

# 异丙甲草胺、醚菌酯和咪鲜胺锰盐对中华大蟾蜍蝌蚪的急性毒性效应

韦力 雷焕宗 邵伟伟 丁国骅 童美玲 林植华\*

丽水学院生态学院 丽水 323000

**摘要:** 采用静态换水方法研究了异丙甲草胺、醚菌酯和咪鲜胺锰盐 3 种农药对中华大蟾蜍 (*Bufo gargarizans*) 蝌蚪的急性毒性及其联合毒性。结果表明, 在急性毒性和两两联合毒性实验中, 不同浓度农药对蝌蚪的死亡率影响均显著。在 24 h、48 h 及 72 h 急性毒性实验中, 异丙甲草胺对中华大蟾蜍蝌蚪的半致死浓度 ( $LC_{50}$ ) 分别为 29.81、28.81 和 25.83 mg/L, 醚菌酯为 1.72、1.46 和 1.41 mg/L, 咪鲜胺锰盐为 7.43、3.75 和 3.22 mg/L。异丙甲草胺、醚菌酯和咪鲜胺锰盐 3 种农药的安全浓度 (SC) 分别为 8.07、0.32 和 0.29 mg/L。异丙甲草胺为中等毒性农药, 而醚菌酯和咪鲜胺锰盐均为剧毒性农药。在两两联合的毒性实验中, 异丙甲草胺 - 醚菌酯和异丙甲草胺 - 咪鲜胺锰盐均表现为中等毒性, 醚菌酯 - 咪鲜胺锰盐表现为剧毒性。在 24 h、48 h 及 72 h 两两联合毒性实验中, 异丙甲草胺 - 醚菌酯对中华大蟾蜍蝌蚪的半致死浓度 ( $LC_{50}$ ) 分别为 18.41、15.69 和 13.38 mg/L, 异丙甲草胺 - 咪鲜胺锰盐为 15.56、10.45 和 8.11 mg/L, 醚菌酯 - 咪鲜胺锰盐为 4.17、2.84 和 2.00 mg/L, 且其相对应的安全浓度分别为 3.42、1.41 和 0.40 mg/L。在联合毒性评价中, 异丙甲草胺 - 醚菌酯联合组在 24 h 和 48 h 表现为拮抗作用, 醚菌酯 - 咪鲜胺锰盐联合组在 48 h 表现为加和作用, 其余均表现为协同作用。同样, 重复方差分析结果表明, 农药浓度、染毒时间及两者相互作用对蝌蚪的存活率影响均显著。与前期发表数据进行比较, 表明中华大蟾蜍蝌蚪对污染物具有很强的敏感性。这些结果将为无尾类动物的毒理学研究提供科学依据。

**关键词:** 农药; 急性毒性; 联合毒性; 半致死浓度; 安全浓度; 中华大蟾蜍; 无尾类

**中图分类号:** Q494 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2016) 01-45-12

## Acute Lethal Toxic Effects of Metolachlor, Kresoxim-methyl and Prochloraz-manganese Chloride Complex to the Chinese toad (*Bufo gargarizans*) Tadpoles

WEI Li LEI Huan-Zong SHAO Wei-Wei DING Guo-Hua TONG Mei-Ling LIN Zhi-Hua\*

College of Ecology, Lishui University, Lishui 323000, China

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (No. 31270443), 浙江省自然科学基金项目 (No. LY13C030004), 丽水市重点研发计划项目 (No. 20151206);

\* 通讯作者, E-mail: zhlin1015@126.com

**第一作者介绍** 韦力, 男, 讲师; 研究方向: 动物生态学; E-mail: weiliveili2007@163.com。

收稿日期: 2015-05-04, 修回日期: 2015-10-28 DOI: 10.13859/j.cjz.201601006

**Abstract:** Acute and joint toxicity of three pesticides to an anuran species tadpoles was investigated. With the method of stability water tests, we examined the acute toxicity and their pair-wise joint toxicity of metolachlor, kresoxim-methyl and prochloraz-manganese chloride complex to the Chinese toad (*Bufo gargarizans*) tadpoles. Our results showed that the mortality of experimental tadpoles was significantly affected by treatment concentrations of both pesticide alone and their pair-wise combinations (Table 1, Table 3, One-way ANOVA,  $n = 10$ ). Under acute toxicity alone treatments examined at 24 h, 48 h and 72 h, the median lethal concentrations ( $LC_{50}$ ) of metolachlor were 29.81, 28.81 and 25.83 mg/L, respectively; the corresponding values for kresoxim-methyl were 1.72, 1.46 and 1.41 mg/L, and those, for prochloraz-manganese chloride complex were 7.43, 3.75 and 3.22 mg/L, respectively. The safety concentration (SC) of metolachlor, kresoxim-methyl and prochloraz-manganese chloride complex were 8.07, 0.32 and 0.29 mg/L, respectively (Table 2). The metolachlor was moderately toxic, whereas both kresoxim-methyl and prochloraz-manganese chloride complex were highly toxic (Table 2). Under pair-wise joint toxicity treatments, the effects of combinations of metolachlor/kresoxim-methyl and metolachlor/prochloraz-manganese chloride complex were moderately toxic, while the combination of kresoxim-methyl and prochloraz-manganese chloride complex was highly toxic (Table 2). For the joint toxicity examined at 24 h, 48 h and 72 h, the  $LC_{50}$  values of metolachlor/kresoxim-methyl group were 18.41, 15.69 and 13.38 mg/L, respectively, with corresponding values of 15.56, 10.45 and 8.11 mg/L for metolachlor/prochloraz-manganese chloride complex group, and 4.17, 2.84 and 2.00 mg/L for kresoxim-methyl/prochloraz-manganese chloride complex group, respectively (Table 2). The safe concentrations (SC) of metolachlor/kresoxim-methyl, metolachlor/prochloraz-manganese chloride complex and kresoxim-methyl/prochloraz-manganese chloride complex were 3.42, 1.41 and 0.40 mg/L, respectively (Table 2). For toxic evaluations of pair-wise combinations of the three pesticides, the toxic effects of metolachlor/kresoxim-methyl group at 24 h and 48 h showed antagonistic, whiel kresoxim-methyl/prochloraz-manganese chloride complex group at 48 h showed adding effects, and the remain treatments showed synergistic (Table 3). Likewise, the results of repeated measures ANOVA indicated that pesticide concentration, exposure time and their interactions significantly affected the tadpoles survival (Table 5). Combined and compared the data previously published, we found that the tadpoles of *B. gargarizans* were highly sensitive to various pollutants. These results should provide us some valuable scientific references for further investigation of toxicity in anuran species.

