

重金属与四环素类抗生素对发光菌的毒性研究

银淑铮, 刘刚, 方俊

引用本文:

银淑铮, 刘刚, 方俊. 重金属与四环素类抗生素对发光菌的毒性研究[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(11): 2422–2429.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2023-0509>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

长期秸秆还田和地下水位对土壤镉积累及有效性的影响

吴佳琪, 黄运湘, 尹力初, 梁玉文, 黄玲, 向艳艳, 施强

农业环境科学学报. 2020, 39(9): 1957–1963 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0486>

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, 厉圆, 沈忱思, 肖冬雪, 柳建设, 赵凤, 熊明瑜

农业环境科学学报. 2019, 38(4): 756–764 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0964>

洪泽湖沉积物中四环素土霉素及相关抗性基因的分布特征及潜在风险分析

罗方园, 潘根兴, 李恋卿, 张俊, 王娜, 焦少俊, 张旭辉

农业环境科学学报. 2017, 36(2): 369–375 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-1237>

广州市北郊蔬菜基地土壤四环素类抗生素的残留及风险评估

朱秀辉, 曾巧云, 解启来, 丁丹, 茹淑玲

农业环境科学学报. 2017, 36(11): 2257–2266 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-0549>

四环素对烤烟生长发育及光合作用的影响研究

张继旭, 申国明, 孔凡玉, 张忠锋, 王瑞, 高林, 戴衍晨, 郑加玉, 张继光

农业环境科学学报. 2017, 36(1): 48–56 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-0662>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

银淑铮, 刘刚, 方俊. 重金属与四环素类抗生素对发光菌的毒性研究[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(11): 2422–2429.

YIN S Z, LIU G, FANG J. Single and combined toxicity of heavy metals and tetracyclines to luminescent bacteria [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2023, 42(11): 2422–2429.

重金属与四环素类抗生素对发光菌的毒性研究

银淑铮, 刘刚, 方俊*

(湖南农业大学生物科学技术学院, 长沙 410028)

摘要:本研究以发光细菌 *Photobacterium kishitanii* 为模式生物, 通过发光抑制试验研究了5种重金属与四环素类抗生素对发光细菌的急性单一毒性与联合毒性。利用毒性单位法(TU法)表征联合毒性, 并采用浓度加和模型(Concentration addition, CA模型)与独立作用模型(Independent action, IA模型)预测二元混合体系对发光细菌的联合急性毒性。研究表明:单一毒性大小排序为硝酸铅>七水硫酸锌>氯化镉>盐酸土霉素>盐酸金霉素>盐酸强力霉素>盐酸四环素>五水硫酸铜>重铬酸钾。重金属之间的联合毒性主要表现为协同作用, 重金属与四环素类抗生素的联合毒性主要表现为相加作用和拮抗作用, 四环素类抗生素之间的联合毒性主要表现为拮抗作用。研究表明, 重金属与四环素类抗生素共存会对发光细菌产生不同的毒性效应, 因此在评价环境复合污染时应考虑联合毒性效应。

关键词: 重金属; 四环素类抗生素; 毒性单位法; 浓度加和模型; 独立作用模型

中图分类号: X172 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2023)11-2422-08 doi:10.11654/jaes.2023-0509

Single and combined toxicity of heavy metals and tetracyclines to luminescent bacteria

YIN Shuzheng, LIU Gang, FANG Jun*

(College of Biological Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410028, China)

Abstract: In this study, the acute single toxicity and combined toxicity of five heavy metals and tetracycline antibiotics on luminescent bacteria were studied by a luminescent test. The toxicity unit method was used to characterize the combined toxicity, and the concentration addition model and independent action model were used to predict the combined acute toxicity of the binary mixed system to luminescent bacteria. The results showed that the toxicity was in the order of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 > \text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} > \text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} > \text{oxytetracycline hydrochloride} > \text{chlortetracycline hydrochloride} > \text{doxycycline hydrochloride} > \text{tetracycline hydrochloride} > \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} > \text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. The combined toxicity of heavy metals was mainly manifested as a synergistic effect. The combined toxicity of heavy metals and tetracycline antibiotics was mainly manifested as an additive and antagonistic effect, and the combined toxicity of tetracycline antibiotics was mainly manifested as an antagonistic effect. When heavy metals coexist with tetracycline antibiotics, they had different toxic effects on luminescent bacteria. Therefore, the combined toxic effects should be considered during the evaluation of combined environmental pollution.

Keywords: heavy metal; tetracycline antibiotics; toxicity unit method; concentration addition model; independent action model

收稿日期: 2023-06-28 录用日期: 2023-08-29

作者简介: 银淑铮(1998—), 女, 湖南邵阳人, 硕士研究生, 主要从事微生物研究。E-mail: yinshuzheng@stu.hunau.edu.cn

*通信作者: 方俊 E-mail: fangjun1973@hunau.edu.cn

基金项目: 湖南省科技厅项目(2021JJ30008, 2020NK2004, 2019TP2004); 湖南农业大学“双一流”建设项目(SYL201802003); 湖南省研究生科研创新项目(CX20210654); 湖南省大学生科技创新创业项目(2021RC1004)

Project supported: Hunan Provincial Science and Technology Department(2021JJ30008, 2020NK2004, 2019TP2004); Double First-Class Construction Project of Hunan Agricultural University(SYL201802003); Postgraduate Scientific Research Innovation Project of Hunan Province(CX20210654); Science and Technology Innovation and Entrepreneurship Project for University Students of Hunan Province(2021RC1004)

重金属对人类赖以生存的生态系统的污染日趋严重^[1],这已经成为一个环境问题^[2-5]。《全国土壤污染状况调查公报》显示,我国土壤污染问题较为严重,且以重金属镉、铬、铅、铜、锌污染为主。在长江三角洲地区的农用地土壤中,镉污染最严重,铅和铜也有轻微污染^[6]。我国高速公路周边土壤也主要受到铅和镉等重金属污染^[7]。此外,据报道镉和铜等重金属在人体积累后会造成毒素富集损伤且会对骨骼产生影响^[8]。由此,重金属已经成为环境中的一类污染物。

