

刘悦薇,陈雯莉,王莉. 抗生素和重金属镉单一和复合污染对集胞藻PCC6803的影响[J]. 华中农业大学学报, 2024, 43(4): 150-158.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.04.017

抗生素和重金属镉单一和复合污染 对集胞藻PCC6803的影响

刘悦薇, 陈雯莉, 王莉

华中农业大学农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室, 武汉 430070

摘要 为评估抗生素和重金属对藻类生态系统的影响,本研究探讨了四环素(tetracycline, TC)/磺胺甲噁唑(sulfamethoxazole, SMX)与 Cd^{2+} 的4个单一处理(100 ng/L TC; 100 ng/L SMX; 0.001 mg/L Cd^{2+} ; 0.5 mg/L Cd^{2+})以及4个复合处理(100 ng/L TC+0.001 mg/L Cd^{2+} ; 100 ng/L TC+0.5 mg/L Cd^{2+} ; 100 ng/L SMX+0.001 mg/L Cd^{2+} ; 100 ng/L SMX+0.5 mg/L Cd^{2+})对集胞藻的生长、光合活性以及抗氧化系统的影响。结果显示, 100 ng/L SMX刺激集胞藻的生长和光合活性, 而用100 ng/L TC处理则无明显影响; 0.001 mg/L Cd^{2+} 对集胞藻的各项指标均无明显影响, 但0.5 mg/L Cd^{2+} 明显抑制集胞藻的生长和光合作用, 破坏抗氧化系统, 损伤细胞膜, 刺激集胞藻分泌胞外多糖。抗生素与镉复合污染处理方面, 100 ng/L TC与0.001 mg/L Cd^{2+} 共存时, 增强集胞藻酯酶活性、刺激分泌胞外多糖; 100 ng/L SMX与0.001 mg/L Cd^{2+} 共存时, 促进集胞藻生长、增强光合作用和酯酶活性; 100 ng/L SMX与0.5 mg/L Cd^{2+} 共存时, SMX能缓解高浓度 Cd^{2+} 造成的氧化损伤, 较单一高浓度 Cd^{2+} 处理组的ROS产量减少、SOD酶活降低、MDA含量降低、协同刺激集胞藻酯酶活性; 而100 ng/L TC不能显著缓解高浓度 Cd^{2+} 对细胞的损伤。研究表明, 低浓度四环素对细胞生长影响较小, 也基本不改变 Cd^{2+} 对集胞藻细胞的毒性, 而低浓度磺胺甲噁唑会促进细胞生长, 且能够减轻 Cd^{2+} 对集胞藻细胞的毒性, 在污染评估时需综合考虑抗生素和重金属的复合污染。

关键词 集胞藻; 四环素; 磺胺甲噁唑; 镉离子; ROS; 蓝藻; 抗生素

中图分类号 Q945.78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)04-0150-09

蓝藻(Cyanobacteria)也称蓝细菌,是光合产氧细菌,生态位广泛,特别是在维持水环境的生态平衡中发挥着重要作用。由于蓝藻生长易受环境污染影响,因此常被用作水体污染指示生物。抗生素和重金属是环境中持久存在的常见污染物,易通过土壤渗滤、地表径流、大气沉降、雨水冲刷等方式进入水环境,进而对水生生态系统造成危害。

抗生素是一类具有抗细菌、真菌活性的合成或半合成物质,被广泛的应用于医药业、畜牧业、水产养殖业,使用量最多的2类抗生素分别是磺胺类和四环素类^[1]。目前已在地表水、地下水、饮用水中广泛检出多种抗生素,如磺胺类、四环素类、大环内酯类、喹诺酮类、三甲咪啉类等^[2-3],其中,我国江河湖泊中磺胺甲噁唑(sulfamethoxazole, SMX)的检出质量浓度是3~193 ng/L,地表水中四环素(tetracycline,

TC)的检出质量浓度是22.98~258.45 ng/L^[4]。Cd是一种生物体非必需的元素,被广泛应用于制造业、采矿业及农业^[5-6]。尽管我国地表水国家质量标准(GB 3838—2002地表水环境质量标准)规定V类地表水中镉含量不应高于10 μ g/L,农渔用水镉含量不超过5 μ g/L,但实际水体中镉含量通常远高于国标,甚至超过我国I类综合废水镉最高排放量(0.1 mg/L)^[7]。来源于医药业和农渔业污水中的抗生素易与工农业和制造业废水中的重金属发生络合作用,从而改变母体抗生素/重金属的环境行为和毒性效应^[8],使生态风险的评估工作更加困难。

目前,关于单一/多种抗生素和单一/多种重金属对藻类的毒性研究已有许多,抗生素和重金属的存在均会不同程度地影响藻体的生物功能,如破坏抗氧化系统^[9]、损伤光合装置^[10]、改变细胞形态及超

收稿日期:2024-05-30

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFE0105600)

刘悦薇, E-mail: 1021927562@qq.com

通信作者:王莉, E-mail: wangli@mail.hzau.edu.cn

微结构^[11]、影响基因表达^[12]等。自然环境往往存在更多、更复杂的污染物,故学者们开始将研究重点转向抗生素和重金属复合污染对生物体的影响,主要研究对象集中于土壤细菌^[13]、猪废水分离菌^[14]及高等植物。然而,用藻类作为材料开展的相关研究较少,且相关试验中所用污染物的浓度远远高于其在环境中的浓度。因此,本研究采用我国最常用的2类抗生素代表(磺胺甲噁唑和四环素)及重金属(镉),以环境相关浓度对集胞藻进行单一和复合处理,从生理、生化和基因表达层面揭示上述污染对其抗氧化系统、光合系统及其他防御系统的生物毒性,以期为制订环境评估标准提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验选取集胞藻 PCC6803 (*Synechocystis* sp. PCC6803, 后文中统一简称为集胞藻) 作为研究对象,该菌株由笔者所在实验室保存。污染物处理前,预培养藻体约2周,具体步骤为:将藻液接种至装有100 mL 无菌 BG₁₁ 的容积为250 mL 的锥形瓶,使初始接种量为 $D_{730\text{ nm}}=0.1$,将锥形瓶置于光照摇床(30 °C, 150 r/min, 50~100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$) 培养4 d,待藻液长至 $D_{730\text{ nm}}$ 约为0.5时转接到新鲜的无菌 BG₁₁ 培养基中,重复上述步骤3~4次。预培养结束后进行污染物处理试验,具体步骤为:将经过预培养的藻液培养至 $D_{730\text{ nm}}=0.5$ 后转接至装有30 mL 无菌 BG₁₁ 的50 mL 锥形瓶中,使藻体初始接种量为 $D_{730\text{ nm}}=0.05$,根据试验设计向各锥形瓶中加入污染物后于光照摇床中暴露培养96 h,培养条件为30 °C, 150 r/min, 50~100 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。

