

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20180427001

王桂祥, 张琼, 匡少平, 等. 环境浓度下的混合抗生素对普通小球藻的联合毒性[J]. 生态毒理学报, 2019, 14(2): 122-128

Wang G X, Zhang Q, Kuang S P, et al. The joint toxicity of mixed antibiotics on *Chlorella vulgaris* at normal environmental concentration [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2019, 14(2): 122-128 (in Chinese)

环境浓度下的混合抗生素对普通小球藻的联合毒性

王桂祥¹, 张琼², 匡少平^{1,*}, 李甲亮^{2,#}

1. 青岛科技大学 环境与安全工程学院, 青岛 266042

2. 滨州学院 生物与环境工程学院, 滨州 256603

收稿日期: 2018-04-27 录用日期: 2018-06-20

摘要: 近年来, 抗生素已成为一类备受关注的新型环境污染物。为了探究这类化合物对各类生物的毒性效应, 本实验以红霉素(ERY)、恩诺沙星(ENR)、磺胺甲恶唑(SMX)这3种常见的抗生素作为代表, 研究其单独作用和两两联合作用对普通小球藻的生长、蛋白合成及丙二醛(MDA)含量的影响。结果表明: ERY、ENR和SMX对小球藻的96 h-EC₅₀分别为85.7、124.5和1 672.7 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 且3种抗生素两两联合时对小球的毒性作用类型均为协同作用。此外, 当暴露于环境浓度的抗生素时, 无论是单独加药还是联合加药, 除ERY处理组的小球藻的蛋白合成被轻微抑制外, 其他各处理组的蛋白含量与对照组相比, 均展现出低剂量刺激效应。对于MDA产量, ENR处理组的MDA含量与对照组无显著差异, 其他各处理组均高于对照组; 故环境浓度下的ENR并没有对小球藻造成明显的氧化损伤, 而其他2种抗生素则对小球藻造成了氧化损伤。该研究为低浓度混合抗生素在淡水环境中联合暴露的生态风险评估提供了科学依据。

关键词: 红霉素; 恩诺沙星; 磺胺甲恶唑; 普通小球藻; 急性毒性; 联合毒性

文章编号: 1673-5897(2019)2-122-07 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

The Joint Toxicity of Mixed Antibiotics on *Chlorella vulgaris* at Normal Environmental Concentration

Wang Guixiang¹, Zhang Qiong², Kuang Shaoping^{1,*}, Li Jialiang^{2,#}

1. College of Environment and Safety Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China

2. College of Biological and Environmental Engineering, Binzhou University, Binzhou 256603, China

Received 27 April 2018 accepted 20 June 2018

Abstract: Antibiotics have been widely concerned as a type of emerging environmental pollutants in recent years. In this work, three common antibiotics, erythromycin (ERY), enrofloxacin (ENR), and sulfamethoxazole (SMX), were selected as representatives to explore the toxic effects of antibiotics on various organisms. The growth situation, contents of protein, and malondialdehyde (MDA) of *Chlorella vulgaris* exposed to these three antibiotics were investigated, alone and in pairs systems. The obtained results showed that the 96 h-EC₅₀ of ERY, ENR, and SMX to *C. vulgaris* was 85.7, 124.5, and 1 672.7 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. Moreover, when *C. vulgaris* was exposed to the antibiotics combined in pairs, the joint toxicity of the mixtures showed synergistic effect. In addition, the protein syn-

基金项目: 国家自然科学基金(No.41673112)

作者简介: 王桂祥(1993-), 男, 硕士研究生, 研究方向为生态毒理学, E-mail: 1358688703@qq.com

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

共同通讯作者 (Co-corresponding author), E-mail: lijialiangcn@163.com

thesis of *C. vulgaris* exposed at environmental concentration was slightly inhibited in the ERY-treatment while the other treatments exhibited low-dose stimulatory effects. The MDA content in the ENR-treatment was not significantly different from that in the control, but those in other treatments were all higher than that in the control. From the result of MDA determination, we can make the conclusion that ENR did not induce significant oxidative damage to *C. vulgaris* at the environmental concentration, while the other two antibiotics induced oxidative damage to *C. vulgaris*. The results provide scientific basis for the ecological risk assessment of combined exposure of low-level mixed antibiotics in freshwater environments.

