

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20140630004

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)

几种抗生素对蛋白核小球藻的时间毒性微板分析法

陈琼, 张瑾*, 李小猛, 刘磊

安徽建筑大学环境与能源工程学院 安徽省水污染控制与废水资源化重点实验室, 合肥 230601

收稿日期: 2014-06-30 录用日期: 2014-08-14

摘要: 抗生素在不同的暴露时间可能具有不同的毒性变化规律。本文以蛋白核小球藻(*C. pyrenoidosa*)为受试生物, 96 孔微板为暴露实验载体, 5 种抗生素硫酸安普霉素、氯霉素、双氢链霉素、硫酸新霉素和硫酸链霉素为研究对象, 通过在 *C. pyrenoidosa* 生长周期内选取 6 个暴露时间节点(即 0、12、24、48、72 和 96 h), 建立了抗生素在不同暴露时间对 *C. pyrenoidosa* 生长抑制毒性的微板测试方法(简称 T-MTA), 并应用 T-MTA 方法系统测定了 5 种抗生素对 *C. pyrenoidosa* 在不同暴露时间的生长抑制毒性。结果表明, 抗生素对 *C. pyrenoidosa* 生长抑制毒性具有明显的时间依赖特征, 即在开始的时候基本无毒性, 而后毒性迅速增加, 然后毒性增加速度减慢; 不同抗生素的毒性随着暴露时间的延长增加速率不同; 同一暴露时间内, 5 种抗生素对 *C. pyrenoidosa* 的毒性大小不同; 且毒性顺序随着暴露时间延长而发生变化。

关键词: 抗生素; 蛋白核小球藻; 时间依赖毒性; 微板毒性分析

文章编号: 1673-5897(2015)2-190-08 中图分类号: X13 文献标识码: A

Time-dependent Microplate Toxicity Analysis (T-MTA) of Several Antibiotics to *Chlorella pyrenoidosa*

Chen Qiong, Zhang Jin*, Li Xiaomeng, Liu Lei

Key Laboratory of Water Pollution Control and Wastewater Resource of Anhui Province, College of Environment and Energy Engineering, Anhui Jianzhu University, Hefei 230601, China

Received 30 June 2014 accepted 14 August 2014

Abstract: Antibiotics probably have different toxicity features in different exposure times. Selecting *Chlorella pyrenoidosa* (*C. pyrenoidosa*) as a test organism, 96-well microplate as exposure experiment carrier and five antibiotics, apramycin sulfate, chloramphenicol, dihydrostreptomycin sesquisulfate, neomycin sulfate and streptomycin sulfate, as test chemicals, a time-dependent microplate toxicity analysis (T-MTA) was developed. Using the T-MTA, the time-dependent toxicities of the five antibiotics on *C. pyrenoidosa* were determined at six exposure time points such as 0, 12, 24, 48, 72 and 96 h. The results showed that the toxicities of the antibiotics exhibited significant time-dependent features, i.e., they had almost no toxicities on *C. pyrenoidosa* at first, then their toxicities increased rapidly, and finally increased slowly. However, the antibiotics had different increasing rates for the time-dependent toxicities. The toxicities of five antibiotics were different at the same exposure

基金项目: 国家自然科学基金(21207002); 博士科研启动基金; 大学生科技创新性实验(201310878060; AH201310878107)

作者简介: 陈琼(1988 -), 男, 硕士, 研究方向为污染物化学与毒理学, E-mail: 13093549315@163.com;

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

time. Moreover, the orders of toxicity of the antibiotics at different exposure times were different.

Keywords: antibiotics; *Chlorella pyrenoidosa*; time-dependent toxicity; microplate toxicity analysis

越来越多的研究表明,环境污染物的毒性不仅与暴露的剂量有关,暴露时间也是一个重要的因素^[1]。如 Zhu 等^[2]采用浓度-时间-效应曲面(CTES)研究发现6种三嗪类除草剂对发光菌 Q67 的毒性随着时间的延长而逐渐增加,但不同的毒物,其毒性增加的幅度不同。Hatano 等^[3]研究发现重金属对3种水生生物:三叶浮萍、虹鳟鱼和大型蚤的毒性均具有很强的时间依赖性。还有的作者发现部分污染物在不同暴露时间的浓度-效应曲线还具有不同的形状如离子液体对发光菌 Q67 的毒性效应随着时间的延长,由抑制发光效应逐渐转变为刺激发光效应^[4-5]。这些研究表明,不同类型和不同结构的污染物可能具有不同的时间毒性规律和作用机制。因此,污染物毒性的检测不仅要关注其在某一特定时间对暴露生物的效应,更应该着眼于其对暴露生物随着时间而变化的动态效应^[6]。这不仅有助于全面了解污染物的毒性效应,而且能更深入地了解污染物的毒理作用机制与途径。

