

三种兽药在不同暴露系统对蚯蚓的急性毒性

刁晓平¹, 孙英健², 孙振钧¹, 沈建忠²

(1. 中国农业大学资源与环境学院, 北京 100094; 2. 中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

摘要: 采用人工土壤法和滤纸法对不同浓度的阿维菌素、安普霉素、磺胺二甲基嘧啶 3 种常用兽药对蚯蚓的急性毒性进行了研究。结果表明, 用土壤法和滤纸法测定的阿维菌素对蚯蚓的半数致死浓度 (LC₅₀) 分别为 17.06 mg · kg⁻¹ 和 4.63 × 10⁻³ mg · cm⁻², 阿维菌素对蚯蚓具有一定的毒性作用, 其皮肤接触毒性比土壤食入毒性更大。用滤纸法测定的安普霉素、磺胺二甲基嘧啶对蚯蚓的半数致死浓度 (LC₅₀) 分别大于 10 mg · cm⁻² 和 15 mg · cm⁻²; 用土壤法测定安普霉素、磺胺二甲基嘧啶对蚯蚓的半数致死浓度 (LC₅₀) 均大于 5 000 mg · kg⁻¹, 表明安普霉素、磺胺二甲基嘧啶对蚯蚓的毒性较低。

关键词: 兽药; 蚯蚓; 急性毒性

中图分类号: X171.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672 - 2043(2004)04 - 0823 - 04

Acute Toxicity of Three Kinds of Veterinary Drugs on Earthworm (*Eisenia fetida*) Under Different Exposure Systems

DIAO Xiao-ping¹, SUN Ying-jian², SUN Zhen-jun¹, SHEN Jian-zhong²

(1. Resources and Environmental College, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. Animal Medicine College, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Veterinary drugs are widely used both therapeutically and growth promoters in animal production. These chemicals undergo little metabolism and most of the dose given to the animal is excreted, relatively unaltered, primarily in the feces and urine. Veterinary drugs, which are suspicious environmental contaminants as they are biologically active, may probably exert effects on terrestrial ecosystem, when they released into the environment. Drugs are harmful to the soil organisms, especially to the soil invertebrates. The fate of veterinary therapeutic agents has aroused attention in recent year as a potential pollutant of the environment. Earthworms are important organisms in the soils and cover 60% ~ 80% of the soil biomass, which makes them one of the most suitable indicating organisms for some chemicals in soils. In the paper we reported the acute toxicity of avermectin B1a, Apramycin and Sulfamethazine on earthworm (*Eisenia fetida*) in different exposure systems. (on filter paper and in artificial soil). Earthworms as test animals, were exposed in different concentrations of three veterinary drugs: Avermectin B1a, Apramycin and Sulfamethazine. The acute toxicity of these three drugs was measured as median lethal concentration values (LC₅₀) of earthworms. The LC₅₀ of Avermectin B1a on earthworms were 24.13 mg · kg⁻¹ and 17.06 mg · kg⁻¹, respectively, for 7 and 14 days in artificial soil. The LC₅₀ on the filter paper for 48 hours was 4.63 μg · cm⁻². However, the LC₅₀ of Apramycin and Sulfamethazine were more than 5 000 mg · kg⁻¹ for 14 days artificial soil test, 10 mg · cm⁻² and 15 mg · cm⁻² for 48 hours contact filter paper bioassay respectively. These outcome led to a conclusion that Avermectin B1a was far more toxic than Apramycin and Sulfamethazine with regard to acute toxicity to earthworm. The results showed that Avermectin has toxic effect on earthworm. Apramycin and Sulfamethazine have no toxic effect on earthworm according to the evaluation standard of pesticides toxicity. The difference of toxicity among three types drugs may depended on the chemical structure, acted mechanism on organisms and other factors. As a biomarker in the soil, Earthworm is available to investigate the acute toxicity of veterinary drugs. However, the comprehensive assessment of the impact of three veterinary drugs to soil ecosystem could not made only by acute toxic test.

