

学校编码: 10384
学 号: 22320121151306

密 级_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

典型抗生素联合暴露对海水青鳉 (*Oryzias melastigma*) 胚胎的毒性及生物富集效应研究
Study on Embryotoxicity and Bioaccumulation of the Combined Exposure of Typical Antibiotics in *Oryzias Melastigma* Embryos

王 耿 丽

指导教师姓名: 王新红 教授
专业名称: 海洋化学
论文提交日期: 2015年 05月
论文答辩时间: 2015年 05月

2015年05月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(王新红)课题(组)的研究成果,获得(王新红)课题(组)经费或实验室的资助,在(王新红)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

2015年05月28日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

2015 年 05 月 28 日

目 录

摘 要	I
Abstract.....	III
第 1 章 绪 论	1
1.1 研究背景	1
1.1.1 抗生素概述.....	1
1.1.2 水环境中抗生素的污染现状	2
1.1.3 国内外抗生素的水生毒理学研究进展.....	5
1.1.4 国内外研究存在的主要问题	9
1.1.5 两种典型抗生素的理化性质及抑菌机制	9
1.2 研究目的、意义、内容及技术路线图.....	12
1.2.1 研究目的和意义	12
1.2.2 研究目内容.....	13
1.2.3 研究技术路线图	14
第 2 章 两种抗生素及其混合物在海水青鳉胚胎体内的生物富集....	15
2.1 材料与方法	15
2.1.1 试剂与仪器.....	15
2.1.2 海水青鳉的养殖及鱼卵的收集	16
2.1.3 实验设计	16
2.1.4 化学分析方法.....	17
2.1.5 海水青鳉胚胎对两种典型抗生素吸收速率的计算.....	20
2.2 结果.....	20
2.2.1 海水青鳉胚胎中 SMZ 富集浓度的变化规律	20
2.2.2 海水青鳉胚胎中 NOR 富集浓度的变化规律	24

2.2.3 暴露水样中两种抗生素的浓度变化.....	27
2.3 讨论.....	28
2.3.1 SMZ 在海水青鲮胚胎体内的生物富集	28
2.3.2 NOR 在海水青鲮胚胎体内的生物富集	28
2.4 本章小结	29
第 3 章 两种抗生素及其混合物对海水青鲮胚胎生理机能的影响	30
3.1 材料与方法	30
3.1.1 试剂与仪器.....	30
3.1.2 海水青鲮的养殖及鱼卵的收集	30
3.1.3 实验设计	31
3.1.4 生理机能观察方法	31
3.1.5 数据处理	32
3.2 结果.....	32
3.2.1 SMZ 作用下胚胎和幼鱼的畸形特征及死亡率	32
3.2.2 NOR 作用下胚胎和幼鱼的畸形特征及死亡率.....	35
3.2.3 SMZ 和 NOR 联合作用下胚胎和幼鱼的畸形特征及死亡率	36
3.2.4 SMZ 对海水青鲮胚胎心搏率的影响.....	39
3.2.5 NOR 对海水青鲮胚胎心搏率的影响	40
3.2.6 SMZ 和 NOR 联合暴露对海水青鲮胚胎心搏率的影响	41
3.3 讨论.....	42
3.3.1 两种抗生素及其混合物对海水青鲮早期的发育毒性	42
3.3.2 两种抗生素及其混合物对海水青鲮胚胎心搏率的影响	44
3.4 本章小结	45
第 4 章 两种抗生素及其混合物对海水青鲮胚胎抗氧化酶活性的影响	46
4.1 材料与方法	46

4.1.1 试剂与仪器.....	46
4.1.2 海水青鳉的养殖及鱼卵的收集	47
4.1.3 实验设计	47
4.1.4 样品的处理与测定	48
4.1.5 数据处理	50
4.2 结果.....	51
4.2.1 SMZ 对海水青鳉胚胎抗氧化酶活性的影响	51
4.2.2 NOR 对海水青鳉胚胎抗氧化酶活性的影响.....	53
4.2.3 SMZ 和 NOR 联合暴露对海水青鳉胚胎抗氧化酶活性的影响.....	55
4.3 讨论	56
4.3.1 SMZ 对海水青鳉胚胎的氧化胁迫效应	57
4.3.2 NOR 对海水青鳉胚胎的氧化胁迫效应	58
4.3.3 SMZ 和 NOR 的混合物对海水青鳉胚胎的氧化胁迫效应	59
4.4 本章小结	60
第 5 章 两种典型抗生素对海水青鳉胚胎致毒机制初探.....	61
5.1 SMZ 对海水青鳉胚胎致毒机制初探	61
5.2 NOR 对海水青鳉胚胎致毒机制初探.....	62
5.3 本章小结	64
第 6 章 结论与展望.....	65
6.1 结论.....	65
6.2 展望.....	66
参考文献.....	67
致谢.....	74

