

磺胺二甲基嘧啶对土壤微生物活动的影响

刁晓平^{1,3}, 孙英健², 孙振钧¹, 沈建忠²

(1.中国农业大学资源与环境学院, 北京 100094; 2.中国农业大学动物医学院, 北京 100094; 3.海南大学生命科学与农学院, 海南 海口 570228)

摘要:采用室内培养方法,研究了磺胺二甲基嘧啶对不同土壤中微生物呼吸活动和种群数量的影响。结果表明,所测药物对不同土壤中微生物呼吸活动的影响有所差异。在污染的中后期,长春土中加入一定量的磺胺二甲基嘧啶能刺激土壤的呼吸作用;而在成都土中,高浓度的药物对土壤的呼吸有抑制作用。磺胺二甲基嘧啶对土壤中的细菌的生长也表现出一定的抑制作用,长春土对细菌的抑制作用较为突出。不同土壤的抑制作用表现出时间差异,24 h 的抑制率高于 48 h。用药后 48 h,磺胺二甲基嘧啶对武汉土中真菌的生长表现出明显的抑制作用,药物浓度越低,抑制作用越强;药物对长春土中真菌的生长也有一定的抑制作用,而在另外 2 种土壤中,药物对真菌的生长没有表现出抑制作用。

关键词:磺胺二甲基嘧啶; 土壤微生物; 呼吸活动; 微生物种群

中图分类号:S154.36 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2005)04-0694-04

Effects of Sulfamethazine on Microbial Activity in Different Types of Soil

DIAO Xiao-ping^{1,3}, SUN Ying-jian², SUN Zhen-jun¹, SHEN Jian-zhong²

(1.Resource and Environmental College, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. Animal Medicine College, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 3. Life Science and Agricultural College, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: The fate and potential impact of veterinary medicines in the environment have been researched in the world. As feed additive, sulfamethazine is widely used to promote animal growth and prevent disease. The relationship between chemicals and soil microorganism has become an important research field in environmental science. The effects of different concentration of sulfamethazine on soil respiration and growth rates of bacteria and fungi in different types of soil were studied. The results showed that the effects of sulfamethazine on soil respiration activity varied with types of soils. During the later period of exposure, sulfamethazine stimulated the soil respiration in soil from Changchun, while, high concentration of sulfamethazine inhibited the CO₂ emission in Chengdu soil. The drug inhibited the growth rates of bacteria in soils, and the inhibition rate was higher at 24 hour than that at 48 hour. Different soil compositions affected sulfamethazine's inhibitive effect on bacteria and fungi growth. The effects of drug on fungus growth varied with soils, and the significant inhibition action presented in Wuhan soil after exposure 48 hour, which may be related to the different types and structures of microorganisms in soil from various regions.

Keywords: sulfamethazine; soil microorganism; soil respiration; microbial populations

随着集约化畜牧业的发展,兽药或饲料添加剂的使用量日渐增加。使用后的兽药或饲料添加剂经过一定的转归进入土壤生态系统,并随食物链影响其中动物、植物和微生物,对生态系统造成不良的影响。因此

排放到环境中药物对环境生物的潜在毒性也成为近年来国际上研究的热点^[1,2]。

微生物在土壤生态系统中起着重要的作用。它们不仅参与土壤的碳氮循环,而且其种类和数量是土壤肥力的重要指标。同时土壤中的微生物还是土壤中的蚯蚓等无脊椎动物的营养来源^[3]。近年来,化学物质和土壤微生物的关系已成为环境科学的重要研究领域。

作为药物型饲料添加剂,磺胺二甲基嘧啶能明显促进增重和提高饲料转化率,在畜禽养殖领域得到广泛应用。它多以原药的形式随动物的粪便排出体外,

收稿日期:2004-10-14

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30130140);国家重大基础研究前期研究专项(2002CCA00800)

作者简介:刁晓平(1963—),女,教授,重庆人,在读博士,主要从事生态毒理和畜牧生态的研究,现在海南大学工作。

E-mail:diaoxip@263.net

它们在环境中的代谢和对环境生物的影响尚未见文献报道。本试验旨在通过研究磺胺二甲基嘧啶对土壤微生物活动的影响,借以了解该药物对土壤生态系统生态毒理学效应,以便为药物的环境安全性评价提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试土壤

