文章编号：1008-1542(2019)06-0548-07　　开放科学(资源服务)标识码(OSID)：

四环素胁迫对羊角月牙藻生长及抗氧化系统的影响

王雅学[1,2]，武鹏鹏[1,2]，沈洪艳[1,2]

(1.河北科技大学环境科学与工程学院，河北石家庄　050018；2.河北省药用分子化学实验室，河北石家庄　050018)

摘　要：为探究四环素对藻类产生的毒性效应，选择羊角月牙藻(*Selenastrum capricornutum*)作为受试生物，采用室内试验方法，研究不同质量浓度的四环素(0，0.2，0.4，0.8，1.6，3.2 mg/L)对羊角月牙藻的生长抑制情况、叶绿素 a 含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量及活性氧(ROS)水平的影响。结果表明：四环素对羊角月牙藻的生长具有抑制作用，96 h 半数效应浓度(EC_{50})为 3.142 mg/L；四环素抑制了羊角月牙藻细胞中的叶绿素 a 含量；试验 96 h 时，随着四环素浓度的增大，羊角月牙藻细胞的 SOD 活性呈现先升高后降低的趋势，MDA 含量、ROS 水平均表现为升高趋势。因此，四环素可胁迫羊角月牙藻产生氧化应激反应，损害藻体的抗氧化系统，对水生生态系统具有潜在风险。

关键词：环境毒理学；四环素；羊角月牙藻；生长抑制；叶绿素 a；氧化胁迫

中图分类号：X171.5　　文献标志码：A　　**doi**：10.7535/hbkd.2019yx06013

Effects of tetracycline on growth and antioxidant system of *Selenastrum capricornutum*

WANG Yaxue[1,2], WU Pengpeng[1,2], SHEN Hongyan[1,2]

(1. School of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018, China; 2. Laboratory of Hebei Province for Medicinal Molecular Chemistry, Shijiazhuang, Hebei 050018, China)

Abstract: In order to study the toxic effects of tetracycline on algae, *Selenastrum capricornutum* is selected as the test organism. The growing situation, chlorophyll a contents, superoxide dismutase (SOD) activity, malondialdehyde (MDA) content and reactive oxygen species (ROS) level in the cells of *Selenastrum capricornutum* after 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 mg·L^{-1}

收稿日期：2019-09-30；修回日期：2019-11-14；责任编辑：王海云

基金项目：国家自然科学基金(41373096)；国家环保公益课题(201509041-05)；河北省自然科学基金(B2014208068)；河北省重点学科建设基金；河北省环保厅公益课题；河北省药用分子化学实验室开放基金

第一作者简介：王雅学(1994—)，女，河北石家庄人，硕士研究生，主要从事污染物环境行为及效应方面的研究。

通信作者：沈洪艳教授。E-mail：1178611805@qq.com

王雅学，武鹏鹏，沈洪艳.四环素胁迫对羊角月牙藻生长及抗氧化系统的影响[J].河北科技大学学报，2019，40(6)：548-554.

WANG Yaxue，WU Pengpeng，SHEN Hongyan.Effects of tetracycline on growth and antioxidant system of *Selenastrum capricornutum* [J].Journal of Hebei University of Science and Technology，2019，40(6)：548-554.

tetracycline exposured are studied by indoor test method. The results show that the tetracycline can strongly inhibit growth of *Selenastrum capricornutum* and the 50% effective concentration (EC_{50}) is 3.142 mg·L^{-1} during 96 h exposured. Tetracycline treatment inhibits the content of chlorophyll a in the cells of *Selenastrum capricornutum*. During 96 h exposure period, with the increase of tetracycline concentrations, the activity of SOD shows a "Bell-shaped" trend, the content of MDA and the level of ROS shows an upward trend. The study indicates that tetracycline can cause oxidative stress and damage the antioxidant system in *Selenastrum capricornutum* cells. Tetracycline poses a potential risk to aquatic ecosystems.

