

金霉素和 4-差向金霉素对油菜生长的影响及其在幼苗体内的积累

魏瑞成, 邵明诚, 陈 明, 王 冉*

(江苏省畜禽产品安全性研究重点实验室, 农业部食用农产品安全监控重点开放实验室, 江苏省食品质量安全重点实验室, 南京 210014)

摘 要:以油菜为材料,研究不同浓度金霉素(chlortetracycline, CTC)和代谢物差向金霉素(4-epi-chlortetracycline, ECTC)胁迫对其发芽、生长和抗氧化酶活性的影响,以及 CTC 和 ECTC 在幼苗体内的积累。结果表明:随着处理浓度的升高,种子发芽率、发芽势没有显著差异,但株高和根长受到明显抑制;在 1~30 mg·L⁻¹ 处理浓度下,CTC 和 ECTC 诱导的幼苗体内抗氧化酶 SOD、POD、CAT 活性均高于对照组;幼苗体内 CTC、ECTC 积累含量随着处理浓度的升高而增加,表明 CTC 和 ECTC 可在油菜幼苗体内积累,这可能产生潜在食品安全风险。

关键词:金霉素;差向金霉素;油菜;抗氧化酶系统;积累

中图分类号:X503.231 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2012)07-1289-07

Effects of Chlortetracycline and 4-epi-chlortetracycline on the Growth of Rape and Its Accumulation in Seedling

WEI Rui-cheng, SHAO Ming-cheng, CHEN Ming, WANG Ran*

(Jiangsu Provincial Key Laboratory of Animal-Derived Food Safety, Key Open Laboratory of Edible Agricultural Products Safe Monitoring and Control, Ministry of Agriculture, Key Lab of Food Quality and Safety of Jiangsu Province, Nanjing 210014, China)

Abstract: Effects of different concentrations of chlortetracycline (CTC) and 4-epi-chlortetracycline (ECTC) on the growth and the activities of antioxidant enzymes in rape and the accumulation of CTC and ECTC in seedlings were studied by using water culture method. The results showed that seedling height and root length significantly reduced, compared to the control, and the root elongation could be recommended as a sensitive indicator to assess crops eco-toxicity of CTC and ECTC. The activities of antioxidant enzymes as superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) induced by CTC and ECTC at concentration ranges of 1~30 mg·L⁻¹ were higher than the control. When rape seedling was stressed by 1 mg·L⁻¹ and 10 mg·L⁻¹ of CTC and ECTC, the activities of SOD and POD were enhanced, but declined by 30 mg·L⁻¹. SOD, POD removed oxygen free radical in coordination with CAT at concentration levels of 1 mg·L⁻¹ and 10 mg·L⁻¹ of CTC and ECTC. However, at a concentration of 30 mg·L⁻¹, CTC and ECTC would cause certain oxidative damage on rape seedling. The difference of antioxidant enzyme system suggested that ability of rape seedling anti-CTC stress was stronger than anti-ECTC. With the concentration of CTC and ECTC increased, the contents of them accumulated in seedlings were increased, which could result in a potential food safety risk.

Keywords: chlortetracycline; 4-epi-chlortetracycline; rape; antioxidant enzyme system; accumulation

长期以来, 抗生素被大量用于治疗人和动物的疾病, 全球抗生素的消耗量每年在 100 000~200 000 t^[1],

中国的使用量大概在 25 000 t^[2], 大部分是以预防和促生长剂加入饲料中使用^[3]。已有文献表明, 抗生素被摄入后除少部分残留在体内, 30%~90%以原药和代谢产物的形式经由病人和动物的粪尿排出^[4-5], 含量在几十至上百 mg·kg⁻¹^[6-7]。因此, 广泛使用的抗生素和其代谢产物将由粪尿作为肥料被施用进入农业环境, 抑制或杀灭环境中的靶标生物, 破坏生态平衡^[8-11], 同时也能被动植物吸收^[11,12-18], 产生生态毒害^[13,19-22]和影响农

收稿日期: 2011-12-26

基金项目: 江苏省自然科学基金(BK2011681); 江苏省农业科技自主创新资金[cx(11)2069]

