

鸡粪与四环素对土壤脲酶和磷酸酶活性的影响

金兰淑, 申 龙, 刘艳茹, 李 平, 王建国

(沈阳农业大学土地与环境学院, 辽宁省农业资源与环境重点实验室, 沈阳 110866)

摘要:采用室内土壤培养方法, 分别在培养第 1、15、30、45、60、75 d 采样, 测定土壤脲酶和磷酸酶活性, 研究鸡粪、四环素和两者共存对土壤脲酶和磷酸酶活性的影响。结果表明: (1) 土壤中添加鸡粪能够明显激活两种土壤酶的活性, 鸡粪对土壤脲酶激活时间大于 75 d, 对磷酸酶的激活时间为 60 d 左右, 最高激活率分别为 287.7% 和 69.0%。(2) 土壤中加入 $0.06 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 四环素可激活土壤脲酶与磷酸酶的活性, 最大激活率出现在培养第 15、45 d, 激活率分别为 22.6%、23.6%, 加入浓度为 $0.12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $0.24 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 四环素在整个培养过程中抑制两种土壤酶活性。(3) 在土壤中加入鸡粪和不同浓度四环素, 各处理组土壤两种酶活性均表现出激活作用, 激活率均高于 100%。由此可知, 在四环素污染的土壤中加入鸡粪能够增强土壤脲酶和磷酸酶活性, 降低四环素对土壤脲酶和磷酸酶活性的影响。

关键词: 鸡粪; 四环素; 土壤脲酶; 土壤磷酸酶

中图分类号: X53 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2013)05-0986-05 doi:10.11654/jaes.2013.05.016

Effect of Chicken Manure and Tetracycline on Soil Urease and Phosphatase Activity

JIN Lan-shu, SHEN Long, LIU Yan-ru, LI Ping, WANG Jian-guo

(Key Laboratory of Agricultural Resources and Environment of Liaoning Province, College of Land and Environment, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: In this study, the effects of chicken manure and tetracycline on soil urease and phosphatase activities were investigated in a laboratory incubation. Soil sample were collected at 1, 15, 30, 45, 60 days and 75 days of incubation. Chicken manure applied to the soil activated significantly ($P < 0.05$), the activities of soil urease and phosphatase with the maximum activating ratio of 287.7% and 69.0% at 75 days and 60 days of incubation, respectively. The concentration of $0.06 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ tetracycline activated the activities of soil urease and phosphatase with the maximum activating ratio of 22.6% and 23.6% at 15 days and 45 days of incubation, respectively. And the concentration of $0.12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and $0.24 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ tetracycline inhibited the two kinds of soil enzymes activities throughout the incubation. The incorporation of chicken manure and various concentrations of tetracycline activated soil enzymes activities with the activation ratio more than 100% for both of the two soil enzymes. The results showed that chicken manure added to the soil contaminated by tetracycline could enhance the activities of soil urease and phosphatase enzyme and control the effects of tetracycline on soil urease and phosphatase activities.

Keywords: chicken manure; tetracycline; soil urease; soil phosphatase

伴随着规模化养殖业的不断发展, 越来越多抗生素用于养殖业。四环素类抗生素作为一种广谱性抗菌药, 质优价廉, 目前已经成为我国畜禽养殖业中生产量和临床使用量最大的抗生素^[1]。据报道, 在畜禽生产中使用的四环素类抗生素有 30%~90% 以母体化合物形式随粪便排出^[2], 我国 7 个省市鸡粪中四环素平均含量为 $2.63 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 其范围在 $0 \sim 14.56 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 之

间^[3]。此外, 还需注意的是, 我国是世界上畜禽养殖大国, 畜禽粪便产生量很大, 大多数的畜禽粪便没有经过处理而直接施于农田, 大量的畜禽粪便排放为农业生态与环境安全带来风险。

