

Rajyalakshmi et al.(1996)指出丁基拉草會顯著抑制蝸牛(*Pila globosa*)乙醯膽鹼酯？活性，作者進行 in vivo 與 in vitro 試驗分析丁基拉草對乙醯膽鹼酯？活性的影響。在 in vivo 試驗中將蝸牛處理在 26.6 mg/L，在處理後 3、6、9、12、24 與 48 小時分析其乙醯膽鹼酯？活性，結果顯示其活性會隨著處理時間下降，在處理後 12 小時活性降到最低，而在 24 小時與 48 小時的時候活性有回復情況發生；在 in vitro 試驗中將不同濃度的丁基拉草加入蝸牛組織均質液中，並測量乙醯膽鹼酯？活性，結果顯示活性和丁基拉草濃度呈現負向關係。然而，根據本試驗顯示，在丁基拉草處理後 3、6、9、12 與 24 小時，澤蛙蝌蚪的乙醯膽鹼酯？活性都沒有隨著時間而降低，每個時間點的酵素活性和控制組也都未呈現明顯差異，表示在 24 小時內澤蛙蝌蚪的乙醯膽鹼酯？活性並未受到丁基拉草的抑制。綜合前人研究與本試驗的結果顯示，不同的物種對丁基拉草有不同的乙醯膽鹼酯？活性反應，並無一定的結果，可能是因為藥劑對於動物所造成的影響機制途徑不同所導致，而澤蛙蝌蚪乙醯膽鹼酯？活性未受到丁基拉草抑制的影響，顯示此種除草劑對澤蛙不具神經毒性。

五、 總結

台灣水稻田是澤蛙經常使用的生殖棲地，在每年二、三月份與七、八月份為水稻的插秧期，澤蛙會利用此時田中的積水進行交配與產卵，而在此階

段施用除草劑對蝌蚪可能造成嚴重的影響，並在本試驗中得到證實。根據本試驗結果顯示，澤蛙蝌蚪對除草劑丁拉免速隆、免速隆與丁基拉草有不同的反應，丁拉免速隆與丁基拉草對蝌蚪的存活有極大的威脅，但是只要能存活的個體生長未受嚴重的影響，進而能成長發育致變態，並無延遲或抑制變態的情形產生，而免速隆對存活則無負面影響，並且所有蝌蚪都能達成變態。在成長發育與變態特徵方面，免速隆處理下的蝌蚪其表現全部一致。雖然丁拉免速隆與丁基拉草會造成蝌蚪致死，但對於蝌蚪之成長發育都沒有明顯影響，即使是在中高濃度處理下最終會死亡的蝌蚪，其表現也和控制組相同，而且存活下來達成變態的蝌蚪，其達到變態的時間與體重也無顯著不同。這樣的結果表示，丁拉免速隆與丁基拉草對澤蛙蝌蚪有著兩極的影響，致死濃度處理下的蝌蚪都會死亡無法達成變態，但是只要能夠存活下來的蝌蚪，其成長發育與變態特徵的表現都沒有差異。根據試驗結果可以發現，在除草劑丁拉免速隆之中造成澤蛙蝌蚪影響的主要原因來自於丁基拉草，丁基拉草對蝌蚪存有遺傳毒性，而且蝌蚪對丁基拉草的遺傳毒性相當敏感，在短時間(四天)與低濃度(0.4 與 0.8 mg/L)的處理之下就有非常明顯的 DNA 損傷產生。本試驗結果指出丁基拉草對澤蛙蝌蚪有很大的影響，不僅有造成蝌蚪死亡之虞，也有遺傳毒性的效應，長期下來可能會對其族群成長有負面的影響，未來需要密切關注。

除了本研究的對象澤蛙之外，台灣也有許多其他兩棲類物種以農業區域作為其生殖場所，進行鳴叫、假交配與產卵的生殖行為，像是白領樹蛙會利

用果園中的人工蓄水池，諸羅樹蛙也會利用竹林中的人工蓄水池，農民以蓄水池的水進行澆水與配置農藥，這可能會對其蝌蚪造成影響。台北赤蛙與虎皮蛙都會利用水稻田進行生殖，在過去牠們是非常普遍的蛙種，但是現在卻已經是瀕為保育物種。另外還有金線蛙也會利用水田，像是水稻田、芋田以及茭白筍田都是其喜愛的環境，牠們對環境非常敏感，易受農藥威脅。從長期以來的野外觀察中發現這些物種的族群數量已經大幅下降，尤其像是台北赤蛙、虎皮蛙與金線蛙的減少更為劇烈，甚至在水稻田中已不見蹤跡，這些動物受到農藥的影響非常？得注意。另外，現在使用的所有農藥在研發上市之前都會經過動物影響試驗的評估工作，經常使用魚類、小型哺乳類等，但是卻很少以兩棲類成體與幼體作為評估對象，然而兩棲類受藥劑的影響卻如此明顯，未來應將兩棲類納入評估，以減少使用農藥對其所造成的影響。本研究是台灣第一篇探討除草劑對兩棲類蝌蚪在生理影響的報導，提供了相當基礎且重要的資訊，未來我們需要更進一步的研究，探討無論是殺蟲劑、除草劑或其他農藥其對於兩棲類成體與蝌蚪在生理、生態上的影響，這不僅是一個？得關注的議題，而且對台灣的兩棲類保育也是極為重要的。

參考文獻

- Ateeq, B., Farsh, M. A., and Ahmad, W. 2005. Detection of DNA damage by alkaline single cell gel electrophoresis in 2,4-dichlorophenoxyacetic-acid- and butachlor-exposed erythrocytes of *Clarias batrachus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62:348-354.
- Ateeq, B., Farah, M. A., and Ahmad, W. 2006. Evidence of apoptotic effects of 2,4-D and butachlor on walking catfish, *Clarias batrachus*, by transmission electron microscopy and DNA degradation studies. *Life Sciences* 78:977-986.
- Buono, D. D., Scarponi, L., and D'amato, R. 2005. An analytical method for the simultaneous determination of butachlor and benoxacor in wheat and soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:4326-4330.
- Dial, C. A. B. and Dial, N. A. 1995. Lethal effects of the consumption of field levels of paraquat-contaminated plants on frog tadpoles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 55:870-877.
- Berven, K.A. 1990. Factors affecting population fluctuations in larval and adult stages of the wood frog (*Rana sylvatica*). *Ecology* 71:1599-1608.
- Blaustein, A. R., Romansici, J. M., Kiesecker, J. M., and Hatchi, A. C. 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Diversity and Distributions* 9:123-140.
- Boone, M. D., and Semlitsch, R. D. 2001. Interactions of an insecticide with larval density and predation in experimental amphibian communities. *Conservation Biology* 15:228-238.
- Boone, M., Bridges, C. M., and Rothermel, B. B. 2001. Growth and development of larval green frogs (*Rana clamitans*) exposed to multiple doses of an insecticide. *Oecologia* 129:518-524.

- Bridges, C. M. 1997. Tadpole swimming performance and activity affected by acute exposure to sublethal levels of carbaryl. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16:1935-1939.
- Bridges, C. M. 1999. Predator-prey interactions between two amphibian species: effects of insecticide exposure. *Aquatic Ecology* 33:205-211.
- Bridges, C. M., Dwyer, F. J., Hardesty, D. K., and Whites., D. W. 2002. Comparative contaminant toxicity: are amphibian larvae more sensitive than fish? *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 69:562-569.
- Broomhall, S. and Shine, R. 2003. Effects of the insecticide endosulfan and presence of congeneric tadpoles on Australian treefrog (*Litoria freycineti*) tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45:221-226.
- Carr, J. A., Gentles, A., Smith, E. E., Goleman, W. L., Urquidi, L. J., Thuett, K., Kendall, R. J., Giesy, J. P., Gross, T. S., Solomon, K. R., and Kraak, G, V, D. 2003. Response of larval *Xenopus leavis* to atrazine: assessment of growth, metamorphosis, and gonadal and laryngeal morphology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22:396-405.
- Cheek, A. O., Ide, C. F., Bollinger, J. E., Rider, C. V., McLachlan, J. A. 1999. Alteration of leopard frog (*Rana pipiens*) metamorphosis by the herbicide acetochlor. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37:70-77.
- Clark, E. J., Norris, D. O., and Jones, R. E. 1998. Interactions of gonadal steroids and pesticides (DDT, DDE) on gonaduct growth in larval tiger salamanders, *Ambystoma tigrinum*. *General and Comparative Endocrinology* 109:94-105.
- Clemments, C., Ralph, S., and Petras, M. 1997. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline sin-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 29:277-288.

- Coady, K. K., Murphya, M. B., Villeneuveb, D. L., Heckerb, M., Jonesa, P. D., Carrc, J. A., Solomond, K. R., Smithe, E. E., Kraakf, G. V. D., Kenfalle, R. J., and Giesya, J. P. 2005. Effects of atrazine on metamorphosis, growth, laryngeal and gonadal development, aromatase activity, and sex steroid concentrations in *Xenopus laevis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62:160-173.
- Coleman, S., Linderman, R., Hodgson, E., Rose, R. L. 2000. Comparative metabolism of chloroacetamide herbicides and selected metabolites in human and rat liver microsomes. *Environmental Health Perspectives* 108:1151-1157.
- Collins, J. and Storfer, A. 2003. Global amphibian declines: sorting the hypotheses. *Diversity and Distributions* 9: 89-98.
- Colombo, A., Orsi, F., and Bonfanti, P. 2005. Exposure to the organophosphorus pesticide chlorpyrifos inhibits acetylcholinesterase activity and affects muscular integrity in *Xenopus laevis* larvae. *Chemosphere* 61:1665-1671.
- Crump, D., Werry, K., Veldhoen, N., Aggelen, G. Van., and Helbing, C. C. 2002. Exposure to the herbicide acetochlor alters thyroid hormone-dependent gene expression and metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Environmental Health Perspectives* 110:1199-1225.
- Czarniewska, E., Kasprzyk, A., and Ziemnicki, K. 2003. Effect of paraquat and metoxychlor on antioxidant enzymes in frog *Rana esculenta* L. liver. *Biological Letters* 40:125-133.
- Davidson, C., Shaffer, H. B., and Jennings, M. R. 2001. Declines of the California red-legged frog: climate, UV-B, habitat, and pesticides hypotheses. *Ecological Applications* 11: 464-479.
- Davidson, C., Shaffer, H. B., and Jennings, M. R. 2002. Spatial tests of the pesticide drift, habitat destruction, UV-B, and climate-change hypotheses for California amphibian declines. *Conservation Biology* 16: 1588-1601.