Keywords: environmental toxicology; tetracycline; *Selenastrum capricornutum*; growth inhibition; chlorophyll a; oxidative stress

四环素类抗生素是世界上应用最为广泛的抗生素之一[1]，中国是四环素类抗生素的生产及使用大国[2]，而四环素(tetracycline)是四环素类抗生素中的典型药物，因其抗菌谱广、质优价廉常被作为动物饲料添加剂，广泛应用于畜牧及水产养殖领域[3]。研究表明，动物所摄入的抗生素中有 30%～90%不能被其完全吸收，而是随尿液和粪便一起排至环境中[4]。四环素水溶性较好，易通过各种环境介质转移到地表水、地下水中[5]。那广水等[6]采集了中国北方 13 个市政排污口及相关河流水样，结果发现在近岸污水排放中四环素类抗生素的质量浓度可达 1.114 μg/L。有研究显示，黄浦江中四环素类抗生素的质量浓度为 0.44～2.69 μg/L[7]。部分地区的地下水也已经检测到四环素的存在，质量浓度达到 0.003 6 μg/L[8]。四环素化学结构非常稳定，大部分可在环境中存留 1 年以上[9]，对生态环境的影响不容忽视。姜蕾等[10]研究发现，四环素暴露能够阻碍铜绿微囊藻的光合作用，破坏抗氧化酶的系统平衡，抑制藻类生物量的增长。周旭东[11]研究后认为，四环素类抗生素主要通过破坏细胞膜结构来抑制藻类生长。李捷[12]研究表明，四环素作用下莱茵衣藻内的抗氧化酶活性被激发。藻类是水生生态系统内重要的初级生产者，四环素可能通过食物链由低营养级向高营养级富集，进而影响整个水生生态系统，最终危害人类健康，因此，有必要进一步探讨四环素对藻类的效应浓度及其生态毒性。

羊角月牙藻(*Selenastrum capricornutum*)是一种淡水绿藻，易于分离培养且繁殖周期较短，对毒性物质较为敏感[13]，可被作为生物毒性模式生物[14-15]，也是生态环境部藻类毒性测试中的推荐藻种之一[16]。因此，本研究以四环素作为研究对象，以羊角月牙藻作为受试生物，通过测定四环素暴露下羊角月牙藻细胞的生长抑制情况、叶绿素 a 含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量、活性氧(ROS)水平的变化，探究四环素对羊角月牙藻的毒性效应，以期为四环素的安全合理使用、污染治理及相关环境风险评估提供基础数据。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

羊角月牙藻(FACHB-271)购自中国科学院水生生物研究所淡水藻种库，在无菌条件下，将藻种重悬于 BG11 培养基中，置于锥形瓶中在人工气候培养箱(PRX-250B，宁波赛福实验仪器有限公司提供)内培养，培养温度为 25 ℃，光照强度为 12 000 lux，光照周期为 14 h 光照＋10 h 黑暗，每日定期摇晃锥形瓶 3 次，每次 5 min，同时随机调整锥形瓶位置以使藻细胞受光均匀，选取对数生长期的羊角月牙藻细胞进行四环素毒性效应研究。四环素(分析纯)购自上海阿拉丁试剂有限公司。

1.2　染毒试验

将对数生长期的羊角月牙藻细胞离心收集(3 500 r/min，4 ℃，10 min)，去除上清液，用无菌超纯水清洗 3 次，将收集到的藻细胞接种至培养基中，加入一定量的四环素溶液。通过预试验探明四环素对羊角月牙藻生长的有效浓度影响范围。根据预试验的结果，设置四环素质量浓度梯度分别为 0(空白对照)，0.2，0.4，0.8，1.6，3.2 mg/L，并同时进行 3 个平行组。在试验开始后的第 24，48，72，96 h 取样，进行其他测定工作。

1.3　藻细胞生长测定

在试验开始后第 24，48，72，96 h 分别取样，并于显微镜下观察藻类生长状况，使用血球计数板进行计数，确定藻细胞的密度；同时用紫外分光光度计测定藻细胞在波长为 684 nm 下的吸光度，以建立藻细胞密度与 OD_{684} 之间的线性关系。

1.4 叶绿素a含量的测定

叶绿素a含量的测定采用分光光度法，取5 mL藻液，离心收集(8 000 r/min，10 min)后，弃去上清液，将藻细胞重悬于体积分数为95%的乙醇中，75 ℃水浴3 min，再次离心(8 000 r/min，10 min)后，用紫外分光光度计测定上清液在波长665 nm和649 nm下的吸光度[17]。叶绿素a含量计算公式为

$$C_a = 13.95\ A_{665} - 6.88\ A_{649},$$

式中，C_a为叶绿素a的浓度；A_{665}和A_{649}为叶绿素溶液在波长665 nm和649 nm下的吸光度。

1.5 酶活性的测定

取20 mL藻液，离心收集(6 500 r/min，10 min)后，弃去上清液，使用预冷的PBS缓冲溶液清洗3次，重悬于PBS缓冲溶液中，使用超声波细胞破碎仪冰浴破碎10 min，离心(10 000 r/min，4 ℃，10 min)后取上清液于冰中储存待测。超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量均采用南京建成工程研究所的检测试剂盒测定。

