

土霉素污染对土壤生物学性质影响的初步研究

王丽平, 章明奎

(浙江大学环境与资源学院, 浙江省亚热带土壤与植物营养重点研究实验室, 浙江 杭州 310029)

摘要: 为了解随粪肥进入农田中的土霉素对土壤生物化学性质产生的可能影响, 采用实验模拟方法研究了土霉素污染对土壤微生物生物量碳、土壤酶活性及微生物组成的影响。结果表明, 土霉素污染对土壤细菌、放线菌数量和微生物总量均有一定的抑制作用, 随土霉素污染程度的提高抑制作用也有所增强; 但土霉素污染对真菌的作用较为复杂, 一般是低浓度时有促进作用, 高浓度时有抑制作用。低量土霉素污染对土壤脲酶和中性磷酸酶活性均无明显的影响, 但高量的土霉素污染对土壤脲酶活性起抑制作用。土霉素对土壤微生物生物量碳的影响因土壤类型、土霉素加入量和培养时间不同有所差异。土霉素污染对土壤生物化学性质的影响主要发生在土霉素进入土壤的初期, 随着时间的增加, 影响逐渐减弱和消失。

关键词: 土霉素; 微生物数量; 酶活性; 微生物生物量碳

中图分类号: X53 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2043(2009)07-1434-05

Effects of Oxytetracycline Pollution on Soil Biological Properties

WANG Li-ping, ZHANG Ming-kui

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Subtropic Soil and Plant Nutrition, College of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: Antibiotics used in livestock production may be present in manure and slurry as the parent compound and/or metabolites. Soils may therefore be exposed to these antibiotics due to the application of animal manure to agricultural land. In order to understand the potential impact of antibiotics on soil biological properties, oxytetracycline ($C_{22}H_{24}N_2O_9$, OTC), an antibiotic that was widely used to prevent animal infectious diseases in China, was selected to characterize its effects on numbers of soil microorganisms, micro-biomass carbon, and enzymes by laboratory studies. The results showed that the OTC pollution of soils could inhibit numbers of bacteria, actinomycetes, and total microorganisms. The numbers of the microorganisms decreased as the concentration of oxytetracycline in the soils increased. The effect of the OTC on fungi varied with concentration of the antibiotic. Low concentration of the OTC could stimulate the growth of fungi, while high concentration of the OTC had the inhibitory effects on the growth of fungi. Low concentration of the OTC in soils had no significant effects on soil neutral phosphatase and urease activities. However, high concentration of the OTC could inhibit soil urease activity. The effects of the OTC on soil micro-biomass carbon varied with soil type, concentration of the OTC added, and incubation time. The influences of the OTC on soil biological properties occurred in initial stage of the antibiotic addition, and declined with increasing the incubation time. The decreased effects might be due to strong adsorption of the soils to the OTC and degradation of the antibiotic in the soils.

Keywords: oxytetracycline; numbers of soil microbes; enzyme activity; micro-biomass carbon

饲料和养殖环节中滥用抗生素对生态环境的不良影响显现越来越严重的趋势, 成为人们普遍关注的一个社会热点问题^[1-3]。土壤(或沉积物)是抗生素等污染物质的最终归宿之地, 进入环境中的抗生素将在土壤/沉积物中积累, 对土壤生态系统产生一定的影

响^[4-8]。抗生素多为抗微生物药物, 能直接杀死或抑制环境中某些微生物而影响环境中微生物群落的组成, 并通过影响土壤中有有机物质的腐殖化和分解而影响土壤肥力^[9]。抗生素还可通过影响环境微生物的种类和数量, 影响土壤对农药等有机污染物的固定或降解能力。Boles 等研究发现^[10]土壤中 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的四环素可显著抑制土壤脱氢酶和磷酸酶的活性。Dijk 等研究也发现^[11]饲料添加剂中的抗生素对土壤和水环境中典型微生物的生长有明显的影响。刁晓平等的研究

收稿日期: 2008-10-21

基金项目: 教育部博士学科点专项科研基金(20060335018)

作者简介: 王丽平(1983—), 女, 硕士, 从事土壤与环境质量方面的研究。

通讯作者: 章明奎 E-mail: mkzhang@zju.edu.cn

表明安普霉素对土壤中的细菌生长具有明显的抑制作用^[12]。但 Thiele 等的研究则发现^[13]即使在抗生素浓度较高的情况下对土壤微生物活性也影响不大,认为与土壤中绝大部分微生物处于休眠状态有关。

