陈 敏,张 瑾,董欣琪,等. 多元抗生素与重金属混合物对蛋白核小球藻的时间依赖性协同与拮抗作用[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(5): 850-859.

CHEN Min, ZHANG Jin, DONG Xin-qi, et al. Time-dependent synergism and antagonism within multi-component mixtures of heavy metals and antibiotics towards *Chlorella pyrenoidosa*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(5): 850-859.

多元抗生素与重金属混合物对蛋白核小球藻的 时间依赖性协同与拮抗作用

陈 敏1,张 瑾1,2,3*,董欣琪1,班龙科1,卞志强1

(1.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;2.安徽建筑大学安徽省绿色 建筑先进技术研究院,合肥 230601;3.清华大学新兴有机污染物控制北京市重点实验室,北京 100084)

摘 要:为探讨水环境中典型污染物抗生素和重金属的联合毒性相互作用,以蛋白核小球藻(Chlorella pyrenoidosa, C. pyrenoidosa) 为指示生物,采用 96 孔微板作为实验载体,以 5 种氨基糖苷类抗生素——硫酸阿米卡星(AMI)、硫酸庆大霉素(GEN)、硫酸卡那霉 素(KAN)、硫酸巴龙霉素(PAR)、妥布霉素(TOB)和 4 种重金属——镉(Cd)、铜(Cu)、锰(Mn)和锌(Zn)为目标混合物,应用均匀设 计射线法设计九元混合物体系,包括 10 条具有不同组分浓度配比的混合物射线。采用已建立的时间依赖微板毒性分析法系统测定 了组分及其多元混合物体系的毒性,采用非线性最小二乘法拟合浓度-毒性数据,应用浓度加和参考模型分析在不同暴露时间的多 元混合物体系的毒性相互作用。结果表明:9 种污染物对 C. pyrenoidosa 的毒性具有明显的时间依赖性,但不同污染物的毒性随时间 变化规律不同,毒性大小顺序也随时间不断发生变化,毒性大小顺序在 96 h 为:KAN<TOB<Zn<Mn<Cd<AMI<GEN<Cu<PAR;九元混 合物射线的毒性也具有时间依赖性,但浓度配比不同射线的毒性随时间变化规律不同;10 条混合物射线对 C. pyrenoidosa 的毒性具 有协同和拮抗作用,且具有明显的时间依赖性,其中 R5~R7 三条混合物射线呈现明显的时间依赖性拮抗作用,且随暴露时间的延 长而趋于明显,余下 7 条混合物射线呈现明显的时间依赖性协同作用,但随暴露时间的延长而逐渐减弱;对同一暴露生物,混合物 毒性相互作用不仅与混合物的组分浓度配比有关,也与暴露时间有关。

关键词:重金属;抗生素;多元混合物;蛋白核小球藻;时间依赖性;协同;拮抗

中图分类号:X171.5 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2018)05-0850-10 doi:10.11654/jaes.2017-1159

Time-dependent synergism and antagonism within multi-component mixtures of heavy metals and antibiotics towards *Chlorella pyrenoidosa*

CHEN Min¹, ZHANG Jin^{1,2,3*}, DONG Xin-qi¹, BAN Long-ke¹, BIAN Zhi-qiang¹

(1.Key Laboratory of Water Pollution Control and Wastewater Resource of Anhui Province, College of Environment and Energy Engineering, Anhui Jianzhu University, Hefei 230601, China; 2.Anhui Advanced Technology Research Institute of Green Building, Anhui Jianzhu University, Hefei 230601, China; 3.Beijing Key Laboratory for Emerging Organic Contaminants Control, Tsinghua University, Beijing 100084, China) **Abstract**: To investigate the joint toxicity of antibiotics and heavy metals, we selected *Chlorella pyrenoidosa* as a test organism, with a 96well microplate as the exposure experiment carrier. Five kinds of aminoglycoside antibiotics : amikacin sulfate (AMI), gentamicin sulfate (GEN), kanamycin sulfate (KAN), paromomycin sulfate (PAR), tobramycin (TOB) and four heavy metals : cadmium, copper, manganese and zinc were selected as the research objects. A nine-component mixture system was designed by the uniform design ray method where 10

