

恩诺沙星和硫氰酸红霉素对铜绿微囊藻的毒性研究

杨弯弯,武氏秋贤,吴亦潇,张维昊* (武汉大学资源与环境科学学院,生物质资源化学与环境生物技术湖北省重点实验室,湖北 武汉 430079)

摘要: 研究了恩诺沙星、硫氰酸红霉素暴露对铜绿微囊藻生长和生理的影响.结果显示恩诺沙星、硫氰酸红霉素对铜绿微囊藻的生长有抑制作用,且 96h-EC₅₀ 分别为 84.6,48.2 μ g/L;对铜绿微囊藻的叶绿素荧光和光合色素含量的影响一致,表现为浓度-效应关系;对可溶性蛋白含量的影响表现为低促高抑的现象;丙二醛含量随着抗生素浓度的增加显著增加.可见,恩诺沙星和硫氰酸红霉素能够阻碍铜绿微囊藻的光合作用,抑制可溶性蛋白的合成,从而影响铜绿微囊藻的正常生长.

关键词: 恩诺沙星; 硫氰酸红霉素; 铜绿微囊藻; Fv/Fm; 光合色素; 可溶性蛋白

中图分类号: X171.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6923(2013)10-1829-06

Toxicity of enrofloxacin and erythromycin thiocyanate on *Microcystis aeruginosa*. YANG Wan-wan, Hien Vu Thi Thu, WU Yi-xiao, ZHANG Wei-hao* (Hubei Key Laboratory of Biomass-Resource Chemical and Environment Biotechnology, School of Resource and Environmental Science, Wuhan University, Wuhan 430079, China). *China Environmental Science*, 2013,33(10): 1829~1834

Abstract: The toxic effects of two antibiotics, enrofloxacin and erythromycin thiocyanate, on the growth and physiology of *Microcystis aeruginosa* are studied. The results show that both enrofloxacin and erythromycin thiocyanate inhibited the growth of *M. aeruginosa*, and their 96h-EC₅₀ values for *M. aeruginosa* were 84.6 μ g/L and 48.2 μ g/L, respectively. The chlorophyll fluorescence and photosynthetic pigment of *Microcystis aeruginosa* were also inhibited by the antibiotics, and the inhibition effects increased with the increasing concentrations of enrofloxacin and erythromycin thiocyanate. The soluble protein content of *M. aeruginosa* was promoted in the presence of low concentrations of antibiotics (≤ 0.02 mg/L), and was inhibited by high levels of antibiotics (≥ 0.05 mg/L). The content of lipid peroxidation (malondialdehyde, MDA) presented a strong positive correlation with the levels of antibiotics. The study indicated that enrofloxacin and erythromycin thiocyanate both hindered the photosynthesis process of *M. aeruginosa* and the synthesis of soluble protein, thus inhibiting the growth of *M. aeruginosa*.

Key words: enrofloxacin; erythromycin thiocyanate; microcystis aeruginosa; Fv/Fm; photosynthetic pigments; soluble protein

近年来抗生素的大量使用以及在环境中的残留问题已经引起了广泛关注.目前全球每年抗生素类药物的使用量超过 20 万 t,其中有将近 4 万吨在我国使用^[1].此外,养殖业和畜牧业中也大量使用抗生素作为畜禽饲料添加剂和生长促进剂.而研究表明,无论人用或是兽用抗生素,进入体内后大约 70%不能被吸收,而是以母体化合物的形式直接被排出体外,并随粪便等进入到污水系统.而各种污水处理过程对这些物质的清除作用较小甚至没有效果,使得环境中此类物质呈现出一种“持久”存在的状态,对环境污染构成潜

在威胁^[2].目前在地下水、地表水、污水处理厂的入水和出水,甚至饮用水中都检测到抗生素的存在,主要包括磺胺类、大环内酯类、四环素类、喹诺酮类和甲氧苄氨嘧啶等,浓度在 ng/L~ μ g/L^[3-5].其中大环内酯类以及磺胺类抗生素在水环境中的残留量最高,已达到 1~2 μ g/L 的水平,

收稿日期: 2013-02-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(J1103409);战略生物资源技术支撑体系专项 cZBZX-1:中国重点湖泊藻种资源调查及信息库建设(543644231);水环境中典型抗生素的环境化学行为及其风险评价(SKLECRA2013OFP10)

* 责任作者,教授, zhangwh@whu.edu.cn

而在一些特殊水域中红霉素等抗生素的残留量已达到 75 μ g/L,氟喹诺酮类抗生素残留量居第 2 位^[6-9].

