

4 种典型抗生素对土壤微生物呼吸的影响

王金花, 朱鲁生*, 王 军, 谢 慧

(山东农业大学资源与环境学院, 山东 泰安 271018)

摘 要:本研究通过室内直接吸收法测定了四环素、金霉素、诺氟沙星和恩诺沙星 4 种典型抗生素对土壤微生物呼吸作用的影响。结果表明, 4 种抗生素对土壤微生物呼吸的影响存在一定差异。四环素在整个处理过程中对土壤呼吸的影响以抑制作用为主; 金霉素在处理第 1 d 和 7 d 均有激活作用, 而且激活率最高可达到 51.23%, 但是在其他处理时间以抑制作用为主; 诺氟沙星在整个处理过程中, 浓度为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 对土壤微生物呼吸都有一定的抑制作用, 浓度为 $5, 25, 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 处理均为激活作用, 激活作用随着处理浓度的增加而升高。恩诺沙星在整个处理过程中, 所有处理对呼吸的影响变化趋势为先激活后抑制。总体来说, 到处理第 15 d, 所有抗生素处理的微生物呼吸作用基本恢复到对照水平, 说明在本试验浓度处理下, 微生物对这 4 种抗生素能够产生一定的适应性。

关键词:四环素; 金霉素; 诺氟沙星; 恩诺沙星; 土壤; 微生物呼吸

中图分类号:X53 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2011)11-2232-05

Effects of Four Typical Antibiotics on Soil Microbial Respiration

WANG Jin-hua, ZHU Lu-sheng*, WANG Jun, XIE Hui

(College of Resources and Environment, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

Abstract: The effects of tetracycline, chlortetracycline, norfloxacin and enrofloxacin on soil microbial respiration were studied using the direct absorption method. The results showed that the effects of these four antibiotics on microbial respiration varied with each other. The soil microbial respiration was mainly inhibited in the tetracycline treatments during the whole incubation. The respiration was improved by chlortetracycline at 1st and 7th and the highest rate was 51.23%, while the respiration was reduced during the other incubation time. The respiration was reduced by norfloxacin ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) and improved by norfloxacin ($5, 25, 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) during the whole incubation. In addition, the respiration was improved during the early incubation, while the respiration was reduced with the incubation progressed in the enrofloxacin treatments. There was no significant difference of respiration between the treatments and control at 15th, which suggested that the four antibiotics caused a little risk to soil microbial environment.

Keywords: tetracycline; chlortetracycline; norfloxacin; enrofloxacin; soil; microbial respiration

抗生素(Antibiotics)是 20 世纪最伟大的发明之一,它是治疗感染性疾病的有力武器,使严重威胁人类健康的感染性疾病得到了很好的控制。抗生素除了用于预防和治疗人类疾病外,在畜牧业和水产养殖业中发挥着重要的作用,大量用于动物疾病的治疗,尤其可以作为生长促进剂加快牲畜及水产品的生长^[1]。研究表明,抗生素摄入后除少部分残留在生物体内,大部分以原药和代谢产物的形式经由动物的粪尿

排出体外,通过各种途径进入到环境中^[2-3]。因此,抗生素对环境介质和生态系统必定会产生广泛而深远的影响,并最终可能对人类的健康和生存造成不利的影响^[4-5]。

进入到环境中的抗生素能够通过各种途径进入土壤环境,特别是规模化养殖场动物粪肥广泛作为有机肥料施用于农业生产,可造成土壤抗生素残留污染。因此一些学者对抗生素在土壤环境中的吸附、迁移、降解和残留等情况进行了研究^[6-9]。研究表明,土壤环境中抗生素的残留水平差异较大,一般在 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 等级和 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 等级^[10-11]。以四环素为例,在土壤中残留的水平大约为 $44.1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \sim 32.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[12-14]。

收稿日期:2011-05-14

基金项目:国家自然科学基金(40801203, 41071164, 41001152)

作者简介:王金花(1978—),女,副教授,主要研究方向为环境毒理与污染修复。

* 通讯作者:朱鲁生 E-mail:lshzhu@sdaa.edu.cn

这些残存于土壤中的抗生素不可避免地与土壤生物接触,对土壤中的生物特别是微生物产生影响^[15-17]。王加龙等^[15]研究了喹诺酮类抗生素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,结果表明恩诺沙星能够降低微生物种群数量,高浓度恩诺沙星能够降低微生物群落功能多样性。刘峰等^[17]报道较高浓度的磺胺类抗生素甲氧苄啶短期内对水稻土微生物呼吸作用有显著抑制作用。