作者简介: 魏瑞成(1979—), 男, 河南商丘人, 硕士, 助研, 主要从事畜禽产品安全与兽药环境毒理等方面的研究。

E-mail: weiruicheng@126.com

* 通讯作者: 王 冉 E-mail: wangran@jaas.ac.cn

产品安全^[18]。

四环素类抗生素的使用量约占中国抗生素消耗量的 14%^[23],金霉素(Chlortetracycline, CTC)是该类药物中常被作为添加剂应用达到预防动物疾病和促进动物生长目的。差向金霉素(4-Epi-chlortetracycline, ECTC)是金霉素的代谢物之一,毒副作用强于金霉素,为残留检测中的残留标识物^[24]。CTC 和 ECTC 在粪便、土壤、水体中的检出浓度一般较高,目前包括 CTC 在内的四环素类抗生素对植物的毒理效应研究多集中于对植物种子萌发、根伸长和芽伸长等直观指标以及品质影响上^[13,19-20],而 ECTC 对植物的生态效应国内还鲜见报道。本研究以油菜为材料,通过研究 CTC 和 ECTC 在水培条件下对油菜种子发芽、幼苗生长、抗氧化酶活性的影响,以及在体内的残留累积,确定油菜对 CTC 和 ECTC 的敏感程度,探讨抗生素和其代谢物对非靶标植物生态毒性的差异和残留特征。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品与试剂

供试油菜品种为宁油 16 号;金霉素(CTC)和差向金霉素(ECTC)标准品(其化学结构见图 1)购自 Dr. Ehrenstorfer,纯度分别为 CTC 99%,ECTC 97%;超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和蛋白质含量测定试剂盒购自南京建成生物技术公司;聚乙烯吡咯烷酮(PVPK30)购自德国 BASF 公司;甲酸(99%),质谱级;乙腈和甲醇,色谱级,ROE SCIENTIFIC INC (Newark, USA);Na₂EDTA、Na₂HPO₄、NaH₂PO₄、柠檬酸和乙酸乙酯为分析纯;水为超纯水。

1.1.2 仪器设备

Waters Oasis HLB 500 mg 6 mL 固相萃取柱;N-EVAPTM112 型氮吹仪;Milli-Q 超纯水仪;Biofuge 高速离心机;配备 DAD 检测器的 Agilent 1200S 高效液相色谱仪和 ESI 源的 Agilent 6410 三重四极质谱仪。

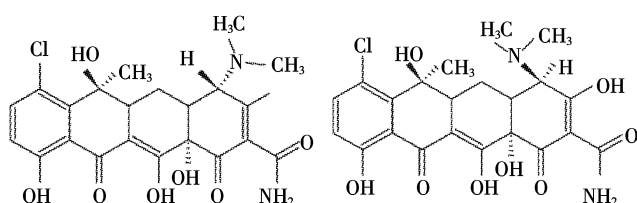


图 1 CTC 和 ECTC 化学结构

Figure 1 General chemical structure of the CTC and ECTC

1.2 处理

油菜种子用 0.3%双氧水消毒 24 h,用蒸馏水洗净后挑选均一、饱满的种子置于铺 3 层滤纸的培养皿(直径 9 cm)中,每皿 70 粒,放置种子时,保持种子胚根末端和生长方向呈直线。CTC 和其代谢物 ECTC 处理浓度为 1、10、30 mg·L⁻¹,将配制的溶液均匀地加入到培养皿中,每皿 5 mL,以蒸馏水作为对照置于恒温培养箱中 25 ℃暗处培养,设置 3 个重复。每日更换相应的溶液以保持滤纸湿润。实验结束后,收获幼苗,用于生理生化指标的测定。

1.3 测定指标和方法

1.3.1 发芽和生长指标

种子发芽势是指发芽实验初期,在规定日期内正常发芽的种子数占供试种子数的百分率。实验分别在第 3 d 和第 7 d 统计种子发芽数,计算发芽势和发芽率。公式如下:发芽势(%)=(前 3 d 发芽种子粒数/供试种子总数)×100%;发芽率(%)=(前 7 d 发芽种子粒数/供试种子数)×100%。实验第 8 d 时收获幼苗,每皿随机挑取 5 棵生长状况较一致的幼苗测量根长、株高,挑取 20 株测量鲜重,并将幼苗于 70 ℃烘干至恒重,测其干重。

1.3.2 抗氧化酶活性测定

测定参照 Xue 等^[25]的方法。处理第 8 d 时取幼苗地上部分 0.5 g,加入 5 mL 预冷的 0.05 mol·L⁻¹ pH 7.8 磷酸缓冲液(含 1% PVP_{K30}),冰浴中研磨成浆,匀浆倒入离心管中,4 ℃下 10 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,上清液即为酶提液,置于 0~4 ℃保存待用。蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝 G-250 法,测定 595 nm 下 OD 值。SOD 活性的测定以 37 ℃条件下每毫升反应液中 SOD 抑制率达 50%时所对应的 SOD 量为 1 个 SOD 活力单位(U),测定 550 nm 下 OD 值。POD 活性的测定以 37 ℃条件下每毫克组织蛋白每分钟内 A₄₂₀ 催化产生 1 μg 底物的酶量为 1 个酶活力单位。过氧化氢酶(CAT)的测定采用可见光法,以每秒钟内 A₄₀₅ 分解 1 μmol 的 H₂O₂ 的量为一个活性单位(U)。

