

Xác định dư lượng kháng sinh Floquinolon trong nước, bùn và tôm tại khu vực nuôi tôm quảng canh Giao An, Giao Thủy, Nam Định

Dương Hồng Anh^{*}, Phạm Ngọc Hà

¹*Trung tâm Nghiên cứu Công nghệ môi trường và Phát triển bền vững (CETASD), Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQĐHN, 334 Nguyễn Trãi, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 04 tháng 3 năm 2014

Chỉnh sửa ngày 25 tháng 3 năm 2014; Chấp nhận đăng ngày 18 tháng 3 năm 2015

Tóm tắt: Các mẫu nước, bùn, tôm được lấy tại các điểm trong ao nuôi, dọc kênh và rừng ngập mặn tiếp giáp ở khu vực nuôi tôm quảng canh thuộc xã Giao An, Giao Thủy, Nam Định vào hai thời điểm thả tôm giống và thu hoạch. Dư lượng các kháng sinh Ciprofloxacin và Norfloxacin được phân tích trong các mẫu sử dụng phương pháp chiết pha rắn, chiết lỏng áp suất cao và sắc ký lỏng hiệu năng cao/ detector huỳnh quang. Chỉ có dư lượng Ciprofloxacin được tìm thấy trong nước và bùn ở các khoảng nồng độ 0,06 – 0,35 µg/L và 0,22 – 0,40 µg/g tương ứng. Kết quả phân tích tại thời điểm đầu vụ nuôi tôm chỉ ra việc sử dụng Ciprofloxacin trong nuôi trồng thủy sản. Tuy nhiên, vào thời điểm thu hoạch, kết quả không được xác nhận rõ ràng do trước đó đã có bão. Trong mẫu tôm sản phẩm thu tại khu vực này không phát hiện thấy Ciprofloxacin và Norfloxacin.
Từ khóa: kháng sinh floquinolon, nuôi trồng thủy sản, mẫu nước, bùn, tôm.

1. Giới thiệu

Theo thống kê của Tổng cục Thủy sản, đến năm 2011 sản lượng nuôi trồng thủy sản của Việt Nam đạt 3 triệu và xuất khẩu thủy sản đã đạt mức 6,118 tỷ USD đứng thứ hai trong các mặt hàng xuất khẩu của Việt Nam (sau dầu khí), trong đó tôm xuất khẩu chiếm hơn 50%. Sự phát triển nhanh chóng của nghề nuôi tôm ở Việt Nam đã và đang đặt ra những vấn đề môi trường trước mắt và lâu dài như suy thoái rừng ngập mặn, mất cân bằng sinh thái, nguy cơ ô

nhiễm môi trường và sự phát triển của dịch bệnh, ... Việc sử dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản không đúng theo quy định về chủng loại, liều lượng, thời gian có thể làm ảnh hưởng tới chất lượng tôm cũng như có tác động tiêu cực đến khả năng kháng dịch bệnh của tôm và gây ô nhiễm môi trường [1].

Bài báo này sẽ trình bày kết quả nghiên cứu xác định dư lượng hai kháng sinh thuộc nhóm Floquinolon là Ciprofloxacin and Norfloxacin trong các mẫu nước và bùn lấy tại khu vực nuôi tôm quảng canh thuộc xã Giao An, Giao Thủy, Nam Định tại thời điểm bắt đầu vụ tôm và sau khi thu hoạch cũng như tôm thành phẩm.