绿藻作为生态系统中的初级生产者和水生食物链的基本环节,对维持生态系统的平衡起着重要作用。因其个体小、繁殖快、对毒物敏感、易于分离培养以及可直接观察细胞水平上的中毒症状,常被用于测定污染物的毒性。藻毒性测试已成为一种广泛应用的生物监测与标准方法,如国际标准化组织(ISO)^[7]、经济合作与发展组织(OECD)^[8]、美国环保署(USEPA)^[9]以及中国国家环境保护总局均将藻类生长抑制毒性试验作为标准毒性测试方法^[10]。蛋白核小球藻(*C. pyrenoidosa*)属于绿藻门,小球藻属,是游离单细胞藻,直径3~5 μm,球形或椭圆形,繁殖快,可以在较短时间内考察污染物对藻类世代和种群水平上的影响,便于培养和试验。此外,藻液分布均匀不易沉降,其与污染物的接触更充分。目前,*C. pyrenoidosa*已成为国内外常用的污染物毒性测试的受试生物之一,如利用*C. pyrenoidosa*测定金属纳米颗粒物的毒性作用^[11],研究十六烷基溴化铵等表面活性剂、商品氯氰菊酯农药以及药物等对*C. pyrenoidosa*的生长抑制效应^[12-14],测试水中砷铬铅镉汞的急性毒性^[15]。

然而,目前的藻毒性测试方法多采用三角玻璃瓶法,该方法的缺点:测试仪器不能同时测定大

量平行样品,而且试液用量大,不仅费时、费力而且浪费试剂。因此,袁静等^[16]建立了以酶标仪为检测仪器和96孔板为载体的藻毒性微板分析法,暴露时间为96 h。利用这一测试体系,研究了多个化合物及其混合物的毒性,包括重金属、农药和离子液体等化合物,获得了大量化合物的完整浓度-效应毒性信息。结果表明,藻微板毒性分析测试法具有操作简单、灵敏度高、重复性好、节省试剂及环境友好等优点。不幸的是,上述这些藻毒性测试方法只获得某一暴露时间终点如72 h或96 h的半数效应浓度 EC_{50} 值,仍不能获得不同时间的污染物毒性效应变化规律。

医药品与个人护理品(pharmaceuticals and personal care products, PPCPs)由于对环境的持续污染和有害性已成为继 POPs 之后的又一类新型污染物^[17]。抗生素由于使用量大、环境分布广泛、潜在危害大,是目前 PPCPs 中最为关注的一类物质^[18]。研究发现,抗生素可改变环境中微生物种类,破坏生态系统的平衡^[19];环境中抗生素残留的持续存在,将诱导出抗药菌株,通过食物等途径进入人体,对人类健康产生危害^[20]。如 Isidori 等^[21]研究了6种抗生素对非靶生物(水生生物)的急性、慢性和遗传毒性,发现急性毒性在 $mg \cdot L^{-1}$ 水平,慢性毒性在 $\mu g \cdot L^{-1}$ 水平,氯四环素具有遗传毒性。刘臻等^[22]研究发现氯霉素、红霉素和四环素能引起热带爪蟾围心腔水肿、泄殖腔增大或拉长、肛门扩张和尾部弯曲等多种畸形现象。因此,研究抗生素类药物生态环境风险及其污染控制具有重要意义。

综上所述,本文拟以*C. pyrenoidosa*为受试生物,以5种抗生素硫酸安普霉素(apramycin sulfate, APR)、氯霉素(chloramphenicol, CHL)、双氢链霉素(dihydrostreptomycin sesquisulfate, DIH)、硫酸新霉素(neomycin sulfate, NEO)和硫酸链霉素(strepomycin sulfate, STS)为研究对象,建立基于*C. pyrenoidosa*的抗生素时间毒性微板分析法(time-dependent microplate toxicity analysis, T-MTA),并应用T-MTA系统测试5种抗生素对*C. pyrenoidosa*的时间毒性。这不仅提供了上述5种抗生素在不同暴露时间的毒性基础数据,同时还为研究其他具有时间依赖毒性特征的污染物提供检测方法与数据分析手段。

表 1 5 种抗生素的基本性质
Table 1 Physical properties of five antibiotics

中文名称	简写	化学式	CAS 号	分子量	纯度/%
Chinese name	Abbreviation	Chemical structure	CAS registration number	Molecular weight	Purity/%
硫酸安普霉素	APR	C ₂₁ H ₄₁ N ₅ O ₁₁	65710-07-8	637.66	95.0
氯霉素	CHL	C ₁₁ H ₁₂ C ₂ N ₂ O ₅	56-75-7	323.13	≥97
双氢链霉素	DIH	C ₂₁ H ₄₁ N ₇ O ₁₂ ·3/2 H ₂ SO ₁₄	5490-27-7	730.71	≥98.0
新霉素硫酸盐	NEO	C ₂₃ H ₄₈ N ₆ O ₁₇ S	1405-10-3	712.72	60.0
硫酸链霉素	STS	C ₄₂ H ₈₄ N ₁₄ O ₃₆ S ₃	3810-74-0	1 457.38	90.0

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 试剂与仪器

试剂:5 种抗生素硫酸安普霉素(APR)、氯霉素(CHL)、双氢链霉素(DIH)、硫酸新霉素(NEO)和硫酸链霉素(STS)均购自上海原叶生物科技有限公司,其基本理化性质见表 1。采用 milli-Q 水配制抗生素储备液,保存在棕色瓶中,置于 4 ℃冰箱,备用。