1.6 活性氧(ROS)水平的测定

采用SHEN等[18]提出的化学荧光法测定ROS水平。将DCFH-DA试剂用培养基以1∶1 000进行稀释，使其工作浓度为10 mmol/L。取1 mL藻液，离心(3 500 r/min，15 min)后，用PBS缓冲溶液清洗3次，使用500 μL稀释后的DCFH-DA试剂重悬，将重悬后的藻细胞放入人工气候培养箱中孵育50 min，孵育完成后离心(7 100 r/min，15 min)，并用BG11基础培养基清洗3次，重悬于1 mL培养基中，取200 μL置于96孔板，每个浓度设置3个复孔，使用多功能酶标仪在激发波长485 nm、发射波长525 nm下进行测定。

1.7 数据分析

试验结果用“均值±标准差”表示。采用SPSS 19.0软件对数据进行单因素方差分析(one way ANOVA)，并用Tukeys作组间多重比较。试验中所有图表均使用软件Origin 8.6绘制，其中：* 代表$p<0.05$，* * 代表$p<0.01$，均表示差异显著；* * * 代表$p<0.001$，表示差异极显著。

2 结果与讨论

2.1 四环素对羊角月牙藻生长的影响

根据藻细胞密度与OD_{684}的测定结果，建立二者之间的线性关系为$y=4.627\ 4x+0.964$，$R^2=0.997\ 4$，该线性回归模型拟合优度较高，可信性较好。观察试验开始后24，48，72，96 h时，不同浓度四环素对羊角月牙藻细胞密度的影响如图1所示。由图1可以看出，48 h后中高浓度四环素(≥0.8 mg/L)胁迫下的藻细胞生长呈现一定的抑制状态；96 h时，与对照组相比，0.2 mg/L试验组的藻细胞生长被显著性抑制($p<0.05$)，其余试验组的藻细胞生长均被极显著性抑制($p<0.001$)，其中羊角月牙藻在3.2 mg/L四环素的作用下，96 h生长抑制率达到50.8%。试验结果表明，四环素对羊角月牙藻的生长繁殖具有抑制作用。随着四环素浓度的升高和试验时间的延长，羊角月牙藻的细胞密度逐渐减小，四环素对羊角月牙藻的抑制效应也越明显，呈现一定的“浓度-效应”及“时间-效应”关系。根据试验结果，由SPSS软件计算可知，96 h时四环素对羊角月牙藻的半数效应质量浓度(96 h-EC_{50})及抑制效应为80%时的四环素质量浓度(96 h-EC_{80})分别为3.142 mg/L和6.309 mg/L。徐冬梅等[19]在四环素对淡水绿藻的毒性研究中发现四环素对蛋白核小球藻的96 h-EC_{50}值及96 h-EC_{80}值分别为6.86 mg/L和17.78 mg/L；对斜生栅藻的96 h-EC_{50}值及96 h-EC_{80}值分别为3.27 mg/L和12.87 mg/L。周旭东[11]研究了四环素对铜绿微囊藻、小球衣藻的毒性，得出其96 h-EC_{50}值分别是10.394 mg/L和2.038 mg/L。与以上研究结论类比可知，四环素胁迫下，羊角月牙藻的96 h-EC_{50}值及96 h-EC_{80}值均低于蛋白核小球藻及斜生栅藻；羊角月牙藻的96 h-EC_{50}值低于铜绿微囊藻，但高于小球衣藻。羊角月牙藻对四环素胁迫较为敏感。

2.2 四环素对羊角月牙藻叶绿素a含量的影响

藻类的生长发育离不开光合作用，而叶绿素就是光合作用重要的基础物质，故叶绿素含量的变化影响光合作用的速率，进而影响藻类的生长状况[20]。而研究发现，叶绿素b是由叶绿素a演变而来的[21]，叶绿素a的含量决定了藻体内叶绿素的总量，故叶绿素a的合成和转化对藻类的生长至关重要，所以叶绿素a的含量与藻类生物量有着紧密的联系。四环素对羊角月牙藻叶绿素a含量的影响如图2所示。由图2可以看出，与对照组相比，1.6 mg/L试验组的叶绿素a含量在试验24，48，72 h均被显著性抑制($p<0.01$)，在试验96 h