采自南京、成都、武汉、长春,取表层 10 cm 下的土壤晾干、过 1 mm 筛,经常规测试后备用。

1.1.2 供试样品及试剂

磺胺二甲基嘧啶,由北京市制药二厂生产。NaOH (分析纯),HCl (分析纯),BaCl₂·H₂O (分析纯),丙酮 (分析纯),均为北京试剂厂提供。

细菌培养基:普通营养琼脂培养基。

真菌培养基:孟加拉红-链霉素培养基,成分为:葡萄糖 10 g,蛋白胨 5 g,磷酸二氢钾 1.0 g,硫酸镁 0.5 g,孟加拉红水溶液 (1/3 000) 100 mL,加蒸馏水 800 mL,121 ℃灭菌 15 min,冷却至 55 ℃~60 ℃,每 100 mL 培养基加入 0.03% 硫酸链霉素溶液 (含链霉素 30 μg·mL⁻¹) 10 mL。

1.2 试验方法

1.2.1 土壤分析方法^[5]

pH 值采用电位法测定。

有机质的测定采用铬酸氧化还原滴定外热源法。全氮采用微量凯氏定氮法测定。

速效磷采用 0.5 mol·L⁻¹ NaHCO₃ 浸提——钼锑抗吸光光度法测定。

速效钾采用 1 mol·L⁻¹ NH₄AC 浸提——火焰光度法测定。

质地采用比重计法测定。

1.2.2 磺胺二甲基嘧啶对土壤微生物呼吸活动的影响

采用直接吸收法 (密闭法) 滴定测定^[6]。测定原理为:在一个密闭系统内放置土壤及过量的 NaOH 标准溶液,土壤微生物在呼吸过程中释放出来的 CO₂ 由 NaOH 吸收。在 BaCl₂ 存在条件下,用 HCl 滴定剩余的 NaOH,根据消耗的盐酸量求得释放出的 CO₂ 量。

取 50 g 供试土壤,加入 1 g 葡萄糖,混匀,放于 100 mL 高型烧杯中,加少量水润湿。将小烧杯放入容积为 2.5 L 的可密闭容器中,在 25 ℃±1 ℃恒温培养箱中培养 7 d。受试药物的浓度为 10、100、500 mg·kg⁻¹。将一定浓度的药物溶液添加到土壤中,并加入一定的

水使土壤含水量达田间最大持水量的 60%,充分混匀。放入换过气的可密闭容器中。同时放入盛有 30 mL 0.2 mol·L⁻¹ 标准 NaOH 的小烧杯,密封瓶口后置恒温培养箱中继续培养。于 5、15、27、39、51、63 h 定期取出小烧杯,每瓶加数滴酚酞指示剂,立即用 0.2 mol·L⁻¹ HCl 滴定剩余的 NaOH。同时换进盛有新鲜 NaOH 液的小烧杯,继续培养,按上述步骤进行测定,各处理重复 3 次。

由于各处理中有等量的 NaOH 用于吸收土壤呼吸时释放的 CO₂,可求出滴定对照与各处理组所消耗的 HCl 量之差,按每毫升消耗 NaOH 相当于 2.2 mg CO₂ 计算土壤的总呼吸作用以及土壤呼吸的 CO₂ 释放量。每次测定结果按下式计算 100 g 干土中的 CO₂ 释放量 W :

$W = (\text{空白值} - \text{滴定值}) \times \text{盐酸摩尔浓度} \times \text{CO}_2 \text{ 分子量} \times 50 / \text{干土重}$

1.2.3 磺胺二甲基嘧啶对土壤微生物种群的影响^[7]

取未经处理的供试土壤样品 2 g,用无菌水逐级稀释,使每毫升稀释液中的细菌菌落数在 100~300 个之间,真菌菌落数在 10~50 个范围内。

试验所用的药物浓度为:2 000、1 000、500、250、125 mg·kg⁻¹ 土壤。准确称量磺胺二甲基嘧啶,将磺胺二甲基嘧啶加 1 mL 有机溶剂溶解,用无菌水倍比稀释,每个稀释度设 3 个重复,以无菌水做对照,同时取 0.5 mL 土壤稀释液作药物空白对照。

向每个平皿加入 0.5 mL 土壤稀释液、13.5 mL 细菌培养基或真菌培养基、1 mL 药物稀释液,将平皿倒置于恒温箱中培养 (温度为 28 ℃±1 ℃),分别于培养 24 h、48 h 记录细菌菌落数,同时分别于培养 48、72、96 h 记录真菌菌落数,与药物空白对照相比计算药物对细菌和真菌的平均抑制率。

2 结果与分析

2.1 土壤的理化性质分析

不同土壤的理化性质见表 1。试验所用的土壤分别采自我国的东北、西南、华中和华东地区,具有一定的区域代表性,分别为壤土、砂壤土和轻粘土。在这 4 个地区的土壤中,以长春土壤中有机质含量最高,土壤肥力最大,成都土次之,南京土再次,武汉土肥力最低。由于不同地区土壤微生物的种类和数量各不相同,土壤肥力各异,土壤微生物对土壤中残留的抗菌素的敏感性、耐受性也有很大的地区差别。

