

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20181023001

朱津辉, 郑泽欣, 李吉平, 等. 脱水红霉素对蛋白核小球藻的生态毒性效应研究[J]. 生态毒理学报, 2019, 14(5): 257-266

Zhu J H, Zheng Z X, Li J P, et al. Ecotoxicological effects of dehydroerythromycin on *Chlorella pyrenoidosa* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2019, 14(5): 257-266 (in Chinese)

脱水红霉素对蛋白核小球藻的生态毒性效应研究

朱津辉, 郑泽欣, 李吉平, 张政, 李威*

南京林业大学南方现代林业协同创新中心, 生物与环境学院, 南京 210037

收稿日期: 2018-10-23 录用日期: 2019-01-28

摘要: 脱水红霉素是环境中普遍存在的一种大环内酯类抗生素, 其生态毒性效应尚不明确。因此, 以蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)为受试生物, 研究了脱水红霉素对绿藻的生长、叶绿素 a 含量、抗氧化酶活性和丙二醛(MDA)含量的影响。结果表明, 脱水红霉素对蛋白核小球藻的生长具有抑制作用, 且随暴露浓度的升高而增强。脱水红霉素对蛋白核小球藻的 96 h 比生长率半数抑制浓度(E_rC_{50})和生长量半数抑制浓度(E_yC_{50})分别为 0.267 和 0.117 mmol·L⁻¹, 属于中-低毒物质。脱水红霉素暴露对蛋白核小球藻的叶绿素 a 含量、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和 MDA 含量具有重要影响。叶绿素 a 含量随脱水红霉素浓度升高而降低; SOD 酶活性升高, 但与脱水红霉素浓度之间不存在剂量效应关系, CAT 酶活性和 MDA 含量随脱水红霉素升高而升高, 说明脱水红霉素对蛋白核小球藻具有氧化胁迫效应。暴露 96 h 后, 藻液中脱水红霉素的去除率随其初始浓度增加而增加, 在脱水红霉素初始浓度为 0.87 mmol·L⁻¹时, 其去除率可达到 43%。研究结果可为脱水红霉素的生态风险评估提供理论依据。

关键词: 抗生素; 脱水红霉素; 蛋白核小球藻; 生态毒性; 抗氧化酶活性

文章编号: 1673-5897(2019)5-257-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Ecotoxicological Effects of Dehydroerythromycin on *Chlorella pyrenoidosa*

Zhu Jinhui, Zheng Zexin, Li Jiping, Zhang Zheng, Li Wei*

Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, College of Biology and the Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China

Received 23 October 2018 accepted 28 January 2019

Abstract: Dehydroerythromycin (DERY) is a common macrolide antibiotic, which is ubiquitous in aquatic environment. However, its ecotoxicological effects are still not clear. Therefore, the effects of DERY on the growth, chlorophyll a, antioxidant enzyme activities and malonaldehyde (MDA) content of *Chlorella pyrenoidosa* were investigated in this paper. The results showed that DERY inhibited the growth of *C. pyrenoidosa*, and the inhibitive effect increased with the increase of DERY concentration. The 96 h median effective concentration of DERY on the specific growth rate (E_rC_{50}) and yield (E_yC_{50}) of *C. pyrenoidosa* were 0.267 and 0.117 mmol·L⁻¹, respectively. DERY was classified as medium to low toxic substance. DERY showed important effects on the chlorophyll a content, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities and MDA concentration. The concentration of chlo-

基金项目: 国家自然科学基金项目(31700441); 江苏省自然科学基金青年项目(BK20160930); 中国博士后基金面上项目(2016M590461); 大学生创新训练计划项目(2016NFUSPITP211)

作者简介: 朱津辉(1997—), 男, 本科, 研究方向为污染生态学, E-mail: 331374049@qq.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: uwliwei@163.com

rophyll a decreased with the increase of DERY concentration. SOD activities increased during DERY exposure, but no dose-response relationship with the DERY concentration was observed; CAT activities and MDA content increased with the increase of DERY concentration, which demonstrated that DERY showed oxidative stress on *C. pyrenoidosa*. After exposed for 96 h, the removal of DERY in algae solution increased with the increase of its initial concentration, with the removal of 43% at DERY concentration of $0.87 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$. The results could provide theoretical basis for the ecological risk assessment of DERY.

Keywords: antibiotics; dehydroerythromycin; *Chlorella pyrenoidosa*; ecological toxicity; antioxidant enzyme activity

近年来,抗生素的环境暴露、迁移转化及生态风险引起了人们的广泛关注^[1-4]。我国是抗生素的生产和使用大国。2013年,我国抗生素的总使用量为16.2万t,其中大环内酯类抗生素的用量为4.2万t,占总抗生素使用量的1/4^[5]。大环内酯类抗生素的大量使用导致其连续不断地进入环境中,其已在污水处理厂出水、地表水甚至于饮用水中检出^[6-10]。其中,红霉素、罗红霉素和克拉霉素是最常检出的抗生素,红霉素和克拉霉素已被欧盟列为优先监测污染物^[11]。

以往研究已对红霉素的生态毒性进行了较为充分的探索^[12-17]。如González-Pleiter等^[12]研究发现,红霉素对羊角月牙藻(*Pseudokirckneriella subcapitata*)的半数抑制浓度(EC_{50})为 $(0.35 \pm 0.03) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。刘滨扬等^[13]发现, $0.18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的红霉素即可使羊角月牙藻光合作用综合性能指数下降69.7%。刘臻^[14]发现,红霉素对热带爪蟾的14d的半数致死浓度(LC_{50})为 $253 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Meinertz等^[15]研究发现,硫氰酸红霉素对大型蚤的最大无作用浓度为 $248 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。红霉素在酸性条件下不稳定,口服后易被胃酸破坏,生成脱水红霉素,在环境中检测到的红霉素多为脱水红霉素^[18-19],如周志洪等^[19]发现,脱水红霉素在珠江广州段水体中的检出频率可达到100%,其在枯水期和丰水期的平均浓度分别为 $213 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $65.8 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$,具有较高的生态风险。但是,目前关于脱水红霉素的生态毒性效应尚不明确。