**Key words:** Pesticide; Acute toxicity; Joint toxicity; Median lethal concentration; Safety concentration; *Bufo gargarizans*; Anura

当前, 全球的两栖类动物种群数量普遍下降已经引起广泛关注。气候变化, 病原体、细菌、真菌和病毒的传染, 生境恶化, 外来物种入侵以及污染物是引起动物种群下降的潜在原因 (Stuart et al. 2004, Sparling et al. 2009, Hayes et al. 2010, Hof et al. 2011, Huang et al. 2014)。随着工业和农业的快速发展, 大量污染物 (如

重金属和农药) 被排放到自然环境中, 已经成为两栖类动物种群下降的主要原因之一 (Gross et al. 2007, Brunelli et al. 2009, Lou et al. 2013, Zhao et al. 2013)。例如, 农药对两栖类动物造成直接或间接致死 (亚致死作用), 主要包括不正常的生长、发育、免疫和行为异常等现象, 这些情况反过来会改变两栖类的被捕食情况、

竞争能力以及降低繁殖成功率 (Bridges 1999, Boone et al. 2002, Relyea 2005, Zhao et al. 2013)。

无尾两栖类具有水生和陆生2个生活史阶段, 对水体污染物具有很强的敏感性, 这与其水生环境和渗透性的皮肤有关, 并且成为用于监测水质状况的指示物 (Ezemonye et al. 2009, Jayawardena 2011, Takahara et al. 2012, Lavorato et al. 2013)。因此, 水体生境中的污染物被认为是两栖类种群下降的重要原因之一 (Hussain et al. 2012)。许多研究表明, 农药的使用以及重金属的排放是水体的重要污染源, 这直接对水生生物群落产生重要影响。例如, 在经常使用农药的农业区, 两栖类物种丰富度和多样性比其相邻的非农业区要低得多, 甚至在农业区的一些地方直接导致两栖类物种的灭绝 (Bonin et al. 1997)。同样, 农药对无尾类蝌蚪的生长、发育、免疫反应和行为产生影响, 如南方豹蛙 (*Rana sphenoccephala*) (Bridges 2000)、大蟾蜍 (*Bufo bufo*) (Brunelli et al. 2009)、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) (Lou et al. 2013)、捷蛙 (*R. dalmatina*) (Lavorato et al. 2013) 等。此外, 重金属在水体的排放也对水生动物造成了重要影响, 如无脊椎动物哑口仙女虫 (*Nais elinguis*) 对诸如铜、镉、铅、锌等重金属均非常敏感 (Shuhaimi-Othman et al. 2012), 斑马鱼 (*Danio rerio*) 胚胎发育受铜离子抑制 (Johnson et al. 2007), 两栖类中的许多物种受铜、锌、汞、铅、镉等致死毒性或亚致死毒性的影响也非常大, 如雨蛙 (*Hypsiboas pulchellus*) (Natale et al. 2006)、黑斑侧褶蛙 (*Pelophylax nigromaculata*) (Huang et al. 2014)、牛蛙 (*R. catesbeiana*) (李红梅等 2010)。这些研究表明, 虽然水生动物毒性效应随着水体污染物浓度的增大和染毒时间的增长而增大, 但是, 不同物种对同一种污染物的敏感性也表现出一定的种属差异。

中华大蟾蜍 (*B. gargarizans*) 在我国属于广布种, 成体主要栖息于草丛、石下或土洞中,

蝌蚪常结成成群同时游动 (费梁等 2009)。前期的毒理学研究主要有重金属铜、汞对其急性毒性效应 (杨再福 2000, 卢祥云等 2006), 农药孔雀石绿 (杨再福等 2000)、三唑磷和高效唑 (熊艳等 2005)、三氯杀螨醇 (唐超智等 2007) 的致死效应等。这些研究结果已表明, 中华大蟾蜍蝌蚪对污染物具有很强的敏感性。然而, 在我国的大部分农业地区, 农药类型及其使用量逐年增多, 加上农药的使用剂量及频率的增加时间与多数两栖类的繁殖及其幼体生长发育时间一致。因此, 两栖类是毒理学的理想材料。但是, 污染物对水体生境及物种的综合影响机制仍然缺乏。

异丙甲草胺 (*metolachlor*) 是一种酰胺类杂草防除剂, 因其具有广谱、高效、选择性强等特点, 当前广泛应用于数十种作物田的杂草防除, 该农药在使用过程中可能会对非靶标生物造成影响或危害 (张璇等 2015), 相关研究表明, 水生动物对异丙甲草胺的敏感度高于哺乳动物 (李丽等 2000, Liu et al. 2006, 徐冬梅等 2009, 周明等 2009)。醚菌酯 (*kresoxim-methyl*) 是一种高效、广谱、新型杀菌剂, 其对由半知菌、子囊菌、担子菌、卵菌纲真菌等引起的多种病害具有很好的抗性, 对人畜和环境相对安全 (常津毓等 2015), 但很少用于动物毒性方面的研究。咪鲜胺锰盐 (*prochloraz-manganese chloride complex*) 也是一种咪唑类广谱性杀菌剂, 在环境中可快速分解为咪鲜胺及其代谢产物, 相关研究主要报道了田水及土壤中咪鲜胺锰盐的残留量, 以及咪鲜胺锰盐在田水和土壤中的消解动态 (王珏等 2014), 而水生动物方面的研究报道仍然缺乏。因此, 本文旨在研究异丙甲草胺、醚菌酯和咪鲜胺锰盐 3 种农药对中华大蟾蜍蝌蚪的急性毒性及其联合毒性作用, 为今后合理利用药物提供一定的理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验蝌蚪采集

中华大蟾蜍蝌蚪采自浙江省丽水学院校园内池塘。实验前,挑选出大小相近(体长 1.90 ~ 2.20 cm, 体重 0.065 ~ 0.095 g)、健康活泼的个体作为实验材料。

## 1.2 实验农药

异丙甲草胺(有效成分含量720 g/L)为济南科赛基农化工有限公司生产。醚菌酯(有效成分含量50%)为凯试(上海)科技有限公司生产。咪鲜胺锰盐(有效成分含量50%)为江苏辉丰农业化股份有限公司生产。实验用水为曝气2 d以上的自来水, pH 6.8。

## 1.3 实验设计

**1.3.1 预实验** 首先,随机选取3~5个间隔较大的浓度梯度范围进行预实验,与此同时,设不加毒物的空白对照,统计在24 h、48 h和72 h后每组实验蝌蚪的死亡率,求出100%死亡的最低浓度(LC<sub>100</sub>)与无死亡的最高浓度(LC<sub>0</sub>),作为下一步实验的范围(Wei et al. 2014)。

