

土霉素对小麦种子发芽与幼苗生长发育的生态毒性

安婧^{1,2}, 周启星^{1,3*}, 刘维涛^{1,2}

(1. 中国科学院沈阳应用生态研究所陆地生态过程重点实验室, 沈阳 110016; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3. 南开大学环境科学与工程学院, 环境污染过程与基准教育部重点实验室, 天津 300071)

摘要: 研究了土霉素对小麦种子发芽以及早期幼苗生长发育的生态毒性效应. 结果表明, 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 mg/L 和 34.7 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 ~ 2.4 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% ~ 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 ~ 2.4 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 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. 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.

关键词: 土霉素; 生态毒性效应; 小麦; 种子发芽; 叶绿素; 可溶性蛋白; 抗氧化系统

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)10-3022-06

Ecotoxicological Effects of Oxytetracycline on Wheat (*Triticum aestivum*) Based on Seed Germination and Seedling Development

AN Jing^{1,2}, ZHOU Qi-xing^{1,3}, LIU Wei-tao^{1,2}

(1. Key Laboratory of Terrestrial Ecological Process, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; 2. Graduate University of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria, Ministry of Education, College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: The ecotoxicological effects of oxytetracycline (OTC) on the germination of wheat (*Triticum aestivum*) seeds and the early development of wheat seedlings were investigated. The results showed that the elongation of wheat shoots and roots was significantly ($p < 0.05$) inhibited by OTC, and there was a good dose-response relationship between the OTC concentration and inhibition rates. According to the linear regression equation, EC_{50} of OTC for inhibiting wheat shoot and root elongation was 65.5 mg/L and 34.7 mg/L, respectively. However, the germination of wheat seeds was not inhibited by OTC. Moreover, after a 21-day exposure to 0.15-2.40 mg/L OTC, the content of chlorophyll (CHL) decreased by 35.6%-47.3%, and the content of soluble protein (SP) in the leaves and roots of wheat plants decreased significantly. After a 7-day exposure, the activity of SOD and POD in wheat was not changed significantly. With the prolongation of exposure time, the activity of SOD and POD in wheat leaves and roots decreased significantly, the inhibition rate of SOD activity in roots increased up to 72.3% after a 21-day exposure to 2.4 mg/L OTC, which indicated that the antioxidant defense systems were damaged. The results above suggested that the low concentration OTC had ecotoxicological effects on wheat seedlings after chronic exposure.

Key words: oxytetracycline; ecotoxicological effect; wheat (*Triticum aestivum*); seed germination; chlorophyll; soluble protein; antioxidant defense systems

通常,人们只是关注药物对人或动物体内靶器官的影响,以及如何使药物的药效成分在机体内持续更长的时间以满足对疾病的治疗效果^[1].然而,这些药物成分对非靶生物的影响却常常被忽视^[2].事实上,药物被摄入体内后并不能完全被吸收和利用,一部分未代谢或是不可溶解的药物成分将通过尿液和粪便排入环境.有研究报道,对肉用动物使用的抗生素类药物有一半以上以母体药物的形式从粪便中排出体外^[3].此外,被直接喷洒在农作物上的、添加到动物饲料中的以及过期被丢弃的药物均会残留在环境中.由于它们的持续输入及污水处理系统对其不理想的去除效果,使 PPCPs 在环境中残留情况日

趋严重.世界很多国家和地区已经陆续在污水处理厂出水^[4,5]、地表水^[6]、土壤及污泥沉积物^[7]中都检测到了 PPCPs 的残留.