- Dial, N. and Bauer, C. A. 1984. Teratogenic and lethal effects of paraquat on developing frog embryos (*Rana pipiens*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 33:592-597.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., and Featherstone, R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7:88-95.
- Fort, D., Rogers, R., Copley, H., Bruning, L., Stover, E., and Rapaport, D. Effect of sulfometuron methyl and nicosulfuron on development and metamorphosis in *Xenopus laevis*: impact of purity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18:2934-2940.
- Galletti, G. C., Bonetti, A., and Dinelli, G. 1995. High-performance liquid chromatography determination of sulfonylureas in soil and water. *Journal of Chromatography A* 692:27-37.
- Geng, B. R., Yao, D., Xue, Q. Q. 2005. Acute toxicity of the pesticide dichlorvos and the herbicide butachlor of tadpoles of four anuran species. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 75:343-349.
- Geng, B. R., Yao, D., Xue, Q. Q. 2005. Genotoxicity of pesticide dichlorvos and herbicide butachlor in *Rhacophorus megacephalus* tadpoles. *Acta Zoologica Sinica* 51:447-454.
- Gosner, K. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16:183-190.
- Hayes, T. B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A. A., and Vonk, A. 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99:5476-5480.
- Hayes, T. B., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., and Vonk, A. 2003. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppm in American leopard frogs

(*Rana pipiens*): laboratory and field evidence. *Environmental Health Perspectives* 111:568-575.

Hayes, T. B., Stuart, A. A., Mendoza, M., Collins, A., Noriega, N., Vonk, A., Johnston, G., Liu, R., and Kpodzo, D. 2006. Characterization of atrazine-induced gonadal malformations in African clawed frogs (*Xenopus laevis*) and comparisons with effects of an androgen antagonist (cyproterone acetate) and exogenous estrogen (17 β -estradiol): support for the demasculinization/feminization hypothesis. *Environmental Health Perspectives* 114:134-141.

Hecker, M., Park, J. W., Murphy, M. B., Jones, P. D., Solomon, K. R., Kraak, G. V. D., Carr, J. A., Smith, E. E., Preez, L. D., Kendall, R. J., and Giesy, J. P. 2005. Effects of atrazine on CYP19 gene expression and aromatase activity in testes and on plasma sex steroid concentrations of male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Toxicological Sciences* 86:273-280.

Helbing, C. C., Ovaska, K., and Ji, L. 2006. Evaluation of the effect of acetochlor on thyroid hormone receptor gene expression in the brain and behavior of *Rana catesbeiana* tadpoles. *Aquatic Toxicology* 80:42-51.

Houlahan, J. E., Findlay, C. S., Schmidt, B. R., Meyer, A. H., and Kuzmin, S. L. 2000. Global amphibian population declines. *Nature* 404:752-755.

Houlahan, J. E., Findlay, C. S., Meyer, A. H., Kuzmin, S. L., and Schmidt, B. R. 2001. Quantitative evidence for global amphibian population declines. *Nature* 412:499-500.

Howe, C. M., Berrill, M., Pauli, B., Helbing, C. C., Werry, K., and Veldhoen, N. 2004. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four north american frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:1928-1938.

- Liu, Y., Zhang, Y., Liu, J., and Huang, D. 2006. The role of reactive oxygen species in the herbicide acetochlor-induced DNA damage on *Bufo raddei* tadpole liver. *Aquatic Toxicology* 78:21-26.
- Osano, O., Oladimeji, A. A., Kraak, M. H. S., and Admiraal, W. 2002 Teratogenic effects of amitraz, 2,4-dimethylaniline, and paraquat on developing frog (*Xenopus*) embryos. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 43:42-49.
- Panda, S and Sahu, K. S. 2004. Recovery of acetylcholine esterase activity of *Drawida willsi* (Oligochaeta) following application of three pesticides to soil. *Chemosphere* 55:283-90.
- Panneerselvam, N., Sinha, S., and Shanmugam, G. 1999. Butachlor is cytotoxic and clastogenic and induces apoptosis in mammalian cells. *Indian Journal of Experimental Biology* 37:888-892.
- Rajyalakshmi, T., Srinivas, T., Swamy, K. V., Prasad, N. S., and Mohan, P. M. 1996. Action of the herbicide butachlor on cholinesterases in the freshwater snail *Pila globosa* (Swainson). *Drug and Chemical Toxicology* 19:325-331.
- Ralph, S., Petras, M., Pandrangi, R., and Vrzoc, M. 1996. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 28:112-120.
- Ralph, S. and Petras, M. 1997. Genotoxicity monitoring of small bodies of water using two species of tadpoles and the alkaline single cell gel (comet) assay.
- Relyea, R. A., and Mills, N. 2001. Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to gray treefrog tadpoles (*Hyla versicolor*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:2491-2496.
- Relyea, R. A. 2005a. The lethal impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecological Applications* 15:618-627.

- Relyea, R. A. 2005b. The lethal impacts of roundup and predatory stress on six species of north American tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 48:351-357.
- Relyea, R. A. 2005c. The lethal impact of roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications* 15:1118-1124.
- Relyea, R. A., Schoepner, N. M., and Hoverman, J. 2005. Pesticides and amphibians: the importance of community context. *Ecological Applications* 15:1125-1134.
- SAS Institute. 1996. SAS/STAT User's Guide, Cary North Carolina: SAS Institute.
- Schuytema, G. S. and Nebeker, A. V. 1998. Comparative toxicity of diuron on survival and growth of pacific treefrog, bullfrog, red-legged frog, and African clawed frog embryos and tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 34:370-376.
- Semlitsch, R. D., Scott, D. E., and Pechmann, J. H. K. 1988. Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma talpoideum*. *Ecology* 69:184-192.
- Sinha, S., Panneerselvam, N., and Shanmugam, G. 1995. Genotoxicity of the herbicide butachlor in cultured human lymphocytes. *Mutation Research /Genetic Toxicology* 344:63-67.
- Sparling, D. W., Fellers, G. M., and McConnell, L. L. 2001. Pesticides, and amphibian population declines in California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:1591-1595.
- Storrs, S. I. and Kiesecker, J. M. 2004. Survivorship patterns of larval amphibians exposed to low concentrations of atrazine. *Environmental Health Perspectives* 112:1054-1057.

- Stuart, S. N., Chanson, J. S., Cox, N. A., Young, B. E., Rodrigues, A. S. L., Fischman, D. L., and Waller, R. W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306:1783-1786.
- Sullivan, K. B., and Spence, K. M. 2003. Effects of sublethal concentrations of atrazine and nitrate on metamorphosis of the African clawed frog. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22:627-635.
- Vismara, C., Battista, V., Vailati, G., and Bacchetta, R. 2000. Paraquat induced embryotoxicity on *Xenopus laevis* development. *Aquatic Toxicology* 49:171-179.
- Wilbur, H. M. and Collins, J. P. 1973. Ecological aspects of amphibian metamorphosis. *Science* 182:1305-1314.
- Wojtaszek, B. F., Staznik, B., Chartrand, D. T., Stephenson, G. R., and Thompson, D. G. 2004. Effects of Vision[®] herbicide on mortality, avoidance response, and growth of amphibian larvae in two forest wetlands. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23:832-842.
- Yu, K. N., Qi, C. J., and Tang, K. 1993. Relationship between degradation rate of Butachlor and conditions of paddy fields. *Acta Scientiae Circumstantiae* 13:169-173.

圖目錄

圖 1	本試驗物種澤蛙-----	47
圖 2	免速隆與丁基拉草檢量線圖-----	48
圖 3	不同濃度丁拉免速隆處理下蝌蚪存活率(96 小時內)-----	49
圖 4	不同濃度免速隆處理下蝌蚪存活率(96 小時內)-----	50
圖 5	不同濃度丁基拉草處理下蝌蚪存活率(96 小時內)-----	51
圖 6	丁基拉草處理後 96 小時的半致死濃度-----	52
圖 7	不同濃度丁拉免速隆處理下蝌蚪的存活率(五週)-----	53
圖 8	不同濃度丁拉免速隆處理下蝌蚪的體重與期數變化圖-----	54
圖 9	不同濃度丁拉免速隆處理下蝌蚪的變態率圖-----	55
圖 10	不同濃度丁拉免速隆處理下蝌蚪達到變態的時間與體重圖-----	56
圖 11	不同濃度免速隆處理下蝌蚪的存活率(五週)-----	57
圖 12	不同濃度免速隆處理下蝌蚪的體重與期數變化圖-----	58
圖 13	不同濃度免速隆處理下蝌蚪的變態率圖-----	59
圖 14	不同濃度免速隆處理下蝌蚪達到變態的時間與體重圖-----	60
圖 15	不同濃度丁基拉草處理下蝌蚪的存活率(五週)-----	61
圖 16	不同濃度丁基拉草處理下蝌蚪的體重與期數變化圖-----	62
圖 17	不同濃度丁基拉草處理下蝌蚪的變態率圖-----	63
圖 18	不同濃度丁基拉草處理下蝌蚪達到變態的時間與體重圖-----	64

圖 19	蝌蚪在控制組、丁基拉草與陶斯松處理下乙醯膽鹼酯? 活性變化(24 小時)-----	65
圖 20	彗星試驗結果照片-----	66
圖 21	不同濃度丁基拉草處理四天的蝌蚪 DNA 損傷情形-----	67

(A)

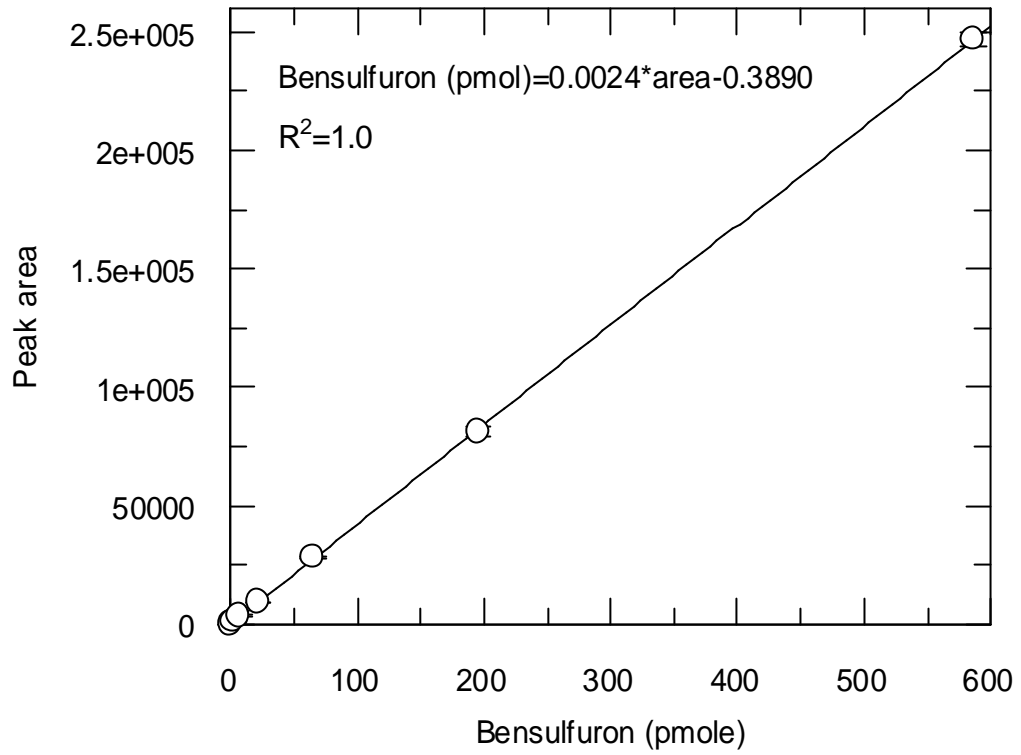


(B)