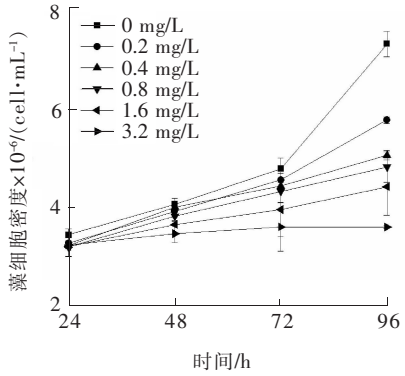

图 1　四环素对羊角月牙藻生长的影响

Fig.1　Effect of different concentrations of tetracyclines on the growth of *Selenastrum capricornutum*

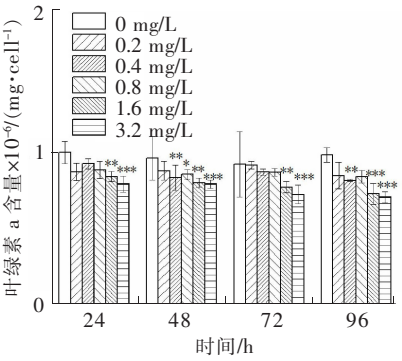

图 2　四环素对羊角月牙藻叶绿素 a 含量的影响

Fig.2　Effect of tetracycline on chlorophyll a content of *Selenastrum capricornutum*

时被极显著性抑制（$p<0.001$）；3.2 mg/L 试验组的叶绿素 a 含量在试验期间均被极显著性抑制（$p<0.001$）。本试验中，在 3.2 mg/L 四环素的胁迫下，与对照组相比，羊角月牙藻的叶绿素 a 含量在试验 96 h 时显著下降 27%。四环素的存在降低了藻类叶绿素 a 的含量，且随四环素浓度的增大，抑制效果更为显著。张迪等[22]研究表明金霉素会使斜生栅藻细胞内的叶绿体发生萎缩，影响其正常的生长代谢。段炼等[23]发现在 1-丁基-3-甲基咪唑氯盐的胁迫下，斜生栅藻叶绿体的片层结构断裂，叶绿素含量下降。四环素胁迫可能导致藻细胞的叶绿素分子受损，影响藻细胞的新陈代谢及正常光合作用的进程，进而危害羊角月牙藻的正常生长繁殖过程。

2.3　四环素对羊角月牙藻 SOD 活性的影响

SOD 是一种诱导酶类，其活性升高可以消除体内的 ROS，防止机体抗氧化损伤[24-25]。不同浓度的四环素对羊角月牙藻 SOD 活性的影响如图 3 所示。试验 24 h 时，与对照组相比，各试验组 SOD 活性均出现增长，其中 1.6，3.2 mg/L 试验组的 SOD 活性被显著性诱导（$p<0.05$），说明在试验初期，藻体在较高浓度的四环素（≥1.6 mg/L）胁迫下产生大量 ROS，藻细胞 SOD 活性升高以消除体内过量的 ROS；试验 96 h 时，与对照组相比，0.2 mg/L 试验组的 SOD 活性被显著性诱导（$p<0.01$），0.4 mg/L 试验组的 SOD 活性被显著性诱导（$p<0.05$），而 3.2 mg/L 试验组的 SOD 活性被显著性抑制（$p<0.05$），羊角月牙藻经四环素暴露 96 h 后，较低浓度的四环素（≤0.4 mg/L）试验组中，藻细胞的 SOD 活性升高以增强对 ROS 的清除能力，而高浓度的四环素（3.2 mg/L）胁迫超出了藻体正常歧化能力，抗氧化系统遭到破坏，氧化损伤加剧，SOD 活性降低。在四环素胁迫下，羊角月牙藻机体产生大量 ROS，SOD 作为抵御机体氧化损伤首先起作用的酶类，可以在一定程度内调节机体内的 ROS 水平[26]。PAPADIMITRIOU 等[27]研究表明，当生物体受到轻度逆境胁迫时，SOD 活性往往升高以清除过量的 ROS，而当胁迫进一步加剧，SOD 活性常常降低。本试验的 SOD 活性呈现了与之相同的趋势：在 3.2 mg/L 试验组中，SOD 活性在试验初期（24 h）被显著性诱导，末期（96 h）时被显著性抑制。