在众多的 PPCPs 中,抗生素的使用量最大而且也最为频繁.在中国,由于人口众多,且畜牧及水产养殖业发达,抗生素的生产和使用总量一直居世界“领先”地位,尤其是土霉素.仅 2003 年,中国生产了

收稿日期: 2008-11-24; 修订日期: 2009-03-02

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2004CB418503); 国家自然科学基金项目(20777040)

作者简介: 安婧(1982~),女,博士研究生,主要研究方向为污染生态毒理学与环境污染化学, E-mail: anjing.china@yahoo.ac.cn

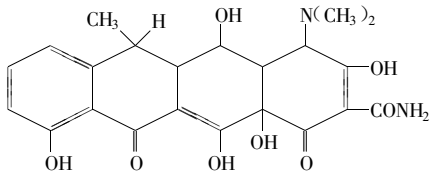
* 通讯联系人, E-mail: zhouqx@iae.ac.cn

近10 000 t土霉素, 占世界当年土霉素总产量的65%^[8]. 巨大的生产和使用量使土霉素在环境中的残留情况日趋严重^[9, 10], 给环境系统造成不可避免的生态风险. Wollenberger^[11]、Ferreira^[12]等研究表明, 环境中残留的土霉素对水生动物具有不良的生态毒理效应. 然而, 关于土壤中及农业灌溉水中残留的土霉素对农作物生长发育的生态毒理效应的研究至今未见报道. 本研究选用中国北方大宗作物——小麦为实验作物, 通过对小麦种子发芽及幼苗生长发育生态毒性的观测, 探讨了土霉素对农业生态系统可能造成的不良影响.

1 材料与方法

1.1 实验所用化学品

本实验所用试剂均为分析纯. 实验用土霉素为原料药品(99%), 分子式为: C₂₂H₂₄N₂O₉; 结构式如下.



该药品购于武汉远城科技发展有限公司, 使用前不经过任何纯化.

1.2 小麦种子发芽实验

实验小麦品种为辽春 10 号, 购于沈阳东亚种子公司.

根据预实验中小麦根长抑制率的 10% ~ 60%, 选择土霉素的实验浓度为 0、10、20、30、40 和 50 mg/L. 选取饱满、均匀的小麦种子, 经过 3% 的 H₂O₂ 消毒 10 min 后用去离子水冲洗干净. 将 20 粒消毒后的小麦种子均匀地放在铺有二层滤纸的培养皿中, 分别在培养皿中加入 5 mL 土霉素溶液, 对照中加入 5 mL 去离子水, 每个处理 3 个重复. 培养皿放在 (25 ± 1)℃ 的培养箱中, 黑暗中培养. 当种子的胚芽和培根长度 > 2 mm 时, 认为是种子正常发芽. 当对照根长达到 20 mm 时, 培养结束. 分别计算每个处理的发芽率、芽长及根长抑制率.

1.3 幼苗生理生态毒性实验

小麦幼苗在土霉素溶液中培养 21 d, 测定其体内的生理指标的变化, 以评估土霉素对小麦幼苗的慢性毒性效应. 灭菌后的小麦种子在 (25 ± 1)℃ 的培养箱中发芽 72 h, 后于营养液中水培 7 d, 培养条件为: 光照 12 h/黑暗 12 h, 恒温 (25 ± 1)℃. 根据急性毒

性实验得出的土霉素对小麦根长的半抑制浓度 (EC₅₀), 确定土霉素的实验浓度为 0.15、0.30、0.60、1.20、2.40 mg/L, 分别对应 EC₅₀/240、EC₅₀/120、EC₅₀/60、EC₅₀/30、EC₅₀/15. 实验期间每天更换培养液, 以避免土霉素溶液浓度的变化, 并在培养的第 0、7、14、21 d 分别采样进行分析.

叶绿素 (Chl) 的测定按照 Hegedüs 等^[13]的方法进行, 其中 Chl 的测定作如下改进: 取 0.05 g 小麦叶片加入 80% 丙酮溶液, 浸提 24 h 后分光光度计测定浸提液的吸光值. 0.1 g 小麦幼苗的叶片以及根组织分别在预冷的磷酸缓冲溶液 (50 mmol/L NaH₂PO₄ · Na₂HPO₄, 1% 聚乙烯吡咯烷酮, pH 7.8) 中匀浆, 4℃ 下 13 000 r/min 离心 30 min, 上清液即为提取液^[14]. 根据 Bradford^[15] 的考马斯亮蓝法测定 SP 含量. 酶活的测定根据 Wu 等^[16] 的方法.