藻类作为水生生态系统的初级生产者,其种类多样性和初级生产量直接影响水生生态系统的结构和功能.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,因而藻类是较为理想的新型污染物测试生物^[10-12].铜绿微囊藻是水华蓝藻的常见藻种,在我国大部分富营养化水体中,铜绿微囊藻在数量和发生频率上均占优势,因而研究铜绿微囊藻对抗生素等物质的毒性反应,对于评价这些污染物对水环境的生态风险具有重要意义.本文以藻类生物量、叶绿素荧光 Fv/Fm 、MDA、蛋白质、叶绿素为评价指标,研究了恩诺沙星和硫氰酸红霉素对铜绿微囊藻的毒性效应,为准确评估抗生素对藻类的毒性以及筛选有效的生物标志物提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa* FACHB-905)以及相应的培养基(BG11)配方均由中国科学院武汉水生生物研究所淡水藻种库资助(543644231).培养液配制化学成分均为分析纯.所选抗生素硫氰酸红霉素和恩诺沙星均购于湖北武汉市福德精细化工厂.其中,硫氰酸红霉素效价为 778U/mg,恩诺沙星纯度 $\geq 98.0\%$.

1.2 实验方法

铜绿微囊藻的培养条件为:温度 $[(25\pm 1)^{\circ}\text{C}]$,光照周期比 12h:12h,照度 2000lx,每天人工摇动 3 次.实验开始之前保证铜绿微囊藻的生物活性以及同步生长.取处于对数生长期的铜绿微囊藻,分装在 250mL 锥形瓶中,每瓶 100mL.在预实验的基础上每种抗生素设立 5 个浓度梯度,硫氰酸红霉素和恩诺沙星的梯度设置为 0.02,0.05,0.10,0.20,0.50mg/L,同时设置空白对照组,每个处理(含对照)设立 3 个重复.加入抗生素后,将铜绿微囊藻置于原培养条件下暴露处理,每 24h 测定生物量和 Fv/Fm ,96h 后测定光合色素、可溶性蛋白

和 MDA.

1.3 藻类生物量测定

本实验室建立了铜绿微囊藻细胞密度与藻液光密度之间的线性关系,铜绿微囊藻细胞密度与 OD 值之间的相关指数 $R^2 > 0.99$,与相关文献报道^[13]相符,因而利用分光光度计(上海尤尼柯 UV2000)测定藻液的光密度(OD₆₈₀)以表征铜绿微囊藻的生物量.

1.4 PS II(光系统 II)最大光能转化效率 Fv/Fm 测定

利用英国 Hansatech 公司的 Handy PEA 测定 Fv/Fm .测定步骤参考 Chen^[14]的方法,即移取 2mL 藻液到配套的瓶中,暗适应 15min 后测定.测定过程中注意避光.

1.5 丙二醛(MDA)、蛋白质、叶绿素的测定

MDA 的测定参考 Kong^[15]的方法,采用硫代巴比妥酸法,取一定量的藻液在 5000r/min 离心 15min 后去除上清液收集藻细胞,加入 10%TCA 2mL,0.6%TBA 2mL,混合后在 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴上煮沸 20min,冷却后于 5000r/min 离心 10min.然后分别测定上清液在 450,532,600nm 处的吸光度值.蛋白质的测定采用考马斯亮蓝法^[16],叶绿素测定采用酒精冷冻抽提法^[17].