我国是抗生素消费大国,畜牧业每年会消耗大量的抗生素。四环素类抗生素(TCs)是世界上使用最广泛的抗生素之一,通常用作医疗和兽用药物以及动物饲料添加剂^[9]。然而,抗生素不能被动物完全吸收,其大部分随排泄物进入土壤和水体,对环境造成污染。抗生素作为一类新型的环境污染物,在水体环境中被广泛检出,据报道其浓度在 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 至 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间^[10-11]。武旭跃等^[12]在太湖贡湖湾水体中检测到13种抗生素,其浓度在 $0.005\sim 4.720\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间,其中土霉素的浓度最高。一项分析我国北方地区市政污水的研究发现,污水中均有四环素族抗生素检出,且土霉素、四环素、强力霉素、金霉素的浓度分别高达 $2\ 175.65$ 、 $1\ 114.27$ 、 187.45 、 $149.09\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[13]。德国污水处理厂的出水口和地表水中检测出四环素的浓度为 $20\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[14]。在黄浦江河流中检测到四环素浓度为 $15.07\sim 113.89\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$,土霉素浓度为 $12.99\sim 84.54\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[15]。重金属和抗生素这两种污染物在环境中都具有持久性和毒性,可能导致耐药菌和抗性基因的产生,对环境和人体健康具有潜在的危害。研究表明抗生素-金属复合物之间的络合作用会使络合物的毒性更强^[16-17]。因此,对重金属和抗生素的联合毒性作用进行研究具有重要意义。

发光细菌法作为生物毒性测定方法之一,由于具有快速、简便、灵敏度高等特点而被广泛应用于检测污染物急性毒性。发光细菌能在短时间内对污染物做出快速响应,且发光强度随着污染物浓度的增加而减弱。重金属(如铬、镉、铜、铅和锌)的急性毒性可通过费氏弧菌、青海弧菌Q67和明亮发光杆菌进行检测^[18-20]。朱松梅等^[21]、任皓等^[22]、朱金国等^[23]、汪皓琦等^[24]研究了抗生素对发光菌的毒性。陈敏等^[25]研究了抗生素与重金属混合物对蛋白核小球藻的联合毒性作用。李孟涵等^[26]研究了重金属铅与抗生素对发光菌的联合毒性效应。目前关

于重金属或抗生素的单一和联合毒性效应已有研究,但关于二者复合污染对发光细菌的联合毒性作用的研究还较少。

因此,本文以5种重金属化合物(包括五水硫酸铜、氯化镉、硝酸铅、重铬酸钾和七水硫酸锌)与四环素类抗生素为研究对象,开展复合污染物的单一毒性及二元联合急性毒性研究并使用浓度加和模型(Concentration addition, CA模型)与独立作用模型(Independent action, IA模型)来评估二元联合急性毒性,以期评价二者复合污染的潜在风险提供数据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

七水硫酸锌、五水硫酸铜、硝酸铅、氯化镉、重铬酸钾购于国药化学试剂有限公司;盐酸四环素、盐酸土霉素、盐酸金霉素、盐酸强力霉素购于上海麦克林生化科技有限公司;便携式Lux-T020毒性分析仪购于广州博鹭腾生物科技有限公司。所用发光细菌*Photobacterium kishitanii*保存于湖南农业大学生物科学技术学院。

1.2 菌株培养

培养基的成分:胰蛋白胨 0.5 g 、牛肉浸膏 0.5 g 、氯化钠 3 g 、磷酸二氢钾 0.275 g 、磷酸氢二钠 0.61 g 、甘油 0.3 g 和蒸馏水 100 mL 。用 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液或 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液调节pH至6.5左右。 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 高压蒸汽灭菌 20 min ,冷却后于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。将发光明亮的单菌落转接至固体斜面培养基上, 24 h 后将培养好的斜面菌种置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。在无菌操作台中,取 2 mL 3%氯化钠溶液将斜面菌种进行洗脱,充分摇匀后取 $200\mu\text{L}$ 接入 50 mL 液体培养基中,在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下培养 $20\sim 22\text{ h}$ (稳定期)成为母液。取母液 $200\mu\text{L}$ 到 40 mL 3%氯化钠溶液中,黑暗条件下可观察到菌液微亮,搅拌 40 min 以使发光菌生长基本同步,制成工作菌液。

1.3 毒性试验方法

本试验基于《食品安全国家标准 急性经口毒性试验》(GB 15193.3—2014)与《水质 急性毒性的测定 发光细菌法》(GB/T 15441—1995)进行急性毒性测试。单一毒性测定时,取一定量的3%氯化钠将待测物质配制成标准溶液,试验时用3%氯化钠稀释成一系列浓度梯度。在每个样品管中加入平衡后的菌液 0.1 mL ,再加入 1.9 mL 待测物质。同时取 1.9 mL 的3%氯化钠作为空白。暴露 15 min 后采用便携式

Lux-T020毒性分析仪测定发光强度,绘制剂量-反应曲线,求得半数效应浓度值(EC_{50} 值)。每个浓度点3个平行样。联合毒性测定时,根据单一毒性试验求得的 EC_{50} 值,按照等毒性比配制重金属与四环素类抗生素的混合溶液,设计的浓度梯度为 EC_{50} 值的0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4倍。

