

生菜对土霉素的吸收及其植物毒性

崔馨, 乔显亮, 韩成伟, 王震

(大连理工大学工业生态与环境工程教育部重点实验室, 辽宁 大连 116024)

摘要:通过水培实验研究了土霉素在植物体内的吸收及其植物毒性。实验选取不同初始浓度的土霉素营养液(1、5、10 mg·L⁻¹),培养 18 d, 结果发现, 营养液中土霉素的浓度越高, 生菜对土霉素的吸收量越大。土霉素浓度为 1 mg·L⁻¹ 时, 根部表现出抑制作用。当土霉素的浓度高于 5 mg·L⁻¹ 时, 生菜根和叶的生长均受到显著抑制; 生菜对水分的吸收减少; 对部分微量元素(Fe、Cu、Zn、Mn)的吸收也受到抑制, 这可能与土霉素的络合有关; 土霉素浓度越高, 抑制作用越明显。土霉素为 1 mg·L⁻¹, 营养液 pH 值 5~8 条件下, 发现 pH 对生菜吸收土霉素有一定的影响, 但对生菜生长的影响不显著。

关键词:土霉素; 生菜; 吸收; 植物毒性

中图分类号: X503.231 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-2043(2008)03-1038-05

Uptake of Oxytetracycline and Its Phytotoxicity to Lettuce

CUI Xin, QIAO Xian-liang, HAN Cheng-wei, WANG Zhen

(Key Laboratory of Industrial Ecology and Environmental Engineering, MOE, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: Oxytetracycline (OTC) is one of broad-spectrum antibiotics, which may enter the environment through various pathways and cause potential ecotoxicological effects. Experiments were conducted in hydroponic system to investigate the uptake of OTC and its phytotoxicity to lettuce. The effects of OTC (1~10 mg·L⁻¹) on lettuce were evaluated after cultivating for 18 days. It was found that the OTC uptake by lettuce increased with the initial OTC concentrations increasing. The growth of lettuce root was inhibited at the OTC concentration of 1 mg·L⁻¹, but the foliage was not affected. Under the concentrations of OTC more than 5 mg·L⁻¹, both root and foliage exhibited phytotoxicity response, and the root was more sensitive to OTC than foliage. Furthermore, with the increase of initial OTC concentration, the water absorption capacity tended to decrease, and the uptake of trace elements (Fe, Cu, Zn and Mn) by lettuce were inhibited as well, which may be due to the complexation of OTC with metals. In the four trace elements, the inhibition effect of Mn by OTC was more remarkable than the other three metals, and the inhibition of Zn was the least. pH could affect the uptake of OTC (1 mg·L⁻¹ OTC, pH 5~8), but the influence of pH on the growth of lettuce was not significant. The results are helpful to assess the uptake and phytotoxicity of OTC to plants.

Keywords: oxytetracycline; lettuce; uptake; phytotoxicity

抗生素广泛使用于畜禽养殖和水产养殖业,被大量排放到水体和土壤环境中,对生态环境存在潜在危害。尤其是抗生素的长期累积会引起抗性病菌和抗性基因的滋生。因此,研究抗生素在环境中的行为和生态影响具有重要的科学价值和现实意义。土霉素属于四环素类抗生素,具有广谱抗菌性,化学结构稳定,在

环境中存在时间较长^[1],因此,其环境行为和生态效应引起环境领域的关注。早期对于土霉素在海水底泥中的环境行为研究较多^[2-4];近年来则比较关注土霉素在土壤中的吸附、固定、迁移和降解等环境行为^[5-9]。

进入土壤中的抗生素可被植物吸收,影响植物正常的生理代谢,并可通过食物链对人类健康产生危害。因此,近年来对于抗生素的植物吸收和毒性也引起了一些研究者的关注。Kumar^[10]和 Boxall^[11]等人发现蔬菜可以选择性的从土壤中吸收部分抗生素。Kong等^[12]研究认为苜蓿对土霉素的吸收可能是依靠能量的主动运输。Migliore等发现一些抗生素对植物的生长

收稿日期:2007-08-27

基金项目:国家自然科学基金青年基金资助(20607005)