Keywords: avermectin B1a; earthworm (*Eisenia foetida*); acute toxicity

收稿日期: 2003 - 12 - 10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30130140)

作者简介: 刁晓平 (1963—), 女, 重庆人, 教授, 中国农业大学资源与环境学院生态学专业在读博士, 主要从事畜牧生态和生态毒理学研究工作。E-mail: diaoxip@263.net

兽药和饲料添加剂在保障动物健康,提高动物生产性能上起到重要的作用。但它们的使用也带来了负面的影响。动物性食品中的药物残留、动物对病原微生物易感性的增加等已引起人们的高度关注。更为严重的是使用后的兽药和饲料添加剂大多以原形和代谢物的形式从动物的粪尿中排出进入生态系统中,并随食物链影响环境生物,对生态系统造成不良的影响。因此排放到环境中的药物对环境生物的潜在毒性是近年来国际上研究的热点^[1-3]。

蚯蚓是维持土壤肥力的重要生物,也是土壤生态系统中许多动物的食物源。它在食物链中是污染物在陆生生物与土壤生物之间的传递桥梁,是农田生态系统中土壤物质生物小循环中的重要一环^[4]。当土壤受到化学物质污染时,作为土壤中主要非靶陆生土壤生物的蚯蚓,其生长、繁殖必将受到不利的影 响,甚至导致死亡,因此蚯蚓被认为是评价化学物质对生态环境安全性的重要指标^[5,6]。

阿维菌素是由放线菌(*streptomyces avermitilis*)产生的大环内酯类抗生素,是目前广泛使用的畜禽体内外抗寄生虫药物,也是农业上新兴的高效杀虫剂^[7]。安普霉素是由 *steptomyses tenebrarius* 菌株发酵而产生的,属于氨基环醇类抗生素,大部分随动物的粪便排出体外^[8];磺胺二甲基嘧啶也是临床上常用的抗生素药物,且它们多用作饲料添加剂来防治动物的疾病,使用量大,多以原药的形式排出体外。有关蚯蚓生态毒性效应研究多集中于农药和杀虫剂^[10],而对于兽药进入土壤后对蚯蚓的生态毒理学效应还未见报道。本研究采用2种不同的暴露途径,选择赤子爱胜蚓为研究对象,进行了3种兽药对蚯蚓的急性毒性研究,以探讨药物对蚯蚓急性毒性,为进一步研究兽药对蚯蚓的分子生态毒理学效应,建立兽药的环境安全性评价指标体系提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试药物:阿维菌素(Avermectin B1a);纯度92%,总量98%以上,由华北制药厂生产。安普霉素(Apramycin);550单位·mg⁻¹,水分38%,由河南濮阳天威药业公司生产;磺胺二甲基嘧啶(Sulfamethazine);纯度为99%,原药购自Sigma公司。

试验动物:赤子爱胜蚓(*Esinia fetioda*)由中国农业大学资源与环境学院畜牧生态实验室提供。选择3

月龄以上,体重约300~400 mg·条⁻¹,环带明显,健康成熟的蚯蚓作受试生物。土壤法试验前先将蚯蚓置于人工土壤中饲养24 h;滤纸法试验前先将蚯蚓在湿润的滤纸上清肠2 h以上。

人工土壤的组成:石英砂69%,高岭土20%,草炭土10%,碳酸钙1%,pH6.4~6.5。

1.2 试验方法

滤纸法:参照OECD(1984)报道的方法^[9]。在平底玻璃管(3 cm×8 cm)内壁衬铺一层滤纸,将受试物阿维菌素、磺胺二甲基嘧啶溶于丙酮,安普霉素溶于去离子水中,根据预试结果配成不同浓度梯度的溶液。吸取1 mL受试物溶液加入玻璃管,待丙酮挥发后或滤纸干后加1 mL去离子水以润湿滤纸。对照组分别加入丙酮或去离子水。清肠后蚯蚓冲洗干净,用滤纸吸干水分,每管放入1条蚯蚓,用扎有小孔的塑料薄膜封口。玻璃管放入20℃±2℃的培养箱中,避光培养。每个药物测定5个浓度,每个浓度10个重复,1个对照。24 h和48 h各记数1次,观察死亡率的情况。以头尾部对针刺刺激无反应者,视其为死亡。同时记录病理症状。

