

诺氟沙星在中国对虾养殖环境中的残留规律

孙 铭^{1,2} 李 健^{2*} 常志强² 李吉涛² 赵法箴² 戴芳钰²

(¹ 中国海洋大学水产学院, 青岛 266003)

(² 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

摘 要 研究了药浴给药和药饵给药两种方式下, 诺氟沙星(NFLX)在中国对虾养殖环境中的残留、迁移、富集等动态变化规律, 以期为其生态风险评价提供参考数据。结果表明, NFLX 进入中国对虾养殖池塘后, 水体中药物浓度迅速下降, 两种给药方式下, 最高浓度均不超过 40 μg/L。底泥表现出明显的吸附积累, 而且长时间保持吸附残留。在药浴给药方式下, 底泥中的药物浓度最高可达 4 375.76 μg/kg。

关键词 对虾; 养殖环境; 诺氟沙星; 残留规律

中图分类号 S948 文献标志码 A 文章编号 1000-7075(2014)01-0068-06

Residual dynamics of norfloxacin in *Fenneropenaeus chinensis* culture environment

SUN Ming^{1,2} LI Jian^{2*} CHANG Zhi-qiang² LI Ji-tao²
ZHAO Fa-zhen² DAI Fang-yu²

(¹ Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(² Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

ABSTRACT The distribution, accumulation and transfer dynamics of norfloxacin (NFLX) in water and sediments of *Fenneropenaeus chinensis* culture ponds were studied to assess the ecological risk of norfloxacin residue on aquaculture ecosystem. Norfloxacin was administrated by two different ways, water bathing and feed administration. The concentration of NFLX in the water decreased rapidly, and the highest concentration was less than 40 μg/L in both delivery ways. NFLX was absorbed and accumulated in the sediments, which reached the concentration up to 4 375.76 μg/kg when the medicine was delivered by water bathing.

KEY WORDS *Fenneropenaeus chinensis*; Culture environment; Norfloxacin; Residue

近几年, 随着对虾养殖业的快速发展, 抗菌药在水产养殖业中大量使用。氟喹诺酮类药物是水产养殖中常

国家虾产业技术体系(CARS-47)、公益性行业(农业)科研专项经费项目(201103034)、科技部农业科技成果转化资金项目(2010GB23260589)

和 2012 年中国水产科学研究院院级基本科研业务费专项(2012A1002)共同资助

* 通讯作者。E-mail: lijian@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85830183

收稿日期: 2012-12-09; 接受日期: 2013-06-13

作者简介: 孙 铭(1986-), 女, 博士研究生, 主要从事对虾健康养殖研究。E-mail: shanshan8543@sina.com, Tel: 13863959281

用的抗菌药之一,常用的给药途径包括饵料口服或药浴浸泡。在抗菌药使用过程中,60%~85%的抗菌药随对虾粪便排泄,最终汇入水体,或随悬浮物沉降汇集于沉积物底部(Halling *et al.* 1998)。诺氟沙星是喹诺酮类药物代表之一,因为分子结构中引入了疏水性的氟原子及亲水性的吡嗪环,使其抗菌活性得到增强(郭海燕等 2008),在水产养殖上广泛应用于细菌性疾病的预防与治疗。但此类药物随着养殖用水的排放进入土壤或水体中,污染地表水、地下水和饮用水,并通过作物吸收和积累进入食物链,对动物和人体健康造成潜在危害。进入水体的抗生素成为水资源安全利用的巨大挑战,因此其在环境中的残留已引起极大的关注。

目前,尽管国内已开展诺氟沙星在日本沼虾、中华鳖、鲤、斑节对虾、凡纳滨对虾及中国对虾等水产动物体内的研究(何平等 2008;陈文银等 1997;张雅斌等 2000;房文红等 2003,2004;孙铭等 2011),但这些研究主要集中在单一物种的药物代谢动力学及积累与残留上,从生态水平上来研究诺氟沙星在对虾养殖系统中的残留规律还未见报道。美国、欧盟禁止诺氟沙星用于鱼类,因此国外少见诺氟沙星在水产动物体内的药物代谢及残留研究报道。抗菌药不同于其他农药和有机物,尽管它在环境中的浓度较低,但对环境生态和人类健康具有一定的危害。进行抗菌药的安全性评价,首先必须了解它在环境中的转化和归趋。本研究模拟实际养殖条件,研究了诺氟沙星在药浴给药和药饵给药两种方式下进入水体后,诺氟沙星在中国对虾养殖系统中的环境行为变化,包括诺氟沙星在水体和底泥的分布及其迁移、分配、富集等变化过程,为更好地认识诺氟沙星在环境中的残留、迁移、归趋过程及评价诺氟沙星在对虾养殖生态系统中的环境污染状况提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器和材料