*通信作者:张 瑾 E-mail:ginnzy@163.com

收稿日期:2017-08-24 录用日期:2017-12-05

作者简介:陈 敏(1991一),男,安徽六安人,硕士研究生,研究方向为毒理学。E-mail:815348266@qq.com

基金项目:国家自然科学基金项目(21677001,21207002);安徽省自然科学基金项目(1708085MB50)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China(21677001;21207002); The Natural Science Foundation of Anhui Pvovince, China (1708085MB50)

rays with different concentration ratios (p_i s) were arranged. The toxicity of the mixture components and each mixture ray were determined by time-dependent microplate toxicity analysis (t-MTA). The obtained toxicity data in different exposure time were fitted by the non-linear least squares method. Concentration addition was selected and so the additive reference model to analyze toxicity interaction within mixture rays. The results showed that the toxicity of antibiotics and heavy metals was time-dependent, as were the toxicity orders of antibiotics and heavy metals. For the exposure time of 96 h, the toxicity order was KAN<TOB<Zn<Mn<Cd<AMI<GEN<Cu<PAR. The toxicity of the mixture rays was also time-dependent, and their toxicity orders also varied with time. The toxicity of the 10 mixture rays displayed obviously time-dependent synergism and antagonism. Three rays, R5, R6 and R7, showed time-dependent antagonism, which grew clearer with time. The remaining seven rays showed clear synergism, with time-dependency decreasing gradually.

Keywords: heavy metals; antibiotics; multiple mixture; Chlorella pyrenoidosa; time dependency; synergism; antagonism

抗生素是现代临床应用最广泛的药物,在控制感 染传播、治疗感染性疾病过程中发挥着至关重要的作 用。抗生素不仅应用于人类疾病治疗,还用于畜牧业 和水产养殖业。在家畜饲养中,除了用于治疗动物的 传染病,还用作常规饲料添加剂¹¹。抗生素的大量生产 和应用,已使其成为水环境中检测到最多的新型污染 物[24]。调查显示,全球许多地区的土壤和水体中都检 测到抗生素药物,且种类较多,浓度呈升高趋势。进 入环境中的抗生素,可改变环境中微生物种类,破坏 生态系统的平衡⁶,也可诱导出抗药菌株¹⁷,通过食物 等途径进入人体,对人类健康产生危害^[8-9]。

重金属是环境中典型的污染物之一,微量浓度的 重金属就可产生毒性作用[10-11]。因具有富集性和不易 降解性,且对环境中的生物甚至人类健康产生有害影 响,重金属污染已成为最难解决的环境问题之一,成 了人们关注的热点[12]。抗生素和重金属这两种环境污 染物,在环境中经常同时被检测到[13-14]。水体中的重金 属和抗生素可能会以各种形态和浓度共存,形成各种 各样的混合污染物[15-16]。混合污染物产生的累积毒性 与相互作用可能会对生态环境、甚至生物健康产生更 大危害[17-19],如张雨[20]和王瑞等[21]研究发现抗生素-金 属复合物之间的络合作用会改变抗生素的环境行为 和生态毒理作用,络合物的毒性最强。因此,开展抗生 素与重金属的联合毒性作用研究具有重要的实际环 境意义。

越来越多的研究表明,除浓度外,暴露时间是影 响污染物毒性的另一个重要因素,且不同的污染物随 时间可能有不同的毒性变化规律[2-24]。如氨基糖苷类 抗生素及其混合物对青海弧菌(Vibrio qinghaisiense sp.-Q67,Q67)的毒性随着时间的延长而逐渐增加,而 有的污染物毒性却随暴露时间的延长逐渐减弱[25-28]。 因此,要考察污染物的毒性,必须全面系统采集这些污 染物在不同暴露时间对暴露生物的毒性数据才能揭

示污染物间发生毒性相互作用(协同或拮抗作用)的 机制,才能客观准确评价环境污染物的潜在风险[29-30]。 目前针对重金属或抗生素在某一特定暴露时间的单 一毒性效应的研究已有报道[31-32],但关于二者复合污 染的联合毒性相互作用的研究,尤其关于抗生素与重 金属的多元污染物联合毒性相互作用随时间变化的 动态规律的研究非常有限[33-35]。

因此,本文以抗生素和重金属为研究对象,以蛋 白核小球藻(Chlorella pyrenoidosa)为检测生物,采用 均匀设计射线法设计抗生素与重金属的多元(九元) 混合污染物体系,应用已建立的时间依赖微板毒性分 析法(t-MTA)系统测定抗生素和重金属及其混合污 染物体系对蛋白核小球藻的生长抑制率130,运用经典 参考模型浓度加和(Concentration additon, CA)分析混 合物在不同暴露时间的毒性相互作用(协同或拮抗作 用),并揭示抗生素与重金属联合毒性相互作用变化 规律,为科学评价重金属以及抗生素可能产生的风险 提供数据参考。

