DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20170831001

王作铭, 陈军, 陈静, 等. 地表水中抗生素复合残留对水生生物的毒性及其生态风险评价[J]. 生态毒理学报,2018, 13(4): 149-160 Wang Z M, Chen J, Chen J, et al. Toxicity to aquatic organisms and ecological risk assessment of antibiotic compound residues in the surface water [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(4): 149-160 (in Chinese)

地表水中抗生素复合残留对水生生物的毒性及其生态 风险评价

王作铭,陈军*,陈静,徐汉杰

上海师范大学生命与环境科学学院,上海 200234 收稿日期:2017-08-31 录用日期:2017-12-07

摘要:针对上海地区地表水中混合并持久残留的抗生素对水生态的危害,测试了3种主要被使用的抗生素(磺胺甲恶唑, SMZ;土霉素,OTC;氟苯尼考,FF)对4个不同营养级的水生生物代表种(蛋白核小球藻、费氏弧菌、大型蚤和斑马鱼胚胎)的单 一毒性和联合毒性,并进一步对生态风险进行评估来探究抗生素对水生态系统的综合作用。研究表明:水生生物对单一抗生 素暴露的毒性敏感顺序为:蛋白核小球藻>斑马鱼胚胎>费氏弧菌>大型蚤。用联合指数(CI)来评价抗生素二元混合物之间的 相互作用时发现对于不同水生模式生物,抗生素之间的相互作用方式以拮抗作用(CI>1)为主。通过与浓度加和(CA)和独立作 用(IA) 2 个传统模型的预测效果比较,发现 CI 模型能准确预测到抗生素联合毒性偏离相加作用。由于养殖废水中这3种抗 生素的含量均远高于其他水体(如黄浦江、长江口、工厂废水),其对不同营养级的水生生物均表现出较高的风险性,需要对养 殖废水采取相应的风险削减措施;相比之下,其他水体中抗生素对费氏弧菌、斑马鱼胚胎、大型蚤均表现出低风险,但是对蛋 白核小球藻仍具有一定的风险性,需要警惕抗生素对水体初级生产者的风险性。 关键词:抗生素;水生生物;联合毒性;生态风险评价;CI 模型;复合残留 **文章编号:**1673-5897(2018)4-149-12 中图分类号:X171.5 文献标识码:A

Toxicity to Aquatic Organisms and Ecological Risk Assessment of Antibiotic Compound Residues in the Surface Water

Wang Zuoming, Chen Jun^{*}, Chen Jing, Xu Hanjie
College of Life and Environmental Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China
Received 31 August 2017 accepted 7 December 2017

Abstract: Three major antibiotics (sulfamethoxazole SMZ, oxytetracycline OTC and florfenicol FF) were used to explore the effects of mixed and persistent antibiotics on aquatic ecology in the Shanghai surface water. The individual and combined toxicities of these antibiotics have been examined in four target organisms (*Chlorella pyrenoidosa, Vibrio fischeri, Daphnia magna* and zebrafish embryo), which were representative aquatic species at four different trophic levels respectively. Moreover, further ecological risk assessment based on toxicity tests was conducted to explore the comprehensive effect of antibiotics on aquatic ecosystems. The results showed that the order of sensitivity of aquatic organisms to three major antibiotics was as follows: *Chlorella pyrenoidosa* > zebrafish em-

基金项目:国家自然科学基金(31070671);上海市科委项目(11440502300)

作者简介: 王作铭(1995-), 男, 本科生, 研究方向为环境毒理学, E-mail: dmhun123@gmail.com;

^{*} 通讯作者(Corresponding author), E-mail: cj7206@shnu.edu.cn

bryo > *Vibrio fischeri* > *Daphnia magna*. The combination index (CI) was used to evaluate interactions between the antibiotic binary mixtures, and it was found that interactions between two antibiotics were mostly antagonistic (CI> 1). In addition, compared with classical models of concentration addition and independent action, CI method could accurately predict the non-additive effect of joint toxicity from antibiotics. As the content of three kinds of antibiotics in aquaculture wastewater is much higher than that of other water bodies (Huangpu River, Yangtze River estuary and factory wastewater), it shows high risk for aquatic organisms at different trophic levels, so corresponding risk reduction measures are needed. In contrast, antibiotics in other water bodies show low risk for *Vibrio fischeri, Daphnia magna* and zebrafish embryo, but still pose a certain risk to *Chlorella pyrenoidosa*. Therefore, vigilance is needed against antibiotic risk to aquatic primary producers.

Keywords: antibiotics; aquatic organisms; joint toxicity; ecological risk assessment; combination index (CI) model; compound residues

抗生素被广泛用于人类和动物感染性疾病的治疗,同时也被作为促生长剂添加于饲料中在养殖业中大量应用^[1];我国是抗生素生产和使用大国,且滥用现象严重^[2];抗生素在使用之后,大量未被代谢的抗生素经不同途径最终进入水体^[3],在我国各地江河流域中普遍发现了抗生素残留的现象^[4],因此抗 生素对水生态的影响特别严重,也是当前国内外最 受关注的环境污染问题之一^[5]。虽然,水体中抗生 素的残留浓度不高且半衰期不长,检出水平常在μg ·L⁻¹和 ng·L⁻¹级别,但由于抗生素被频繁地使用并 进入了水环境,使得抗生素在水体中持续存在,即表 现出"假持续"现象^[6-8];值得注意的是,这种现象极 有可能会对水体中的微生物群落产生影响,并通过 生物富集和食物链传递影响高级生物,破坏生态系

实际上,由于水体中残留的抗生素种类繁多和 特定地域的限制,通过实验来评价环境中所有不同 浓度的混合药物是不可能的^[7,11],为了预测联合毒性 效应和识别药物之间的作用关系,毒性预测模型得 到了发展^[7]。目前,多采用浓度相加(CA)和独立作 用(IA)传统模型进行毒性预测,缺陷是这2种传统 模型忽视了药物之间的协同、拮抗作用。然而,水体 中化合物之间不仅仅是简单的相加作用,也会发生 相互作用而产生协同或拮抗效应^[12],抗生素对环境 的危害作用可能会因共存而加强^[13]。因此,考虑到 当抗生素共存时判断相互作用发生与否对于准确评 价水生态风险的重要性^[9],Chou^[14]提出的联合指数 (CI)模型被用于研究污染物相互作用^[15-16]。

