

四环素和金霉素对水生生物的生态毒性效应

王慧珠², 罗 义¹, 徐文青¹, 周启星¹, 汤保华¹, 王媛媛¹

(1. 南开大学环境科学与工程学院, 天津 300071; 2. 辽宁大学环境学院, 辽宁 沈阳 110036)

摘 要: 由于抗生素在养殖业和畜牧业中的长期滥用, 其对水环境的污染胁迫已日益受到关注。本研究选取大型溞(*Daphnia magna*)、斑马鱼(*Danio rerio*)和鲫鱼(*Carassius auratus*)作为受试生物, 探讨环境中普遍存在的四环素类抗生素——四环素(Tetracycline, TC)和金霉素(Chlortetracycline, CTC)对以上3种水生生物的急性毒性, 从而初步评价四环素类抗生素对水生生物的潜在生态风险。结果表明, 四环素对鲫鱼和斑马鱼96 h- LC_{50} 值分别为322.8 mg·L⁻¹和406.0 mg·L⁻¹, 对大型溞的48 h- EC_{50} 值为617.2 mg·L⁻¹。金霉素对鲫鱼和斑马鱼96 h- LC_{50} 值分别为34.68 mg·L⁻¹和61.15 mg·L⁻¹, 对大型溞48 h- EC_{50} 值为137.6 mg·L⁻¹。3种水生生物对四环素和金霉素的毒性敏感顺序均为: 鲫鱼>斑马鱼>大型溞, 金霉素的毒性明显高于四环素。根据毒性分级标准判定, 四环素对3种水生生物均属低毒, 金霉素对大型溞属低毒, 对于斑马鱼和鲫鱼则属中毒。

关键词: 四环素; 金霉素; 急性毒性; 大型溞; 斑马鱼; 鲫鱼

中图分类号: X592 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)04-1536-04

Ecotoxic Effects of Tetracycline and Chlortetracycline on Aquatic Organisms

WANG Hui-zhu², LUO Yi¹, XU Wen-qing¹, ZHOU Qi-xing¹, TANG Bao-hua¹, WANG Yuan-yuan¹

(1. College of Environmental Sciences and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China; 2. School of Environment, Liaoning University, Shenyang 110036, China)

Abstract: Due to the long-term abuse of antibiotics in the aquaculture industry and the livestock husbandry, its impact on the aquatic environment has been paid increasing concern. The acute toxicity of tetracycline (TC) and chlortetracycline (CTC) to *Daphnia magna*, *Danio rerio* and *Carassius auratus* was studied in this paper. It showed that the 96 h- LC_{50} values of TC to *C. auratus* and *D. rerio* were 322.8 mg·L⁻¹ and 406.0 mg·L⁻¹, and the 48 h- EC_{50} value of *D. magna* was 617.2 mg·L⁻¹. On the other hand, the acute toxicity of CTC to *D. magna*, *D. rerio* and *C. auratus* were 137.59 mg·L⁻¹ (48 h- EC_{50}), 61.15 mg·L⁻¹ (96 h- LC_{50}) and 34.68 mg·L⁻¹ (96 h- LC_{50}) respectively. The toxic sensitivities of these organisms to TC and CTC were both in an order of *C. auratus* > *D. rerio* > *D. magna*. However, the toxicity of CTC to three organisms was significantly higher than that of TC. Based on these acute toxic values and the classification criteria of the toxic chemicals, TC belonged to the class of low toxicity to all of the three organisms. CTC belonged to the class of low toxicity to *D. magna*, but, middle toxicity to *D. rerio* and *C. auratus*. The results could be used as the risk assessment of the two antibiotics in the environment.

Keywords: tetracycline; chlortetracycline; acute toxicity; *Daphnia magna*; *Danio rerio*; *Carassius auratus*

近年来由于抗生素在养殖业和畜牧业中的大量使用, 导致其对水环境污染的问题日趋严重, 已成为当前国际研究热点之一^[1]。抗生素包括人用和兽用两类。我国由于人口多, 人用抗生素的使用总量居世界

前列; 与此同时, 兽药抗生素由于能促进动物生长和增产, 在养殖业中以亚治疗剂量长期添加于动物饲料中。目前, 世界上生产的抗生素已达200多种, 其中至少有50%的抗生素用于畜牧养殖业、养蜂业和水产养殖业^[2]。在我国, 每年生产的1300种化学原料药中, 抗生素类药品年产量达3.3万t。

