

## 摘要

Y2223239

随着我国大中城市和乡镇集约化畜禽养殖业的迅速发展，含有各种兽药抗生素的畜禽粪便的年产出量在不断增加，导致大量兽药随动物粪便排出体外。含有残留兽药的粪便作为有机肥施入农田可造成农业土壤污染，对人类健康和土壤生态系统产生潜在危害。Cu 是有毒的环境污染物，随着冶金工业的发展，大量 Cu 进入环境，势必造成 Cu 和兽药的复合污染。为评价 Cu 与兽药磺胺嘧啶复合污染对生态环境造成的潜在风险，研究了常用兽药磺胺嘧啶(SD)与 Cu 单一及复合污染对土壤和植物的生态毒理效应。

采用急性毒性试验方法，研究了 SD、Cu 单一及 SD-Cu 复合污染对 4 种作物（西红柿、小白菜、黄瓜和萝卜）种子发芽、根伸长及芽伸长的影响。结果表明，在单一 SD 作用下，根伸长抑制率和芽伸长抑制率与药物浓度显著相关( $p<0.05$ )，发芽抑制率与药物浓度不相关( $p>0.05$ )；药物对根伸长及芽伸长的抑制高于对种子发芽的抑制；SD 对 4 种作物根伸长的  $IC_{50}$ (抑制率为 50% 时污染物浓度)分别为 33.64, 1.8, 581.5, 3.822 mg/kg, Cu 对 4 种作物根伸长的  $IC_{50}$  分别为 723.5, 273.6, 493.7, 203.9 mg/kg，即 4 种作物在 SD 和 Cu 的胁迫下，其敏感性顺序为：白菜>萝卜>黄瓜>西红柿。SD-Cu 复合污染时，在低 Cu (100 mg/kg)的胁迫下，当 SD 浓度较低时，联合作用主要体现为协同作用，但随着 SD 浓度的增加，协同效应不显著，甚至出现拮抗作用；在高 Cu (300 mg/kg)作用下，二者的联合效应中 Cu 起主要作用。

采用室内培养的方法，研究了 SD、Cu 单一及 SD-Cu 复合污染对黄潮土土壤酶活性的影响。实验结果表明，SD 对磷酸酶和蔗糖酶活性有明显的抑制作用，在试验前期，单一 SD 对脲酶、过氧化氢酶和磷酸酶也有明显的抑制作用，但到后期表现为微弱的激活作用，在整个实验期间，对蔗糖酶活性则表现为抑制效应。SD 浓度不变时，随 Cu 浓度的增加，对磷酸酶活性的抑制率增大，在试验后期，对各种酶活性也都表现出类似情况。

对小白菜幼苗生理毒性实验表明，高浓度(1 mg/kg 和 10 mg/kg) SD 在胁迫后期叶片中叶绿素含量显著低于对照；小白菜幼苗根系中可溶性蛋白质(SP)含量及 SOD 活性在 SMM 处理后的 5d 显著下降，且有较好的剂量-效应关系，表明根系中 SP 含量和 SOD 活性可以作为 SD 污染胁迫的生物标记物；叶片 POD 活性在 SD 胁迫下呈现出先上升后

下降的趋势, 小麦幼苗根系的 POD 活性大于叶片 POD 活性。小白菜幼苗受 Cu 与 SD 复合污染时, SD 表现出主导作用;高含量的复合处理,其联合毒性表现为协同效应。复合污染时,对小白菜的叶绿素含量、可溶性蛋白质含量、过氧化物酶超氧化物歧化酶活性的影响作用受 SD 的影响较大。小白菜各指标的毒性效应随复合污染含量的增加有所增大;在高含量水平的复合污染下,其毒性效应更加显著, Cu 与 SD 复合污染明显增强了对小白菜的毒性效应。

**关键词:** 土壤污染, 生态毒性, 磷胺嘧啶, 铜, 抑制率, 酶活性, 生理生化

## ABSTRACT

With large and medium cities and towns of the rapid development of intensive livestock farming systems, it contains all kinds of poultry and animal feces of veterinary medicine antibiotics in output increases, and the resulting in a large animal waste eliminated from the body with veterinary medicine. Contain residues of organic manure as a veterinary drug into farmland can cause agricultural soil pollution, the health of human beings and soil ecological system to produce potential hazards. Cu is toxic environmental pollutants, along with the development of metallurgical industry, a large number of Cu into the environment, Cu and veterinary medicine would cause the composite pollution. To evaluate the veterinary medicine and Cu single and composite pollution on the ecological environment caused by the potential risks, the single and composite pollution of the commonly used veterinary medicine such as sulfa-drugs pyramiding (SD) and Cu to soil and plant would be worked.

Single and joint toxic effects of veterinary drugs [sulfadiazine] (SD) and copper (Cu) on seed germination, root elongation and shoot elongation of tomato, Chinese cabbage, cucumber and radish were carried out. In the single-factor experiments, there was a dose-response relationship between the concentration of SD or Cu and the inhibitory rate of crop root elongation and shoot elongation ( $p<0.05$ ), but no correlation was found between the concentration of each pollutant and the inhibitory rate of crop seed germination ( $p>0.05$ ). SD showed a much higher toxic effect on crops than did Cu. The  $IC_{50}$  (half inhibition concentration) values of SD on root elongation of tomato, Chinese cabbage, cucumber and radish were 33.64, 1.8, 581.5 and 3.822mg/kg, respectively, the corresponding values of Cu were 723.5, 273.6, 493.7 and 203.9 mg/kg, respectively. In the joint effect tests, the mixture of SD and Cu had synergistic effects on the four crops when root elongation was selected as the toxicological endpoint. At the low concentration of Cu (100mg/kg), they had markedly significant ( $p<0.01$ ) linear interrelationships based on the regression analyses. However, the synergic effect on Chinese cabbage and cucumber was not significant with the increase of added Cu concentration ( $p>0.05$ ). Joint toxicity of SD and Cu was more dependent on Cu.

Using potting to study the impact of single and combined pollution between SD and Cu to soil enzyme activity on the soil - soybean system. The results showed that cadmium could outstanding inhibited the activity of phosphates and invertase early in the trial SD also could outstanding inhibited the activity of unease, catalane, phosphates, but in the late in the performance of weak activation, and SD plays the role of Inhibition inverts activity continued to the end of the experiment. When SD concentration was constant, the combined treatment on the inhibition rate of phosphates activity with increasing concentration of cadmium in larger and later in the test cycle, the various enzyme activity also show such circumstances, this may be due to impact of enzyme activity by cadmium was large and persistent, the effects of SD on the enzyme activity in the latter part of the experiment weaken because of their self concentration and microbes resistant .

Physiological toxicity of Chinese cabbage seedlings showed that chlorophyll content was significantly lower than the control under the late stress of high concentration Sad( $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  and  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). The significant decrease of soluble protein (SP) content and SOD activity in Chinese cabbage seedling root was detected after 5 day exposure of SD, and dose-response relationship was found on 5 day, so they could be considered as biomarkers of stress by SD in soil. Under the stress of SD, POD activity in leaves increased firstly and then decreased, and POD activity in root was higher than in leaves. Chinese cabbage seedlings and composite pollution by Cu and SD, SD show leading role; the high content of composite processing, the joint toxicity performance for synergy effect. Composite pollution, Chinese cabbage for the chlorophyll content, soluble protein content, peroxides superoxide dismutase (sod), the effect of influenced by SD. Chinese cabbage the toxic effects of each index with the increase of composite process content increased; In the high content level of composite process, its toxic effect more remarkable, Cu and SD composite pollution clearly enhance to the toxic effects of cabbage.

**KEY WORDS:** soil pollution, ecological toxicity, sulfadiazine (SD), copper, inhibitory rate, enzyme activity

## 第一章 绪论

### 1.1 污染生态毒理效应

#### 1.1.1 污染生态毒理效应的研究意义

污染生态毒理学是随着生态环境问题的日益突出和恶化而产生的一门新兴学科，其核心部分是污染生态毒理效应，即有毒有害污染物质对生命有机体危害的程度与范围的研究以及剂量-效应关系的建立。污染生态毒理学不仅是一门科学，而且是污染防治中应用性很强的环境保护基本工具。污染生态毒理学可以为环境管理和保护措施的制定以及污染风险评价提供技术标准与准则，如通过海洋污染生态毒理学研究，获得有关海洋污染物与海洋生物及海洋生态系统相互关系的数据，可为海洋环境管理和保护措施的制定提供技术标准和准则，特别是污染生态风险评价的论述，可以为化学品生态风险管理提供技术框架和参考<sup>[1]</sup>。污染生态毒性学在健康风险评价及污染生态风险评价中十分重要。对于污染生态风险评价，污染生态毒理学的主要研究对象是鸟类、水生物、陆地无脊椎动物和植物等<sup>[2]</sup>。

#### 1.1.2 污染生态毒理效应的基本原理<sup>[1]</sup>

本论文研究内容所用的依据主要原理为环境毒物的剂量-效应原理、毒理作用的多层次效应原理以及环境毒物的生态适应性原理。

##### （1）环境毒物的剂量-效应关系原理

在一定的暴露时间内，试验生物对环境污染物的反应或环境毒物对生物体的作用与环境毒物或污染物剂量之间的关系，用相应的数学方程加以描述，即为剂量-效应关系。其代谢产物在生物体作用部位的浓度或剂量，通常不易测定；外剂量指环境毒物暴露或给予的剂量，剂量-效应关系中的剂量经常以此进行表示，在使用外剂量时还应考虑环境毒物的生物有效性问题。

##### （2）毒理作用的多层次效应原理

生态系统尤其是生物组分对环境毒物作用的反应，表现为产生各种不同类型的毒性效应。毒性效应包括急性毒性效应、亚急性毒性效应和慢性毒性效应；或个体、种群系

## 第一章 绪论

### 1.1 污染生态毒理效应

#### 1.1.1 污染生态毒理效应的研究意义

污染生态毒理学是随着生态环境问题的日益突出和恶化而产生的一门新兴学科，其核心部分是污染生态毒理效应，即有毒有害污染物质对生命有机体危害的程度与范围的研究以及剂量-效应关系的建立。污染生态毒理学不仅是一门科学，而且是污染防治中应用性很强的环境保护基本工具。污染生态毒理学可以为环境管理和保护措施的制定以及污染风险评价提供技术标准与准则，如通过海洋污染生态毒理学研究，获得有关海洋污染物与海洋生物及海洋生态系统相互关系的数据，可为海洋环境管理和保护措施的制定提供技术标准和准则，特别是污染生态风险评价的论述，可以为化学品生态风险管理提供技术框架和参考<sup>[1]</sup>。污染生态毒理学在健康风险评价及污染生态风险评价中十分重要。对于污染生态风险评价，污染生态毒理学的主要研究对象是鸟类、水生物、陆地无脊椎动物和植物等<sup>[2]</sup>。

#### 1.1.2 污染生态毒理效应的基本原理<sup>[1]</sup>

本论文研究内容所用的依据主要原理为环境毒物的剂量-效应原理、毒理作用的多层次效应原理以及环境毒物的生态适应性原理。

##### （1）环境毒物的剂量-效应关系原理

在一定的暴露时间内，试验生物对环境污染物的反应或环境毒物对生物体的作用与环境毒物或污染物剂量之间的关系，用相应的数学方程加以描述，即为剂量-效应关系。其代谢产物在生物体作用部位的浓度或剂量，通常不易测定；外剂量指环境毒物暴露或给予的剂量，剂量-效应关系中的剂量经常以此进行表示，在使用外剂量时还应考虑环境毒物的生物有效性问题。

##### （2）毒理作用的多层次效应原理

生态系统尤其是生物组分对环境毒物作用的反应，表现为产生各种不同类型的毒性效应。毒性效应包括急性毒性效应、亚急性毒性效应和慢性毒性效应；或个体、种群系

统水平的不良效应；或分子、细胞合器官水平的不良效应，包括基因突变或基因表达的改变，在基因、mRNA、蛋白或代谢水平引起的改变表现在细胞水平如细胞增殖或分化等的改变或细胞代谢能力的改变等。

### （3）环境毒物的生态适应性原理

生物抗性与耐性是生物对环境毒物的生态适应性的表现。生物抗性是指生物体抵御环境毒物导致不良效应的能力。生物体本身具有的抵御能力，为天然抗性；生物体在受环境毒物的暴露后，经过一段时间的适应，后天获得的抵御能力，为获得性抗性。不同类型、不同种类的生物体，对同一环境毒物具有不同的抗性。植物通过本身的调节作用以增强对环境毒物的抵御能力，称植物抗性，可分为抗性强、抗性中等和敏感 3 类。生物体还具有其生理生化特性保护机制，避免和减轻环境毒物危害的能力，即耐性，又称为生理学抗性。

## 1.1.3 污染生态毒理效应的研究方法

### （1）污染物毒性试验<sup>[1]</sup>

急性毒性试验（acute toxicity test）：是研究化学物质大剂量一次染毒或 24 小时内多次染毒生物所引起的毒性试验。其目的是确定化学物质的毒性程度以及剂量—反应关系，确定次化学物质与其他化学物质的相对毒性，确定具体的急性毒性作用以及提供毒性作用模式方面资料，并为进一步开展其他毒性试验提供理论依据。

#### ①植物急性毒性试验

在实验室条件下，植物急性毒性试验包括植物发育临界期的生物检测以及与田间生态效应评价相关的产量方面的生物检测。其中种子发芽和根伸长试验是从传统植物科学的研究以及肥料和除草剂评价方法中衍生过来的。种子发芽试验可以直接反应出受试物在基质（如土壤）中的潜在危害性。种子发芽代表植物发育过程中的一个临界期，因此，种子对污染物的反应为评价受试物在基质如原位土壤的风险评价提供毒理学信息。

##### a. 种子发芽和根伸长的急性毒性试验

本方法可用于测定受试物对陆生植物种子萌发和根系伸长的抑制作用，以评定受试物对陆生植物胚胎发育的影响。种子在含一定浓度受试物的基质中发芽，当对照组发芽率在 65% 以上，根长达 2cm 时，试验结束，测定不同处理浓度种子的发芽率和根伸长抑制率并计算。种子发芽和根伸长试验的植物种子可选一种或几种，但是必须是普遍存在，具有一定商业和经济效益并且容易发芽、生长较快的植物种类。

b. 陆生植物生长急性毒性试验

本方法可用于评定受试物对陆生植物毒性及生态效应，估计受试物对植物生长及生产力的影响。植物幼苗生长在一定浓度的受试物环境中，时间以 14 天为宜，用生长指标和中毒症状与对照的相应参数加以比较。

c. 蚯蚓急性毒性试验

蚯蚓急性毒性试验的目标是评价环境中化学物质，如农药和有毒有机污染物对土壤中动物的急性伤害。常用的蚯蚓品种为赤子爱胜蚓（*Eisenia fetida*）。整个试验期为 14 天，每一处理和对照组应有 4 个平行样本。

(2) 分子及细胞生态毒性方法<sup>[2]</sup>

①一般代谢酶（乙酰胆碱酶）的活性测定乙酰胆碱酯酶（Ache）是生物体内的一种重要酶，也是一个很典型的毒理学指标。一般认为 20% 以上的 Ache 抑制表明暴露作用的存在，50% 以上的 Ache 抑制表明对生物的生存有影响。

② 抗氧化防御系统检测

a. 超氧化物歧化酶（SOD）是一组金属酶，SOD 被认为发挥关键性的抗氧化作用；它们的重要性在于其存在于所有已研究的好氧生物体内。并且该酶的活性很高，在催化 O<sub>2</sub> 产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的反应中速率近似于扩散极限。

b. 过氧化物酶（POD）系包含了许多酶，这些酶将各种过氧化物还原成相应的醇类。

③ RAPD 技术在 DNA 损伤检测中的作用。

## 1.2 兽药污染的生态毒理学效应研究进展

### 1.2.1 兽药污染对植物的生态毒理效应

兽药对植物的毒性效应依兽药种类、植物种类和土壤理化特征不同有很大差异<sup>[3]</sup>。Boxall<sup>[4]</sup>等研究发现，土壤中 1 mg/kg 土霉素、恩诺沙星对胡萝卜和莴苣生长有显著的抑制作用，而相同浓度的磺胺嘧啶、泰乐素等对胡萝卜和莴苣生长却没有影响。Jemba<sup>[5]</sup>等研究发现当土壤中灭滴灵、氯喹、奎纳克林浓度分别达到 500、8000、10600 mg/kg 时，大豆生长未受到显著的影响，这说明大豆对这 3 种兽药抗生素并不敏感或者说这 3 种兽药的毒性较小。另外，该结果也可能与药物在供试土壤中的有效性和土壤的理化性质有关。该实验中土壤有机质含量较高，兽药可能被有机质强烈吸附而降低了其生物有效性，减小了对作物的毒性。

**b. 陆生植物生长急性毒性试验**

本方法可用于评定受试物对陆生植物毒性及生态效应，估计受试物对植物生长及生产力的影响。植物幼苗生长在一定浓度的受试物环境中，时间以 14 天为宜，用生长指标和中毒症状与对照的相应参数加以比较。

**c. 蚯蚓急性毒性试验**

蚯蚓急性毒性试验的目标是评价环境中化学物质，如农药和有毒有机污染物对土壤中动物的急性伤害。常用的蚯蚓品种为赤子爱胜蚓（*Eugenia fetid*）。整个试验期为 14 天，每一处理和对照组应有 4 各平行样本。

**(2) 分子及细胞生态毒性方法<sup>[2]</sup>**

①一般代谢酶（乙酰胆碱酶）的活性测定乙酰胆碱酯酶（Ache）是生物体内的一种重要酶，也是一个很典型的毒理学指标。一般认为 20% 以上的 Ache 抑制表明暴露作用的存在，50% 以上的 Ache 抑制表明对生物的生存有影响。

**② 抗氧化防御系统检测**

a. 超氧化物歧化酶（SOD）是一组金属酶，SOD 被认为发挥关键性的抗氧化作用；它们的重要性在于其存在于所有已研究的好氧生物体内。并且该酶的活性很高，在催化 O<sub>2</sub> 产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的反应中速率近似于扩散极限。

b. 过氧化物酶（POD）系包含了许多酶，这些酶将各种过氧化物还原成相应的醇类。

③ RAPD 技术在 DNA 损伤检测中的作用。

## 1.2 兽药污染的生态毒理学效应研究进展

### 1.2.1 兽药污染对植物的生态毒理效应

兽药对植物的毒性效应依兽药种类、植物种类和土壤理化特征不同有很大差异<sup>[3]</sup>。Boxall<sup>[4]</sup>等研究发现，土壤中 1 mg/kg 土霉素、恩诺沙星对胡萝卜和莴苣生长有显著的抑制作用，而相同浓度的磺胺嘧啶、泰乐素等对胡萝卜和莴苣生长却没有影响。Jemba<sup>[5]</sup>等研究发现当土壤中灭滴灵、氯喹、奎纳克林浓度分别达到 500、8000、10600 mg/kg 时，大豆生长未受到显著的影响，这说明大豆对这 3 种兽药抗生素并不敏感或者说这 3 种兽药的毒性较小。另外，该结果也可能与药物在供试土壤中的有效性和土壤的理化性质有关。该实验中土壤有机质含量较高，兽药可能被有机质强烈吸附而降低了其生物有效性，减小了对作物的毒性。

金彩霞等研究表明, 磺胺嘧啶钠、磺胺间甲氧嘧啶钠、环丙沙星和恩诺沙星对小麦、白菜、番茄根伸长和芽伸长的抑制率随着土壤中药物含量的增加而增大, 磺胺嘧啶钠含量 $> 10 \text{ mg/kg}$  时, 对 3 种作物芽伸长的胁迫效应均大于对根伸长的胁迫效应, 这与重金属污染不同, 土壤被磺胺嘧啶钠污染时, 3 种作物的敏感性顺序依次为小麦>白菜>番茄, 土壤被环丙沙星污染时, 3 种作物的敏感性顺序为白菜>番茄>小麦, 小麦在这里表现出完全相反的趋势, 这可能与药物作用的靶分子和作物本身的抗性机制<sup>[6]</sup>。土霉素、伊维菌素 2 种常用兽药对小麦和白菜生态毒性效应的研究结果显示, 作物根和芽伸长抑制率与 2 种兽药浓度呈显著剂量-效应关系, 伊维菌素对作物的抑制程度远远大于土霉素<sup>[7]</sup>。

安婧等研究发现, 土霉素对小麦种子芽长及根长的抑制效应显著( $p<0.01$ ), 而且它们之间具有良好的剂量-效应关系。根据线性回归方程得出, 土霉素对小麦种子芽长和根长的半抑制浓度为  $65.5 \text{ mg/L}$  和  $34.7 \text{ mg/L}$ 。然而, 土霉素对小麦种子的发芽率并没有显著的影响。研究还表明,  $0.15\text{-}2.4 \text{ mg/L}$  土霉素暴露 21 d 后, 小麦叶片中的叶绿素含量降低了  $35.6\%\text{-}47.3\%$ , 叶片及根部的可溶性蛋白含量也均呈显著下降趋势。暴露 7 d 后,  $0.15\text{-}2.4 \text{ mg/L}$  土霉素对小麦叶片和根部 SOD 与 POD 活性的抑制效应不显著, 但随着暴露时间的延长, 土霉素对小麦的 SOD 与 POD 酶活性抑制率显著下降;  $2.4 \text{ mg/L}$  土霉素暴露 21 d 后, 小麦根部的 SOD 活性下降  $72.3\%$ , 说明土霉素对小麦幼苗体内的抗氧化系统具有破坏作用<sup>[8]</sup>。该实验结果显示, 低浓度土霉素长期暴露对小麦幼苗的生长发育具有不良的生态毒性效应<sup>[8]</sup>。

不同兽药对植物的毒害机理不同, 但目前这方面的研究还较少。Migliore 等<sup>[9]</sup>研究表明, 磺胺间二甲氧嘧啶能够显著抑制玉米和大麦生长, 他们认为, 磺胺类药物对植物的毒性作用机制主要是: 植物体内的该药物与植物细胞中叶酸相互竞争, 致使叶酸的合成量减少, 而叶酸与嘌呤合成有关, 嘌呤又是细胞分裂素和脱落酸的前体, 影响了植物细胞的分裂与增殖, 抑制植物的生长; 四环素类抗生素可通过抑制植物叶绿体合成酶的活性, 对植物生长产生抑制作用, 影响植物发芽率和根的生长<sup>[10]</sup>; 而恩诺沙星和氟甲喹对植物生长的影响可能与其抑制植物的 DNA 拓扑异构酶 II 有关<sup>[9]</sup>。

