

恩诺沙星对雨生红球藻的生长抑制毒性测定

吴银宝¹, 廖新伟¹, 汪植三¹, 陈杖榴², 王耀满¹

(1 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642;

2 华南农业大学 广东省兽药研制与安全评价重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:以雨生红球藻 *Haemafococcus pluvialis* 为研究对象, 测定了恩诺沙星对雨生红球藻的生长抑制毒性. 结果表明: 在 25 ℃ 条件下, 24 h 时恩诺沙星对雨生红球藻的生长不产生抑制的最高质量浓度为 50 μg/mL, 致使雨生红球藻完全死亡的最低质量浓度为 180 μg/mL. 随着时间的延长, 雨生红球藻对恩诺沙星的耐受力增强. 24、48 h 时恩诺沙星对雨生红球藻的 EC₅₀ 分别为 119.67 和 152.29 μg/mL. 在天然水体中恩诺沙星不会对雨生红球藻的生长造成直接的抑制毒性.

关键词: 恩诺沙星; 雨生红球藻; 生长抑制

中图分类号: TS811.5; X502.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X (2005) 04-0099-03

The growth inhibition toxicity of enrofloxacin to *Haemafococcus pluvialis*

WU Yin-bao¹, LIAO Xin-di¹, WANG Zhi-san¹, CHEN Zhang-liu², WANG Yao-man¹

(1 College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China; 2 Guangdong Key Laboratory for Veterinary Drug Development and Safety Evaluation, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The growth inhibition toxicity of enrofloxacin to *Haemafococcus pluvialis* was studied at 25 ℃. The results showed that the maximum concentration of enrofloxacin that could not have inhibition to the growth of experimental alga was 50 μg/mL; the minimum concentration that caused all alga die was 180 μg/mL. The sensitivity of *H. pluvialis* to enrofloxacin decreased along with the time extension. The EC₅₀ of enrofloxacin to *H. pluvialis* were 119.67 and 152.29 μg/mL at 24 and 48 h, respectively. Enrofloxacin didn't have growth inhibition toxicity to *H. pluvialis* in nature water.

Key words: enrofloxacin; *Haemafococcus pluvialis*; growth inhibition

恩诺沙星(enrofloxacin)是畜禽养殖业中广泛应用的抗菌药之一, 主要用于治疗畜禽细菌性疾病和支原体感染^[1]. 恩诺沙星在体内的主要代谢产物为原形及环丙沙星(ciprofloxacin), 而且代谢物生成与消除缓慢, 在体内分布广泛^[2,3]. 1999年中国对恩诺沙星在畜禽产品中的最高残留限量进行了修订, 其范围在 100~300 μg/kg 之间^[4]. 恩诺沙星进入动物体后, 除在动物产品中残留外, 其原形及代谢产物还会随排泄物进入环境^[5], 从而对生态环境产生影响. 藻类是水生生态系统的初级生产者, 其种类和数量的变化直接影响到鱼、虾等水产业的发展, 进而影响

到水生生态系统的结构和功能. 同时藻类广泛存在于各类水体, 生长繁殖迅速, 对毒物敏感, 是研究水生生态毒理学的很好的测试生物^[6,7]. 本文以雨生红球藻 *Haemafococcus pluvialis* 为研究对象, 研究恩诺沙星对雨生红球藻的生长抑制毒性, 旨在为恩诺沙星的生态安全评价提供数据, 对恩诺沙星在畜牧业的合理使用将起到重要作用.

1 材料与方法

1.1 材料

雨生红球藻: 由华南农业大学动物科学学院水

收稿日期: 2005-04-28

作者简介: 吴银宝(1973-), 男, 讲师, 博士. 通讯作者: 陈杖榴(1937-), 男, 教授;

E-mail: chenzt@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(31031040)

产系提供,购自中国科学院武汉水生生物所.

试验用水:自来水,静置 48 h 以上以除氯,其 pH 值为 7.62.