主要仪器:BioRad 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)、MGC-250 型智能型光照培养箱(上海一恒科技有限公司)、BT25S 型五位电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)有限公司)、70SW -CJ-IF 超净工作台(苏州佳宝净化工程设备有限公司)和 Dragon-lab 单道可调移液器(10 ~ 100 μL)(大龙兴创实验仪器有限公司)。

1.2 藻种与培养

蛋白核小球藻(*C. pyrenoidosa*)购自中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库(FACHB),编号为 FACHB-5。

SE 培养基配方:0.25 g NaNO₃、0.075 g K₂HPO₄·3H₂O、0.075 g MgSO₄·7H₂O、0.025 g CaCl₂·2H₂O、0.175 g KH₂PO₄、0.025 g NaCl、0.05 mL FeCl₃·6H₂O、1 mL EDTA-Fe、40 mL 土壤浸出液和 1 mL A5 溶液。

EDTA-Fe:1 g Na₂EDTA、81 mg FeCl₃·6H₂O、50 mL 0.1 mol·L⁻¹ HCl 和 50 mL H₂O。

A5 溶液:286 mg H₃BO₃、181 mg MnCl₂·4H₂O、22 mg ZnSO₄·7H₂O、7.9 mg CuSO₄·5H₂O、3.9 mg (NH₄)₆·Mo₇O₂₄·4H₂O 和 100 mL H₂O。

收到藻种后,稍松试管管盖,放入恒温光照振荡培养箱,于(25 ± 1) ℃、照度 5 000 lx、光暗比 14 h:10 h 条件下培养。每隔 10 ~ 15 d 按 1:2 稀释转接藻种扩大培养,使之进入对数生长期。接种时间应在白天,藻类细胞代谢最旺盛时期(因傍晚至夜间藻类有细胞下沉现象)。整个过程要求绝对无菌操作。暴露试验前 1 ~ 2 d 转接处于对数生长期的藻种至新鲜培养基

培养至 690 nm 波长下光密度(OD₆₉₀)为 0.2 ~ 0.3 之间,备用。暴露试验中为避免挥发造成的误差,微板加上透明盖^[16]。

1.3 微板设计与时间毒性测试

96 孔透明微板中空白与污染物浓度梯度设计如图 1 所示。在 96 孔微板的 4 周共 36 个孔中均加入 200 μL 的蒸馏水防止产生边缘效应;第 6,7 列共 12 个孔(b)中分别加入 100 μL milli-Q 水作为空白对照;第 2 列 6 个孔(c_{*i*}, *i* = 1, 2, 3, 4, 5, 6)以及第 4 列共 6 个孔(c_{*i*}, *i* = 7, 8, 9, 10, 11, 12)分别加入按稀释因子设计的不同浓度污染物的溶液 100 μL;第 3 和 5 列分别为第 2 列和第 4 列的平行试验;第 8、9、10、11 列为第 2、3、4、5 列的重复实验。最后在空白和处理孔共 60 个孔中分别加入密度均匀、吸光度 OD₆₉₀ 值为 0.20 ~ 0.30 的 100 μL 藻液,使各孔总体积为 200 μL;加透明盖后置于温度为(25 ± 1) ℃、光照强度为 5 000 lx、光暗比 14 h:10 h 的光照培养箱中培养,分别在暴露时间节点为 0, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h 和 96 h 时将微板取出,并放入酶标仪中测定 OD₆₉₀。上述微板实验至少重复 3 板。

以污染物对 *C. pyrenoidosa* 的生长速率 μ 的抑制率(E)为毒性效应,计算不同暴露时间终点污染物的毒性:

$$E_{i,j} = (1 - \mu_{i,j} / \mu_{0,j}) \times 100\%$$
 (1)

$$\mu_j = (OD_{690,n} - OD_{690,n-j}) / OD_{690,n}$$
 (2)

式中,E_{*i,j*}为污染物浓度 c_{*i*}(*i* = 1, 2, 3, ..., 12)在暴露时间 *j*(*j* = 0, 12, 24, 48, 72, 96 h)对 *C. pyrenoidosa* 的生长速率抑制率;μ_{*i,j*}为微板中污染物浓度 c_{*i*}处理孔中 *C. pyrenoidosa* 在暴露时间 *j* 时的平均生长速率;μ_{0,*j*}为微板空白孔中 *C. pyrenoidosa* 在暴露时间 *j*(*j* = 0, 12, 24, 48, 72, 96 h)的平均生长速率;μ_{*j*}为微板孔中 *C. pyrenoidosa* 在某一暴露时间 *j*(*j* = 0, 12, 24, 48, 72, 96 h)的平均生长速率;OD_{690,*n*}为微板孔中 *C. pyrenoidosa* 在第 *n* 个暴露时间点(*n* = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6)的平均