Content

Abstract in Chinese	I
Abstract.....	III
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Background	1
1.1.1 Overview of Antibiotics	1
1.1.2 the Status of Antibiotics Pollution in Water Environment.....	2
1.1.3 Toxicology Research Progress of Antibiotics	5
1.1.4 Problems in Present Study	9
1.1.5 the Physicochemical Properties and Antibacterial Mechanism of Two Kinds Typical Antibiotics	9
1.2 Research Purposes, Significance, Content and Routes	12
1.2.1 Research Purposes and Significance	12
1.2.2 Research Content	13
1.2.2 Research Routes	14
Chapter 2 Bioaccumulation on Marine Medaka Embryos Exposed to Two Antibiotics	15
2.1 Material and Methods.....	15
2.1.1 Instruments and Reagents.....	15
2.1.2 Medaka Culture and Embryos Collection	16
2.1.3 Experimental Design.....	16
2.1.4 Sample Preparation and Analysis	17
2.1.5 the Calculation of Marine Medaka Embryos on The Absorption Rate of Two Kinds of Typical Antibiotics	20

2.2 Results	20
2.2.1 Variation of SMZ Concentrations in Marine Medaka Embryos Exposed to SMZ	20
2.2.2 Variation of NOR Concentrations in Marine Medaka Embryos Exposed to NOR.....	24
2.2.3 the Concentration Changes of Two Kinds of Antibiotics in Water	27
2.3 Discussion.....	28
2.3.1 Bioaccumulation in Marine Medaka Embryos Exposed to SMZ	28
2.3.2 Bioaccumulation in Marine Medaka Embryos Exposed to NOR	28
2.4 Summary	29
Chapter 3 Physiological Impact on the Marine Medaka Embryos Exposed to Two Antibiotics	30
3.1 Material and Methods.....	30
3.1.1 Instruments and Reagents.....	30
3.1.2 Medaka Culture and Embryos Collection	30
3.1.3 Experimental Design.....	31
3.1.4 Methods of Morphology Observation.....	31
3.1.5 Statistical Analysis	32
3.2 Results	32
3.2.1 SMZ Exposure Induced Malformation and Mortality in Marine Medaka Embryos and Larvae	32
3.2.2 NOR Exposure Induced Malformation and Mortality in Marine Medaka Embryos and Larvae	35
3.2.3 the Mixture of SMZ and NOR Exposure Induced Malformation and Mortality in Marine Medaka Embryos and Larvae	36

3.2.4 Heart Beats of Marine Medaka Embryos Exposed to SMZ.....	39
3.2.5 Heart Beats of Marine Medaka Embryos Exposed to NOR.....	40
3.2.6 Heart Beats of Marine Medaka Embryos Exposed to the Mixture of SMZ and NOR.....	41
3.3 Discussion.....	42
3.3.1 Two Antibiotics Induced Developmental Toxicity in Marine Medaka Embryos	42
3.3.2 Heart Beats of Marine Medaka Embryos Exposed to Two Antibiotics	44
3.4 Summary	45
Chapter 4 Antioxidant Enzymes Impact on Marine Medaka Embryos Exposed to Two Antibiotics.....	46
4.1 Material and Methods.....	46
4.1.1 Instruments and Reagents.....	46
4.1.2 Medaka Culture and Embryos Collection	47
4.1.3 Experimental Design	47
4.1.4 Sample Treatment and Measurement	48
4.1.5 Statistical Analysis	50
4.2 Results	51
4.2.1 Effect on Antioxidant Enzymes Activity in Marine Medaka Embryos Exposed to SMZ	51
4.2.2 Effect on Antioxidant Enzymes Activity in Marine Medaka Embryos Exposed to NOR.....	53
4.2.3 Effect on Antioxidant Enzymes Activity in Marine Medaka Embryos Exposed to the Mixture of SMZ and NOR.....	55
4.3 Discussion	56

4.3.1 Oxidative Effect in Marine Medaka Embryos Exposed to SMZ	57
4.3.2 Oxidative Effect in Marine Medaka Embryos Exposed to NOR.....	58
4.3.3 Oxidative Effect in Marine Medaka Embryos Exposed to The Mixture of SMZ and NOR	59
4.4 Summary	60
Chapter 5 Preliminary Study on The Toxicology Mechanism of Two Kinds Typical Antibiotics in Marine Medaka Embryos.....	61
5.1 Toxicology Mechanism of SMZ in Marine Medaka Embryos.....	61
5.2 Toxicology Mechanism of NOR in Marine Medaka Embryos.....	62
5.3 Summary	64
Chapter 6 Conclusions and Perspectives.....	65
6.1 Conclusions	65
6.2 Perspectives.....	66
Reference	67
Acknowledgment.....	74