研究表明^[3], 抗生素进入生物体后, 并不被完全吸收, 其中85%以上以原药形式排出体外, 有些抗生素在生物体内经生物转化, 生成毒性更大的代谢物随粪便和尿液排出体外。这些抗生素及其代谢物随雨水、

收稿日期: 2007-09-19

基金项目: 国家自然科学基金(20777041); 天津市城市生态环境修复与污染防治重点实验室开放基金(06TXJJJC14000)

作者简介: 王慧珠(1981—), 女, 硕士生, 主要研究方向为生态毒理学。
E-mail: yue660@163.com

通讯作者: 罗 义 E-mail: luoyi@nankai.edu.cn

地表径流污染地表水,或通过渗滤作用污染地下水,尽管浓度很低(一般在 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}\sim\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 水平),但由于其在养殖业和畜牧业中被长期频繁的施用,因此,对水生生态系统和人体健康构成极大的潜在威胁。最近,在德国等地的城市废水、农田土壤、地表水甚至饮用水中检测到了一定浓度抗生素的存在^[4-6],美国在 30 个州 139 多条河流检测到了包括农药、医药、兽药、激素等 95 种有机污染物^[7],并于 2001 年开始对水体中抗生素进行大范围的调查和研究^[8]。

目前,关于抗生素对水生生物的毒性研究主要集中在细菌、藻类和甲壳类。Back-haus^[9]通过 MICRO-TOX 试验对 5 大类 20 种常用抗生素进行了研究。结果表明,盐酸四环素毒性最强。Holling 等^[10]进行了四环素类药物对藻类的毒性试验,结果发现,铜绿微囊藻要比绿藻对四环素类药物的敏感性高出 2 个数量级,因此,四环素类药物对水生藻类植物属于强毒或中等毒性。Wollenberger 等^[11]研究了集约化渔场中常用的 9 种抗生素对淡水甲壳动物大型溞的急-慢性毒性试验,结果显示,土霉素 48 h- EC_{50} 约为 $1000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,四环素的无效应浓度(NOEC)为 $340\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在我国,对于抗生素的研究目前还没有引起足够的重视,只停留在对于畜牧农产品中抗生素残留量的检测上,关于抗生素的生物有效性以及生物毒性方面的研究尚属空白。

四环素类抗生素(Tetracyclines, TCs)是养殖业和畜牧业中使用最多、最广泛的一类抗生素,本研究选取四环素类抗生素中具代表性的四环素和金霉素作为目标化合物,研究四环素和金霉素对水生生物大型溞、斑马鱼和鲫鱼的急性毒性效应,从而评价四环素和金霉素对不同水生生物的毒性等级和生态风险。

1 材料与方法

1.1 受试生物和化学品

四环素,金霉素,纯度均为 97%,由南京德宝生化试剂公司提供。

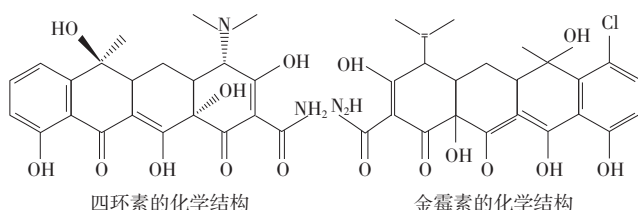


图 1 四环素和金霉素的化学结构

Figure 1 Chemical formulas for TC and CTC

选用的大型溞(*Daphnia magna*)为实验室孤雌生殖得到的至少三代以上的幼溞,用实验室培养的栅藻为饵料,培养用水选用曝气 24 h 以上的自来水。大型溞密度以每升水中 50 个左右母溞为宜。试验选用出生 6~24 h 的幼溞。

斑马鱼(*Danio rerio*)购至天津市塘沽区花鸟鱼虫市场,试验前驯养一周,驯养期间,健康状态良好,且没有死亡。选择足够数量、个体差异不大、健康活泼的斑马鱼用于试验;平均体长(1.8 ± 0.2)cm,体重(0.15 ± 0.02)g。