绿藻是水生生态系统的初级生产力,其初级生产量和种类多样性直接影响着水生生态系统的健康状况。同时,藻类对污染物的耐受性较低,比水体中的甲壳类动物以及鱼类更为敏感,往往高出几个数量级^[20]。蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)属于绿藻门,小球藻属,是游离单细胞藻,直径 $3 \sim 5 \text{ } \mu\text{m}$,球形或椭圆形,繁殖快,便于培养和试验,藻液分布均匀不易沉降,与污染物的接触更充分,是国内外常用的污染物毒性测试的受试生物之一^[21]。

综上所述,本论文拟以脱水红霉素为研究对象,以蛋白核小球藻为受试生物,通过研究脱水红霉素对蛋白核小球藻的生长、叶绿素含量和抗氧化酶活性的影响,探讨脱水红霉素的生态毒性效应,为其生态风险评估提供依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料

蛋白核小球藻(编号FACHB-11)购于中国科学院武汉水生生物研究所。

红霉素($\text{C}_{37}\text{H}_{67}\text{NO}_{13}$,分子量733.9,纯度>98.0%)购于百灵威科技有限公司。脱水红霉素($\text{C}_{37}\text{H}_{65}\text{NO}_{12}$,分子量715.9)的配制方法^[22]为:称取1.835g的红霉素,溶于用硫酸调节pH为3的超纯水中,12h后用氢氧化钠调节pH至7,定容至50mL,配制得到 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的脱水红霉素母液。硼酸、柠檬酸、硫酸镁(七水)、氯化钙(二水)、磷酸氢二钾和柠檬酸铁铵购于国药集团化学试剂有限公司;四水合氯化锰、硝酸钠购于南京化学试剂股份有限公司;无水硫酸钠、乙二醇四乙酸二钠和无水碳酸钠购于西陇化工股份有限公司。五水合硫酸铜购自广州光华科技股份有限公司;钼酸钠(二水合物)购于上海麦克林生化科技有限公司。实验中用到的化学药品均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白核小球藻的预培养

在无菌条件下将藻种接种至GB11培养基中,放置于光照培养箱中培养至对数生长期,并进一步扩大培养。培养条件为:温度 $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$,光照强度 3000 lux ,光暗比为12h:12h。每天至少震荡3次($15 \text{ min} \cdot \text{次}^{-1}$)。预培养3代,镜检细胞正常,待藻细胞进入对数生长期进行实验。

1.2.2 脱水红霉素对蛋白核小球藻的急性毒性试验

脱水红霉素对蛋白核小球藻的急性毒性试验参照《化学品藻类生长抑制试验》(GB/T 21805—

2008)^[23]进行。根据预实验结果,确定正式实验中脱水红霉素浓度梯度为0、0.14、0.2、0.29、0.42、0.60和0.87 mmol·L⁻¹。采用灭菌后的BG11培养基,在250 mL的锥形瓶中配制相应浓度的脱水红霉素溶液,加入处于对数生长期的蛋白核小球藻母液10 mL,蛋白核小球藻的初始细胞浓度约为0.8×10⁶ cells·mL⁻¹,培养液总体积为100 mL。每个浓度设3个平行。同时由于配制脱水红霉素母液过程中会引入硫酸钠,为了了解硫酸钠盐对蛋白核小球藻的影响,根据配制脱水红霉素时加入的硫酸钠的量,设置低盐和高盐2个对照组,其硫酸钠的浓度分别为9.92和43.15 mmol·L⁻¹,相当于0.2 mmol·L⁻¹和0.87 mmol·L⁻¹脱水红霉素处理组中添加的盐分,培养条件同上。实验开始后分别于24、48、72和96 h取样测定藻细胞浓度。

藻细胞浓度采用镜检和分光光度法相结合的方法进行测定,通过显微镜用血球计数板进行藻类计数,并在波长680 nm下测定藻类的吸光值,建立蛋白核小球藻细胞密度(y)和吸光度(x)之间线性关系方程为 $y = (15.055x + 0.5417) \times 10^6$,相关系数 r^2 为0.991。

1.2.3 脱水红霉素对蛋白核小球藻的生理生化指标的影响

叶绿素a含量的测定:根据欧阳少虎^[24]的测定方法并适当改进,取暴露96 h后的藻液30 mL放入50 mL离心管中,10 000 r·min⁻¹离心15 min,弃去上清液。加入20 mL 95%无水乙醇,在涡旋混匀器上充分混匀。4℃冰箱中黑暗处理24 h,以充分提取蛋白核小球藻的叶绿素。24 h后,冷冻高速离心(10 000 r·min⁻¹、4℃)15 min,取上清液测定其在波长665 nm和649 nm下的吸光度,代入公式(1)计算叶绿素a的浓度。

$$C_a = (13.7OD_{665} - 5.76OD_{649})/4 \quad (1)$$

提取粗酶液:取暴露96 h后的藻液30 mL放入50 mL离心管中,4℃、6 000 r·min⁻¹下离心20 min,弃去上清液,加入预冷的0.1 mol·L⁻¹ pH为7.0~7.4的磷酸盐缓冲液20 mL,在超声细胞破碎仪中破碎细胞30 min。破碎完成转移至干净离心管,在4℃、6 000 r·min⁻¹条件下离心20 min,取上清液用于测量酶活性。

蛋白质含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性和丙二醛(MDA)含量按照南京建成生物工程公司试剂盒说明书测定。

1.3 脱水红霉素浓度的测定

暴露96 h后,取10 mL藻液,6 000 r·min⁻¹离心20 min后,取上清液测定脱水红霉素的剩余浓度。脱水红霉素的剩余浓度采用高效液相色谱-质谱联用仪(HPLC-LTQ-orbitrap XL MS,赛默飞,德国)来测定。液相条件为:色谱柱Agilent Poroshell 120 EC-C18柱(100 mm×2.1 mm, 2.7 μm);流动相A为体积比为1:1的甲醇/乙腈溶液,流动相B为10 mmol·L⁻¹的乙酸铵溶液(加入0.05%的乙酸),梯度洗脱程序为0 min时45% A,14 min时80% A,17 min时80% A,17.2 min时45% A,20 min时45% A,流速0.2 mL·min⁻¹,进样量5 μL。质谱条件为:电喷雾离子源,正离子模式,一级和二级模式扫描。离子源温度350℃,毛细管温度325℃,鞘气流速40 arb,辅助气流速10 arb,喷雾电压3.5 kV,毛细管电压9 V,透镜电压100 V。一级全扫质量扫描范围为 m/z 100~1 000,分辨率30 000;二级质谱采用数据依赖性扫描,在一级扫描基础上选取其前三强进行诱导碰撞解离(CID)获取其二级质谱数据。根据脱水红霉素母离子($m/z=716.4569$)和子离子($m/z=558.3651$)来定性和定量。