土壤呼吸作用反映了土壤微生物的总活性,可以用来作为监测土壤生态环境变化的重要指标,但关于抗生素类药物对土壤呼吸的研究报道很少^[17]。本研究选用4种最常使用的抗生素:2种四环素类(四环素和金霉素)和2种喹诺酮类(诺氟沙星和恩诺沙星)作为研究对象,开展这4种抗生素对土壤微生物呼吸的影响研究,以期为抗生素的环境风险评价提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 土壤

供试土壤采于山东农业大学实习农场,除去地面植被和枯枝落叶,用铁铲除去表面1 cm左右的表土,采样深度约为2~20 cm,剔除石砾和植物残根等杂物,过20目筛,风干后装袋备用。土壤理化性质:土壤类型为棕壤,pH值7.2,有机质17.3 g·kg⁻¹,速效钾124.7 mg·kg⁻¹,有效磷130.3 mg·kg⁻¹,速效磷17.633 mg·kg⁻¹。

1.1.2 药品与试剂

四环素(纯度98%)、金霉素(纯度为98%)、诺氟沙星(纯度98%)、恩诺沙星(纯度98%),其他药品试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

采用直接吸收法(密闭法)测定土壤微生物呼吸。具体试验步骤:称50 g供试土壤于100 mL的高型烧杯中,向土壤中添加抗生素,使4种抗生素(四环素、金霉素、诺氟沙星和恩诺沙星)在土壤中的浓度均为0(对照)、0.2、1、5、25、50 mg·kg⁻¹共6个处理,以上各处理均设3个重复。加水调节土壤含水量达最大含水量的60%,放于2.5 L可密闭容器(广口玻璃瓶)中。同时将盛放有35 mL的0.1 mol·L⁻¹氢氧化钠的100 mL的高型烧杯放入密闭容器底部,盖严广口玻璃瓶盖。放入人工气候培养箱,温度为25℃培养。在培养后的1、2、4、7、11、15 d,取出盛氢氧化钠的高型烧杯,加1 mL的1 mol·L⁻¹氯化钡溶液,加入2~3滴酚

酞做指示剂,用0.05 mol·L⁻¹盐酸滴定,记录消耗的盐酸量,同时换盛有新鲜氢氧化钠的高型烧杯。

1.3 数据分析

根据空白与处理的滴定盐酸之差,计算二氧化碳释放量。计算结果转化为每克干土释放二氧化碳的毫克量。各处理与对照比较得出影响率的计算公式:

$$R\%=(P_t-P_0)/P_0\times 100\%$$

式中: R 为影响率,%;正值表明激活,负值表明抑制;

P_t 为处理组CO₂释放量,mg·g⁻¹;

P_0 为对照组CO₂释放量,mg·g⁻¹。

数据处理方法采用Excel 2003和SPSS 16.0软件进行。

2 结果与讨论

2.1 四环素类抗生素对土壤微生物呼吸的影响

2.1.1 四环素对土壤微生物呼吸的影响

四环素对土壤微生物呼吸的影响结果见图1。从图1中可以看出,处理第1 d,所有浓度四环素对呼吸作用的影响均为抑制,而且抑制率随着处理浓度的升高而升高,最大值为29.41%(50 mg·kg⁻¹)。处理第2 d,影响仍为抑制,但是抑制程度减轻。处理第4 d,所有处理均变为激活,最高激活率为38.46%(50 mg·kg⁻¹);统计分析结果发现,除了0.2 mg·kg⁻¹处理外,其他浓度处理土壤的微生物呼吸与对照相比都有显著差异($P<0.05$)。处理第7 d和11 d,所有处理浓度又转变为抑制作用,但是抑制率不高,最高抑制率值为19.80%。处理第15 d,所有处理的影响率值很低,不超过10.00%,与对照相比没有明显变化($P>0.05$),说明土壤微生物呼吸基本恢复至对照水平。

