

三种兽药对蚯蚓的急性毒性试验

李银生^{1,2}, 曾振灵¹, 陈杖榴¹, 邱江平²

(1. 华南农业大学兽医学院药理研究室, 广东 广州 510642; 2. 上海交通大学农业与生物学院资源环境系, 上海 201101)

摘要: 用滤纸接触法、人工土壤法和自然土壤法 3 种方法研究了洛克沙肿、氯霉素和磺胺二甲嘧啶 3 种兽药对安德爱胜蚓 (*Eisenia Andrei*) 的急性毒性。结果表明, 用滤纸接触法测得的 3 种兽药对蚯蚓的 LC_{50} 分别为: 洛克沙肿 $5.50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、氯霉素 $5.40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、磺胺二甲嘧啶 $13.32 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 用人工土壤法测得的 3 种兽药对蚯蚓的 LC_{50} 分别为: 洛克沙肿 $3.23 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤、氯霉素 $1.67 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤、磺胺二甲嘧啶 $4.68 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤; 用自然土壤法测得的三种兽药对蚯蚓的 LC_{50} 分别为: 洛克沙肿 $3.45 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤、氯霉素 $2.44 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤、磺胺二甲嘧啶 $5.33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤。3 种兽药对蚯蚓的急性毒性都较低。

关键词: 洛克沙肿; 氯霉素; 磺胺二甲嘧啶; 蚯蚓; LC_{50}

中图分类号: X835 文献标识码: A 文章编号: 1672 - 2043(2004)06 - 1065 - 05

LC_{50} The Acute Toxicity of Three Veterinary Pharmaceuticals to Earthworms

LI Yin-sheng^{1,2}, ZENG Zhen-ling¹, CHEN Zhang-liu¹, QIU Jiang-ping²

(1. Laboratory of Veterinary Pharmacology, College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guanzhou 510642, China; 2. Department of Resource and Environmental Science, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao - Tong University, Shanghai 201101, China)

Abstract: Pharmaceuticals and their metabolites could be accumulated, transported and transformed in the environments, which may cause ecotoxic effect to the organisms. So the environmental effect of pharmaceuticals has been an important research field in recent years. Roxarsone, chloramphenicol and sulphamezathine are three veterinary pharmaceuticals that are used extensively in the animal breeding to promote the growth and cure the diseases. These pharmaceuticals and their metabolites are introduced to the environment with the manure of the animal, but nothing has been known about their ecotoxicological effect. The acute toxicity of the three pharmaceuticals to earthworms (*Eisenia Andrei*) was studied using three methods: contact filter paper test, artificial soil test and natural soil test. The LC_{50} of roxarsone, chloramphenicol, sulphamezathine to earthworms were $5.50 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, $5.40 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, $13.32 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ respectively for the contact filter paper test, were $2.99 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ soil, $1.67 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ soil, $4.68 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ soil respectively for the artificial soil test, and for the natural soil test, these were $3.45 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ soil, $2.44 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ soil, $5.33 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ soil, respectively. The standard procedure to assess the toxicity of pharmaceuticals to earthworms was not available until now. But compared to the pesticides, the toxicity of these pharmaceuticals to earthworms was much lower. The sequences of the toxicity of the three veterinary pharmaceuticals for all three test methods were same: sulphamezathine > roxarsone > chloramphenicol, but differed from that in the bred animals (livestock and poultry), probably due to the different way that the pharmaceutical was absorbed by the animals and the different solubility of these pharmaceuticals. The common toxic symptom of these pharmaceuticals to earthworms was that the clitellum was significantly swollen, even rankled, which implied that the reproductive system of earthworm was most sensitive.