1.4 计算方法

发光抑制率的计算方法如公式(1)所示;TU法的计算方法如式2所示;根据式3对数据进行拟合(GraphPad Prism 8.0软件剂量-反应模型);CA模型和IA模型是目前广泛应用于混合物毒性预测的模型,CA模型通常被认为是对相似作用的化学物质联合毒性的评价,而IA模型被认为是对不同作用化学物质联合毒性的评价,CA模型和IA模型的数学函数分别表示为式(4)和式(5)^[27]。

$$I = (1 - \frac{S}{C}) \times 100\% \quad (1)$$

式中: I 表示抑制率,%; S 表示待测物质的发光值; C 表示空白平均发光值。

$$TU_{\text{mix}} = \frac{C_A}{EC_{50A}} + \frac{C_B}{EC_{50B}} \quad (2)$$

式中: TU_{mix} 为二元混合体系的毒性单位; C_A 和 C_B 是二元混合体系在 EC_{50} 值时A和B在混合体系中的浓度, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; EC_{50A} 和 EC_{50B} 分别是污染物A和B单一污染时的 EC_{50} 值, $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

Broderius等^[28]所研究的联合毒性判别标准为: $TU < 0.8$ 时两混合体系间为协同作用; $0.8 \leq TU \leq 1.2$ 时两混合体系间为加和作用(即相加作用); $TU > 1.2$ 时两混合体系间为拮抗作用。

$$Y = B + (T - B) / (1 + 10^{(\log EC_{50,x})^k}) \quad (3)$$

式中: Y 表示抑制率,随 X 增大而增大; B 和 T 分别为抑制比的底值和顶值; X 为被测样品的浓度; $EC_{50,x}$ 为 X 在50%发光抑制比下的值; k 为剂量-反应曲线的斜率参数,无单位。

$$EC_{x,m} = \frac{P_A}{EC_{x,A}} + \frac{P_B}{EC_{x,B}} \quad (4)$$

$$E(C_M) = 1 - [1 - E(C_A)] \times [1 - E(C_B)] \quad (5)$$

式中: $EC_{x,m}$ 、 $EC_{x,A}$ 、 $EC_{x,B}$ 分别表示混合物、A、B在抑制率为 $X\%$ 时的浓度; P_A 和 P_B 分别为混合物中A和B的浓度比; $E(C_M)$ 是混合物的毒性效应; $E(C_A)$ 和 $E(C_B)$ 分别是A和B在单一毒性试验中的毒性效应。

1.5 统计学分析

使用GraphPad Prism 8.0软件以Dose-response-Inhibition为模型进行拟合,得到剂量-反应曲线。

2 结果与分析

2.1 重金属与四环素类抗生素对发光细菌的单一急性毒性

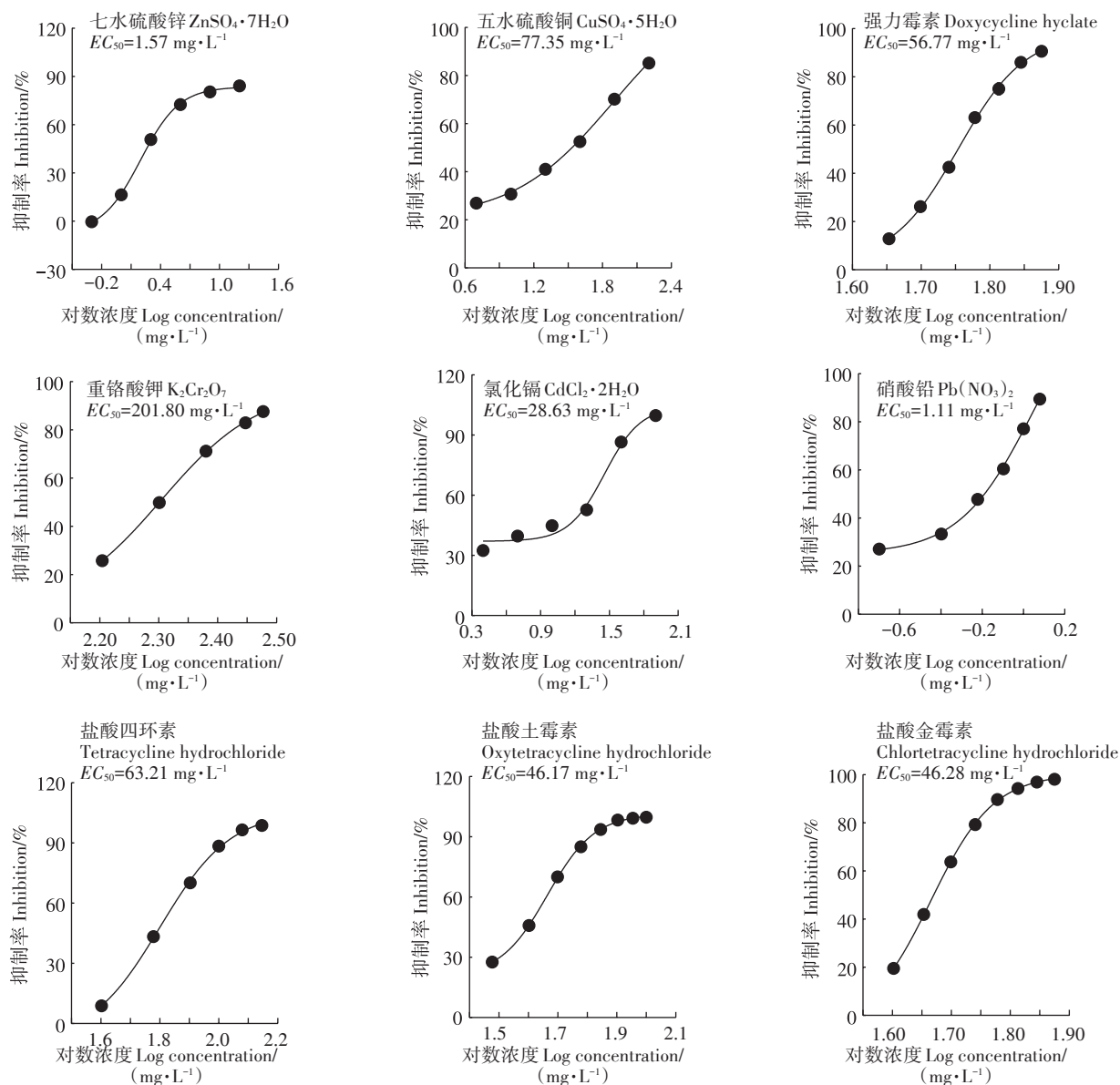
重金属与四环素类抗生素对发光细菌的剂量-反应曲线如图1所示,相关数值如表1所示。从图1中可以看出,随着重金属与抗生素的浓度增加,细菌的发光抑制率也逐渐增强,重金属、抗生素浓度的对数与其发光抑制率具有良好的线性关系, R^2 值均大于0.98,表明重金属与四环素类抗生素浓度的对数与其发光抑制率呈正相关。 EC_{50} 值可以反映污染物毒性大小, EC_{50} 值越小其毒性越大。根据表1可知,毒性大小依次为硝酸铅>七水硫酸锌>氯化镉>盐酸土霉素>盐酸金霉素>盐酸强力霉素>盐酸四环素>五水硫酸铜>重铬酸钾。

