

土霉素及镉污染对土壤呼吸及酶活性的影响

闫雷¹, 毕世欣¹, 赵启慧¹, 王喆¹, 潘东琪¹, 曲娟娟¹

(东北农业大学 资源与环境学院 寒地黑土资源利用与保护重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 随着饲料工业以及畜禽养殖业的规模化发展, 抗生素和重金属在土壤环境中同时存在的几率不断增大。为了分析抗生素和重金属对土壤微生物生态系统的影响, 以土霉素(OTC)与镉(Cd)为污染物, 采用室内培养法, 研究了土霉素(OTC)与镉(Cd)单一处理及复合污染对土壤呼吸和酶活性的影响。结果表明, 10 mg/kg 重金属镉单独污染对土壤微生物呼吸表现为先抑制后激活作用, 且显著抑制了土壤蔗糖酶、脲酶、磷酸酶活性, 对3种酶活性平均抑制率从大到小依次为: 蔗糖酶>磷酸酶>脲酶; 1 mg/kg 土霉素显著激活土壤微生物呼吸, 50和200 mg/kg 土霉素对土壤微生物呼吸的影响呈现出先抑制后激活的规律。各处理浓度下的土霉素对蔗糖酶和脲酶活性均主要表现为抑制作用, 对磷酸酶活性的影响呈现出一定的波动性; 当土霉素的浓度为1和200 mg/kg时, 其与10 mg/kg 镉的复合污染对土壤微生物呼吸及3种酶活性的影响主要为拮抗作用, 但当土霉素的浓度为50 mg/kg时, 与10 mg/kg 镉的复合污染对土壤微生物呼吸及3种酶活性的影响则主要为协同作用。微生物呼吸对土霉素与镉胁迫更为敏感, 最高抑制率和激活率分别可达98.98%和300.82%, 土壤酶活性受土霉素和镉污染的影响要弱于它们对土壤微生物呼吸的影响。

关键词: 土霉素; 镉; 土壤呼吸; 酶活性; 抑制; 激活

文献标识码: A

文章编号: 1000-288X(2014)06-0101-08

中图分类号: X171.5

DOI:10.13961/j.cnki.stbctb.2014.06.026

Effects of Oxytetracycline and Cd Pollution on Soil Respiration and Enzyme Activity

YAN Lei¹, BI Shi-xin¹, ZHAO Qi-hui¹, WANG Zhe¹, PAN Dong-qi¹, QU Juan-juan¹

(Black Soil Resources Utilization and Protection of Key Laboratory in Cold Region, College of Resources and Environmental Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: Co-existence probability of antibiotics and heavy metals in soil environment increased with the large-scale development of feed and livestock industry. In order to analyze the effects of antibiotics and heavy metals on soil microorganism ecosystem, we studied the single or combined pollution of oxytetracycline (OTC) and cadmium(Cd) on soil respiration and enzyme activities by laboratory cultivation. The results showed that the soil respiration was inhibited firstly, and then stimulated by sole treatment of 10 mg/kg Cd, while activities of invertase, urease and phosphatase in soil were significantly inhibited during the whole process. The order of inhibiting rate for enzyme activity was invertase>phosphatase>urease. Soil respiration was significantly activated by sole treatment of OTC at concentration of 1 mg/kg, while inhibited first, then activated by OTC at concentration of 50 or 200 mg/kg. Activities of invertase and urease were inhibited but the activities of phosphatase fluctuated when oxytetracycline was solely used. The combined pollution treatments of OTC+Cd(1+10 mg/kg) as well as OTC+Cd(200+10 mg/kg) showed antagonistic action, while the treatment of OTC+Cd(50+10 mg/kg) presented synergistic action on soil respiration and the 3 kinds of enzyme activities. Soil respiration responded more sensitively than soil enzyme activity by combined pollution of OTC and Cd, with the maximum inhibition and activation rates of 98.98% and 300.82%, respectively. Effects of OTC and Cd on enzyme activities were less than that on soil respiration.

Keywords: oxytetracycline; cadmium; soil respiration; enzyme activity; inhibition; activation

收稿日期: 2014-07-29

修回日期: 2014-09-17

资助项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目“四环素类抗生素的土壤环境行为及生态毒性”(12541028); 黑龙江省高校寒地黑土资源利用与保护重点实验室课题(ht2012-05); 公益性行业(环保)科研专项(201309035-01)

作者简介: 闫雷(1974—), 女(汉族), 黑龙江省牡丹江市人, 博士, 教授, 主要从事土壤环境保护方面的研究。E-mail: yanlei_74@163.com。

通信作者: 曲娟娟(1974—), 女(汉族), 山东省龙口市人, 博士, 教授, 主要从事环境微生物方面的研究。E-mail: juanjuanqu@126.com。