**1.3.2 急性毒性实验** 参照预实验的结果,将异丙甲草胺、醚菌酯、咪鲜胺锰盐分别按0.060 mg/L、0.048 mg/L和0.165 mg/L的等对数间距(即浓度对数呈等差数列)设置6个实验浓度组(陈娜等 2007),其中异丙甲草胺的浓度梯度分别为10、23、26、30、35和40 mg/L,醚菌酯的浓度梯度分别为1.1、1.2、1.4、1.5、1.7和1.9 mg/L,咪鲜胺锰盐的浓度梯度分别为1.5、2.2、3.2、4.7、6.9和10.0 mg/L,同时另设一个空白对照组,每组浓度梯度设2个平行组。实验使用容积为1 L的塑料圆盒,各组实验药水为800 ml,每个盒子放10尾实验蝌蚪,整个实验期间在室温下进行。在毒性实验期间,不投喂。分别记录24 h、48 h和72 h中华大蟾蜍蝌蚪的死亡数,并及时清出死亡个体。判断蝌蚪死亡的标准是用镊子轻夹蝌蚪的尾部,若无反应,即认为蝌蚪已死亡(Mgbaeruhu 2002)。

**1.3.3 联合毒性实验** 在急性实验基础上,按照毒性1:1两两组合,进行3组联合毒性实验,每组也按浓度常用对数呈等差数列设定6个浓度梯度。分别为异丙甲草胺-醚菌酯 10

(9.48/0.52)、11.4(10.81/0.59)、12.9(12.24/0.66)、14.7(13.94/0.76)、16.7(15.84/0.86)和19(18.02/0.98) mg/L;异丙甲草胺-咪鲜胺锰盐 5(4.12/0.88)、6.5(5.36/1.14)、8.3(6.83/1.47)、10.8(8.91/1.89)、13.9(11.46/2.44)和17.9(14.76/3.14) mg/L;醚菌酯-咪鲜胺锰盐 1.4(0.29/1.11)、1.7(0.35/1.35)、2.1(0.43/1.67)、2.6(0.53/2.07)、3.2(0.65/2.55)和4.0(0.82/3.18) mg/L。每组另设一个空白对照组,每个浓度梯度设置2个平行组,每组放10尾实验蝌蚪。与急性毒性实验一样,分别观察和统计24 h、48 h和72 h后蝌蚪的死亡数。

## 1.4 数据处理

**1.4.1 不同农药浓度、染毒时间对蝌蚪死亡率影响** 对于每一种农药类型(单一和联合)的不同浓度在不同染毒时间对蝌蚪死亡率的影响,分别采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和Tukey多重比较对相关数据进行统计。为进一步确定每种农药在不同浓度、不同染毒时间以及两者的交互作用对蝌蚪死亡率的影响,采用重复方差分析(repeated measures ANOVA)。用STATISTICA 6.0软件进行统计,数据均以平均值(Mean)表示,显著性水平设为 $\alpha = 0.05$ 。

**1.4.2 半致死浓度和安全浓度** 先参照几率单位法求得各农药对中华大蟾蜍蝌蚪的24 h、48 h和72 h半致死浓度LC<sub>50</sub>(陈娜等 2007)。然后采用经典公式(48 h LC<sub>50</sub> × 0.3) / (24 h LC<sub>50</sub> / 48 h LC<sub>50</sub>)<sup>2</sup>计算安全浓度(张云龙等 2011)。最后,根据国家环境保护局对化学农药环境安全评价实验准则,将农药对蝌蚪的毒性划分为3个等级:半致死浓度LC<sub>50</sub> > 10.0 mg/L为低毒,1.0 ~ 10.0 mg/L为中等毒性,< 1.0 mg/L为剧毒(周永欣等 1989)。

**1.4.3 联合毒性评价** 采用水生毒理联合效应Marking相加指数法进行农药联合毒性的评价。其评价公式为 $S = (A_m/A_1) + (B_m/B_1)$ ,其中,S表示联合农药的毒力,A、B分别为实验

农药,  $A_i$  指农药 A 单独进行实验时的半致死浓度 ( $LC_{50}$ ),  $A_m$  指联合后农药 A 的半致死浓度 ( $LC_{50}$ ); 同理,  $B_i$  和  $B_m$  分别指农药 B 单独进行实验和联合后农药 B 的半致死浓度 ( $LC_{50}$ )。用  $AI$  评价农药的联合毒性, 当  $S \leq 1$  时,  $AI = (1/S) - 1$ ; 当  $S > 1$  时,  $AI = -S + 1$ 。若  $AI > 0$  时为协同作用,  $AI < 0$  时为拮抗作用,  $AI = 0$  时为加和作用 (张云龙等 2011)。

## 2 结果与分析

### 2.1 急性毒性

3 种农药分别单独进行急性毒性实验时, 蝌蚪死亡率均随着农药实验浓度的增加而增大, 且在相同染毒时间内, 不同浓度实验组之间的死亡率差异显著 (均  $P < 0.001$ , 表 1)。异丙甲草胺、醚菌酯和咪鲜胺锰盐的半致死浓度 ( $LC_{50}$ ) 均随染毒时间的增加而减小 (表 2)。

表 1 三种农药单独对中华大蟾蜍蝌蚪急性毒性实验结果 ( $n = 10$ )

Table 1 The effects of acute toxicity of three pesticides alone on mortality of Chinese toad tadpoles

	浓度 (mg/L) Concentration	死亡率 Mortality (%)		
		24 h	48 h	72 h
异丙甲草胺 Metolachlor	0.0	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>
	10.0	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>
	23.0	5 <sup>d</sup>	10 <sup>d</sup>	25 <sup>c</sup>
	26.0	15 <sup>d</sup>	25 <sup>c</sup>	45 <sup>b</sup>
	30.0	40 <sup>c</sup>	65 <sup>b</sup>	85 <sup>a</sup>
	35.0	65 <sup>b</sup>	90 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
	40.0	100 <sup>a</sup>		
One-way ANOVA		$F_{6,13} = 137.556^{**}$	$F_{5,11} = 257.500^{**}$	$F_{5,11} = 144.600^{**}$
醚菌酯 Kresoxim-methyl	0.0	0 <sup>d</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>d</sup>
	1.1	0 <sup>d</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>d</sup>
	1.2	0 <sup>d</sup>	10 <sup>de</sup>	15 <sup>c</sup>
	1.4	10 <sup>cd</sup>	20 <sup>d</sup>	30 <sup>b</sup>
	1.5	25 <sup>c</sup>	65 <sup>c</sup>	80 <sup>a</sup>
	1.7	45 <sup>b</sup>	80 <sup>b</sup>	95 <sup>a</sup>
	1.9	75 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	
One-way ANOVA		$F_{6,13} = 76.889^{**}$	$F_{6,13} = 481.667^{**}$	$F_{5,11} = 314.760^{**}$
咪鲜胺锰盐 Prochloraz-manganese chloride complex	0.0	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>
	1.5	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>
	2.2	0 <sup>d</sup>	25 <sup>cd</sup>	35 <sup>c</sup>
	3.2	10 <sup>d</sup>	40 <sup>bc</sup>	45 <sup>c</sup>
	4.7	25 <sup>c</sup>	60 <sup>b</sup>	65 <sup>b</sup>
	6.9	55 <sup>b</sup>	95 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
	10.0	70 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	
One-way ANOVA		$F_{6,13} = 116.500^{**}$	$F_{6,13} = 79.500^{**}$	$F_{5,11} = 119.533^{**}$

\*\* 表示同列不同浓度之间的蝌蚪死亡率比较, 差异显著  $P < 0.001$ ; 上标有不同字母表示蝌蚪死亡率比较差异显著 (Tukey's test,  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b > c > d > e$ )。

\*\* within the same rows indicated significant differences at  $P < 0.001$  in tadpole mortalities among different concentration; different superscripts indicated significant difference in tadpole mortalities among different treatments. (Tukey's test,  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b > c > d > e$ ).