### 1.2.2 兽药对微生物群落结构和功能的影响

微生物是土壤生态系统的重要组成部分, 微生物生态平衡的失调会影响到土壤的肥力和土壤的质量。而兽药广泛使用于畜牧业和水产养殖业, 以及人用药物, 用来治疗细

菌及特定微生物引起的多种传染疾病，并且残留于环境中的兽药大部分仍然具有生物活性，所以，土壤中残留的兽药可显著影响微生物的生物活性<sup>[5-10]</sup>。Kong 等<sup>[11]</sup>将从土壤中提取出来的微生物群落暴露于含有土霉素水溶液后，发现土壤微生物群落功能多样性随土霉素的处理浓度升高显著降低。王加龙等<sup>[12]</sup>研究指出，恩诺沙星对土壤微生物数量及群落功能多样性产生影响，其研究结果表明，恩诺沙星对土壤微生物影响的强弱顺序为：细菌>放线菌>真菌；土壤中微生物群落的功能多样性指数差异比较明显，较低浓度的恩诺沙星残留则不影响土壤微生物群落功能的多样性，但是高浓度的恩诺沙星则降低了微生物群落功能的多样性，药物浓度与土壤微生物的多样性成反比。某些兽药分子中还有重金属离子，这些重金属离子对微生物也有一定的抑制作用，且兽药与重金属的复合污染可能对土壤中的微生物造成更大的影响。Kong 等<sup>[11]</sup>的研究结果表明，土霉素与 Cu 复合污染对土壤微生物群落功能的影响显著大于单一污染物。Boleas 等<sup>[13]</sup>研究发现，土壤中 1 mg/kg 的四环素即能够显著抑制土壤中磷酸酶和脱氢酶的活性。张跃华等<sup>[14]</sup>研究也表明：当土壤中阿维菌素的浓度达到 125 mg/kg 时，土壤微生物的种群数量以及细菌、真菌、放线菌的生长速度都受到明显的抑制。但也有学者研究发现，即使兽药在较高浓度下，对土壤微生物活性影响也不大。Thiele-Bruhn 等<sup>[15]</sup>研究结果表明，在土壤中土霉素含量高达 1 000 μg/g 时，土壤基础呼吸和脱氢酶活性仍未受到影响。这可能是因为土壤中大部分微生物暂时处于休眠状态<sup>[16]</sup>，而微生物吸收兽药是一个需要能量的主动过程<sup>[17]</sup>，休眠的微生物必须氧化外界的碳源来提供给自己能量，才能将兽药分子转移至细胞内，因此，只有添加一定碳源，兽药的毒性才能表现出来<sup>[3]</sup>。金彩霞<sup>[18]</sup>等研究表明：磺胺间甲氧嘧啶对土壤呼吸作用的影响远大于其对土壤酶活性的影响，在试验浓度范围内，药物对土壤微生物呼吸的最大抑制和激活率分别为 72% 和 254%，而对 4 种酶活性的抑制或激活率都在 30% 以下，这说明土壤微生物呼吸在该药物胁迫下反应更为敏感；磺胺间甲氧嘧啶对土壤呼吸强度的影响表现为先抑制后激活的规律；对脲酶活性的影响在第 11 d 之前主要表现为抑制作用，而对磷酸酶活性则主要为激活作用；药物对蔗糖酶活性的影响表现为“激活-抑制-激活”的规律；对过氧化氢酶活性的影响表现为“激活-恢复-激活”的规律。

兽药对土壤微生物的作用与兽药种类、微生物种类和土壤因子等密切相关。Van Dijck 等<sup>[19]</sup>研究了抗生素对 36 种典型微生物的作用，结果发现，有 7 种微生物对抗生素是敏感的，其生长受到明显的抑制，其余 29 种则不敏感。Thiele<sup>[20]</sup>研究了 9 种抗生素类

兽药对土壤微生物的毒性作用,结果表明,氯四环素和磺胺地索辛对微生物的  $ED_{50}$  较低,分别为 53 和 58 mmol/kg,而芬苯哒唑和磺胺在实验最高浓度 3300 和 5800 mmol/kg 时,仍未对微生物产生显著的影响。其研究结果还表明,兽药对土壤微生物的影响与受试土壤的有机质含量显著相关,有机质含量越高,则药物对土壤微生物的影响越小。这可能是因为高有机质土壤对兽药的吸附能力较强,从而降低了药物在土壤中有效性。

兽药对土壤微生物的毒性效应与也与二者的接触时间有关。金彩霞<sup>[18]</sup>等研究还表明:磺胺间甲氧嘧啶在加入到土壤的初期(前 3 d)即对土壤呼吸强度产生明显的抑制作用,随着时间推移,药物的降解及土壤微生物耐受性增加,使得土壤呼吸逐渐恢复正常。可能是因为药物对其靶微生物的抑制,而随时间的增长,药物对土壤呼吸强度又表现出强烈的激活效应,可能的原因有二:一是由于药物的作用目标是针对一定的“靶微生物”<sup>[21]</sup>,当这些靶微生物活性受到抑制,土壤中其他微生物种群便获得大量的碳源等营养物质,从而使其活性增强;另一方面,药物本身可作为一种碳源促进微生物的分解,或其本身的降解也能释放二氧化碳<sup>[18]</sup>。土壤中 0.01g/kg 四环素,8 周后显著抑制土壤代谢,16 周后抑制作用明显减轻,这说明随作用时间的延长,土壤中的微生物可能对该兽药产生了一定的抗性<sup>[20]</sup>。另外, Thiele 等<sup>[20]</sup>研究了磺胺嘧啶和土霉素对粘壤淋溶土和砂壤始成土呼吸强度的影响,结果表明,粘壤淋溶土在施入这 2 种兽药后,48h 内对呼吸强度没有影响,48h 后显著抑制土壤呼吸强度;砂壤始成土在施药 24h 后显著抑制呼吸强度,48h 后土壤呼吸强度又升高。

### 1.3 重金属-有机物复合污染的联合毒理效应研究进展

重金属和有机污染物具有差别很大的污染特性,它们不同的浓度和组合方式会产生不同的环境行为和环境效应。因此,有机物和重金属复合污染研究具有更大的复杂性、未知性和一定的科学和实践意义,同时也是研究的难点<sup>[22]</sup>。多数有机污染物在土壤中难降解,同时它们的降解主要依赖微生物的作用,有机污染物与重金属在土壤中的复合污染会降低土壤中酶的活性,进而影响微生物的生存与发展,从而减缓有机污染物的降解速率,有机污染物在环境中存在的时间越长,对环境造成的危害就越大,复合污染的毒性效应就越强<sup>[20-22]</sup>。张倩茹等<sup>[23]</sup>对乙草胺-Cu 的复合污染的研究表明,乙草胺-Cu 复合污染比其单一污染更能降低细菌总数以及固氮菌、硅酸盐细菌和矿化磷细菌活菌量和土壤脱氢酶的活性,更能促进土壤呼吸强度的增加;利用以 16S rRNA 为基础的变性梯

度凝胶电泳(DGGE)分析各处理样品间的相似程度,发现复合污染明显影响微生物群落结构。由相似系数结果表明:并且乙草胺-Cu 复合污染土壤与长期施用农药土壤具有较高相似性(相似系数达 74.1%)。除草剂乙草胺与铜的复合污染对蚯蚓的毒性研究结果表明,低浓度水平的 Cu 与乙草胺复合时,毒性减弱;高浓度水平的 Cu 与乙草胺复合时,毒性大大增强<sup>[24]</sup>。

重金属与有机物的复合污染也严重影响植物的正常生长和发育。金彩霞等<sup>[25]</sup>研究豆磺隆-Cd 复合污染对小麦的联合毒性的结果表明,镉和高浓度的豆磺隆复合起到协同作用,而且豆磺隆-Cd 复合污染对小麦的株高、地上部鲜重和干重、根鲜重和干重的联合效应都达到了极显著水平。金彩霞<sup>[26]</sup>等研究了 SMM 与 Cd 复合污染对 4 种作物种子根伸长和芽伸长的影响,结果显示,低浓度 SMM 作用下,不同浓度 Cd 处理对 4 种作物种子根伸长和芽伸长抑制效应有显著的差异,但高浓度下作用下,差异并不明显,当根和芽伸长的抑制率超过 60%时,Cd 浓度越高,SMM 对白菜和萝卜根和芽伸长的抑制作用越小,表明高浓度时 SMM 与 Cd 之间存在拮抗效应,在低浓度 Cd(200mg/kg)的胁迫下,联合作用主要体现为协同作用,但随着 SMM 浓度的增加,协同效应不显著;在高浓度 Cd(500mg/kg)作用下,二者的联合效应主要依靠于 Cd 的作用。

王米道<sup>[27]</sup>等以小麦种子为供试作物,研究了重金属铜与除草剂草甘膦复合污染对其发芽率以及发芽后的根长、芽长的影响。研究结果表明,在实验浓度下铜单一污染对小麦发芽率没有明显的影响,对根伸长和芽长的抑制显著;而草甘膦单一污染对小麦发芽、根伸长和芽长均有明显的抑制效应。当铜与草甘膦复合污染时,铜的存在在一定程度上减弱了草甘膦对小麦发芽及芽长的抑制作用;而在根伸长实验中,在低草甘膦浓度条件下,铜的存在在一定程度上增加了草甘膦对根伸长的抑制作用;在较高草甘膦浓度条件下,铜的存在则降低了草甘膦对根伸长的抑制作用。铜的存在减轻草甘膦对小麦毒性的可能原因是:草甘膦与铜络合形成了毒性较小的稳定络合物,使草甘膦毒性降低或失去活性。

## 1.4 实验研究目的与意义和内容

### 1.4.1 研究目的与意义

#### (1) 为 Cu-SD 单一及复合污染的环境生态风险评价提供理论依据

目前,磺胺类药物对土壤生态环境的影响研究还比较少。本实验研究了 Cu-SD 单一

度凝胶电泳(DGGE)分析各处理样品间的相似程度,发现复合污染明显影响微生物群落结构。由相似系数结果表明:并且乙草胺-Cu 复合污染土壤与长期施用农药土壤具有较高相似性(相似系数达 74.1%)。除草剂乙草胺与铜的复合污染对蚯蚓的毒性研究结果表明,低浓度水平的 Cu 与乙草胺复合时,毒性减弱;高浓度水平的 Cu 与乙草胺复合时,毒性大大增强<sup>[24]</sup>。

重金属与有机物的复合污染也严重影响植物的正常生长和发育。金彩霞等<sup>[25]</sup>研究豆磺隆-Cd 复合污染对小麦的联合毒性的结果表明,镉和高浓度的豆磺隆复合起到协同作用,而且豆磺隆-Cd 复合污染对小麦的株高、地上部鲜重和干重、根鲜重和干重的联合效应都达到了极显著水平。金彩霞<sup>[26]</sup>等研究了 SMM 与 Cd 复合污染对 4 种作物种子根伸长和芽伸长的影响,结果显示,低浓度 SMM 作用下,不同浓度 Cd 处理对 4 种作物种子根伸长和芽伸长抑制效应有显著的差异,但高浓度下作用下,差异并不明显,当根和芽伸长的抑制率超过 60%时,Cd 浓度越高,SMM 对白菜和萝卜根和芽伸长的抑制作用越小,表明高浓度时 SMM 与 Cd 之间存在拮抗效应,在低浓度 Cd(200mg/kg)的胁迫下,联合作用主要体现为协同作用,但随着 SMM 浓度的增加,协同效应不显著;在高浓度 Cd(500mg/kg)作用下,二者的联合效应主要依靠于 Cd 的作用。

王米道<sup>[27]</sup>等以小麦种子为供试作物,研究了重金属铜与除草剂草甘膦复合污染对其发芽率以及发芽后的根长、芽长的影响。研究结果表明,在实验浓度下铜单一污染对小麦发芽率没有明显的影响,对根伸长和芽长的抑制显著;而草甘膦单一污染对小麦发芽、根伸长和芽长均有明显的抑制效应。当铜与草甘膦复合污染时,铜的存在在一定程度上减弱了草甘膦对小麦发芽及芽长的抑制作用;而在根伸长实验中,在低草甘膦浓度条件下,铜的存在在一定程度上增加了草甘膦对根伸长的抑制作用;在较高草甘膦浓度条件下,铜的存在则降低了草甘膦对根伸长的抑制作用。铜的存在减轻草甘膦对小麦毒性的可能原因是:草甘膦与铜络合形成了毒性较小的稳定络合物,使草甘膦毒性降低或失去活性。

## 1.4 实验研究目的与意义和内容

### 1.4.1 研究目的与意义

#### (1) 为 Cu-SD 单一及复合污染的环境生态风险评价提供理论依据

目前,磺胺类药物对土壤生态环境的影响研究还比较少。本实验研究了 Cu-SD 单一

及复合污染对土壤微生物和植物的生态毒性效应,探讨了不同浓度 Cu-SD 单一及复合污染胁迫下酶活性的变化规律,并结合 4 种植物种子发芽与根伸长的试验及幼苗生长生理试验,建立了相应的剂量-效应关系,从而为 Cu-SD 单一及复合污染土壤的环境生态风险评价提供了较为全面的数据资料,同时也为 Cu-SD 单一及复合污染土壤的生态风险评价方法提供了研究方向。

### (2) 可为诊断 Cu-SD 单一及复合污染提供快捷有效的生物标记物

本研究通过对土壤微生物和植物幼苗生长相关的几个常见生物标记物的比较研究,筛选出较稳定的、相对较敏感的分子生化水平的生物标记物,为诊断 Cu-SD 单一及复合污染提供简单、快捷、有效的方法。

## 1.4.2 研究内容

### (1) Cu-SD 单一及复合污染对高等植物的急性毒性试验

以西红柿、小白菜、萝卜和黄瓜 4 种蔬菜作物为供试植物,研究了 Cu-SD 单一及复合污染对 4 种植物种子发芽、根伸长和芽伸长的毒性效应,建立污染物浓度与根(芽)伸长抑制率的剂量-效应关系,揭示了不同植物对 Cu-SD 单一及复合污染胁迫的敏感性大小及在 Cu-SD 复合污染胁迫时哪种污染物起主要的胁迫作用。

### (2) Cu-SD 单一及复合污染对土壤酶活性的生态毒性试验

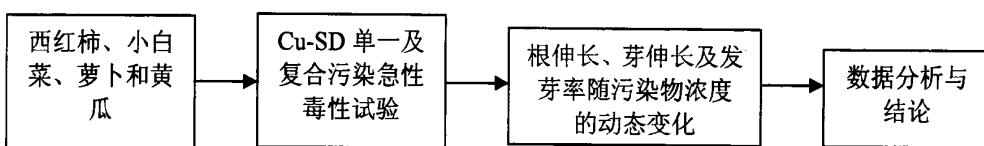
研究了 Cu-SD 单一及复合对黄潮土脲酶、蔗糖酶、过氧化氢酶及磷酸酶活性的影响,揭示了土壤酶活性随 Cu-SD 浓度和时间动态变化的规律。

### (3) Cu-SD 单一及复合污染对小白菜幼苗生理毒性试验

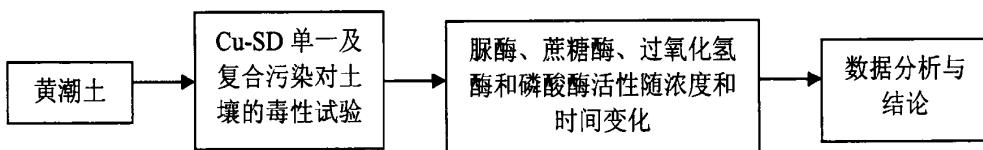
结合溶液培养和自然土壤试验法进行不同 Cu-SD 单一及复合浓度对小白菜生长敏感期(苗期)抗氧化酶系及其它相关分子生化指标变化研究,获得 Cu-SD 单一及复合污染对植物的分子生态毒理效应,探讨植物分子生化水平上的生物标记物(叶绿素含量、可溶性蛋白含量、抗氧化酶系 SOD 和 POD 活性)对 Cu-SD 单一及复合污染的敏感性。

## 1.4.3 设计路线

### (1) Cu-SD 单一及复合污染对高等植物的急性毒性试验技术路线



(2) Cu-SD 单一及复合污染对土壤微生物的生态毒性试验技术路线



(3) Cu-SD 单一及复合污染对小白菜幼苗生理毒性试验技术路线



## 第二章 Cu-SD 单一及复合污染对蔬菜作物种子发芽的影响

### 2.1 前言

随着集约化、规模化养殖业的快速发展,大量兽药被用来防治各种畜禽疾病。研究表明,大约有 60%~90%兽药随动物粪便排出体外,含有大量兽药的养殖场粪尿作为有机肥施入农田后可造成农田土壤污染<sup>[28-31]</sup>。兽药在土壤中累积和富集,进而影响其中的植物、动物和微生物的正常生命活动,甚至将影响人类的身体健康。高等植物的生长状况可以反映土壤的污染程度<sup>[32-35]</sup>。目前常用的高等植物生态毒理试验方法主要有根伸长试验、种子发芽试验和植物幼苗早期生长试验<sup>[36-38]</sup>。有关植物对兽药的毒性响应已受到研究者的关注<sup>[39-40]</sup>。

磺胺类药物(SAs)是一类以对氨基苯磺酰胺为基本化学结构的合成抗菌药物,是我国生产和使用量最大的兽药之一。新鲜猪粪中磺胺药物可高达 20~40mg/kg,每亩农田每年将有高达几百克的磺胺药物施入<sup>[41]</sup>。Cu 是植物生长发育所必需的营养元素,但若超量存在亦会造成污染,其可以通过工业排放、化肥施用、污水灌溉、污泥农用等多种途径进入农田生态系统,影响作物的生长、发育并通过食物链富集到人体和动物体,给动物和人类健康带来危害<sup>[42]</sup>。因此,农田生态系统中磺胺类药物-铜的复合污染较普遍。而目前针对此类复合污染开展的生态毒理研究较少,有必要加强相关方面的研究。

本研究以黄潮土作为供试土壤,研究了铜-磺胺嘧啶 (SD) 单一及复合污染对西红柿和小白菜种子根伸长、芽伸长和发芽率的影响。通过作物种子生长受抑制程度,评价 SD-Cu 单一及复合污染的生态毒性及可能对农业生产带来的环境风险。

### 2.2 材料与方法

#### 2.2.1 材料

药品 磺胺嘧啶(SD)原药,纯度 93%,购自北京博亚华牧业科技有限公司;  
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  分析纯,广州化学试剂厂生产。

供试种子和土壤 小白菜 (*Raphine's sativa*, 品种为上海青),发芽率为 98%; 西红柿(*Cipher and rabetacea*, 合作 908),发芽率为 95%; 萝卜 (*Raphanus sativus L*, 品种为地

## 第二章 Cu-SD 单一及复合污染对蔬菜作物种子发芽的影响

### 2.1 前言

随着集约化、规模化养殖业的快速发展,大量兽药被用来防治各种畜禽疾病。研究表明,大约有 60%~90%兽药随动物粪便排出体外,含有大量兽药的养殖场粪尿作为有机肥施入农田后可造成农田土壤污染<sup>[28-31]</sup>。兽药在土壤中累积和富集,进而影响其中的植物、动物和微生物的正常生命活动,甚至将影响人类的身体健康。高等植物的生长状况可以反映土壤的污染程度<sup>[32-35]</sup>。目前常用的高等植物生态毒理试验方法主要有根伸长试验、种子发芽试验和植物幼苗早期生长试验<sup>[36-38]</sup>。有关植物对兽药的毒性响应已受到研究者的关注<sup>[39-40]</sup>。

磺胺类药物(SAs)是一类以对氨基苯磺酰胺为基本化学结构的合成抗菌药物,是我国生产和使用量最大的兽药之一。新鲜猪粪中磺胺药物可高达 20~40mg/kg,每亩农田每年将有高达几百克的磺胺药物施入<sup>[41]</sup>。Cu 是植物生长发育所必需的营养元素,但若超量存在亦会造成污染,其可以通过工业排放、化肥施用、污水灌溉、污泥农用等多种途径进入农田生态系统,影响作物的生长、发育并通过食物链富集到人体和动物体,给动物和人类健康带来危害<sup>[42]</sup>。因此,农田生态系统中磺胺类药物-铜的复合污染较普遍。而目前针对此类复合污染开展的生态毒理研究较少,有必要加强相关方面的研究。

本研究以黄潮土作为供试土壤,研究了铜-磺胺嘧啶 (SD) 单一及复合污染对西红柿和小白菜种子根伸长、芽伸长和发芽率的影响。通过作物种子生长受抑制程度,评价 SD-Cu 单一及复合污染的生态毒性及可能对农业生产带来的环境风险。

### 2.2 材料与方法

#### 2.2.1 材料

药品 磺胺嘧啶(SD)原药,纯度 93%,购自北京博亚华牧业科技有限公司;  
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  分析纯,广州化学试剂厂生产。

供试种子和土壤 小白菜 (*Raphine's sativa*, 品种为上海青),发芽率为 98%; 西红柿(*Cipher and rabetacea*, 合作 908),发芽率为 95%; 萝卜 (*Raphanus sativus L*, 品种为地

黄樱), 发芽率为 75%, 黄瓜 (Cumber, 预新 12), 发芽率为 90%, 均购自新乡市种子公司。供试土壤自河南师范大学校内生物实验田 0~20cm 表土。

## 2.2.2 实验方法

预备试验 称取 50g 风干土壤于 90mm 直径的玻璃培养皿中, 加入不同剂量的 SD 和 Cu<sup>2+</sup>, 并用去离子水调节土壤含水量至田间最大持水量的 60%, 将其置于恒温培养箱中 25℃下平衡 48h 后, 用镊子将植物种子均匀播种于土壤中(种子放置时, 保持种子胚根末端和生长方向呈直线), 盖好玻璃培养皿, 置于恒温培养箱 25℃暗处培养。当对照种子发芽率>90%, 根长度为 20mm 时, 实验结束.确定种子根和芽伸长抑制浓度(ID), 使其抑制率在 10%~60%之间, 开始正式试验。抑制率(ID)可通过式(1)计算:

$$\text{抑制率 (ID)} = (1 - B/A) * 100\% \quad (1)$$

式中: A 为对照根或芽的伸长, mm; B 为处理浓度下根或芽的伸长, mm。

## 2.2.3 正式试验

单一污染实验 根据预备实验结果, 在种子发芽和根伸长 IC 达到抑制率 10%~60% 范围内, 设置 6 个不同处理浓度, 磺胺嘧啶的处理浓度为: 西红柿为 2.0、5.0、10、15、20、25 mg/kg; 小白菜为 0.5、0.8、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/kg; 黄瓜为 30、50、100、150、200、250 mg/kg; 萝卜为 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/kg; 铜的处理浓度为: 西红柿和萝卜为 10、100、200、300、400、500 mg/kg; 小白菜和黄瓜为 10、50、100、150、200、250 mg/kg。每个处理 20 粒种子, 实验设 3 个重复。在与预备试验相同的温度和水分条件下, 进行作物种子发芽与生长培养试验。实验结束时, 测定各处理土壤的植株根、地上部长度 (根长的测定以胚轴与根之间的过点开始), 计算根长度、芽长度的平均值及标准偏差, 并以剂量-抑制率绘制曲线, 进行回归分析, 计算 ID<sub>50</sub>。

复合污染实验 为了与单一污染实验相对应, 小白菜、西红柿、黄瓜和萝卜的 SD 浓度同样设定为 0.5、0.8、1.0、1.5、2.0、2.5, 2.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0, 30、50、100、150、200、250, 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/kg Cu<sup>2+</sup>的浓度设置为 0、100.0、300.0 mg/kg, 每个处理 20 粒种子, 3 次重复。在与预备试验相同的温度和水分条件下, 进行作物种子发芽与生长培养试验。

