

恩诺沙星残留对土壤微生物功能的影响

王加龙¹, 刘坚真¹, 陈杖榴², 邝永彬¹

(1. 华南农业大学 食品学院; 2. 华南农业大学 动物医学院, 广州 510642)

摘要:研究了恩诺沙星残留对土壤呼吸作用、纤维分解作用、氨化作用、硝化作用的影响,结果表明,相对较低浓度恩诺沙星残留(0.01μg/g 土,0.1μg/g 土)刺激土壤呼吸作用,相对较高浓度恩诺沙星残留(1μg/g 土)对土壤呼吸作用产生抑制,药物作用活性维持期为 6d;恩诺沙星残留对土壤纤维分解作用影响较不明显;较低浓度恩诺沙星残留(0.01μg/g 土,0.1μg/g 土)对土壤氨化作用有刺激作用,而较高浓度恩诺沙星残留(1μg/g 土,10μg/g 土)则会对其起抑制作用,药物作用活性期为 9d;不同浓度恩诺沙星对土壤硝化作用影响极其显著,当恩诺沙星浓度达到 1μg/ml 时,在 3~9d 内,对土壤硝化作用有一定抑制作用。当恩诺沙星浓度达到 10μg/ml 时,强烈抑制了土壤硝化作用,直到本试验结束时,其抑制作用未见减弱。结果表明恩诺沙星残留影响了土壤微生物这些功能,因而可能影响到土壤特性和土壤中一些生态过程。

关键词:恩诺沙星残留;土壤微生物;土壤呼吸作用;土壤纤维分解作用;土壤氨化作用;土壤硝化作用

Effects of enrofloxacin residues on the functions of soil microbes

WANG Jia-Long¹, LIU Jian-Zhen¹, CHEN Zhang-Liu², KUANG Yong-Bin¹ (1. College of Food Science; 2. College of Animal Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou, 510642, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25(2): 279~282.

Abstract: Enrofloxacin is widely used to prevent animal infectious diseases, and can be applied by oral administration or subcutaneous injection. However, most of it may enter the environments in its undegraded form or metabolites after application, which results in enrofloxacin residues in soil. In this paper, the effects of enrofloxacin residues on soil ecological processes (soil respiration, soil cellulosic decomposition, soil ammonification, and soil nitrification) were studied. The results show that the effects of enrofloxacin residues were variable on these processes. Enrofloxacin had no significant effects on soil cellulosic decomposition independently of application doses. Enrofloxacin residues stimulated soil respiration at lower application dose (0.01μg/g, 0.1μg/g) over a period of 6d, while they had the inhibitory effects on soil respiration at higher application doses (1μg/g). Over a period of 9d, when enrofloxacin was applied at lower application dose (0.01μg/g, 0.1μg/g), its residues stimulated soil ammonification, while they inhibited soil ammonification at higher application dose (1μg/g, 10μg/g). Enrofloxacin residues (1μg/ml, 3~9d) had the inhibitory effects on soil nitrification at all application doses, which increased with increasing application dose. The inhibitory effects were not weakened even if the experiment was terminated. These results suggest that enrofloxacin residues can affect the functions of soil microbes, implying that enrofloxacin residues may affect soil properties and ecological processes in the soil.

Key words: enrofloxacin residues; soil microbes; soil respiration; soil cellulosic decomposition; soil ammonification; soil nitrification

文章编号:1000-0933(2005)02-0279-04 中图分类号:Q142,Q938,R994.6 文献标识码:A

兽药在防治动物疾病,促进动物生长以及提高其品质方面起重要作用。动物摄入药物后,一部分药物以原形或代谢产物方式积累于动物的组织、器官及其产品(如蛋、奶)中,造成兽药在动物性食品中的残留;另一部分则随排泄物进入周围土壤中,造

基金项目:广州市科技攻关资助项目(2000-2-035-01)

收稿日期:2003-12-19;修订日期:2004-09-19

作者简介:王加龙(1977~),男,江苏盐城人,硕士,主要从事兽药残留环境影响研究。E-mail: wangjialong2000@163.com

Foundation item: Guangzhou Scientific Key Project (No. 2000-2-035-01)

Received date: 2003-12-19; Accepted date: 2004-09-19

Biography: Wang Jialong, Master, mainly engaged in effects of veterinary drug residue on environment. E-mail: wangjialong2000@163.com

