

3种大环内酯类抗生素对海洋发光菌的毒性作用

朱松梅, 方政, 董玉瑛*

(大连民族大学环境与资源学院, 辽宁 大连 116605)

摘要:以海洋发光菌为受试生物,研究了红霉素、罗红霉素、乙酰螺旋霉素3种抗生素的单一和联合毒性作用。基于常见的3种联合作用评价方法,对混合体系的联合毒性作用进行了评价研究。结果表明,3种抗生素对发光菌单独作用的半最大效应浓度(EC_{50})分别为: 0.7259×10^{-3} , 1.2078×10^{-3} 和 0.633×10^{-3} mol/L;二元联合体系对发光菌的毒性强弱为:红霉素+乙酰螺旋霉素>罗红霉素+红霉素>罗红霉素+乙酰螺旋霉素。3种抗生素联合体系作用类型的不同与每种抗生素不同取代基对微生物生理生化过程的影响有关。在选择联合研究体系中,以毒性单位法获得参数的数值较大,灵敏度较高。研究大环内酯类抗生素对发光菌的毒性作用可为环境风险评价提供基础数据。

关键词:大环内酯类抗生素;发光菌;单一毒性;联合毒性;作用机制

中图分类号:X834

文献标志码:A

文章编号:1674-6732(2020)05-0112-05

Toxicity of Three Macrolide Antibiotics to Marine *Photobacterium Phosphoreum*

ZHU Song-mei, FANG Zheng, DONG Yu-ying*

(College of Environment & Resources, Dalian Minzu University, Dalian, Liaoning 116605, China)

Abstract: In this paper, marine *photobacterium phosphoreum* were used as test organisms to research the single and combined toxic effects of erythromycin, roxithromycin and acetylspiramycin. The joint toxicity was evaluated by three common evaluating methods. The results showed that EC_{50} of the single toxic effects of three antibiotics on *photobacterium phosphoreum* were: 0.7259×10^{-3} , 1.2078×10^{-3} and 0.633×10^{-3} mol/L respectively. The toxic effect of the binary mixed system on *photobacterium phosphoreum* ranged as follows: erythromycin + acetylspiramycin > erythromycin + roxithromycin > roxithromycin + acetylspiramycin. The toxic effect types varied with different substituents of each antibiotic which affect the physiological and biochemical process of microbes. Of the evaluating methods, Toxic Unit method showed higher value and was most sensitive. Studying the toxic effects of macrolide antibiotics on *photobacterium phosphoreum* can provide basic data for environmental risk assessment.

Key words: Macrolide antibiotic; *Photobacterium phosphoreum*; Single toxicity; Joint toxicity; Mechanism

大环内酯类抗生素是日常生活中常用的一类药物,这些药物不能全部被生物体吸收,其中的30%~90%都会被排出体外^[1]。由于抗生素的滥用和低吸收性,大量抗生素随着人类活动被排入环境中。研究表明,污水处理厂对抗生素类污染物的去除率不高,因此抗生素在环境中残留产生的危害使其成为研究热点^[2]。红霉素属于第1代大环内酯类抗生素,由红霉素链霉菌产生,因其具有广谱抗菌性,抑菌作用好,组织分布广泛,药性性质稳

定,且仅有少部分作用对象会出现较轻的不良反应,被广泛用于医药行业和畜禽养殖业,是全球范围内环境检出率较高的抗生素之一^[3]。罗红霉素是红霉素的醚类衍生物,是半合成的十四元环大环内酯类抗生素,口服吸收疗效好,在生物体内产生的抗菌效果比红霉素强1~4倍,且避开了红霉素会溶于胃酸而失活的缺陷,被广泛应用于临床医学,治疗多种由于敏感菌株引起的感染性疾病^[4]。乙酰螺旋霉素是螺旋霉素的醋酸酯,强效抑菌剂的