作者简介:崔馨(1981—),女,辽宁鞍山人,硕士研究生,主要研究方向为环境生态学。E-mail:tracy1125ex@163.com

联系人:乔显亮 E-mail:xlqiao@dlut.edu.cn

有毒性兴奋效应,并认为抗生素对植物的毒性与抗生素和叶酸相互竞争有关^[13-15]。Bradel 等^[16]发现四环素可以通过抑制植原体的活性而影响幼芽分枝。

土霉素是目前使用量最大的四环素类抗生素。目前对于植物吸收土霉素及其植物毒性方面的研究还鲜有报道。生菜作为人们日常食用的蔬菜,具有生长周期短、易于栽培、对污染物敏感等特点,常被作为受试植物用来评价植物对污染物的吸收与毒性效应。因此,本研究采用水培实验研究了生菜对土霉素的吸收以及土霉素对生菜的植物毒性。

1 材料与方法

1.1 生菜的培养

生菜种子在 4℃ 条件下,用水浸泡 24 h 后放入装有珍珠岩的穴盘中,在人工气候箱中(光照 14 h:黑暗 10 h;光照 22℃:黑暗 18℃;相对湿度 60%)培养 1 个月后,移栽至容量为 300 mL 的水培塑料杯中单株培养,盖有不透光的塑料挡板防止水分蒸发。营养液的浓度选取日本园试通用营养液 1/2 标准浓度,营养液初始 pH 调至 6,配制营养液时选用去离子水,每 3 d 更换营养液。生菜在人工气候箱中预培养两周后开始实验。

1.2 实验方法

1.2.1 土霉素的动态吸收及植物毒性实验

将 0.05 g 二水合土霉素溶于 500 mL Tris-HCl (pH = 7) 溶液中,制得 100 mg·L⁻¹ 土霉素储备液,用铝箔包裹后放于冰箱中保存。将一定体积的土霉素储备液用 1/2 营养液稀释,配成含土霉素浓度为 1、5、10 mg·L⁻¹ 的营养液。

将预培养的生菜移至对照和含不同浓度土霉素的营养液中,单株培养。采用铝箔纸包裹塑料杯防止光照对土霉素的影响。在人工气候箱中培养 18 d,每个处理 3 次重复。每 3 d 更换营养液并测定生菜的鲜重,剩余营养液的体积和混合液中土霉素的浓度。其中,为了扣除生菜根表面吸附的土霉素,参照 Kong 等^[12]的方法,采用去离子水浸泡生菜根部 30 min,而后再将浸泡液与剩余营养液混合。每 6 d 测定生菜叶中微量元素的含量。

1.2.2 pH 影响生菜吸收土霉素实验

将预培养的生菜移至对照和含土霉素浓度为 1 mg·L⁻¹ 的营养液中,将 pH 分别调至 5、6、7、8,在人工气候箱中培养 12 d,3 次重复。每 3 d 更换营养液并测定生菜的鲜重、剩余营养液的体积和混合液中土霉素

的浓度。

1.3 样品分析

取一定时间的混合液加入 25 mmol 等体积的 Na₂EDTA,稀释后过 0.22 μm 滤膜,采用 Agilent 1100 型高效液相色谱测定土霉素的浓度。色谱柱为 Hypersil BDS (C18, 250 mm × 4.6 mm i.d., 5.0 μm) 反相色谱柱。色谱条件:柱温 35℃,检测器为二极管阵列检测器,波长 355 nm,进样量 100 μL,流动相为甲醇:乙腈:1%甲酸 (pH = 3) = 10:15:75 (体积比),流速为 1.5 mL·min⁻¹。

将生菜叶烘干称重、研碎后,称取 0.5 g 的干生菜叶样品于 100 mL 锥形瓶中,加入 10 mL 4:1 的 HNO₃ 和 HClO₄ 混合液,静置 8 h 以上,移至加热板上加热约 2 h。待样品完全消解后,冷却,用 2% 稀硝酸定容,过滤后待测。生菜消解液中 Cu、Zn、Mn、Fe 金属元素的浓度采用 PerkinElmer 公司的 AAnalyst 700 火焰原子吸收光谱仪进行测定。