抗生素(antibiotics)是 20 世纪最伟大的发明之一,其发明后被用于预防和治疗人类及动物的疾病,同时作为促生长剂长期添加于动物饲料中加快畜禽及水产品的生长。土霉素(OTC)是四环素类抗生素之一,具有质优价廉、广谱抗菌性的特点,在畜禽生产中应用广泛。进入动物机体内的大部分土霉素不能完全被吸收,高达 75% 以上以原形或代谢物形式经由畜禽粪尿排入环境,经不同途径(堆肥)对土壤和水体造成污染^[1-4]。Hamscher 等人^[5]研究了兽用抗生素在土壤中的残留,发现四环素在土壤 10—20 cm 处可达 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。德国施用动物粪肥后的土壤中土霉素的残留最大浓度为 32.3 mg/kg ^[6]。在我国,大型养殖场周围土壤中土霉素含量高达 200 mg/kg ^[7],在水产养殖厂的沉积物中更是高达 285 mg/kg ^[8]。重金属污染已成为人们日益关注的问题,中国环境保护部和国土资源部于 2014 年 4 月 17 日发布的“全国土壤污染状况调查公报”中指出,全国土壤重金属污染总的点位超标率为 16.1%。与其他重金属相比,镉(Cd)在土水系统中有较高的迁移能力,更易对环境产生毒害^[9]。调查发现我国珠三角地区土壤中 Cd 含量在 0.57~11.0 mg/kg ^[10],湖南宝山矿区局部表层土壤 Cd 含量高达 2 587 mg/kg ^[11]。江苏省某市疾病预防控制中心在对该市从事饲料生产的企业调查时发现,某些猪饲料中镉的含量高达 370 mg/kg ^[12]。这主要是由于锌矿中常含有镉,当锌矿作为矿物质原料被添加到饲料中时可能会造成镉的污染;另外,使用镀镉机具加工饲料,也可能是造成镉污染的原因之一^[13-14]。摄入过量的镉对生物体的危害极其严重,会导致肾脏、肝脏、肺部、骨骼、生殖器官的损伤,对免疫系统、心血管系统等具有毒性效应,进而引发多种疾病。

抗生素与重金属复合污染物通常通过畜禽粪便

进入土壤生态系统中,其复合污染对环境的影响日益突出,成为热点关注问题,目前国内外研究者^[15-20]针对抗生素和重金属污染已有大量研究。张树清等^[15]对我国 7 省、市、自治区的典型规模化养殖场畜禽粪便的主要成分分析发现,猪粪中土霉素平均含量为 9.09 mg/kg ,最高达 134.75 mg/kg ,重金属镉的平均含量为 13.25 mg/kg ,最高达 120.13 mg/kg 。De 等^[16]研究发现南极地区的水域中存在具有重金属和抗生素抗性的菌落。吴丹等人^[17]研究发现过氧化氢酶和蔗糖酶活性在 Cd 浓度为 10 mg/kg 的时候达到最高值。刘琳等^[19]研究表明 OTC 对土壤中蔗糖酶、脲酶和磷酸酶活性毒性强度随着投加浓度升高而增加。Kong 等人^[20]研究 OTC 与 Cu 复合污染对水稻土壤微生物群落功能时发现,OTC 和 Cu 对土壤微生物群落功能多样性、均一度和平滑颜色变化率(AWCD)的负面影响有明显的加合作用。但有关抗生素和重金属复合污染对东北地区典型耕作土壤—黑土土壤生态系统的影响研究还鲜见报道。本研究以土霉素和重金属镉作为目标污染物,采用室内培养法,通过探讨微生物呼吸和土壤酶活性的变化规律,以期进一步完善抗生素与重金属的生态毒理效应研究,为其环境风险评估提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试土壤采自东北农业大学试验田(土霉素和重金属镉未见检出)。除去地面植被、枯枝落叶及表面 1 cm 左右的表土,采样深度为 2~20 cm,过 20 目筛,风干后装袋备用。其理化性质详见表 1。土霉素原药(纯度 $\geq 88.8\%$),购自黑龙江省药检所,其他试剂均为分析纯。

表 1 供试土壤理化性质

pH 值	有机质/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	CEC/ ($\text{cmol}\cdot\text{kg}^{-1}$)	全磷/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	速效磷/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	速效钾/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	缓效钾/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	全氮/ ($\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Cd/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	OTC/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)
6.50	16.73	18.56	543.8	33.18	261.69	793.25	2.61	—	—

注:CEC 为阳离子交换量,OTC 为土霉素;“—”为检出限以下。

1.2 试验设计

1.2.1 土壤呼吸强度测定 取部分冷藏于冰箱中的风干土样,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中预培养 7 d,以恢复微生物活性。称取若干份土壤,每份 50 g 置于 100 ml 的高型烧杯中,加入 1.0 g 葡萄糖,混匀,加入不同质量分数的土霉素溶液或硫酸镉溶液。试验分为两个处理组,第一组:单一处理组,使土霉素在土壤中的浓度分别为 0, 1, 50 和 200 mg/kg ,重金属镉在土壤中

的浓度为 10 mg/kg ;第二组:复合处理组,使土霉素和重金属镉在土壤中的浓度分别为: $[(\text{OTC}+\text{Cd})=(1+10)\text{mg}/\text{kg}]$, $[(\text{OTC}+\text{Cd})=(50+10)\text{mg}/\text{kg}]$, $[(\text{OTC}+\text{Cd})=(200+10)\text{mg}/\text{kg}]$ 。各处理均设 3 个重复,并调节土壤含水量达田间最大持水量的 60%,置于密闭容器中。同时将盛放有 35 ml 0.1 mol/L NaOH 的 100 ml 的高型烧杯放入密闭容器底部,盖严瓶盖,分别于培养后的 1, 7, 15, 21, 27 d 测定其呼吸

强度。土壤呼吸强度采用直接吸收法滴定测定^[21]。

1.2.2 土壤酶活性测定 取部分冷藏于冰箱中的风干土样,在 25 °C 的培养箱中预培养 7 d,以恢复微生物活性。称取若干份土壤,每份 100 g 置于三角瓶中,加入不同质量分数的土霉素溶液或硫酸镉溶液。试验分为两个处理组,第一组:单一处理组,使土霉素在土壤中的浓度分别为 0,1,50 和 200 mg/kg,重金属镉在土壤中的浓度为 10 mg/kg;第二组:复合处理组,使土霉素和重金属镉在土壤中的浓度分别为: [(OTC+Cd)=(1+10)mg/kg], [(OTC+Cd)=(50+10)mg/kg], [(OTC+Cd)=(200+10)mg/kg]。各处理均设 3 个重复,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 1,7,15,21,27 天取样测定蔗糖酶、脲酶和磷酸酶的酶活性。土壤酶活性测定参见关松荫等方法^[22],土壤蔗糖酶采用 3,5-二硝基水杨酸比色法;土壤脲酶采用苯酚钠一次氯酸钠比色法;土壤磷酸酶采用磷酸苯二钠比色法。

