张 迪, 厉 圆, 沈忱思, 等. 金霉素及其异构体降解产物对斜生栅藻的毒性效应研究[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(4): 756-764. ZHANG Di, LI Yuan, SHEN Chen-si, et al. Understanding the toxic effects of chlortetracyclineandits and its isomer degradation products on *Scenedesmus obliquus*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2019, 38(4): 756-764.

金霉素及其异构体降解产物对斜生栅藻的毒性效应研究

张 迪1, 厉 圆1, 沈忱思1,2*, 肖冬雪3, 柳建设1, 赵 凤1, 熊明瑜4

(1.东华大学环境科学与工程学院,国家环境保护纺织工业污染防治工程技术中心,上海 201620;2.上海污染控制与生态安全研究院,上海 200092;3.中国水产科学研究院东海水产研究所,上海 200090;4.嘉兴市环境科学研究所有限公司,浙江 嘉兴 314100)

摘 要:为探索水体中四环素类抗生素异构体降解产物的毒性效应,选取金霉素及其异构体降解产物为目标化合物,斜生栅藻 (Scenedesmus obliquus)为受试生物,结合藻类生理指标探讨金霉素及其异构体降解产物的毒性效应。研究结果表明,在斜生栅藻 藻液中,金霉素主要的异构体降解产物为异金霉素及异差向金霉素。暴露72h后,金霉素及其异构体降解产物处理组的藻细胞 形态发生了明显的质壁分离,且细胞通透性均显著增大。但是,金霉素母体药物与不同异构体降解产物对斜生栅藻的毒性效应 表现出了明显的差异。金霉素母体药物处理组的斜生栅藻细胞中可溶性蛋白质和叶绿素a浓度降低得更为显著,且氧化损伤更 为严重。金霉素母体药物与其异构体降解产物虽然具有相似的化学结构,但取代基空间构象的不同会导致药物与藻细胞中的可 溶性蛋白质的结合位点不同,因而对藻细胞产生不同的毒性效应。探究金霉素及其异构体降解产物对水生环境产生的毒性效 应,有望为全面认识四环素类抗生素的生态环境风险提供新的依据。

关键词:金霉素;异构体;斜生栅藻;降解产物;毒性效应

中图分类号:X171.5 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2019)04-0756-09 doi:10.11654/jaes.2018-0964

Understanding the toxic effects of chlortetracyclineandits and its isomer degradation products on *Scenedes*mus obliquus

ZHANG Di¹, LI Yuan¹, SHEN Chen-si^{1,2*}, XIAO Dong-xue³, LIU Jian-she¹, ZHAO Feng¹, XIONG Ming-yu⁴

(1.Environmental Science and Engineering College of Dong Hua University, State Environmental Protection Engineering Center for Pollution Treatment and Control in Textile Industry, Shanghai 201620, China; 2.Shanghai Institute of Pollution Control and Ecological Security, Shanghai 200092, China; 3.East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China; 4.Jiaxing Environmental Science Research Institute Limited Company, Jiaxing 314100, China)

Abstract: To explore the toxicity of tetracycline antibiotics and their isomeric degradation products in the aqueous environment, chlortetracycline was used as the target compound and *Scenedesmus obliquus* as the test organism. A study of the growth inhibitors and physiological indicators of the algae was combined with an investigation of the difference in toxicity between chlortetracycline and its isomers. The results showed that the degradation products of chlortetracycline were mainly iso-chlortetracycline and epi-iso-chlortetracycline in the presence

收稿日期:2018-07-25 录用日期:2018-10-10

作者简介:张 迪(1994—),女,安徽宿州人,硕士研究生,主要研究方向为水污染控制化学及生态毒理。E-mail:zhangdi_chn@163.com *通信作者:沈忱思 E-mail:shencs@dhu.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金项目(21777023);国家重点研发计划项目(2016YFC0400501);东华大学中央高校基金项目(2232016D-12);上海市 青年科技英才扬帆计划项目(17YF1425600);中央级公益性科研院所基本业务费专项资金(2016T10);中央高校基金项目(2232018G-11)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China (21777023); The National Key Research and Development Plan (2016YFC0400501); The Fundamental Research Funds for the Central University of Dong Hua University (2232016D-12); The Shanghai Youth Science and Technology Talent Sailing Plan (17YF1425600); The Special Found for Basic Business Expenses of Public Welfare Research Institutes at the Central Level(2016T10); The Fundamental Research Fund for the Central Universities (2232018G-11)