摘要

抗生素以其优良的抗菌作用，被人类广泛地使用，致使其以各种途径，大量地进入到自然环境中，尤其是水环境中。其中，磺胺类和氟喹诺酮类药物因其广谱的抗菌性而被大量使用，因此成为水环境中检出率最高、检出浓度最大的两类抗生素。目前，环境中抗生素的研究主要集中于痕量检测，对于水生生物毒性研究多针对于大型蚤、浮萍、月芽藻等低等水生生物，而对低剂量、长期暴露下抗生素对鱼类的生理毒性效应，及其在生物体内的富集研究相对较少，其在水环境中潜在的生态毒理效应尚未有明确的评价，有必要对相关的生态毒理数据进行完善，同时，研究手段上偏重生物学方法，与化学相结合来研究毒性作用机制非常欠缺。

本研究从磺胺类和氟喹诺酮两大类抗生素中各选取一种具有代表性的药物，即磺胺二甲基嘧啶 (Sulfamethazine, SMZ) 和诺氟沙星 (Norfloxacin, NOR) 作为研究对象，选取海水青鳉胚胎为受试生物，采用化学、生物化学、生态毒理学等理论与技术相结合的方法来探究不同暴露浓度下两种药物单独以及联合暴露下对海水青鳉 (*Oryzias melastigma*) 胚胎生理机能、抗氧化防御系统关键酶 (超氧化物歧化酶 SOD 和过氧化氢酶 CAT) 的影响，并测定海水青鳉胚胎体内 SMZ、NOR 含量的变化，揭示胚胎体内这两种污染物的生物积累动力学特征，为深入研究磺胺类和氟喹诺酮类药物的生态毒理效应及其生态风险评价提供理论依据。取得结果如下：

(1) SMZ 在海水青鳉胚胎体内的富集量随暴露浓度和暴露时间的增加而增加，在整个暴露周期内，没有出现富集平衡的现象，表明海水青鳉胚胎对 SMZ 有较强的富集能力。NOR 在海水青鳉胚胎体内的生物富集，与 SMZ 不同，0.001、0.1、1 mg/L 三个较低浓度组中，NOR 在海水青鳉胚胎中的富集量均随暴露浓度和暴露时间的增加而增加，10 mg/L 和 50 mg/L 浓度组中 NOR 的富集量均出现先升高后降低的现象，NOR 在海水青鳉胚胎体内的生物富集量约达 8 ng/embryo 时吸收速率出现负值，开始消除。前 4 天胚胎对 SMZ 和 NOR 的吸收速率最大，

且随暴露浓度的增大而增大。单独暴露实验与联合暴露实验中，SMZ 和 NOR 的富集程度和吸收速率在数值上虽然存在些许差异，但整体规律性较为相似。

(2) SMZ、NOR 单独及联合水相暴露海水青鳞胚胎，可引起孵化幼鱼的卵黄囊水肿畸形，随着暴露浓度的增加，这种畸形的畸形率增加，呈现一定的剂量-效应关系。幼鱼的这种卵黄囊水肿畸形，在幼鱼被放入无污染的海水中饲养后，是可以得到恢复的。在 SMZ 单独暴露时，胚胎还会出现凝血畸形，凝血畸形率同样随着暴露浓度的增加而上升，此外，凝血可能会导致胚胎血液循环障碍，成为胚胎死亡的主要原因。SMZ 和 NOR 对胚胎的心脏具有一定的毒性作用，单独及联合暴露均会引起海水青鳞胚胎心搏率的增加。生理毒性实验表明 SMZ 对海水青鳞胚胎的发育毒性大于 NOR，且二者联合暴露时毒性作用减弱。同时，抗生素本身的抗菌性在一定程度上可能会对胚胎的发育起到保护作用。

(3) SMZ 单独暴露海水青鳞胚胎时，胚胎的 SOD 活性基本呈现的是先诱导，后抑制的趋势，而 CAT 的活性基本随暴露浓度的增加呈诱导趋势，相比 SOD，CAT 对 SMZ 响应更加敏感。NOR 单独暴露海水青鳞胚胎时，胚胎的 SOD 活性基本随暴露浓度的增加呈诱导的趋势，CAT 活性只有在第 8 dpf 时，最高浓度组中被显著诱导，相比 CAT，SOD 对 NOR 响应更加敏感。两种抗生素联合暴露时 SOD 和 CAT 两种酶，响应均较敏感，且较为集中地出现在第 8 dpf 和 12 dpf 时。不论 SMZ、NOR 单独暴露，还是二者联合暴露均会对海水青鳞胚胎造成氧化胁迫，但联合暴露与单独暴露对海水青鳞胚胎造成的氧化胁迫的方式和途径存在一定差异。