材料与方法 1

1.1 试剂与仪器

5种抗生素分别为硫酸阿米卡星(Amikacin sulfate,AMI)、硫酸庆大霉素(Gentamycin sulfate,GEN)、 硫酸卡那霉素(Kanamycin sulfate, KAN)、硫酸巴龙霉 素(Paromomycin sulfate, PAR)、妥布霉素(Tobramycin, TOB),购自上海原叶生物科技有限公司,理化性质列 于表1中。4种重金属分别为氯化镉、五水合硫酸铜、 四水合氯化锰、七水合硫酸锌,均为分析纯,均购置于 国药集团化学试剂有限公司,理化性质列于表1中。

重金属和抗生素的储备液均用超纯水(Reverses Osmosis)配制,并于4℃冰箱中保存、备用。

主要仪器: Bio-RAD 680 型酶标仪(美国 Bio-RAD 伯乐仪器有限公司),超净工作台(三发仪器有

表1 实验用抗生素与重金属的理化性质

Table 1 Physi-chemical properties of antibiotics and heavy metals

试剂名称	简写	分子式	CAS 号	分子量/g·mol ⁻¹	纯度/%
氯化镉	Cd	$CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$	7790-78-5	228.35	≥99.0
五水合硫酸铜	Cu	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	7758-99-8	249.69	≥99.0
四水合氯化锰	Mn	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	13446-34-9	197.90	≥99.0
七水合硫酸锌	Zn	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	7446-20-0	287.56	≥99.0
硫酸阿米卡星	AMI	$C_{22}H_{43}N_5O_{13}{\boldsymbol{\cdot}}2(H_2SO_4)$	39831-55-5	781.76	≥67.4
硫酸庆大霉素	GEN	$C_{21}H_{43}N_5O_7{\scriptstyle{\bullet}}H_2SO_4$	1405-41-0	575.67	≥59.0
硫酸卡那霉素	KAN	$C_{18}H_{36}N_4O_{11}\!\cdot\!H_2SO_4$	25389-94-0	582.57	≥75.0
硫酸巴龙霉素	PAR	$C_{23}H_{45}N_5O_{14}\!\cdot\!H_2SO_4$	1263-89-4	713.71	≥96
妥布霉素	TOB	$C_{18}H_{37}N_5O_9$	32986-56-4	467.51	≥90

限公司),YX280A 手提式压力蒸汽灭菌器(上海三申 医疗器械有限公司),MGC-250 智能型光照培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司),FA1004 型五位电子 天平(天津天马衡基仪器有限公司)。

1.2 藻种与培养

实验藻种:蛋白核小球藻购自中国科学院典型培养物保藏委员会淡水藻种库(FACHB),藻的培养基配制及其培养过程参见文献[24]和[32]。

1.3 混合物实验设计

采用均匀设计射线法(UD-Ray)^[37]设计抗生素与 重金属的混合物体系,共安排 10 条九元混合物射线 (R1~R10),每条混合物射线包含的抗生素和重金属 组分和各组分的浓度配比(*p_i*)及每条混合物射线的 最高和最低设定浓度见表 2。

1.4 微板设计与时间毒性测试

微板设计与毒性测试过程参考文献[24]:在96孔 透明微板(Corning,9018)的四周24孔中加入200μL 蒸馏水以防止边缘效应,于2、6、7、11列的24孔中加 人 100 μL 的蒸馏水,在余下孔加入事先配好的12 个 不同浓度的污染物储备液 100 μL, 然后加入事先培 养至对数期的蛋白核小球藻溶液 100 μL, 最后加透 明盖,然后将微孔板置于温度为 25 ℃、照度为 5000 lx、光暗比 14 h:10 h 的光照培养箱中培养,分别在暴 露时间 *t*= 0、12、24、48、72 h 和 96 h 时将微板放入酶 标仪中,测定 690 nm 波长下的光密度(OD₆₀₀)。针对每 一个毒物,上述微板实验操作至少重复 3 遍。

小球藻生长抑制率的计算公式如下:

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

 $\mu_{j} = (OD_{690,n} - OD_{690,n-1}) / OD_{690,n}$ (2)

式中: $E_{i,j}$ 为污染物浓度 $c_i(i=1,2,3,\dots,12)$ 在暴露时 间终点 j(j=0,12,24,48,72,96 h)对小球藻的生长速 率抑制率: $\mu_{i,j}$ 为微板中污染物浓度 c_i 处理孔中小球 藻在暴露时间终点 j 时的平均生长速率: $\mu_{0,j}$ 为微板 中空白藻在暴露时间终点 j(j=0,12,24,48,72,96 h)的平均生长速率。 μ_j 为微板孔中小球藻在某一暴露时 间j(j=0,12,24,48,72,96 h)的平均生长速率; $OD_{60,n}$