成兽药在土壤环境中的残留。对于兽药在土壤环境中的残留问题,国外从 20 世纪 70~80 年代就已开始广泛研究,而我国目前基本缺乏这方面的研究^[1~3]。

恩诺沙星(Enrofloxacin)作为动物专用抗菌药,已广泛用于动物感染性疾病的预防和治疗。动物摄入药物后,一部分以原药及其代谢物形式随其排泄物进入到土壤环境中,造成恩诺沙星在土壤中的残留,势必会对土壤微生物物质转化包括呼吸作用、氨化作用、硝化作用、反硝化作用、纤维分解作用、固氮作用和土壤各种酶活性等产生影响。Babich 等^[4]提出一种化学污染物对某一生态系统中微生物的影响,可以间接反映出该化学品对此生态系统的影响。本文主要研究恩诺沙星残留对土壤呼吸作用、纤维分解作用、氨化作用、硝化作用的影响,评价其带来的后继作用,为环境监测与保护、农业生产提供生态依据。

1 材料与方法

1.1 供试土壤

采自华南农业大学花园苗圃,土质为黑黏土,饱和含水约为 50%左右,凉干后过 40 目筛。

1.2 土壤呼吸作用的测定

用碱吸收滴定法进行测定,步骤如下:土壤样品处理,取 4 个 500ml 广口瓶,瓶内盛 20ml 0.1mol/L 氢氧化钠。分别置 20g 供试土壤(含恩诺沙星分别为 0 μ g/g 土(CK)、0.01 μ g/g 土、0.1 μ g/g 土、1 μ g/g 土)于纱布上,塞上瓶塞,压住纱布,是土壤悬于瓶中(为增强呼吸作用,土壤中分别已加入 0.1g 葡萄糖),并用纱布蒙住,塞紧瓶塞,于 28℃培养箱中培养。以酚酞为指示剂,用 0.1mol/L 盐酸滴定。同时,另取同样体积广口瓶,同上处理,唯不加土壤作为空白。根据两者之差计算出二氧化碳释放量。每隔 2d 测定 1 次,共 7 次,试验重复 3 次。

1.3 土壤纤维分解作用的测定

将白细布剪成 3cm×8cm 大小布条,置于 0.02mol/L 硫酸中,加热煮沸,直至布条与碘液不呈蓝色反应为止。取出布条,用水洗去多余的酸,置 105℃烘至恒重并称重。称 5 份 550g 供试土壤(含恩诺沙星分别为 0 μ g/g 土(CK)、0.01 μ g/g 土、0.1 μ g/g 土、1 μ g/g 土、10 μ g/g 土),每份分为 2 份。将其中 1 份置于 20cm×28cm 塑料盘中,铺平。然后将白细布平铺其上,勿重叠。再将另一份土壤覆于其上。用牛皮纸盖在盘上以减慢水分的蒸发。于 28℃培养箱中培养。取出 3 个布条,仔细洗去布条上的土粒,105℃烘至恒重并称重。根据培养前后布条失重的百分数表示纤维分解作用的强度。每隔 4d 各处理测定 1 次,共 7 次,试验重复 3 次。

1.4 土壤氨化作用的测定

1.4.1 氨态氮标准曲线的绘制 分别吸取氨态氮的标准溶液 0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5ml 置于 25ml 容量瓶中,用蒸馏水稀释至 10ml,加入 0.8ml 奈氏试剂,摇匀。缓缓地加入 4ml 1mol/L 的氢氧化钠,显色后稀释至刻度。10min 后,在分光光度计上波长 460nm 处测定其吸光度。以氨态氮质量为横坐标,以吸光度为纵坐标绘成标准曲线。

1.4.2 土壤氨化作用的测定 取 5 支 1000ml 三角瓶,各加入 150g 供试土壤,向土壤中加入灭菌的 0.2%蛋白胨 5ml,氨化菌液体培养基 2ml,并加入恩诺沙星使其终浓度分别为 0(CK)、0.01、0.1、1、10 μ g/g 土,最终土:水=3:1。把上述三角瓶塞上棉塞置于 28℃恒温培养箱中培养。康维皿扩散试验:从三角瓶中称取土壤 20g,加入 1mol/L 氯化钾溶液 80ml,振荡浸提 1h,过滤,吸取滤液 4ml,置于康维皿外室,中心小室加入 2ml 0.1mol/L 的硫酸。然后在皿盖边沿涂上阿拉伯胶,盖上皿盖,留一小孔,迅速由小孔用滴管加入 1ml 40%的氢氧化钠溶液。立即盖严并摇动,置于 40℃恒温箱中放置 4h。取出,中心小室溶液用 10ml 蒸馏水,分 4 次转移至 25ml 容量瓶中。奈氏试剂显色:方法与上述氨态氮标准曲线的绘制相同。对照标准曲线查出氨态氮含量。各处理每 3d 测定 1 次,共 7 次,试验重复 3 次。