土壤酶在土壤污染物的转化中起到重要作用, 可以根据土壤酶活性的变化来判断土壤的污染程度^[4]。四环素对土壤微生物的活动、菌落代谢功能、菌落数量等都会产生影响, 使土壤微生物的生物区系发生改变, 影响其分泌物及对动植物残体的分解作用, 进而影响土壤酶活性和土壤肥力^[5-6]。由于四环素进入土壤

收稿日期: 2012-10-31

作者简介: 金兰淑(1968—), 女, 博士, 副教授, 主要从事环境污染控制方面的研究工作。E-mail: ara168@163.com

的重要途径是伴随着畜禽粪便的施用而进入,而且畜禽粪便能够提高土壤酶活性,改善土壤微环境^[7],在使用土壤酶活性判断四环素土壤污染及土壤质量时必须考虑畜禽粪便对土壤酶活性的影响。土壤脲酶和土壤磷酸酶与土壤中植物有效态氮素、磷素的转化有着密切的关系,两种酶活性均与土壤有机物含量呈正相关性^[8]。因此,本试验旨在研究鸡粪和不同浓度四环素对土壤脲酶和土壤磷酸酶影响及其程度,了解畜禽粪便和四环素共存对土壤两种酶活性影响的一般规律,以期合理利用畜禽粪便及抗生素污染修复提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试四环素为化学纯。供试土样采自辽宁省农业科学研究院实验基地。采样时,先去除表土,采 2~20 cm 土样,混匀带回室内,风干,过 1 mm 尼龙筛备用。鸡粪取自吉林省一户农家,饲料为自家谷物,取鸡粪前未使用抗生素,经风干后,磨碎使用。土壤及鸡粪化学性质分别为:土壤 pH 为 5.4,速效氮 197.43 mg·kg⁻¹,速效磷 43.18 mg·kg⁻¹,速效钾 136.69 mg·kg⁻¹;鸡粪 pH 为 6.4,速效氮 5 107.63 mg·kg⁻¹,速效磷 5 065.57 mg·kg⁻¹,速效钾 21 184.83 mg·kg⁻¹。

1.2 试验设计与方法

实验室内采用土壤培养法,在日光温室环境条件下进行,土壤培养时间为 2012 年 4 月 15 日—6 月 30 日。共设 8 个处理,培养 75 d。根据我国菜地的有机肥用量 30 000~90 000 kg·hm⁻²^[9](即耕层每千克土壤中有有机肥的施用量约为 0.012 5 kg)和我国 7 个省市鸡粪中四环素平均含量(0~14.56 mg·kg⁻¹ 之间^[3]),设计不同量的四环素添加到 0.05 kg 鸡粪中,使得鸡粪中四环素浓度分别为 0、5、15 mg·kg⁻¹ 和 30 mg·kg⁻¹,再将含四环素的鸡粪均匀拌入供试土壤(土壤中四环素添加浓度分别为 0、0.06、0.12 mg·kg⁻¹ 和 0.24 mg·kg⁻¹)。同时实验设不添加鸡粪处理,四环素量同上。每个实验处理做 3 个重复。

每个处理用风干土 4 kg,按设计的四环素浓度分别加入所需的四环素标准溶液,装进 5 L 塑料盆中,置于日光温室中培养,每隔 1 d 称量 1 次,控制土壤含水量为田间持水量的 60%。于培养第 1、15、30、45、60、75 d 取样,测定土壤脲酶和土壤磷酸酶活性。

1.3 测定与分析方法

土壤脲酶活性测定采用苯酚钠比色法^[8];土壤磷

酸酶活性测定采用对硝基苯磷酸二钠比色法^[10]。

四环素对土壤酶活性影响指数的计算公式为:

$$\text{影响指数} = (b - a) / a \times 100\%$$

式中: a 为空白处理的土壤酶活性; b 为添加药剂或鸡粪处理的土壤酶活性。

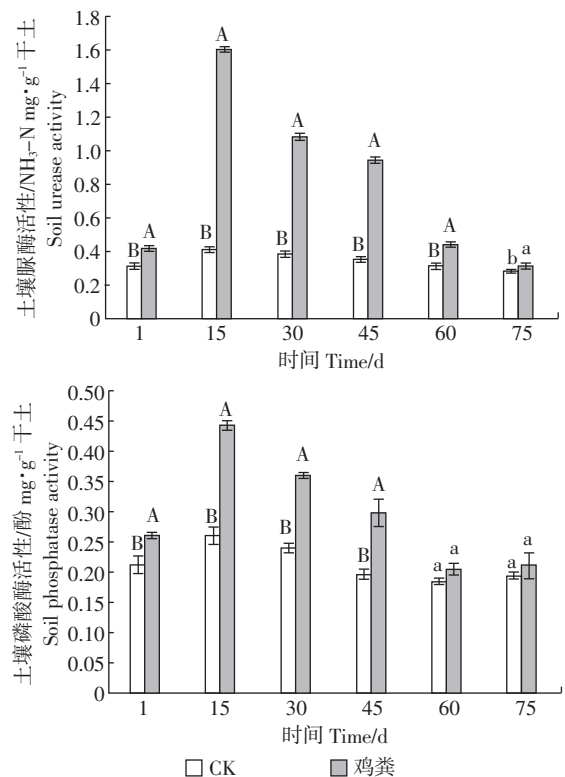
评价标准:影响指数 > 0,表明激活作用;影响指数 < 0,表明抑制作用。采用 Microsoft Excel 2007 软件对数据进行处理;采用 SPSS 16.0 软件进行方差分析,并采用 LSD 方法进行差异显著性比较。

2 结果与讨论

2.1 鸡粪对土壤脲酶和磷酸酶活性的影响

鸡粪处理与对照土壤连续培养 75 d,期间测定土壤脲酶和磷酸酶活性,结果如图 1 所示。添加鸡粪处理土壤脲酶和磷酸酶活性均比空白处理高,各时期酶活性激活率如表 1 所示。

处理第 15 d,添加鸡粪处理较空白组,两种土壤酶活性均极显著增加($P < 0.01$),并达到最大,土壤脲酶和磷酸酶活性激活率分别为 287.7%、69.0%。土壤中添



图中不同小写字母表示处理间差异显著 $P < 0.05$,

不同大写字母表示差异极显著 $P < 0.01$

图 1 鸡粪对土壤脲酶和磷酸酶活性的影响

Figure 1 Effects of chicken manure on soil urease and phosphatase activity

表 1 鸡粪对土壤脲酶和磷酸酶活性的影响指数
Table 1 Effects index of chicken manure on soil urease and phosphatase activity

时间/t·d ⁻¹	1	15	30	45	60	75
脲酶	34.6	287.7	183.0	167.1	41.2	12.6
磷酸酶	22.1	69.0	49.5	51.9	10.3	13.3

加鸡粪,为土壤带来大量的有机物。有机物能够提高土壤酶活性,其活性增强是腐殖物质对土壤酶的高度稳定性与土壤有机碳含量提高所带来的土壤微生物生物量提高的综合作用结果^[11-12],同时鸡粪中所含大量有机氮、磷进入土壤,增加了酶促基质,从而诱导并提高土壤脲酶、磷酸酶活性^[13-14]。在第 15 d 以后两种酶活性开始缓慢降低,但土壤脲酶在第 75 d 时酶活性与空白组仍表现出显著差异($P<0.05$)。土壤磷酸酶在第 60、75 d 酶活性较空白组差异不显著($P>0.05$),酶活性逐渐恢复至空白水平。可见鸡粪对土壤脲酶激活作用时间大于 75 d,对磷酸酶的激活时间为 60 d 左右。随着时间的推移,土壤中鸡粪逐渐被分解,有机物含量降低,无论是微生物数量和酶促基质都减少,从而使两种酶活性恢复至空白水平。这与如下观点一致^[8]:土壤酶保护容量是相对恒定的值,外界条件可以短时间或一定范围内改变土壤酶的保护容量,当外界条件消失,酶活性要恢复到土壤固有的酶保护容量状态,因为超过保护容量的土壤酶容易分解钝化。