Keywords: erythromycin; enrofloxacin; sulfamethoxazole; *Chlorella vulgaris*; acute toxicity; joint effect

抗生素作为药品及个人护理品(PPCPs)的重要一类,正在全球范围内广泛生产和大量使用,2013年中国抗生素的使用量高达16.2万t^[1]。然而,抗生素被人畜摄入后仅有少部分被吸收利用,70%~80%以原药或代谢产物的形式排出体外,进入各种环境介质^[2]。章强等^[3]调研了中国地表水抗生素的污染情况,发现含量最多的是氟喹诺酮类和磺胺类抗生素,其含量在 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}\sim\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的水平。在一些特殊地区如台湾新店溪和大汉溪中,红霉素的残留量可达 $75.5\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[4]。大量研究表明,环境中低浓度的抗生素即可对人体健康与生态环境造成严重影响^[5-7]。目前抗生素已成为一类不可忽视的新型环境污染物,其造成的环境危害也越来越突出,故它们已经成为近年来环境领域的研究热点。

普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)是一种常见的淡水绿藻,由于其具有生长周期短,繁殖速度快,对污染物敏感等特点,常被用来进行毒性试验。淦志兵等^[8]评价了原壳小球藻对6种抗生素单独投加时的敏感性,发现原壳小球藻对卡那霉素、链霉素、壮观霉素、潮霉素和遗传霉素G418都表现出较强的敏感性。然而抗生素在环境中呈“混合-持久-低剂量”的暴露特征^[9],因此仅开展单一抗生素对环境的影响并不能反映其真实的环境风险。但是,目前关于低浓度二元混合抗生素对各类生物的毒性效应的研究报道较少,因此亟需开展混合抗生素对各类生物特别是藻类这样的敏感水生生物的联合毒性研究。

本文研究了红霉素(ERY)、恩诺沙星(ENR)和磺胺甲恶唑(SMX)3种使用广泛的抗生素对普通小球藻的单一毒性效应,并进行两两联合试验,评价了它们对小球藻的联合毒性效应。更进一步,通过单独或者等毒性当量的联合加入上述3种抗生素,测定了小球藻的蛋白合成和丙二醛(MDA)含量,以期探讨这几种抗生素对普通小球藻可能的致毒机理。本实验为低浓度混合抗生素在淡水环境中联合暴露的

生态风险性评估提供了科学依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料

实验所用普通小球藻(*C. vulgaris*,藻种编号:FACHB-1227)购自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库(湖北,武汉)。实验所用培养基为BG11培养基,配方由藻种库提供,培养基经 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌20min后备用。红霉素、恩诺沙星以及磺胺甲恶唑(纯度均高于99%)均购自Dr. Ehrenstorfer公司(奥格斯堡,德国),其他所有试剂均为分析纯。主要仪器为分光光度计(UV2000,上海尤尼科)和Tecan多功能酶标仪(Tecan infinite 200,瑞士)。

1.2 实验方法

1.2.1 藻细胞的接种与培养

新购的藻种经2~3次反复接种使其适应新环境,具体操作为:在无菌环境下将藻种摇匀后转接到50mL的三角瓶中,并用四层灭菌纱布封住瓶口,以免受到外界污染且能保持瓶内空气流通。然后放置在智能光照培养箱(宁波莱福科技有限公司,中国)中培养1~2d,让其适应新的培养环境。培养箱温度 $(26\pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$,光照强度2000lx,光暗比为14h:10h。接着开始扩大培养,在无菌操作下取10~15mL藻种转接到20~30mL新鲜BG11培养基中;待*C. vulgaris*生物量明显增多时,按藻液:培养基为1:8的比例进行再次转接。每次实验的初始接种量约为 10^6 个细胞/mL藻液,连续培养3~4d后,*C. vulgaris*即进入对数生长期,采用此时的培养液进行毒理学实验。培养期间每天定时摇瓶3~4次,并随机调换位置,使其始终保持光照条件均等。

1.2.2 生物量的测定

将藻液用双蒸水稀释,得到不同生物量的一系列藻液,利用血细胞计数法在高倍显微镜下数出每组藻液的细胞个数,并在680nm下利用分光光度计测出相应稀释组的藻液的吸光度,由细胞个数(C.D.)