2.2 磺胺二甲基嘧啶对土壤呼吸的影响

表 1 土壤样品的理化特性

Table 1 Physical and chemical properties of the tested soils

土壤样品	有机质/g · kg ⁻¹	pH	全氮/mg · g ⁻¹	速效磷/mg · g ⁻¹	速效钾/mg · g ⁻¹	质地
长春土	61.36	6.98	1.652	33.65	292.00	砂壤土
成都土	29.94	6.90	1.752	18.06	60.00	壤土
武汉土	7.61	6.53	0.047	1.53	48.00	轻粘土
南京土	22.17	6.64	0.800	0.46	124.00	轻粘土

磺胺二甲基嘧啶对土壤 CO₂ 释放量的影响结果见表 2。由表 2 可以看出,从 39 h 开始,加入不同浓度磺胺二甲基嘧啶的长春土中,CO₂ 的释放量不但没有受到抑制,反而有增强的现象出现,并且这种现象随着药物浓度的增加而趋于明显。随着时间的推移,到 63 h 时,药物组的 CO₂ 的释放量逐渐接近对照组。在

成都土中,药物的作用则不一样。从 5 h 开始,高浓度药物组(500 mg · kg⁻¹)CO₂ 的释放量明显低于对照组,经显著性分析具有明显的差异,表明土壤的呼吸活动受到明显的抑制。63 h 后,高浓度药物组的 CO₂ 的释放量逐渐增加接近对照组。总体上看,除 39 h 时低浓度药物组表现有一定的抑制作用外,其他时间低浓度

表 2 磺胺二甲基嘧啶对土壤 CO₂ 释放量的影响(mL · 100 g⁻¹ 土壤)

Table 2 Effect of sulfamehtaoid on CO₂ emission (mL · 100 g⁻¹ soil)

土样	浓度/mg · kg ⁻¹	5 h	15 h	27 h	39 h	51 h	63 h
长春土 S1	10	12.77a	32.19a	50.51a	73.42a	88.37a	124.96a
	100	10.64a	32.26a	54.66a	81.42b	90.72a	122.53a
	500	10.75a	37.86a	55.78a	84.37b	95.49a	116.37a
	CK	10.53a	36.18a	60.03a	68.10a	71.23b	120.51a
成都土 S2	10	29.24a	31.14a	35.73a	35.73a	41.44a	62.05a
	100	28.58a	32.86a	35.39a	43.12b	44.58a	55.44b
	500	16.35b	22.06b	22.29b	25.09c	27.33b	40.78b
	CK	29.34a	40.21a	44.02a	51.52d	46.03a	48.11b

注:同一列字母相同者为差异不明显($P>0.05$),同一列字母不相同者,为差异明显($P<0.05$)。

的药物对成都土的呼吸活动没有明显的影响。

2.3 磺胺二甲基嘧啶对土壤微生物种群生长的影响

磺胺二甲基嘧啶对不同土壤中细菌生长影响的试验结果见表 3。从表 3 中可以看出,磺胺二甲基嘧啶对土壤中细菌的生长表现一定的抑制作用,这种抑制作用随土壤的不同而表现出一定的差异。在武汉土和长春土中,高浓度药组物(2 000 mg · kg⁻¹)24 h 的最高抑制率超过 85%,抑菌作用较为突出;药物对不同土壤的细菌抑制作用总体上随浓度的降低而出现下降的趋势,并表现出明显的时间差异。4 种土壤中 24

h 的平均抑制率高于 48 h。其中,长春土对土壤中细菌的平均抑制率最高,抑菌作用最为明显。

磺胺二甲基嘧啶对不同土壤中真菌生长影响的实验结果见表 4。从表 4 中可以看出,磺胺二甲基嘧啶对成都土和南京土中真菌的生长未表现出抑制作用。在武汉土中,磺胺二甲基嘧啶对真菌的生长有一定的影响,药物的浓度越低,抑制作用越明显,48 h 的剂量-效应关系最为明显;在长春土中,磺胺二甲基嘧啶对真菌的生长也表现出一定的抑制作用,药物的浓度和药物的抑制作用呈负相关。

表 3 磺胺二甲基嘧啶对不同地区土壤中细菌生长的影响(抑制率/%)

Table 3 Effect of sulfamehtaoid on growth of bacteria in different soils (Inhibition Rate %)

磺胺二甲基嘧啶浓度 /mg · kg ⁻¹	成都		南京		武汉		长春	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
2000	58.5	25.3	70.2	44.2	85.5	26.0	88.3	65.0
1000	44.8	14.8	78.6	59.9	49.8	10.6	85.2	48.4
500	40.7	27.3	28.7	29.1	35.4	11.7	37.5	36.2
250	7.4	4.0	18.3	23.6	19.9	12.6	40.4	34.6
125	4.9	6.7	8.4	25.9	14.2	5.9	22.1	17.5