表1 重金属与四环素类抗生素对发光细菌的单一毒性结果
Table 1 Single toxicity results of heavy metals and tetracycline antibiotics to luminescent bacteria

名称 Name	化学式 Chemical formula	$EC_{50}/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	离子质量浓度 Ion mass concentration/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	R^2
七水硫酸锌	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.57	0.36	0.999 4
五水硫酸铜	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	77.35	19.80	0.998 8
硝酸铅	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	1.11	14.09	0.996 2
氯化镉	$\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	28.63	0.69	0.984 8
重铬酸钾	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	201.80	35.67	0.999 2
盐酸四环素	$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot \text{HCl}$	63.21	58.42	0.998 7
盐酸土霉素	$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_9 \cdot \text{HCl}(95\%)$	46.17	40.64	0.998 7
盐酸金霉素	$\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}_8 \cdot \text{HCl}$	46.28	43.00	0.998 8
盐酸强力霉素	$\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot \text{HCl}(\geq 98\%)$	56.77	51.42	0.997 6

2.2 重金属与四环素类抗生素二元混合体系对发光细菌的联合急性毒性

从图2和表2中可以看出,在36组联合毒性效应中,有6组 $TU < 0.8$,说明其联合作用表现为协同作用;13组 TU 在0.8~1.2之间,表现为相加作用;17组 $TU > 1.2$,表现为拮抗作用。重金属与重金属之间的联合毒性主要表现为协同作用,作用大小依次为五水硫酸铜+氯化镉>七水硫酸锌+氯化镉>五水硫酸铜+硝酸铅>七水硫酸锌+五水硫酸铜>硝酸铅+氯化镉;而七水硫酸锌+重铬酸钾、硝酸铅+重铬酸钾、氯化镉+重铬酸钾表现为拮抗作用;七水硫酸锌+硝酸铅、五水硫酸铜+重铬酸钾表现为相加作用。在重金属和抗生素的联合毒性中,除重铬酸钾+盐酸强力霉素表现



每个浓度点3个平行样,误差线表示标准差(SD)。下同。

Three parallel samples at each concentration point, and the error line represents the standard deviation (SD). The same below.

图1 重金属和四环素类抗生素的单一毒性

Figure 1 Single toxicity of heavy metals and tetracycline antibiotics

为协同作用外,其余表现为拮抗作用与相加作用。抗生素和抗生素的联合毒性主要表现为拮抗作用,拮抗作用最强的为盐酸四环素+盐酸金霉素组合。联合毒性由于存在方式的不同可能会导致化合物联合作用有差异。

2.3 CA与IA模型预测二元混合体系对发光细菌的联合急性毒性

CA和IA模型预测曲线如图3所示,在浓度区间内实测曲线与CA和IA模型预测曲线的偏离程度一直在变化,说明联合作用也一直在变化。实测

曲线位于模型预测曲线上方,说明联合效应表现为相加作用;实测曲线位于模型预测曲线下方表现为拮抗作用;实测曲线位于模型预测曲线之间表现为相加作用。除图3中的3组外,其余组也均体现了这种联合作用的变化。