1.2 暴露试验污染物质量浓度设置

根据自然水体、制药厂及医疗机构、工厂附近等高污染风险的水体中四环素(tetracycline, TC)、磺胺甲噁唑(sulfamethoxazole, SMX)及镉离子(Cd^{2+})含量的污染状况,本试验污染物暴露质量浓度设置如表1,每个质量浓度设置3组平行试验组。

1) 生长试验。将集胞藻接种至 $D_{730\text{ nm}}=0.05$ 后培养,在接种后0、24、48、72、96 h 取样,用可见分光光度计测定波长为730 nm 处的吸光度值($D_{730\text{ nm}}$),以此作为集胞藻生长曲线指标。

2) 光合作用系统。①光合色素测定^[15]。取接种后96 h 的集胞藻藻液2 mL,离心(12 000 r/min, 5 min),弃上清。再向管中加入2 mL N,N-二甲基甲

表1 暴露试验质量浓度设置
Table 1 Concentration settings for the exposure experiments

污染物种类 Pollutant type		质量浓度设置 Concentration setting
对照组 Control group	CK	0
单一处理 Single contamination	TC	100 ng/L TC
	SMX	100 ng/L SMX
	Cd1	0.001 mg/L Cd^{2+}
	Cd2	0.5 mg/L Cd^{2+}
复合处理 Compound contamination	TC+Cd1	100 ng/L TC+0.001 mg/L Cd^{2+}
	TC+Cd2	100 ng/L TC+ 0.5 mg/L Cd^{2+}
	SMX+Cd1	100 ng/L SMX+0.001 mg/L Cd^{2+}
	SMX+Cd2	100 ng/L SMX+0.5 mg/L Cd^{2+}

酰胺(DMF)重悬沉淀,均匀混合后静置10 min,再次离心(12 000 r/min, 2 min),取上清待测。用分光光度计于波长为663、645、450 nm 处测吸光值,空白对照为DMF。叶绿素a(Chla)含量、类胡萝卜素(carotenoids)含量计算公式分别如下:

$$C_{\text{chla}} = 12.7 \times D_{663\text{ nm}} - 2.35 \times D_{645\text{ nm}} \quad (1)$$

$$C_{\text{carotenoids}} = 4.1 \times D_{450\text{ nm}} - 0.553 - D_{663\text{ nm}} + 0.118 \times D_{645\text{ nm}} \quad (2)$$

②光合活性测定^[16]。本研究使用便携式调制叶绿素荧光分析仪(PAM-2500)测定集胞藻的叶绿素荧光参数 F_v/F_m (光系统II反应中心的最大光合效率)。取接种96 h 的藻液2 mL,暗适应10~15 min 后,测得 F_v/F_m 。

3) 抗氧化系统。本研究中ROS测定试验使用活性氧检测试剂盒(北京碧云天生物科技公司)。SOD酶活性测定使用总SOD活性检测试剂盒(北京碧云天生物科技公司)。细胞膜脂过氧化分析使用MDA含量试剂盒(北京碧云天生物科技公司)。

4) 其他防御系统。①酯酶活性。本试验采用荧光素二乙酸酯给细胞染色的方法进行酯酶活性的测定,数据由流式细胞仪配套软件产出。FDA储备液使用丙酮作为溶剂,浓度为1 mmol/L,避光储存于-20 °C 冰箱中。取接种96 h 的藻液2 mL,经48 μm 滤膜过滤,加入FDA,使终浓度为25 $\mu\text{mol}/\text{L}$,置于37 °C 恒温培养箱,避光温育10 min, FDA 荧光由FITC 通道收集。本试验先根据细胞酯酶活性是否被抑制将细胞划分为FDA-和FDA+2种细胞状态,前者用100 °C 水浴处理后用FDA 染色,后者直接用FDA 染色不做任何处理;统计后者和所有浓度试验

组中FDA+细胞的平均荧光强度值,结果以试验组荧光强度与对照组荧光强度的百分比表示。

②细胞膜完整性。细胞膜完整性使用碘化丙啶(propidium iodide, PI)进行细胞染色,用流式细胞仪及其配套软件分析数据。PI储备液使用DMSO作为溶剂,储备液浓度为1 mmol/L,避光储存于4℃冰箱中。取1 mL接种96 h的集胞藻,经48 μm滤网过滤后,向藻液加入PI,使终浓度为10 μmol/L,于25℃避光温育10 min,PI荧光由PE通道收集。荧光结果分析与酯酶活性结果分析方法相同。

③EPS含量。EPS中多糖含量测定使用苯酚-硫酸法^[17]。取接种96 h的集胞藻2 mL,离心(2 500 r/min, 15 min, 4℃),收集上清;用0.05% NaCl溶液重悬剩余藻体,离心(5 000 r/min, 15 min, 4℃)收集上清;再次用0.05% NaCl溶液重悬剩余藻体并加热(60℃, 30 min),离心(15 000 r/min, 20 min, 4℃),收集上清,将混合液摇匀待测。测定EPS含量前,用烘干的无水葡萄糖制作标准溶液,并以x轴为葡萄糖溶液的质量浓度(mg/L),y轴为 $D_{490\text{nm}}$ 值,绘制葡萄糖标准曲线。用分光光度计测定样品的 $D_{490\text{nm}}$ 值,代入葡萄糖标准曲线换算出EPS的多糖含量。