2.1.2 金霉素对土壤微生物呼吸的影响

金霉素对土壤微生物呼吸的影响结果见图2。从图2中可以看出,处理第1 d,所有浓度金霉素对呼吸作用的影响均为激活,而且激活率随着处理浓度升高而升高,最高激活率为35.41%(50 mg·kg⁻¹)。处理第2 d和4 d,影响均变为抑制,处理第4 d的影响率值整体低于第2 d。在处理第7 d,所有处理影响率明显升高,最高值达到51.23%;所有浓度处理与对照相比差异显著($P<0.05$)。处理第11 d,所有浓度处理的影响又变为抑制,抑制率随着浓度的升高而升高,最高抑制率为28.36%。处理第15 d,所有处理的影响变为激活作用,但是激活率很低,与对照相比差异不明显($P>0.05$)。

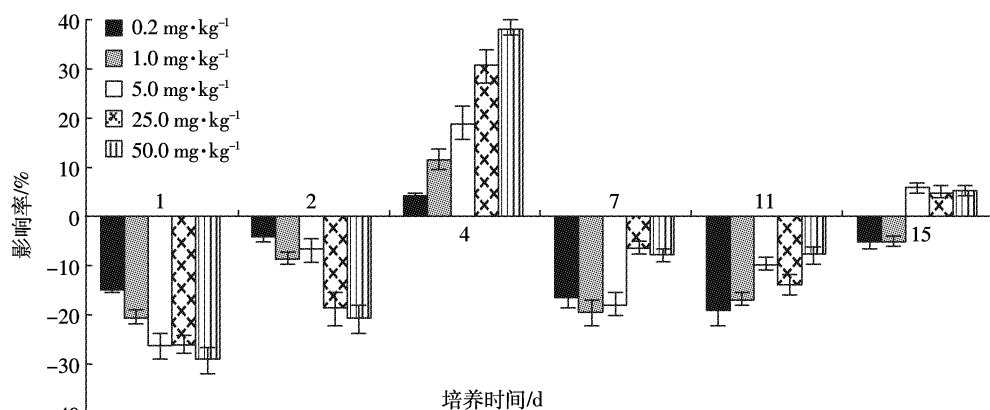


图1 四环素对土壤微生物呼吸的影响

Figure 1 Effects of tetracycline on soil microbial respiration

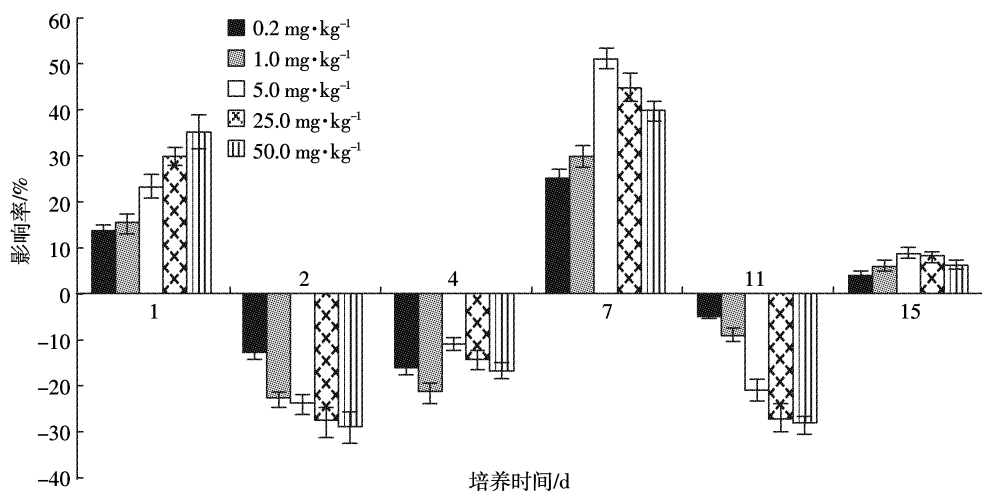


图2 金霉素对土壤微生物呼吸的影响

Figure 2 Effects of chlortetracycline on soil microbial respiration

2.2 喹诺酮类抗生素对土壤微生物呼吸的影响

2.2.1 诺氟沙星对土壤微生物呼吸的影响

诺氟沙星对土壤微生物呼吸的影响结果见图3。从图3中可以看出,整个处理过程中(1~15 d),低浓度诺氟沙星 0.2 、 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 对土壤微生物呼吸都有一定的抑制作用,但是抑制作用比较低,与对照相比差异不显著($P>0.05$)。但是,浓度为 5 、 25 、 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 处理均为激活作用,激活作用随着处理浓度的增加而升高;在处理第7 d,激活作用达到最高,最高值为 54.54% ;随着培养时间的延长,激活作用减弱,到处理第15 d,激活率均低于 20.00% 。

