

恩诺沙星对小型模型水生生态系统中微生物的影响

吴银宝¹, 汪植三¹, 廖新倮¹, 陈杖榴²

(1. 华南农业大学动物科学学院, 广州 510642; 2. 广东省兽药研制与安全评价重点实验室, 广州 510642)

摘要: 恩诺沙星是畜禽养殖业中广泛应用的抗菌药, 它进入畜禽体后, 会随畜禽的排泄物进入环境, 对生态环境造成影响。通过人工构建的小型模型水生生态系统, 研究了恩诺沙星在水体的降解及其对水生生态系统微生物的影响, 为其生态风险评价提供数据。试验设5个浓度系列, 1个空白对照。结果表明: 在试验中, 恩诺沙星的降解速度很快, 经5h后就已降到原始浓度的50%以下, 之后随时间推移, 降解速度逐步减慢。在试验初始浓度0.2~5mg/L的范围内, 恩诺沙星对水体中的好氧细菌、真菌、放线菌、氨化细菌和硝化细菌的数量均无显著影响。讨论了恩诺沙星进入水环境后的生态效应。

关键词: 恩诺沙星; 小型模型水生生态系统; 微生物

文章编号: 1000-0933(2006)08-2640-06 **中图分类号:** S811.5 **文献标识码:** A

Effects of enrofloxacin on microorganisms in wetlands

WU Yin-Bao¹, WANG Zhi-San¹, LIAO Xin-Di¹, CHEN Zhang-Liu² (1. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Guangdong Key Laboratory for Veterinary Drug Development and Safety Evaluation, South China Agricultural University, Guangzhou, 510642, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(8): 2640 ~ 2645.

Abstract: Enrofloxacin is a widely used antibiotics in animal production. Animal excreted residual enrofloxacin which can adversely affecting the environment. The effects of 5 concentrations of enrofloxacin (0, 0.2, 0.5, 1, 2, 5mg·L⁻¹) on the aquatic microorganisms and their degradation rates were determined in a constructed wetland to assess the ecological risk of enrofloxacin on aquatic ecosystem. The results showed that enrofloxacin was rapidly degraded in the wetland environment in the initial stage, with more than 50% degraded within the first 5 hours. And thereafter the degradation rate of enrofloxacin slowed down. The results indicated that enrofloxacin concentrations of 0.2 ~ 5mg·L⁻¹ had no significant effects on the population of aerobic bacteria, fungus, actinomycetes, nitrite bacteria and nitrate-reducing bacteria under aquatic environment. The ecological effects of enrofloxacin on aquatic ecosystem were also discussed.

Key words: enrofloxacin; aquatic microcosmos; microorganisms

兽药进入畜禽机体后, 其原形和代谢产物除以游离和结合的形式残留在畜禽机体组织和畜禽产品中, 还会随粪、尿等排泄物排出体外, 进入水域及陆域生态系统中, 可能对生态系统中的生物群落构成威胁, 对系统的结构和功能产生直接或间接的影响。国外对兽药的生态风险评价非常重视, 对兽药在环境中的含量及其降解^[1,2]、进入环境后的行为^[3,4]及其对生态系统的影响^[5,6]方面的研究也越来越多。国内对兽药的生态风险评价刚起步, 相关研究较少, 是一个亟待加强的领域。

恩诺沙星是目前广泛应用于畜禽养殖业的人工合成的抗菌药, 为畜禽、水产养殖业的发展作出了很大贡献, 同时长期用药而导致的在畜禽产品中的残留、耐药性的增加以及在环境中的生态效应等方面已引起广泛

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(31031040); 华南农业大学校长基金资助项目(2005K105)

收稿日期: 2005-06-30; **修订日期:** 2006-02-11

作者简介: 吴银宝(1973~), 男, 博士, 主要从事家畜生态学研究. E-mail: wuyinbao@scau.edu.cn

Foundation item: The project was supported by Key Program of National Natural Science Foundation of China (No. 31031040) and President Fund of South China Agricultural University (No. 2005K105)

Received date: 2005-06-30; **Accepted date:** 2006-02-11

Biography: WU Yin-Bao, Ph.D., mainly engaged in domestic ecology. E-mail: wuyinbao@scau.edu.cn