2.4　四环素对羊角月牙藻 MDA 含量的影响

研究表明，生物体在转化外源污染物质的过程中会导致 ROS 的产生[28]，而过量的 ROS 会与生物膜中的多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应，生成过氧化产物 MDA，而 MDA 的出现又将进一步加剧膜损伤状况[29]，所以 MDA 含量可以体现细胞膜脂质过氧化的程度[30]，同时可以体现机体受 ROS 攻击的情况。如图 4 所示，在试验初期（24 h），与对照组相比，0.8 mg/L 试验组的藻细胞 MDA 含量被显著性诱导（$p<0.05$），1.6 mg/L试验组的藻细胞 MDA 含量被极显著性诱导（$p<0.001$）；试验 48 h 时，3.2 mg/L 试验组的 MDA 含量被极显著性诱导（$p<0.001$）至试验期间最大值，其余各试验组的 MDA 含量均被显著性诱导（$p<0.05$），表明四环素可引起羊角月牙藻的氧化应激反应，产生过量的 ROS 攻击膜不饱和酸，发生脂质过氧化反应，使其产物的 MDA 含量升高；试验 72 h 时，与对照组相比，1.6，3.2 mg/L 试验组的藻细胞 MDA 含量均被显著性诱导（$p<0.05$）；试验 96 h 时，与对照组相比，除 0.2 mg/L 试验组外，其他各试验组的 MDA 含量均被极显著性诱导（$p<0.001$），说明四环素胁迫导致的羊角月牙藻氧化损伤效应持续。高问等[31]在土霉

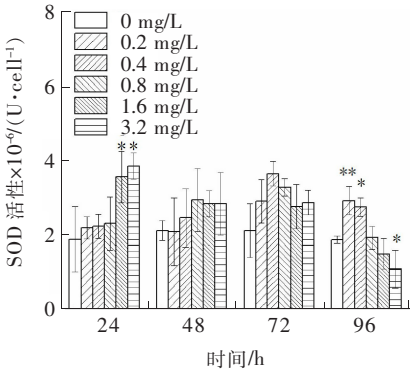

图3 四环素对羊角月牙藻SOD活性的影响

Fig.3 Effect of tetracyclines on SOD activity in *Selenastrum capricornutum*

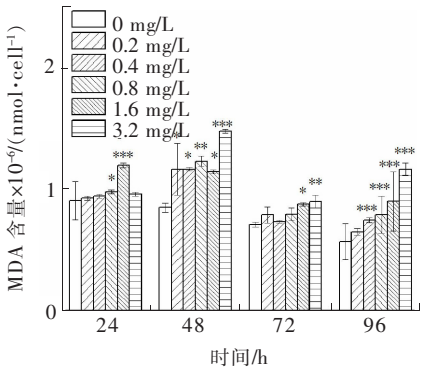

图4 四环素对羊角月牙藻MDA含量的影响

Fig.4 Effect of tetracyclines on MDA content in *Selenastrum capricornutum*

素废水对斑马鱼肌肉组织MDA含量的影响研究中发现，暴露15 d时，与对照组相比，各暴露组的MDA含量被显著性诱导。沈洪艳等[32]研究发现，70%试验组的链霉素废水对斑马鱼肌肉组织的MDA含量产生诱导作用，造成严重的氧化损伤。将本试验结果与其他指标对比可知，羊角月牙藻的MDA含量对四环素胁迫较为敏感。试验96 h时，不同浓度四环素胁迫下的羊角月牙藻细胞内的MDA含量随四环素浓度的增大呈现升高趋势，该结果与刘伟杰等[33]在壬基酚对羊角月牙藻MDA含量影响的研究结果类似：壬基酚浓度越高，羊角月牙藻的细胞膜脂质过氧化程度越严重。