上海地处长江流域下游,是中国人口密度最高 且经济最发达的城市之一;近年来,不同种类、浓度 的抗生素在上海地区的地表水、地下水^[4,17-18],甚至

在饮用水以及学生体内被检出[19-20]。因此,上海地 区水体中抗生素污染风险不得不受到重视,而最直 接的危害是通过影响水生生物破坏水生态健康。现 有权威统计数据表明磺胺类、四环素类和氯霉素类 抗生素是当前上海地区水体中被检出最多且污染最 为严重的抗生素种类[4.17-18.21],本文以这3类抗生素的 3种代表物质即磺胺甲恶唑、土霉素和氟苯尼考为受 试物质,以不同营养级的国际通用模式生物蛋白核小 球藻(Chlorella pyrenoidosa)、费氏弧菌(Vibrio fischeri)、大型蚤(Daphnia magna)和斑马鱼胚胎(zebrafish embryo)为受试对象,进行了急性毒性研究,然后在其 基础上开展联合毒性试验并用 CA、IA 和 CI 模型对 抗生素的联合毒性进行了预测,同时用联合指数 CI 对不同浓度下药物之间作用关系(相加、协同、拮抗)进 行了识别和评价;最后以近年来上海地区水体中抗生 素主要来源(养殖废水、工厂废水)和主要地表水(黄浦 江、长江口)的检出数据为指标,在 CI 模型基础上测 试分析上海地区水体抗生素污染状况,评价其中的生 态风险,为上海地区抗生素污染监测提供参考。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 供试材料

药品:磺胺甲恶唑(sulfamethoxazole, SMZ)购自 阿拉丁,分析标准品,纯度为99%,试剂CAS编号 为723-46-6;土霉素(oxytetracycline,OTC)购自阿拉 丁,分析标准品,纯度为97%,试剂CAS编号为 6153-64-6;氟苯尼考(florfenicol,FF)购自阿拉丁,分 析标准品,纯度为98%,试剂CAS编号为73231-34-2。取待测化合物用适量二甲基亚砜(DMSO)配制成 标准溶液备用(最终质量分数<0.1%)。

受试生物:蛋白核小球藻(Chlorella pyrenoidosa)、大型蚤(Daphnia magna)均为上海师范大学水生 生物实验室保存种;费氏弧菌(Vibrio fischeri)由中国 海洋大学海洋生命学院王祥红教授惠赠;斑马鱼 (zebrafish)购于上海市奉贤区花鸟市场,试验前驯养 一周以上,驯养期间,健康状态良好且无死亡。

试验用水及培养基:①曝气自来水:曝气除氯 48 h 以上的自来水。②大型蚤稀释用水:CaSO₄ 60 mg・ L⁻¹,MgSO₄ 60 mg・L⁻¹,Na₂CO₃ 96 mg・L⁻¹,KCl 4 mg・ L⁻¹,pH 7.6。③斑马鱼胚胎培养水:CaCl₂・2H₂O 0.294 g・L⁻¹,MgSO₄・7H₂O 0.123 g・L⁻¹,NaHCO₃0.065 g・L⁻¹, KCl 0.006 g・L⁻¹,用曝气 48 h 以上自来水溶解。④ BG-11 复合培养基:购于樊克生物有限公司⑤费氏弧 菌液体培养基:NaCl 30 g・L⁻¹,酵母膏 5 g・L⁻¹,胰蛋白 胨 5 g・L⁻¹,甘油 3 g・L⁻¹,KH₂PO₄ 1 g・L⁻¹,Na₂HPO₄ 5 g・L⁻¹,pH 7.0,121 ℃蒸汽灭菌 20 min。⑥费氏弧菌固 体培养基:NaCl 30 g・L⁻¹,酵母膏 5 g・L⁻¹,胰蛋白胨 5 g・L⁻¹,甘油 3 g・L⁻¹,KH₂PO₄ 1 g・L⁻¹,Na₂HPO₄ 5 g・ L⁻¹,甘油 3 g・L⁻¹,KH₂PO₄ 1 g・L⁻¹,Na₂HPO₄ 5 g・ L⁻¹,20 g・L⁻¹琼脂,pH 7.0,121 ℃蒸汽灭菌 20 min。

1.2 仪器

主要仪器包括 AE20/21 倒置生物显微镜(麦克 奥迪实业集团有限公司); Tecan M200 PRO 多功能 酶标仪(瑞士帝肯公司); PQX—350H 人工气候箱(上 海申贤恒温设备厂)。

1.3 受试生物的培养

(1)小球藻的培养:在无菌条件下,将对数期的 藻种接种到 100 mL BG-11 培养基中,容器为 250 mL 锥形瓶,在温度(22±1) ℃、光照强度 2 500 Lux,光 暗比 12 h: 12 h 的条件下静置培养。每天的固定时 间震荡 3 次以上(15 min/次),每隔 96 h 移种一次。

(2)大型蚤的培养:大型蚤的扩大培养采用曝气 自来水,培养温度为(20±1)℃;光照强度为2500 Lux;光暗比为12h:12h。每隔2天换一次水并喂 食蛋白核小球藻,投饵密度为2.0×10⁵~3.0×10⁵ cells ·L⁻¹。实验前24h选取怀卵的健康母蚤在稀释用水 中进行培养,实验前6h将母蚤挑出,挑选出生时间 在6~24h之间的幼蚤用于实验。期间喂食蛋白核 小球藻,投饵密度为2.0×10⁵~3.0×10⁵ cells·L⁻¹,其 他培养条件亦相同。

(3)斑马鱼的培养及胚胎的获取:将斑马鱼驯养 于曝气自来水中,pH 7.5,温度(28.5±1)℃,光暗比为 14 h:10 h,饵料为丰年虾,每日喂食2次并清理污 物。选用鱼龄3个月以上的成鱼用于产卵,在繁殖 前一天,将雌鱼和雄鱼以1:2的比例放入孵化箱中 的网兜中,网孔稍大于受精卵大小。设定好开灯时 间,第2天开灯 30 min 内斑马鱼产卵完成。用胚胎 培养水冲洗胚胎,在体视镜下挑取受精正常的胚胎 用于暴露实验。