1.1.1 主要仪器和设备

Agilent-1100 型高效液相色谱仪;G1321A 荧光检测器;数据处理系统,Windows NT4.0 惠普工作站;液相色谱专用微量注射器 50 μ l;PA/SA 精密电子天平;Eppendorf 5804 R 高速台式离心机;MS3 漩涡振荡器;HSC-24B 型氮吹仪及其配套 HSC-24B 型数控恒温水浴;XHF-D 高速分散器;SB5200 超声波清洗机;SZ-93 自动双重纯水蒸馏器;0.22 μ m 滤膜。

1.1.2 试验动物

试验时间为 2011 年 7 月 2~22 日,为期 21d。健康中国对虾,平均体重(4.95 \pm 0.3)g,购于山东胶州宝荣水产科技有限公司。试验前暂养 7d,水温(28 \pm 1) $^{\circ}$ C,盐度为 18,连续充氧。

1.1.3 水和底泥

中国对虾养殖系统的水来自曝气 24h 的海水,底泥采自山东胶州宝荣水产科技有限公司养殖场池塘。

1.1.4 实验药品与试剂

诺氟沙星标准品(99.5%)、诺氟沙星原粉(纯度为 94.78%)购于武汉刚正生物科技有限公司,乙腈和甲醇为色谱纯,磷酸、三乙胺、正己烷均为分析纯。

1.2 给药方式

1.2.1 药浴给药

准确称取诺氟沙星 20g,用 1mol/L NaOH 溶液溶解,加入试验水样中并混匀,使水中诺氟沙星浓度为 10mg/L。连续药浴 5d,整个试验期间不换水。

1.2.2 药饵给药

准确称取 1.5g 诺氟沙星原粉,加入 1 000g 无药物残留饵料混合后制成药物浓度为 30mg/kg \cdot bw 的药饵。连续投喂 5d,每天投喂 4 次。

1.3 饲养管理及取样

中国对虾养殖系统采用大棚内养殖系统,在体积 3m³ 的水泥池中放入 5cm 深底泥,加入曝气海水 2m³,采

用自然光照。静置 48h 后,放入中国对虾,连续充气。健康中国对虾随机分在 6 个 3m³ 的水泥池里,药浴和药饵各 3 个池子,每池 46 尾,连续充气,暂养 7d 后用于实验。另设 1 个空白对照。

试验期间每日投喂 4 次(即 06:00、10:00、14:00、20:00 各投喂 1 次),日投喂量按虾体重的 2% 计(药浴给药组投喂空白饵料,药饵给药组投喂完药饵后,再投喂空白饵料)。

给药结束后,分别在 0.5、2、4、6、9、12、24、48、96、144、216、288、384h 取底泥和水样,每一个时间点随机取 6 个平行用于药物分析。试验期间对虾无死亡、蜕皮及行为不适等相关症状。另取未给药的底泥、水样做空白对照。全部样品于 -20℃ 冷冻保存用于药物分析。

1.4 样品的处理

1.4.1 水样的处理

取 10ml 水样,12 000r/min 离心 10min,0.22μm 滤膜过滤,使用 LC-18 小柱浓缩,6ml 甲醇和 8ml 乙腈活化,10ml 溶液过柱后,用 10ml 甲醇洗脱,然后在 40℃ 恒温水浴条件下氮气吹干,残留物用 1ml 流动相超声溶解,0.22μm 滤膜过滤,滤液用于 HPLC 分析。