1.3 功能基因表达

从接种96 h的集胞藻样品中提取RNA。使用HiScript II Q RT SuperMix for qPCR(+gDNA wiper)(Vazyme, China)试剂盒消解样品中的残余DNA以获得cDNA。qPCR的引物参考Hu等^[18]报道的方法。在qPCR中,使用*mpB*作为内参基因。

1.4 数据分析

本研究使用R语言的rstatix包进行单因素方差分析,使用agricolae包进行组间多重比较分析,使用R语言的ggplot2包绘图。

2 结果与分析

2.1 抗生素、Cd²⁺单一及复合污染对集胞藻生长的影响

图1是常见污染质量浓度(100 ng/L)的单一抗生素和不同浓度梯度的单一Cd²⁺对集胞藻生长的影响。由图1A可知,TC处理组的 $D_{730\text{nm}}$ 值与对照组无显著差异,而SMX处理组显著高于对照组($P<0.05$)。结果表明,100 ng/L TC处理对集胞藻的生长无明显影响,而SMX刺激其生长。低质量浓度(0.001、0.01、0.1 mg/L) Cd²⁺与对照组无显著差异,而较高质量浓度(>0.1 mg/L) Cd²⁺对集胞藻的生长

起抑制作用。随着Cd²⁺质量浓度的升高,集胞藻的生长抑制增强,当Cd²⁺质量浓度达到1 mg/L时,集胞藻的生长几乎完全被抑制(图1B)。Cd²⁺对集胞藻的96 h-EC₅₀为0.53 mg/L。为了探究抗生素和镉复合污染对集胞藻的影响,选取2个具有代表性的Cd²⁺浓度,即环境安全质量浓度(0.001 mg/L)和近半效应质量浓度(0.5 mg/L)进行试验,并分别命名为Cd1和Cd2。探究抗生素与Cd²⁺复合污染对集胞藻生长的影响(图1C、图1D)。结果显示,TC+Cd1组与对照组和Cd1组均无显著差异,而SMX+Cd1组显著高于对照组和Cd1组($P<0.05$),说明TC与Cd1共存对藻的生长无明显影响,而SMX与Cd1共存时对集胞藻的生长起促进作用,该促进作用应该是由SMX所引起。TC+Cd2与Cd2组无显著差异,SMX+Cd2组显著高于Cd2组($P<0.05$),说明SMX拮抗Cd2对集胞藻生长的抑制作用,而TC对Cd2抑制集胞藻生长的作用无明显影响。

2.2 抗生素、Cd²⁺单一及复合污染对集胞藻光合作用的影响

叶绿素荧光参数 F_v/F_m 可以反映藻类PS II的最大光化学效率,也能指示光合装置的光化学活性。光合色素是藻类进行光合作用的重要物质,当遭受胁迫时其含量会发生变化,能间接指示藻类的生长状态,因而常被作为评价污染物对藻类毒性的生化指标。为探究抗生素和Cd²⁺的单一及复合污染对集胞藻的光合作用的影响,测定了处理条件下暴露96 h集胞藻的叶绿素荧光参数 F_v/F_m (图2A),Cd1组与对照组的叶绿素荧光参数无显著差异,而TC、SMX组 F_v/F_m 值显著($P<0.05$)高于对照组,并分别较对照组升高14.26%、17.56%,说明环境安全浓度下的镉对集胞藻光系统II的活性没有显著影响,但环境污染浓度下,TC、SMX对集胞藻光系统II的活性起刺激作用。而复合处理时,SMX+Cd1组的 F_v/F_m 值较对照组升高了22.75%,显著($P<0.05$)高于Cd1组,但与SMX组没有显著差异,这说明SMX与Cd1共存时刺激集胞藻的光系统II,且SMX发挥了主要作用。Cd2组的 F_v/F_m 值比对照组降低了65.75%($P<0.01$),这说明高浓度的Cd²⁺导致光系统II被损坏,光合活性被严重抑制。TC+Cd2组的 F_v/F_m 值与Cd2组无显著差异,而SMX+Cd2组与Cd2组存在显著差异($P<0.05$),这说明TC的存在对高浓度Cd²⁺造成的光系统II的损伤无明显影响,而SMX能