(4)费氏弧菌的培养及检测用菌液制备:无菌条 件下,取适量斜面三代菌种接入 5 mL 液体培养基, 在 28 ℃、转速 250 r·min⁻¹条件下培养 12 ~16 h。取 活化的菌液 100 μL 涂布,将平板置于 22 ℃培养箱 中培养约 22 h 后,用 3% NaCl 溶液将菌落洗下并 稀释至约为 10⁷ cfu·mL⁻¹后作为工作菌液备用。

1.4 试验方法

1.4.1 毒性指标的测定

(1)小球藻生长抑制试验

藻类生长抑制试验方法参照经济合作与发展组 织(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)201标准方法^[22],取对数期的纯种 藻液接种到 100 mL BG-11培养基中,接种后的初 始密度约 2×10⁵ cells·mL⁻¹。所测试抗生素设置 8 个浓度组,并设置空白对照,每组实验设置 3 个平 行。经测定 OD_{680 nm}与藻液密度(10⁵ cells·mL⁻¹)线性 相关方程为: Y=81.807 OD_{680 nm}, $R^2=0.9924$ 。分别 在 24、48、72、96 h,取 1 mL 藻液测定吸光度,从而 确定其浓度。按照公式(1)、(2)计算抑制率:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times T_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (T_2 - T_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (T_n - T_{n-1})$$
(1)

式中:A 为生长曲线以下的面积; N_0 为 T_0 时刻每毫 升藻液中的藻细胞数; N_1 为 T_1 时刻每毫升藻液中所 测得的藻细胞数; N_n 为 T_n 时刻每毫升藻液中所测得 的藻细胞数; T_1 为试验开始后第一次计数的时间; T_n 为试验开始后第 n次计数的时间。

$$I_{\rm A} = \frac{A_{\rm c} - A_{\rm t}}{A_{\rm c}} \times 100 \tag{2}$$

式中: *I*_A为每一浓度下藻类细胞生长抑制百分率 (%); *A*_c为对照组生长曲线所包围的面积; *A*_t为处理 组生长曲线所包围的面积。

(2)费氏弧菌发光抑制试验

费氏弧菌发光抑制试验方法参照国际标准化组织(International Organization for Standardization, ISO) 11348-1(2009)标准方法^[23],并依据文献[24]进行适当修改;所测试抗生素用 3% NaCl 溶液稀释为 9 个浓度组,每组实验设置 3 个平行。取 100 μL 工作菌液加入到白色 96 孔板中,用多功能酶标仪测发光量,

记为 I₀,然后加入等体积的待测抗生素溶液,振荡 250 s 充分混合均匀,然后在 15 ℃的条件下检测 30 min 时的发光强度 I。

(3)大型蚤急性毒性试验

大型蚤急性毒性试验方法参照 OECD 202 标准 方法^[25],所测试抗生素用大型蚤稀释用水稀释为 7 个浓度组,每组实验设置 3 个平行。实验容器为 50 mL 烧杯,每个容器内装 50 mL 一定浓度的供试溶 液,每一处理放 18 头同一母体 6~24 h 内的新生活 泼个体进行试验,试验水温为(20±1) ℃、光暗比为 14 h:10 h,实验期间不进行喂食。24 h 试验后观 察大型蚤个体,大型蚤受抑制的判定是振荡试验溶 液,在 15 s 内无反应,记录受抑制个数。

(4)斑马鱼胚胎急性毒性试验

斑马鱼胚胎急性毒性试验方法参照 ISO15088 (2007)标准方法^[26],选取4细胞至128细胞阶段下镜 检正常的受精卵用于染毒实验,在24孔板中每孔加 入6枚受精卵和2mL受试液,每组放4个孔,设置 6个浓度组和1个对照组。染毒48h后出现凝结、 不显示尾脱离以及未检出心跳状况均视为死亡。

上述指标的测定,除大型蚤急性毒性试验外,其 他操作均为无菌操作。

1.4.2 联合毒性试验方法

在单一毒性的基础上,按照毒性单位1:1的配 比组成二元混合体系,测定混合体系对4种水生生 物的联合毒性,试验方法和步骤与单一毒性的测定 相同;二元混合物的总浓度为2个组分浓度之和。 采用基于中效原理的中效方程来计算抗生素单独和 联用的效果^[27],公式如下:

$$\frac{f_a}{f_u} = \left(\frac{D}{D_m}\right)^m \tag{3}$$

式中,D是剂量, D_m 是产生中度效果的剂量,这是相 当于有效剂量的中值剂量(EC₅₀), f_a 是反应系统中的 D剂量的有效部分, $f_a = 1 - f_a$, m 是剂量-效应曲线的 系数。

根据定义,方程(3)可以变形为公式(4)

$$D = D_{\rm m} \left(\frac{f_{\rm a}}{1 - f_{\rm a}}\right)^{1/m} \tag{4}$$

对于不同效应下的联合指数 CI 根据下列公式 进行计算^[14]:

$${}^{n}(\mathrm{CI})_{x} = \sum_{j=1}^{n} \frac{(D)_{j}}{(D_{x})_{i}} = \sum_{j=1}^{n} \frac{(D_{x})_{1-n} \frac{[D]_{j}}{\sum_{i=1}^{n} [D]}}{(D_{m})_{j} \left\{ \frac{(f_{a_{x}})_{j}}{[1-(f_{a_{x}})_{j}]} \right\}^{1/mj}}$$
(5)

式中,"(CI)_x为各个组分产生 x%效应的联合指数, (D_x)_{1-n}为混合物产生 x%效应的各组分浓度之和, [D]_j/ Σ_1^n [D]为混合物产生 x%效应时,各组分浓度的 比例,(D_n)_j {(f_{a_x})_j]}^{1/mj}为能够产生 x%效应 的单一物质浓度。其中 CI<1 表示协同作用,CI=1 表示相加作用,CI>1 表示拮抗作用。但根据联合指 数计算分析软件 CalcuSyn 指导书^[28],0.90 \leq CI \leq 1. 10 仍可视为相加作用。