关注。研究表明,健康鸡灌服恩诺沙星后,主要以恩诺沙星原形、其次以环丙沙星的形式随粪(尿)排出体外,而且鸡粪中的恩诺沙星浓度要高于恩诺沙星对多种微生物的最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MBC)^[7,8]。因此本文将构建小型模型水生态系统(微宇宙, Microcosm),研究恩诺沙星在其中的降解及其对水生态系统中微生物种类及数量的影响,评价这种人工合成物进入水环境后对水生微生物的生态效应,为恩诺沙星的生态风险评价提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 高效液相色谱仪(HPLC): Waters 600 Controller, Waters 717 plus Autosampler, Waters TM 474 Scanning Fluorescence Detector(美国); SR2000 色谱数据工作站: 上海三锐科技

1.1.2 药品 恩诺沙星对照品: 含量 100%, 批号 H051200, 中国兽药监测所; 恩诺沙星原料药: 含量 99.4%, 批号 20010515, 浙江国邦制药厂; 乙腈: Fisher scientific worldwide company, 色谱纯; 四丁基溴化铵、胆盐、乳糖、蛋白胨、磷酸氢二钾、七水硫酸亚铁、七水硫酸镁等均为国产分析纯。

1.1.3 试剂和培养基 流动相: 称取 4.8845g 四丁基溴化铵溶于 850ml 双蒸水中, 加乙腈 150ml, 混匀后用 85% 的磷酸调 pH 至 3.0, 过滤脱气后待用。

好氧细菌采用营养琼脂培养基; 真菌采用察氏培养基; 放线菌采用高氏 1 号培养基; 氨化细菌采用氨氧化细菌计数用培养基; 硝化细菌采用硝酸还原菌计数用培养基。上述微生物均采用 MPN(Most Probable Number)法培养计数。

1.1.4 材料 试验用水: 静置 10d 以上的自来水。玻璃水族缸: 规格为 0.6m × 0.3m × 0.4m(长 × 宽 × 高), 容积 60L。塘泥: 取自华南农业大学校外池塘, 未经动物废弃物污染, 池水经检验不含恩诺沙星。将塘泥风干粉碎, 去除较大的石子及杂物。

1.2 试验方法

1.2.1 水体微宇宙的建立 试验先培养 7 个水体微宇宙, 于大棚内进行。试验开始时, 各缸底先铺 5cm 厚的塘土(重 23.75kg), 其中含有多多种水生生物的种子、孢子和卵, 每缸灌注自来水 55L。每 3d 用自来水补充蒸发失水。30d 后, 各缸底泥及四壁长出一些水生植物(如水绵等), 水中有较丰富的藻类、原生动物、枝角类及微生物, 各缸生物种类相似, 代谢功能相近。

1.2.2 试验分组 水体微宇宙至少培育 2 个月, 待其稳定后取其中功能相近的 6 个微宇宙用作正式试验。第 1 组为空白组(不加入恩诺沙星), 从第 2 组到第 6 组, 水体中恩诺沙星浓度分别为 0.2、0.5、1、2 mg/L 和 5 mg/L。试验期间平均气温为 30.5℃。

1.2.3 采样 各组按相应的恩诺沙星浓度给药、混匀后, 在给定时间采集水样, 采集水样的时间为 0、0.25、0.63、1、1.21、2、3、4、7、12、20、30、41d, 5 点采样, 每点采集从水面到水底的水柱, 所采样品混合均匀后, 用于水体中恩诺沙星浓度检测。用于微生物数量检测的采样时间为 1、2、3、4、6、9、14、23、41d。

1.3 检测方法

1.3.1 水样前处理方法 水样混合均匀后, 取 4ml 于 12000r/min 离心 10min, 再取上清液过 0.22μm 的滤膜, 取所得滤液 1ml, 用 HPLC 法进样 50μl 测定其中的药物浓度。

1.3.2 色谱条件及工作指标 检测器: 荧光检测器, 激发波长(λ_{ex})278nm, 发射波长(λ_{em})452nm, 衰减为 10, 增益为 64; 色谱柱: Hypersil BDS C18(5μm, 4.6 × 250mm), 大连依利特科学仪器有限公司填装; 流速: 1.0ml/min; 最低检测限: 恩诺沙星及环丙沙星均为 0.002mg/L。

在上述检测条件下, 能将恩诺沙星、环丙沙星与水样中的其它成分分开, 恩诺沙星和环丙沙星色谱峰保留时间分别为 4.9min 和 4.3min。

1.3.3 水样中恩诺沙星及环丙沙星浓度测定 给药后不同时间获得的水样, 按“1.3.1 水样前处理方法”处理后进行 HPLC 分析, 将恩诺沙星及其代谢产物环丙沙星的峰面积代入标准曲线回归方程中, 计算出相应水