1.4.2 底泥的处理

称取 2.00g 的底泥样品,加入 5ml 乙腈提取液,充分研磨搅拌,振荡 30s,超声波超声 3min,3 000r/min 离心 5min,取出上层溶液后,剩余物再重复 1 遍,合并两次上层溶液,12 000r/min 离心 10min,过 0.45μm 滤膜后,LC-18 小柱净化,6ml 甲醇和 8ml 乙腈活化,上层溶液过柱后,用 10ml 甲醇洗脱,然后在 40℃ 恒温水浴条件下氮气吹干,残留物用 1ml 流动相超声溶解,0.22μm 滤膜过滤,滤液用于 HPLC 分析。

1.5 方法

1.5.1 标准曲线及检测限

将配置的浓度为 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、5μg/ml 诺氟沙星标准溶液,依次从低浓度到高浓度进行 HPLC(Agilent-1100 型)测定。用荧光检测器检测,记录其峰面积。以诺氟沙星浓度为横坐标(x),峰面积为纵坐标(y)做标准曲线。进行回归分析,求出回归方程和相关系数及曲线估计标准误差。

最低检测限根据公式 $LOD = 3 \times V \times C / (S/N)$ 计算。式中, V 为进样体积(ml), C 为最小检测浓度(μg/ml), S/N 为信噪比。

1.5.2 回收率及精密度

一组取 0.1、0.5、1、5μg/ml 4 个水平的诺氟沙星标准液各 1ml,分别加入 1ml 水样和底泥两种空白样品中,每个浓度有 3 个平行,处理样品后进行 HPLC 测定;另一组为标准溶液经处理后进行 HPLC 测定。按照公式计算回收率。回收率 = (处理前加入标准液样品的测定值/标准溶液的测定值) × 100%。

取 0.1、0.5、1、5μg/ml 不同浓度诺氟沙星标准液,分别加入水样和底泥两种空白样品中,经处理后,制得的各浓度样品于 1d 内分别重复进样 5 次和连续进样 5d 测定,计算各浓度水平响应值峰面积的变异系数 $C.V.$

1.5.3 测定条件

柱子条件:Agilent TC-C18(5 μm,250 × 4.6 mm, I. D);流动相:乙腈:0.01 mol/L 的磷酸溶液(三乙胺调节 pH 至 3.42) = 16:84(V/V);流速 1.0ml/min;荧光检测器:激发波长 280nm,发射波长 450nm;柱温 30℃;手动进样量 20 μl。

2 结果

2.1 NFLX 的 HPLC 分析

以 HPLC 测得的峰面积为纵坐标(y),相应的浓度为横坐标(x)绘制标准曲线,得线性方程 $y = 1\,973.03x + 58.72$, $R^2 = 0.9997$ 。方法检测限为 0.02μg/ml。在各空白样品中,添加 4 个不同浓度水平的 NFLX 标准溶液,使水样中 NFLX 含量分别为 0.01、0.05、1、5μg/ml,底泥中 NFLX 含量分别为 0.01、0.05、1、5μg/mg,进行回

收率实验,其回收率为 69.3%~75.2%。各样品日内(5次)精密密度为 1.32%~5.21%,日间(5次)精密密度在 2.92%~8.31%之间。该检测方法可靠、重复性良好,其准确度和精密密度均符合残留分析的要求。

2.2 NFLX 在水体、底泥中的分布及残留

两种给药方式下,NFLX 在水体的变化趋势如图 1。药浴给药条件下,NFLX 含量变化趋势呈先下降、再上升、后下降的趋势。在停止给药后 0.5 h,NFLX 浓度最高,为 38.15 $\mu\text{g/L}$,在 288h 时,NFLX 含量最低,浓度为 10.28 $\mu\text{g/L}$ 。药饵给药下,NFLX 含量变化趋势有所不同,呈先上升、后下降的趋势。NFLX 含量在 6h 达到高峰,浓度为 23.54 $\mu\text{g/L}$,在 288h 时,NFLX 含量最低,浓度为 6.86 $\mu\text{g/L}$ 。两种给药方式下,水体中 NFLX 的含量均较低。

