

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2020052502

侯力睿, 傅榆涵, 赵冲, 等. 兽药抗生素对生态环境的混合毒性研究进展[J]. 环境化学, 2021, 40(1): 55-64.

HOU Lirui, FU Yuhan, ZHAO Chong, et al. Advance on combined toxicity of veterinary antibiotics on ecological environments[J]. Environmental Chemistry, 2021, 40(1): 55-64.

兽药抗生素对生态环境的混合毒性研究进展*

侯力睿 傅榆涵 赵冲 扈洪波 尹淑涛**

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京, 100083)

摘要 抗生素是环境中普遍存在的污染物, 畜牧水产养殖是其主要来源之一. 环境中可能同时存在多种抗生素残留, 因此单一药物的毒性评价难以反映抗生素对生态环境的影响, 应探究其混合物的毒性效应. 本文在总结大量文献的基础上, 介绍了兽用抗生素的残留现状, 总结了兽用抗生素对生态环境的混合毒性研究进展, 讨论了兽用抗生素残留对土壤生物和水生生物的生态毒性效应, 最后对兽用抗生素的环境混合毒性研究进行了展望.

关键词 兽药抗生素, 混合毒性, 毒性评价, 环境污染.

Advance on combined toxicity of veterinary antibiotics on ecological environments

HOU Lirui FU Yuhan ZHAO Chong HU Hongbo YIN Shutao**

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing, 100083, China)

Abstract: Antibiotics are emerging pollutants that widely occur in the environment, and livestock farm and aquaculture are one of the main genres in the environment. Multiple antibiotic residues may exist in the environment at the same time, so the toxicity evaluation of a single drug can't be used to reflect the actual situation, and the toxic effects of antibiotics mixture should be explored. This paper reviewed the current research progress on the status of veterinary antibiotic residues, and the research progress of mixed toxicity of veterinary antibiotics to the ecological environment was summarized. Furthermore, the ecological toxicity effects of veterinary antibiotics on soil and aquatic organisms were discussed. Finally, the research prospects about the mixed toxicity of veterinary antibiotics to the environment were proposed.

Keywords: veterinary antibiotics, combined toxicity, toxicity evaluation, environmental pollution.

抗生素的发现被认为是 20 世纪最重大的科学成就之一, 对人类医学和兽医学都产生了革命性变化. 抗生素是能够杀死或抑制细菌生长的天然或合成的药物, 近年来, 随着水产和畜牧业养殖规模快速发展, 兽用抗生素除了被广泛用于预防和治疗畜禽疾病外, 还被用做饲料添加剂以促进动物生长^[1]. 据统计, 全世界每年用于水产养殖和畜牧业等领域的兽用抗生素消耗量至少为 63000 t, 预计到 2030 年增至 106600 t^[2].

兽用抗生素是环境中抗生素的主要来源之一, 使用量较大的兽用抗生素包括喹诺酮类、四环素类、磺胺类等. 抗生素被动物摄入后, 70%—80% 的药物以原药或者其代谢产物的形式排出体外^[3]. 进入环境

2020 年 5 月 25 日收稿 (Received: May 25, 2020).

* 国家重点研发计划项目 (2018YFC1603005) 资助.

Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFC1603005).

** 通讯联系人 Corresponding author, Tel: 15810636261, E-mail: yinshutao@cau.edu.cn

中的抗生素会使病菌产生耐药性,破坏生态环境平衡,也会对动物和植物产生毒性作用,或者通过生物富集作用进入食物链,进而危害人类健康^[4-5].调查研究显示,我国长三角地区孕妇尿样中有 16 种抗生素被检出,一种及以上抗生素的检出率为 41.6%,除此之外,儿童尿样中检测出 21 种人或兽用抗生素,一种或多种抗生素的检出率为 79.6%,且部分药物已在临床上禁用^[6].环境中的抗生素种类繁多,混合后的抗生素可能会由于药物间的相互作用产生不同的混合毒性作用,如协同、拮抗或相加作用等.

本文概述了兽药抗生素及其混合毒性作用,并对近年来抗生素联合对生物体毒性方面的研究现状进行综述,旨在警示人们抗生素对生态环境造成的毒性作用,从而引起人们对抗生素导致环境污染的重视.

1 兽药抗生素联合用药及混合毒性作用研究 (Study on the combination and combined toxic effects of veterinary antibiotics)

随着抗菌药物的广泛使用以及不规范用药,造成了动物对抗菌药物的敏感性降低、细菌耐药性逐渐增强等现象,对动物疾病治疗方面构成了严重的威胁,现已成为了全球性的问题^[7].在水产和畜牧养殖中,动物疾病发生的原因复杂,单一用药往往难以控制病情,为了扩大治疗范围、增强疗效,通常情况下会使用两种或多种药物同时或先后进行给药,通过药物的抗菌机制产生的互补或者相加作用提高疗效,并减少细菌的耐药性^[8-10].

对于养殖动物来说,联合用药对病情的治疗与预防作用是十分有效的,通过联合使用抗菌药物可以产生相加或者协同效应,比如临床上常用的阿莫西林和克拉维酸钾,氨苄西林和舒巴坦等,在降低细菌耐药率的同时增强治疗效果^[11].Bergamin 等^[12]使用黏菌素和氯霉素联合用药,探究该药物组合对具有多重抗药性的阴沟肠杆菌的杀灭作用,结果表明两种药物联合使用可以有效杀灭具有多重耐药的阴沟肠杆菌,并且提出可以用黏菌素和氯霉素的复方剂治疗阴沟肠杆菌引起的疾病.另有用青霉素和庆大霉素联合治疗肠球菌引起的新内膜炎的研究,发现联合用药具有杀菌作用,单独使用只有抑菌效果^[13].

一方面,抗生素的联合使用对细菌的抑制作用效果显著,但另一方面,当用于畜禽或者水产的抗生素随着动物的排泄进入环境后,混合后的抗生素之间可能会发生相互作用而增强毒性,且不同种类抗生素之间的联合毒性作用不同,对不同的种类生物毒性作用也不相同.因此,运用适当的数学评价模型,模拟不同种类抗生素对环境生物的毒性作用,对预测抗生素的生态毒性具有重要意义.