of *Scenedesmus obliquus*. After being exposed to chlortetracycline and its isomeric degradation products for 72 h, the *Scenedesmus obliquus* experienced plasmolysis and its cell permeability increased significantly. In addition, the difference in toxicity between chlortetracycline and its isomeric degradation products was obvious. In the chlortetracycline treatment, the concentration of soluble protein and chlorophyll– a in the *Scenedesmus obliquus* decreased significantly and it underwent serious oxidative damage. Although chlortetracycline and its isomeric degradation products had similar chemical structures, they did not have the same toxic effects on algal cells. This might be due to differences in the conformation of the substituents in chlortetracycline and its isomers, which would cause the drugs to bind to different sites on the proteins in the algal cells. It is hoped that this investigation of the toxic effect of chlortetracycline and its isomeric degradation products on an aquatic organism will be help provide a deeper understanding of the environmental risks of tetracycline antibiotics. **Keywords**; chlortetracycline(CTC); isomers; *Scenedesmus obliquus*; degradation products; toxicity

四环素类抗生素(Tetracycline antibiotics,TCs)由 于其抗菌谱广、价格低廉以及具有显著的治疗价值已 经被广泛使用于水产养殖、畜禽业和医药卫生等行 业^{III}。四环素类抗生素的频繁使用造成了其在环境 中呈现出一种"假持久性"的现象,所带来的一系列环 境污染和生态安全问题已引起广泛关注^[1-3]。然而, 它们的化学结构并不稳定,尤其是四环素(Tetracycline,TC)、金霉素(Chlortetracycline,CTC)、土霉素 (Oxytetracycline,OTC)等天然四环素,在水体中极易 发生异构化,生成差向四环素类异构体^[4-7]。因此,重 视四环素类母体污染物的同时,其异构化产物造成的 环境污染和生态安全问题也迫切需要关注。

据研究报道,金霉素异构化产物4-差向金霉素 (4-epi-chlortetracycline,ECTC)在国内外的地表水中 均有检出^[8-10]。基于药物化学理论,在弱酸性条件 (pH=2~6)下,四环素类抗生素分子中的不对称碳原 子C-4可逆地发生异构化,形成差向四环素;在弱碱 性(pH=8)条件下,四环素的C环打开,转化为内酯化 异构体(异四环素);在酸性较强(pH<2)的条件下,四 环素C₆位上的叔羟基易脱落而形成脱水四环素^[11-12]。 同时,也有报道指出差向异构体的半衰期相对较长, 细胞毒性相比母体药物明显增加^[13]。然而,自然水 体比药物化学的研究环境复杂得多,四环素类抗生 素及其异构体对水体环境条件十分敏感,且不同种 类四环素的降解性质差异较大,但目前此方面的研 究鲜有报道。

藻类作为水生生态系统的初级生产者,在水生生态系统中发挥着重要作用。另外,藻类较其他水生生物敏感,被经济合作与发展组织(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)推荐为模式生物。藻细胞会不断蓄积抗生素,抗生素产生的毒性效应将随着食物链的递增而影响较高营养级别的生物,甚至对人类健康造成威胁^[14]。徐冬梅等^[15]研

究报道了土霉素、金霉素及强力霉素对蛋白核小球藻和斜生栅藻的细胞膜通透性及生长抑制作用差异,姜思等¹¹⁶报道了四环素等4种常用抗生素对莱茵衣藻的生长及光化学活性的抑制作用,以上研究均表明四环素类抗生素对藻类具有一定的毒性。然而,这些研究均着眼于药物母体对藻类的毒性影响,对其代谢及降解产物的毒性效应研究报道甚少。因此,探索四环素类抗生素降解产物的毒性效应,有望更加全面地认识抗生素在水体中降解所带来的环境风险。

因此,本研究选取具有代表性的斜生栅藻 (Scenedesmus obliquus)为受试生物,选用四环素类抗 生素中稳定性较弱的金霉素为目标化合物,探索金霉 素异构体降解产物对斜生栅藻的毒性效应并对其毒 性机制进行探讨,为全面认识四环素类抗生素因降解 和转化产生的潜在的环境风险提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器:UVPC-2401紫外-可见分光光度计(日本 岛津公司)、GXZ型智能恒温人工培养箱(宁波江南仪 器厂)、JY92-II超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科 技股份有限公司)、LDZM-40KCS立式压力蒸汽灭菌 锅(上海申安医疗器械厂)、Waters高效液相色谱-质 谱仪(美国Waters)、Heraeus MultifugeX1冷冻离心机 [赛默飞世尔科技(中国)有限公司]。

