

# 魚類行為研究 在生態毒理學上的應用

Application of Fish Behavior Studies in Ecotoxicology

陳德豪 國立海洋生物博物館企畫研究組

Chen, Te-Hao Department of Planning and Research, National Museum of Marine Biology and Aquarium

## 什麼是生態毒理學？

自從工業革命以來，人類科技突飛猛進，生活水準大幅提昇，然而伴隨而來的是大量的資源使用及污染物排放。在第二次世界大戰之前，人類對於污染的處理原則是「稀釋」，認為稀釋就是污染的解決方法(The solution to pollution is dilution)，所以廢氣經由煙囪排放至高空、廢污水被排放到河海裡、垃圾則是被傾倒掩埋。這樣的處理方式持續了幾十年，並沒有發生什麼大問題，所以大家也就覺得理所當然，然而，可怕的环境危機卻在悄悄地發生。1950年代，在日本的熊本縣水俣灣(Minamata Bay)發生集體汞中毒，稱為水俣病(Minamata disease)，本事件有上千人中毒，其中許多人死亡，並有許多畸胎的產生，造成極大的生命財產損失。後來的調查發現，水俣病的成因是因為海灣附近的工廠所排放的廢水中含有微量的重金屬汞，在海域環境中被轉化成甲基汞並隨著食物鏈累積在魚蝦之中，當地居民長期食用含甲基汞的海鮮造成慢性汞中毒。同一時期，發生在日本富士縣因為食用含鎘的米導致的痛痛病(Itai-itai disease)也受到世人極大的關注。同時在世界的另一端，北美及歐洲發生遊隼或禿鷹等猛禽類族群不明原因地大幅衰退，經過多年研究之後才發現，有機氯農藥如DDT會累積在生物體內，並藉由食物鏈的生物放大效應在食物鏈頂端的猛禽體內累積很高的濃度，造成蛋殼變薄以致孵化失敗。1962年瑞秋卡爾森女士(Rachel Carson)在其名作《寂靜的春天》(Silent Spring)中痛陳有機氯農藥及其他現代

殺蟲劑對鳥類及野生動物的危害，引起社會大眾的重視，並促成後來DDT的禁用。水俣病事件和寂靜的春天一書喚醒人類對環境污染的警覺，可說是現代環保運動的催化劑。此後環境運動及環境科學蓬勃發展，但環境污染問題卻更加嚴重，越來越多各式各樣的污染物被製造並釋放到環境中，危害人類及其他生物的健康。經過多年的經驗及教訓，現在人們知道稀釋不是解決污染的方法，因為任何我們丟給環境的污染物，大自然最後都會透過不同方式、直接或間接地還給我們，就像迴力飛鏢一樣。因此，環境管理及污染防制便成為一個重要的課題，而各種環境科學便應運而生，生態毒理學便是其中一項。

生態毒理學(或環境毒理學)是一門跨領域的科學，專門研究環境污染物對生態系及其中各樣生物的影響。以水域環境而言，常見的環境污染物質包括重金屬、石油產品、殺蟲劑、工業污染物、民生污水。除此之外，近年來還有一些新興污染物質開始受到人們注意，例如溴化阻燃劑、人工雌激素、藥物及個人護理產品、抗菌劑、介面活性劑、塑化劑、全氟化物、人造奈米顆粒等。這些新興污染物質包羅萬象、涵蓋各種用途、使用量大、在環境中分佈廣泛，但是我們對他們的生物毒性及可能的環境衝擊所知非常有限。不管是傳統或新興的污染物質，在製造、運輸、使用、廢棄的過程中會進入到環境中，最終大多會流入到水域環境裡，例如河川、湖泊、濕地、海洋中，並對這些環境裡的水生生物如魚類造成不良的影響。

響。生物毒性試驗是生態毒理學常用的研究方法，可以用來測試環境毒物對各種生物的毒性。生物毒性試驗裡最常見的毒性終點(toxic endpoints)是急性致死效應(例如96小時半致死濃度)，主要是藉由觀察短時間內不同濃度暴露下的死亡率求得。這種測試方法的優點是簡單經濟，而且資料間容易比較。但是這種急毒性試驗所得的半致死濃度通常比環境中可偵測到的濃度高很多，而且測試時間極短、只觀察致死效應(lethal effect)，無法反應生物在低濃度、長時間的暴露之下對其他重要生物功能的影響，因此有些生物毒性試驗會以低濃度、長時間的暴露來探討環境污染物對生物的亞致死效應(sublethal effects)，以追求更接近實際環境的狀況，但這類生物試驗會比急毒性生物試驗花費更多時間、人力、經費，所以相對上比較少被應用。