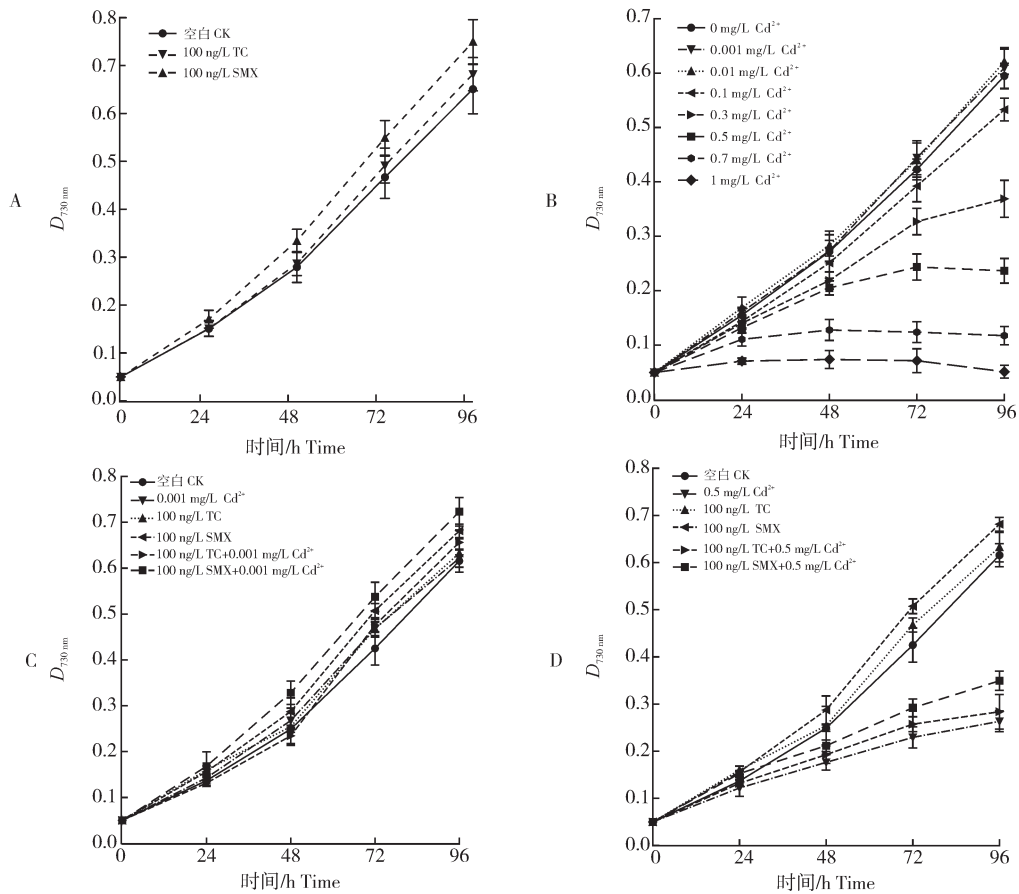


图 1 抗生素、Cd²⁺单一及复合污染对集胞藻生长的影响

Fig.1 Effects of single and combined contamination of antibiotics and Cd²⁺ on the growth of *Synechocystis* sp. PCC6803

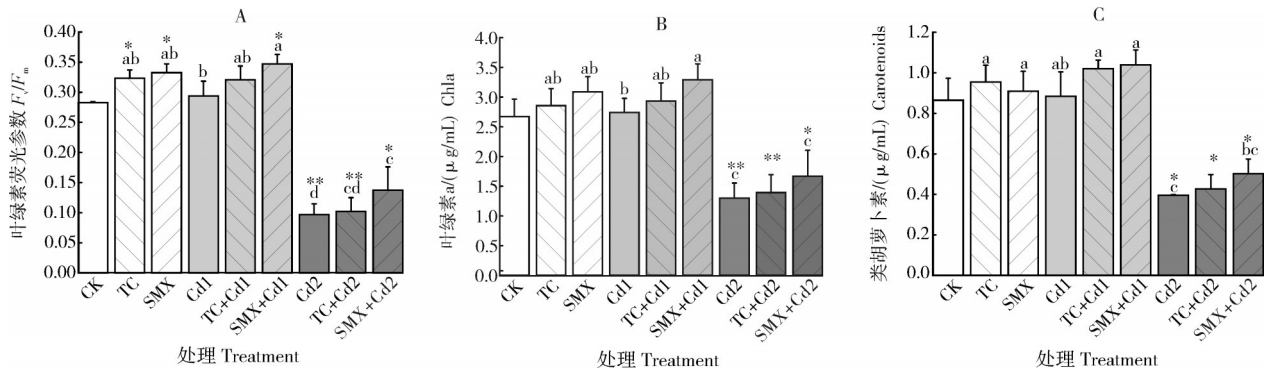
显著缓解该损伤。

同时还考察了上述污染对集胞藻中叶绿素a(图2B)和类胡萝卜素(图2C)含量的影响。单一抗生素和Cd1组无论在单独存在还是共存时,光合色素含量与对照组均无显著差异,但SMX+Cd1组叶绿素a的含量显著($P<0.05$)高于Cd1组,说明上述处理对藻叶绿素a合成虽均无明显影响,但SMX与Cd1共存时,SMX对叶绿素a合成起促进作用。Cd2组的叶绿素a和类胡萝卜素含量分别显著低于对照组51.4%和54.27%,说明高浓度Cd²⁺可能通过抑制合成叶绿素a和类胡萝卜素来减弱光合作用。TC+ Cd2组、SMX+ Cd2组的叶绿素a含量和类胡萝卜素含量与Cd2组无显著差异,说明TC、SMX均未显著影响Cd2对叶绿素a和类胡萝卜素合成的抑制。

2.3 抗生素和 Cd²⁺单一及复合污染对集胞藻抗氧化系统的影响

ROS是细胞正常代谢的产物,健康细胞ROS的产生与清除保持动态平衡,当细胞受到高盐、干旱等

非生物胁迫时,ROS在胞内被大量积累会导致细胞膜上不饱和脂肪酸过氧化,脂肪酸降解后产生MDA,其含量可反映藻类膜系统脂质过氧化的程度。超氧化物歧化酶(SOD)是抗氧化系统的核心成员之一,通常最先参与清除ROS,主要用于催化超氧阴离子歧化为H₂O₂和O₂,从而达到为细胞解毒的作用。由图3可知,TC、SMX、TC+ Cd1、SMX+ Cd1组的ROS相对含量、MDA相对含量、SOD相对酶活性均与对照组无显著差异,说明上述处理对集胞藻的抗氧化系统无明显影响。Cd2组的ROS相对含量、MDA相对含量、SOD相对酶活性均极显著高于对照组($P<0.01$),分别较对照组升高113.02%、61.53%、100.57%,这表明高浓度Cd²⁺造成集胞藻抗氧化系统的损伤,ROS不能被及时清理而大量积累于细胞内,细胞膜上的不饱和脂肪酸被大量过氧化,细胞为了更好的生存,增强SOD酶活以清除ROS。TC+ Cd2组、SMX+ Cd2组的ROS相对含量显著低于Cd2组($P<0.05$),表明TC和SMX的存在可以减



*($P < 0.05$), **($P < 0.01$)表示处理组与对照组之间的显著性差异,不同字母表示处理组之间存在显著性差异($P < 0.05$),下同。*($P < 0.05$), **($P < 0.01$) indicate the significant difference between the treatment group and the control group. Different letters indicatesignificant differences between the treatment groups ($P < 0.05$). The same as below.