## 2.3 数据分析

采用 SPSS17.0 和 Origin7.5 数据处理软件(美国 Microcal Software 公司)对数据进行方差分析及回归分析, 计算出  $ID_{50}$ 。对剂量-效应曲线进行拟合并作图。实验数据结果采用平均值  $X \pm SD$ (标准差)表示, 差异显著性水平为  $p < 0.05$ 。

## 2.4 结果与讨论

### 2.4.1 SD 对 4 种蔬菜根伸长和芽伸长的影响

SD 污染对 4 种蔬菜根伸长与芽伸长的影响和作物根伸长、芽伸长与土壤中 SD 浓度的关系见图 2-1 和表 2-1。西红柿种子在 SD 的污染胁迫下, 出现明显的中毒症状, 与铜的胁迫相比, 西红柿种子的幼根明显变细。由表 2-1 方差分析可知, 土壤中 SD 浓度与西红柿根伸长和芽伸长抑制率具有显著相关性 ( $p < 0.01$ )。但是土壤中 SD 浓度与西红柿发芽抑制率之间不具有相关性 ( $p > 0.05$ )。土壤 SD 浓度与西红柿根伸长和芽伸长抑制率回归方程见表 2-1。由回归方程可以求出 SD 对西红柿的  $IC_{50}$  值 (根为  $33.64 \text{ mg/kg}$ , 芽为  $64.98 \text{ mg/kg}$ ), 由此可知, 根比芽更敏感。由相关分析可知, 西红柿的根伸长、芽伸长抑制率与 SD 浓度具有很好的相关性 ( $R^2_{\text{根}}=0.9680$ ,  $R^2_{\text{芽}}=0.9110$ ), 但是发芽抑制率与 SD 浓度的相关性较差 ( $R^2_{\text{发芽}}=0.5832$ ), 根伸长是在测量的所有指标 (包括根伸长、芽伸长和发芽) 中对土壤中 SD 浓度的变化最敏感的。

由方差分析可知, 土壤中 SD 浓度与小白菜根伸长和芽伸长抑制率具有显著相关性 ( $p < 0.05$ )。但是土壤中 SD 浓度与小白菜发芽抑制率之间不具有相关性 ( $p > 0.05$ )。由回归方程可以求出 SD 对小白菜的  $IC_{50}$  值 (根为  $1.767 \text{ mg/kg}$ , 芽为  $8.786 \text{ mg/kg}$ ), 由此可知, 根比芽更敏感。由图 2-1(b)及相关分析可知, 小白菜的根伸长、发芽抑制率与 SD 浓度具有很好的线性相关性 ( $R^2_{\text{根}}=0.941$ ,  $R^2_{\text{发芽}}=0.915$ ), 但是芽伸长抑制率与 SD 浓度的相关性较差 ( $R^2_{\text{芽}}=0.792$ ), 小白菜根伸长是在测量的所有指标 (包括根伸长、芽伸长和发芽) 中对土壤中 SD 浓度变化最敏感的。

如图 2-1 (c) 所示, 在磺胺嘧啶单一污染时, 随着磺胺嘧啶浓度由  $30 \text{ mg/kg}$  增加到  $250 \text{ mg/kg}$ , 其对黄瓜根伸长的抑制率也由  $10.9\%$  增加到  $27.9\%$ 。对芽伸长抑制率而言, 当其浓度为  $30 \text{ mg/kg}$  时, 芽长抑制率是  $1.1\%$ , 当磺胺嘧啶浓度增加到  $250 \text{ mg/kg}$  时, 其对黄瓜芽长抑制率增加到  $16.7\%$ , 表明随着磺胺嘧啶浓度的增加, 芽受到的抑制作用明显增大。图 2-1 (d) 和表 2-1 表明, 萝卜根伸长及芽伸长抑制率与 SD 浓度之间的关

## 2.3 数据分析

采用 SPSS17.0 和 Origin7.5 数据处理软件(美国 Microcal Software 公司)对数据进行方差分析及回归分析, 计算出  $ID_{50}$ 。对剂量-效应曲线进行拟合并作图。实验数据结果采用平均值  $X \pm SD$ (标准差)表示, 差异显著性水平为  $p < 0.05$ 。

## 2.4 结果与讨论

### 2.4.1 SD 对 4 种蔬菜根伸长和芽伸长的影响

SD 污染对 4 种蔬菜根伸长与芽伸长的影响和作物根伸长、芽伸长与土壤中 SD 浓度的关系见图 2-1 和表 2-1。西红柿种子在 SD 的污染胁迫下, 出现明显的中毒症状, 与铜的胁迫相比, 西红柿种子的幼根明显变细。由表 2-1 方差分析可知, 土壤中 SD 浓度与西红柿根伸长和芽伸长抑制率具有显著相关性 ( $p < 0.01$ )。但是土壤中 SD 浓度与西红柿发芽抑制率之间不具有相关性 ( $p > 0.05$ )。土壤 SD 浓度与西红柿根伸长和芽伸长抑制率回归方程见表 2-1。由回归方程可以求出 SD 对西红柿的  $IC_{50}$  值 (根为  $33.64 \text{ mg/kg}$ , 芽为  $64.98 \text{ mg/kg}$ ), 由此可知, 根比芽更敏感。由相关分析可知, 西红柿的根伸长、芽伸长抑制率与 SD 浓度具有很好的相关性 ( $R^2_{\text{根}}=0.9680$ ,  $R^2_{\text{芽}}=0.9110$ ), 但是发芽抑制率与 SD 浓度的相关性较差 ( $R^2_{\text{发芽}}=0.5832$ ), 根伸长是在测量的所有指标 (包括根伸长、芽伸长和发芽) 中对土壤中 SD 浓度的变化最敏感的。

由方差分析可知, 土壤中 SD 浓度与小白菜根伸长和芽伸长抑制率具有显著相关性 ( $p < 0.05$ )。但是土壤中 SD 浓度与小白菜发芽抑制率之间不具有相关性 ( $p > 0.05$ )。由回归方程可以求出 SD 对小白菜的  $IC_{50}$  值 (根为  $1.767 \text{ mg/kg}$ , 芽为  $8.786 \text{ mg/kg}$ ), 由此可知, 根比芽更敏感。由图 2-1(b)及相关分析可知, 小白菜的根伸长、发芽抑制率与 SD 浓度具有很好的线性相关性 ( $R^2_{\text{根}}=0.941$ ,  $R^2_{\text{发芽}}=0.915$ ), 但是芽伸长抑制率与 SD 浓度的相关性较差 ( $R^2_{\text{芽}}=0.792$ ), 小白菜根伸长是在测量的所有指标 (包括根伸长、芽伸长和发芽) 中对土壤中 SD 浓度变化最敏感的。

如图 2-1 (c) 所示, 在磺胺嘧啶单一污染时, 随着磺胺嘧啶浓度由  $30 \text{ mg/kg}$  增加到  $250 \text{ mg/kg}$ , 其对黄瓜根伸长的抑制率也由  $10.9\%$  增加到  $27.9\%$ 。对芽伸长抑制率而言, 当其浓度为  $30 \text{ mg/kg}$  时, 芽长抑制率是  $1.1\%$ , 当磺胺嘧啶浓度增加到  $250 \text{ mg/kg}$  时, 其对黄瓜芽长抑制率增加到  $16.7\%$ , 表明随着磺胺嘧啶浓度的增加, 芽受到的抑制作用明显增大。图 2-1 (d) 和表 2-1 表明, 萝卜根伸长及芽伸长抑制率与 SD 浓度之间的关

系。土壤中 SD 的浓度与萝卜的根伸长、芽伸长之间具有显著的相关性( $p < 0.01$ )。从图 2-1 (d) 可见, 土壤中 SD 的浓度与萝卜的根伸长抑制率之间呈线性相关 (表 2)。从表 2-1 回归方程和  $ID_{50}$  可以看出, SD 对根伸长的抑制大于对芽伸长的抑制。

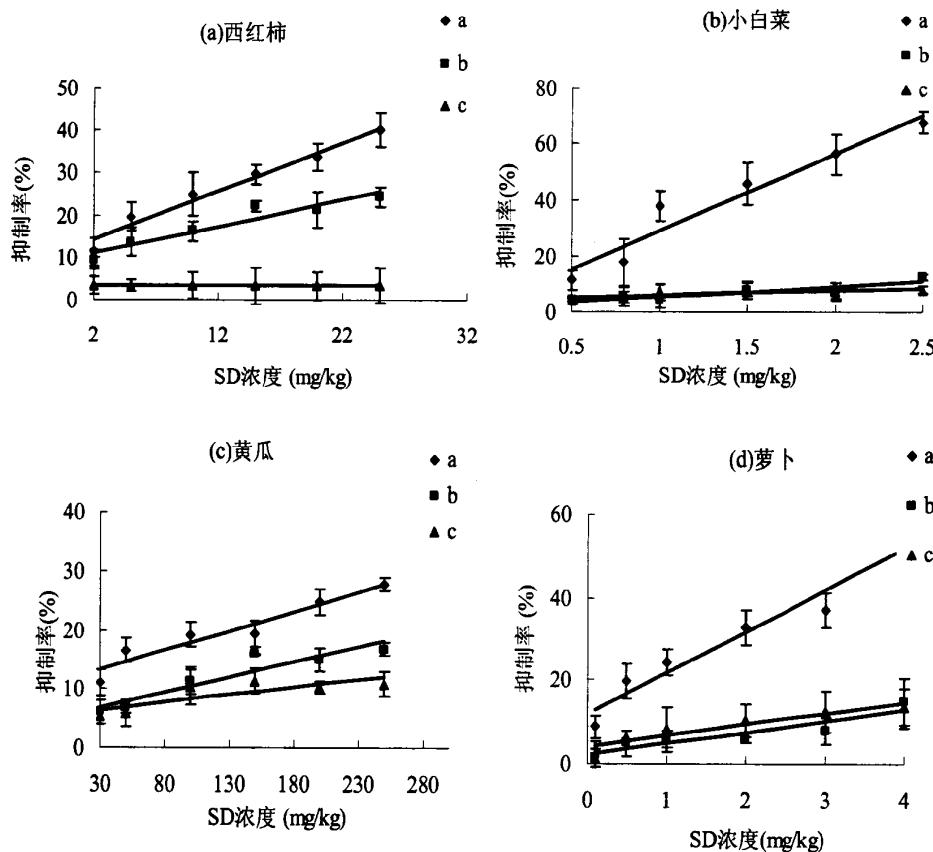


图 2-1 SD 对种蔬菜作物种子发芽的影响

表 2-1 作物根伸长、芽伸长与土壤中 SD 浓度的关系

作物种类	回归方程	$R^2$	$p$	$ID_{50}^b$
西红柿	$RI_{SD}=1.1286X+12.029$	0.968	<0.01	33.64
	$SI_{SD}=0.6153X+10.015$	0.911	<0.01	64.98
小白菜	$RI_{SD}=27.608X+1.2172$	0.941	<0.01	1.767
	$SI_{SD}=5.7155X-0.2142$	0.792	>0.05	8.789
黄瓜	$RI_{SD}=0.0669X+11.101$	0.921	<0.01	581.5
	$SI_{SD}=0.0516X+5.1871$	0.881	<0.01	868.5
萝卜	$RI_{SD}=10.043X+11.662$	0.953	<0.01	3.822
	$SI_{SD}=2.6965X+2.0502$	0.850	<0.01	17.78

从图 2-1 可见, 土壤中 SD 的浓度与西红柿、小白菜、黄瓜和萝卜的根伸长和芽伸长抑制率之间呈线性相关(表 2-1)。从表 2-1 回归方程和  $ID_{50}$  可以看出, 无论是哪种蔬菜,

对根伸长的抑制都大于对芽伸长的抑制。从  $ID_{50}$  可以得出, 小白菜根对 SD 最敏感, 而黄瓜根对 SD 最不敏感。当土壤中的 SD 浓度为  $1.77 \text{ mg/kg}$  时, 小白菜根的抑制率即达到 50%, 而土壤中的 SD 浓度为  $581.5 \text{ mg/kg}$ , 黄瓜根的抑制率才达到 50%。由相关分析可知, 西红柿、小白菜、黄瓜和萝卜根伸长抑制率与 SD 浓度的线性相关性( $R^2=0.967$ ,  $R^2=0.941$ ,  $R^2=0.921$ ,  $R^2=0.953$ )要好于芽伸长抑制率与 SD 浓度的线性相关性( $R^2=0.911$ ,  $R^2=0.792$ ,  $R^2=0.881$ ,  $R^2=0.850$ )。另外, 方差分析表明, 土壤中 SD 的浓度与西红柿、黄瓜、萝卜根伸长、芽伸长和小白菜的根伸长之间具有显著相关性( $p<0.01$ ), 而与小白菜的芽伸长之间不具有相关性( $p>0.05$ )。本研究表明, 根伸长在实验研究的所有指标(根伸长、芽伸长、幼苗的干重和发芽率)中对外源污染物浓度的变化最为敏感, 这与宋玉芳等<sup>[33]</sup>、金彩霞等<sup>[43]</sup>的研究结论是相一致的。

磺胺类药物对西红柿和小白菜根和芽伸长产生较强的毒害效应。其毒性主要是植物体内该污染物与叶酸相互竞争的结果, 叶酸与嘌呤合成有关, 而嘌呤是细胞分裂素和脱落酸的前体, 因此植物吸收兽药而降低了对叶酸的吸收, 从而影响了其正常的生理功能<sup>[44]</sup>。在 SD 的胁迫下, 作物可能因吸收药物, 体内缺乏细胞生长所需的叶酸, 故根伸长和芽伸长受到较强的抑制, 但其具体作用机制有待于进一步研究。

#### 2.4.2 Cu 对 4 种蔬菜根伸长和芽伸长的影响

由图 2-2(a)可知, Cu 对西红柿根伸长和芽伸长具有极显著的影响( $p<0.01$ ), 但是在实验浓度范围内, 土壤中 Cu 浓度与西红柿发芽抑制率之间不具有相关性( $p>0.05$ )。当土壤中 Cu 浓度为  $10 \text{ mg/kg}$  时, 西红柿的根伸长抑制率分别为-3.3%, 即此时 Cu 促进了作物的生长。而在高浓度的 Cu 胁迫下, 作物受害明显, 根伸长收到显著的抑制, 土壤中 Cu 的浓度为  $600 \text{ mg/kg}$  时, 西红柿根伸长抑制率为 56.1%。由表 2-2 相关分析可知, 西红柿的根伸长、芽伸长抑制率与 Cu 浓度具有很好的相关性( $R^2_{\text{根}}=0.9588$ ,  $R^2_{\text{芽}}=0.952$ ), 但是发芽抑制率与铜浓度的相关性较差( $R^2_{\text{发芽}}=0.4857$ ), 根伸长是在测量的所有指标(包括根伸长、芽伸长和发芽)中对土壤中 Cu 浓度的变化最敏感的。低 Cu 处理( $=5.0 \text{ mg/kg}$ )对西红柿根系伸长均有促进作用, 当 Cu 处理浓度增加到  $100 \text{ mg/kg}$  时, 则抑制根系伸长, 降低净伸长量。随 Cu 处理浓度进一步增加, 根系净伸长量的总趋势均先上升后下降。方差分析表明, 其种子发芽率、幼芽的干重与土壤中 Cu 浓度之间不具有显著相关性( $p>0.05$ )。

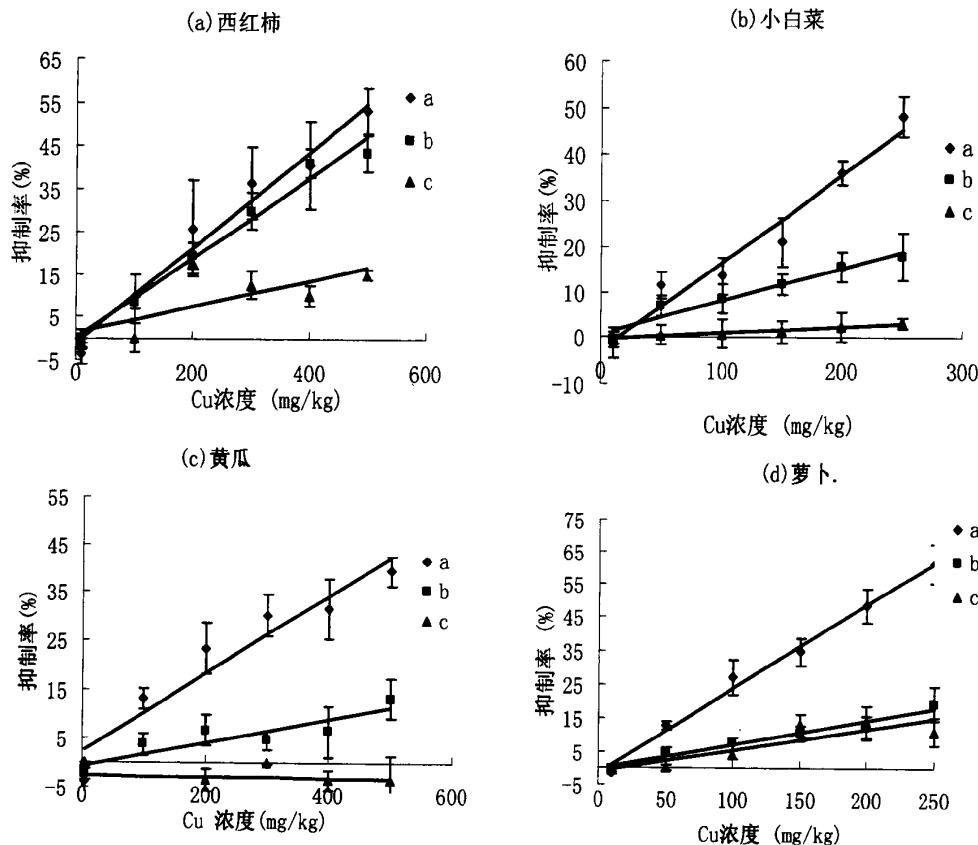


图 2-2 Cu 对 4 种蔬菜作物种子发芽的影响

表 2-2 作物根伸长、芽伸长与土壤中 Cu 浓度的关系

作物种类	回归方程	$R^2$	$p$	$IC_{50}^b$
西红柿	$RI=0.1119X-1.2147$	0.972	<0.01	457.7
	$SI=0.0946X-0.1857$	0.979	<0.01	530.5
小白菜	$RI=0.1935X-2.9375$	0.961	<0.01	273.6
	$SI=0.0727X+0.8361$	0.946	<0.01	676.2
黄瓜	$RI=0.0799X+2.2521$	0.921	<0.01	597.6
	$SI=0.0240X+0.5979$	0.888	<0.01	2108
萝卜	$RI=0.2528X-1.5586$	0.991	<0.01	203.9
	$SI=0.0721X-0.0359$	0.959	<0.01	693.9

由图 2-2(b)、图 2-2(d)及表 2-2 知, 土壤中 Cu 浓度与小白菜和萝卜的根伸长抑制率、芽伸长抑制率之间具有显著的线性相关( $p < 0.01$ )。当土壤中 Cu 的浓度为 10mg/kg 时, 小白菜和萝卜的根伸长抑制率分别为-1.24%和-1.63%, 即此时药物促进了作物的生长。而在高浓度 Cu 胁迫下, 作物受害症状明显, 根伸长受到显著抑制, 土壤中 Cu 浓度为 250mg/kg 时, 小白菜和萝卜根伸长抑制率分别为 48.26% 和 61.51%。由相关分析可知, 小白菜的根伸长、芽伸长抑制率与 Cu 浓度具有很好的相关性( $R^2_{\text{根}}=0.9592, R^2_{\text{芽}}=0.9832$ ),

但是发芽抑制率与 Cu 浓度的相关性较差 ( $R^2_{\text{发芽}}=0.781$ )，根伸长对土壤中 Cu 浓度的变化最敏感的。低  $\text{Cu}^{2+}$  处理( $=3.0$ )对小白菜根系伸长均有促进作用，当  $\text{Cu}^{2+}$  处理浓度增加到  $5.0 \text{ mg/kg}$  时，则抑制根系伸长，降低净伸长量。

图 2-2(c)显示了 Cu 对黄瓜芽长的影响。从表 2-2 可以看出，Cu 和磺胺嘧啶单一污染均对黄瓜的芽伸长表现出显著的抑制作用( $p<0.01$ )。如当 Cu 浓度为  $100 \text{ mg/kg}$  时，其对黄瓜芽长的抑制率是  $3.8\%$ ，当 Cu 浓度增加到  $500 \text{ g/kg}$  时，其对黄瓜芽长的抑制率增加到  $19.2\%$ ，表明 Cu 对黄瓜芽长的抑制作用显著，但与 Cu 对根伸长的抑制作用相比，芽伸长受到的抑制作用相对较小。(没有根伸长的数据)

由图 2-2 及表 2-2 可知，土壤中 Cu 浓度与 4 种蔬菜的根伸长、芽伸长抑制率之间具有显著线性相关关系( $p<0.01$ )。当土壤中 Cu 的浓度为  $10 \text{ mg/kg}$  时，西红柿和小白菜的根伸长抑制率分别为  $-3.56\%$  和  $-1.24\%$ ，即此时 Cu 促进了作物的生长，黄瓜和萝卜根伸长抑制率也表现为相同的趋势。而在高浓度 Cu 胁迫下，作物受害症状明显，根伸长受到显著抑制，土壤中 Cu 浓度为  $250 \text{ mg/kg}$  时，小白菜根伸长抑制率为  $48.3\%$ ，土壤中 Cu 浓度为  $500 \text{ mg/kg}$  时，西红柿根伸长抑制率为  $53.0\%$ 。由  $ID_{50}$  可知，与 SD 对四种蔬菜的影响类似，Cu 对 4 种蔬菜根伸长的抑制大于对 4 种蔬菜芽伸长的抑制，且萝卜根对土壤中 Cu 浓度最敏感，而黄瓜对土壤中 Cu 的耐性最强。与 SD 对作物种子发芽影响相同，在试验浓度范围内，土壤中 Cu 的浓度对西红柿和小白菜种子发芽抑制率无显著影响( $p>0.05$ )。

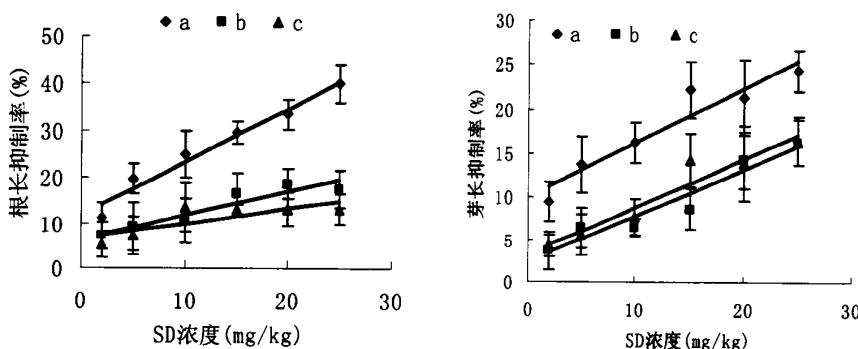
Cu 是植物生长发育所必需的营养元素，它参与植物光合作用，并且是超氧化物歧化酶、多酚氧化酶、细胞色素氧化酶和抗坏血酸氧化酶等组成成分<sup>[45-46]</sup>，当 Cu 过量时，又会对植物产生毒害从而使植物根伸长受阻、根茎生物量减少等<sup>[47]</sup>，其原因可能是，过量的 Cu 使细胞膜的通透性下降，导致 Cu 渗入细胞膜而产生毒害作用，进而影响细胞器的结构和功能<sup>[48]</sup>。此外，有研究表明，Cu 能够破坏植物根尖细胞有丝分裂过程中纺锤体的形成，从而使根尖细胞无法正常分裂，最终阻碍根的伸长<sup>[49]</sup>。