1.4 数据统计与分析

采用SPSS19.0和Origin2018对实验数据进行统计分析并作图。运用概率单位回归分析法,计算蛋白核小球藻的24、48、72和96 h的比生长率半数抑制浓度(E_rC_{50})和生长量半数抑制率(E_yC_{50})。采用单因素方差分析法(one-way ANOVA)的Levene检验,对数据进行方差齐性假设检验,以0.05为显著性水平的临界值。数据满足齐性要求采用LSD检验,数据不满足齐性要求则采用Dunnett's T3检验组间的差异显著性。

2 结果(Results)

2.1 脱水红霉素对蛋白核小球藻生长的影响

硫酸盐组(Na_2SO_4)和不同浓度的脱水红霉素对蛋白核小球藻的生长量和比生长率的抑制率如图1所示。由图1可知,硫酸盐组对蛋白核小球藻的生长无明显影响,低盐组和高盐组在不同的暴露条件下都未表现出显著性差异。脱水红霉素对蛋白核小球藻生长量和比生长率的抑制率随脱水红霉素浓度的增加和暴露时间的延长而增加,表现出明显的时间-效应关系和剂量-效应关系。如0.14 mmol·L⁻¹的脱水红霉素处理48 h和96 h后,蛋白核小球藻的生长量

抑制率分别为 15.0% 和 51.3%; $0.60\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的脱水红霉素处理 48 h 和 96 h 后,蛋白核小球藻的生长量抑制率分别为 70.1% 和 88.8%。脱水红霉素处理组与硫酸盐组相比,除了 $0.14\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组暴露 24 h 外,其他都具有显著性差异。不同浓度的脱水红霉素处理组,除了部分相邻浓度组别不具有显著

性差异,大部分处理组都具有显著性差异(图 1)。
根据概率单位法回归分析,计算出不同暴露时间下,脱水红霉素对蛋白核小球藻的 E_rC_{50} 和 E_yC_{50} 如表 1 所示。脱水红霉素对蛋白核小球藻的 E_rC_{50} 和 E_yC_{50} 均随暴露时间的增加而减少,在 24 h 时, E_rC_{50} 和 E_yC_{50} 分别为 2.107 和 $1.444\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,当

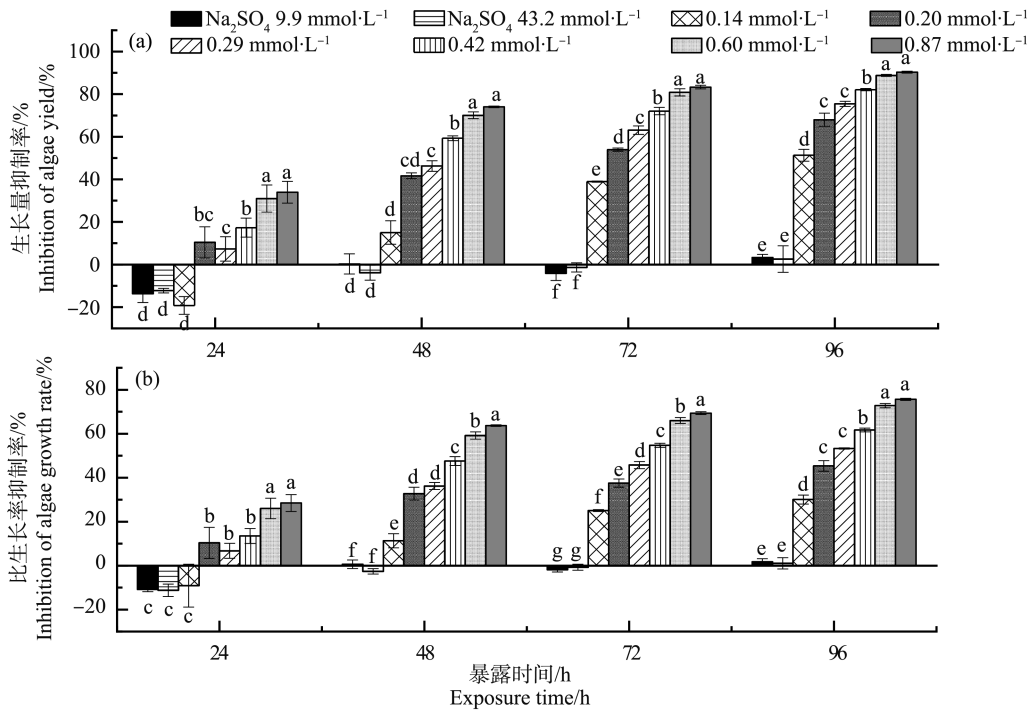


图 1 脱水红霉素对蛋白核小球藻的生长量抑制率和比生长率抑制率

Fig. 1 Inhibition of dehydroerythromycin on the yield and growth rate of *Chlorella pyrenlidosa*

表 1 脱水红霉素对蛋白核小球藻的生长率和生长量的半数抑制浓度 (E_rC_{50} 和 E_yC_{50})

Table 1 Median effective concentration (E_rC_{50} and E_yC_{50}) of dehydroerythromycin on the specific growth rate and yield of *Chlorella pyrenlidosa*

指标	暴露时间/h	回归方程	E_yC_{50}/E_rC_{50}	95% 置信限/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	R^2
Index	Exposure time/h	Regression equation	/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	95% Confidence interval/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	
生长量 Yield	24	$y=1.673x-0.267$	1.444	0.992 ~ 3.404	0.837
	48	$y=1.912x+0.903$	0.337	0.301 ~ 0.376	0.911
	72	$y=1.603x+1.167$	0.187	0.164 ~ 0.209	0.978
	96	$y=1.631x+1.522$	0.117	0.095 ~ 0.136	0.969
比生长率 Specific growth rate	24	$y=1.427x-0.462$	2.107	1.237 ~ 5.409	0.782
	48	$y=1.741x+0.565$	0.474	0.426 ~ 0.535	0.915
	72	$y=1.492x+0.676$	0.352	0.321 ~ 0.387	0.981
	96	$y=1.526x+0.875$	0.267	0.241 ~ 0.293	0.974

注: x 为脱水红霉素的浓度对数, y 为抑制率概率单位, R^2 表示回归方程的可决系数; E_yC_{50} 和 E_rC_{50} 分别表示生长量半数抑制浓度和比生长率半数抑制浓度。

Note: x represents the log value of concentration of dehydroerythromycin, and y represents the probit of inhibition rate; R^2 represents the coefficient of determination of the regression equation; E_yC_{50}/E_rC_{50} represents median effective concentration of dehydroerythromycin on the yield and specific growth rate of *C. pyrenlidosa*, respectively.