1.3.3 幼苗体内抗生素蓄积量测定

取待测幼苗用蒸馏水洗涤除去附在表面的 CTC 和 ECTC,然后用滤纸吸干表面水分,研磨后备用。样品处理参照 Martínez-Carballo 等^[26]方法。准确称取 0.5~1.0 g 研磨样品,加 10 mL Na₂EDTA-McIlvaine (pH4.0) 溶液振荡 10 min,12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min (4 ℃),转移上清液至另一试管,重复提取 2 次,合并上清液。用 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化固相萃取小柱,

加入提取后的上清液,依次用 5 mL 水、5 mL 5%甲醇水溶液淋洗,用 8 mL 甲醇:乙酸乙酯=1:9(V/V)溶液洗脱。洗脱液在 40 ℃水浴中氮气吹干,用 0.5~1 mL 甲醇溶解残留物,过 0.22 μm 滤膜后供 LC-MS 测定。

色谱条件:Agilent 150 mm×2.1 mm C18,5 μm 色谱柱;Agilent 4 mm×2.1 mm C18,5 μm 保护柱;流速 0.35 mL·min⁻¹;柱温 30 ℃;进样量 5 μL;流动相为 0.1%甲酸水(A)-乙腈(B),洗脱梯度为:0~8.2 min 13.5% B→11~16 min 98% B→20~25 min 13.5% B。基本质谱条件为:ESI 源(+),气体温度 350 ℃,气体流速 10 L·min⁻¹,雾化器压力 310 kPa(45 psi),capillary voltage of 4 000 V;监测质谱条件见表 1。

加入 5 μg·kg⁻¹ CTC 和 25 μg·kg⁻¹ ECTC 制成加标样品,两种化合物的回收率分别 72.9%和 87.5%,相对标准偏差 RSD 均小于 10%。CTC 在 0.005~0.2 μg·mL⁻¹、ECTC 在 0.025~0.8 μg·mL⁻¹ 浓度范围内标准曲线呈线性关系,相关系数 ≥0.99,测定 CTC 和 ECTC 的 MQL 分别为 5 μg·kg⁻¹ 和 20 μg·kg⁻¹,符合本实验要求。

1.4 数据分析

得到的实验数据用 SPSS 16.0 和 SigmaPlot 11.0

进行统计分析和作图。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 CTC 与 ECTC 对油菜生长的影响

2.1.1 对油菜种子发芽率和发芽势的影响

由表 2 可知,1~10 mg·L⁻¹ 范围内,随着处理浓度增加,CTC 和 ECTC 有利于种子的萌发,10 mg·L⁻¹ 处理组与对照组相比,CTC 使发芽势和发芽率提高了 2.08%和 2.43%,ECTC 为 0.34%和 0.70%;而 30 mg·L⁻¹ 处理组的种子发芽势和发芽率均比对照下降,CTC 分别为 3.13%和 1.38%,ECTC 分别为 2.43%和 2.08%。虽然油菜种子的发芽势和发芽率受到加入 CTC 和 ECTC 的影响,但与对照相比差异不显著,说明其对种子发芽影响不明显。

2.1.2 对油菜幼苗株高和根长的影响

油菜幼苗的株高和根长均随着 CTC 和 ECTC 处理浓度的升高而减小,当 CTC 浓度为 1~30 mg·L⁻¹ 时,各处理组的株高和根长均受到不同程度抑制,10 和 30 mg·L⁻¹ 处理组与对照间存在显著差异,而 1 mg·L⁻¹ 处理组的株高和根长同对照组差异不显著。说明在本实验条件下,油菜幼苗株高和根长受外源污染

表 1 CTC 和 ECTC 的 MRM 监测质谱条件

Table 1 MS/MS multiple reaction monitoring(MRM) analysis conditions of CTC and ECTC

药物 Drug	保留时间 Retention time/min	母离子 Precursor ion/ m·z ⁻¹	子离子 Product ion/ m·z ⁻¹	Fragmentor	Collision Energy/ eV	回收率 Recovery/%	定量限 MQL/ μg·kg ⁻¹
ECTC	7.5	479	98	120	32	87.5	20
			444*	120	17		
			462	120	11		
CTC	12.3	479	154	120	25	72.9	5
			444*	120	15		
			462	120	11		

注:* 为定量离子。Note:*Quantitative analysis ion.