表 2 九元混合物体系中 10 条射线的组分及其所占浓度比(p_i)

Table 2 The components and their concentration ratios together with the highes and lowest experimental concentration of

ten rays in nine-component mixture system

Ray	AMI	GEN	KAN	PAR	TOB	Cd	Cu	Mn	Zn	最高浓度/mol·L ⁻¹	最低浓度/mol·L ⁻¹
R1	1.17E-02	1.36E-02	6.78E-03	2.10E-04	9.06E-01	3.10E-04	1.35E-03	5.65E-02	3.10E-03	4.01E-03	1.45E-05
R2	1.49E-02	1.17E-02	4.77E-02	3.80E-04	8.48E-01	1.60E-03	1.42E-03	6.12E-02	1.30E-02	3.98E-03	1.44E-05
R3	1.57E-02	1.04E-02	1.09E-01	4.70E-04	7.77E-01	3.18E-03	1.37E-03	5.99E-02	2.34E-02	4.10E-03	1.49E-05
R4	1.42E-02	7.76E-03	2.28E-02	5.00E-04	6.04E-01	5.72E-03	1.13E-03	5.01E-02	8.93E-02	4.43E-03	1.61E-05
R5	1.36E-02	6.54E-03	3.80E-01	5.39E-04	5.22E-01	8.64E-03	1.01E-03	4.54E-02	2.27E-02	5.16E-03	1.87E-05
R6	1.10E-02	4.79E-03	4.88E-01	4.81E-04	3.90E-01	1.02E-02	7.81E-04	3.53E-02	5.96E-02	5.79E-03	2.10E-05
R7	8.84E-03	3.49E-03	5.94E-01	4.20E-04	2.90E-01	1.16E-02	5.97E-04	2.72E-02	6.40E-02	6.66E-03	2.42E-05
R8	1.49E-02	1.17E-02	4.77E-02	3.80E-03	8.48E-01	1.60E-03	1.42E-03	6.12E-02	1.30E-02	3.98E-03	1.44E-05
R9	1.57E-02	1.04E-02	1.09E-01	4.70E-04	7.77E-01	3.18E-03	1.37E-03	5.99E-02	2.34E-02	4.10E-03	1.49E-05
R10	1.32E-02	6.34E-03	3.69E-01	5.20E-04	5.06E-01	8.39E-03	9.80E-04	4.40E-02	5.18E-02	5.08E-03	1.84E-05

为微板孔中小球藻在第 n 个暴露时间点(n=0、1、2、3、 4、5、6)的平均吸光光度值;OD_{60,n-1}为微板孔中小球 藻在第 n-1 个暴露时间点的平均吸光光度值。

1.5 时间毒性数据拟合

实验数据处理方法参见文献[24]。将获得的在不同暴露时间污染物的浓度-抑制率数据运用两参数 Logit 函数进行非线模拟合。

 $E=1/[1+exp(-\alpha-\beta x \lg_c)]$ (3) 式中:E表示效应(0 $\leq E \leq 1$);c表示单个化合物或者 混合物浓度; α 和 β 都是参数。

由于毒性实验的固有误差,评估化合物或混合物 毒性时必须考察置信区间的范围,特别是观测值的置 信区间(OCI)。OCI主要用于表征实验数据的不确定 度。本论文中,OCI是基于实测毒性效应,在显著性水 平为 0.05 情况下,化合物实验浓度的可信范围,即化 合物产生某一效应 x%时的 95% OCI。并且本文是在 整个浓度-效应区域内建立整条 OCI 曲线。

1.6 混合物毒性相互作用分析

混合物毒性相互作用常常是参考某一标准加和 参考模型来定义的,浓度加和(CA)模型能用来评估 大多数混合物的毒性^[38-39]。

CA 模型的公式表达为:

$$\sum_{i=1}^{n} \frac{c_i}{\mathrm{EC}_{x,i}} = 1 \tag{3}$$

式中:c_i表示混合物中产生某一效应 x%时组分 i 的浓度;EC_{xi}表示混合物中第 i 个化合物单独存在时所产生的效应与混合物总效应 x%相同时的浓度。当观测毒性等于、大于或小于参考模型预测毒性时,分别称混合物发生了加和作用、协同作用和拮抗作用。