暴露时间延长到 96 h 时, E_rC_{50} 和 E_yC_{50} 分别降低为 0.267 和 0.117 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 这说明脱水红霉素的暴露时间越长, 对蛋白核小球藻的毒性越大。值得注意的是, 在不同暴露时间条件下, 脱水红霉素对蛋白核小球藻的 E_yC_{50} 都小于 E_rC_{50} , 说明蛋白核小球藻的生长量抑制率是更敏感的指标。

2.2 脱水红霉素对蛋白核小球藻生理生化指标的影响

2.2.1 叶绿素 a 含量

不同浓度脱水红霉素暴露 96 h 后, 蛋白核小球藻的叶绿素 a 含量变化如图 2 所示。低盐组和高盐组都造成了蛋白核小球藻叶绿素 a 含量的降低, 分别为对照组的 69% 和 65%。但低盐组和高盐组与对照组都无显著性差异。不同浓度的脱水红霉素均抑制了蛋白核小球藻叶绿素 a 的合成。在脱水红霉素浓度为 0.14 和 0.87 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 暴露 96 h 后, 蛋白核小球藻的叶绿素 a 含量分别为对照组的 38% 和 11%, 为低盐组的 55% 和 16%, 为高盐组的 59% 和 17%。不同浓度的脱水红霉素处理组与对照组间均存在显著性差异。除 0.14 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组与低盐组无显著性差异外, 不同浓度的脱水红霉素处理组与硫酸盐组都具有显著性差异。

2.2.2 抗氧化酶活性

脱水红霉素对蛋白核小球藻 SOD 和 CAT 酶活性的影响如图 3 所示。由图 3(a) 可知, 盐分导致蛋白核小球藻的 SOD 酶活性略微降低, 低盐组的 SOD 酶活性为空白对照组的 89%, 且两者之间无显

著性差异; 高盐组的 SOD 酶活性为空白对照组的 80%, 其与空白对照组有显著性差异。脱水红霉素的存在均导致 SOD 酶活性增强, 可达到空白对照组的 1.18 ~ 1.34 倍, 不同浓度脱水红霉素组 SOD 酶活性与空白对照组和硫酸盐组相比均具有显著性差异。

如图 3(b) 所示, 硫酸盐组和脱水红霉素处理组都导致了蛋白核小球藻 CAT 酶活性的增加。低盐组和高盐组中, 蛋白核小球藻的 CAT 酶活性可达到空白对照组的 2.81 倍和 2.03 倍, 与空白对照组具有显著性差异。蛋白核小球藻的 CAT 酶活性随脱水红霉素浓度增加而增加, 在脱水红霉素浓度为 0.14 和 0.87 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 蛋白核小球藻的 CAT 活性分别为对照组的 1.79 倍和 3.89 倍。在脱水红霉素浓度为 0.2 ~ 0.6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 蛋白核小球藻的 CAT 活性与低盐组无显著性差异。脱水红霉素浓度为 0.14 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 蛋白核小球藻的 CAT 活性与高盐组无显著性差异, 其余脱水红霉素处理组与高盐组具有显著性差异。

2.2.3 MDA 含量

脱水红霉素对蛋白核小球藻 MDA 含量的影响如图 4 所示。硫酸盐组和脱水红霉素组都导致了 MDA 含量的增加。低盐组和高盐组的 MDA 含量是空白对照组的 1.70 倍和 1.80 倍, 且与对照组具有显著性差异。蛋白核小球藻的 MDA 含量随脱水红霉素浓度增加先增大后降低, 在脱水红霉素浓度为 0.6 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 蛋白核小球藻的 MDA 含量可达到对

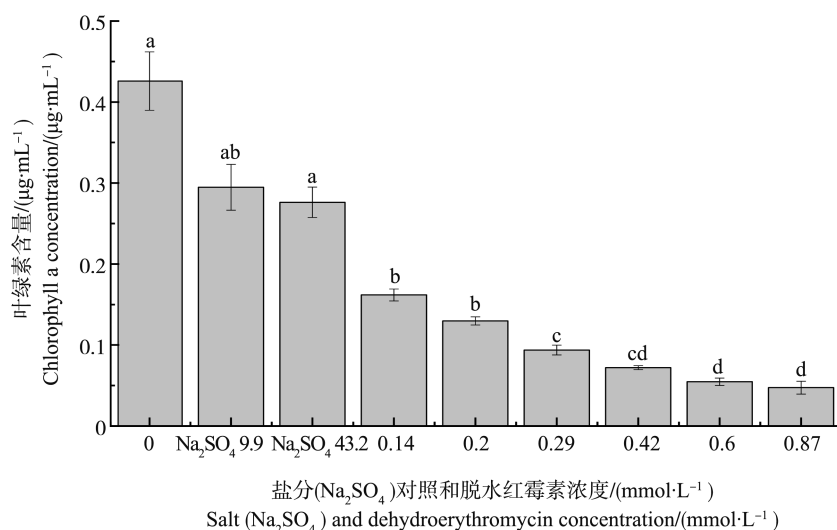


图2 脱水红霉素暴露 96 h 对蛋白核小球藻叶绿素 a 含量的影响

Fig. 2 Effect of dehydroerythromycin on the chlorophyll a content of *Chlorella pyrenoidosa* after exposure for 96 h