吸光光度值; $OD_{690,n-1}$ 为微板孔中 *C. pyrenoidosa* 在第 $n-1$ 个暴露时间点的平均吸光光度值。

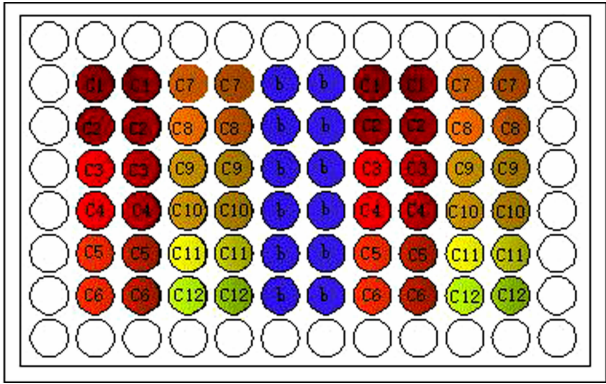


图 1 时间毒性微板分析法中微板设计示意图
注:b,空白;c_i,第 i 个浓度。

Fig. 1 Schematic diagram of the microplate design in a time-dependent toxicity microplate analysis where b refers to blank and c_i to the concentration of the i th treatment

1.4 时间毒性数据处理

为了揭示不同暴露时间、不同浓度污染物对 *C. pyrenoidosa* 生长抑制毒性变化规律,需要对不同时间节点的浓度一效应数据进行非线性最小二乘拟合。对于浓度一效应曲线(concentration-response curve, CRC)的浓度一效应数据,采用两参数非线性函数 Weibull 和 Logit 进行拟合,选择拟合值与试验观测值之间的相关系数(correlation coefficient, R)与均方根误差(root mean square error, RMSE)评价 CRC 模型的拟合优度, R 值越大、RMSE 越小,拟合越好^[23]。2 个用于描述实验毒性数据的非线性函数 Weibull 和 Logit 如式(3)和(4)所示:

$$E = 1 / (1 + \exp(-\alpha - \beta \log_{10}(c))) \tag{3}$$

$$E = 1 - \exp(-\exp(\alpha + \beta \log_{10}(c))) \tag{4}$$

式中 α 、 β 是 Weibull 和 Logit 的位置与斜率参数, E 为效应即污染物对绿藻 *C. pyrenoidosa* 的生长抑制率; c 是污染物的浓度。

2 结果 (Results)

2.1 同步生长速率曲线和测定波长选择

为了检测时间依赖毒性测试过程中 *C. pyrenoidosa* 是否处于对数生长期,我们在所有实验中,均单独设置一块 96 孔板同步测试 *C. pyrenoidosa* 在微孔中的生长曲线,其微板设计与时间依赖毒性测试类似:微板周边的 36 个微孔加入 200 μ L 蒸馏水,在剩

余 60 个孔中均加入体积 100 μ L 的蒸馏水,再加入 100 μ L 已培养好的藻液,使试液总体积达到 200 μ L。结果见图 2(A),绿藻 *C. pyrenoidosa* 在微板中经短暂适应期后开始快速增长,36 h 后 *C. pyrenoidosa* 生长速率快速增加,72 h 后开始下降,96 h 后几乎下降到初始生长速率,120 h 后几乎不再生长。因此,时间依赖性实验的测试时间长度最长设置在 96 h。

用 1 cm 比色皿、在波长 350 ~ 850 nm 范围内,按步长 1 nm 测定 *C. pyrenoidosa* 的紫外—可见吸收光谱图谱,结果见图 2(B)。由图 2(B)可见,在波长为 446、504 和 690 nm 处存在吸收峰,其中 690 nm 吸收峰最尖,光谱干扰较少,因此,绿藻 *C. pyrenoidosa* 的光密度 OD 值的测定选择 690 nm 波长处的吸收峰。

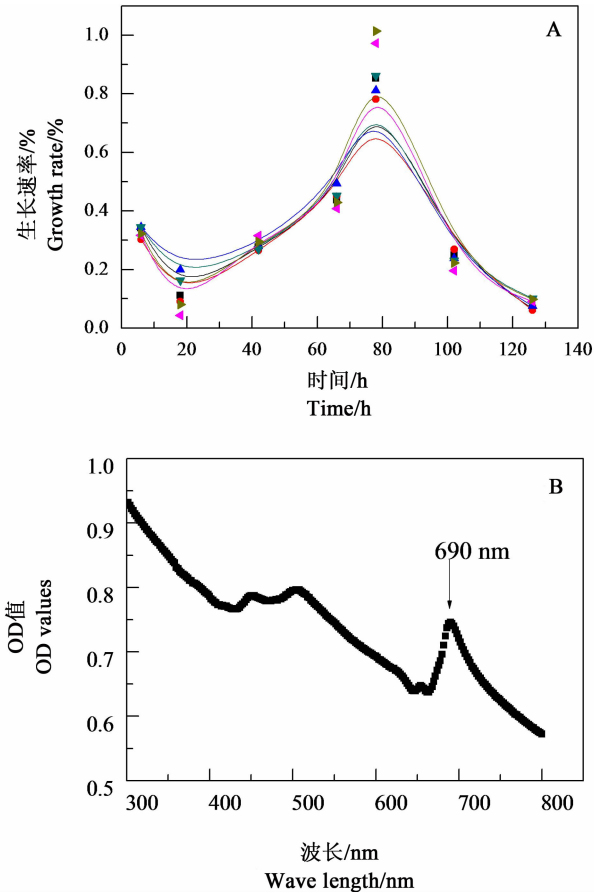


图 2 *C. pyrenoidosa* 的生长特性
Fig. 2 Growth characteristic of *Chlorella pyrenoidosa*