采用 CA、IA 和 CI 模型对联合毒性作用进行预测。CA 模型是基于混合体系中的所有物质都是通过相似的作用方式而产生效应这一假设的,适用于相似联合作用^[9],按照公式(6)来计算:

$$\mathrm{EC}_{x,\mathrm{mix}} = \left(\sum_{i=1}^{n} \frac{P_i}{\mathrm{EC}_{x,i}}\right)^{-1} \tag{6}$$

式中, $EC_{x,i}$ 为混合物中 i组分单独产生 x%效应时的浓度; $EC_{x,mix}$ 为产生效应 x% 的混合物浓度; P_i 为 i组分的浓度占混合物浓度的百分比;n为混合物组分数。

IA 模型则适用于独立联合作用,即指混合物中 各组分产生的效应独立于其他的,作用形式也不 同⁹⁹。其公式如下:

$$E(C_{\min}) = 1 - \prod_{i=1}^{m} (1 - E(C_i))$$
(7)

式中, $E(C_{mix})$ 为包含 n个组分的混合物在浓度为 $C_{mix}(C_{mix} = C_1 +, \dots, +C_n)$ 时所产生的效应, $E(C_i)$ 为混 合物中组分 i在浓度为 C_i 时单独产生的效应。

CI 模型采用如下公式计算^[14]:

$$EC_{x,mix} = \left(\sum_{i=1}^{n} \frac{P_i}{EC_{x,i} \times CI_{xcomp}}\right)^{-1}$$
(8)

式中,CI_{xcomp}为各个组分产生 x%效应的联合指数, 其按照公式(5)计算。

1.4.3 生态风险评价

为了评估抗生素在水体中对生态环境的不良影响,根据欧盟的技术指导文件(TGD)^[29]采用危险商 值(HQs)对潜在环境风险进行评价,HQs 是通过预测 或检测的环境浓度(PEC 或 MEC)与预测的无效浓 度(PNEC)值进行计算的,运用公式(9)进行计算^[9]:

$$HQ = \frac{MEC}{PNEC}$$
(9)

其中 PNEC 是基于生物毒性实验来计算,表达 式如下:

$$PNEC = \frac{EC_{50}}{AF}$$
(10)

式中,EC₅₀值采用本试验3种抗生素及其二元混合物对4种模式生物的中效值;AF(评价因子)为1000(对于单营养级急性毒性试验)。

对于混合物的危险商值,多采用公式(11)计算^[3]:

 $HQ_{mix} = \sum_{i=1}^{n} HQ_{i}$ (11)

式中,HQ,表示单一抗生素的危险商值。

1.5 数据统计和处理

采用 SPSS 23 和 Origin 8.5 对实验数据分别进行统计分析和作图,实验结果采用平均值±标准差(SD)表示。采用 CalcuSyn 软件求出药物单用和联用时的有关参数、联合指数(CI)。

2 结果与讨论(Results and discussion)

2.1 单一毒性及敏感性比较

用 CalcuSyn 软件计算出单一抗生素对模式生物的 EC₅₀值和 95% 置信限^[9],结果如表 1 所示。抗 生素的毒性分级采用我国环境保护行业保护标准 《新化学物质危害评估导则》^[30](HJ/T 154—2004):极 高毒(EC₅₀, \leq 1 mg·L⁻¹),高毒(EC₅₀,1~10 mg·L⁻¹),中 毒(EC₅₀,10~100 mg·L⁻¹),低毒(EC₅₀,>100 mg·L⁻¹)。

由表1可知不同模式生物对同种抗生素敏感性 不同(小球藻>斑马鱼胚胎>费氏弧菌>大型蚤);不同 抗生素同样对同种模式生物的毒性亦有差异,OTC 对4种模式生物的毒性最大,其对小球藻极高毒;对 于 SMZ,费氏弧菌和大型蚤的 EC_{s0}值分别为85.72 mg·L⁻¹和 188.00 mg·L⁻¹,这与 Kim 等^[31]报道的结果 十分接近(78.1 mg·L⁻¹和 189.2 mg·L⁻¹);至于 FF 对 非靶生物的生态毒理学研究甚少,李霞^[32]对小球藻 和隆线蚤进行急性毒性测试时发现 FF 对 2 种生物 毒性分别表现为高毒和低毒,这与本文的研究结果 一致;对于斑马鱼胚胎和大型蚤,测试抗生素均分别 表现出中毒和低毒;至于费氏弧菌,SMZ 和 OTC 表 现出中毒,FF 则表现出低毒,抗生素并未对费氏弧 菌表现很强的毒性,Isidori 等^[33]解释为费氏弧菌短 时间(5~30 min)暴露在药物的情况下,药物对其生 物合成途径影响有限,选择 24 h 暴露时间毒性作用 效果会更加明显。

2.2 联合毒性的评价及预测

2.2.1 抗生素联合毒性相互作用

在得到抗生素单一和联合毒性数据的基础上, 通过联合指数法来量化不同效应或浓度水平下抗生 素之间的作用方式^[34]。表 2 表示二元抗生素相互作 用的剂量效应关系参数 D_m 即 EC₅₀、m、r 值及不同效 应水平下(EC₁₀, EC₅₀, EC₉₀)联合指数 CI 平均值,联 合指数 CI 与效应 f_a 的关系如图 1 所示。

大体上,3种二元混合物组合对水生生物的毒性作用以拮抗效应为主。例如,OTC-FF 组合在不同浓度下对4种模式生物均表现拮抗效应;丛永平等^[35]也观测到相似的实验结果,OTC-FF 二元混合物