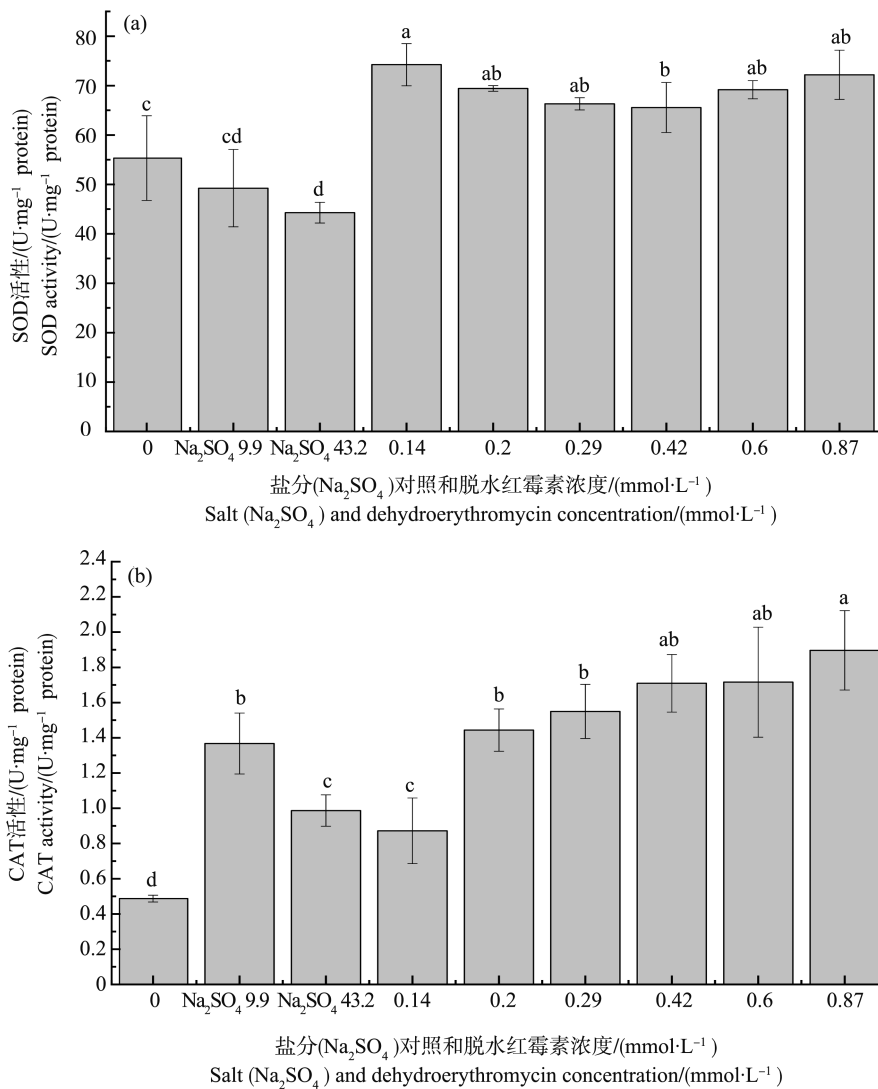


图3 脱水红霉素暴露96 h对蛋白核小球藻的超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性的影响

Fig. 3 Effect of dehydroerythromycin on the superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities of *Chlorella pyrenoidosa* after exposure for 96 h

照组的3.11倍,当脱水红霉素浓度升高到0.87 mmol·L⁻¹时,蛋白核小球藻的MDA含量降低,为对照组的2.58倍。脱水红霉素处理组与空白对照组都有显著性差异,浓度为0.14 mmol·L⁻¹的脱水红霉素处理组与硫酸盐组无显著性差异,而其他浓度的脱水红霉素处理组与硫酸盐组均具有显著性差异。

2.3 藻液中脱水红霉素浓度变化

不同浓度的脱水红霉素暴露96 h后,藻液中脱水红霉素的剩余浓度占其初始浓度的百分比如图5所示。总体上,藻液中脱水红霉素的剩余浓度与其初始浓度之比随着脱水红霉素初始浓度的增加而降低,说明脱水红霉素的去除量随脱水红霉素初始浓度的增加而增加。在脱水红霉素浓度为0.14 mmol·

L⁻¹时,藻液中脱水红霉素的剩余量为0.135 mmol·L⁻¹,剩余的脱水红霉素浓度为其初始浓度的96.2%;当脱水红霉素的初始浓度增加到0.87 mmol·L⁻¹时,藻液中脱水红霉素的剩余浓度为0.493 mmol·L⁻¹,剩余的脱水红霉素浓度为其初始浓度的56.6%。

3 讨论(Discussion)

红霉素的生态毒性效应得到了较为充分的研究,普遍认为红霉素的生态毒性较高,在环境浓度水平下就可能引起可观察到的不利效应。González-Pleiter等^[12]研究发现,红霉素对羊角月牙藻(*Pseudokirchneriella subcapitata*)的EC₅₀为(0.35±0.03) mg·L⁻¹,对项圈藻(*Anabaena*)的EC₅₀为(0.022±0.003)

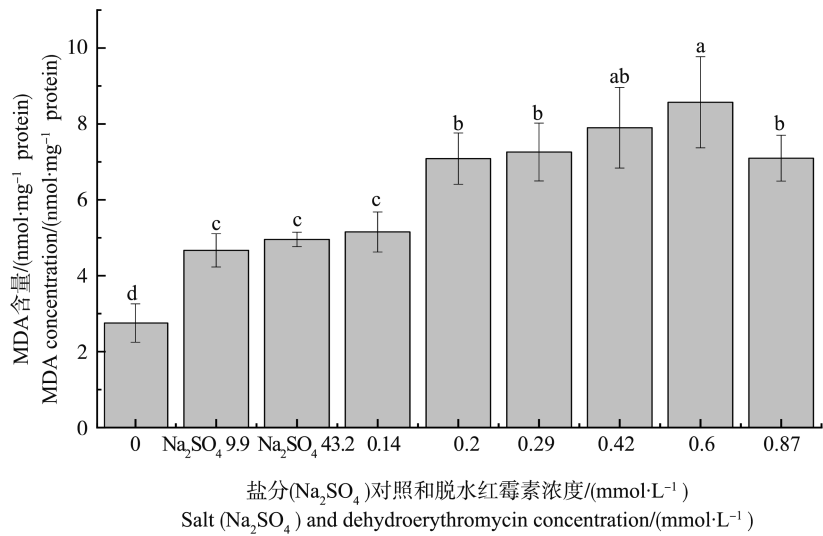


图 4 脱水红霉素暴露 96 h 对蛋白核小球藻的丙二醛 (MDA) 含量的影响

Fig. 4 Effect of dehydroerythromycin on the malonaldehyde (MDA) content of *Chlorella pyrenoidosa* after exposure for 96 h