2.2 四环素对土壤脲酶和磷酸酶活性的影响

不同浓度四环素处理连续培养 75 d,期间测定土壤脲酶和磷酸酶活性,结果如图 2 所示。

四环素浓度在 $0.06\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,土壤脲酶在 0~45 d 酶活性均大于空白处理,差异达到了显著性水平

($P<0.05$),表现出激活作用,其中第 15 d 激活作用最强,激活率为 22.5%。在整个培养期内, $0.12、0.24\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 浓度处理与空白相比,对土壤脲酶活性影响差异达到了显著性水平($P<0.05$), $0.12、0.24\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 浓度处理始终保持抑制状态,在第 30 d 出现最大抑制作用,其抑制率分别达到-58.1%、-74.3%;随着时间的推移, $0.06\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 处理在第 45 d 酶活性恢复到空白水平, $0.12、0.24\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 处理土壤酶活性仍然处于抑制状态,其抑制率分别为-10.6%、-26.4%。土壤磷酸酶在培养第 1~15 d 所有处理酶活性均表现出增大的趋势,各处理对土壤磷酸酶活性影响差异不显著($P>0.05$);随后 $0.06\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 浓度处理较空白处理酶活性继续增加,表现出激活作用,在第 45 d 激活作用达到最大,其激活率为 19.8%。 $0.12、0.24\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 处理在第 15 d 以后酶活性较空白逐渐降低,表现出抑制作用。随着时间的推移, $0.06\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 处理经 75 d 酶活性恢复到空白水平, $0.12、0.24\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 处理土壤经 75 d 酶活性仍处于抑制状态,其抑制率分别为-7.9%、-11.7%。

由图 2 可知, $0.06\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 四环素对土壤脲酶、磷酸酶的激活作用分别能持续 7 周和 9 周左右, $0.12、0.24\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 对土壤脲酶抑制作用持续大于 10 周,对土壤磷酸酶抑制作用持续大于 8 周。

不同浓度四环素对土壤脲酶和磷酸酶活性具有不同的影响,其主要原因可能是低浓度四环素进入土壤,只对部分较敏感的微生物产生了抑制作用,活化了其他微生物,从而促进了酶活性的升高。高浓度四环素进入土壤,对多数土壤微生物产生明显的抑制作用,使得微生物生物量减少,微生物正常代谢过程中具有酶促作用的有机物释放量减少。另一方面,四环

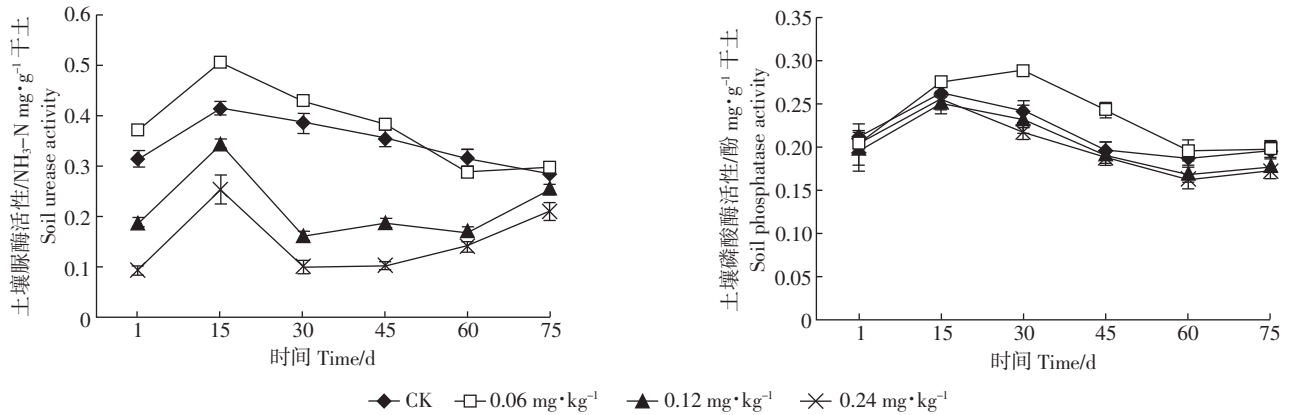


图 2 不同浓度四环素对土壤脲酶和磷酸酶活性的影响

Figure 2 Effects of different concentrations of tetracycline on soil urease and phosphatase activity