3 讨论

3.1 重金属对发光细菌的单一急性毒性

本研究检测了七水硫酸锌、五水硫酸铜、硝酸铅、氯化镉、重铬酸钾对发光细菌的单一毒性,毒性大小

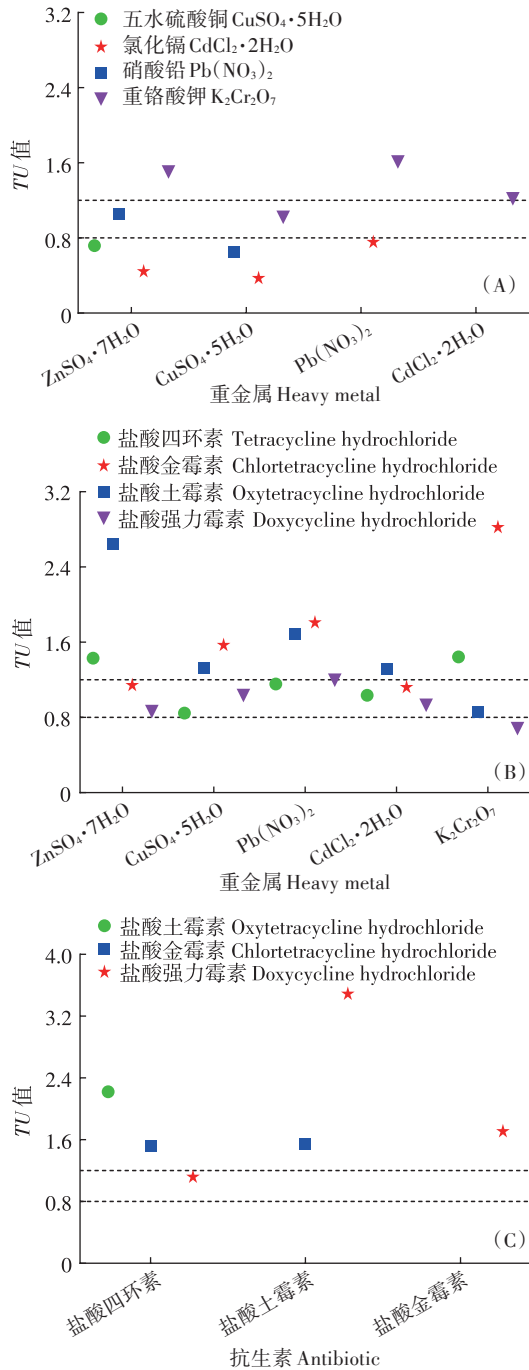


图2 重金属二元混合的TU值(A);重金属和四环素类抗生素二元混合的TU值(B);四环素类抗生素二元混合的TU值(C)
Figure 2 TU value of the binary mixture of heavy metals(A), TU value of the binary mixture of heavy metal and tetracycline antibiotics(B), TU value of the binary mixture of tetracycline antibiotics(C)

排序为硝酸铅>七水硫酸锌>氯化镉>五水硫酸铜>重铬酸钾。何早等^[29]在利用发光细菌法检测大米中的重金属研究中探讨了硝酸铅、氯化镉和氯化汞对明亮发光杆菌的急性毒性作用,结果表明3种重金属对明

表2 二元混合体系的TU值及联合毒性结果

Table 2 TU value and joint toxicity results of a binary mixed system

序号 Number	混合体系(1:1) Mixed system(1:1)	$EC_{50\text{mix}}/$ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	TU值 TU value	联合作用 Joint action
1	七水硫酸锌+五水硫酸铜	7.25	0.719	协同
2	七水硫酸锌+硝酸铅	0.55	1.051	相加
3	七水硫酸锌+氯化镉	3.21	0.444	协同
4	七水硫酸锌+重铬酸钾	27.06	1.502	拮抗
5	七水硫酸锌+盐酸四环素	42.04	1.430	拮抗
6	七水硫酸锌+盐酸土霉素	54.26	2.647	拮抗
7	七水硫酸锌+盐酸金霉素	24.77	1.143	相加
8	七水硫酸锌+盐酸强力霉素	22.32	0.862	相加
9	五水硫酸铜+硝酸铅	6.66	0.650	协同
10	五水硫酸铜+氯化镉	6.32	0.373	协同
11	五水硫酸铜+重铬酸钾	28.32	1.021	相加
12	五水硫酸铜+盐酸四环素	33.10	0.846	相加
13	五水硫酸铜+盐酸土霉素	40.06	1.326	拮抗
14	五水硫酸铜+盐酸金霉素	49.29	1.570	拮抗
15	五水硫酸铜+盐酸强力霉素	36.80	1.033	相加
16	硝酸铅+氯化镉	5.58	0.756	协同
17	硝酸铅+重铬酸钾	29.28	1.611	拮抗
18	硝酸铅+盐酸四环素	34.19	1.157	相加
19	硝酸铅+盐酸土霉素	34.83	1.685	拮抗
20	硝酸铅+盐酸金霉素	39.51	1.809	拮抗
21	硝酸铅+盐酸强力霉素	31.16	1.196	相加
22	氯化镉+重铬酸钾	30.31	1.218	拮抗
23	氯化镉+盐酸四环素	37.58	1.037	相加
24	氯化镉+盐酸土霉素	36.08	1.318	拮抗
25	氯化镉+盐酸金霉素	32.04	1.122	相加
26	氯化镉+盐酸强力霉素	30.47	0.930	相加
27	重铬酸钾+盐酸四环素	67.90	1.443	拮抗
28	重铬酸钾+盐酸土霉素	32.77	0.859	相加
29	重铬酸钾+盐酸金霉素	111.00	2.822	拮抗
30	重铬酸钾+盐酸强力霉素	29.72	0.683	协同
31	盐酸四环素+盐酸土霉素	110.00	2.221	拮抗
32	盐酸四环素+盐酸金霉素	77.06	1.520	拮抗
33	盐酸四环素+盐酸强力霉素	61.41	1.118	相加
34	盐酸土霉素+盐酸金霉素	64.68	1.547	拮抗
35	盐酸土霉素+盐酸强力霉素	160.50	3.487	拮抗
36	盐酸金霉素+盐酸强力霉素	80.64	1.708	拮抗

亮发光杆菌的毒性大小排序为 $\text{Hg}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$ 。仇爱峰等^[30]研究了克百威、氯化镉和硫酸铜对费氏弧菌的毒性,其毒性大小为 $\text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{克百威}$ 。吴淑杭等^[31]利用明亮发光杆菌T3研究了硝酸镉、重铬酸钾和氯化汞的单一毒性, Cd^{2+} 、 Cr^{6+} 和 Hg^{2+} 对明亮发光杆菌的 EC_{50} 值分别 6.05 、 $30.65 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.044 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,毒性大