Keywords: roxarsone; chloramphenicol; sulphamezathine; earthworm; LC_{50}

收稿日期: 2004 - 01 - 19

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(30130140)

作者简介: 李银生(1973—), 男, 四川广安人, 博士, 讲师, 现在上海交通大学工作, 主要从事兽医药理学及生态毒理学方面的研究。

E-mail: yinshengli@hotmail.com

联系人: 邱江平

药物的环境效应是国际上刚刚兴起的热点^[1,2]。近年来的研究表明, 药物及其代谢物在环境中会发生蓄积、迁移和转化并对各种生物产生影响^[3,4]。蚯蚓是土壤生态系统中的主要动物类群之一, 能改善土壤的通气性, 增进土壤肥力。同时蚯蚓也是土壤生态系统中许多动物如蛇类、鸟类、鼠类等的食物来源。在食物链中它是陆生生物与土壤生物之间传递污染物的桥梁。因此, 蚯蚓已成为评价外来化合物(如农药)对生态环境尤其是土壤环境安全性的一种重要指示生物^[5]。

洛克沙肿(roxarsone)、氯霉素(chloramphenicol)、磺胺二甲嘧啶(sulphamezathine)是3种常用兽药, 促进了养殖业的发展。但同时大量原形药物及其代谢物随畜禽排泄物进入环境, 造成了环境污染^[6,7]。然而关于这些药物对环境生态造成影响的研究报道极少。本文研究了这3种兽药对蚯蚓的急性毒性, 为进一步研究它们对蚯蚓的分子毒理学效应, 全面评价和控制其对土壤环境的安全性打下基础。

1 材料和方法

使用了欧盟推荐的2种标准蚯蚓急性毒性试验方法^[5]: 滤纸接触法(Contact filter paper test, OECD - guideline No. 207)和人工土壤法(Artificial soil test, OECD - guideline No. 207)。为了解受试药物在真实土壤中的情况, 还作了在自然土壤中的实验。据报道, 3种兽药都主要以原形药物通过畜禽废弃物排入环境^[3], 因而本研究用原药进行试验。

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物

安德爱胜蚓(*Eisenia Andrei*), 一种国际标准实验蚯蚓, 由上海西郊动植物养殖场提供。先预养一段时间, 然后选择具有环带的健壮成体进行试验。蚯蚓大小和重量要尽量相同, 平均体重约350 mg。

1.1.2 药物、试剂及仪器

洛克沙肿原粉: 含量96.3%, 太原基耀动物保健品公司生产, 批号0008010。氯霉素原粉: 含量98.71%, 上海第六制药厂生产, 批号0110577。磺胺二甲嘧啶钠原粉: 含量99.47%, 广东南海北沙医药原料厂, 批号240624。高岭粘土、碳酸钙、石英砂等均为国产分析纯试剂。RXZ-260B智能人工气候箱, 宁波江南仪器厂制造。

1.2 试验方法

1.2.1 滤纸接触法

(1) 清肠: 取一烧杯, 在底部铺上一层滤纸, 加少量水, 以刚浸没滤纸为宜。挑选具有环带的健壮蚯蚓, 放在滤纸上, 用塑料薄膜封口, 并用解剖针扎孔, 将烧杯放入温度约20℃, 湿度约75%的人工气候箱中, 清肠一天。

(2) 配药: 在直径15 cm的培养皿底铺衬滤纸, 以刚好遮住皿底为宜。①洛克沙肿和磺胺二甲嘧啶: 由于二者溶于水(洛克沙肿常温时微溶于水, 沸水中的溶解度为30%, 需要浓度高时加热, 本试验所用最高浓度均小于30%), 将其分别溶于蒸馏水, 配成系列浓度, 取4 mL溶液加入培养皿中, 使滤纸润湿。②氯霉素: 不溶于水, 但溶于丙酮。故将氯霉素用丙酮作溶剂配成系列浓度, 加入培养皿中, 加入的体积与①相等, 将培养皿放入通风橱中, 使丙酮蒸发掉, 至闻不到丙酮气味为止, 再加入等体积的蒸馏水至培养皿中。