1.4 数据处理

利用 SPSS 软件进行数据统计分析, 包括平均值、标准差、回归分析以及方差分析; 对根长和芽长进行了多重比较 (LSD), 统计显著性设为 $p < 0.05$.

2 结果与分析

2.1 土霉素对小麦种子发芽的生态毒性

统计分析表明, 土霉素各浓度处理之间, 发芽率没有显著差异, 而对芽长及根长的抑制效应极为显著 ($p < 0.01$). 小麦根组织对土霉素的胁迫较为敏感, 当土霉素浓度为 10 mg/L 时, 对小麦根长抑制率已达到 39.3% (图 1). 此外, 芽长及根长抑制率与土霉素各处理浓度之间相关性显著 ($p < 0.01$), 当土霉素浓度升高时, 芽长及根长抑制率随之增加, 且它们之间具有良好的剂量-效应关系, 线性回归方程如下.

$$SI_{OTC} = 0.731X + 2.15 \quad (1)$$

$$(R^2 = 0.969, p < 0.01)$$

$$RI_{OTC} = 0.412X + 35.71 \quad (2)$$

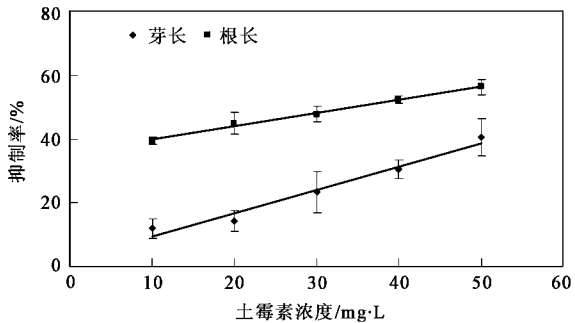


图 1 土霉素对小麦芽长及根长的毒性效应

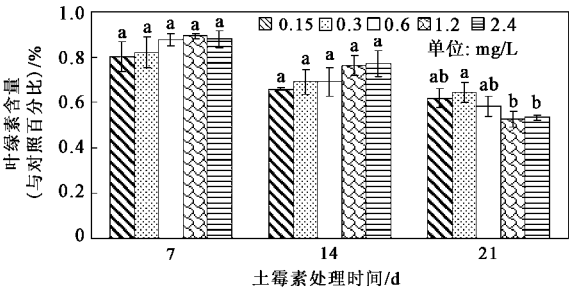
Fig. 1 Toxic effects of OTC on shoot and root elongation of wheat

($R^2 = 0.993, p < 0.01$)

式中, X 为土霉素的实验浓度 (mg/L); SI_{OTC} 和 RI_{OTC} 分别为小麦芽长及根长抑制率 (%). 由方程(1)、(2) 计算得出土霉素对小麦芽长及根长的 EC_{50} 分别为 65.5 mg/L 和 34.7 mg/L. 由此可知, 土霉素对小麦根长的抑制效应大于对其他指标的抑制效应.

2.2 土霉素对小麦幼苗叶片中叶绿素的生态毒性

由图 2 可知, 0.15 ~ 2.40 mg/L 的土霉素对小麦幼苗叶绿素的合成均有抑制作用. 土霉素处理条件下小麦幼苗的叶绿素含量下降, 但各处理浓度之间的差异不显著. 土霉素暴露 7 d 后, 小麦叶片中叶绿素含量下降, 但与对照的差异不显著, 且各处理浓度之间的差异性也不显著. 随着暴露时间的延长, 土霉素处理下的小麦叶片中叶绿素的含量显著下降. 土霉素暴露 14 d 后, 叶绿素抑制率由暴露 7 d 时 11.9% ~ 19.6% 上升到 22.7% ~ 34.0%, 但各处理浓度之间的差异性仍然不显著. 当暴露 21 d 后, 不同处理浓度之间的叶绿素含量出现了显著差异, 1.20 ~ 2.40 mg/L 的土霉素对叶绿素的抑制效应更加显著, 抑制率达到 47.3%. 此时, 小麦叶片直观的变化为: 叶片由绿色逐渐变成黄绿色.