2 结果与讨论

2.1 抗生素与重金属对蛋白核小球藻的时间毒性

不同污染物的毒性随暴露时间具有不同的变化 规律^[40-41]。图 1 是 5 种抗生素和 4 种重金属对蛋白核 小球藻在不同暴露时间的浓度-效应曲线(CRC)。从 图 1 可以看出,抗生素和重金属对小球藻的毒性均随 着暴露时间的延长而逐渐增强,呈现出时间依赖性。 不同物质对小球藻毒性随时间变化的规律不同,如 AMI、GEN、KAN、PAR、Cd、Mn 和 Zn 均是从 0 时刻的 没有明显毒性逐渐增强,但每个物质毒性增强的速率 不同,在各个暴露时间点,几个物质的毒性不同,如在 96 h,PAR 的最大抑制率超过了 90%,AMI 和 GEN 的 最大抑制率超过了 80%,KAN、Mn 和 Zn 的最大抑制 率约 60%。TOB 在前三个时间点几乎没有毒性,72 h 后在高浓度才有明显毒性,96 h 的最高抑制率迅速达到了 70%。而Cd 和 Cu 具有急性毒性,即在 12 h 就呈现出了 30%以上的抑制率,此后 Cu 的毒性逐渐增加,72 h 后最大抑制率达到 90%以上,此后几乎不再增加,Cd 的最大抑制率在 12 h 后迅速增加达到了 70%以上,此后增加缓慢,72 h 后几乎不再增加。

研究表明,重金属对藻的毒性主要是通过改变运 动器的细微结构,使核酸组成发生变化,影响细胞生 长和缩小细胞体^[42]。氨基糖苷类抗生素的毒性作用是 损害细胞膜,使细胞浆外漏,并作用于核糖体阻抑蛋 白质合成,影响细胞生长^[43]。由此可以看出本研究中 两种污染物对蛋白核小球藻的毒性作用机理相似,可 以比较同一暴露时间节点的毒性大小。以 pEC₅₀ 值 (半数效应浓度 EC50 的负对数)为毒性指标,污染物 在同一暴露时间的毒性不同,且毒性大小顺序随着暴 露时间延长而变化,如在 12 h 所有物质的 pECso 值均 为 0, 在 24 h 除了 Cd 有 pEC₅₀ 值, 其余 8 种物质的 pEC50值均为0,在48h,三种物质的毒性大小顺序为 PAR<Cd<Cu, 其余 6 种物质的 pEC₅₀ 值均为 0,72 h 时 KAN 和 TOB 的 pEC_{50} 值为 0,其余 7 种物质的毒 性大小顺序为 Zn<Mn<Cd<AMI<GEN<PAR<Cu,96 h 的毒性顺序为 KAN<TOB<Zn<Mn<Cd<AMI<GEN< $Cu < PAR_{\circ}$

2.2 抗生素-重金属对蛋白核小球藻在不同时间点的 联合毒性

将抗生素与重金属的九元混合物体系对蛋白核 小球藻的浓度-效应数据及拟合 CRC 绘于图 2 中。从 图 2 可以看出,抗生素和重金属的九元混合物射线对 蛋白核小球藻的毒性,均随着暴露时间的延长逐渐增 强,即具有时间依赖性,但不同浓度配比的混合物射 线,毒性随时间变化的规律略有不同。如 R1、R2、R3、 R8 和 R9 的毒性均随暴露时间的延长逐渐增强,24 h 后增加速度较快,72 h 后增加速率减慢,96 h 后几乎不 再增加,而余下的 5 条射线的毒性随暴露时间的延长, 只在开始的 48 h 内迅速增加,此后毒性增加非常缓慢, 96 h 不再增加。九元混合物体系几条射线的毒性较接 近 TOB 的毒性,可能是由于 TOB 所占浓度比最高(表 2),直接影响了混合物毒性随时间的变化规律。

2.3 抗生素-重金属多元混合物对蛋白核小球藻的联 合毒性相互作用

CA 模型能较好地评估混合物毒性^[39]。CA 对 10 条射线在不同时间点的预测 CRC 与实验 CRC 及其





置信区间绘于图 3 中。由于在暴露时间 12 h 和 24 h 内,部分组分(如 TOB)没有明显的毒性,因此,图 3 只 给出了 48 h 后的浓度-效应关系图。