(3) 放入蚯蚓: 将清肠后的蚯蚓冲洗干净, 并用滤纸吸干蚯蚓体表的水分, 放入培养皿中。每一处理放入蚯蚓10条。用塑料薄膜封口, 并用解剖针扎孔。

(4) 培养: 将培养皿放入人工气候箱中培养, 箱中为标准试验条件: 温度20℃±1℃, 湿度75%±7%, 光照1333 lx(间歇光照, 即12 h光照, 12 h黑暗)。

(5) 观察: 24 h、48 h各计数一次, 记录死亡数及中毒症状, 蚓体对针刺无反应判为死亡, 48 h后结束试验。每一浓度设置4个重复, 总共设置1个不含药物的对照。

1.2.2 人工土壤法

配制土壤: 人工土壤由10%的苔藓泥炭细土(pH=6, 采自上海交大农学院农场), 20%的高岭粘土(高岭土大于50%), 69%的工业石英砂(含50%以上0.05~0.2 mm的细小颗粒)和1%的CaCO₃组成, 每一处理总重500 g。依次将各种成分加入1 L的试剂瓶中, 混匀。

加药: 药物的用量以在500 g土壤中的含量计算(下同)。将洛克沙肿和磺胺二甲嘧啶溶于蒸馏水, 加入瓶中, 混匀。蒸馏水的用量约为土壤重量的1/4。而氯霉素仍以丙酮溶解, 加入配好的人工土壤后混匀, 在磁盘中摊开后放在通风橱中使丙酮蒸发完全后再转移入1 L试剂瓶中, 加入与前两种药等量的蒸馏水, 混匀。以下放入蚯蚓、培养、观察及设置重复等各步骤与滤纸接触法相似, 只是观察的时间在第7 d和第14 d, 14 d后结束试验。

1.2.3 自然土壤法

土壤采集点是一块试验地, 土质较肥沃, 已荒芜

5 a 以上。为滨海沉积物上发育的灰潮土,砂壤质,是上海地区的典型栽培旱作土壤,测得其中的砷含量为 $(8.75 \pm 0.63) \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,在正常范围之内。土壤采回后,在阴凉处风干。研细,过 120 目筛。测定土壤基本参数如 pH 值、有机碳、氮、磷、钾含量等,见表 1。然后称取该土壤 500 g,加入 1 L 试剂瓶中。将洛克沙肿和磺胺二甲嘧啶溶于蒸馏水,加入瓶中,混匀。蒸馏水的用量约为土壤最大持水量的 60%。氯霉素的加入方法与人工土壤法相似。以下放入蚯蚓、培养、观察及设置重复等各步骤均与人工土壤法相同。

表 1 自然土壤基本参数

Table 1 Basic character of tested natural soils

pH	有机碳含量/%	总 N/%	总 P/%	总 K/%
7.5	2.1	0.13	0.073	2.1

2 试验结果

各种方法的试验结果见表 2 至表 7,采用文献[7]所用的标准曲线法进行计算,以剂量为横坐标,死亡数为纵坐标,得出回归方程,再求出 LC_{50} 。

3 种试验方法蚯蚓的中毒症状均相似。洛克沙肿:有出血现象,周围土壤能见到明显的红染斑;环带肿大,充血;贮精囊所在的节肿大;有黄色液体渗出;身体萎缩,有断裂现象,有的断成多节,或节间沟深陷整条蚯蚓成串珠状。氯霉素:全身颜色变浅;腹部变白,水肿;生殖环带部膨大较显著;没有萎缩及脱节现

表 2 滤纸接触法的蚯蚓急性毒性试验结果

Table 2 The contact filter paper test results of acute toxicity of the three pharmaceuticals to earthworms

剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$		24 h 平均死亡条数	48 h 平均死亡条数
		($n=3$)	($n=3$)
洛克沙肿	对照	0	0
	2	0	0
	4	0	3
	6	1	9
	8	2	10
氯霉素	对照	0	0
	1	0	0
	2	0	3
	4	1	4
	8	2	8
磺胺二甲嘧啶	对照	0	0
	2	0	0
	4	0	1
	8	0	3
	16	1	6
32	3	10	

表 3 滤纸接触法的计算结果(95%置信限)

Table 3 The computed results of contact filter paper test (95% confidence limits)

药物	标准曲线	相关系数	$\text{LC}_{50}(\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{土壤})$
洛克沙肿	$y = 0.52x + 2.13$	$r = 0.94$	5.50
氯霉素	$y = 0.85x + 0.39$	$r = 0.95$	5.40
磺胺二甲嘧啶	$y = 0.33x - 0.08$	$r = 0.98$	13.32

表 4 人工土壤法的蚯蚓急性毒性试验结果

Table 4 The artificial soil test results of acute toxicity of the three pharmaceuticals to earthworms

剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤		7 d 平均死亡数	14 d 平均死亡条数
		($n=4$)	($n=4$)
洛克沙肿	对照	0	0
	1	0	0
	1.5	0	1
	2	1	2
	3.5	1	6
氯霉素	对照	0	0
	0.5	0	2
	1	1	5
	3	2	8
	5	4	10
磺胺二甲嘧啶	对照	0	0
	2	0	1
	4	0	3
	6	1	8
	8	8	10

表 5 人工土壤法的计算结果(95%置信限)

Table 5 The computed results of artificial soil test (95% confidence limits)

药物	标准曲线	相关系数	$\text{LC}_{50}/\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤
洛克沙肿	$y = 2.27x - 2.33$	$r = 0.99$	3.23
氯霉素	$y = 1.63x + 2.39$	$r = 0.91$	1.67
磺胺二甲嘧啶	$y = 1.60x - 2.50$	$r = 0.97$	4.68

象,整个身体见不到出血斑。磺胺二甲嘧啶:整个身体显示枯萎;有断裂;生殖带膨大成壶腹状,特别显著;有不定位的膨大,甚至溃烂。

3 讨论

3.1 兽药对蚯蚓的毒性

目前尚无药物对蚯蚓毒性的安全评价标准。参照《化学农药环境安全评价试验准则》,采用 LC_{50} 值的大小进行评价: $\text{LC}_{50} > 10.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤,低毒级; $\text{LC}_{50} 1.0 \sim 10.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤,中毒级; $\text{LC}_{50} < 1.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤,高毒级。几种土壤方法测得的 LC_{50} 值均在 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤级,远远大于 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土壤,

表6 自然土壤法的蚯蚓急性毒性试验结果

Table 6 The natural soil test results of acute toxicity of the three pharmaceuticals to earthworms

剂量/g · kg ⁻¹ 土壤		7 d 平均死亡数 (n = 4)	14 d 平均死亡条数 (n = 4)
洛克沙肿	对照	0	0
	1.5	0	0
	2	0	2
	3	0	4
	4	1	7
	6	3	10
氯霉素	对照	0	0
	0.5	0	1
	1	0	3
	2	2	5
	4	3	8
	6	5	10
磺胺二甲嘧啶	对照	0	0
	2	0	0
	4	0	3
	6	0	7
	8	2	8
	10	3	10

表7 自然土壤法的计算结果(95%置信限)

Table 7 The computed results of natural soil test (95% confidence limits)

药物	标准曲线	相关系数	LC ₅₀ /g · kg ⁻¹ 土壤
洛克沙肿	$y = 2.20x - 2.64$	$r = 0.98$	3.45
氯霉素	$y = 1.57x + 1.17$	$r = 0.96$	2.44
磺胺二甲嘧啶	$y = 1.25x - 1.90$	$r = 0.96$	5.33