在土壤受到 SD、Cu 单一污染时，土壤中污染物的含量与西红柿和小白菜的根伸长抑制率显著相关( $p<0.01$ )，而与其芽伸长抑制率相关性没有达到显著水平( $p>0.05$ )，同时对种子发芽率无显著影响( $p>0.05$ )。这可能与种子发芽和根伸长的生长过程有关。通常种子发芽过程除了受外界环境影响外，还可从胚内得到养分供应，土壤污染对种子发芽的毒害作用在一定浓度范围内仅表现为部分抑制，只有土壤受到严重污染时，种子发芽

才能完全被抑制。根是幼苗吸收营养元素的器官，也是直接与污染物质接触的部位，根尖的细胞分裂和分生组织的细胞伸长是根生长的两个不同的过程，这两种过程均可被污染物所影响<sup>[50]</sup>，其生长和发育全过程受土壤条件的影响较大。因此，根对土壤污染的反应更敏感。

### 2.4.3 SD-Cu 复合污染对 4 种蔬菜的影响

由图 2-3 和表 2-4 可知，SD-Cu 复合污染时，土壤中 SD 含量与西红柿根伸长和芽伸长抑制率之间具有显著相关性 ( $p<0.01$ )，但当 Cu 浓度为 300 mg/kg 时，土壤中 SD 含量与西红柿根伸长抑制率之间不具有相关性 ( $p>0.05$ )，而与西红柿芽伸长抑制率之间却显著相关 ( $p<0.01$ )。土壤中 SD 含量与西红柿根伸长和芽伸长抑制率之间线性相关，随着 Cu 投加量的增加，SD 含量与西红柿根伸长抑制率之间相关性逐渐减小，而与小白菜芽伸长抑制率之间的相关性逐渐增大。在 SD-Cu 复合污染作用下，Cu 与 SD 对西红柿根伸长和芽伸长抑制率有明显的拮抗作用。Cu 的加入降低了 SD 对西红柿根伸长和芽伸长的抑制作用，随着  $\text{Cu}^{2+}$  加入量的增加，拮抗作用增强。当土壤中 SD 浓度为 20 mg/kg 时，在 SD 单一作用下，西红柿根伸长和芽伸长抑制率分别为 33.6% 和 21.4%；当加入 100 mg/kg 的 Cu 时，西红柿根伸长和芽伸长抑制率分别减少到 18.8% 和 14.3%；当加入 300 mg/kg 的 Cu 时，西红柿根伸长和芽伸长抑制率又分别减少到 13.3% 和 13.9%。与 SD 单一污染相比，不论是根伸长抑制率还是芽伸长抑制率都明显降低，这说明在 Cu 与 SD 复合污染条件下，Cu 的加入是毒性降低的主要原因。由回归方程可知，在 Cu 浓度分别为 0, 100, 300 mg/kg 西红柿的根伸长抑制率达到 50% 时，土壤中 SD 浓度随 Cu 浓度的增加而增加，其  $\text{ID}_{50}$  分别为 33.6、75.5 和 160.3 mg/kg。



注: a. $\text{Cu}^{2+}$  0      b. $\text{Cu}^{2+}$  100mg/kg      c. $\text{Cu}^{2+}$  300mg/kg

图 2-3 SD-Cu 复合污染对西红柿根伸长和芽伸长的影响

表 2-3 SD-Cu 复合污染对西红柿根伸长的影响

Cu(mg/kg)	SD(mg/kg)						
	0	2	5	10	15	20	25
0	3.42±0.26a	2.96±0.57b	2.78±0.58bc	2.53±0.34c	2.32±0.44c	2.38±0.45c	2.32±0.48c
100	2.88±0.42a	2.80±0.59a	2.72±0.51a	2.35±0.48a	2.25±0.36b	2.31±0.36b	2.24±0.33b
300	2.81±0.58a	2.76±0.52a	2.70±0.42a	2.25±0.33a	2.17±0.36a	2.21±0.29a	2.17±0.33a

表 2-4 在相同 Cu 浓度作用下 4 种蔬菜根/芽伸长抑制率与土壤中 SD 的关系

作物种类	铜浓度	回归方程	R <sup>2</sup>	p	ID <sub>50</sub>
西红柿	0	y(根)=1.1286x+12.029	0.967	<0.01	33.6
		y(芽)=0.6153x+10.015	0.911	<0.01	64.9
	100	y(根)=0.5913x+5.3462	0.893	<0.01	75.5
		y(芽)=0.5389x+2.4166	0.935	<0.01	88.3
	300	y(根)=0.2608x+8.1916	0.625	>0.05	160.3
		y(芽)=0.5573x+3.256	0.928	<0.01	83.8
	小白菜	y(根)=27.608x+1.2172	0.940	<0.01	1.76
		y(芽)=5.7155x-0.2142	0.715	>0.05	8.78
		y(根)=2.4575x+13.855	0.182	>0.05	14.7
		y(芽)=3.1798x+8.6582	0.764	>0.05	13.0
		y(根)=8.0861x+11.785	0.546	>0.05	4.72
		y(芽)=6.697x+1.358	0.978	<0.01	7.26
萝卜	0	y(根)=10.043x+11.662	0.952	<0.01	3.81
		y(芽)=2.6965x+2.0502	0.849	<0.01	17.7
	100	y(根)=9.3356x+19.045	0.958	<0.01	3.31
		y(芽)=0.6555x+23.179	0.163	>0.05	40.9
	300	y(根)=6.9704x+30.44	0.980	<0.01	2.81
		y(芽)=5.3927x+4.1543	0.896	<0.01	8.51
	黄瓜	y(根)=0.0669X+11.101	0.921	<0.01	581.4
		y(芽)=0.0516X+5.1871	0.881	<0.05	868.4
		y(根)=0.0545X+15.897	0.759	<0.05	625.7
		y(芽)=0.0889X+10.167	0.898	<0.05	448.1
		y(根)=0.0257X+22.197	0.764	<0.05	1081.8
		y(芽)=0.0816X+7.7716	0.952	<0.01	518.1

由图 2-4 和表 2-4 可知, SD 和 Cu 复合污染与小白菜根伸长和芽伸长抑制率之间线性相关 ( $p<0.05$ ) , 但是当 Cu 浓度为 300 mg/kg 时, 小白菜芽伸长抑制率和土壤中 SD 浓度具有显著性相关性 ( $p <0.01$ ) 。由  $R^2$  知, 当 Cu 浓度为 0 时, SD 与小白菜的根伸长相关性较好, 但 SD 与小白菜芽伸长抑制率相关性较差, 随 Cu 浓度的增加, SD 与小白菜根伸长抑制率之间的相关性越来越差, 而与小白菜芽伸长抑制率之间的相关性越来

越好，并且 SD 与小白菜芽伸长抑制率之间的相关性要好于与根伸长抑制率之间的相关性。二者复合污染对小白菜芽伸长抑制率的影响比较复杂，当 Cu 的浓度为 100 mg/kg 时，这两种污染物之间为协同作用；当 Cu 浓度为 300 mg/kg 时则为拮抗作用。这说明，随着土壤中 Cu 浓度的增加，Cu 与 SD 对根伸长的拮抗作用强度也明显增加，但对小白菜芽伸长的协同作用却降低。由图 2-4 知，当加入 Cu 浓度达 300 mg/kg 时，Cu 与 SD 对小白菜芽伸长表现为协同作用。由图 2-4 可知，与单一污染相比，加入 Cu 后，在相同的 SD 浓度下，小白菜根伸长抑制率明显降低，且随土壤中 Cu 量的增加，其根伸长抑制率先降低后增加；但是小白菜芽伸长抑制率却明显升高，随土壤中 Cu 的增加，其芽伸长抑制率也是先降低后增加，这说明 Cu 的加入降低了 SD 对根的毒性却增加了对小白菜芽的毒性。同时该结果进一步说明，Cu 是在相同 SD 浓度下造成小白菜根伸长和芽伸长变化的主要原因。另外，在 Cu 浓度分别为 0, 100, 300 mg/kg 时，土壤中 SD 浓度 (ID<sub>50</sub>) 分别为 1.8、14.7 和 4.7 mg/kg。可以看出，随着土壤中 Cu 浓度的增加，SD 对小白菜的 ID<sub>50</sub> 呈现先增加后降低的趋势。

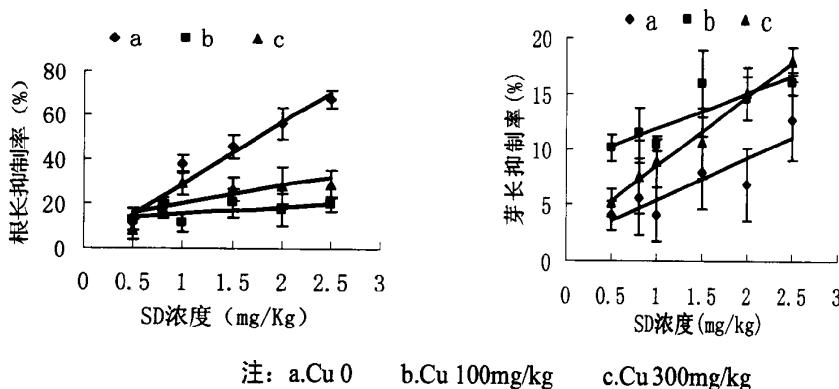


图 2-4 SD-Cu 复合污染对小白菜根伸长和芽伸长的毒性效应

表 2-5 SD-Cu 复合污染对小白菜根伸长的影响

Cu(mg/kg)	SD(mg/kg)						
	0	0.5	0.8	1	1.5	2	2.5
0	3.36±0.57a	3±0.61b	2.77±0.49bc	2.23±0.32c	1.83±0.38d	1.72±0.26d	1.57±0.30d
	a	a	a	a	a	a	a
100	2.11±0.52a	2.04±0.48a	1.96±0.44a	1.95±0.48a	1.85±0.37a	1.86±0.56a	1.82±0.56a
	b	b	b	a	a	a	a
300	2.0±0.62a	2.03±0.39a	1.90±0.32a	1.65±0.54b	1.75±0.56b	1.74±0.59b	1.71±0.57b
	b	b	b	a	a	a	a

由表 2-4 和图 2-5 可知，SD-Cu 复合污染与萝卜根伸长和芽伸长抑制率之间线性相

关 ( $p<0.05$ )。在低浓度 SD 的胁迫下, 随着 Cu 投入量的增加, 其对萝卜根伸长和芽伸长抑制率也相应的增加, 且差异较大。而在高浓度 SD 的胁迫下, 表现出随 Cu 投加量的增加对萝卜根伸长和芽伸长抑制率的差异逐渐减小。由表 3 回归方程可知, 在加入 Cu 的浓度分别为 0、100、300mg/kg, 萝卜根伸长抑制率为 50% 时, 其  $ID_{50}$  分别为 3.82、3.32、2.81mg/kg, 这说明在 Cu-SD 复合污染条件下, Cu 的加入在一定程度上增加了 SD 对萝卜的生物毒性。

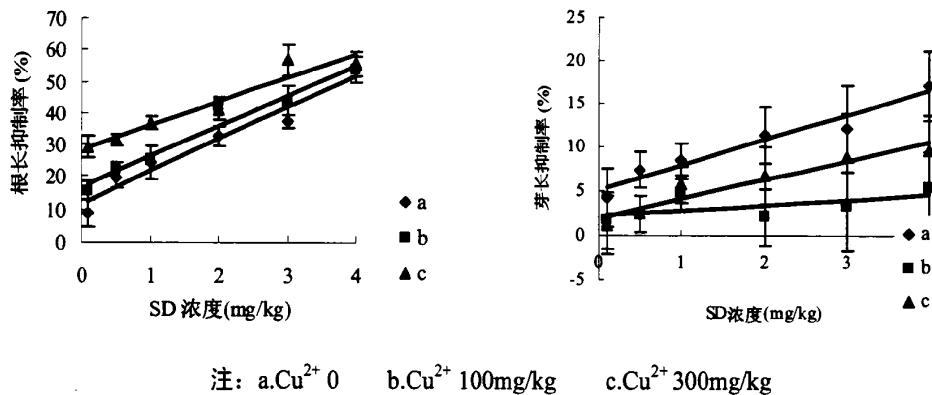


图 2-5 SD-Cu 复合污染对萝卜根伸长和芽伸长的毒性效应

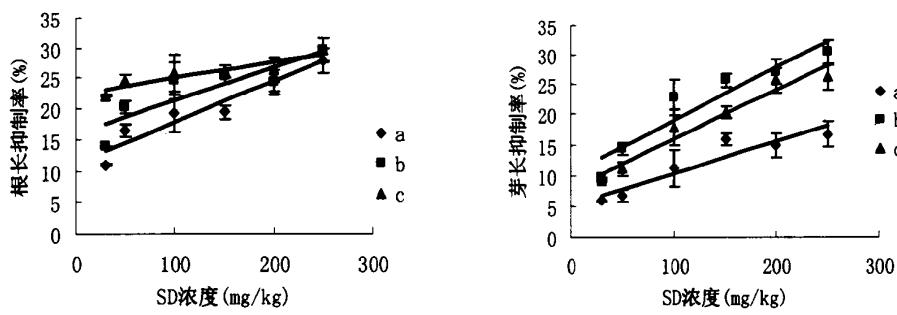
表 2-6 SD-Cu 复合污染对萝卜根伸长的影响

Cu(mg/kg)	SD(mg/kg)						
	0	0.1	0.5	1	2	3	4
0	4.55±0.56a	4.04±0.68b	3.64±0.35bc	3.44±0.27c	3.06±0.36c	2.86±0.18cd	2.85±0.18d
100	3.88±0.23a	3.85±0.31a	3.53±0.17b	3.41±0.34b	2.75±0.33c	2.56±0.38c	2.1±0.34d
300	3.4±0.42a	3.22±0.40a	3.12±0.34a	2.88±0.19b	2.69±0.56b	1.96±0.32c	2.01±0.32c

图 2-6 SD-Cu 复合污染对黄瓜根伸长和芽伸长的毒性效应。在研究 Cu 和 SD 复合污染对黄瓜根伸长的影响过程中, 由表 2-4 方差分析和回归分析知, 土壤中 Cu 浓度为 100、300 mg/kg 时, 土壤中 SD 浓度与黄瓜根伸长抑制率之间具有相关性( $p<0.05$ )。我们还发现, 在低磺胺嘧啶浓度( $<150$  mg/kg)条件下, Cu 的存在增加了 SD 的生物毒性; 而在较高磺胺嘧啶浓度( $>150$  mg/kg)条件下, Cu 的存在则降低了 SD 的生物毒性但是影响不大。如磺胺嘧啶单一污染浓度为 30 mg/kg 时, 对黄瓜根伸长的抑制率为 10.9%, 在此浓度下, 当其与 300 mg/kg 的 Cu 复合污染时, 对黄瓜根伸长的抑制率增加到 25.9%; 当 SD

浓度为 250 mg/kg 时, 对黄瓜根伸长的抑制率为 27.9%; 当其与 300 mg/kg 的 Cu 复合污染时, 黄瓜根伸长的抑制率则降低到 26.3%。但是, 在 SD 浓度下, 随着 Cu 浓度的增加, 它们的联合毒性基本呈逐渐增加趋势。

由图 2-6 可知, 在相同 Cu 浓度下, 土壤中 SD 浓度与黄瓜根伸长抑制率之间具有显著的相关性( $p<0.05$ ), 且线性关系好。Cu 的加入在 SD 低浓度(<150 mg/kg) 时降低了 SD 对黄瓜芽长的抑制作用, 但随着 Cu 浓度的增大, 这种降低作用有所减小, 即联合毒性作用增加; 但在 SD 高浓度(>150 mg/kg) 时却增加了磺胺嘧啶对黄瓜芽长的抑制作用。以 SD 浓度为 100 mg/kg、250 mg/kg 为例, SD 单独作用时, 黄瓜芽长抑制率分别为 13.9%、16.7%, 当其与 100 mg/kg 的 Cu 交互作用时, 黄瓜芽长抑制率分别为 13.4%、30.6%。



注: a.  $\text{Cu}^{2+}$  0      b.  $\text{Cu}^{2+}$  100mg/kg      c.  $\text{Cu}^{2+}$  300mg/kg

图 2-6 SD-Cu 复合污染对黄瓜根伸长和芽伸长的毒性效应

表 2-7 SD-Cu 复合污染对黄瓜根伸长的影响

Cu(mg/kg)	SD(mg/kg)						
	0	30	50	100	150	200	250
0	4.48±0.38a	3.99±0.51b	3.74±0.45bc	3.66±0.43c	3.54±0.46cd	3.37±0.36cd	3.26±0.28d
100	3.10±0.42a	2.67±0.59bc	2.47±0.31bc	2.33±0.35c	2.32±0.30c	2.34±0.31c	2.18±0.33c
300	2.87±0.21a	2.23±0.23b	2.16±0.26b	2.12±0.33b	2.12±0.32b	2.12±0.29b	2.14±0.29b

Sun 等<sup>[19]</sup>研究了农药氯氰菊酯(CPM)与 Cu 复合污染对白菜种子发芽的影响, 结果表明: 土壤中 CPM-Cu 复合污染对白菜根伸长的影响要小于单一 Cu 的作用。这与本实验研究结果相同, 本实验中 SD 和 Cu 复合污染对西红柿根和芽伸长的抑制作用和小白

菜根伸长的抑制作用整体上要小于 SD 单一作用, 这可能与污染物和作物之间的作用机制有关。目前关于复合污染的作用机理主要有竞争结合位点、影响生物酶的活性、干扰生物正常的生理过程、改变生物细胞结构和功能、螯合 (或络合) 和沉淀作用以及干扰生物大分子的结构和功能等几种学说<sup>[51-53]</sup>。土壤中有机物与重金属的复合污染可能会降低重金属毒性<sup>[54-55]</sup>, 在 SD 的胁迫下, 土壤因吸附/解吸 SD, 一些表面特性发生改变, 比如有机质含量等, 土壤可能吸附更多的 Cu 而降低其生物有效性, 减少了作物根对 SD 和 Cu 的吸收, 从而降低了二者复合污染对作物的毒害作用。Inaba and Takenaka<sup>[56]</sup>研究表明, 人工合成螯合剂和有机酸能够降低 Cu 的生物毒性。两种不同的化合物交互作用时, 其自身的基团会发生作用从而改变其化学结构<sup>[57]</sup>, 可能导致拮抗作用。磺胺类药物可与 Cu 生成盐沉淀<sup>[57]</sup>, SD 中含有对氨基苯磺酰胺等, 这些基团可能与 Cu 形成稳定的 SD- Cu 复合体, 从而使 SD 的毒性减低甚至失去活性。而 SD 和 Cu 复合污染对小白菜芽伸长的抑制作用却大于单一 SD 作用机制有待于进一步的研究。总之, 有机污染物与重金属间的联合作用机制很复杂, 其毒性一般由药物的交互作用和浓度组合以及污染物本身的化学性质决定, 在一定条件下, 污染物暴露的浓度组合关系甚至起决定作用<sup>[58-59]</sup>。

## 2.5 结论

- (1) 结果表明, 无论是在Cu或SD单一污染物作用下, 根伸长抑制率和芽伸长抑制率与污染物浓度显著相关( $p<0.01$ ), 发芽抑制率与污染物浓度不相关( $p>0.05$ ); 污染物对根伸长及芽伸长的抑制高于对种子发芽的抑制; SD对4种作物的毒性效应明显强于Cu。
- (2) SD-Cu复合污染, 对西红柿的根和芽伸长的拮抗作用显著( $p<0.01$ ), 随着SD浓度的增加, 二者对西红柿的联合拮抗效应增加; 但对小白菜来说, 在低浓度Cu (100 mg/kg) 作用下, 二者的联合拮抗作用不显著( $p>0.05$ ), 随Cu的增加, 拮抗作用显著( $p<0.01$ ); 对萝卜的根和芽伸长起显著协同作用( $p<0.01$ ); 对黄瓜根伸长产生拮抗而对其芽伸长产生协同作用。不论对于西红柿、小白菜、萝卜还是黄瓜, 二者的联合效应中Cu起主要作用。
- (3) 从药物对作物生长抑制的强弱及ID<sub>50</sub>值来看, SD对4种作物的生态毒性效应远强于重金属Cu; 在本实验中, 小白菜相对于西红柿更敏感。

## 第三章 Cu-SD 复合污染对土壤-小白菜系统中土壤酶活性的影响

### 3.1 前言

兽药添加剂广泛使用，导致大量含有残留兽药的粪便作为有机肥施入农田造成土壤污染，并对土壤生态系统产生不良影响<sup>[60]</sup>。土壤酶是土壤自净容量的一个指标，土壤酶活性能提高土壤自净能力，如氰基酶能分解土壤中的氰酸氨，减少其对植物的危害<sup>[61]</sup>。在城镇和工厂的废弃物中，含有许多有毒有害的物质，研究土壤酶活性变化，是从土壤生物化学角度探索环境保护的一个新的方向。

目前有关农药与重金属污染对酶活性影响国内外已有较多报道<sup>[62-66]</sup>，而针对重金属-兽药复合污染开展的研究还很少。黄潮土广泛分布于黄淮海平原、长江中下游平原、辽河下游平原以及汾渭河谷平原，本文选其作为供试土壤，以磺胺类药物中毒性相对较大的 SD 和 Cu 作为供试药物，通过研究 Cu-SD 单一及复合污染对土壤-小白菜系统中土壤酶活性的影响，了解其对土壤生态系统的生态毒理效应，以便为药物的环境安全性评价提供理论依据。

### 3.2 材料与方法

#### 3.2.1 实验药品

Cu 为 CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O (分析纯)，广州化学试剂厂生产；原药 SD，含量不低于 99%，购于北京博亚华牧业有限公司。

#### 3.2.2 实验作物

小白菜，购于新乡市种子有限公司。

#### 3.2.3 实验土壤

实验所用土壤取自河南师范大学校内，无药物污染，晾干并研磨后过2mm筛备用。

#### 3.2.4 试验设计

将小白菜种子浸泡于 3.0%的次氯酸钠溶液中，对种子灭菌 20 min 后，用去离子水

## 第三章 Cu-SD 复合污染对土壤-小白菜系统中土壤酶活性的影响

### 3.1 前言

兽药添加剂广泛使用，导致大量含有残留兽药的粪便作为有机肥施入农田造成土壤污染，并对土壤生态系统产生不良影响<sup>[60]</sup>。土壤酶是土壤自净容量的一个指标，土壤酶活性能提高土壤自净能力，如氰基酶能分解土壤中的氰酸氨，减少其对植物的危害<sup>[61]</sup>。在城镇和工厂的废弃物中，含有许多有毒有害的物质，研究土壤酶活性变化，是从土壤生物化学角度探索环境保护的一个新的方向。