模式生物 Model organism	测试终点 Bioassay endpoint	抗生素简称 Abbreviation of antibiotics	浓度 /(mg·L ⁻¹) Concentration /(mg·L ⁻¹)	95% 置信区间 /(mg·L ⁻¹) 95% confidence interval /(mg·L ⁻¹)	т	R^2
蛋白核小球藻 Chlorella pyrenoidosa	96 h-EC ₅₀	SMZ	18.80	8.24~42.91	1.04	0.877
		OTC	0.16	$0.06 \sim 0.40$	0.25	0.828
		FF	2.29	1.47~3.58	0.77	0.957
费氏弧菌 Vibrio fischeri	30 min-EC ₅₀	SMZ	85.72	64.17~114.50	1.17	0.964
		OTC	45.86	33.70~62.40	0.88	0.977
		FF	130.96	97.15~176.53	0.45	0.975
斑马鱼胚胎 Zebrafish embryo	48 h-EC ₅₀	SMZ	50.94	31.07~83.54	0.93	0.920
		OTC	48.05	21.17~109.04	0.97	0.821
		FF	63.76	43.65~93.15	0.93	0.948
大型蚤 Daphnia magna	24 h-EC ₅₀	SMZ	188.00	161.47~218.89	1.76	0.974
		OTC	175.72	160.27~192.66	1.80	0.990
		FF	247.01	215.21~283.51	2.67	0.978

表 1 单一抗生素对 4 种模式生物的毒性终点值 Table 1 Acute median effective concentrations of the test pharmaceuticals

注:SMZ、OTC、FF为磺胺甲恶唑、土霉素和氟苯尼考。



Note: SMZ, OTC, FF stand for sulfamethoxazole, oxytetracycline and florfenicol.

注: SMZ-OTC(-**□**-), SMZ-FF(-**●**-), OTC-FF(-**▲**-)。 Fig. 1 Combination index plot (f_a -CI plot) for binary combinations of SMZ, OTC and FF Note: SMZ-OTC(-**□**-), SMZ-FF(-**●**-), OTC-FF(-**▲**-).

表 2 抗生素二元混合物对蛋白核小球藻、费氏弧菌、斑马鱼胚胎和大型蚤的剂量反应参数以及 CI 值

 Table 2
 Dose-effect relationship parameters and mean combination index (CI) values of sulfamethoxazole, oxytetracycline and florfenicol in their binary for

 Cline
 Value

模式生物 Model organism	二元混合物 Binary mixtures	剂量反应参数 Dose-response parameter			CI 值 CI values						
										$EC_{50}/(mg \cdot L^{-1})$	т
		蛋白核小球藻 Chlorella pyrenoidosa	SMZ-OTC	9.01	0.50	0.966	857.39	Ant	10.26	Ant	3.88
SMZ-FF	9.68		0.40	0.978	0.06	Syn	1.01	Add	19.64	Ant	
OTC-FF	3.11		0.20	0.881	1.55	Ant	11.83	Ant	1 727.17	Ant	
费氏弧菌 Vibrio fischeri	SMZ-OTC	157.12	0.73	0.990	1.06	Add	2.35	Ant	5.74	Ant	
	SMZ-FF	134.99	0.48	0.978	0.90	Add	1.26	Ant	9.90	Ant	
	OTC-FF	123.88	0.66	0.964	3.68	Ant	1.40	Ant	1.74	Ant	
斑马鱼胚胎 Zebrafish embryo	SMZ-OTC	54.54	1.24	0.998	1.91	Ant	1.10	Add	0.64	Syn	
	SMZ-FF	129.37	1.04	0.982	2.93	Ant	2.26	Ant	1.74	Ant	
	OTC-FF	137.81	1.03	0.981	2.99	Ant	2.48	Ant	2.07	Ant	
大型蚤 Daphnia magna	SMZ-OTC	140.36	1.33	0.902	0.51	Syn	0.77	Syn	1.17	Ant	
	SMZ-FF	265.54	1.68	0.974	0.96	Add	1.23	Ant	1.64	Ant	
	OTC-FF	221.69	1.45	0.950	10.93	Ant	49.77	Ant	226.54	Ant	

Chlorella pyrenoidosa, Vibrio fischeri, zebrafish embryos and Daphnia magna

注:协同、相加和拮抗作用分别用 Syn, Add 和 Ant 英文缩写表示。

Note: Syn, Add, Ant stand for synergism, additive effect and antagonism.

对明亮发光杆菌的毒性作用呈现拮抗效应。OTC 与 FF 常作为主要渔药被使用,二者可能会因此在 水体中共存对水生生物造成潜在危害。OTC 与 FF 在 DNA 和 RNA 水平上具有相似的作用方式^[36],2 种抗生素在不同阶段抑制细菌蛋白质的合成^[37],因 此有研究将 OTC 与 FF 之间作用关系解释为协同或 相加^[38];然而,当药物释放到水环境中时其作用于非 靶标生物的作用机理可能会不同于靶生物^[39]。联合 指数仅仅只是量化了协同或拮抗效应,对于协同或 拮抗作用机理的阐述是需要不同的方法去解决的单独问题^[39];例如,Fu等^[40]用定量构效关系(QSAR)研究了OTC和FF对绿藻的作用机制。但是,目前还未有关于OTC与FF联合作用于非靶标生物的机理解释。此外,SMZ-OTC、SMZ-FF组合在对费氏弧菌和大型蚤的联合毒性效果上表现出一定的相似性,即在低效应情况下表现出协同或相加作用,高效应下表现出拮抗作用;这也说明联合毒性效果会随着效应水平的不同产生变化。



图 2 二元抗生素混合物对 4 种模式生物的浓度-效应曲线和模型预测曲线

Fig. 2 Experimental toxicity values (Exp) and predicted dose-response curves of the binary mixtures of the three chemicals based on concentration addition (CA), independent action (IA), and combination index (CI) models for the four aquatic organisms acute toxicity test

2.2.2 3种联合毒性预测模型的比较

应用 CA、IA 和 CI 这 3 个模型分别预测等毒 性浓度比抗生素混合物对 4 种水生生物的联合毒 性。混合物的观测浓度-效应散点图, CA、IA 和 CI 预测的浓度-效应曲线均绘于图 2, 图 2 由上至下 分别对应蛋白核小球藻、费氏弧菌、斑马鱼胚胎、 大型蚤。