斑馬魚成魚

### 魚類行為毒物學

魚類具有很高的生態及經濟重要性，是水生生態毒理學非常重要的研究對象。魚類亞致死毒性試驗常見的毒性終點包括孵化、胚胎發育、生長、生殖，有時也包括組織切片，但行為觀察卻很少被包括在其中。魚類行為其實具有很高的生物學及生態學意義，因為行為是魚類內在及外在因子交互影響下的綜合表現，並可連結魚體內的各項生化及生理反應。魚類正常的行為表現是開始於接收到環境中的刺激，並由中樞神經系統處理之後，產生生理變化(如內分泌、代謝、心肺功能等)及行為反應，生理狀態會調控行為反應，行為也可能影響生理狀態。由於魚類行為可以連結生理及生態，因此非常適合用來探討環境毒物的影響。既然如此，為何行為學方法很少被應用在生態毒理學研究裡呢？這主要有幾個原因。第一就是動物個體間行為變異很大，會造成資料

分析上的困難，但這可以靠增加樣本數及良好的實驗設計來改善。第二就是行為觀察比較難被客觀地量化，但這也可以靠現代科技設備及改善實驗設計來克服。第三點，其實也是最重要的一點，是因為長期缺乏跨領域的整合，生態毒理學家及動物行為學家雙方並不熟悉各自的研究領域，因此無法擴大合作應用，這實在是非常可惜的事情。因此，越來越多的學者呼籲應該擴大行為研究在魚類生態毒理學的應用。

魚類整個生活史時期牽涉許多種間(如掠食)及種內(如競爭、生殖)的互動，這些都需要靠著適當的行為表現才能達成。如果暴露環境污染物會改變了這些行為的正常表現，就有可能危及個體生存，甚至是族群狀態。許多環境毒物能在比致死濃度低很多的暴露下改變魚類的正常行為，這樣的毒性反應是無法在急毒性試驗中被反映出來的。在相關文獻中

較常被探討的魚類行為包括運動行為、攝食行為、避敵行為、群游行為、築巢、求偶、領域行為等。在生理上，環境污染物質可藉由干擾感覺、內分泌、神經、或者代謝系統來影響行為。本人實驗室目前的主要研究方向之一就是環境污染物對魚類的行為的影響，這些環境污染物包括多溴聯苯醚、奈米及有機防曬物質、人工雌激素、以及民生污水。以下就以本實驗室最近的一些研究結果來舉例說明魚類行為學研究在生態毒理上的應用。

### 多溴聯苯醚降低發育中魚類的活動力

多溴聯苯醚(polybrominated diphenyl ethers)是溴化阻燃劑的一大類，可用於添加在各種織品、家具或電器中作為防焰材料，近三十年來在全球廣泛地被使用。多溴聯苯醚是一種持久性有機污染物，在環境中不易被

分解，而且具有生物累積性，可累積在動物體或人體中，淡水或海水魚中也常發現有多溴聯苯醚的累積。在哺乳動物(如老鼠)的實驗發現，多溴聯苯醚具有環境荷爾蒙的效應，主要能干擾動物的甲狀腺系統，並可能影響神經行為發育及生殖表現。在少數的魚類研究裡，也發現高劑量的多溴聯苯醚暴露會影響生殖及性腺組織發育，但卻沒有行為學上量化的研究。本實驗室利用一種常見的淡水模式魚種—斑馬魚(*Danio rerio*)，從幼苗時期開始餵食摻有低劑量環境濃度的多溴聯苯醚的飼料長達三個月，直到

斑馬魚達到性成熟。實驗結束時我們以一種專門的動物運動軌跡分析系統來量化分析斑馬魚的各項游泳行為參數，例如游泳速度、運動距離、活動時間百分比。我



斑馬魚受精卵

們也以組織切片技術來分析雌雄性比以及雌雄性腺發育。我們發現，在我們這樣的實驗設計下，斑馬魚體內可以累積到類似文獻中報導的野外魚體樣本中的多溴聯苯醚濃度。與原先假設不同的是，在這樣程度的暴露下並不會影響斑馬魚的生長、型態發育，也不會影響斑馬魚的性腺組織分化及發育。然而，我們的行為量化研究卻發現，斑馬魚的活動力與體內累積的多溴聯苯醚濃度成反比，亦即體內多溴聯苯醚濃度越高，活動力越低。先前的文獻指稱多溴聯苯醚會影響魚類性腺組織發育，但他們所使用的濃度比環境濃度高出許多。我們的研究結果則指出，在環境濃度暴露下並不會造成原先預期的生殖毒性，卻會降低魚的活動力。由於甲狀腺對魚類早期神經發育具有很大的影響，活動力降低可能反映出神經系統發育時期所受到的損害，這樣的結果與鼠類的實驗結果一致。從生態角度而言，活動力降低會影響魚的許多重要的行為功能，包括攝食、避敵和求偶等。本研究首度證實，模擬野外環境中的魚類體內所累積之長期多溴聯苯醚暴露，雖不至影響魚類的生