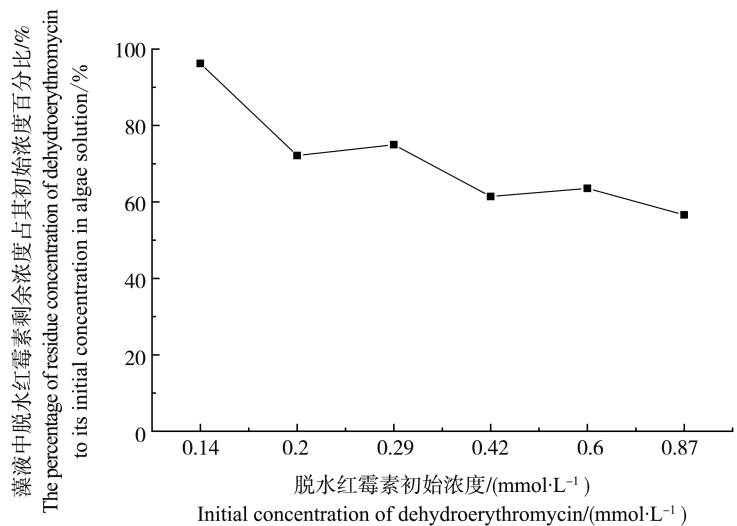


图 5 暴露 96 h 后,藻液中脱水红霉素的剩余浓度与其初始浓度的关系

Fig. 5 The relationship between the residual concentration of dehydroerythromycin and its initial concentration in algae solution after exposure time of 96 h

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Eguchi 等^[16]研究发现,红霉素对羊角月牙藻(*Selenastrum capricornutum*)的 EC_{50} 值为 $0.0366 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,对普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)的 EC_{50} 为 $33.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。El-Bassat 等^[17]研究发现,红霉素对普通小球藻(*Chlorella vulgaris*)的 24 h 半数致死浓度(LC_{50})值为 $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,对尾草履虫(*Paramecium caudatum*)的 48 h- LC_{50} 值是 $16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本研究中,脱水红霉素对蛋白核小球藻生长量和比生长率的 96 h- EC_{50} 值分别为 0.267 和 $0.117 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,即 83.76

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $191.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,明显高于红霉素对绿藻的毒性数据,说明脱水红霉素的生态毒性低于红霉素。水和废水检测方法^[25]中规定,藻类生长抑制试验对毒物毒性的分级标准为:96 h- $\text{EC}_{50} < 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时为极高毒,在 $1 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间为高毒,在 $10 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间为中毒, $>100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时为低毒,脱水红霉素对于蛋白核小球藻属于中-低毒物质。

叶绿素是各种浮游藻类中广泛存在的天然色素,是客观反映植物利用光照能力的一类重要指标,

往往可以作为判断植物光合生理能力、反映环境胁迫状况的依据^[26]。因此,叶绿素含量的变化趋势可以反映蛋白核小球藻在各发育阶段的生长状态。暴露于脱水红霉素 96 h 后,蛋白核小球藻细胞的叶绿素含量显著降低,且随着脱水红霉素浓度的增加而降低,表现出明显的剂量-效应关系,这与红霉素对羊角月牙藻叶绿素的影响是一致的^[27]。研究表明,红霉素作为蛋白质合成抑制剂,可以有效抑制原核生物基因的表达,而叶绿体在基因表达等方面与原核生物具有很高的相似性,因此,红霉素可能对叶绿体基因表达有抑制作用^[27-29]。而脱水红霉素具有与红霉素相似的结构,其对叶绿素 a 的影响可能也是因为抑制了叶绿体基因的表达,阻碍了叶绿素的合成造成的。

SOD-CAT 系统是细胞对抗氧化中毒的第一道防线^[30],SOD 是一种以自由基为基质的重要过氧化物酶,它可将 $\cdot\text{O}_2$ 转化为 H_2O_2 和 O_2 ,防止产生超氧化物阴离子自由基。CAT 能催化 H_2O_2 分解为 O_2 和 H_2O ,缓解由 H_2O_2 带来的氧化危害。SOD 和 CAT 代表了氧化和抗氧化系统,是有机体为了抵抗氧自由基对机体造成伤害的不可缺少的过程^[31]。在本研究中,脱水红霉素的暴露导致 SOD 酶和 CAT 酶活性的增加,这可能是因为脱水红霉素的暴露对蛋白核小球藻产生了氧化胁迫,从而生成了过量的超氧化物,而超氧化物是信号传递的关键性原料,激活了现有的 SOD 酶库,或者提高了编码 SOD 的基因表达^[32-35]。这和已有的研究结果“药品类有机污染物能诱导 SOD 酶活性和 CAT 酶活性增加”是一致的^[36]。Kurama 等^[37]也研究发现,大量产生 SOD 是植物保护叶绿体免受有机污染物损伤的一种机制。SOD 酶活性的提高使超氧化物更多地转化为 H_2O_2 ,进而激活了 CAT 酶活性,以清除细胞体内过量的 H_2O_2 ^[38],因此,CAT 酶活性的增加可以被当作细胞对抗氧化作用的一种适应性策略。

MDA 是膜脂中的脂肪酸的一种过氧化产物,也是脂质过氧化的重要指标,常用来反映环境污染胁迫对藻细胞带来的过氧化损害^[39-40]。研究表明,暴露于螺旋霉素和四环素等有机污染物时,可导致植物细胞中 MDA 含量显著升高^[41-42]。本研究中,脱水红霉素暴露也导致了 MDA 含量的升高,这说明脱水红霉素诱导的 SOD 和 CAT 酶活性升高并不足以清除细胞体内的氧化自由基,脱水红霉素对藻