1.2 试剂

微量元素营养液: Na_2EDTA 750 mg/L, FeCl_3 97 mg/L, MnCl_2 41 mg/L, ZnCl_2 5 mg/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 mg/L, Na_2MoO_4 4 mg/L. 灭菌后备用.

藻类培养液: NaNO_3 496 mg/L, K_2HPO_4 39 mg/L, MgSO_4 75 mg/L, CaCl_2 36 mg/L, Na_2SiO_4 58 mg/L, 微量元素营养液 3 mL/L, 土壤浸出液 3 mL/L. 混匀后,用体积分数为 1% 的乙酸溶液调培养液的 pH 值,使其在 7.0~7.5 之间,灭菌备用.

1.3 试验方法

1.3.1 藻种的驯化 将藻种接种到藻类培养液中扩大繁殖,接入藻种 7 d 左右,藻类进入对数生长期. 将此期的藻液以 2 500 r/min 离心 10 min,去除营养液,加入试验用水洗涤,再离心分离,加入试验用水使藻细胞数量为 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,驯化 2~3 d 后即可进行毒性试验.

1.3.2 预备试验 取 10 mL 离心管,加入 0.5 mL 恩诺沙星的系列质量浓度标准液和 4.5 mL 藻液,找出使水藻死亡的最低质量浓度和不产生死亡的最高质量浓度,以确定毒性试验需要的质量浓度系列.

1.3.3 毒性试验 在 50 mL 锥形瓶中加入 18 mL 藻液和 2 mL 恩诺沙星系列标准液,使毒性试验的质量浓度系列为 0、50、75、100、125、150、160、170、180 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,每个质量浓度设 3 个平行样. 混匀后恒温(25.0 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 培养,12 h 光暗循环,有光时光照强 2 000 lx,每天定时振荡 3 次. 在 0、24、48、72、96 h 时,吸取 1 mL 的藻液,加等体积的甲醛,充分混

合后,在血球计数板上进行计数.

1.4 EC_{50} 的计算方法

采用概率单位法计算 EC_{50} (半数有效抑制浓度, effective concentration for 50% reduction in growth). 先求出不同时间各处理组藻细胞平均数,以对照组藻细胞数为 100%,求出各处理组的藻类生长百分率. 查百分比与概率单位对照表得经验概率单位. 以各组经验概率单位和相应藻液中恩诺沙星的质量浓度的对数值作图,拟合曲线,并利用该回归曲线求恩诺沙星对雨生红球藻的 EC_{50} ^[8].

2 结果与分析

预备试验结果表明,使试验水藻完全死亡的最低质量浓度为 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对水藻的生长不产生影响的最高质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,由此确定正式试验的质量浓度系列. 在不同恩诺沙星质量浓度下,试验藻在不同时间的生长结果如表 1 所示.

由表 1 可知,毒性试验进行至 24、48 h 时,试验藻的生长受到恩诺沙星质量浓度的影响,表现出一定的规律性. 此时,以各组经验概率单位和相应藻液中恩诺沙星质量浓度的对数值拟合曲线,可知二者间呈线性相关关系,拟合曲线的结果如图 1 所示. 但此后随着时间的延长,水藻对恩诺沙星的耐受力增强. 72 和 96 h 时,160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下试验组藻类的生长已超过了对照组,尤其是 125 和 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组;160 和 170 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组藻类的生长逐步恢复,但 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组藻类在 24 h 时沉底后生长始终没有恢复;各组经验概率单位和相应藻液中恩诺沙星的质量浓度对数值之间无明显的规律可循.