为了定量表征混合物的联合毒性效应,科学家们提出例如指数法、浓度加和与独立作用模型(CA/IA)、等效线图条评价模型来判别和预测混合物的联合毒性.等效线图法是一种经典的分析二元混合无相互作用的统计方法, x 轴和 y 轴分别代表组分A和组分B的毒性单位,一般是用混合物中该组分浓度与其单独作用时特定效应水平下浓度的比值表示($c_i/EC_{50,i}$),当实验点出现在两者连线的直线上表示混合物两组分之间没有相互作用,为相加作用,在直线的上、下方分别表示为有拮抗和协同作用^[14].而混合物毒性的指数法是通过公式计算定量比较模型预测值和实际观测值之间的方法,例如CI法(combination index)、毒性单位法(TU)等^[15].除此之外,浓度加和与独立作用模型(CA/IA)是毒理学评价混合物联合毒性作用最常用的模型之一^[16-17].浓度加和模型(CA, concentration addition)主要用于评价具有相似毒性作用方式的混合体系,而独立作用模型(IA, independent action)也称效应加和模型,适用于评价具有不同毒性作用模式的联合毒性作用.

表1总结了运用不同方法评价抗生素联合毒性的研究情况,从检索到的文献来看,对抗生素的二元混合毒性研究较多,三元及以上抗生素混合毒性的研究较少,且受试生物大多为微生物和藻类,缺乏对其他高等动植物的混合毒性评价,除此之外,目前大多数研究为急性毒性实验,对于慢性毒性和蓄积毒性的研究较少.还可以看出不同抗生素组合对生物的毒性效应不同,但三元及以上抗生素混合物的毒性效应多呈现为协同作用.另外还需要注意的是,环境中的物质体系复杂,除抗生素之间存在联合作用,它们与环境中的其他污染物,如重金属、农药等之间的混合毒性作用也应给予关注,例如金霉素与 Cu^{2+} 的长时间暴露会对蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)和铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)产生协同毒性^[18].

表 1 不同抗生素组合对生物的联合毒性评价

Table 1 Evaluation of different antibiotics combined toxicity to organisms

组合类别 Type of mixtures	抗生素药物组合 Mixtures of antibiotics	受试生物 Test organism	EC ₅₀	评价模型 Methodology model	结果 Result	参考文献 Reference
二元	红霉素+四环素 ERY+TET	羊角月牙藻 <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	0.27 mg·L ⁻¹	CI	协同	[19]
		鱼腥藻 <i>Anabaena</i> CPB4337	3.0 mg·L ⁻¹	CI	低浓度协同, 高浓度拮抗	
	头孢菌素+环丙沙星 CEP+CPF	羊角月牙藻 <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	0.9 mg·L ⁻¹	CA/IA	协同	[20]
		红霉素+诺氟沙星 ERY+NOR	鱼腥藻 <i>Anabaena</i> CPB4337	4.5 mg·L ⁻¹	CI	相加
	磺胺二甲嘧啶+盐酸四环素 SMZ+TH	大肠杆菌 <i>E. coli</i> MG1655	3.89 μmol·L ⁻¹	TU	拮抗	[21]
		枯草芽孢杆菌 <i>subtilis</i> 168	10.2 μmol·L ⁻¹	TU	相加	
		费氏弧菌 <i>V. fischeri</i> AS 1.3842	97.7 μmol·L ⁻¹	TU	拮抗	
		土霉素+氟苯尼考 OTC+FLO	费氏弧菌 <i>V. fischeri</i>		等效线图法	协同
	土霉素+红霉素 OTC+ETM	费氏弧菌 <i>V. fischeri</i>		等效线图法	协同	
	氟苯尼考+红霉素 FLO+ETM	羊角月牙藻 <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		等效线图法	相加	
土霉素+氟尿嘧啶 OTC+FLU	羊角月牙藻 <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		等效线图法	拮抗		
螺旋霉素+氨基青霉素 SP+AMP	铜绿微囊藻 <i>Microcystis aeruginosa</i>	1.26 μg·L ⁻¹	CA/IA	低浓度协同, 高浓度拮抗	[23]	
三元	磺胺二甲氧嘧啶+盐酸四环素 +甲氧苄啶 SMM+TH+TMP	大肠杆菌 <i>E. coli</i> MG1655	0.28 μmol·L ⁻¹	TU	协同	[21]
		枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i> 168	0.42 μmol·L ⁻¹	TU	协同	
		费氏弧菌 <i>V. fischeri</i> AS 1.3842	17.7 μmol·L ⁻¹	TU	协同	
	土霉素+红霉素+氟尿嘧啶 OTC+ETM+FLU	费氏弧菌 <i>V. fischeri</i>		等效线图法	相加	[22]
四元	红霉素+左氧氟沙星+ 诺氟沙星+四环素 ERY+LEV+NOR+TET	羊角月牙藻 <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	16.0 mg·L ⁻¹	CI	协同	[19]
五元	红霉素+左氧氟沙星+诺氟 沙星+四环素+阿莫西林 ERY+LEV+NOR+TET+AMO	鱼腥藻 <i>Anabaena</i> CPB4337	12.4 mg·L ⁻¹	CI	协同	[19]

2 兽药抗生素混合残留对生态的毒性效应 (Ecotoxicity of mixed residues of veterinary antibiotics)

大多数抗生素的物理化学性质稳定,不易降解,可以长时间在环境中存在,通过吸附、迁移、转化、降解等过程在土壤和水体环境介质间进行再分配^[24-26]。兽用抗生素通过工业排放、畜禽排泄、水产养殖等途径进入环境,在水体环境以及土壤中蓄集,对水体和土壤中的动植物和微生物产生直接或间接的危害,进而危害人类的健康。图 1^[27-28]为环境中兽用抗生素的来源、迁移和生态影响流程图。环境中的兽药抗生素混合物对不同对象产生的毒性作用不同,表 2 简要总结了兽药抗生素混合物对不同受试生物产生的毒性效应,可见兽用抗生素除了会抑制细菌活性外,对农作物和动物也会造成一定的影响,阻碍农作物的正常生长,危害动物的正常生长发育。