供试斜生栅藻(Scenedesmus obliquus, FACHB-416)藻种购自中国科学院武汉水生生物研究所,抗生 素及其异构体标准品均购自百灵威科技有限公司,纯 度均>90%,质谱级甲酸和乙腈购自上海安谱科学仪 器有限公司,活性氧自由基(ROS)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶(CAT)试剂盒购自南京建成生物 工程有限公司,其余化学试剂均为分析纯购自国药集 团化学试剂有限公司。金霉素(Chlortetracycline, CTC),4-差向金霉素(4-epi-chlortetracycline, ECTC),异金霉素(Iso-chlortetracycline,ICTC)结构式 如图1所示。



图1 三种金霉素异构体的基本结构

Figure 1 Chemical structure of three chlortetracycline isomers

1.2 藻类培养

按照OECD推荐方法,斜生栅藻藻种在无菌条件 下于BG11培养基中培养。培养条件为温度25℃,光 照周期设置为12h光照及12h黑暗,光照强度为 3000~4000 lx,放置于智能恒温光照培养箱中静置培 养至对数生长期,并继续扩大培养,预培养3代,镜检 细胞正常后培养至对数生长期进行毒性试验。

1.3 藻类毒性试验

按照OECD推荐方法,将培养至对数生长期的斜 生栅藻分别接种到50 mL含有CTC、ECTC和ICTC药 物的培养液中进行无菌培养,药物的浓度分别设置为 1×10⁻⁵、1×10⁻⁶、5×10⁻⁷ mol·L⁻¹,同时选用不添加药物 的培养液进行无菌培养作为对照组(CK)。试验藻细 胞初始密度约为8.0×10⁵ cells·mL⁻¹,各个浓度设置3 个平行。将藻细胞于含有不同浓度的抗生素中静置 培养72 h,每隔24 h用无菌注射器取出1 mL测定吸 光度(培养液 pH相同,放入恒温光照培养箱中进行培 养)。本实验建立了斜生栅藻藻密度与吸光度之间的 线性关系,且相关指数*R*²>0.999,利用紫外-可见分光 光度计于680 nm处测定光密度来表征斜生栅藻藻细 胞的密度,并根据以下公式计算藻细胞生长抑制率:

$$\mu = \left(1 - \frac{N_t}{N_0}\right) \times 100\%$$

式中:µ为斜生栅藻生长抑制率;N,和N₀分别为t(24、 48、72 h)时刻和t₀(初始接种)时的藻细胞个数。

1.4 高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS)解析藻液 中CTC及异构体降解产物

藻细胞培养期间,每隔12h使用无菌注射器在无

菌条件下取1mL藻液,并使用0.22μm纤维素滤膜过 滤,取滤出清液进行CTC及异构体降解产物浓度的检 测。CTC及异构体降解产物浓度使用高效液相色谱-质谱仪(配电喷雾离子源,ESI)测定。检测条件如下: 色谱柱为Waters Atlantis C18(2.1 mm×150 mm);柱温 为30℃;流动相为1%甲酸/乙腈(80/20);进样量和流 速分别为10μL和0.2 mL·min⁻¹,毛细管电压20V;荷 质比*m/z*为479。

1.5 藻细胞亚细胞形态的测定

取暴露72h后的藻液10mL,4℃10000r·min⁻¹ 离心10min,去上清液,参考邹宁等^{□7}的方法对样品 进行前处理,采用LEICA EM UC7型超薄切片机切 片,经柠檬酸铅溶液和醋酸双氧铀50%乙醇饱和溶 液各染色5~10min后,在Hitachi H-7650型透射电镜 中观察。

1.6 粗酶液提取

将暴露72h后的藻液无菌条件下转移至已灭菌的50mL离心管中,放置超声波细胞破碎机下破碎8min,工作10s,间隔10s,功率为200W。细胞破碎结束后4℃10000r・min⁻¹离心10min,上清液即为粗酶液。

1.7 活性氧自由基(ROS)、细胞通透性、叶绿素及抗 氧化系统测定

斜生栅藻细胞通透性的测定参考Ouyang等^[18]的 方法,采用荧光指示物乙二酸荧光素(FDA)对藻细胞 进行标记,通过荧光酶标仪测定荧光强度间接反应细 胞膜的通透性,叶绿素 a采用反复冻融法^[19]测定,可溶 性蛋白质采用考马斯亮蓝染色法^[20]进行测定,本研究 中 ROS、SOD、CAT 的测定均严格按照南京建成生物 工程有限公司试剂盒说明书进行操作。

1.8 数据分析

所有数据均采用 mean±SD 的形式表示,利用 GraphPad prism 7和 SPSS 进行数据分析及单因素方 差分析(ANOVA)中的 LSD 检验进行统计分析(不同 小写字母表示经 LSD 法检验后差异显著 P<0.05)。

