

兽药磺胺间甲氧嘧啶对土壤呼吸及酶活性的影响

金彩霞, 刘军军, 陈秋颖, 樊 静, 周庆祥, 潘 峰

(河南师范大学化学与环境科学学院 河南省环境污染控制重点实验室, 黄淮水环境与污染防治省部共建教育部重点实验室, 河南新乡 453007)

摘要:为评价兽药污染对土壤生态环境造成的潜在环境风险,采用室内培养的方法,研究了兽药抗生素磺胺间甲氧嘧啶对黄潮土土壤微生物呼吸及土壤酶活性的影响。结果表明,磺胺间甲氧嘧啶可显著影响土壤呼吸强度,抑制率和激活率分别可达72%和254%,药物对土壤酶活性的影响小于其对土壤呼吸强度的影响。在添加磺胺间甲氧嘧啶的前11 d,其对脲酶活性的影响主要以抑制作用为主;药物对蔗糖酶活性的影响较为明显,最大抑制和激活率可分别达到18%和30%;磺胺间甲氧嘧啶作用于过氧化氢酶和磷酸酶主要表现为激活效应,最大激活率分别为17%和25%。在试验浓度范围内,土壤微生物呼吸及酶活性的抑制率或激活率呈现一定的波动性。

关键词:磺胺间甲氧嘧啶; 土壤呼吸; 酶活性; 抑制; 激活

中图分类号:X592 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2010)02-0314-05

Effects of Sulfamonomethoxine on Soil Respiration and Enzyme Activity

JIN Cai-xia, LIU Jun-jun, CHEN Qiu-ying, FAN Jing, ZHOU Qing-xiang, PAN Feng

(College of Chemistry and Environmental Science, Henan Normal University, Henan Key Laboratory of Environmental Pollution Control, Key Laboratory for Yellow River and Huaihe River Water Environmental and Pollution Control Ministry of Education, Xinxiang 453007, China)

Abstract: The animal excrements containing veterinary drugs manured into field soils would result in agricultural soil pollution, and which drew an important potential threat on the human health and ecosystem. The effects of sulfamonomethoxine on soil respiration and enzyme activity were studied in the yellow moist soil by indoor cultivating to evaluate the potential toxicological effects of veterinary drugs. The results showed that soil respiration was influenced obviously under the stress of sulfamonomethoxine, the inhibition rate and activation rate reached 72% and 254%, respectively. The effect on enzyme activity by sulfamonomethoxine was much less than the soil respiration, which demonstrated the fact that soil respiration was much more sensitive under the stress of the drug. Sulfamonomethoxine had inhibition or activation effect on the activities of the tested soil enzymes. Urease activity was inhibited before the 11th day of the test time; Invertase activity was inhibited and stimulated significantly, the ratio reached 18% and 30%, respectively. While catalase activity and phosphatase activity in soil were mainly activated, the maximal activation rates reached 17% and 25%, respectively, under the stress of the drug; In addition, the activities of soil respiration and the four tested soil enzymes fluctuated with time.

Keywords: sulfamonomethoxine; soil respiration; enzyme activity; inhibition; activation

随着集约化、规模化养殖业的快速发展,各种兽药和饲料添加剂广泛使用,导致大量兽药随动物粪便排出体外,含有残留兽药的粪便作为有机肥施入农田造成土壤污染,并对土壤生态系统产生不良影响^[1-3]。

收稿日期:2009-06-25

基金项目:国家自然科学基金重点项目(20877022);河南省基础与前沿技术研究计划项目(092300410090);河南省基础与前沿技术研究计划项目(082300423202)

