

## 三嗪类农药复合污染物对蛋白核小球藻的联合毒性作用评估

王滔, 班龙科, 张瑾, 卞志强, 潘法康

引用本文:

王滔, 班龙科, 张瑾, 等. 三嗪类农药复合污染物对蛋白核小球藻的联合毒性作用评估[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(3): 482–495.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2019-1096>

## 您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

### 多元抗生素与重金属混合物对蛋白核小球藻的时间依赖性协同与拮抗作用

陈敏, 张瑾, 董欣琪, 班龙科, 卞志强

农业环境科学学报. 2018, 37(5): 850–859, 858 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-1159>

### 磺胺类抗生素对青海弧菌Q67的浓度比依赖性拮抗作用

丁婷婷, 张瑾, 董欣琪, 洪桂云, 鲍立宁

农业环境科学学报. 2017, 36(11): 2199–2206 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-0722>

### 克百威、镉和铜对费氏弧菌的联合毒性效应

仇爱锋, 王玉涛, 张树秋, 彭强辉, 陈子雷

农业环境科学学报. 2017, 36(5): 869–875 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-1502>

### 卡马西平对小球藻生长的影响和氧化损伤

阎晓静, 王金花, 朱鲁生, 王军, 张风兆

农业环境科学学报. 2017, 36(4): 643–650 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-1259>

### 常用农药对赤子爱胜蚓急性毒性和抗氧化酶系的影响

姜锦林, 单正军, 周军英, 卜元卿, 田丰

农业环境科学学报. 2017, 36(3): 466–473 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-1095>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

王滔, 班龙科, 张瑾, 等. 三嗪类农药复合污染物对蛋白核小球藻的联合毒性作用评估[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(3): 482–495.

WANG Tao, BAN Long-ke, ZHANG Jin, et al. Evaluation of combined toxicity of triazine pesticide contaminants against *Chlorella pyrenoidosa*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(3): 482–495.

# 三嗪类农药复合污染物对蛋白核小球藻的联合毒性作用评估

王滔, 班龙科, 张瑾\*, 卞志强, 潘法康

(安徽建筑大学环境与能源工程学院, 安徽省水污染控制与废水资源化重点实验室, 合肥 230601)

**摘要:**为探讨复合污染了三嗪类农药对非靶标生物的联合毒性作用,以苯噻草酮(Metamitron, Met)、草净津(Bladex, Bla)和特丁通(Terbumeton, Ter)为目标污染物,以蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*, *C. pyrenoidosa*)为指示生物,分别应用直接均分射线法和均匀设计射线法设计二元及三元混合物体系,采用微板毒性分析法系统测定3种农药及其混合污染物对*C. pyrenoidosa*的时间-浓度-效应数据,应用浓度加和(Concentration addition, CA)为标准参考模型分析混合物毒性相互作用,应用二维和三维等效图表征混合物联合毒性作用规律,并同步分析*C. pyrenoidosa*中叶绿素a含量变化,进一步评价农药及其混合物对小球藻的毒性效应。结果表明:农药及其混合物对*C. pyrenoidosa*的毒性数据可用Logit函数较好拟合,3种农药的毒性顺序为Bla>Ter>Met;依据CA模型,二元混合物的毒性相互作用整体上呈现为加和作用向协同作用的转变,二维等效图显示3组二元混合物体系在半数效应浓度均具有较强的协同作用;农药三元混合物体系的5条射线均呈现加和作用,且不随暴露时间延长发生改变,三维等效图法与CA模型的分析结果基本一致;叶绿素a含量减少率与其浓度-效应曲线变化趋势基本一致。

**关键词:**三嗪类农药;蛋白核小球藻;联合毒性;叶绿素a;三维等效图

中图分类号:X592 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2020)03-0482-14 doi:10.11654/jaes.2019-1096

## Evaluation of combined toxicity of triazine pesticide contaminants against *Chlorella pyrenoidosa*

WANG Tao, BAN Long-ke, ZHANG Jin\*, BIAN Zhi-qiang, PAN Fa-kang

(Key Laboratory of Water Pollution Control and Wastewater Resource of Anhui Province, College of Environment and Energy Engineering, Anhui Jianzhu University, Hefei 230601, China)

**Abstract:** In order to explore the toxicity of pesticide mixtures to non-target organisms, three triazine pesticides; metamitron (Met), bladex (Bla), and terbumeton (Ter) being as research objects and *Chlorella pyrenoidosa* (*C. pyrenoidosa*) as a test organism, direct equipartition ray and uniform design ray procedures were used to design binary and ternary mixture systems, respectively. The time-concentration-effect curves of triazine pesticide contaminants on *C. pyrenoidosa* were determined by using the microplate toxicity analysis method. Concentration addition (CA) was used as a standard reference model to analyze the toxicity interaction within mixture systems. Two-dimensional isobologram and three-dimensional isobologram were applied to characterize combined toxicity interactions of mixtures. The change of *chlorophyll a* content in *C. pyrenoidosa* was analyzed to further evaluate the toxic effects of pesticides and their mixtures on *C. pyrenoidosa*. The results show that the Logit function can effectively describe the toxicity of pesticides and their mixtures toward *C. pyrenoidosa*, the toxicity order of the three triazines is as follows; Met>Bla>Ter. Based on the results predicted by CA model, toxicity interaction within binary mixtures

收稿日期:2019-10-16 录用日期:2019-12-11

作者简介:王滔(1996—),男,山西运城人,硕士研究生,从事毒理学研究。E-mail:943726050@qq.com

\*通信作者:张瑾 E-mail:ginnzy@163.com

基金项目:国家自然科学基金项目(21677001);安徽省自然科学基金项目(1708085MB50);安徽省质量工程项目(2016jyxm0214)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China (21677001); The Natural Science Foundation of Anhui Province (1708085MB50); Grant Program of Quality Technology of Anhui Province (2016jyxm0214)

changes from additive action to synergism, two-dimensional isobolograms indicate that the three binary mixture systems all show strong synergism at the median effective concentration. Five rays of ternary mixture systems all exhibit additive action which remain unchanged with the lengthening of exposure time. The results predicted by CA model are the same as those of three-dimensional isobolograms. The reduction rate of chlorophyll a content is consistent with the changing trends of the pesticides' concentration-response curves.

**Keywords:** triazine pesticides; *Chlorella pyrenoidosa*; combined toxicity; chlorophyll a; three-dimensional isobologram

农药在粮食生产和农业发展中使用量很大,我国以占全球7%的耕地面积养活了占全球22%的人口,其中农药发挥着关键作用<sup>[1]</sup>。施用的农药中只有10%能得到利用,而其余部分则会通过下渗和雨水冲刷等方式残留在环境中。残留农药可能通过食物链的传递作用进入人体,对人类健康构成威胁<sup>[2-3]</sup>。三嗪类农药主要用于防除禾本科杂草和阔叶杂草,是国内外应用广泛的高效除草剂之一,且该类药物具有水溶性强、化学性质稳定的特点,因而会对环境产生更持久的不利影响<sup>[4-7]</sup>。有研究表明,三嗪类农药是黄、淮海及松辽流域等不同水域中的主要检出农药<sup>[5]</sup>。

传统农残检测通常是按照标准项目逐个检测,这种方法可能会低估农药残留的风险<sup>[8-9]</sup>。由于环境中的农药会以各种形式和浓度共存,形成复杂的混合物并产生联合毒性,从而会对生物产生更大的风险,因此开展农药联合毒性作用分析的研究就显得尤为重要<sup>[10-12]</sup>。除浓度加和模型以外,等效线分析法也是比较经典的联合毒性作用评估方法,可全面考察某指定效应下混合物的毒性相互作用情况<sup>[13-14]</sup>。传统等效线图法适用于二元混合物联合毒性评估,有学者在此基础上还构建了适用于三元混合物的三维等效图法,并能直观地反映三元混合物联合毒性特征<sup>[15]</sup>。

因此,本研究选择在多种农作物中均被检出过的3种三嗪类农药<sup>[4,16]</sup>:苯嗪草酮(Metamitron, Met)、草净津(Bladex, Bla)、特丁通(Terbumeton, Ter)为混合物组分,以蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*, *C. pyrenoidosa*)为实验生物,分别采用直接均分射线法(Equipartition ray, Equ-Ray)和均匀设计射线法(Uniform design ray, UD-Ray)设计具有代表性的二元及三元混合物体系,应用微板毒性分析法(Microplate toxicity

analysis, MTA)考察三嗪类农药及其混合物体系的毒性,通过浓度加和(Concentration addition, CA)模型分析混合物毒性相互作用,并建立二维和三维等效图进一步评估混合物联合毒性,通过叶绿素a含量的测定考察三嗪类农药对蛋白核小球藻的生理毒性作用,以期科学评价三嗪类农药的环境风险提供基础数据,为三嗪类农药在农业生产中的科学应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 藻种、仪器及药品

1.1.1 藻种与仪器

实验藻种蛋白核小球藻(*C. pyrenoidosa*)购自中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库(FACHB),藻种的培养与保存方法参见文献[17]。