人工土壤法:采用OECD(1984)标准化人工土壤法^[9]。将各土壤成分充分混匀,按预试确定的剂量梯度将不同浓度的兽药掺入人工土壤,混合均匀,加入无离子水,使含水量至35%。将混药后的土壤装入1L广口瓶中。每瓶放入10条蚯蚓,置于20℃±1℃的培养箱内。定期补加水分,保持湿度80%左右,并提供光照。每个浓度4个重复,1个对照。于第7、14 d各计数1次,以针刺无反应为死亡标准。同时记录蚯蚓的生理状况和毒性反应。结果输入计算机,计算LC₅₀。

2 结果和讨论

2.1 滤纸法测定结果

用寇氏法测得了蚯蚓的半数致死量。在滤纸法中,阿维菌素48 d的LC₅₀为4.63×10⁻³ mg·cm⁻²。死亡后的蚯蚓身体变长变细,身体发生断裂。在高浓度组有自溶的现象发生。当安普霉素的剂量达到10 mg·cm⁻²时,在滤纸上的沉积量达到饱和,滤纸不能完全吸收药液,在该剂量下蚯蚓仍无死亡产生,所以可以推测其半数致死剂量大于10 mg·cm⁻²。磺胺二甲基嘧啶不溶于水,溶于丙酮,当剂量达到15 mg·cm⁻²时,药物就从滤纸上析出,所以它是磺胺二甲基在滤纸上的最大沉积量,在该剂量下蚯蚓不死亡,因此可得出其LC₅₀>15 mg·cm⁻²。从滤纸法试验结果

中可以看出, 3 种药物对蚯蚓的急性毒性为阿维菌素 > 安普霉素 > 磺胺二甲基嘧啶。

2.2 人工土壤法测定结果

在人工土壤法中, 阿维菌素 7 d 的 LC_{50} 为 $23.44 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 干土, 14 d 的 LC_{50} 为 $17.06 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 干土, 95% 可信限为 $15.40 \sim 18.90 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 死亡后的蚯蚓身体变长变细, 甚至发生断裂, 个别身体出现充血。在高浓度组蚯蚓滞留于土壤的表面, 有自溶的现象发生。试验中未死亡的蚯蚓的活动性下降, 表现为身体断裂为两节, 环节松散, 身体变长, 分泌出黄色的体腔液, 个体不活泼, 不钻土。试验结束时, 与对照组相比, 体重均有下降。安普霉素和磺胺二甲基嘧啶的 LC_{50} 均大于 $5000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 干土, 在此浓度下蚯蚓的行为和身体无异常现象发生, 体重略有下降。

从生态毒理学的观点来看, 急性毒性试验中蚯蚓的死亡率可以部分反映种群对化学物质的敏感性。在生产实际中, 药物对蚯蚓的产生的毒性不仅取决于药物固有的毒性, 而且还与药物在土壤中的转归和在蚯蚓体内的代谢密切相关, 所以人工土壤法较接近于自然状况下药物与蚯蚓的接触方式, 它可作为判定兽药对蚯蚓毒性的依据。

2.3 3 种药物对蚯蚓的毒性比较

试验结果见表 1。不同的药物由于其化学结构不同, 其作用机理也有很大的差异。阿维菌素作用机理是通过阻断虫体神经元之间及节肢动物神经末梢和肌细胞的神经冲动传导, 使虫体麻痹而死。安普霉素作为抗生素饲料添加剂, 其抗菌作用是通过干扰原核生物核蛋白的合成, 而抑制动物体内细菌的生长。磺胺类药物主要通过抑制细菌叶酸代谢而达到抑制细菌的目的, 它抗菌范围广, 且对球虫和弓形虫也有效。

