

仇爱锋, 王玉涛, 张树秋, 等. 克百威、镉和铜对费氏弧菌的联合毒性效应[J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(5):869-875.

QIU Ai-feng, WANG Yu-tao, ZHANG Shu-qiu, et al. Joint toxic effects of carbofuran, Cd and Cu to *Vibrio fischeri*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(5): 869-875.

克百威、镉和铜对费氏弧菌的联合毒性效应

仇爱锋^{1,3}, 王玉涛², 张树秋², 彭强辉³, 陈子雷^{2*}

(1.常州大学环境与安全工程学院, 江苏 常州 213000; 2.山东省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 济南 250100; 3.浙江清华长三角研究院分析测试中心, 浙江 嘉兴 314006)

摘要:通过费氏弧菌急性毒性实验,研究克百威、镉(Cd)和铜(Cu)三种受试样本及其混合样本(克百威-Cd和克百威-Cu)的等毒性单位比为1:1、1:2、2:1,克百威-Cd-Cu的等毒性单位比为1:1:1、1:1:2、1:2:1、2:1:1)对费氏弧菌15 min和30 min的急性毒性效应,计算克百威、Cd和Cu的单一和混合样本的半数效应浓度(Median effective concentration, EC₅₀)。克百威、Cd和Cu暴露15 min的EC₅₀值分别为101.29、13.11、47.06 mg·L⁻¹,暴露30 min的EC₅₀值分别为107.88、11.17、39.73 mg·L⁻¹。利用毒性单位(Toxicity unit, TU)法、相加指数(Additive index, AI)法和混合毒性指数(Mixtures toxicity index, MTI)法对混合样本进行了定性评价,结果表明:克百威与Cu和Cd两种重金属二元和三元复合作用后主要表现为部分相加和协同作用,说明二元和三元复合毒性较单一毒性增强,且不同混合比例下,联合毒性效应具有差异。TU法与MTI法的评价结果一致,而AI法的结果略有差异。

关键词:克百威;镉;铜;费氏弧菌;联合毒性

中图分类号:X171.5 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2017)05-0869-07 doi:10.11654/jaes.2016-1502

Joint toxic effects of carbofuran, Cd and Cu to *Vibrio fischeri*

QIU Ai-feng^{1,3}, WANG Yu-tao², ZHANG Shu-qiu², PENG Qiang-hui³, CHEN Zi-lei^{2*}

(1.School of Environmental and Safety Engineering, Changzhou University, Changzhou 213000, China; 2.Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agricultural Products, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China; 3.Analysis and Testing Center, Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University, Jiaxing 314006, China)

Abstract: Toxicity tests were conducted to evaluate the 15 min and 30 min acute toxicity effects of single and mixed samples of carbofuran, cadmium (Cd) and copper (Cu) (carbofuran-Cd and carbofuran-Cu toxicity mixed ratios of 1:1, 1:2 and 2:1, carbofuran-Cd-Cu toxicity mixed ratios of 1:1:1, 1:1:2, 1:2:1 and 2:1:1) to *Vibrio fischeri*, and to calculate the median effective concentration (EC₅₀) of the single and mixed samples. EC₅₀ values of carbofuran, Cd and Cu for 15 min tests are 101.29, 13.11 and 47.06 mg·L⁻¹, and that for 30 min tests are 107.88, 11.17 and 39.73 mg·L⁻¹ respectively. Toxicity unit (TU) method, mixtures toxicity index (MTI) method and additive index (AI) method were used to evaluate the joint toxicity of carbofuran, Cd and Cu to *Vibrio fischeri*. The results show that the joint toxicity of carbofuran-Cd, carbofuran-Cu and carbofuran-Cd-Cu are partial additive and synergistic effects, which present that the joint toxicity are higher than the single toxicity. The joint toxicity of binary and ternary mixtures to *Vibrio fischeri* depend on the different mixed ratios. Even though the type are the same, the strength may be different. The evaluation results of TU and MTI method are consistent, while AI method shows slight different from the other two methods.