样的药物浓度。对药物浓度过高超出检测限范围的样品,用流动相稀释后再进样测定其浓度。

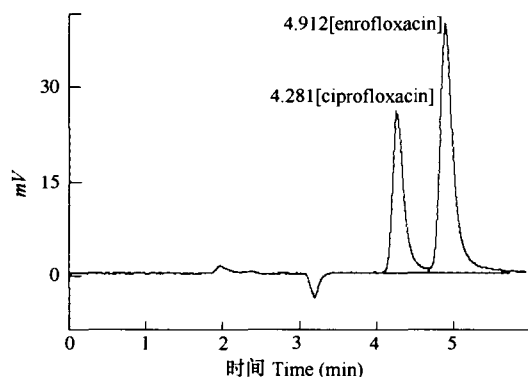


图1 恩诺沙星和环丙沙星标准品色谱图

Fig.1 Chromatography graph of the standard sample of enrofloxacin and ciprofloxacin

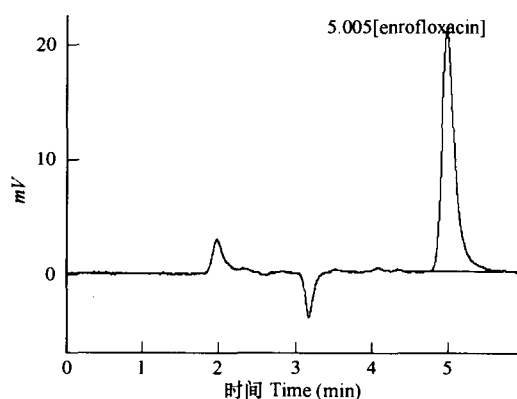


图2 水样样品色谱图

Fig.2 Chromatography graph of the samples of water

1.4 统计分析方法

对试验所取得的数据用 SPSS10.0 for Windows 进行统计分析,多重比较采用邓肯氏新复极差检验法(DMRT法),利用 Microsoft Excel 2000 进行曲线拟合。

2 结果与分析

2.1 恩诺沙星在模型水生态系统中的降解

在微宇宙中加入不同浓度的恩诺沙星溶液,测定不同采样时间水中恩诺沙星浓度的变化,结果如表1所示。试验开始时,恩诺沙星的降解速度很快,在试验开始后5h左右浓度已经降至原浓度的50%以下,之后随时间推移,降解速度逐步减慢,并且在低浓度时维持较长的时间。初始浓度越高,恩诺沙星在低浓度时维持的时间就越久。这种变化趋势与其在自然水体中的降解结果相似^[7]。

2.2 恩诺沙星对水中微生物的影响

2.2.1 好氧细菌 在不同时间,测定不同浓度恩诺沙星水中的好氧细菌总数,并将其对数值与采样时间作图可得图3。由图3可知,在试验浓度范围内,各试验组好氧细菌总数的变化趋势均与空白组相似,水体中好氧细菌总数在开始加入恩诺沙星后下降较低快,但之后回升也较快,然后又逐步下降并趋于稳定,方差分析无显著差异($p > 0.05$)。对各试验组进行多重比较,也得到相同结果。表明在试验浓度范围内,水体中恩诺沙星的初始浓度对好氧细菌总数变化的影响较小。这可能与恩诺沙星在水环境中消失较快有关。

2.2.2 真菌和放线菌 在不同采样时间,各试验组测得的真菌和放线菌的数量变化如表2所示。

表1 各试验组恩诺沙星的浓度变化

Table 1 Changes of enrofloxacin concentration in water in experimental trials

采样时间(d)	0 mg/L(CK)	0.2mg/L	0.5mg/L	1mg/L	2mg/L	5mg/L
0	ND	180.97	493.59	931.27	1818.61	4105.80
0.25	ND	138.34	252.23	368.56	599.94	1890.99
0.63	ND	80.00	126.85	176.44	354.41	1412.55
1.00	ND	55.67	104.66	140.83	217.01	1070.34
1.21	ND	37.39	71.04	80.18	167.09	714.85
2.00	ND	15.55	38.25	44.89	69.99	505.62
3.00	ND	12.26	24.29	24.98	34.06	301.34
4.00	ND	8.79	11.31	14.61	16.62	137.18
7.00	ND	4.55	3.88	8.03	8.55	65.90
12.00	ND	3.42	3.51	6.37	7.94	19.45
20.00	ND	3.04	3.19	3.79	4.13	7.20
30.00	ND	2.25	2.56	2.99	3.96	6.52
41.00	ND	2.15	2.22	2.28	3.95	5.51