^{*} Tác giả liên hệ. ĐT: 84-912380373.
Email: hoangianga0@gmail.com

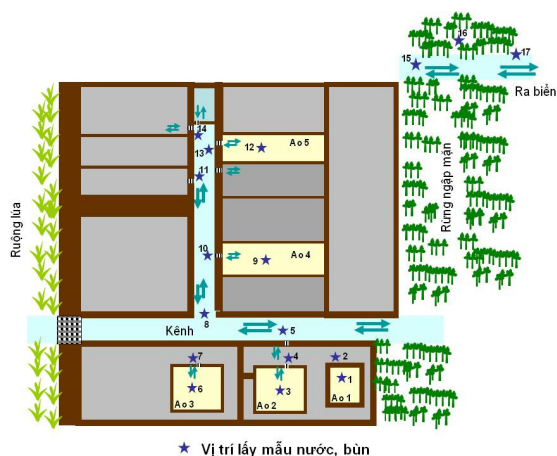
2. Thục nghiệm

2.1. *Hóa chất, thiết bị:* Các chất chuẩn bao gồm Norfloxacin (NOR), Ciprofloxacin (CIP) và Tosulfloxacin (TOS) dùng làm nội chuẩn >98% của Fluka, Thụy Sĩ và Abbott Laboratories, Thụy Sĩ. Các dung môi hóa chất sử dụng trong quá trình xử lý mẫu, phân tích sắc ký lỏng hiệu năng cao bao gồm Axetonitril, Metanol, Axeton, ortho- Phôtphoric axit (85%), dung dịch ammoniac (37%), axit clohydric và EDTA của BDH và Merck. Cột chiết pha rắn HLB 6mL (Waters Corporation Milford, Mỹ) được dùng cho quá trình chiết pha rắn. Quá trình xử lý mẫu sử dụng thiết bị chiết dung môi áp suất cao (ASE) ký hiệu ASE 200 (Dionex, Mỹ) và bộ chiết pha rắn (Supelco, Mỹ). Quá trình phân tích sắc ký sử dụng: thiết bị sắc ký lỏng hiệu năng cao HP 1090 Series II kết nối với detector huỳnh quang HP 1100 (Hewlett-Packard AG), cột tách: discovery RP- Amide C16, 5µm, 250 x 3mm (Supelco, Mỹ)

2.2. *Lấy mẫu:* Các mẫu được lấy tại khu vực nuôi tôm quảng canh thuộc xã Giao An, Giao Thủy, Nam Định tại thời điểm bắt đầu vụ tôm (tháng 4) và khi thu hoạch (tháng 8). Mẫu nước và bùn được lấy tại các vị trí trong, vùng chuyển tiếp ngoài ao nuôi, dọc kênh dẫn nước và khu vực rừng ngập mặn liền kề. 03 mẫu tôm sản phẩm được lấy khi thu hoạch.

Bảng 1. Các mẫu lấy tại khu vực Giao An, Giao Thủy, Nam Định

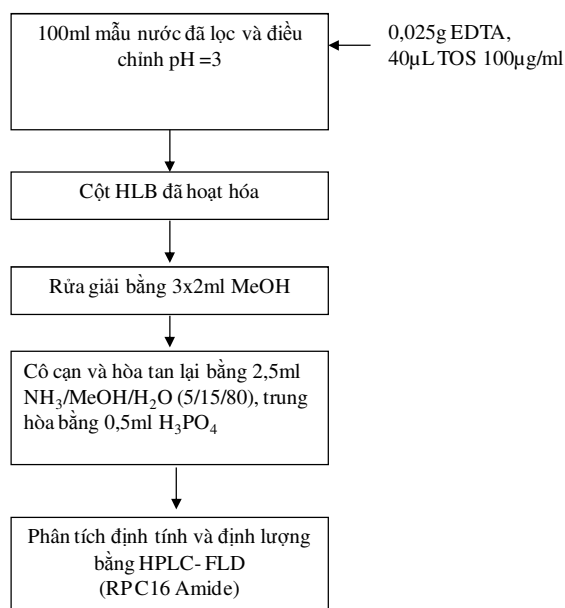
Đợt lấy mẫu	Mẫu nước	Mẫu bùn	Mẫu tôm
Đợt 1:	WS 1, 3, 5	MS 1, 3, 4,	
Bắt đầu vụ tôm	8, 9, 10, 11	5, 10, 11, 12,	
	12, 13, 14, 15,	13, 14, 15,	
	15, 16, 17	16, 17	
Đợt 2:	WS 1, 2, 3	MS 1, 2, 3,	S 3, 6, 9
Thu hoạch	4, 6, 7, 8, 9	4, 5, 6, 7, 8,	
	10, 12, 13,	9, 10, 12, 13,	
	14	14	