2.5 四环素对羊角月牙藻ROS水平的影响

活性氧(ROS)是细胞在有氧条件下进行能量代谢产生的一类具有氧化活性的分子总称[34-35]。正常条件下，机体中产生的ROS可通过抗氧化系统(酶促系统和非酶促系统)的调节，稳定在动态平衡状态，当机体受到胁迫时，ROS过量积累或抗氧化酶的消耗将破坏平衡，引起机体氧化应激反应[36]，如生物膜过氧化、蛋白质变性、植物细胞光合作用受阻、酶的失活等，进一步引起氧化损伤[19]。当细胞内ROS水平超过机体抗氧化能力和修复水平时，将诱导细胞凋亡[24]。由图5所示，与对照组相比，3.2 mg/L试验组的ROS水平在试验48，72，96 h时均被显著性诱导($p<0.05$)；1.6 mg/L试验组的ROS水平在96 h被显著性诱导($p<0.05$)，较高浓度的四环素(≥1.6 mg/L)在试验48 h后显著提升了藻细胞内的ROS水平，表示在较高浓度四环素(≥1.6 mg/L)的持续胁迫下，藻细胞内的ROS水平已经超出了细胞自身调节及解毒能力，ROS产生与清除的动态平衡状态被打破，危害藻体抗氧化系统。

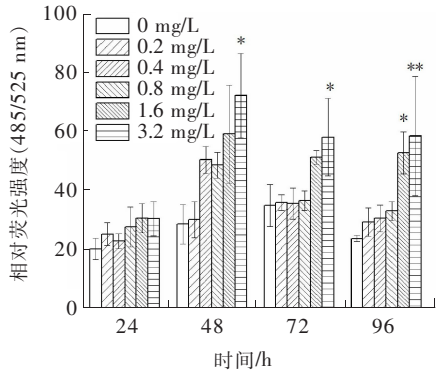

图5 四环素对羊角月牙藻ROS水平的影响

Fig.5 Effect of tetracycline on ROS level of *Selenastrum capricornutum*

3 结 论

1)四环素对羊角月牙藻的生长具有抑制作用，四环素对羊角月牙藻的96 h-EC_{50}值为3.142 mg/L。

2)四环素能够降低羊角月牙藻的叶绿素a含量，抑制羊角月牙藻的光合作用，影响其正常生长进程。

3)高浓度四环素(3.2 mg/L)在试验初期(24 h)对羊角月牙藻细胞的SOD活性有显著性诱导作用，末期时(96 h)呈现显著性抑制作用。试验期间，四环素对藻细胞的MDA含量、ROS水平具有不同程度的诱导作用。试验96 h时，随着四环素浓度的增大，羊角月牙藻细胞的SOD活性呈现先升高后降低的趋势；MDA含量、ROS水平表现为升高趋势。四环素胁迫使羊角月牙藻产生氧化应激反应，对藻体抗氧化系统造成损伤。

4)四环素对羊角月牙藻生长及抗氧化系统的影响是个复杂的过程，本文选取了生长抑制情况、叶绿素a含量、SOD活性、MDA含量、ROS水平等表征生长和抗氧化的典型指标进行了测定与分析，今后可进一步在毒性作用机制、基因表达水平等更深层面进行探究。

参考文献/References：

[1] 张浩，罗义，周启星.四环素类抗生素生态毒性研究进展[J].农业环境科学学报，2008，27(2)：407-413.
ZHANG Hao，LUO Yi，ZHOU Qixing. Research advancement of eco-toxicity of tetracycline antibiotics[J]. Journal of Agro-Environment Science，2008，27(2)：407-413.

[2] 贺德春，徐振成，吴根义，等.四环素类抗生素的环境行为研究进展[J].动物医学进展，2011，32(4)：98-102.
HE Dechun，XU Zhencheng，WU Genyi，et al. Progress on residues and environmental behaivor of tetracycline antibiotics[J]. Progress in Veterinary Medicine，2011，32 (4)：98-102.

[3] 江羚，曾昆，邵杰，等.四环素类抗生素快速分析方法研究进展[J]. 江苏农业科学，2018，46(8)：15-21.
JIANG Ling，ZENG Kun，SHAO Jie，et al. Research progress of rapid analysis methods for tetracyclines[J]. Jiangsu Agricultural Sciences，2018，46(8)：15-21.

[4] CHEE-SANFORD J C，MACKIE R I，KOIKE S，et al. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste[J]. Journal of Environment Quality，2009，38(3)：1086-1108.

[5] LI Bing，ZHANG Tong. Mass flows and removal of antibiotics in two municipal wastewater treatment plants[J]. Chemosphere，2011，83 (9)：1284-1289.

[6] 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，2009，25(6)：78-80.
NA Guangshui，CHEN Tong，ZHANG Yuemei，et al. Analysis terracyclines antibiotics residues status in water of north China[J]. Environmental Monitoring in China，2009，25(6)：78-80.