2.2.2 恩诺沙星对土壤微生物呼吸的影响

恩诺沙星对土壤微生物呼吸的影响结果见图4。从图4中可以看出,处理第1、2、4 d,所有处理浓度的影响均为激活作用;随着处理时间的延长,激活作用

增强,最高激活率出现在处理第4 d,激活率为 47.93% ,而且所有浓度处理与对照相比差异显著($P<0.05$)。处理第7 d和11 d,恩诺沙星对呼吸的影响变为抑制作用,最高抑制率为 25.54% 。处理第15 d,所有处理的影响不明显($P>0.05$),微生物呼吸作用基本恢复到对照水平。

本研究所选用的4种抗生素对土壤微生物呼吸的影响存在明显差异,即使是同一类型的抗生素,如同为四环素类抗生素的四环素和金霉素,以及同为喹诺酮类抗生素的诺氟沙星和恩诺沙星对土壤呼吸的影响均存在差异。总体来说,在整个处理过程中(1~15 d),4种抗生素对土壤微生物呼吸作用有明显影响,但是这些影响表现出非持久性,到处理第15 d,所有处理的微生物呼吸作用基本恢复到对照水平,与对照没有显著差异($P>0.05$)。土壤环境非常复杂,其中

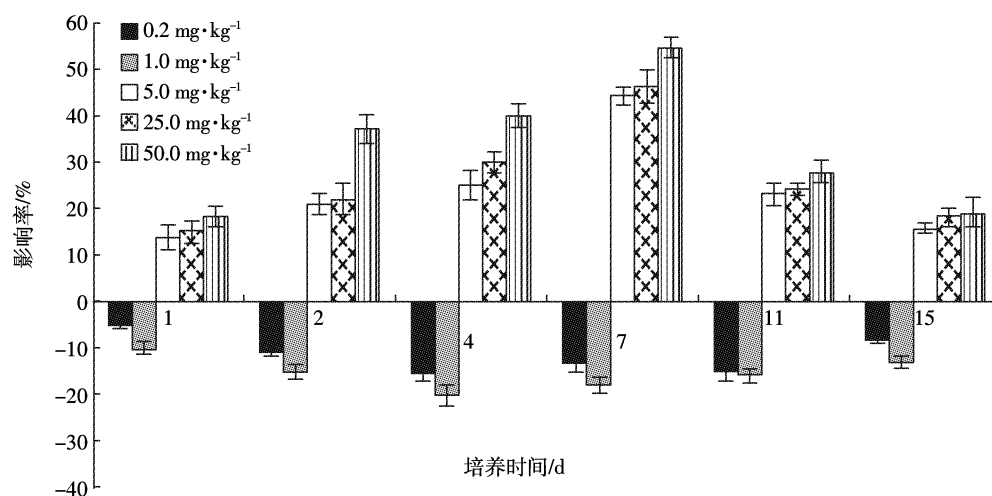


图3 诺氟沙星对土壤微生物呼吸的影响

Figure 3 Effects of norfloxacin on soil microbial respiration

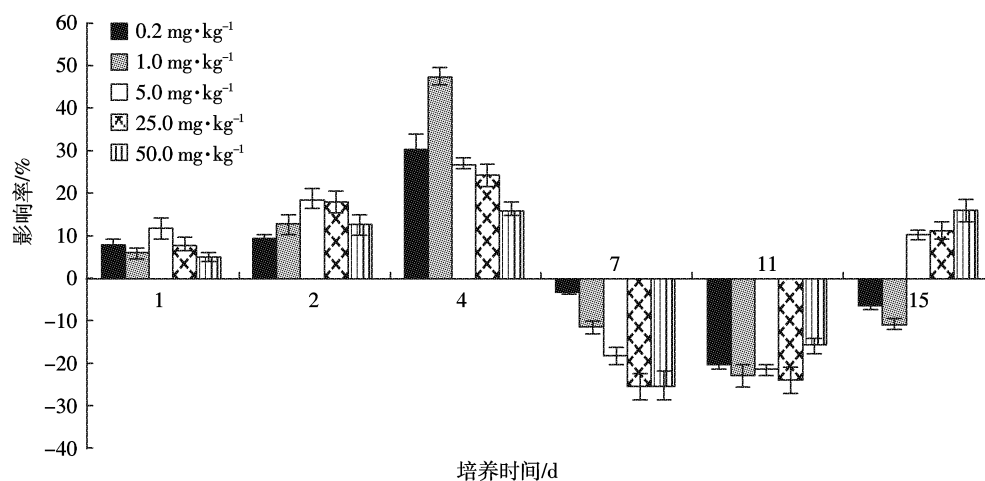


图4 恩诺沙星对土壤微生物呼吸的影响

Figure 4 Effects of enrofloxacin on soil microbial respiration

的各种理化因子如土壤含水量、温度、pH、有机质含量以及土壤微生物均可能促使抗生素降解；因此，推断本研究的上述结果可能是，到处理后期，抗生素浓度降解至低于影响土壤呼吸的阈值水平，对土壤呼吸不能产生明显影响^[15]。也有研究报道可能是土壤微生物对抗生素逐渐产生了耐受性，一些耐受微生物种群占据了主导，土壤微生物耐受性不断增加，从而使土壤的呼吸逐渐恢复正常^[17]。