1.5 土壤硝化作用的测定

1.5.1 亚硝酸根标准曲线的绘制 吸取亚硝酸根标准液(每毫升含亚硝酸根 0.01mg)0、1、2、3、4、5、6、7、8、9ml,分别放入 50ml 容量瓶中,稀释至约 40ml,加入 1ml 格里斯试剂 I,放置 10min。再加入 1ml 格里斯试剂 II 和 1ml 2%醋酸钠溶液,显色后稀释至刻度,放置 10min 后,在分光光度计上波长 520nm 处测定其吸光度。以亚硝酸根质量为横坐标,以吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

1.5.2 土壤硝化作用的测定 取 5 个 250ml 三角瓶,分别加入 100ml 硝化细菌培养基,121℃灭菌 20min,冷却后分别加入 1g 供试土壤,并加入恩诺沙星使其浓度分别为 0(CK)、0.01、0.1、1、10 μ g/ml)。把三角瓶放入 28℃培养箱中培养。亚硝酸根含量的测定为格里斯试剂显色:从三角瓶中吸取 5ml 过滤,取滤液 1ml 于 50ml 容量瓶中,以下步骤与亚硝酸根标准曲线的绘制相同。对照标准曲线查出亚硝酸根含量。各处理每 3d 测定 1 次,共 7 次,试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 恩诺沙星残留对土壤微生物的物质转化能力的影响

2.1.1 恩诺沙星残留对土壤呼吸作用的影响 结果见图 1,不同浓度恩诺沙星处理土壤后,药物作用第 2 天,各浓度土壤中二

氧化碳释放量低于对照。药物作用第 4 天,浓度为 0.01、0.1 $\mu\text{g/g}$ 土壤中二氧化碳释放量分别比对照高 11.19%和 4.52%,而浓度为 1 $\mu\text{g/g}$ 的土壤中二氧化碳释放量比对照低 7.7%。以药物作用第 4 天与作用第 2 天相比较,不同浓度药物处理土壤样品中二氧化碳释量变化百分率:0.01、0.1、1 $\mu\text{g/g}$ 土分别比 CK 高 11.81%、高 5.8%、低 3.03%。所以在药物作用 2~4d,相对较低浓度恩诺沙星残留(0.01、0.1 $\mu\text{g/g}$ 土)对土壤呼吸作用有刺激作用,而相对较高浓度(1 $\mu\text{g/g}$ 土)则对其产生抑制作用。药物作用活性期为 6d,6d 后各处理二氧化碳释放量基本一致。

2.1.2 恩诺沙星残留对土壤纤维分解作用的影响 结果如图 2 示,不同浓度恩诺沙星处理土壤后,从第 4 至第 28 天,布条平均每天失重百分率为:0.01、0.1、1、10 $\mu\text{g/g}$ 土分别比 CK 低 0.03%、0.01%、0.19%和 0.15%。相对较低浓度恩诺沙星(0.01、0.1 $\mu\text{g/g}$ 土)对土壤纤维分解作用基本没有影响,而相对较高浓度(1、10 $\mu\text{g/g}$ 土)则对土壤纤维分解有微弱抑制作用。

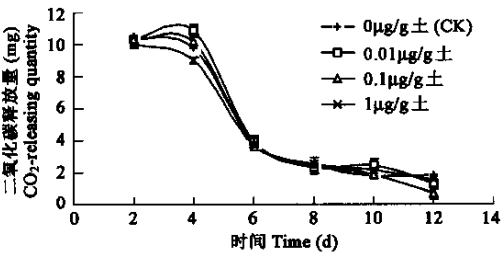


图 1 不同浓度恩诺沙星残留对土壤呼吸作用的影响

Fig. 1 The effect of different concentration of enrofloxacin residue on soil respiration

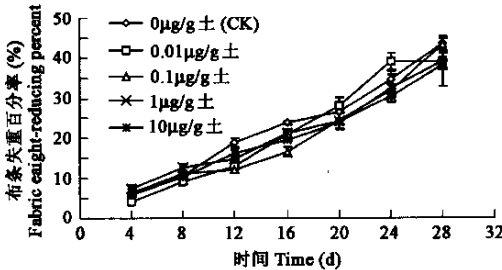


图 2 不同浓度恩诺沙星残留对土壤纤维分解作用的影响

Fig. 2 The effect of different concentration of enrofloxacin residue on soil cellulolytic action