2 结果与讨论

2.1 CTC 对斜生栅藻的生长抑制及异构体降解产物 分析

图 2 为 3 种浓度 CTC 胁迫下斜生栅藻的生长抑制 情况。结果表明, CTC 在所测浓度范围内对斜生栅藻 具有明显的生长抑制作用, 且随着浓度升高, 对斜生 栅藻生长的抑制率增大。在 72 h 暴露过程中, CTC 于 48 h时对斜生栅藻的生长抑制率最大,1×10⁻⁵、1× 10⁻⁶、5×10⁻⁷ mol·L⁻¹的暴露浓度下抑制率分别达到 22.79%、17.78%、15.08%。已有研究提出,四环素类 抗生素可通过主动转运进入细胞并与细胞核糖体上 30S亚基不可逆结合,阻止氨酰基转移与DNA结合而 抑制细胞蛋白质的合成,从而抑制藻细胞生长^[21-22]。 然而,本研究还发现CTC在水相环境中很不稳定,易 转变成其他降解产物。因此,我们认为四环素类抗生 素对藻类的抑制机制除母体药物的作用之外,其降解 产物或是降解产物与母体药物的混合物对藻细胞所 产生的不利影响也不可忽视^[23]。



Figure 2 The growth inhibition rate of *Scenedesmus obliquus* under CTC stress

据已有报道,CTC对水体条件十分敏感,易产生 ECTC、ICTC、脱水金霉素等一系列降解及代谢产 物^[24]。Halling-Sorensen 等^[25]和Soeborg 等^[26]研究认为, pH、水体温度及光照强度对四环素类抗生素的水解 影响显著,差向四环素类和异四环素类是主要的降解 产物,水解产物中ICTC的半衰期最长。同时,Solliec 等^[27]指出CTC在加标的地表水溶液中孵育一个月后, 已经基本被转化成ICTC及4-差向异金霉素(4-epiiso-chlortetracycline,4-EICTC)。基于此,为深入考察 不同种类降解产物的毒性贡献,本研究使用HPLC-MS对金霉素在斜生栅藻存在下的异构体降解产物进 行了测定。如图3所示,CTC在藻液中并不稳定,24h 已经基本转化为异构体产物,且随着胁迫时间的延 长,CTC逐渐向ICTC转化,并伴随着少量4-EICTC的 产生,ICTC的浓度在36h达到最大,随后,藻液中的 异构体抗生素浓度降低,这可能是由于藻细胞会优先 积累抗生素,之后再通过吸附^[28]、吸收^[29]、降解或代 谢^[30]等一系列响应,将抗生素转化成其他降解产物进 行释放。由图3可以得出,在斜生栅藻存在下的CTC





algae suspension

转化产物主要以ICTC为主。

2.2 ECTC、ICTC对斜生栅藻的生长抑制

图 4 为斜生栅藻暴露于 CTC 异构体降解产物 ECTC与ICTC下,72h内的生长抑制情况。在所测浓 度范围 ECTC、ICTC 的胁迫下,斜生栅藻均表现出明 显的生长抑制。在ECTC胁迫下,斜生栅藻在48h时 生长抑制情况最为严重,1×10⁻⁵、1×10⁻⁶、5×10⁻⁷ mol· L⁻¹的 ECTC 对斜生栅藻抑制率分别为 18.77%、 14.86%、13.01%。而在ICTC胁迫下,斜生栅藻生长抑 制率在72h内随药物浓度的降低而升高。结合图2 分析,母体药物 CTC 与异构体降解产物 ECTC、ICTC 结构相似,但它们对于斜生栅藻的生长抑制却表现出 了明显不同的规律,取代基空间构象的不同可能是造 成毒性差异的主要原因^[31]。此外,由图5可知,CTC母 体药物暴露较其异构体降解产物具有更高的毒性,暴 露浓度为1×10-5 mol·L-1的CTC与其余各处理组相 比,其对斜生栅藻的生长抑制呈现出显著差异(P< 0.05),而作为主要降解产物之一的ICTC的毒性效力 最低。但是,结合图3中CTC异构体降解产物的分布 结果可见,在暴露24h时,CTC在藻液中的存在以 ICTC形式为主。因此,推测CTC母体药物所产生的 较高的毒性可能是由于3种异构体降解产物的联合 作用。