圖 1-本試驗物種澤蛙(A)與卵塊(B)

(A)



(B)

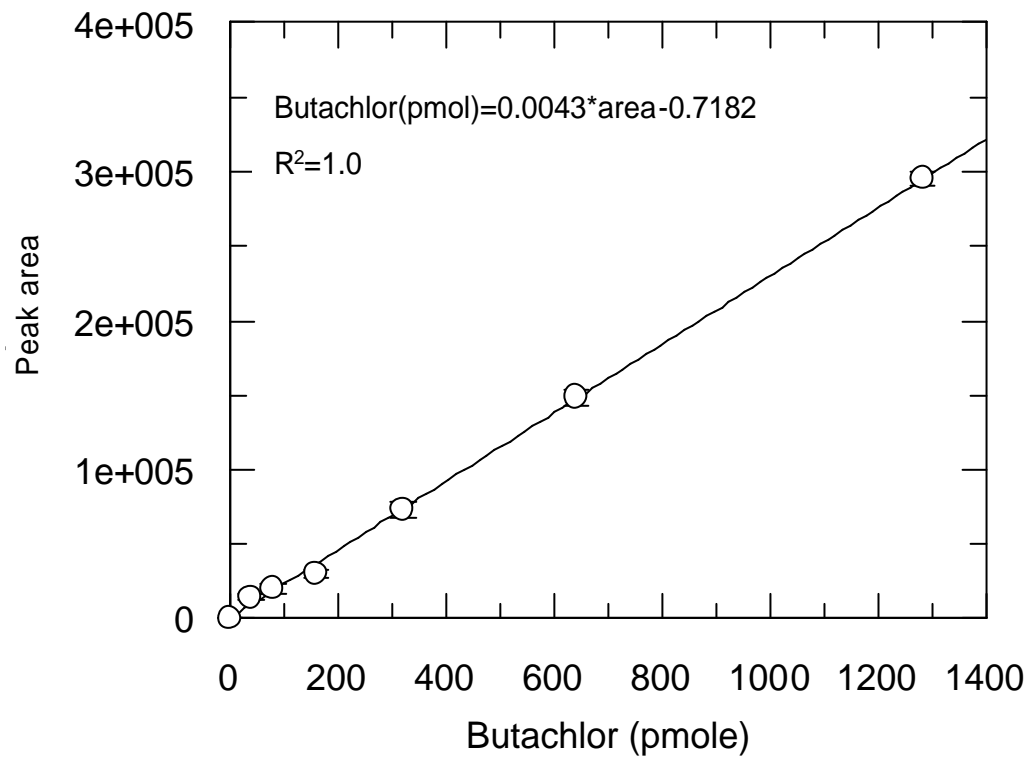


圖 2-免速隆(A)與丁基拉草(B)檢量線。

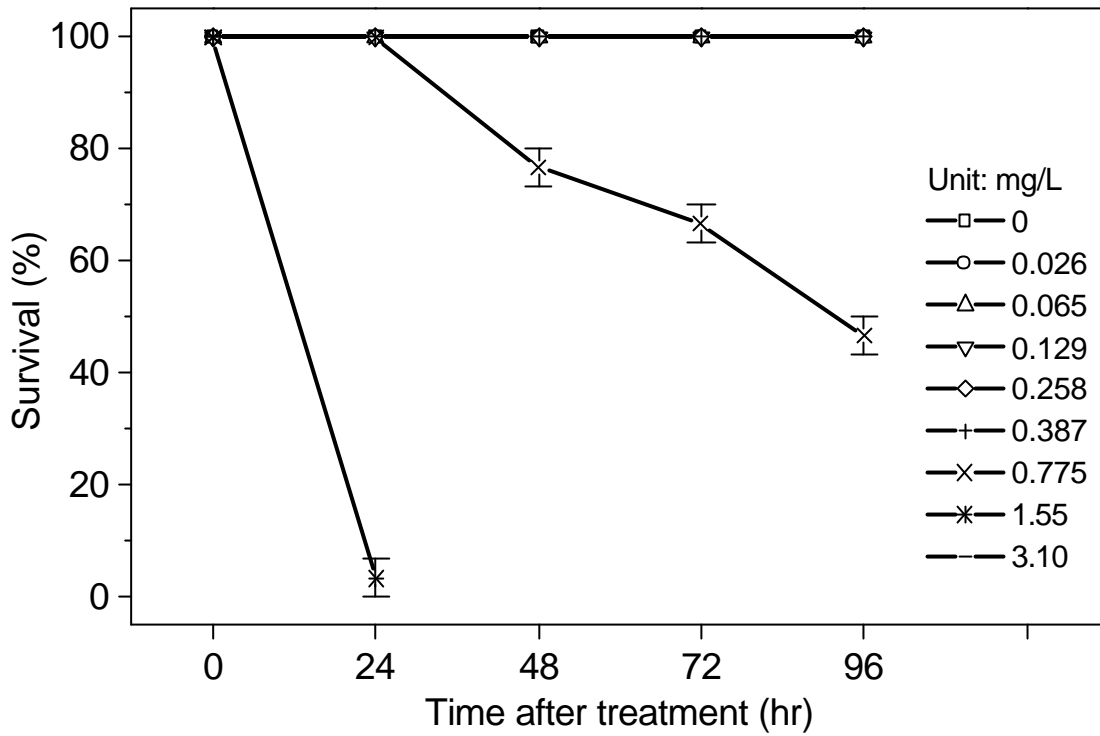


圖 3-在不同濃度丁拉免速隆處理下，於 96 小時內的蝌蚪存活率。數值為平均存活率 ±標準誤差。水稻田間建議用量換算田水中之濃度為 1.55 mg/L。

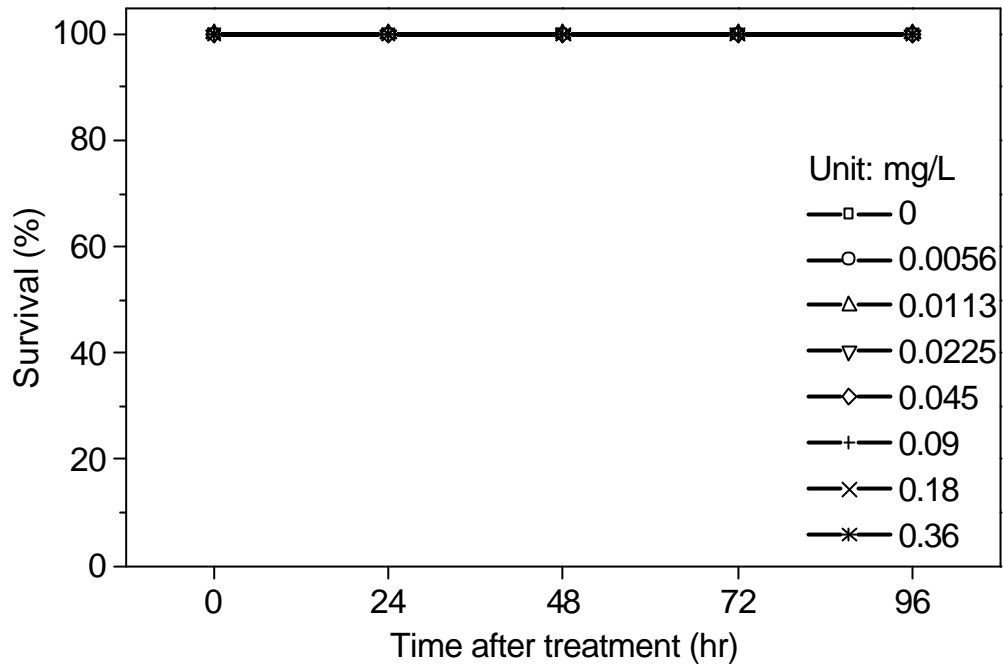


圖 4 在不同濃度免速隆處理下，於 96 小時內的蝌蚪存活率。數值為平均存活率 ± 標準誤差。田間建議用量為 0.09 mg/L。

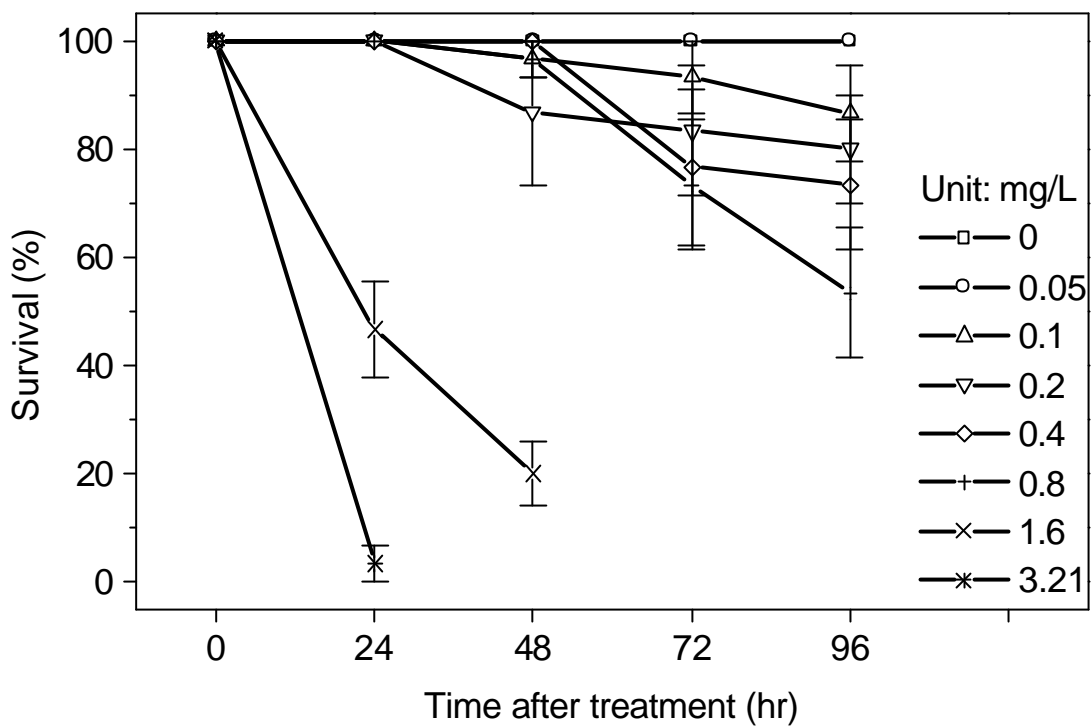


