

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20120814001

李亚宁, 陈春, 李国东, 等. 磺胺甲恶唑暴露对小麦叶片蛋白和叶绿素含量及 SOD 酶活性的影响[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(4): 543-548

Li Y N, Chen C, Li Guo D, et al. Effects of Sulfamethoxazole (SMZ) on the Content of Chlorophyll (CHL) and Soluble Protein (SP), and the Superoxide Dismutases (SOD) Activity of Wheat, *Triticum aestivum*[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(4): 543-548(in Chinese)

磺胺甲恶唑对小麦叶片蛋白和叶绿素含量及 SOD 酶活性的影响

李亚宁¹, 陈春², 李国东^{1,*}, 刘庆余¹, 田莉莉³

1. 南开大学滨海学院环境科学与工程系, 天津 300270

2. 农业部环境保护科研监测所 农业部产地环境与农产品安全重点开放实验室/天津农业环境与农产品安全重点开放实验室, 天津 300191

3. 南京大学环境学院, 南京 211102

摘要: 为了探明磺胺甲恶唑(sulfamethoxazole, SMZ)的生态毒理效应, 通过实验室人工控制毒理实验, 研究了低浓度 SMZ 暴露对小麦体内超氧化物歧化酶(SOD)活性、叶绿素(CHL)和蛋白质(SP)含量的影响。结果显示: 染毒 7 d 后, 各浓度组小麦叶片的 SOD 活性均被显著诱导($P < 0.01$), 并且染毒浓度的升高增强了 SOD 的活性, 表明 SMZ 暴露胁迫下, 小麦可启动自身的保护机制以最大限度地减少自由基损伤。而小麦叶片的 CHL 含量, 随着 SMZ 染毒浓度的增加而逐渐降低。并且当 SMZ 暴露浓度较高时, 小麦叶片的 CHL 含量被显著抑制($P < 0.05$)。当 SMZ 染毒浓度为 $0.05 \sim 0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, SP 的含量被显著诱导($P < 0.01$); $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ SMZ 对 SP 的含量产生显著($P < 0.01$)抑制, 这说明 SMZ 染毒剂量将对蛋白质的合成产生严重影响。综上, SOD 的活性变化可反映出 SMZ 暴露对小麦的污染效应及其生态毒性作用, 但将其作为评估 SMZ 污染暴露的生物标志物有待于进一步深入研究。

关键词: 磺胺甲恶唑; 小麦; 生态毒理效应; 超氧化物歧化酶

文章编号: 1673-5897(2013)4-543-06 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of Sulfamethoxazole (SMZ) on the Content of Chlorophyll (CHL) and Soluble Protein (SP), and the Superoxide Dismutases (SOD) Activity of Wheat, *Triticum aestivum*

Li Yaning¹, Chen Chun², Li Guodong^{1,*}, Liu QingYu¹, Tian Lili³

1. Department of Environmental Science and Engineering, Nankai University Binhai College, Tianjin 300270, China

2. Key Laboratory of Production Environment and Agro-Product Safety of Ministry of Agriculture/Tianjin Key Laboratory of Agro-Environment and Agro-Product Safety, Agro-Environmental Protection Institute of Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China

3. College of Environmental Science and Engineering, Nanjing University, Nanjing 211102, China

Received 14 August 2012 accepted 31 October 2012

收稿日期: 2012-08-14 录用日期: 2012-10-31

基金项目: 南开大学滨海学院科研启动金项目

作者简介: 李亚宁(1981-), 女, 讲师, 研究方向为污染生态化学与水处理工程, E-mail: lyn1031@126.com;

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: gd_ljww@126.com

Abstract: To study the ecotoxicology of sulfamethoxazole (SMZ), the laboratory toxicity test was conducted to investigate the toxic effects of SMZ on the superoxide dismutases (SOD) activity and the contents of chlorophyll (CHL) and soluble protein (SP) of wheat (*Triticum aestivum*). The results showed that after the 7-day exposure, SOD activity in all the SMZ treatments was significantly ($P < 0.01$) higher than that in the control. And the SOD activity increased with the increase in SMZ concentration. It is indicated that wheat could prevent the reactive oxygen species (ROS) damage by scavenging free radicals. While, the CHL content decreased with the increase in SMZ concentration. The treatments with higher SMZ concentrations significantly ($P < 0.05$) decreased the CHL content in *Triticum aestivum*. The SP content in the treatments of 0.05–0.50 mg·L⁻¹ of SMZ was significantly ($P < 0.01$) higher than that in the control. In contrast, the SP content in the treatment of 1.00 mg·L⁻¹ of SMZ decreased significantly ($P < 0.01$). It is indicated that SMZ influenced the protein synthesis of wheat leaves. Therefore, the changes in the activity of SOD were able to reflect the toxic effects of pollutants on wheat. SOD as good biomarker for evaluating the ecotoxicological effect of SMZ exposure needs further study.