1.6 数据处理与统计

所有数据统计分析用 Origin7.5 软件处理.

2 结果与分析

2.1 抗生素对铜绿微囊藻生长的影响

恩诺沙星(a)和硫氰酸红霉素(b)胁迫铜绿微囊藻 4d 的生长曲线如图 1 所示.由图 1(a)可知,当恩诺沙星浓度为 0.02mg/L 时,对铜绿微囊藻的抑制作用较小,比生长抑制率为 7.57%;当恩诺沙星浓度高于 0.02mg/L 时,比生长抑制率显著增加,分别为 41.5%、66.5%、72.3%、80.9%.由图 1(b)可知,随着硫氰酸红霉素浓度的增加,铜绿微囊藻的生长受到的抑制作用越大,当硫氰酸红霉素浓度为 0.50mg/L 时,比生长抑制率高达 92.6%.总的来说,恩诺沙星、硫氰酸红霉素对铜绿微囊藻的胁迫都表现出显著的浓度-效应关系和时间-效应关系,且两者的 96h-EC₅₀ 分别为 84.6,48.2 μ g/L,

即硫氰酸红霉素对铜绿微囊藻生长的抑制作用更大。

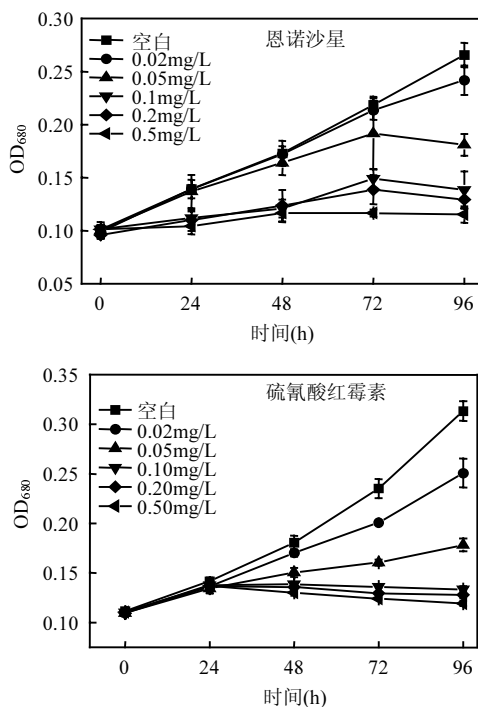


图1 恩诺沙星、硫氰酸红霉素暴露下铜绿微囊藻的生长

Fig.1 Growth of *M. aeruginosa* under the exposure of enrofloxacin and erythromycin thiocyanate

2.2 恩诺沙星、硫氰酸红霉素对铜绿微囊藻 Fv/Fm 的影响

叶绿素荧光动力学是以植物体内叶绿素为探针,研究和探测植物光和生理状况及各种外界因子对其细微影响的新型植物活体测定和诊断技术,具有快速、灵敏、对细胞无损伤的优点^[18],在荧光分析中最常用的参数是 Fv/Fm ^[19].当微藻等受到高温、重金属污染等逆境胁迫时,反映藻类光合作用强度的叶绿素荧光参数都会受到影响,一般表现为 Fv/Fm 降低,并且下降幅度随着胁迫时间的延长逐步增大^[20].由图 2(a)可知,随着恩诺沙星浓度的增加,铜绿微囊藻的 Fv/Fm 逐渐降低,表现为显著的浓度-效应关系.由图 2(b)可知,当浓度不高于 0.02mg/L 时,与对照组无显著差异,当浓度高于 0.02mg/L 时, Fv/Fm 随着硫氰酸红霉素浓度的增加逐渐降低,也表现为显著的

浓度-效应关系.总的来说,由实验结果可知恩诺沙星和硫氰酸红霉素使铜绿微囊藻的光合效率受到了抑制.