主要实验仪器:Synergy-2酶标仪(美国伯腾仪器有限公司)、MGC-250光照培养箱(上海一恒科技有限公司)、YXQ-LS-100A立式压力蒸汽灭菌锅(上海博迅实业有限公司)、721型分光光度计(上海舜宇恒平科学仪器有限公司)。

1.1.2 药品

农药:苯嗪草酮(Met)、草净津(Bla)及特丁通(Ter)均购自上海原叶生物科技有限公司。表1列出了3种农药的基本理化性质,图1为3种农药的化学结构。3种药物浓度均在溶解度范围内,使用超纯水配制药物储备液,并于4℃冰箱储存、备用。

1.2 混合物设计

在化学混合物中,各组分毒性大小及组分间毒性相互作用决定了混合物的整体毒性,且毒性大小及组分间毒性相互作用与暴露时间和浓度有关。为系统考察混合物的毒性作用规律,分别采用Equ-Ray和

表1 3种三嗪类农药的理化性质  
Table 1 The physiochemical properties of three triazine pesticides

| 名称 Name         | 简称 Abb. | 分子式 Molecular formula                            | CAS        | 分子量 Molecular weight/g·mol <sup>-1</sup> | 纯度 Purity/% | 浓度 Concentration/mol·L <sup>-1</sup> |
|-----------------|---------|--------------------------------------------------|------------|------------------------------------------|-------------|--------------------------------------|
| 苯嗪草酮 Metamitron | Met     | C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O | 41394-05-2 | 202.2                                    | >98.0       | 8.40E-04                             |
| 草净津 Bladex      | Bla     | C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>6</sub>  | 21725-46-2 | 240.6                                    | >99.3       | 4.16E-04                             |
| 特丁通 Terbumeton  | Ter     | C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> O | 33693-04-8 | 225.3                                    | >99.0       | 4.44E-04                             |

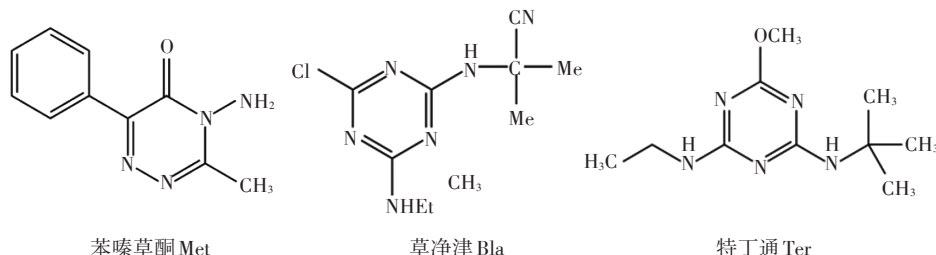


图1 3种三嗪类农药的化学结构

Figure 1 The chemical structures of three triazine pesticides

UD-Ray 设计农药二元及三元混合物体系<sup>[18-20]</sup>,表2为各混合物射线的组分及其浓度比 $P_i$ 值。

### 1.3 时间毒性测定与计算

应用基于蛋白核小球藻的微板毒性分析法,测定农药及其混合物对 *C.pyrenoidosa* 的时间毒性,采用透明的96孔微板作为实验载体<sup>[21-23]</sup>。微板实验设计方法:在微板最外侧36个孔中,均加入200  $\mu$ L超纯水,以减少边缘效应的影响;在第3列和第8列共12个孔中,从上至下依次加入按稀释因子设计的不同浓度药物溶液100  $\mu$ L;第4列和第5列为第3列的平行实验;第10列和11列为第8列的平行实验;在第2、6、7、11列共24个孔中均加入100  $\mu$ L超纯水作为空白对照组;最后在处理组和空白组共60个孔中均加入吸光度为0.20~0.30的100  $\mu$ L藻液,使每个微孔中总体积为200  $\mu$ L,加透明盖以减少溶剂挥发。重复以上操作3次<sup>[17]</sup>。

将加入药物和 *C.pyrenoidosa* 的微板置于 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、5000 lx的培养箱中培养,分别在12、24、48、72 h和96 h后取出,应用酶标仪测定690 nm波长下的吸光度,并计算各暴露时间下药物对 *C.pyrenoidosa* 的生长抑制率。

蛋白核小球藻抑制率的计算公式如下:

$$I = \left( 1 - \frac{OD}{OD_0} \right) \times 100\%$$

式中: $I$ 为抑制率; $OD_0$ 为对照组的吸光值; $OD$ 为实验组的吸光值。

### 1.4 时间毒性数据拟合

为反映 *C.pyrenoidosa* 在不同暴露时间、不同药物浓度下的生长变化规律,采用时间-浓度-效应三维曲线的方法。对于不同暴露时间的浓度-效应数据,采用Logit函数进行拟合,并根据拟合相关系数(Correlation coefficient,  $R^2$ )与均方根误差(Root mean square error, RMSE)判断拟合效果, $R^2$ 越接近1且RMSE越接近0,说明拟合效果越好<sup>[21]</sup>。毒性实验中的实验误差无法避免,因此在描述拟合函数不确定度时,利用观测置信区间(Observed confident interval, OCI)来表征毒性实验数据的准确程度<sup>[24]</sup>。

非线性Logit函数公式如下:

$$E = 1 / [1 + \exp(-\alpha - \beta \times \lg c)]$$

式中: $E$ 为毒性效应即生长抑制率; $c$ 为药物的浓度,  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $\alpha$ 和 $\beta$ 分别为位置和斜率参数。

### 1.5 混合物毒性相互作用分析

#### 1.5.1 浓度加和模型

混合物毒性相互作用的识别具有重要意义,目前国内常采用CA作为加和参考模型,且该模型可用于评估多数农药的混合物毒性<sup>[25-27]</sup>。当CA预测曲线位于OCI内,毒性相互作用表现为加和作用;当位于OCI以下时,则为协同作用;当位于OCI以上时,则为拮抗作用<sup>[28]</sup>。

CA模型数学表达式如下:

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

表2 混合物体系的组分及其浓度比

Table 2 The components and their concentration ratios of three binary and one ternary mixture systems

| 射线 Ray | $P_{\text{Met}}$ | $P_{\text{Bla}}$ | 射线 Ray | $P_{\text{Met}}$ | $P_{\text{Ter}}$ | 射线 Ray | $P_{\text{Bla}}$ | $P_{\text{Ter}}$ | 射线 Ray | $P_{\text{Met}}$ | $P_{\text{Bla}}$ | $P_{\text{Ter}}$ |
|--------|------------------|------------------|--------|------------------|------------------|--------|------------------|------------------|--------|------------------|------------------|------------------|
| R1     | 5.83E-01         | 4.17E-01         | R1     | 9.78E-01         | 2.19E-02         | R1     | 8.65E-01         | 1.35E-01         | R1     | 7.46E-01         | 1.23E-01         | 1.31E-01         |
| R2     | 7.78E-01         | 2.23E-01         | R2     | 9.47E-01         | 5.30E-02         | R2     | 7.19E-01         | 2.81E-01         | R2     | 7.46E-01         | 1.23E-01         | 1.31E-01         |
| R3     | 8.75E-01         | 1.25E-01         | R3     | 8.99E-01         | 1.01E-01         | R3     | 5.61E-01         | 4.39E-01         | R3     | 7.91E-01         | 1.92E-01         | 1.71E-02         |
| R4     | 9.33E-01         | 6.68E-02         | R4     | 8.17E-01         | 1.83E-01         | R4     | 3.90E-01         | 6.10E-01         | R4     | 8.67E-01         | 2.76E-02         | 1.05E-01         |
| R5     | 9.72E-01         | 2.78E-02         | R5     | 6.41E-01         | 3.59E-01         | R5     | 2.04E-01         | 7.97E-01         | R5     | 8.98E-01         | 7.58E-02         | 2.60E-02         |

式中: $C_i$ 表示混合物产生 $x\%$ 效应时第 $i$ 组分的浓度, $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $EC_{x,i}$ 表示混合物中第 $i$ 个组分单独作用时产生 $x\%$ 效应时的浓度, $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 1.5.2 二维等效图

对于二元混合物系统,利用二维等效线图法可全面考察某指定效应下不同混合比射线的毒性相互作用。利用浓度-效应曲线(Concentration response curve, CRC)函数计算某一等效效应下混合物浓度,根据拟合曲线的95% OCl确定该效应的置信上下限浓度,以两组分的毒性单位(Toxic unit, TU)为坐标绘制二维浓度图,等效点及其置信区间形成等效线段,基于CA模型绘制加和等效线。通过等效线段与加和等效线的位置关系可判断毒性相互作用的类型,且等效线段偏离程度越大,毒性相互作用越明显。若等效线段位于加和等效线下方,表示二元混合物组分间毒性相互作用为协同作用;若位于加和等效线上方,则为拮抗作用;若与加和等效线相交,则呈现为加和作用。

### 1.5.3 三维等效图

对于三元混合物系统,利用三维等效线图法可考察任意效应水平下组分间的毒性相互作用,其构建方法参见文献[15]。三维等效图中三角平面为浓度加和等效面,各条线段对应于不同混合物射线的半数效应浓度及置信区间。如果线段位于三角平面右上方,说明混合物毒性相互作用为拮抗作用;若线段与三角平面相交,则为加和作用;若线段位于三角平面左下方,则为协同作用[27]。