从滤纸法实验结果中可以看出, 3 种兽药对蚯蚓的 LC_{50} 从大到小依次为阿维菌素 > 安普霉素 > 磺胺二甲基嘧啶。说明 3 种药物对蚯蚓的毒性作用有很大的差异, 阿维菌素的毒性最大, 磺胺二甲基嘧啶的毒性最低, 安普霉素介于二者之间。这种顺序可能在动物体内因药物的溶解性不同而表现出差异, 但这种结果可以部分反映药物在真实环境中对土壤生物的毒性。

阿维菌素作为兽用驱虫药是近 20 年来的最优良, 最广泛应用的药物。对牛、羊的给药量为皮下注射 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 猪 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 饲料添加剂用量为 $0.2 \sim 0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。而阿维菌素 96% 以上是由粪便以原形排出, 因而其依然具有生物活性, 会对土壤生物产生影响。通过蚯蚓的急性毒性试验发现阿维菌素

表 1 3 种兽药对蚯蚓的毒性比较

Table 1 Comparisons of toxicity to earthworm among the three veterinary drugs tested

方法	滤纸法 (48 h)	人工土壤法 (14 d)
阿维菌素/安普霉素	> 2160 倍	> 284 倍
阿维菌素/磺胺二甲基嘧啶	> 3240 倍	> 284 倍
磺胺二甲基嘧啶/安普霉素	> 1.5 倍	

对蚯蚓具有皮肤接触毒性和土壤食入毒性。虽然土壤法急性毒性试验结果 LC_{50} 仍高于土壤本身的药物浓度, 但在实验中我们发现即使存活下来的蚯蚓它的活动性也已大大下降了, 这说明阿维菌素在低浓度就对蚯蚓有毒性。

2.4 3 种兽药对蚯蚓毒性的安全性评价

目前国内尚无兽药对蚯蚓毒性安全评价的标准。按照《化学农药环境安全评价试验准则》评价农药对蚯蚓的安全性采用 2 种方法: 一是根据投毒系数的大小来划分农药对蚯蚓的毒性等级; 二是以 LC_{50} 值的大小来划分: $LC_{50} > 10.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤, 低毒级; $LC_{50} 1.0 \sim 10.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤, 中毒级, $LC_{50} < 1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤, 高毒级。我们用 2 种不同的方法测得的 3 种药物的 LC_{50} 均大于 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤, 因此它们均属于低毒级。

根据文献报道^[10], 农药对蚯蚓的 LC_{50} 基本上在 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的水平上, 很少达到 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的水平。农药的毒性比兽药高。这是因为兽药主要用于动物, 有一部分还是人畜共用的, 因此毒性本来就很低。大多数兽药通过动物的粪尿排出体外进入环境, 经过环境的降解, 毒性会进一步降低, 因而对土壤动物蚯蚓的毒性应是很低的。但上述兽药对环境生物的慢性毒性和在土壤动物中的蓄积毒性有待于进一步研究。

3 结论

利用 2 种不同的暴露途径比较了 3 种药物对蚯蚓的急性毒性, 结果显示阿维菌素的毒性较大; 而安普霉素和磺胺二甲基嘧啶对蚯蚓的毒性作用很低。当阿维菌素在土壤中积累到一定浓度时, 就会对蚯蚓产生毒害作用, 引起种群数量下降, 从而使土壤生态系统受到影响。作为土壤中无脊椎动物的指示生物, 利用蚯蚓来测定兽药的急性毒性作用是可行的。

参考文献:

[1] Jorgensen S E, Halling - Sorensen B. Drugs in the environment[J].

Chemosphere, 2000, 40, 691 - 699.