1.3 数据处理

土壤呼吸和土壤酶活性的影响率计算公式为:

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

式中:A——添加污染物土壤呼吸或土壤酶活性;
B——不添加污染物土壤呼吸或土壤酶活性,正值表示激活,负值表示抑制。复合污染的交互作用类型的判断参考沈国清与 Gao 等方法^[23-24],当复合处理的实测值 > 理论值时,表示协同作用;当实测值 < 理论值时,表示拮抗作用。其中,理论值为各处理浓度下平均影响率的加和;实测值为试验实际测定影响率。试验数据采用 Excel 处理,统计分析采用 SPSS 软件。

2 结果与分析

2.1 土霉素与镉对土壤微生物呼吸的影响

在室内模拟条件下,镉单一污染对土壤微生物呼吸的影响结果如图 1 所示。从图 1 可以看出,10 mg/kg Cd 处理下,培养第 1 天即对土壤微生物呼吸产生了强烈的抑制作用,抑制率高达 78.05%。这可能是由于在培养初期重金属产生的毒性抑制甚至杀死了部分敏感的土壤微生物,导致土壤微生物呼吸下降^[25]。当培养第 7 天时,发现 Cd 对土壤微生物呼吸的影响转为激活作用,但激活率不高,只有 6.66%。随着培养时间的延长,激活作用逐渐增强,第 21 天达最大激活率 38.75%;而后激活率逐渐降低,直至培养结束恢复到对照水平($p > 0.05$)。分析其原因可能是在重金属的胁迫下,微生物代谢过程的能源利用效率降低,需要更多的碳进行维护并最终增加呼吸;另一方面杀死微生物时发生的分解反应也会增加基底呼吸,进而达到

激活的效果^[26]。而到培养后期,土壤微生物逐步适应了这种环境,恢复到对照水平。

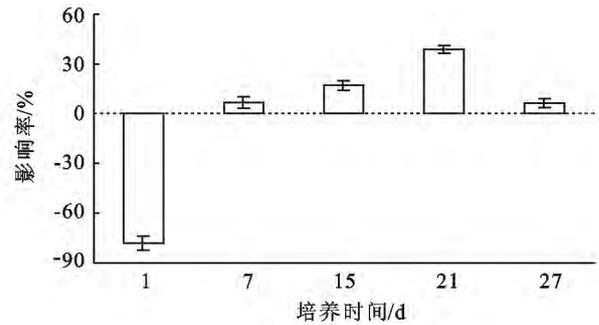


图 1 镉单一污染对土壤微生物呼吸的影响

土霉素单一污染对土壤微生物呼吸的影响结果如图 2 所示。从图 2 可以看出,在整个培养过程中(1~27 d),1 mg/kg OTC 浓度处理对土壤微生物呼吸具有明显的激活作用($p < 0.05$),50 和 200 mg/kg OTC 对土壤微生物呼吸的影响表现为先抑制后激活,且 OTC 浓度越高,对微生物呼吸抑制作用时间越长。已有的研究报道发现,虽然 OTC 可抑制土壤中细菌和放线菌的生长,但可以促进真菌的生长^[27-28]。本试验中 1 mg/kg OTC 对土壤微生物的呼吸激活效应可能是由于土壤中细菌和放线菌活性受到抑制,真菌等其他微生物获得大量营养物质,从而活性增强;另外,抗生素本身作为碳源被微生物分解利用,或其通过物理或化学作用的降解释放出二氧化碳,增加了呼吸量^[29]。而当 OTC 污染浓度不断增大,施药后土壤中抗生素含量超过了影响土壤微生物呼吸作用的浓度阈值,甚至杀死了某些微生物,因此表现为抑制^[30]。但这种抑制作用是非持续性的,当抗生素的含量低于药物对土壤微生物呼吸影响的浓度阈值时,呼吸作用逐渐开始恢复。另一方面随着土壤微生物耐受性增加,土壤中产生抗性种群,以该种抗生素为碳源,促使土壤微生物的呼吸由抑制逐渐恢复正常直至转为激活^[31]。