2.1 对土壤生物的生态毒性效应

土壤是自然环境的重要组成部分,承担着环境中约 90%的来自各方面的污染物质^[36]。土壤中污染物种类繁多,抗生素是其中的一种,它可以通过被污染的灌溉废水、水产养殖中残余的兽药以及动物粪便等途径进入到土壤当中,在长期低剂量的暴露下,可能会抑制植物的种子萌发和根茎生长,或造成蚯蚓的氧化应激损伤,以及增强环境中微生物的抗性基因等后果,严重危害生态环境健康^[28,37]。

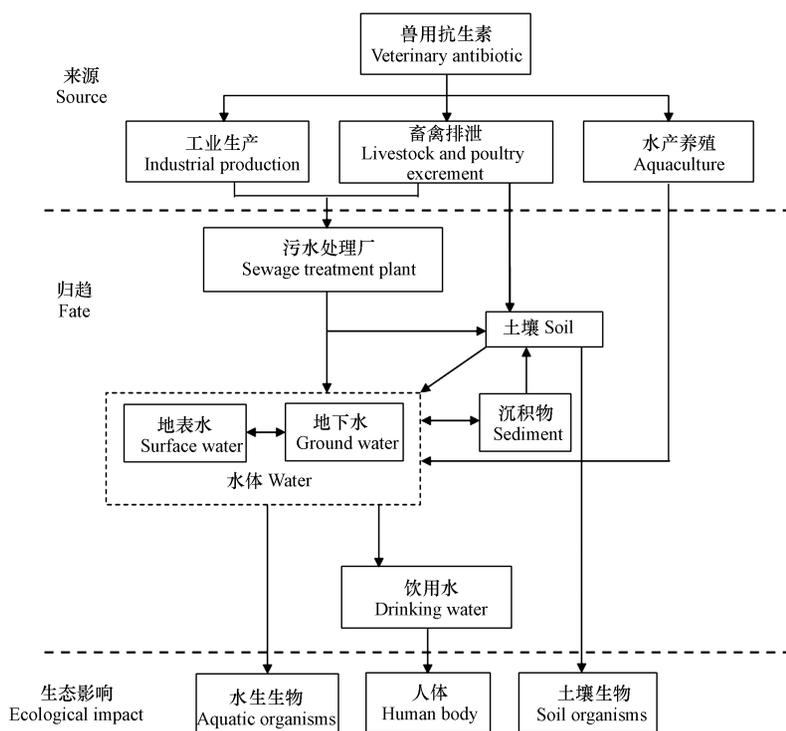


图1 环境中兽用抗生素的来源、迁移和生态影响流程图

Fig.1 Flow chart of veterinary antibiotic source, migration and ecological impact

表2 兽药抗生素混合物对不同受试生物的毒性效应

Table 2 Toxic effects of mixture of veterinary antibiotics on different tested organisms

药物组合 Mixtures of veterinary antibiotics	受试生物 Test organism	毒性效应 Toxic effects	参考文献 Reference
四环素+金霉素 四环素+磺胺嘧啶	小白菜幼苗	低浓度促进生长,高浓度抑制	[29]
纳西地酸+环丙沙星	蚕豆	遗传毒性增强	[30]
磺胺类+喹诺酮类 胺类+四环素	大肠杆菌	抑制活性	[31]
吉他霉素+金霉素 盐霉素+黄霉素	发光细菌	抑制发光强度	[32]
氯霉素+万古霉素	家蚕	促进摄食行为,减少肠道菌群	[33]
诺氟沙星+磺胺甲恶唑	斑马鱼	减低产卵量以及子代孵化率	[34]
磺胺单甲恶唑+头孢噻肟钠+恩诺沙星+ 四环素	斑马鱼胚胎	死亡率升高,畸形率升高	[35]

2.1.1 对植物的混合毒性作用

进入土壤中的抗生素会在土壤中长期残留,可对农作物产生毒性作用,影响农作物的正常生长. Boxall 等^[38]的研究发现, $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 土霉素、恩诺沙星和保泰松可以显著抑制胡萝卜和莴苣的生长,但阿莫西林、磺胺嘧啶、氟苯尼考等对这两种植物无明显影响.说明不同抗生素对植物的毒性与药物种类有关. Khadra 等^[30]的研究表明纳西地酸、恩诺沙星和环丙沙星混合作用于蚕豆时,与单一作用时相比,在遗传毒性方面有较强的协同作用.这可能是由于氟喹诺酮类的抗生素药物抑制了拓扑异构酶 II 的活性,抑制 DNA 复制,在减数分裂过程中造成染色体异常,从而导致遗传毒性.抗生素与大多污染物相似,在低浓度下可以促进植物的生长,高浓度则抑制植物生长^[39]. 宫晓双等^[29]研究了土壤中四环素与金霉素、四环素与磺胺嘧啶二元复合物对小白菜幼苗生长发育的毒性作用,结果表明较低浓度时抗生素复合物能促进小白菜芽长和根长的生长,但随着浓度的升高,小白菜的生长受到抑制,并且二元复合物对抗氧化酶的抑制呈现协同作用.

2.1.2 对动物的混合毒性作用

土壤中的动物,如蚯蚓、线虫等,是维持土壤肥力的重要生物,而且在环境监测和生态毒性诊断方面也有着重要作用.有研究表明土霉素、泰乐菌素对土壤中蚯蚓、跳虫(*Springtails*)和线虫(*Enchytraeids*)的毒性较低,半数致死浓度为 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ [40].说明抗生素只有在远超环境实际浓度时,才会对土壤中的动物产生急性毒性[41].尽管如此,并不能就此忽略抗生素对土壤中动物的危害.研究发现,土壤中的恩诺沙星可以促进蚯蚓对重金属镉的吸收,表现为加强的协同作用[42].除此之外,有研究发现土壤或污泥等对抗生素有较强的吸附作用,抗生素或者其降解产物在土壤中迁移并蓄积[43],单一药物的毒性试验并不能反映实际环境中的情况,因此有必要进一步进行抗生素联合或抗生素及其降解产物对土壤动物的慢性或蓄积毒性的实验.