Keywords: sulfamethoxazole (SMZ); wheat (*Triticum aestivum*); ecotoxicological effect; superoxide dismutases (SOD)

抗生素是由微生物或高等动植物在生活过程中所产生的,它是具有抗病原体或其他活性的一类次级代谢产物,能干扰其他生活细胞的发育功能^[1]。近年来,抗生素作为全球应用最广泛的药物之一,在人类医用药物使用量中居第3位,占处方药总量的6%以上,兽药用量中更是占到70%以上^[2]。医用和兽用抗生素的大量使用已经造成了抗生素在环境中的广泛暴露。自20世纪90年代以来,已有不少关于抗生素在不同环境介质中暴露的研究报道^[3-6],许多学者通过对土壤、沉积物、地表水、大气,甚至地下水的环境监测,发现了抗生素在环境中的残留问题。并且抗生素大量使用所带来的环境污染和生态毒理效应也日益严重。可是,与国外研究相比,我国对抗生素在土壤生态环境中的毒理效应研究尚处于起步阶段。因此,有必要在这方面开展更多的研究工作。

磺胺类抗生素是应用较早的一类人工合成抗菌药物。由于其具有抗菌谱广、疗效强、方便安全等优点而被广泛使用^[7-8]。而磺胺甲恶唑是最常用的一种磺胺类药物,近年来其在各种环境介质中被检出的报道逐渐增多,但是通常检出的浓度水平很低,如在越南进行的一项研究显示,虾养殖场和周边水渠中磺胺甲恶唑的残留量分别为0.04和5.57 mg·L⁻¹^[9]。目前,选择小麦作为生态毒理学实验生物,探索低浓度磺胺类抗生素污染物对陆生生物生态毒性的研究尚未见报导,为此以典型磺胺类抗生素磺胺甲恶唑为供试污染物,重点研究其胁迫对小麦幼苗的叶绿素(CHL)、蛋白质(SP)含量以及抗氧化酶活性的影响,以期评估磺胺甲恶唑环境效应提供

更为全面的生态毒理学数据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 仪器与试剂

Hettich 32R 低温高速冷冻离心机(德国 Hettich 公司),TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司)。磺胺甲恶唑(sulfamethoxazole, SMZ,纯度98%)购自 sigma 公司,丙酮(色谱纯)购自 Acros 公司,其他酶反应试剂均为分析纯,购自 Acros 公司。

1.2 实验方法

于直径90 mm的培养皿中放入2层滤纸,并用去离子水润湿,此过程要避免气泡产生。加入新配制的SMZ受试液,挑选籽粒饱满的小麦种子置于基质表面,放置种子时,保持种子凹面朝下,且种子胚根末端和生长方向呈一直线,每个培养皿中放置10粒种子^[10]。染毒浓度分别为0.05、0.25、0.50、1.00 mg·L⁻¹,同时设空白及溶剂对照,每个浓度3次重复。将小麦置于光照恒温培养箱中(25±1)℃下培养,7 d后采样待分析测定。

1.3 CHL含量测定

按照 Hegedüs 等^[11]经典方法测定小麦 CHL 含量,单位为 mg·g⁻¹(以单位鲜质量计)。

1.4 酶液提取

染毒暴露实验结束后,称取0.5 g左右小麦叶片,以1:10的比例加入50 mmol·L⁻¹ pH 7.8 磷酸缓冲溶液5 mL。研磨匀浆后,4℃下15 000 r·min⁻¹离心15 min,上清液用于酶活性的测定。

1.5 SP含量测定

根据 Bradford 的考马斯亮兰法测定 SP 含

量^[12],用牛血清蛋白作标准曲线。

1.6 SOD 活性测定

采用氮蓝四唑光化还原法^[13]。以每单位时间内抑制光化还原 50%的氮蓝四唑为 1 个酶活力单位。

1.7 数据处理

实验结果采用 SPSS 统计软件进行分析,用平均数±标准偏差表示。采用 One-Way ANOVA 对组间的数据进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 表明差异显著, $P < 0.01$ 表明差异极显著, $P > 0.05$ 表明差异不显著。