对吸光度 (OD_{680}) 作图, 得到一条标准曲线 ($C.D. = 87.586 \times OD_{680} + 4.3808, R^2 = 0.9969$)。此后根据测得的样品吸光度, 即可计算样品的细胞密度。

1.2.3 抗生素对 *C. vulgaris* 的单独毒性实验

将3种抗生素标准品分别用无水乙醇配制成高浓度的标准溶液, 实验时将标准溶液逐级稀释, 得到一系列所需浓度的抗生素实验液。实验采用一次性加药, 按等对数间距设置7个实验浓度(各加药组的助溶剂乙醇加入量均小于5%)和1个助溶剂对照组(加5%无水乙醇), 浓度分别为0、 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} 、0.05、0.1、1、 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 每个处理设置4个平行, 连续培养96 h, 分别测定初始与加药96 h后680 nm下的藻液吸光度。

1.2.4 混合抗生素对 *C. vulgaris* 的联合毒性实验

联合毒性实验采用等毒性加药的方式, 根据前期单独毒性实验研究中每种抗生素对 *C. vulgaris* 的 EC_{50} 浓度值来确定2种抗生素联合作用时的具体浓度。其他实验条件与单独加药实验条件一致。分别采用毒性单位法(TU)^[10-11]、相加指数法(AI)^[12]以及混合毒性指数法(MTI)^[13]来评价2种抗生素的联合毒性, 具体评价方法见表1。

1.2.5 蛋白含量和MDA含量的测定

根据每种抗生素单独以及两两联合时的 EC_{50} 值, 设定ERY、ENR、SMX、ERY-ENR、ERY-SMX和ENR-SMX处理组的浓度分别为0.86、1.25、16.73、0.40、7.58和1.41 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 使每个处理组的毒性相等。收集加药培养96 h后的藻液, 每个样品取20

mL, 在4℃下6000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 冷冻离心10 min, 弃掉上清液, 余下的 *C. vulgaris* 沉淀加蒸馏水反复冻融3~4次, 再在4℃下3500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 冷冻离心10 min, 取上清液, 分别采用BCA法和TBA法测定蛋白和MDA含量, 具体方法均参照南京建成生物工程研究所的试剂盒说明书。

1.3 数据处理

数据的统计分析利用SPSS 20.0软件(IBM公司, 美国), 具体来说采用了单因素方差分析法(One-Way ANOVA), 并且用LSD法比较组间的显著性差异。 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 表示存在显著性差异。各类抗生素的 EC_{50} 浓度是利用浓度的对数为横坐标, 抑制率为纵坐标作图, 并采用Origin 9.1软件(OriginLab公司, 美国)的DoseResp模型进行拟合得出的。

2 结果(Results)

2.1 抗生素对 *C. vulgaris* 生长的影响

采用前述方法对各抗生素处理组的毒性实验数据进行拟合, 拟合结果见表2。本次实验测得ERY、ENR与SMX的96 h- EC_{50} 分别为85.7、124.5和1672.7 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。而且ERY-ENR、ERY-SMX和ENR-SMX两两联合时的96 h- EC_{50} 分别为39.9、757.5和141.3 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 混合抗生素对 *C. vulgaris* 的联合毒性评价

采用等毒性加药的方式, 3种抗生素两两联合进行了急性毒性实验, 并采用毒性单位法(TU)、相加指数法(AI)以及混合毒性指数法(MTI)来评价其联合

表1 3种联合毒性评价方法
Table 1 Three methods of joint toxicity assessment

方法类型 Methods	公式 Formula	作用类型及评价标准 Type and evaluation criteria
毒性单位法(TU) Toxicity unit (TU)	$TU_i = C_i / EC_{50,i}$ $TU = \sum TU_i$ $TU_0 = TU / TU_{i,max}$	TU=1 相加 Addition; TU>TU ₀ 拮抗 Antagonism TU<1 协同 Synergism; TU=TU ₀ 独立 Independence TU ₀ >TU>1 部分相加 Partly addition
相加指数(AI) Additive index (AI)	$TU \leq 1.0, AI = 1 / TU - 1$ $TU \geq 1.0, AI = TU - 1 + 1$	AI=0 相加 Addition; AI<0 拮抗 Antagonism AI>0 协同 Synergism
混合毒性指数法(MTI) Mixtures toxicity index (MTI)	$MTI = 1 - \frac{\log TU}{\log TU_0}$	MTI<0 拮抗 Antagonism; MTI=0 独立 Independence MTI>1 协同 Synergism; MTI=1 相加 Addition 0<MTI<1 部分相加 Partly addition

注: TU_i 表示化合物 i 的毒性单位; $TU_{i,max}$ 表示最大毒性单位; TU_0 表示毒性单位总和与最大毒性单位的比值; C_i 表示化合物 i 的浓度; $EC_{50,i}$ 表示化合物 i 的半数效应浓度。

Note: TU_i stands for the toxic unit of compound i ; $TU_{i,max}$ stands for the maximum toxic unit; C_i stands for the concentration of compound i ; TU_0 stands for the ratio of the total toxic unit to the maximum toxic unit; $EC_{50,i}$ stands for the median effect concentration of compound i .