2.3 CTC 及其异构体降解产物对斜生栅藻亚细胞形态的影响

图 6 为 1×10⁻⁵ mol·L⁻¹ 3 种药物处理下斜生栅藻 的亚细胞形态。由图可知, 对照组的细胞呈现椭圆 形, 有较规则的细胞壁, 具有完整的细胞结构, 叶绿体 几乎充满了整个细胞, 而在 CTC、ECTC、ICTC 胁迫下, 藻细胞有不同程度的损伤, 叶绿体萎缩, 发生了明显的 质壁分离, 叶绿体的萎缩会影响藻细胞的光合作用, 影



图4 ECTC、ICTC 胁迫下斜生栅藻的生长抑制情况

Figure 4 The growth inhibition rate of *Scenedesmus obliquus* under ECTC and ICTC stress





响藻类正常的生长代谢³²¹。其中,CTC处理下细胞受 损最为严重,与其表现出的生长抑制情况一致。研究 表明,在藻细胞受到外界胁迫时,其细胞形态会发生变 化,使得细胞变性,破裂,发生质壁分离,对叶绿体具有 较大的毒害作用,影响藻类的光合作用^[32-33]。

2.4 CTC 及其异构体降解产物对斜生栅藻细胞通透性的影响

细胞膜是保护细胞的第一道屏障,可以选择性控



 $\begin{array}{c} (a. \ CK \ ; b. \ 1\times 10^{-5} \ mol \cdot L^{-1} \ CTC \ ; c. \ 1\times 10^{-5} \ mol \cdot L^{-1} \ ECTC \ ; \\ & d. \ 1\times 10^{-5} \ mol \cdot L^{-1} \ ICTC \) \end{array}$

图 6 CTC 及其异构体降解产物 72 h 胁迫下藻细胞的亚细胞形态 Figure 6 Subcellular morphology of algal cells after 72 h stress in CTC and its isomer degradation products

制物质进出细胞,通透性是它们主动或被动地将物质 输入和输出细胞的能力的指标,细胞膜通透性的改变 会使得有毒物质更容易进入藻细胞,在藻细胞中不断 地进行积累,导致藻细胞的代谢过程紊乱,从而对藻 细胞产生毒性^[34]。已有研究表明,低浓度的四环素类 抗生素可以影响淡水绿藻的细胞膜通透性^[15],因此, 本研究也进一步对CTC及其异构体降解产物胁迫下 的斜生栅藻细胞通透性进行了考察。图7为CTC及 其异构体降解产物72h胁迫对斜生栅藻细胞膜通透 性的影响,与对照组相比,CTC及其异构体降解产物 均使斜生栅藻细胞膜通透性显著增大,CTC母体药 物及其异构体降解产物均对斜生栅藻细胞膜造成一 定程度的损伤,也是影响藻类正常生长的重要因素 之一。

2.5 CTC 及其异构体降解产物对斜生栅藻 ROS 及抗氧化系统的影响

据已有研究报道,微藻在外源污染物的胁迫下会 应激产生大量ROS,ROS的过量产生随之会导致细胞 产生氧化应激,损害微藻的细胞膜和蛋白质,从而抑 制正常生理生化功能^[35]。基于此,本研究对CTC母体 药物及其异构体降解产物胁迫下的斜生栅藻进行了 ROS分析。结果如图8所示,10⁻⁵ mol·L⁻¹ CTC、ECTC、 ICTC处理组的藻细胞在72 h时的ROS相比于对照组





2019年4月





分别增加了 2.19、2.01、1.49倍,且所有处理组均较对 照组产生显著差异。细胞内 ROS 的不断产生和积累 会破坏 ROS 积累与清除之间的平衡,从而激发抗氧 化系统的活性。因此,基于 ROS 的分析结果,本研究 进一步选取了 SOD 和 CAT 两类生物体内主要的抗氧 化酶进行分析。图 9呈现了藻细胞内 CAT 和 SOD 的 活性变化趋势,证实了藻细胞内氧化应激的变化。在 CTC 母体药物的胁迫下,藻细胞内的 SOD 和 CAT 的 活性均显著升高,与 ROS 的变化趋势呈正相关。这 可能是由于 CTC 胁迫下 ROS 含量显著升高,藻细胞 产生了脂质过氧化,促使 SOD 和 CAT 的活性显著增 加,清除了藻细胞内多余的活性氧¹³⁶;而在 ECTC 及 ICTC 胁迫下,藻细胞内的 SOD 与 CAT 的活性变化与 对照组相比差异性明显减弱,表明了 CTC 母体药物对



图 8 CTC 及其异构体降解产物 72 h 胁迫下对斜生栅藻 ROS 的影响





图9 CTC及其异构体降解产物72 h 胁迫下对斜生栅藻 CAT和 SOD 酶活性的影响

Figure 9 The effects of CTC and its isomer degradation products on CAT and SOD of *Scenedesmus obliquus* in 72 h