图2 抗生素、 Cd^{2+} 单一及复合污染对集胞藻光合作用的影响

Fig.2 Effects of single and compound contamination of antibiotics and Cd^{2+} on the photosynthesis of *Synechocystis sp. PCC6803*

少Cd引起的ROS含量升高。Cd2组胞内的MDA、SOD相对含量极显著($P < 0.01$)高于对照组,SMX+Cd2组SOD、MDA相对含量显著($P < 0.05$)低于Cd2组,TC+Cd2组与Cd2组SOD、MDA相对含量无显

著性差异。结果表明,SMX能缓解高浓度 Cd^{2+} 造成的氧化损伤,这使得细胞产生的ROS减少,SOD酶的活性相应降低,膜脂过氧化程度减弱;而TC无明显缓解作用。

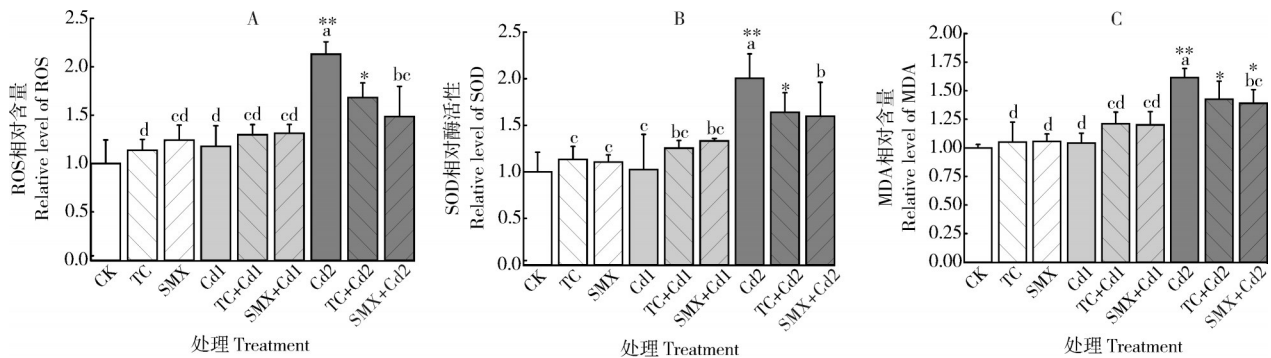


图3 抗生素和 Cd^{2+} 对集胞藻抗氧化系统的影响

Fig.3 Effects of single and compound contamination of antibiotics and Cd^{2+} on the antioxidant system of *Synechocystis sp. PCC6803*

2.4 抗生素和 Cd^{2+} 单一及复合污染对集胞藻其他防御系统的影响

酯酶属于溶酶体酶类的水解酶,能够降解和清除入侵毒物,其活性的高低可以反映细胞新陈代谢和抵御毒物的能力。本研究使用FDA染色法测定其含量,FDA作为荧光探针被非特异性酯酶水解,产生荧光素,通过荧光强度可以定量分析细胞的酯酶活性。TC、SMX、Cd1组的FDA相对平均荧光强度与对照组无显著差异,而TC+Cd1组、SMX+Cd1组分别显著($P < 0.05$)高于对照组91.13%、212.61% (图4A)。这表明低浓度的抗生素、 Cd^{2+} 单独存在对集胞藻的酯酶活性无明显影响,而两者复合污染时发挥协同作用,增强了集胞藻的酯酶活性。Cd2组的

FDA相对平均荧光强度极显著($P < 0.01$)高于对照组564.95%,表明Cd2触发了集胞藻的自我修复机制,酯酶为清除异物提高自身活性,细胞代谢活动增强。此外,Cd2组的生长情况弱于对照组,而酯酶活性高于对照组,这暗示着藻类在此种生存环境下,能量转移重心可能从生长转移至代谢。TC+Cd2组FDA相对平均荧光强度显著低于Cd2组($P < 0.05$),而SMX+Cd2组FDA相对平均荧光强度显著($P < 0.05$)高于Cd2组,表明TC减弱了高浓度 Cd^{2+} 对集胞藻酯酶活性的影响,而SMX的存在对集胞藻酯酶活性的增强起协同作用。

细胞膜是除细胞壁外用于隔绝外源物入侵细胞的重要屏障,是藻细胞能够正常进行生理代谢的必

要保证,因此研究其完整性能间接判断藻细胞的生理状态。PI是一种核酸染料,当细胞膜完整时,PI不能穿过膜与核酸结合,但当细胞膜受损时,PI能通过膜受损区域进入细胞,并与核酸结合后发出荧光,因此其荧光强弱可以指示细胞膜受损的严重程度。TC、SMX、Cd1、TC+Cd1、SMX+Cd1组的PI相对平均荧光强度均与对照组无显著差异,这表明上述处理对集胞藻细胞膜的完整性无显著影响(图4B)。Cd2组PI的相对平均荧光强度较对照组显著($P<0.05$)升高了20.84%,表明集胞藻的细胞膜完整性受到高浓度 Cd^{2+} 的显著破坏。TC+Cd2组和SMX+Cd2组的PI相对平均荧光强度分别较对照组显著($P<0.05$)升高了21.32%和17.58%,但与Cd2组无显著差异,表明TC、SMX均不能影响Cd2对细胞膜完整性造成的破坏。

胞外聚合物(extracellular polymeric substances, EPS)是由细胞产生的混合次级代谢物,主要由多糖、

蛋白质、核酸和脂质组成^[19],当细胞处于胁迫环境时,会通过增加分泌胞外聚合物来抵御毒物入侵。本研究针对大多物种胞外聚合物中的主要成分—胞外多糖(exopolysaccharide, PS),来探索集胞藻的毒物抵御能力(图4C)。结果显示,TC、SMX、Cd1组均与对照组无显著差异,TC+Cd1组显著($P<0.05$)高于对照组18.31%。这表明TC、SMX、Cd1单独存在时,对集胞藻胞外多糖的分泌无明显影响,而TC与Cd1共存时会协同刺激集胞藻分泌胞外多糖。Cd2组的胞外多糖极显著($P<0.01$)高于对照组46.61%,TC+Cd2组与Cd2组无显著差异,SMX+Cd2组显著($P<0.05$)低于Cd2组。这表明Cd2对集胞藻的生存造成了胁迫,集胞藻通过分泌大量胞外聚合物以抵御高浓度 Cd^{2+} 的入侵;TC对Cd2诱发胞外多糖的分泌无明显影响,但SMX能减弱Cd2对集胞藻的毒性作用而使胞外多糖的分泌相应减少。