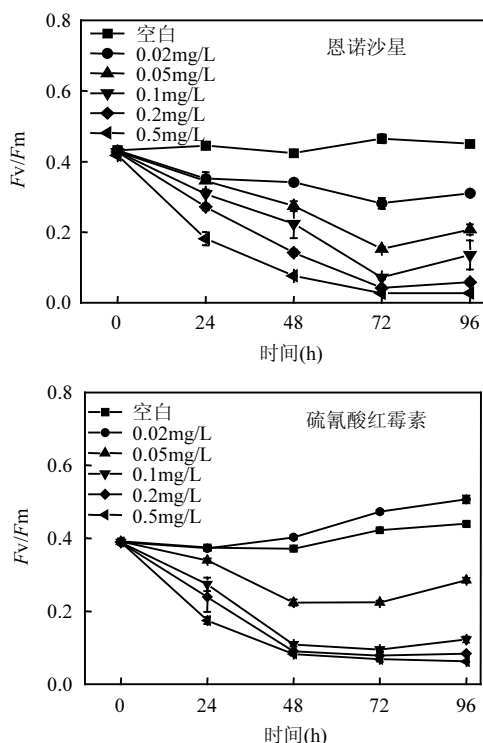


图2 恩诺沙星、硫氰酸红霉素暴露下铜绿微囊藻 Fv/Fm 的变化

Fig.2 Fv/Fm index of *M. aeruginosa* under the exposure of enrofloxacin and erythromycin thiocyanate

2.3 恩诺沙星、硫氰酸红霉素对微藻色素含量的影响

光合色素是藻类进行光合作用的物质基础,也是间接反映进行光合作用生物的生物量指标,其含量变化能较好地反映生物各阶段生长发育正常与否^[21].叶绿素的含量及其比例会影响光合作用的正常进行,进而影响植物体内其他有机物质(如各种蛋白质)的合成^[22].

图 3 显示了恩诺沙星、硫氰酸红霉素对铜绿微囊藻光合色素含量的影响.由图 3(a)可知,叶绿素 a 的含量随着恩诺沙星浓度的增加而显著降低,当恩诺沙星浓度高于 0.02mg/L 时,类胡萝卜素

素的含量与对照组呈显著差异.由图 3(b)可见,随着硫氰酸红霉素浓度的增加,叶绿素 a 含量逐渐降低,当浓度高于 0.02mg/L 时,类胡萝卜素含量与对照组有显著差异.实验结果表明恩诺沙星、硫氰酸红霉素对铜绿微囊藻的光合色素含量均有显著影响,说明 2 种抗生素暴露下铜绿微囊藻的光合作用将受到严重影响;且 2 种抗生素对叶绿素 a 含量的影响要比对类胡萝卜素含量的影响显著,这是由于类胡萝卜素除在光合作用中具有一定功能外,还可吸收剩余光能、淬灭活性氧,可防止膜脂过氧化,保护叶绿素和光合机能^[23].

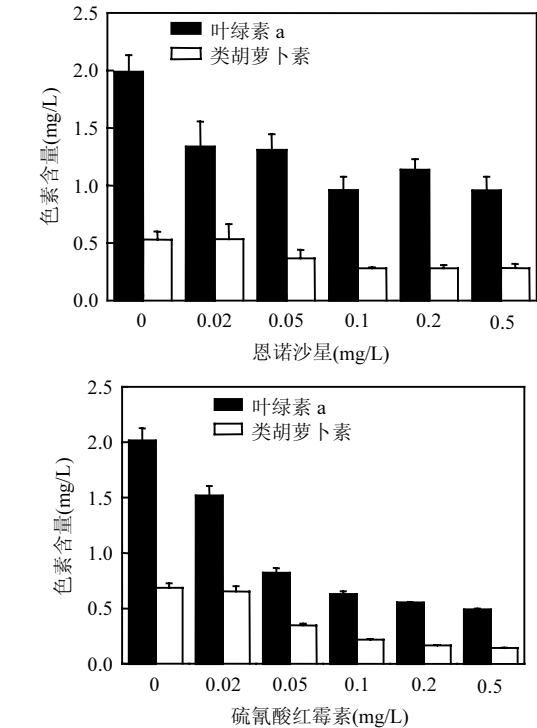


图 3 恩诺沙星、硫氰酸红霉素对铜绿微囊藻色素含量的影响

Fig.3 Contents of photosynthetic pigments in *M. aeruginosa* under the exposure of enrofloxacin and erythromycin thiocyanate