藻细胞内ROS及抗氧系统的影响最为明显。 2.6 CTC 及其异构体降解产物对斜生栅藻叶绿素 a 浓 度的影响

叶绿素 a 是光合作用的重要参数,其浓度的变化 可以直接影响藻类生物量的变化,间接反映出斜生栅 藻对 3 种药物的毒性反应^[37]。图 10 为 CTC 及其异构 体降解产物 72 h 暴露对斜生栅藻细胞内叶绿素 a 浓 度的影响。结果表明,3 种异构体降解产物对斜生栅 藻叶绿素 a 浓度的影响具有明显差异,在 10⁻⁵ mol·L⁻¹ 浓度 CTC 和 ICTC 的胁迫下,叶绿素 a 的浓度与对照 组相比分别显著下降了 23.31% 和 15.95%,暴露浓度 越小,对叶绿素 a 的抑制越小;在 ECTC 的暴露下,斜 生栅藻叶绿素 a 含量与对照组无明显差异。结合图 8 中藻细胞内 ROS 的升高及生长抑制情况,我们推测 是藻细胞受到外界胁迫,大量 ROS 的积累破坏细胞 内部结构,抑制叶绿素合成酶的活性,使叶绿素的浓 度降低,影响藻细胞的光合作用,细胞的新陈代谢变 慢,进而影响藻细胞的生物量^[32]。

农业环境科学学报 第38卷第4期





2.7 CTC 及其异构体降解产物对斜生栅藻可溶性蛋 白质的影响

据已有研究报道,四环素类抗生素对藻类的毒性效应主要体现在抑制蛋白质合成和叶绿体生成方面,从而对藻类的生长产生抑制^[38]。由图11可见,在CTC及其异构体降解产物的胁迫下,藻细胞可溶性蛋白质的浓度均呈现下降趋势,且浓度越大,下降趋势愈显著,CTC和ECTC处理下的斜生栅藻的可溶性蛋白质的浓度分别下降了31.46%、22.76%、21.99%和24.05%、17.91%、12.57%。而ICTC胁迫对藻细胞可溶性蛋白质浓度的影响较小,不同处理下的浓度下降均低于10%,与对照组相比无明显变化。由此进一步可得CTC、ECTC、ICTC虽然具有相似的化学结构,但取代基空间构象的不同会导致药物与藻细胞中可



Figure 11 The effects of chlortetracycline and its isomers on soluble protein content of *Scenedesmus obliquus* in 72 h

溶性蛋白质的结合位点不同,因而产生不同的毒性效 应^[39]。

3 结论

(1)CTC 对斜生栅藻具有明显的生长抑制作用, 且在斜生栅藻存在下,CTC 转化产物主要以ICTC 为 主。CTC、ECTC、ICTC 虽然结构类似,但对斜生栅藻 有显著的异构体毒性差异,在相同的暴露浓度下,生 长抑制作用表现为CTC>ECTC>ICTC。

(2)CTC母体药物对藻细胞的光合作用、蛋白质 含量、活性氧及抗氧化酶与对照组相比均具有显著性 差异,金霉素内酯化异构体(ICTC)对藻细胞则具有 较低的毒性效应。

(3)金霉素抗生素在环境中不断地进行积累和代谢,在斜生栅藻存在下 CTC 最主要的中间产物为其内酯化产物及其差向异构化产物,CTC 母体药物与其异构体降解产物虽然具有相似的化学结构,但取代基空间构象的不同会导致药物与藻细胞中的可溶性蛋白质的结合位点不同,因而对藻细胞产生不同的毒性效应。

参考文献:

- Daghrir R, Drogui P. Tetracycline antibiotics in the environment: A review[J]. Environmental Chemistry Letters, 2013, 11(3):209-227.
- [2] Nathan C. Antibiotics at the crossroads[J]. Nature, 2004, 431 (7011): 899-902.
- [3] 朱永官, 欧阳纬莹, 吴 楠, 等. 抗生素耐药性的来源与控制对策 [J]. 中国科学院院刊, 2015, 30(4):509-516.

ZHU Yong-guan, OUYANG Wei-ying, WU Nan, et al. Antibiotic resistance: Sources and mitigation[J]. *Bulletin of the Chinese Academy of Sciences*, 2015, 30(4):509–516.

[4] 伊丽丽, 焦文涛, 陈卫平. 不同抗生素在剖面土壤中的吸附特征[J]. 环境化学, 2013, 32(12):2357-2363.