细胞产生氧化胁迫,并导致过氧化产物 MDA 的积累,影响了细胞膜的完整性,导致细胞功能的不可逆损伤^[27],并进而影响到藻的生长和生理生化功能。

值得注意的是,尽管盐分的存在未影响蛋白核小球藻的生长,但是却对其生理生化响应产生了一定的影响。硫酸盐组导致叶绿素 a 含量略微降低,与空白组之间无显著性差异。这可能是因为硫酸钠能抑制叶绿体中 PS II 活动中的电子转移,导致 PS II 中的量子产率也相应的受到抑制,影响了叶绿素的合成^[43]。硫酸盐组导致了 SOD 酶活性略微降低,CAT 酶活性和 MDA 含量升高,这说明过量的硫酸钠盐分也会对绿藻产生氧化胁迫^[44]。

暴露 96 h 后,藻液中脱水红霉素的去除率随其初始浓度增加而增高,在脱水红霉素浓度为 $0.87\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,脱水红霉素的去除率可达到 43%。由于脱水红霉素难以水解和生物降解^[45],其在藻液中的消除可能主要是由于蛋白核小球藻的表面吸附、吸收以及代谢作用,但这 3 种途径对脱水红霉素去除率的贡献,以及脱水红霉素在细胞体内的积累、代谢过程及其毒作用机理还待于进一步的研究。

通讯作者简介:李威(1982—),女,博士,副教授,研究方向为新型污染物的环境转化及其生态毒性效应。

参考文献 (References):

- [1] 张国栋,董文平,刘晓晖,等.我国水环境中抗生素赋存、归趋及风险评估研究进展[J].环境化学,2018,37(7):1491-1500
Zhang G D, Dong W P, Liu X H, et al. Occurrence, fate and risk assessment of antibiotics in water environment of China [J]. Environmental Chemistry, 2018, 37(7): 1491-1500 (in Chinese)
- [2] Bu Q W, Wang B, Huang J, et al. Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment in China: A review [J]. Journal of Hazardous Materials, 2013, 262: 189-211
- [3] Grenni P, Ancona V, Caracciolo A B. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review [J]. Microchemical Journal, 2018, 136: 25-39
- [4] Brandt K K, Amezcua A, Bckhaus T, et al. Ecotoxicological assessment of antibiotics: A call for improved consideration of microorganisms [J]. Environment International, 2015, 85: 189-205
- [5] 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 and Technology*, 2015, 49: 6772-6782
- [6] 闫幸, 余卫娟, 兰亚琼, 等. 嘉兴市地表水中兽用抗生素的污染现状调查[J]. *环境科学*, 2013, 34(9): 3368-3373
- Lv X, Yu W J, Lan Y Q, et al. A study on the veterinary antibiotics contamination in groundwater of Jiaxing [J]. *Environmental Science*, 2013, 34(9): 3368-3373 (in Chinese)
- [7] 李嘉, 张瑞杰, 王润梅, 等. 小清河流域抗生素污染分布特征与生态风险评估[J]. *农业环境科学学报*, 2016, 35(7): 1384-1391
- Li J, Zhang R J, Wang R M, et al. Distribution characteristics and ecological risk assessment of antibiotic pollution in Xiaoqing River watershed [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(7): 1384-1391 (in Chinese)
- [8] 周佳虹, 张翔宇, 李茹莹. 抗生素在污水处理系统中的迁移分布研究进展[J]. *环境科学与技术*, 2017, 40(8): 77-86
- Zhou J H, Zhang X Y, Li R Y. Research progress of distribution and migration of antibiotics in wastewater treatment system [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 40(8): 77-86 (in Chinese)
- [9] 张练, 吴维, 李楠, 等. 供水管网中抗生素污染研究[J]. *中国给水排水*, 2017, 33(11): 39-43
- Zhang L, Wu W, Li N, et al. Occurrence of antibiotics in drinking water distribution networks [J]. *China Water & Wastewater*, 2017, 33(11): 39-43 (in Chinese)
- [10] 刘鹏霄. 城市污水处理厂中痕量抗生素的归趋及其减排技术研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2014: 38-40
- Liu P X. Study on the fate of trace antibiotics in municipal wastewater treatment plants and technologies to reduce their discharge [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2014: 38-40 (in Chinese)
- [11] Barbosa M O, Moreira N F F, Ribeiro A R, et al. Occurrence and removal of organic micropollutants: An overview of the watch list of EU Decision 2015/495 [J]. *Water Research*, 2016, 94: 257-279
- [12] González-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
- [13] 刘滨扬, 刘蔚秋, 陈菊芳, 等. 3种抗生素对羊角月牙藻次生代谢的影响[J]. *应用与环境生物学报*, 2010, 16(6): 765-769
- Liu B Y, Liu W Q, Chen J F, et al. Effects of three antibiotics on the secondary metabolism of *Selenastrum capricornutum* [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2010, 16(6): 765-769 (in Chinese)
- [14] 刘臻. 典型抗生素对热带爪蟾胚胎生态毒性的研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2012: 18-20
- Liu Z. Ecological toxicity of selected antibiotics on the embryo of *Xenopus* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012: 18-20 (in Chinese)
- [15] Meinertz J R, Schreier T M, Bernardy J A, et al. Chronic toxicity of diphenhydramine hydrochloride and erythromycin thiocyanate to daphnia, *Daphnia magna*, in a continuous exposure test system [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2010, 85(5): 447-451
- [16] Eguchi K, Nagase H, Ozawa M, et al. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae [J]. *Chemosphere*, 2004, 57(11): 1733-1738
- [17] El-Bassat R A, Touliabah H E, Harisa G I. Toxicity of four pharmaceuticals from different classes to isolated plankton species [J]. *African Journal of Aquatic Science*, 2012, 37(1): 71-80
- [18] 徐维海, 张干, 邹世春, 等. 香港维多利亚港和珠江广州河段水体中抗生素的含量特征及其季节变化[J]. *环境科学*, 2006, 27(12): 2458-2462
- Xu W H, Zhang G, Zou S C, et al. Occurrence and seasonal change of antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China [J]. *Environmental Science*, 2006, 27(12): 2458-2462 (in Chinese)
- [19] 周志洪, 赵建亮, 魏晓东, 等. 珠江广州段水体抗生素的复合污染特征及其生态风险[J]. *生态环境学报*, 2017, 26(6): 1034-1041
- Zhou Z H, Zhao J L, Wei X D, et al. Co-occurrence and ecological risk of antibiotics in surface water of Guangzhou section of Pearl River [J]. *Ecology and Environmental Science*, 2017, 26(6): 1034-1041 (in Chinese)
- [20] 杨弯弯, 武氏秋贤, 吴亦潇, 等. 恩诺沙星和硫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, Wu T H, 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)
- [21] 陈琼, 张瑾, 李小猛, 等. 几种抗生素对蛋白核小球藻的时间毒性微板分析法[J]. *生态毒理学报*, 2015, 10(2): 190-197
- Chen Q, Zhang J, Li X M, et al. Time-dependent microplate toxicity analysis (T-MTA) of several antibiotics to *Chlorella pyrenoidosa* [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2015, 10(2): 190-197 (in Chinese)
- [22] 闭凤丽, 李志广, 刘波, 等. 南方某地区水体抗生素含量及风险评估[J]. *环境化学*, 2018, 37(3): 621-624
- [23] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 中国国