圖 5-在不同濃度丁基拉草處理下，於 96 小時內的蝌蚪存活率。數值為平均存活率 ± 標準誤差。田間建議用量為 4.8 mg/L。

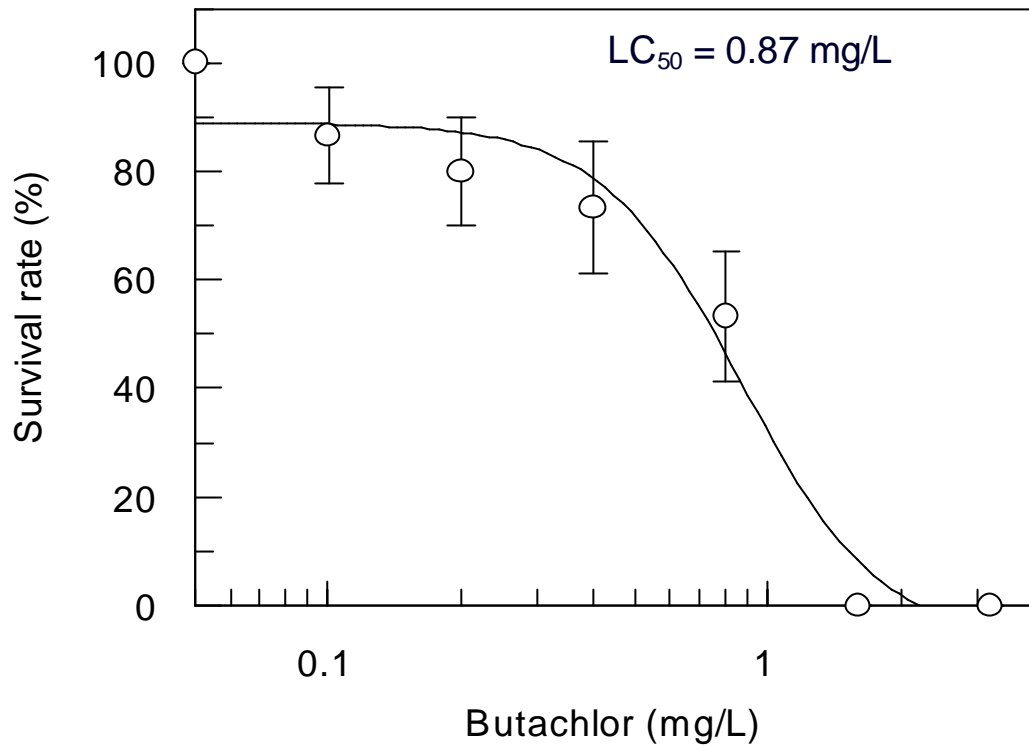


圖 6-蝌蚪在丁基拉草處理後 96 小時的半致死濃度為 0.87 mg/L。數值為蝌蚪的存活率，以 log logistic model 計算的半數致死濃度。

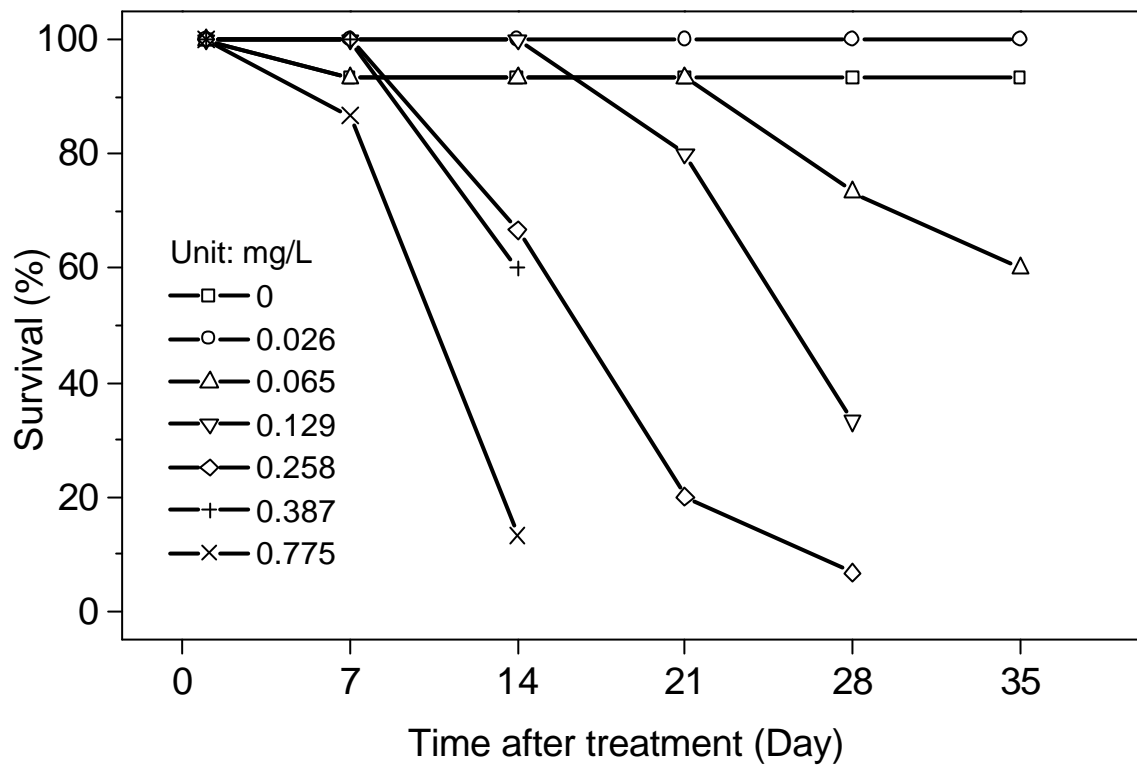


圖 7-蝌蚪在不同濃度丁拉免速隆處理下五週的存活率。田間建議用量為 1.55 mg/L。

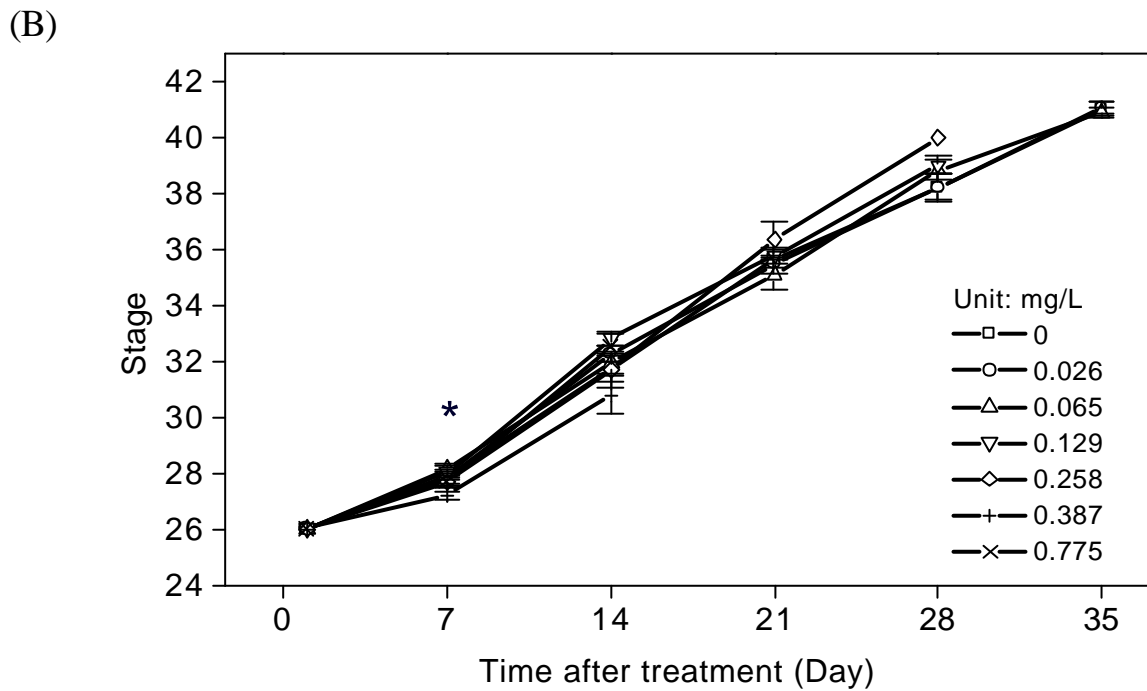
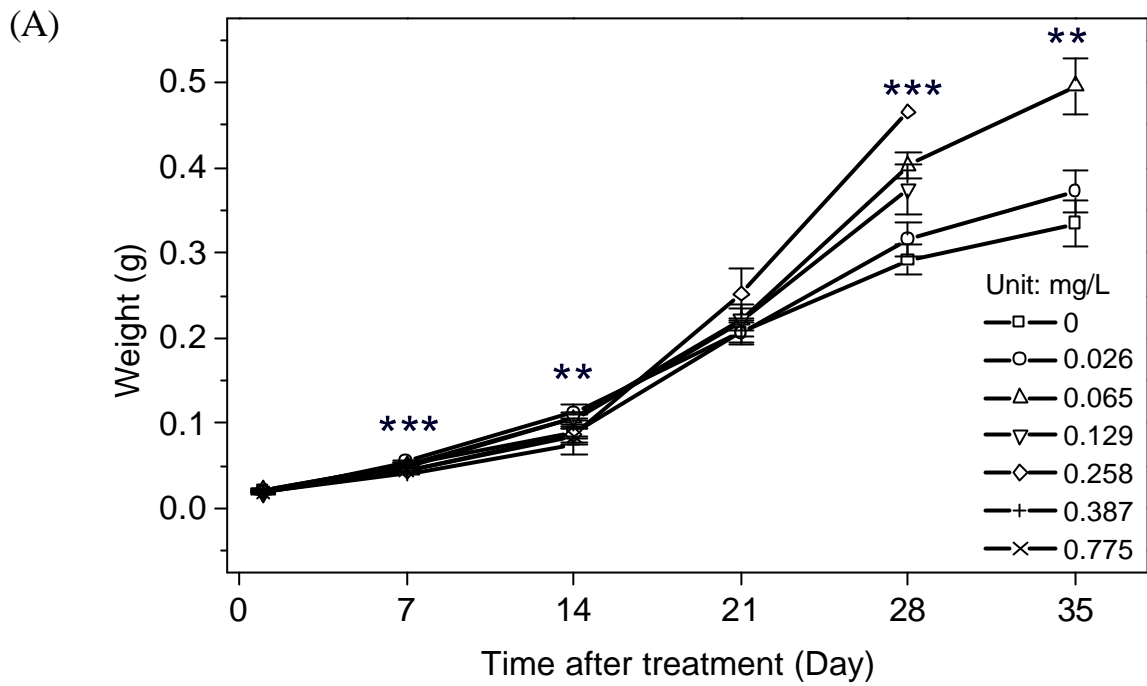