Keywords: carbofuran; Cd; Cu; *Vibrio fischeri*; joint toxicity

收稿日期:2016-11-25

作者简介:仇爱锋(1991—),男,江苏盐城人,硕士研究生,主要研究方向为环境毒理学。E-mail:captainqiu1013@163.com

*通信作者:陈子雷 E-mail:CZL7274@163.com

基金项目:混合农药联合毒性效应与膳食摄入风险评估(ZR2016YL027);国家重大科学仪器设备开发专项(2012YQ15008705)

Project supported: Joint Toxic Effects of Mixed Pesticides and Risk Assessment of Dietary Intake, China (ZR2016YL027); The National Key Scientific Instrument and Equipment Development Projects, China (2012YQ15008705)

农药是有意引入农业环境中的化学物质,残留时间长,有较强生物毒性,易造成非目标物种的损害,因此农药对土壤环境的污染成为公众关注的问题^[1-2]。当前,土壤污染呈形式多样且范围扩大之势,污染物之间的复杂联合作用是其表现之一,具代表性的是有机物和重金属的复合污染^[3]。

目前,我国受重金属污染的耕地面积已达2000万 hm^2 ,占全国耕地面积的1/6。2014年土壤调查公报指出镉、汞、砷、铜、铅、铬、锌、镍8种无机污染物点位超标率分别为7.0%、1.6%、2.7%、2.1%、1.5%、1.1%、0.9%、4.8%^[4],其中Cd是一种典型非必需的剧毒重金属,被国际癌症研究机构界定为人类致癌物(第一组)^[5]。Cd和Cu等化合物通过食物链的富集作用进入人体,在肝脏和肾脏积存,造成毒素富集损伤,另外也对骨骼产生影响^[6-7]。在农业活动中,农药与重金属的联合污染较为常见,比如耕种使用农药克百威杀虫,伴随使用含Cu的杀菌剂进行杀菌,如可杀得 $[\text{Cu}(\text{OH})_2]$,其可缓慢释放出Cu。此外,在耕种过程中过量使用磷肥会造成Cd污染^[8],同时由于畜禽饲料生产中存在超量加入重金属元素的现象,动物粪便和秸秆混合的有机肥料也存在重金属污染^[9]。因此,在土壤环境中,克百威、Cd和Cu造成复合污染不可避免。

目前,部分学者针对重金属或农药克百威等污染物的单一毒性效应和机理做了深入探索,Cooper等^[10]报道了 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 对两种蚤类的急性和慢性毒性,潘波等^[11]用蚯蚓研究了克百威的生物毒性。近年来,发光细菌毒性检测法作为一种毒性效应快、灵敏度高,成本低的方法,应用较广^[12]。发光细菌是一类在正常生理条件下能够发射可见荧光的细菌,在合适浓度范围内,其相对发光强度与污染物浓度之间存在剂量-效应关系^[13]。Wu等^[14]用发光细菌作受试生物发现多菌灵与 Hg^{2+} 能产生拮抗作用,周垂帆等^[3]利用明亮杆菌研究了草甘膦对重金属Cd和Cu的抑制效应。

鉴于克百威和重金属共存的环境污染和相互作用机理还不完善,本试验采用费氏弧菌为受试生物,用毒性单位(TU)法、相加指数(AI)法和混合毒性指数(MTI)法评价克百威、Cd和Cu的联合毒性效应,为重金属和农药复合污染的生态风险评估提供一定的数据支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 受试样本

克百威,纯度为98.8%,购自上海农药研究所;氯化镉($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$),分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司;硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$),分析纯,购自江苏强盛功能化学有限公司。

实验前分别将克百威、氯化镉和硫酸铜在超纯水中配制成储备液,并于4℃下密封保存备用。

1.1.2 供试生物

费氏弧菌冻干粉(*Vibrio fischeri*, NRRLB-111777),菌株符合国际标准,购于北京金达清创环保科技有限公司,-20℃避光保存。

1.2 仪器与试剂

细胞培养板(WHB-24,美国康宁公司);微孔板型多功能检测仪(E7031,美国普洛麦格公司);超声清洗机(BL22-500A,上海比郎仪器公司);氯化钠(分析纯,江苏强盛功能化学有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 费氏弧菌复苏

在4℃的条件下,将费氏弧菌冻干粉用1mL 2% NaCl溶液制成细菌悬浮液,复苏3min,菌体即发光,再加入2% NaCl溶液到10mL,混匀后20℃恒温15min。实验前,用微孔板型多功能检测仪测试其发光强度(需大于100万光子数)。

1.3.2 单一毒性测定

(1) 预实验

按对数系列将样品液稀释成5个选定质量浓度,每个浓度3次平行,并设置空白对照(不含毒物的2% NaCl溶液)。将96孔板第一行设为空白对照,在每个试验浓度孔中加入稀释后的菌液100 μL ,用微孔板型多功能检测仪测试发光菌的初始发光强度,测试合格后,每孔按照实验质量浓度梯度加入100 μL 的受试样品,混匀后20℃恒温反应15min,测其发光强度,并计算发光抑制率。设定正式实验质量浓度。