[2] Jongdloed A W, Lenis N P. Environmental concerns about animal manure

- [J]. *J Anim Sci*, 1998, 76: 2641 - 2648.
- [3] Christensen F M. Pharmaceutical in the environment - a human risk[J]. *Regulatory and Pharmacology*, 1998, 28: 212 - 221.
- [4] 邱江平. 蚯蚓在环境保护和生态毒理学上的应用[J]. 上海农学院学报, 1999, 17(4): 301 - 308.
- [5] 钟远, 孔志明, 臧宇, 等. 吡虫啉与抑食肼的毒理学研究[J]. 农药, 1999, 38(9): 15 - 16.
- [6] Ville P, Roch P, Cooper E L, et al. Immuno - modulator effects of carbaryl and 2, 4D in the earthworm *Eisenia fetida andrei*[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1997, 32: 291 - 297.
- [7] 扈洪波, 朱蓓蕾, 李俊锁. 阿维菌素的研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2000, 31(6): 520 - 529.
- [8] 萨仁娜, 佟建明. 安普霉素对肉鸡的促生长作用[J]. 饲料研究, 2001, 10: 8 - 10.
- [9] OECD - guideline for testing of chemicals No. 207, 1984.
- [10] 孔志明, 臧宇, 崔玉霞, 等. 两种新型杀虫剂在不同暴露系统对蚯蚓的急性毒性[J]. 生态学杂志, 1999, 18(6): 20 - 23.

欢迎订阅 2005 年《农业环境与发展》

《农业环境与发展》是由中国农业生态环境保护协会、农业部环境保护科研监测所和全国农业环境保护科技信息网联合主办的国家级综合指导类科技期刊。该刊积极宣传我国农业生态环境保护有关政策, 及时报道生态农业建设与无公害农产品生产的发展, 在农业生态环境保护工作中发挥宣传指导作用。该刊主要刊登我国农业生态环境保护的方针政策、管理经验, 监测与评价方法, 生态农业建设理论与实践以及无公害农产品生产技术, 农业环境信息、动态等。同时, 《农业环境与发展》在重要版面上宣传各地农业环境保护成就并承办各类相关广告业务。

《农业环境与发展》为双月刊, 48 页, 大 16 开, 逢双月 25 日出版, 刊号 ISSN 1005 - 4944, CN12 - 1233/S, 全国发行, 各地邮电局(所)均可订阅, 邮发代号 6 - 40, 每本定价 6.00 元, 全年 36.00 元。有漏订者可直接与编辑部联系订阅。本刊现有 1999—2000 年度合订本, 定价 60.00 元/册(含邮资), 2001 年合订本每册 50 元(含邮资), 2002 年合订本每册 65 元(含邮资)。需订购者请直接从邮局汇款至编辑部订阅(务请在汇款单上注明订户详细地址及需订内容)。

编辑部地址: 天津市南开区复康路 31 号 邮政编码: 300191 电话: 022 - 23674336

传真: 022 - 23367139 E-mail: caed@public.tpt.tj.cn

欢迎订阅 2005 年《农业环境科学学报》

《农业环境科学学报》(原《农业环境保护》)是由农业部主管、中国农业生态环境保护协会主办的全国性学术期刊。是中国科学引文数据库核心期刊, 列于被引频次最高的中国科技期刊 500 名之内并入编《中国学术期刊(光盘版)》。本刊还被国外多家著名检索机构收录, 如美国《化学文摘》(CA)和俄罗斯《文摘杂志》(AJ), 美国《剑桥科学文摘社网站: 水系统、水科学与渔业文摘、环境工程、水资源文摘及环境科学与污染管理》等 7 种国际检索系统列为来源期刊。本刊主要刊登农业生态环境科学领域具有创新性的研究成果, 包括新理论、新技术和新方法。读者对象为从事农业科学、环境科学、林业科学、生态学、医学和资源保护等领域的科技人员和院校师生。

《农业环境科学学报》为双月刊, 大 16 开, 208 页, 每本定价 30.00 元, 全年定价 180.00 元。国内外公开发行, 全国各地邮局征订, 邮发代号 6 - 64。如读者在当地邮局漏订, 可通过邮局汇款至本刊编辑部补订。此外, 编辑部存有 2000 年以前的各卷合订本(1999 年以前每本 50 元, 2000 年每本 80 元), 欢迎选购。

编辑部地址: 300191 天津市南开区复康路 31 号 电话: (022)23674336

传真: (022)23367139 电子信箱: caep@public.tpt.tj.cn

