



## 模拟养殖系统药饵给药后恩诺沙星在异育银鲫体内、 水体和底泥中代谢与分布

凌海<sup>1,2</sup>, 缪天音<sup>1</sup>, 王元<sup>2</sup>, 向阳<sup>1,2</sup>, 胡鲲<sup>1\*</sup>, 房文红<sup>2\*</sup>

(1. 上海海洋大学水产与生命学院, 国家水生动物病原库, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院东海水产研究所,

农业农村部东海渔业资源开发利用重点实验室, 上海 200090)

**摘要:** 为探究水产养殖中恩诺沙星用药后在水环境中的归趋, 本实验在模拟池塘水产养殖系统中, 恩诺沙星以 18 mg/kg 剂量药饵投喂异育银鲫, 每天 2 次、给药周期 6 d, 研究恩诺沙星在异育银鲫体内吸收、分布、代谢和消除规律, 以及在水体和底泥中的分布规律。结果显示, 异育银鲫组织中恩诺沙星峰浓度 ( $C_{max}$ ) 依次为肠道>肾脏>肌肉>鳃>肝脏>血浆, 分别为 14.15、13.31、14.15、7.48、7.94 mg/kg 和 2.94 mg/L; 各组织中均可检测到代谢产物环丙沙星, 其峰浓度与恩诺沙星峰浓度的百分比分别为 5.10%、1.70%、6.28%、2.97%、2.90% 和 6.53%; 组织中恩诺沙星清除率 ( $CL_2$ ) 顺序为血浆>肝脏>肠道>鳃>肌肉>肾脏。随着给药次数增多, 水体中恩诺沙星残留浓度快速升高, 在最后一次给药后 6 h 时达到峰值 (5.23  $\mu$ g/L), 随后开始下降, 但水体中一直未检测到代谢产物环丙沙星; 底泥中恩诺沙星首先呈现上升趋势, 在 240 h 达到峰值 (796  $\mu$ g/kg), 之后略有下降, 480 h 时降至 587  $\mu$ g/kg; 底泥中环丙沙星残留呈现逐渐上升的趋势, 在 480 h 时残留量为 382  $\mu$ g/kg; 底泥中代谢产物环丙沙星残留浓度与恩诺沙星浓度的百分比为 27.5%~65.1%。药饵给药后药物残留主要存在于养殖生态系统的底泥中, 底泥中药物残留百分比为 41.86%~46.69%, 且消除较慢, 药饵投喂后残留在底泥中的药物生态安全风险应引起重视。本研究为养殖生产科学用药提供技术支撑, 为生态安全评价提供理论数据。

**关键词:** 异育银鲫; 恩诺沙星; 环丙沙星; 药物残留; 底泥; 代谢与分布

中图分类号: S 948

文献标志码: A

近年来, 抗菌素引起的环境污染问题受到全社会的高度重视。随着水产养殖集约化规模化发展, 水产病害问题日益突出<sup>[1]</sup>, 针对细菌性疾病多采用抗菌素拌饲投喂给药方式进行治疗。水生动物生活在水环境中, 药饵投喂后通过肠道吸收进入循环系统, 然后通过肾脏和鳃排泄到水中<sup>[2-3]</sup>, 而没有被吸收的药物直接从肠道排泄到水中<sup>[4]</sup>,

另外尚有少量药物从药饵中散失到水中<sup>[5]</sup>, 由此可见, 水生动物生活的水环境成了药物的最终去处, 残留在环境中的抗菌素势必威胁着环境生态安全。对抗菌药物在水生动物体内的代谢和消除规律研究很多<sup>[6-9]</sup>, 然而对药物进入到水环境中的研究甚少<sup>[10]</sup>。本实验模拟水产养殖投喂药饵用药方式, 研究恩诺沙星药饵投喂异育银鲫 (*Carassius*

收稿日期: 2022-01-26 修回日期: 2022-10-09

资助项目: 上海市科技兴农重点攻关项目 (2018-02-08-00-07-F01549); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项 (2020TD41)

第一作者: 凌海 (照片), 从事水产动物药理学研究, E-mail: linghaishou@163.com

通信作者: 胡鲲, 从事水产品药物安全使用技术研究, E-mail: khu@shou.edu.cn;

房文红, 从事水产动物病害研究, E-mail: fwenhong@163.com



*auratus gibelio*) 后在动物体内的代谢与消除, 以及在水环境和底泥中的分布, 同时探讨恩诺沙星代谢产物环丙沙星在异育银鲫体内和水、底泥环境中的代谢, 为养殖生产科学用药提供技术支撑, 为生态安全评价提供理论数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验试剂

恩诺沙星原料药(纯度>98.5%) 购于生工生物工程(上海)股份有限公司; 恩诺沙星和环丙沙星标准品(纯度≥99.0%) 为德国 Dr.Ehrenstorfer 产品; 色谱纯乙腈、甲醇、正己烷和甲酸均为德国 CNW 公司产品; 四丁基溴化铵、乙酸、磷酸均购自国药集团化学试剂有限公司; 肝素钠为上海源叶生物科技有限公司产品。

### 1.2 实验仪器

高效液相色谱仪(Waters e2695, 美国); 超纯水仪(Millipore Milli-Q Advantage, 美国); 微量移液器(Eppendorf, 德国); 高速冷冻离心机(Hitachi CF16 RXL, 日本); 电子分析天平(感量 0.0001 g, Mettler Toledo AB204, 瑞士); 高速组织捣碎机(IKA T18, 德国); 多管涡旋混合仪(EFAA-HM-01, 安谱); 旋转蒸发仪(RE-52A, 亚荣); 超声波清洗器(SB-5200D, SCIENTZ); pH 计(PHS-2F, 雷磁); HLB 固相萃取小柱(Waters, 美国)以及 0.22 μm 微孔滤膜。

### 1.3 实验设计

实验用异育银鲫购自上海崇明某水产养殖场(无恩诺沙星使用记录), 鱼体重(50±10) g。直径 114~138 cm、高 100 cm 的塑料圆桶 6 个, 桶底铺高度 10 cm 的池塘底泥, 底泥事先检测不含恩诺沙星和环丙沙星, 水深 70 cm, 水温(22±1) °C, 保持 24 h 充气; 每桶放养 20 尾异育银鲫, 于水面下 30 cm 放置料台用于投放药饵, 每次投喂鱼体重 1% 的药饵, 每天 7:00 和 19:00 各投喂 1 次, 连续投喂 6 d, 单次给药剂量为 18 mg/kg。