2.1.3 对微生物的混合毒性作用

土壤中的微生物与土壤状况密切相关,是维持生态中生物活性的重要组成部分.土壤中微生物的物种多样性丰富,包括细菌、放线菌和真菌等,其中细菌占比最大,数量最多,营养结构也最复杂,它们对土壤中极低浓度的污染物十分敏感,并且能做出迅速的响应,被认为是土壤环境评价最好的指示物和最灵敏的指标[44].尽管多数研究显示,低浓度的抗生素对微生物并无显著的毒性效应,甚至能促进微生物的生长,但是仍会抑制微生物的活性[45-46].据报道,低浓度的恩诺沙星会刺激土壤的呼吸作用和氨化作用,但较高浓度的恩诺沙星则会抑制对土壤的呼吸和氨化作用以及土壤的硝化作用[47].

在联合作用方面,Wang等[21]研究了磺胺类(SAs)、磺酰胺增强剂(SAPs)和四环素(TCs)分别对大肠杆菌(*Escherichia coli*)、费氏弧菌(*Vibrio fischeri*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)等3种细菌的二元及三元联合毒性,结果表明SA-SAP和SA-SAP-TC混合物对3种细菌的抑制均为协同作用,而SA-TC和SAP-TC混合物则表现出拮抗作用.Long等[31]同样以大肠杆菌为目标生物,探究了磺胺类抗生素与其他种类抗生素混合的毒性作用,研究结果表明磺胺类抗生素和喹诺酮类抗生素之间以及与部分 β -内酰胺类抗生素之间的二元联合毒性为相加作用,与头孢塞肟钠之间呈协同作用,与四环素或青霉素之间为拮抗作用,说明抗生素之间的联合毒性效应与混合物的种类也有关系.

另有研究表明土壤中不同物种的微生物对兽药抗生素的敏感度不同,例如恩诺沙星对细菌的影响要强于放线菌和真菌[48],造成细菌数量大量减少,破坏了原有的细菌与放线菌和真菌之间的比例平衡,破坏了土壤中微生物群落结构,进而影响土壤环境的生态平衡[49-51].

2.2 对水生生物的生态毒性效应

近年来,抗生素在地表水和饮用水中被频繁检测出来,2014年Zhang等[52]对北京温榆河及其支流收集的45个样本进行了抗生素的检测,检测到15种氟喹诺酮类抗生素,8种四环素类和16种磺胺类.并且发现磺胺类是河水中的主要抗生素,总浓度高达 $3164.0 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$,其次是氟喹诺酮类($1430.3 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$)和四环素类($296.6 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$).不同种类的抗生素在水中混合,大量研究已经证明它们之间会发生的相互作用从而增加毒性,水环境中的抗生素会在生物体内累积,对植物生长、水生生物以及微生物都会产生负面影响,因此深入探究抗生素的联合毒性作用对评估水生生态系统中抗生素的生态风险具有重要意义.

2.2.1 水生植物

藻类作为生态系统的初级生产者,可以为水环境中的鱼类等水生生物提供氧气和食物,是水生生态环境中重要的能量来源,在维持和稳定生态系统平衡有着重要的作用[53].由于藻类的生长周期短、繁殖快、对环境敏感等特征,因此常常将藻类用做评价水生生态系统污染状况的标志物[54].Wang等[23]研究了螺旋霉素和氨苄青霉素的对铜绿微囊藻的联合毒性,结果显示不同浓度比例的混合物对铜绿微囊藻的毒性不同,随着总浓度的增加,联合毒性从协同作用变成了拮抗作用,并且在环境浓度的混合下,显示两者联合可以促进微囊藻毒素的释放.González-Pleiter等[19]的研究结果表明,低浓度的红霉素和四环素的二元混合对羊角月牙藻(绿藻)和鱼腥藻CPB4337(蓝藻)的活性都表现出强烈的协同作用,并且发现蓝藻对抗生素的敏感程度要高于绿藻.Magdaleno等[20]研究了6种抗生素对羊角月牙藻(*Pseudokirchneriella subcapitata*)的联合毒性作用,发现抗生素间的两两联合相较于单一药物对该绿藻的抑制作用更强,呈现协同作用.抗生素对藻类产生的危害与抗生素种类有关,可能是通过改变藻类细胞中

叶绿素和可溶性蛋白含量,抗生素抑制叶绿素的合成,降低藻类光合作用效率,从而阻碍藻类的正常生长^[55];或是抗生素会抑制藻类细胞光化学效率和光合作用电子传递链速率,影响相关基因的表达,破坏光合系统^[56-57];又或是抗生素诱导产生过量的活性氧,导致膜脂过氧化,破坏细胞膜结构而造成细胞的氧化损伤,影响藻类细胞的正常生长代谢甚至死亡^[58]。另外,值得注意的是水环境中的抗生素除了自身具有毒性外,还会与其他污染物如重金属、农药等联合,导致藻类的不正常生长,造成水华等更严重的后果。

2.2.2 水生动物

水体中残留的抗生素进入水生动物体内,残留在体内组织中,在体内蓄积。相关急性毒性实验显示,抗生素暴露会影响动物的正常发育,对机体造成损伤。例如已有研究表明甲硝唑和磺胺类药物可以显著抑制鲤鱼和虹鳟鱼的先天免疫反应,抑制鱼肝细胞中细胞色素氧化酶 CYP1A 的活性^[59-60],对机体产生免疫毒性作用。另有研究学者发现诺氟沙星和磺胺甲恶唑在单独和联合暴露会降低斑马鱼的产卵量以及子代的孵化率^[34],造成机体的生殖毒性。除此之外,还会对机体产生发育毒性。例如 Qiu 等^[61]用磺胺单甲恶唑、头孢噻肟钠、恩诺沙星和四环素等 4 种抗生素对斑马鱼胚胎进行了单一及联合毒性的研究,结果表明 4 种抗生素及其混合物对斑马鱼幼虫早期发育有显著的影响,畸形率随浓度升高而上升,并显示它们联合毒性要强于单独接触。