2 结果(Results)

2.1 SMZ 对小麦叶片 SP 含量的影响

染毒 7 d 后小麦叶片 SP 含量变化如图 1 所示,当染毒浓度为 0.05、0.25 或 0.50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,SP 含量显著高于对照组,而当染毒浓度达到 1.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,SP 含量显著低于对照组;总体而言,随着 SMZ 暴露浓度的增加,SP 含量呈逐渐降低的趋势。

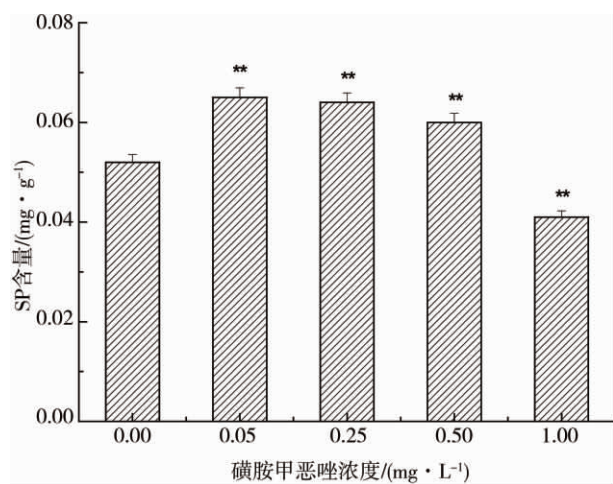


图 1 不同浓度的磺胺甲恶唑(SMZ)对小麦叶片蛋白质含量(SP)的影响

注: **表示 SMZ 各浓度处理组与对照组相比较存在极显著差异($P < 0.01$),误差线表示 SD ($n = 3$),下同。

Fig. 1 Effects of SMZ on the content of SP in wheat leaves

2.2 SMZ 对小麦叶片 SOD 活性的影响

SOD 是 $\text{O}_2\cdot$ 的主要清除者,并在防御有毒的活性氧自由基(AOS)积累方面起重要作用。其存在于各种细胞室中,并可催化由 2 个 $\text{O}_2\cdot$ 转化成 H_2O_2 和 O_2 的歧化反应^[14]。SOD 活性的诱导会引起 H_2O_2 含量的增加。由图 2 可以看出,经过 7 d 的暴露,在 0.00~1.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内小麦叶片的 SOD 活性

是随着 SMZ 浓度的增加呈现逐渐升高的趋势,并且与对照组相比,各处理组 SOD 活性均被显著诱导,染毒浓度为 1.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 SOD 的活性诱导达到最大。

结果说明,在 SMZ 胁迫下,小麦叶片中 SOD 活性的变化能够作为 SMZ 污染的生物标记物,并且小麦叶片 SOD 活性与 SMZ 浓度之间具有较好的剂量-效应关系。

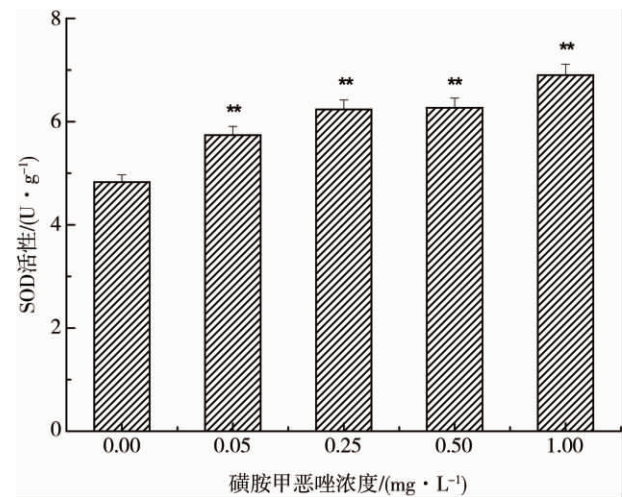


图 2 不同浓度的 SMZ 对小麦叶片 SOD 活性的影响

Fig. 2 Effects of SMZ on the activity of SOD in wheat leaves

2.3 SMZ 对小麦叶片 CHL 含量的影响

染毒 7 d 后,小麦叶片的 CHL 含量变化如图 3 所示,随着 SMZ 染毒浓度的增加,小麦叶片中 CHL 的含量逐渐降低。当 SMZ 浓度较高为 0.50 和 1.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,小麦叶片中 CHL 的含量显著低于对照组。而较低浓度(0.05 和 0.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的 SMZ 暴露对小麦叶片 CHL