YI Li-li, JIAO Wen-tao, CHEN Wei-ping. Adsorption characteristics of three types of antibiotics in the soil profiles[J]. *Environmental Chemistry*, 2013, 32(12):2357–2363.

[5] 周启星, 罗 义, 王美娥. 抗生素的环境残留、生态毒性及抗性基因 污染[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(3):243-251.

ZHOU Qi-xing, LUO Yi, WANG Mei-e. Environmental residues and ecotoxicity of antibiotics and their resistance gene pollution: A review [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2007, 2(3):243-251.

- [6] Kühne M, Ihnen D, Möller G, et al. Stability of tetracycline in water and liquid manure[J]. Journal of Veterinary Medicine Series A, 2000, 47 (6):379-384.
- [7] Halling-Sorensen B, Sengelov G, Tjornelund J. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria[J]. Ar-

chives of Environmental Contamination and Toxicology, 2002, 42(3): 263-271.

- [8] 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(22):189-211.
- [9] Li D, Yang M, Hu J, et al. Determination and fate of oxytetracycline and related compounds in oxytetracycline production wastewater and the receiving river[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008, 27(1):80-86.
- [10] Bartelt-Hunt S, Snow D D, Damon-Powell T, et al. Occurrence of steroid hormones and antibiotics in shallow groundwater impacted by livestock waste control facilities[J]. *Journal of Contaminant Hydrolo*gy, 2011, 123(3):94–103.
- [11] 李志裕. 药物化学[M]. 南京:东南大学出版社, 2009:380-405.
 LI Zhi-yu. Medicinal chemistry[M]. Nanjing: Southeast University Press, 2009:380-405.
- [12] 顾觉奋.抗生素[M].上海:上海科学技术出版社, 2002:265-280. GU Jue-fen. Antibiotics[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2002:265-280.
- [13] Loftin K A, Adams C D, Meyer M T, et al. Effects of ionic strength, temperature, and pH on degradation of selected antibiotics[J]. *Journal* of Environmental Quality, 2008, 37(2):378-386.
- [14] 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.
- [15] 徐冬梅, 王艳花, 饶桂维. 四环素类抗生素对淡水绿藻的毒性作用
 [J]. 环境科学, 2013, 34(9):3386-3390.
 XU Dong-mei, WANG Yan-hua, RAO Gui-wei. Cellular response of freshwater green algae to the toxicity of tetracycline antibiotics[J]. En-
- vironmental Science, 2013, 34(9):3386-3390. [16] 姜 思,刘莹莹,佟少明.4种常用抗生素对莱茵衣藻生长及光化 学活性的影响[J].生物加工过程, 2017, 15(2):13-20.

JIANG Si, LIU Ying-ying, TONG Shao-ming. Effects of four antibiotics on growth and photochemical activities of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2017, 15(2): 13-20.

- [17] 邹 宁,魏丕伟,肖 波,等. 扁藻细胞电镜观察的制样技术[J]. 烟 台教育学院学报, 2004, 10(3):73-75. ZOU Ning, WEI Pi-wei, XIAO Bo, et al. Sample preparation methods of platymonas subcordiformis for the submicroscopic structure observation by transmission electric microscope (TEM)[J]. Journal of Yantai Vocational College, 2004, 10(3):73-75.
- [18] Ouyang S H, Hu X G, Zhou Q X. Envelopment-Internalization synergistic effects and metabolic mechanisms of graphene oxide on singlecell *Chlorella vulgaris* are dependent on the nanomaterial particle size [J]. Acs Applied Materials & Interfaces, 2015, 7(32):18104–18112.
- [19] 冯 菁,李艳波,朱 擎,等.浮游植物叶绿素 a 测定方法比较[J].
 生态环境, 2008, 17(2):524-527.

FENG Jing, LI Yan-bo, ZHU Qing, et al. Comparison of methods for phytoplankton chlorophyll-a concentration measurement[J]. *Ecology* and Environmental Sciences, 2008, 17(2):524–527.

[20] 王孝平, 邢树礼. 考马斯亮蓝法测定蛋白含量的研究[J]. 天津化 工, 2009, 23(3):40-42.

WANG Xiao-ping, XING Shu-li. Determination of protein quantitation using the method of Coomassie brilliant blue[J]. *Tianjin Chemical Industry*, 2009, 23(3):40-42.

