

恩诺沙星对隆腺蚤(*Daphnia Carinata*)的急性活动抑制毒性测定

吴银宝¹, 汪植三¹, 廖新倮¹, 陈杖榴², 郑楠¹

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

摘要:恩诺沙星是在畜禽养殖业中得到广泛应用的抗菌药物。以隆腺蚤(*Daphnia Carinata*)为试验对象,测定了恩诺沙星对隆腺蚤的急性毒性。结果表明,25℃时,24 h 恩诺沙星对隆腺蚤的最大不致死浓度为 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,使隆腺蚤全部死亡的最低浓度为 $120\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;恩诺沙星在 24 h、48 h 时对隆腺蚤的 EC_{50} 分别为 $34.03\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $19.37\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。48 h 时,恩诺沙星对隆腺蚤的 LC_{50} 为 $25.86\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。依据蚤类急性活动抑制毒性分级标准,恩诺沙星对于隆腺蚤属于中毒性化合物。

关键词:恩诺沙星; 隆腺蚤; 急性活动抑制毒性

中图分类号:S859.82 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2005)04-0698-03

The Acute Immobilization Toxicity of Enrofloxacin to *Daphnia Carinata*

WU Yin-bao¹, WANG Zhi-san¹, LIAO Xin-di¹, CHEN Zhang-liu², ZHENG Nan¹

(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)

Abstract:Enrofloxacin is a kind of antibiotics extensively applied in animal husbandry. After application, it would not only remain in the product of animals, but also enter the environment through the excrement. The acute immobilization toxicity of enrofloxacin to *Daphnia Carinata* at 25℃ was studied, in which eight treatments of different concentrations of enrofloxacin and one blank group were included. At 24 h, the minimum concentration was $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ that could not make *Daphnia Carinata* die and the minimum concentration was $120\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ that made *Daphnia Carinata* die all. The sensitivity of *Daphnia Carinata* to enrofloxacin increased with the time extension or the concentration increasing. The EC_{50} (effective concentration for 50% reduction) and LC_{50} (lethal concentration for 50%) of enrofloxacin was calculated using the method of probability unit. The 24h- EC_{50} and 48h- EC_{50} of enrofloxacin to *Daphnia Carinata* were $34.03\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $19.37\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively, and the 48h- LC_{50} was $25.86\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. According to the standard of acute immobilization toxicity to *Daphnia*, enrofloxacin was medium-toxin to *Daphnia Carinata*. When enrofloxacin entered into aquatic ecosystem, its concentration decreased as a result of dilution and the degradation would be very fast, so it had no acute toxicity to *Daphnia Carinata* in natural water.

Keywords: enrofloxacin; *Daphnia Carinata*; acute immobilization toxicity

恩诺沙星(enrofloxacin),是第一个动物专用的氟喹诺酮类药物(fluoroquinolones, FQNs),1987年由德国拜尔公司研制成功并投入使用。目前恩诺沙星已被广泛应用于畜禽养殖业,主要用于治疗畜禽细菌性疾病和支原体感染^[1]。恩诺沙星进入动物体后,不仅会在

动物产品中残留,其原形及活性代谢产物还会随排泄物进入环境,对生态环境产生影响^[2]。目前对恩诺沙星的研究主要集中在畜禽的临床应用、畜禽体内的代谢动力学及其在畜禽产品中的残留等方面^[3-7],尚未从生态毒理学角度研究恩诺沙星进入环境后的毒性效应。

水蚤属甲壳纲、鳃足亚纲的枝角类浮游生物,广泛分布于淡水中,是鱼类的天然饵料,是淡水食物链中重要的一环。它繁殖快,生命周期短,培养简便,对许多毒物敏感,是一种优秀的毒性试验测试生物^[8]。蚤

收稿日期:2005-03-17

基金项目:国家自然科学基金重点项目(31031040)

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

类生物测试系统已被许多国家用于环境污染物的毒理学评价,目前常用于毒性试验的蚤类主要有大型蚤、蚤状蚤、隆腺蚤等^[9]。本文以隆腺蚤(*Daphnia Carinata*)为研究对象,研究了恩诺沙星对隆腺蚤的急性毒性,旨在为恩诺沙星的生态毒理评价提供数据,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

隆腺蚤(*Daphnia Carinata*):采自华南农业大学校内池塘,经哈尔滨师范大学生物系鉴定。

雨生红球藻:由华南农业大学动物科学学院水产系提供,购自中国科学院武汉水生生物所。

恩诺沙星原料药:含量 99.4%,批号 20010515,购自浙江国邦制药厂。

1.2 试验方法

1.2.1 试验蚤种的培养

蚤种在鱼缸内培养,温度控制在 25℃±0.5℃,12 h 光暗循环,有光时光强为 2 000 lx。培养用水为经活性炭过滤并静置 2 d 以上的自来水,以雨生红球藻作为蚤类的食物。毒性试验前 24 h,用吸管将怀卵的母蚤分开培养,24 h 后即可获得供试验用的初生幼蚤。试验开始时试验蚤蚤龄不超过 24 h。