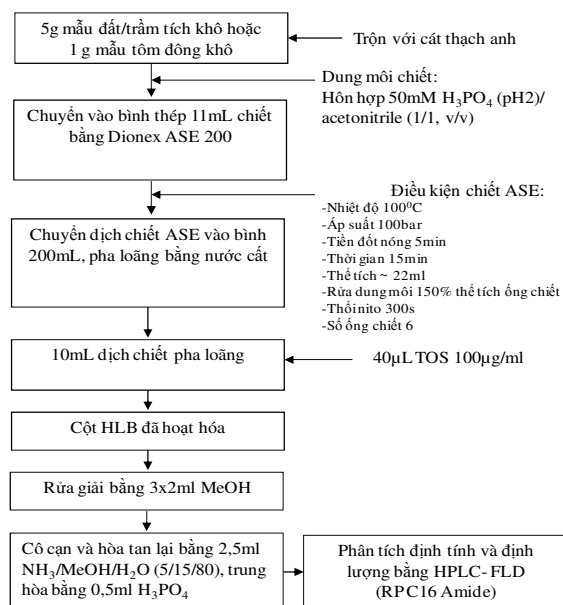
Hình 1. Sơ đồ vị trí lấy mẫu tại khu vực Giao An, Giao Thủy, Nam Định.

Mẫu nước được lấy từ 2-3 điểm tại một vị trí lấy mẫu, đem trộn thành một mẫu phân tích, mẫu được đo các thông số như pH, độ dẫn, rồi được chỉnh về pH =3 bằng HCl đặc. Mẫu được bảo quản trong chai thủy tinh nâu, đem về PTN, mẫu được lọc bằng màng xenlulo nitrat 0,45 µm và bảo quản ở 4⁰C trước khi phân tích. Mẫu bùn được làm khô tại 60⁰C trong 72h, nghiền nhỏ và rây qua sàng 0,2 mm, cho vào chai thủy tinh và bảo quản ở nhiệt độ phòng. Mẫu tôm được làm đông khô, nghiền nhỏ và bảo quản ở 4⁰C trước khi phân tích.

2.3. *Quy trình phân tích:* Mẫu nước được chiết tách, làm giàu bằng phương pháp chiết pha rắn sử dụng cột HLB (do mẫu có độ mặn cao), sau đó phân tích các FQ bằng HPLC-FLD [2,3]. Sơ đồ quá trình xử lý mẫu nước được trình bày trong hình 2. Mẫu bùn khô (5g) được chiết bằng phương pháp chiết lỏng ở áp suất và nhiệt độ cao với dung môi là axit phôtphoric/axetonitril 1:1. Sau đó dịch chiết tiếp tục được xử lý bằng phương pháp chiết pha rắn sử dụng cột HLB trước khi phân tích sắc ký (sơ đồ hình 3). Quy trình xử lý mẫu tôm tương tự như mẫu bùn nhưng chỉ lấy lượng 1g.



Hình 2. Quy trình phân tích mẫu nước lợ.



Hình 3. Quy trình phân tích mẫu bùn, mẫu tôm.

Điều kiện phân tích của hệ HPLC/FLD như sau: cột Amide C16, nhiệt độ lò: 40°C, áp suất tối thiểu: 10bar, áp suất tối đa: 400 bar, thể tích bơm mẫu: 50µL, tốc độ dòng 0,6ml/phút. Detector huỳnh quang (FLD): bước sóng kích thích (excitation): $\nu_1 = 278$ nm, bước sóng phát xạ (emission): $\nu_2 = 445$ nm, dải của bước sóng phát xạ: 300 - 450 nm. Chương trình pha động chạy theo chế độ gradien với dung môi A là dung dịch H_3PO_4 25mM, dung môi B là axetonitril.

Trước khi phân tích các mẫu thực, một số mẫu bùn, nước, tôm được thêm một lượng chuẩn FQ đã biết chính xác nồng độ, phân tích cả mẫu nền và mẫu thêm chuẩn để xác định hiệu suất thu hồi. Giới hạn phát hiện của các NOR và CIP trên các nền mẫu nước lợ, bùn, tôm lần lượt là: 0,02 µg/L, 0,01 µg/g, 0,005 µg/g.