表 2 三种农药及其联合的半致死浓度和安全浓度

Table 2 The half lethal concentrations (LC<sub>50</sub>) and safe concentrations (SC) of the three pesticides and their pairwise combinations

农药 Pesticide	染毒时间(h) Exposure time	拟合方程 Simulation equation	相关系数 (R <sup>2</sup> ) Correlation coefficient	半致死浓度 LC <sub>50</sub> (mg/L) Half lethal concentration	安全浓度 SC (mg/L) Safe concentration
异丙甲草胺 Metolachlor	24	$Y = 0.280x - 3.346$	0.869 <sup>*</sup>	29.81	
	48	$Y = 0.218x - 1.280$	0.994 <sup>*</sup>	28.81	8.07
	72	$Y = 0.367x - 4.480$	0.953 <sup>*</sup>	25.83	
醚菌酯 Kresoxim-methyl	24	$Y = 3.720x - 1.397$	0.985 <sup>*</sup>	1.72	
	48	$Y = 6.890x - 5.046$	0.898 <sup>*</sup>	1.46	0.32
	72	$Y = 5.683x - 3.008$	0.922 <sup>*</sup>	1.41	
咪鲜胺锰盐 Prochloraz-manganese chloride complex	24	$Y = 0.265x + 3.031$	0.937 <sup>*</sup>	7.43	
	48	$Y = 0.567x + 2.874$	0.986 <sup>*</sup>	3.75	0.29
	72	$Y = 0.874x + 2.184$	0.877	3.22	
异丙甲草胺 - 醚菌酯 Metolachlor - Kresoxim-methyl	24	$Y = 0.224x + 0.820$	0.989 <sup>*</sup>	18.41	
	48	$Y = 0.357x - 0.600$	0.993 <sup>*</sup>	15.69	3.42
	72	$Y = 0.551x - 2.375$	0.907 <sup>*</sup>	13.38	
异丙甲草胺 - 咪鲜胺锰盐 Metolachlor - Prochloraz-manganese chloride complex	24	$Y = 0.189x + 2.060$	0.992 <sup>*</sup>	15.56	
	48	$Y = 0.229x + 2.606$	0.991 <sup>*</sup>	10.45	1.41
	72	$Y = 0.353x + 2.137$	0.974 <sup>*</sup>	8.11	
醚菌酯 - 咪鲜胺锰盐 Kresoxim-methyl - Prochloraz-manganese chloride complex	24	$Y = 0.647x + 2.303$	0.950 <sup>*</sup>	4.17	
	48	$Y = 1.277x + 1.367$	0.979 <sup>*</sup>	2.84	0.40
	72	$Y = 1.606x + 1.792$	0.908 <sup>*</sup>	2.00	

Y 为因变量 (死亡几率), x 为自变量 (农药浓度, mg/L)。

Y. Dependent variable (death probability), x. Independent variable (pesticide concentration).

异丙甲草胺、醚菌酯和咪鲜胺锰盐 3 种农药的安全浓度 (SC) 分别为 8.07、0.32 和 0.29 mg/L (表 2)。根据农药对水生生物的毒性等级的划分可知, 异丙甲草胺为中等毒性农药, 醚菌酯和咪鲜胺锰盐为剧毒性农药 (表 2)。

## 2.2 联合毒性

异丙甲草胺、醚菌酯和咪鲜胺锰盐的两两联合毒性结果见表 3。与急性毒性实验一样, 蝌蚪死亡率在联合毒性实验中也与农药浓度呈正相关, 并随染毒时间的增加而增加。农药联合后的半致死浓度 LC<sub>50</sub> 也均随染毒时间的增加而减小 (表 3)。异丙甲草胺 - 醚菌酯联合时表现为中等毒性; 异丙甲草胺 - 咪鲜胺锰盐联合时表现为中等毒性; 醚菌酯 - 咪鲜胺锰盐联

合时表现为剧毒性 (表 2)。根据 Marking 的相加指数法对农药联合毒性评价结果得知, 异丙甲草胺 - 醚菌酯联合实验组在 24 h 和 48 h 表现为拮抗作用, 醚菌酯 - 咪鲜胺锰盐联合实验组在 48 h 时表现为加和作用, 其余均表现为协同作用 (表 4)。

## 2.3 农药浓度、染毒时间及其交互作用

重复方差分析 (repeated measures ANOVA) 结果表明, 在所有 6 个实验组中, 农药浓度、染毒时间以及两者的交互作用对中华大蟾蜍蝌蚪死亡率影响均显著 (表 5)。

## 3 讨论

本研究中, 在所有的对照组中没有发现蝌

表3 三种农药两两组合对中华大蟾蜍蝌蚪联合毒性实验结果 ( $n = 10$ )

Table 3 The effects of pair-wise combinations of three pesticides on mortality of Chinese toad tadpoles