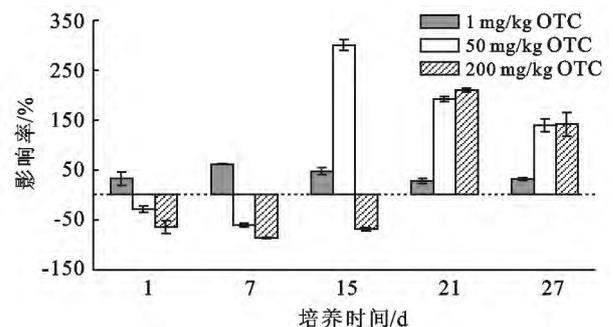


图 2 土霉素单一污染对土壤微生物呼吸的影响

土霉素与镉复合污染对土壤微生物呼吸的影响结果如图 3 所示。从图 3 可以看出,与单一污染处理相比,在 1 mg/kg OTC 与 10 mg/kg Cd 复合处理下对土壤微生物呼吸的影响呈现出“抑制—激活—抑制”的规律。且在 7~21 d 复合处理的影响与两者单一处理时趋势一致,均为显著的激活作用($p < 0.05$),在此阶段 OTC, Cd 两者单一处理的平均激活率分别为 46.04% 和 20.87%,复合处理平均激活率为 132.86%,为两者单一处理之和的 2 倍左右, Cd 增强了对土壤微生物呼吸的激活作用。表 2 为 OTC 与 Cd 对土壤微生物呼吸和土壤酶活性的平均影响率及其交互作用类型。从表 2 中可以看出,复合处理 [(OTC+Cd)=(1+10)mg/kg] 对土壤微生物呼吸影响的实测值 > 理论值,总体来看,交互作用类型为协同激活。当 OTC 的处理浓度逐渐增大,达到 [(OTC+Cd)=(50+10)mg/kg] 时,培养第 1 天为激活作用,这与两者单一污染时的抑制作用相反,表明复合污染使土壤 CO₂ 的释放量增加了,土壤微生物呼吸由原来的

受抑制转为被激活。从培养第 7 天开始,复合污染对微生物呼吸的影响与 OTC 单一作用时趋势一致,第 15 天时出现了最高激活率 300.82%,总体来说复合处理表现出协同激活作用。当 OTC 的污染浓度进一步增大至 [(OTC+Cd)=(200+10)mg/kg] 时,复合处理对土壤微生物呼吸作用的影响与 OTC 单一污染时完全一致,均为先抑制后激活,交互作用类型为拮抗激活。

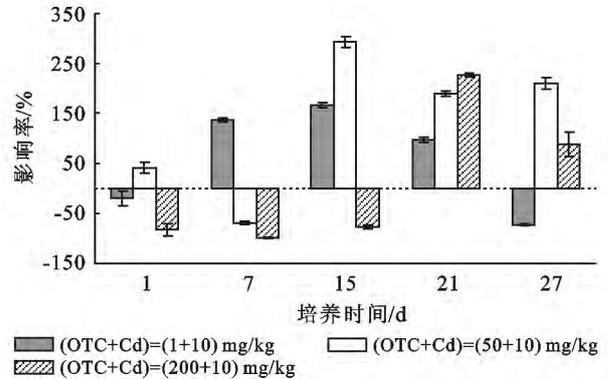


图 3 土霉素与镉复合污染对土壤微生物呼吸的影响

表 2 土霉素与镉对土壤微生物呼吸和土壤酶活性的交互影响率

污染物处理	土壤微生物呼吸	蔗糖酶	脲酶	磷酸酶
Cd(10 mg/kg)	-1.82%	-12.95%	-6.43%	-9.66%
OTC(1 mg/kg)	40.53%	-1.52%	-4.99%	-0.75%
OTC(50 mg/kg)	109.01%	-35.19%	-9.90%	15.37%
OTC(200 mg/kg)	26.71%	-47.19%	-43.92%	11.62%
[(OTC+Cd)=(1+10)mg/kg]理论值	38.71%	-14.47%	-11.42%	-10.41%
[(OTC+Cd)=(1+10)mg/kg]实测值	61.15%	-13.92%	-2.65%	-2.37%
交互作用类型	协同	拮抗	拮抗	拮抗
[(OTC+Cd)=(50+10)mg/kg]理论值	107.19%	-48.14%	-16.33%	5.71%
[(OTC+Cd)=(50+10)mg/kg]实测值	132.65%	-40.74%	-19.44%	6.69%
交互作用类型	协同	拮抗	协同	协同
[(OTC+Cd)=(200+10)mg/kg]理论值	24.89%	-59.78%	-50.35%	1.96%
[(OTC+Cd)=(200+10)mg/kg]实测值	11.06%	-53.02%	-33.87%	4.38%
交互作用类型	拮抗	拮抗	拮抗	协同

2.2 土霉素与镉对蔗糖酶活性的影响

蔗糖酶又称转化酶,广泛存在于土壤中,对于增加土壤中易溶解的营养物质起重要作用。一般情况下,土壤肥力越高,蔗糖酶的活性越强^[32]。镉单一污染对蔗糖酶活性的影响如图 4 所示。从图 4 可以看出,在整个培养过程中(1~27 d)重金属镉对蔗糖酶的影响为显著抑制作用($p < 0.05$),抑制率随时间延长先增大后减小,最大抑制率为 20.92%(第 7 天)。郝英华等人^[33]的研究也发现, Cd 可以抑制土壤蔗糖酶的活性。抑制作用可能是由于添加重金属后抑制了土壤微生物的生长和繁殖,减少了体内酶的合成量