表 2 不同浓度处理对油菜生长的影响

Table 2 Effects of different concentrations of CTC and ECTC on the growth of rape

组别 Group	浓度 Concentration/ mg·L ⁻¹	发芽势 Germination percentage/%	发芽率 Germinating viability/%	株高 Shoot height/mm	根长 Root length/mm	鲜重 Fresh weight/mg	干重 Dry weight/mg
对照	0	96.00±0.00a	96.33±3.06a	68.27±6.69a	31.53±5.45a	34.27±3.12a	2.75±0.26a
CTC	1	95.67±2.31a	96.33±4.62a	69.67±3.33a	30.00±1.40a	39.15±2.25b	3.29±0.21b
	10	98.00±1.73a	98.67±1.53a	57.73±1.10b	22.67±1.33b	34.70±1.20a	3.21±0.15b
	30	93.00±6.00a	95.00±4.58a	53.40±1.91b	20.40±1.31b	32.50±1.02a	3.20±0.30b
ECTC	1	94.67±3.21a	97.33±2.89a	82.73±6.70b	40.00±5.03b	44.17±2.45b	3.25±0.15b
	10	96.33±0.58a	97.00±0.00a	81.73±4.92b	39.27±4.10b	42.33±4.17b	3.00±0.12a
	30	93.67±2.52a	94.33±3.79a	73.47±6.89a	31.20±4.45a	37.56±1.34a	2.84±0.08a

注:统计检验采用 LSD q 检验(P≤0.05),不同字母代表处理浓度间差异性显著。

Note:The different letters in the same column mean the significant difference at P≤0.05(LSD)。

物 CTC 的影响存在浓度效应,高浓度容易造成植物器官损伤,但低浓度($\leq 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的 CTC 对油菜幼苗的株高和根长基本没有抑制作用,相反有时可能会作为营养源被植物利用,此现象在 ECTC 处理组表现更为明显。 $1 \sim 30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 ECTC 促进了油菜的生长,其株高分别比对照增高了 21.18%、19.72% 和 7.62%,处理组 1、 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组和对照组相比差异显著;与株高相比,油菜的根长仅在 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时受到抑制低于对照,其余两组对植株的生长均有明显的促进作用。CTC 和 ECTC 胁迫反应在油菜幼苗生长上的差异,说明 CTC 和 ECTC 对油菜幼苗生长尤其是根部伸长存在抑制作用,且 CTC 抑制作用比 ECTC 更明显。

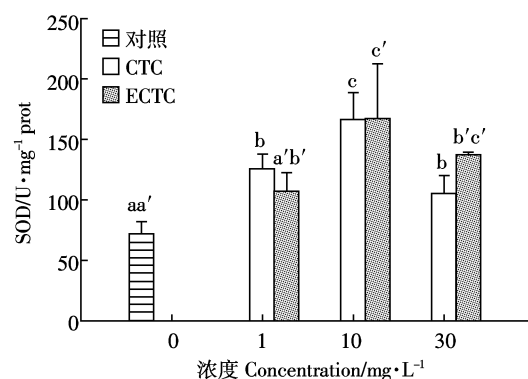
2.1.3 对油菜幼苗生物量的影响

本实验浓度下,CTC 和 ECTC 对油菜幼苗鲜重和干重有促进作用,低浓度时明显,随浓度升高,增重效果下降,除 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ CTC 造成油菜幼苗鲜重低于对照组外,其余的 CTC 和 ECTC 处理组鲜重均要高于对照组, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ CTC 组比对照增重了 14.24%,差异显著,ECTC 浓度为 1 、 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,油菜幼苗的鲜重分别比对照增加了 28.89%、23.52% 和 9.60%,前两者差异显著。而油菜幼苗干物质受到 CTC 和 ECTC 诱导均要高于对照,其中 CTC 的促进效果最为明显,在 10 、 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ CTC 造成的鲜重低于或同对照基本无差别的情况下,干重却比对照增加了 16.73% 和 16.36%,并且差异显著。在 CTC 对植株胁迫导致株高和根长抑制均强于 ECTC 作用下,其促进植株干物质显著增加的机理还需要深入研究。

2.2 不同浓度 CTC 与 ECTC 对油菜幼苗 SOD、POD 和 CAT 活性的影响

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)是 1969 年由 McCord 和 Fridovich 发现的,它的直接作用是能使 $\text{O}_2 \cdot$ 变成 O_2 和 H_2O_2 ,后者虽不是自由基,但仍属于活性氧,需要清除。

由图 2 可知,CTC 和 ECTC 处理组的 SOD 活性均高于对照。 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度胁迫时油菜中 SOD 活性升高,分别比对照升高了 74.25% 和 49.02%,其中对 CTC 的应激反应要高于 ECTC; $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度处理的油菜中 SOD 活性最强,分别比对照升高了 131.23% 和 131.48%,随着胁迫浓度的升高,SOD 活性下降; $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度处理的油菜中 SOD 活性仅比对照升高了 46.40% 和 90.67%,CTC 组 SOD 活性下降趋势明显高于 ECTC 组。CTC 各处理组 SOD 活性与对照差异显