(2) 正式实验

按预实验得到的质量浓度范围,用2%浓度的NaCl溶液将样品稀释成12个几何级数质量浓度梯度,尽量保证其覆盖相对发光强度的10%~90%^[15],试验方法参照预实验。

1.3.3 联合毒性测定

根据克百威、Cd和Cu对费氏弧菌的单一毒性实验结果,以15min EC_{50} 值为一个毒性单位,按等毒性单位比1:1、1:2和2:1设计二元联合毒性实验,等毒性单位比1:1:1、1:1:2、1:2:1和2:1:1设计三元联合毒性实验,方法参照单一毒性实验。测定不同毒性单位

比的混合物对费氏弧菌的 EC_{50} 值,用于后续联合毒性效应评价。

1.3.4 数据处理

应用 Origin 8.5 软件中的非线性最小二乘拟合 (NLSF) 模块对混合污染物毒性的剂量-效应模型 (DRC) 进行非线性拟合,再由非线性回归方程计算出发光细菌的 15 min 和 30 min 的 EC_{50} 值,并通过 SPSS 计算出 95% 置信区间。每个染毒浓度组与空白对照组的显著性差异采用 SPSS 进行分析比较 ($P < 0.05$)。

1.4 联合毒性效应评价

1.4.1 TU 法^[16]

$$M = \sum_{i=1}^n TU_i = \sum_{i=1}^n \frac{C_i}{EC_{50i}}$$

$$M_0 = M / TU_{i, \max}$$

式中: TU_i 为混合污染物中 i 组分的毒性单位, $TU_{i, \max}$ 为混合物中各组分毒性单位最大值; C_i 为混合物中造成生物半抑制 i 组分的浓度; EC_{50i} 为单一受试样本 i 的 EC_{50} 值。

根据计算得到的 M_0 和 M 值评价联合毒性的类型: $M=1$, 简单相加作用; $1 < M < M_0$, 部分相加作用; $M < 1$, 协同作用; $M=M_0$, 此时 $TU_{i, \max}=1$, 表示单一污染物决定联合毒性, 即独立作用; $M > M_0$, 拮抗作用。

1.4.2 AI 法^[17]

$$M \leq 1, AI = \frac{1}{M} - 1.0$$

$$M > 1, AI = 1.0 - M$$

根据 AI 值评价联合毒性的类型: $AI=0$, 简单相加作用; $AI > 0$, 协同作用; $AI < 0$, 拮抗作用。

1.4.3 MTI 法^[18]

$$MTI = 1 - \lg \frac{M}{\lg M_0}$$

根据 MTI 值评价联合毒性的类型: $MTI=1$, 简单相加作用; $MTI < 0$, 拮抗作用; $MTI > 1$, 协同作用; $MTI=0$, 独立作用; $0 < MTI < 1$, 部分相加作用。

2 结果与讨论

2.1 单一急性毒性效应

克百威、Cd 和 Cu 对费氏弧菌作用 15 min 和 30 min 的 EC_{50} 值及 95% 的置信区间均可用 Origin 8.5 软件中的 Logistic 函数进行非线性拟合获得。如图 1 所示, 暴露 15 min, 克百威、Cd 和 Cu 对费氏弧菌的 EC_{50} 分别为 101.29、13.11、47.06 $mg \cdot L^{-1}$, 可得出受试样本对费氏弧菌的毒性大小为 $Cd > Cu >$ 克百威; 暴露 30

min, 毒性大小顺序未变, 克百威、Cd 和 Cu 对费氏弧菌的 EC_{50} 分别为 107.88、11.17、39.73 $mg \cdot L^{-1}$ 。与暴露 15 min 相比, 暴露 30 min 时克百威的毒性减弱, Cd 和 Cu 的毒性增强, 原因可能是随着暴露时间延长, 重金属增强细胞膜通透性, 使其毒性增大。此结果与邢胜男^[19]的研究结果相似。本研究中 Cd 和 Cu 对费氏弧菌的毒性大小顺序与已有结果相同, 如李真等^[20]总结的重金属离子的毒性顺序 $CuSO_4 \cdot 5H_2O < CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$ 。