* ND 为不可测得 ND means "Not Detectable"

表 2 各试验组真菌、放线菌总数(CFU/ml 水)

Table 2 The sum of fungus and actinomycete in water in experimental trials

采样 时间 (d)	0mg/L		0.2mg/L		0.5mg/L		1mg/L		2mg/L		5mg/L	
	真菌 Fungus	放线菌 Actinomycetes	真菌 Fungus	放线菌 Actinomycetes	真菌 Fungus	放线菌 Actinomycetes	真菌 Fungus	放线菌 Actinomycetes	真菌 Fungus	放线菌 Actinomycetes	真菌 Fungus	放线菌 Actinomycetes
1	0	0	0	0.1	0	0.1	1	0.95	0	0.05	0	0.05
2	0	0	0	0	0	0	0	0.5	40	0	0	0
3	0	50	0	0	0	0	50	0	5	0	5	0
4	0	0	3.5	1	3	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	5	0	5	0	0	0	0	0
9	10	0	15	0	10	0	0	0	0	0	10	5
14	11.5	0	0	1.5	0	0	0.5	0.5	0	0.5	0	3.5
23	0.5	0	3	0.5	0.5	0.5	1.5	2.5	1	2.5	0.5	0
41	10	0	9	0	0	0.5	1	0	1	0	3	0.5

由表 2 可以看出,从空白组到试验组,真菌和放线菌的数量都很少。将所测数据以 $\lg(x+1)$ 形式转换后,进行方差分析和多重比较,结果表明,空白组与其它试验组真菌的数量变化无显著性差异。这说明,在试验浓度范围内,恩诺沙星对真菌和放线菌的发生与发展未产生显著影响。

2.2.3 氨化细菌 恩诺沙星对氨化细菌的影响如图 4 所示。在试验前 5d,各试验组氨化细菌总数呈先降后升趋势,5d 后各组变化较大,规律性不明显。方差分析表明,各试验组与空白组之间的氨化细菌总数无显著差异($p > 0.05$),这说明在试验浓度范围内,恩诺沙星对氨化细菌总数变化的影响不显著。

2.2.4 硝化细菌 在不同采样时间,各试验组测得硝化细菌对数值的变化如表 3 所示。方差分析表明,各组间差异不显著($p > 0.05$)。这表明在试验浓度范围内,恩诺沙星加入与否及其浓度大小不会影响水体中硝化细菌的数量变化。