不同小写字母表示处理间差异达 0.05 显著性水平, abc 对应 CTC, a'b'c' 对应 ECTC, 下同

图 2 不同浓度 CTC 和 ECTC 对油菜幼苗 SOD 活性的影响

Figure 2 Effect of CTC and ECTC on the activity of SOD in rape

著,处理组间除 1 、 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 间差异不显著,其他均差异显著;而 ECTC 处理组 10 、 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 与对照差异显著, $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组同对照差异不显著, 1 、 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 间差异显著。可能是由于 CTC 和 ECTC 对油菜造成了胁迫,促进了活性氧自由基产生, $1 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ CTC 和 ECTC 诱导了 SOD 活性升高清除产生的自由基,而 $10 \sim 30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 SOD 活性受到抑制,CTC 组下降明显,阻碍了 SOD 清除自由基的能力,如果长时间处于高浓度胁迫状态,油菜的生理机能可能损伤。

过氧化物酶(Peroxidase, POD),是一族能利用 H_2O_2 氧化供氢体的氧化还原酶,它与植物的生长、发育、抗病性、衰老、抗寒、抗旱有密切关系。

由图 3 可知,油菜幼苗 POD 活性受到加入 CTC 和 ECTC 影响,其中 CTC 胁迫诱导 POD 活性能力要强于 ECTC。 $1 \sim 30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CTC 处理的 POD 活性均比对照有明显升高,分别比对照升高了 51.28%、71.68% 和 43.62%,各处理组 POD 活性同对照差异显著;而 ECTC 诱导 POD 活性也均高于对照,分别增加了 33.74%、46.25% 和 15.57%, $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组同对照相比差异显著,其他均差异不显著。

过氧化氢酶(Catalase, CAT)是清除过氧化氢的重要酶类,它催化 H_2O_2 分解为 H_2O 和 O_2 ,它与 SOD、POD 等协同作用,有效地清除体内的活性氧。CAT 专一作用于 H_2O_2 ,但反应的 K_m 较大,所以只能在 H_2O_2 浓度或酶活性较高时发挥作用。

从图 4 可以看出, $1 \sim 30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CTC 处理的 CAT 活性分别比对照升高了 40.38%、17.12% 和 30.79%,各处理组 CAT 活性同对照差异不显著。而 ECTC 诱导 CAT 活性在 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 胁迫下活性最高,为对照的 1.72 倍,与对照和其余处理组差异显著; 10

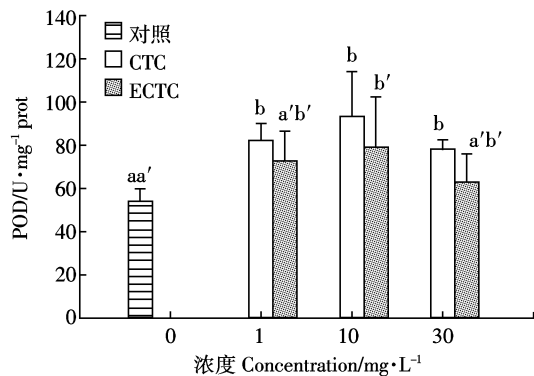


图 3 不同浓度 CTC 和 ECTC 对油菜幼苗 POD 活性的影响
Figure 3 Effect of CTC and ECTC on the activity of POD in rape

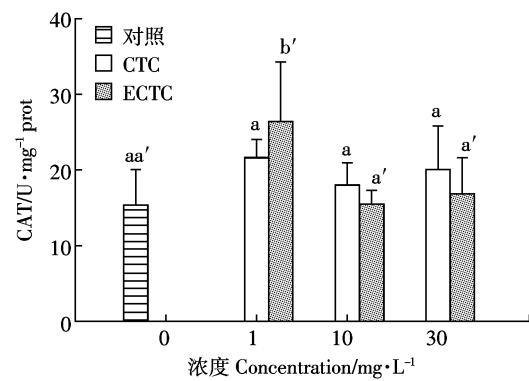


图 4 不同浓度 CTC 和 ECTC 对油菜幼苗 CAT 活性的影响
Figure 4 Effect of CTC and ECTC on the activity of CAT in rape

mg·L⁻¹ 处理组 CAT 活性同对照相比几乎没有变化, 仅升高了 0.39%; 30 mg·L⁻¹ 处理组的 CAT 活性是对照的 1.09 倍。这可能是由于油菜幼苗吸收 CTC 后抑制了 CAT 的活性, 而随着 CTC 浓度的增加, 刺激产生了较多的 H₂O₂, 而高浓度的 H₂O₂ 又诱导了 CAT 活性的升高。