作用类型,相关计算结果见表 3。由计算结果可以看出,3 种抗生素两两联合下的联合毒性作用类型均为协同作用。

2.3 抗生素对 *C. vulgaris* 蛋白质合成的影响

各处理组蛋白合成的结果如图 1~图 3 所示。除 ERY 对 *C. vulgaris* 蛋白合成表现出抑制作用外,其他各组均有不同程度的促进作用,其中,SMX、ERY-SMX 和 ENR-SMX 与助溶剂对照组(CK)之间存在显著性差异($P<0.01$)。ERY 与 ENR 联合对 *C. vulgaris* 蛋白合成的影响如图 1 所示,单因素方差分析(One-Way ANOVA)结果表明,ERY 与 ENR 联合作用时的蛋白含量与其单独作用时没有显著性差异($P=0.089$)(图 1),而与 SMX 联合时存在显著性差异(图 2);ENR 与 SMX 联合时的蛋白含量均显著高于 CK、ENR 和 SMX 处理组(图 3)。

2.4 抗生素对 *C. vulgaris* MDA 含量的影响

3 种抗生素对 *C. vulgaris* MDA 合成影响的结果显示:仅 ENR 组的 MDA 含量低于 CK,其他各组则均高于 CK 组。这说明在低浓度($1.25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)时,ENR 并没有对 *C. vulgaris* 造成明显的氧化损伤,而其他 2 种抗生素则对 *C. vulgaris* 造成了氧化损伤。

ERY 与 ENR 联合时的 MDA 水平显著低于其单独处理组($P=0.001$)(图 1),而与 SMX 联合时有显著升高的趋势($P=0.022$);ENR 与 SMX 联合时的 MDA 含量显著高于 ENR 处理组($P=0.007$),但显著低于 SMX 处理组的 MDA 含量($P=0.039$)(图 3)。

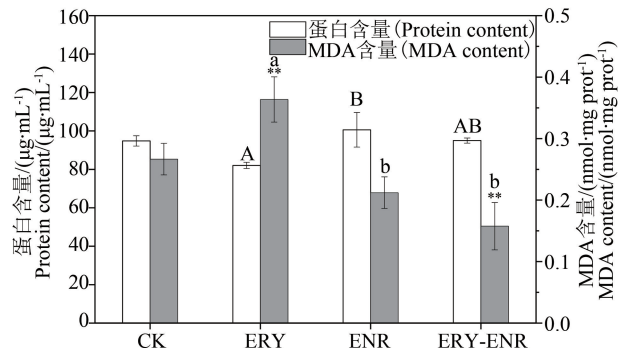


图 1 ERY 和 ENR 联合对 *C. vulgaris* 蛋白与丙二醛(MDA)含量的影响

注:不同字母表示处理组间存在显著性差异($P<0.05$)。

Fig. 1 Joint effects of ERY and ENR on protein and malondialdehyde (MDA) content of *C. vulgaris*

Note: Different letters show statistically significant differences between treatment groups ($P<0.05$).

表 2 不同抗生素对 *C. vulgaris* 的急性毒性测试结果

Table 2 The results of acute toxic tests of different antibiotics on *C. vulgaris*

处理组 Treatment groups	拟合公式 Fitting formula	96 h-EC ₅₀ / ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	R ²
ERY	$y=9.33+36.88/(1+10^{-0.78(1.07+x)})$	85.7	0.987
ENR	$y=12.46+23.92/(1+10^{-0.6(0.9+x)})$	124.5	0.997
SMX	$y=14.70+55.70/(1+10^{0.72(0.22-x)})$	1 672.7	0.981
ERY-ENR	$y=12.68+104.69/(1+10^{-1.05(1.4+x)})$	39.9	0.998
ERY-SMX	$y=11.61+80.02/(1+10^{-0.46(0.12+x)})$	757.5	0.990
ENR-SMX	$y=-7.21+84.87/(1+10^{-0.3(0.85+x)})$	141.3	0.989

注:ERY、ENR、SMX 分别表示红霉素、恩诺沙星、磺胺甲恶唑;ERY-ENR、ERY-SMX、ENR-SMX 分别表示红霉素和恩诺沙星、红霉素和磺胺甲恶唑、恩诺沙星和磺胺甲恶唑联合。

Note: ERY, ENR, SMX stand for erythromycin, enrofloxacin, sulfamethoxazole, respectively; ERY-ENR, ERY-SMX, ENR-SMX stand for the combinations of erythromycin and enrofloxacin, erythromycin and sulfamethoxazole, enrofloxacin and sulfamethoxazole, respectively.