目前有关农药与重金属污染对酶活性影响国内外已有较多报道<sup>[62-66]</sup>，而针对重金属-兽药复合污染开展的研究还很少。黄潮土广泛分布于黄淮海平原、长江中下游平原、辽河下游平原以及汾渭河谷平原，本文选其作为供试土壤，以磺胺类药物中毒性相对较大的 SD 和 Cu 作为供试药物，通过研究 Cu-SD 单一及复合污染对土壤-小白菜系统中土壤酶活性的影响，了解其对土壤生态系统的生态毒理效应，以便为药物的环境安全性评价提供理论依据。

### 3.2 材料与方法

#### 3.2.1 实验药品

Cu 为 CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O (分析纯)，广州化学试剂厂生产；原药 SD，含量不低于 99%，购于北京博亚华牧业有限公司。

#### 3.2.2 实验作物

小白菜，购于新乡市种子有限公司。

#### 3.2.3 实验土壤

实验所用土壤取自河南师范大学校内，无药物污染，晾干并研磨后过2mm筛备用。

#### 3.2.4 试验设计

将小白菜种子浸泡于 3.0%的次氯酸钠溶液中，对种子灭菌 20 min 后，用去离子水

对种子反复冲洗 3 次。将小白菜种子放入光照培养箱中于 25 ℃下催芽 72 h, 发芽后将其放置于 1/2 浓度的 Hoagland 营养液中, 在光照培养箱中 25 ℃下培养 7 d (每 1 d 更换一次培养液), 设置 12 h 光照, 12 h 黑暗的循环处理, 培养 7 天后移植至已准备好的盆中。将备好的土样拌入尿素和磷酸二氢钾做底肥, 基肥量为 N 0.15g/kg, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 0.15g/kg, K<sub>2</sub>O 0.1g/kg, 混匀后放置 3 天。每盆称量 1kg 土, 把 CdCl<sub>2</sub> 和 SMM 配成溶液, 量取一定体积加入土中混匀再放置 3 天。土壤中 Cu 的浓度设为 0, 100, 300mg/kg, SD 浓度为 0, 0.1, 1, 10mg/kg, 设 (0, 0)、(0, 0.1)、(0, 1)、(0, 10)、(100, 0)、(100, 0.1)、(100, 1)、(100, 10)、(300, 0)、(300, 0.1)、(300, 1)、(300, 10) 共 12 个处理, 每个处理 3 次重复。出苗后每盆保苗 15 株。从播种时开始计时, 培养 5 天后每隔 5 天取土壤样品测定其各项指标。

### 3.2.5 样品的测定及数据处理分析

土壤脲酶、过氧化氢酶、蔗糖酶、磷酸酶活性的测定参考关松萌方法<sup>[67]</sup>。

数据处理、多重比较采用 Microsoft Excel 2003 和 SPSS17.0 软件进行, 多重比较以添加 Cu- SD 复合污染处理的酶活性与对照(未添加 Cu- SD 复合污染处理酶活性)进行比较, 差异显著性水平为 P<0.05。本试验土壤呼吸和酶活性的抑制率按 3-4 式计算:

$$\text{抑制率} = [(A-B)/A] \times 100\% \quad (3-4)$$

式中: A 为不加 Cu- SD 复合污染土壤酶活性; B 为添加 Cu- SD 复合污染土壤酶活性。

## 3.3 结果与讨论

### 3.3.1 Cu-SD 复合污染对土壤-小白菜系统中土壤脲酶活性的影响

脲酶是参与氮素循环的一种很重要的酶, 它可以促进土壤中尿素分子中酰胺氮键的水解生成的氨, 氨是植物氮素营养来源之一, 在氮肥利用和土壤环境中氮素的代谢方面意义重大<sup>[68]</sup>。因此, 土壤中脲酶的大量存在可为植物提供自身生长所需的 N<sup>[69]</sup>。图 3-1 显示 Cu-SD 复合污染对土壤脲酶活性的影响。在单一 SD 污染作用下, 不同的 SD 浓度对土壤脲酶活性的影响大体相同, 都表现为激活-抑制效应。在处理的前 15 天, SD 对土壤脲酶表现为激活效应, 在添加药物后的第 10 天, 各处理对酶活性激活率均达到最大值, 最大激活率为 52%; 随着处理时间的继续延长, 至第 20 天后各处理的脲酶活性逐渐表现为抑制效应, 并且随着 SD 浓度的增大抑制效应越明显。

对种子反复冲洗 3 次。将小白菜种子放入光照培养箱中于 25 ℃下催芽 72 h, 发芽后将其放置于 1/2 浓度的 Hoagland 营养液中, 在光照培养箱中 25 ℃下培养 7 d (每 1 d 更换一次培养液), 设置 12 h 光照, 12 h 黑暗的循环处理, 培养 7 天后移植至已准备好的盆中。将备好的土样拌入尿素和磷酸二氢钾做底肥, 基肥量为 N 0.15g/kg, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 0.15g/kg, K<sub>2</sub>O 0.1g/kg, 混匀后放置 3 天。每盆称量 1kg 土, 把 CdCl<sub>2</sub> 和 SMM 配成溶液, 量取一定体积加入土中混匀再放置 3 天。土壤中 Cu 的浓度设为 0, 100, 300mg/kg, SD 浓度为 0, 0.1, 1, 10mg/kg, 设 (0, 0)、(0, 0.1)、(0, 1)、(0, 10)、(100, 0)、(100, 0.1)、(100, 1)、(100, 10)、(300, 0)、(300, 0.1)、(300, 1)、(300, 10) 共 12 个处理, 每个处理 3 次重复。出苗后每盆保苗 15 株。从播种时开始计时, 培养 5 天后每隔 5 天取土壤样品测定其各项指标。

### 3.2.5 样品的测定及数据处理分析

土壤脲酶、过氧化氢酶、蔗糖酶、磷酸酶活性的测定参考关松萌方法<sup>[67]</sup>。

数据处理、多重比较采用 Microsoft Excel 2003 和 SPSS17.0 软件进行, 多重比较以添加 Cu- SD 复合污染处理的酶活性与对照(未添加 Cu- SD 复合污染处理酶活性)进行比较, 差异显著性水平为 P<0.05。本试验土壤呼吸和酶活性的抑制率按 3-4 式计算:

$$\text{抑制率} = [(A-B)/A] \times 100\% \quad (3-4)$$

式中: A 为不加 Cu- SD 复合污染土壤酶活性; B 为添加 Cu- SD 复合污染土壤酶活性。

## 3.3 结果与讨论

### 3.3.1 Cu-SD 复合污染对土壤-小白菜系统中土壤脲酶活性的影响

脲酶是参与氮素循环的一种很重要的酶, 它可以促进土壤中尿素分子中酰胺氮键的水解生成的氨, 氨是植物氮素营养来源之一, 在氮肥利用和土壤环境中氮素的代谢方面意义重大<sup>[68]</sup>。因此, 土壤中脲酶的大量存在可为植物提供自身生长所需的 N<sup>[69]</sup>。图 3-1 显示 Cu-SD 复合污染对土壤脲酶活性的影响。在单一 SD 污染作用下, 不同的 SD 浓度对土壤脲酶活性的影响大体相同, 都表现为激活-抑制效应。在处理的前 15 天, SD 对土壤脲酶表现为激活效应, 在添加药物后的第 10 天, 各处理对酶活性激活率均达到最大值, 最大激活率为 52%; 随着处理时间的继续延长, 至第 20 天后各处理的脲酶活性逐渐表现为抑制效应, 并且随着 SD 浓度的增大抑制效应越明显。

低浓度 Cu(100mg/kg)与 SD 复合处理下, 第 5 天和 10 天时各处理对脲酶活性都起激活作用, 激活率的大小与复合污染的 SD 浓度关系不显著, 它们对脲酶活性的影响与 Cu 单一污染时的结果很相似, 在污染物作用的第 10 天污染物对脲酶的激活率都达到最大值, 此时是 Cu 对脲酶起主要作用; 而在第 15、20 天时则表现为抑制作用, 并且随着污染物 SD 浓度的增加, 抑制作用也增强, 各处理浓度之间差异不显著, 这可能是由于 Cu 的存在增强了 SD 对土壤中脲酶的抑制作用, 即 Cu 与 SD 之间存在协同作用。高浓度 Cu(300mg/kg)与 SD 复合处理与低浓度 Cu(100mg/kg)处理相比, 在整个实验周期内, 脲酶活性受到激活, 且随着 SD 浓度的增加激活作用也增强, 脲酶活性最大提高了 35%。

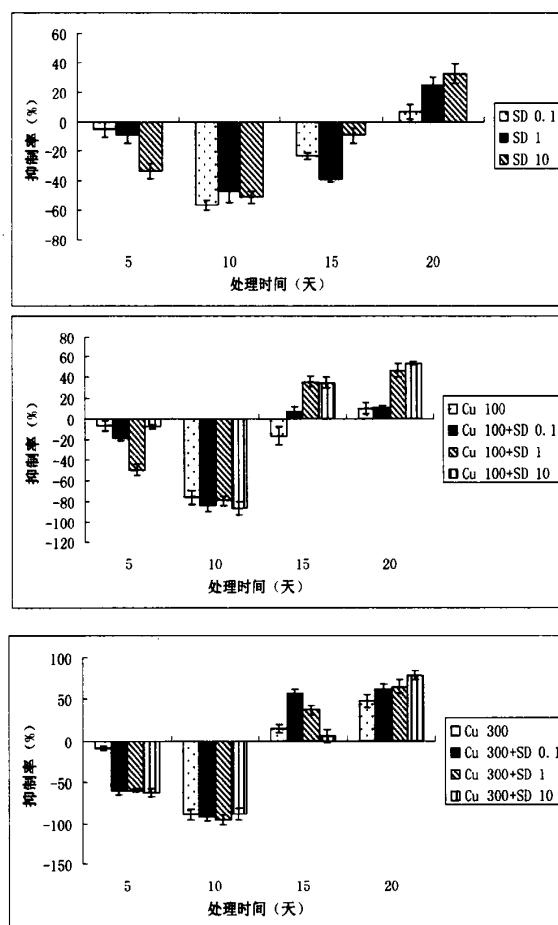


图 3-1 Cu-SD 复合污染对土壤脲酶活性的影响

磺胺类药物的基本化学结构和细菌“生长物质”一对氨基甲酸很相似, 它可以与对氨基甲酸竞争二氢叶酸合成酶, 从而妨碍二氢叶酸的形成, 进而影响核蛋白的合成, 最终抑制细菌的生长与繁殖<sup>[18]</sup>。土壤中的脲酶主要来源于植物根系和土壤中的细菌和真菌

<sup>[67]</sup>，因此，磺胺嘧啶可能是通过抑制土壤中细菌的生长及繁殖，对脲酶活性产生抑制作用。另外，刘惠君等研究了酰胺类除草剂与脲酶的相互作用机制，发现除草剂与脲酶之间有结合作用，二者之间可形成结合位点，并且溶解度越大，结合作用越强<sup>[69]</sup>。所以，药物也可能进入脲酶分子结构中并形成结合位点而发生作用，从而抑制其活性。

Cu-SD 污染土壤脲酶活性的变化则是，在低浓度 Cu(100mg/kg)处理下，脲酶先被激活再被抑制，这一现象原因可能是：磺胺嘧啶可以和 Cu 形成络合物，使土壤中的 Cu 含量减少，酶作为蛋白质，需要一定量的金属离子作为辅基，少量 Cu 的加入能促进酶的活性中心与底物间的配位结合，使酶分子及其活性中心保持一定的专性结构，改变酶催化反应的平衡性质和酶蛋白的表面电荷，从而增强酶活性。

### 3.3.2 Cu-SD 复合污染对土壤-小白菜系统中土壤蔗糖酶活性的影响

蔗糖酶在土壤中广泛存在，它们直接参与土壤有机质的代谢，能够增加土壤中溶解性有机物<sup>[70]</sup>。Cu-SD 复合污染对土壤-小白菜系统中土壤蔗糖酶活性的影响如图 3-2 所示。在 SD 单一污染下，SD 对土壤蔗糖酶活性表现出不同程度的激活效应，最大激活率不超过 35%；实验处理的第 10、15 天时，在实验浓度范围内，低浓度 (<0.1mg/kg) 或高浓度 (>10mg/kg) SD 对土壤蔗糖酶活性都表现为显著的激活作用。其原因可能是低浓度的 SD 被土壤微生物作为营养物质，其降解产物促进酶促反应，而在土壤中高浓度 SD 存在下，大量的 SD 被土壤吸附，土壤微生物对污染物的耐性增强，进而可以激活土壤酶活性。

与 SD 单一污染相同，Cu-SD 复合污染下，土壤中蔗糖酶活性都表现为激活作用。在 100mg/kg 浓度 Cu 作用下，添加 SD 能降低单一 Cu 处理下污染物对蔗糖酶的激活效应，但在实验处理的第 20 天后，土壤中添加 SD 能增强单一 Cu 处理下污染物对蔗糖酶的激活效应；在 300mg/kg 浓度 Cu 处理下，土壤中添加 SD 能增强单一 Cu 处理下污染物对土壤蔗糖酶的激活作用，说明 Cu-SD 复合污染下，在实验浓度范围内，低浓度 Cu (<100mg/kg) 处理条件下，污染物对蔗糖酶的复合效应主要表现为拮抗作用，高浓度 Cu (>300mg/kg) 处理条件下，污染物对蔗糖酶的复合效应则表现为协同作用。

药物对土壤酶活性的影响较复杂，主要原因有以下 3 方面：(1) 药物与酶分子产生直接效应，包括抑制效应、激活效应或无关<sup>[71]</sup>。(2) 加入的药物导致细胞壁渗透性增强或使细胞分解，从而释放出胞内酶，使酶活性增强<sup>[72]</sup>。(3) 由于药物和酶分子在土壤无机矿物或有机质外表面甚至内表面产生竞争性吸附作用，而部分酶分子被吸附成为游

离态酶, 从而表现出更高的活性<sup>[73]</sup>。Cu-SD 复合污染下, 污染物对蔗糖酶表现为抑制作用其原因可能是, 磷酸盐与 Cu 生成盐沉淀<sup>[73]</sup>, 产生的盐沉淀与酶分子产生直接抑制效应, 从而抑制土壤中蔗糖酶活性; 加入的 Cu 和 SD 导致小白菜细胞壁渗透性增强, 从而释放出胞内酶, 使土壤蔗糖酶活性增强<sup>[74]</sup>; Cu 和 SD 沉淀生成的盐和酶分子在土壤有机质外表面甚至内表面产生竞争性吸附作用, 部分酶分子被吸附成为游离态酶, 从而表现出更高的活性<sup>[75]</sup>。但是有关 SD-Cu 复合污染对土壤蔗糖酶活性的影响机制, 有待于进一步研究。

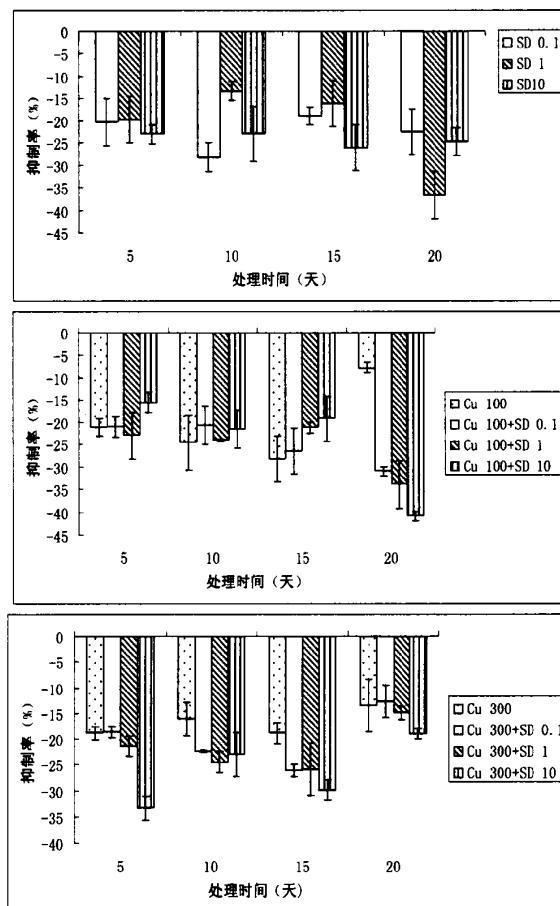


图 3-2 Cu-SD 复合污染对土壤蔗糖酶活性的影响

### 3.3.3 Cu-SD 复合污染对土壤-小白菜系统中土壤过氧化氢酶活性的影响

从图 3-3 可以看出, 单一 SD 处理条件下, 添加 0.1~10 mg/kg SD 处理后的第 5 天, 高浓度的 SD 能在不同程度上激活土壤中过氧化氢酶的活性, 随时间的推移, 在第 10 天至第 15 天, 过氧化氢酶活性逐渐恢复, 表现出微弱的抑制或激活效应。至第 20 天,

各处理对过氧化氢酶活性的影响又表现出一定的激活作用。从总体上看，在试验浓度内，磺胺嘧啶对土壤过氧化氢酶活性的影响表现出“激活—抑制—激活”的规律。

Cu-SD 复合污染下，污染物对土壤中过氧化氢酶活性的影响表现出“抑制—激活—抑制—激活”的规律。在相同低 Cu 浓度( $<100\text{mg/kg}$ )处理条件下，土壤中添加 SD 能降低单一 Cu 处理下污染物对土壤过氧化氢酶的激活或抑制效应，甚至在处理的第 5 天，土壤中添加 SD 使土壤过氧化氢酶转而表现为抑制效应；在相同高 Cu 浓度( $>300\text{mg/kg}$ )处理条件下，在实验处理的第 10 天添加 SD 能增强单一 Cu 处理下污染物对土壤过氧化氢酶的激活效应，在添加  $1\text{ mg/kg}$  SD 时，激活率达到最大值 22%，随着时间的推移，土壤中添加 SD 能降低单一 Cu 处理下污染物对土壤过氧化氢酶的激活或抑制效应。

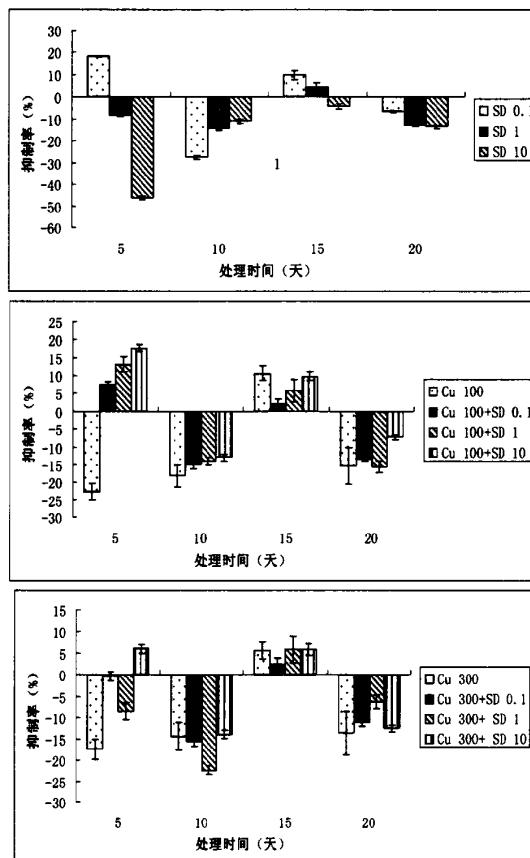


图 3-3 Cu-SD 复合污染对土壤过氧化氢酶活性的影响

Cu 和 SD 复合污染初期对土壤-小白菜系统中土壤过氧化氢活性则表现为激活效应其原因可能是加入药物的初期，土壤中存在大量营养物质（如碳源、氮源等），部分好氧微生物得以增殖，从而使过氧化氢酶活性激活<sup>[76]</sup>；另一方面，药物进入土壤以后，微

生物为了减少其对自身的毒害作用需要通过氧化代谢作用将药物分解, 同时为了保护自身不受氧化剂—过氧化氢的危害而必须产生过氧化氢酶来分解残留在体内的过氧化氢, 因此, 微生物在受到污染物干扰的初期会表现出一定的过氧化氢酶激活效应<sup>[77]</sup>。

### 3.3.4 Cu-SD 复合污染对土壤-小白菜系统中土壤磷酸酶活性的影响

Cu-SD 复合污染对土壤磷酸酶活性的影响见图 3-4。在磺胺嘧啶单一污染条件下, 在施药后的第 5 天至第 10 天, 各处理对磷酸酶活性都表现出激活效应, 其中浓度 10mg/kg 激活率达到最大, 分别达到 43% 和 42%, 在处理的第 15 天, 土壤中磷酸酶活性则恢复至对照组且表现为微弱的抑制效应, 随着处理时间的增加, 至第 20 天, 各处理对磷酸酶活性又表现出激活效应。从总体上看, 磺胺嘧啶单一污染条件下, 土壤磷酸酶主要表现为激活效应。

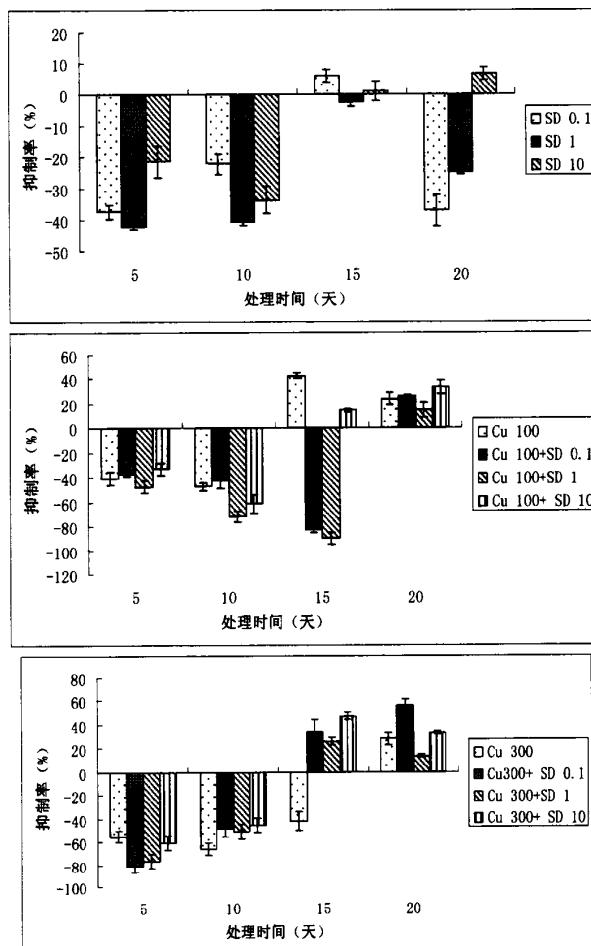


图 3-4 Cu-SD 复合污染对土壤磷酸酶活性的影响

与磺胺嘧啶单一污染不同, Cu-SD 复合污染对土壤-小白菜系统中土壤磷酸酶活性则表现为激活—抑制的规律。在施药后的第 5 天至第 10 天, 100mg/kg 浓度 Cu 处理条件下, 各处理对磷酸酶活性都表现为激活效应, 其中加入 SD 浓度为 1mg/kg 时激活率最大, 分别达到 50% 和 72%; 至第 20 天, 各处理对磷酸酶活性激活效应均比较显著, 激活率在 20%~45% 之间。