尽管抗生素对高等水生生物的急性毒性实验的结果并不乐观,但是实验中所用浓度远超实际环境浓度,就目前的研究结果显示,抗生素在环境相关浓度下对高等水生生物无明显影响^[35,62],但基于抗生素在环境中存在的特点,低浓度长时间的暴露对生物产生的慢性毒性以及蓄积毒性等还需深入研究。除此之外,对于处于低营养级的小型动物来说,它们对抗生素更为敏感,应给予更多关注。例如有研究表明低浓度下的土霉素会导致锥形宽水蚤的幼虫发育受阻,成年个体的繁育能力下降^[63]。

2.2.3 水体微生物

相较于土壤环境,抗生素对水中沉积物和污泥中的微生物的影响研究较少。抗生素在水和沉积物之间处于迁移转化的动态平衡之中,地表水中的抗生素有很大一部分都被吸附到沉积物中^[64-65],由于吸附作用较强,抗生素在此类环境中可能会降低甚至失去抗菌活性,因此多数研究显示抗生素对沉积物和活性污泥中微生物数量、活性及群落结构的效应浓度较高,在 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 或 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 级别^[66-68]。在从智利鲑鳟鱼类养殖场水体中分离出的 103 种细菌中,发现大多数细菌对阿莫西林、氨苄西林、红霉素、呋喃唑酮、氟苯尼考、氯霉素、头孢氨苄和甲氧苄啶等抗生素具有抗药性^[69]。另有研究发现吉他霉素与盐酸金霉素、盐霉素和黄霉素的二元混合物对发光细菌的抑制作用均表现为协同作用^[32]。另外,抗生素在水体中的毒性作用与暴露时间相关。Zhang 等^[70]研究发现氨基糖苷类抗生素及其混合物对发光菌具有明显的时间依赖毒性。除此之外还需注意的是,抗生素在水体环境中会发生光解或水解,水体中除了抗生素原药有毒性,抗生素与其分解后的代谢产物也存在联合作用^[71-72]。Wang 等^[73]的研究表明氟喹诺酮类的抗生素及其光解产物对大肠杆菌的单独及联合毒性作用,发现紫外线照射后的降解产物增强了细菌的耐药性和诱导抗性突变的能力,并且联合毒性表现呈相加作用。

2.3 其他动物

抗生素联合作用主要集中在对水生生物和土壤生物方面,实验对象多为微生物、藻类、鱼、蚯蚓等,对其他动物的联合毒性研究较少,但是抗生素对其他生物的危害并不是不存在。它们可以通过饮用水或者食物链的富集进入动物或者人体中,长时间摄入后随血液循环到达各个器官,造成机体损伤。进入体内的抗生素可能会对胃肠道内的有益菌造成危害,破坏肠道微生态平衡,增加肠道内抗生素抗性基因 (ARGs) 的丰度。有研究表明抗生素引起的肠道菌群变化可能导致宿主免疫稳态失调,并增加对病原体感染的敏感性^[74]。Li 等^[33]研究了家蚕 (*Bombyx mori* L.) 联合口服氯霉素和万古霉素的生理和毒理反应,结果表明,抗生素可促进蚕的摄食行为,并显著减少肠道可培养细菌数。另有研究发现小鼠和猪口服含抗生素的水和饲料后会显著增加肠道内 ARGs 的密度和丰度^[75]。除此之外,抗生素还可能具有生殖毒性,导致雄性的精子损伤,抑制繁殖能力^[76-77]。

抗生素除了对动物机体产生损害,粪便中残留的抗生素对依赖于动物粪便生存的昆虫也会造成危害。有报道称残留有阿维菌素、伊维菌素和美贝霉素脞的粪便,对草原中的多种昆虫及堆肥周围的多种

昆虫都有强大的抑制或杀灭作用.牛经伊维菌素皮下给药后排出的粪便可使草场上双翅目昆虫的数量减少 36%^[78].尽管目前抗生素对其他动物方面的报道较少,且大多都关注单一抗生素的毒性,在抗生素联合方面的研究更少,因此,需要开展抗生素联合对不同物种的研究,为兽药抗生素对环境生态的安全性评价提供更多有力数据.

3 结语与展望 (Conclusion and prospect)

抗生素现已成为一类不可忽视的环境污染物,除了兽用抗生素之外,还有医用抗生素、农用抗生素和工业用抗生素,通过污水和排泄等方式进入环境中,因此,揭示抗生素对环境的毒性危害,对于其生态风险性评价具有重要意义.虽然已有大量研究者对抗生素的毒性效应开展了相应的研究,但是这些工作仍然不能满足实际的生态风险评价需要.首先,由于我国关于地表水等环境中抗生素赋存水平限值尚无强制标准,污水深度处理工艺缺失等现象,导致我国的环境中不断有抗生素被检测出来.其次,抗生素在环境中的暴露大多呈现为“混合-持久-低剂量”的特征,因此对于抗生素的慢性和蓄积毒性仍有待于进一步研究.

大量的抗生素联合毒性研究显示,抗生素混合物之间存在协同或拮抗作用,并且在同一种混合物体系下,不同浓度表现出的毒性作用也不同.鉴于环境体系复杂,环境中污染物类别和数目众多,单一药物的毒性评价难以满足生态风险性评价的客观需要,因此需要进行对混合物产生的毒性效应进行多元的研究.除了要对同类别污染物,如抗生素之间的混合毒性进行研究,还应探究抗生素与农药、重金属、医药及个人护理品(PPCPs)、生物毒素等的混合毒性.并且应扩大受试生物种类,应涵盖低等生物和高等生物,水生生物和陆生生物,微生物和动植物等,全面探究抗生素混合物对生态环境的毒性作用.

尽管近些年来抗生素的环境污染引起了广泛的关注,关于抗生素混合毒性作用的研究也越来越多,但是目前的研究现状大多只是关注抗生素引起了环境生物的毒性,关于引起毒性的机理方面十分缺乏.除此之外,现有的混合毒性评价体系使用条件局限,不能有效的评价三元以上或更复杂的情况,发展预测能力和外推能力更好的新方法和新模型也十分必要.因此需要广大研究者们结合我国环境中抗生素的分布特点,系统而深入的开展相应的研究,为进一步展开联合毒性评价以及生态风险评估提供更加充分的理论依据,对推动我国抗生素相关标准的修订,加强环境监管和提高污染处理能力具有重要意义.