### 1.4 样品采集

水和底泥采样 在第 1 次投喂药饵后 42、90 和 126 h, 最后 1 次投喂药饵后 6 h、1 d、3 d、5 d、10 d、15 d 和 20 d 采集水和底泥样品, 每桶采 3 个点的底泥样品混合均匀, 分别为 6 个样品。

鱼组织采样 分别在最后 1 次给药后 1、6、12 和 24 h 及 2、3、5、10、15 和 20 d, 每桶取 1 条异育银鲫, 采用 1 mL 注射器从尾静脉抽取 1 mL 左右血液, 注入预先用肝素钠抗凝剂润湿的 2 mL 离心管, 振荡混匀后于 8 000 r/min 离心 5 min, 取上层血浆置于-20 °C 保存。同时采集肝脏、肌肉、肠道、鳃和肾脏等组织, 装入密封袋并置于-20 °C 保存。实验过程中操作人员严格遵守实验动物伦理规范, 并按照上海海洋大学动物伦理委员会制定的规章制度执行。

### 1.5 样品前处理

鱼组织样品前处理参照赵留杰等<sup>[11]</sup>的方法, 底泥样品前处理参照刘立早等<sup>[12]</sup>的方法, 水样取 1 mL, 过 0.22 μm 滤膜后直接 HPLC 分析。在本实验条件下, 恩诺沙星和环丙沙星在异育银鲫各组织以及水中的回收率为 75.2%~107.0%, 精密度(RSD) 均小于 10%; 在底泥中的回收率为 57.0%~108.3%, 精密度(RSD) 为 3.0%~11.7%。异育银鲫各组织和底泥的检测限为 5 μg/L, 水中的检测限为 0.5 μg/L, 满足分析方法要求。

### 1.6 色谱条件

色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> (150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈:0.01 mol/L 四丁基溴化铵溶液(磷酸调 pH 至 2.8)=10:90 (体积比), 使用前进行抽滤、脱气; 柱温 30 °C; 流速 1.0 mL/min。检测波长: 荧光检测器, 激发波长为 280 nm, 发射波长为 450 nm。进样量为 10 μL。

### 1.7 数据分析

药物标准曲线及药时曲线图采用 Microsoft Excel 2016 进行处理, 药动学参数采用 DAS 3.0 软件进行分析。

### 1.8 鱼体、水体和底泥中药物残留百分比推算

根据药物浓度×质量(体积)来推算给药后鱼体、水体和底泥中的药物残留量, 经测算每个圆桶底泥重量( $m_s$ )为 98.5 kg、水体( $V_w$ )为 985.1 L、鱼体总重量( $m_f$ )为 1 kg、总给药量( $M$ )为 216 mg; 按比例最大的肌肉组织的药物浓度计算鱼体残留药物含量, 得到给药后多个时间点鱼体、水体和底泥中药物残留量(恩诺沙星和环丙沙星), 残留百分比推算公式:

$$C(\%) = \frac{m_s(V_w, m_f) \times m}{M}$$

式中,  $C$ 为残留百分比(%),  $m_s$ 为底泥质量(kg),  $V_w$ 为水体体积(L),  $m_f$ 为鱼体总质量(kg),  $m$ 为恩诺沙星和环丙沙星残留量之和(mg/kg, mg/L),  $M$ 为总给药量(mg)。

## 2 结果

### 2.1 恩诺沙星及其代谢产物环丙沙星在异育银鲫体内的药-时变化规律

给药后, 异育银鲫体内各组织中恩诺沙星浓

度先上升再快速下降, 72 h后呈现缓慢下降趋势。肠道和肾脏分别在最后1次给药后2和1 h达到峰值, 峰浓度  $C_{max}$  较高, 分别为 14.15 和 13.31 mg/kg; 肌肉、鳃和肝脏中的药物峰浓度分别在 6、2 和 2 h 达到峰值,  $C_{max}$  分别为 9.76、7.94 和 7.48 mg/kg。血浆中的药物峰浓度最低, 在 1 h 达到峰值,  $C_{max}$  为 2.94 mg/L。480 h 时, 肌肉、肠道、肝脏、肾脏、鳃和血浆中恩诺沙星浓度分别降至 0.12、0.12、0.09、0.28、0.20 mg/kg 和 0.04 mg/L (图 1)。

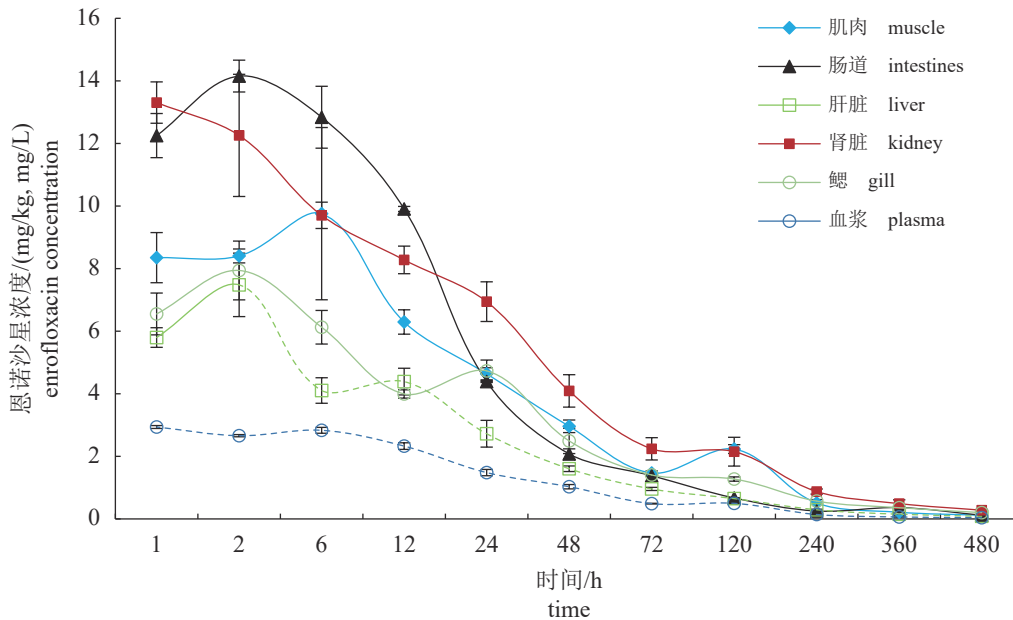


图 1 药饵给药后异育银鲫体内恩诺沙星浓度-时间关系曲线 (n=6)

Fig. 1 Tissue enrofloxacin concentration in *C. auratus gibelio* after oral administration via enrofloxacin-mediated feed (n=6)