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Hiệu suất thu hồi của FQ trên nền mẫu nước

Mẫu thêm chuẩn để xác định hiệu suất thu hồi được thực hiện trên hai nền mẫu: mẫu nước ngầm và mẫu nước lợ tại khu vực nuôi tôm nói trên. Mẫu nước ngầm được điều chỉnh pH về 3, thêm NaCl để độ dẫn cỡ 34 mS tương ứng với nền mẫu thực tế. Sau đó lấy 100 ml mỗi mẫu nước nền, thêm NOR và CIP với nồng độ 0,2 tới 2 µg/L rồi phân tích cả mẫu nền và mẫu thêm chuẩn theo quy trình như hình 2. Kết quả hiệu suất thu hồi trên nền mẫu nước được trình bày trong bảng 2 đều nằm trong khoảng giá trị tốt 94 - 100%.

Bảng 2. Hiệu suất thu hồi của NOR và CIP trên nền mẫu nước

Loại nền	Nồng độ thêm chuẩn ($\mu\text{g/L}$)	Hiệu suất thu hồi (%) (n=2)	
		CIP	NOR
Nước ngầm 1 ^a	0,2	94 \pm 6	95 \pm 5
Nước ngầm 2 ^a	0,4	98	98
Nước ngầm 3 ^a	2	99 \pm 1	100 \pm 1
Hỗn hợp rùng ngập mặn ^b	1	96 \pm 3	97 \pm 3
Hỗn hợp mẫu dọc kênh đợt 1 ^b	1	100	100
Hỗn hợp mẫu dọc kênh đợt 2 ^b	2	95 \pm 6	99 \pm 1

^a: độ dẫn 34mS (thêm NaCl); ^b: độ dẫn ~34mS

3.2. Hiệu suất thu hồi của FQ trên nền bùn, tôm

5g mẫu bùn khô được thêm NOR và CIP với nồng độ 1 $\mu\text{g/g}$ rồi phân tích cả mẫu nền và mẫu thêm chuẩn theo quy trình như hình 3. Kết quả hiệu suất thu hồi trên nền mẫu bùn được trình bày trong bảng 3, kém hơn so với thu hồi

trên nền mẫu nước nhưng vẫn nằm trong khoảng giá trị tốt 75 - 86%. Hiệu suất thu hồi đạt được khi phân tích mẫu thêm chuẩn 0,5 $\mu\text{g/g}$ trên nền mẫu tôm đạt trong khoảng 64 - 71%.

Bảng 3. Hiệu suất thu hồi của NOR và CIP trên nền mẫu bùn, mẫu tôm

Loại nền	Nồng độ thêm chuẩn ($\mu\text{g/g}$)	Hiệu suất thu hồi (%) (n=2)	
		CIP	NOR
Mẫu bùn MS3 đợt 1	1	75 \pm 1	84 \pm 8
Mẫu bùn MS5 đợt 1	1	86	81
Mẫu bùn MS1 đợt 2	1	78	79
Mẫu bùn MS9 đợt 2	1	85	82
Mẫu tôm S3	0,5	71 \pm 10	65 \pm 8
Mẫu tôm S6	0,5	68 \pm 4	64 \pm 3

3.3. Kết quả phân tích dư lượng FQ trong các mẫu nước, bùn, tôm lấy tại Giao An, Giao Thủy, Nam Định

Trong tất cả các mẫu nước, bùn, tôm đều không thấy xuất hiện NOR. Nồng độ CIP phát hiện thấy trong mẫu nước đợt 1 trong khoảng 0,06 – 0,35 $\mu\text{g/L}$ và đợt 2 trong khoảng 0,07 – 0,12 $\mu\text{g/L}$ (bảng 4). So sánh giữa hai đợt cho thấy, kết quả nồng độ CIP trong các mẫu nước

đầu vụ tôm cao hơn so với trong mẫu nước đợt 2 khi thu hoạch, còn nồng độ CIP trong các mẫu nước đợt 2 khá đồng đều. Điều đó chứng tỏ các chủ ao đã có sử dụng kháng sinh CIP vào đầu vụ tôm nhưng số lượng hạn chế. Vào đợt 2, trước khi lấy mẫu có bão nên có sự chảy tràn nước giữa các ao, vùng chuyển tiếp, kênh nên có thể dẫn tới kết quả nồng độ đồng đều.