圖 8-蝌蚪在不同濃度丁拉免速隆處理下的體重(A)與期數(B)變化。數值為平均數 ± 標準誤差，體重的數據以每週數值進行 ANOVA 分析，期數的數據以 Kruskal-Wallis test 分析，「*、**、***」分別代表達顯著差異 $p < 0.05$, 0.01 , 0.001 。

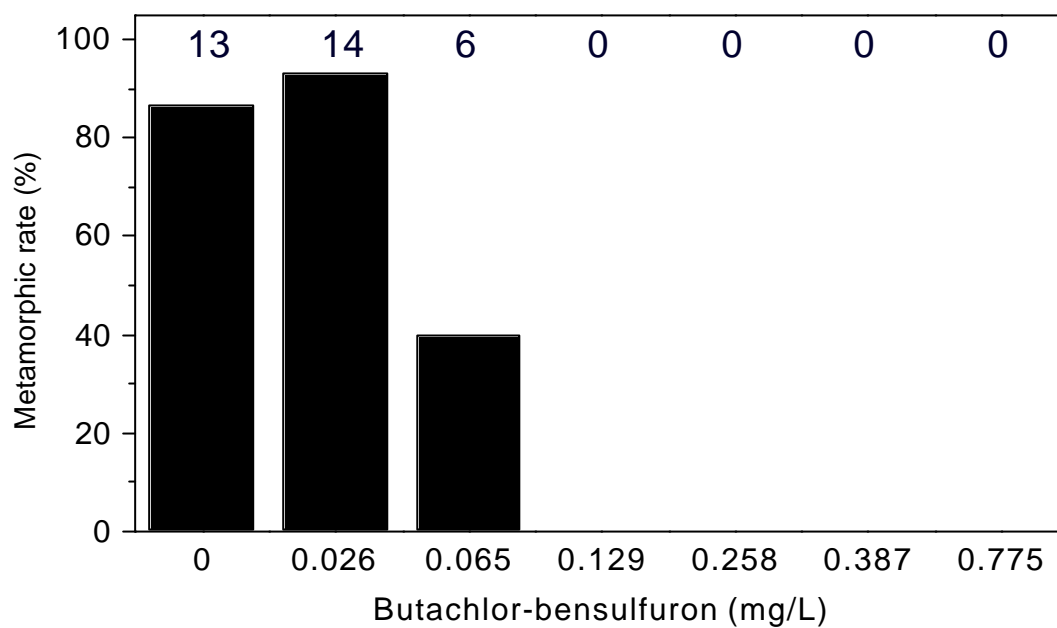
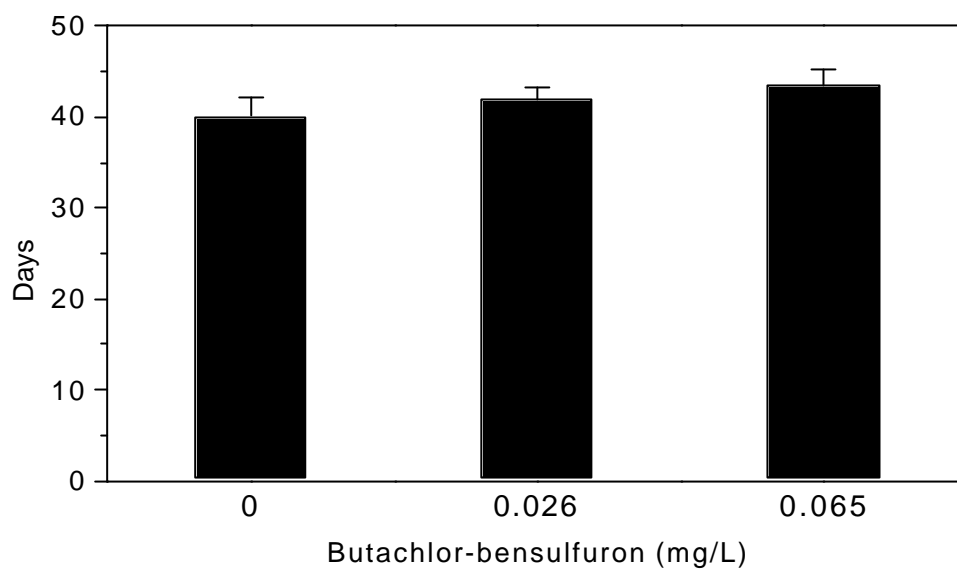


圖 9- 蝌蚪在不同濃度丁拉免速隆處理下的變態率。柱狀圖上的數字代表每組達到變態的個數。變態率以卡方分析檢驗， $\chi^2 = 207.89$, $p < 0.0001$ 。

(A)



(B)

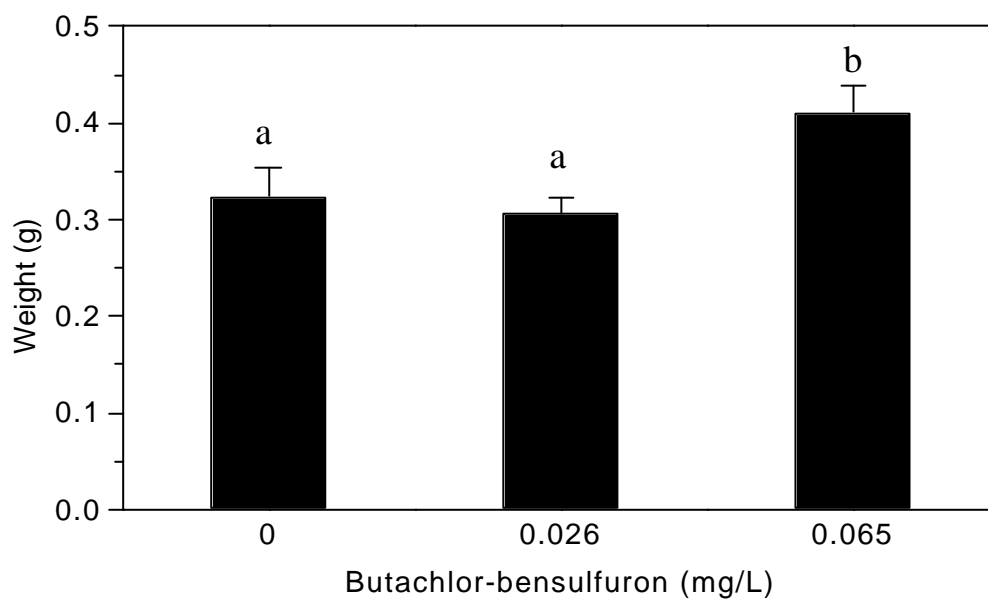


圖 10- 蝌蚪在不同濃度丁拉免速隆處理下達到變態的時間(A)與體重(B)。數值為平均值 ± 標準誤差，以 ANOVA、Tukey 分析，柱狀圖上不同英文字母代表有顯著差異。

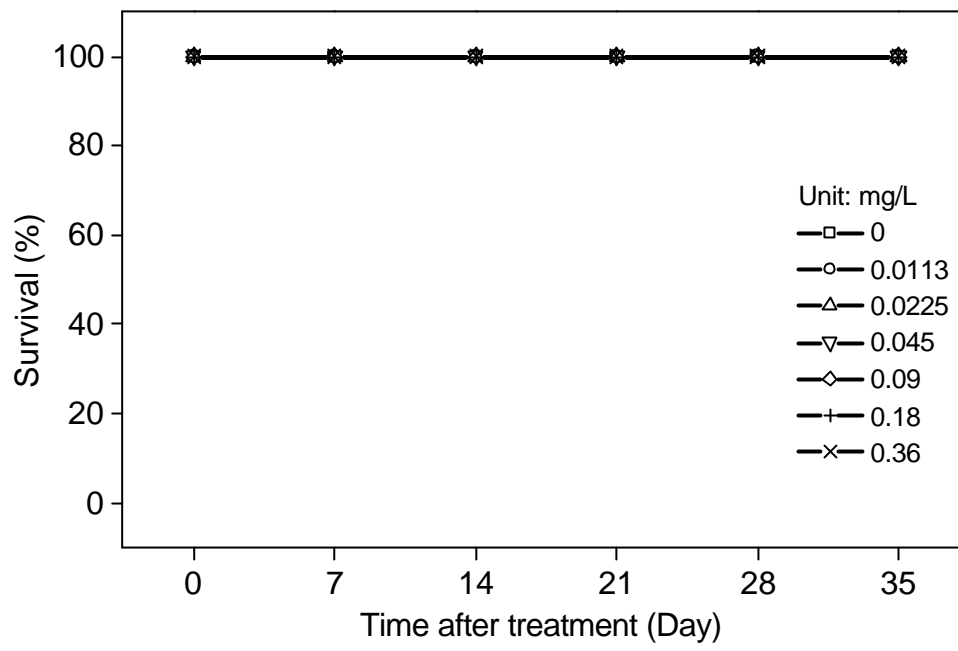
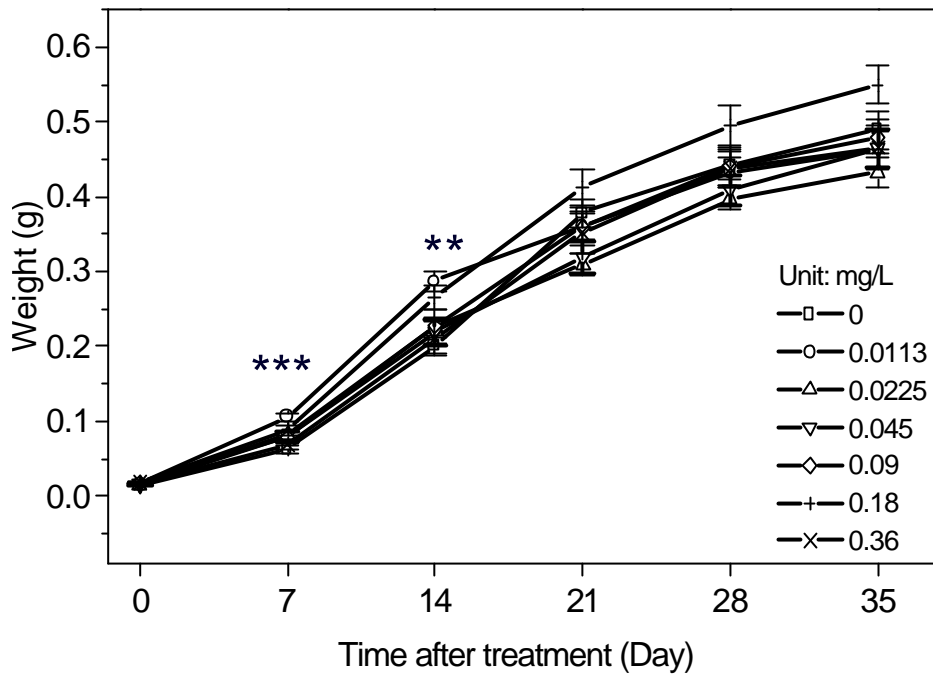