药饵给药后, 恩诺沙星代谢产物环丙沙星在异育银鲫体内组织中的浓度-时间曲线关系结果显示, 异育银鲫组织中环丙沙星变化趋势与恩诺沙星相似, 肾脏中环丙沙星浓度最高,  $C_{max}$  为 0.87 mg/kg ( $T_{max}$  = 1 h); 其次是肝脏,  $C_{max}$  为 0.47 mg/kg ( $T_{max}$  = 12 h); 鳃、肌肉和肠道中环丙沙星浓度较为接近,  $C_{max}$  分别为 0.32、0.29 和 0.24 mg/kg,  $T_{max}$  分别为 2、6 和 6 h; 血浆中环丙沙星浓度最低,  $C_{max}$  为 0.15 mg/L ( $T_{max}$  = 6 h) (图 2)。

### 2.2 恩诺沙星及其代谢产物环丙沙星在异育银鲫体内的药动学参数

采用统计矩原理推算药饵给药后恩诺沙星和环丙沙星在异育银鲫体内的药动学参数(表 1)。结果显示, 恩诺沙星在血浆中消除最快 ( $t_{1/2z}$  为 80.4 h),

在肠道中消除最慢 ( $t_{1/2z}$  为 150.9 h); 肾脏中的  $AUC_{0-t}$  最大 [831.9 mg/(kg·h)], 其次为肌肉 [623.6 mg/(kg·h)], 血浆中的  $AUC_{0-t}$  最小 [182.6 mg/(L·h)]; 各组织中恩诺沙星平均驻留时间 ( $MRT_{0-t}$ ) 表现为 鳃>肾脏>肌肉>肝脏>血浆>肠道, 分别为 115.2、109.2、96.3、94.2、90.0 和 82.2 h。

血浆、肾脏、鳃、肝脏、肠道和肌肉中环丙沙星残留峰浓度分别为 0.15 mg/L、0.24 mg/kg、0.47 mg/kg、0.29 mg/kg、0.23 mg/kg 和 0.87 mg/kg, 分别为恩诺沙星峰浓度的 5.10%、1.70%、6.28%、2.97%、2.90% 和 6.53%; 各组织中相应的平均驻留时间 ( $MRT_{0-t}$ ) 分别为 191.6、190.5、170.2、163.3、156.7 和 139.9 h; 总体清除率 ( $CL_z$ ) 分别为 0.30 L/(h·kg)、0.13、0.21、0.34、0.81 和 0.82 kg/(h·kg); 曲线下面积 ( $AUC_{0-t}$ ) 分别为 28.9 mg/(L·h)、153.6、

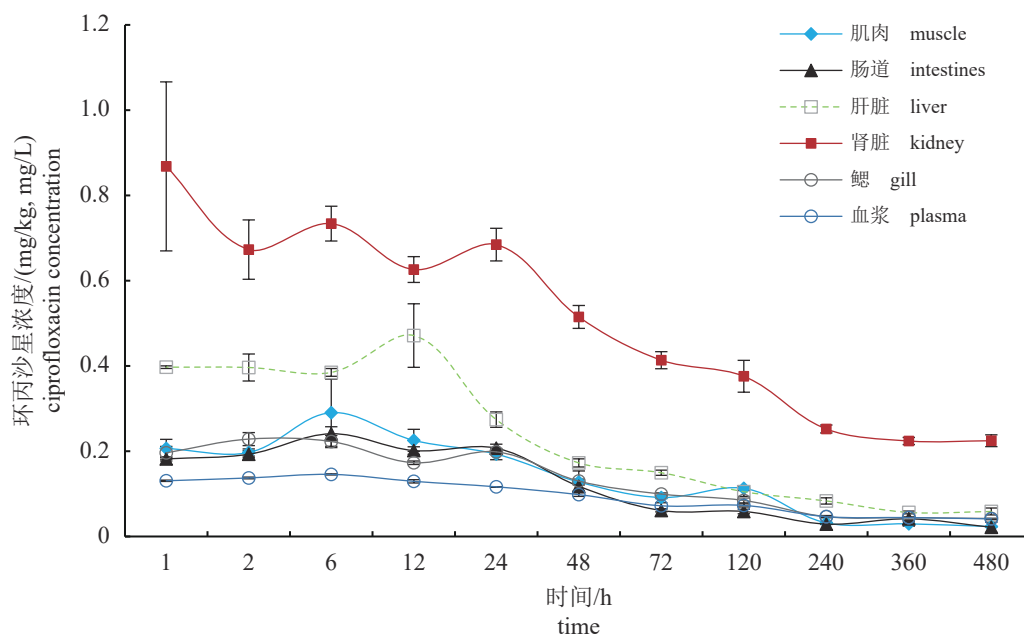


图 2 恩诺沙星药饵给药后异育银鲫体内环丙沙星药-时曲线 (n=6)

Fig. 2 Tissue ciprofloxacin concentration in *C. auratus gibelio* after oral administration via enrofloxacin-mediated feed (n=6)

表 1 药饵给药后恩诺沙星及其代谢产物环丙沙星在异育银鲫体内的药动学参数

Tab. 1 Pharmacokinetic parameters of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in *C. auratus gibelio* after oral administration via enrofloxacin-mediated feed

药物 drug	药动学参数 pharmacokinetic parameter	血浆 plasma	肠道 intestine	肝脏 liver	肌肉 muscle	鳃 gill	肾脏 kidney
恩诺沙星 enrofloxacin	AUC <sub>0-t</sub> /[mg/(kg·h)]	182.6	516.9	319.6	623.6	519.3	831.9
	AUC <sub>0-∞</sub> /[mg/(kg·h)]	185.0	540.5	331.1	641.8	557.9	890.3
	MRT <sub>0-t</sub> /h	90.0	82.2	94.2	96.3	115.2	109.2
	MRT <sub>0-∞</sub> /h	96.6	109.1	113.4	111.8	153.9	147.3
	t <sub>1/2α</sub> /h	80.4	150.9	113.4	113.1	134.8	145.5
	T <sub>max</sub> /h	1	2	2	6	2	1
	V <sub>z</sub> /(L/kg)	18.8					
	CL <sub>z</sub> /[L/(h·kg)]	0.162	0.056	0.091	0.047	0.054	0.034
环丙沙星 ciprofloxacin	C <sub>max</sub> /(mg/kg, mg/L)	2.94	14.15	7.48	9.76	7.94	13.31
	AUC <sub>0-t</sub> /[mg/(kg·h)]	28.9	27.1	51.1	32.3	34.1	153.6
	AUC <sub>0-∞</sub> /[mg/(kg·h)]	101.0	36.8	88.2	36.8	145.0	230.0
	MRT <sub>0-t</sub> /h	191.6	156.7	163.3	139.9	170.2	190.5
	MRT <sub>0-∞</sub> /h	1 651.8	344.9	563.6	208.0	2 423.9	440.6
	t <sub>1/2α</sub> /h	1 217.8	270.1	439.8	151.3	1 828.3	321.1
	T <sub>max</sub> /h	6	6	12	6	2	1
	CL <sub>z</sub> /[L/(h·kg)]	0.30	0.81	0.34	0.82	0.21	0.13
C <sub>max</sub> /(mg/kg, mg/L)	0.15	0.24	0.47	0.29	0.23	0.87	