两种给药方式下 NFLX 在底泥中的变化趋势见图 2。比较图 1 和图 2 可以看出,药浴给药条件下,底泥中 NFLX 含量变化趋势与水体中 NFLX 含量变化趋势相同。在停止给药后 0.5h NFLX 浓度最高,为 4 375.76 $\mu\text{g/kg}$ 。药饵给药下,NFLX 含量在停止给药后 0.5h 最高,浓度为 3 371.81 $\mu\text{g/kg}$,随后 NFLX 浓度下降,在 288h 时,几乎检测不出 NFLX 残留。底泥中的 NFLX 含量明显较水体中的 NFLX 浓度高,约为水体中 NFLX 含量的 100 倍。试验初期,诺氟沙星的降解速度很快,停止给药后 2h 左右,浓度已降至初始浓度的 50%以下,之后随着时间的推移,降解速度逐步减慢,并在低浓度中维持较高时间。

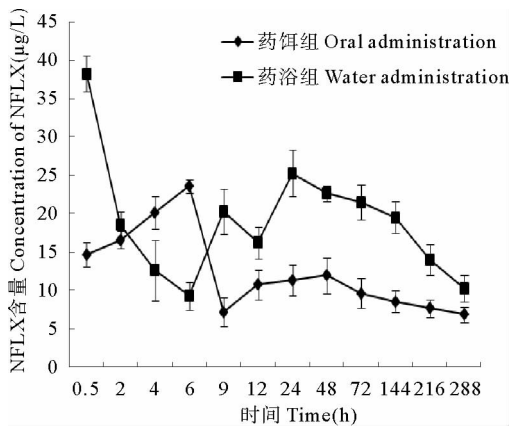


图 1 水体中 NFLX 的变化

Fig. 1 The variation of NFLX in the pond water

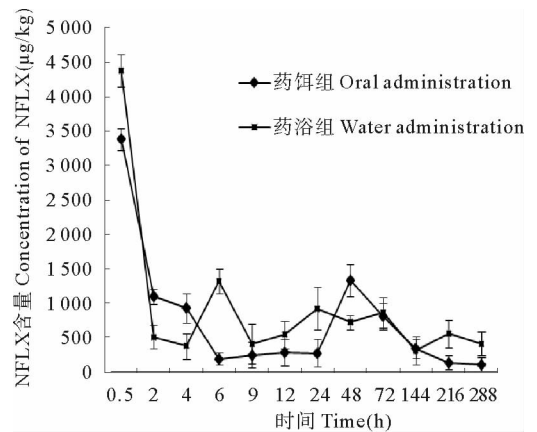


图 2 底泥中 NFLX 的变化

Fig. 2 The variation of NFLX in the sediments

3 讨论

3.1 两种给药方式下 NFLX 在水体、底泥中的变化

两种给药方式下,水体中 NFLX 的含量总体呈下降趋势,是水体中诺氟沙星不断向生态系统其他组分转移的结果,如被底泥、悬浮物等吸附、吸收;同时,在自然光照射下,水体中的诺氟沙星会发生光降解。药饵给药方式下,(0.5~6)h 水体中 NFLX 呈上升趋势,原因是药饵给药后,只有一部分药饵被对虾摄食,未被对虾摄食的药饵逐渐溶解进入水体,使水体中 NFLX 浓度逐渐升高,在 6h 后急剧下降,可能部分水解,部分被底泥吸附。药饵给药下,(9~48)h 水体中 NFLX 浓度回升,药浴给药下(6~24)h,水体中 NFLX 浓度回升,表明诺氟沙星可能在固相基质的吸附位点积累,然后再慢慢释放到环境中(Sassman *et al.* 2005),也可能是对虾体内 NFLX 代谢进入水环境中。据孙 铭等(2011)研究报道,经药浴给药后,中国对虾鳃中 NFLX 从 9h 开始急剧下降,在 48h 消除到 0,肝胰腺中 NFLX 从 9h 急剧下降;经药饵给药后,肌肉和肝胰腺中 NFLX 在(4~48)h 呈下降趋势。随后,水体中 NFLX 浓度逐渐下降。