从图 2 可以看出,CI 模型预测的数值大体上接 近观测值。而当 CI 指数值与 1 偏差较大时,CA、CI 模型的预测值与观测值均发生了明显的偏离,这说 明组分之间发生了相互作用,高于观测值认为是拮 抗作用,反之为协同作用^[7]。当 CI 指数值与 1 接近 时(相加作用),如 SMZ-OTC、SMZ-FF 二元混合物对 大型蚤的毒性作用,CA 和 IA 模型也能较好地预测 联合毒性相互作用;这也说明传统 CA 和 IA 模型适 合预测药物不发生相互作用的相加作用,但在准确 预测药物发生相互作用的联合毒性作用上有缺陷, 而 CI 模型能够克服这一点^[16,41]。

2.3 生态风险评价

2.3.1 单一抗生素的最大生态风险评价

被选择的 3 种抗生素在上海地区河流和排放废 水中检出含量如表 3 所示,图 3 表示上海地区不同 水体中 3 种主要抗生素对 4 个不同营养级的水生生 物(蛋白核小球藻、费氏弧菌、斑马鱼胚胎和大型蚤) 的最大危险商值图(MEC 取水体中最大抗生素浓 度)。生态风险分为三级:当风险商值 0.01 ≤ HQ < 0.1时意味着低度风险(low risk);当 0.1 ≤ HQ < 1.0 时 意味着中度风险(moderate risk);当 HQ ≥ 1.0 时意味 着高度风险(high risk)^[42]。

从图 3 可以看出,目标抗生素对蛋白核小球藻 的危害性最大,而 OTC 最甚。相比之下,对于其他 3 种受试生物,除养殖废水处的风险程度表现出高 度风险性外,其他 3 处水体均表现出低度风险或无 风险。这表明除蛋白核小球藻外,其他水生生物所 测试指标对目标抗生素的指示作用并不明显,但由 于生物毒性蓄积作用,仍不能排除潜在风险。此外, 也说明养殖废水的生态风险性远高于其他3处水体,原因可能是由于养殖户对抗生素的过量使用造成的,而目前我国对抗生素的使用没有明确的政策规定,因此使得未经代谢的残余抗生素直接排入水体而并未进行有效的处理,这导致养殖废水中抗生素含量偏高^[4,18];然而,养殖废水是抗生素污染的重要来源,目前国内外关于抗生素污染特征的研究偏重于河流、河口湾和污水处理厂等水环境,而对养殖区抗生素污染的生态风险评估较少^[43],这需要进一步的调查和数据统计。

2.3.2 三元抗生素混合物的生态风险评价

单一抗生素风险评价表明,蛋白核小球藻具有 很好的风险指示作用,因此选用其对抗生素三元混 合物进行生态风险评价。采用检出浓度的最大值、 平均值和最小值来进行风险评价,这样更接近实际 情况。抗生素混合物的危险商值图如图 4 所示,首 先可以看出养殖废水对蛋白核小球藻具有极高风 险,因为在检出浓度最小的情况下仍具有高风险,从 表3看出这种风险居高不下主要是养殖废水中高浓 度的 OTC 导致的。因此要降低养殖废水的生态风 险影响必须对 OTC 进行处理后排放。此外,抗生素 混合物在检出浓度平均值下的危险商值在长江口处 接近 0.1 即中风险,在其他 3 处均表现出高风险。 然而,这是未考虑抗生素相互作用下的风险情况;从 图 1 可以看出 SMZ-FF、OTC-FF 组合在低剂量下对 小球藻表现为协同作用或呈现该趋势。有研究表明 二元混合物的相互作用主导了三元或多元混合物的 作用方式[37,39],因此二元混合物之间的协同作用可 能会使得三元混合物生态风险进一步增加;目前,将 非相加性相互作用数据用于生态风险评价的可行方 法是"二元证据权法"(Binary Weight of Evidence)^[48]。Marx 等^[49]应用该方法发现如果忽略抗生 素之间的协同作用,会低估 50%~200% 的风险,这 相当于联合指数 CI 从 0.75 到 0.5 所表现的协同效 应。然而,该方法的主要限制是二元混合物转换到 多元混合物的关键参数的不确定性^[48]。

表 3 上海地区水体中 3 种主要抗生素的检出浓度(ng·L⁻¹)

Table 3 The contamination level of three main antibiotics in the waters of Shanghai area $(ng \cdot L^{-1})$

化合物	英文名称	简称	黄浦江 ^[4,17]	长江口 ^[4,44]	养殖废水 ^[4,45-46]	工厂废水 ^[21,47]
Tested chemical	English name	Abbreviation	Huangpu River ^[4,17]	Yangtze estuary ^[4,44]	Aquaculture wastewater ^[4,45-46]	Plant effluent ^[21,47]
磺胺甲恶唑	Sulfamethoxazole	SMZ	2.2~764.9	1.48~56.8	$1 \sim 142\ 900$	7.37~106.6
土霉素	Oxytetracycline	OTC	31.3~470	0.48~22.5	21 200~237 800	16.7~337.81
氟苯尼考	Florfenicol	FF	19.88~241.1	1.88~89.5	228~893	8.7~19.4



图 3 基于上海地区水体中检出抗生素最大浓度计算出的危险商值图 注:S1 黄浦江;S2 长江口;S3 养殖废水;S4 工厂废水。

Fig. 3 Figure based on the calculated risk quotients for the three antibiotics in the waters of Shanghai area Note: S1, Huangpu River; S2, Yangtze estuary; S3, Aquaculture wastewater; S4, Plant effluent.