收稿日期:2020-05-09;修订日期:2020-06-30

基金项目:辽宁省自然科学基金资助项目(20180550107);中央高校基本科研专项资金资助项目(0918110143)

作者简介:朱松梅(1995—),女,硕士在读,研究方向为化学品风险分析和评价。

*通讯作者:董玉瑛 E-mail:dong_yuying@163.com

典型代表,在口服条件下能够更快地分布到生物体的组织和体液中去,但只有浓度较高时才能起到杀菌作用,相对疗效较为缓和,但对耐红霉素的金黄色葡萄球菌的抑制作用很强,也是治疗弓形虫感染的极为安全有效的一种抑菌药物^[5]。

发光菌是一种兼性厌氧生物,主要存在于海洋、淡水和陆地环境中。发光原理为,荧光素酶氧化了特定的底物荧光素和还原型辅酶,使黄素单核苷酸发生反应。毒物的量或浓度越大,被测生物发光菌发出的光越弱,其发光强度与污染物浓度呈较好的线性关系^[6]。该方法具有快速、灵敏、操作简单、应用范围广泛等优点。那广水等^[7]用发光菌来评价排污口污水中总有机污染物的毒性,并对环渤海排污口水质状况进行评价。现选用3种大环内酯类抗生素对海洋发光菌的毒性进行实验,为其对环境及生物的影响提供了基础数据,为国内制定该类抗生素污染效应的环境基准以及相关生产行业的排放标准提供有效依据。

1 材料与方法

1.1 实验仪器

DXY-2生物毒性测试仪(中国科学院南京土壤研究所);THZ-82恒温振荡器(江苏金城国胜试验仪器厂);DHP-9082恒温培养箱(上海一恒科技有限公司);85-2恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器厂);LDZX-40CI高压蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂);BS214D型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.2 实验试剂

红霉素肠溶片(西安利君制药有限责任公司);乙酰螺旋霉素片(西南药业股份有限公司);罗红霉素分散片(哈药集团制药六厂)。以上3种抗生素均采用校正后的有效成分含量配制,根据溶液稀释公式 $C_1V_1 = C_2V_2$ 对溶液进行配比,使溶质浓度符合实验设计。其中: C_1 为稀释前溶质浓度; V_1 为稀释前溶液体积; C_2 为稀释后溶质浓度; V_2 为稀释后溶液体积。海洋明亮发光菌冻干粉(中国科学院南京土壤研究所)。

1.3 发光菌培养

(1)发光菌冻干粉制剂的复苏:无菌条件下,取已灭菌的3% NaCl溶液1 mL于明亮发光菌的

冻干粉制剂中均匀混合,常温下放置2 min即可复苏;

(2)斜面菌种的培养:将已复苏的发光菌用已灭菌的接种棒转接至斜面培养基,20℃下恒温培养24 h后转接第二代,相同的操作至第三代后放于冰箱保存备用,以上操作均须在无菌条件下进行;

(3)摇瓶菌液的培养:将上述制得的第三代发光菌斜面菌种转接到含有100 mL培养液的250 mL锥形瓶中,20℃恒温振荡,培养至对数生长期备用;

(4)工作菌液的制备:吸取一定量的摇瓶菌液于3% NaCl溶液中,充分搅拌,发光强度控制在300~900 mV为宜^[8]。

1.4 毒性测定

1.4.1 单一毒性 EC_{50} 的测定

半最大效应浓度(EC_{50})是指能引起50%最大效应的浓度。根据预实验确定大致的浓度范围,将3种抗生素分别配制至少15个浓度梯度。用移液枪吸取各浓度梯度的样品溶液2 mL于具塞磨口比色管中,以2 mL 3% NaCl溶液作为空白对照,每组再将0.5 mL的工作菌液加入试管中,加塞上下振荡均匀后去塞,暴露15 min时测定发光强度。每组浓度梯度做2个平行实验,确保毒性分析结果标准偏差<10%。