表 1 恩诺沙星对雨生红球藻生长抑制试验结果¹⁾

Tab. 1 Result of the growth inhibition trial of enrofloxacin to *Haemafococcus pluvialis*

ρ (恩诺沙星 enrofloxacin)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	藻胞浓度 the concentration of alga $\times 10^4/(\text{mL}^{-1})$			
	24 h	48 h	72 h	96 h
0	5.33 ± 0.22	7.08 ± 0.30	8.00 ± 0.29	8.83 ± 0.33
50	5.25 ± 0.38	7.33 ± 0.17	8.17 ± 0.46	9.17 ± 0.65
75	4.42 ± 0.25	6.75 ± 0.43	8.17 ± 0.79	9.58 ± 0.51
100	3.75 ± 0.14	6.08 ± 0.22	8.58 ± 0.51	9.75 ± 0.52
125	3.00 ± 0.25	5.08 ± 0.44	11.42 ± 0.17	10.83 ± 0.96
150	1.83 ± 0.17	4.17 ± 0.44	13.17 ± 0.87	13.25 ± 0.63
160	1.25 ± 0.14	3.17 ± 0.30	8.42 ± 0.22	11.83 ± 0.71
170	0.75 ± 0.14	2.33 ± 0.36	4.50 ± 0.43	6.42 ± 0.96
180	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00

1) 表中数值为平均数 $\pm$ 标准误 ($n=3$)