2 结果与讨论

2.1 土霉素的动态吸收及其植物毒性

由于植物体内土霉素提取技术尚缺少成熟的方法可以借鉴,因此本实验中生菜对土霉素的吸收量由营养液中土霉素的减少量计算得出,即采用无植物的营养液中土霉素的水解减少作为对照,以无植物生长的营养液与有植物生长的混合液中土霉素的差值作为生菜吸收土霉素的量。其中通过去离子水浸泡根 30 min,去除根系表面吸附的土霉素的干扰;土霉素在水体中的降解途径主要是光解,本实验中通过包裹铝箔排除了光解的影响;考虑到土霉素的广谱抑菌性及本研究中土霉素的处理水平,营养液中的土霉素不易被根际微生物降解,因此在本实验中未添加其他抑菌剂。

图 1 为不同浓度土霉素处理条件下,生菜对土霉素的吸收情况(本文中土霉素、水分及微量元素吸收量均以单株生菜为计量单位)。由图 1 可知在 1~10 mg·L⁻¹ 范围内,土霉素的处理浓度越高,生菜对其吸收量越大。

不同浓度土霉素对生菜生长(叶、根鲜重)的影响如图 2 所示。随土霉素浓度的增加,生菜生长受到明显的抑制。当土霉素浓度为 1 mg·L⁻¹ 时,土霉素对生菜叶的生长影响不显著,但抑制了根的生长;当土霉素的浓度增加至 5 mg·L⁻¹ 时,土霉素对生菜叶和根的生长均表现出明显的抑制作用,并随着浓度的升高抑

制作用逐渐增强。土霉素对生菜根生长的抑制作用大于叶,这与前人的研究结果一致^[12,14]。Migliore 等^[14]发现生菜的根是恩诺沙星积累的主要位置。Kong 等^[12]在水培条件下研究了苜蓿对土霉素的吸收,结果发现土霉素对根生长的抑制作用大于叶。

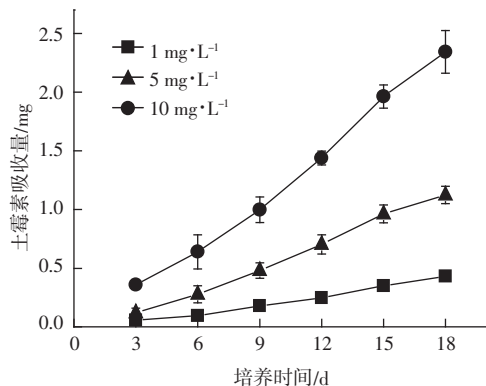


图1 不同浓度水平处理对生菜吸收土霉素的影响

Figure 1 The uptake of oxytetracycline by lettuce under different concentrations

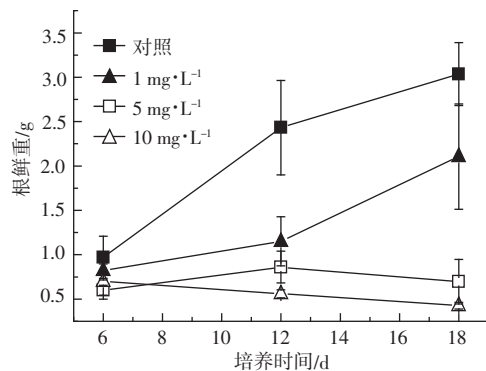
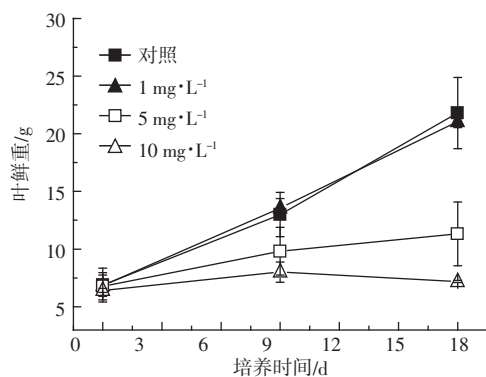


图2 土霉素对生菜生长的影响

Figure 2 Effect of oxytetracycline on the growth of lettuce

土霉素对生菜吸水量的影响如图3所示。结果表明,随土霉素浓度的升高,生菜的吸水量呈减少趋势。当浓度达到 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,15 d 后吸水量显著下降;当