1.4.2 联合毒性 EC_{50} 的测定

根据单一毒性测试结果,绘制毒性作用的效应-剂量曲线,获得红霉素、罗红霉素、乙酰螺旋霉素的 EC_{40} 、 EC_{45} 、 EC_{50} 、 EC_{55} 、 EC_{60} 所对应的质量浓度值。将3种待测药品的5个浓度梯度按照 EC_x 值进行等毒性比例设计配制二元和三元联合体系,将3%的NaCl溶液作为实验组的空白对照,每组浓度设置2个平行实验,确保每组平行实验的标准偏差<10%,测定二元及三元联合体系抗生素对发光菌联合毒性作用的 EC_{50} 。

1.5 联合毒性评价方法

多元联合体系下的污染物对生物体的联合毒性作用类型包括独立作用、协同作用、相加作用(简单相加作用和部分相加作用)和拮抗作用4种。现使用相加指数法(AI)、毒性单位法(TU)、混合毒性指数法(MTI)对3种抗生素的二元及三

元联合体系的作用类型进行定量判别和分析^[9], M 表示各种化合物的毒性之和, M_0 为 M 与联合作用中各化合物单一毒性的最大值之比, 判断标准见表 1。

表 1 不同评价指标的联合作用类型判断标准

作用类型	协同作用	独立作用	拮抗作用	简单相加作用	部分相加作用
TU	$M < 1$	$M = M_0$	$M > M_0$	$M = 1$	$M_0 > M > 1$
AI	$AI > 0$		$AI < 0$	$AI = 0$	
MTI	$MTI > 1$	$MTI = 0$	$MTI < 0$	$MTI = 1$	$0 < MTI < 1$

1.6 数据处理

发光抑制率计算公式为:

发光抑制率 = (对照发光强度 - 实验样品发光强度) / 对照发光强度 × 100%。

以发光抑制率对抗生素浓度采用 Excel 绘图, 得到 3 种抗生素对发光菌的单一毒性范围图, 进一步选取对发光菌抑制率为 50% 左右的 5~7 个点作线性图, 根据线性方程求得相对发光抑制率为 50% 时对应的药品浓度, 即得该抗生素对发光菌的 EC_{50} 。

2 结果与讨论

2.1 单一毒性作用测试分析

抗生素浓度和抑制率之间的相关系数 r , 经显著性水平检验, 置信区间 > 90%, 故 3 种大环内酯类抗生素的浓度与抑制率之间均表现出较好的线性拟合关系。目前, 国内外在水体中检测出的红霉

素质量浓度为 2.9 ~ 2 189 ng/L, 罗红霉素质量浓度为 20 ~ 560 ng/L, 乙酰螺旋霉素质量浓度为 1 800 ~ 912 000 $\mu\text{g/L}$ 。浮游动植物对此类抗生素非常敏感, 较低剂量也会对环境 and 生物存在较大威胁^[10-12]。3 种大环内酯类抗生素的单一毒性大小为: 乙酰螺旋霉素 > 红霉素 > 罗红霉素(表 2)。有研究人员通过测试部分取代苯和苯并噻唑类污染物的毒性, 发现母体相同的抗生素, 其毒性差异由同类化合物中的取代基决定^[13-14], 该结果对本研究单一毒性测试所得到的结论具有参考意义。3 种大环内酯类抗生素的分子结构式见图 1(a)(b)(c), 由图 1 可以看出, 其取代基的结构和数量均不相同, 其毒性效应也有差异。研究人员发现, 罗红霉素比红霉素具有更长的半衰期和更高的血药峰浓度, 在生物体内产生的抗菌效果比红霉素强 1~4 倍, 且避开了红霉素会溶于胃酸而失活的缺陷, 其作为红霉素衍生物, 它的毒性作用低, 变态反应少^[4,15], 这与本研究结论一致。这一结论的取得以及大环内酯类抗生素分子中各取代基对抗生素的毒性贡献, 说明大环内酯类抗生素的分子间相互作用机制仍须进一步研究。