圖 11-蝌蚪在不同濃度免速隆處理下五週的存活率。田間建議用量為 0.09 mg/L。

(A)



(B)

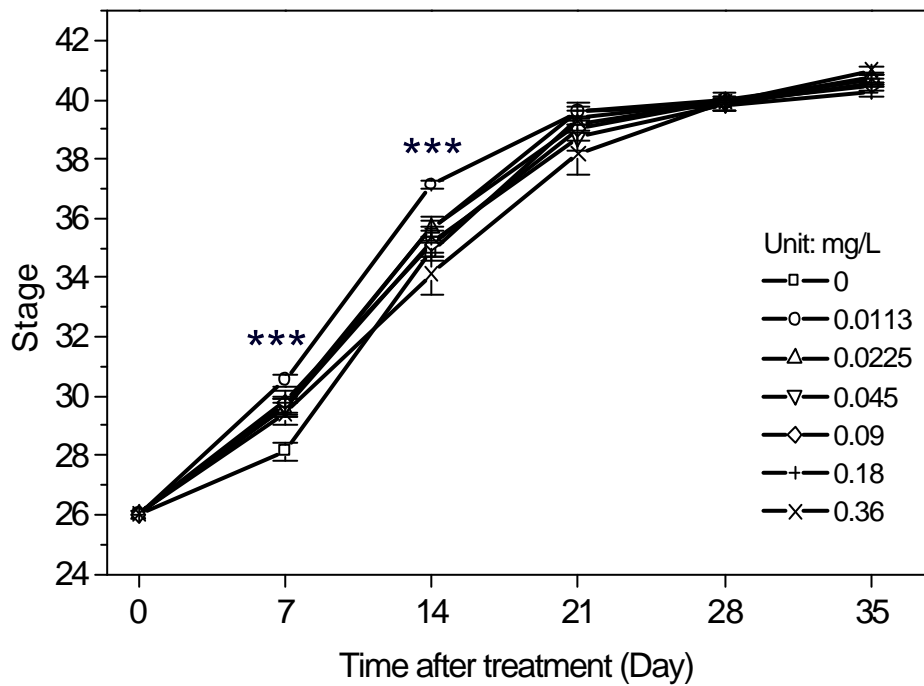


圖 12-蝌蚪在不同濃度免速隆處理下的體重(A)與期數(B)變化。數值為平均數±標準誤差，以每週數值進行 ANOVA 分析。期數數據以 Kruskal-Wallis test 分析，「*，**，***」分別代表達顯著差異 $p < 0.05, 0.01, 0.001$ 。

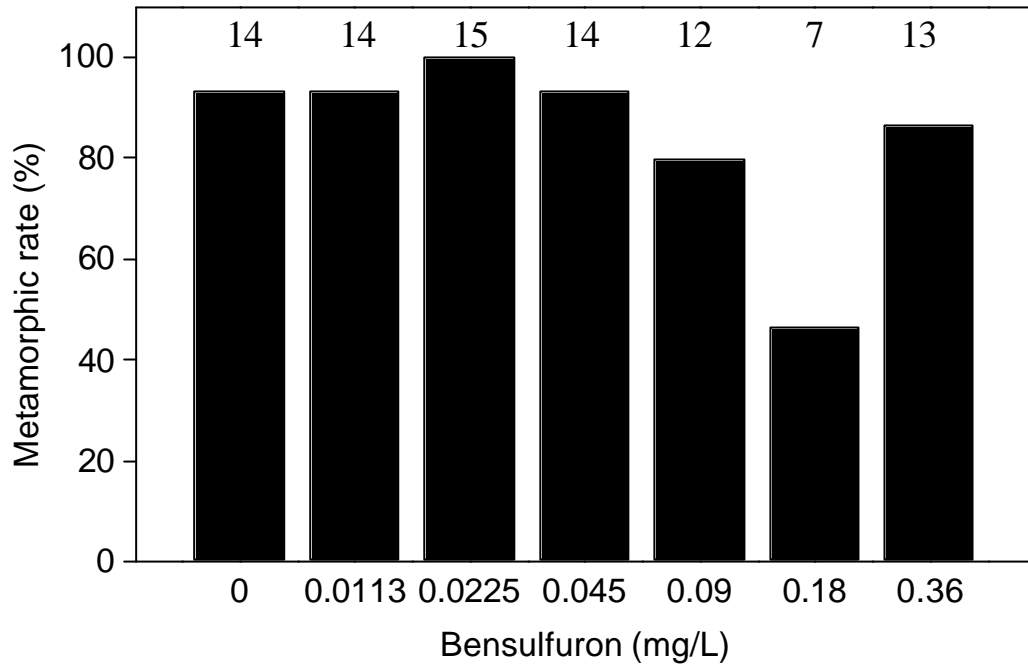
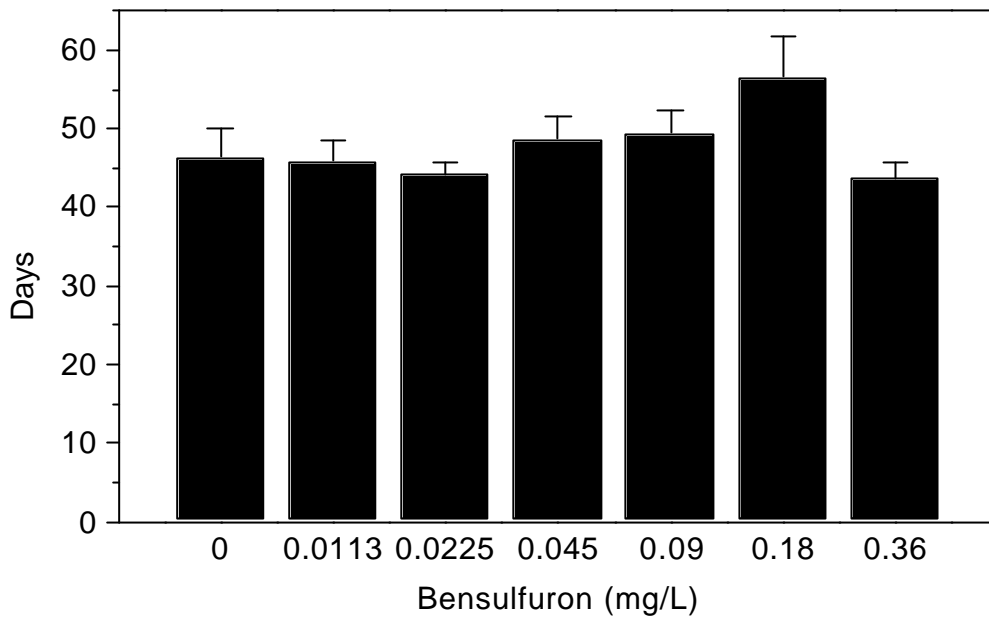


圖 13-蝌蚪在不同濃度免速隆處理下的變態率。柱狀圖上的數字代表每組達到變態的個數。變態率以卡方分析檢驗， $\chi^2_4 = 1.2741$, $p = 0.8658$ 。

(A)



(B)