2.2 浓度-效应曲线 CRC

由时间毒性微板分析法测得的 5 种抗生素在不同暴露时间节点的浓度-效应数据(点)以及通过非线性最小二乘拟合方法得到的统计量与回归系数(位置参数 α 和斜率参数 β)结果见表 2,并将拟合所得的

CRC 曲线绘于图 3。

从表 2 可看出,Logit 函数对暴露时间在 48 ~ 96 h 的毒性数据拟合的结果较好($R > 0.91$, $RMSE < 0.1$),但对暴露时间节点为 24 h 的浓度-效应数据拟合效果稍差,如 CHL 的浓度-效应数据的 R 值为 0.6307,对 0 和 12 h 的浓度-效应数据不能有效拟合,可能因为在暴露时间 24 h 以内,藻的生长处于延迟期,数据不稳定造成的,也可能是拟合函数不太合适。以半数效应浓度(EC_{50})的负对数 pEC_{50} 为毒性指标,5 种抗生素的毒性均随着暴露时间的延长而在逐渐增强即具有典型的时间依赖特征。但不同抗生素在同一暴露时间的毒性不同,且毒性大小顺序随着时间延长而变化,如在暴露时间节点 24 h 时,5 种抗生素的毒性大小顺序:CHL < APR < STS < DIH < NEO;在暴露时间节点 48 h 时,毒性大小顺序:APR < CHL < DIH < STS = NEO;在暴露时间节点 72 h 时,毒性大小顺序:CHL = APR < DIH < NEO < STS;在暴露时间节点 96 h 时,毒性大小顺序:CHL < APR < DIH < NEO < STS。

表 2 5 种抗生素在 6 个时间点的拟合函数 (Logit 函数的 α 和 β)、拟合统计量 (R 和 $RMSE$)以及 EC_{50} 和 pEC_{50} 值

Table 2 The regression parameters (α and β of Logit function), two statistics (R and $RMSE$), EC_{50} and pEC_{50} of five antibiotics at six time points

抗生素 Antibiotics	时间/h Time/h	模型参数 Parameters of fitted functions				EC_{50} /(mol·L ⁻¹)	pEC_{50}
		α	β	$RMSE$	R		
硫酸安普霉素 APR	0						-
	12						-
	24	2.74	1.52	0.050	0.9156	1.575E-02	1.80
	48	4.06	1.72	0.072	0.9520	4.360E-03	2.36
	72	4.68	1.66	0.077	0.9648	1.516E-03	2.82
	96	5.94	1.92	0.087	0.9669	8.058E-04	3.09
氯霉素 CHL	0						-
	12						-
	24	12.93	5.00	0.029	0.9764	2.57E-3	2.59
	48	11.75	4.41	0.028	0.9852	2.188E-3	2.66
	72	13.62	4.48	0.043	0.9831	1.479E-3	2.83
	96	14.51	5.00	0.049	0.9846	1.259E-3	2.90
双氢链霉素 DIH	0						-
	12						-
	24	10.73	3.21	0.104	0.7904	4.543E-04	3.34
	48	8.94	2.47	0.069	0.9304	2.402E-04	3.62
	72	9.52	2.30	0.066	0.9683	7.259E-05	4.14
	96	9.82	2.14	0.048	0.9876	2.578E-05	4.59
新霉素硫酸盐 NEO	0						-
	12						-
	24	7.51	2.66	0.042	0.9654	1.502E-03	2.82
	48	6.27	1.86	0.071	0.9559	4.256E-04	3.37
	72	7.29	2.02	0.084	0.9532	2.461E-04	3.61
	96	7.71	2.05	0.086	0.9551	1.734E-04	3.76
硫酸链霉素 STS	0						-
	12						-
	24	3.08	1.18	0.050	0.8891	2.454E-03	2.61
	48	4.00	1.09	0.068	0.9407	2.139E-04	3.67
	72	3.73	1.04	0.080	0.9127	5.295E-05	4.28
	96	7.62	1.63	0.097	0.9488	2.114E-05	4.68