Bảng 4. Dư lượng Floquinolon trong các mẫu nước tại Giao An, Giao Thủy, Nam Định

Đợt 1- đầu vụ	Mẫu		Nồng độ CIP (µg/L)	
	Đợt 2 – thu hoạch	Vị trí	Đợt 1	Đợt 2
Nước - hỗn hợp rừng ngập mặn ^a	-	Rừng ngập mặn	0,17	
Nước - hỗn hợp dọc kênh ^b	Nước - hỗn hợp dọc kênh ^c	Dọc kênh	0,06	0,11
Mẫu nước WS5	-	Kênh	0,16	
Mẫu nước WS1	Mẫu nước WS1	Trong ao nuôi tôm 1	0,17	0,08
-	Mẫu nước WS2	Vùng chuyển tiếp ao nuôi tôm 1		0,10
Mẫu nước WS3	Mẫu nước WS3	Trong ao nuôi tôm 2	0,29	0,11
-	Mẫu nước WS4	Vùng chuyển tiếp ao nuôi tôm 2		0,10
-	Mẫu nước WS5	Trong ao nuôi tôm 3		0,09
-	Mẫu nước WS6	Vùng chuyển tiếp ao nuôi tôm 3		0,12
Mẫu nước WS9	Mẫu nước WS9	Trong ao nuôi tôm 4	0,35	0,07
Mẫu nước WS12	Mẫu nước WS12	Trong ao nuôi tôm 5	0,17	0,09

Nước - hỗn hợp rừng ngập mặn^a: hỗn hợp các mẫu WS 15, 16, 17 trong đợt 1

Nước - hỗn hợp dọc kênh^b : hỗn hợp các mẫu WS 8, 10, 11, 13, 14 trong đợt 1

Nước - hỗn hợp dọc kênh^c : hỗn hợp các mẫu WS 8, 10,13, 14 trong đợt 2

Các kết quả phân tích mẫu bùn được trình bày trong bảng 5 cho thấy chỉ phát hiện dư lượng CIP trong mẫu bùn lấy phía trong ao nuôi (4/8 mẫu) với khoảng nồng độ 0,2 – 0,4 µg/g. Các kết quả này thấp hơn nhiều so với số liệu được công bố của tác giả Lê Xuân Tuấn năm

2002 [4] là 6-2615 µg/g FQs trong mẫu bùn, khi có dịch bệnh ở phạm vi rộng tại địa phương này và FQs còn chưa bị cấm sử dụng. Tại các khu vực ngoài ao nuôi như vùng chuyển tiếp, kênh, rừng ngập mặn đều không phát hiện thấy dư lượng kháng sinh CIP và NOR.

Bảng 5. Dư lượng Floquinolon trong các mẫu bùn tại Giao An, Giao Thủy, Nam Định

Đợt 1- đầu vụ	Mẫu		Nồng độ CIP (µg/g)	
	Đợt 2 – thu hoạch	Vị trí	Đợt 1	Đợt 2
Bùn - hỗn hợp rừng ngập mặn ^a	-	Rừng ngập mặn	nd	
Mẫu bùn MS5	Mẫu bùn MS5	Kênh	nd	nd
-	Mẫu bùn MS8	Kênh		nd
Mẫu bùn MS10	Mẫu bùn MS10	Kênh	nd	nd
Mẫu bùn MS11	-	Kênh	nd	
Mẫu bùn MS13	Mẫu bùn MS13	Kênh	nd	nd
Mẫu bùn MS14	Mẫu bùn MS14	Kênh	nd	nd
Mẫu bùn WS1	Mẫu bùn WS1	Trong ao nuôi tôm 1	nd	nd
-	Mẫu bùn WS2	Vùng chuyển tiếp ao nuôi tôm 1		nd
Mẫu bùn MS3	Mẫu bùn MS3	Trong ao nuôi tôm 2	0,30	nd
Mẫu bùn MS4	Mẫu bùn MS4	Vùng chuyển tiếp ao nuôi tôm 2	nd	nd
-	Mẫu bùn MS6	Trong ao nuôi tôm 3		nd
-	Mẫu bùn MS7	Vùng chuyển tiếp ao nuôi tôm 3		nd
-	Mẫu bùn MS9	Trong ao nuôi tôm 4		0,40
Mẫu bùn MS12	Mẫu bùn MS12	Trong ao nuôi tôm 5	0,22	0,31

Bùn - hỗn hợp rừng ngập mặn^a: hỗn hợp các mẫu MS 15, 16, 17 trong đợt 1

- : không lấy mẫu; nd : nhỏ hơn giới hạn phát hiện 0,01 µg/g

Ba mẫu tôm đã lấy tại các ao nuôi số 2, 3 và 4 đều không phát hiện thấy dư lượng CIP và NOR (< 0,05 mg/kg).