## 1.6 *C. pyrenoidosa* 中叶绿素 a 含量的测定

光合作用是植物体内最重要的生命活动,叶绿素也是各种浮游藻类中广泛存在的色素,因而其含量能客观反映植物的生长情况和光合作用水平[29]。对于*C. pyrenoidosa*,其体内的叶绿素 a 含量变化比叶绿素 b 对污染物的响应更为敏感[30],因此本文选择叶绿素 a 含量为指标,考察不同药物作用下叶绿素 a 含量随暴露时间和暴露浓度的变化情况。

叶绿素 a 含量的测定方法:取对数生长期的蛋白核小球藻藻液 10 mL,用 0.45  $\mu\text{m}$  的混合纤维素膜进行过滤,将带有藻细胞的滤膜置于冰箱冷冻过夜,取出后迅速加入体积分数为 95% 的乙醇溶液萃取 2 min,将萃取液超声破碎 15 min,于暗处静置 4 h 后以 5000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  冷冻离心 5 min,取上清液置于比色皿中,分别在 665 nm 和 649 nm 波长下测定吸光值[30-31]。

叶绿素 a 含量计算公式如下:

$$P_{\text{chla}} = \frac{(13.95 \times \text{OD}_{665} - 6.88 \times \text{OD}_{649}) \times V_1}{1000 \times V_2 \times L}$$

式中: $P_{\text{chla}}$ 为叶绿素 a 含量, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{OD}_{665}$ 为 665 nm 波长下的吸光值; $\text{OD}_{649}$ 为 649 nm 波长下的吸光值; $V_1$ 为定容体积, mL;  $V_2$ 为样品的体积, mL;  $L$ 为比色皿光程长度, cm。

每组药物在 10%、30%、50% 及 70% 4 个效应浓度下进行毒性实验,并以加入超纯水的藻液作为空白对照,分别在暴露时间 48 h 和 96 h 测定叶绿素 a 的含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 3 种农药对 *C. pyrenoidosa* 的毒性效应

通过 MTA 法测得 3 种三嗪类农药对 *C. pyrenoidosa* 的浓度-效应数据,利用 Logit 函数进行最小二乘拟合,其拟合参数  $\alpha$ 、 $\beta$  值以及统计结果( $R^2$  和 RMSE)见表 3,拟合曲线(CRCs)以及实验观测数据见图 2。

从表 3 可看出,Logit 函数能较好拟合 3 种农药对 *C. pyrenoidosa* 在不同暴露时间的浓度-效应数据, $R^2$  除在暴露时间 12 h 外均大于 0.97, RMSE 均小于 0.1。在暴露时间 12 h 时的拟合效果稍差,可能是由于 *C. pyrenoidosa* 处于生长适应阶段,也可能需要其他更适

表 3 3 种三嗪类农药的 Logit 函数拟合参数、统计量、半数效应浓度( $EC_{50}$ )及其负对数( $pEC_{50}$ )

Table 3 The Logit function fitting parameters and statistics, mean effect concentration and its negative logarithm for the three triazine pesticides

| 名称<br>Name | 时间<br>Time/h | 拟合参数 Fitting parameters |         |       |         | $EC_{50}/$<br>$\text{mol}\cdot\text{L}$ | $pEC_{50}$ |
|------------|--------------|-------------------------|---------|-------|---------|-----------------------------------------|------------|
|            |              | $\alpha$                | $\beta$ | RMSE  | $R^2$   |                                         |            |
| Met        | 12           | 4.88                    | 1.95    | 0.023 | 0.906 9 | $\infty$                                | 0          |
|            | 24           | 6.60                    | 1.83    | 0.068 | 0.979 5 | 2.47E-04                                | 3.60       |
|            | 48           | 12.44                   | 2.93    | 0.094 | 0.976 5 | 5.67E-05                                | 4.24       |
|            | 72           | 15.00                   | 3.50    | 0.083 | 0.987 2 | 5.17E-05                                | 4.28       |
|            | 96           | 15.00                   | 3.52    | 0.085 | 0.991 5 | 5.47E-05                                | 4.26       |
| Bla        | 12           | 0.86                    | 0.66    | 0.031 | 0.820 3 | $\infty$                                | 0          |
|            | 24           | 2.56                    | 0.60    | 0.051 | 0.973 9 | 5.41E-05                                | 4.26       |
|            | 48           | 4.62                    | 0.89    | 0.068 | 0.976 3 | 6.44E-06                                | 5.19       |
|            | 72           | 7.76                    | 1.48    | 0.074 | 0.972 1 | 5.71E-06                                | 5.24       |
|            | 96           | 10.32                   | 1.98    | 0.075 | 0.986 3 | 6.13E-06                                | 5.21       |
| Ter        | 12           | 0.01                    | 0.42    | 0.030 | 0.516 4 | $\infty$                                | 0          |
|            | 24           | 2.67                    | 0.62    | 0.048 | 0.971 6 | 4.93E-05                                | 4.30       |
|            | 48           | 6.17                    | 1.22    | 0.067 | 0.971 8 | 8.76E-06                                | 5.05       |
|            | 72           | 9.35                    | 1.83    | 0.083 | 0.988 1 | 7.77E-06                                | 5.10       |
|            | 96           | 12.56                   | 2.46    | 0.087 | 0.990 7 | 7.83E-06                                | 5.10       |

合的函数进行拟合。

不同农药对 *C. pyrenoidosa* 的毒性大小不同,且随暴露时间延长,毒性大小顺序也会发生改变。以  $EC_{50}$  负对数值  $pEC_{50}$  为毒性大小指标,暴露时间 12 h 时,毒性大小顺序为 Met>Bla>Ter;暴露时间 24 h 时,毒性大小顺序为 Ter>Bla>Met;暴露时间为 48、72、96 h 时,毒性大小顺序保持不变,为 Bla>Ter>Met。3 种农药在 48 h 及以后的  $EC_{50}$  值变化不大,说明 3 种农药具有明显的急性毒性,即生物在接触药物后,农药产生毒性较快,且迅速达到最大,此后随暴露时间延长,而不再有明显的增加。

3 种农药对 *C. pyrenoidosa* 的时间-浓度-效应曲线如图 2 所示。从图中可以看出, *C. pyrenoidosa* 在 3 种农药单独作用下,抑制率随时间和浓度的变化规律稍有差异。在低浓度 Met 的各个暴露时间,农药对 *C. pyrenoidosa* 的抑制率都接近为 0,而在中浓度和高浓度区域的抑制率则明显增加,尤其在暴露 72 h 和 96 h 时,高浓度区域的抑制率接近 100%。农药 Bla 和 Ter 单独作用于 *C. pyrenoidosa* 时的抑制率变化规律相似,即在低浓度农药暴露下,农药对 *C. pyrenoidosa* 的抑制率随暴露时间延长先增加后降低,在中浓度和高浓度区域的抑制率,则随暴露时间延长而逐渐增加。

## 2.2 农药二元混合物对蛋白核小球藻的毒性相互作用

采用 Equ-Ray 法设计 3 组农药二元混合物体系,基于 CA 模型对不同暴露时间的混合毒性进行预测。在混合物暴露 12 h 和 24 h 时, *C. pyrenoidosa* 处于生长适应阶段,生物代谢反应缓慢,无法用 CA 模型准确判断毒性相互作用。图 3 为 3 组二元混合物体系暴露 48、72 h 和 96 h 时的实验观测值及其 95% OCI、拟合曲线及 CA 预测曲线。

从图 3 可看出, Met-Bla 二元混合物体系中, Met 所占浓度比例从 R1 射线到 R5 射线逐渐增加。在同一暴露时间下,随 Met 浓度比增加, CA 预测曲线与浓度-效应拟合曲线之间的偏离程度越来越大,毒性相互作用由部分加和、部分协同逐渐转变为整个浓度区域的协同作用。对于同一条混合物射线,随暴露时间延长, CA 预测曲线偏离 95% OCI 程度越来越大,协同作用越来越明显。表明 Met-Bla 二元混合物毒性相互作用具有明显的时间依赖性和浓度比依赖性。

Met-Ter 二元混合物体系中, Ter 所占浓度比从 R1 射线到 R5 射线逐渐增加。在同一暴露时间下,随 Ter 浓度比增加, CA 预测曲线与浓度-效应拟合曲线之间的距离整体呈减小趋势,毒性相互作用为协同作