和分泌量,削弱了土壤中 C, N 营养元素的循环速率和能量流动,最终导致土壤酶活性下降^[34]。

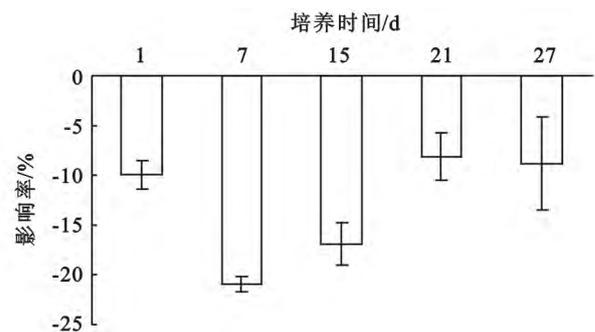


图 4 镉单一污染对土壤蔗糖酶活性的影响

土霉素单一污染对蔗糖酶活性的影响如图 5 所示。从图 5 可以看出,土霉素单一污染下,培养第 1 和第 7 天,所有处理浓度的 OTC 均对蔗糖酶表现为显著抑制($p < 0.05$),抑制率随浓度的升高而增大,最大抑制率为 77.24%(200 mg/kg,第 7 天)。培养第 15 和第 21 天,除 1 mg/kg 处理转为激活作用外,其余各处理仍为显著抑制($p < 0.05$)。培养第 27 天,200 mg/kg 处理也转为激活作用,只有 50 mg/kg 处理仍为抑制作用。总体来说,在整个培养过程中(1~27 d),1 mg/kg OTC 对蔗糖酶活性的影响呈现先抑制后激活的规律,其余各浓度处理主要表现为抑制作用。这也进一步验证了 Gao 等人^[24]的试验,他们在研究 100 mg/kg OTC 对蔗糖酶活性的影响时发现,OTC 对蔗糖酶的影响均为显著的抑制作用($p < 0.05$)。由于土壤与 OTC 电荷形式差异,及 OTC 含有较多极性/离子型官能团可引发阳离子交换、金属离子架桥和氢键作用等原因,在酸性和中性条件下土壤易于对 OTC 进行吸附,并且在酸性环境中 OTC 较为稳定,半衰期较长^[35]。本试验中土壤的 pH 值为 6.5,因此较高浓度 OTC 胁迫对系统内微生物存在长期毒性作用,从而造成土壤酶活性显著降低。

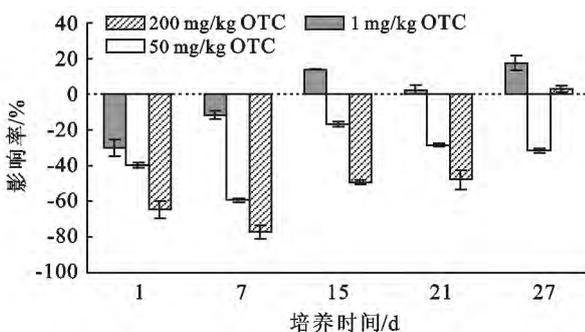


图 5 土霉素单一污染对土壤蔗糖酶活性的影响

土霉素与铜复合污染对蔗糖酶的影响结果如图 6 所示。由图 6 可知,复合污染下蔗糖酶活性显著降低($p < 0.05$),且复合处理中 OTC 浓度越大,蔗糖酶活性越小,说明复合污染对蔗糖酶活性存在显著的抑制作用。同时可以看出,随着培养时间的延长,各处理浓度下的复合污染对蔗糖酶活性的抑制作用基本上逐渐减弱。与 OTC 和 Cd 单独处理时相比,除 [(OTC+Cd)=(1+10)mg/kg] 外,其余各复合处理对蔗糖酶的影响情况与单一污染时相同,复合污染交互作用类型均为拮抗抑制。该结果与已有的相关文献报道较为相似,如沈国清等人^[23]研究发现,菲和铜复合污染在整个培养期间(1~49 d)始终抑制了蔗糖酶的活性,平均抑制率达 53.57%,复合污染表现为协同抑制作用。

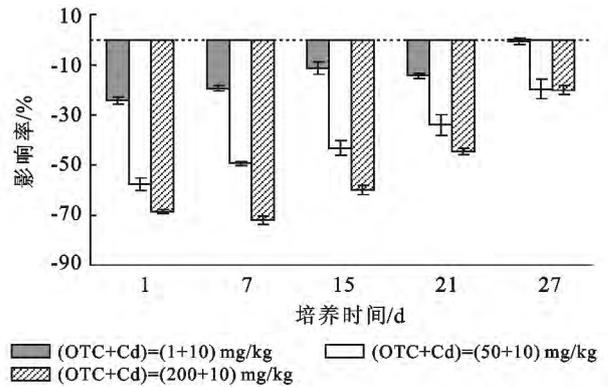


图 6 土霉素与铜复合污染对土壤蔗糖酶活性的影响

2.3 土霉素与铜对脲酶活性的影响

脲酶是一种酰胺水解酶,在土壤中主要来自于植物和微生物,其在氮肥利用和土壤氮素代谢方面有重要意义^[32]。铜单一污染对脲酶活性的影响结果如图 7 所示。由图 7 可见,重金属 Cd 对脲酶具有显著抑制作用($p < 0.05$),这与程金和 张平等人^[36-37]的研究结果一致。其抑制机理可能与酶分子中的活性部位巯基和含咪唑的配体等结合,形成较稳定的络合物,产生了与底物的竞争性抑制作用有关^[38]。

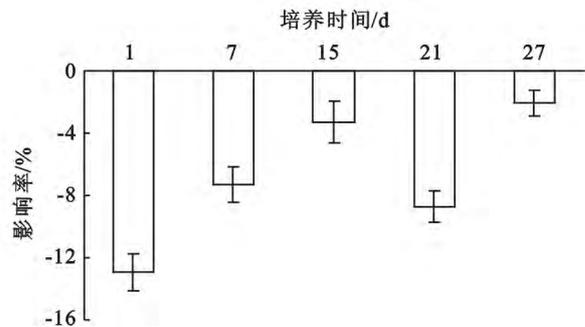


图 7 铜单一污染对土壤脲酶活性的影响

土霉素单一污染对脲酶活性的影响结果如图 8 所示。由图 8 可知,1 mg/kg OTC 在整个培养期对脲酶活性具有抑制作用。在培养第 1 天和第 27 天的抑制率不超过 1%,与对照相比无显著差异($p > 0.05$),培养中期(7~21 d)抑制率为 3.89%~13.45%。当 OTC 处理浓度增至 50 mg/kg 时,对脲酶活性的影响呈现出“激活—抑制—激活”规律,试验结果与文献报道不十分一致, Yang 等人^[39]研究认为 50 mg/kg OTC 对小麦根际土壤脲酶活性无明显的影响。这可能是由于根际土壤微生物活性较高,对外来物质的胁迫具有更强的抗性。本试验中出现激活作用可能是由于 OTC 具有酰胺键结构,而脲酶以酰胺键作为底物,根据底物诱导原理,导致 OTC 对脲酶活性的正效应大于负效应,即为激活^[40]。当 OTC 单独处理浓度达到 200 mg/kg,其对脲酶活性表现出显著的抑制作