表 3 3 种抗生素两两联合时的联合毒性评价结果

Table 3 Joint toxicity evaluation results of three antibiotics combined in pairs

处理组 Treatment groups	毒性单位法(TU)				相加指数法(AI)	混合毒性指数法(MTI)	联合类型 Type
	TU	TU-1	TU ₀	TU-TU ₀			
ERY-ENR	0.38	-0.62	1.97	-1.59	1.64	2.43	协同 Synergism
ERY-SMX	0.85	-0.15	1.98	-1.16	0.17	1.23	协同 Synergism
ENR-SMX	0.16	-0.84	1.99	-1.83	5.34	3.68	协同 Synergism

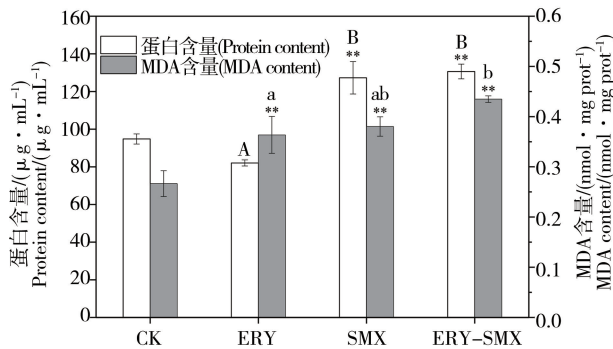


图2 ERY和SMX联合对*C. vulgaris*蛋白与MDA含量的影响

注:不同字母表示处理组间存在显著性差异($P < 0.05$)。

Fig. 2 Joint effects of ERY and SMX on protein and MDA content of *C. vulgaris*

Note: Different letters show statistically significant differences between treatment groups ($P < 0.05$).

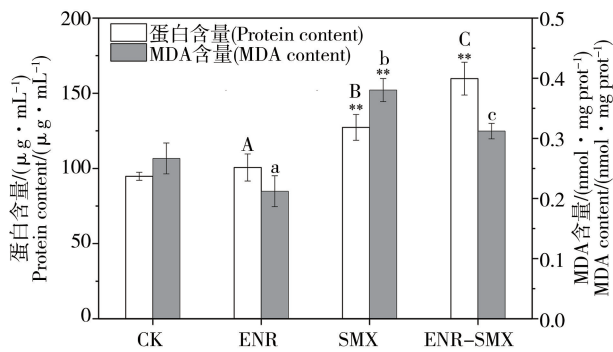


图3 ENR和SMX联合对*C. vulgaris*蛋白与MDA含量的影响

注:不同字母表示处理组间存在显著性差异($P < 0.05$)。

Fig. 3 Joint effects of ENR and SMX on protein and MDA content of *C. vulgaris*

Note: Different letters show statistically significant differences between treatment groups ($P < 0.05$).

3 讨论 (Discussion)

本实验藻类生长抑制数据的拟合采用 Origin 9.1 软件中 Fit Sigmoidal 拟合的 DoseResp 模型, 相关研究表明^[14-15], 相比于 WeiBull 以及 Logistic 模型, 此模型更适用于拟合藻类在复合污染下的生长规律。从 3 种抗生素对 *C. vulgaris* 96 h 生长抑制实验拟合结果(表 2)可以看出, ERY 对 *C. vulgaris* 的 EC_{50} 值最小, 表明其对 *C. vulgaris* 的生长抑制最为明显, ENR 次之, SMX 抑制作用最小。这表明 3 种抗生素对 *C. vulgaris* 的毒性顺序为 ERY > ENR > SMX, 产生这种毒性差异的原因可能是因为不同抗

生素对 *C. vulgaris* 的毒性机制不同。杨弯弯等^[16]研究了 ENR 和 ERY 对铜绿微囊藻生长的影响, 发现 ERY 对铜绿微囊藻的生长抑制作用更大, 这与本实验的结果一致。已有研究报道显示, 链霉素^[17]、纳米银(AgNPs)^[18]和氧化乐果^[19]对 *C. vulgaris* 的 96 h- EC_{50} 分别为 20.08、1.11 和 4.88 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 而该研究中 3 种抗生素对 *C. vulgaris* 的 96 h- EC_{50} 在 0.086 ~ 1.67 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 表明 *C. vulgaris* 对这 3 种抗生素均十分敏感。