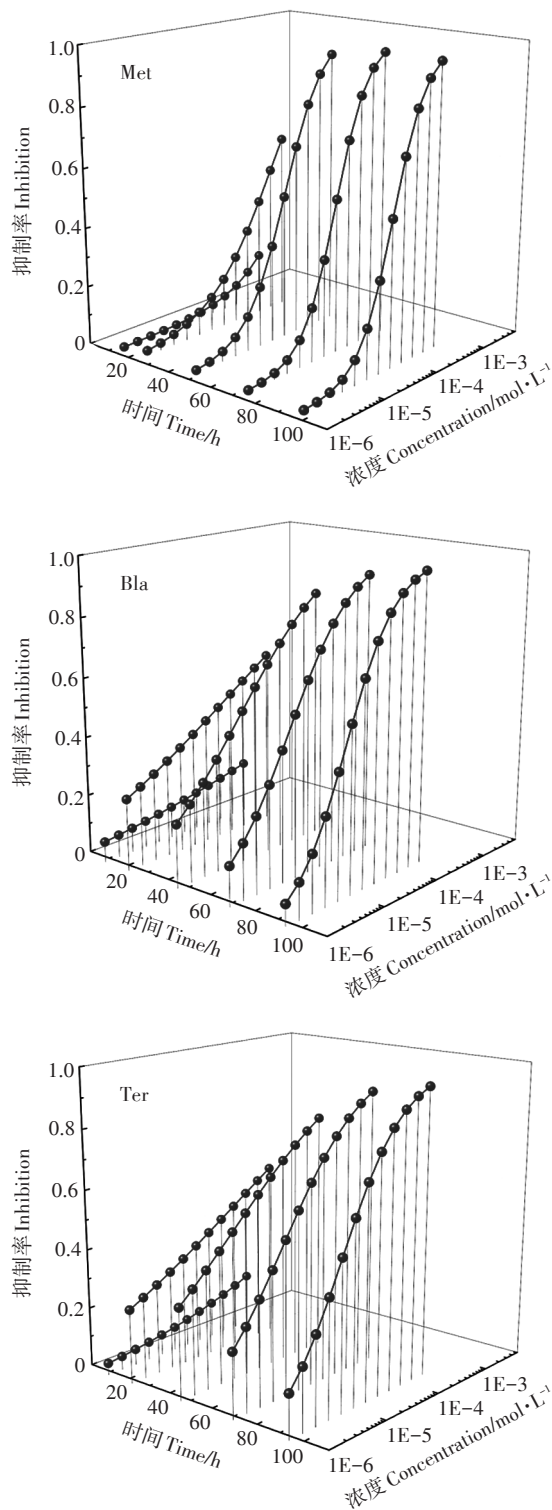


图2 3种农药对 *C. pyrenoidosa* 的时间-浓度-效应曲线  
Figure 2 The time-concentration-effect curve of three triazine pesticides on *C. pyrenoidosa*

用且逐渐减弱。对于同一条混合物射线,随暴露时间延长, CA 预测曲线偏离 95% OCI 程度越来越大,协同作用越来越明显。表明 Met-Ter 二元混合物毒性相

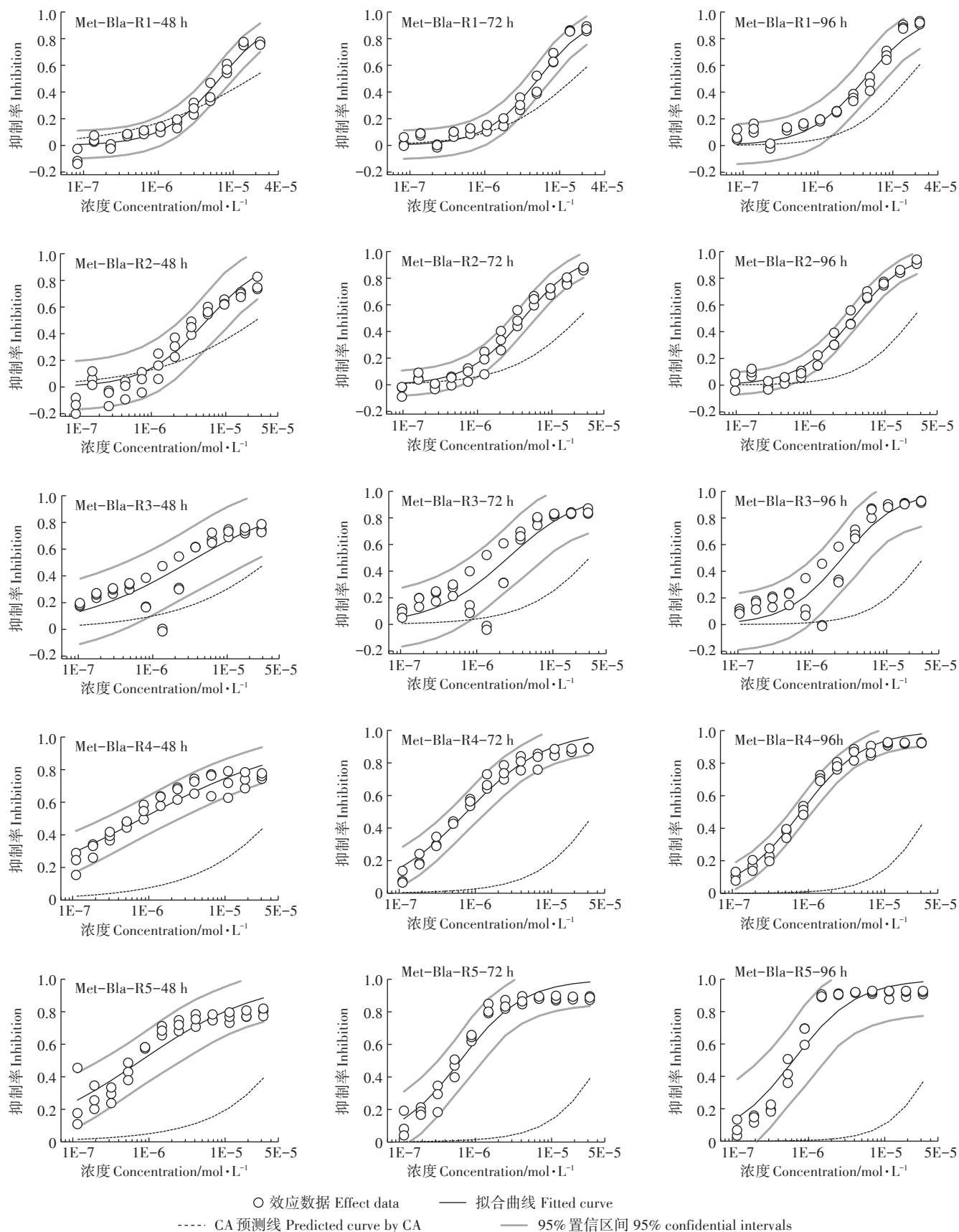
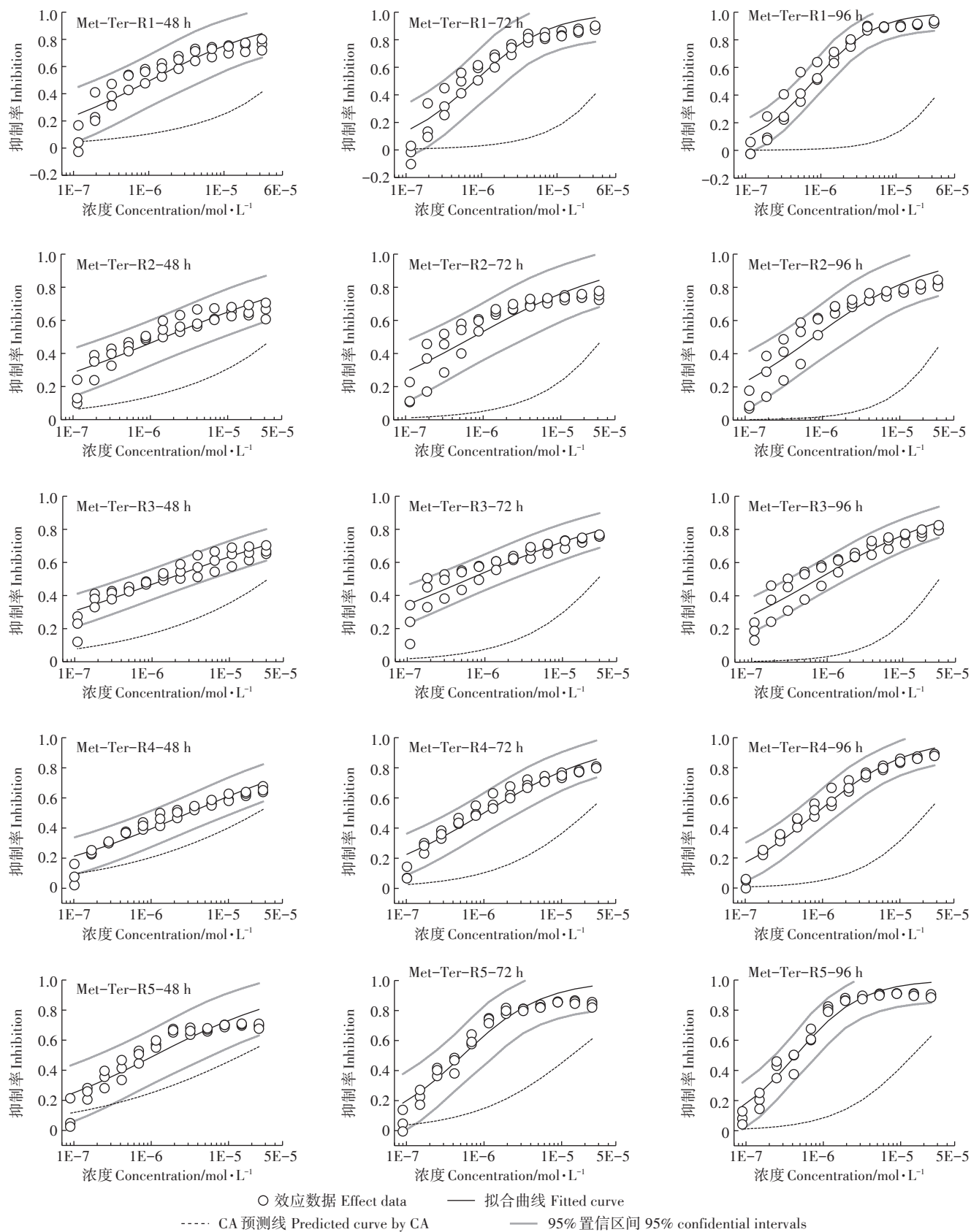
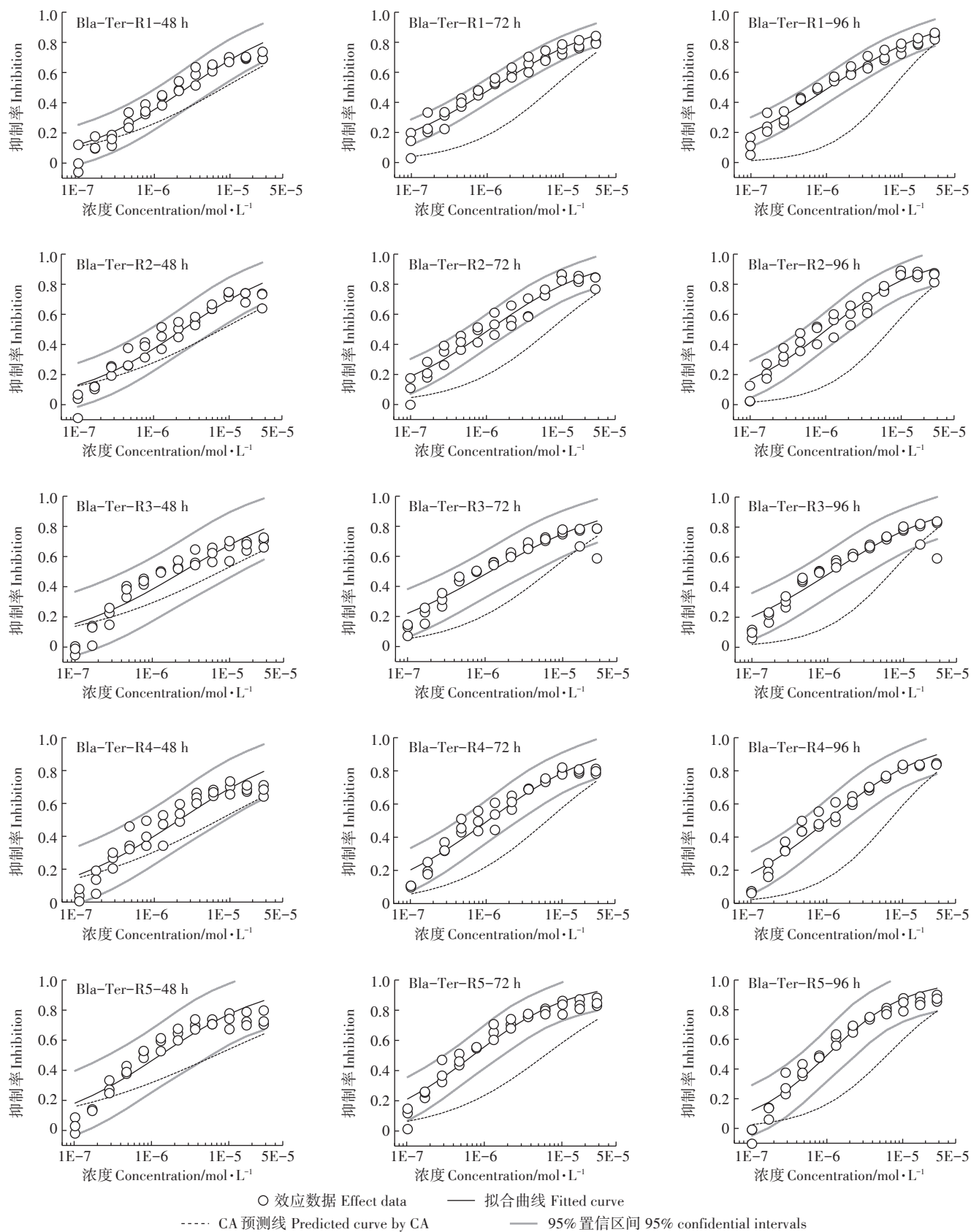