存、生長、性別分化與性腺發育，卻會導致游泳能力改變，這些行為改變對於個體甚至族群在生態上的適存度的可能影響，值得未來更進一步的探討。

### 二氧化鈦奈米顆粒影響魚苗的游泳能力

人造奈米顆粒(manufactured nanoparticles)是指粒徑等於或小於100 nm的新興人造物質。當傳統材料奈米化後，其物理、化學性質及生物相容性都會隨之改變。奈米顆粒會經由呼吸、飲食、血管注射、皮膚接觸等途徑

進入生物體內。傳統材料的二氧化鈦，為不可燃、無毒的白色粉末，在自然界中存在的型態分為三種，分別為銳鈦礦(anatase)、金紅石(rutile)和鈦礦(brookite)，早已被廣泛利用在塗料、造紙、



剛孵化的斑馬魚苗

塑料、陶瓷等白色顏料。當傳統二氧化鈦材料變成奈米層級(顆粒小於100nm)後，具有高穩定性，可用來吸收或反射紫外光(UV)，並已被大量且廣泛地添加在防曬乳、化妝品、塗料及光觸媒等產品。奈米化的二氧化鈦因顆粒變小、表面積增加，可能造成生物毒性。目前為止，二氧化鈦奈米顆粒對於生態毒理上之研究仍相當有限，而對於水生生物之文獻也只佔少數。水蚤在48小時的急性毒試驗中，暴露於二氧化鈦奈米顆粒下，死亡率隨著濃度上升而增加。在虹鱒的研究中也指出二氧化鈦奈米顆粒非常小，所以容易隨著水體流動進入魚的鰓中，進而影響到魚類呼吸，或造成某些亞致死毒性，例如：氧化緊迫(oxidative stress)、器官病變及誘導抗氧化防禦系統。二氧化鈦奈米顆粒在光下可以轉移電子，快速生成羥基自由基( $\cdot\text{OH}$ )。在金魚皮膚細胞(GFSk-S1)中也發現到細胞毒性和DNA受損，因誘導而產生羥基自由基(hydroxyl radical)。然而，奈米顆粒的毒性作用及毒性機制在魚類或其他水生生物研究中仍是相當有限的，因此需要更多相關研究來印證二氧化鈦奈米顆粒在環境中之風險。我

們以斑馬魚胚胎進行二氧化鈦奈米顆粒暴露實驗(0-10 ppm)，暴露後每12小時觀察其孵化率、畸形率，並在魚苗開始會游泳時，進行游泳行為觀察。結果顯示，在孵化率、存活率、畸形率皆無顯著影響，但在濃度為0.1-1 ppm時會造成斑馬魚仔魚平均泳速及活動力下降。另外，我們也添加抗氧化劑或抗氧化劑抑制物以探討氧化緊迫反應在二氧化鈦奈米顆粒毒性的角色，這部分結果顯示添加抗氧化劑或抗氧化劑抑制物並不會改變二氧化鈦奈米顆粒對幼苗游泳行為的影響，顯示除了氧化緊迫外可能還有其他因素參與了行為毒性，例如生理上反應、腦部神經受損等。本研究也顯示，行為比其他傳統毒理學研究標的(例如：孵化率、活存率)更能敏感地偵測二氧化鈦奈米顆粒的魚類胚胎發育毒性。