参考文献 (References)

- [1] CARVALHO I T, SANTOS L. Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario[J]. Environment International, 2016, 94: 736-757.
- [2] VAN BOECKEL T P, BROWER C, GILBERT M, et al. Global trends in antimicrobial use in food animals[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(18): 5649-5654.
- [3] STOICHEV T, BAPTISTA M S, BASTO M C P, et al. Effects of minocycline and its degradation products on the growth of *Microcystis aeruginosa*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2011, 74(3): 219-224.
- [4] EBERT I, BACHMANN J, KUEHNEN U, et al. Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin to photoautotrophic aquatic organisms[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2011, 30(12): 2786-2792.
- [5] WAGIL M, KUMIRSKA J, STOLTE S, et al. Development of sensitive and reliable LC-MS/MS methods for the determination of three fluoroquinolones in water and fish tissue samples and preliminary environmental risk assessment of their presence in two rivers in northern Poland[J]. Science of the Total Environment, 2014, 493: 1006-1013.
- [6] 凌军辉, 秦华江, 陆华东. 长江流域抗生素污染调查[J]. 瞭望, 2020(17): 50-51.
LLING J H, QIN H J, LU H D. Investigation of antibiotic pollution in the Yangtze River basin[J]. Outlook, 2020(17): 50-51 (in Chinese).
- [7] ASLAM B, WANG W, ARSHAD M I, et al. Antibiotic resistance: A rundown of a global crisis[J]. Infection and Drug Resistance, 2018, 11: 1645-1658.
- [8] AYUKEKBONG J A, NTEMGWA M, ATABE A N. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: Causes and control strategies[J]. Antimicrobial Resistance & Infection Control, 2017, 6:47. doi.org/10.1186/s13756-017-0208-x.
- [9] CUNHA C B, OPAL S M. Antibiotic stewardship: Strategies to minimize antibiotic resistance while maximizing antibiotic effectiveness[J]. Med Clin North Am, 2018, 102(5): 831-843.
- [10] HUGHES D, KARLÉN A. Discovery and preclinical development of new antibiotics[J]. Upsala Journal of Medical Sciences, 2014, 119(2): 162-169.

- [11] LAXMINARAYAN R, DUSE A, WATTAL C, et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2013, 13(12): 1057-1098.
- [12] BERGAMIN L T, NASCIMENTO S O, CAROLINE D A K, et al. Antibiotic combinations for controlling colistin-resistant *Enterobacter cloacae*[J]. The Journal of Antibiotics, 2017, 70(2): 122-129.
- [13] COLEMAN K, LEVASSEUR P, GIRARD A M, et al. Activities of ceftazidime and avibactam against beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in a hollow-fiber pharmacodynamic model[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2014, 58(6): 3366-3372.
- [14] 杨蓉, 李娜, 饶凯锋, 等. 环境混合物的联合毒性研究方法[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(1): 1-13.
YANG R, LI N, RAO K F, et al. Review on methodology for environmental mixture toxicity study[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(1): 1-13(in Chinese).
- [15] 孔令云, 田大勇, 石恬恬, 等. 混合化合物联合毒性研究进展[J]. 中国科技论文, 2014, 9(6): 663-668.
KONG L, TIAN D Y, SHI T T, et al. Research progress in toxicity of mixed compounds[J]. China Science Paper, 2014, 9(6): 663-668(in Chinese).
- [16] BACKHAUS T, SCHOLZE M, GRIMME L H. The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*[J]. Aquatic Toxicology, 2000, 49(1/2): 49-61.
- [17] 曾鸣, 林志芬, 尹大强, 等. 混合污染物联合毒性研究进展[J]. 环境科学与技术, 2009, 32(2): 80-86.
ZENG M, LIN Z F, YIN D Q, et al. Progress on joint effect of mixture pollutants[J]. Environmental Science & Technology, 2009, 32(2): 80-86(in Chinese).
- [18] LU L, WU Y, DING H, et al. The combined and second exposure effect of copper (II) and chlortetracycline on fresh water algae, *Chlorella pyrenoidosa* and *Microcystis aeruginosa*[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2015, 40(1): 140-148.
- [19] GONZÁLEZ-PLEITER M, GONZALO S, RODEA-PALOMARES I, et al. Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms; Implications for environmental risk assessment[J]. Water Research, 2013, 47(6): 2050-2064.
- [20] MAGDALENO A, SAENZ M E, JUÁREZ A B, et al. Effects of six antibiotics and their binary mixtures on growth of *Pseudokirchneriella subcapitata*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2015, 113: 72-78.
- [21] WANG D, WU X, LIN Z, et al. A comparative study on the binary and ternary mixture toxicity of antibiotics towards three bacteria based on QSAR investigation[J]. Environmental Research, 2018, 162: 127-134.
- [22] MUNCH C A, FLEMMING I, ANDERS B. Ecotoxicity of mixtures of antibiotics used in aquacultures[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2006, 25(8): 2208-2215.
- [23] WANG Z, CHEN Q, HU L, et al. Combined effects of binary antibiotic mixture on growth, microcystin production, and extracellular release of *Microcystis aeruginosa*: Application of response surface methodology[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2018, 25(1): 736-748.
- [24] GULKOWSKA A, LEUNG H W, SO M K, et al. Removal of antibiotics from wastewater by sewage treatment facilities in Hong Kong and Shenzhen, China[J]. Water Research, 2008, 42(1): 395-403.
- [25] KUMMERER K. Antibiotics in the aquatic environment: A review-part I[J]. Chemosphere, 2009, 75(4): 417-434.
- [26] WAMMER K H, KORTE A R, LUNDEEN R A, et al. Direct photochemistry of three fluoroquinolone antibacterials: Norfloxacin, ofloxacin, and enrofloxacin[J]. Water Research, 2013, 47(1): 439-448.
- [27] 孟磊, 杨兵, 薛南冬. 氟喹诺酮类抗生素环境行为及其生态毒理研究进展[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(2): 76-88.
MENG L, YANG B, XUE N D. A review on environmental behaviors and ecotoxicology of fluoroquinolone antibiotics[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(2): 76-88(in Chinese).
- [28] 陈姗, 许凡, 张玮. 磺胺类抗生素污染现状及其环境行为的研究进展[J]. 环境化学, 2019, 38(7): 1557-1569.
CHEN S, XU F, ZHANG W, et al. Research progress in pollution situation and environmental behavior of Sulfonamides[J]. Environmental Chemistry, 2019, 38(7): 1557-1569(in Chinese).
- [29] 宫晓双, 安婧, 张立娜, 等. 典型抗生素复合污染对小白菜生长发育的毒理效应[J]. 生态学杂志, 2019, 38(2): 541-547.
GONG X S, AN J, ZHANG L N, et al. Toxicological effects of combined pollution of typical antibiotics on the development of Chinese white cabbage (*Brassica rapa*) seedlings[J]. Chinese Journal of Ecology, 2019, 38(2): 541-547(in Chinese).
- [30] KHADRA A, PINELLI E, LACROIX M Z, et al. Assessment of the genotoxicity of quinolone and fluoroquinolones contaminated soil with the *Vicia faba* micronucleus test[J]. Ecotoxicology Environmental Safety, 2012, 76(2): 187-192.
- [31] LONG X, WANG D, LIN Z, et al. The mixture toxicity of environmental contaminants containing sulfonamides and other antibiotics in *Escherichia coli*: Differences in both the special target proteins of individual chemicals and their effective combined concentration[J]. Chemosphere, 2016, 158: 193-203.
- [32] 任皓, 王金荣, 陈行杰, 等. 应用发光细菌法检测饲用抗生素单一及联合毒性的研究[J]. 中国畜牧杂志, 2011, 47(21): 49-53.
REN H, WANG J R, CHEN X J, et al. Primary research on single and combined toxicity of antibiotics in feeds by luminescent bacteria [J]. Chinese Journal of Animal Science, 2011, 47(21): 49-53(in Chinese).
- [33] LI G, XIA X, ZHAO S, et al. The physiological and toxicological effects of antibiotics on an interspecies insect model[J]. Chemosphere, 2020, 248: 126019. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.126019.