土霉素是我国应用最为广泛的抗生素之一,其用量大且在动物体内有较高的稳定性,当其随粪肥进入农田后可能会对土壤微生物产生影响,但有关这方面的影响目前还了解不多。为此,本文用实验模拟方法,研究了土霉素进入土壤后对土壤微生物生物量碳、土壤酶活性及微生物种类组成的影响,旨在揭示因施用有机肥引入农田的土霉素对土壤微生物多样性及土壤养分循环的可能影响,为正确评价抗生素的环境效应提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

供试土样 3 个(S1、S2、S3),均采自浙江大学华家池校区试验地,系表层土样(0~20 cm),土壤类型为粉泥土(属潮土土类),利用方式分别为蔬菜、草坪、果园。新鲜土样采集后拣去植物残体,分成两部分,一部分土样直接过 2 mm 筛,混合均匀,放入 4℃ 保存,供培养实验用;另一部分土样风干后,研磨分别过 2、0.25 mm 筛,用于土壤基本理化性状的测定,供试土样基本理化性质见表 1。供试抗生素为土霉素(Oxytetracycline),分子式为 $C_{22}H_{24}N_2O_9$ 。

表 1 供试土壤基本性质
Table 1 Properties of soils tested

土样号	利用方式	pH	有机质/ $g \cdot kg^{-1}$	CEC/ $cmol \cdot kg^{-1}$	砂粒/ $g \cdot kg^{-1}$	粉粒/ $g \cdot kg^{-1}$	粘粒/ $g \cdot kg^{-1}$
S1	蔬菜地	8.20	19.88	10.70	128	718	144
S2	草坪	8.11	21.98	10.10	232	624	144
S3	果园	6.22	22.89	13.10	158	710	132

1.2 试验设计和分析方法

取部分冷藏于冰箱中的土样(S1、S2、S3),在 20~25℃ 下放置 7 d,以恢复微生物活性。然后加入不同浓度的土霉素溶液和适量的蒸馏水并充分混匀,使土壤含水量达到饱和田间持水量的 50%,同时使土壤中抗生素含量分别为 0、1.0、2.5、10、50、100 和 200 $mg \cdot kg^{-1}$ 7 个等级,每个处理用土量为 300 g。把添加土霉素后的土样置于大烧杯中,上覆保鲜膜并扎小孔,在 25℃ 条件下恒温恒湿培养箱中进行培养,每隔 2 d 称重补足损失的水分。分别在培养 2~55 d 取样分析微生物生物量碳、脲酶活性、中性磷酸酶活性和微生物

数量。每个处理重复 3 次。

供试土壤的基本理化性质采用常规分析方法进行测定^[14]。微生物生物量碳采用氯仿熏蒸-硫酸钾提取法测定,提取液中可溶性总碳的含量用 Shimadzu TOC 自动分析仪测定。土壤微生物种类用稀释平板法测定^[15]。脲酶与磷酸酶的测定方法参考《土壤酶及其研究方法》^[16]。试验数据采用 Microsoft Excel 2003 处理,统计分析采用软件 DPS 3.0 实现。

2 结果与分析

2.1 对土壤微生物组成的影响

图 1 为培养时间为 5、30 d 时不同浓度土霉素处理土壤的微生物组成情况。从中可知,当培养时间为 5 d 时,菜地和果园土壤的细菌数量、菜地和草地土壤的放线菌数量和 3 种土壤的微生物总量均随土霉素浓度的增加而降低。但对于对照土壤(指未经抗生素处理时的土壤)细菌数量相对较低的草地和放线菌数量相对较低的果园,土霉素处理对土壤细菌数量(草地)及放线菌数量(果园)影响较小,这可能与当土壤中某类微生物种群较小时其受外部污染物影响也较小有关。在大部分情况下,土霉素可抑制土壤中细菌和放线菌的生长。然而,土霉素污染对真菌的影响在不同土壤中的表现有所差异:在菜地和草地土壤中,低浓度的土霉素(1 和 10 $mg \cdot kg^{-1}$)可促进土壤真菌的生长;但高浓度(100 $mg \cdot kg^{-1}$)时,对土壤真菌的生长有抑制作用。在果园土壤中,土霉素污染对真菌有明显的抑制作用,抑制程度随土霉素加入量的增加而增加。Kong 等将土壤中提取的微生物群落暴露于含有土霉素的生理盐水溶液后,发现土壤微生物群落功能多样性随土霉素浓度升高显著下降^[17]。王加龙等^[2]和王丽平等^[18]对土壤抗生素恩诺沙星污染的生物学效应研究也都表明,恩诺沙星对三大类微生物数量的影响是:细菌>真菌>放线菌。低量的恩诺沙星残留可刺激土壤微生物生长,而高量的恩诺沙星残留却明显抑制了土壤微生物的生长,抑制程度随恩诺沙星加入量的增加而增强^[18]。