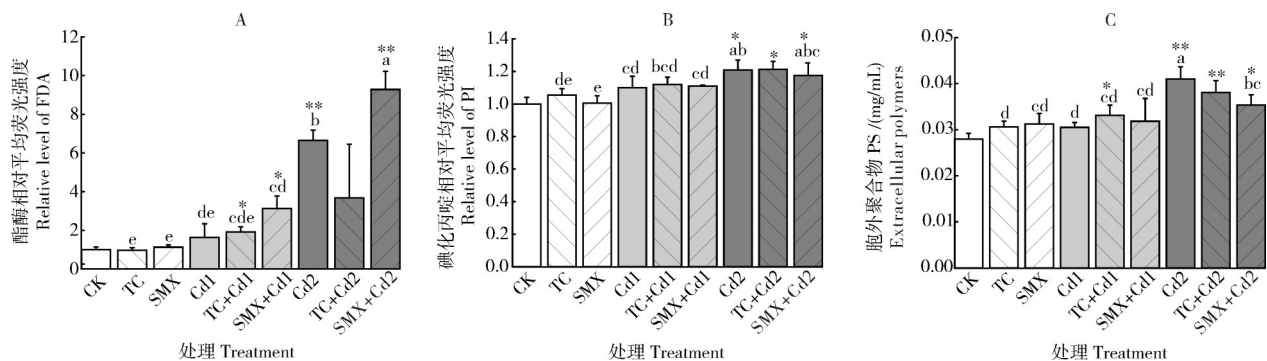


图4 抗生素、 Cd^{2+} 单一及复合污染对集胞藻其他防御系统的影响

Fig.4 Effects of antibiotics, Cd^{2+} single and compound contamination on other defense of system *Synechocystis* sp. PCC6803

2.5 抗生素和 Cd^{2+} 单一及复合污染对集胞藻功能基因表达的影响

本研究进一步探索了上述污染物对集胞藻功能基因表达的影响(图5)。*psbA2*是光合作用相关基因,编码光系统II反应中心的D1蛋白。TC、SMX、Cd1、TC+Cd1、SMX+Cd1组中,集胞藻*psbA2*的表达量与对照组无显著差异,而Cd2组、TC+Cd2组、SMX+Cd2组均显著($P<0.05$)低于对照组,且TC+Cd2组、SMX+Cd2组均与Cd2组无显著差异,说明高浓度 Cd^{2+} 抑制了*psbA2*的表达,这与前述高浓度 Cd^{2+} 降低了集胞藻光系统II活性结果一致。*sodB*、*katG*分别编码超氧化物歧化酶和过氧化物酶-过氧化氢酶。TC、SMX、Cd1、TC+Cd1、SMX+Cd1组的*sodB*和*katG*的相对表达量与对照组的无显著差异,而Cd2组、TC+Cd2组、SMX+Cd2组的

*sodB*相对表达量被显著上调,TC+Cd2组与Cd2组无显著差异,SMX+Cd2组显著低于Cd2组;Cd2组、TC+Cd2组、SMX+Cd2组的*katG*相对表达量均被显著下调,TC+Cd2组、SMX+Cd2组与Cd2组的*katG*相对表达量无显著差异,说明高浓度 Cd^{2+} 会使集胞藻抗氧化系统受损,SMX有一定的缓解作用,而TC无明显的缓解作用。这与ROS含量增加、SOD酶活增加、MDA含量增加现象一致。

*rfbF*编码葡萄糖-1-磷酸转移酶,参与多糖代谢,TC组、SMX组、Cd1组、TC+Cd1组、SMX+Cd1组的相对表达量与对照组的无显著差异,而Cd2组、TC+Cd2组、SMX+Cd2组的相对表达量均显著上调,且TC+Cd2、SMX+Cd2组与Cd2组间无显著差异,说明集胞藻受到高浓度 Cd^{2+} 胁迫后增加多糖代谢,TC和SMX均不能显著缓解。

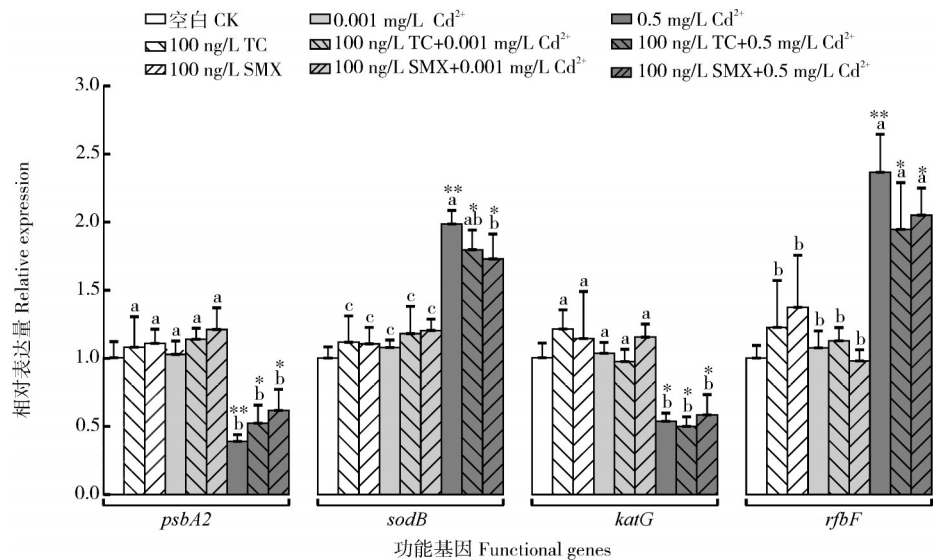


图5 抗生素、 Cd^{2+} 单一及复合污染对集胞藻功能基因表达的影响

Fig.5 Effects of antibiotics, Cd^{2+} single and compound contamination on the expression of functional gene of *Synechocystis* sp. PCC6803