- [34] WANG X, LIU S, GUO H. A nosocomial-pathogens-infections model with impulsive antibiotics treatment on multiple bacteria[J]. Applied Mathematics and Computation, 2017, 296: 64-87.
- [35] 魏瑞成, 包红朵, 郑勤, 等. 粪源抗生素金霉素和喹乙醇在养殖水体中的残留及对锦鲤的生态毒理效应研究[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(9): 1800-1805.
WEI R C, BAO H D, ZHENG Q, et al. Chlortetracycline and olaquinox residues of manure-derived antibiotics in the aquatic water and their ecotoxicological effects on KoiCarp[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2009, 28(9): 1800-1805(in Chinese).
- [36] 魏子艳. 土霉素、恩诺沙星、磺胺二甲嘧啶与铜单一及复合污染对土壤微生物的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.
WEI Z Y. Single and joint toxicity of oxytetracycline, enrofloxacin, sulfadimidine and Cu on soil microorganism[D]. Taian: Shandong Agriculture University, 2014(in Chinese).
- [37] 葛林科, 任红蕾, 鲁建江. 我国环境中新兴污染物抗生素及其抗性基因的分布特征[J]. 环境化学, 2015, 34(5): 875-883.
GE L K, REN H L, LU J J, et al. Occurrence of antibiotics and corresponding resistance genes in the environment of China[J]. Environmental Chemistry, 2015, 34(5): 875-883(in Chinese).
- [38] BOXALL A B A, JOHNSON P, SMITH E J, et al. Uptake of veterinary medicines from soils into plants[J]. Pubmed, 2006, 54(6): 2288-2297.
- [39] MIGLIORE L, COZZOLINO S, FIORI M. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants[J]. Chemosphere, 2003, 52(7): 1233-1244.
- [40] BAGUER A J, JENSEN J, KROGH P H. Effects of the antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna[J]. Chemosphere, 2000, 40(7): 751-757.
- [41] GAO Y, SUN Z, SUN X, et al. Toxic effect of olaquinox antibiotic on *Eisenia fetida*[J]. European Journal of Soil Biology, 2007, 43(1): 252-255.
- [42] LI Y, TANG H, HU Y, et al. Enrofloxacin at environmentally relevant concentrations enhances uptake and toxicity of cadmium in the earthworm *Eisenia fetida* in farm soils[J]. Journal of Hazardous Materials, 2016, 308: 312-320.
- [43] KAY P, BLACKWELL P A, ALISTAIR B A B. Fate of veterinary antibiotics in a macroporous tile drained clay soil[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2004, 23(5): 1136-1144.
- [44] ANDREONI V, CAVALCA L, RAO M A, et al. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils[J]. Chemosphere, 2004, 57(5): 401-412.
- [45] DANTAS G, SOMMER M O, OLUWASEGUN R D, et al. Bacteria subsisting on antibiotics[J]. Science, 2008, 320(5872): 100-103.
- [46] TOTH J D, FENG Y, DOU Z. Veterinary antibiotics at environmentally relevant concentrations inhibit soil iron reduction and nitrification[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2011, 43(12): 2470-2472.
- [47] 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).
- [48] 王加龙, 刘坚真, 陈杖榴, 等. 恩诺沙星残留对土壤微生物数量及群落功能多样性的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2005, 11(1): 86-89.
WANG J L, LIU J Z, CHEN Z L, et al. Effects of enrofloxacin residue on number and community function diversity of soil microbes[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2005, 11(1): 86-89(in Chinese).
- [49] GIRARDI C, GREVE J, LAMSHOFT M, et al. Biodegradation of ciprofloxacin in water and soil and its effects on the microbial communities[J]. Journal of Hazardous Materials, 2011, 198: 22-30.
- [50] HUND-RINKE K, SIMON M, LUKOW T. Effects of tetracycline on the soil microflora: Function, diversity, resistance[J]. Journal of Soils & Sediments, 2004, 4(1): 11-16.
- [51] HAMMESFAHR U, HEUER H, MANZKE B, et al. Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40(7): 1583-1591.
- [52] ZHANG Q, JIA A, WAN Y, et al. Occurrences of three classes of antibiotics in a natural river basin: Association with antibiotic-resistant *Escherichia coli*[J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(24): 14317-14325.
- [53] CHALEW E T, HALDEN U R. Environmental exposure of aquatic and terrestrial biota to triclosan and triclocarban[J]. Journal of the American Water Resources Association, 2009, 45(1): 4-13.
- [54] YANG L H, YING G G, SU H C, et al. Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2008, 27(5): 1201-1208.
- [55] QIAN H, PAN X, CHEN J, et al. Analyses of gene expression and physiological changes in *Microcystis aeruginosa* reveal the phytotoxicities of three environmental pollutants[J]. Ecotoxicology, 2012, 21(3): 847-859.
- [56] QIAN H, LI J, PAN X, et al. Effects of streptomycin on growth of algae *Chlorella vulgaris* and *Microcystis aeruginosa*[J]. Environmental Toxicology, 2012, 27(4): 229-237.
- [57] VICENTE M, MANUEL N C, MARIA L D, et al. Tolerance to stress combination in tomato plants: New insights in the protective role of melatonin[J]. Molecules, 2018, 23(3): 535.