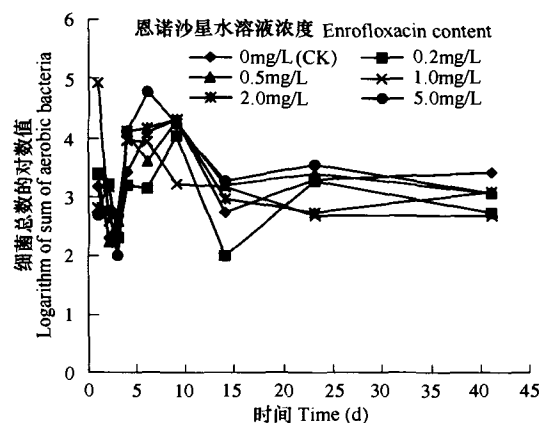


图 3 恩诺沙星对好氧细菌总数的影响

Fig.3 Effect of enrofloxacin on sum of water aerobic bacteria

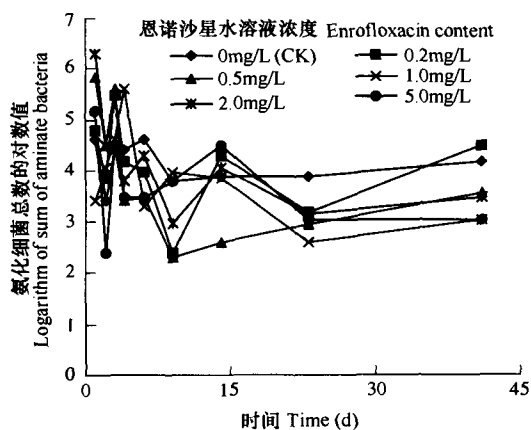


图 4 恩诺沙星对水体氨化细菌的影响

Fig.4 Effect of enrofloxacin on sum of water amine bacteria

表 3 各试验组硝化细菌总数的对数值

Table 3 Logarithm of sum of nitrobacteria in water in experimental trials

采样时间(d)	0mg/L	0.2mg/L	0.5mg/L	1mg/L	2mg/L	5mg/L
1	4.0414	2.0414	0.8451	1.4771	3.0414	1.6021
2	1.4771	1.6021	0.8451	3.1461	2.3010	0.9542
3	1.4771	0.4771	0.0414	0.1761	0	2.3979
4	1.3010	1.5441	2.1461	-0.1549	1.1761	0
6	3.1461	2.1461	3.1461	3.0414	1.6021	1.6021
9	1.4771	4.0414	4.0414	2.4771	2.6021	2.3010
14	4.1461	4.1461	4.1461	2.6021	4.1461	4.0414
23	2.8751	3.6532	1.5441	2.3010	1.3010	3.1461
41	2.5441	4.4771	3.4771	3.6532	3.1461	1.6021

3 讨论

3.1 恩诺沙星对水体微生物数量的影响

影响水体微生物种类和数量的因素较多,如水温、外界气压、微生物可利用养分、水体中的 DO 等^[9]。在

本试验中,空白组与各试验组各类微生物的变化趋势均相似,无显著差异,表明在试验浓度范围内,水体中恩诺沙星初始浓度的高低不会影响到水生微生物数量的变化,其原因可能与恩诺沙星在水环境中消失较快有关。本文中恩诺沙星在水体中的初始浓度为 $0.2 \sim 5 \text{ mg/L}$, 主要因为恩诺沙星是治疗用兽药,在采用《中华人民共和国兽药典》规定的最大治疗用量时,恩诺沙星在鸡粪中排出的最高浓度为 41.45 mg/L ^[7]。由于鸡粪进入水体时会被稀释,因此实际水体中恩诺沙星的浓度要低于本试验所采用的最高浓度,这就表明按《中华人民共和国兽药典》规定的治疗用量,随排泄物进入水体的恩诺沙星不会对微生物数量造成明显影响。

该结果与 Dijck 等^[10]的研究结果类似,他们通过研究认为饲料中添加的抗菌素对土壤和水中的微生物影响较小。但也有不同的结论,王加龙等人^[11]的研究表明,高浓度的恩诺沙星(1 mg/kg 土)对土壤的呼吸作用、氨化作用和硝化作用均有不同程度的抑制作用,可能会影响到土壤的特性和土壤中的一些生态过程。Wollenberger 等人^[12]则报导畜禽常用的抗菌药甲硝唑、喹乙醇、土霉素、萘啶酸、泰乐菌素等对水环境有潜在的不良效应。

3.2 恩诺沙星对水体的生态效应

水生生物和淤泥是水体微宇宙的重要组成部分。恩诺沙星进入水体后,可能通过水解、水体颗粒物吸附沉降、底泥吸附、生物降解和生物富集等途径消除。本试验中,由于恩诺沙星在微宇宙中的降解与其在自然水(无淤泥)中的降解相似,表明在水体中恩诺沙星消失的主要途径是降解。同时,土壤对恩诺沙星的吸附试验表明,土壤对水相中的恩诺沙星有吸附作用,在恒温振荡条件下的吸附平衡时间为 33 h ^[13],本次试验表明在试验开始后 5 h 左右水体中恩诺沙星的浓度已经降至原浓度的 50% 以下,这也提示进入水生微宇宙的恩诺沙星在尚未被淤泥大量吸附时,就已大部分被降解。但是,底泥吸附对兽药在水环境中消失的影响也不容忽视。Kummerer^[14]报道环丙沙星进入水体后,会被沉积物所吸附,在水体中消失的环丙沙星中有 65% 进入到污泥中。因此恩诺沙星在水体中被降解的同时,有一部分将进入底泥。由于恩诺沙星的降解以光解为主,因此进入底泥的恩诺沙星可保持较长时间,并可通过底泥的解吸作用向水体缓慢释放恩诺沙星。这也解释了本试验中,恩诺沙星在微宇宙中降解到较低浓度时,降解速率变慢,并可在低浓度维持较长时间。

恩诺沙星在低浓度下保持较长时间,虽然对水体微生物的数量没有形成显著影响,但微生物长时间与低浓度药物接触,很容易导致微生物耐药性的产生;同时,根据恩诺沙星的正辛醇/水分配系数值可知,恩诺沙星有一定的亲脂性,较易在生物体内累积,最终影响人类的健康。Migliore 等^[15]的研究表明,恩诺沙星可以在作物中富集,并体现出一定的植物毒性。由此可见,恩诺沙星进入水体后,依然存在一定的生态风险。