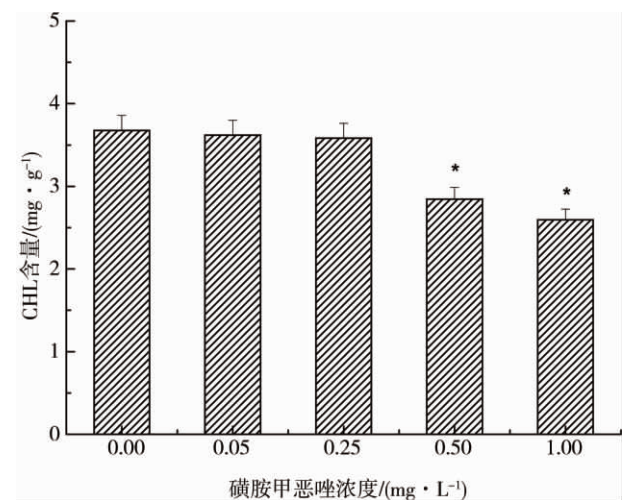


图 3 不同浓度的 SMZ 对小麦叶片 CHL 含量的影响

Fig. 3 Effects of SMZ on the content of CHL in wheat leaves

含量的影响并不显著。并且小麦叶片 CHL 含量与 SMZ 浓度之间的剂量-效应关系并不显著。

3 讨论 (Discussion)

本研究发现了 SMZ 对小麦在生化水平上的毒性效应。结果显示, CHL 和 SP 的含量都发生了显著变化。并且 SOD 的活性在 7 d 的暴露时间内被 SMZ 显著诱导。总之, 小麦叶片中的生化过程被 SMZ 污染显著影响了。目前有关磺胺类抗生素污染的研究已经成为环境学界研究的一个新热点, 金彩霞等^[15]的研究显示磺胺嘧啶钠胁迫对植物的根长和芽长都产生了明显的抑制, 并且小麦对磺胺嘧啶钠胁迫的反应较为敏感。

植物叶绿素是吸收太阳光能并进行光合作用的重要物质, 是绿色植物主要的光合色素, 其含量变化会很大程度地影响到植物的生长。因此, 植物的叶绿素含量是植物生理生化及生态调查中的一个重要测量参数。它不仅是表达植物生物量的一个指标, 也是检测植物健康程度及环境因子影响的关键指标^[16]。除草剂氯嘧磺隆与 Cd 联合效应的研究, 以及从氯嘧磺隆或重金属的单一效应的研究获得的结果皆证明 CHL 含量的降低可以作为小麦受到污染物胁迫后生长受到损伤的指示^[17-18]。这与本研究的结论是相符的。随着 SMZ 浓度的增加, CHL 含量显著降低。已有研究显示, 小麦叶片中下降的 CHL 含量要归因于 CHL 生物合成的抑制或“荧光复合物”合成的扰乱, 新形成的 CHL 即被光氧化降解了^[19]。这种现象在 Cu 胁迫下的燕麦叶片中也曾出现过^[20]。但是多重比较显示, 当 SMZ 浓度为 0.05、0.25 mg·L⁻¹ 时, 小麦叶片中叶绿素的含量与对照之间没有显著的差异 ($P > 0.05$)。这表明 SMZ 的存在虽然能够抑制 CHL 的积累, 但是, SMZ 与小麦叶片 CHL 含量之间的剂量-效应关系并不明显, 这与笔者在四溴双酚-A 的毒性效应研究中得出的结论是相似的^[21]。

当生物体受到外界胁迫时, 其体内蛋白质含量变化是其生长发育是否受到影响的直接指示。蛋白质经常参与到各种代谢活动中, 其含量是植物总体代谢的一个重要指标^[22-24]。已有研究表明, 当植物适应周围的生长环境而进入旺盛的生长期后, 其各种代谢活动随之旺盛, 同时可溶性蛋白的合成能力也会有所增强。但是在重金属、有机物以及寒、旱等的胁迫下, 植物体内的蛋白含量会有所降低^[19, 25]。这与本研究得出的结论一致, 在 SMZ 暴露胁迫下,