目前研究二元混合物的联合作用普遍采用的划分方法是: 相加作用(addition)、协同作用(synergism)、拮抗作用(antagonism)和独立作用(independence)^[20]。近年来在渤海湾^[21]以及辽河流域^[22]等水域中都同时检测出了磺胺类、氟喹诺酮类、大环内酯类等多种类型的抗生素。因此在真实环境中抗生素通常以混合形式存在, 而混合抗生素的联合毒性作用往往不是简单的相加作用。Yang 等^[23]研究了 12 种不同类型抗生素对羊角月牙藻(*Pseudokirchneriella subcapitata*)的联合毒性, 发现不同类型抗生素联合得到了不同的联合作用结果。如磺胺类抗生素之间存在相加作用, 而氟喹诺酮类之间、大环内酯类之间以及四环素类之间表现为协同作用。本研究结果显示 ERY(大环内酯类)、ENR(氟喹诺酮类)以及 SMX(磺胺类)两两联合的作用类型均为协同作用(表 3), 且 3 种评价方法的结果一致。这表明不仅同类抗生素之间联合能够产生协同作用, 不同种类的抗生素联合也可能产生协同作用, 这意味着在现实环境中各类抗生素混合之后其毒性可能会变大, 将会对生态环境产生更严重的影响。也有研究发现十六烷基三甲基氯化铵(CTAC)与多环芳烃荧蒽(Flu)对小球藻的联合毒性随 Flu 浓度的升高由协同效应转为拮抗效应^[24], 本文仅研究了 2 种抗生素等毒性加药的联合毒性, 因此不同毒性配比的抗生素对 *C. vulgaris* 的联合毒性有待进一步探究。

研究表明, 大多数抗生素都表现出“低促高抑”的 Hormesis 效应^[25], 如杨弯弯等^[16]研究发现低浓度(20 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)的 ENR 和 ERY 能够对铜绿微囊藻的蛋白合成产生促进作用, 而高于 20 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时表现出抑制作用。从不同组蛋白含量的结果可以看出, 仅 ERY 组的蛋白受到了抑制, 而其他各组与对照组相比均有不同程度的增加。根据过度补偿理论^[26], 藻类在受到抗生素的抑制作用之后会产生一个补偿过程, 当这种补偿超过低浓度(环境浓度)抗生素的抑

制作用时,就会产生促进作用。而 ERY 组表现出对 *C. vulgaris* 蛋白的抑制作用可能与其作用机理相关,ERY 能够与核糖体 50S 亚基结合,抑制肽酰转移酶活性,妨碍碳链延长,从而抑制细胞蛋白质的合成^[27],并且 ERY 对 *C. vulgaris* 蛋白的抑制作用可能已经超出了上述补偿过程,从而打破了 *C. vulgaris* 的这种调节机制,这表明环境浓度的 ERY 具有更大的生态风险。从图 1 可以看出,ERY 与 ENR 联合时的蛋白含量处在两者单独作用之间,且与对照组相比有小幅的增加,这表明两者联合时 ENR 对 *C. vulgaris* 的促进作用起到了主导作用。而 ENR 与 SMX 联合时的蛋白含量均显著高于两者单独作用组,这种现象与表观的协同作用相一致,表明两者联合时对 *C. vulgaris* 的影响更严重。

MDA 是生物体内脂质过氧化的重要产物,通常用于反映生物体在受到外界刺激后的细胞氧化损伤程度^[18,28]。在本研究中 ERY 与 SMX 联合时的 MDA 含量显著增加(图 2),这与表观的协同作用相一致,表明两者联合可能会对藻细胞产生更强的氧化损伤;而 ERY-ENR 和 ENR-SMX 处理组的结果与表观的协同作用不一致,这可能是由于低浓度的 ENR 并没有对 *C. vulgaris* 造成严重的氧化损伤,从而导致它与其他抗生素联合时的 MDA 含量与生物量的结果不一致的现象。另有研究表明低浓度(0.01 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的甲砒霉素(TPA)对水华微囊藻的 MDA 含量产生抑制^[29],这与本研究中 ENR 组的结果相似,出现这种现象的原因可能是由于低浓度的 ENR 并不是以氧化损伤为主要途径来抑制藻细胞的生长,相关研究表明 ENR 的作用机理主要是抑制 DNA 旋转酶的活性,而该酶在原核生物 DNA 转录和复制的过程中起到重要作用^[30]。另外,2 种抗生素联合可能会产生一系列复杂的交互作用,产物之间也可能存在一系列化学反应,这些复杂的作用机理需开展进一步的研究进行探究^[9,27]。