作者简介:金彩霞(1976—),女,黑龙江哈尔滨人,博士,副教授,主要从事土壤污染生态学方面的研究。

E-mail:heartjin0509@yahoo.com.cn

土壤生态系统中的各种微生物及酶对土壤中的碳、氮、磷等物质和能量的循环起着十分重要的作用。土壤微生物的呼吸作用反映土壤微生物的总活性,是评价化学物质对生态环境安全性的重要指标^[4-5];土壤酶的活性反映了土壤中进行的各种生物化学过程的强度和方向。土壤中的酶活性易受到环境中物理、化学和生物等因素的影响,在一定程度上可以灵敏地反映土壤环境状况,因此以土壤酶活性作为一项生态毒理学指标,被许多学者用来判断外来物质对土壤的污染程度以及可能对生态环境造成的影响^[6]。

目前有关农药及重金属污染对土壤呼吸及酶活性影响国内外已有较多报道^[7-11],而针对兽药污染开展的研究见于报道的很少。Boleas等研究发现,土壤中 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的四环素即可显著抑制土壤脱氢酶和磷酸酶的活性,与单施土霉素处理相比,土霉素与粪便混施处理的酶活性最先受到抑制,但随后毒性消失^[12]。

磺胺类药物是一种以对氨基苯磺酰胺为基本化学结构的合成抗菌药物,主要用于预防和治疗细菌性疾病,是国家允许使用的广谱抗菌药物,是我国生产量和使用量最大的兽药之一。已有研究表明,磺胺药物不能被动物全部吸收,其中50%~90%以原药及其代谢物的形式经由动物粪尿排入环境^[13]。Burkhardt等检测到新鲜猪粪中磺胺药物可高达 $20\sim40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,每 667 m^2 农田每年将有高达几百克的磺胺药物被施入^[14]。本试验选择磺胺间甲氧嘧啶作为供试药物,通过研究该药物对土壤微生物呼吸及土壤酶活性的影响,了解其对土壤生态系统的生态毒理效应,以便为药物的环境安全性评价提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试土壤

供试土壤采自河南师范大学校内生物实验田0~20 cm表土,属于清洁土壤,风干研磨,过1 mm筛后备用。其理化性质见表1。

表1 供试土壤理化性质

Table 1 The physical-chemical properties of test soil

干容重/ $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	pH	有机质	CEC/ $\text{cmol}\cdot\text{kg}^{-1}$	T-P/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	T-K/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	K-N/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
1.41	8.31	2.01%	12.26	0.04	0.18	0.09

注:CEC为阳离子交换量;T-P为总磷;T-K为总钾;K-N为凯氏氮。

1.1.2 供试药品

磺胺间甲氧嘧啶原药(纯度 $\geqslant 92\%$),购自北京博亚华牧业科技有限公司。

1.2 试验设计

1.2.1 土壤呼吸强度

称取50 g供试土样于100 mL烧杯中,加入1 g葡萄糖,混匀,加水10 mL,搅拌均匀,置于密闭容器中,在25 °C的培养箱中预培养7 d,然后加入磺胺间甲氧嘧啶,使其在土壤中的浓度分别为0、0.1、1.0、10、50、100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,3次重复,并将土壤含水量调节至田间最大持水量的60%。分别于培养后第1、3、6、

10、15、21、27 d测定其呼吸强度。

1.2.2 土壤酶活性

取风干土样若干份,每份100 g,加20 mL水,于25 °C下预培养一星期后,加入不同浓度的磺胺间甲氧嘧啶,使其在土样中的浓度分别为0、0.1、0.5、1.0、10、100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,于25 °C下培养,定期加水以保持土壤含水量为田间最大持水量的60%。分别于第1、4、7、11、15、21 d取样测定脲酶、蔗糖酶、过氧化氢酶和磷酸酶的酶活性。每个处理重复3次。

1.3 测定方法

土壤呼吸强度采用直接吸收法滴定测定^[5],土壤酶活性测定方法参见关松荫等方法^[15]。脲酶、蔗糖酶、过氧化氢酶和磷酸酶活性测定方法分别是:靛酚蓝比色法、3,5-二硝基水杨酸比色法、高锰酸钾滴定法和磷酸苯二钠比色法。