图3 二元混合物体系代表性射线的效应数据、拟合曲线、95%置信区间曲线及CA预测线

Figure 3 The effect data, fitted curve, 95% confidential intervals and predicted curve by CA of representative ray of binary mixture systems



续图3 二元混合物体系代表性射线的效应数据和拟合曲线、95%置信区间曲线及CA预测线  
 Continued figure 3 The effect data, fitted curve, 95% confidential intervals and predicted curve by CA of  
 representative ray of binary mixture systems



续图3 二元混合物体系代表性射线的效应数据和拟合曲线、95%置信区间曲线及CA预测线  
 Continued figure 3 The effect data, fitted curve, 95% confidential intervals and predicted curve by CA of  
 representative ray of binary mixture systems

互作用具有时间依赖性和浓度比依赖性。

Bla-Ter 二元混合物体系中, Ter 所占浓度比从 R1 射线到 R5 射线逐渐增加。在同一暴露时间下, 随 Bla 浓度比增加, CA 预测曲线与浓度-效应拟合曲线间的位置关系没有明显变化规律。对于同一条混合物射线, 随暴露时间延长, CA 预测曲线偏离 95% OCI 程度越来越大, 毒性相互作用由加和作用逐渐转变为协同作用。表明 Bla-Ter 二元混合物毒性相互作用具有明显的时间依赖性。

选择暴露时间 96 h 的半数效应浓度  $EC_{50}$  绘制农药二元混合物的二维等效图(图 4), 考察 50% 效应时不同混合比射线的毒性相互作用。由图 4 可看出, 所有农药二元混合物体系各条射线的等效线段均位于浓度加和等效线下方, 呈现出显著的协同作用, 尤其是 Met-Bla 混合物 R3 射线的等效线段偏离程度最大, 所呈现的协同作用最强。这一结果和农药二元混合物射线 CA 预测结果基本吻合, 且能更直观地反映指定效应下所有射线的毒性相互作用情况。

### 2.3 农药三元混合物对蛋白核小球藻的毒性相互作用

采用 UD-Ray 法设计农药三元混合物体系, 基于 CA 模型对农药三元混合物在不同暴露时间的混合毒性进行预测, 发现三元混合物 5 条射线具有相似的规律, 且没有随时间发生明显变化。图 5 为 Met-Bla-Ter 三元混合物具代表性射线的实验观测值及其 95% OCI、拟合曲线、CA 预测曲线。

从图 5 中可以明显看出, 农药三元混合物 R1、R2 和 R5 射线的 CA 预测曲线均落在实验观测 95% 置信区间以内, 毒性相互作用表现为加和作用, 且随着暴露时间延长, 毒性相互作用未发生改变。本研究中 CA 模型也可较准确预测 3 种农药的混合物对蛋白核小球藻的毒性。

选择暴露时间 96 h 的半数效应浓度  $EC_{50}$  绘制农药三元混合物的三维等效图(图 6)。由图可看出, 农药三元混合物体系中, 浓度加和等效面与混合物射线的  $EC_{50}$  置信区间线相交, 表明农药混合物射线在  $EC_{50}$  水平下呈加和作用。这一结果与农药三元混合物射线的 CA 预测线及 CRC 间关系相吻合, 进一步说明三维等效图法分析结果的可靠性。

### 2.4 农药及其混合物对蛋白核小球藻叶绿素含量的影响

选择 3 种农药及其二元混合物 R3 射线、三元混合物 R5 射线进行叶绿素测定实验, 在拟合曲线 CRCs 相关参数的基础上, 计算不同药物对 *C. pyrenoidosa* 产生 10%、30%、50% 及 70% 抑制效应时的浓度。分别在暴露时间 48 h 和 96 h 测定 *C. pyrenoidosa* 中叶绿素 a 的含量, 并根据对照组含量, 计算不同暴露时间及不同抑制效应下的叶绿素 a 减少率, 结果如图 7 所示。

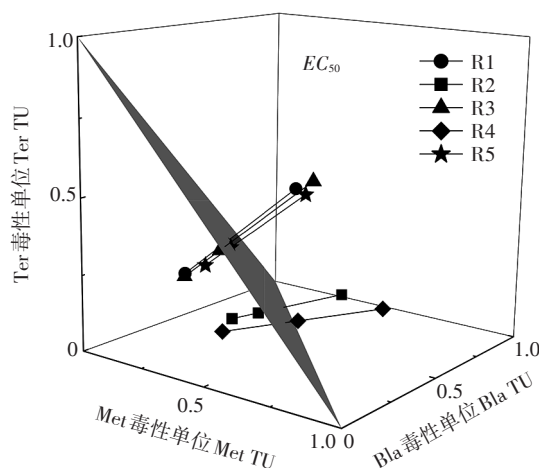


图 6 农药三元混合物射线在  $EC_{50}$  下的三维等效图

Figure 6 Three-dimensional isobiologram of pesticide ternary mixture rays responding to the effect of 50%