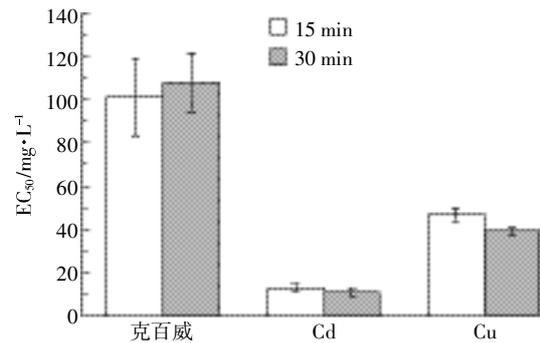


图1 克百威、Cd 和 Cu 对费氏弧菌的 EC_{50} 值
Figure 1 The EC_{50} value of carbofuran, Cd and Cu to *Vibrio fischeri*

2.2 二元联合毒性效应

克百威-Cd 与克百威-Cu 的二元联合毒性结果如表 1 所示, 二元混合物中各样本的 15 min 和 30 min EC_{50} 值都低于单一毒性的 EC_{50} 值。采用 TU 法、AI 法和 MTI 法评价混合物联合毒性的结果列于表 2 和表 3。根据李志华等^[21]的研究, AI 法评价联合毒性效应时, 只有当 $AI=0$ 时, 才是简单相加作用, 但仅存于理想状态下, 真实实验中存在误差, 难以得到 $AI=0$ 的结果。本实验中有几组混合体系的评价指数 AI 在 $-0.1 \sim -0.02$ 之间, 可以近似认为这几组联合毒性效应为部分相加。

克百威-Cd 的混合体系中, TU 法和 MTI 法评价结果具有一致性。当等毒性单位比为 1:1 时, 三种评价方法的评价结果相同, 为部分相加作用, 表明其联合毒性介于独立和相加作用之间, 毒性略有增强。配比为 1:2 时, TU 法和 MTI 法评价结果一致, 为部分相加作用, 而 AI 法评价暴露 15 min 和 30 min 的联合毒性效应结果为拮抗作用。AI 法的评价结果与其他两个方法差异的原因可能是: 目前相加指数法的评价准则不够细分和完善, 用于评价联合作用为部分相加和拮抗时不够灵敏^[22]。上述结果与邓辅财等^[23]以及王兰^[24]的研究结论相似。综合考虑, 二元联合毒性大

表1 克百威-Cd和克百威-Cu对费氏弧菌的联合毒性

Table 1 Joint toxicity of carbofuran-Cd and carbofuran-Cu to *Vibrio fischeri*

混合比例	克百威-Cd			克百威-Cu		
	受试样品	15 min EC ₅₀ /mg·L ⁻¹	30 min EC ₅₀ /mg·L ⁻¹	受试样品	15 min EC ₅₀ /mg·L ⁻¹	30 min EC ₅₀ /mg·L ⁻¹
1:1	克百威	51.74	50.60	克百威	18.95	18.21
	Cd	6.70	6.55	Cu	8.81	8.46
1:2	克百威	44.97	38.77	克百威	36.74	28.83
	Cd	11.38	10.04	Cu	34.13	26.78
2:1	克百威	57.43	59.28	克百威	74.45	72.53
	Cd	3.72	3.84	Cu	17.29	16.84

表2 克百威-Cd二元混合体系联合毒性评价结果

Table 2 Evaluation of joint toxicity of binary mixtures of carbofuran-Cd

混合比例	作用时间	TU法			AI法		MTI法	
		M ₀	M	作用类型	AI	作用类型	MTI	作用类型
1:1	15 min	2.00	1.02	部分相加	-0.02	部分相加	0.97	部分相加
	30 min	1.79	1.05	部分相加	-0.05	部分相加	0.85	部分相加
1:2	15 min	1.53	1.33	部分相加	-0.33	拮抗	0.29	部分相加
	30 min	1.40	1.26	部分相加	-0.26	拮抗	0.31	部分相加
2:1	15 min	1.50	0.85	协同	0.18	协同	1.40	协同
	30 min	1.62	0.89	协同	0.12	协同	1.24	协同

表3 克百威-Cu二元混合体系联合毒性评价结果

Table 3 Evaluation of joint toxicity of binary mixtures of carbofuran-Cu

混合比例	作用时间	TU法			AI法		MTI法	
		M ₀	M	作用类型	AI	作用类型	MTI	作用类型
1:1	15 min	1.98	0.37	协同	1.70	协同	2.46	协同
	30 min	1.78	0.38	协同	1.63	协同	2.68	协同
1:2	15 min	1.50	1.09	部分相加	-0.09	部分相加	0.79	部分相加
	30 min	1.39	0.94	协同	0.06	协同	1.19	协同
2:1	15 min	1.50	1.10	部分相加	-0.10	部分相加	0.76	部分相加
	30 min	1.62	1.09	部分相加	-0.09	部分相加	0.82	部分相加