综上所述:

(1)根据单一急性毒性测试结果,4种模式生物 对抗生素的敏感性差异显著,敏感性:蛋白核小球藻 >斑马鱼胚胎>费氏弧菌>大型蚤。目标抗生素中, OTC 最具毒性,其对蛋白核小球藻具极高毒性。

(2)联合指数 CI 分析结果显示在效应 EC₁₀至 EC₉₀之间,二元混合药物之间多以拮抗作用为主;此外,随着抗生素浓度的变化,抗生素之间的作用效果 亦随之变化;低浓度下,部分抗生素组合对模式生物 表现出协同作用或趋势。通过与传统模型 CA、IA 的预测效果比较,发现 CI 模型更加贴近观测值,说 明 CI 模型能准确预测抗生素混合物非相加性相互 作用方式,并且通过 CI 指数量化作用程度。

(3)通过对上海不同水体中主要抗生素进行风 险评价发现养殖废水对不同营养级的水生生物均有 较高的风险性,这主要是养殖废水中 OTC 浓度过高 所致;此外,相比其他营养级模式生物,蛋白核小球 藻对不同水体均有很好的风险指示作用。并以小球 藻作为指示生物进行抗生素混合物风险评价,结果 显示在抗生素检出平均浓度下,长江口水体表现出 中度风险,其他水体均表现出高度风险。如果考虑 抗生素之间的相互作用,风险可能会继续升高。

通讯作者简介:陈军(1966-),男,博士,副教授,主要研究领域 为环境微生物生态技术,发表学术论文 50 余篇。

参考文献(References):

- Zhao S, Liu X, Cheng D, et al. Temporal-spatial variation and partitioning prediction of antibiotics in surface water and sediments from the intertidal zones of the Yellow River Delta, China [J]. Science of The Total Environment, 2016, 569-570: 1350-1358
- [2] 武旭跃, 邹华, 朱荣, 等. 太湖贡湖湾水域抗生素污染
 特征分析与生态风险评价[J]. 环境科学, 2016, 37(12):
 4596-4604

Wu X Y, Zou H, Zhu R, et al. Occurrence, distribution and ecological risk of antibiotics in surface water of the Gonghu Bay, Taihu Lake [J]. Environmental Science, 2016, 37(12): 4596-4604 (in Chinese)

- [3] Guo J, Selby K, Boxall A B A. Assessment of the risks of mixtures of major use veterinary antibiotics in European surface waters [J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50(15): 8282-8289
- [4] 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)

- [5] 徐永刚, 宇万太, 马强, 等. 环境中抗生素及其生态毒 性效应研究进展[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(3): 11-27 Xu Y G, Yu W T, Ma Q, et al. The antibiotic in environment and its ecotoxicity: A review [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(3): 11-27 (in Chinese)
- [6] Fabbri E. Pharmaceuticals in the environment: Expected and unexpected effects on aquatic fauna [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2015, 1340(1): 20-28
- [7] Trombini C, Hampel M, Blasco J. Evaluation of acute effects of four pharmaceuticals and their mixtures on the copepod *Tisbe battagliai* [J]. Chemosphere, 2016, 155: 319-328
- [8] Nieto E, Hampel M, González-Ortegón E, et al. Influence of temperature on toxicity of single pharmaceuticals and mixtures, in the crustacean A. desmarestii [J]. Journal of Hazardous Materials, 2016, 313: 159-169
- [9] Gonzúlez-Pleiter M, Gonzalo S, Rodea-Palomares I, et al. Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment [J]. Water Research, 2013, 47 (6): 2050-2064
- [10] 王路光,朱晓磊,王靖飞,等.环境水体中的残留抗生 素及其潜在风险[J]. 工业水处理, 2009, 29(5): 10-14 Wang L G, Zhu X L, Wang J F, et al. Antibiotic residual in environmental water body and its potential risks [J]. Industrial Water Treatment, 2009, 29(5): 10-14 (in Chinese)
- [11] Di Nica V, Villa S, Finizio A. Toxicity of individual pharmaceuticals and their mixtures to *Aliivibrio fischeri*. Evidence of toxicological interactions in binary combinations
 [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2017, 36 (3): 807
- [12] Rodea-Palomares I, Leganés F, Rosal R, et al. Toxicological interactions of perfluorooctane sulfonic acid (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) with selected pollutants [J]. Journal of Hazardous Materials, 2012, 201-202: 209-218
- [13] 朱婷婷, 宋战锋, 尹魁浩, 等. 南方某水库水体中抗生素生态与健康风险研究[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(5):
 124-131
 Zhu T T, Song Z F, Yin K H, et al. Assessments of eco-

logical and health risk induced by antibiotics in source water of a reservoir in a Southern City [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(5): 124-131 (in Chinese)

[14] Chou T C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in

drug combination studies [J]. Pharmacological Reviews, 2006, 58(3): 621-681

- [15] Wang Y, Chen C, Qian Y, et al. Toxicity of mixtures of λcyhalothrin, imidacloprid and cadmium on the earthworm *Eisenia fetida* by combination index (CI)-isobologram method [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2015, 111: 242-247
- [16] Wang Y, Chen C, Qian Y, et al. Ternary toxicological interactions of insecticides, herbicides, and a heavy metal on the earthworm *Eisenia fetida* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2015, 284: 233-240
- [17] Chen K, Zhou J L. Occurrence and behavior of antibiotics in water and sediments from the Huangpu River, Shanghai, China [J]. Chemosphere, 2014, 95: 604-612
- [18] 徐晖. 上海地区水体中抗生素类药物的检测及其环境 行为研究[D]. 上海: 上海大学, 2015: 61-62
 Xu H. Determination of antibiotics in Shanghai and the study of its environmental behavior [D]. Shanghai: Shanghai University, 2015: 61-62 (in Chinese)
- [19] Wang H, Wang N, Wang B, et al. Antibiotics detected in urines and adipogenesis in school children [J]. Environment International, 2016, 89-90: 204-211
- [20] Wang H, Wang N, Wang B, et al. Antibiotics indrinking water in Shanghai and their contribution to antibiotic exposure of school children [J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50(5): 2692-2699
- [21] Wu M, Que C, Tang L, et al. Distribution, fate, and risk assessment of antibiotics in five wastewater treatment plants in Shanghai, China [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23(18): 18055-18063
- [22] OECD. Test No. 201: Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test [S]. Paris: OECD, 2006
- [23] ISO. DIN EN ISO 11348-1-2009 Water quality Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test) - Part 1: Method using freshly prepared bacteria [S]. Geneva: ISO, 2009
- [24] 李翔, 潘力, 王斌. 黄曲霉毒素对费氏弧菌发光的影响
 [J]. 微生物学报, 2011, 51(12): 1669-1674
 Li X, Pan L, Wang B. Influence of aflatoxin on *Vibrio fischeri* luminescence [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(12): 1669-1674 (in Chinese)
- [25] OECD. Test No. 202: Daphnia magna acute immobilization test and reproduction test [S]. Paris: OECD, 2004
- [26] ISO. ISO 15088-2007, Water quality-Determination of the acute toxicity of waste water to zebra fish eggs (*Danio rerio*) [S]. Geneva: ISO, 2007
- [27] Chou T, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect re-

lationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors [J]. Advances in Enzyme Regulation, 1984, 22: 27-55