- [58] CHENG J, QIU H, CHANG Z, et al. The effect of cadmium on the growth and antioxidant response for freshwater algae *Chlorella vulgaris* [J]. SpringerPlus, 2016, 5(1): 1290.
- [59] HAN J, ZHANG L, YANG S, et al. Detrimental effects of metronidazole on selected innate immunological indicators in common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2014, 92(2): 198-201.
- [60] SAGLAM N, YONAR M E. Effects of sulfamerazine on selected haematological and immunological parameters in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) [J]. Aquaculture Research, 2009, 40(4): 395-404.
- [61] QIU W, LIU X, YANG F, et al. Single and joint toxic effects of four antibiotics on some metabolic pathways of zebrafish (*Danio rerio*) larvae [J]. Science of the Total Environment, 2020, 716:137062. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137062>.
- [62] LIGUORO M D, FIORETTO B, POLTRONIERI C, et al. The toxicity of sulfamethazine to *Daphnia magna* and its additivity to other veterinary sulfonamides and trimethoprim [J]. Chemosphere, 2009, 75(11): 1519-1524.
- [63] LAVILLE N, AIT-AISSA S, GOMEZ E, et al. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes [J]. Toxicology, 2004, 196(1/2): 41-55.
- [64] YANG J F, YING G G, ZHAO J L, et al. Simultaneous determination of four classes of antibiotics in sediments of the Pearl Rivers using RRLC-MS/MS [J]. The Science of the Total Environment, 2010, 408(16): 3424-3432.
- [65] SILVA B F D, JELIC A, L6PEZ-SERNA R, et al. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain [J]. Chemosphere, 2011, 85(8): 1331-1339.
- [66] HALLING-SRENSEN B. Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2001, 40(4): 451-460.
- [67] MA D, HU Y, WANG J, et al. Effects of antibacterials use in aquaculture on biogeochemical processes in marine sediment [J]. The Science of the Total Environment, 2006, 367(1): 273-277.
- [68] LUCÍA C K A, M S K. Effects of ciprofloxacin on salt marsh sediment microbial communities [J]. The ISME Journal, 2007, 1(7): 585-595.
- [69] MIRAND C D, ZEMELMAN R. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms [J]. Science of the Total Environment, 2002(1/3): 207-218.
- [70] ZHANG J, LIU S S, ZHEN Y Y, et al. Time-dependent hormetic effects of 1-alkyl-3-methylimidazolium bromide on *Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67: luminescence, redox reactants and antioxidant enzymes [J]. Chemosphere, 2013, 91(4): 462-467.
- [71] 任红蕾, 张蓬, 李凯, 等. 水中氟喹诺酮类抗生素光降解过程中抑菌活性的变化 [J]. 环境化学, 2014, 33(5): 753-759.
- REN H L, ZHANG P, LI K, et al. Changes in antibacterial activity of fluoroquinolone antibiotics due to photodegradation [J]. Environmental Chemistry, 2014, 33(5): 753-759 (in Chinese).
- [72] GE L, NA G, ZHANG S, et al. New insights into the aquatic photochemistry of fluoroquinolone antibiotics: Direct photodegradation, hydroxyl-radical oxidation, and antibacterial activity changes [J]. Science of the Total Environment, 2015, 527/528(sep.15): 12-17.
- [73] WANG D, NING Q, DONG J, et al. Predicting mixture toxicity and antibiotic resistance of fluoroquinolones and their photodegradation products in *Escherichia coli* [J]. Environmental Pollution, 2020, 262: 114275. doi:10.1016/j.envpol.2020.114275.
- [74] WILLING B P, RUSSELL S L, FINLAY B B. Shifting the balance: Antibiotic effects on host-microbiota mutualism [J]. Nature Reviews. Microbiology, 2011, 9(4): 233-243.
- [75] LOOFT T, JOHNSON T A, ALLEN H K, et al. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(5): 1691-1696.
- [76] JIN Y, ZENG Z, WU Y, et al. Oral exposure of mice to carbendazim induces hepatic lipid metabolism disorder and gut microbiota dysbiosis [J]. Toxicological Sciences, 2015, 147(1): 116-126.
- [77] PHOLPRAMOOOL C, RUCHIRAWAT S, VERAWATNAPAKUL V, et al. Structural requirements of some sulphonamides that possess an antifertility activity in male rats [J]. Journal of Reproduction and Fertility, 1991, 92(1): 169-178.
- [78] LAFFONT C M, ALVINERIE M, BOUSQUET-MÉLOU A, et al. Licking behaviour and environmental contamination arising from pour-on ivermectin for Cattle [J]. International Journal for Parasitology, 2002, 31(14): 1687-1692.