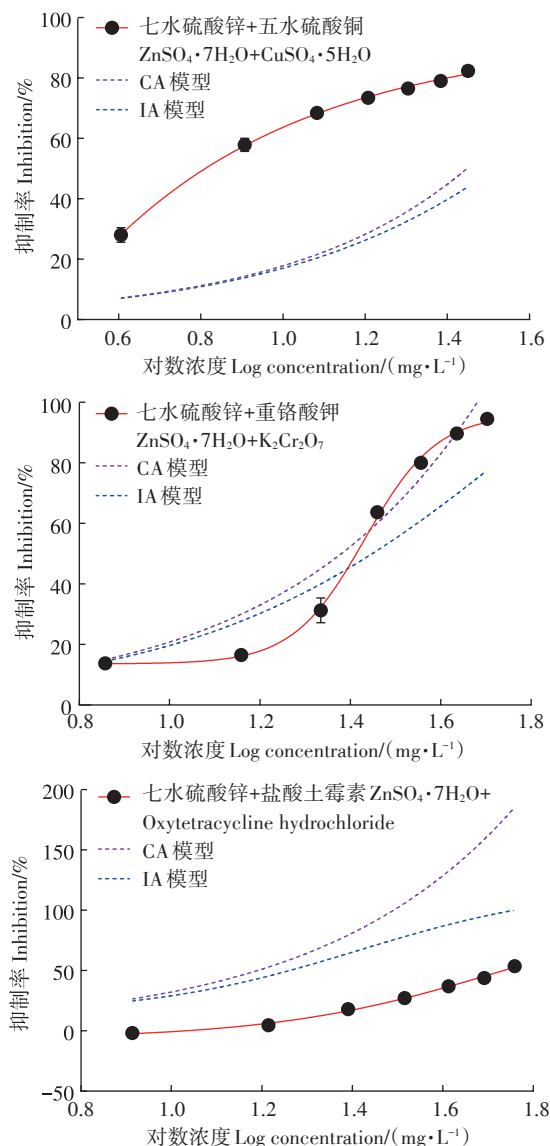


图3 CA与IA模型预测二元混合毒性曲线

Figure 3 CA and IA models predicted the binary mixed toxicity diagram

小为 $\text{Hg}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cr}^{6+}$ 。周上洋等^[32]应用基因重组发光菌研究了 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Hg^{2+} 的毒性,结果发现毒性大小排序为 $\text{Hg}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+}$ 。李小鹏^[33]的研究结果表明7种重金属对发光细菌的毒性大小排序为 $\text{Ni}^{2+} = \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Cr}^{3+}$ 。在本研究中,毒性大小排序为 $\text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cr}^{6+}$,与上述研究结果一致。而杨虹^[34]的实验结果表明重金属对费氏弧菌的毒性大小排序为 $\text{Hg}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cr}^{6+}$ 。杨虹使用的发光细菌为费氏弧菌,可能是不同菌株对重金属的敏感性及其所用仪器不同导致其与本研究测得的结果有差异,这还有待进一步验证。

3.2 四环素类抗生素对发光细菌的单一急性毒性

本研究测定了四环素、盐酸土霉素、盐酸金霉素、

盐酸强力霉素对发光细菌的单一急性毒性。当抗生素浓度不断增加时,发光细菌的发光强度明显减弱。这是因为四环素类抗生素与发光细菌的30S亚基结合,抑制氨基脂酰基tRNA与mRNA密码子依赖性核糖体A位结合,从而抑制肽链的增长,进而影响生物蛋白的合成^[22]。由于抑制效应的持续增强,相对发光强度随着四环素类抗生素浓度的升高而显著降低(即发光抑制率上升)。

3.3 重金属与抗生素对发光细菌的联合急性毒性

研究表明在不同试验中联合效应可能是不一致的,这取决于混合物的浓度、种类和受试生物^[35]。在重金属与重金属之间的二元联合毒性效应中,联合毒性表现为协同作用可能是因为一种离子的增加增强了另一种离子的毒性。相加作用是两种离子作用于同一位点的毒性作用相似,作用机理也类似,相当于一种化学物质代替了另外一种化学物质,其混合物的毒性不发生改变^[36]。而拮抗作用是两种离子间的位点竞争从而导致毒性降低,即位点竞争理论^[37];另一种可能是与细胞内金属硫蛋白的形成有关^[38]。本研究五水硫酸铜+氯化镉的协同作用大于其他组,联合毒性最强。仇爱峰等^[30]的研究表明铜在混合物中浓度高时,可增加细胞膜的通透性,使二元联合毒性逐渐增强。抗生素与抗生素之间的联合毒性效应主要表现为拮抗作用,其中盐酸四环素+盐酸金霉素的拮抗作用最强。四环素类抗生素具有十二氢化并四苯基本结构,由于取代基不同及膜通透性造成了毒性差异。如金霉素中C₇位上极性氯原子可使其透过生物膜进入细菌体内而表现出较高的毒性^[39]。丛永平等^[40]研究发现磺胺类抗生素、甲氧苄啶、四环素类及氯霉素对明亮发光细菌(*Photobacterium phosphoreum*)的联合急性毒性亦均表现出拮抗作用。重金属与抗生素之间的二元联合毒性效应主要表现为拮抗作用与相加作用,其中的机制可能是膜的通透性改变或与位点竞争理论相似。因此,自然环境中混合污染物的联合毒性会因为存在方式的差异而产生不同的联合效应。

3.4 CA和IA模型预测重金属与四环素类抗生素二元混合物的毒性

定量结构-活性关系(Quantitative structure-activity relationship, QSAR)模型、CA模型和IA模型已被用于预测污染物混合物的毒性^[41]。研究表明CA模型可以预测镉、铅和锰混合物的毒性^[42]。然而,观察到的这些混合物的毒性常低于或高于预测值。

Chen 等^[43]的研究表明 CA 模型和 IA 模型不适用于预测纳米氧化锌-化学物质等毒性比下的混合物毒性。Yang 等^[27]的研究也表明 CA 模型和 IA 模型都不适合预测双酚 A 和重金属混合物的毒性。在本研究结果中,CA 模型和 IA 模型偏离实测值,表明这两种模型不适用于预测重金属与四环素类抗生素二元混合体系的毒性。

4 结论

(1)单一毒性大小表现为硝酸铅>七水硫酸锌>氯化镉>盐酸土霉素>盐酸金霉素>盐酸强力霉素>盐酸四环素>五水硫酸铜>重铬酸钾,由此可知发光细菌对硝酸铅较敏感。

(2)当重金属与四环素类抗生素共存时,会对发光细菌产生不同的毒性效应。

(3)CA 模型和 IA 模型偏离实测值,不适用于预测重金属与四环素类抗生素二元混合体系的毒性。

参考文献:

- [1] KELLY C J, TUMSAROJ N, LAJOIE C A. Assessing wastewater metal toxicity with bacterial bioluminescence in a bench-scale wastewater treatment system[J]. *Water Research*, 2004, 38(2):423-431.
- [2] 王玉军, 吴同亮, 周东美, 等. 农田土壤重金属污染评价研究进展[J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(12):2365-2378. WANG Y J, WU T L, ZHOU D M, et al. Advances in soil heavy metal pollution evaluation based on bibliometrics analysis[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(12):2365-2378.
- [3] LIN Y, WANG L, XU K, et al. Revealing taxon-specific heavy metal-resistance mechanisms in denitrifying phosphorus removal sludge using genome-centric metaproteomics[J]. *Microbiome*, 2021, 9(1):1-17.
- [4] QI Y, MA J, XIU F R, et al. Determination of Cr(VI) based on the peroxidase mimetic catalytic activity of citrate-capped gold nanoparticles[J]. *Mikrochimica Acta*, 2021, 188(8):273.
- [5] QI Y, SONG D, CHEN Y. Colorimetric oligonucleotide-based sensor for ultra-low Hg^{2+} in contaminated environmental medium: convenience, sensitivity and mechanism[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 766:142579.
- [6] 甘婷婷, 赵南京, 殷高方, 等. 长江三角洲地区农用地土壤重金属污染状况与防治建议[J]. 中国工程科学, 2021, 23(1):174-184. GAN T T, ZHAO N J, YIN G F, et al. A review on heavy metal pollution of agricultural land soil in the Yangtze River Delta and relevant pollution control strategy[J]. *Strategic Study of CAE*, 2021, 23(1):174-184.
- [7] 周怡, 胡文友, 黄标, 等. 我国高速公路周边土壤重金属污染现状及研究进展[J]. 中国环境监测, 2020, 36(5):112-120. ZHOU Y, HU W Y, HUANG B, et al. Current status and research progress of heavy metal pollution in soils surrounding highways of China[J]. *Environmental Monitoring of China*, 2020, 36(5):112-120.
- [8] CHEN J, MYERBURG M M, PASSERO C J, et al. External Cu^{2+} inhibits its human epithelial Na^+ channels by binding at a subunit interface of extracellular domains[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(31):27436-27446.
- [9] SARMAH A K, MEYER M T, BOXALL A B A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment[J]. *Chemosphere*, 2006, 65(5):725-759.
- [10] LI S, SHI W, LIU W, et al. A duodecennial national synthesis of antibiotics in China's major rivers and seas (2005-2016)[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 615:906-917.
- [11] PATEL M, KUMAR R, KISHOR K, et al. Pharmaceuticals of emerging concern in aquatic systems: chemistry, occurrence, effects, and removal methods[J]. *Chemical Reviews*, 2019, 119(6):3510-3673.
- [12] 武旭跃, 邹华, 朱荣, 等. 太湖贡湖湾水域抗生素污染特征分析与生态风险评价[J]. 环境科学, 2016, 37(12):4596-4604. WU X Y, ZOU H, ZHU R, et al. Occurrence, distribution and ecological risk of antibiotics in surface water of the Gonghu Bay, Taihu Lake[J]. *Environmental Science*, 2016, 37(12):4596-4604.
- [13] 那广水, 陈彤, 张月梅, 等. 中国北方地区水体中四环素族抗生素残留现状分析[J]. 中国环境监测, 2009(6):78-80. NA G S, CHEN T, ZHANG Y M, et al. Analysis tetracyclines antibiotics residues status in water of north China[J]. *Environmental Monitoring of China*, 2009(6):78-80.
- [14] HIRSCH R, TERNES T A, HABERER K, et al. Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 1998, 815(2):213-223.
- [15] JIANG L, HU X L, YIN D Q, et al. Occurrence, distribution and seasonal variation of antibiotics in the Huangpu River, Shanghai, China[J]. *Chemosphere*, 2011, 82(6):822-828.
- [16] 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, 2013:12-23. ZHANG Y. Aquatic toxicity and selective adsorption removal of antibiotic and metal complex[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2013:12-23.
- [17] 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 R, WEI Y S. Pollution and control of tetracyclines and heavy metals residues in animal manure[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(9):1705-1719.
- [18] MA M, TONG Z, WANG Z, et al. Acute toxicity bioassay using the freshwater luminescent bacterium *Vibrio-Qinghaiensis* Sp. Nov. -Q67[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1999, 62:247-253.
- [19] DEHEYN D D, BENCHEIKH-LATMANI R, LATZ M I. Chemical speciation and toxicity of metals assessed by three bioluminescence-based assays using marine organisms[J]. *Environmental Toxicology*, 2004, 19(3):161-178.
- [20] HASSAN S H A, OH S E. Improved detection of toxic chemicals by *Photobacterium phosphoreum* using modified boss medium[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology*, 2010, 101(1):16-21.
- [21] 朱松梅, 方政, 董玉瑛. 3种大环内酯类抗生素对海洋发光菌的毒性作用[J]. 环境监控与预警, 2020, 12(5):112-116. ZHU S M,