于单个物质毒性之和,毒性略增。配比为2:1时,三种评价方法的评价结果一致,为协同作用,表明其混合物联合毒性大于各物质单独作用毒性之和,毒性大幅增强。对于协同作用,有研究认为膜通透性理论可以对其进行解释,不同化合物共同作用时,可以增加细胞膜的通透性,使得不同化合物可以进入生物体内,增强混合物的生物毒性,产生协同作用^[25]。由表2可以看出,克百威-Cd的二元混合物对费氏弧菌的联合毒性效应以相加作用为主,少部分表现为弱的协同和拮抗作用。从不同评价方法的结论分析,在实验探索多组分混合物联合作用时,需多选用几种方法对最终结果进行评价,选择一致性的结果作为最终结论。

克百威-Cu的混合体系中,三种评价方法的结果

具有一致性。由表3可知,当毒性单位比为1:1时,二元联合毒性效应是协同作用,混合物毒性大于各物质相加作用毒性。在1:2的配比下,暴露30 min,二元联合毒性效应由部分相加作用变为协同作用,表明随着暴露时间的延长,克百威-Cu的联合毒性逐渐增强。由单一毒性实验结果可知Cu的毒性大于克百威,Cu在混合物中所占比例大、浓度高时,可增加细胞膜的通透性,利于Cu渗入细胞膜内产生毒害作用,使得二元毒性逐渐增强^[26-27]。在2:1的配比下,二元联合毒性效应是较弱的部分相加作用,偏向于协同作用,即克百威-Cu的二元联合毒性强于其单一毒性。对比两组二元混合物可以看出,在等毒性单位比为1:1时,克百威-Cu毒性大于克百威-Cd。杨亚琴等^[28]研究表

明,Cu对细胞表面具有很高的亲和力,而克百威具有脂溶性,能够穿过细胞膜,增大混合物的生物毒性。

2.3 三元联合毒性效应

克百威、Cd和Cu的三元联合毒性实验结果如表4和表5所示。克百威-Cd-Cu等毒性单位比1:1:1,暴露15 min和30 min时,TU法和MTI法的评价结果均为部分相加作用,而AI法的评价结果为拮抗作用。克百威-Cd-Cu配比1:1:2,暴露15 min时,三种评价方法的评价结果都为部分相加作用,暴露30 min时,三种方法都表现为协同作用,表明三元联合毒性效应随着暴露时间的延长而增强。结合克百威-Cu的二元联合毒性实验结果,Cu在混合物中所占比例越大,越容易促进污染物逐渐渗入细胞膜内,并且Cu与Cd共存时表现为毒性增强^[29],则三元联合毒性相应增强。克百威-Cd-Cu的配比为1:2:1,暴露15 min和30 min时,三种方法的评价结果一致,均为协同作用,表示其毒性剧增。克百威-Cd-Cu的配比为2:1:1,暴露

15 min时,三种评价方法的评价结果都为简单相加作用,此时三元联合毒性效应等于各个物质毒性之和,而暴露30 min,都为协同作用,表明三元联合毒性随着暴露时间的延长,毒性增强。原因可能是:克百威是一种弱酸性化合物,当克百威所占比例较大时,高浓度的克百威会降低混合物的pH,在较低pH条件下,Cd和Cu的解析量逐渐增大,增强Cd和Cu的毒性,导致三元联合毒性增强^[30]。

本实验结果表明,在多种污染物混合的情况下,生物体受到复合污染的联合毒性作用,其中不仅有污染物自身的理化性质的影响,而且污染物不同混合比例也起着相当重要的作用^[31]。克百威,Cd和Cu在不同混合比例下,整体都产生了部分相加和协同作用,即三种污染物混合毒性等于或大于三种污染物的单一毒性总和。周启星等^[32]模拟实验结果表明,复合污染的联合毒性效应取决于复合污染物不同浓度的混合比例。