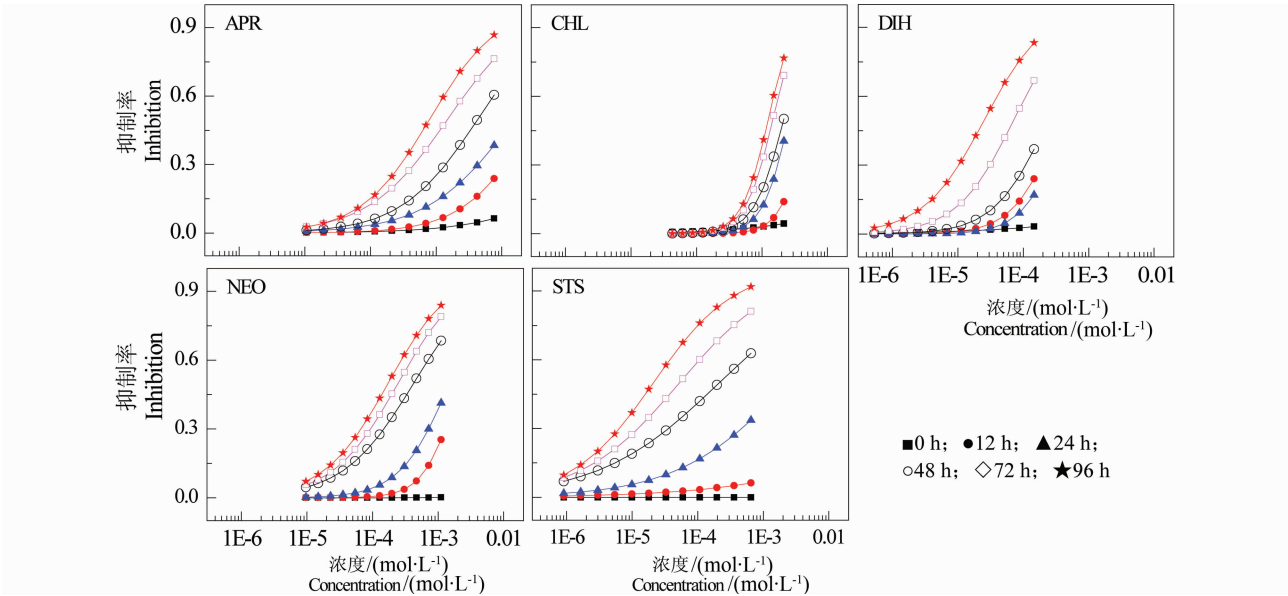


图 3 5 种抗生素在 6 个时间节点的浓度-效应曲线
Fig. 3 Concentration-response curves of five antibiotics at six time points

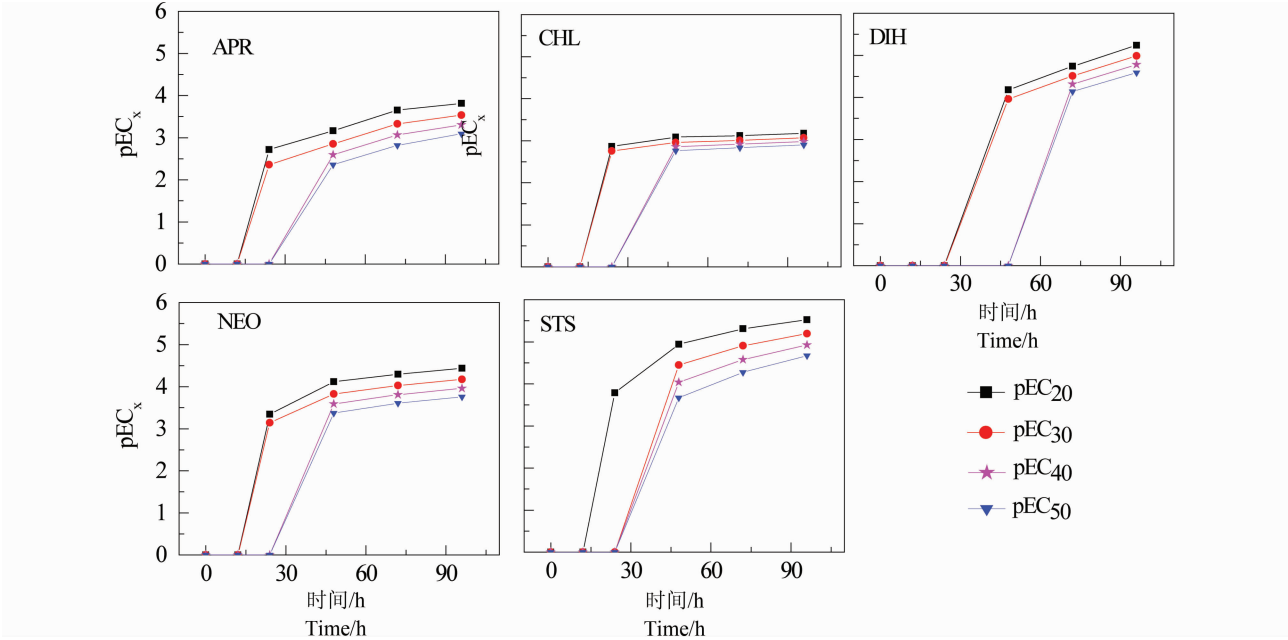


图 4 5 种抗生素毒性随时间的变化曲线
Fig. 4 Plot of pECx versus time for five antibiotics

图 3 也显示 5 种抗生素均表现出明显的时间依赖毒性特征:在 0~24 h,5 种抗生素对 *C. pyrenoidosa* 基本无毒性,然后随着暴露时间的延长,毒性逐渐增加,在 24~48 h 内毒性增加速度最快,此后毒性增加速度逐渐减慢。

3 讨论 (Discussion)