不同小写字母表示组间差异显著 ($p < 0.05$), 下同

图 2 土霉素对小麦幼苗叶片中叶绿素含量的影响

Fig.2 Effects of OTC on the content of CHL in leaves of wheat seedling

2.3 土霉素对小麦幼苗中可溶性蛋白的生态毒性

生物体内蛋白质含量的变化是外界胁迫下生物生长发育受到影响的直接指示. 由图 3 可知, 土霉素暴露 7 d 后, 0.15 ~ 2.40 mg/L 土霉素处理的小麦根部中 SP 与对照中的 SP 没有显著性差异. 在叶片中, 虽然 0.15 ~ 0.30 mg/L 的土霉素对 SP 没有不良毒性效应, 但是当土霉素浓度 > 0.30 mg/L 时 SP 的含量显著增加. 当土霉素暴露 14 d 后, 2.40 mg/L 土霉素处理的小麦叶片中的 SP 显著下降, SP 抑制率为 22.1%, 而其余的土霉素处理的小麦叶片及根组织中的 SP 均高出对照. 随着土霉素暴露时间的延长, 情况发生了显著变化. 土霉素暴露 21 d 后, 小麦叶

片及根组织中的 SP 均呈显著下降趋势, 且土霉素浓度越大, SP 的抑制率越高. 0.15 ~ 2.40 mg/L 的土霉素使叶片及根组织中的 SP 抑制率分别达到 25.4% ~ 50.9% 和 22.2% ~ 60.4%, 表明土霉素对小麦根组织中的 SP 抑制作用更加明显.

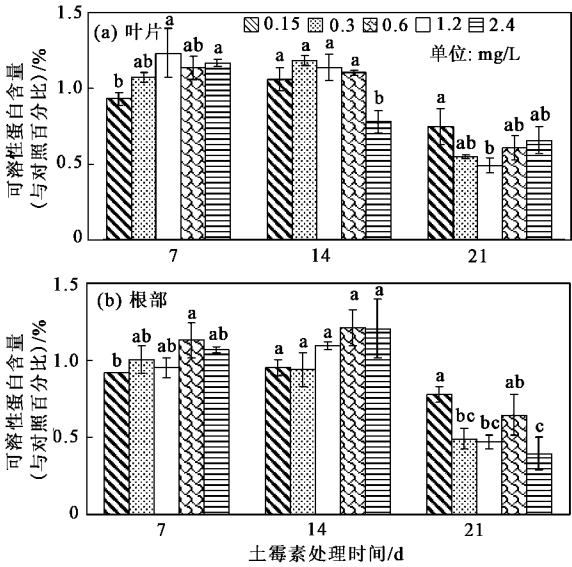


图 3 土霉素对小麦幼苗叶片及根组织中的可溶性蛋白含量的影响

Fig.3 Effects of OTC on soluble protein content in leaves and roots of wheat seedlings with the increase of incubation time

2.4 土霉素对小麦幼苗中抗氧化系统的生态毒性

土霉素处理的小麦幼苗叶片及根组织中的 SOD 活性变化如图 4 所示. 暴露 7 d 后, 0.15 ~ 2.40 mg/L 土霉素对小麦的叶片及根组织中的 SOD 活性均起到了抑制作用. 不同浓度的土霉素对叶片中 SOD 活性抑制率的差异性不显著, 而 2.40 mg/L 土霉素处理的根组织中的 SOD 活性却显著低于其余处理浓度. 土霉素暴露 21 d 后, SOD 活性的抑制率没有明显升高. 叶片及根组织中 SOD 活性的抑制率分别为 6.1% ~ 24.6% 和 21.5% ~ 29.3%, 且各处理浓度之间的 SOD 活性呈现不规则的变化. 随着土霉素暴露时间的延长, 情况发生了显著变化. 土霉素暴露 21 d 后, 小麦叶片及根组织中的 SOD 活性均显著下降, 尤其是根组织中的 SOD 活性. 0.15 ~ 0.60 mg/L 的土霉素使 SOD 活性抑制率平均达到 57.2%; 随着土霉素浓度的增加, SOD 活性的抑制率显著升高, 1.2 ~ 2.40 mg/L 的土霉素使根组织中的 SOD 抑制率达到 76.1%. 土霉素处理小麦组织中 POD 活性的变化情况见图 5. 暴露 7 d 后, 0.15 ~ 2.40 mg/L 土霉素处理的小麦根组织中的 POD 活性与对照差异不显著;