本试验土壤呼吸和酶活性的抑制率计算公式为:

$$\text{抑制率} = [(A - B)/A] \times 100\%$$

式中:A为不加兽药土壤呼吸或酶活性,B为加兽药土壤呼吸或酶活性;正值表示抑制率,负值表示激活率。

2 结果与讨论

2.1 磺胺间甲氧嘧啶对土壤微生物呼吸的影响

磺胺间甲氧嘧啶对土壤呼吸作用的影响见图1。施药后的前3 d,除0.1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 外,其余各处理均显著抑制土壤微生物呼吸($P < 0.05$),且浓度越大对其抑制作用越大。在3 d内,随时间增长,各处理对土壤呼吸强度的抑制效应愈明显。当土壤中药物浓度为100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,在第1 d和第3 d对土壤呼吸作用的抑制率分别为32%和72%;由图1可见,在加药后的第4~15 d,各处理均表现出激活效应,最大激活率高达254%;而第21 d之后,各处理的土壤呼吸强度与对照组趋于一致,且差异不明显($P > 0.05$),呈微弱的抑制或激活效应。在试验浓度及时间内,磺胺间甲氧嘧啶对土壤呼吸作用的影响呈现“抑制-激活-恢复”的规律,且在此过程中,低浓度(0.1、1.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)恢复较快,高浓度(50、100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)恢复较慢,说明高浓度对土壤呼吸作用的影响更为持久。

大部分兽药都有其作用的标靶微生物^[3]。磺胺间甲氧嘧啶在加入到土壤的初期(前3 d)即对土壤呼吸强度产生明显的抑制作用,可能是因为药物对其标靶微生物的抑制,而随着时间的增长,药物对土壤呼吸强度又表现出强烈的激活效应,可能的原因有二:一是

由于药物的作用目标是针对一定的“靶微生物”^[5],当这些靶微生物活性受到抑制,土壤中其他微生物种群便获得大量的碳源等营养物质,从而使其活性增强;另一方面,药物本身可作为一种碳源促进微生物的分解,或其本身的降解也能释放二氧化碳。随着时间推移,药物的降解及土壤微生物耐受性增加,使得土壤呼吸逐渐恢复正常。

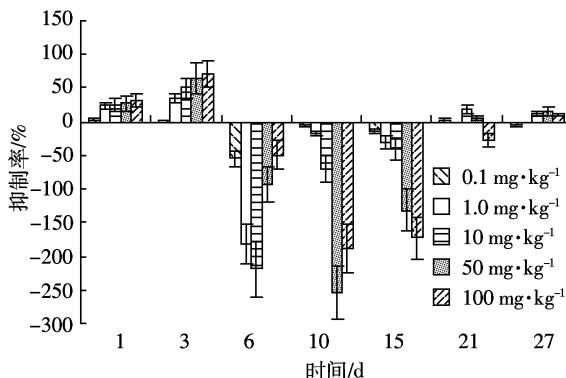


图1 磺胺间甲氧嘧啶对土壤呼吸作用的影响

Figure 1 Effects of Sulfamonomethoxine (SMM) on soil respiration

2.2 磺胺间甲氧嘧啶对脲酶活性的影响

脲酶是氮素循环的一种关键性酶,可以促进土壤尿素分子中酰胺氮键的水解,生成的氨是植物氮素营养来源之一,在氮肥利用和土壤氮素代谢方面有重要的意义^[16]。由图2可以看出,在添加药物后的第1 d,各处理的脲酶活性均受到不同程度的抑制。当土壤中磺胺间甲氧嘧啶浓度为100 mg·kg⁻¹时,与空白相比其酶活性降低了21%,显著抑制脲酶活性($P<0.05$);在添加药物后的第7 d,除最高浓度(100 mg·kg⁻¹)外,其余各处理对酶活性抑制率均达到最大值,最大抑制率为22%;随着处理时间的继续延长,至第15 d之后各处理的脲酶活性逐渐恢复至对照水平,大都表现为微弱的激活效应。