#### 防曬油中的有機防曬物質抑制雄性泰國鬥魚的領域行為

全世界藥品及個人護理產品 (pharmaceuticals and personal care products, PPCPs) 的生產及消耗相當可觀，而這些產品會由經汗水排放至觀光海岸地區並可能擴散至整個海洋，其中所含的化學物質可能會危害到環境資源。例如，遊客身上所使用的防曬油會經由海水直接沖刷或旅館廢水排放進入附近的海域當中，並對當地水環境造成衝擊。二苯酮-3 (Benzophenone-3或BP-3) 是目前使用最廣泛的有機防曬物質，可吸收及反射紫外光的輻射，且對皮膚及眼睛不具刺激性，其抗紫外線及防水性能均優，常添加於防曬油、化妝品、生活清潔用品、食品包裝、塗料及塑料中，以避免人類的皮膚及產品受到紫外線的傷害。但其在自然環境中不易被生物分解，且具有生物累積的作用，經過汗水處理過程後仍無法完全去除，因此容易經由汗水一起排入環境水體中，目前已有許多報告指出在環境中及魚體內均發現BP-3殘留。對於BP-3的特性及影響，近年來倍受關注，目前有些報告指出BP-3具有雌激素或抗雄性激素的性質，屬於仿雌激素，可能會對雄性生物造成雌性化的影響。目前大多數的研究都只針對於BP-3對生物生殖及對哺乳類所產生的影響，並未有其對動物行為產生影響的研究。污染物

會改變動物的生理機能，特別是影響生殖器官所引起的性別反常效應，但更少量的污染物就可以改變物種的群居及生殖行為，這樣的影響很可能構成遠比造成精子數減少更為嚴重的生存問題。對許多動物而言，進行生殖行為是繁殖成功的關鍵因素，生殖行為有助於選擇適合的配偶，且對大多數的魚類而言，此行為促成配子的同步釋放。如果生殖行為受到干擾，生物獲得配偶的成功率及配子的受精率均會下降。為了探討BP-3對雄性魚類領域行為及性腺發育的影響，我們將雄性泰國鬥魚暴露



斑馬魚幼苗的游泳軌跡分析



進行領域展示行為的雄性泰國鬥魚



進行領域展示行為的雄蝦虎魚



黑點青將魚



俗稱小丑魚的眼斑海葵魚

於亞致死濃度的BP-3(0-1000 ppb)或人工雌激素(EE2)中28天。於暴露前及暴露後分別測量個體體長及體重，並各拍攝並分析一次一般游泳行為(總移動距離、活動時間、絕對旋轉角度)及領域展示行為(鰓蓋展示的時間、最大衝刺泳速)。實驗結束後採集精巢以測量性腺體重比及製作性腺組織切片。實驗中沒有出現任何個體死亡，各組間性腺體重比沒有顯著差異。在精巢組織切片的部分，成熟精子發育比例只有在100 ppb BP-3處理組比控制組稍低。在行為的部分，各處理組雄魚的一般游泳行為於暴露前與暴露後並無顯著差異，但在EE2及1000 ppb BP-3處理組的鰓蓋展示時間及最大衝刺泳速於暴露後均有顯著的降低，代表這些雄魚的領域行為反應下降。我們的研究結果顯示BP-3會干擾雄性泰國鬥魚的領域行為及精子形成，可能具有環境荷爾蒙的效應，本實驗也是第一個以雄性領域行為顯示有機防曬物質類雌激素效應的研究。

#### 墾丁地區民生污水影響魚類胚胎發育及游泳行為

墾丁國家公園每年可吸引數百萬遊客造訪，這些遊客以及當地居民的人為活動造成附近環境極大的壓力。處理過或未經處理的民生污水直接排入當地的溪溝裡，進而流至河口及附近沿岸地區。這些污水含有複雜的混合污染物，包括過量營養鹽、農藥、多環芳香族碳氫化合物、戴奧辛、藥品及個人護理產品、以及各式家用化學產品。這些物質可能具有致癌性、致畸形性、神經活性、或環境荷爾蒙效應。然而，由於成本或技術的限制，實務上不可能以化學分析方法定性及定量污水中所有的污染物質。全放流水毒性(whole effluent toxicity, WET)測試方法直接監測放流水或承載水體原水對生物所造成的毒性，可以在污水的化學組成尚不明確的情形下，測試污水中所有成分之整體生物毒性。由於墾丁河口及鄰近之珊瑚礁是許多魚類重要的繁殖場所，因此有必要研究墾丁地區溪流及排水溝污水排放對魚類發育時期的影響。因此，我們針對墾丁南灣地區三個主要的民生污水來源，包括石牛溪、墾丁大排、小灣小排，以斑馬魚