0.6 ~ 2.40 mg/L 的土霉素对叶片中的 POD 活性略有抑制,其余处理浓度与对照差异不显著.暴露 14 d 后,虽然 0.15 mg/L 的土霉素对叶片中的 POD 没有显著抑制效应,但 0.30 ~ 2.40 mg/L 的土霉素已经开始显著抑制 POD 活性,且处理浓度间没有差异.暴露 21 d 后,0.15 ~ 2.40 mg/L 的土霉素使叶片中 POD 活

性抑制率达到 44.0% ~ 65.0%.随着土霉素暴露时间的延长,根组织中的 POD 活性也呈现逐渐下降的趋势.

3 讨论

高等植物的毒理实验包括:发芽实验、根长实验以及早期幼苗的生长实验,这些实验方法用于检测污染物对植物的毒性十分方便、快捷.通过小麦种子发芽实验可知,土霉素处理的小麦种子发芽率与对照没有显著差异,也就是说土霉素对小麦种子出芽没有毒性效应.此外,种皮对土霉素溶液也具有一定的吸附功能,它在胚芽与污染环境中间架起了一道“保护屏障”使种子可以正常发芽^[17].但是土霉素对小麦芽长及根长则具有抑制作用,且芽长及根长抑制率与土霉素浓度呈线性正相关.土霉素对小麦叶片及根组织的 EC₅₀ 表明,土霉素对小麦根部的影响尤为突出.土霉素对小麦种子发芽的毒性大小依次为:根长 > 芽长 > 发芽率.这与 Chen 等^[18]的研究结果相似,即有机化合物在相同浓度下对小麦幼苗根长的抑制效应大于其他参数.但是 Carlsson 等^[19]和 Fent 等^[20]认为,这个浓度是不太可能在环境中存在的,除非发生严重的环境突发事件.因此,环境中的土霉素通常不会对小麦种子的发芽造成危害.

由于土霉素等药物成分持续不断地被输入环境,且污水处理系统对它们的去除效果不佳.因此,它们在环境中的低浓度长期暴露对植物的生态毒性效应是不容忽视的^[21].作为可见症状之一,叶绿素含量的下降能够用来指示土霉素对小麦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,而且初期形成的 Chl 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 Chl 的积累^[22].这个结论在本研究也有相似体现,土霉素的存在能够抑制叶绿素的积累,且随着暴露时间的延长,土霉素对叶绿素的抑制作用更加显著.但是,土霉素与小麦叶片 Chl 的剂量-效应关系不明显.

除了植物的可见症状之外,植物体内的生理指标对药物成分低浓度长期暴露产生的毒性反应更为敏感.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^[8-10].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.但是在有机物、重金属以及寒旱等胁迫下,植物体内的 SP 含量会下降^[16,23].这与本实验得出的结果相似,土霉素