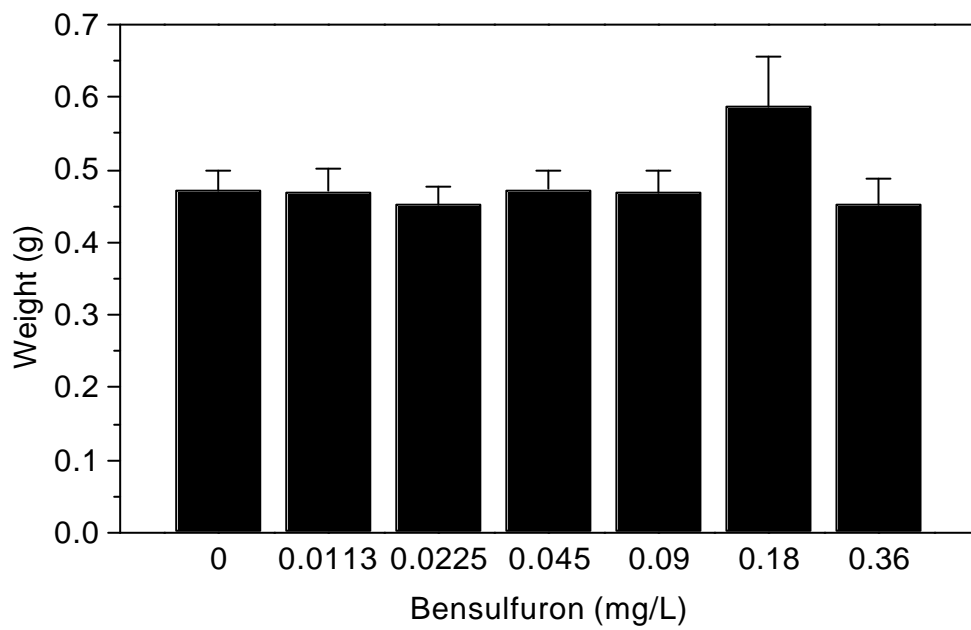


圖 14-蝌蚪在不同濃度免速隆處理下達到變態的時間(A)與體重(B)。數值為平均天數 ±標準誤差。

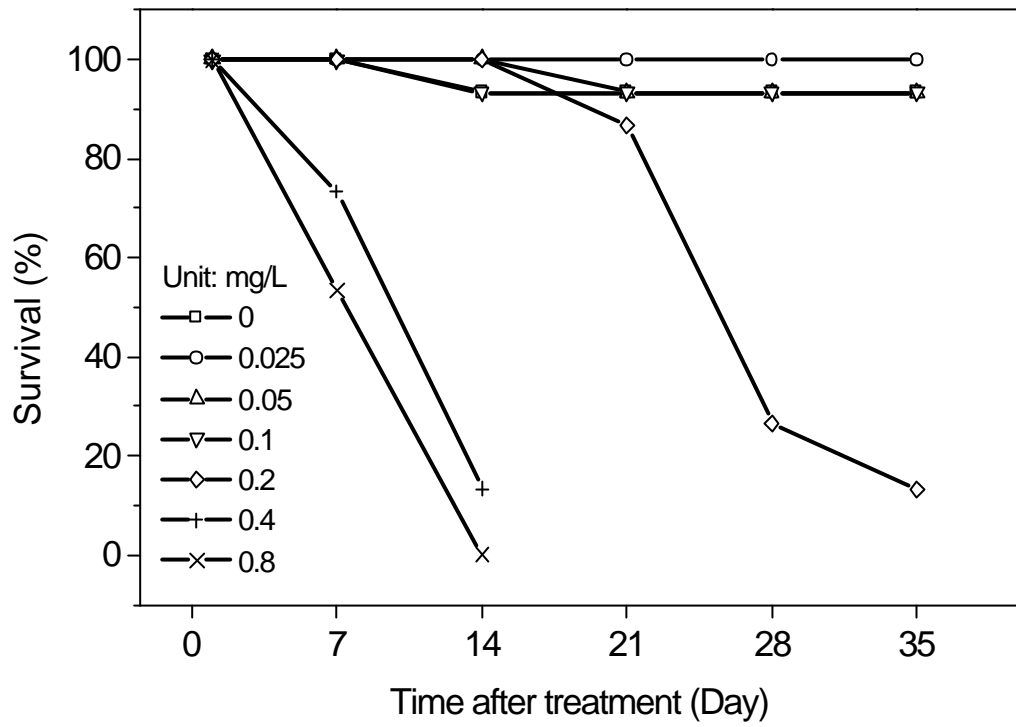
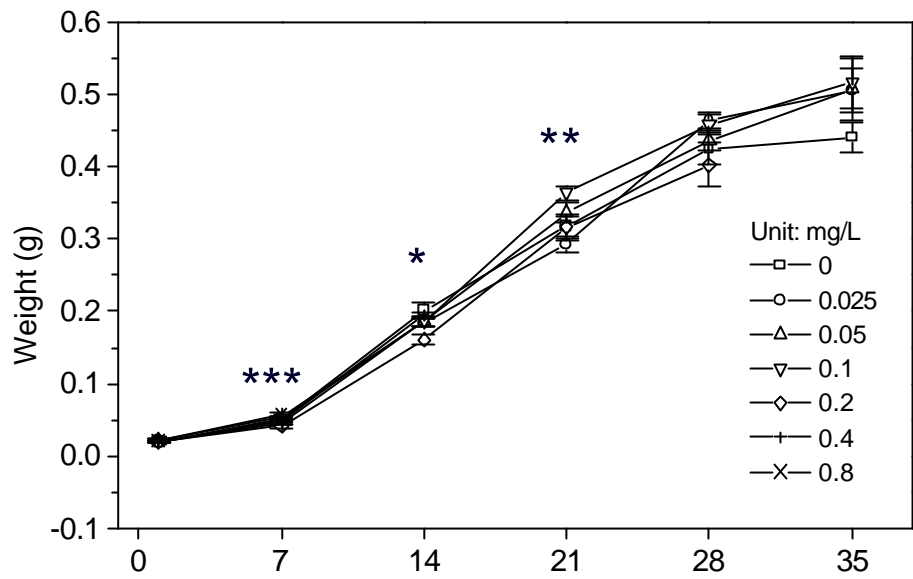


圖 15-蝌蚪在不同濃度丁基拉草處理下五週的存活率。田間建議用量為 4.8 mg/L。

(A)



(B)

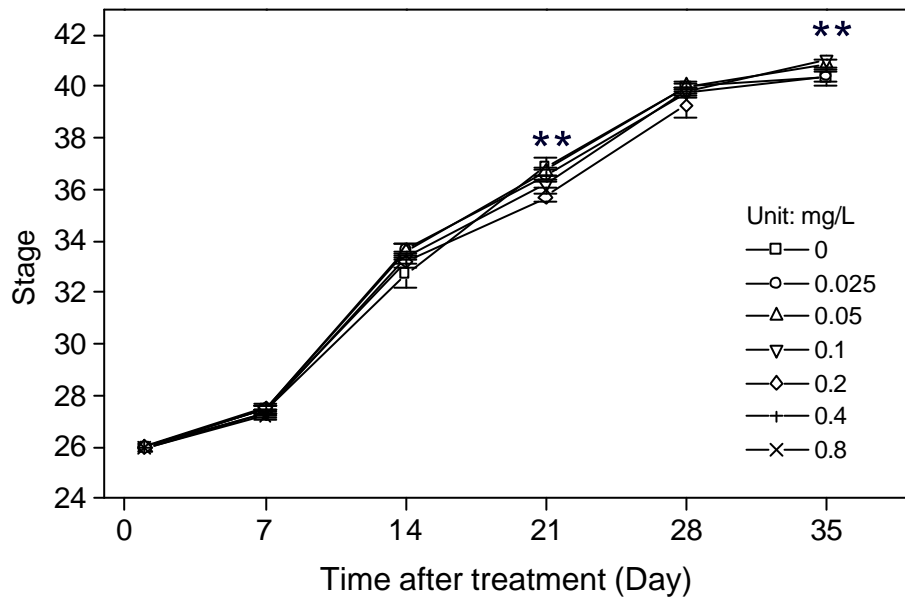


圖 16-蝌蚪在不同濃度丁基拉草處理下的體重(A)與期數(B)變化。數值為平均數 ± 標準誤差，以每週數值進行 ANOVA 分析。期數數據以 Kruskal-Wallis test 分析，「*，**，***」分別代表達顯著差異 $p < 0.05, 0.01, 0.001$ 。

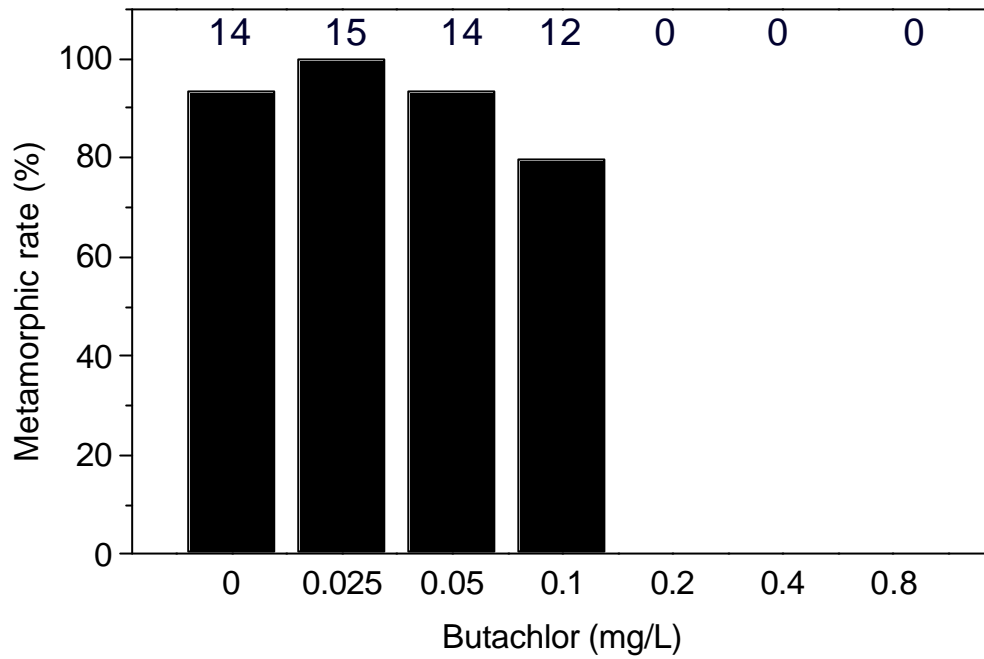
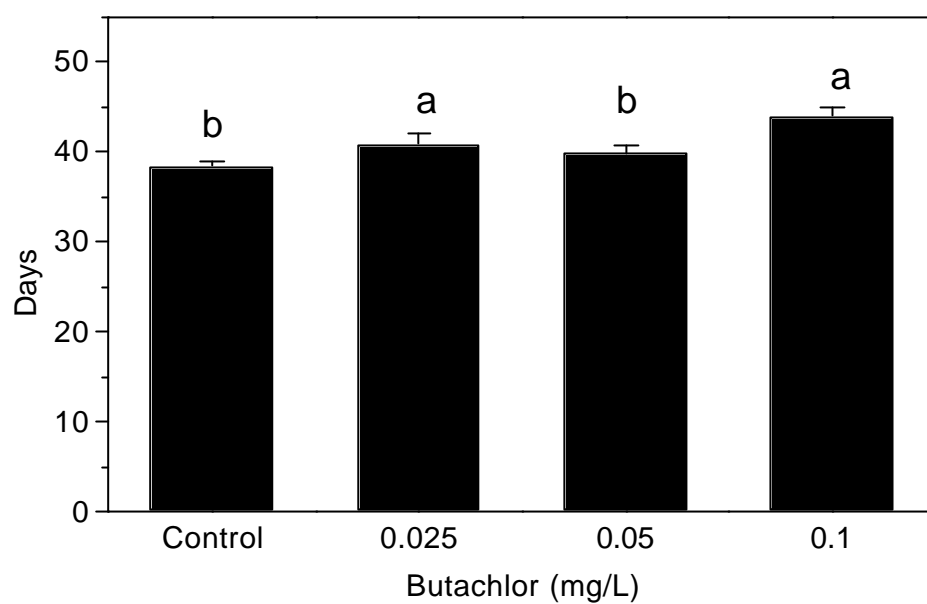


圖 17-蝌蚪在不同濃度丁基拉草處理下的變態率。柱狀圖上的數字代表每組達到變態的個數。變態率以卡方分析檢驗， $\chi^2_5 = 206.81$, $p < 0.0001$ 。

(A)



(B)

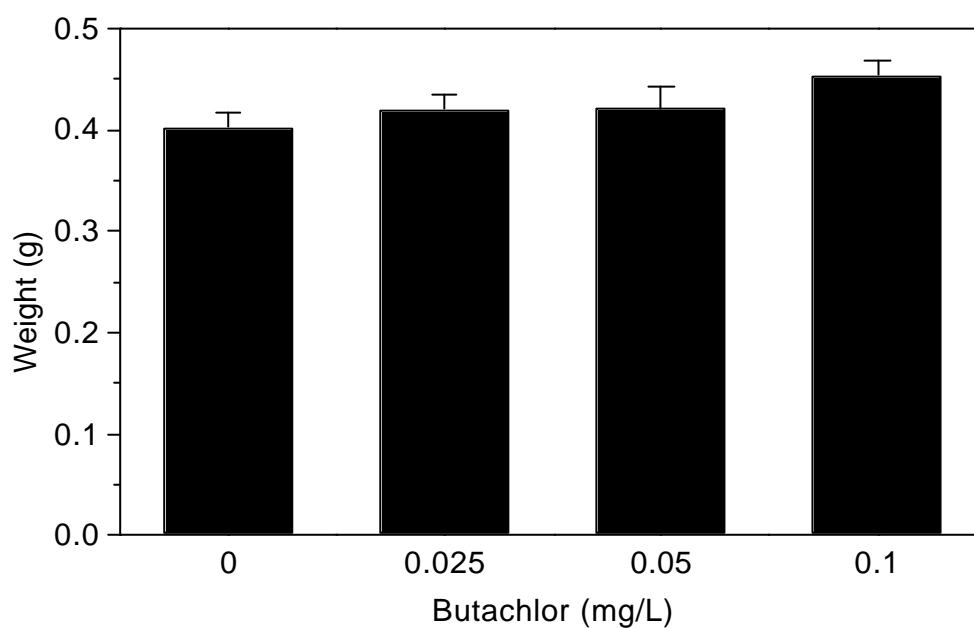


圖 18-蝌蚪在不同濃度丁基拉草處理下達到變態的時間(A)與體重(B)。數值為平均天數 ± 標準誤差，以 ANOVA、Tukey 分析，柱狀圖上不同英文字代表有顯著差異。