2.3 CTC 和 ECTC 在油菜幼苗体内的累积

如表 3 所示, CTC 和 ECTC 处理浓度在 1~30 mg·L⁻¹ 时, 随着 CTC 和 ECTC 处理浓度升高, 单位鲜重油菜幼苗体内蓄积的 CTC 和 ECTC 浓度也相应增加, 各组间差异极显著。最高浓度 CTC 和 ECTC 处理油菜幼苗体内两种化合物的含量分别是最低浓度的 47.84 倍和 44.51 倍, 而油菜幼苗体内蓄积的 CTC 是 ECTC 的 0.98~1.06 倍。用 CTC 处理的幼苗体内除了有 CTC 残留, 还检测到代谢物 ECTC, 用 ECTC 处理的也检测到一定浓度的母体抗生素 CTC。

3 讨论

一般认为, 污染物对种子萌发和幼苗生长的影响

表 3 CTC 和 ECTC 在油菜幼苗体内的累积

Table 3 The contents of CTC and ECTC in rape

处理浓度/ mg·L ⁻¹	CTC 处理组 Treatment group of CTC/μg·kg ⁻¹		ECTC 处理组 Treatment group of ECTC/μg·kg ⁻¹	
	CTC	ECTC	CTC	ECTC
0	0	0	0	0
1	2.08±0.16a	1.32±0.11a	1.23±0.06a	2.10±0.36a
10	23.10±3.38b	14.47±1.43b	12.91±1.03b	23.09±2.32b
30	99.50±4.31c	63.58±0.55c	53.49±1.08c	93.48±1.96c

注: 统计检验采用 LSD q 检验 (P≤0.01), 不同字母代表处理浓度间差异性极显著。

Note: The different letters in the same column mean the significant difference at P≤0.01 (LSD).

存在一个较低浓度下刺激效应和高浓度下的抑制效应^[27], CTC 和 ECTC 作为环境的有机污染物, 也具有类似效应。本研究在不同浓度的 CTC 和 ECTC 胁迫下油菜呈现出不同响应。在 1 mg·L⁻¹ CTC 的胁迫下, 促进油菜株高、鲜重和干重, 鲜重和干重与对照相比差异显著, 发芽势、发芽率和根长受到一定的抑制作用; 在 1 mg·L⁻¹ ECTC 的胁迫下, 促进油菜发芽率、株高、根长、鲜重和干重, 与对照相比除发芽率其余指标差异均显著, 发芽势受到一定的抑制作用。在 10 mg·L⁻¹ 浓度胁迫下, CTC 和 ECTC 促进了油菜发芽势、发芽率、鲜重和干重, 株高和根长在 CTC 组受到显著抑制, 却在 ECTC 诱导下有显著促生长的能力。在 30 mg·L⁻¹ 的 CTC 和 ECTC 胁迫下, 发芽势、发芽率和根长受到抑制, 干物质被增加, 株高和鲜重在 CTC 组受抑制, 在 ECTC 组被促进。通过对油菜种子萌发和幼苗生长中各指标比较和筛选, 发现株高和根长较其他指标对 CTC 和 ECTC 生态毒性敏感, 尤其是根长对外来污染物胁迫所表达的特征是最好的生态毒性指示指标, 该指标同样适用于其代谢物, 这与鲍艳宇^[13]和金彩霞^[19]等研究四环素类抗生素对小麦和白菜生态毒性抑制实验结果类似。

SOD、POD 和 CAT 是植物体内活性氧清除系统中的 3 种重要酶, 其活性的增加还是减少, 反映了植物在逆境因子作用下对环境胁迫做出保护性应激反应^[28]。本研究结果表明: 油菜幼苗中 3 种抗氧化酶活性的变化因外源污染物种类和胁迫浓度的不同而有所不同。低浓度 CTC 和 ECTC 胁迫下产生的影响, 大部分被 SOD、POD 和 CAT 协同清除, 最大限度地减少自由基对膜系统结构和功能的伤害; 中浓度胁迫下, 主要依靠 SOD 和 POD 活性的增强来清除过氧化伤害; 高浓度 CTC 和 ECTC 胁迫下产生的氧自由基, 已

经不能被有效清除,从而导致油菜幼苗的过氧化损伤。油菜幼苗中SOD、POD和CAT活性在CTC和ECTC胁迫下所表现出的活性差异同时也表明其抗CTC胁迫的能力强于ECTC。