因此属低毒级,而且毒性很低。

从 LC₅₀ 的实测值来看,兽药比农药高得多。根据现有资料,农药对蚯蚓的 LC₅₀ 基本上是在 mg · kg⁻¹ 土壤的水平上,很少达到 g · kg⁻¹ 土壤的水平。如朱鲁生等^[9]报道辛硫磷、甲氰菊酯及其混剂用自然土壤法测得的对蚯蚓的 LC₅₀ 分别为 8.0、1.08、2.63 mg · kg⁻¹ 土壤。这3种农药对蚯蚓的毒性属于中毒级。孔志明等^[10]报道用人工土壤法测定的吡虫啉和抑食肼对蚯蚓的 LC₅₀ 分别为 2.3、1 000 mg · kg⁻¹ 土壤。农药对蚯蚓的毒性比兽药大,这是很容易理解的。因为兽药可以用于动物,且大部分兽药可以人用,因而毒性本来就低。而药物通过动物排泄物进入环境后,经过环境的稀释和降解,其毒性往往会进一步下降,因而对蚯蚓的毒性应该是较低的。

几种兽药对蚯蚓的急性毒性低,但并不能就此忽略。因为它们及代谢物在环境中可发生迁移,并可在环境生物中蓄积并造成蓄积毒性。因而有必要进一步

进行兽药及其降解产物对蚯蚓的慢性毒性或蓄积毒性试验,以了解其对环境生物的毒性毒理。

3.2 几种兽药对蚯蚓急性毒性试验结果的比较

滤纸接触法的 LC₅₀ 较高,说明对蚯蚓的毒性最小,可能是因为蚯蚓暴露的时间短,只有 2 d,毒性表现较轻。当然其 LC₅₀ 是以水溶液计算的,与土壤法不同。滤纸接触试验法方便快捷,通过试验结果可以初步了解化学药品的固有毒性和对土壤动物的潜在毒性。但是土壤法才最接近自然状况下蚯蚓接触药物的方式,故以土壤法测定的 LC₅₀ 作为划分药物毒性等级的依据比滤纸接触法更客观准确。自然土壤法与人工土壤法相比,LC₅₀ 值稍大,毒性稍低,原因可能是自然土壤中成分复杂,药物与其中某些成分结合,从而使毒性降低。但经统计检验,二者差异不显著。可以用人工土壤法的试验结果来反映自然土壤中的状况。但因各地土壤有差异,故用人工土壤法便于试验结果的比较。

3种兽药对蚯蚓的 LC₅₀ 从大到小依次为磺胺二甲嘧啶 > 洛克沙肿 > 氯霉素。说明氯霉素的毒性最大,磺胺二甲嘧啶最小,洛克沙肿介于二者之间。这种顺序可能与在动物(这里主要指畜禽,下同)体内的毒性大小不一致,推测主要与它们的水溶性不一样有关。土壤中的药物进入蚯蚓体内的方式主要是吞食和经皮肤吸收,其差别主要在于皮肤吸收。由于水溶性的不同,导致这几种药物通过皮肤进入蚯蚓体内的量肯定不一样,而动物实验可以以确定的剂量到达动物体内。但这种顺序可以基本反映这些药物在真实环境中对环境生物的毒性,因为它们在动物体中都主要是以原形药物的形式排入环境中,然后再与环境生物接触(当然实际情况要复杂得多)。

由此可见,药物对环境生物的毒性与其对动物体的毒性并不一定一致,因为其起作用的方式和受到的影响不一样,也不能以药物对动物体毒性的大小来判断其对环境生物毒性的大小。

各药引起蚯蚓的中毒症状有共同点,也有差别。共同的症状是:环带和贮精囊所在的节肿大,尤其环带肿大特别典型,严重者甚至溃烂。说明蚯蚓的生殖系统对药物是最敏感的,各种外来化合物都可能对蚯蚓的生殖系统造成伤害。这一结果与农药实验是相似的。

参考文献:

[1] Velagaleti R, Burns PK, Gill M, Prothro J. Impact of current good

manufacturing practices and emission regulations and guidances on the discharge of pharmaceutical chemicals into the environment from manufacturing, use, and disposal[J]. *Environ Health Perspect*, 2002, 110(3): 213 - 20.