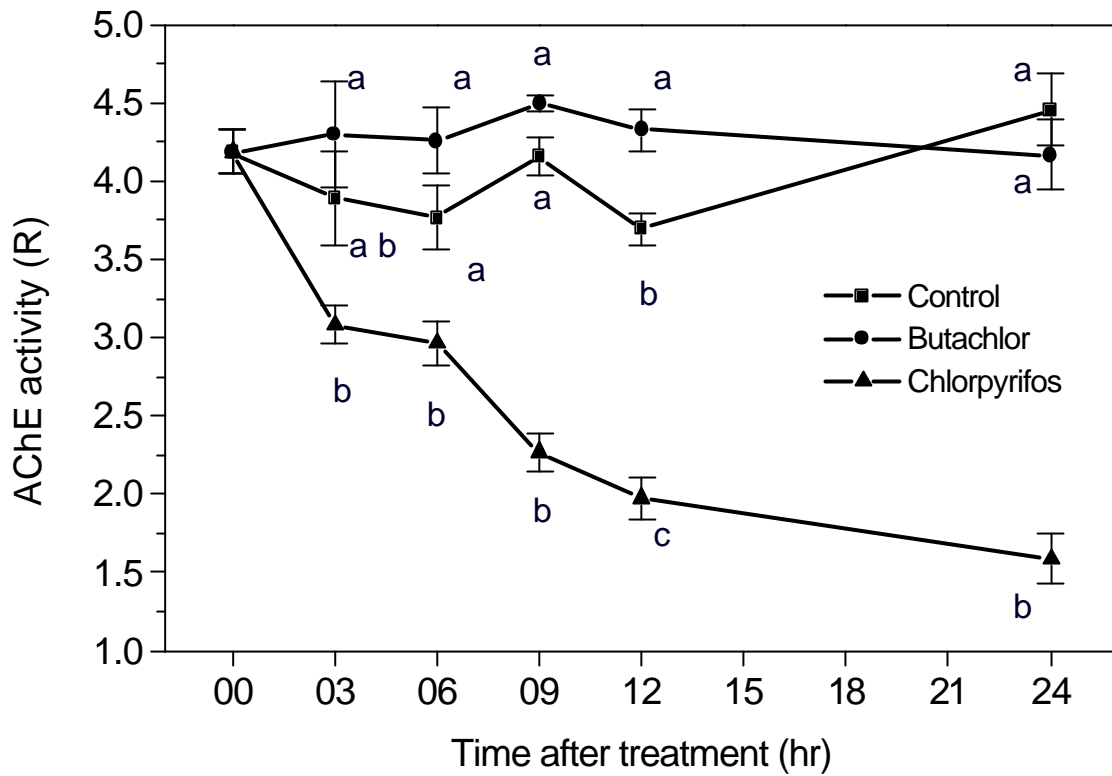


圖 19-蝌蚪處理在控制組、0.8 mg/L 丁基拉草(butachlor)、0.12 mg/L 陶斯松 (chlorpyrifos)處理下，於 24 小時內的乙醯膽鹼酯? 活性變化。數值為平均值 ± 標準誤差，以 ANOVA、Tukey 分析每個時間點的活性，圖上不同的英文字代表有顯著差異。

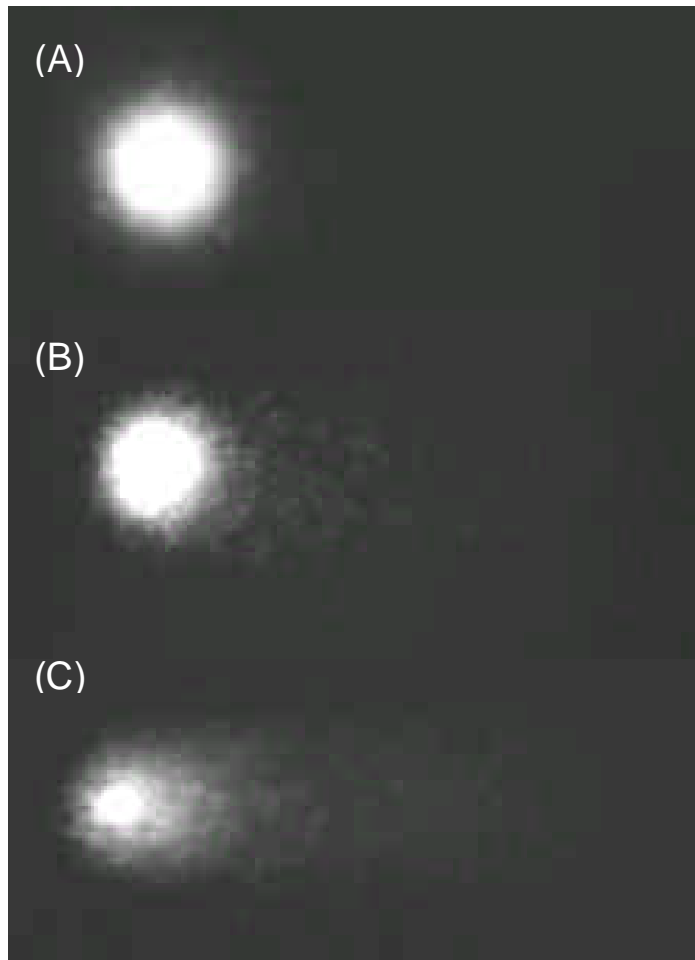


圖 20-彗星試驗結果。(A) 0 mg/L , (B) 0.4 mg/L , (C) 0.8 mg/L。

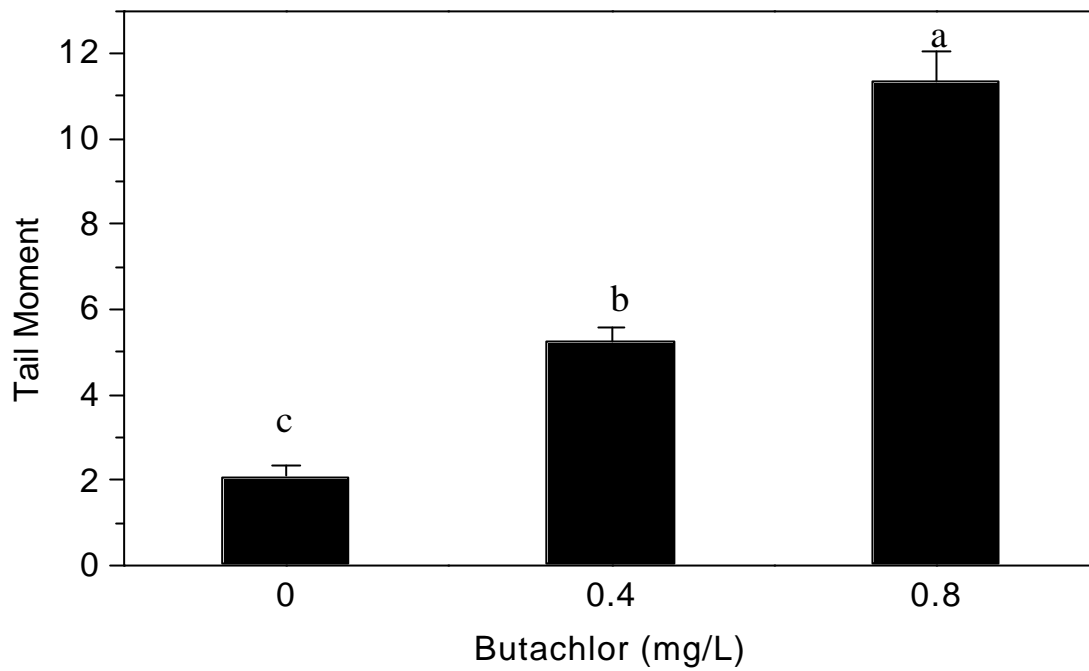


圖 21-蝌蚪處理在不同濃度的丁基拉草下四天的 DNA 損傷情形。數值為平均值 ± 標準誤差，以 ANOVA、Tukey 分析，圖上不同的英文字代表處理組間有顯著差異。



附錄一、HPLC 系統條件

1. 免速隆分析系統

(1) Inject: 10 μ L

(2) Standard: bensulfuron (Du Pont), MW 410.4

(3) Analytical column: LiChrospher 100 RPP-18e (5 μ m); 125*4 mm,
Merck Co., Darmstadt, Germany.

(4) Mobile phase: CH₃OH / H₂O (以磷酸調整 pH 值為 3.1)= 60 / 40 (v/v)

(5) Column temperature: 40

(6) Flow rate: 1.2 mL/min

(7) UV-Detector: 215 nm (L-4000, HITACHI Co. Ltd)

2. 丁基拉草分析系統

(1) Inject: 10 μ L

(2) Standard: butachlor (Sigma-Aldrich) MW 311.8

(3) Analytical column: Nucleosil 100 C18 (7 μ m); 250*4.6 mm;
MACHEREY-NAGEL GmbH & Co.KG P.O.Cox 101352 D-52323
Düren Germany

(4) Mobile phase: CH₃OH / H₂O (以磷酸調整 pH 值為 3.1)= 60 / 40 (v/v)

(5) Column temperature: ambient

(6) Flow rate: 1.5 mL/min

(7) UV-Detector: 254 nm (L-4000, HITACHI Co. Ltd)

附錄二、乙醯膽鹼酯？ 活性檢測藥劑配置

三種溶液：

1. Buffer：phosphate 0.1 M, pH 8.0。以 NaH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 配製成 pH 8.0 的磷酸鹽緩衝液。
2. Substrate：acetylthiocholine iodide 0.075 M (21.67 mg/mL)。保存於黑暗中 4 週，可維持 10~15 天的使用。
3. DTNB reagent：以 39.6 mg 的 dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB) 溶於 10 mL 的 pH 7.0 phosphate buffer，再加入 15 mg 的 sodium bicarbonate (NaHCO_3)，則形成 0.01M 的 DTNB。保存於黑暗中 4 週。

附錄三、彗星試驗藥劑

1. Agarose
 - a. Normal melting agarose (1% NMA) (Amresco)
 - b. Low melting agarose (1% LMA) (Amresco)
2. Phosphate buffered saline (PBS) CaCl₂ and MgCl₂ free (Sigma Chemicals Co. Ltd, Spruce St., USA)
3. Lysis solution
 - a. 10 mM Tris (Merck)
 - b. 100 m Na₂EDTA (Merck)
 - c. 2.5 M NaCl (Merck)
 - d. 1 % (V/V) Triton X-100 (ICN Biomedicals)
4. Electrophoresis solution: pH>13.0
 - a. 1 mM Na₂EDTA (Merck)
 - b. 300 mM NaOH (Merck)
5. Neutralization buffer 0.4 M Tris, pH 7.5 (Merck)
6. Ethidium Bromide (20 µg/ml)

附錄四、彗星試驗步驟概要