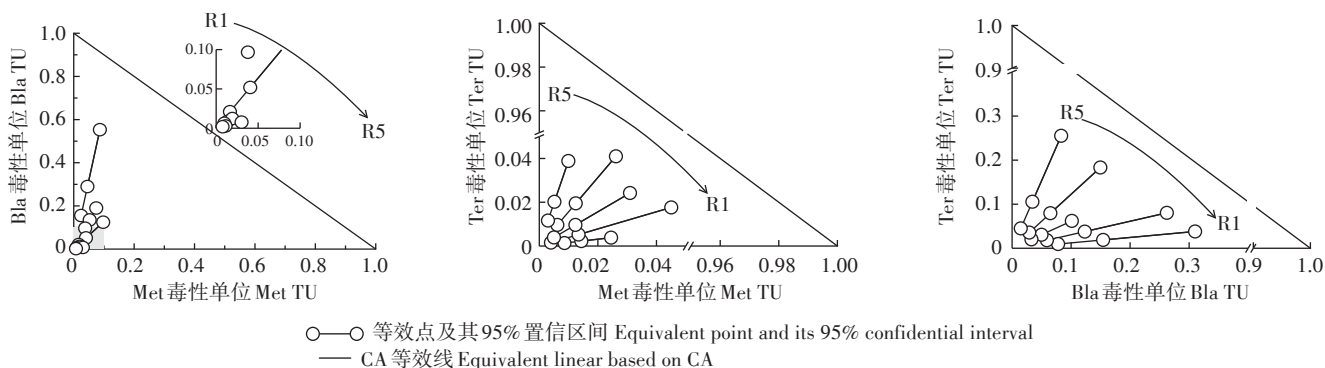


图 4 农药二元混合物射线在  $EC_{50}$  下的二维等效图

Figure 4 Two-dimensional isobiolograms of pesticide binary mixture rays responding to the effect of 50%

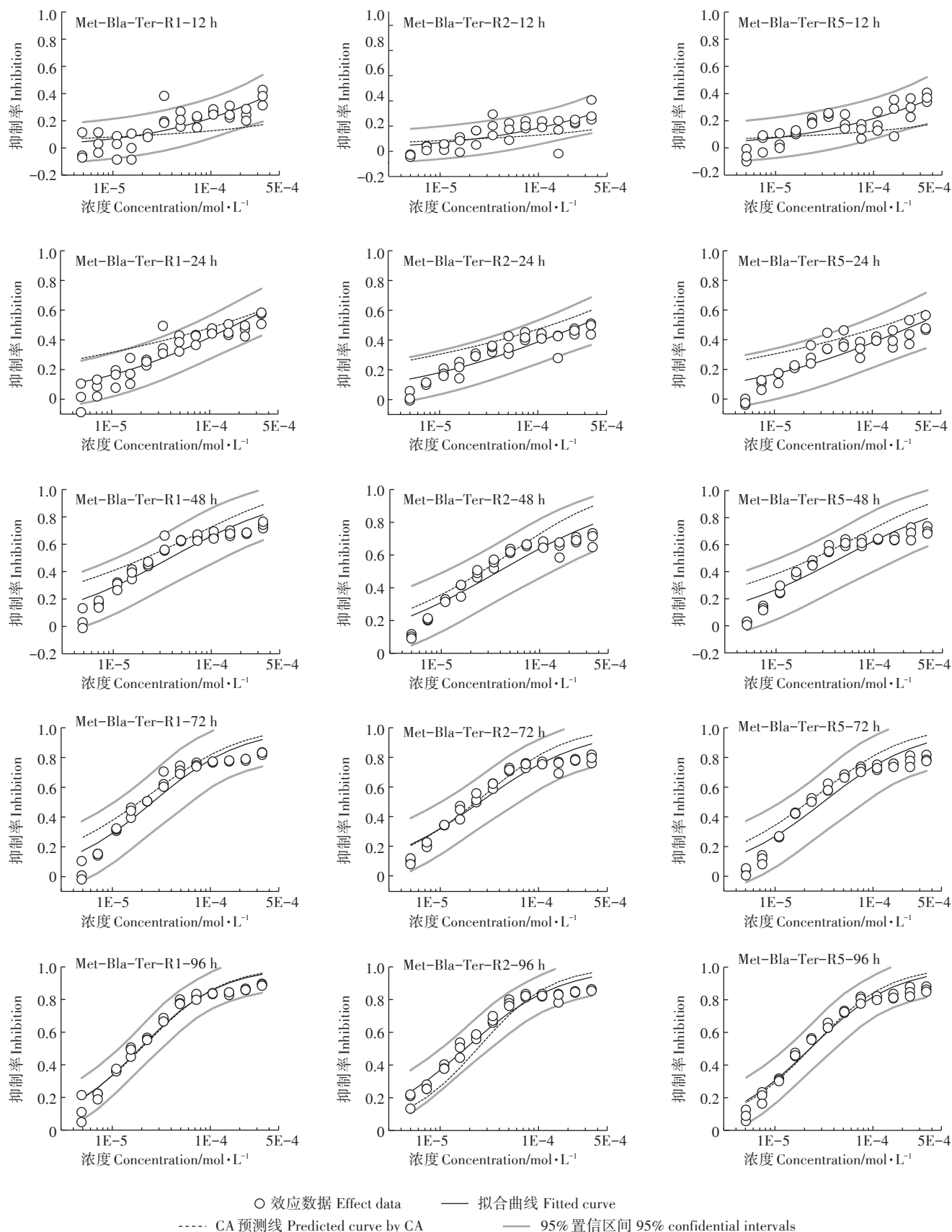


图5 三元混合物体系代表性射线的效应数据、拟合曲线、95% 置信区间曲线和CA 预测线

Figure 5 The effect data, fitted curve, 95% confidence intervals and predicted curve by CA of representative ray of ternary mixture systems

从图7可明显看出, *C. pyrenoidosa* 分别在48 h和96 h暴露时间下, 随着药物效应浓度的增加, 叶绿素a含量逐渐减小, 且在对照组基础上计算出的减少率逐渐变大, 这与各组药物对应的CRCs曲线变化趋势基本一致。

虽然叶绿素a减少率与浓度效应曲线变化规律相似, 但在不同组药物的作用下, 减少率变化的程度明显不同。在农药Met及Met-Ter暴露下, 各效应浓度时的叶绿素a减少率均小于其抑制效应, 以农药Met-Ter暴露96 h为例, 效应浓度10%、30%、50%和70%对应的叶绿素a减少率分别为6.66%、10.66%、30.46%和60.85%。在农药Met-Bla暴露下, 各效应浓度时的叶绿素a减少率均大于其抑制效应, 效应浓度10%、30%、50%和70%对应的叶绿素a减少率分别为10.76%、40.28%、60.53%和81.34%。而在农药Bla、Ter、Bla-Ter和Met-Bla-Ter暴露下, 各效应浓度时的叶绿素a减少率与相应抑制效应基本一致。

### 3 讨论

李威等<sup>[30]</sup>在研究中发现, 5氟尿嘧啶对藻类的毒性没有明显的时间-效应关系。陶梦婷等<sup>[32]</sup>也发现, 草甘膦低浓度暴露对青海弧菌的毒性没有时间依赖性。本研究中, 3种农药对*C. pyrenoidosa*的毒性也具有一定的时间和浓度依赖性, 即整体上呈现为随暴露时间的延长和暴露浓度的增加, 毒性逐渐增强。但在低浓度区域的毒性变化却没有时间依赖性, 这可能是生物适应等原因所致<sup>[33]</sup>。沈国兴等<sup>[34]</sup>的研究也发现, 许多农药在高浓度作用下会对藻类产生毒害作用, 而在低浓度时则无毒性效应, 并且提出农药对藻类同时存在毒害和降解两个过程, 在低浓度时降解占主导地位表现为无毒性效应, 在高浓度时毒害作用占主导地位表现为毒性效应。*C. pyrenoidosa*在低浓度Met暴露下几乎没有毒性作用, 而在低浓度Bla和Ter暴露下, 毒性作用随暴露时间延长先增强后逐渐减弱; 在中浓度和高浓度区域有一定的时间和浓度依赖性, Met对*C. pyrenoidosa*的毒性出现突然增强, 而Bla和Ter对*C. pyrenoidosa*的毒性则逐渐增强。这与陶梦婷等<sup>[32]</sup>在农药对青海弧菌毒性作用研究中的结果类似。

多种化合物同时作用于生物会产生联合毒性, 可能通过作用于相同的靶器官产生加和作用<sup>[35]</sup>, 通过组分间结构互补性产生协同作用<sup>[36]</sup>, 通过竞争作用位点产生拮抗作用<sup>[37]</sup>。在考察三嗪类农药混合物毒性基础上, 进一步研究了混合物毒性相互作用随时间和组