尽管水体微宇宙具备了自然水生态系统的结构与功能^[16],但与真实系统之间毕竟存在差异,因此在结果外推时必须考虑野外自然状况所存在的不确定性因素,如生物组成更加多样;群落更大更复杂;环境条件更加复杂,往往不仅仅药物一个因素,甚至还有其它污染物;野外大面积的水生态系统所具有的水力学特征与微宇宙有差异;野外光照条件与试验时有一定差异等,这样才能更准确地对恩诺沙星进行生态风险评价。

References:

- [1] Samuelsen O B, Lunestad B T, Ervik A, *et al.* Stability of antibacterial agents in an artificial marine aquaculture sediment studied under laboratory conditions. *Aquaculture*, 1994, (126):283 ~ 290.
- [2] Ingerslev F, Halling B. Biodegradability of metronidazole, olaquinox, and tylosin and formation of tylosin degradation products in aerobic soil manure slurries. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2001, 48: 311 ~ 320.
- [3] Assaf N A, Pothuluri J V, Wang R F, *et al.* Bioassay procedure for the evaluation of erythromycin activity in aquaculture environments. *J World Aquac Soc*, 1999, 30(2): 137 ~ 146.
- [4] Pursell L, Dineen T, Kerry J, *et al.* The biological significance of breakpoint concentrations of oxytetracycline in media for the examination of marine sediment microflora. *Aquaculture*, 1996, (145): 1 ~ 4, 21 ~ 30.
- [5] Coats J R. Model ecosystem evaluation of the environmental impacts of the veterinary drug phenothiazine, sulfamethazine, clopidol, and diethylstilbestrol. *Environ. Health. Perspect.*, 1976, (18):167 ~ 179.
- [6] Herd R, Strong L, Wardhaugh K. Environmental impact of Avermectin usage in livestock. *Vet. Parasitol.*, 1993, 48(special issue):1 ~ 344.

- [7] Wu Y B, Wang ZH S, Liao X D, *et al.* Study on the excretion of enrofloxacin in chicken and its degradation in chicken feces. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2005, 36(10): 1069 ~ 1074.
- [8] Vancutsem P M, Babish J G, Schwark W S. The fluoroquinolone antimicrobials: structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity. *Cormell. Vet.*, 1990, 80(2): 173 ~ 183.
- [9] Li Ch Y, Shi L, Yin XC, *et al.* Study on relationship of water quality to bacterial biomass. *Journal of Qingdao University*, 2001, 16 (4): 37 ~ 41.
- [10] Dijk P V, van de Vooredh. Sensitivity of environmental microorganism to antimicrobial agents. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1976, 31(3): 332 ~ 336.
- [11] Wang J L, Liu J Zh, CHen Zh L, *et al.* Effects of enrofloxacin residues on the function s of soil microbes. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(2): 279 ~ 282.
- [12] Wollenberger L, Halling S B, Kusk K O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 2000, 40(7): 723 ~ 730.
- [13] Wu Y B, Wang ZH S, Liao X D, *et al.* Study on the absorption and desorption of soil to enrofloxacin. *Ecology and Environment*, 2005, 14(5): 645 ~ 649.
- [14] Kummerer K. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources — a review. *Chemosphere*, 2001, (45): 957 ~ 969.
- [15] Migliore L, Cozzolino S, Fiori M. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. *Chemosphere*, 2003, 52: 1233 ~ 1244.
- [16] Xu, X B, Dai S G, Huang Y Y. *Changes and Ecological Effects of Typical Chemical Pollutants in Environment*. Beijing: Science Press, 1998. 9.

参考文献:

- [7] 吴银宝, 汪植三, 廖新伟, 等. 恩诺沙星在鸡体中的排泄及其在鸡粪中的降解. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(10): 1069 ~ 1074.
- [9] 李春雁, 石磊, 殷效彩, 等. 山东月湖水环境因子与细菌生物量相关性的研究. *青岛大学学报*, 2001, 16(4): 37 ~ 41.
- [11] 王加龙, 刘坚真, 陈杖榴, 等. 恩诺沙星残留对土壤微生物功能的影响. *生态学报*, 2005, 25(2): 279 ~ 282.
- [14] 吴银宝, 汪植三, 廖新伟, 等. 土壤对恩诺沙星的吸附与解吸特性研究. *生态环境*, 2005, 14(5): 645 ~ 649.
- [16] 徐晓白, 戴树桂, 黄玉瑶. *典型化学污染物在环境中的变化及生态效应*. 北京: 科学出版社, 1998. 9.