药浴给药方式下,0.5h 后底泥药物含量达到峰值,且浓度较高,说明 NFLX 容易被底泥吸附。随后 NFLX

含量逐渐降低,在2d又略有回升,原因估计是对虾代谢粪便的不断沉积造成。之后由于养殖系统中各生物对NFLX的降解以及NFLX自身的降解作用,底泥中NFLX含量又缓慢下降。从两种给药方式可以看出,底泥具有很强的吸附、积累作用。王 冉等(2006)报道,抗菌药物在底泥中吸附的强弱顺序依次为四环素类>大环内酯类>氟喹诺酮类>磺胺类>氨基糖苷类>青霉素类,说明底泥对氟喹诺酮类药物的吸附能力属于较高水平,底泥的理化性质在很大程度上也影响底泥对药物的吸附(俞道进等 2008)。诺氟沙星在底泥中具有强滞留性和解吸过程的滞后效应,预示其在环境中长期滞留。因此,长期低水平暴露下可能会诱导细菌对药物产生耐药性,造成潜在的生态风险(张劲强等 2007)。除了吸附作用,抗菌药物在环境中可能发生水解、光解和生物降解等一系列降解反应。生物降解是抗菌药物在环境中降解的最重要的途径。Lai等(1995)、Chien等(1999)发现氯霉素和土霉素在鱼塘沉积物中的微生物作用下可以发生微生物降解;吕玄文等(2007)从鱼塘沉积物中筛选出了能够降解氯霉素的高效降解菌CSFO-3,并初步推测了氯霉素的微生物降解途径。李保莹等(2010)从长期受诺氟沙星污染的土壤中筛选出了能够降解诺氟沙星的真菌NFX3,初步鉴定为常见青霉。但是微生物降解易受环境因素影响,与pH、水分、温度、氧气、土壤类型、环境介质和抗菌药物使用种类和剂量有关,并且降解半衰期很长。两种给药方式下,水体和底泥中诺氟沙星含量有所差异,可能因为不同给药方式影响了水环境因素,导致了微生物降解程度的不同。药浴给药下,水环境中的诺氟沙星含量较初始含量有大幅度降低,可能是由于在该养殖环境下,底泥中真菌NFX3大量繁殖,对诺氟沙星起了很大的降解作用。

了解抗生素在水环境中的转化和归趋,是进行其环境安全性评价的必要前提。目前,已有许多学者研究了抗生素在水环境中的残留消除规律,但由于研究对象及试验条件的不同,研究结果也有一定的差异。周孝治等(2007)研究了三氯异氰尿酸(TCCA)在模拟水生态系统中的归趋,结果表明TCCA除发生水解外,其余或被水生生物吸收,或者沉降进入底泥。Huang等(2007)研究了壬基苯酚在水环境中的分布与迁移,结果表明,61.99%的壬基苯酚沉积到底泥,34.89%的壬基苯酚分布在水体中。吴银宝等(2006)的研究表明,恩诺沙星在水环境中能很快降解到初始浓度的50%,且随着时间的推移,降解速度减慢,本研究的结果与上述结果相似。陈菊芳等(2007)研究了不同给药方式下环丙沙星在模拟水生态系统中的归趋,其结果表明,药饵给药条件下,环丙沙星在底泥中的变化趋势是先升高、后下降,本研究与上述文献给药后采样时间明显不同,导致结果的差异。

3.2 诺氟沙星对水体和底泥的生态效应

水生生物和底泥是水生生态系统的重要组成部分。诺氟沙星进入水体后,主要通过水解、光降解、生物降解及底泥吸附等途径消除。Kummerer(2001)报道另一种喹诺酮类药物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有65%进入到污泥中。诺氟沙星进入水体被降解的同时,有一部分将进入底泥。诺氟沙星是用来治疗细菌性疾病的,其进入底泥中,会对底泥的微生物产生一定影响,使有益微生物和细菌受到潜在威胁,影响生态平衡。有研究报道,诺氟沙星经动物排泄进入土壤后,对土壤微生物产生广泛的效应,会引起微生物种群的数量和组成发生变化,且诺氟沙星化学性质稳定,在环境中降解缓慢。长期低浓度的残留,很容易导致微生物耐药性的产生。马 驿等(2012)报道,100 $\mu\text{g}/\text{g}$ 的诺氟沙星能显著影响土壤细菌的数量,且药物浓度越高,细菌数量越少。除了对底泥微生物产生影响,彭金菊等(2009)报道,池塘水中诺氟沙星含量大于或等于8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,水体中耐药菌显著增加。

4 结论

本研究采用两种不同给药方式研究了诺氟沙星在中国对虾养殖系统中的残留消除规律。结果表明,NFLX进入中国对虾养殖系统后,水体中药物浓度迅速下降。底泥表现出明显的吸附积累,而且长时间保持吸附残留。因此,使用该类药物引起的环境安全问题值得重视。