1.2.2 预备试验

取 50 mL 的烧杯,加入 2.5 mL 恩诺沙星的系列浓度标准液和 22.5 mL 试验用水,混匀后,置 4 个蚤,24 h 和 48 h 后观察蚤的活动情况,并在显微镜下判断是否死亡,找出使试验蚤全部死亡的最低浓度和未发生死亡的最高浓度,以确定急性毒性试验需要的浓度系列,使毒性试验中出现 0%、<50%、>50%、100% 蚤类死亡的结果。

1.2.3 急性毒性抑制试验

用 100 mL 的小烧杯,按表 1 加入 5 mL 恩诺沙星的系列浓度标准液和 45 mL 试验用水,混匀,随机加入 10 个水蚤,所有试验蚤必须在 30 min 内分入试液。分完后,放入生化培养箱,试验期间温度控制在 25℃±0.5℃,12 h 光暗循环。每个浓度设 3 个平行样,设空白对照组。试验重复 3 次。

24 h 和 48 h 后观察水蚤的活动情况,轻轻晃动烧杯,水蚤在 15 s 内不能游动作为受抑制的标志,记下受抑制的水蚤数。48 h 后将蚤吸出,在显微镜下观察,以蚤类心跳停止、大触角和刚毛不弹动为死亡标志,记录死亡的水蚤数。试验结束时对照组不活动的

表 1 恩诺沙星对隆腺蚤毒性试验的系列浓度
Table 1 The treatmental concentrations of enrofloxacin in the acute toxicity to *Daphnia Carinata*

编号	试验用水量 /mL	恩诺沙星浓度 /μg·mL ⁻¹	恩诺沙星标液量 /mL	制得恩诺沙星浓度 /μg·mL ⁻¹
1	45	0	5	0
2	45	10	5	1
3	45	25	5	2.5
4	45	100	5	10
5	45	250	5	25
6	45	500	5	50
7	45	750	5	75
8	45	1 000	5	100
9	45	1 250	5	125

水蚤数应不少于 10%,不得有死亡。

1.2.4 EC₅₀(Effective concentration for 50% reduction)和 LC₅₀(半数致死浓度,Lethal concentration for 50%)的计算方法

采用概率单位法,根据各组蚤类的抑制率或死亡率,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恩诺沙星浓度的对数值作图,拟合曲线,并利用该回归曲线求恩诺沙星对隆腺蚤的 EC₅₀ 和 LC₅₀^[9,10]。

2 结果与分析

2.1 恩诺沙星对隆腺蚤的 EC₅₀

恩诺沙星对隆腺蚤的急性毒性抑制试验结果见表 2。由表 2 可知,试验时间的延长、恩诺沙星浓度的增加都会增强恩诺沙星对隆腺蚤的抑制。根据 24 h、48 h 各组蚤类的抑制率,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试验液中恩诺沙星浓度的对数值作图,可知二者呈线性关系,对其拟合曲线可得线性方程如图 1、图 2 所示,经检验相关性显著($P<0.05$)。利用线性方程可求得恩诺沙星在 24 h、48 h 时对隆腺蚤的 EC₅₀ 分别为:34.03±1.32(mg·L⁻¹, $X\pm S.E.$)和 19.37±2.65(mg·L⁻¹, $X\pm S.E.$)。

2.2 恩诺沙星对隆腺蚤的 LC₅₀

预备试验表明,在 25℃条件下,48 h 时恩诺沙星对隆腺蚤的最大不出现死亡的浓度为 1 mg·L⁻¹,当其浓度超过 120 mg·L⁻¹时,试验蚤全部死亡。本次试验用显微镜观察试验蚤的心跳是否停止作为判断水蚤死亡的标准,因此不能得出恩诺沙星对试验蚤 24 h 时的 LC₅₀。

48 h 时,观测试验蚤的死亡情况,得到各组蚤死

表 2 恩诺沙星对水蚤 24、48 h 毒性抑制试验结果

Table 2 The 24 h-EC₅₀ and 48 h-EC₅₀ of enrofloxacin to *Daphnia Carinata*

试验浓度 /mg·L ⁻¹	平均抑制数/个		抑制百分比/%, X±S.E.	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	0	0	0.00±0.00	0.00±0.00
1	0	0.33	0.00±0.00	3.33±3.33
2.5	0.67	1.67	6.67±3.33	16.67±3.33
10	1.67	3.67	16.67±3.33	36.67±3.33
25	2.67	5.33	26.67±3.33	53.33±3.33
50	4.67	7.00	46.67±3.33	70.00±5.77