### 3.5 结论

本文通过研究在不同浓度条件下 SD—Cu 单一及复合污染对土壤脲酶、蔗糖酶、过氧化氢酶及磷酸酶活性 4 个指标的影响, 得到以下结论:

- (1) 单一 SD 污染条件下, 对土壤酶活性的影响效果及作用规律不同。SD 对脲酶, 磷酸酶活性的影响主要表现为“激活—抑制”作用; 对蔗糖酶活性的影响表现为激活作用; 对过氧化氢酶活性的影响表现为“激活—抑制”作用。
- (2) Cu-SD 复合污染条件下, 在相同 Cu 浓度作用下, SD 对脲酶活性的影响表现为“激活—抑制”; 对蔗糖酶活性的影响为激活; 对过氧化氢酶活性的影响主要表现为“抑制—激活—抑制—激活”; 对磷酸酶活性的影响表现为“激活—抑制”。

## 第四章 Cu-SD 复合污染对小白菜幼苗生理生化特性的影响

### 4.1 前言

植物在生长和发育过程中不可避免地要暴露于不同类型和程度的胁迫，如：干旱、高温、寒冷、强光、紫外线、重金属、各种有机物、大气污染物等，导致植物体内氧自由基（AOS）等积累，从而引起氧化胁迫，使植物组织受到伤害<sup>[78-79]</sup>。这些 AOS 能够破坏细胞膜脂、蛋白质、细胞色素以及核酸等，使植物的活力和生产力大幅下降，生长发育异常，甚至能够使某些植物种类死亡<sup>[78]</sup>。同时，植物在进化过程中也形成了各种清除和降低 AOS 的保护机制，抗氧化酶系统是其中之一<sup>[78]</sup>。抗氧化酶系统通过一系列抗氧化酶包括超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化物酶（POD）、过氧化氢酶（CAT）等相继和同时作用来清除 AOS<sup>[79]</sup>。SOD 存在于多种细胞器，能够催化  $O_2^-$  生成  $H_2O_2$  和  $O_2$ 。 $H_2O_2$  能够被多种抗氧化酶所分解如存在于过氧化物酶体、乙醛酸循环体以及线粒体内的 CAT 能够清除大部分光呼吸以及呼吸作用生成的  $H_2O_2$ <sup>[79-83]</sup>。POD 能够参与木质素的生物合成并且能够把  $H_2O_2$  转变为水，由于它们的电子供体很广泛包括愈创木酚，因此 POD 也可称为愈创木酚过氧化物酶<sup>[79-84]</sup>。

人类生活水平的日益提高，增大了对肉禽的需求，也带动了规模化养殖业的快速发展，后果之一就是兽药和饲料添加剂的大量使用。这些药物并不会被动物完全吸收，而是会以粪肥等形式进入土壤-植物系统。Cu 是有毒的环境污染物，随着冶金化工等工业的发展，大量的 Cu 进入环境，造成环境污染，特别是对农作物的生长能够产生明显危害<sup>[85]</sup>。由于大部分已有的研究主要针对作物对除草剂的反应，极少有研究针对兽药对植物或植物-土壤生态系统在生理机制上的生态效应。有些植物能够被用来作为指示重金属和农用化学品污染的生物指示<sup>[86]</sup>。POD 酶系的很大一部分被认为在植物体内具有总体保护功能，POD 酶参与清除植物组织内由于化合物或重金属暴露产生的氧自由基，由此参与增强植物组织机制性抵抗胁迫的能力<sup>[87]</sup>。叶片组织中的 POD 酶活性升高可以作为许多污染胁迫下的生物标记物<sup>[87]</sup>，但是由于 POD 酶活性变化缺少专一性，使 POD 测试法的利用受到限制<sup>[88]</sup>。对植物根系 POD 酶活性研究比较少，但也有研究发现，POD 酶活性可以作为 Ni 和 Cu 胁迫的生物标记物<sup>[89]</sup>。发芽实验结果表明，磺胺嘧啶和铜对小

白菜有毒性效应,能够抑制小白菜种子发芽以及抑制小白菜幼苗的根长和芽长<sup>[90]</sup>。本实验对是 SD-Cu 的单一及复合污染引起的小麦幼苗抗氧化酶活性 (POD、SOD 活性)、可溶性蛋白 (SP) 含量以及叶绿素含量的变化进行进一步研究, 旨在探索 SD-Cu 单一及复合胁迫下的植物—土壤系统的生理变化机制, 并且试图发现能够指示土壤—植物系统 SD-Cu 单一及复合污染的生化分子生物标记物。

## 4.2 材料与方法

### 4.2.1 供试药品

Cu 为 CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O (分析纯), 广州化学试剂厂生产; SD, 含量不低于 99%, 购于北京博亚华牧业有限公司。

### 4.2.2 实验作物

小白菜, 购于新乡市种子有限公司。

### 4.2.3 实验土壤

实验所用土壤取自河南师范大学校内, 无药物污染, 晾干并研磨后过 2mm 筛备用。

### 4.2.4 植物培养

将小白菜种子浸泡于 3.0%的次氯酸钠溶液中, 对种子灭菌 20 min 后, 用去离子水对种子反复冲洗 3 次。将小白菜种子放入光照培养箱中于 25 ℃下催芽 72 h, 发芽后将其放置于 1/2 浓度的 Hoagland 营养液中, 在光照培养箱中 25 ℃下培养 7 d (每 1 d 更换一次培养液), 设置 12 h 光照, 12 h 黑暗的循环处理, 培养 7 天后移植至已准备好的盆中。将备好的土样拌入尿素和磷酸二氢钾做底肥, 基肥量为 N 0.15g/kg, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 0.15g/kg, K<sub>2</sub>O 0.1g/kg, 混匀后放置 3 天。每盆称量 1kg 土, 把 CdCl<sub>2</sub> 和 SMM 配成溶液, 量取一定体积加入土中混匀再放置 3 天。土壤中 Cu 的浓度设为 0, 100, 300mg/kg, SD 浓度为 0, 0.1, 1, 10mg/kg, 设 (0, 0)、(0, 0.1)、(0, 1)、(0, 10)、(100, 0)、(100, 0.1)、(100, 1)、(100, 10)、(300, 0)、(300, 0.1)、(300, 1)、(300, 10) 共 12 个处理, 每个处理 3 次重复。出苗后每盆保苗 15 株。从播种时开始计时, 培养 5 天后每隔 5 天取植物样品测定其叶绿素含量、可溶性蛋白质含量、过氧化物酶超氧化物歧化酶活性等各项指标的变化。

白菜有毒性效应,能够抑制小白菜种子发芽以及抑制小白菜幼苗的根长和芽长<sup>[90]</sup>。本实验对是 SD-Cu 的单一及复合污染引起的小麦幼苗抗氧化酶活性 (POD、SOD 活性)、可溶性蛋白 (SP) 含量以及叶绿素含量的变化进行进一步研究, 旨在探索 SD-Cu 单一及复合胁迫下的植物—土壤系统的生理变化机制, 并且试图发现能够指示土壤—植物系统 SD-Cu 单一及复合污染的生化分子生物标记物。

## 4.2 材料与方法

### 4.2.1 供试药品

Cu 为 CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O (分析纯), 广州化学试剂厂生产; SD, 含量不低于 99%, 购于北京博亚华牧业有限公司。

### 4.2.2 实验作物

小白菜, 购于新乡市种子有限公司。

### 4.2.3 实验土壤

实验所用土壤取自河南师范大学校内, 无药物污染, 晾干并研磨后过 2mm 筛备用。

### 4.2.4 植物培养

将小白菜种子浸泡于 3.0%的次氯酸钠溶液中, 对种子灭菌 20 min 后, 用去离子水对种子反复冲洗 3 次。将小白菜种子放入光照培养箱中于 25 ℃下催芽 72 h, 发芽后将其放置于 1/2 浓度的 Hoagland 营养液中, 在光照培养箱中 25 ℃下培养 7 d (每 1 d 更换一次培养液), 设置 12 h 光照, 12 h 黑暗的循环处理, 培养 7 天后移植至已准备好的盆中。将备好的土样拌入尿素和磷酸二氢钾做底肥, 基肥量为 N 0.15g/kg, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 0.15g/kg, K<sub>2</sub>O 0.1g/kg, 混匀后放置 3 天。每盆称量 1kg 土, 把 CdCl<sub>2</sub> 和 SMM 配成溶液, 量取一定体积加入土中混匀再放置 3 天。土壤中 Cu 的浓度设为 0, 100, 300mg/kg, SD 浓度为 0, 0.1, 1, 10mg/kg, 设 (0, 0)、(0, 0.1)、(0, 1)、(0, 10)、(100, 0)、(100, 0.1)、(100, 1)、(100, 10)、(300, 0)、(300, 0.1)、(300, 1)、(300, 10) 共 12 个处理, 每个处理 3 次重复。出苗后每盆保苗 15 株。从播种时开始计时, 培养 5 天后每隔 5 天取植物样品测定其叶绿素含量、可溶性蛋白质含量、过氧化物酶超氧化物歧化酶活性等各项指标的变化。

#### 4.2.5 样品的处理

叶绿素的提取：称取新鲜植物叶片 0.5g 剪碎后置于研钵中，加少量石英砂、碳酸钙粉和 5ml 95% 乙醇，研成均浆后再加入乙醇 10ml，并且继续研磨至组织变白。此时静置 3~5min。取滤纸 2 张并置于漏斗中，乙醇湿润后，沿玻璃棒将提取液倒入漏斗中，过滤到 25ml 棕色容量瓶中，然后再用少量乙醇冲洗研钵、研棒及残渣数次，最后连同残渣一起倒入漏斗中。用滴管吸取乙醇，将滤纸上的叶绿体色素全部洗入容量瓶中，直至滤纸和残渣中无绿色为止。最后用乙醇定容至 25ml，摇匀待测。

粗酶液的提取：称取植物样品 0.1 g 剪碎后置于预冷研钵中，加 2 ml 预冷的 50mmol/L pH=7.8 的磷酸缓冲液，在冰浴下研磨至匀浆，继续加磷酸溶液冲洗研钵，定容到 10 ml，4 °C 下于 12000 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 min，此上清液即为粗酶液。

#### 4.2.6 样品的测定

叶绿素的测定参照周祖富方法<sup>[91]</sup>；植物可溶性蛋白质含量，过氧化物酶和超氧化物歧化酶活性的测定方法参考侯福林方法<sup>[92]</sup>；

#### 4.2.7 数据处理

所有的测定指标均重复 3 次，实验数据用 Microsoft Excel 2003 处理后，用 SPSS17.0 软件进行方差分析，差异显著性水平为  $p<0.05$ 。

### 4.3 结果与分析

#### 4.3.1 Cu-SD 单一及复合污染对小白菜幼苗叶绿素含量的影响

在单一兽药 SD 胁迫下，小白菜叶片叶绿素含量随药物剂量与时间的变化如图 4-1 所示。添加药物处理的小白菜叶片中叶绿素含量较空白低。在处理的前 10 天，各浓度与对照(CK)之间没有显著性差异( $p>0.05$ )，但随着作用时间的延长，SD 逐渐在植物叶片中积累，其毒性表现愈加明显；在处理后的第 15、20 天，高浓度(1mg/kg 和 10 mg/kg) 处理叶片叶绿素含量显著低于对照( $p<0.05$ )，说明 SD 对小白菜幼苗叶绿素的合成均有抑制作用；当暴露 20 天后，不同处理浓度之间的叶绿素含量出现了显著差异，此时，小白菜叶片直观的变化为：叶片由绿色逐渐变成黄绿色。

由图 4-1 可知，Cu-SD 复合污染胁迫下，总体来说，在相同 Cu 浓度下，SD 的加入

#### 4.2.5 样品的处理

叶绿素的提取：称取新鲜植物叶片 0.5g 剪碎后置于研钵中，加少量石英砂、碳酸钙粉和 5ml 95% 乙醇，研成均浆后再加入乙醇 10ml，并且继续研磨至组织变白。此时静置 3~5min。取滤纸 2 张并置于漏斗中，乙醇湿润后，沿玻璃棒将提取液倒入漏斗中，过滤到 25ml 棕色容量瓶中，然后再用少量乙醇冲洗研钵、研棒及残渣数次，最后连同残渣一起倒入漏斗中。用滴管吸取乙醇，将滤纸上的叶绿体色素全部洗入容量瓶中，直至滤纸和残渣中无绿色为止。最后用乙醇定容至 25ml，摇匀待测。

粗酶液的提取：称取植物样品 0.1 g 剪碎后置于预冷研钵中，加 2 ml 预冷的 50mmol/L pH=7.8 的磷酸缓冲液，在冰浴下研磨至匀浆，继续加磷酸溶液冲洗研钵，定容到 10 ml，4 °C 下于 12000 r·min<sup>-1</sup> 离心 30 min，此上清液即为粗酶液。

#### 4.2.6 样品的测定

叶绿素的测定参照周祖富方法<sup>[91]</sup>；植物可溶性蛋白质含量，过氧化物酶和超氧化物歧化酶活性的测定方法参考侯福林方法<sup>[92]</sup>；

#### 4.2.7 数据处理

所有的测定指标均重复 3 次，实验数据用 Microsoft Excel 2003 处理后，用 SPSS17.0 软件进行方差分析，差异显著性水平为  $p<0.05$ 。

### 4.3 结果与分析

#### 4.3.1 Cu-SD 单一及复合污染对小白菜幼苗叶绿素含量的影响

在单一兽药 SD 胁迫下，小白菜叶片叶绿素含量随药物剂量与时间的变化如图 4-1 所示。添加药物处理的小白菜叶片中叶绿素含量较空白低。在处理的前 10 天，各浓度与对照(CK)之间没有显著性差异( $p>0.05$ )，但随着作用时间的延长，SD 逐渐在植物叶片中积累，其毒性表现愈加明显；在处理后的第 15、20 天，高浓度(1mg/kg 和 10 mg/kg) 处理叶片叶绿素含量显著低于对照( $p<0.05$ )，说明 SD 对小白菜幼苗叶绿素的合成均有抑制作用；当暴露 20 天后，不同处理浓度之间的叶绿素含量出现了显著差异，此时，小白菜叶片直观的变化为：叶片由绿色逐渐变成黄绿色。

由图 4-1 可知，Cu-SD 复合污染胁迫下，总体来说，在相同 Cu 浓度下，SD 的加入

能抑制小白菜植物体内叶绿素的合成,说明 Cu-SD 复合污染对小白菜叶绿素的合成表现为协同作用。当土壤中 Cu 浓度为 100, 300mg/kg 时, 在 Cu-SD 复合污染下, 在处理的第 5 天, 各处理浓度下小白菜叶片中叶绿素的含量与对照值相近; 处理第 10 天时, 小白菜叶片中叶绿素的含量明显高于在 Cu 单一污染下叶绿素的含量; 受胁迫至 15 天以后, 各处理浓度下小白菜叶片中叶绿素的含量低于 Cu 单一污染叶绿素的含量和对照值, 并且在受胁迫的第 20 天各处理浓度下, 小白菜叶片中叶绿素的含量显著低于对照值, 同时, 当土壤中添加 SD 浓度为 1mg/kg 时, 小白菜叶片中叶绿素含量最低, 其值不足对照值的 50%, 说明小白菜叶绿素的合成, 在土壤中添加 SD 浓度为 1mg/kg 时受到的抑制作用最大, 试验中也发现该浓度处理组的叶片有些已经明显变黄。

作为可见症状之一,叶绿素含量的下降能够用来指示 Cu-SD 复合污染下对小白菜幼苗生长发育的危害。有研究表明:在污染物的胁迫下,由于捕光化合物 LHC 蛋白合成的转录过程会受到抑制<sup>[93]</sup>,而且初期形成的叶绿素单体也被光氧化分解,导致光截获 LHC 的形成受到影响,从而影响叶绿素的积累<sup>[94-96]</sup>。这个结论在本研究中也有相似体现, Cu 和 SD 的存在能够抑制叶绿素的积累,且随着暴露时间的延长, Cu 和 SD 对叶绿素的抑制作用更加显著。但在本实验的测定时间及浓度范围内, 整体上各处理之间的差异不显著, 叶绿素含量与土壤中 SD 浓度之间不具有显著的剂量-效应关系。

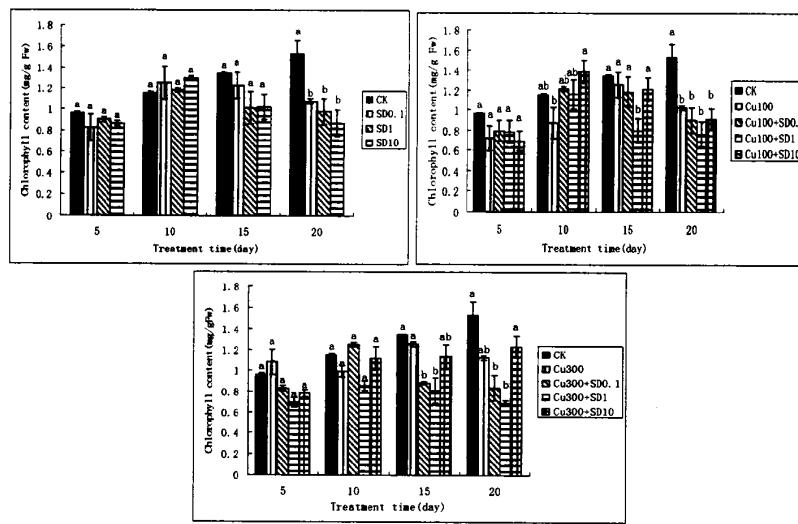


图 4-1 Cu-SD 单一及复合污染对小白菜叶片叶绿素含量的影响

#### 4.3.2 Cu-SD 单一及复合污染对小白菜幼苗可溶性蛋白质(SP)含量的影响

SD 单一胁迫下,由图 4-2a(1) 和 4-2b(1)可知, SD 暴露 10 天后, 0.1-10mg/kg 的 SD

处理的小白菜叶片和根部中 SP 与对照中的 SP 没有显著性差异。当暴露 15 天后, 10 mg/kg SD 处理的小白菜根系中的 SP 显著下降, 抑制率为 22.1%, 而其余的 SD 处理的小白菜叶片及根系中的 SP 均高出对照。SD 暴露 20 天后, 小白菜叶片及根组织中的 SP 均呈显著下降趋势, 且 SD 浓度越大, SP 的抑制率越高。10mg/kg 的 SD 使叶片及根组织中的 SP 抑制率分别达到 50.4% 和 52.2%, 表明 SD 对小白菜根组织中的 SP 抑制作用更加明显, 但各处理浓度之间差异不显著( $P>0.05$ )。

Cu-SD 复合污染下, 在相同 Cu 浓度处理条件下, 当污染物处理的第 15 天时, 叶片中可溶性蛋白质含量显著高于对照( $P<0.05$ ), 其余各处理在相同的测定时间与空白之间差异不显著( $P>0.05$ )。在处理后的第 10 和第 15 天, 随 SD 浓度的增大, 叶中 SP 含量呈明显增加趋势, 但是在污染物处理后的第 20 天, 叶中 SP 含量随 SD 含量的增加而明显降低。在实验周期内, 小白菜叶片和根系可溶性蛋白质含量受 SD 胁迫时间的变化较为明显(图 4-2b), 都是在污染物暴露的第 15 天, 小白菜叶片和根系 SP 含量显著高于对照值并且达到最大值, 此结论和单一 SD 处理时的变化相同。

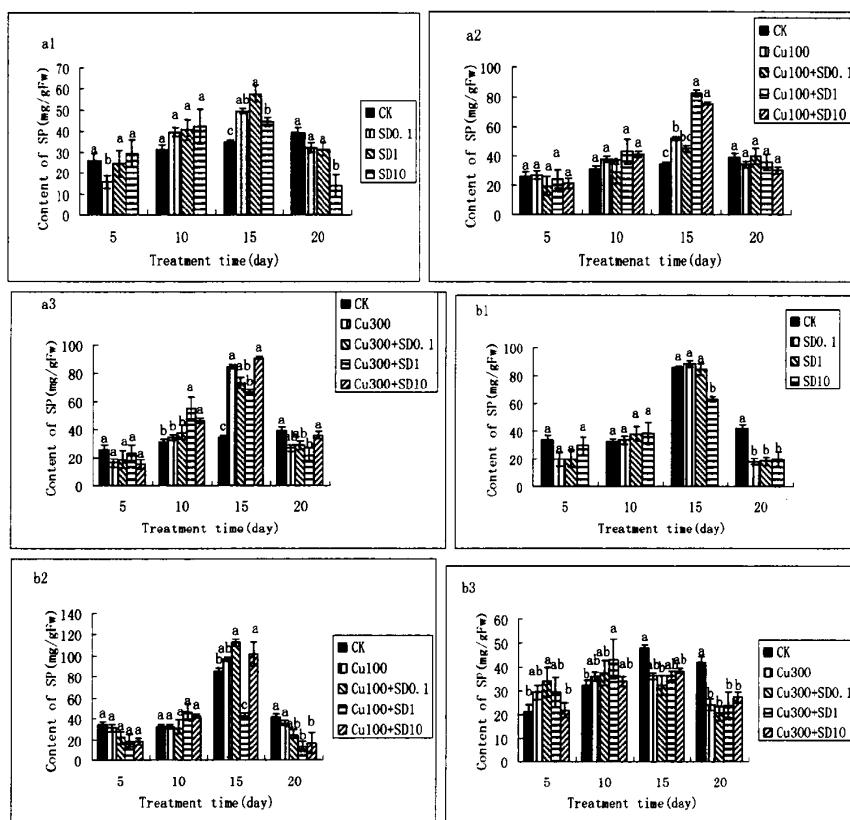


图 4-2 Cu-SD 单一及复合污染对小白菜叶片(a)、根系(b)可溶性蛋白含量的影响

植物体内的 SP 经常参与各种代谢活动, 其含量是植物总体代谢的一个重要指标<sup>[97]</sup>。

当植物适应其生长环境进入旺盛的生长期后,各种代谢活动旺盛,可溶性蛋白的合成能力也有所增强<sup>[98-100]</sup>。有研究表明,当受到人工合成药物、重金属及有害气体的胁迫时,植物体内的蛋白质含量会减少<sup>[101-103]</sup>。这与本文的研究相似,暴露 15d 的小白菜叶片及根组织中的 SP 含量均有所上升,说明 SD 短期低浓度暴露可以诱导 SP 的合成。但是暴露时间的延长,SD 对 SP 的合成逐渐显露出抑制效应。而且,从数据统计结果可以看出,SD 对小白菜根系中 SP 的影响更为显著。这可能是由于药物胁迫会抑制 RNA 转录和翻译受阻,降低蛋白质的合成能力<sup>[104]</sup>。植物根系受到污染时比叶片受到污染时表现得更严重<sup>[105]</sup>。