注: T<sub>max</sub>. 达峰时间; C<sub>max</sub>. 药物峰浓度; t<sub>1/2α</sub>. 消除半衰期; MRT<sub>0-t</sub>, MRT<sub>0-∞</sub>分别为平均驻留时间; AUC<sub>0-t</sub>, AUC<sub>0-∞</sub>分别为曲线下面积(0-t)和曲线下面积(0-∞); CL<sub>z</sub>为总体清除率; V<sub>z</sub>表示表观分布容积。  
Notes: T<sub>max</sub> is the time to reach the peak; C<sub>max</sub> is the peak concentration of the drug; t<sub>1/2α</sub> is the elimination half-life; MRT<sub>0-t</sub> and MRT<sub>0-∞</sub> are the average residence time; AUC<sub>0-t</sub> and AUC<sub>0-∞</sub> are the area under the curve (0-t) and the area under the curve (0-∞); CL<sub>z</sub> is total clearance; V<sub>z</sub> is the apparent volume of distribution.

34.1、51.1、27.1 和 32.3 mg/(kg·h)。

### 2.3 药饵给药后水体和底泥中恩诺沙星及其代谢产物环丙沙星残留情况

恩诺沙星药饵给药后水体和底泥中恩诺沙星及其代谢产物环丙沙星残留情况, 随着给药次数增多, 水体中恩诺沙星残留浓度升高很快, 在最后一次给药后 6 h 水体中恩诺沙星浓度达到峰值

5.23  $\mu\text{g/L}$ , 随后开始下降, 在 480 h 残留量达到最低值 0.68  $\mu\text{g/L}$ , 但在水体中一直未检测到代谢产物环丙沙星 (图 3)。底泥中恩诺沙星首先呈现上升趋势, 在 240 h 达到峰值, 残留量为 796  $\mu\text{g/kg}$ , 后略有下降, 480 h 时降至 587  $\mu\text{g/kg}$ ; 底泥中环丙沙星残留呈现逐渐上升趋势, 在 480 h 残留量为 382  $\mu\text{g/kg}$  (图 4)。底泥中代谢产物环丙沙星残留浓度与恩诺沙星浓度的比值范围为 27.5%~65.1%。

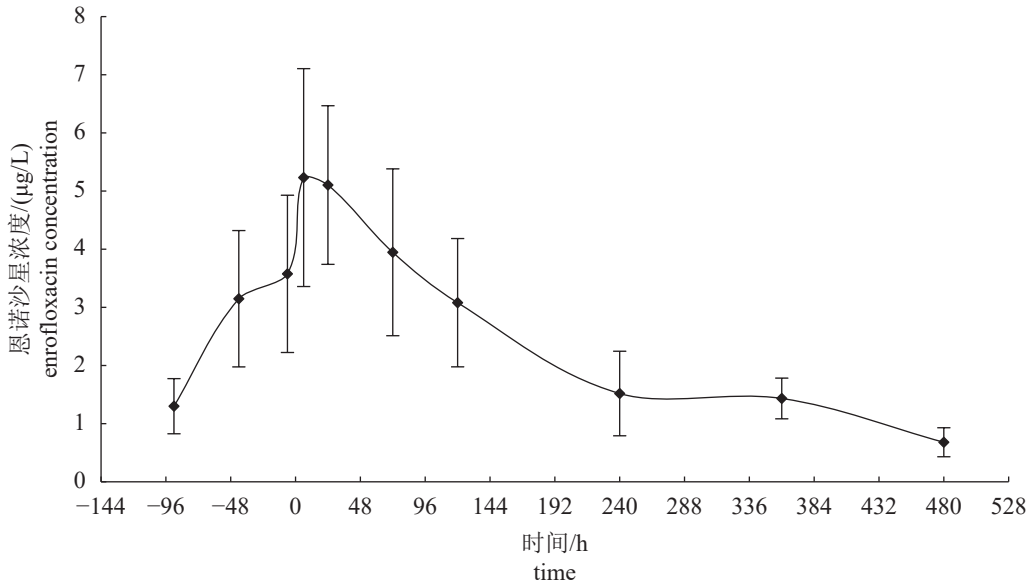


图 3 恩诺沙星药饵给药后水体介质中恩诺沙星残留规律

横坐标零点为最后 1 次给药, 给药时间间隔为 12 h, 下同。

Fig. 3 Residues of enrofloxacin in water after oral administration via enrofloxacin-mediated feed

Zero on the X-axis is the last oral administration, and the administration interval is 12 hours, the same below.

### 2.4 药饵给药后恩诺沙星及其代谢产物环丙沙星在鱼体、水体和底泥中的残留分布

投喂药饵后, 恩诺沙星及其代谢产物环丙沙星在鱼体和在水体中的药物残留量在药后 6 h 为最高值, 其残留百分比分别为 4.65% 和 2.38%, 之后逐渐下降。底泥中的药物残留量逐渐增加, 长时间处于较高水平, 其残留百分比为 41.86%~46.69% (表 2)。

## 3 讨论

### 3.1 模拟临床给药后恩诺沙星在异育银鲫体内药物代谢规律

恩诺沙星是我国批准可以在水产养殖动物中使用的抗菌药, 其在水产动物体内药动学研究报道较多, 但即使在相同的给药方式, 在不同水产动物体内药动学仍存在着较大差别。同为单剂量

口灌给药, 莫桑比克罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) 口灌 10 mg/kg 恩诺沙星, 其血浆在 2 h 的  $C_{\max}$  为 4.38 mg/L<sup>[6]</sup>, 杂交鲟 [(施氏鲟 *Acipenser schrenckii* (♂) × 达氏鳇 *Huso dauricus* (♀)] 血浆在 2.01 h 的  $C_{\max}$  为 0.33 mg/L<sup>[13]</sup>, 西伯利亚鲟 (*A. baeri*) 血浆在 0.5 h 的  $C_{\max}$  为 0.33 mg/L<sup>[7]</sup>。本实验条件下, 恩诺沙星以 18 mg/kg 剂量药饵给药后, 血药在 1 h 的  $C_{\max}$  为 2.94 mg/L, 虽然低于莫桑比克罗非鱼的峰浓度, 但远高于杂交鲟和西伯利亚鲟, 本实验的血药峰浓度与赵留杰等<sup>[11]</sup>以 30 mg/kg 剂量药饵给药结果 ( $C_{\max}$  为 5.60 mg/L) 相近。本实验中, 恩诺沙星在肠道和肾脏中的药物浓度均高于其他组织, 这说明肠道和肾脏分别是恩诺沙星的主要吸收器官和排泄器官。