[7] 沈群辉，冀秀玲，傅淑珺，等.黄浦江水域抗生素及抗性基因污染初步研究[J]. 生态环境学报，2012，21(10)：1717-1723.
SHEN Qunhui，JI Xiuling，FU Shujun，et al. Preliminary studies on the pollution levels of antibiotic and antibiotic resistance genes in Huangpu river，China[J]. Ecology and Environmental Sciences，2012，21(10)：1717-1723.

[8] ZHANG Qinqin，JIA Ai，WAN Yi，et al. Occurrences of three classes of antibiotics in a natural river basin：Association with antibiotic-resistant *Escherichia coli*[J]. Environmental Science & Technology，2014，48(24)：14317-14325.

[9] SCHLÜSENER M P，KAI B. Persistence of antibiotics such as macrolides，tiamulin and salinomycin in soil[J]. Environmental Pollution，2006，143(3)：565-571.

[10] 姜蕾，陈书怡，尹大强.四环素对铜绿微囊藻光合作用和抗氧化酶活性的影响[J].生态与农村环境学报，2010，26(6)：564-567.
JIANG Lei，CHEN Shuyi，YIN Daqiang. Effects of tetracycline on photosynthesis and antioxidant enzymes of *Microcystis aeruginosa*[J]. Journal of Ecology and Rural Environment，2010，26(6)：564-567.

[11] 周旭东. 四环素类、磺胺类抗生素对铜绿微囊藻和小球衣藻的影响研究[D].杨凌：西北农林科技大学，2017.
ZHOU Xudong. Effects of Tetracyclines and Sulfonamides on *Microcystis aeruginosa* and *Chlamydomonas microsphaera*[D]. Yangling：Northwest A&F University，2017.

[12] 李捷. 四环素对莱茵衣藻生长及去除再生水中营养物质的影响[D]. 泰安：山东农业大学，2017.
LI Jie. Effects of Tetracycline on the Growth and Nutrient Removal of *Chlamydomonas reinhardtii* in Reclaimed Water[D]. Taian：Shandong Agricultural University，2017.

[13] 石丽娟. 水环境中典型抗生素类药物的检测分析和生态毒性研究[D].上海：上海交通大学，2010.
SHI Lijuan. Analysis of Typical Antibiotic in Water Environment and Investigation of Their Ecological Toxicity[D]. Shanghai：Shanghai Jiaotong University，2010.

[14] ANGEL B M，VALLOTTON P，APTE S C. On the mechanism of nanoparticulate CeO_2 toxicity to freshwater algae[J]. Aquatic Toxicology，2015，168：90-97.

[15] 李义刚，刘滨扬，彭颖，等. 三氯生对羊角月牙藻生长及其抗氧化系统的影响[J].生态毒理学报，2013，8(3)：357-365.
LI Yigang，LIU Binyang，PENG Ying，et al. Toxic effects of triclosan on growth and antioxidase activity of *Selenastrum capricornutum*[J]. Asian Journal of Ecotoxicology，2013，8(3)：357-365.

[16] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京：中国环境科学出版社，2002.

[17] 李合生，孙群，赵世杰，等. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京：高等教育出版社，2000.

[18] SHEN Xiangchun，QIAN Zhiyu，WANG Yajuan，et al. Crocetin attenuates norepinephrine-induced cytotoxicity in primary cultured rat cardiac myocytes by antioxidant in vitro[J]. Journal of Asian Natural Products Research，2009，11(5)：417-425.

[19] 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 Dongmei，WANG Yanhua，RAO Guiwei. Cellular response of freshwater green algae to the toxicity of tetracycline antibiotics[J]. Environmental Science，2013，34(9)：3386-3390.

[20] 杜青平，黄彩娜，贾晓珊. 1，2，4-三氯苯对斜生栅藻的毒性效应及其机制研究[J].农业环境科学学报，2007，26(4)：1375-1379.
DU Qingping，HUANG Caina，JIA Xiaoshan. The toxic effects of 1，2，4-trichlorobenzene on three kinds of ocean tiny algae[J]. Journal of Agro-Environment Science，2007，26(4)：1375-1379.

[21] 潘瑞炽.植物生理学[M]. 7 版. 北京：高等教育出版社，2008.