分浓度的变化。农药二元混合物体系Met-Bla和Met-Ter的毒性相互作用, 均具有明显的时间依赖性和浓度比依赖性, Bla-Ter体系只具有明显的时间依赖性。但不同混合物体系随暴露时间和组分浓度比改变, 其毒性相互作用呈现各异的规律, 说明混合物毒性相互作用机理较复杂, 需要进一步做分子水平方面的研究。

二维等效线图法常用于二元混合体系中多种浓度比混合物的毒性相互作用分析, 且多选择 $EC_{50}$ 为等效效应浓度参考点<sup>[38-39]</sup>, 但这种传统等效线图法只能反映 $EC_{50}$ 效应下二元混合物毒性相互作用情况。本研究中的三维等效线图法评估3种三嗪类农药混合物对蛋白核小球藻的毒性相互作用, 拓展了等效线图法的应用范围, 较直观地反映3种组分联合毒性作用情况, 但目前只是针对混合物的 $EC_{50}$ 浓度水平的评估, 有待于进一步探讨三维等效线图的多水平应用。

### 4 结论

(1) Logit函数能较好地拟合3种三嗪类农药及其混合物体系对*C. pyrenoidosa*的浓度-效应数据, 在暴露时间48 h及以上, 3种农药的毒性大小顺序为Bla>Ter>Met。

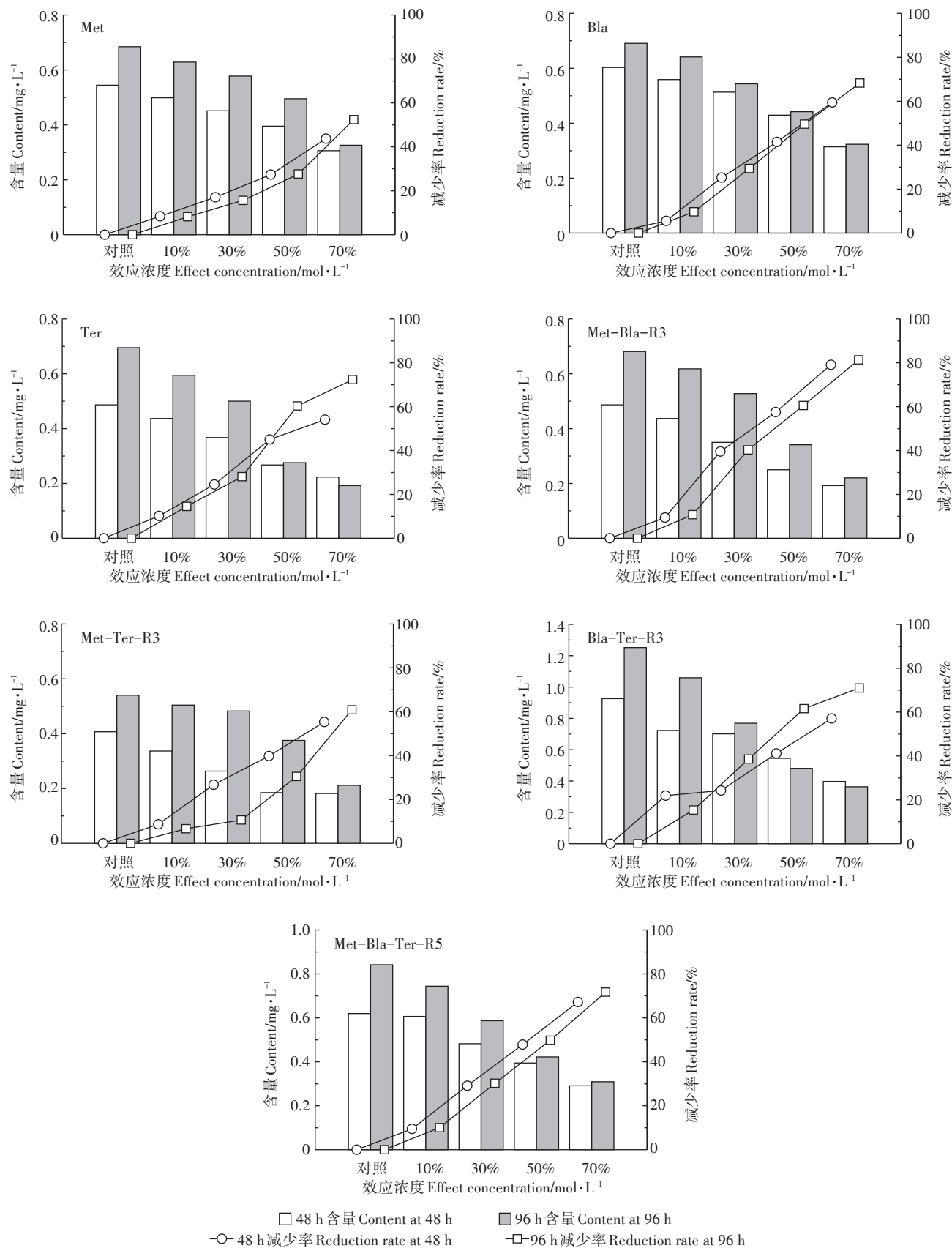
(2) 二元混合物的毒性相互作用整体上呈现为加和作用向协同作用的转变。Met-Bla和Met-Ter二元混合物体系毒性相互作用具有时间依赖性和浓度比依赖性, 而Bla-Ter二元混合物体系的毒性相互作用只有时间依赖性。根据3个混合物体系的二维等效线图, 可看出各混合物体系在 $EC_{50}$ 效应下均具有较强的协同作用。

(3) 农药三元混合物体系对*C. pyrenoidosa*的毒性作用表现为加和作用, 且随暴露时间延长, 作用类型未发生改变, 混合物三维等效图与对应CA模型的分析结果一致, 且毒性作用更加直观, 也说明三维等效图分析结果的可靠性。

(4) 3种农药及其混合物射线中, *C. pyrenoidosa*叶绿素a含量的减少率与各组药物对应的CRCs曲线变化趋势基本一致。但在不同药物作用下, *C. pyrenoidosa*生理毒性与种群水平毒性间关系稍有差异。

### 参考文献:

- [1] 黄菁, 乔传令. 昆虫解毒酶解毒机理及其在农药污染治理中的应用[J]. 农业环境保护, 2002, 21(3): 285-287.  
HUANG Jing, QIAO Chuan-ling. Mechanism and application of insect

图7 *C. pyrenoidosa* 中叶绿素 a 含量及减少率的变化Figure 7 Changes of chlorophyll-a content and reduction rate in *C. pyrenoidosa*