AUC 是反映药物在体内分布的主要药动学参数,  $t_{1/2z}$ 、 $CL_z$  和 MRT 是反映药物在体内消除缓慢的主要药动学参数。鲤 (*Cyprinus carpio*) 在 20

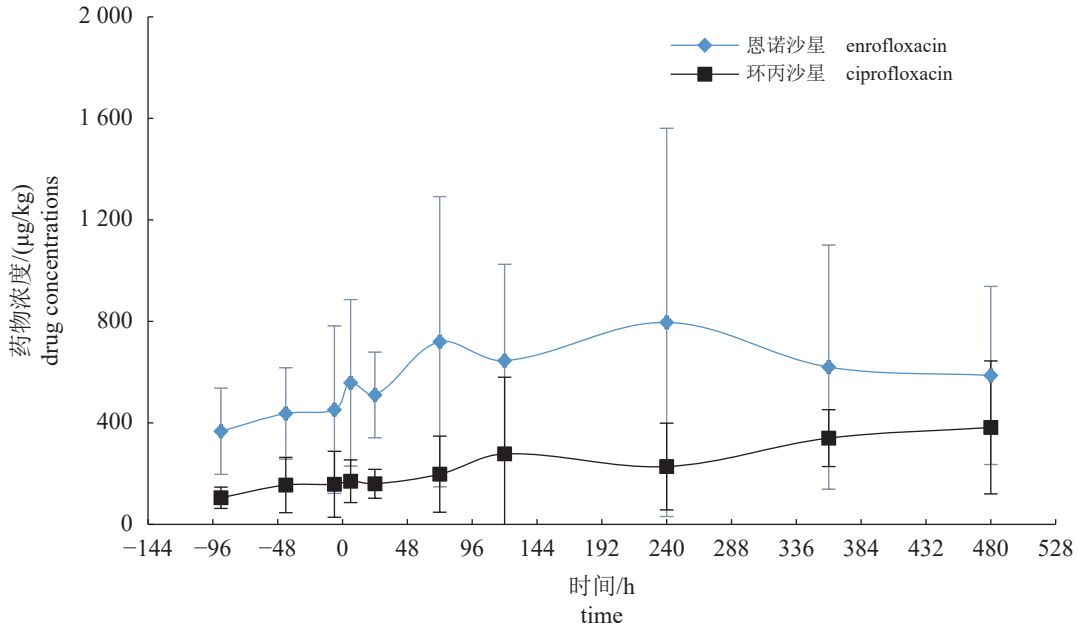


图4 恩诺沙星药饵给药后底泥介质中恩诺沙星和环丙沙星的残留规律

Fig. 4 Residues of enrofloxacin and ciprofloxacin in sediment after oral administration via enrofloxacin-mediated feed

表2 药饵给药后鱼体、水体和底泥中药物残留量和残留百分比

Tab. 2 Drug distribution in aquatic environment after oral administration via enrofloxacin-mediated feed

时间/h time	药物残留量/mg, 残留百分比/% quantity of drug res, percentage of drug residues		
	底泥 sediment	水体 water body	鱼体 fish body
6	71.71, 33.20	5.15, 2.38	10.05, 4.65
24	66.00, 30.56	5.03, 2.33	4.83, 2.24
72	90.42, 41.86	3.89, 1.80	1.56, 0.72
120	90.92, 42.09	3.03, 1.40	2.35, 1.09
240	100.86, 46.69	1.50, 0.69	0.54, 0.25
360	94.56, 43.78	1.41, 0.65	0.24, 0.11
480	95.45, 44.19	0.67, 0.31	0.14, 0.06

和 25 °C 下口灌恩诺沙星, 均显示肾脏中的 AUC [151.4 和 75.6 mg/(kg·h)] 高于血浆 [78.9 和 31.1 mg/(L·h)] 和肝脏 [7.8 和 6.2 mg/(kg·h)]<sup>[9]</sup>; 澳洲银鲈 (*Bidyanus bidyanus*) 和哲罗鲑 (*Hucho taimen*) 肌肉注射恩诺沙星后, 澳洲银鲈和哲罗鲑肾脏中的 AUC [247.7 和 233.9 mg/(kg·h)] 均高于血浆 [126.4 和 191.6 mg/(kg·h)] 和肝脏 [7.5 和 60.1 mg/(kg·h)]<sup>[8]</sup>; 莫桑比克罗非鱼口灌恩诺沙星后, 肾脏中恩诺沙星消除慢于肝脏、血浆和肌肉中, 且肾脏中的  $t_{1/2}$  和 MRT 最长<sup>[6]</sup>。本研究中恩诺沙星多次药饵给药后, 肾脏的 AUC、 $t_{1/2}$  和 MRT 都处于较高水

平, 高于血浆和肝脏等其他组织, 和文献<sup>[6-9, 13]</sup>报道的一致。这是因为在恩诺沙星不断经过肾脏随着尿液排出的过程中, 其他组织中的一部分恩诺沙星会被运输到肾脏, 从而导致恩诺沙星在肾脏中的蓄积<sup>[6]</sup>。由此可见, 肾脏是异育银鲫代谢恩诺沙星的主要器官, 对于恩诺沙星在异育银鲫体内的消除具有重要作用。

### 3.2 模拟临床药饵给药恩诺沙星残留主要分布在底泥介质中

水产养殖中药饵投喂给药, 水产动物摄食后药物在肠道被吸收进入循环系统, 然后通过肾脏和鳃排泄到水中<sup>[2-3]</sup>, 没有被吸收的药物直接从肠道排泄到水中<sup>[4]</sup>, 少量药物从药饵中散失到水中<sup>[5]</sup>。从本研究结果来看, 药饵投喂给药后, 恩诺沙星及其代谢产物在水体中残留量最少 (2.38%~0.69%), 其次是鱼体中残留, 略高于水体 (4.65%~0.03%), 且它们均随着时间延长而逐渐下降; 大量药物最终进入到底泥中 (30.56%~46.69%), 这可能是因为恩诺沙星和环丙沙星难溶于水, 从鱼体内排泄后很快沉淀到底泥。恩诺沙星在池塘底泥中以较高残留浓度存在对生态的影响应引起重视。抗菌药残留对土壤生态效应的研究报道较多, 喹诺酮类抗生素可抑制土壤微生物的呼吸作用、硝化作用、氨化作用和纤维降解能力<sup>[14]</sup>, 恩诺沙星含量大于或等于 0.1 µg/g 时将显著降低土壤细菌的数量,