#### 4.3.3 Cu-SD 单一及复合污染对小白菜幼苗过氧化物酶 (POD) 活性的影响

小白菜幼苗 POD 酶活性的变化如图 4-3 所示。在单一 SD 胁迫下,根系 POD 酶活性比叶片 POD 高很多,对照中叶片 POD 最高值为 280 U/g·FW 左右,而根系 POD 酶活的最低值也超过 400 U/g·FW。SD 暴露 5d 后,各浓度处理的小白菜幼苗叶片中 POD 酶活性高于对照,但不同浓度的 SD 处理之间没有显著性差异。在处理的第 20 d 之后,对照叶片中 POD 酶活性高于 SD 处理的叶片 POD 酶活性,并且高浓度(1mg/kg 和 10 mg/kg)处理与对照之间有显著性差异。SD 对小白菜根系 POD 活性在污染物暴露初期有激活作用,且在处理后的第 10d 激活作用最为显著。暴露 15d 后,0.1-10mg/kg 的 SD 使根系中 POD 活性抑制率达到 64.0%-75.1%。随着 SD 暴露时间的延长,根系中的 POD 活性也呈现逐渐下降的趋势。

Cu-SD 复合污染下,100mg/kg Cu 和 1 mg/kg SD 能显著降低小白菜叶片中 POD 的活性,并且随着暴露时间的延长,这种作用越明显。总体来说,Cu 和 SD 复合污染能够使小白菜叶片中 POD 活性增加。但是当暴露 20 以后,各处理浓度下小白菜叶片中 POD 活性显著低于对照,并且存在显著性差异( $p < 0.05$ )。图 4-2b 为 Cu-SD 复合污染对小白菜根系中 POD 活性的影响。在污染物处理的第 5 天和第 10 天时酶活性都高于空白且各处理之间的差别并不显著;在相同铜浓度下,各处理浓度的 POD 活性由最初的高于对照下降到最后低于对照并与对照有显著性差异。

作物是农用生态系统中的重要组成部分,在生态风险评价中的必不可少的重要元素<sup>[105]</sup>,有毒化合物的施用对农用生态系统具有不良生态效应,而作物正是反映这些不良效应的载体,并且适合在实验室和野外条件下试验<sup>[105]</sup>,因此,作物在生态风险评价具有极为重要的地位。在实验室条件下,作物的毒性实验包括作物生长过程中关键阶段的

评价以及有关野外生态效应的产量信息<sup>[106]</sup>。作物对亚致死胁迫在生化水平上的反应是生态毒理学一个重要研究领域<sup>[106-107]</sup>。抗氧化酶 POD、SOD 被认为是 2 个重要的有关植物氧化胁迫的生物标记物<sup>[107-110]</sup>，已有研究发现许多污染物能够导致可提取 POD、SOD 酶活性的变化<sup>[106-114]</sup>。如：Cd 胁迫初期大蒜幼苗的 SOD 酶活被抑制，但随着处理时间的延长酶活性恢复并且高于对照；而 POD 酶活在处理后 12hr 内是对照的 3-4 倍，然后虽有下降，但是在实验结束时仍然比对照高<sup>[108]</sup>。Horsegram and bengalgram 暴露于 Cd 时也能够使 SOD、POD 酶活性上升，并且 Pb 的毒性效应与浓度有剂量关系<sup>[109]</sup>；而除草剂乙草胺也发现能够显著提高所有抗氧化酶活性<sup>[110]</sup>。豆磺隆单因子实验结果显示高浓度豆磺隆能够抑制小麦幼苗的 SOD 酶活性并且随着暴露时间的延长，抑制作用更明显；而 POD 酶活在豆磺隆的胁迫下都表现为上升<sup>[109]</sup>。叶片 POD 酶活性的上升被认为能够指示多种污染物胁迫<sup>[110]</sup>，但是 POD 酶活性监测法的应用由于其非特异性而受到限制。

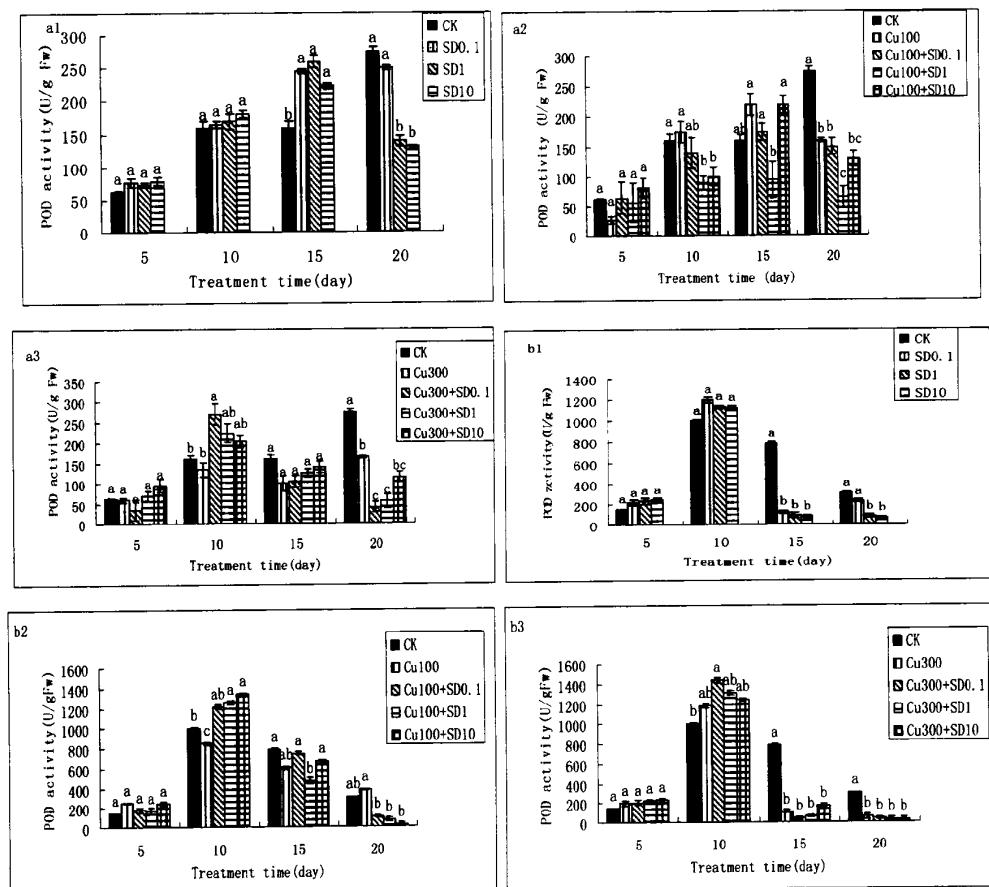


图 4-3 Cu-SD 单一及复合污染对小白菜叶片(a)、根系(b)POD 活性的影响

在有机物、重金属等污染物胁迫下,植物体内会产生活性氧物质(AOS),比如 $O_2^-$ 、 $RO\cdot$ 等活性自由基<sup>[115-117]</sup>。植物体内有多种保护机制,这些机制能去除或降低 AOS,植物体内的抗氧化防御系统是众多保护机制中对污染物胁迫最为敏感的系统,包括众多具有清除 AOS 的酶<sup>[109]</sup>,其中,POD 被认为是最重要的具有清除 AOS 的酶之一,因为 POD 的细胞内外形态都能够参与  $H_2O_2$  的清除<sup>[109-111]</sup>。在本研究中发现小白菜幼苗的根组织中的 POD 活性比叶片中的高,这可能与根系离子微环境或是根组织专性基因表达有关<sup>[112]</sup>。在暴露初期,叶片及根系中 POD 的活性与对照相比略有上升,这说明小白菜具有一定的抵抗氧化胁迫的能力。但是,这种自我抗氧化的能力是有限的,随着污染物 Cu-SD 复合暴露时间的延长,POD 活性呈显著下降趋势,这也说明 Cu-SD 复合污染对小白菜幼苗叶片及根系的损伤与暴露时间有关系。

#### 4.3.4 Cu-SD 单一及复合污染对小白菜幼苗超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的影响

单一 SD 胁迫下,SD 处理的小白菜幼苗叶片及根系中的 SOD 活性变化如图 4-4a1 和 4-4b1 所示。在实验浓度范围内,SD 对小白菜叶片中 SOD 活性起到激活作用,在处理的第 20 天后,激活效应越明显,且各处理浓度之间的 SOD 活性呈现逐渐降低的变化规律。但是,SD 对小白菜根系中 SOD 活性的作用表现为“激活—抑制”效应,在 SD 暴露的第 5 天,SD 对小白菜根系中 SOD 活性起激活作用,在 15 天以后则表现为抑制作用,并且随着 SD 浓度的增加,对小白菜根系中 SOD 活性的抑制作用越大。

在受到 Cu-SD 复合污染时,在实验周期内,小白菜幼苗叶片和根系中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性呈现上升的趋势。在叶片中,当受到 SD 与 100mg/kgCu 的复合污染时,SOD 活性在第 15 天时高于对照,到第 20 天时已经显著高于对照;在不同浓度 SD 与 300mg/kgCd 复合污染作用下,SOD 活性在第 10 天时已经高于对照。(100, 1) 和 (100, 10) 的 SOD 酶活性由最初的高于对照下降到最后与对照没有显著差别,而 (100, 1) 和 (100, 5) 的 SOD 酶活性由最初的低于对照升高到最后与对照也没有显著差别。

许多逆境条件下,植物体内活性氧代谢系统的平衡会受到影响,体内活性氧含量的升高能启动膜脂过氧化或膜脂脱脂作用,从而破坏膜结构<sup>[112]</sup>。SOD 酶是清除正常代谢过程以及氧化因子诱导产生的  $O_2^-$  的首要酶,对防止有害的 AOS 在植物体内的积累具有重要作用,SOD 酶的诱导与清除  $H_2O_2$  的酶活性升高一致,它们之间的协调配合对植物

体抵抗污染物胁迫有着重要的作用,因此其含量或活性水平的高低对植物的逆境能力具有重要的意义<sup>[109-121]</sup>。许多研究表明兽药特别是磺胺类药物对植物体内的氧化代谢系统的平衡影响很大<sup>[114-119]</sup>。本实验研究表明,随着 SD 暴露时间的延长,小白菜幼苗叶片和根系中的 SOD 活性呈逐渐上升趋势,这说明小白菜叶片和根系中的 SOD 酶活性的上升可能与 SOD 诱导产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的量上升有关。而且实验结果还表明,随着暴露时间的延长,小白菜根系中的 SOD 酶活性的降低比叶片中的更为明显,说明小白菜根系对 SD 的胁迫更为敏感。小白菜幼苗叶片与根系中的 POD 与 SOD 的变化表明,它的抗氧化系统由于 SD 的存在而遭到破坏,其自身的抗氧化防御功能降低。

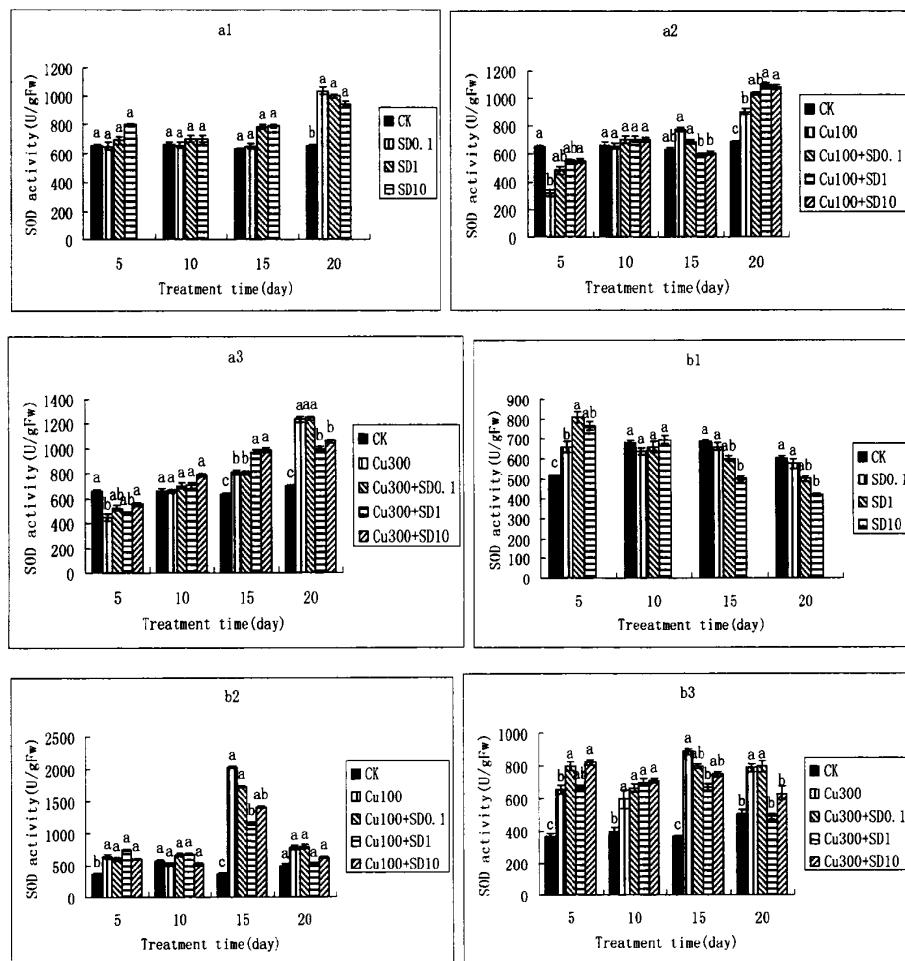


图 4-4 Cu-SD 单一及复合污染对小白菜叶片(a)、根系(b)SOD 活性的影响

#### 4.4 结论

(1) 在小白菜幼苗受 SD 单一胁迫时,各浓度处理叶片叶绿素含量与对照之间差异并不显著,随着时间的延长在处理后的第 15、20d,高浓度( $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  和  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )处理

叶片叶绿素含量显著低于对照；小白菜幼苗叶片中 SP 含量随 SD 浓度的变化不如在根系中明显，在处理后的第 5 d，随 SD 浓度的增大，根中 SP 含量呈明显下降趋势，有较好的剂量-效应关系，表明 SP 含量可以作为 SD 污染胁迫的生物标记物；SD 胁迫下小白菜幼苗叶片 POD 酶活性总体上先上升后下降，对根系 POD 活性表现为先激活再抑制作用，小白菜幼苗根系的 POD 酶活性比叶片 POD 酶活性高很多并且在处理的第 20 d 后，小白菜幼苗根系 POD 活性显著低于对照值；小白菜叶片与根系在 SD 胁迫下 SOD 活性表现出了相似的规律性，在处理后的第 1 d，叶片和根系 SOD 活性都显著低于对照，随着时间的延长，各处理与对照之间的差异逐渐减小；小白菜叶片在 SD 胁迫下 SOD 活性表现为随着 SD 浓度的增加和时间的延长，SOD 活性逐渐增加但是各浓度之间不存在显著性差异，而根系 SOD 活性随着 SD 浓度的增加和时间的延长，SOD 活性逐渐减少。

(2) 小白菜幼苗受 Cu 与 SD 复合污染时，SD 表现出主导作用；高含量的复合处理，其联合毒性表现为协同效应。复合污染时，对小白菜的叶绿素含量、可溶性蛋白质含量、过氧化物酶超氧化物歧化酶活性的影响作用受 SD 的影响较大。小白菜各指标的毒性效应随复合处理含量的增大有所增大；在高含量水平的复合处理下，其毒性效应更加显著，Cu 与 SD 复合污染明显增强了对小白菜的毒性效应。

(3) 外源污染物胁迫下，抗氧化酶活性通常会被抑制，但是酶活性上升在某些情况下也能够出现。测定酶活性的降低能够被用来作为指示外源污染物不良效应的生物标记物。在发芽实验中发现根系对铜以及磺胺嘧啶的敏感性较强，这与本实验的结果相符合。小白菜幼苗根系 POD、SOD 酶活性以及 SP 含量受到胁迫的影响较叶片明显，因此可以认为小麦幼苗根系 POD、SOD 酶活性以及 SP 含量的下降可以被用来作为指示 Cu 与 SD 单一和复合胁迫的生物指示物。

## 第五章 总结与展望

### 5.1 研究结论

本文以常用兽药磺胺嘧啶和铜为供试药物, 通过研究其对植物和土壤微生物的生态毒理效应, 得出以下结论:

#### (1) Cu-SD 单一及复合污染对植物种子发芽的急性毒性实验

在 SD、Cu 单一污染条件下, 土壤中 SD、Cu 浓度与 4 种作物 (西红柿、小白菜、萝卜和黄瓜) 的根伸长和芽伸长抑制率有显著相关性 ( $p<0.05$ ), 但与这 4 种作物种子发芽抑制率之间不具有相关性 ( $p>0.05$ )。作物的发芽率、根伸长和芽伸长对 SD、Cu 的生态毒性敏感顺序依次为: 根伸长>芽伸长>发芽率, 根伸长对土壤中的污染物响应最为敏感, 发芽率受土壤污染物胁迫效应最小。从 SD 对作物生长抑制的强弱及  $IC_{50}$  值来看, 4 种作物在 SMM 的胁迫下, 其敏感性顺序为: 白菜>萝卜>黄瓜>西红柿; 从 Cu 对作物生长抑制的强弱及  $IC_{50}$  值来看, 4 种作物在 Cu 的胁迫下, 其敏感性顺序为: 萝卜> 小白菜>西红柿>黄瓜。

SD-Cu 复合污染对作物生长的影响较复杂, 在低浓度 SD 的胁迫下, 3 个不同浓度处理的 Cu 对 4 种作物根伸长及芽伸长抑制差异较明显, 但随着 SD 浓度的增加, 这种差异逐渐减小。当根 (芽) 伸长抑制率高于 60% 时, 高 Cu 作用下, SD 对白菜和萝卜的根 (芽) 伸长的影响小于低 Cu, 二者联合作用体现为拮抗效应。高 Cu 作用下, 不同处理的 SD 对 4 种作物的根(芽)伸长影响较小, 说明在此条件下, 二者的联合毒性主要依靠 Cu 的作用。

#### (2) Cu-SD 单一及复合污染对土壤微生物的生态毒理实验

单一 SD 污染条件下, 土壤中添加 SD 对土壤酶活性的影响效果及作用规律不同。SD 对脲酶, 磷酸酶活性的影响主要表现为“激活—抑制”作用; 药物对蔗糖酶活性的影响表现为激活的规律; 对过氧化氢酶活性的影响表现为“激活—抑制”的规律。

SD-Cu 复合污染条件下, 在相同 Cu 浓度下, SD 对脲酶活性的影响表现为“激活—抑制”作用; 药物对蔗糖酶活性的影响表现为激活的规律; 对过氧化氢酶活性的影响主要表现为“抑制—激活—抑制—激活”的规律; 对磷酸酶活性的影响表现为“激活—抑

制”的规律。

### (3) Cu-SD 单一及复合污染对小白菜幼苗生长生理机能的毒性实验

在小白菜幼苗受 SD 单一胁迫时, 各浓度处理叶片叶绿素含量与对照之间差异并不显著, 随着时间的延长, 高浓度( $1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  和  $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )处理叶片叶绿素含量显著低于对照; 小白菜幼苗叶片中 POD、SOD 酶活性及 SP 含量随 SD 浓度的变化不如在根系中明显, 表明 POD、SOD 酶活性及 SP 含量可以作为 SD 污染胁迫的生物标记物。

小白菜幼苗受 Cu 与 SD 复合污染时, SD 表现出主导作用, 高含量的复合处理, 其联合毒性表现为协同效应。复合污染时, 对小白菜的叶绿素含量、可溶性蛋白质含量、过氧化物酶超氧化物歧化酶活性的影响作用受 SD 的影响较大。小白菜各指标的毒性效应随复合处理含量的增大有所增大; 在高含量水平的复合处理下, 其毒性效应更加显著, Cu 与 SD 复合污染明显增强了对小白菜的毒性效应。

## 5.2 研究展望

土壤中残留兽药及重金属的复合污染已成为环境中广泛存在的潜在污染物, 然而目前残留兽药及重金属的复合污染对植物-微生物系统及潜在的生态毒理学效应研究还较少, 并且缺乏对机理的探索, 今后需在以下几个方面深入开展研究:

(1) 兽药及重金属的复合污染对土壤-作物生态系统的毒理过程研究: 兽药及重金属的复合污染与土壤根际微生物间的相互作用机制; 兽药及重金属的复合污染在根际土壤中的环境行为研究, 其残留数量、形态及转化对动植物、微生物的生态毒理效应; 土壤-作物-微生物根际协同降解兽药及重金属的复合污染的机理与污染的根际调控机制。

(2) 作物吸收、累积兽药的规律研究: 兽药及重金属的复合污染从土壤进入根际的途径和机制; 作物对兽药及重金属的复合污染污染胁迫的适应机制及兽药在不同作物体内迁移积累的规律; 作物体内主要污染物准确、快速、低成本的检测方法, 加强蔬菜类植物的吸收、累积兽药及重金属的复合污染的规律, 从而为兽药及重金属的复合污染对人体健康的风险评价提供依据。

## 参考文献

- [1] 周启星, 孔繁翔, 朱琳主编.生态毒理学(M). 北京:科学出版社,2004..
- [2] 周启星, 宋玉芳等著.污染土壤修复原理与方法(M). 北京:科学出版社,2004.
- [3] 孔维栋, 朱永官. 抗生素类兽药对植物和土壤微生物的生态毒理学效应研究进展[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(1): 1-9.
- [4] Boxall A B A, Johnson P, Smith E J, et al. Uptake of veterinary medicines from soils into plants[J]. *J. Agric. Food. Chem.*, 2006, 54(6): 2288-2297.
- [5] Jjemba P K. The effect of chloroquine, quinacrine, and metronidazole on both soybean plants and soil microbiota[J]. *Chemosphere*, 2002, 46: 1019-1025.
- [6] Jin C X, Chen Q Y, Sun R L, Zhou Q X, Liu J J, 2009. Eco-toxic effects of sulfadiazine sodium, sulfamonomethoxine sodium and enrofloxacin on wheat, Chinese cabbage and tomato[J]. *Ecotoxicology*, 18:878-885.
- [7] 金彩霞, 刘军军, 陈秋颖, 周庆祥. 兽药污染土壤对小麦和白菜根伸长抑制的毒性效应[J]. 农业环境科学学报, 2009,28(7):1358-1362.
- [8] 安婧,周启星,刘维涛. 土霉素对小麦种子发芽与幼苗生长发育的生态毒性[J]. 环境科学,2009,30(10):3022-3027.
- [9] Migliore L, Cozzolino S, Fiori M. Phytotoxicity to and uptake of flumequine used in intensive aquaculture on the aquatic weed, *Lythrum salicaria* L[J]. *Chemosphere*, 2000, 40: 741-750.
- [10] 张浩, 罗义, 周启星. 四环素类抗生素生态毒性研究进展[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(2): 407-413.
- [11] Kong W D, Zhu Y G, Fu B J, et al. The veterinary antibiotic oxytetracycline and Cu influence functional diversity of the soil microbial community [J]. *Environmental Pollution*, 2006, 143: 129-137.
- [12] 王加龙, 刘坚真, 陈杖榴, 等. 恩诺沙星对土壤微生物数量及群落功能多样性的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(1): 86-89.
- [13] Boleas S, Alonso C, Pro J, et al. Toxicity of the antimicrobial oxytetracycline to soil organisms in a multi-species-soil system(MS·3)and influence of manure co-addition[J]. *J. Hazard. Mater.*, 2005. 122: 233-241.
- [14] 陈昇, 董元华, 王辉, 等. 江苏省畜禽粪便中磺胺类药物残留特征[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(1): 385-389.
- [15] Thiele-Bruhn S, Beckl I C. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass[J]. *Chemosphere*, 2005, 59: 457-465.
- [16] Jenkinson D S, Ladd J N. Microbial biomass in soil:measurement and turnover[M]. In:Paul E A,Ladd J N (Eds.). *Soil biochemistry*, vol.5. New York, NY: Marcel Dekker, 2001, 415-471.
- [17] Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, 65(2): 232-260.
- [18] 金彩霞,刘军军,陈秋颖,樊 静,周庆祥,潘 峰. 兽药磺胺间甲氧嘧啶对土壤呼吸及酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报,2010,29(2):314-318.
- [19] Van Dijck P, Van de Voorde H. Sensitivity of environmental microorganisms to antimicrobial agents[J]. *Appl. Environ. Microb.*, 1976, 31(3): 332-336.
- [20] Thiele S. Microbial inhibition by pharmaceutical antibiotics in different soils—dose-effect relations determined with the iron(II) reduction test[J]. *Environ. Toxicol. Chem.*, 2005, 24(4): 869-876.
- [21] 刁晓平,孙英健,孙振钧,等.3 种兽药对土壤微生物呼吸的影响[J]. 中国农业大学学报, 2006, 11(2):39-43.
- [22] 王兆炜.有机-重金属复合污染根际微生物生态效应[D]. 杭州:浙江大学,2005.
- [23] 张倩茹, 周启星, 张惠文, 陈锡时.乙草胺—铜离子复合污染对黑土农田生态系统中土著细菌群落的影响[J]. 环境科学学报, 2004,24(2):326-332.