四环素在整个处理过程中对土壤呼吸的影响以抑制作用为主；金霉素在处理第1 d和7 d均为激活作用，但是在其他处理时间以抑制作用为主；诺氟沙星在整个处理过程中，低浓度(0.2、1 mg·kg⁻¹)为抑制作用，其他浓度处理为激活作用。恩诺沙星在整个处理过程中，所有处理对呼吸的影响变化趋势为先激活

后抑制。综上所述，4种抗生素对土壤呼吸虽然不同时间段的影响规律不一致，但是都显示出激活或抑制作用。研究表明，抗生素对土壤微生物呼吸的抑制作用，可能是使用抗生素后杀死了某些微生物，从而出现呼吸抑制效应^[15]。抗生素作为有机物含有丰富的碳源等营养物质，因此可以推测抗生素对土壤微生物呼吸的激活作用，可能因为抗生素被某些微生物利用作为自身生长的碳源，促进微生物的生长，对微生物呼吸起到促进作用^[16,18]；也有研究报道认为，抗生素促进土壤呼吸可能是其“非靶标微生物”耐受性和活性增强所致^[17]。要明确抗生素对土壤微生物的影响机理，需要通过生理生化测定方法和分子生物学手段来分析测定更多的指标来综合评价，因此需要更加系统和深入地研究探讨。

3 结论

本研究所选用的4种抗生素四环素、金霉素、诺氟沙星及恩诺沙星对土壤微生物呼吸作用的影响效果和作用规律存在差异。四环素对土壤呼吸的影响以抑制作用为主;金霉素在处理第1 d和7 d均有激活作用,但是在其他处理时间以抑制作用为主;诺氟沙星低浓度表现为抑制作用,高浓度表现为激活作用;恩诺沙星对土壤呼吸的影响规律为先激活后抑制。在整个处理过程中(1~15 d),虽然4种抗生素对土壤微生物呼吸作用有明显抑制或激活作用,但是到处理第15 d,所有处理的微生物呼吸作用基本恢复到对照水平,与对照相比没有明显差异,说明在本试验浓度处理下,虽然土壤微生物对这4种抗生素有一定的应激反应,但是通过一定时间的培养后,微生物对其能够产生适应性,因此培养后期所有抗生素处理对土壤微生物没有明显毒害作用。

参考文献:

- [1] Richardson B J, Lam P K S, Martin M. Emerging chemicals of concern: Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Asia, with particular reference to Southern China[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2005, 50: 913-920.
- [2] Blackwell P A, Kay P, Ashauer R, et al. Effects of agricultural conditions on the leaching behaviour of veterinary antibiotics in soils[J]. *Chemosphere*, 2009, 75: 13-19.
- [3] Aust M O, Godlinski F, Travis G R, et al. Distribution of sulfamethazine, chlortetracycline and tylosin in manure and soil of Canadian feedlots after subtherapeutic use in cattle[J]. *Environmental Pollution*, 2008, 156: 1243-1251.
- [4] 周启星. 土壤环境污染化学与化学修复研究最新进展[J]. *环境化学*, 2006, 25(3): 257-265.
ZHOU Q X. New researching progresses in pollution chemistry of soil environment and chemistry and chemical remediation [J]. *Environmental Chemistry*, 2006, 25(3): 257-265.
- [5] Yi R H, Wang Q J, Mo C H, et al. Determination of four fluoroquinolone antibiotics in tap water in Guangzhou and Macao[J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158(7): 2350-2358.
- [6] Figueroa R A, Leonard A, MacKay A A. Modeling tetracycline antibiotic sorption to clays[J]. *Environmental Science Technology*, 2004, 38(2): 476-483.
- [7] 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(4): 497-507.
- [8] Sassman S A, Lee L S. Sorption of three tetracyclines by several soils: assessing the role of pH and cation exchange[J]. *Environmental Science Technology*, 2005, 39: 7452-7459.
- [9] 邵义萍, 莫测辉, 吴小莲, 等. 东莞市蔬菜基地土壤中喹诺酮类抗生素的污染特征研究[J]. *环境科学学报*, 2011, 31(4): 839-845.
TAI Y P, MO C H, WU X L, et al. Occurrence of quinolone antibiotics in soils from vegetable fields of Dongguan City[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2011, 31(4): 839-845.
- [10] Ajit K S, Michael T, Meyer, et al. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment[J]. *Chemosphere*, 2006, 65(5): 725-759.
- [11] 国 彬, 姚丽贤, 刘忠珍, 等. 广州市兽用抗生素的环境残留研究[J]. *农业环境科学学报*, 2011, 30(5): 938-945.
GUO B, YAO L X, LIU Z Z, et al. Environmental residues of veterinary antibiotics in Guangzhou City, China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(5): 938-945.
- [12] Hamscher G, Sczesny S, Hoper H, et al. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2002, 74: 1509-1518.
- [13] Morales M S, Luque-García J L, Luque de Castro M D. Continuous microwave-assisted extraction coupled with derivatization and fluorimetric monitoring for the determination of fluoroquinolone antibacterial agents from soil samples[J]. *J Chromatography A*, 2004, 1059(1-2): 25-31.
- [14] 李彦文, 莫测辉, 赵 娜, 等. 菜地土壤中磺胺类和四环素类抗生素污染特征研究[J]. *环境科学*, 2009, 30(6): 1762-1766.
LI Y W, MO C H, ZHAO N, et al. Investigation of sulfonamides and tetracyclines antibiotics in soils from various vegetable fields[J]. *Environmental Science*, 2009, 30(6): 1762-1766.
- [15] 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 J L, LIU J Z, CHEN Z L, et al. Effect of enrofloxacin residue on number and community function diversity of soil microbes[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2005, 11(1): 86-89.
- [16] 董璐璐, 谢秀杰, 周启星, 等. 新型环境污染物质抗生素的分子生态毒理研究进展[J]. *生态学杂志*, 2010, 29(10): 2042-2048.
DONG L X, XIE X J, ZHOU Q X, et al. Molecular ecotoxicology of antibiotics, an emerging type of environmental contaminants: A review [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2010, 29(10): 2042-2048.
- [17] 刘 锋, 应光国, 周启星, 等. 抗生素类药物对土壤微生物呼吸的影响[J]. *环境科学*, 2009, 30(5): 1280-1285.
LIU F, YING G G, ZHOU Q X, et al. Effects of antimicrobial drugs on soil microbial respiration [J]. *Environmental Science*, 2009, 30(5): 1280-1285.
- [18] 金彩霞, 刘军军, 陈秋颖, 等. 兽药磺胺间甲氧嘧啶对土壤呼吸及酶活性的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2010, 29(2): 314-318.
JIN C X, LIU J J, CHEN Q Y, et al. Effects of sulfamonomethoxine on soil respiration and enzyme activity [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(2): 314-318.