且随着药物含量的增加, 细菌数量逐渐减少<sup>[15]</sup>; 土壤中添加大于或等于 0.1  $\mu\text{g/g}$  恩诺沙星 14 d, 可显著降低土壤中微生物生物量碳含量, 药物含量越高, 微生物生物量碳含量越低<sup>[15]</sup>。0.05 和 0.2 mmol/kg 浓度的恩诺沙星刺激了土壤中某些微生物的生长, 加快了各元素的转化, 使得土壤元素循环加快, 然而在 0.8 mmol/kg 浓度时, 抑制微生物增长, 降低微生物群落丰度<sup>[16-18]</sup>。本研究中底泥中的恩诺沙星残留量最高可达 0.86  $\mu\text{g/g}$ , 如此高的药物残留量势必会对底泥微生物群落结构产生影响。马驿等<sup>[19]</sup>发现, 单剂量给予不同浓度的恩诺沙星就能对土壤中耐药细菌产生明显的选择作用, 初步确定土壤中恩诺沙星含量为 4  $\mu\text{g/g}$  是对细菌选择产生耐药性的最低浓度。但其实验是通过单剂量产生的结果, 若长期多次给药, 对土壤细菌的危害性可能会更大。抗生素抗性基因 (antibiotic resistance genes, ARGs) 的存在会影响土壤中细菌群落结构, 对土壤微生物环境产生不良影响<sup>[20]</sup>。杨莉莉<sup>[18]</sup>研究发现, 在抗生素的存在下会影响 ARGs 含量, 其随抗生素浓度增加而增加, ARGs 具有持久性和流动性, 它们对环境、人类和动物健康的长期风险是目前最严重的全球威胁之一<sup>[21]</sup>。本研究中恩诺沙星多次给药后, 在 480 h 恩诺沙星的残留量仍然可达 0.59  $\mu\text{g/g}$ , 长期下去会影响底泥中 ARGs 含量, 诱导细菌耐药性的产生。

### 3.3 底泥中代谢产物环丙沙星的生成

研究表明, 恩诺沙星通过脱乙基生成具有活性作用的环丙沙星<sup>[22]</sup>, 陆生动物体内代谢产物环丙沙星含量与恩诺沙星的比值, 在绵羊 (*Capra hircus*)<sup>[23]</sup>、狗 (*Canis familiaris*)<sup>[24]</sup> 和骆驼 (*Lama glummu*)<sup>[25]</sup> 分别为 55%、43% 和 36%, 而水生动物体内此比值一般低于陆生动物, 如欧洲鳗鲡 (*Anguilla anguilla*) 血浆中为 6.24%<sup>[26]</sup>、罗非鱼血浆中为 4.68%<sup>[6]</sup>、拟穴青蟹 (*Scylla paramamosain*) 血浆中为 4.16%<sup>[27]</sup>、中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 血浆中为 1.2%<sup>[28]</sup>。本研究中, 在异育银鲫的血浆、肠道、肝脏、肌肉、鳃和肾脏中均可检测到环丙沙星, 其峰浓度分别为恩诺沙星峰浓度的 5.10%、1.70%、6.28%、2.97%、2.90% 和 6.53%, 肾脏和肝脏中的比例最高, 说明肾脏和肝脏是恩诺沙星代谢和排泄的主要器官。本研究中, 异育银鲫体内  $C_{\text{max-CIP}}/C_{\text{max-ENR}}$  最高的为肾脏 (6.53%), 水中未检测到环丙沙星变化, 且恩诺沙

星在水中残留浓度较低; 然而, 在底泥中代谢产物环丙沙星残留浓度与恩诺沙星浓度的比值为 27.5%~65.1%, 这说明底泥中大部分环丙沙星是在底泥中生成, 而非从水或者鱼体中转移而来。

在活性污泥中, 利用好氧细菌和厌氧细菌降解有机物和医药化合物<sup>[29]</sup>。有关真菌降解抗菌药多见于陆生真菌的研究报道<sup>[30]</sup>, 恩诺沙星在褐腐真菌 (*Gloeophyllum striatum*) 作用下可代谢生成 11 种产物<sup>[31]</sup>; 诺氟沙星、氧氟沙星和环丙沙星在真菌白囊肥齿菌 (*Irpex lacteus*)、变色栓菌 (*Trametes versicolor*) 培养液中分别培养 10 和 14 d, 几乎完全被降解<sup>[32]</sup>。但在水生真菌方面的研究很少, 双氯芬酸在淡水子囊菌 (*Phoma* sp.) 菌株 UHH 5-1-03 作用下发生羟基化、环化和脱羧等反应, 形成多个氧化物和低聚物; 磺胺甲基异噁唑在淡水子囊菌菌株 UHH 5-1-03 作用下, 生物转化生成多个分子量低于原药的降解产物<sup>[33]</sup>。水产养殖池塘底泥中存在种类丰富的细菌和真菌<sup>[34-35]</sup>, 它们在池塘底泥中对恩诺沙星的生物转化作用还有待进一步研究。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

### 参考文献 (References):

- 赵玲敏, 左妍斐, 黄力行. 水产健康养殖中病害防控研究进展[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(28): 18-21, 52.  
Zhao L M, Zuo Y F, Huang L X. Research progress on control of disease in aquaculture[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2018, 46(28): 18-21, 52 (in Chinese).
- 周律. 三七和黄连提取物肠道菌群代谢及药代动力学初步研究 [D]. 广州: 广东药科大学, 2018.  
Zhou L. The preliminary study on intestinal flora metabolism and pharmacokinetics about extracts of *Panax notoginseng* and *Coptidis*[D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2018 (in Chinese).
- 田丽粉. 氟苯尼考在牙鲆体内的药代动力学及残留消除规律研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.  
Tian L F. Studies on the pharmacokinetics and the elimination regularity of florfenicol residues in *Paralichthys oliuaceus* (T & S) *in vivo*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009 (in Chinese).
- 熊文广. 抗生素耐药基因在动物肠道中的排布和在微环境中的消减规律 [D]. 广州: 华南农业大学, 2016.  
Xiong W G. Arrangement and distribution of antibiotic resistance genes in animal intestine and its dissipation in