- [2] Fink - Gremmels J, van Miert AS. Veterinary drugs: disposition, biotransformation and risk evaluation[J]. *Analyst*, 1994, 119(12): 2521 - 8.
- [3] 陈杖榴, 杨桂香, 孙永学, 等. 兽药和饲料添加剂残留的毒性与生态毒理研究进展[J]. 华南农业大学学报. 2001, 22(1): 88 - 91.
- [4] 李银生, 曾振灵. 兽药残留的现状与危害[J]. 中国兽药杂志, 2002, 36(1): 29 - 33.
- [5] 邱江平. 蚯蚓与环境保护[J]. 贵州科学. 2000, 18(1): 116 - 133.

- [6] 徐仁达, 陈仁尔. 经济高效多功能饲料添加剂 - 洛克沙生[J]. 中国饲料, 1996, (9): 31 - 32.
- [7] Garbarino J R, Rutherford D W, Wershaw R L. Degradation of Roxarsone in Poultry Litter: In the proceedings of Arsenic in the Environment Workshop. Denver, Colorado; U. S. Geological Survey. 2001, February 21 - 22.
- [8] 江泉观. 基础毒理学[M]. 北京: 化学工业出版社, 1991.
- [9] 朱鲁生, 樊德方, 王玉军. 辛硫磷, 甲氰菊酯及其混剂对蚯蚓的毒性及安全性评价[J]. 浙江农业大学学报, 1999, 25(1): 77 - 80.
- [10] 孔志明, 臧宇, 崔玉霞. 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, 37.

第二届海峡两岸土壤及地下水污染与修复研讨会在南开大学召开

为了加强海峡两岸环境界科学家在对土壤及地下水污染与修复问题的交流和合作, 海峡两岸相关学术单位决定举办系列海峡两岸土壤及地下水污染与修复研讨会。第一届研讨会由台湾土壤与地下水保护协会主办, 于 2002 年 9 月在台湾举行。经大会组委会讨论和协商, 决定第二届海峡两岸土壤及地下水污染与修复研讨会由南开大学主办。

2004 年 9 月 24 - 27 日, 由南开大学环境科学与工程学院承办、中国农业生态环境保护协会、中国地质科学院水文地质环境地质研究所、台湾土壤及地下水环境保护协会及台湾中央大学应用地质研究所等单位协办的第二届海峡两岸土壤及地下水污染与修复研讨会在南开大学召开。国土资源部国际合作与科技司、国家自然科学基金委员会地学部及天津市科学技术委员会等主管单位的领导参加了大会开幕式并讲话。

与会正式代表约 150 人, 分别就 (1) 土壤及地下水污染物迁移转化模式; (2) 土壤及地下水污染调查、

风险评估及管理; (3) 土壤及地下水污染修复原理及技术三个主题进行了学术交流。中国工程院院士、中国科学院应用生态研究所孙铁珩院士、台湾中央大学应用地质研究所所长陈家洵教授及美国莱斯大学环境工程系 Alvarez 教授分别代表海峡两岸及外国专家做了大会主题报告, 其它与会代表还就大陆在土壤及地下水方面进行的国家“863”、“973”及国家攻关等重大课题进行了专门的报告。

会议进行了三天, 达到了海峡两岸土壤及地下水保护科技工作者加强交流和合作的目的, 并使双方对海峡两岸土壤及地下水保护的管理和科技工作水平有了充分的了解。会后, 部分代表参观考察了天津市滨海新区生态工业园、再生水循环及废渣治理等环境保护事业的成果, 滨海新区皮黔生主任接见了部分代表。

(南开大学环境科学与工程学院 供稿)