3 讨论

目前国内外关于抗生素与重金属联合处理对藻类的研究较少,大多数是高浓度胁迫的报道,关于抗生素或重金属对藻类的影响的研究都不够系统,有的只着重探索了胁迫对光合作用的影响^[10],有的只探索了藻类的抗氧化系统的响应^[9],且均只针对藻类整体,对细胞水平的研究较少。本研究用四环素/磺胺甲噁唑、 Cd^{2+} 对集胞藻进行了单一及复合处理,从生理、生化、基因表达层面,揭示了上述污染物对藻类光合系统、抗氧化系统及其他防御系统造成的影响。100 ng/L SMX 促进集胞藻生长、增强光系统 II (PS II) 光合活性,100 ng/L TC 和低质量浓度 0.001 mg/L Cd^{2+} 对集胞藻无显著影响。0.5 mg/L Cd^{2+} 显著抑制集胞藻的生长,破坏其光合系统及抗氧化系统,刺激胞外多糖的分泌。100 ng/L TC 与 0.001 mg/L Cd^{2+} 共存时,对增强酯酶活性、刺激分泌胞外多糖起协同作用;100 ng/L SMX 与 0.001 mg/L Cd^{2+} 共存时,对增强酯酶活性起协同作用,与 0.5 mg/L Cd^{2+} 共存时,100 ng/L SMX 能缓解高浓度 Cd^{2+} 对集胞藻细胞的生长及 PS II 活性的抑制,降低氧化损伤程度,而 TC 不能显著缓解高浓度 Cd^{2+} 对集胞藻细胞的损伤。这些结果提示我们,在评估污染物对生物体的毒性时,还应考虑环境中是否存在其他物质与待评估的污染物存在拮抗或者协同作用,以免对污染物的污染情况及生态风险造成错误评估。

本研究发现环境常见污染浓度的 SMX 能够促进集胞藻的生长,这可能是其引发了集胞藻的毒性兴奋效应。SMX 是四氢叶酸合成酶抑制剂,抑制合成叶酸前体,而叶酸和生长密切相关^[20]。低剂量的 SMX 引发集胞藻的过度补偿,因此体现出过度刺激,激活四氢叶酸合成酶,进而引发叶酸含量增加,最终被促进生长,未来可以去探索 SMX/TC 与 Cd^{2+} 的络合试验,以更好揭示致毒机制。目前,虽已有研究报道了单一抗生素/重金属与藻类胞外聚合物(EPS)发生作用的结合位点^[19],但没有对抗生素和重金属共存与藻 EPS 的作用机制展开研究。抗生素与重金属共存环境下容易形成抗生素-重金属络合物(antibiotic-metal complexes, AMC)^[8],AMC 的理化性质不同于母体抗生素及重金属,因此,可以先用分子对接技术预测其与 EPS 的结合位点,再通过相关试验验证抗生素、重金属复合污染下,细胞的 EPS 组成及 AMC 与 EPS 的相互作用位点。此外,藻类常作为去除水中污染物的生物载体,接下来可以从藻类净化污染物的角度出发,探究抗生素在藻类中的降解途径及降解产物、重金属在藻类中的吸附及转化途径等,以便更好地开发污染治理的方法。

参考文献 References

- [1] 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 D M, WANG Y H, RAO G W. Cellular response of freshwater