- microcosm environment[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [ 5 ] 张为民. 湿颗粒饲料在甲鱼养殖中的应用[J]. *广东饲料*, 2001(3): 33-34.  
Zhang W M. Use of wet-pelleted feed in turtle[J]. *Guangdong Feed*, 2001(3): 33-34 (in Chinese).
- [ 6 ] 朱晓漫, 刘永涛, 杨秋红, 等. 恩诺沙星乳在罗非鱼体内的药代动力学及组织分布[J]. *淡水渔业*, 2021, 51(4): 42-48.  
Zhu X M, Liu Y T, Yang Q H, *et al.* Pharmacokinetics and tissue distribution of enrofloxacin emulsion in tilapia[J]. *Freshwater Fisheries*, 2021, 51(4): 42-48 (in Chinese).
- [ 7 ] 赵凤, 周洲, 刘永涛, 等. 恩诺沙星及其代谢物在西伯利亚鲟体内的药理学及消除规律[J]. *西南农业学报*, 2017, 30(4): 957-961.  
Zhao F, Zhou Z, Liu Y T, *et al.* Pharmacokinetics and elimination of enrofloxacin and ciprofloxacin (enrofloxacin metabolite) in *Acipenser baeri*[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2017, 30(4): 957-961 (in Chinese).
- [ 8 ] 司力娜, 陈琛, 李绍戊, 等. 恩诺沙星在金鳊和哲罗鲑鱼体内的药代动力学比较[J]. *江苏农业科学*, 2011, 39(6): 390-392.  
Si L N, Chen C, Li S W, *et al.* Comparison of pharmacokinetics of enrofloxacin in *Bidyanus bidyanus* and *Hucho taimen*[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2011, 39(6): 390-392 (in Chinese).
- [ 9 ] 汪文选, 卢彤岩, 王荻, 等. 两种水温条件下恩诺沙星在鲫鱼体内的药理学比较[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2010(2): 129-131.  
Wang W X, Lu T Y, Wang D, *et al.* Comparison of pharmacokinetics of enrofloxacin in crucian carp at two water temperature[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2010(2): 129-131 (in Chinese).
- [10] 孟勇, 朱晓华, 李邦平, 等. 池塘养殖条件下恩诺沙星及其代谢产物在斑点叉尾鲟体内的残留消除规律[J]. *华中农业大学学报*, 2019, 38(1): 97-102.  
Meng Y, Zhu X H, Li B P, *et al.* Residues elimination rules of enrofloxacin and its metabolites in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) under pond culture conditions[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2019, 38(1): 97-102 (in Chinese).
- [11] 赵留杰, 王元, 常晓晴, 等. 盐酸氯苯胍钙饵给药条件下在异育银鲫体内药理学和组织分布与消除规律[J]. *海洋渔业*, 2018, 40(2): 227-234.  
Zhao L J, Wang Y, Chang X Q, *et al.* Pharmacokinetics, tissue distribution and elimination of robenidine hydrochloride in *Carassius auratus gibelio* after oral administration via medicated feed[J]. *Marine Fisheries*, 2018, 40(2): 227-234 (in Chinese).
- [12] 刘立早, 孙振中, 张玲玲. 水产养殖池塘底泥中氟喹诺酮类抗生素的检测方法研究[J]. *水产科技情报*, 2019, 46(4): 219-223.  
Liu L Z, Sun Z Z, Zhang L L. Study on detection methods of fluoroquinolone antibiotics in sediment of aquaculture ponds[J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2019, 46(4): 219-223 (in Chinese).
- [13] 郭娇娇, 潘红艳, 杨虎, 等. 恩诺沙星在杂交鲟体内的药物代谢动力学[J]. *大连海洋大学学报*, 2011, 26(4): 362-366.  
Guo J J, Pan H Y, Yang H, *et al.* Pharmacokinetics of enrofloxacin in sturgeon *Acipenser schrenckii*[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2011, 26(4): 362-366 (in Chinese).
- [14] 王加龙, 刘坚真, 陈杖榴, 等. 恩诺沙星残留对土壤微生物功能的影响[J]. *生态学报*, 2005, 25(2): 279-282.  
Wang J L, Liu J Z, Chen Z L, *et al.* Effects of enrofloxacin residues on the functions of soil microbes[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(2): 279-282 (in Chinese).
- [15] 马驿, 陈杖榴. 恩诺沙星对土壤细菌数量及微生物生物量碳的影响[J]. *生态毒理学报*, 2008, 3(2): 196-200.  
Ma Y, Chen Z L. Effects of enrofloxacin on the total number of bacteria and the content of microbial biomass carbon in soil[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2008, 3(2): 196-200 (in Chinese).
- [16] Jiang X J, Hou X Y, Zhou X, *et al.* pH regulates key players of nitrification in paddy soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 81: 9-16.
- [17] McMillan A M S, Pal P, Phillips R L, *et al.* Can pH amendments in grazed pastures help reduce N<sub>2</sub>O emissions from denitrification? -The effects of liming and urine addition on the completion of denitrification in fluvial and volcanic soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 93: 90-104.
- [18] 杨莉莉. 三种抗生素和铜单一及复合污染对土壤微生物群落结构和功能的影响 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2019.  
Yang L L. Single and combined pollution of three antibiotics and copper affect on soil microbial community structure and function[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2019 (in Chinese).