- FANG Z, DONG Y Y. Toxicity of three macrolide antibiotics to marine *Photobacterium phosphoreum*[J]. *Environmental Monitoring and Forewarning*, 2020, 12(5):112–116.
- [22] 任皓, 王金荣, 陈行杰, 等. 应用发光细菌法检测饲用抗生素单一及联合毒性的研究[J]. 中国畜牧杂志, 2011, 47(21):49–53. REN H, WANG J R, CHEN X J, et al. Primary research on single and combined toxicity of antibiotics in feeds by luminescent bacteria[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2011, 47(21):49–53.
- [23] 朱金国, 刘红霞. 发光细菌检测四环素类抗生素体系的建立[J]. 中国食品卫生杂志, 2005(2):150–153. ZHU J G, LIU H X. System constructed to detect tetracyclines drug by luminescent bacteria[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2005(2):150–163.
- [24] 汪皓琦, 董玉瑛, 汪灵伟, 等. 4种喹诺酮类抗生素对发光菌毒性作用研究[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(3):453–459. WANG H Q, DONG Y Y, WANG L W, et al. The toxicity of four quinolones to *Photobacterium phosphoreum*[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2017, 12(3):453–459.
- [25] 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 M, ZHANG J, DONG X Q, 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.
- [26] 李孟涵, 贺子琪, 苗家赫, 等. 重金属Pb与抗生素对发光菌的联合毒性研究[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(9):1925–1936. LI M H, HE Z Q, MIAO J H, et al. Joint toxicity of heavy metal Pb and antibiotics to photobacterium[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(9):1925–1936.
- [27] YANG J, LIAO A Q, HU S L, et al. Acute and chronic toxicity of binary mixtures of bisphenol A and heavy metals[J]. *Toxics*, 2022, 10(5):255.
- [28] BRODERIUS S J, KAHL M D, HÖGLUND M D. Use of joint toxic response to define the primary mode of toxic action for diverse industrial organic chemicals[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 1995, 14(9):1591–1605.
- [29] 何早, 吴卫国, 胡雨欣, 等. 发光细菌法检测大米中的重金属[J]. 粮食与油脂, 2016, 29(5):63–66. HE Z, WU W G, HU Y X, et al. Study on the detection of heavy metals in rice using luminescence bacteria[J]. *Cereals & Oils*, 2016, 29(5):63–66.
- [30] 仇爱锋, 王玉涛, 张树秋, 等. 克百威、镉和铜对费氏弧菌的联合毒性效应[J]. 农业环境科学学报, 2017, 36(5):869–875. QIU A F, WANG Y T, ZHANG S Q, et al. Joint toxic effects of carbofuran, Cd and Cu to *Vibrio fischeri*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(5):869–875.
- [31] 吴淑杭, 周德平, 徐亚同, 等. 重金属汞、镉和铬对明亮发光杆菌的生物毒性[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(12):2446–2450. WU S H, ZHOU D P, XU Y T, et al. Toxicities of heavy metals Hg, Cd and Cr to *Photobacterium phosphoreum*[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(12):2446–2450.
- [32] 周上洋, 赵建亮, 黄国勇, 等. 重金属Zn、Cu和Hg对基因重组发光菌的综合毒性及其联合效应[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2018, 50(1):33–37. ZHOU S Y, ZHAO J L, HUANG G Y, et al. Toxicity and joint effects of heavy metals Zn, Cu and Hg to recombinant luminescent bacterium[J]. *Journal of South China Normal University(Natural Science Edition)*, 2018, 50(1):33–37.
- [33] 李小明. 重金属对发光菌联合毒性控制的研究[D]. 北京:华北电力大学, 2014:11–13. LI X P. Research on joint toxicity control of heavy metals to *Photobacterium phosphoreum*[D]. Beijing:North China Electric Power University, 2014:11–13.
- [34] 杨虹. 常见重金属对费氏弧菌的生物毒性研究[J]. 环境科学与管理, 2015, 40(10):140–142. YANG H. Toxicities of heavy metals to *Vibrio fischeri*[J]. *Environmental Science and Management*, 2015, 40(10):140–142.
- [35] GAO Y, FENG J, KANG L, et al. Concentration addition and independent action model: which is better in predicting the toxicity for metal mixtures on zebrafish larvae[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 610:442–450.
- [36] 赵莉, 杨虹, 郭晶晶. 二元含汞重金属混合物对费氏弧菌的联合毒性研究[J]. 安全与环境学报, 2015, 15(1):297–300. ZHAO L, YANG H, GUO J J. Study on the combined toxicity of binary heavy metal mixture to *Vibrio fischeri*[J]. *Journal of Safety and Environment*, 2015, 15(1):297–300.
- [37] 曹维, 陈建孟, 马建义, 等. MTBE与雌二醇对螺旋鱼腥藻的联合毒性[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(4):450–455. CAO W, CHEN J M, MA J Y, et al. Joint toxicity of MTBE and estradiol to *Anabaena spiroides*[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2007, 2(4):450–455.
- [38] WARNE M S, HAWKER D W. The number of components in a mixture determines whether synergistic and antagonistic or additive toxicity predominate: the funnel hypothesis[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1995, 31(1):23–28.
- [39] 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 J Q, LIANG Y, DONG Y H, et al. Toxicity of tetracyclines and their epi isomers on the luminescent bacterium[J]. *Journal of Toxicology*, 2006, 20(5):279–281.
- [40] 丛永平, 姜蕾, 王婷, 等. 典型抗生素二元混合物对明亮发光杆菌的急性联合毒性[J]. 环境化学, 2013, 32(7):1348–1352. CONG Y P, JIANG L, WANG T, et al. Acute joint toxicity of binary antibiotic mixtures on photobacterium phosphoreum[J]. *Environmental Chemistry*, 2013, 32(7):1348–1352.
- [41] WANG D, WANG S, BAI L M, et al. Mathematical modeling approaches for assessing the joint toxicity of chemical mixtures based on luminescent bacteria: a systematic review[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11:1651.
- [42] ZHANG J, DING T T, DONG X Q, et al. Time-dependent and Pb-dependent antagonism and synergism towards *Vibrio qinghaiensis* sp. - Q67 within heavy metal mixtures[J]. *RSC Advances*, 2018, 8(46):26089.
- [43] CHEN F, WU L, XIAO X, et al. Mixture toxicity of zinc oxide nanoparticle and chemicals with different mode of action upon *Vibrio fischeri*[J]. *Environmental Sciences Europe*, 2020, 32(1):1–10.

(责任编辑:李丹)