从图 3 可以看出,除了射线 R5~R7 的 CA 预测 CRC 部分落在实验观测置信区间的上方,表现为部 分拮抗作用,其余射线的 CA 预测线都在实验 CRC 置信区间的下方,呈现明显的协同作用,但不同射线 协同作用不同。R1~R3 和 R8、R9 均呈现出明显的协 同作用,而 R4 和 R10 均在 48 h 呈现明显的协同作 用,且随暴露时间的延长而逐渐减弱甚至变为加和作 用,而 R5~R7 在暴露时间为 48 h 时,CA 预测 CRC 都 落在实验 CRC 置信区间内,表现为经典的加和作用, 随后随暴露时间的延长,CA 预测线 CRC 落在了置信 区间上限的上方,即呈现出拮抗作用,表明R5、R6 和 R7 三条射线呈现出明显的时间依赖性拮抗作用。如 前所述,两类物质作用于藻细胞的机理接近,因此大 多数混合物射线呈现出明显的协同作用。同时,由于 抗生素分子中含有大量的羧基、羟基、氨等基团或电 子供体原子,可与金属离子发生络合作用,这种络合 作用会在不同程度上改变混合污染物的环境行为和 毒理效应,这可能使污染物的联合毒性增强或减弱, 即产生了协同或拮抗作用^[20-21]。综上所述,混合物的相 互作用的毒性大小及其变化规律不仅与组分的浓度 比有关,也会随暴露时间变化而变化,这就要求我们 在揭示污染物相互作用规律时,要同时考虑浓度与时 间两个因素,提高生态风险评估的可信度。

3 结论

(1)9种污染物对蛋白核小球藻的毒性具有明显的时间依赖性,但不同物质对其毒性随时间变化的规律不同,毒性大小顺序也随时间不断变化。

(2)抗生素和重金属的九元混合物体系对蛋白核





Figure 2 The concentration-effect curves of the nine-component mixture systems at different exposure time

小球藻具有时间依赖毒性,且毒性的大小随暴露时 间的延长而增强,前48h内毒性显著增强,在48~96 h内,毒性增加幅度减小。

(3) 10 条抗生素和重金属的九元混合物射线对 蛋白核小球藻的毒性具有时间依赖性协同或拮抗作 用,射线 R1~R3 和 R8~R9 均呈现出随时间的延长而 逐渐减弱的协同作用,而射线 R5~R7 呈现出随时间 的延长而逐渐趋于明显的拮抗作用。

(4)混合物的毒性相互作用不仅与组分的浓度配 比有关,也与暴露时间有关。

参考文献:

- [1] Teuber M. Veterinary use and antibiotic resistance[J]. Current Opinion in Microbiology, 2001, 4(5):493-499.
- [2] 张琳晓, 那广水, 陆紫皓, 等. 快速评估近岸海洋水体与沉积物中 E. coli 与 S. aureus 抗生素抗性水平的新方法[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(1):155-162.
 - ZHANG Lin-xiao, NA Guang-shui, LU Zi-hao, et al. A novel method for rapid assessment of antibiotic resistance E. coli and S. aureus in waters and sediments[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(1): 155-162.





Figure 3 The nine-component mixture systems of toxic interaction of Chlorella pyrenoidosa concentration-effect relationship





 $Continued \ figure \ 3 \ \ The \ nine-component \ mixture \ systems \ of \ toxic \ interaction \ of \ Chlorella \ pyrenoidos a \ concentration-effect \ relationship$

农业环境科学学报 第 37 卷第 5 期

- [3] 刘 佳. 重金属污染农田土壤中抗生素抗性基因与可移动遗传元件的分布[D]. 郑州:郑州大学, 2016.
 LIU Jia. Distribution of antibiotic resistance genes and removable genet-ic elements in soil contaminated by heavy metals[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2016.
- [4] 李宗宸. 河流沉积物吸附四环素类抗生素的行为规律研究[D]. 上海:东华大学, 2017.

LI Zong-chen. Study on the adsorption behaviors and rules of tetracycline on river sediment[D]. Shanghai: Donghua University, 2017.