农药浓度 Pesticide concentration (mg/L)	死亡率 Mortality (%)		
	24 h	48 h	72 h
异丙甲草胺 - 醚菌酯 Metolachlor - Kresoxim-methyl			
0.0	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>
10.0 (9.48/0.52)	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>
11.4 (10.81/0.59)	0 <sup>d</sup>	5 <sup>d</sup>	20 <sup>cd</sup>
12.9 (12.24/0.66)	10 <sup>cd</sup>	15 <sup>d</sup>	45 <sup>bc</sup>
14.7 (13.94/0.76)	20 <sup>bc</sup>	35 <sup>c</sup>	70 <sup>ab</sup>
16.7 (15.84/0.86)	30 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>	85 <sup>a</sup>
19.0 (18.02/0.98)	55 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
One-way ANOVA	$F_{6,13} = 118.333^{**}$	$F_{6,13} = 111.556^{**}$	$F_{6,13} = 41.091^{**}$
异丙甲草胺 - 咪鲜胺锰盐 Metolachlor - Prochloraz-manganese chloride complex			
0.0	0 <sup>d</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
5.0 (4.12/0.88)	0 <sup>d</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
6.5 (5.36/1.14)	0 <sup>d</sup>	15 <sup>c</sup>	30 <sup>bc</sup>
8.3 (6.83/1.47)	5 <sup>d</sup>	35 <sup>bc</sup>	60 <sup>ab</sup>
10.8 (8.91/1.89)	20 <sup>c</sup>	55 <sup>abc</sup>	80 <sup>a</sup>
13.9 (11.46/2.44)	40 <sup>b</sup>	80 <sup>ab</sup>	95 <sup>a</sup>
17.9 (14.76/3.14)	65 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
One-way ANOVA	$F_{6,13} = 89.500^{**}$	$F_{6,13} = 12.688^{**}$	$F_{6,13} = 24.206^{**}$
醚菌酯 - 咪鲜胺锰盐 Kresoxim-methyl - Prochloraz-manganese chloride complex			
0.0	0 <sup>c</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>
1.4 (0.29/1.11)	0 <sup>c</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>
1.7 (0.35/1.35)	0 <sup>c</sup>	10 <sup>cd</sup>	40 <sup>c</sup>
2.1 (0.43/1.67)	5 <sup>c</sup>	15 <sup>cd</sup>	65 <sup>bc</sup>
2.6 (0.53/2.07)	20 <sup>bc</sup>	35 <sup>bc</sup>	75 <sup>ab</sup>
3.2 (0.65/2.55)	25 <sup>b</sup>	60 <sup>b</sup>	90 <sup>ab</sup>
4.0 (0.82/3.18)	45 <sup>a</sup>	95 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
One-way ANOVA	$F_{6,13} = 27.778^{**}$	$F_{6,13} = 50.476^{**}$	$F_{6,13} = 77.722^{**}$

\*\* 表示同列不同浓度之间的蝌蚪死亡率比较, 差异显著  $P < 0.001$ , 上标有不同字母表示蝌蚪死亡率比较差异显著 (Tukey's test,  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b > c > d$ )。

\*\* indicated comparisons of tadpole mortalities among different concentrations within the same rows with significant differences at  $P < 0.001$ , types with different superscripts indicated comparisons of tadpole mortalities among different treatments differ significantly (Tukey's test,  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b > c > d$ ).

蚪死亡记录, 而 3 种农药的不同浓度实验组蝌蚪均出现不同程度的死亡情况, 该结果表明, 农药是造成实验蝌蚪死亡的直接原因, 这与其他农药对无尾两栖类蝌蚪的毒性研究结果一

致, 如阿特拉津对北方豹蛙 (*R. pipiens*) 蝌蚪 (Allran et al. 2000) 和美洲蟾蜍 (*B. americanus*) 蝌蚪 (Berrill et al. 1994), 以及硫丹对大蟾蜍蝌蚪的毒性效应 (Bernabò et al.

表 4 三种农药两两联合后的联合毒性评价

Table 4 The toxicity evaluations of pairwise combinations of three pesticides

农药 Pesticides	染毒时间 (h) Exposure time	$A_m/B_m$ (mg/L)	联合农药的毒力 (S) Mixed pesticide toxicity	联合毒性 (AI) Joint toxicity	毒性评价 Toxicity evaluation
异丙甲草胺 - 醚菌酯 Metolachlor - Kresoxim-methyl	24	17.65/0.96	1.18	- 0.18	拮抗作用 Antagonistic
	48	14.89/0.81	1.07	- 0.07	拮抗作用 Antagonistic
	72	12.70/0.70	0.99	0.01	协同作用 Synergistic
异丙甲草胺 - 咪鲜胺锰盐 Metolachlor - Prochloraz-manganese chloride complex	24	12.83/2.73	0.80	0.25	协同作用 Synergistic
	48	8.60/1.83	0.79	0.27	协同作用 Synergistic
	72	6.68/1.43	0.70	0.43	协同作用 Synergistic
醚菌酯 - 咪鲜胺锰盐 Kresoxim-methyl - Prochloraz-manganese chloride complex	24	0.85/3.32	0.94	0.06	协同作用 Synergistic
	48	0.58/2.26	1.00	0.00	加和作用 Adding effects
	72	0.41/1.59	0.88	0.14	协同作用 Synergistic

$A_m$  指联合后农药 A 的  $LC_{50}$ ;  $B_m$  指联合后农药 B 的  $LC_{50}$ 。

$A_m$ , The  $LC_{50}$  values of pesticide A after the two pesticides mixed;  $B_m$ , The  $LC_{50}$  values of pesticide B after the two pesticides mixed.

表 5 农药浓度、染毒时间及农药浓度与染毒时间的交互作用对蝌蚪死亡率的影响

Table 5 The effects of pesticide concentration, exposure time and their interactions on mortality of *Bufo gargarizans* tadpoles

农药 Pesticide	农药浓度 Concentration	染毒时间 Exposure time	农药浓度 × 染毒时间 Concentration × Exposure time
异丙甲草胺 Metolachlor	$F_{6,7} = 306.071^{**}$ I <sup>f</sup> , II <sup>f</sup> , III <sup>e</sup> , IV <sup>d</sup> , V <sup>c</sup> , VI <sup>b</sup> , VII <sup>a</sup>	$F_{2,14} = 101.400^{**}$ 24 h <sup>c</sup> , 48 h <sup>b</sup> , 72 h <sup>a</sup>	$F_{12,14} = 16.000^{**}$
醚菌酯 Kresoxim-methyl	$F_{6,7} = 837.078^{**}$ I <sup>f</sup> , II <sup>f</sup> , III <sup>e</sup> , IV <sup>d</sup> , V <sup>c</sup> , VI <sup>b</sup> , VII <sup>a</sup>	$F_{2,14} = 148.217^{**}$ 24 h <sup>c</sup> , 48 h <sup>b</sup> , 72 h <sup>a</sup>	$F_{12,14} = 18.667^{**}$
咪鲜胺锰盐 Prochloraz-manganese chloride complex	$F_{6,7} = 162.873^{**}$ I <sup>d</sup> , II <sup>d</sup> , III <sup>c</sup> , IV <sup>c</sup> , V <sup>b</sup> , VI <sup>a</sup> , VII <sup>a</sup>	$F_{2,14} = 201.500^{**}$ 24 h <sup>b</sup> , 48 h <sup>a</sup> , 72 h <sup>a</sup>	$F_{12,14} = 14.639^{**}$
异丙甲草胺/醚菌酯 Metolachlor/Kresoxim-methyl	$F_{6,7} = 223.333^{**}$ I <sup>e</sup> , II <sup>e</sup> , III <sup>e</sup> , IV <sup>d</sup> , V <sup>c</sup> , VI <sup>b</sup> , VII <sup>a</sup>	$F_{2,14} = 78.353^{**}$ 24 h <sup>c</sup> , 48 h <sup>b</sup> , 72 h <sup>a</sup>	$F_{12,14} = 7.598^{**}$
异丙甲草胺/咪鲜胺锰盐 Metolachlor/Prochloraz-manganese chloride complex	$F_{6,7} = 37.848^{**}$ I <sup>e</sup> , II <sup>e</sup> , III <sup>de</sup> , IV <sup>cd</sup> , V <sup>bc</sup> , VI <sup>ab</sup> , VII <sup>a</sup>	$F_{2,14} = 39.512^{**}$ 24 h <sup>c</sup> , 48 h <sup>b</sup> , 72 h <sup>a</sup>	$F_{12,14} = 3.372^*$
醚菌酯/咪鲜胺锰盐 Kresoxim-methyl/Prochloraz-manganese chloride complex	$F_{6,7} = 87.577^{**}$ I <sup>e</sup> , II <sup>e</sup> , III <sup>de</sup> , IV <sup>cd</sup> , V <sup>bc</sup> , VI <sup>b</sup> , VII <sup>a</sup>	$F_{2,14} = 207.364^{**}$ 24 h <sup>c</sup> , 48 h <sup>b</sup> , 72 h <sup>a</sup>	$F_{12,14} = 19.636^{**}$