鲫鱼(*Carassius auratus*)购至天津市塘沽区花鸟鱼虫市场,鲫鱼幼体平均体长 8 cm,平均体重 12 g,实验前将鲫鱼驯养一周,驯养采用除氯自来水,鱼体健康活泼,无外观畸形。试验前一周不喂食,随机选取个体差异不大、健康活泼的鲫鱼用于试验。

1.2 试验条件

试验采用人工配制标准稀释水^[12],pH 值为 7.8 ± 0.2 ,硬度为 $(250\pm25)\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (以 CaCO_3 计),Ca/Mg 的比例接近 4:1,溶解氧浓度在空气饱和值的 80%以上,光照强度为 2500 lx ,光照周期为 16 h(光照):8 h(黑暗)。

1.3 试验方法

1.3.1 大型溞急性毒性试验

取溞龄(12 ± 12)h 并为同一母体的新生个体进行试验,试验方法参照 ISO^[13]和 OECD^[14]标准。以稀释水配置四环素和金霉素母液,根据预试验得出的浓度范围,在使大型溞全部死亡的最小浓度与最大无效应浓度之间以几何级数设置 7 个浓度组,每个浓度设 3 个平行,同时设空白对照。

由于四环素和金霉素易光解,每 12 h 换一次试验液,保证实验过程中溶液浓度稳定在 80%以上,48 h 后观察各个浓度组大型溞活动受抑制的情况。大型溞活动抑制的判别依据是振荡溶液,15 s 内无反应或游动的距离小于其体长的 3 倍。

1.3.2 斑马鱼 96 h 急性毒性试验

参考 ISO 和 OECD^[15]标准试验方法进行。根据预试验得出的浓度范围,以几何级数设置 6 个浓度组和一个空白对照组,每个浓度 3 个平行,水温(21 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 。光暗比 16:8,试验期间不投放饵料,12 h 换一次试验液,观察斑马鱼的存活状态并记录结果。斑马鱼死亡的标志:没有任何肉眼可见的运动,无鳃的扇动,触碰尾柄后无反应,即可判断该鱼死亡。

1.3.3 鲫鱼 96 h 急性毒性试验

试验容器为 10 L 鱼缸,盛放 8 L 曝气水,每个鱼缸放 10 条个体健康活泼的鲫鱼,其他条件同上。

1.3.4 统计分析

用 Origin6.0 统计软件按概率单位法进行分析。

2 结果与讨论

2.1 四环素和金霉素对大型蚤、斑马鱼和鲫鱼 3 种水生生物的急性毒性

表 1 四环素对 3 种水生生物的急性毒性				
Table 1 Acute toxicities of TC to <i>D. magna</i> , <i>D. rerio</i> and <i>C. auratus</i>				
受试生物	数值/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	回归方程	r^2	NOEC/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
大型蚤	48 h-EC ₅₀ =617.2	$Y=-6.970+2.677X$	0.982 8	401.4
斑马鱼	96 h-LC ₅₀ =406.0	$Y=-9.217+3.725X$	0.976 7	298.1
鲫鱼	96 h-LC ₅₀ =322.8	$Y=-28.64+11.62X$	0.965 7	292.3

说明:NOEC (no observed effect concentration)为无效应观察浓度。

表 2 金霉素对 3 种水生生物的急性毒性				
Table 2 Acute toxicities of CTC to <i>D. magna</i> , <i>D. rerio</i> and <i>C. auratus</i>				
受试生物	数值/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	回归方程	r^2	NOEC/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
大型蚤	48 h-EC ₅₀ =137.6	$Y=-2.959+1.618X$	0.992 2	67.53
斑马鱼	96 h-LC ₅₀ =61.15	$Y=-11.63+6.724X$	0.986 0	47.57
鲫鱼	96 h-LC ₅₀ =34.68	$Y=-6.387+4.472X$	0.981 0	26.81

四环素对 3 种水生生物的毒性效应如表 1 所示,在 48 h 静态暴露下,大型蚤的运动完全受到四环素的抑制,48 h-EC₅₀ 为 617.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,NOEC 为 401.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;对于斑马鱼,四环素 96 h-LC₅₀ 为 406.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,NOEC 为 298.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;四环素对于鲫鱼 96 h-LC₅₀ 为 322.8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,NOEC 为 292.3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。与表 1 相比,在相同暴露时间内,金霉素对于大型蚤的急性毒性比四环素强(如表 2 所示),48 h-EC₅₀ 仅为 137.6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,NOEC 为 67.53 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。可见四环素和金霉素对于生物的毒性差异很大(如图 2 所示)。根据 Holten 等(1999),抗生素对于高营养级生物的急性毒性浓度大部分在 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,甚至更高。而我们的实验结果与 Holten 的结果基本类似。