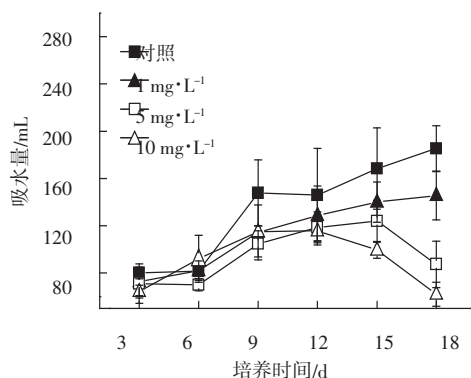


图3 土霉素对生菜吸水量的影响

Figure 3 Effect of oxytetracycline on the uptake quantity of water by lettuce

浓度升至 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,9 d 后吸水量开始下降。生菜组织内含水量高达 95%,吸水量的降低会减少生菜的质量并可能影响生菜的其他生理代谢。

图4为培养18 d时土霉素对生菜吸收微量元素的影响。由图4a可以看出,随着土霉素浓度的升高,生菜对 Fe、Zn、Mn、Cu 等元素的吸收量减小。当土霉素的浓度达到 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,生菜对各微量元素的吸收减少约 50%。图4b为生菜叶片中微量元素的吸收抑制比(土霉素处理的生菜与对照处理的生菜中微量元素含量之比)。如图所示,土霉素对 Zn 的抑制作用较小;对 Fe 和 Cu 的抑制作用较大;对 Mn 的抑制作用最显著。这4种金属元素均为植物生长必需的微量元素,它们吸收量的减少可能影响生菜正常的生理代谢。

分析土霉素抑制这4种微量元素吸收的原因,可能包括:(1) 植物吸收水分和微量元素存在不同的途径和机理^[17],吸水量的减少可使植物的生理代谢受到抑制,而这种抑制作用可能引起植物体内能量的变化,从而影响通过共质体运输微量元素的主动吸收过程;(2) 土霉素与 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 等金属离子可发生络合反应^[18-21],而络合作用可能会减少生菜对微量元素的吸收。前人研究发现,在水培条件下,EDTA^[22,23]、EDDS^[24]与金属络合后会减少植物对金属离子的吸收。前人的研究结果可以在一定程度上解释土霉素对微量元素吸收的影响。

2.2 pH 影响生菜吸收土霉素

土霉素在 $\text{pH} < 3.57$ 时带正电荷 (+), $\text{pK}_{\text{a}1}=3.57$; 在 $3.57 < \text{pH} < 7.49$ 时呈两性(±), $\text{pK}_{\text{a}2}=7.49$; 在 $\text{pH} > 7.49$ 时带负电荷(-), $\text{pK}_{\text{a}3}=9.44$,如图5所示^[25]。

不同 pH 条件下生菜对土霉素的吸收如图6所示,当 pH 由 5.0 升高至 7.0 时,土霉素的吸收量依次减少;当 $\text{pH} = 8.0$ 时,土霉素的吸收量又呈增加的趋势。

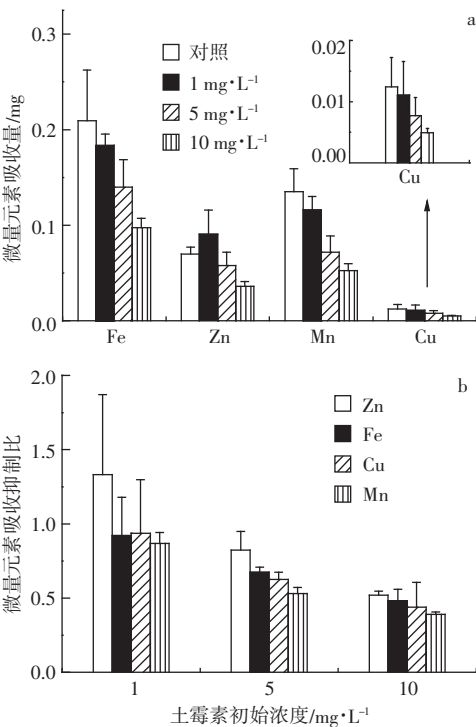


图 4 土霉素对生菜吸收微量元素的影响
Figure 4 Effect of oxytetracycline on the uptake of trace elements by lettuce