- [19] 马驿, 陈杖榴. 恩诺沙星诱导土壤细菌产生耐药性的最低选择浓度的调查[J]. *中国兽医杂志*, 2008, 44(4): 67-68.  
Ma Y, Chen Z L. Investigation of the minimum selected concentration of enrofloxacin to induce resistance in soil bacteria[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2008, 44(4): 67-68 (in Chinese).
- [20] Zhang F L, Zhao X X, Li Q B, *et al.* Bacterial community structure and abundances of antibiotic resistance genes in heavy metals contaminated agricultural soil[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(10): 9547-9555.
- [21] Szekeres E, Chiriac C M, Baricz A, *et al.* Investigating antibiotics, antibiotic resistance genes, and microbial contaminants in groundwater in relation to the proximity of urban areas[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 236: 734-744.
- [22] Tyczkowska K, Hedeon K M, Aucoin D P, *et al.* High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of enrofloxacin and its primary metabolite ciprofloxacin in canine serum and prostatic tissue[J]. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1989, 493: 337-346.
- [23] Mengozzi G, Intorre L, Bertini S, *et al.* Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and intramuscular administrations in sheep[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 1996, 57(7): 1040-1043.
- [24] Bidgood T L, Papich M G. Plasma and interstitial fluid pharmacokinetics of enrofloxacin, its metabolite ciprofloxacin, and marbofloxacin after oral administration and a constant rate intravenous infusion in dogs[J]. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2005, 28(4): 329-341.
- [25] Christensen J M, Smith B B, Murdane S B, *et al.* The disposition of five therapeutically important antimicrobial agents in llamas[J]. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 1996, 19(6): 431-438.
- [26] 房文红, 于慧娟, 蔡友琼, 等. 恩诺沙星及其代谢物环丙沙星在欧洲鳗鲡体内的代谢动力学[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(4): 622-629.  
Fang W H, Yu H J, Cai Y Q, *et al.* Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in European eel (*Anguilla anguilla*) after a single oral gavage[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(4): 622-629 (in Chinese).
- [27] 周帅, 胡琳琳, 房文红, 等. 恩诺沙星及其代谢物环丙沙星在拟穴青蟹体内的药代动力学[J]. *水产学报*, 2011, 35(8): 1182-1190.  
Zhou S, Hu L L, Fang W H, *et al.* Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in mud crab (*Scylla paramamosain*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(8): 1182-1190 (in Chinese).
- [28] 钱云云, 唐俊, 郑宗林, 等. 恩诺沙星在罗氏沼虾体内的药物代谢动力学[J]. *动物学杂志*, 2007, 42(5): 62-69.  
Qian Y Y, Tang J, Zheng Z L, *et al.* Pharmacokinetics of enrofloxacin in *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2007, 42(5): 62-69 (in Chinese).
- [29] 张怡鸣, 张玉秀, 祖德彪, 等. 焦化废水处理技术及其污泥细菌菌群结构功能研究进展[J]. *矿业科学学报*, 2020, 5(2): 232-241.  
Zhang Y M, Zhang Y X, Zu D B, *et al.* Coking wastewater treatment technology and its bacterial community structure and function in sludge[J]. *Journal of Mining Science and Technology*, 2020, 5(2): 232-241 (in Chinese).
- [30] 王强锋, 朱彭玲, 夏中梅, 等. 三种农用抗生素降解真菌的筛选及其降解性能[J]. *农业资源与环境学报*, 2018, 35(6): 533-539.  
Wang Q F, Zhu P L, Xia Z M, *et al.* Screening and degradation properties of three kinds of agricultural antibiotics degrading fungi[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2018, 35(6): 533-539 (in Chinese).
- [31] Wetzstein H G, Schmeer N, Karl W. Degradation of the fluoroquinolone enrofloxacin by the brown rot fungus *Gloeophyllum striatum*: identification of metabolites[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(11): 4272-4281.
- [32] Čvančarová M, Moeder M, Filipová A, *et al.* Biotransformation of fluoroquinolone antibiotics by ligninolytic fungi –metabolites, enzymes and residual antibacterial activity[J]. *Chemosphere*, 2015, 136: 311-320.
- [33] Hofmann U, Schlosser D. Biochemical and physicochemical processes contributing to the removal of endocrine-disrupting chemicals and pharmaceuticals by the aquatic ascomycete *Phoma* sp. UHH 5-1-03[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(5): 2381-2399.
- [34] 谢芹. 凡纳滨对虾和罗氏沼虾亲虾养殖塘水质及微生物群落多样性的研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.  
Xie Q. The microbial community diversity and water

- quality in culturing ponds of *Penaeus vannamei* and *Macrobrachium rosenbergii*[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017 (in Chinese).
- [35] 范立民. 吉富罗非鱼养殖池塘微生物群落研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- Fan L M. Microbial community in tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured ponds[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015 (in Chinese).

## Metabolism and distribution of enrofloxacin in *Carassius auratus gibelio*, pond water and sediment after oral administration of medicated feed in the simulated aquaculture ecosystem

LING Hai<sup>1,2</sup>, MIAO Tianyin<sup>1</sup>, WANG Yuan<sup>2</sup>, XIANG Yang<sup>1,2</sup>, HU Kun<sup>1\*</sup>, FANG Wenhong<sup>2\*</sup>

(1. National Pathogen Collection Center for Aquatic Animals, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Key Laboratory of East China Sea Fishery Resources Exploitation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** In order to investigate the fate of enrofloxacin in aquatic environment, the pharmacokinetics and metabolism of enrofloxacin in silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) were monitored after oral administration of medicated feed in the simulated aquaculture system, and the pattern of metabolism and distribution of enrofloxacin in the water body and sediment. Fish were fed enrofloxacin-medicated feed at a multiple dose of 18 mg/kg twice a day for a period of 6 days. The peak concentration ( $C_{max}$ ) of enrofloxacin in *C. auratus gibelio* was intestine > kidney > muscle > gill > liver > plasma, the  $C_{max}$  were 14.15, 13.31, 14.15, 7.48, 7.94 mg/kg and 2.94 mg/L, respectively. The metabolite ciprofloxacin could be detected in all tissues, and the percentages of  $C_{max}$  of ciprofloxacin to  $C_{max}$  of enrofloxacin were 5.10%, 1.70%, 6.28%, 2.97%, 2.90% and 6.53%, respectively. The order of body clearance ( $CL_z$ ) of enrofloxacin in the tissues was plasma > liver > intestine > gill > muscle > kidney. With the increase of administration times, the enrofloxacin concentration in water went up rapidly and the peak value (5.23  $\mu\text{g/L}$ ) was reached at 6 hours after the last administration; it began to decline afterwards, but the metabolite ciprofloxacin could not be detected in water. The enrofloxacin concentration in the sediment first showed an upward trend, and reached the peak value (796  $\mu\text{g/kg}$ ) at 240 h, then it decreased slightly and fell to 587  $\mu\text{g/kg}$  at 480 h. The metabolite ciprofloxacin concentration in the sediment showed a gradual upward trend, and the residue was 382  $\mu\text{g/kg}$  at 480 h. The percentage of ciprofloxacin to enrofloxacin concentration in the sediment was 27.5%-65.1%. The antibacterial residues after medicated-diet administration mainly existed in the sediment of the aquaculture ecosystem, and the percentage of antibacterial residues in the sediment was 41.86%-46.69%, and the residues eliminated slowly. We should pay close attention to the ecological safety risk of the antibacterial residues in the sediment after medicated-diet administration. This study provides technical support for scientific medicine production in aquaculture and theoretical data for ecological security assessment.

**Key words:** *Carassius auratus gibelio*; enrofloxacin; ciprofloxacin; antibacterial residue; sediment; metabolism and distribution

**Corresponding authors:** HU Kun. E-mail: khu@shou.edu.cn;

FANG Wenhong. E-mail: fwenhong@163.com

**Funding projects:** Key Project of Developing Agriculture by Science and Technology in Shanghai (2018-02-08-00-07-F01549); The Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2020TD41)