关键词： 抗生素；海水青鳞胚胎；生物富集；氧化胁迫

Abstract

Antibiotics have been widely used by people with its excellent antibacterial effect, which result in a large number of antibiotics into the environment through a variety of ways, especially water environment. The sulfonamides and fluoroquinolones were widely used, and this has caused that they became one of the highest detection rate and quantity antibiotics. Currently, most reseach focus on trace detection for antibiotics in environment, and toxicity to aquatic aims at lower grade aquatic lives as *Daphnia magna*, *Lemnaceae*, *Pseudokirchneriella subcapitata* and so on. However, less results on chronic and physiological toxicity in low dose was reported, so does the bioconcentration in organisam. Meanwhile, most study in toxicity mechanism employ biological method, rather than combine with chemical approach. therefore, it is necessary to consummate the ecological toxicology data for the clear assessment of the eco-toxicology effect.

Sulfamethazine (SMZ) and Norfloxacin (NOR) are representative of the sulfonamides and fluoroquinolones. This study researched bioaccumulation of SMZ, NOR and their mixture in marine medaka (*Oryzias melastigma*) embryos, and assessed their potential developmental toxicity to embryos. The results would provide theoretical basis for further study of the ecotoxicological effects and ecological risk assessment of antibiotics. The results were obtained as following:

(1) Suffering from exposure to various concentrations of SMZ, bioaccumulation of SMZ in embryos was increased linearly with increasing SMZ exposure concentration and exposure duration. Bioaccumulation of NOR in embryos was increased linearly with increasing exposure duration when suffering from exposure to 0.001 mg/L, 0.1 mg/L, 1 mg/L concentrations of NOR. The NOR bioaccumulation rates of 0.1 mg/L and 1 mg/L concentrations were the same, and faster than 0.001 mg/L concentration. And the NOR bioaccumulation rate of 50 mg/L concentration was faster than 10 mg/L concentration. The bioaccumulation of NOR would decrease when the NOR concentration was about 8 ng/embryo in embryos. In the first four days, the

concentration of antibiotics increase with a fast initial uptake rate, and the uptake rate (K_u) increase with the increasing exposuer concentration. There was some little difference between SMZ or NOR separate exposure and their mixture exposure in the bioaccumulation degree and the bioaccumulation regularity, but with the similar tendency.

(2) Neither separate exposure nor mixture exposure have significant effects on *O. melastigma* embryo hatch-out time. Both separate exposure and mixture exposure caused malformation of the hatched larvae in a concentration-dependent, and the main hatched larvae' malformation was yolk sac edema. There was embryos' hemoglutination malformation in SMZ exposure experiment, and the region and manifestation of hemoglutination were irregular. The heart rate of medaka embryos was induced by exposure to SMZ, NOR and their mixture, which indicated that SMZ and NOR had a certain toxic effect on development of embryonic heart tissue.

(3) Suffering from exposure to SMZ could induce oxidative stress of embryos, the activity of SOD first was induced, and then inhibited, however the activity of CAT was always induced. CAT was more sensitive for SMZ than SOD. Suffering from exposure to NOR also could induce oxidative stress of embryos, the activity of SOD was always induced, however the activity of CAT was significantly induced only in the highest concentration group on the eighth day. SOD was more sensitive for NOR than CAT. SOD and CAT were more sensitive in the mixture exposure experiment. There were some differences in oxidative stress between separate exposure and mixture exposure.