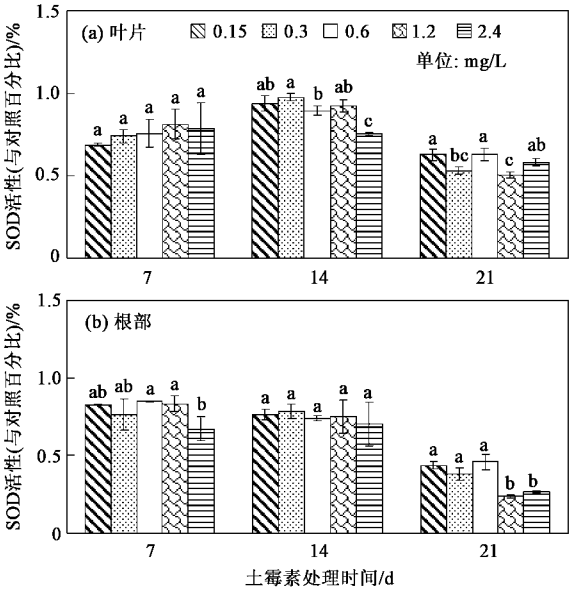


图 4 土霉素对小麦幼苗叶片及根组织中 SOD 活性的影响
Fig.4 Effects of OTC on the activity of SOD in leaves and roots of wheat seedlings

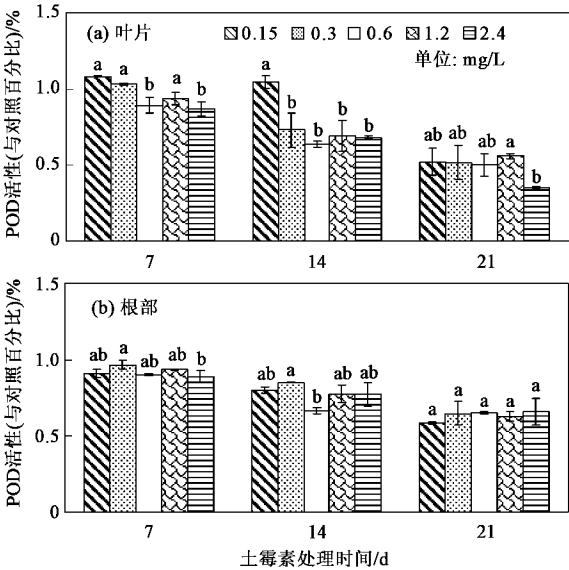


图 5 土霉素对小麦幼苗叶片及根组织中 POD 活性的影响
Fig.5 Effects of OTC on the activity of POD in leaves and roots of wheat seedlings

暴露 14d 的小麦叶片及根组织中的 SP 含量均有所上升,说明土霉素短期低浓度暴露可以诱导 SP 的合成.但是暴露时间的延长,土霉素对 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,土霉素对小麦根组织中 SP 的影响更为显著.

通常在有机物、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 $O_2^{\cdot-}$ 、 $RO\cdot$ 等活性自由基.植物体内具有多种保护机制,这些机制可以去或降低 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.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.在本研究中发现小麦幼苗的根组织中的 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.在暴露初期,叶片及根组织中 POD 的活性与对照相比略有上升或是无显著差异,这说明小麦具有一定的抵抗氧化胁迫的能力.但是,这种自我保护的能力是有限的,随着土霉素暴露时间的延长,POD 活性呈显著下降趋势,这也说明土霉素对小麦幼苗叶片及根组织的损伤与暴露时间有关系.SOD 是清除正常代谢过程以及氧化物质诱导产生 $O_2^{\cdot-}$ 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.本实验研究表明,随着土霉素暴露时间的延长,小麦幼苗叶片和根组织中的 SOD 活性呈逐渐下降趋势,这说明小麦叶片中的 POD 酶活的下降可能与 SOD 诱导产生 H_2O_2 的量下降有关.而且实验结果还表明,随着暴露时间的延长,小麦根组织中的 SOD 酶活的降低比叶片中的更为明显,说明小麦根系对土霉素的胁迫更为明显.小麦幼苗叶片与根组织中的 POD 与 SOD 的变化表明,它的抗氧化系统由于土霉素的存在而遭到破坏,其自身的抗氧化防御功能降低.

4 结论

(1)由种子发芽实验得出土霉素可以抑制小麦种子的芽和根的伸长,并且土霉素浓度与芽长(或根长)抑制率之间具有显著的线性关系;土霉素对小麦根部的毒性效应最显著,但对种子的发芽率没有显著影响.