表 4 磺胺二甲基嘧啶对不同地区土壤中真菌生长的影响(抑制率/%)

Table 4 Effect of sulfamehtaoid on growth of fungus in different soils (Inhibition Rate %)

磺胺二甲基嘧啶浓度 /mg·kg ⁻¹	成都			南京			武汉			长春		
	48h	72h	96h	48h	72h	96h	48h	72h	96h	48h	72h	96h
2000	0	0	0	0	0	0	31.3	0	0	0	0	0
1000	0	0	0	0	0	0	43.8	0	0	0	14.3	18.2
500	0	0	0	0	0	0	47.9	0	0	0.6	22.9	25.1
250	0	0	0	0	0	0	58.3	2.1	0	14	24.3	31.2
125	0	0	0	0	0	0	60.4	31.3	37.5	23.3	28.6	32.4

注:药物组的真菌菌落数大于对照组,则抑制率计为 0。

3 讨论

磺胺类药物具有抗菌谱广,性质稳定,价格便宜等优点,在畜牧业生产中被广泛用作饲料添加剂来预防动物疾病和提高饲料利用率。磺胺类药物的基本化学结构和细菌“生长物质”对氨苯甲酸很相似,它可与对氨苯甲酸竞争二氢叶酸合成酶,妨碍二氢叶酸的形 成,影响核蛋白的合成,最终抑制细菌的生长与繁殖。磺胺二甲基嘧啶主要是从肾脏排泄,尿中浓度较高。由于它们多以原形排出,因而依然具有生物活性。当排入环境中后,它们会对土壤生态系统产生影响。

磺胺二甲基嘧啶对不同土壤中微生物呼吸活动的影响随土壤的不同而异。在土质较好的长春土中,磺胺二甲基嘧啶对 CO₂ 的释放量的影响最终表现为增强作用,而且这种影响表现出非持续性。这可能是由于长春土有机质含量高,菌群数量较多、种类较为复杂,随着时间的推移,药物在影响微生物活动的同时,也能被相应的微生物分解。随着土壤微生物耐受性的增加,土壤中产生抗性种群的机会增加,从而使土壤的呼吸又逐渐增强。而在土壤肥力差的成都土中,由于微生物种群有限,药物抑制了微生物正常的活动,土壤呼吸活动减弱。

进入环境中的兽药,在对环境产生影响的同时,也受环境中各种物理、化学和生物等因素的作用,在环境中产生不同的转归。由于药物的性质、代谢途径及使用的剂量不同,它们在环境中的转移也不一样。吸附是兽药在环境中迁移的重要过程。它反映了化学物质与土壤沉积物相互作用和发生的规律,并可预测

兽药对环境影响的大小。不同的兽药吸附能力是不一样的,这与土壤类型、pH 值和药物的生理生化特性有关。这也可能是磺胺二甲基嘧啶在不同的土壤中对细菌、真菌生长的影响表现出差异的原因所在。关于磺胺二甲基嘧啶在不同土壤中的迁移转化途径还有待于进一步研究。

4 结论

磺胺二甲基嘧啶对土壤呼吸的影响随土质的不同表现各异。在有机质含量较低的土壤中,药物对土壤呼吸活动有抑制作用。同时,磺胺二甲基嘧啶对所测的 4 种土壤中的细菌的生长均有一定的抑制作用,这种抑制作用随浓度的降低而出现下降的趋势,并表现出明显的时间差异。磺胺二甲基嘧啶对不同土壤中真菌的生长的影响表现出一定的差异,在染毒的初期,药物对武汉土中真菌的抑制作用较为明显。

参考文献:

[1] Jorgensen S E,Halling-Sorensen B. Drugs in the environment[J].*Chemosphere*,2000,40:691-699.
[2] Jongdloed A W,Lenis N P. Environmental concerns about animal manure [J]. *J Anim Sci*, 1998, 76:2641-2648.
[3] 邱江平. 蚯蚓在环境保护上的应用——生态毒理学[J].上海农学院学报,1999,17(4):301-308.
[4] 李 兰,索德成,李丽蓓. 饲料中磺胺二甲基嘧啶及磺胺间甲氧嘧啶快速测定[J].中国饲料,2003,10:29-31.
[5] 中国科学院南京土壤研究所. 土壤理化分析[M].上海:上海科学技术出版社,1978.
[6] 国家环保总局. 化学农药环境安全评价实验准则(续)[J].农药科学与管理,1990,4:4-9.