2.4 恩诺沙星、硫氰酸红霉素对铜绿微囊藻可溶性蛋白含量的影响

图 4 显示了恩诺沙星、硫氰酸红霉素对铜绿微囊藻可溶性蛋白含量的影响.由图 4(a)可知,当恩诺沙星浓度为 0.02mg/L 时,可溶性蛋白含量较

对照组稍高;当恩诺沙星浓度高于 0.02mg/L,可溶性蛋白含量随恩诺沙星浓度的增加而递减.由图 4(b)可知,当硫氰酸红霉素浓度为 0.02mg/L 时,可溶性蛋白含量高于对照组,而当硫氰酸红霉素浓度高于 0.02mg/L 时,可溶性蛋白含量逐渐降低.总的来看,恩诺沙星、硫氰酸红霉素对铜绿微囊藻的可溶性蛋白含量都表现为在较低浓度促进,在较高浓度抑制的现象:说明在较低浓度铜绿微囊藻可以通过自身机制通过增加可溶性蛋白含量来抵御伤害,但在高浓度下铜绿微囊藻的调节机制被破坏,可溶性蛋白含量显著降低.

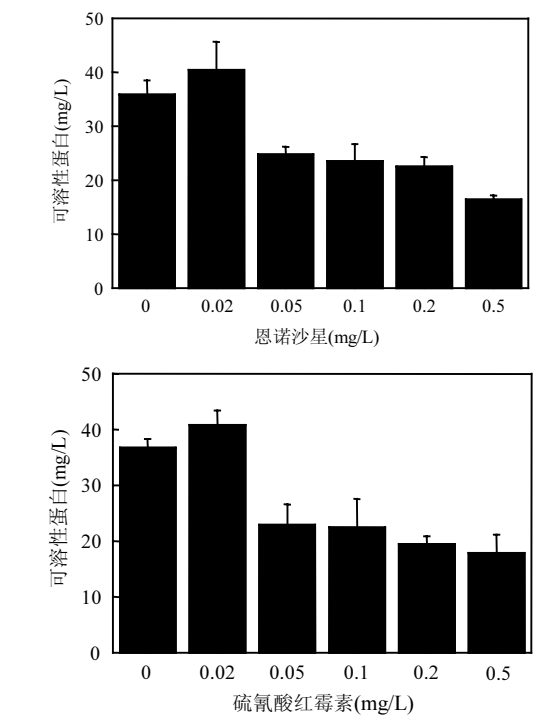


图 4 恩诺沙星、硫氰酸红霉素暴露下铜绿微囊藻可溶性蛋白含量的变化

Fig.4 Contents of soluble protein in *M. aeruginosa* under the exposure of enrofloxacin and erythromycin thiocyanate

2.5 恩诺沙星、硫氰酸红霉素对铜绿微囊藻丙二醛含量的影响

MDA 是指示藻细胞内膜脂氧化程度的重要指标.由图 5 可见,暴露 96h 后实验组的 MDA 含量均明显上升,并随着抗生素浓度的增加而增加,表现为显著的浓度-效应关系.且 0.5mg/L 的恩诺

沙星、硫氰酸红霉素暴露条件下的 MDA 含量分别是空白对照组的 2.53 倍、2.83 倍.说明经过恩诺沙星、硫氰酸红霉素胁迫后,铜绿微囊藻产生了大量的活性氧,导致膜脂过氧化严重,而膜脂质过氧化易使膜结构和功能受损,进而导致细胞代谢失调甚至死.