- 家标准化管理委员会. GB/T21805—2008 化学品 藻类生长抑制试验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008
- [24] 欧阳少虎. 三种碳纳米材料对小球藻的毒性效应及其机理研究[D]. 天津: 南开大学, 2016: 15-16
- Ouyang S H. The toxic effects and mechanism of three carbonaceous nanomaterials on *Chlorella vulgaris* [D]. Tianjin: Nankai University, 2016: 15-16 (in Chinese)
- [25] 国家环境保护局. 水和废水监测分析方法(第四版)[M]. 北京: 环境科学出版社, 2002: 741-742
- [26] 刘碧云, 周培疆, 李佳洁, 等. 丙体六六六对斜生栅藻生长及光合色素和膜脂过氧化影响的研究[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(1): 204-207
- Liu B Y, Zhou P J, Li J J, et al. Effects of γ -HCH on the growth and photosystem and lipid peroxidation of *Scenedesmus obliquus* kütz [J]. Journal of Agro-Environmental Science, 2006, 25(1): 204-207 (in Chinese)
- [27] Liu B Y, Nie X P, Liu W Q, et al. Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole on photosynthetic apparatus in *Selenastrum capricornutum* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2011, 74(4): 1027-1035
- [28] Halling-Sørensen B. Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming [J]. Chemosphere, 2000, 40(7): 731-739
- [29] Kasai K, Kanno T, Endo Y, et al. Guanosine tetra- and pentaphosphate synthase activity in chloroplasts of a higher plant: Association with 70S ribosomes and inhibition by tetracycline [J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(19): 5732-5741
- [30] Barata C, Navarro J C, Varo I, et al. Changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in *Daphnia magna* during the aging process [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, 2004, 140(1): 81-90
- [31] Tripathi B N, Mehta S K, Amar A, et al. Oxidative stress in *Scenedesmus* sp. during short- and long-term exposure to Cu^{2+} and Zn^{2+} [J]. Chemosphere, 2005, 62(4): 538-544
- [32] Xie X J, Zhou Q X, Lin D S, et al. Toxic effect of tetracycline exposure on growth, antioxidative and genetic indices of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2011, 18(4): 566-575
- [33] Foyer C H, Dat J F, Scott I M, et al. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling [J]. Physiologia Plantarum, 1997, 100(2): 241-254
- [34] Mishra S, Srivastava S, Tripathi R D, et al. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2006, 44(1): 25-37
- [35] Abd Allah E F, Gucel S, Tran L P, et al. Nitric oxide mitigates salt stress by regulating levels of osmolytes and antioxidant enzymes in chickpea [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 347
- [36] Wang M X, Zhang Y X, Guo P Y. Effect of florfenicol and thiamphenicol exposure on the photosynthesis and antioxidant system of *Microcystis flos-aquae* [J]. Aquatic Toxicology, 2017, 186: 67-76
- [37] Kurama E E, Fenille R C, Rosa V E, et al. Mining the enzymes involved in the detoxification of reactive oxygen species (ROS) in sugarcane [J]. Molecular Plant Pathology, 2002, 3(4): 251-259
- [38] Wan J J, Guo P Y, Zhang S X. Response of the cyanobacterium *Microcystis flos-aquae* to levofloxacin [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2014, 21(5): 3858-3865
- [39] Yang F, Miao L F. Adaptive responses to progressive drought stress in two poplar species originating from different altitudes [J]. Silva Fennica, 2010, 44(1): 23-37
- [40] Sahu G K, Sabat S C. Changes in growth, pigment content and antioxidants in the root and leaf tissues of wheat plants under the influence of exogenous salicylic acid [J]. Brazilian Journal of Plant Physiology, 2011, 23(3): 209-218
- [41] Liu Y, Gao B Y, Yue Q Y, et al. Influences of two antibiotic contaminants on the production, release and toxicity of microcystins [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2012, 77: 79-87
- [42] Yang W W, Tang Z P, Zhou F Q, et al. Toxicity studies of tetracycline on *Microcystis aeruginosa* and *Selenastrum capricornutum* [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2013, 35(2): 320-324
- [43] 凌旌瑾. 环境胁迫对蛋白核小球藻生长和光合作用的影响[D]. 上海: 华东师范大学, 2009: 47-48
- Ling J J. The influence of environmental stress on the growth and photosynthesis of *Chorella pyrenoidosa* [D]. Shanghai: East China Normal University, 2009: 47-48 (in Chinese)
- [44] 王小冬, 王艳. 赤潮异弯藻和海洋卡盾藻抗氧化酶活性对氮磷比失衡的响应[J]. 海洋环境科学, 2012, 31(3): 337-340
- Wang X D, Wang Y. Response of antioxidant enzyme activities in *Heterosigma akashiwo* and *Chattonella marina* to lose-balance of N/P ratio [J]. Marine Environmental Science, 2012, 31(3): 337-340 (in Chinese)
- [45] Peng X Z, Zhang K, Tang C, et al. Distribution pattern, behavior, and fate of antibacterials in urban aquatic environments in South China [J]. Journal of Environmental Monitoring, 2011, 13(2): 446-454