- [24] 梁继东, 周启星. 甲胺磷、乙草胺和 Cu 单一与复合污染对蚯蚓的毒性效应研究[J]. 应用生态学报, 2003, 14(4): 593-596.
- [25] 金彩霞, 周启星, 王新. 镉-豆磺隆复合污染对小麦生物学性状与品质的胁迫[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(6): 1160-1163.
- [26] 金彩霞, 刘军军, 鲍林林. 磺胺间甲氧嘧啶-镉复合污染对作物种子发芽的影响[J]. 中国环境科学, 2010, 30(6): 839-844.
- [27] 王米道, 程凤侠, 司友斌. 铜与草甘膦复合污染对小麦种子发芽与根伸长的抑制作用[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(4): 591-596.
- [28] Halling-Sorenson B, Nors Nielsen S, Lanzky P F, et al. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—a review[J]. Chemosphere, 1998, 36(2): 357-393.
- [29] Spaepen K R I, Van Leemput L J J, Wislocki P G, et al. A uniform procedure to estimate the predicted environmental concentration of the residues of veterinary medicines in soil[J]. Environ Toxicol Chem, 1997, 16: 1977-1982.
- [30] Montforts M H M M, Kalf D F, Van Vlaardingen P L A, et al. The exposure assessment for veterinary medicinal products[J]. Sci Total Environ, 1999, 225: 119-133.
- [31] Meyer M T, Bumgarner J E, Varns J L, et al. Use of radioimmunoassay as a screen for antibiotics in confined animal feeding operations and confirmation by liquid chromatography/mass spectrometry[J]. Sci Total Environ, 2000, 248(2-3): 181-187.
- [32] ZHANG Jian-xin, NA Ming-liang, XU Ming-gang. Inhibition and toxicity of Cu, Zn, Pb on root elongation of vegetable in contaminated soil[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2007, 26(3): 945-949.
- [33] 宋玉芳, 许华夏, 任丽萍, 等. 重金属对土壤中萝卜种子发芽与根伸长抑制的生态毒性[J]. 生态学杂志, 2001, 4(2): 4-8.
- [34] Ince N H. Assessment of toxic interactions of heavy metals in binary mixtures: a statistical approach[J]. Arch Environ Contam Toxicol, 1999, 36(4): 365-372.
- [35] Knoke K, Marwood T M, Cassidy M B, et al. A comparison of five bioassays to monitor toxicity during bioremediation of pentachlorophenol -contaminated soil [J]. Water, Air and Soil Pollution, 1999, 110: 157-169.
- [36] International Organization for Standardization (ISO) . Soil quality-determination of the effects of pollutants on soil flora. Part 1: method for the measurement of inhibition of root growth. ISO, 1993: 11269-1.
- [37] International Organization for Standardization (ISO) . Soil quality-determination of the effects of pollutants on soil flora. Part 2: effects of chemicals on the emergence and growth of higher crops. ISO, 1993: 11269-2.
- [38] Greene J C. Protocols for short -term toxicity screening of hazardous waste sites[S]. US Environmental Protection Agency, 1998, EPA/ 600/3—88/ 029.
- [39] Boxall A B A, Johnson P, Smith E J, et al. Uptake of veterinary medicines from soils into crops[J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(6): 2288-2297.
- [40] Migliore L, Civitareale C, Cozzolino S, et al. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop crops[J]. Chemosphere, 2003, 52: 1233-1244.
- [41] Burkhardt M, Stoob K, Stamm C, et al. Veterinary antibiotics in animal slurries-A new environmental issue in grassland research[J]. Grassl Sci Eur, 2004, 9: 322-324.
- [42] 王小驷, 张永志, 王刚军, 等. 蔬菜中有害重金属元素污染研究进展[J]. 浙江农业学报, 2004, 16(5): 259-262.
- [43] 金彩霞, 刘军军, 陈秋颖, 周庆祥. 兽药污染土壤对小麦和白菜根伸长抑制的毒性效应[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(7): 1358-1362.
- [44] Migliore L, Civitareale C, Cozzolino S, et al. Laboratory models to evaluate phytotoxicity of sulphadimethoxine on terrestriaplants [J]. Chemosphere, 1998, 37: 2957-2961.
- [45] 王松华, 杨志敏, 吕波, 等. 印度芥菜对 Cu 诱导的氧化胁迫响应[J]. 南京农业大学学报, 2004, 27(1): 24-27.
- [46] 薛艳, 沈振国, 周东美. 蔬菜对土壤重金属吸收的差异与机理[J]. 土壤, 2005, 37(1): 32-36.
- [47] 郑爱珍, 刘传平, 沈振国. 铜对白菜、青菜生长的影响[J]. 北方园艺, 2005, (2): 42-43.

- [48] Strange J, Macnair M R.. Evidence for a role for the cell membrane in copper tolerance of *Mimulus guttatus* Fischer ex DC[J]. *New Phytologist*, 1991,119(3):383-388.
- [49] 钱晓薇.硫酸铜对蚕豆根尖细胞有丝分裂的影响[J]. *细胞生物学杂志*, 2004,26(1):171-175.
- [50] Arduini I, Godbold D L, Onnis A..Cadmium and copperchange root growth and morphology of *Pinus pinea* and *Pinuspinaster* seedlings[J]. *Physiologia Plantarum*, 1994,92(4):675 – 680.
- [51] Stewart A R, Malley D F. Effect of metal mixture (Cu,Zn, Pb and Ni) on cadmium partitioning in littoral sediments ands accumulation by the freshwater macrophyte *Eriocaulonseptangulare* [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1999,18(3):436- 447.
- [52] Combination toxicology of copper, zinc, and cadmium in binarymixtures: concentration dependent antagonistic, nonadditive, andsynergistic effects on root growth in *Silene vulgaris* [J].*Environmental Toxicology and Chemistry*, 1999,18(2):348-355.
- [53] S. Inaba, C. Takenaka, Effects of dissolved organic matter on toxicity and bioavailability of copper for lettuce sprouts[J].*Environ. Int.* 2005 , 31:603 - 608.
- [54] Chao L, Zhou Q X, Chen Su, et al. Single and joint stress of acetochlor and Pb on three agricultural crops in Northeast China [J]. *J. Environ. Sci.*, 2007,19:719-724.
- [55] Wang M E, Zhou Q X. Single and joint toxicity of chlorimuron -ethyl, cadmium, and copper acting on wheat *Triticum aestivum* [J]. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2005, 60:169-175.
- [56] Ensenbach U, Nagel R. 1997. Toxicity of binary chemical mixtures:effects on reproduction of zebrafish (*Brachydanio rerio*) [J].*Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 32 (2): 204-210.
- [57] L.K.S. Chauhan, S.K. Gupta, Combined cytogenetic and ultrastructural effects of substituted urea herbicides and synthetic pyrethroid insecticide on the rootmeristem cells of *Allium cepa*, *Pestic. Biochem[J]. Physiol.* 2005,82: 27 – 35.
- [58] 霍燕兰.药物分析技术[M]. 北京:化学工业出版社, 2005 .
- [59] Teisseire H, Couderduet M, Vernet G. Toxic responses and catalase activity of *Lemna minor* L. exposed to flopet, copper, and their combination [J]. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 1998,40:194-200.
- [60] 孔维栋, 朱永官. 抗生素类兽药对植物和土壤微生物的生态毒理学效应研究进展[J]. *生态毒理学报*, 2007, 2(1): 1-9.
- [61] Donnelly K C, Claxton L D, Huebner H J, Capizzi J L. Mutagenic interactions of model chemical mixtures[J]. *Chemosphere*, 1998,37(7):1253-1261.
- [62] Sannino F, Gianfreda L.Pesticide influence on soil enzymatic activities[J]. *Chemosphere*, 2001, 45(7): 417-425.
- [63] 于寿娜, 廖敏, 黄昌勇. 镉、汞复合污染对土壤脲酶和酸性磷酸酶活性的影响[J]. *应用生态学报*, 2008, 19(8): 1841-1847.
- [64] 杨志新, 刘树庆. 重金属 Cd、Zn、Pb 复合污染对土壤酶活性的影响[J]. *环境科学学报*, 2001, 21(1): 60-63.
- [65] 谢显传, 张少华, 王冬生, 等. 阿维菌素对蔬菜地土壤微生物及土壤酶的生态毒理效应[J]. *土壤学报*, 2007, 44(4): 740-743.
- [66] 闫颖, 袁星, 樊宏娜, 等. 五种农药对土壤转化酶活性的影响[J]. *中国环境科学*, 2004, 24(5): 588-591.
- [67] 关松萌等.土壤酶及其研究方法[M]. 北京: 农业出版社,1986.
- [68] LI Yong -hong, GAO Yu -bao. Effects of monosulfuron on growth of millet and soil microbial function [J] . *Journal of Agro – Environment Science*, 2004, 23(4):633-637.
- [69] LIU Hui -jun, LIU Wei -ping. The reaction mechanism of acetanilideherbicides with urease[J]. *Journal of Zhejiang University (Agric & Life Sci)* , 2004, 30(2):210-214.
- [70] 马恒亮,占新华,张晓斌等. 小麦/苜蓿套作对菲污染土壤酶活性的影响[J]. *环境科学*,2009,30(12):3684-3690.
- [71] 杨春璐, 孙铁玲, 和文祥. 汞和两种农药复合污染对土壤转化酶活性的影响[J]. *中国环境科学*, 2006, 26(4):486-490.
- [72] Gianfreda L, Sannino F, Ortega N, et al. Activity of free and immobi – lized urease in soil: effects of pesticides[J]. *Soil Bio & Biochem*, 1994,26(6):777-784.
- [73] Gianfreda L, Sannino F, Violante A. Pesticides effects on the activity of free, immobilized and soil inverse[J]. *Soil Bio & Biochem*, 1995, 27(9):1201-1208.

- [74] L.K.S. Chauhan, S.K. Gupta, Combined cytogenetic and ultrastructural effects of substituted urea herbicides and synthetic pyrethroid insecticide on the root meristem cells of *Allium cepa*, *Pestic. Biochem[J]. Physiol.* 2005,82: 27 - 35.
- [75] Liu T F, Wang T, Sun C, et al. Single and joint toxicity of cypermethrin and copper on Chinese cabbage(Pakchoi) seeds [J]. *J. Hazard. Mater.*,2009,163:344-348.
- [76] 田生科, 李廷轩, 彭红云, 等. 铜胁迫对海州香薷和紫花香薷根系形态及铜富集的影响[J]. 水土保持学报, 2005, 3(19): 87- 100.
- [77] 周启星, 程云, 张倩茹, 等. 复合污染生态毒理效应的定量分析关系[J]. 中国科学(C 辑), 2003,33(6):566-573.
- [78] 刘莉莉, 林匡飞, 苏爱华, 等. 四溴双酚 A 对土壤酶活性的影响[J]. 环境污染与防治, 2008, 30(6): 13-16.
- [79] Foyer C H, Lelandais M, Kunert K J. Photooxidative stress in plants[J]. *J. Physiol. Plant*,1994, 92: 696-717.
- [80] Sanitadi Toppi L, Gabbrielli R. Response to cadmium in higher plants[J]. *J. Environ. Exp. Bot*, 1999, 41: 105-113.
- [81] 王多加, 金肇熙, 钟娇娥, 等. 深圳市永久性菜地蔬菜重金属污染状况分析[J]. 广东农业科学, 2000,1:20-22.
- [82] Boxall A B A, Kolpin D W, Halling -Sorensen B, et al. Are veterinary medicines causing environmental risks?[J]. *Environ Sci Technol*, 2003,37:286A-294A.
- [83] Thiele S. Pharmaceutical antibiotic compound in soils —a review[J]. *J Plant Nutr Soil Sci*, 2003, 166:145-167.
- [84] 王宏康, 阎寿沧. 污泥施肥时铜对农作物的污染[J]. 环境科学, 1990,11(3): 6- 11.
- [85] Shen ZG, ZhangF Q, ZhangF S. Toxicityof copper and zinc in seedlings of mung beamand inducing accumulation of polyamine[J]. *J Plant Nutr*,1998, 21(6):1153- 1162.
- [86] Wang M E, Zhou Q X, 2005. Single and joint toxicity of chlorimuron-ethyl, cadmium, and copper acting on wheat *Triticum aestivum*[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60(2):169-175.
- [87] Liao, X.R., Chen, J., Zhou, Y.F. Effect of salicylic acid on the isozymesof peroxidase and catalase in cells of wheat callus[J]. *J. Triticeae Crops*.2000.20:66-68.
- [88] Pang, X., Wang, D., Peng, H.A. Effect of lead stress on the activity of antioxidant enzymes in wheat seedling[J]. *Environ. Sci.*,2001,22:108-111.
- [89] An J, Zhou Q X, Sun Y B, Xu Z Q, 2009. Ecotoxicological effectsof typical personal care products on seed germination andseedling development of wheat (*Triticum aestivum L.*) [J]. *Chemosphere*, 76(10): 1428-1434.
- [90] Cuihong Chen, Qixing Zhou, Yanyu Bao, Yaning Li, Ping Wang,2010.Ecotoxicological effects of polycyclic musks and cadmium on seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum*) [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 22(12):1966-1973.
- [91] Lara, F. J., García-Campan, A. M., Neusüss, C., Alés-Barrero, F. 2009.Determination of sulfonamide residues in water samples by in-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis[J]. *Journal of Chromatography A*, 1216,3372-3379.
- [92] 周祖富,黎兆安.植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社. 2005 .
- [93] Ranieri A, Castagna A, Sciebba F. Oxidative stress and phytochelatin characterization in bread wheat exposed to cadmium excess [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, 43: 45—54.
- [94] 王美娥, 周启星. 重金属 Cd、Cu 对小麦(*Triticum asetivum*)幼苗生理生化过程的影响及毒性机理研究[J]. 环境科学学报, 2006, 26(12): 2033-2038.
- [95] Wang M E, Zhou Q X. Effects of herbicide chlorimuron-ethyl on physiological mechanisms in wheat(*Triticum asetivum*) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2006, 64: 190—197.
- [96] 犀雷, 周启星, 陈苏, 等. 乙草胺对小麦生理机能的影响与生物标记物识别[J]. 环境科学, 2007, 28(4): 866-871.
- [97] Horváth G, Droppa M, Oravecza. Formation of the photosyntheticapparatus during greening of cadmium poisoned barley leaves [J]. *Planta*, 1996,199:238-243.
- [98] Richardson B J, Lam P K S, Martin M. Emerging chemicals of concern: Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Asia, with particular reference to Southern China [J]. *Mar Pollut Bull*, 2005,50:913-920.
- [99] Jin, P.,Ma, J.M., Yang, K.J. Effect of soaking of Hg2t on wheat during its germination and seedling growth[J]. *J.HenanNorm.Univ. (Nat. Sci.)*,2002,30:81-84.

- [100] Wu, X.Y., von Tiedemann, A. Impact of fungicides on active oxygen species and antioxidant enzymes in spring barley (*Hordeum vulgare L.*) exposed to ozone[J]. *Environ. Pollut.*, 2002, 116, 37-47.
- [101] Zhou, Q.X., Kong, F.X., Zhu, L., *Ecotoxicology: Principles and Methods*[M]. Science Press, Beijing. 2004.
- [102] 靳萍, 马剑敏, 杨柯金, 等. Hg 对小麦种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2002, 30(4): 81-84.
- [103] Wu, X.Y. von Tiedemann, A. Impact of fungicides on active oxygen species and antioxidant enzymes in spring barley(*Hordeum vulgare L.*)exposed to ozone[J]. *Environ. Pollution.*, 2002, 116, 37-47.
- [104] 张惠, 汪沛洪. 渗透胁迫下小麦叶片蛋白质合成与降解的示踪追究[J]. 植物生理学报, 1991, 17(3): 259-266.
- [105] Chao L, Zhou Q X, Chen Su, et al. Single and joint stress of acetochlor and Pb on three agricultural crops in Northeast China[J]. *J. Environ. Sci.*, 2007, 19: 719-724.
- [106] Chen C H, Zhou Q X, Bao Y Y et al. Ecotoxicological effects of polycyclic musks and cadmium on seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum*) [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2010, 22(12): 1966-1973.
- [107] Cao Q, Hu Q H, Khan S et al. Wheat phytotoxicity from arsenic and cadmium separately and together in solution culture and in a calcareous soil[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 148(1-2): 377-382.
- [108] Diao XP, Jensen J, Hansen AD .Toxicity of the anthelmintic abamectin to four species of soil invertebrates[J]. *Environ Pollut*, 2007, 148:514-519.
- [109] Mei-E Wang, Qi-Xing Zhou. Joint stress of chlorimuron-ethyl and cadmium on wheat *Triticum aestivum* at biochemical levels[J]. *Environmental Pollution*, 2006, 144:572-580.
- [110] Marc Dazy, Eric Béraud, Sylvie Cotelle, Eric Meux, Jean-Fran ois Masfaraud, Jean-Fran ois Férand. Antioxidant enzyme activities as affected by trivalent and hexavalent chromium species in *Fontinalis antipyretica* Hedw[J]. *Chemosphere* , 2008, 73:281-290.
- [111] T.F. Liu, T.Wang, C. Sun, Y.M.Wang. Single and joint toxicity of cypermethrin and copper on Chinese cabbage(Pakchoi) seeds[J]. *Journal of Hazardous Materials* , 2009, 163: 344 - 348.
- [112] Tolls J. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils:A review[J]. *Environ. Sci. Technol.*, 2001, 35(17):3397-3406.
- [113] 庞欣, 王东红, 彭安. 铅胁迫对小麦幼苗抗氧化酶活性的影响[J]. 环境科学, 2001, 22(5): 108 -111.
- [114] Lai, H. T., Hou, J. H. Light and microbial effects on the transformation of four sulfonamides in eel pond water and sediment[J]. *Aquaculture*, 2008, 283, 50-55.
- [115] Sun, L., Chen, L. G., Sun, X., et al. Analysis of sulfonamides in environmental water samples based on magnetic mixed hemimicelles solid-phase extraction coupled with HPLC-UV detection[J]. *Chemosphere*, 2009, 77:1306-1312.
- [116] Lara, F. J., García-Campan, A. M., Neusüss, C.,et al. Determination of sulfonamide residues in water samples by in-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis[J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216:3372-3379.
- [117] Lin, C. Y., & Huang, S. D. Application of liquid-liquid-liquid microextraction and high-performance liquid-chromatography for the determination of sulfonamides in water[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 612, 37-43.
- [118] Li, J. D., Cai, Y. Q., Shi, Y. L., et al. Determination of sulfonamide compounds in sewage and river by mixed hemimicelles solid-phase extraction prior to liquid chromatography spectrophotometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1139:178-184.
- [119] Zhang, H. Y., Zhang, Y., Wang, S. Development of flow-through and dip-stick immunoassays for screening of sulfonamide residues[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2008, 337, 1-6.
- [120] Meie Wang,,Qixing Zhou,Liping Ren. Toxicological responses in wheat *Triticum aestivum* under joint stress of chlorimuron-ethyl and copper[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2009, 72 :2121-2129.
- [121] Manuel Tejada,Isidoro Go'mez, Ana Mar 'a Garc 'a-Mart 'nez, Paloma Osta, Juan Parrado. Effects of Prochloraz fungicide on soil enzymatic activities and bacterial communities[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2011, 74 :708-1714.
- [122] Chen C H, Zhou Q X, Bao Y Y et al. Ecotoxicological effects of polycyclic musks and cadmium on seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum*) [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2010, 22(12): 1966-1973.

## 致 谢

本论文是在导师金彩霞副教授的精心设计和悉心指导下完成的。三年来，金老师高尚的做人风格、严谨的治学态度、务实的科研作风使我受益终生；金老师在学业、科研和生活上给予我的关怀、指导和帮助，令我终生难忘。在我的心目中，导师不仅是治学严谨、博学多才的老师，更是我生活道路上正值、热心的领路人。在此，我衷心的向我的导师表示最真挚的感谢和深深的祝福！

在实验和论文完成过程中，环境教研室的各位老师也给予了我热心的帮助。此外，我的同学、实验室的师兄妹也为我的论文设计及试验提出了好的建议和帮助，在此并向他们表示衷心的感谢。

同时，我也要感谢我的家人，三年的学习生活中，他们在物质上、精神上给予了我大力的支持和鼓励，让我有这样的机会和信心面对学习和生活的挑战。感谢所有曾经帮助过我的亲人和朋友！

赵保真

二零一二年五月

## 攻读硕士学位期间发表的学术论文

- [1] 金彩霞, 赵保真, 李明亮, 薛万新, 吴春艳。硫酸盐还原条件下水稻土中六氯乙烷厌氧脱氯的研究. 浙江农业学报, 第 4 期刊出
- [2] C. X, Jin, B. Z, Zhao, W. F, Zhu, X. Y, Song, W. Q, Chen, J. Fan. Ecotoxicological effects of sulfadiazine and copper on seed germination and seedling growth of three agricultural crops (EPPH2012, Accepted)