势。对 4 种 pH 处理的生菜吸收土霉素的量进行 *t* 检验, 结果发现, pH = 5.0 和 pH = 7.0 处理的生菜对土霉素的吸收存在显著性差异($P=0.05$)。Kong 等^[12]通过苜蓿离体实验发现在较高浓度土霉素处理条件下($20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 苜蓿对土霉素的吸收随 pH 的升高而增加。而本研究选用了较低浓度水平的土霉素($1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\approx 2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)进行生菜活体实验, 这些实验条件的差异可能导致两种植物对土霉素吸收规律的不同。本研究还发现 4 种 pH 条件下土霉素对生菜生长的影响无显著性差异。

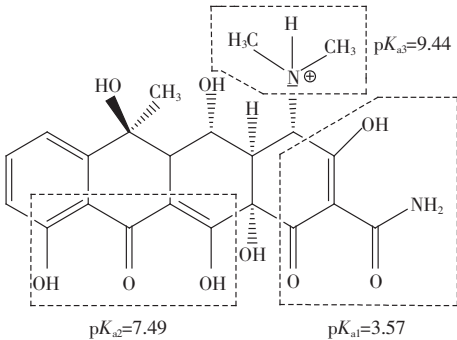


图 5 土霉素的解离常数
Figure 5 pK_{a} values of oxytetracycline

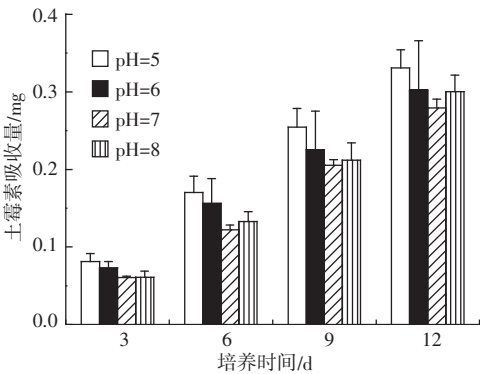


图 6 不同 pH 条件下生菜对土霉素吸收量的影响
Figure 6 Effect of pH on the quantity of oxytetracycline uptake by lettuce

3 结论与展望

水培实验表明, 当土霉素浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 其对生菜根部的生长表现出抑制作用。当土霉素的浓度高于 $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 生菜对水分和微量元素(Fe、Cu、Zn、Mn)的吸收均减少; 生菜根和叶的生长受到抑制, 土霉素浓度越高抑制作用越显著。营养液的 pH 对生菜吸收土霉素有一定的影响, 但对生菜的生长无显著性影响。

抗生素可对植物的生长产生直接影响, 也会通过植物摄取进入食物链而对动物和人类的健康产生间接危害。但是, 目前对于植物吸收抗生素的机理, 以及抗生素在植物体内的运输过程尚不清楚, 有待于进一步的研究。

参考文献:

[1] Liguoro M D, Gibin V, Capolongo F, et al. Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil[J]. *Chemosphere*, 2003, 52: 203–212.

[2] Jacobsen P, Berglund L. Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farms [J]. *Aquaculture*, 1988, 70: 365–370.

[3] Björklund H, Bondestam J, Bylund G. Residues of oxytetracycline in wild fish and sediments from fish farms[J]. *Aquaculture*, 1990, 86: 359–367.

[4] Coyne R, Hiney M, O'Connor B, et al. Concentration and persistence of oxytetracycline in sediments under a marine salmon farm [J]. *Aquaculture*, 1994, 123: 31–42.

[5] Kay P, Blackwell P A, Boxall A B A. Column studies to investigate the fate of veterinary antibiotics in clay soils following slurry application to agricultural land [J]. *Chemosphere*, 2005, 60: 497–507.

[6] Rabølle M, Spliid N H. Sorption and mobility of metronidazole, olaquinoxidox, oxytetracycline and tylosin in soil[J]. *Chemosphere*, 2000, 40: 715–722.