表4 克百威-Cd-Cu对费氏弧菌的联合毒性

Table 4 Joint toxicity of carbofuran-Cd-Cu to *Vibrio fischeri*

混合比例	受试样品	15 min EC ₅₀ (95%置信区间)/(mg·L ⁻¹)	30 min EC ₅₀ (95%置信区间)/(mg·L ⁻¹)
1:1:1	克百威	42.43(39.85~45.29)	37.78(35.80~39.85)
	Cd	5.49(5.16~5.86)	4.89(4.64~5.16)
	Cu	19.71(18.51~21.04)	17.55(16.63~18.51)
1:1:2	克百威	25(23.28~26.87)	18.45(17.31~19.60)
	Cd	3.66(2.85~4.56)	2.38(2.23~2.53)
	Cu	23.26(21.65~24.89)	17.15(16.09~18.22)
1:2:1	克百威	22.35(20.03~24.77)	16.74(13.67~19.41)
	Cd	5.80(5.19~6.42)	4.26(3.54~5.00)
	Cu	10.40(9.31~11.52)	7.64(6.35~9.02)
2:1:1	克百威	50.73(47.76~53.83)	42.12(38.90~45.48)
	Cd	3.27(3.08~3.47)	2.72(2.51~2.93)
	Cu	11.78(11.09~12.39)	9.78(9.03~10.56)

表5 克百威-Cd-Cu三元混合体系联合毒性评价结果

Table 5 Evaluation of joint toxicity of ternary mixtures of carbofuran-Cd-Cu

混合比例	作用时间	TU法			AI法		MTI法	
		M ₀	M	作用类型	AI	作用类型	MTI	作用类型
1:1:1	15min	3.00	1.26	部分相加	-0.26	拮抗	0.79	部分相加
	30 min	2.78	1.23	部分相加	-0.23	拮抗	0.80	部分相加
1:1:2	15 min	2.06	1.02	部分相加	-0.02	部分相加	0.97	部分相加
	30 min	1.88	0.81	协同	0.23	协同	1.33	协同
1:2:1	15 min	1.98	0.88	协同	0.14	协同	1.19	协同
	30 min	1.91	0.73	协同	0.37	协同	1.49	协同
2:1:1	15 min	2.00	1.00	简单相加	0	简单相加	1	简单相加
	30 min	2.25	0.88	协同	0.14	协同	1.16	协同

3 结论

(1)克百威、Cd 和 Cu 单一作用于费氏弧菌时,克百威暴露 15 min 和 30 min 的 EC_{50} 分别为 101.29、107.88 $mg \cdot L^{-1}$;Cd 暴露 15 min 和 30 min 的 EC_{50} 分别为 13.11、11.17 $mg \cdot L^{-1}$;Cu 暴露 15 min 和 30 min 的 EC_{50} 分别为 47.06、39.73 $mg \cdot L^{-1}$ 。毒性大小依次为 $Cd > Cu >$ 克百威。

(2)克百威-Cd、克百威-Cu 和克百威-Cd-Cu 在不同毒性单位配比下的联合毒性效应主要表现为相加作用和协同作用,表明其复合污染后毒性有不同程度的增强,在农业应用中需引起重视。

(3)由于不同污染物复合的复杂性,在实际联合毒性风险评估中应考虑其混合比例、混合时间等因素,同时复合污染物对发光菌产生毒性作用的机制尚不明确,需进一步的实验证实。

参考文献:

- [1] Mehler W T, Li H, Lydy M J, et al. Identifying the causes of sediment-associated toxicity in urban waterways of the Pearl river delta, China[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(5):1812-9.
- [2] 王 俊,胡进锋,陈 峰,等.福州菜地土壤中有机磷农药残留特征及风险评估[J].农业环境科学学报,2014,33(5):951-957.
WANG Jun, HU Jin-feng, CHEN Feng, et al. Residues and risk assessment of organophosphorus pesticides in vegetable soils in Fuzhou, China [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2014, 33(5):951-957.
- [3] 周垂帆,林静雯,李 莹,等.草甘膦对重金属毒性的抑制效应研究——以发光菌(*Photobacterium phosphoreum* T3)为例[J].农业环境科学学报,2014,33(12):2329-2334.
ZHOU Chui-fan, LIN Jing-wen, LI Ying, et al. Inhibitory effect of glyphosate on toxicity of heavy metals: A case study on *Photobacterium phosphoreum* T3[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2014, 33(12): 2329-2334.
- [4] 刘文庆,祝 方,马少云.重金属污染土壤电动力学修复技术研究进展[J].安全与环境工程,2015,22(2):55-60.
LIU Wen-qing, ZHU Fang, MA Shao-yun. Research progress on the electro-kinetic remediation of soil polluted by heavy metal[J]. *Safety and Environmental Engineering*, 2015, 22(2):55-60.
- [5] 殷 健.重金属对斑马鱼的毒性效应及作用机制研究[D].北京:北京协和医学院,2014.
YIN Jian. Studies on toxic effect and mechanism of heavy metals on zebrafish[D]. Beijing: Peking Union Medical College, 2014.
- [6] Malik N, Biswas A K, Qureshi T A, et al. Bioaccumulation of heavy metals in fish tissues of a freshwater lake of Bhopal[J]. *Environmental Monitoring & Assessment*, 2010, 160(1/2/3/4):267-276.
- [7] Chen J, Myerburg M M, Passero C J, et al. External Cu^{2+} inhibits human epithelial Na^+ channels by binding at a subunit interface of extracellular domains[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(31):27436-27446.
- [8] Wang Q Y, Zhou D M, Long C. Microbial and enzyme properties of apple orchard soil as affected by long-term application of copper fungicide[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(7):1504-1509.
- [9] 潘 寻,韩 哲,贲伟伟.山东省规模化猪场猪粪及配合饲料中重金属含量研究[J].农业环境科学学报,2013,32(1):160-165.
PAN Xun, HAN Zhe, PEN Wei-wei. Heavy metal contents in pig manure and pig feeds from intensive pig farms in Shandong Province, China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(1):160-165.
- [10] Cooper N L, Bidwell J R, Kumar A. Toxicity of copper, lead, and zinc mixtures to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia carinata*[J]. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 2009, 72(5):1523-1528.
- [11] 潘 波,方 佳,林 勇,等.土壤中克百威的动态变化及其对蚯蚓的毒性[J].农药,2012,51(8):595-598.
PAN Bo, FANG Jia, LIN Yong, et al. The dynamic changes and toxicity to earthworms of carbofuran in soil[J]. *Agrochemicals*, 2012, 51(8): 595-598.
- [12] 杜丽娜,杨 帆,穆玉峰,等.某制药废水对发光细菌急性毒性的评价研究[J].环境科学,2014,35(1):286-291.
DU Li-na, YANG Fan, MU Yu-feng, et al. Evaluation of the acute toxicity of pharmaceutical wastewater to luminescent bacteria[J]. *Environmental Science*, 2014, 35(1):286-291.
- [13] 李 璇,蔡磊明,汤保华,等.几种有机化合物与重金属对发光细菌的联合毒性[J].农药,2011,50(5):365-367.
LI Xuan, CAI Lei-ming, TANG Bao-hua, et al. The joint toxicity of organic pollutants and heavy metals on luminescent bacteria (*Photobacterium phosphoreum*) [J]. *Agrochemicals*, 2011, 50(5):365-367.
- [14] Wu S H, Zhou D P, Xu Y T, et al. The joint toxicity of binary mixed pollutants to luminescent bacteria[J]. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2011, 27(3):16-20.
- [15] 朱文杰,郑天凌,李伟民.发光细菌与环境毒性检测[M].北京:中国轻工业出版社,2009.
ZHU Wen-jie, ZHENG Tian-ling, LI Wei-min. luminescent bacteria and environmental toxicity detection[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2009.
- [16] Marking L, Mauck W. Toxicity of paired mixtures of candidate forest insecticides to rainbow trout[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1975, 13(5):518-23.
- [17] 孟顺龙,瞿建宏,宋 超,等.农药灭多威和辛硫磷对罗非鱼的联合毒性研究[J].农业环境科学学报,2014,33(2):257-263.
MENG Shun-long, QU Jian-hong, SONG Chao, et al. Joint toxicity of pesticides methomyl and phoxim to tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2014, 33(2):257-263.
- [18] Könnemann H. Quantitative structure-activity relationships in fish toxicity studies. Part 1: Relationship for 50 industrial pollutants[J]. *Toxicology*, 1981, 19(3):209-221.
- [19] 邢胜男.斑马鱼胚胎发育毒性试验评价重金属联合生物毒性[D].上海:上海师范大学,2016.
XING Sheng-nan. Evaluation of combined toxicity of heavy metals on zebrafish embryo developmental toxicity test[D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2016.