通讯作者简介: 匡少平(1966—),男,博士,教授,主要研究方向为环境化学与污染控制,发表学术论文 110 余篇。

共同通讯作者简介: 李甲亮(1972—),男,博士,教授,主要从事环境污染控制与资源化研究。

参考文献 (References):

- [1] Zhang Q Q, Ying G G, Pan C G, et al. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river ba-

sins of China: Source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(11): 6772-6782

- [2] Stoichev T, Baptista M S, Basto M C P, et al. Effects of minocycline and its degradation products on the growth of *Microcystis aeruginosa* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2011, 74(3): 219-224

- [3] 章强, 辛琦, 朱静敏, 等. 中国主要水域抗生素污染现状及其生态环境效应研究进展[J]. *环境化学*, 2014, 33(7): 1075-1083

Zhang Q, Xin Q, Zhu J M, et al. The antibiotic contaminations in the main water bodies in China and the associated environmental and human health impacts [J]. *Environmental Chemistry*, 2014, 33(7): 1075-1083 (in Chinese)

- [4] Lin A Y C, Tsai Y T. Occurrence of pharmaceuticals in Taiwan's surface waters: Impact of waste streams from hospitals and pharmaceutical production facilities [J]. *Science of the Total Environment*, 2009, 407(12): 3793-3802

- [5] 姚林林. 水环境中抗生素的分布、归趋与危害研究[D]. 武汉: 中国地质大学, 2017: 9-11

Yao L L. The occurrence, fate and hazards of antibiotics in the aquatic environment [D]. Wuhan: China University of Geosciences, 2017: 9-11 (in Chinese)

- [6] Ebert I, Bachmann J, Kühnen U, et al. Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin to photoautotrophic aquatic organisms [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2011, 30(12): 2786-2792

- [7] Wagil M, Kumirska J, Stolte S, et al. Development of sensitive and reliable LC-MS/MS methods for the determination of three fluoroquinolones in water and fish tissue samples and preliminary environmental risk assessment of their presence in two rivers in northern Poland [J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 493: 1006-1013

- [8] 涂志兵, 李美芽, 施春雷, 等. 原壳小球藻对 6 种常用抗生素的敏感性评价[J]. *中国食品学报*, 2012, 12(7): 171-177

Gan Z B, Li M Y, Shi C L, et al. Sensitivity evaluation of *Chlorella protothecoides* to six common antibiotics [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2012, 12(7): 171-177 (in Chinese)

- [9] 方淑霞, 王大力, 朱丽华, 等. 抗生素对微生物的联合与低剂量毒性研究进展[J]. *生态毒理学报*, 2015, 10(2): 69-75

Fang S X, Wang D L, Zhu L H, et al. Progress in researches on toxicity of antibiotics in low dose and mixture exposure to microorganisms [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2015, 10(2): 69-75 (in Chinese)

- [10] Sprague J, Ramsay B A. Lethal levels of mixed copper-zinc solutions for juvenile salmon [J]. *Journal of the Fish-*