2.1.3 恩诺沙星残留对土壤氨化作用的影响 结果见图 3,不同浓度恩诺沙星对土壤氨化作用影响差异较大。0~9d 内,含药量为 0.01、0.1 $\mu\text{g/g}$ 的土壤中氨态氮的浓度高于对照,而含药量为 1、10 $\mu\text{g/g}$ 的土壤中氨态氮浓度则低于对照。药物作用第 3 天,各浓度药物残留土壤中氨态氮浓度变化与 CK 相比:0.01、0.1、1 $\mu\text{g/g}$ 土、10 $\mu\text{g/g}$ 土分别比 CK 高 32.82%、高 7%、低 1.27%、低 22.22%。说明较低浓度恩诺沙星残留(0.01、0.1 $\mu\text{g/g}$ 土)对土壤氨化作用有刺激作用,而较高浓度恩诺沙星残留(1、10 $\mu\text{g/g}$ 土)则会对其起抑制作用。药物作用活性期为 9d,9d 后各处理土壤中氨态氮基本一致,说明恩诺沙星对土壤氨化作用影响消失。

2.1.4 恩诺沙星残留对土壤硝化作用的影响 结果见图 4,3d 内各浓度对土壤硝化作用影响不明显。药物作用第 6 天,浓度为 1 $\mu\text{g/ml}$ 和 10 $\mu\text{g/ml}$ 的土壤中硝化作用明显受到抑制,抑制率分别达 91%和 591%。药物作用第 9 天,浓度为 1 $\mu\text{g/ml}$ 的土壤硝化作用抑制消失,而浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$ 的土壤硝化作用抑制依然明显,直到本试验结束时,其抑制作用未见减弱。因此,不同浓度恩诺沙星对土壤硝化作用影响是极其显著的。

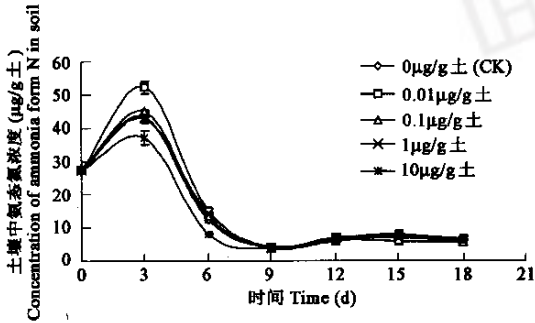


图 3 不同浓度恩诺沙星残留对土壤氨化作用的影响

Fig. 3 The effect of different concentration of enrofloxacin residue on soil ammonification

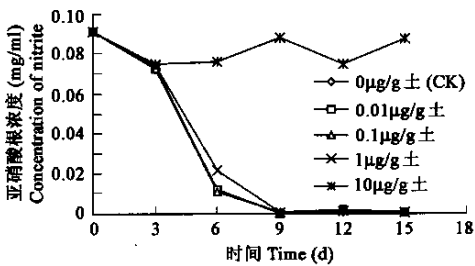


图 4 不同浓度恩诺沙星残留对土壤硝化作用的影响

Fig. 4 The effect of different concentration of enrofloxacin residue on soil nitrification

3 讨论

微生物在土壤生态系统的物质转化和能量流动中起重要作用。恩诺沙星残留于土壤后,对土壤微生物产生影响,从而对土壤生物活性产生影响。

土壤呼吸作用可以看作衡量土壤微生物总的活性指标^[5~8]。结果显示,在药物作用活性期 6d 内,相对较低浓度恩诺沙星残留(0.01、0.1 $\mu\text{g/g}$ 土)对土壤呼吸作用有刺激作用,而相对较高浓度(1 $\mu\text{g/g}$ 土)则对其产生抑制作用。这说明高浓度恩诺沙星残留会抑制土壤微生物群体的生命活动,降低土壤呼吸作用,进而会影响土壤中有机质的分解与再循环,降低土壤肥力。

在测定土壤纤维分解作用过程中,发现不同浓度恩诺沙星残留的土壤中布条失重百分率基本一致,因此恩诺沙星残留对土壤纤维分解作用没有明显影响,其原因可能是土壤中分解纤维素的微生物很多,细菌、放线菌、真菌中都有,能分解纤维素的类型、其数量及活动强度皆受土壤环境因子影响,特别是纤维素分解微生物对土壤酸度较敏感,在通气良好的酸性土壤中纤维素分解主要靠真菌作用,试验土壤 pH 为 6.0。恩诺沙星抗菌机制主要是通过抑制原核生物特别是细菌 DNA 旋转酶活力使其 DNA 无法复制而起到杀菌作用,而对真核生物相应酶作用微弱,所以,恩诺沙星对土壤纤维分解作用没有明显作用是与药物作用机理一致的。