4. Kết luận

Kết quả đợt khảo sát dư lượng kháng sinh floquinolon trong các mẫu nước, bùn và tôm lấy tại khu vực nuôi tôm quảng canh Giao An, Giao Thủy, Nam Định cho thấy có việc sử dụng và tích lũy dư lượng Ciprofloxacin mẫu bùn và nước ở mức độ thấp. Trong mẫu tôm không phát hiện thấy dư lượng kháng sinh floquinolon. Các kết quả này là một tín hiệu đáng mừng cho vùng nuôi trồng thủy sản Nam Định.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được hoàn thành với sự hỗ trợ tài chính từ đề tài hợp tác quốc tế Việt Nam-Thụy sỹ ESTNV. Các tác giả chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của các đồng nghiệp thuộc Trung tâm Nghiên cứu Công nghệ Môi trường và Phát triển bền vững, Trường ĐHKHTN, ĐHQGHN và TS. Alfredo Alder – Viện Khoa học và Công nghệ nước, Thụy sỹ trong quá trình thực hiện nghiên cứu.

Tài liệu tham khảo

- [1] Andreu Rico, Tran Minh Phu, Kriengkrai Satapornvanit, Jiang Min, A.M. Shahabuddin, Patrik J.G. Henriksson, Francis J. Murray, David C. Little, Anders Dalsgaard, Paul J. Van den Brink, (2013). Use of veterinary medicines, feed additives and probiotics in four major internationally traded aquaculture species farmed in Asia. *Aquaculture, Volumes 412–413*, pp. 231-243.
- [2] Duong Hong Anh, Pham Ngoc Ha, Tran Thanh Tuan, Nguyen Hoang Tung, and Pham Hung Viet, (2008) Analytical Method for Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Shrimp Sample by Solid Phase Extraction Technique and High Performance Chromatography/Fluorescence Detection. The 8th General Seminar of the Core University Program. *Environmental Science and Technology for the Earth*. Osaka, 26-28/11/2008, pp. 70-75.
- [3] Andrea Speltini, Michela Sturini, Federica Maraschi, Antonella Profumo, Angelo Albini, (2011). Analytical methods for the determination of fluoroquinolones in solid environmental matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 30, Issue 8, pp. 1337-1350.
- [4] Le Xuan Tuan, (2004). A study of antibiotics in coastal aquaculture areas: residues, bacterial resistance and degradation, PhD. Thesis, Ehime University, Matsuyama, Japan.

Determination of Fluoroquinolone Anti-biotic Residues in Water, Mud and Shrimp in Aquacultural Area from Giao An, Giao Thủy, Nam Định Province

Dương Hồng Anh, Phạm Ngọc Hà

*Research Center for Environmental Technology and Sustainable Development,
VNU University of Science, 334, Nguyễn Trãi, Hanoi, Vietnam*

Brackish water, mud and shrimp samples were collected in extensive cultivation shrimp ponds, canals and mangrove areas at Giao An, Giao Thủy, Nam Định province in the rearing season and

harvesting season. Residues of Ciprofloxacin and Norfloxacin were determined in the samples by using solid phase extraction, pressurized liquid extraction and high performance liquid chromatography/fluorescence detection method. Only Ciprofloxacin was found in the range of 0.06 – 0.35 $\mu\text{g/L}$ and 0.22 – 0.40 $\mu\text{g/g}$ in water and mud samples, respectively. Results in the rearing season indicated the application of Ciprofloxacin for shrimp cultivation. However, the assumption was not clearly confirmed due to the effect of the storm in harvesting season. Ciprofloxacin and Norfloxacin were not found in shrimp samples collected from investigated area.

Keywords: Fluoroquinolone antibiotics, aquacultural area, brackish water, mud, shrimp.