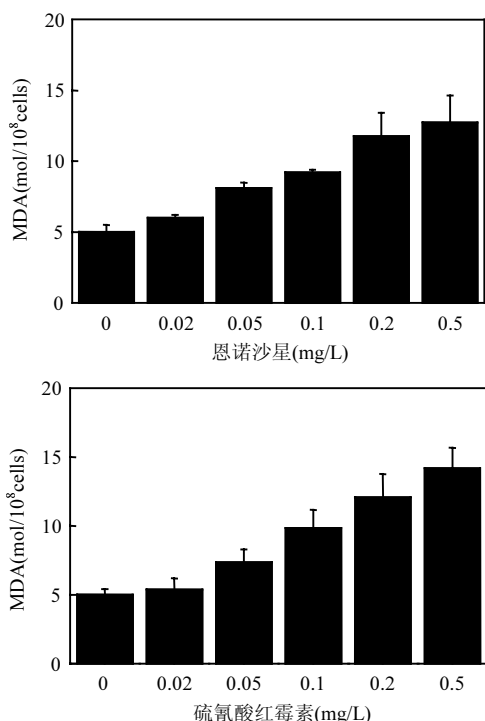


图5 恩诺沙星、硫氰酸红霉素暴露下铜绿微囊藻 MDA 含量的变化

Fig.5 MDA contents in *M. aeruginosa* under the exposure enrofloxacin and erythromycin thiocyanate

3 讨论

在恩诺沙星、硫氰酸红霉素暴露 96h 后,随着抗生素浓度的增加,铜绿微囊藻的 Fv/Fm、光合色素含量呈下降趋势,且叶绿素 a 比类胡萝卜素更敏感;可溶性蛋白先增后减,MDA 含量开始变化不显著,后来快速增加,该研究结果与相关研究^[24-25]结果相似.恩诺沙星作为广谱性的氟喹诺酮类抗生素,能抑制 DNA 旋转酶的活性,而 DNA 旋转酶是原核生物 DNA 转录和复制所需的重要酶^[24].原因可能是在恩诺沙星的暴露下,铜绿微

囊藻产生大量的活性氧,一方面导致光合电子传递链氧化还原态的改变,该改变可以对相关核基因的表达造成影响,干扰叶绿素定位,从而使自由状态的叶绿素被降解,最终光合效率和叶绿素含量降低^[26];另一方面导致生物大分子的损伤,进而改变生物膜的渗透率,因而可溶性蛋白含量降低,最终影响铜绿微囊藻的正常生长.红霉素的作用机理主要是与核糖体 50S 亚单位结合,抑制肽酰转移酶,妨碍碳链延长,从而抑制原核细胞蛋白质的合成^[25].硫氰酸红霉素作为蛋白质合成抑制剂,可抑制原核生物基因的表达,而叶绿体基因与原核生物基因相似,因此硫氰酸红霉素可能对叶绿体基因的表达有抑制作用,导致光合效率和叶绿素含量降低^[27];此外,由于 PSII 电子传递受到阻碍,处于激发态的叶绿素分子可自发转变为三线态叶绿素,进而促使 ROS 的形成,导致膜脂过氧化^[28].

4 结论

4.1 恩诺沙星和硫氰酸红霉素对铜绿微囊藻的生长均有抑制作用,且 96h-EC₅₀ 分别为 84.6、48.2 μg/L.

4.2 恩诺沙星和硫氰酸红霉素对铜绿微囊藻的 Fv/Fm 也有影响,表现为显著的浓度-效应关系.

4.3 在恩诺沙星和硫氰酸红霉素的胁迫下,铜绿微囊藻光合色素含量逐渐降低,且叶绿素 a 的变化更为敏感.

4.4 恩诺沙星和硫氰酸红霉素对铜绿微囊藻的可溶性蛋白含量有影响,且表现为低促高抑的现象.