培养 30 d 后,土霉素对土壤细菌、放线菌和总微生物数量仍有抑制作用,但与培养初期相比,其抑制作用有明显的下降。30 d 后,土霉素对真菌呈现轻微的抑制作用(图 1),这可能与随培养时间的增加土霉素发生降解损失或被土壤吸附固定有关。Thiele 认为抗生素对土壤微生物影响随时间的变化可能与土壤微生物对抗生素产生抗性有关^[19]。土霉

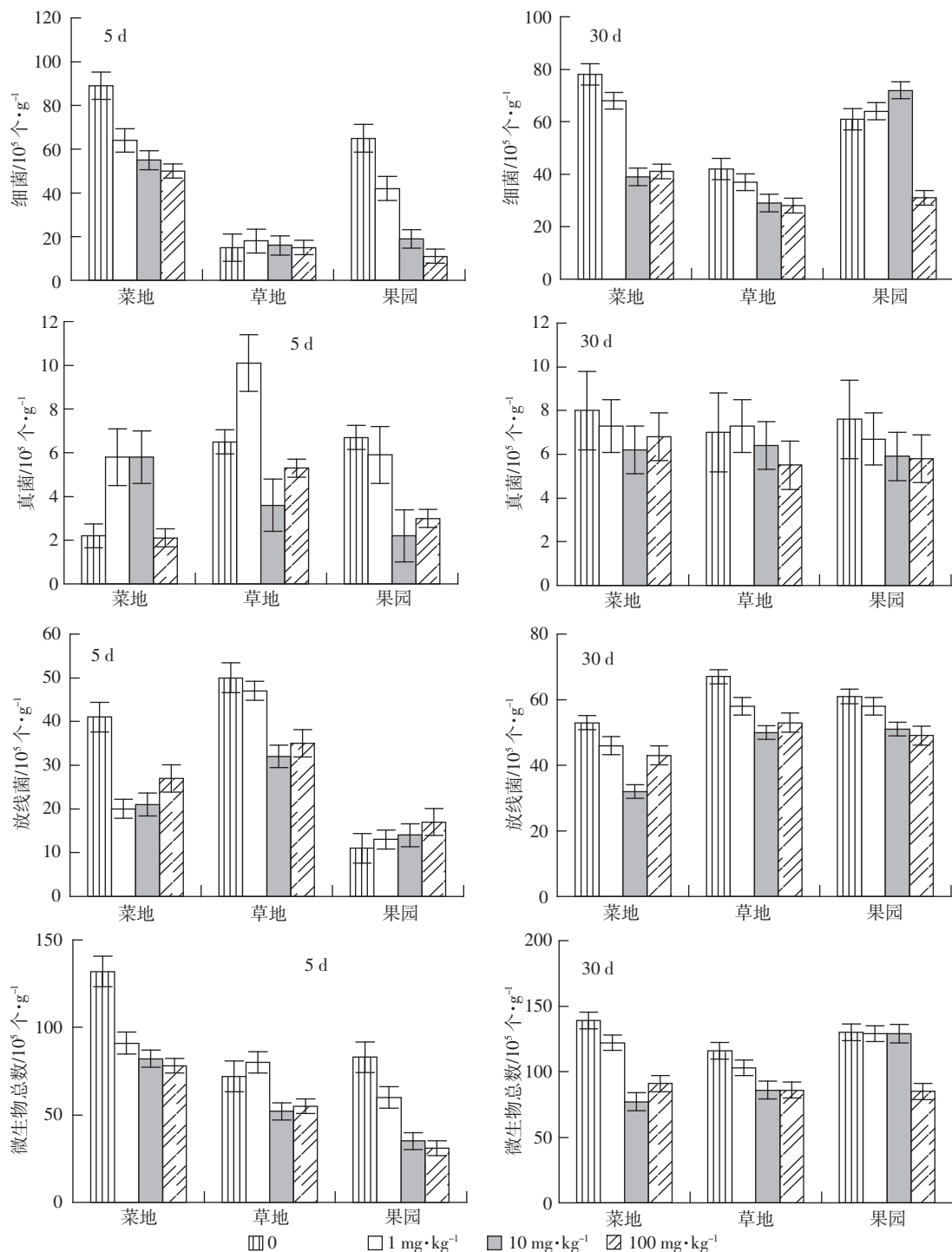


图1 土霉素浓度对土壤微生物的影响

Figure 1 Effect of oxytetracycline concentration on numbers of soil microorganisms

素的加入对不同土壤中微生物量影响的差异可能与土壤养分状况、土壤性质及土壤微生物种群大小的差异有关,有关这方面的机理,还有待进一步的研究。

2.2 对土壤微生物生物量碳的影响

表2为不同培养时间时不同浓度土霉素对土壤微生物生物量碳的影响。结果表明,所有处理在培养

5 d时微生物生物量碳有明显增加,但随着培养时间的延长,所有处理的微生物生物量碳又逐渐降低。至培养55 d时,微生物生物量碳达到最低水平,这一变化趋势与抗生素加入量无关,可能是由于培养初期进行了水分调节,土壤含水量比较适合微生物的生长,促进了微生物的生长,并在培养5 d时达到了较高的

值。但随着培养时间的延长,土壤中的有效养分被逐渐消耗,微生物生长受到养分胁迫,导致微生物生物量碳逐渐减少。

土霉素的加入对 3 种土壤微生物生物量碳的影响因土壤类型、土霉素加入量和培养时间不同有所差异(表 3)。在培养时间为 2 d 时,土霉素的加入对 3 种土壤微生物生物量碳均无明显的影响(与对照相比)。当培养时间为 5 d 时,土霉素的加入增加了菜地土壤的微生物生物量碳,但降低了果园土壤中的微生物生物量碳,对草地土壤微生物生物量碳影响不明显。草地和果园土壤中,土霉素对土壤微生物生物量碳产生抑制作用出现的时间和产生抑制时的土霉素浓度有一定的差异,前者出现在 30 d 时,后者出现在 5 d 时,这可能与它们之间土壤本身理化性质不同有关。随着培养时间的增加,土霉素对土壤的微生物生物量碳的影响逐渐消失。

2.3 对脲酶、中性磷酸酶活性的影响