- [20] 李真, 苗晶晶, 潘鲁青. 6种重金属的发光菌毒性效应及其海洋生物物种敏感度分析[J]. 海洋环境科学, 2015, 34(2): 176-183.
LI Zhen, MIAO Jing-jing, PAN Lu-qing. Toxicity effect of heavy metals on *Photobacterium phosphoreum* and the species sensitivity comparison with other marine organisms[J]. *Marine Environmental Science*, 2015, 34(2): 176-183.
- [21] 李志华, 朱正丽, 陆光华, 等. 2-氯苯酚与取代苯酚及苯胺类化合物对鲫鱼联合毒性效应的定量构效关系[J]. 河海大学学报(自然科学版), 2012, 40(2): 156-161.
LI Zhi-hua, ZHU Zheng-li, LU Guang-hua, et al. Quantitative structure-activity relationship of joint toxic effects of 2-chlorophenol, substituted phenols, and anilines on *Carassius auratus*[J]. *Journal of Hohai University(Natural Sciences)*, 2012, 40(2): 156-161.
- [22] 杨永滨, 刘征涛, 郑明辉, 等. 卤代酚对斑马鱼的急性联合毒性效应研究[J]. 环境科学研究, 2007, 20(2): 5-8.
YANG Yong-bin, LIU Zheng-tao, ZHENG Ming-hui, et al. Study on the effects of joint acute toxicities of halophenols in zebrafish[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2007, 20(2): 5-8.
- [23] 邓辅财, 刘树深, 刘海玲, 等. 部分重金属化合物对淡水发光菌的毒性研究[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(4): 402-408.
DENG Fu-cai, LIU Shu-shen, LIU Hai-ling, et al. Toxicities of selected heavy metal compounds and their mixtures to photobacteria(*Vibrio-tinghaiensis* sp-Q67)[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2007, 2(4): 402-408.
- [24] 王兰. 多种重金属对发光菌联合毒性特征研究[D]. 北京: 华北电力大学, 2014.
WANG Lan. Research on joint toxicity of multiple heavy metal compounds to photobacteria phosphoreum[D]. Beijing: North China Electric Power University, 2014.
- [25] 邱阳, 邓延慧, 王建秋, 等. 利用发光菌毒性测试评价氯苯及其降解中间产物的毒性[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2009, 29(1): 92-95.
QIU Yang, DENG Yan-hui, WANG Jian-qiu, et al. Toxicity assessment of chlorobenzene and some of the intermediate products using *Photobacterium phosphoreum*[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Nanjing(Natural Science)*, 2009, 29(1): 92-95.
- [26] 苏丽敏, 刘惠清, 李志群, 等. 三种农药与三种重金属对发光菌的联合毒性效应[J]. 东北师大学报(自然科学), 2011, 43(4): 137-140.
SU Li-min, LIU Hui-qing, LI Zhi-qun, et al. Joint toxic effects of three pesticides and three heavy metals on luminescent bacteria[J]. *Journal of Northeast Normal University(Natural Science Edition)*, 2011, 43(4): 137-140.
- [27] 赵保真. Cu-磺胺嘧啶单一及复合污染的生态毒性效应研究[D]. 新乡: 河南师范大学, 2012.
ZHAO Bao-zhen. Study of the ecology toxic effects of single and combined pollution between Cu and sulfadiazine[D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2012.
- [28] 杨亚琴, 贾秀英. Cu²⁺、Zn²⁺和 Cd²⁺对蟾蜍蝌蚪的联合毒性[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(3): 356-359.
YANG Ya-qin, JIA Xiu-ying. Joint toxicity of Cu²⁺, Zn²⁺ and Cd²⁺ to tadpole of *Bufo bufo gargarizans*[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2006, 12(3): 356-359.
- [29] 欧小兵, 李海云, 陈永煌, 等. 铜、镉对水螅的急性和联合毒性作用[J]. 环境污染与防治, 2006, 28(8): 584-588.
OU Xiao-bing, LI Hai-yun, CHEN Yong-huang, et al. Toxicity and toxic effects of heavy metals cadmium and copper on *Hydra* sp.[J]. *Environmental Pollution & Control*, 2006, 28(8): 584-588.
- [30] 许艳秋. 克百威-镉、氯噻磺隆-镉复合污染对土壤酶活性影响研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2006.
XU Yan-qiu. Study on activities of soil enzyme induced of carbofuran and cadmium, chlfonylurea-rthyl and cadmium combined pollution[D]. Changchun: Northeast Normal University, 2006.
- [31] 汤保华, 祝凌燕, 周启星. 五溴联苯醚(Penta-BDE)与重金属对水生无脊椎动物大型蚤 *Daphnia magna* 存活及其繁殖的联合毒性影响[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2010, 49(6): 93-99.
TANG Bao-hua, ZHU Ling-yan, ZHOU Qi-xing. Joint effect of Penta-BDE and heavy metals on aquatic invertebrate *Daphnia magna* survival and its reproduction[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2010, 49(6): 93-99.
- [32] 周启星, 孔繁祥, 朱琳. 生态毒理学[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
ZHOU Qi-xing, KONG Fan-xiang, ZHU Lin. Ecological toxicology[M]. Beijing: Science Press, 2006.