- [28] Chou T C, Hayball M P. CalcuSyn for Windows. Software for Dose Effect Analysis [CP]. Cambridge: Biosoft Copyright 1996-2005 (CalcuSyn 2).
- [29] EU. Technical guidance document (TGD) on risk assessment of chemical substances following European regulation and directives [R]. Italy: EU, 2003
- [30] 国家环境保护总局. HJ/T 154—2004 新化学物质危害 评估导则 [S]. 北京: 国家环境保护总局, 2004
 State Environmental Protection Administration of China.
 HJ/T 154-2004 The guidelines for harzard evaluation of new chemical substances [S]. Beijing: State Environmental Protection Administration of China, 2004 (in Chinese)
- [31] Kim Y, Choi K, Jung J, et al. Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea [J]. Environment International, 2007, 33(3): 370-375
- [32] 李霞. 氟苯尼考及其类似物对水生生物的毒性效应
 [D]. 广州: 暨南大学, 2010: 51
 Li X. Toxic effects of florfenicol and its analogues to aquatic organisms [D]. Guangzhou: Jinan University, 2010: 51 (in Chinese)
- [33] Isidori M, Lavorgna M, Nardelli A, et al. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms
 [J]. Science of The Total Environment, 2005, 346(1-3): 87-98
- [34] Rosal R, Rodea-Palomares I, Boltes K, et al. Ecotoxicological assessment of surfactants in the aquatic environment: Combined toxicity of docusate sodium with chlorinated pollutants [J]. Chemosphere, 2010, 81(2): 288-293
- [35] 丛永平,姜蕾,王婷,等.典型抗生素二元混合物对明亮发光杆菌的急性联合毒性[J].环境化学,2013(7): 1348-1352
 Cong Y P, Jiang L, Wang T, et al. Acute joint toxicity of binary antibiotic mixtures on *Photobacterium phosphoreum* [J]. Environmental Chemistry, 2013(7): 1348-1352 (in
- Chinese)
 [36] Kołodziejska M, Maszkowska J, Białk-Bielińska A, et al. Aquatic toxicity of four veterinary drugs commonly applied in fish farming and animal husbandry [J]. Chemosphere, 2013, 92(9): 1253-1259
- [37] Cedergreen N, Sørensen H, Svendsen C. Can the joint effect of ternary mixtures be predicted from binary mixture toxicity results? [J]. Science of The Total Environment, 2012, 427-428: 229-237

[38] 周文中,毕可东,邹本革,等. 氟苯尼考与盐酸土霉素
 体外联合抑菌效果研究[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(7):
 201-203

Zhou W Z, Bi K D, Zou B G, et al. Studies on the combined antibacterial activity of florfenicol and oxytetracycline hydrochloride *in vitro* [J]. China Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2011, 38(7): 201-203 (in Chinese)

- [39] Rodea-Palomares I, Petre A L, Boltes K, et al. Application of the combination index (CI)-isobologram equation to study the toxicological interactions of lipid regulators in two aquatic bioluminescent organisms [J]. Water Research, 2010, 44(2): 427-438
- [40] Fu L, Huang T, Wang S, et al. Toxicity of 13 different antibiotics towards freshwater green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and their modes of action [J]. Chemosphere, 2017, 168: 217-222
- [41] 陈晨. 农药残留混合污染联合毒性效应研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014: 42-44
 Chen C. Study on combined effects of pesticide residue mixtures [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2014: 42-44 (in Chinese)
- [42] Li N, Zhang X, Wu W, et al. Occurrence, seasonal variation and risk assessment of antibiotics in the reservoirs in North China [J]. Chemosphere, 2014, 111: 327-335
- [43] 梁惜梅, 施震, 黄小平. 珠江口典型水产养殖区抗生素的污染特征[J]. 生态环境学报, 2013, 22(2): 304-310
 Liang X M, Shi Z, Huang X P. Occurrence of antibiotics in typical aquaculture of the Pearl River Estuary [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2013, 22(2): 304-310 (in Chinese)
- [44] Yan C, Yang Y, Zhou J, et al. Antibiotics in the surface water of the Yangtze Estuary: Occurrence, distribution and risk assessment [J]. Environmental Pollution, 2013, 175: 22-29
- [45] 黄翔峰, 王珅, 陈国鑫, 等. 人工湿地对水产养殖废水
 典型污染物的去除[J]. 环境工程学报, 2016, 10(1): 12-20

Huang X F, Wang K, Chen G X, et al. Typical pollutants removal efficiency from aquaculture wastewater by using constructed wetlands [J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2016, 10(1): 12-20 (in Chinese)

- [46] 闾幸. 生猪养殖废水及地表水中兽用抗生素污染现状 与处理技术研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2013: 38-39
 Lv X. Veterinary antibiotics in swine wastewater and groundwater and processing technology [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2013: 38-39 (in Chinese)
- [47] 柯润辉, 蒋愉林, 黄清辉, 等. 上海某城市污水处理厂

污水中药物类个人护理用品(PPCPs)的调查研究[J]. 生态毒理学报, 2014, 9(6): 1146-1155

Ke R H, Jiang Y L, Huang Q H, et al. Investigative screening of pharmaceuticals in a municipal wastewater treatment plant in Shanghai [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2014, 9(6): 1146-1155 (in Chinese)

[48] Rodea-Palomares I, González-Pleiter M, Martín-Betancor

K, et al. Additivity and interactions in ecotoxicity of pollutant mixtures: Some patterns, conclusions, and open questions [J]. Toxics, 2015, 3(4): 342-369

[49] Marx C, Mühlbauer V, Krebs P, et al. Environmental risk assessment of antibiotics including synergistic and antagonistic combination effects [J]. Science of The Total Environment, 2015, 524-525: 269-279