表 2 3 种大环内酯类抗生素对发光菌的单一毒性测试

化合物	线性方程	R^2	$C(EC_{50}) / (10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$
红霉素	$y = 0.0032x - 1.2048$	0.9965	0.7259
罗红霉素	$y = 0.0011x - 0.5118$	0.9931	1.2078
乙酰螺旋霉素	$y = 0.0014x - 0.2844$	0.9912	0.6330

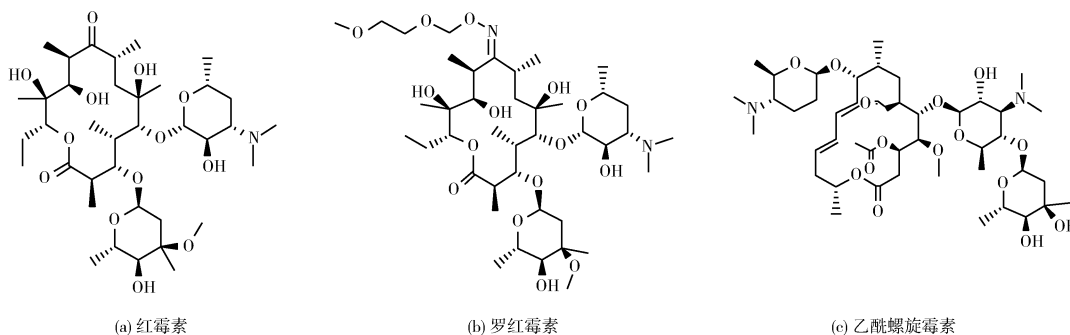


图 1 3 种大环内酯类抗生素的分子结构式

2.2 二元联合体系的联合毒性评价

综合分析 3 种大环内酯类抗生素的二元联合体系对海洋发光菌的联合毒性作用(表 3), 当以等毒性比例混合时, 红霉素 + 乙酰螺旋霉素的作用类

型为协同作用, 红霉素 + 罗红霉素及罗红霉素 + 乙酰螺旋霉素的作用类型为部分相加作用。采用 TU 法和 MTI 法对上述 2 组二元联合体系进行评价, 得到的评价结果相同, 而通过 AI 法对其评价却得

到拮抗作用的结论。由于 AI 法中没有进一步对部分相加作用进行详细划分,此外由 Moshkovsky 所提出的分类也是从传统分类里的拮抗区域中再分类得到的部分相加作用和掩盖作用,故部分相加作用在某种意义上属于拮抗作用,因此上述评价结果归于拮抗作用类型^[16]。根据 2 组拮抗类型的二元

联合体系中得到的 AI 和 MTI 值,可推断拮抗作用强弱顺序为:红霉素 + 罗红霉素 > 罗红霉素 + 乙酰螺旋霉素。根据拮抗作用的强弱和二元联合体系 EC₅₀ 的大小可知,3 种大环内酯类抗生素二元联合体系的毒性强弱为:红霉素 + 乙酰螺旋霉素 > 红霉素 + 罗红霉素 > 罗红霉素 + 乙酰螺旋霉素。

表 3 3 种大环内酯类抗生素联合毒性评价参数

联合体系	$C(EC_{50})/(10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1})$	TU	M	M ₀	AI	MTI
红霉素 + 乙酰螺旋霉素	0.267 8	0.608 8 0.147 7	0.756 6	1.242 7	0.321 7	1.402 3
红霉素 + 罗红霉素	0.470 5	0.398 0 0.633 9	1.031 9	1.627 8	-0.031 9	0.954 6
罗红霉素 + 乙酰螺旋霉素	0.577 7	0.674 5 0.538 0	1.212 5	1.797 5	-0.212 5	0.721 9
红霉素 + 罗红霉素 + 乙酰螺旋霉素	0.797 5	0.937 4 0.963 8 0.885 7	2.787 0	2.891 4	-1.787 0	0.067 0