[7] Halling-Sørensen B, Lykkeberg A, Ingerslev F, et al. Characterisation of

1042	崔 馨等:生菜对土霉素的吸收及其植物毒性	2008年 5月
the abiotic degradation pathways of oxytetracyclines in soil interstitial water using LC–MS–MS[J]. <i>Chemosphere</i> , 2003, 50: 1331– 1342.		
[8]	Brambilla G, Patrizii M, Filippis S P D, et al. Oxytetracycline as environmental contaminant in arable lands [J]. <i>Analytica Chimica Acta</i> , 2007, 586:326–329.	
[9]	Martínez–Carballo E, González–Barreiro C, Scharf S, et al. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria [J]. <i>Environmental Pollution</i> , 2007, 148:570–579.	
[10]	Kumar K, Gupta S C, Baidoo S K, et al. Antibiotic uptake by plants from soil fertilized with animal manure[J]. <i>Journal of Environmental Quality</i> , 2005, 34:2082–2085.	
[11]	Boxall A B A, Johnson P, Smith E J, et al. Uptake of veterinary medicines from soils into plants [J]. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> , 2006, 54(6):2288–2297.	
[12]	Kong W D, Zhu Y G, Liang Y C, et al. Uptake of oxytetracycline and its phytotoxicity to alfalfa[J]. <i>Environmental Pollution</i> , 2007,147:187–193.	
[13]	Migliore L, Cozzolino S, Fiori M. Phytotoxicity to and uptake of flumequine used in intensive aquaculture on the aquatic weed, <i>Lythrum salicaria</i> L.[J]. <i>Chemosphere</i> , 2000, 40:741–750.	
[14]	Migliore L, Cozzolino S, Fiori M. Phytotoxicity and uptake of enrofloxacin in crop plants[J]. <i>Chemosphere</i> , 2003, 52:1233–1244.	
[15]	Migliore L, Civitareale C, Cozzolino S, et al. Laboratory models to evaluate phytotoxicity of sulphadimethoxine on terrestrial plants [J]. <i>Chemosphere</i> , 1998, 37:2957–2961.	
[16]	Bradel B G, Preil W, Jeske H. Remission of the free–branching pattern of <i>Euphorbia pulcherrima</i> by tetracycline treatment[J]. <i>Journal of Phytopathology</i> , 2000, 148:587–590.	
[17]	叶庆华, 曾 定, 陈振端, 等. 植物生物学[M]. 厦门:厦门大学出版社, 2005. 156–163.	
	YE Q H, ZENG D, CHEN Z D, et al. Plant Biology [M]. Xiamen: Xiamen University Press, 2005. 156–163.	
[18]	Tongaree S, Flanagan D R, Poust R I. The interaction between oxytetracycline and divalent metal ions in aqueous and mixed solvent systems[J]. <i>Pharmaceutical Development and Technology</i> , 1999, 4:581– 591.	
[19]	Riaz M, Pilpel N. Complexation of tetracyclines with metal ions in relation to photosensitization [J]. <i>Journal of Pharmacy and Pharmacology</i> , 1984, 36: 153–156.	
[20]	Santos H F D, Almeida W B D, Zerner M C. Theoretical near UV and VIS electronic spectra for the Zn II – anhydrotetracycline complex[J]. <i>Journal of Chemical Society, Perkin Transactions 2</i> , 1998, 11:2519–2525.	
[21]	Machado F C, Demicheli C, Garnier–Suillerot A, et al. Metal complexes of anhydrotetracycline. 2. Absorption and circular dichroism study of Mg (II), Al (III), and Fe (III) complexes. Possible influence of the Mg (II) complex on the toxic side effects of tetracycline[J]. <i>Journal of Inorganic Biochemistry</i> , 1995, 60:163–173.	
[22]	Laurie S H, Tancoek N P, McGrath S P, et al. Influence of complexation on the uptake by plants of iron, manganese, copper and zinc. I. Effect of EDTA in a multi–metal and computer simulation study [J]. <i>Journal of Experimental Botany</i> , 1991, 42:509–513.	
[23]	Laurie S H, Tancoek N P, McGrath S P, et al. Influence of EDTA complexation on plant uptake of manganese (II) [J]. <i>Plant Science</i> , 1995, 109:231–235.	
[24]	Tandy S, Schulin R, Nowack B. The influence of EDDS on the uptake of heavy metals in hydroponically grown sunflowers[J]. <i>Chemosphere</i> , 2006, 62:1454–1463.	
[25]	Figueroa R A, Mackay A A. Sorption of oxytetracycline to iron oxides and iron oxide–rich soils [J]. <i>Environmental Science and Technology</i> , 2005, 39:6664–6671.	