(2)土霉素低浓度长期暴露对小麦幼苗的生长

发育具有生态毒性作用.0.15~2.40 mg/L 土霉素暴露 21 d 后,小麦幼苗叶片中叶绿素含量下降,叶片及根组织中的可溶性蛋白、SOD 及 POD 的活性也不不同程度受到了抑制,这些生理指标的变化将影响小麦植株正常的生长发育.

参考文献:

- [1] Temes T A, Hirsch R. Occurrence and behavior of X-ray contrast media in sewage facilities and the aquatic environment [J]. Environ Sci & Technol, 2000, **34** (13): 2741-2748.
- [2] 周启星, 王美娥. 土壤生态毒理学研究进展与展望[J]. 生态毒理学报, 2006, **1** (1): 1-11.
- [3] Addison J B. Antibiotics in sediments and run-of water from feedlots [J]. Residu Reviews, 1984, **92**: 1-28.
- [4] Vieno N, Tuhkanen T, Kronberg L. Elimination of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Finland [J]. Water Res, 2007, **41**: 1001-1012.
- [5] Nakada N, Shinohara H, Murata A, *et al.* Removal of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine-disrupting chemicals (EDCs) during sand filtration and ozonation at a municipal sewage treatment plant [J]. Water Res, 2007, **41**: 4373-4382.
- [6] Kolpin D W, Furlong E T, Meyer M T, *et al.* Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in U. S. streams. 1999-2000: A National Reconnaissance [J]. Environ Sci & Technol, 2002, **36**: 1202-1211.
- [7] Díza-Cruz M S, López de Alda M J, Barceló D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2003, **22** (6): 340-351.
- [8] 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.
- [9] Arıkan O A, Rice C, Eodling E. Occurrence of antibiotics and hormones in a major agricultural watershed [J]. Desalination, 2008, **226**: 121-133.
- [10] 周启星, 罗义, 王美娥. 抗生素的环境残留、生态毒性及抗性基因污染[J]. 生态毒理学报, 2007, **2**(3): 243-251.
- [11] Wollenberger L, Halling-Sørensen B, Kusk K O. Acute anchronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia* [J]. Chemosphere, 2000, **40**: 723-730.
- [12] Ferreira C S G, Nunes B A, Henriques-Almeida J M de M, *et al.* Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica* [J]. Ecotox Environ Safe, 2007, **67**: 452-458.
- [13] Hegedüs A, Erdei S, Horváth G. Comparative studies of H_2O_2 detoxifying enzymes in green and greening barley seedling under cadmium stress [J]. Plant Sci, 2001, **160**: 1085-1093.
- [14] Polle A, Eiblmeier M, Sheppard L, *et al.* Responses of antioxidative enzymes to elevated CO_2 in leaves of beech (*Fagus sylvatica* L.) seedlings grown under a range of nutrient regimes [J].

Plant Cell Environ, 1997, **20**: 1317-1321.

[15] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, **72**: 248-254.

[16] 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.

[17] Araújo A S F, Monteiro R T R. Plant bioassays to assess toxicity of textile sludge compost[J]. Sci Agric Piracicaba Brazil, 2005, **62**: 286-290.

[18] Chen Y, Zhou Q X. Ecological toxicity of reactive X-3B red dye and cadmium acting on wheat (*Triticum aestivum*) [J]. J Environ Sci-China, 2002, **14**: 136-140.

[19] Carlsson C, Johansson A K, Alvan G, *et al*. Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients [J]. Sci Total Environ, 2006, **364**: 67-87.

[20] Fent K, Weston A A, Caminada D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals [J]. Aquat Toxicol, 2006, **76**: 122-159.

[21] Crane M, Watts C, Boucard T. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals [J]. Sci Total Environ, 2006, **367**: 23-41.

[22] Horváth G, Droppa M, Oravec  . Formation of the photosynthetic apparatus during greening of cadmium poisoned barley leaves [J]. Planta, 1996, **199**: 238-243.

[23] Liao X R, Chen J, Zhou Y F. Effect of salicylic acid on the isozymes of peroxidase and catalase in cells of wheat callus [J]. J Triticeae Crops, 2000, **20** (2): 66-68.