\*\*和\*分别表示实验因子对蝌蚪死亡率影响显著,  $P < 0.001$  和  $P < 0.05$ 。F 值为 F 检验的统计量。I、II、III、IV、V、VI (转下页)



(接上页)和Ⅶ分别表示各农药的7种不同实验浓度;24 h、48 h和72 h分别表示蝌蚪的3种不同染毒时间。上标有不同字母表示实验因子对蝌蚪死亡率影响显著(Tukey's test,  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b > c > d > e > f$ )。

\*\* and \* indicated that the tadpole mortalities were significantly affected by experimental factors with significant differences at  $P < 0.001$  and  $P < 0.05$ , respectively. *F* values indicated *F*-statistic analysis. I, II, III, IV, V, VI and VII indicated 7 different experimental concentrations of each pesticide type (see details in Table 1 and Table 3). 24 h, 48 h and 72 h indicated 3 different exposure time points to experimental tadpoles. Types with different superscripts indicated that the tadpole mortalities affected by experimental factors differ significantly (Tukey's test,  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b > c > d > e > f$ ).

表 6 不同污染物对中华大蟾蜍蝌蚪半致死浓度的比较

Table 6 Comparisons of LC<sub>50</sub> values of *Bufo gargarizans* tadpoles tested with different pollutants

污染物 Pollutant	体长 (cm) Body length	体重 (g) Body mass	结果 Results	文献 Reference
Cu <sup>2+</sup>	1.38	0.024	24 h 和 48 h 的 LC <sub>50</sub> 分别为 1.310 和 0.862 mg/L The LC <sub>50</sub> values of Cu <sup>2+</sup> examined in 24 h and 48 h were 1.310 and 0.862 mg/L, respectively	卢祥云等 2006
Hg <sup>2+</sup>	1.38	0.024	24 h 和 48 h 的 LC <sub>50</sub> 分别为 0.712 和 0.612 mg/L The LC <sub>50</sub> values of Hg <sup>2+</sup> examined in 24 h and 48 h were 0.712 and 0.612 mg/L, respectively	
Cu <sup>2+</sup>		0.8	24 h、48 h 和 96 h 的 LC <sub>50</sub> 分别为 0.526 8、0.351 2 和 0.262 1 mg/L The LC <sub>50</sub> values of Cu <sup>2+</sup> examined in 24 h, 48 h and 96 h were 0.526 8, 0.351 2 and 0.262 1 mg/L, respectively	杨再福 2000
孔雀石绿 Malachite green		0.8	24 h、48 h 和 96 h 的 LC <sub>50</sub> 分别为 0.195、0.164 和 0.149 mg/L The LC <sub>50</sub> values of malachite green examined in 24 h, 48 h and 96 h were 0.195, 0.164 and 0.149 mg/L, respectively	杨再福等 2000
三唑磷 Trazophos	3.01	0.228	24 h、48 h、72 h 和 96 h 的 LC <sub>50</sub> 分别为 5.57、5.09、5.09 和 5.09 mg/L The LC <sub>50</sub> values of trazophos examined in 24 h, 48 h, 72 h and 96 h were 5.57, 5.09, 5.09 和 5.09 mg/L, respectively	熊艳等 2005
多效唑 Pacloutrazol	3.01	0.228	24 h、48 h 和 72 h 的 LC <sub>50</sub> 分别为 60.12、40.50 和 34.32 mg/L The LC <sub>50</sub> values of pacloutrazol examined in 24 h, 48 h and 72 h were 60.12, 40.50 and 34.32 mg/L, respectively	
三氯杀螨醇 Dicofol			15℃和20℃条件下,其48 h的LC <sub>50</sub> 分别为13.24和9.85 mg/L The LC <sub>50</sub> values of dicofol examined in 48 h were 13.24 and 9.85 mg/L under 15℃ and 20℃ conditions, respectively	唐超智等 2007
醚菌酯 Kresoxim-methyl	1.55	0.08	当 pH 5.0 时,蝌蚪在 24 h、48 h 和 72 h 的 LC <sub>50</sub> 分别为 1.85 mg/L、1.47 mg/L 和 1.42 mg/L; pH 7.0 时,蝌蚪在 24 h、48 h 和 72 h 的 LC <sub>50</sub> 分别为 2.15 mg/L、2.04 mg/L 和 1.94 mg/L The LC <sub>50</sub> values of Kresoxim-methyl examined in 24 h, 48 h and 72h were 1.85, 1.47 and 1.42 mg/L under pH = 5.0 conditions, with corresponding those of 2.15, 2.04 and 1.94 mg/L under pH = 7.0 conditions	雷焕宗等 2014

续表 6

污染物 Pollutant	体长 (cm) Body length	体重 (g) Body mass	结果 Results	文献 Reference
世清-苯醚甲环唑 Difenoconazole	1.55	0.08	当 pH 5.0 时, 蝌蚪在 24 h、48 h 和 72 h 的 LC <sub>50</sub> 分别为 52.69、29.06 和 27.06 mg/L; pH 7.0 时, 蝌蚪在 24 h、48 h 和 72 h 的 LC <sub>50</sub> 分别为 56.06、26.86 和 19.47 mg/L The LC <sub>50</sub> values of difenoconazole examined in 24 h, 48 h and 72 h were 52.69, 29.06 and 27.06 mg/L under pH = 5.0 conditions, with corresponding those of 56.06, 26.86 and 19.47 mg/L under pH = 7.0 conditions	
锐高 Ruigao	3.68	0.83	24 h、48 h 及 72 h 的 LC <sub>50</sub> 分别为 37.279、35.515 和 35.006 mg/L The LC <sub>50</sub> values of ruigao examined in 24 h, 48 h and 72 h were 37.279, 35.515 and 35.006 mg/L	张燕萍等 2010
飞网 Feiwang	3.68	0.83	24 h、48 h 及 72 h 的 LC <sub>50</sub> 分别为 64.423、62.781 和 62.301 mg/L The LC <sub>50</sub> values of feiwang examined in 24 h, 48 h and 72 h were 64.423, 62.781 and 62.301 mg/L	