小麦叶片中的蛋白质合成会受到抑制。

抗氧化防御系统主要包括酶系统与一些小分子的抗氧化物。其作为活性氧的清道夫, 在参与活性氧的清除以及机体自身的保护性防御反应中发挥巨大作用, 生物体的抗氧化防御系统对污染物的胁迫相当敏感, 特别是 SOD 对多种污染物的反应均很敏感。SOD 是唯一以氧自由基(如 O₂⁻·、·OH)为底物的酶, 在活性氧的代谢中处于重要地位, 可终止由 O₂⁻·启动的一系列自由基连锁反应所造成的生物毒损伤^[26]。在本研究中 SMZ 的胁迫导致小麦体内产生了大量的活性氧自由基, 而小麦由于要清除这些活性氧, SOD 的活性被诱导。并且出现了染毒浓度越大, SOD 酶活性越高的现象。这说明在本实验的染毒浓度范围内, 活性氧自由基的产生量逐渐增多, 从而对小麦产生的氧化胁迫越来越严重, 而小麦能启动自身的保护机制以最大限度的减少伤害。

由本研究数据可见, CHL 含量虽受到抑制, 但是其与 SMZ 之间的剂量-效应关系并不明显。而 SP 含量先被诱导, 后达到最高染毒剂量时才被抑制。只有 SOD 酶活性在整个染毒时间段内, 均被各处理浓度显著诱导, 并且与 SMZ 浓度之间具有较好的剂量-效应关系。这表明小麦叶片 SOD 酶活性有作为磺胺甲恶唑污染的生物标记物的潜力。徐佳等^[27]研究发现新型多烯大环内酯抗生素暴露胁迫可显著诱导水稻叶片内 SOD 酶活的水平。这与本研究的结论相一致。但是, 也有研究得到的结论与本实验不同, 如罗义等^[28]在研究四溴双酚-A (TBBPA) 对鲫鱼的生态毒性时, 发现 TBBPA 胁迫抑制了 SOD 的活性, 这可能是由于实验生物物种、污染物种类或暴露浓度存在差异。因此, SOD 能否作为指示污染物胁迫的生物标志物, 以及抗生素磺胺甲恶唑对小麦的毒作用机制等问题还有待进一步研究。

本研究可以得到: 磺胺甲恶唑在 0.00~1.00 mg·L⁻¹ 暴露剂量下对小麦叶片 SOD 酶活均有显著影响, 1.00 mg·L⁻¹ 磺胺甲恶唑对蛋白含量产生显著抑制; 0.50 mg·L⁻¹ 以上磺胺甲恶唑显著抑制叶绿素合成。因此, 磺胺甲恶唑暴露能够导致氧化性损伤, 并在较高暴露浓度下影响光合作用和蛋白质合成。

通讯作者简介: 李国东(1970—), 男, 博士, 副教授, 主要研究方向为膜科学与技术, 发表学术论文 20 余篇。

参考文献:

[1] 王丽平. 典型外源抗生素在土壤中的转归及其与土

- 壤微生物多样性的相互作用和机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2008: 12-14
- Wang L P. The fate of typical exterior—source antibiotics in soils and their interaction with microbial diversity[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008: 12-14 (in Chinese)
- [2] Halling—Sørensen B, Nielsen S N, Lanzky P F, et al. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—A review [J]. *Chemosphere*, 1998, 36(2): 357-393
- [3] Batt A L, Kim S, Aga D S. Comparison of the occurrence of antibiotics in four full—scale wastewater treatment plants with varying designs and operations [J]. *Chemosphere*, 2007, 68(3): 428-435
- [4] Lindberg R H, Wennberg P, Johansson M I, et al. Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden [J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39(10): 3421-3429
- [5] Brown K D, Kulis J, Thomson B, et al. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico [J]. *Science of the Total Environment*, 2006, 366(2-3): 772-783
- [6] Chen H, Dong Y H, Wang H, et al. Residual characteristics of sulfanilamide in animal feces in Jiangsu Province [J]. *Journal of Agro—Environment Science*, 2008, 27(1): 385-389
- [7] 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): 1-4
- Kong W D, Zhu Y G. A review on ecotoxicology of veterinary pharmaceuticals to plants and soil microbes [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2007, 2(1): 1-4 (in Chinese)
- [8] 王丽平, 章明奎. 土霉素污染对土壤生物学性质影响的初步研究[J]. *农业环境科学学报*, 2009, 28(7): 1434-1438
- Wang L P, Zhang M K. Effects of oxytetracycline pollution on soil biological properties [J]. *Journal of Agro—Environment Science*, 2009, 28(7): 1434-1438 (in Chinese)
- [9] Le T X, Munekage Y. Residues of selected antibiotics in water and mud from shrimp ponds in mangrove areas in Viet Nam [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2004, 49(11-12): 922-929
- [10] 魏复盛. 水和废水监测分析方法[M]. 第四版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 740-743
- [11] Hegedüs A, Erdei S, Horvath G. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedling under cadmium stress [J]. *Plant Science*, 2001, 160(6): 1085-1093
- [12] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein—dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1-2): 248-254
- [13] 李合生, 孙群, 赵世杰, 等. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 167-169
- [14] Salin M L. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast [J]. *Physiologia Plantarum*, 1987, 72(3): 681-689
- [15] 金彩霞, 陈秋颖, 刘军军, 等. 两种常用兽药对作物发芽的生态毒性效应[J]. *环境科学学报*, 2009, 29(3): 619-625
- Jin C X, Chen Q Y, Liu J J, et al. The eco-toxicological effect of two common veterinary drugs on crop germination [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2009, 29(3): 619-625 (in Chinese)
- [16] Horváth G, Droppa M, Oravecz A, et al. Formation of the photosynthetic apparatus during greening of cadmium—poisoned barley leaves [J]. *Planta*, 1996, 199(2): 238-243
- [17] Wang M E, Zhou Q X. Single and joint toxicity of chlorimuron—ethyl, cadmium, and copper acting on wheat *Triticum aestivum* [J]. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 2005, 60(2): 169-175
- [18] Wang M E, Zhou Q X. Joint stress of chlorimuron—ethyl and cadmium on wheat *Triticum aestivum* at biochemical levels [J]. *Environmental Pollution*, 2006, 144(2): 572-580
- [19] 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]. *Environmental Pollution*, 2002, 116(1): 37-47
- [20] Luna C M, González C A, Trippi V S. Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves [J]. *Plant Cell Physiology*, 1994, 35(1): 11-15
- [21] Li Y N, Zhou Q X, Li F X, et al. Effects of tetrabromobisphenol A as an emerging pollutant on wheat (*Triticum aestivum*) at biochemical levels [J]. *Chemosphere*, 2008, 74(1): 119-124
- [22] Richardson B J, Lam P K S, Martin M. Emerging chemicals of concern: Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Asia, with particular refer-

- ence to Southern China [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2005, 50(9): 913-920
- [23] Arikan O A, Rice C, Eodling E. Occurrence of antibiotics and hormones in a major agricultural watershed [J]. *Desalination*, 2008, 226(1-3): 121-133
- [24] 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
- Zhou Q X, Luo Y, Wang M E. Environmental residues and ecotoxicity of antibiotics and their resistance gene pollution: A review [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2007, 2(3): 243-251 (in Chinese)
- [25] 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]. *Journal of Triticeae Crops*, 2000, 20(2): 66-68
- [26] 张副锁. 环境胁迫与植物营养[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1993: 79
- [27] 徐佳, 涂晓嵘, 卢慧, 等. 新型多烯大环内酯抗生素农抗 702 对水稻 5 种防御酶活性的影响[J]. *广东农业科学*, 2011, 38(21): 8-10
- Xu J, Tu X R, Lu H, et al. Activity of five defense enzymes in rice leaves after treatment with a new polyene macrolide antibiotics agricultural antibiotic 702 [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2011, 38(21): 8-10 (in Chinese)
- [28] 罗义, 王晓蓉. 氯酚类和四溴双酚-A 诱导鲫鱼活性氧产生及分子致毒机制的研究[D]. 南京: 南京大学, 2006: 144-154
- Luo Y, Wang X R. The study of reactive oxygen species generation and toxic mechanisms in freshwater fish *Carassius auratus* induced by chlorophenols and tetrabromobisphenol on the molecular level [D]. Nanjing: Nanjing University, 2006: 144-154 (in Chinese) ◆