四环素类抗生素是并四苯衍生物,具有十二氢化并四苯的基本结构。四环素和金霉素是四环素类抗生素的典型代表,金霉素与四环素化学结构惟一的不同点就是在 C-7 位置上一个氯原子取代了氢原子。氯原子的存在增加了金霉素的脂溶性,从而有助金霉素透过生物膜进入生物体内而表现出较高的毒性^[16,17],因此与四环素相比,金霉素的毒性更大。从表 1 和表 2 中的数据(48 h-EC₅₀ 和 96 h-LC₅₀)可以得出,金霉

素对于大型蚤的急性毒性是四环素的 4.49 倍,对于斑马鱼的毒性是四环素的 6.64 倍,对于鲫鱼的毒性是四环素的 9.31 倍。

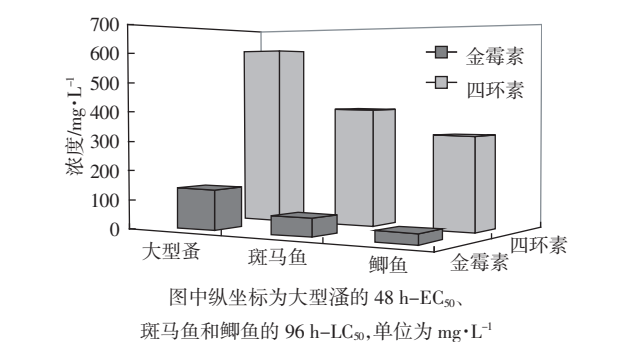


图 2 四环素和金霉素对 3 种水生生物的急性毒性比较
Figure 2 The acut toxicity comparison of TC and CTC

2.2 大型蚤、斑马鱼和鲫鱼对四环素和金霉素的敏感性比较

四环素对 3 种生物的急性毒性试验中,四环素对斑马鱼和鲫鱼 96 h-LC₅₀ 相差不大,斑马鱼对四环素的敏感性略低,而四环素对大型蚤的 48 h-EC₅₀ 值则较高,是斑马鱼急性毒性值的 1.52 倍,是鲫鱼急性毒性值的 1.91 倍,这说明在 3 种生物中大型蚤对于四环素的敏感性最低。而在金霉素的急性毒性试验中,3 种生物对金霉素的敏感性顺序与四环素的相同,也为鲫鱼>斑马鱼>大型蚤。如图 2 所示。3 种水生生物对于四环素和金霉素敏感性的高低可能与生物体对抗生素的吸收密切相关。污染物通过鱼类皮肤被吸收是一重要途径,斑马鱼与鲫鱼相比,其体表面积/体积比值小,这使得其将水环境中的抗生素有效利用而进入体内的部分减少。大型蚤为甲壳类动物,由于其外壳阻挡了抗生素进入体内,使大部分四环素和金霉素附着在大型蚤外壳上,使得大型蚤对抗生素的有效吸收最小。因此,大型蚤对四环素和金霉素的敏感性均最低。

2.3 四环素和金霉素的安全性评价

目前,在国内关于化学品对生物毒性的安全性评价尚没有统一的标准。本文在四环素和金霉素对于大型蚤、斑马鱼和鲫鱼的水环境安全性评价研究中,采用国家环保局的新化学物质危害评估准则^[18]中的危害分级标准,确定四环素和金霉素对 3 种水生生物的危害等级(见表 3),并对四环素和金霉素在水体环境中的安全浓度进行预测。

通过四环素和金霉素对大型蚤、斑马鱼和鲫鱼的急性毒性试验,可以看出四环素对 3 种生物均属于低

表 3 化学物质对水生生物的毒性等级评价标准

Table 3 Criteria for evaluating and grading toxicity of chemicals to aquatic organisms

毒性等级	LC ₅₀ 或 EC ₅₀ /mg·L ⁻¹
极毒	<1.0
高毒	1.0~10.0
中毒	10.0~100.0
低毒	100.0~1 000.0
微毒或无毒	>1 000.0