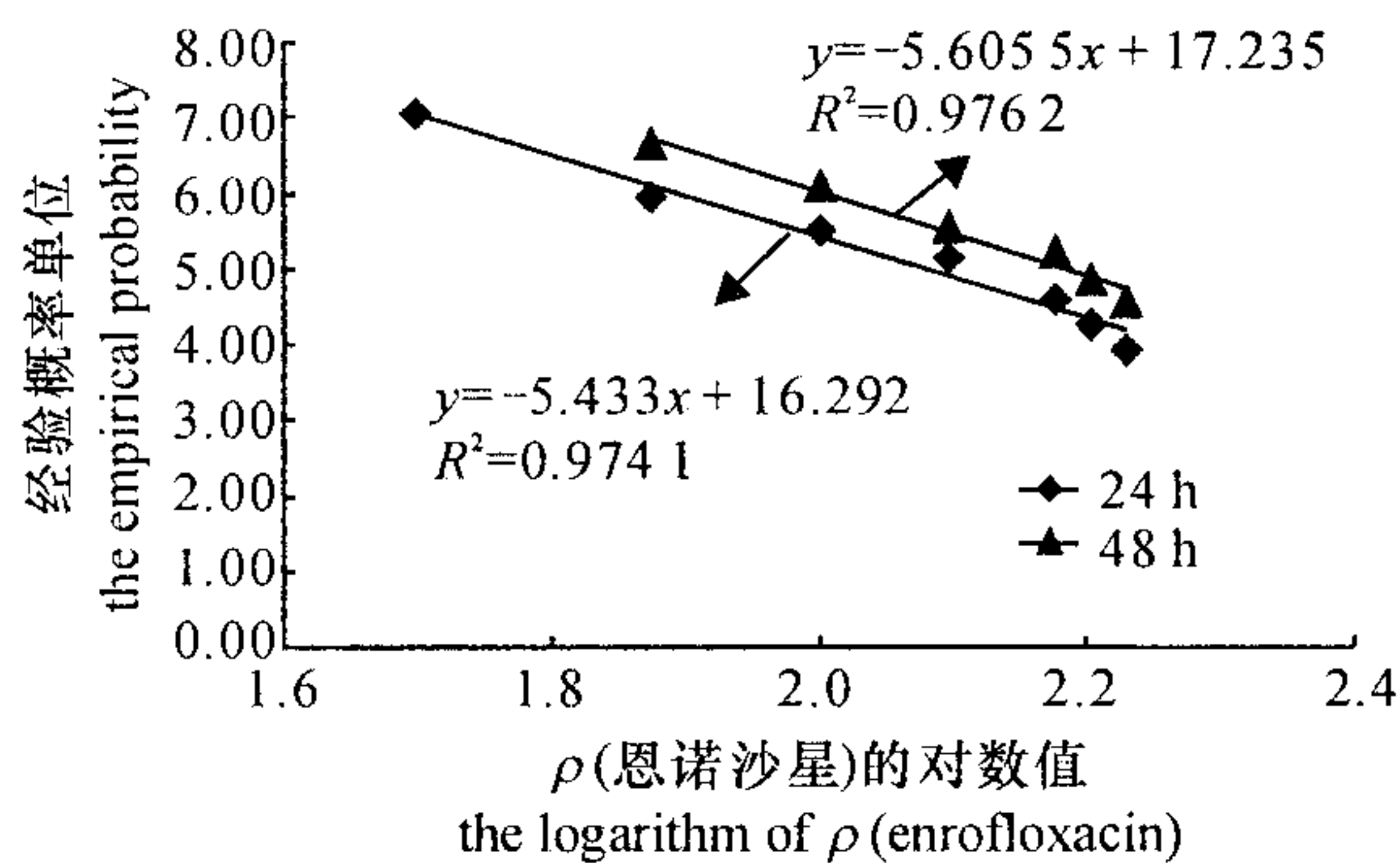


图 1 24、48 h 时恩诺沙星质量浓度对数值与经验概率单位的回归曲线

Fig. 1 Regression curve of the logarithm of the enrofloxacin mass concentration and the empirical probability at 24 and 48 h respectively

利用上述回归曲线可求得 24、48 h 时恩诺沙星对雨生红球藻的 EC_{50} 分别为 119.67、152.29 $\mu\text{g/mL}$ 。本次试验未能得到 96 h 时恩诺沙星对雨生红球藻的 EC_{50} ，不能依据藻类生长抑制毒性分级标准评估恩诺沙星对雨生红球藻的毒性。但由于雨生红球藻对恩诺沙星的耐受力随着时间的延长而增强，96 h 时 160 $\mu\text{g/mL}$ 以下试验组藻类的生长甚至超过了对照组，表明恩诺沙星对试验藻的生长抑制毒性较低。

研究表明，在不同的给药剂量条件下，恩诺沙星在鸡粪尿中的质量浓度较低，而且在室外自然光照下恩诺沙星降解很快^[5]，同时排泄物中的恩诺沙星进入水体后被稀释，因此自然水体中恩诺沙星质量浓度要远低于恩诺沙星对雨生红球藻的 EC_{50} ，不会对其生长造成直接的抑制效应。

3 结论

在 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下，24 h 时恩诺沙星对雨生红球藻的生长不产生抑制的最高质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ ，致使雨生红球藻完全死亡的最低质量浓度为 180 $\mu\text{g/mL}$ ，24、48 h 时恩诺沙星对雨生红球藻的 EC_{50} 分别为 119.67 和 152.29 $\mu\text{g/mL}$ 。恩诺沙星对雨生红球藻的生长抑制毒性较低，在自然水体中不会对其生长造成直接的抑制效应。

参考文献：

[1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典: 二部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000. 186 - 187.

[2] POSYNIK A, ZMUDZKI J, SEMENIUK S. Effects of the matrix and sample preparation on the determination of fluoroquinolone residues in animal tissues [J]. Journal of Chromatography A, 2001, 914 (1 - 2): 89 - 94.

[3] 刘涤洁. 恩诺沙星及其代谢产物在奶山羊的药动学及抗菌药后效应[D]. 广州: 华南农业大学兽医学院, 2000.

[4] 中华人民共和国农业部公告第 235 号. 动物性食品中兽药最高残留限量[S]. 2002 - 12 - 24.

[5] 吴银宝. 恩诺沙星在鸡粪中的残留及其生态毒理学研究[D]. 广州: 华南农业大学动物科学学院, 2003.

[6] 国家环保局. 水和废水监测分析方法[M]. 第 4 版. 北京: 中国环境出版社, 2002. 715 - 721.

[7] 陆光华, 赵元慧, 汤洁. 绿藻对硝基苯类化合物的富集与释放研究[J]. 环境科学研究, 2001, 14(3): 4 - 5, 20.

[8] 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[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 375 - 376.

【责任编辑 柴 焰】