- green algae to the toxicity of tetracycline antibiotics[J]. Environmental science, 2013, 34(9): 3386-3390 (in Chinese with English abstract).
- [2] 杨礼震, 刘天琪, 王禄禄, 等. 养猪废水处理工艺对耐药基因迁移影响研究进展[J]. 华中农业大学学报, 2022, 41(4): 1-9. YANG L Z, LIU T Q, WANG L L, et al. Research progress on transfer effect of antibiotic resistance gene in swine wastewater treatment process[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2022, 41(4): 1-9 (in Chinese with English abstract).
- [3] YANG W W, TANG Z P, ZHOU F Q, et al. Toxicity studies of tetracycline on *Microcystis aeruginosa* and *Selenastrum capricornutum* [J]. Environmental toxicology and pharmacology, 2013, 35(2): 320-324.
- [4] CHENG D M, LIU X H, WANG L, et al. Seasonal variation and sediment - water exchange of antibiotics in a shallower large lake in North China[J]. Science of the total environment, 2014, 476: 266-275.
- [5] TÓTH T, ZSIROS O, KIS M, et al. Cadmium exerts its toxic effects on photosynthesis via a cascade mechanism in the cyanobacterium, *Synechocystis* PCC6803 [J]. Plant, cell & environment, 2012, 35(12): 2075-2086.
- [6] 刘国胜, 童潜明, 何长顺, 等. 土壤镉污染调查研究[J]. 四川环境, 2004, 23(5): 8-10. LIU G S, TONG Q M, HE C S, et al. Investigation and research of cadmium pollution in soils[J]. Sichuan environment, 2004, 23(5): 8-10 (in Chinese with English abstract).
- [7] 朱泊丞, 施泽明, 王新宇, 等. 安宁河水体中重金属空间分布特征及来源识别[J]. 四川冶金, 2018, 40(4): 24-31. ZHU B C, SHI Z M, WANG X Y, et al. Spatial distribution characteristics and source identification of heavy metals in Anning River [J]. Sichuan metallurgy, 2018, 40(4): 24-31 (in Chinese with English abstract).
- [8] KHURANA P, PULICHARLA R, KAUR BRAR S. Antibiotic-metal complexes in wastewaters: fate and treatment trajectory[J/OL]. Environment international, 2021, 157: 106863 [2024-05-30]. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106863>.
- [9] DIAS M C, MONTEIRO C, MOUTINHO-PEREIRA J, et al. Cadmium toxicity affects photosynthesis and plant growth at different levels[J]. Acta physiologiae plantarum, 2013, 35(4): 1281-1289.
- [10] LIU Y, ZHANG J, GAO B Y, et al. Combined effects of two antibiotic contaminants on *Microcystis aeruginosa* [J]. Journal of hazardous materials, 2014, 279: 148-155.
- [11] ZHANG Y Q, ZHANG X Y, GUO R, et al. Effects of florfenicol on growth, photosynthesis and antioxidant system of the non-target organism *Isochrysis galbana* [J/OL]. Comparative biochemistry and physiology part C: toxicology & pharmacology, 2020, 233: 108764 [2024-05-30]. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108764>.
- [12] 熊邦. 铅对普通小球藻和原壳小球藻的毒性效应研究[D]. 上海: 华东理工大学, 2013. XIONG B. The toxicological effects of Pb²⁺ on *Chlorella vulgaris* and *Chlorella protothecoides* [D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2013 (in Chinese with English abstract).
- [13] 傅海霞, 刘怡, 董志英, 等. 抗生素与重金属复合污染的生态毒理效应研究进展[J]. 环境工程, 2016, 34(4): 60-63. FU H X, LIU Y, DONG Z Y, et al. Progress in research on ecological toxicity of combined pollution of antibiotics and heavy metals[J]. Environmental engineering, 2016, 34(4): 60-63 (in Chinese with English abstract).
- [14] ZHOU Y, XU Y B, XU J X, et al. Combined toxic effects of heavy metals and antibiotics on a *Pseudomonas fluorescens* strain ZY2 isolated from swine wastewater [J]. International journal of molecular sciences, 2015, 16(2): 2839-2850.
- [15] 胡鑫钰. 集胞蓝细菌 *Synechocystis* sp. PCC6803 对氧化胁迫的应答机制[D]. 武汉: 华中农业大学, 2021. HU X Y. Response mechanism of *Synechocystis* sp. PCC6803 to oxidative stress [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021 (in Chinese with English abstract).
- [16] 牛楠楠. 集胞蓝细菌 PBSs 的组装、LCM PB-domain 的结构及在状态转换中的功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2021. NIU N N. Assembly of *Pseudomonas aeruginosa* PBSs, structure and function of LCM PB domain in state transition [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021 (in Chinese with English abstract).
- [17] XU H C, YU G H, JIANG H L. Investigation on extracellular polymeric substances from mucilaginous cyanobacterial blooms in eutrophic freshwater lakes [J]. Chemosphere, 2013, 93(1): 75-81.
- [18] HU X Y, LUO K, JI K, et al. ABC transporter slr0982 affects response of *Synechocystis* sp. PCC6803 to oxidative stress caused by methyl viologen [J/OL]. Research in microbiology, 2022, 173(1/2): 103888 [2024-05-30]. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2021.103888>.
- [19] OZTURK S, ASLIM B, SULUDERE Z. Cadmium (II) sequestration characteristics by two isolates of *Synechocystis* sp. in terms of exopolysaccharide (EPS) production and monomer composition [J]. Bioresource technology, 2010, 101(24): 9742-9748.
- [20] 刘滨扬. 红霉素、环丙沙星和磺胺甲噁唑对羊角月牙藻的毒性效应及其作用机理[D]. 广州: 暨南大学, 2011. LIU B Y. Toxic effects and its mechanism of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole to *Selenastrum capricornutum* [D]. Guangzhou: Jinan University, 2011 (in Chinese with English abstract).

Effects of single and combined pollution of antibiotics and cadmium on growth of *Synechocystis* sp. PCC6803

LIU Yuewei, CHEN Wenli, WANG Li

*National Key Laboratory of Agricultural Microbiology,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

Abstract Antibiotics and heavy metals are persistent pollutants in the environment, and the assessment of their toxicity to organisms has always been a hotspot of study. This article investigated the effects of single and combined pollution of tetracycline/sulfamethoxazole and cadmium ions on the growth of *Synechocystis* sp. PCC6803. The results showed that a single exposure to 100 ng/L sulfamethoxazole (SMX) stimulated the growth and photosynthetic activity of *Synechocystis*, whereas treatment with tetracycline (TC) had no significant effect. Cadmium ions (Cd^{2+}) at 0.001 mg/L did not significantly affect the physiology of *Synechocystis*, but Cd^{2+} at 0.5 mg/L significantly inhibited the growth and photosynthesis of *Synechocystis*. This concentration downregulated photosynthesis-related gene (psbA2), disrupted the antioxidant system of *Synechocystis*, damaged its cell membranes, and stimulated the secretion of its extracellular polysaccharides. When 100 ng/L TC coexisted with 0.001 mg/L Cd^{2+} synergistically, the cellular esterase activity was stimulated. 100 ng/L SMX alleviated oxidative damage caused by 0.5 mg/L Cd^{2+} , resulting in the reduced production of reactive oxygen species (ROS), the decreased activity of superoxide dismutase (SOD), and the low content of malonaldehyde (MDA) compared to the group treated by single 0.5 mg/L Cd^{2+} . When both were present simultaneously, they synergistically stimulated the activity of esterase in *Synechocystis*. Low concentrations of tetracycline had minimal impact on cell growth and did not significantly alter the cytotoxicity of Cd^{2+} on cells. In contrast, low concentrations of sulfamethoxazole promoted cell growth and mitigated the cytotoxic effects of Cd^{2+} on cells. It is indicated that it is necessary to comprehensively consider the combined pollution of antibiotics and heavy metals when pollution is assessed.

Keywords *Synechocystis*; tetracycline; sulfamethoxazole; cadmium ions; ROS; *Cyanobacteria*; antibiotic

(责任编辑:陆文昌)