用($p < 0.05$)。刘惠君等^[41]在研究酰胺类除草剂与脲酶的相互作用机制时发现,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。高浓度 OTC(200 mg/kg)与脲酶分子之间可能也存在着这种作用机制,形成结合位点而发生作用,从而抑制了脲酶活性。

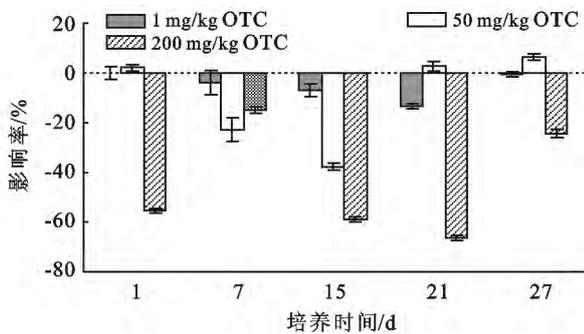


图 8 土霉素单一污染对土壤脲酶活性的影响

土霉素与镉复合处理对土壤脲酶的影响结果如图 9 所示。从图 9 可以看出,[(OTC+Cd)=(1+10)mg/kg]复合处理条件下,培养第 1 天显著抑制了脲酶活性,抑制率高达 26.05%,与两者单一污染时相比,脲酶活性明显降低,这表明在培养第 1 天复合处理在一定程度上增强了对脲酶的抑制作用。从培养第 7 天开始,[(OTC+Cd)=(1+10)mg/kg]复合处理对脲酶转为激活作用,但激活率不高,始终没有超过 5%,总体来看复合处理仍为拮抗抑制。当复合处理浓度为[(OTC+Cd)=(50+10)mg/kg]和[(OTC+Cd)=(200+10)mg/kg]时,对脲酶的影响均为抑制作用,抑制率随时间的延长呈现“下降—上升—下降”的规律,最大抑制率为 65.14%[第 15 d,(200+10)mg/kg]。统计分析结果发现,在整个培养过程中(1~27 d),除第 7 天处理浓度为[(OTC+Cd)=(1+10)mg/kg]和[(OTC+Cd)=(200+10)mg/kg]外,其余各浓度处理下,两者单独污染与复合污染对脲酶相比都有显著差异($p < 0.05$)。

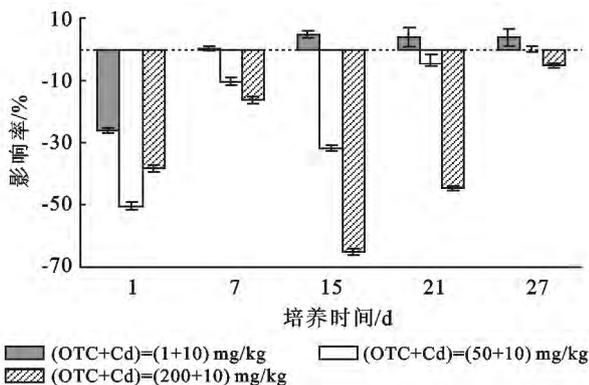


图 9 土霉素与镉复合污染对土壤脲酶活性的影响

2.4 土霉素与镉对磷酸酶活性的影响

磷酸酶是一类催化土壤有机磷化合物矿化的酶,其活性高低直接影响着土壤中有机磷的分解、转化及其生物有效性^[32]。镉对磷酸酶活性的影响结果如图 10 所示。从图 10 可以看出,重金属镉单独处理对磷酸酶活性具有抑制作用,最大抑制率为 30.04%,但抑制率随培养时间的变化呈现一定波动性,表现为“增大—减小—增大”的现象。这与陆文龙^[42]的研究结果一致,该研究在分析 10 mg/kg Cd 污染对土壤磷酸酶活性的影响时也发现,随着培养时间的延长,其抑制率也表现出“增大—减小—增大”的波动性。同样,Khan 和 Moreno^[43-44]的研究也表明 Cd 能抑制土壤磷酸酶的活性。