胚胎幼苗生物試驗來進行全放流水毒性測試，評估觀光產業造成之民生污水對魚類胚胎發育及魚苗游泳行為的影響。我們在2010年五月至十月間，每個月至這三個地點採集水樣，進行基本水質檢測，並進行斑馬魚胚胎暴露實驗，觀察孵化率、存活率、以及外部型態發育等常見的檢驗項目。此外，我們也應用行為學的方法，在魚苗孵化後以動物軌跡分析系統分析其游泳行為是否正常。結果顯示，某些月份、某些地點的污水水樣會降低胚胎孵化及存活率，但並未顯著提升畸形率。有趣的是，在成功孵化且型態正常的仔魚中，我們發現游泳速度及活動力顯著降低，反應出體內不易觀察的生理或神經傷害。本研究顯示，若以一般常用的孵化率、存活率、以及外部型態發育作為毒性終點的話，無法完全反應污水對胚胎發育的亞致死效應。游泳行為實驗的結果也顯示，行為參數是比上述觀察項目更敏感的毒性終點，且可輕易被客觀地量化，未來應更廣泛地應用在魚類的全放流水毒性測試中。

### 其他海水魚類的行為的應用

前述的斑馬魚及泰國鬥魚雖是常見好用的研究模式魚種，但是他們都屬於淡水魚類，並不適合用來進行鹽度較高的河口或海洋地區的生態毒理試驗，因此有必要運用其他廣鹽性或純海水魚種來進行相關研究。出乎意料的是，學術界常用的淡水模式魚不少，但是海水模式魚卻非常稀少。近年來有一種新興的鹹水實驗模式魚種：黑點青鱗魚(*Oryzias dancena*)，該魚種幾乎具有另一種廣泛使用之淡水模式魚：日本青鱗魚(*Oryzias latipes*)作為模式生物所有的優點，且能在不同鹽度之下生存，並能在全海水條件下完成全生活史，極適合用於海水環境生態毒理研究。目前我們已成功運用黑點青鱗魚成魚生殖實驗探討人工雌激素EE2對其求偶及生殖行為的影響，並以類似方法進一步探討其他環境荷爾蒙的類雌激素效應，並發展黑點青鱗魚胚胎一幼苗毒性測試，探討墾丁附近河口或沿海環境污染對魚類生活史初期之發育及行為毒性。我們也嘗試以臺灣原生的海水魚進行行為生態毒理

學研究，例如以小丑魚的游泳及避敵行為研究環境污染物的神經毒性，或者以蝦虎魚的雄性領域展示行為探討環境荷爾蒙的類雌激素效應，都是未來可以應用的方向。

### 結論及未來展望

從科學文獻及我們團隊目前的研究顯示，魚類行為分析能夠敏地偵測到環境污染物細微的亞致死毒性，可以作為生態毒理學一項有力的研究工具。從生物階層的角度來看，個體行為介於化生生理層次與族群群聚層次之間，可以連結毒性機制及生態影響。拜現代攝影及電腦科技之賜，客觀地量化動物行為不再那麼困難，因此生態毒理學界應該更廣泛地應用動物行為量化研究。目前許多環境污染物的行為毒性資料非常缺乏，未來應繼續朝這方向努力。未來的研究也應該更多地探討環境毒物在低濃度、長時間暴露下對動物行為的影響，以求更接近真實環境中的暴露情況。動物生理與動物行為的關係密不可分，例如中樞神經、內分泌、或嗅覺視覺等感官的異常會改變動物行為，因此未來生態毒理學研究應該更強調兩者之間的關連，以找出行為毒性的生理機制。此外，我們也該以實際實驗或電腦模式的方法，探討污染物的行為毒性對生物族群甚至群聚的影響，以便提供更多資訊給相關單位進行風險評估及污染防制參考。



### 參考文獻

- Chen, T.H., Lin, C.Y., Tseng, M.C. 2011. Behavioral effects of titanium dioxide nanoparticles on larval zebrafish (*Danio rerio*). *Marine Pollution Bulletin* 63: 303-308.
- Chou, C.T., Hsiao, Y.C., Ko, F.C., Cheng, J.O., Cheng, Y.M., Chen, T.H. 2010. Chronic exposure of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) alters locomotion behavior in juvenile zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 98:388-395.
- Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology* 68, 369-392.
- 陳健民, 2008。環境毒物學第二版。臺北縣。新文京開發出版股份有限公司。
- 吳雅婷, 2011。有機防曬物質 benzophenone-3 (BP-3)對雄性泰國鬥魚領域行為及性腺的影響。國立東華大學海洋生物多樣性及演化研究所碩士論文。
- 陳怡伶, 2011。墾丁地區溪流污水對斑馬魚胚胎發育及行為之影響。國立東華大學海洋生物多樣性及演化研究所碩士論文。