2008) 相似。本研究结果也明显地说明, 异丙甲草胺、醚菌酯和咪鲜胺锰盐 3 种农药对中华大蟾蜍蝌蚪存活率的影响差异很大。3 种农药对实验蝌蚪的毒性表现为咪鲜胺锰盐 > 醚菌酯 > 异丙甲草胺 (表 2)。对于每种农药, 实验浓度越大, 蝌蚪死亡率就越大, 进一步说明蝌蚪剂量依赖性存活和浓度等级致死 (Ezemonye et al. 2009)。

本研究中, 异丙甲草胺、醚菌酯和咪鲜胺锰盐在 24 h、48 h 和 72 h 的半致死浓度与前期的研究结果相比较, 不同农药污染物对中华大蟾蜍蝌蚪的毒性效应均有所不同 (表 6), 其原因可能是每个研究的实验方法诸如实验蝌蚪的大小、体重和实验用水 (pH、水温) 以及农药毒性大小等不同造成的。此外, 在卢祥云等 (2006) 和杨再福 (2000) 的毒性实验中, 发现不同大小蝌蚪受铜离子的毒性影响也不同 (表 6)。这些研究结果表明, 不同农药污染物在蝌蚪体内的积累程度与其对蝌蚪的毒性作用机制有关 (Harris et al. 2000)。

研究表明, 不同农药和重金属对两栖类蝌蚪的联合毒性一般表现为协同作用, 如卢祥云等 (2006) 在铜离子和汞离子、郭正元等 (2005) 在异恶草酮与镉、念宇等 (2009) 在三唑磷、敌百虫和吡虫啉对泽蛙 (*Rana limnocharis*) 的

联合毒性以及张燕萍等 (2010) 在杀虫剂锐高和飞网对中华大蟾蜍蝌蚪的联合毒性实验中均得到相同的结果。在本文的 3 种农药两两联合毒性实验中, 在同一染毒时间内, 每种组合的不同浓度实验组的死亡率比较均表现出显著性差异。同时, 它们在 24 h、48 h、72 h 的半致死浓度 LC<sub>50</sub> 均比其单一的急性毒性实验的半致死浓度要低。在联合毒性评价中, 发现异丙甲草胺 - 醚菌酯联合组在 24 h 和 48 h 表现为拮抗作用, 醚菌酯 - 咪鲜胺锰盐联合实验组在 48 h 时表现为加和作用, 其余均表现为协同作用, 这与贾秀英等 (2005) 在铜、锌和三唑磷对泽蛙蝌蚪的联合毒性研究, 以及我们前期在康宽、稻腾和稻杰对虎纹蛙 (*Hoplobatrachus chinensis*) 蝌蚪的联合毒性研究结果相似 (Wei et al. 2014), 其原因可能是实验蝌蚪在面对不同农药的联合毒性作用时, 响应机制可能较为复杂, 也可能与物种及发育历期, 农药染毒的持续时间及强度有关 (Berrill et al. 1993)。可见, 若农田或水体被其中任两种农药污染时, 都可对栖息于此的蝌蚪繁殖和生长产生危害。因此, 科学合理地控制各种农药进入水体的途径及水体中农药浓度限量, 为两栖动物提供安全的生存环境, 对于维持生态平衡和环境保护具有极为重要的现实意义。

**致谢** 本研究工作得到曾小雁、赖秋婷同学的帮助, 在此一并致谢。

## 参 考 文 献

- Allran J W, Karasov W H. 2000. Effects of atrazine and nitrate on northern leopard frog (*Rana pipiens*) larvae exposed in the laboratory from posthatch through metamorphosis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(11): 2850–2855.
- Bernabò I, Brunelli E, Berg C, et al. 2008. Endosulfan acute toxicity in *Bufo bufo* gills: ultrastructural changes and nitric oxide synthase localization. *Aquatic Toxicology*, 86(3): 447–456.
- Berrill M, Bertham S, Wilson A, et al. 1993. Lethal and sublethal impacts of pyrethroid insecticides on amphibian embryos and tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12(3): 525–539.
- Berrill M, Bertram S, McGilliray L, et al. 1994. Effects of low concentrations of forest-use pesticides on frog embryos and tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13(4): 657–664.
- Bonin J, DesGranges J L, Rodrigue J, et al. 1997. Anuran species richness in agricultural landscapes of Quebec: foreseeing long-term results of road call survey // Green D M. *Amphibians in Decline: Canadian Studies of a Global Problem*. St. Louis, Missouri: Society for the Study of Amphibians and Reptiles, 141–149.
- Boone M D, Semlitsch R D. 2002. Interactions of an insecticide with competition and pond drying in amphibian communities. *Ecological Applications*, 12(1): 307–316.
- Bridges C M. 1999. Predator-prey interactions between two amphibian species: effects of insecticide exposure. *Aquatic Ecology*, 33(2): 205–211.
- Bridges C M. 2000. Long-term effects of pesticide exposure at various life stages of the southern leopard frog (*Rana sphenoccephala*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39(1): 91–96.
- Brunelli E, Bernabò I, Berg C, et al. 2009. Environmentally relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behaviour in *Bufo bufo* tadpoles. *Aquatic Toxicology*, 91(2): 135–142.
- Ezemonye L I N, Tongo I. 2009. Lethal and sublethal effects of atrazine to amphibian larvae. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 2(1): 29–36.
- Gross J A, Chen T H, Karasov W H. 2007. Lethal and sublethal effects of chronic cadmium exposure on northern leopard frog (*Rana pipiens*) tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(6): 1192–1197.
- Harris M L, Chora L, Bishop C A, et al. 2000. Species- and age-related differences in susceptibility to pesticide exposure for two amphibians, *Rana pipiens*, and *Bufo americanus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 64(2): 263–270.
- Hayes T B, Falso P, Gallipeau S, et al. 2010. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *Journal of Experimental Biology*, 213(6): 921–933.
- Hof C, Araújo M B, Jetz W, et al. 2011. Additive threats from pathogens, climate and land-use change for global amphibian diversity. *Nature*, 480(7378): 516–519.
- Huang M Y, Duan R Y, Ji X. 2014. Chronic effects of environmentally-relevant concentrations of lead in *Pelophylax nigromaculata* tadpoles: threshold dose and adverse effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 104: 310–316.
- Hussain Q A, Pandit A K. 2012. Global amphibian declines: a review. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 4(10): 348–357.
- Jayawardena U A, Navaratne A N, Amerasinghe P H, et al. 2011. Acute and chronic toxicity of four commonly used agricultural pesticides on the Asian common toad, *Bufo melanostictus* Schneider. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 39(3): 267–276.
- Johnson A, Carew E, Sloman K A. 2007. The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, 84(4): 431–438.
- Lavorato M, Bernabò I, Crescente A, et al. 2013. Endosulfan effects on *Rana dalmatina* tadpoles: quantitative developmental and behavioural analysis. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 64(2): 253–262.
- Liu H J, Ye W H, Zhan X M, et al. 2006. A comparative study of rac- and S-metolachlor toxicity to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63(3): 451–455.