参 考 文 献

- 王 冉, 刘铁铮, 王 恬. 2006. 抗生素在环境中的转归及其生态毒性. 生态学报, 26(1): 265-270
- 吕玄文, 冯茜丹, 党 志. 2007. 氯霉素降解菌的驯化、筛选及分离鉴定. 农业环境科学学报, 26(4): 1477-1481
- 孙 铭, 李 健, 张 喆, 王静凤. 2011. 诺氟沙星2种不同给药方式在中国对虾体内的残留及消除规律研究. 中国海洋大学学报(自然科学版), 41(5): 43-48
- 李保莹. 2010. 土壤中诺氟沙星的吸附与微生物降解研究. 见: 郑州大学硕士研究生学位论文
- 吴银宝, 汪植三, 廖新伟, 陈杖榴. 2006. 恩诺沙星对小型模型水生态系统中微生物的影响. 生态学报, 26(8): 2640-2645
- 何 平, 尹文林, 沈锦玉. 2008. 诺氟沙星在淡水青虾体内药物代谢动力学研究. 浙江海洋学院学报, 27(2): 135-139
- 张雅斌, 张祚新, 郑 伟, 刘艳辉, 杨永胜, 张锦霞, 吴永魁. 2000. 不同给药方式下鲤对诺氟沙星的药代动力学研究. 水产学报, 24(6): 559-563
- 张劲强, 董元华. 2007. 诺氟沙星在4种土壤中的吸附-解吸特征. 环境科学, 28(9): 2134-2140
- 陈文银, 印春华. 1997. 诺氟沙星在中华鳖体内的药代动力学研究. 水产学报, 21(4): 434-437
- 陈菊芳, 周孝治, 聂湘平, 江天久. 2007. 不同给药方式下环丙沙星在模拟水生态系统中的归趋. 生态学报, (12): 5300-5307
- 周孝治, 陈菊芳, 聂湘平, 江天久. 2007. 三氯异氰尿酸在模拟水生态系统中归趋的研究. 生态科学, 26(4): 361-366
- 房文红, 杨先乐, 周 凯. 2004. 诺氟沙星在凡纳滨对虾不同组织中处置和消除规律. 水产学报, 28(增刊): 19-24
- 房文红, 邵锦华, 施兆鸿, 杨宪时. 2003. 斑节对虾血淋巴中诺氟沙星含量测定及药代动力学. 水生生物学报, 27(1): 13-17
- 俞道进, 曾振灵, 陈杖榴. 2008. 土霉素残留在模型池塘生态系统中的消除与迁移规律. 应用与环境生物学报, 14(3): 403-407
- 郭海燕, 张其中. 2007. 诺氟沙星在水产动物体内的药物动力学及残留研究. 水产养殖, 28(1): 1-3
- 彭金菊, 马 驿, 杨 明, 安守文, 曾令军. 2009. 诺氟沙星诱导水生细菌产生耐药性的最低选择浓度的调查. 中国兽药杂志, 43(6): 12-14
- Chien YH, Lai HT, Liu SM. 1999. Modeling the effects of sodium chloride on degradation of chloramphenicol in aquaculture pond sediment. The Sci Total Envir 239(1-3): 81-87
- Huang GL, Hou SG, Wang L and 1 other. 2007. Distribution and fate of nonylphenol in an aquatic microcosm. Water Res 41(20): 4630-4638
- Halling SB, Nors NS, Lanzky PF. 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—a review. Chemosphere 36(2): 357-393
- Ingerslev F, Torang L, Loke ML and 2 others. 2001. Primary biodegradation of veterinary antibiotics in aerobic and anaerobic surface water simulation systems. Chemosphere 44(4): 865-872
- Kummerer K. 2001. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources—a review. Chemosphere 45(6-7): 957-969
- Lai HT, Liu SM, Chien YH. 1995. Transformation of chloramphenicol and oxytetracycline in aquaculture pond sediments. J Environ Sci Health A30(9): 1897-1923
- Sassman SA, Lee LS. 2005. Sorption of three tetracyclines by several soils: assessing the role of pH and cation exchange. Environ Sci Technol 39(19): 7452-7459