- detoxification enzymes in bioremediation of pesticide contamination[J]. *Agro-environmental Protection*, 2002, 21(3):285-287.
- [2] 叶新强, 鲁岩, 张恒. 除草剂阿特拉津的使用与危害[J]. 环境科学与管理, 2006, 31(8):95-97.
- YE Xin-qiang, LU Yan, ZHANG Heng. The usage and permiciousness of the herbicide atrazine[J]. *Environmental Science and Management*, 2006, 31(8):95-97.
- [3] Shalaby S E M, El-Saadany S S, Abo-Eyta A M, et al. Levels of pesticide residues in water, sediment, and fish samples collected from Nile River in Cairo, Egypt[J]. *Environmental Forensics*, 2019, 19(4):228-238.
- [4] Singh S, Kumar V, Chauhan A, et al. Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2017, 16(1):211-237.
- [5] 王未, 黄从建, 张满成, 等. 我国区域性水体农药污染现状研究分析[J]. 环境保护科学, 2013, 39(5):5-9.
- WANG Wei, HUANG Cong-jian, ZHANG Man-cheng, et al. Study on status of regional water pollution by pesticides in China[J]. *Environmental Protection Science*, 2013, 39(5):5-9.
- [6] 吴岩, 赵伟, 刘永, 等. 快速基质分散净化-超快速液相色谱-串联质谱法同时测定玉米中22种三嗪类除草剂残留[J]. 分析化学, 2016, 44(6):125-132.
- WU Yan, ZHAO Wei, LIU Yong, et al. Determination of 22 triazine herbicides residual in corn by enhanced matrix removal QuEChERS-Ultra flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2016, 44(6):125-132.
- [7] 顾林玲. 三嗪酮类除草剂: 苯嗪草酮[J]. 现代农药, 2016, 15(4):51-54.
- GU Lin-ling. Metamitron, a triazinone herbicide[J]. *Modern Agrochemicals*, 2016, 15(4):51-54.
- [8] Legrand E, Céline B L, Restoux G, et al. Individual and mixture acute toxicity of model pesticides chlordecone and pyriproxyfen in the estuarine copepod *Eurytemora affinis*[J]. *Environmental Science & Pollution Research International*, 2017, 24(6):5976-5984.
- [9] Liu D, Zeng X A, Sun D W. Recent developments and applications of hyperspectral imaging for quality evaluation of agricultural products: A review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2015, 55(12):1744-1757.
- [10] Maazouzi C, Coureau C, Piscart C, et al. Individual and joint toxicity of the herbicide S-metolachlor and a metabolite, deethylatrazine on aquatic crustaceans: Difference between ecological groups[J]. *Chemosphere*, 2016, 165:118-125.
- [11] 张瑾, 董欣琪, 陈敏, 等. 五元氨基甲酸酯类农药混合物体系对青海弧菌的毒性特点[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(4):138-145.
- ZHANG Jin, DONG Xin-qi, CHEN Min, et al. Toxicity characteristics of five-carbamate pesticide mixture system towards *Vibrio qinghaiensis* sp. Q67[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2017, 12(4):138-145.
- [12] Wu S, Li X, Liu X, et al. Joint toxic effects of triazophos and imidacloprid on zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Environmental Pollution*, 2018, 235:470-481.
- [13] Junghans M, Backhaus T, Faust M, et al. Predictability of combined effects of eight chloroacetanilide herbicides on algal reproduction[J]. *Pest Management Science*, 2010, 59(10):1101-1110.
- [14] Zhang Y H, Liu S S, Liu H L, et al. Evaluation of the combined toxicity of 15 pesticides by uniform design[J]. *Pest Management Science*, 2010, 66(8):879-887.
- [15] 刘雪, 刘树深, 刘海玲. 构建三元混合污染物的三维等效图[J]. 环境科学, 2015, 36(12):4574-4581.
- LIU Xue, LIU Shu-shen, LIU Hai-ling. Construction of three-dimensional isobologram for ternary pollutant mixtures[J]. *Environmental Science*, 2015, 36(12):4574-4581.
- [16] 朱春红, 凌云, 雍炜, 等. 小麦中20种三嗪类除草剂残留量的超高效液相色谱测定[J]. 现代科学仪器, 2007, 17(4):70-73.
- ZHU Chun-hong, LING Yun, YONG Wei, et al. Simultaneous determination of residues of triazine herbicides in wheat by ultra performance LC<sup>TM</sup>[J]. *Modern Scientific Instruments*, 2007, 17(4):70-73.
- [17] 陈琼, 张瑾, 李小猛, 等. 几种抗生素对蛋白核小球藻的时间毒性微板分析法[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(2):190-197.
- CHEN Qiong, ZHANG Jin, LI Xiao-meng, et al. Time-dependent microplate toxicity analysis (T-MTA) of several antibiotics to *Chlorella pyrenoidosa*[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2015, 10(2):190-197.
- [18] Dou R N, Liu S S, Mo L Y, et al. A novel direct equipartition ray design (EquRay) procedure for toxicity interaction between ionic liquid and dichlorvos[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2010, 18(5):734-742.
- [19] Liu S S, Li K, Li T, et al. Comments on "The synergistic toxicity of the multi chemical mixtures: Implications for risk assessment in the terrestrial environment"[J]. *Environment International*, 2016, 94:396-398.
- [20] Liu S S, Xiao Q F, Zhang J, et al. Uniform design ray in the assessment of combined toxicities of multi-component mixtures[J]. *Science Bulletin*, 2016, 61(1):52-58.
- [21] 姜慧, 丁婷婷, 张瑾, 等. 3种有机溶剂及其混合物对蛋白核小球藻时间毒性的探究[J]. 安徽农业大学学报, 2018, 45(3):480-486.
- JIANG Hui, DING Ting-ting, ZHANG Jin, et al. The time-dependent toxicity of three organic solvents and their mixtures towards *Chlorella pyrenoidosa*[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2018, 45(3):480-486.
- [22] 班龙科, 丁婷婷, 陈敏, 等. 五种重金属对蛋白核小球藻的动态毒性研究[J]. 安徽建筑大学学报, 2017, 25(4):24-28.
- BAN Long-ke, DING Ting-ting, CHEN Min, et al. Study on the dynamic toxicity of five heavy metals on *Chlorella pyrenoidosa*[J]. *Journal of Anhui Jianzhu University*, 2017, 25(4):24-28.
- [23] 袁静, 刘树深, 王丽娟, 等. 蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)微板毒性分析方法优化[J]. 环境科学研究, 2011, 24(5):553-558.
- YUAN Jing, LIU Shu-shen, WANG Li-juan, et al. Optimization of microplate toxicity analysis method based on *Chlorella pyrenoidosa*[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2011, 24(5):553-558.
- [24] 朱祥伟, 刘树深, 葛会林, 等. 剂量-效应关系两种置信区间的比较[J]. 中国环境科学, 2009, 29(2):113-117.

- ZHU Xiang-wei, LIU Shu-shen, GE Hui-lin, et al. Comparison between two confidence intervals of dose-response relationships[J]. *China Environmental Science*, 2009, 29(2): 113-117.
- [25] 刘树深, 张瑾, 张亚辉, 等. APTox: 化学混合物毒性评估与预测[J]. *化学学报*, 2012, 70(14): 1511-1517.
- LIU Shu-shen, ZHANG Jin, ZHANG Ya-hui, et al. APTox: Assessment and prediction on toxicity of chemical mixtures[J]. *Acta Chimica Sinica*, 2012, 70(14): 1511-1517.
- [26] Qin L T, Liu S S, Zhang J, et al. A novel model integrated concentration addition with independent action for the prediction of toxicity of multi-component mixture[J]. *Toxicology*, 2011, 280(3): 164-172.
- [27] Rodney S I, Teed R S, Moore D R J. Estimating the toxicity of pesticide mixtures to aquatic organisms: A review[J]. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 2013, 19(6): 1557-1575.
- [28] Zhang J, Liu S S, Dou R N, et al. Evaluation on the toxicity of ionic liquid mixture with antagonism and synergism to *Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67[J]. *Chemosphere*, 2011, 82(7): 1024-1029.
- [29] 郭庆亮. 咪唑类离子液体对蛋白核小球藻致毒效应及机制研究[D]. 厦门: 华侨大学, 2013.
- GUO Qing-liang. The toxic effects of imidazolium-based ionic liquids and the cytotoxic mechanism on *Chlorella pyrenoidosa*[D]. Xiamen: Huaqiao University, 2013.
- [30] 李威, 恽桦, 是怡芸, 等. 5-氟尿嘧啶对蛋白核小球藻和羊角芽藻生长及叶绿素含量的影响[J]. *生态毒理学报*, 2015, 10(6): 213-218.
- LI Wei, YUN Ye, SHI Yi-yun, et al. Effects of 5-fluorouracil on the growth and chlorophyll content of *Chlorella pyrenoidosa* and *Selenastrium capricornutum*[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2015, 10(6): 213-218.
- [31] 梁兴飞, 郭宗楼. 超声辅助热乙醇提取法测定浮游植物叶绿素a的方法优化[J]. *水生生物学报*, 2010, 34(4): 856-861.
- LIANG Xing-fei, GUO Zong-lou. Optimization of the method on determination of phytoplankton chlorophyll a by using ultrasound-assisted hot-ethanol extraction[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(4): 856-861.
- [32] 陶梦婷, 张瑾, 姜慧, 等. 3种农药对青海弧菌Q67的联合毒性作用特征[J]. *环境科学与技术*, 2019, 42(6): 12-20.
- TAO Meng-ting, ZHANG Jin, JIANG Hui, et al. Combined toxicity characteristics of three pesticides to *Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67[J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 42(6): 12-20.
- [33] Mohapatra P K, Mohanty R C. Growth pattern changes of *Chlorella vulgaris* and *Anabaena doliolum* due to toxicity of dimethoate and endosulfan[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1992, 49(4): 576-581.
- [34] 沈国兴, 严国安, 彭金良, 等. 农药对藻类的生态毒理学研究 II: 毒性机理及其富集和降解[J]. *环境科学进展*, 1999, 7(6): 132-141.
- SHEN Guo-xing, YAN Guo-an, PENG Jin-liang, et al. Study on ecotoxicology for pesticides to algae II: Toxic mechanism and accumulation, degradation[J]. *Advances in Environmental Science*, 1999, 7(6): 132-141.
- [35] 陈鑫. 拟除虫菊酯类农药与重金属的复合毒性对高毒沉积物毒性评价的影响及机制研究[D]. 广州: 中国科学院研究生院(广州地球化学研究所), 2016.
- CHEN Xin. Mechanism of joint toxicity of pyrethroid insecticides and metals in toxicity evaluation for highly toxic sediments[D]. Guangzhou: Chinese Academy of Sciences (Guangzhou Institute of Geochemistry), 2016.
- [36] 农朝赞, 叶海洪, 王丽, 等. 黄酮类化合物与大环内酯类抗生素的协同抑菌作用机制[J]. *中国医院药学杂志*, 2011, 31(9): 52-54.
- NONG Chao-zan, YE Hai-hong, WANG Li, et al. Flavanoid combined with macrolide antibiotic synergy on the antibiosis[J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2011, 31(9): 52-54.
- [37] Groten J P, Feron V J, Sühnel J. Toxicology of simple and complex mixtures[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2001, 22(6): 316-322.
- [38] Matsumura N, Nakaki T. Isobolographic analysis of the mechanisms of action of anticonvulsants from a combination effect[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2014, 741: 237-246.
- [39] 吴宗凡, 刘兴国, 王高学, 等. 重金属与有机磷农药二元混合物对卤虫联合毒性的评价及预测[J]. *生态毒理学报*, 2013, 8(4): 602-608.
- WU Zong-fan, LIU Xing-guo, WANG Gao-xue, et al. Evaluating and modeling the toxicity of binary mixtures of heavy metals and organophosphate pesticides to *Artemia salina*[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2013, 8(4): 602-608.