表 3 和表 4 分别为不同土霉素加入量时土壤脲

表 2 土霉素对微生物量碳的影响($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)

Table 2 Effect of oxytetracycline pollution on soil micro-biomass carbon ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)

土壤	土霉素加入量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	培养时间/d			
		2	5	30	55
菜地	0	167ab	354b	177a	152a
	1	146b	363ab	176a	138ab
	2.5	188a	422a	167a	136ab
	10	194a	411a	174a	165a
	50	137b	419a	176a	144ab
	100	148b	361ab	169a	154a
	200	176a	369ab	164a	147a
草地	0	221ab	477ab	353a	192a
	1	207b	447b	347a	191a
	2.5	199b	520a	327ab	179a
	10	236a	551a	288ab	177a
	50	229a	543a	209b	161a
	100	214ab	490ab	230b	165a
	200	228a	481b	290b	182a
果园	0	210a	306a	133a	122a
	1	197a	245a	146a	124a
	2.5	189a	214ab	137a	118a
	10	193a	154b	132a	116a
	50	198a	100b	136a	122a
	100	190a	120b	127a	114a
	200	204a	102b	138a	126a

注:表中同一土壤相同时间处理微生物生物量碳平均后英文字母不同者表明二者显著差异($P < 0.05$),下同。

表 3 土霉素对土壤(S1)脲酶活性的影响($\text{mg NH}_3\text{-N} \cdot \text{g}^{-1} \text{土}$)