表 4 四环素和金霉素对大型溞、斑马鱼和鲫鱼的安全性评价

Table 4 Risk assessment for the tested chemicals to *D. magna*, *D. rerio* and *C. auratus*

抗生素	大型溞	斑马鱼	鲫 鱼
四环素	LT	LT	LT
金霉素	LT	MT	MT

注: MT: 中毒 Middle toxicity; LT: 低毒 Low toxicity。

毒性物质, 金霉素对大型溞属于低毒性物质, 但是对斑马鱼和鲫鱼则属于中毒性物质。在自然环境中, 溞和鱼组成了水环境中重要的食物链, 而污染物通过食物链在高营养级生物体内富集的浓度则可能比该试验所得出的结果高, 这对于处在食物链最高等级的人类将构成更大的健康威胁。因此, 要全面评价四环素和金霉素对于水生生态系的安全, 还必须结合低浓度慢性暴露条件下所产生的毒性效应以及抗生素对食物链中不同等级生物的生态毒性进行综合评价。

参考文献:

- [1] Boxall A B A, Fogg L A, Kay P, et al. Veterinary medicines in the environment[J]. *Reviews in Environmental Contamination and Toxicology*, 2004, 180: 1-92.
- [2] Michael Teuber. Veterinary use and antibiotic resistance[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2001, 4: 493-499.
- [3] Hartmann A, Alder A C, Koller T, et al. Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of human genotoxicity in native hospital wastewater[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1998, 17: 377-382.
- [4] Hirsch R, Ternes T, Haberer K, et al. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment [J]. *The Science of the Total Environment*, 1999, 225: 109-118.
- [5] Meyer M T, Bumgarner J E, Varns J L, et al. Use of radioimmunoassay as a screen for antibiotics in confined animal feeding operations and confirmation by liquid chromatography mass spectrometry[J]. *Science of the Total Environment*, 2000, 248: 181-187.
- [6] Frick E A, Henderson A K, Moll D M, et al. Presence of pharmaceuticals in wastewater effluent and drinking water, Metropolitan Atlanta, Georgia, July 2 September 1999. Proceedings of the 2001 Georgia Water Resources Conference, Athens, GA; Carl Vinson Institute of Government, The University of Georgia, 2001. 282-286.
- [7] Koplin D W. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U. S. streams, 1999-2000; A national reconnaissance [J]. *Environmental Science and Technology*, 2002, 36 (6): 1202-1211.
- [8] Benbrook C M. Antibiotic Drug Use in U. S. Aquaculture. Institute for Agriculture and Trade Policy Report, February 2002. www. iatp. Org/library/antibiotics.
- [9] Backhaus T, Grimme L H. The toxicity of antibiotic agents to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*[J]. *Chemosphere*, 1999, 38: 329-301.
- [10] Halling S B. Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming[J]. *Chemosphere*, 2000, 40: 731-739.
- [11] Wollenberger L, Halling-Sørensen B, Kusk K O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna* [J]. *Chemosphere*, 2000, 40 (7): 723-730.
- [12] Fromme H, Otto T, Pilz K. Polycyclic musk fragrances in different environmental compartments in Berlin (Germany)[J]. *Water Res*, 2001, 35(1): 121-128.
- [13] ISO International Organisation for Standardization, 1989b. Water Quality-Determination of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). ISO 6341. Geneva, Switzerland [S].
- [14] OECD TG211, OECD guideline for Testing of Chemicals; *Daphnia magna* Reproduction Test[S].
- [15] OECD TG203, OECD guideline for Testing of Chemicals; Fish, Acute Toxicity Test[S].
- [16] 张劲强, 梁 岩, 董元华, 等. 差向异构体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 tetracyclines and their epi-isomers on the luminescent bacterium[J]. *Journal of Toxicology*, 2006, 20(5): 279-281.
- [17] 仇文升. 药物化学应试指南[M]. (第二版). 北京: 北京大学医学出版社, 2002.
ZHANG Wen-sheng. Medicinal Chemistry exam-oriented guide[M]. Beijing: Peking University Medical Press, 2002.
- [18] 国家环保局编. 新化学物质危害评估准则[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1996.
State Environmental Protection Administration of China. The guidelines for the hazard evaluation of new chemical substances[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1996.

致谢: 感谢天津市城市生态环境修复与污染防治重点实验室基金资助。