素加入土壤后,能与土壤酶分子中的活性部位——巯基和含咪唑的配位体等结合,形成较稳定的络合物,抑制了酶的活性中心,使酶活性降低^[15]。随着培养时间的延长,四环素发生降解或作为底物被微生物分解,使其土壤中的含量逐渐下降^[9],从而对土壤微生物和土壤酶活性的抑制作用随着培养时间逐渐减弱,直至培养后期酶活性逐渐恢复到空白水平。

2.3 鸡粪和不同浓度四环素处理对土壤脲酶和磷酸酶活性的影响

鸡粪和不同浓度四环素处理连续培养 75 d,此期间土壤脲酶和磷酸酶活性测定结果如图 3 所示。所有处理在培养的前 60 d,土壤脲酶和磷酸酶均表现为先增加,且在第 15 d 内激活率最高,各处理两种土壤酶活性激活率均超过 100%,较空白相比两种土壤酶活性均表现为激活作用。第 15 d 后酶活性逐渐回落,第 60 d 后两种酶活性逐渐恢复到空白水平。土壤有机质中许多官能团呈现一定的极性,特别是腐植酸中的羧基、酚羟基、羰基、氨基和甲氧基等。这些官能团使土壤带有大量的表面负电荷,从而对有机污染物的吸附

等产生影响^[16]。此外,鸡粪进入土壤,增加土壤有机成分,大量的有机氮、有机磷为土壤酶提供了分解基质,明显增加了土壤酶活性,从而掩蔽了四环素对土壤酶活性的影响,这与增多土壤有机质的含量和增大土壤的阳离子代换量,能提高土壤的抗污染的能力结论相似^[15]。

含有不同浓度四环素的鸡粪处理,两种酶的活性都表现出鸡粪 0.06 mg·kg⁻¹ 四环素处理大于 0.12、0.24 mg·kg⁻¹ 处理。土壤脲酶在整个培养期内,鸡粪 0.12 mg·kg⁻¹、鸡粪 0.24 mg·kg⁻¹ 两个处理组的酶活性差异不明显,但均显著低于鸡粪处理组($P<0.05$)。在培养第 30 d 时鸡粪 0.06 mg·kg⁻¹ 与鸡粪处理差异不显著($P>0.05$),而第 30~45 d,其酶活性趋于鸡粪 0.12 mg·kg⁻¹、鸡粪 0.24 mg·kg⁻¹ 处理,但与鸡粪处理酶活性差异达到显著水平($P<0.05$)。土壤磷酸酶在整个培养期内,仅在第 30 d 时,鸡粪 0.12 mg·kg⁻¹、鸡粪 0.24 mg·kg⁻¹ 处理酶活性与鸡粪处理、鸡粪 0.06 mg·kg⁻¹ 处理的酶活性表现出显著性差异($P<0.05$),其余培养期内酶活性差异不显著($P>0.05$)。这说明鸡粪中不同浓度四环素处理间对土壤酶活性的影响差异不明显,鸡粪掩蔽了四环素对两种土壤酶活性的负面作用,即使鸡粪中四环素浓度为 30 mg·kg⁻¹ 时,两种土壤酶活性较空白组均显著增加($P<0.05$)。两种酶活性的激活作用持续整个培养过程中,且这种激活作用伴随着鸡粪的分解而逐渐减弱。由于鸡粪中四环素的半衰期在 63 d 左右^[17],随着鸡粪分解消失,残留在土壤中的四环素仍可能对土壤脲酶和磷酸酶产生影响。