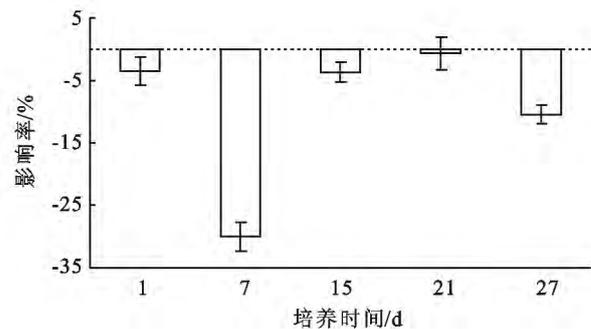


图 10 镉单一污染对土壤磷酸酶活性的影响

土霉素单一污染对磷酸酶活性的影响结果如图 11 所示。从图 11 可以看出,培养第 1 天,1 mg/kg OTC 浓度处理对磷酸酶活性的影响为抑制,但抑制率很低,仅为 4.48%,与对照相比无显著差异($p > 0.05$);50 和 200 mg/kg 处理表现为显著激活($p < 0.05$),最大激活率为 88.56%(50 mg/kg OTC)。培养第 7 天,除 200 mg/kg 处理仍为显著的激活作用($p < 0.05$),OTC 其余浓度处理对磷酸酶均转为显著性抑制($p < 0.05$),抑制率在 7.33%~26.01%。随着时间的推移,至第 27 天,OTC 各浓度处理对磷酸酶的抑制或激活已降至较低水平,说明此时磷酸酶受 OTC 的影响已基本恢复。本试验中,200 mg/kg OTC 在整个培养期内,对磷酸酶活性的影响以激活作用为主,这也进一步证实了 Gao 等人^[24]的研究,较高浓度处理 OTC 对碱性磷酸酶的活性具有激活作用。

土霉素与镉复合处理对磷酸酶的影响结果如图 12 所示。从图 12 可以看出,复合处理为[(OTC+Cd)=(1+10)mg/kg]时,在整个培养过程中(1~27 d),对磷酸酶的影响呈现出“抑制—激活—抑制”的规律,复合处理表现为拮抗抑制作用。统计分析结果表

明,除第 1 天外,其余培养时间内土霉素—镉复合处理对磷酸酶的影响与 OTC 单独处理具有显著差异 ($p < 0.05$)。土霉素—镉复合污染为 $[(\text{OTC} + \text{Cd}) = (50 + 10) \text{ mg/kg}]$ 时,对磷酸酶的影响呈现“激活—抑制—激活—抑制”的规律,主要表现为拮抗激活作用。 $[(\text{OTC} + \text{Cd}) = (200 + 10) \text{ mg/kg}]$ 在整个培养过程中呈现先激活后抑制的规律,最大激活率为 18.89%,复合处理表现为协同激活作用。总体来说,复合污染的作用效果与 OTC 单一污染时基本相同,均呈现一定的波动性,其作用机理有待进一步研究。

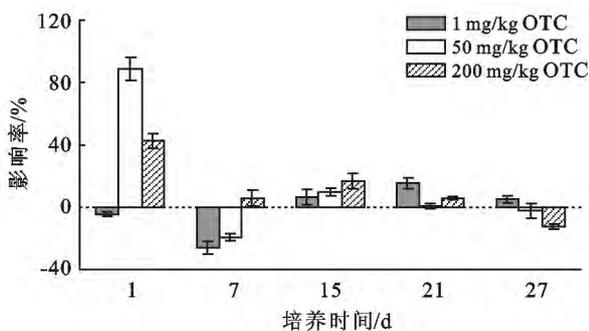


图 11 土霉素单一污染对土壤磷酸酶活性的影响

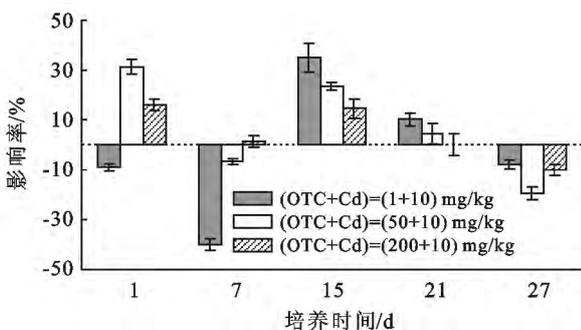


图 12 土霉素与镉复合污染对土壤磷酸酶活性的影响

3 结论

(1) 重金属镉单独污染时,对土壤微生物呼吸表现出先抑制后激活作用;对土壤酶活性具有显著抑制作用,平均抑制率从大到小依次为:蔗糖酶 > 磷酸酶 > 脲酶。

(2) 土霉素单独污染时,1 mg/kg 土霉素可显著激活土壤微生物呼吸,而 50 或 200 mg/kg 土霉素对土壤微生物呼吸表现为先抑制后激活;各处理浓度下的土霉素对蔗糖酶和脲酶活性具有抑制作用,对磷酸酶活性的影响呈现出一定的波动性。

(3) 土霉素与镉复合污染对土壤微生物呼吸和土壤酶活性的交互作用的影响较为复杂,交互作用类型与土霉素浓度有一定的关联性,主要表现为,当土

霉素的浓度为 1 和 200 mg/kg 时,复合污染主要为拮抗作用,但当土霉素的浓度为 50 mg/kg 时,复合污染主要为协同作用。

(4) 与土壤酶活性相比,土壤微生物呼吸对土霉素与镉胁迫条件下的反应更为敏感。

[参 考 文 献]

- [1] Yang Shiwoo, Cha Jongmun, Carlson K. Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography (A)*, 2005, 1097 (12): 40-53.
- [2] Hammesfahr U, Heuer H, Manzke B, et al. Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008, 40(7): 1583-1591.
- [3] Bao Yanyu, Wan Ying, Zhou Qixing, et al. Competitive adsorption and desorption of oxytetracycline and cadmium with different input loadings on cinnamon soil [J]. *Soil Sediment*, 2013, 13(2): 364-374.
- [4] Qiao Min, Chen Wangda, Su Jianqiang, et al. Fate of tetracyclines in swine manure of three selected swine farms in China [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2012, 24(6): 1047-1052.
- [5] 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]. *Anal. Chem.*, 2002, 74(7): 1509-1518.
- [6] Hamscher G, Sczesny S, Abu-Qare A, et al. Substances with pharmacological effects including hormonally active substances in the environment: Identification of tetracyclines in soil fertilized with animal slurry [J]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 2000, 107(8): 332-334.
- [7] 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): 265-269.
- [8] 鲍艳宇. 四环素类抗生素在土壤中的环境行为及生态毒性研究[D]. 天津:南开大学, 2008.
- [9] 黄爽,张仁铎,张家应,等. 土壤理化性质对吸附重金属镉的影响[J]. *灌溉排水学报*, 2012, 31(1): 19-22.
- [10] Yang Silin, Zhou Dequn, Yu Huayong, et al. Distribution and speciation of metals (Cu, Zn, Cd and Pb) in agricultural and non-agricultural soils near a stream up-river from the Pearl River, China [J]. *Environmental Pollution*, 2013, 177(6): 64-70.
- [11] 刘威,束文圣,蓝崇钰. 宝山莴菜:一种新的镉超富集植物[J]. *科学通报*, 2003, 48(19): 2046-2049.