[22] 张迪，厉圆，沈忱思，等. 金霉素及其异构体降解产物对斜生栅藻的毒性效应研究[J]. 农业环境科学学报，2019，38(4)：756-764.
ZHANG Di，LI Yuan，SHEN Chensi，et al. Understanding the toxic effects of chlortetracyclineandits and its isomer degradation products

on *Scenedesmus obliquus*[J].Journal of Agro-Environment Science, 2019, 38(4): 756-764.

[23] 段炼, 杜耀, 陆秋琳, 等.离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑氯盐对斜生栅藻的毒性效应[J].中国环境科学, 2012, 32(5): 886-891.
DUAN Lian, DU Yao, LU Qiulin, et al.Toxicity of 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquid to *Scenedesmus obliqnus*[J]. China Environmental Science, 2012, 32(5): 886-891.

[24] BOWLER C, MONTAGU M V, INZE D, et al. Superoxide dismutase and stress tolerance[J]. Annual Review of Plant Biology, 1992, 43: 83-116.

[25] MISHRA S, SRIVASTAVA S, TRIPATHI R. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L[J]. Plant Physiology and Biochemistry,2006,44: 25-37.

[26] 刘聪. 萘和镉对斑马鱼的联合毒性研究[D].大连:大连海事大学,2010.
LIU Cong. Joint Toxicity of Naphthalene and Cadmium on Zebrafish (*Danio renio*)[D]. Dalian: Dalian Maritime University, 2010.

[27] PAPADIMITRIOU E, LOUMBOURDIS N S. Exposure of the frog *Rana ridibunda* to copper: Impact on two biomarkers, lipid peroxidation, and glutathione[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2002, 69(6): 885-891.

[28] HALLIWELL B,GUTTERIDGE J M C. Free Radicals in Biology and Medicine[M]. 4th ed.Oxford: Oxford University Press,2000:230-240.

[29] 程晓燕, 赵新仕, 叶立群, 等.纳米 BiOBr 对羊角月牙藻的毒性效应[J]. 环境科学学报, 2018, 38(10): 4176-4184.
CHENG Xiaoyan, ZHAO Xinshi, YE Liqun, et al. Toxic effects of nano-sized BiOBr on *Pseudokirchneriella subcapitata*[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2018, 38(10): 4176-4184.

[30] 夏继刚, 牛翠娟, 高颖.壬基酚长期暴露对斑马鱼雄鱼第二性征、精子活力的影响[J]. 生态毒理学报, 2010, 5(1): 44-49.
XIA Jigang, NIU Cuijuan, GAO Ying. Effects of long-term exposure to nonylphenol on secondary sexual characteristics and sperm motility of male zebrafish (*Brachydanio rerio*)[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2010, 5(1): 44-49.

[31] 高问, 武鹏鹏, 王雅学, 等.土霉素废水对斑马鱼的生物毒性效应研究[J]. 河北科技大学学报, 2019, 40(1): 38-44.
GAO Wen, WU Pengpeng, WANG Yaxue, et al. Study of the biological toxicity of oxytetracycline wastewater on zebrafish[J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2019, 40(1): 38-44.

[32] 沈洪艳, 王丽新, 杨金迪, 等. 链霉素生产废水对斑马鱼肌肉组织 SOD 活性和 MDA 含量的影响[J]. 河北科技大学学报, 2014, 35(3): 303-308.
SHEN Hongyan, WANG Lixin, YANG Jindi, et al. Effect of streptomycin wastewater on SOD activity and MDA content in muscles of zebrafish[J]. Journal of Hebei University of Science and Technology, 2014, 35(3): 303-308.

[33] 刘伟杰, 吴孝情, 鄢佳英, 等. 壬基酚对羊角月牙藻的毒性效应研究[J]. 中国环境科学, 2018, 38(6): 2329-2336.
LIU Weijie, WU Xiaoqing, YAN Jiaying,et al. Toxic effects of nonylphenol on *Selenastrum capricornutum*[J]. China Environmental Science, 2018, 38(6): 2329-2336.

[34] PHULL A R, NASIR B, HAQ I U, et al. Oxidative stress,consequences and ROS mediated cellular signaling in rheumatoid arthritis[J]. Chemico-Biological Interactions, 2018, 281: 121-136.

[35] BRYNILDSEN M P, WINKLER J A, SPINA C S, et al. Potentiating antibacterial activity by predictably enhancing endogenous microbial ROS production[J]. Nature Biotechnol, 2013, 31(2): 160-165.

[36] LUSHCHAK V I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology,2011,153(2):175-190.