- [5] Díaz-Cruz S, Barceló D. Occurrence and analysis of selected pharmaceuticals and metabolites as contaminants present in waste waters, sludge and sediments[J]. *Water Pollution*, 2004, 511:47-63.
- [6] Costanzo S D, Murby J, Bates J. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2005, 51(1): 218–223.
- [7] Duffy B, Holliger E, Walsh F. Streptomycin use in apple orchards did not increase abundance of mobile resistance genes[J]. *Fems Microbiolo*gy Letters, 2014, 350(2):180–189.
- [8] 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.
- [9] Liu Y, Gao B Y, Yue Q Y, et al. Influences of two antibiotic contaminants on the production, release and toxicity of microcystins[J]. *Ecotoxi*cology and Environmental Safety, 2012, 77:79–87.
- [10] 韦丽丽,周 琼,谢从新,等. 三峡库区重金属的生物富集、生物放 大及其生物因子的影响[J]. 环境科学, 2016, 37(1):325-334.
 WEI Li-li, ZHOU Qiong, XIE Cong-xin, et al. Bioaccumulation and biomagnification of heavy metals in Three Gorges Reservoir and effect of biological factors[J]. Environmental Science, 2016, 37(1):325-334.
- [11] Bing H J, Zhou J, Wu Y H, et al. Current state, sources, and potential risk of heavy metals in sediments of Three Gorges Reservoir, China[J]. *Environmental Pollution*, 2016, 214:485–496.
- [12] Lin Y, Gritsenko D, Feng S L, et al. Detection of heavy metal by paperbased microfluidics[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 83:256– 266.
- [13] Yang R S. Some critical issues and concerns related to research advances on toxicology of chemical mixtures[J]. *Environmental Health Perspectives*, 1998, 106(Suppl 4):1059–1063.
- [14] Zhang Z Z, Zhang Q Q, Xu J J, et al. Evaluation of the inhibitory effects of heavy metals on anammox activity: A batch test study[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 200:208–216.
- [15] 刘艳萍, 刘鸿雁, 吴龙华, 等. 贵阳市某蔬菜地养殖废水污灌土壤 重金属、抗生素复合污染研究[J]. 环境科学学报, 2017, 37(3): 1074-1082.

LIU Yan-ping, LIU Hong-yan, WU Long-hua, et al. Co-contamination of heavy metals and antibiotics in soils under husbandry wastewater irrigation in Guiyang City[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2017, 37 (3):1074–1082.

[16] 李美芳, 刘云国, 舒 鼎, 等. 一种使用改性氧化石墨烯处理抗生素 和重金属复合污染水体的方法:中国, 201611044606. 0[P]. 2017-03-22. LI Mei-fang, LIU Yun-guo, SHU Ding, et al. A method for treating contaminated water with antibiotic and heavy metal complexes using modified graphene: China, 201611044606. 0[P]. 2017-03-22.

- [17] Zhang Y, Cai X Y, Lang X M, et al. Insights into aquatic toxicities of the antibiotics oxytetracycline and ciprofloxacin in the presence of metal:Complexation versus mixture[J]. *Environmental Pollution*, 2012, 166:48–56.
- [18] Backhaus T, Porsbring T, Arrhenius Å, et al. Single-substance and mixture toxicity of five pharmaceuticals and personal care products to marine periphyton communities[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2011, 30(9):2030–2040.
- [19] Chen C, Wang Y H, Qian Y Z, et al. The synergistic toxicity of the multiple chemical mixtures: Implications for risk assessment in the terrestrial environment[J]. *Environment International*, 2015, 77:95–105.

[20]张 雨. 抗生素-金属复合物水生毒理及选择性吸附去除[D]. 大连:大连理工大学, 2013.

ZHANG Yu. Aquatic toxicity and selective adsorption removal of antibiotic and metal complex[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2013.

- [21] 王 瑞,魏源送. 畜禽粪便中残留四环素类抗生素和重金属的污染 特征及其控制[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(9):1705-1719.
 WANG Rui, WEI Yuan-song. Pollution and control of tetracyclines and heavy metals residues in animal manure[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2013, 32(9):1705-1719.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] 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-Qiong, ZHANG Jin, LI Xiao-meng, 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.
- [25] 朱祥伟, 刘树深,张 琼,等. 杀虫剂及抗生素对发光菌的短期毒性 与长期毒性[J]. 环境科学研究, 2009, 22(5):589-594. ZHU Xiang-wei, LIU Shu-shen, ZHANG Qiong, et al. Comparison between the short-term and the long-term toxicity of selected insecticides and antibiotics on photobacteria[J]. *Research of Environmental Science*, 2009, 43(6):1731-1739.
- [26] 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毒性[J]. 化学学报, 2013, 72(1):56-60.
 WANG Meng-chao, LIU Shu-shen, CHEN Fu. Predicting the time-dependent toxicities of three triazine herbicide mixtures to *V. qinghaien*sis sp. Q67 using the extended concentration addition model[J]. *A cta Chimica Sinica*, 2013, 72(1):56-60.
- [27] 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 antioxidases[J]. *Chemosphere*, 2013,

91(4):462-467.