磺胺类药物的基本化学结构和细菌“生长物质”对氨基甲酸很相似,它可与对氨基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。而土壤中的脲酶主要来源于植物根系及土壤中的细菌和真菌^[15],因此,磺胺间甲氧嘧啶可能是通过抑制土壤中细菌的生长与繁殖,从而对脲酶活性产生抑制作用。另外,刘惠君等研究了酰胺类除草剂与脲酶的相互作用机制,发现除草剂与脲酶之间有结合作用,二者之间可形成结合位点,并且溶解度越大,结合作用越强^[17]。所以,药物也可能

进入脲酶分子结构中并形成结合位点而发生作用,从而抑制其活性。

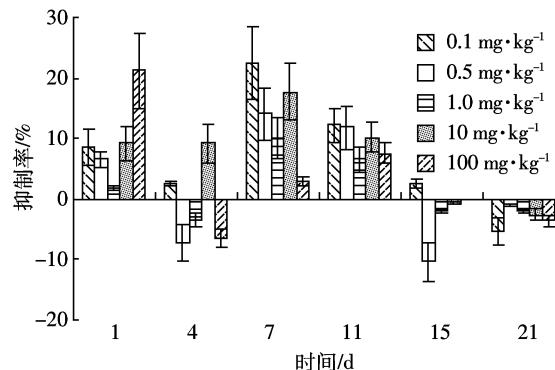


图2 磺胺间甲氧嘧啶对脲酶活性的影响

Figure 2 Effects of SMM on urease activity in soil

2.3 磺胺间甲氧嘧啶对蔗糖酶活性的影响

由图3可以看出,施加磺胺间甲氧嘧啶后的第1 d,由于药物与土壤微生物的作用时间较短,土壤蔗糖酶活性与对照相比变化不明显,呈现为微弱的抑制或激活效应;在施药后的第4 d,各处理对蔗糖酶的活性均表现出不同程度的激活效应,浓度最高的100 mg·kg⁻¹激活率最大,达到30%;而在第7 d至第11 d,药物对蔗糖酶活性主要表现为抑制作用,这可能是由于磺胺间甲氧嘧啶被土壤微生物的降解产物抑制其酶促反应所致;在第15 d至第21 d,各处理的蔗糖酶活性有一定的恢复,主要表现为微弱的激活效应。从总体上看,在试验浓度内,磺胺间甲氧嘧啶对土壤蔗糖酶活性的影响表现出“激活-抑制-激活”的规律。

药物对土壤酶活性的影响较复杂,主要原因有以下3方面^[18]:

(1)药物与酶分子作用产生的直接效应,包括抑制、激活或无关。

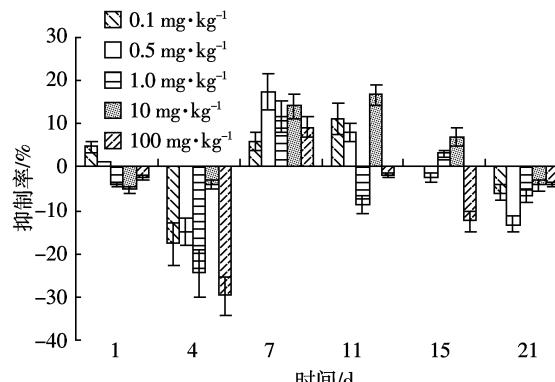


图3 磺胺间甲氧嘧啶对蔗糖酶活性的影响

Figure 3 Effects of SMM on invertase activity in soil

(2)药物的加入导致细胞壁渗透性显著增强或使细胞分解,从而释放出胞内酶表现出酶活性增强^[19]。

(3)由于药物和酶分子在土壤无机矿物或有机质外表面甚至内表面产生竞争性吸附,而部分酶分子解吸附成为游离态酶,因而表现出更高的活性^[20]。

已有研究表明,重金属对转化酶活性的抑制作用主要是由于其能与酶活性部位中的巯基和咪唑的配位体等结合并形成稳定的化学键,从而与底物产生非竞争性抑制作用^[21]。有关磺胺间甲氧嘧啶对土壤蔗糖酶活性的影响机制,有待于进一步研究。