环境污染物的毒性不仅与暴露的剂量有关,暴

露时间也是一个重要的因素。已有研究表明污染物对发光菌 Q67 的毒性具有时间依赖特征^[24-26]。本文中 5 种抗生素对绿藻 *C. pyrenoidosa* 的毒性也具有明显的时间依赖特征。为了进一步说明 5 种抗生素对 *C. pyrenoidosa* 的毒性具有明显的时间依赖特征,我们将每种药物的 4 个典型 pEC_x 值:pEC₂₀、pEC₃₀、pEC₄₀ 和 pEC₅₀ 随着时间变化趋势绘成图 4。如图 4 所示,5 种抗生素的毒性值 pEC₂₀、pEC₃₀、

pEC₄₀和pEC₅₀均随着时间的延长而增加,但不同的抗生素增加规律不同。如 APR、CHL 和 NEO 的 pEC₂₀与pEC₃₀值在 0~12 h 内几乎为 0,在 12~24 h 内毒性迅速增加,然后增加速度减慢,而 pEC₄₀和pEC₅₀值在 0~24 h 内几乎为 0,在 24~48 h 内迅速增加,然后增加速度减慢。但是,CHL 的 4 个毒性值 pEC₂₀、pEC₃₀、pEC₄₀和 pEC₅₀之间的差异较小。STS 的 pEC₂₀值在 0~12 h 内几乎为 0,在 12~24 h 内迅速增加,然后增加速度减慢,而 pEC₃₀、pEC₄₀和pEC₅₀值在 0~24 h 内几乎为 0,在 24~48 h 内迅速增加,然后增加速度减慢。DIH 的 pEC₂₀与pEC₃₀值在 0~24 h 内几乎为 0,在 24~48 h 内迅速增加,然后增加速度减慢,而 pEC₄₀和pEC₅₀值在 0~48 h 内几乎为 0,在 48~72 h 内迅速增加,然后增加速度减慢。这与林楠等所获的研究结论类似^[24]。

上述研究结果显示,污染物的毒性大小及其变化规律也会随暴露时间延长出现变化,这就要求我们在进行污染物生态毒性评价时应进行实时分析,同时考虑浓度与时间 2 个因素,才能全面了解污染物的毒性效应,更深入的了解污染物的毒性作用机制与途径,更能体现实际环境中污染物暴露的现象和信息,同时提高生态风险评估的可信性^[6]。

本文建立了不同暴露时间下污染物对绿藻 *C. pyrenoidosa* 的生长抑制毒性的微板测试分析方法,并成功地应用于环境中普遍存在的 5 种抗生素 APR、STS、DIH、NEO 和 CHL 对 *C. pyrenoidosa* 的时间依赖毒性测试。5 种抗生素对绿藻 *C. pyrenoidosa* 的毒性均随着时间的延长而增加:在开始的 24 h 内基本无毒性,然后随着时间的延长,毒性迅速增加,而后毒性增加的速度逐渐减慢。5 种抗生素对 *C. pyrenoidosa* 在同一暴露时间的毒性大小不同。且在不同的暴露时间节点,5 种抗生素的毒性顺序也不同。以半数效应浓度(EC₅₀)的负对数 pEC₅₀为毒性指标,在 24 h 暴露时间节点的毒性顺序:CHL < APR < STS < DIH < NEO,48 h 的毒性顺序:APR < CHL < DIH < STS = NEO,72 h 的毒性顺序:CHL = APR < DIH < NEO < STS,96 h 的毒性顺序:CHL < APR < DIH < NEO < STS。

通讯作者简介:张瑾(1978—),女,博士,副教授,近年主要从事有机污染物化学与毒理学研究,发表学术论文 30 余篇。

参考文献(References):

- [1] Yu M, Liu S S, Wang M C, et al. Mixture toxicities of three pesticides having different time- toxicity profiles [J]. Chinese Journal of Chemistry, 2014, 32(6): 545 – 552
- [2] Zhu X W, Liu S S, Ge H L, et al. Comparison between the short – term and the long – term toxicity of six triazine herbicides on photobacteria Q67 [J]. Water Research, 2009, 43(6): 1731 – 1739
- [3] Hatano A, Shoji R. A new model for predicting time course toxicity of heavy metals based on Biotic Ligand Model (BLM) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2010, 151(1): 25 – 32
- [4] Wang L J, Liu S S, Yuan J, et al. Remarkable hormesis induced by 1 – ethyl – 3 – methyl imidazolium tetrafluoroborate on *Vibrio qinghaiensis* sp. – Q67 [J]. Chemosphere, 2011, 84(10): 1440 – 1445
- [5] Zhang J, Liu S S, Yu Z Y, et al. Time – dependent hormetic effects of 1 – alkyl – 3 – methylimidazolium bromide on *Vibrio qinghaiensis* sp. – Q67: Luminescence, redox reactants and antioxidants [J]. Chemosphere, 2013, 91(4): 462 – 467
- [6] Newman M C, McCloskey J T. Time – to – event analyses of ecotoxicity data [J]. Ecotoxicology, 1996, 5(3): 187 – 196
- [7] International Organization for Standardization. ISO8692 – 2012: Water quality-Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae [S]. Genève: International Organization for Standardization, 2012
- [8] OECD. Guidelines for the testing of chemicals, freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test [S]. Paris: Economic Co-Operation and Development, 2004
- [9] US EPA. Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850. 5400, Algal Toxicity, Tiers I and II [S]. United States Environmental Protection Agency, 1996
- [10] 国家标准化管理委员会. 21805—2008 G T. 化学品藻类生长抑制试验[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008
- [11] 汪静, 刘娅琛, 曲冰, 等. 金属纳米颗粒对蛋白核小球藻生长活性的影响[J]. 大连海洋大学学报, 2011, 26(5): 386 – 390
- [12] Wang J, Liu Y S, Qu B, et al. The effect of the metal nanoparticles (Fe/Ni) on growth in alga *Chlorella pyrenoidosa* [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2011, 26(5): 386 – 390 (in Chinese)
- [12] 郑香娇, 周作明. 十六烷基三甲基溴化铵对蛋白核小球藻的毒性效应[J]. 湖南农业大学学报, 2012, 38(1): 27 – 31, 68
- Zheng X J, Zhou Z M. Toxic effects of the cetyltrimethylammonium bromide on *Chlorella pyrenoidosa* [J]. Journal of Hunan Agricultural University: Natural Sci-