3 结论

(1)鸡粪能够激活土壤脲酶、磷酸酶活性,且鸡粪对土壤脲酶的激活影响指数及激活时间均强于土壤磷酸酶。

(2)不同浓度四环素对土壤脲酶和土壤磷酸酶活性影响表现出差异,低浓度四环素促进土壤两种酶活性,高浓度四环素抑制两种土壤酶活性。四环素对两种酶活性的激活或抑制作用具有阶段性特点。

(3)鸡粪的存在改变了四环素对土壤脲酶、磷酸酶活性的影响,激活了土壤中两种酶的活性。在采用土壤脲酶和土壤磷酸酶活性评价土壤四环素污染效应时,需要考虑鸡粪对土壤酶的作用。在四环素污染土壤中,添加鸡粪可以保持土壤酶活性。四环素在鸡粪中的半衰期为 60 d 左右,鸡粪分解后,土壤中残留的四环素仍可能继续影响土壤酶活性。

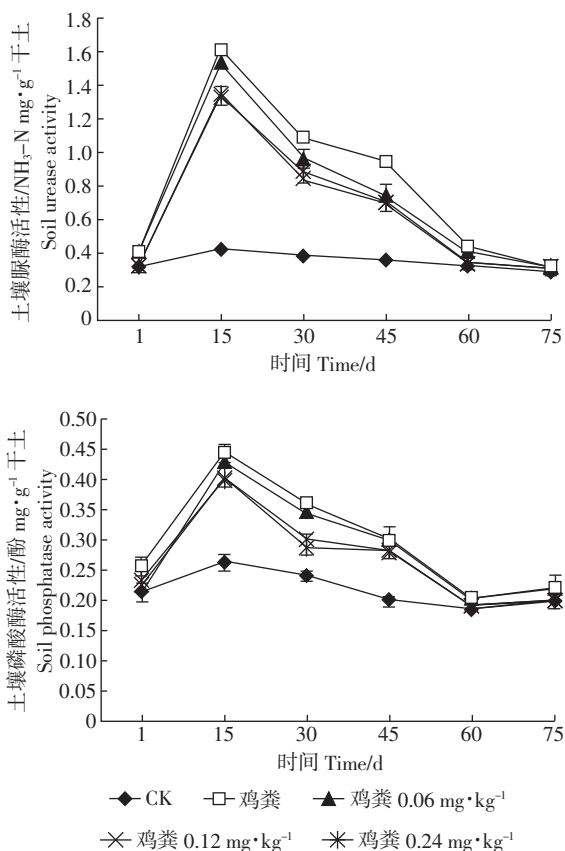


图 3 鸡粪与不同浓度四环素对土壤脲酶和磷酸酶活性的影响

Figure 3 Effects of chicken manure and different concentrations of tetracycline on soil urease and phosphatase activity

参考文献:

- [1] 陈育枝, 张元元, 袁希平, 等. 动物四环素类抗生素现状及前景[J]. 兽药, 2006, 11(3): 16-17.
CHEN Yu-zhi, ZHANG Yuan-yuan, YUAN Xi-ping, et al. The animals tetracycline antibiotics status quo and prospects[J]. *Veterinary*, 2006, 11(3): 16-17.
- [2] 刘雨霞, 鲍艳宇. 土壤中四环素类抗生素污染研究进展[J]. 环境污染与防治, 2011, 33(8): 81-86.
LIU Yu-xia, BAO Yan-yu. A review on pollution situation of tetracycline antibiotics in soil environment[J]. *Environmental Pollution and Control*, 2011, 33(8): 81-86.
- [3] 张树清, 张夫道, 刘秀梅, 等. 规模化养殖畜禽粪主要有害成分测定分析研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2005, 11(6): 822-829.
ZHANG Shu-qing, ZHANG Fu-dao, LIU Xiu-mei, et al. Determination and analysis on main harmful composition in excrement of scale live-stock and poultry feedlots[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2005, 11(6): 822-829.
- [4] 周礼恺. 土壤酶学[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
ZHOU Li-kai. Soil enzymology[M]. Beijing: Science Press, 1987.
- [5] 崔丽娜, 董树亭, 高荣岐, 等. 外源四环素对菜田土壤微生物活性及数量的影响[J]. 水土保持学报, 2010, 24(2): 214-218.
CUI Li-na, DONG Shu-ting, GAO Rong-qi, et al. Effects of extraneous tetracycline on soil microbial activity and microbial population of vegetable field[J]. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2010, 24(2): 214-218.
- [6] 曹慧, 孙辉, 杨浩, 等. 土壤酶活性及其对土壤质量的指示研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(1): 105-109.
CAO Hui, SUN Hui, YANG Hao, et al. A review of soil enzyme activity and its indication for soil quality[J]. *Chinese Journal of Applied and Environment Biology*, 2003, 9(1): 105-109.
- [7] 李江涛, 钟晓兰, 刘勤, 等. 长期施用畜禽粪便对土壤生物化学质量指标的影响[J]. 土壤, 2010, 42(4): 526-525.
LI Jiang-tao, ZHONG Xiao-lan, LIU Qin, et al. Effects of long-term application of livestock manures on soil biochemical quality indicators[J]. *Soils*, 2010, 42(4): 526-525.
- [8] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1986.
GUAN Song-yin. Soil enzyme and its research method[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1986.
- [9] 刘吉强, 诸葛玉平, 崔丽娜. 外源四环素对土壤酶活性和油菜品质的影响[J]. 应用生态学报, 2009, 20(4): 943-948.
LIU Ji-qiang, ZHUGE Yu-ping, CUI Li-na. Effects of exogenous tetracycline on rape soil enzyme activity and rape quality[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2009, 20(4): 943-948.
- [10] Schinner F, Hlanger R, Kandeler E, et al. Methods in soil biology[M]. Berlin: Springer 2 Verlag, 1996.
- [11] Goyal S, Mishra M M, Dhankar S S, et al. Microbial biomass turnover and enzyme activities following the application of farmyard manure to field soils with and without previous long-term applications[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1993, 15: 60-64.
- [12] Martens D A, Loeffelmann K L. Improved accounting of carbohydrate carbon from plants and soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, 34(10): 1393-1399.
- [13] 耿玉清, 白翠霞, 赵广亮, 等. 土壤磷酸酶活性及其与有机磷组分的相关性[J]. 北京林业大学学报, 2008, 30(11): 139-143.
GENG Yu-qing, BAI Cui-xia, ZHAO Guang-liang, et al. Soil phosphatase activity and its correlation with composition of organic phosphorus[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2008, 30(11): 139-143.
- [14] 王金花, 朱鲁生, 孙瑞莲, 等. 阿特拉津对两种不同施肥条件土壤脲酶的影响[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(1): 162-166.
WANG Jin-hua, ZHU Lu-sheng, SUN Rui-lian, et al. Effects of atrazine on urease in soils with different fertilization[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2004, 23(1): 162-166.
- [15] 周礼恺, 张志明, 曹承绵, 等. 土壤的重金属污染与土壤酶活性[J]. 环境科学学报, 1985, 5(6): 176-183.
ZHOU Li-kai, ZHANG Zhi-ming, CAO Cheng-mian, et al. Soil heavy metal pollution and soil enzymatic activities[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1985, 5(6): 176-183.
- [16] 鲍艳宇, 周启星, 万莹, 等. 土壤有机质对土霉素在土壤中吸附-解吸的影响[J]. 中国环境科学, 2009, 29(6): 651-655.
BAO Yan-yu, ZHOU Qi-xing, WAN Ying, et al. Effect of soil organic matter on adsorption and desorption of oxytetracycline in soils[J]. *China Environmental Science*, 2009, 29(6): 651-655.
- [17] 张健, 关连珠, 颜丽. 鸡粪中3种四环素类抗生素在棕壤中的动态变化及原因分析[J]. 环境科学学报, 2011, 31(5): 1039-1044.
ZHANG Jian, GUAN Lian-zhu, YAN Li. Dynamics and mechanism of degradation of three tetracycline antibiotics from chicken feces in brown soil[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2011, 31(5): 1039-1044.