试验还表明:相对较低浓度恩诺沙星残留(0.01、0.1 $\mu\text{g/g}$ 土)对土壤氮化作用有刺激作用,而相对较高浓度恩诺沙星残留(1、10 $\mu\text{g/g}$ 土)则会对其起抑制作用。土壤氮化作用强度在一定程度上反映了土壤的供氮能力^[9,10]。因此,如果土壤中恩诺沙星残留长期保持着较高浓度,则降低了土壤供氮能力。

本试验发现不同浓度恩诺沙星对土壤硝化作用影响是极其显著的。当恩诺沙星浓度达到 1 $\mu\text{g/ml}$ 时,在 3~9d 内,对土壤硝化作用有一定抑制作用。当恩诺沙星浓度达到 10 $\mu\text{g/ml}$ 时,强烈抑制了土壤硝化作用,直到本试验结束时,其抑制作用未见减弱。可能是硝化细菌对恩诺沙星很敏感,在相对较低浓度时就受到抑制;也有可能是和本试验的测定方法有关,该方法测定的实际是恩诺沙星对土壤悬浊液状态下微生物硝化作用的影响,因其土壤含量少,对药物的吸附少,以及药物对微生物作用均匀等,使得结果极其显著。土壤硝化作用与氮化作用一样,都是生物圈内氮循环的重要环节^[11~13],因此,土壤中恩诺沙星残留若长期保持着较高水平,则会破坏土壤的氮循环。

References:

- [1] Sun Z J. Livestock agriculture contamination and pasture environmental protection technology. *Chinese Animal Health Protection*, 2000, **11**:26~27.
- [2] Chen Z L, Yang G F, SUN Y X. Research progress of toxicity and ecological toxic principle of veterinary residue. *Journal of South Agricultural University*, 2001, **2**(1):88~91.
- [3] Xu S X. Research status of veterinary residue in China. *Chinese Animal Protection*, 2000, **10**:105~107.
- [4] Babich E, Stot G. Developing standard for environmental toxicants: The need to consider abiotic environmental factors and microbe mediated ecological processes. *Environ. Health Perspect*, 1983, **49**:345~353.
- [5] Beyer L. Intersite characterization and variability of soil respiration in different arable and forest soils. *Biology and Fertility of Soils*, 1991, **12**:122~126.
- [6] Buyanovsky G A, Wagner G H, Gantzer C J. Soil respiration in a winter wheat ecosystem. *Soil Science Society of America Journal*, 1986, **50**:338~344.
- [7] Zelles L, Bahig M E. Measurement of bioactivity based on CO₂-released and ATP content in soil after different treatments. *Chemosphere*, 1984, **13**(8):899~913.
- [8] Zhu L S, Zhang Y F, Fan D F. Study on the effects of phoxim, fenprothrin and its mixture on respiration of soil microbe. *Agroenvironmental Protection*, 1999, **18**(1):25~27.
- [9] Goos F J, Fairlie T E. Effect of ammonium thiosulfate and liquid fertilizer droplet size on urea hydrolysis. *Soil Science Society of America Journal*, 1988, **52**(2):522~524.
- [10] Kanani T A, Mackenzie A F, Blenkhorn H. The influence of formula modification and additives on ammonium losses from surface applied urea-ammonium nitrate solutions. *Fertilizer Research*, 1990, **22**:49~59.
- [11] Klaver A L, Marrhews R A. Effects of oxytetracycline on nitrification in a model aquatic system. *Aquaculture*, 1994, **123**(3-4):237~247.
- [12] Landi L, Badalucco L, Pomare F, *et al.* Effectiveness of antibiotics to distinguish the contributions of fungi and bacteria to net nitrogen mineralization, nitrification and respiration. *Soil Biology and Biochemistry*, 1993, **25**(12):1771~1778.
- [13] Malhi S S, Nyborg M. Inhibiting nitrification and increasing yield of barely by band placement of thiourea with fall applied urea. *Plant and Soil*, 1984, **77**:193~206.

参考文献:

- [1] 孙振钧. 畜牧业污染与畜牧环保技术. 中国动物保健, 2000, **11**:26~27.
- [2] 陈杖榴, 杨桂芳, 孙永学, 等. 兽药残留的毒性与生态毒理研究进展. 华南农大学学报, 2001, **2**(1):88~91.
- [3] 徐示新. 我国兽药残留工作的现状. 中国动物保护, 2000, **10**:105~107.