2.3 三元联合体系的联合毒性评价

由于二元联合体系的毒性评价结果中有 2 组呈现拮抗作用,其原因可能是 3 种抗生素分子间不同的活性成分相互作用,进而降低联合体系的总毒性,从而呈现出拮抗作用。而在三元联合体系中,多个拮抗体系的相互累加使各抗生素分子间的相互作用更强,致使三元联合体系的毒性仍呈现拮抗作用(表 3),这与丛永平等^[17]的研究结果一致。三元联合体系的毒性依旧很强,其可能引发的环境风险应引起学者及公众的关注。

2.4 联合毒性作用机制探讨及其类型评价

对于抗生素联合体系同时出现拮抗和部分相加作用的评价结果,有学者认为其原因是化合物的联合体系在以等毒性比例混合后,各化合物都不能占据主导作用,对发光菌的毒性更倾向于各自的独立作用^[18]。结合发光菌的发光原理对联合毒性做进一步分析,海洋发光菌在发光过程中氧化态的黄素单核苷酸(FMN)与还原态的黄素单核苷酸(FMNH₂)在反应过程中具备了传递氢(H)的作用,3 种抗生素分子中都含有羟基(-OH),-OH 与 FMN 反应形成氢键,阻断 FMNH₂ 在氧化还原作用中 H 的传递,影响海洋发光菌的活性。3 种抗生素的分子中均含有氮(N)元素,它能够作为海洋发光菌的营养元素对发光反应过程起促进作用,同时减弱联合体系对发光强度的抑制作用,呈现出拮抗

作用^[19-20]。

2.5 不同联合毒性评价方法的比较

为了比较 3 种不同联合毒性评价方法,对表 3 中的数据做进一步处理,认为 M₀ - M、MTI - 1、AI 的数值大小可以代表联合作用的强度^[21]。图 2 为不同联合毒性评价方法的比较,由图 2 可见,(M₀ - M)数值波动相对较小,灵敏度较高,因此为该研究体系的推荐评价方法。同时也可以直观地看出,红霉素 + 罗红霉素 + 乙酰螺旋霉素三元体系拮抗作用较弱。

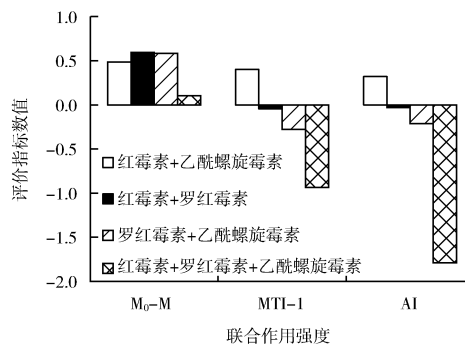


图 2 不同联合毒性评价方法的比较

3 结语

抗生素单一毒性的差异取决于不同的取代官能团、半衰期和血药浓度等。除红霉素 + 乙酰螺旋霉素表现为协同作用以外,其他二元及三元联合体

系均呈现不同程度的拮抗作用,对于其在生物体内的真实毒性作用仍须深入研究。3 种评价方法都是联合毒性评价的可行性方法,其中 TU 法获得参数的数据波动范围小,稳定性较好,灵敏度较高,为该研究体系的推荐评价方法。

[参考文献]