- eries Board of Canada, 1965, 22(2): 425-432
- [11] 王焕校. 污染生态学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 50-55
Wang H X. Pollution Ecology [M]. Beijing: China Higher Education Press, 2000: 50-55 (in Chinese)
- [12] Marking L L. Method for assessing additive toxicity of chemical mixtures [J]. Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation, 1977, 634: 99-108
- [13] Könemann H. Fish toxicity tests with mixtures of more than two chemicals: A proposal for a quantitative approach and experimental results [J]. Toxicology, 1981, 19 (3): 229-238
- [14] 鲁蕾, 张维昊. 两种淡水藻对金霉素与铜复合污染的响应[C]. 成都: 2014 中国环境科学学会学术年会(第四章), 2014
- [15] 徐冬梅, 王艳花, 饶桂维. 四环素类抗生素对淡水绿藻的毒性作用[J]. 环境科学, 2013, 34(9): 3386-3390
Xu D M, Wang Y H, Rao G W. Cellular response of freshwater green algae to the toxicity of tetracycline antibiotics [J]. Environmental Science, 2013, 34 (9): 3386-3390 (in Chinese)
- [16] 杨弯弯, 武氏秋贤, 吴亦潇, 等. 恩诺沙星和硫氰酸红霉素对铜绿微囊藻的毒性研究[J]. 中国环境科学, 2013, 33(10): 1829-1834
Yang W W, Hien Vu T T, Wu Y X, et al. Toxicity of enrofloxacin and erythromycin thiocyanate on *Microcystis aeruginosa* [J]. China Environmental Science, 2013, 33 (10): 1829-1834 (in Chinese)
- [17] Qian H, Li J, Pan X, et al. Effects of streptomycin on growth of algae *Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa* [J]. Environmental Toxicology, 2012, 27 (4): 229-237
- [18] 于朋飞, 刘晖, 牟之健, 等. 纳米银和银离子对 2 种微藻的急性毒性效应[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(6): 188-198
Yu P F, Liu H, Mou Z J, et al. Acute toxic effects of silver nanoparticles and silver ion on two microalgae [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(6): 188-198 (in Chinese)
- [19] 宋志慧, 刘冰. 氧化乐果对小球藻的毒性研究[J]. 生态毒理学报, 2014, 9(3): 483-489
Song Z H, Liu B. Toxic effects of omethoate on *Chlorella vulgaris* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2014, 9(3): 483-489 (in Chinese)
- [20] Plackett R L, Hewlett P S. Quantal responses to mixtures of poisons [J]. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological), 1952, 14(2): 141-163
- [21] Zou S, Xu W, Zhang R, et al. Occurrence and distribution of antibiotics in coastal water of the Bohai Bay, China: Impacts of river discharge and aquaculture activities [J]. Environmental Pollution, 2011, 159(10): 2913-2920
- [22] 张晓娇, 柏杨巍, 张远, 等. 辽河流域地表水中典型抗生素污染特征及生态风险评估[J]. 环境科学, 2017, 38 (11): 4553-4561
Zhang X J, Bai Y W, Zhang Y, et al. Occurrence, distribution, and ecological risk of antibiotics in surface water in the Liaohe River Basin, China [J]. Environmental Science, 2017, 38(11): 4553-4561 (in Chinese)
- [23] Yang L H, Ying G G, Su H C, et al. Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2008, 27 (5): 1201-1208
- [24] 杨良, 葛飞, 喻方琴, 等. 十六烷基三甲基氯化铵与蒽蒽对小球藻的联合毒性及其作用机制[J]. 中国环境科学, 2011, 31(1): 150-155
Yang L, Ge F, Yu F Q, et al. Joint toxicity and its mechanism of cetyltrimethyl ammonium chloride and fluoranthene on *Chlorella vulgaris* [J]. China Environmental Science, 2011, 31(1): 150-155 (in Chinese)
- [25] Deng Z, Lin Z, Zou X, et al. Model of hormesis and its toxicity mechanism based on quorum sensing: A case study on the toxicity of sulfonamides to *Photobacterium phosphoreum* [J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(14): 7746-7754
- [26] Calabrese E J. Overcompensation stimulation: A mechanism for hormetic effects [J]. Critical Reviews in Toxicology, 2001, 31(4-5): 425-470
- [27] 刘滨扬. 红霉素、环丙沙星和磺胺甲噁唑对羊角月牙藻的毒性效应及其作用机理[D]. 广州: 暨南大学, 2011: 12-13
Liu B Y. Toxic effects and its mechanism of ciprofloxacin, erythromycin and sulfamethoxazole to *Selenastrum capricornutum* [D]. Guangzhou: Jinan University, 2011: 12-13 (in Chinese)
- [28] Yang W, Tang Z, Zhou F, et al. Toxicity studies of tetracycline on *Microcystis aeruginosa* and *Selenastrum capricornutum* [J]. Environmental Toxicology & Pharmacology, 2013, 35(2): 320-324
- [29] 王美仙. 淡水微藻对水体颗粒物与抗生素及其复合污染胁迫的响应研究[D]. 福州: 华侨大学, 2017: 26-27
Wang M X. Study on the response of freshwater microalgae to suspended particles, antibiotics and combined stress [D]. Fuzhou: Huaqiao University, 2017: 26-27 (in Chinese)
- [30] Qin H, Chen L, Lu N, et al. Toxic effects of enrofloxacin on *Scenedesmus obliquus* [J]. Frontiers of Environmental Science & Engineering, 2012, 6(1): 107-116