2.4 磺胺间甲氧嘧啶对过氧化氢酶活性的影响

从图4可以看出,添加0.1~100 mg·kg⁻¹磺胺间甲氧嘧啶处理后的第1 d,均在不同程度上表现出对过氧化氢酶的激活作用,激活率在9.6%~16.7%。随着时间的推移,在第4 d至第7 d,过氧化氢酶活性逐渐恢复,表现出微弱的抑制或激活效应;在第11 d至第21 d,各处理对过氧化氢酶活性的影响又表现出一定的激活作用。

过氧化氢酶被看作是好氧微生物的指示物,并且过氧化氢酶活性与好氧微生物的数量、土壤肥力有着密切的联系^[22]。在试验浓度范围内,磺胺间甲氧嘧啶对土壤中过氧化氢酶活性主要表现出激活效应。这可能是在药物加入的初期,由于土壤中存在大量营养物质(如碳源等),部分好氧微生物的增殖,使得过氧化氢酶活性得以激活;另一方面,当药物进入土壤后,微生物为减少其对自身的毒害需要通过氧化代谢作用将其分解,而为了保护自身不受氧化剂——过氧化氢的危害则必须产生过氧化氢酶以分解残留于体内的过氧化氢。因此,微生物在受到污染物干扰的初期会产生一定的过氧化氢酶激活效应^[23]。

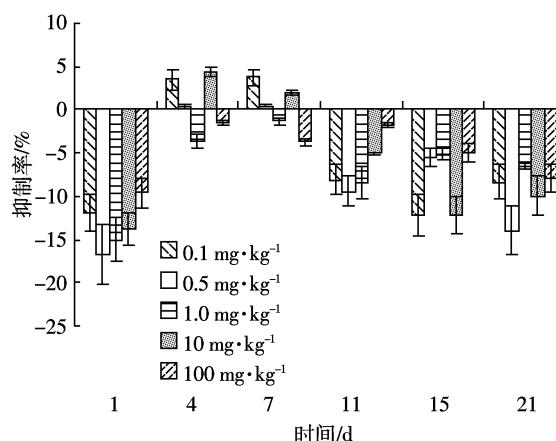


图4 磺胺间甲氧嘧啶对过氧化氢酶活性的影响

Figure 4 Effects of SMM on catalase activity in soil

2.5 磺胺间甲氧嘧啶对磷酸酶活性的影响

磺胺间甲氧嘧啶对土壤磷酸酶活性的影响见图5。在施药后的第1 d,各处理对磷酸酶活性都表现出激活效应,其中浓度最大的100 mg·kg⁻¹激活率最大,达到25%;至第7 d,各处理对磷酸酶活性激活效应均比较显著,激活率在15%~25%之间;第11 d之后,磷酸酶活性逐渐恢复,至第21 d,各处理的磷酸酶活性恢复至对照水平。从整体上看,在试验浓度范围内,磺胺间甲氧嘧啶对土壤磷酸酶活性主要表现为激活作用。这与宫璇等的研究结果一致^[6],他们在研究菲对磷酸酶活性的影响时,发现土壤中添加菲后的第1 d,各处理的磷酸酶活性均有相应的增加,随时间的推移,激活作用逐渐消失,至第14 d,各处理的磷酸酶活性与对照之间差异不显著。