- Lou Q Q, Zhang Y F, Zhou Z, et al. 2013. Effects of perfluorooctanesulfonate and perfluorobutanesulfonate on the growth and sexual development of *Xenopus laevis*. *Ecotoxicology*, 22(7): 1133–1144.
- Mgbaeruhu J E. 2002. The influence of pH on the toxicity domestic detergents against tadpoles of *Rana rana* and fingerlings of *Tilapia niloticus*. Lagos: MSc Thesis University of Lagos.
- Natale G S, Ammassari L L, Basso N G, et al. 2006. Acute and chronic effects of Cr (VI) on *Hypsiboas pulchellus* embryos and tadpoles. *Diseases of Aquatic Organisms*, 72(3): 261–267.
- Relyea R A. 2005. The lethal impacts of Roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(3): 351–357.
- Shuhaimi-Othman M, Nadzifah Y, Umirah N S, et al. 2012. Toxicity of metals to an aquatic worm, *Nais elinguis* (Oligochaeta, Naididae). *Research Journal of Environmental Toxicology*, 6(4): 122–132.
- Sparling D W, Fellers G M. 2009. Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(8): 1696–1703.
- Stuart S N, Chanson J S, Cox N A, et al. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306(5702): 1783–1786.
- Takahara T, Kohmatsu Y, Maruyama A, et al. 2012. Inducible defense behavior of an anuran tadpole: cue-detection range and cue types used against predator. *Behavioral Ecology*, 23(4): 863–868.
- Wei L, Shao W W, Ding G H, et al. 2014. Acute and joint toxicity of three agrochemicals to Chinese tiger frog (*Hoplobatrachus chinensis*) tadpoles. *Zoological Research*, 35(4): 272–279.
- Zhao H F, Chai L H, Wang H Y. 2013. Effects of fluoride on metamorphosis, thyroid and skeletal development in *Bufo gargarizans* tadpoles. *Ecotoxicology*, 22(7): 1123–1132.
- 常津毓, 王晓梅, 侯志广, 等. 2015. 醚菌酯在平菇和榆黄蘑及培养料中的残留动态研究. *食用菌*, 37(2): 62–64.
- 陈娜, 郝家胜, 王莹, 等. 2007. 铜、铅、镉、锌、汞和银离子复合污染对水螅的急性毒性效应. *生物学杂志*, 24(3): 32–35.
- 费梁, 胡淑琴, 叶昌媛, 等. 2009. 中国动物志: 两栖纲 下卷 无尾目蛙科. 北京: 科学出版社.
- 郭正元, 何文, 贺仲兵. 2005. 异恶草酮与镉对蝌蚪的联合毒性研究. *武夷科学*, 21(12): 113–116.
- 贾秀英, 董爱华, 杨亚琴. 2005. 铜、锌和三唑磷对泽蛙蝌蚪的毒性研究. *环境科学研究*, 18(5): 26–29, 48.
- 雷焕宗, 陈文君, 邵伟伟, 等. 2014. 农药及 pH 对中华大蟾蜍蝌蚪的急性毒性. *丽水学院学报*, 36(5): 23–30.
- 李红梅, 田先娇. 2010. 9 种因子对牛蛙蝌蚪的毒性研究. *安徽农业科学*, 38(2): 769–771.
- 李丽, 李凤珍, 安丽, 等. 2000. 异丙甲草胺的毒性研究. *农药*, 39(5): 17–18.
- 卢祥云, 张燕萍, 吴海东, 等. 2006. 汞离子和铜离子对中华大蟾蜍蝌蚪联合毒性研究. *四川动物*, 25(2): 379–381.
- 念宇, 杨再福, 魏倩倩. 2009. 三唑磷·敌百虫和吡虫啉对泽蛙蝌蚪的毒性研究. *安徽农业科学*, 37(18): 8538–8540.
- 唐超智, 胡素霞, 王坤英. 2007. 三氯杀螨醇对中华大蟾蜍的急性毒性. *河南师范大学学报: 自然科学版*, 35(1): 210–212.
- 王珏, 毛晨蕾, 尹晓辉, 等. 2014. 咪鲜胺锰盐在田水和土壤中的消解动态. *农药*, 53(5): 356–358, 376.
- 熊艳, 万丽娟. 2005. 三唑磷和多效唑及其混合对中华大蟾蜍蝌蚪的急性毒性. *南昌大学学报: 理科版*, 29(5): 493–496.
- 徐冬梅, 许晓路, 刘文丽, 等. 2009. 异丙甲草胺及其 S 型对映体对蚯蚓的急性毒性差异. *中国环境科学*, 29(9): 1000–1004.
- 杨再福. 2000. 铜 (Cu<sup>2+</sup>) 对中华大蟾蜍蝌蚪的毒性试验. *环境保护科学*, 26(5): 37–38.
- 杨再福, 张阿林, 赵姬. 2000. 孔雀石绿对中华大蟾蜍蝌蚪的毒性研究. *四川动物*, 19(3): 182.
- 张璇, 杨瑞丽, 柳春红, 等. 2015. 手性除草剂异丙甲草胺毒理研究进展. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 43(1): 152–158.
- 张燕萍, 方许武, 卢祥云. 2010. 杀虫剂锐高和飞网对中华大蟾蜍蝌蚪的联合毒性. *湖北农业科学*, 49(2): 354–355, 365.
- 张云龙, 袁娟, 陈丽萍, 等. 2011. 三种重金属对鲫鱼苗的急性毒性和联合毒性试验. *河北渔业*, (2): 24–27.
- 周明, 刘昌英, 刘志勇, 等. 2009. 精异丙甲草胺原药的毒性实验观察. *职业与健康*, 25(24): 2657–2661.
- 周永欣, 章宗涉. 1989. 水生生物毒性试验方法. 北京: 农业出版社.