- ences, 2012, 38(1): 27 – 31, 68 (in Chinese)
- [13] 王朝晖, 谢骏, 姜珊, 等. 商品氯氟菊酯农药对蛋白核小球藻的毒性效应研究[J]. 环境科学学报, 2012, 32(5): 1192 – 1198
- Wang Z H, Xie J, Jiang S, et al. Toxicological effects of commercial cypermethrin on *Chlorella pyrenoidosa* [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2012, 32(5): 1192 – 1198 (in Chinese)
- [14] 聂湘平, 鹿金雁, 李潇, 等. 诺氟沙星(norfloxacin)对蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)生长及抗氧化酶活性的影响[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(3): 327 – 332
- Nie X P, Lu J Y, Li X, et al. Toxic effects of norfloxacin on the growth and the activity of antioxidant of *Chlorella pyrenoidosa* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2007, 2(3): 327 – 332 (in Chinese)
- [15] 周世明, 赵清, 舒为群. 青海弧菌 Q67 新鲜培养菌液测试水中砷铬铅镉汞的急性毒性[J]. 预防医学情报杂志, 2008, 24(6): 403 – 406
- Zhou S M, Zhao Q, Shu W Q. Use freshly prepared *Vibrio qinghaiensis* sp-Q67 suspension to detect acute toxicity of metal chemicals in water [J]. Journal of Preventive Medicine Information, 2008, 24(6): 403 – 406 (in Chinese)
- [16] 袁静, 刘树深, 王丽娟, 等. 蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)微板毒性分析方法优化[J]. 环境科学研究, 2011, 24(5): 553 – 558
- Yuan J, Liu S S, Wang L J, et al. Optimization of microplate toxicity analysis method based on *Chlorella pyrenoidosa* [J]. Research of Environmental Science, 2011, 24(5): 553 – 558 (in Chinese)
- [17] 安婧, 周启星. 药品及个人护理用品(PPCPs)的污染来源、环境残留及生态毒性[J]. 生态学杂志, 2009, 28(9): 1878 – 1890
- An J, Zhou Q X. Pollution sources, environmental residues, and ecological toxicity of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): A review [J]. Chinese Journal of Ecology, 2009, 28(9): 1878 – 1890 (in Chinese)
- [18] Gonzalez-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
- [19] Costanzo S D, Murby J, Bates J. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment [J]. Marine Pollution Bulletin, 2005, 51(1): 218 – 223
- [20] Heberer T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data [J]. Toxicology Letters, 2002, 131(1 – 2): 5 – 17
- [21] 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
- [22] 刘臻, 施华宏, 黄宏, 等. 3 种抗生素对热带爪蟾胚胎发育的毒性影响[J]. 安全与环境学报, 2011, 11(5): 1 – 6
- Liu Z, Shi H H, Huang H, et al. Study on the effects of chloramphenicol erythromycin and tetracycline on the growing *Xenopus tropicalis* embryos [J]. Journal of Safety and Environment, 2011, 11(5): 1 – 6 (in Chinese)
- [23] 刘树深, 张瑾, 张亚辉, 等. APTox: 化学混合物毒性评估与预测[J]. 化学学报, 2012, 70(14): 1511 – 1517
- Liu S S, Zhang J, Zhang Y H, et al. APTox: Assessment and prediction on toxicity of chemical mixtures [J]. Acta Chimica Sinica, 2012, 70(14): 1511 – 1517 (in Chinese)
- [24] 林楠, 张晶, 刘树深. 污染物对青海弧菌 Q67 的时间依赖微板毒性分析[J/OL]. 中国科技论文在线精品论文, 2013, 6(24): 2321 – 2328
- Lin N, Zhang J, Liu S S. Time – dependent microplate toxicity analysis (T-MTA) of pollutant to *Vibrio qinghaiensis* sp. Q67 [J/OL]. Science Paper Online, 2013, 6(24): 2321 – 2328 (in Chinese)
- [25] 王猛超, 刘树深, 陈浮. 拓展浓度加和模型预测三种三嗪类除草剂混合物的时间依赖性毒性[J]. 化学学报, 2013, 72(1): 56 – 60
- Wang M C, Liu S S, Chen F. Application of concentration addition into predicting the time – dependent toxicities of herbicide mixtures to *Vibrio qinghaiensis* sp. Q67 [J]. Acta Chimica Sinica, 2013, 72(1): 56 – 60 (in Chinese)
- ◆