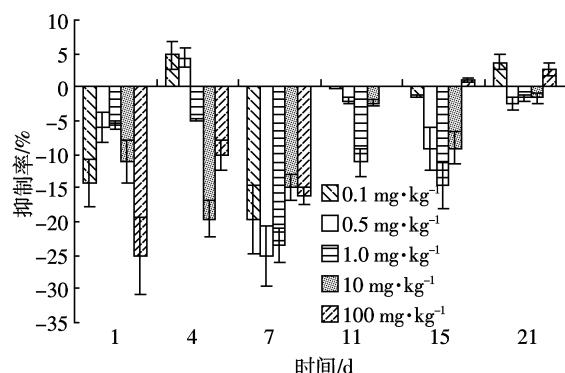


图5 磺胺间甲氧嘧啶对磷酸酶活性的影响

Figure 5 Effects of SMM on phosphatase activity in soil

3 结论

通过研究在设定不同浓度条件下兽药磺胺间甲氧嘧啶对土壤微生物呼吸强度、脲酶、蔗糖酶、过氧化氢酶及磷酸酶活性5个指标的影响,得到以下结论:

(1)磺胺间甲氧嘧啶对土壤呼吸作用的影响远大于其对土壤酶活性的影响,在试验浓度范围内,药物对土壤微生物呼吸的最大抑制和激活率分别为72%和254%,而对4种酶活性的抑制或激活率都在30%以下,这说明土壤微生物呼吸在该药物胁迫下反应更为敏感。

(2)土壤中添加磺胺间甲氧嘧啶对土壤呼吸强度及土壤酶活性的影响效果及作用规律不同。磺胺间甲氧嘧啶对土壤呼吸强度的影响表现为先抑制后激活的规律;对脲酶活性的影响在第11 d之前主要表现为抑制作用,而对磷酸酶活性则主要为激活作用;药物对蔗糖酶活性的影响表现为“激活-抑制-激活”的

规律;对过氧化氢酶活性的影响表现为“激活—恢复—激活”的规律。

(3)在试验的后期(第 21 d),除过氧化氢酶活性外,土壤微生物呼吸强度、脲酶、蔗糖酶及磷酸酶活性与对照相比均有不同程度的恢复。

参考文献:

- [1] Nicole Kemper. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment[J]. *Ecological Indicators*, 2008, 8(1):1–13.
- [2] Luciana Migliore, Salvatore Cozzolino, Maurizio Fiori. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants[J]. *Chemosphere*, 2003, 52(7):1233–1244.
- [3] 孔维栋,朱永官.抗生素类兽药对植物和土壤微生物的生态毒理学效应研究进展[J].生态毒理学报,2007,2(1):1–9.
KONG Wei-dong, ZHU Yong-guan. A review on ecotoxicology of veterinary pharmaceuticals to plants and soil microbes[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2007, 2(1):1–9.
- [4] Wardle D A, Parkinson D. Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity[J]. *Plant and Soil*, 1990, 122:21–28.
- [5] 刁晓平,孙英健,孙振钧,等.3种兽药对土壤微生物呼吸的影响[J].中国农业大学学报,2006,11(2):39–43.
DIAO Xiao-ping, SUN Ying-jian, SUN Zhen-jun, et al. Effects of three kinds of veterinary drugs on microbe respiration in different soils [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2006, 11(2):39–43.
- [6] 宫璇,李培军,张海荣,等.菲对土壤酶活性的影响[J].农业环境科学学报,2004,23(5):981–984.
GONG Xuan, LI Pei-jun, ZHANG Hai-rong, et al. Effects of phenanthrene contamination on enzyme activity in soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2004, 23(5):981–984.
- [7] Sannino F, Gianfreda L. Pesticide influence on soil enzymatic activities [J]. *Chemosphere*, 2001, 45(7):417–425.
- [8] 于寿娜,廖敏,黄昌勇.镉、汞复合污染对土壤脲酶和酸性磷酸酶活性的影响[J].应用生态学报,2008,19(8):1841–1847.
YU Shou-na, LIAO Min, HUANG Chang-yong. Effects of cadmium and mercury combined pollution on soil urease and acid phosphatase activities[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2008, 19(8):1841–1847.
- [9] 杨志新,刘树庆.重金属 Cd/Zn/Pb 复合污染对土壤酶活性的影响[J].环境科学学报,2001,21(1):60–63.
YANG Zhi-xin, LIU Shu-qing. Effect of compound pollution of heavy metals on soil enzymic activities[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2001, 21(1):60–63.
- [10] 谢显传,张少华,王冬生,等.阿维菌素对蔬菜地土壤微生物及土壤酶的生态毒理效应[J].土壤学报,2007,44(4):740–743.
XIE Xian-chuan, ZHANG Shao-hua, WANG Dong-sheng. Eco-toxicological effects of abamectin on vegetable-growing soil [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2007, 44(4):740–743.
- [11] 向颖,袁星,樊宏娜.五种农药对土壤转化酶活性的影响[J].中
国环境科学,2004,24(5):588–591.
YAN Ying, YUAN Xing, FAN Hong-na. Influence of five pesticides on invertase activity in soil[J]. *China Environmental Science*, 2004, 24(5):588–591.
- [12] Sara Boleas, Carmen Alonso, Javier Pro, et al. Toxicity of the antimicrobial oxytetracycline to soil organisms in a multi-species-soil system (MS·S) and influence of manure co-addition[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2005, 122:233–241.
- [13] Haller M Y, Muller R S, Mcardell C S, et al. Quantification of veterinary antibiotics (sulfonamides and trimethoprim) in animal manure by liquid chromatography–mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2002, 952:111–120.
- [14] Burkhardt M, Stoob K, Stamm C, et al. Veterinary antibiotics in animal slurries—A new environmental issue in grassland research[J]. *Grassl Sci Eur*, 2004, 9:322–324.
- [15] 关松荫.土壤酶及其研究法[M].北京:农业出版社,1986.
- [16] 李永红,高玉葆.土壤中单嘧磺隆对谷子生长及土壤微生物若干生化功能的影响[J].农业环境科学学报,2004,23(4):633–637.
LI Yong-hong, GAO Yu-bao. Effects of monosulfuron on growth of millet and soil microbial function[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2004, 23(4):633–637.
- [17] 刘惠君,刘维屏.酰胺类除草剂与脲酶的相互作用机制研究 [J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2004,30(2):210–214.
LIU Hui-jun, LIU Wei-ping. The reaction mechanism of acetanilide herbicides with urease[J]. *Journal of Zhejiang University(Agric & Life Sci)*, 2004, 30(2):210–214.
- [18] 杨春璐,孙铁珩,和文祥.汞和两种农药复合污染对土壤转化酶活性的影响[J].中国环境科学,2006,26(4):486–490.
YANG Chun-lu, SUN Tie-heng, HE Wen-xiang. Influence of joint pollution of mercury and two kinds of pesticides on invertase activity in soils[J]. *China Environmental Science*, 2006, 26(4):486–490.
- [19] Gianfreda L, Sannino F, Ortega N, et al. Activity of free and immobilized urease in soil: effects of pesticides[J]. *Soil Bio & Biochem*, 1994, 26(6):777–784.
- [20] Gianfreda L, Sannino F, Violante A. Pesticides effects on the activity of free, immobilized and soil inverse[J]. *Soil Bio & Biochem*, 1995, 27(9):1201–1208.
- [21] 周礼恺,张志明,曹承锦,等.土壤的重金属污染与土壤酶活性[J].环境科学学报,1985,5(2):176–183.
- [22] Margesin R, Walder G, Schinner F. The impact of hydrocarbon remediation (diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbons) on enzyme activities and microbial properties of soil [J]. *Acta Biotechnol*, 2000, 20:313–333.
- [23] 刘莉莉,林匡飞,苏爱华,等.四溴双酚 A 对土壤酶活性的影响[J].环境污染与防治,2008,30(6):13–16.
LIU Li-li, LIN Kuang-fei, SU Ai-hua, et al. Effects of tetrabromo-bisphenol A on soil enzyme activities[J]. *Environmental Pollution and Control*, 2008, 30(6):13–16.