- [1] CHEN Y J, ZHANG S T, LAN T, et al. The joint toxicity effect of five antibiotics and dibutyl phthalate to luminescent bacteria (*Vibrio fischeri*) [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(26): 26504 - 26511.
- [2] 吴秀茹. 大环内酯类抗生素的厌氧降解及其生态毒性研究 [D]. 河南: 河南大学, 2018.
- [3] 李洪和. 红霉素与洁霉素类药物在养殖中的应用 [J]. *养殖技术顾问*, 2014(3): 229.
- [4] 穆平玲. 罗红霉素在临床上的应用 [J]. *山东畜牧兽医*, 2013, 34(3): 28.
- [5] 曲君竹. 紫外分光光度法测定乙酰螺旋霉素含量 [J]. *科学与财富*, 2018(17): 1.
- [6] 李真, 苗晶晶, 潘鲁青. 6 种重金属的发光菌毒性效应及其海洋生物物种敏感度分析 [J]. *海洋环境科学*, 2015, 34(2): 176 - 183.
- [7] 那广水, 张月梅, 陈彤, 等. 发光菌法评价排污口污水中总有机污染物毒性 [J]. *中国环境监测*, 2010, 26(5): 61 - 64.
- [8] 方政, 董玉瑛, 赵晶晶, 等. 3 种不同功效医药品活性成分对发光菌的毒性作用 [J]. *生态毒理学报*, 2018(4): 185 - 190.
- [9] 孟庆俊, 肖昕. 不同方法对联合毒性作用的评价 [J]. *污染防治技术*, 2004(1): 33 - 35.
- [10] 方媛媛, 丁惠君. 抗生素的生态毒性效应研究进展 [J]. *环境科学与技术*, 2018, 41(5): 102 - 110.
- [11] 刘建超, 陆光华, 杨晓凡, 等. 水环境中抗生素的分布、累积及生态毒理效应 [J]. *环境监测管理与技术*, 2012, 24(4): 14 - 20.
- [12] 孙凯. 洪泽湖湿地典型抗生素污染特征与生态风险 [D]. 南京: 南京林业大学, 2015.
- [13] 翟丽华. 部分取代苯化合物对发光菌的急性毒性研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2003.
- [14] 李晓, 李娜, 饶凯锋. 苯并噻唑类污染物对青海弧菌 Q67 毒性效应 [J]. *生态毒理学报*, 2015, 10(2): 167 - 172.
- [15] 王晓华. 红霉素及其衍生物的研究 [J]. *黑龙江医药*, 2003(4): 301 - 302.
- [16] 顾兵, 王心如. 联合作用特征的评价 [J]. *中国工业医学杂志*, 2000(1): 55 - 58.
- [17] 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(7): 1348 - 1352.
- [18] 石昊, 袁孟杰, 孟一鸣, 等. 铜、铬和敌敌畏对费氏弧菌的联合毒性效应研究 [J]. *环境与发展*, 2019, 31(3): 105 - 107.
- [19] 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.
- [20] 童蕾, 姚林林, 刘慧, 等. 抗生素在地下水系统中的环境行为及生态效应研究进展 [J]. *生态毒理学报*, 2016, 11(2): 27 - 36.
- [21] XU S, NIRMALAKHANDAN N. Use of QSAR models in prediction joint effects in multi - component mixtures of organic chemicals [J]. *Water Research*, 1998, 32(8): 2391 - 2399.

栏目编辑 周亚平 王 湜 李文峻

· 征订启事 ·

欢迎订阅 2021 年《环境监测管理与技术》

《环境监测管理与技术》杂志是由江苏省生态环境厅主管,江苏省环境监测中心和江苏省南京环境监测中心联合主办的集学术性与实用性于一体的环境科技双月刊。本刊为全国中文核心期刊(2004)、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊,江苏省一级期刊。国内统一刊号:CN 32 - 1418/X,国际标准刊号:ISSN 1006 - 2009。以从事环境管理、环境监测、环境监察和环境教学的专业技术人员、管理干部、教师及其他环境科技工作者为服务对象,从多角度向读者介绍国内外环境保护的新成果、新技术、新动态和新经验。常设栏目有:管理与改革、专论与综述、研究报告、调查与评价、监测技术、争鸣与探索等。

本刊邮发代号:28 - 341,全国各地邮局均可订阅。本刊逢双月 25 日出版,定价为 15.00 元/期,全年定价 90.00 元,热忱欢迎新、老订户订阅。联系电话:(025)83701931;电子信箱:HJJS@chinajournal.net.cn。

《环境监测管理与技术》编辑部