Table 3 Effect of oxytetracycline pollution on soil urease activity ($\text{mg NH}_3\text{-N} \cdot \text{g}^{-1} \text{soil}$)

土霉素加入量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	培养时间/d					
	2	5	10	20	30	50
0	0.68a	0.58a	0.46c	0.38c	0.40b	0.13a
1	0.68a	0.59a	0.50bc	0.44bc	0.45ab	0.13a
2.5	0.67a	0.56ab	0.58ab	0.41bc	0.47ab	0.14a
10	0.66a	0.53b	0.60a	0.42bc	0.45ab	0.13a
50	0.68a	0.55ab	0.50bc	0.47b	0.52a	0.12a
100	0.65a	0.52b	0.54abc	0.56a	0.47ab	0.13a
200	0.68a	0.54ab	0.60a	0.46b	0.53a	0.13a

酶和中性磷酸酶活性随时间的变化。土霉素对土壤脲酶活性的影响主要发生在培养时间为 5~30 d 时,在培养初期(2 d)和后期(50 d)影响不大。培养时间为 5 d 时,土霉素浓度 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上处理土壤的脲酶活性与对照相比有轻微的降低,说明当土霉素加入量超过 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上时对土壤脲酶活性产生了抑制;但培养 10 d 后,各土霉素浓度处理对脲酶活性的影响变得较为复杂,在高浓度时出现促进作用,并且随着培养时间的增加,出现促进作用时的土霉素加入量也有所增加。但至培养时间为 50 d 时,不同土霉素浓度处理土壤脲酶活性与对照相比无明显差异,这一方面可能与土霉素在土壤中的降解、且降解的抗生素可作为土壤微生物的碳源有关,另一方面,随着抗生素加入时间的延长,土壤微生物对土霉素产生了适应和抗性有关。Boleas 等的研究也表明,抗生素对土壤酶活性的影响随时间将逐渐减弱^[10]。

土壤中添加不同量的土霉素仅在培养时间为 10 d 时和土霉素添加量为 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时对中性磷酸酶活性有一定的促进作用(表 4),其他情况下与对照处理均无显著的差异。由于农田土壤中土霉素的残留量一

表 4 土霉素对土壤(S1)中性磷酸酶活性的影响($\text{mg 酚} \cdot \text{kg}^{-1} \text{土}$)

Table 4 Effect of oxytetracycline pollution on soil neutral phosphatase activity ($\text{mg phenol} \cdot \text{kg}^{-1} \text{soil}$)

土霉素加入量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	培养时间/d				
	2	5	10	30	50
0	0.66a	0.54a	0.64b	0.59a	0.50a
1	0.63a	0.63a	0.64b	0.61a	0.43a
2.5	0.62a	0.53a	0.69ab	0.59a	0.49a
10	0.62a	0.61a	0.65b	0.58a	0.49a
50	0.63a	0.64a	0.63b	0.69a	0.49a
100	0.65a	0.54a	0.74a	0.66a	0.44a
200	0.66a	0.62a	0.60b	0.66a	0.50a

一般在 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以下^[20],所以农田情况下土霉素污染一般不会对土壤中中性磷酸酶活性产生明显的影响。

3 结论

土霉素对土壤生物化学性质的影响可以两种方式进行:一是其作为碳源增加微生物的活性;二是通过抑制微生物活动影响土壤微生物的活性。由于两种影响在不同土壤中表现的程度不同,因此,土霉素的污染最终对土壤生物化学性质产生正影响还是负影响在不同土壤中有所差异。本研究的结果表明,土霉素污染对土壤细菌、放线菌数量和微生物总量均有一定的抑制作用,随土霉素污染程度的提高抑制作用也有所增强;但土霉素污染对真菌的作用较为复杂,一般是低浓度时有促进作用,高浓度时有抑制作用。低量土霉素污染对土壤脲酶和中性磷酸酶活性均无明显的影响,但高量的土霉素污染对土壤脲酶活性起抑制作用。而当土霉素浓度达到 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,对土壤中性磷酸酶活性有轻微的促进作用。土霉素污染对土壤生物化学性质的影响主要发生在土霉素进入土壤的初期,随着时间的延长,影响逐渐减弱和消失。总的来说,当土霉素污染程度较低时(残留浓度小于 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时),土霉素对土壤生物化学性质影响不明显。

参考文献:

- [1] 王 冉,刘铁铮,王 恬. 抗生素在环境中的转归及其生态毒性[J]. 生态学报, 2006, 26(1):265-270.
WANG Ran, LIU Tie-zheng, WANG Tian. The fate of antibiotics in environmental and its ecotoxicology: a review[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(1):265-270.
- [2] 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 Jia-long, LIU Jian-zhen, CHEN Zhang-liu, et al. Effects of enrofloxacin residue on number and community function diversity of soil microbes[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2005, 11(1):86-89.
- [3] Soren, Thiele-Bruhn, Iris-Constanze Beck. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass[J]. *Chemosphere*, 2005, 59(2):457-465.
- [4] Halling-Sorensen B, Nielsen S N, Lansky P F, et al. Occurrence, fate, and effects of pharmaceuticals in the environment—a review[J]. *Chemosphere*, 1998, 36(2):357-365.
- [5] Jemba P K. The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: a review[J]. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2002, 93(2):267-278.
- [6] Thiele-Bruhn S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils—a review [J]. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2003, 166(1):145-167.
- [7] Diaz-Cruz M S, Larclo D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2003, 22(6):340-350.
- [8] Jemba P K. The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: a review[J]. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2002, 93(2):267-278.
- [9] Vaclavik E, Halling-Sorensen B, Ingerslev F. Evaluation of manometric respiration tests to assess the effects of veterinary antibiotics in soil[J]. *Chemosphere*, 2004, 56(3):667-676.
- [10] Boles S, Alonso C, Pro J, et al. Toxicity of the antimicrobial oxytetracycline to soil organism in a multi-species-soil system and influence of manure co-addition[J]. *Journal of Hazard Materials*, 2005, 122(2):233-241.
- [11] Dijk P V, van de Voorde H. Sensitivity of environmental microorganism to antimicrobial agents[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 1976, 31(2):332-336.
- [12] 刁晓平,孙英健,孙振钧,等. 安普霉素对不同土壤中微生物活动的影响[J]. 生态与环境, 2004, 13(4):565-568.
DIAO Xiao-ping, SUN Ying-jian, SUN Zhen-jun, et al. Effects of apramycin on microbial activity in different types of soil[J]. *Ecology and Environment*, 2004, 13(4):565-568.
- [13] Thiele S, Beck I C. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass[J]. *Chemosphere*, 2005, 59(4):457-465.
- [14] 鲁如坤. 土壤农化分析方法[M]. 北京:中国农业出版社, 2000.
LU Ru-kun. Analytical methods on agro-chemical properties of soil[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2000.
- [15] 许光辉,郑洪元. 土壤微生物分析方法手册[M]. 北京:农业出版社, 1986:220-223.
XU Guang-hui, ZHENG Hong-yuan. Analysis manual of soil microbial[M]. Beijing: Agricultural Press, 1986:220-223.
- [16] 关松荫. 土壤酶及其研究方法[M]. 北京:农业出版社, 1987.
GUAN Song-yin. Soil enzyme and research methods[M]. Beijing: Agricultural Press, 1987.
- [17] Kong W D, Zhu Y G, Fu B J, et al. The veterinary antibiotic oxytetracycline and Cu influence functional diversity of the soil microbial community[J]. *Environmental Pollution*, 2006, 143(1):129-137.
- [18] 王丽平,章明奎,郑顺安. 土壤中恩诺沙星的吸附-解吸特性和生物学效应[J]. 土壤通报, 2008, 39(2):391-397.
WANG Li-ping, ZHANG Ming-kui, ZHENG Shun-an. Adsorption-desorption characteristics and biological effects of enrofloxacin in agricultural soils [J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2008, 39(2):391-397.
- [19] Thiele S. Microbial inhibition by pharmaceutical antibiotics in different soils—dose-effect relations determined with the iron (III) reduction test[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2005, 24(4):869-876.
- [20] 张慧敏,章明奎,顾国平. 浙江地区畜禽粪便和农田土壤中四环素类抗生素的残留[J]. 生态与农村环境学报, 2008, 24(3):69-73.
ZHANG Hui-min, ZHANG Ming-kui, GU Guo-ping. Residues of tetracyclines in livestock and poultry manures and agricultural soils from north Zhejiang Province[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2008, 24(3):69-73.