一般植物对抗生素的吸收大部分蓄积在根中,只有很少量部分转运到地上部^[29-30],本实验虽未对油菜根部抗生素含量进行测定,但从已有文献看,四环素类药物在植物根部的含量高于茎和叶^[30],根部沉积的CTC、ECTC将破坏油菜对养分的吸收,影响植物的正常生长,表2中部分指标也充分反映了这一点,并且浓度越高影响越大。ECTC是植物吸收CTC后在体内因素参与下发生代谢生成的产物之一^[31],体现在没有经过ECTC处理的油菜组发现了ECTC的存在,然而CTC向ECTC转化在一定条件下是可逆的^[32],在仅有ECTC处理的油菜地上部分也检测到了母体药物的存在。随着油菜幼苗生育期延长,CTC和ECTC是否会继续积累以及物质代谢发生的程度,还需要进一步研究和探讨。

4 结论

(1) CTC和ECTC胁迫对非靶标生物油菜种子的萌发和幼苗生长产生了影响,发芽势、发芽率、根伸长、株高、鲜重和干重对其的毒性敏感不同,而根伸长是反映CTC等抗生素最好的生态毒性指示指标,该指标同样适用于其代谢物。

(2) CTC和ECTC胁迫对油菜体内SOD、POD和CAT酶活性均有影响,易引起幼苗抗氧化酶系统损伤,其机制和作用机理还需要进一步研究。

(3) CTC和ECTC可被油菜幼苗吸收和积累,且药物处理浓度越高,吸收和积累量越多,累积的药物可以在植物体内发生代谢。

参考文献:

- [1] Kümmerer K. Significance of antibiotics in the environment[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 52:5-7.
- [2] Xu W H, Zhang G, Zou S C, et al. Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using high-performance liquid chromatography spectroscopy ionization tandem mass spectrometry[J]. *Environ Pollut*, 2007, 145:672-679.
- [3] 侯放亮. 饲料添加剂应用大全[M]. 北京:中国农业出版社, 2003. HOU Fang-liang. Feed additive application[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2003.
- [4] Alcock R E, Sweetman A, Jones K C. Assessment of organic contaminant fate in wastewater treatment plants: I. Selected compounds and physiochemical properties[J]. *Chemosphere*, 1999, 38:2247-2262.
- [5] Tolls J. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review[J]. *Environ Sci Technol*, 2001, 35:3397-3406.
- [6] De Liguoro M, Cibir V, Capolongo F, et al. Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: Evaluation of transfer to manure and soil[J]. *Chemosphere*, 2003, 52:203-212.
- [7] Hamscher G, Sczesny S, Hoper H, et al. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Anal Chem*, 2002, 74:1509-1518.
- [8] Mackie R I, Koike S, Krapac I, et al. Tetracycline residues and tetracycline resistance genes in groundwater impacted by swine production facilities[J]. *Anim Biotechnol*, 2006, 17:157-176.
- [9] Schmitt H, Stooß K, Hamscher G, et al. Tetracyclines and tetracycline resistance in agricultural soils: Microcosm and field studies[J]. *Microb Ecol*, 2006, 51:267-276.
- [10] Sengeløv G, Halling-Sørensen B, Aarestrup F M. Susceptibility of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium* isolated from pigs and broiler chickens to tetracycline degradation products and distribution of tetracycline resistance determinants in *E. coli* from food animals[J]. *Vet Microbiol*, 2003, 95:91-101.
- [11] Teuber M. Veterinary use and antibiotic resistance[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2001, 4:493-499.
- [12] Dolliver H, Kumar K, Gupta S. Sulfamethazine uptake by plants from manure-amended soil[J]. *J Environ Qual*, 2007, 36:1224-1230.
- [13] 鲍艳宇, 周启星, 谢秀杰. 四环素类抗生素对小麦种子芽与根伸长的影响[J]. 中国环境科学, 2008, 28(6):566-570. BAO Yan-yu, ZHOU Qi-xing, XIE Xiu-jie. Influence of tetracycline kind antibiotics on the control of wheat germination and root elongation[J]. *China Environmental Science*, 2008, 28(6):566-570.
- [14] Farkas M H, Mojico E E, Patel M, et al. Development of a rapid biolistic assay to determine the changes in relative levels of intracellular calcium in leaves following tetracycline uptake by pinto bean plants[J]. *Analyst*, 2009, 134:1594-1600.
- [15] Boxall B A, Johnson P, Smith E J, et al. Uptake of veterinary medicines from soils into plants[J]. *J Agr Food Chem*, 2006, 54:2288-2297.
- [16] Kumar K, Gupta S C, Baidoo S K, et al. Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure [J]. *J Environ Qual*, 2005, 34:2082-2085.
- [17] 包艳萍, 李彦文, 莫测辉, 等. 固相萃取-高效液相色谱法分析蔬菜中6种磺胺类抗生素[J]. 环境化学, 2010, 29(3):513-518. BAO Yan-ping, LI Yan-wen, MO Ce-hui, et al. Determination of six sulfonamide antibiotics in vegetables by solid phase extraction and high performance liquid chromatography[J]. *Environmental Chemistry*, 2010, 29(3):513-518.
- [18] 吴小莲, 莫测辉, 李彦文, 等. 蔬菜中喹诺酮类抗生素污染探查与风险评估:以广州市超市蔬菜为例[J]. 环境科学, 2011, 32(6):1704-1709. WU Xiao-lian, MO Ce-hui, LI Yan-wen, et al. Investigation and health risk assessment of quinolone antibiotics in vegetables: Taking supermarket vegetables of Guangzhou city for an example[J]. *Environmental Science*, 2011, 32(6):1704-1709.