- [21] Lu L, Wu Y X, Ding H J, et al. The combined and second exposure effect of copper(II) and chlortetracycline on fresh water algae, *Chlorel-la pyrenoidosa* and *Microcystis aeruginosa*[J]. *Environmental Toxicology & Pharmacology*, 2015, 40(1):140–148.
- [22] Halling-Sorensen B. Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming[J]. Chemosphere, 2000, 40(7):731-739.
- [23] Guo R X, Chen J Q. Phytoplankton toxicity of the antibiotic chlortetracycline and its UV light degradation products[J]. *Chemosphere*, 2012, 87(11):1254–1259.
- [24] 李伟明, 鲍艳宇, 周启星.四环素类抗生素降解途径及其主要降解 产物研究进展[J].应用生态学报, 2012, 23(8):2300-2308.

LI Wei-ming, BAO Yan-yu, ZHOU Qi-xing. Degradation pathways and main degradation products of tetracycline antibiotics: Research progress[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2012, 23(8):2300-2308.

- [25] Halling-Sorensen B, Lykkeberg A, Ingerslev F, et al. Characterization of the abiotic degradation pathways of oxytetracyclines in soil interstitial water using LC-MS-MS[J]. *Chemosphere*, 2003, 50 (10) : 1331– 1342.
- [26] Soeborg T, Ingerslev F, Halling-Sorensen B. Chemical stability of chlortetracycline and chlortetracycline degradation products and epimers in soil interstitial water[J]. *Chemosphere*, 2004, 57(10):1515– 1524.
- [27] Solliec M, Roy-Lachapelle A, Gasser M O, et al. Fractionation and analysis of veterinary antibiotics and their related degradation products in agricultural soils and drainage waters following swine manure amendment[J]. Science of the Total Environment, 2016, 543 (Part A): 524-535.
- [28] Tran V S, Ngo H H, Guo W S, et al. Typical low cost biosorbents for adsorptive removal of specific organic pollutants from water[J]. *Biore-source Technology*, 2015, 182:353–363.
- [29] Rhiem S, Riding M J, Baumgartner W, et al. Interactions of multiwalled carbon nanotubes with algal cells: Quantification of association, visualization of uptake, and measurement of alterations in the composition of cells[J]. *Environmental Pollution*, 2015, 196(2):431– 439.
- [30] Wang Y H, Liu J Z, Kang D, et al. Removal of pharmaceuticals and personal care products from wastewater using algae-based technologies: A review[J]. *Reviews in Environmental Science and Bio-Technolo*gy, 2017, 16(2):717-735.
- [31] 张劲强,梁 岩,董元华,等. 差向异构对四环素类药物的发光菌 毒性研究[J]. 毒理学杂志, 2006, 20(5):279-281.
 ZHANG Jin-qiang, LIANG Yan, DONG Yuan-hua, et al. Toxicity of tetracycline and their epi-isomers on the luminescent bacterium[J]. *Journal of Toxicology*, 2006, 20(5):279-281.
- [32]段 炼,杜 耀,陆秋琳,等.离子液体1-丁基-3-甲基咪唑氯盐

农业环境科学学报 第38卷第4期

对斜生栅藻的毒性效应[J]. 中国环境科学, 2012, 32(5):886-891. DUAN Lian, DU Yao, LU Qiu-lin, et al. Toxicity of 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquid to *Scenedesmus obliquus*[J]. *China Environmental Science*, 2012, 32(5):886-891.

- [33] Qian H F, Chen W, Sheng G D, et al. Effects of glufosinate on antioxidant enzymes, subcellular structure, and gene expression in the unicellular green alga *Chlorella vulgaris*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, 88 (4):301-307.
- [34] Xu D M, Li C D, Chen H, et al. Cellular response of freshwater green algae to perfluorooctanoic acid toxicity[J]. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 2013, 88(2):103-107.
- [35] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease[J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007, 39(1):44-84.
- [36] 张 军, 王文科, 耿雅妮, 等. 黑麦草抗氧化酶对 Cd、Zn 和 Pb 复合 污染的响应[J]. 农业环境科学学报, 2018, 37(6):1117-1124.

ZHANG Jun, WANG Wen-ke, GENG Ya-ni, et al. The response to the combined pollution of cadmium, zinc, and lead by the antioxidant enzyme activity of *Lolium perenne* L.[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(6):1117–1124.

- [37] Gu S R, Zheng H, Xu Q Q, et al. Comparative toxicity of the plasticizer dibutyl phthalate to two freshwater algae[J]. Aquatic Toxicology, 2017, 191:122-130.
- [38]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.
 ZHANG Hao, LUO Yi, ZHOU Qi-xing. Research advancement of eco-toxicity of tetracycline antibiotics[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2008, 27(2):407-413.
- [39] Volkers G, Petruschka L, Hinrichs W. Recognition of drug degradation products by target proteins: Isotetracycline binding to Tet repressor[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2011, 54(14):5108-5115.