- [12] 赵哲, 冒小鸥. 畜禽饲料中镉污染情况及猪肾镉含量调查[J]. 江苏预防医学, 2008, 19(1): 36-37.
- [13] 余萍. 畜禽饲料中镉的污染危害及控制[J]. 贵州畜牧兽医, 2010, 34(1): 34-35.
- [14] 于炎湖. 警惕饲料中镉的污染与危害[J]. 中国饲料, 2001, 12(5): 21-23.
- [15] 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.
- [16] De Souza M J, Nair S, Bharathi P A. Metal and antibiotic-resistance in psychrotrophic bacteria from Antarctic marine waters[J]. *Ecotoxicology*, 2006, 15(5): 379-384.
- [17] 吴丹, 王友保, 李伟, 等. 镉胁迫对吊兰生长与土壤酶活性的影响[J]. 环境化学, 2012(10): 1562-1567.
- [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.
- [19] 刘琳, 向衡, 刘玉洪, 等. 人工湿地中土霉素胁迫对杂交狼尾草及土壤特征的影响[J]. 环境工程, 2014(5): 20-24.
- [20] Kong Weidong, Zhu Yongguan, Fu Baijie, et al. The veterinary antibiotics oxytetracycline and Cu influence functional diversity of the soil microbial community[J]. *Environmental Pollution*, 2006, 143(1): 129-137.
- [21] 王金花, 朱鲁生, 王军, 等. 4 种典型抗生素对土壤微生物呼吸的影响[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(11): 2232-2236.
- [22] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1986.
- [23] 沈国清, 陆贻通, 洪静波, 等. 菲和镉复合污染对土壤微生物的生态毒理效应[J]. 环境化学, 2005, 11(24): 662-665.
- [24] Gao Mingling, Song Wenhua, Zhou Qian, et al. Interactive effect of oxytetracycline and lead on soil enzymatic activity and microbial biomass [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2013, 36(9): 667-674.
- [25] Lu Mang, Xu Kui, Chen Jun. Effect of pyrene and cadmium on microbial activity and community structure in soil[J]. *Chemosphere*, 2013, 91(4): 491-497.
- [26] Mushtaq N. Effect of heavy metals contamination of soil by industrial/domestic effluents on size and activity of soil microbial biomass[D]. Pakistan: Arid Agriculture University, 2010.
- [27] Thiele B S, Beck I C. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass[J]. *Chemosphere*, 2005, 59(4): 457-465.
- [28] 王丽平. 典型外源抗生素在土壤中的转归及其与土壤微生物多样性的相互作用和机理研究[D]. 浙江 杭州: 浙江大学, 2008.
- [29] 董璐玺, 谢秀杰, 周启星, 等. 新型环境污染物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.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] 吴金水, 林启美, 黄巧云, 等. 土壤微生物生物量测定方法及其应用[M]. 北京: 气象出版社, 2002.
- [33] 郝英华, 李光德, 刘明明, 等. MTEB 和 Cd 复合作用对土壤酶活性和小麦吸收重金属的影响[J]. 水土保持学报, 2013, 27(3): 110-119.
- [34] 史长青. 重金属污染对水稻土酶活性的影响[J]. 土壤通报, 1995, 26(1): 34-35.
- [35] Gu C, Karthikeyan K G. Interaction of tetracycline with aluminum and iron hydrous oxides[J]. *Environ Sci. Technol*, 2005, 39(8): 2660-2667.
- [36] 程金金, 宋静, 陈文超, 等. 镉污染对红壤和潮土微生物的生态毒理效应[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(4): 577-586.
- [37] 张平, 廖柏寒, 曾敏, 等. 外源 Cd 对不同利用方式红壤脲酶活性的影响[J]. 环境工程学报, 2012, 6(6): 2029-2033.
- [38] 周礼恺. 土壤酶学[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [39] Yang Qingxiang, Zhang Jing, Zhu Kongfang, et al. Influence of oxytetracycline on the structure and activity of microbial community in wheat rhizosphere soil [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2009, 21(7): 954-959.
- [40] 陈智学, 谷洁, 高华, 等. 土霉素对堆肥过程中酶活性和微生物群落代谢的影响[J]. 生态学报, 2013, 33(21): 6957-6966.
- [41] 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.
- [42] 陆文龙. 重金属镉对土壤微生物活性影响的研究[D]. 吉林 长春: 东北师范大学, 2008.
- [43] Khan S, Cao Q, Hesham A, et al. Soil enzymatic activities and microbial community structure with different application rates of Cd and Pb [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2007, 19(7): 834-840.
- [44] Moreno J L, Garcla C, Hernandez T. Toxic effect of cadmium and nickel on soil enzymes and the influence of adding sewage sludge[J]. *Euro. J. Soil Sci.*, 2003, 54(2): 377-386.