2018 年 5 月

- [28] Zhang J, Liu S S, Dong X Q, et al. Predictability of the time-dependent toxicities of aminoglycoside antibiotic mixtures to *Vibrio qinghaiensis* sp. -Q67[J]. *RSC Advances*, 2015, 5(129):107076-107082.
- [29] Baas J, Jager T, Kooijman B. Understanding toxicity as processes in time[J]. Science of the Total Environment, 2010, 408(18): 3735–3739.
- [30] Margerit A, Gomez E, Gilbin R. Dynamic energy-based modeling of uranium and cadmium joint toxicity to *Caenorhabditis elegans* [J]. *Chemosphere*, 2016, 146:405–412.
- [31] 邓辅财, 刘树深, 刘海玲, 等. 部分重金属化合物对淡水发光菌的 毒性研究[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(4):402-408.
 DENG Fu-cai, LIU Shu-shen, LIU Hai-ling, et al. Toxicities of Selected heavy metal compounds and their mixtures to photobacteria (*Vibrio qinghaiensis* sp. -Q67) [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2007, 2(4):402-408.
- [32] 袁 静, 刘树深, 王丽娟, 等. 蛋白核小球菜(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 Jing, LIU Shu-shen, WANG Li-juan, et al. Optimization of microplate toxicity analysis method based on *Chlorella pyrenoidose*[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2011, 24(5):553-558.
- [33] Zhou Y, Xu Y B, Xu J X, et al. Combined toxic effects of heavy metals and antibiotics on a *Pseudomonas fluorescens* strain ZY2 isolated from swine wastewater[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(2):2839–2850.
- [34] 吕 旋,向 垒,李彦文,等.环丙沙星-镉复合污染对高低累积型菜心种子发芽的影响[J].农业环境科学学报,2014,33(4):819-820.
 LÜ Xuan, XIANG Lei, LI Yan-wen, et al. Influences of ciprofloxacin-cadmium combined pollution on seed germination and seedling growth of ciprofloxacin high- and low- accumulating *Brassica parachinensis*[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2014, 33(4):819-820.
- [35] Brausch J M, Rand G M. A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity[J]. *Chemosphere*, 2010, 82(11):1518–1532.
- [36] 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]. 中国科技论文在线精品论文, 2013, 6(24):2321-2328.

LIN Nan, ZHANG Jing, LIU Shu-shen. Time-dependent microplate toxicity analysis(T-MTA) of pollutant to *Vibrio qinghaiensis* sp. Q67 [J]. *Highlights of Sciencepaper Online*, 2013, 6(24):2321-2328.

- [37] Zhang Y H, Liu S S, Song X Q, et al. Prediction for the mixture toxicity of six organophosphorus pesticides to the luminescent bacterium Q67
 [J]. Ecotoxicology & Environmental Safety, 2008, 71(3):880.
- [38] Iwasaki Y, Gauthier P. Concentration addition and response addition to analyze mixture toxicity: Is it worth testing?[J]. Environmental Toxicology & Chemistry, 2016, 35(3):526-527.
- [39] 刘树深, 刘 玲, 陈 浮. 浓度加和模型在化学混合物毒性评估中的应用[J]. 化学学报, 2013, 71(10):1335-1340. LIU Shu-shen, LIU Ling, CHEN Fu. Application of the concentration addition model in the assessment of chemical mixture toxicity[J]. Acta Chimica Sinica, 2013, 71(10):1335-1340.
- [40] 董欣琦,陈 敏,张 瑾,等. 氨基糖苷类抗生素混合物对蛋白核小 球藻的时间依赖毒性[J]. 安徽建筑大学学报, 2016, 24(6):67-73. DONG Xin-qi, CHEN Min, ZHANG Jin, et al. Time-dependent Toxicity of Aminoglycoside antibiotics to *Chlorella pyrenoidosa*[J]. *Journal of Anhui Jianzhu University*, 2016, 24(6):67-73.
- [41] Tang H X, Liu S S, Li K, et al. Combining the uniform design-based ray procedure with combination index to investigate synergistic lethal toxicities of ternary mixtures on *Caenorhabditis elegans* [J]. *Analytical Methods*, 2016, 8(22):4466–4472.
- [42] 石 磊. 重金属对小球藻的毒性作用及小球藻对 Hg²*的吸附研究 [D]. 沈阳:东北大学, 2008.

SHI Lei. Research on the toxicity of heavy metals on *Chlorella* sp. and the adsorpyion of Hg²⁺ by *Chlorella* sp.[D]. Shenyang:Northeastern U-niversity, 2008.

[43] 田中信男,高 恩. 氨基糖苷类抗生素的作用及耐药机理[J]. 国外 医药(抗生素分册), 1987(6):425-426.
Tanaka Nobuo, GAO En. The effect and mechanism of aminoglycoside antibiotics[J]. World Notes on Antibiotics, 1987(6):425-426.