Key Words: Antibiotics; Marine Medaka Embryos; Bioaccumulation; Oxidative Stress

第 1 章 绪 论

1.1 研究背景

1.1.1 抗生素概述

抗生素 (Antibiotics) 是包含微生物、植物和动物在内的生物, 在其生命活动过程中, 产生的或由其他方法获得的, 可在极低浓度下, 选择性地抑制或影响其它生物功能的有机物 (Boxall et al., 2003)。自青霉素 1940 年应用于临床以来, 抗生素开始被人类广泛使用。目前, 抗生素的种类已达千种, 仅临床常用就有数百种之多 (Batt et al., 2006)。根据抗生素的化学结构和作用主要分为: 氯霉素类、四环素类、喹诺酮类、磺胺类、大环内酯类、氨基糖苷类和 β -内酰胺类 (包含青霉素类和头孢菌素类) 等。不可否认, 抗生素在疾病的治疗中确实发挥了极其重要的作用。不同种类的抗生素, 因其化学结构的不同, 化学稳定性会存在差异。物质在环境中的持久性, 通常以其半衰期加以表征。由于抗生素种类繁多, 化学结构和性质各异, 所以不同的抗生素在环境中的半衰期存在较大差异, 如 β -内酰胺类抗生素, 其结构不稳定, 因此易于在环境中降解, 半衰期较短, 大多小于 1 天; 磺胺类和喹诺酮类抗生素结构较为稳定, 半衰期可达 1 个月至 300 天不等; 大环内酯类和四环素类抗生素化学结构极其稳定, 在环境中存留均可超过 1 年 (Hektoen et al., 1995; Schlusener and Bester, 2006)。

由于抗生素优良的抗菌作用, 使其在人类疾病治疗、水产养殖业、畜牧业、农业、个人护理等方面被大量使用, 其中, 人类医用药物中抗生素的使用量居第 3 位、占处方药总量的 6% 以上 (Schwabe, 2001), 在兽药用量中更是占到 70% 以上 (Halling et al., 1998)。在巨大经济利益的推动下, 加之细菌耐药性的产生, 双重因素促使抗生素的使用量迅猛增长。据 Thiele (2003) 统计, 1999 年欧盟使用了四环素 2575 t, 磺胺 78 t, β -内酰胺 351 t, 大环内酯 468 t, 氨基糖苷类 1564t。2000 年英国萘普生的用量超过 35t; 2001 年德国阿司匹林的用量超过 836 t; 对乙酰氨基酚用量超过 622 t; 布洛芬用量超过 345 t; 双氯芬酸用量超过 86 t; 抗癫痫药物卡巴咪嗪用量超过 88 t (Fent et al., 2006)。相比西方国家, 我国抗生

素的使用量有过之而无不及。2003 年,我国青霉素产量为 28000 t,占世界总产量的 60%;土霉素产量为 10000 t,占世界总产量的 65%;多西环素的产量也为世界第一 (Richardson et al., 2005)。2007 年,对国内 5 省、市进行的畜牧养殖业滥用抗生素的现场调查显示,饲养场滥用抗生素现象相当严重 (王云鹏和马越, 2008)。2010 年,北京大学临床药理研究所肖永红教授等专家调查推算,中国每年生产抗生素大约 210000 t,其中 97000 t 抗生素用于畜牧养殖业 (http://news.sina.com.cn/c/2010-11-28/080321546362_4.shtml)。2013 年,一项来自美国《国家科学院学报》的研究结果显示,中国是世界上最大的生产国与消费国,兽药抗生素的用量为美国的 4 倍。

1.1.2 水环境中抗生素的污染现状

由于抗生素大量地被滥用,加之对过期抗生素药品的不当处理,致使大量抗生素通过各种途径进入到自然环境中 (如图 1-1) (张丽娟, 2010; 周启星, 2007)。排放量来看,环境中抗生素的主要来源是医药和畜牧养殖业的使用和排泄,其次是生产工业的工业废水 (孙成和胡冠九, 2007)。

研究表明,人类和动物服用的抗生素有 95%会随着尿液和粪便以原药的形式排出体外,进入到废水中 (Calamari et al., 2003; Tong et al., 2014),大部分抗生素,在污水处理厂中,是不能完全被去除的,以至于它们被释放到自然水体中 (Halling et al., 1998; Heberer, 2002)。抗生素大多是水溶性的,而且较难降解,以至于它们可穿透各种自然的筛滤,进入到地下水中,最终,进入饮用水 (Grujic et al., 2009) (如图 1-2) (周启星, 2007)。由于抗生素固有的生物活性,使得它们即便在痕量的水平,依然能对环境和公共健康产生严重的危害。虽然,在环境中,抗生素不像典型持久有机污染物那样难降解,但由于被频繁大量地使用,导致其持续不断地向环境中输入,形成了“假持续”现象 (Vojinovic, 2011)。

目前,关于水环境中抗生素的存在状况,各国已展开了调查,在污水处理厂的入水和出水、养殖水体、医院污水、地表水、饮用水、地下水中均有抗生素被检测出来 (Chang et al., 2010; Chen and Zhou, 2014; Gbylik et al., 2014; Gibs et al., 2013; Li et al., 2012; Liang et al., 2013; Zhou et al., 2011),其中部分检出抗生素的质量浓度,如表 1-1 (刘建超等, 2012)。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.