参考文献:

- [1] 刘滨扬,蔚秋,陈菊芳,等.3 种抗生素对羊角月芽藻次生代谢的影响 [J]. 应用与环境生物学报, 2011,16(6):765-769.
- [2] 张浩,罗义,周启星.四环素类抗生素生态毒性研究进展 [J]. 农业环境科学学报, 2008,27(2):407-413.
- [3] 姜蕾,陈书怡,杨蓉,等.长江三角洲地区典型废水中抗生素的初步分析 [J]. 环境化学, 2008,27(3):371-374.
- [4] 彭先芝,谭建华,唐才明,等.高效液相色谱法同时分析城市河水中的多种抗生素 [J]. 色谱, 2007,25(4):546-549.
- [5] 叶计朋,邹世春,张干,等.典型抗生素类药物在珠江三角洲水

- 体中的污染特征 [J]. 生态环境, 2007,16(2):384-388.
- [6] Lalumera G M, Calamari D, Galli P, et al. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy [J]. Chemosphere, 2004, 54(5):661-668.
- [7] 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.
- [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]. Marine Pollution Bulletin, 2005,50(9):913-920.
- [9] Ternes T A, Joss A, Siegrist H. Peer reviewed: scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment [J]. Environmental Science and Technology, 2004, 38(20):392-399.
- [10] Chalew T E A, Halden R U. Environmental exposure of aquatic and terrestrial biota to triclosan and triclocarban [J]. JAWRA Journal of the American Water Resources Association, 2009, 45(1):4-13.
- [11] Ferrari B, Paxeus N, Lo Giudice R, et al. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2003,55(3):359-370.
- [12] 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.
- [13] Ismail M, Phang S M, Tong S L, et al. A modified toxicity testing method using tropical marine microalgae [J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2002,75(2):145-154.
- [14] Chen L Z, Zhou L N, Liu Y D, et al. Toxicological effects of nanometer titanium dioxide (nano-TiO₂) on *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2012, 84(1):155-162.
- [15] Kong Q, Zhu L, Shen X. The toxicity of naphthalene to marine *Chlorella vulgaris* under different nutrient conditions [J]. Journal of Hazardous Materials, 2010,178(1-3):282-286.
- [16] 陈建勋,王晓峰.植物生理学实验指导 [M]. 广州:华南理工大学出版社, 2006.
- [17] 萧浪涛,王三根.植物生理学实验技术 [M]. 北京:中国农业出版社, 2005.
- [18] 梁 英.叶绿素荧光技术在微藻环境胁迫研究中的应用现状及前景 [J]. 海洋科学, 2007,31(1):71-76.
- [19] 尹翠玲.磷浓度对盐生杜氏藻和纤细角毛藻叶绿素荧光特性及生长的影响 [J]. 水产科学, 2007,26(3):154-159.
- [20] 张 琼,伍 琴,高香玉,等.二溴联苯醚对纤细裸藻的生态遗传毒性效应 [J]. 中国环境科学, 2010,30(6):833-838.
- [21] 陈柳芳.三种喹诺酮类抗生素对斜生栅藻的毒性效应 [D]. 吉林:东北师范大学, 2010.
- [22] 刘 涛,熊 丽,生秀梅,等.高效氯氰菊酯对斜生栅藻的毒性研究 [J]. 化学与生物工程, 2006,23(7):37-39.
- [23] 秦天才,阮 捷,王腊娇.镉对植物光合作用的影响 [J]. 环境科学与技术, 2000,23(1):33-35.
- [24] Qin H W, Chen L F, Lu N, et al. Toxic effects of enrofloxacin on *Scenedesmus obliquus* [J]. Frontiers of Environmental Science & Engineering, 2012,6(1):107-116.
- [25] 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.
- [26] Koussevitzky S, Nott A, Mockler T C, et al. Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression [J]. Science Signalling, 2007,316(5825):715-719.
- [27] Halling-Sorensen B. Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming [J]. Chemosphere, 2000,40(7):731-739.
- [28] Nemat Alla M, Hassan N. Changes of antioxidants levels in two maize lines following atrazine treatments [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2006,44(4):202-210.

作者简介: 杨弯弯(1989-),女,湖北荆州人,武汉大学硕士研究生,主要从事环境毒理学研究。