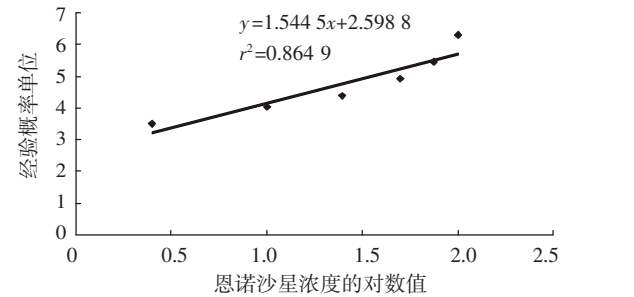


图 1 24 h 时恩诺沙星浓度对数值与经验概率单位(抑制率)的回归曲线

Figure 1 Regression curve of the logarithm of the enrofloxacin concentration and the empirical probability (the inhibition rate) at 24 h

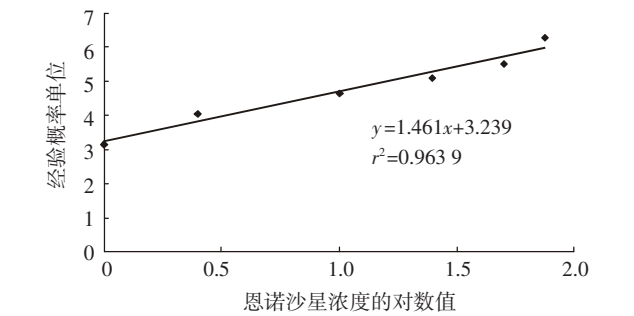


图 2 48 h 时恩诺沙星浓度对数值与经验概率单位(抑制率)的回归曲线

Figure 2 Regression curve of the logarithm of the enrofloxacin concentration and the empirical probability (the inhibition rate)at 48 h

亡率。根据概率单位法,可得出各组经验概率单位和相应恩诺沙星浓度的对数值的线性方程如图 1 所示,经检验相关性显著 ($P<0.05$)。利用线性方程可求得 48 h 时,恩诺沙星对隆腺蚤的 LC₅₀ 为:25.86±1.06 (mg·L⁻¹, X±S.E.)。

依据蚤类急性活动抑制毒性分级标准,恩诺沙星对于隆腺蚤属于中毒性化合物^[9]。虽然在不同给药剂

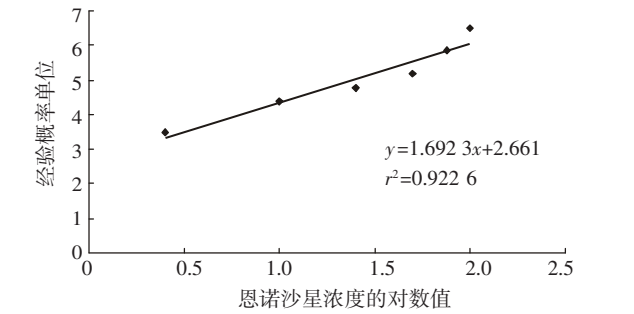


图 3 48 h 时恩诺沙星浓度对数值与经验概率单位(死亡率)的回归曲线

Figure 3 Regression curve of the logarithm of the enrofloxacin concentration and the empirical probability (the mortality rate)at 48 h

量条件下,恩诺沙星在鸡粪尿中排泄的峰浓度要高于其对隆腺蚤的 EC₅₀ 和 LC₅₀,但由于自然光照下恩诺沙星降解很快^[2],而且畜禽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浓度要远低于恩诺沙星对隆腺蚤的 EC₅₀ 和 LC₅₀,不会对隆腺蚤造成直接的急性毒性效应。

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] 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(博士学位论文),2003.100.

[3] Anadon, Matinez-Larranaga M R, Diaz M J, et al. Phatmacokinetes and residues of enrofloxacin in chickens[J].*Am J Vet Res*, 1994, 56(4):501-505.

[4] Banholzer E, Heinritzi K, Steinhausen G.Pharmacokinetics of enrofloxacin in slarghter pigs following different routes of administration[J]. *J Vet Pharmacol Therap*, 1997, 20(1):48.

[5] Dosogne H, Meyer E, Sturk A, et al. Effect of enrofloxacin treatment on plasma endotoxin during bovine Escherichia coli mastitis[J]. *Inflamm Research*,2002, (51):201-205.

[6] Vancutsem P M, Babish J G, Schwark W S. The fluoroquinolone amtimi-crobials; structure, amtimicrobual activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animals and toxicity[J].*Cornell Vet*, 1990, 80(2):173-183.

[7] 肖田安,陈杖榴.氟喹诺酮类药物在动物体内的药动力学研究进展[J].中国兽药杂志,2000,34(1):57-59.

[8] Joseph E, et al. Acute and chronic toxicity of some chlorinated benzenes and tetrachloroethylene to *Daphnia Magna*. *Arch. Environ[J]. Contam Toxicology*, 1983, 12(6):679-684.

[9] 国家环保局.水和废水监测分析方法(第四版)[M].北京:中国环境科学出版社,2002.722-724.

[10] 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.