- [19] 金彩霞, 刘建军, 陈秋颖, 等. 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: 1358–1362.
JIN Cai-xia, LIU Jun-jun, CHEN Qiu-ying, et al. Toxicological effects of veterinary drugs in soil on the inhibition of root elongation of wheat and Chinese cabbages[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28: 1358–1362.
- [20] 刘吉强, 诸葛玉平, 崔丽娜. 外源四环素对土壤酶活性和油菜品质的影响[J]. 应用生态学报, 2009, 20: 943–948.
LIU Ji-qiang, ZHUGE Yu-ping, CUI Li-na. Effects of exogenous tetracycline on rape soil enzyme activity and rape quality [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2009, 20: 943–948.
- [21] 魏瑞成, 包红朵, 郑 勤, 等. 粪源抗生素金霉素和喹乙醇在养殖水体中的残留及对锦鲤的生态毒理效应研究[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28: 1800–1805.
WEI Rui-cheng, BAO Hong-duo, ZHENG Qin, et al. Chlortetracycline and olaquinox residues of manure-derived antibiotics in the aquatic water and their ecotoxicological effects on Koi Carp[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28: 1800–1805.
- [22] 林 琳, 安 婧, 周启星. 土壤四环素污染对小白菜幼苗生长发育的生态毒性[J]. 环境科学, 2011, 32(8): 2430–2435.
LIN Lin, AN Jing, ZHOU Qi-xing. Ecotoxicological effects of tetracycline on the seedling development of Chinese white cabbage (*Brassica rapa L. Chinensis Group.*) in soil[J]. *Environmental Science*, 2011, 32(8): 2430–2435.
- [23] Xu W H, Zhang G, Li X D, et al. Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South China[J]. *Water Res*, 2007, 41: 4526–4534.
- [24] 李俊锁, 邱月明, 王 超. 兽药残留分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 393–412.
LI Jun-suo, QIU Yue-ming, WANG Chao. Residue analysis for veterinary drug[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2002: 393–412.
- [25] Xue Y F, Liu L, Liu Z P, et al. Protective role of Ca against NaCl toxicity in Jerusalem artichoke by up-regulation of antioxidant enzymes[J]. *Pedosphere*, 2008, 18: 766–774.
- [26] Martínez-Carballo E, González-Barreiro C, Scharf S, et al. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria[J]. *Environ Pollut*, 2007, 148: 570–579.
- [27] 王 敏, 唐景春. 土壤中的抗生素污染及其生态毒性研究进展[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29: 261–266.
WANG Min, TANG Jing-chun. Research of antibiotics pollution in soil environment and its ecological toxicity[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29: 261–266.
- [28] 张清智, 陈振德, 王文娇, 等. 毒死蜱胁迫对小白菜抗氧化酶活性和相关生理指标的影响[J]. 生态学报, 2008, 28: 4524–4530.
ZHANG Qing-zhi, CHEN Zhen-de, WANG Wen-jiao, et al. Effects of chlorpyrifos stress on antioxidant enzyme activities and some related compound contents in pakchoi[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28: 4524–4530.
- [29] Herklotz PA, Gurung P, Vanden Heuvel B, et al. Uptake of human pharmaceuticals by plants grown under hydroponic conditions [J]. *Chemosphere*, 2010, 78: 1416–1421.
- [30] Migliore L, Godeas F, De Filippis S P, et al. Hormetic effect(s) of tetracyclines as environmental contaminant on *Zea mays*[J]. *Environ Pollut*, 2010, 158: 129–134.
- [31] Arian O A. Degradation and metabolization of chlortetracycline during the anaerobic digestion of manure from medicated calves[J]. *J Hazard Mater*, 2008, 158: 485–490.
- [32] Søbørg T, Ingerslev F, Halling-Sørensen B. Chemical stability of chlortetracycline and chlortetracycline degradation products and epimers in soil interstitial water[J]. *Chemosphere*, 2004, 57(10): 1515–1524.