

朱秀辉,丁丹,茹淑玲,等. Ca^{2+} 和四环素类抗生素单体、复合溶液及土壤解吸液对白菜种子萌发和根芽伸长的影响[J]. 江苏农业科学, 2018,46(17):141-144.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.17.036

Ca^{2+} 和四环素类抗生素单体、复合溶液及土壤解吸液对白菜种子萌发和根芽伸长的影响

朱秀辉¹, 丁丹¹, 茹淑玲¹, 檀笑², 解启来¹, 邓春军¹, 曾巧云¹

(1. 华南农业大学资源环境学院, 广东广州 510642; 2. 环境保护部华南环境科学研究所, 广东广州 510655)

摘要:采用水培法研究 Ca^{2+} 和3种四环素类抗生素(四环素、土霉素、金霉素)溶液对白菜(*Brassica campestris* ssp. *chinensis*)种子萌发、根和芽伸长抑制的影响。结果表明:在设置浓度范围内, Ca^{2+} 和3种抗生素单体及其复合溶液对白菜种子的萌发影响显著,发芽率在60.00%~88.33%,而广州北郊供试土壤的解吸液抑制白菜种子萌发; Ca^{2+} 和3种四环素类抗生素单体以及它们的复合溶液均能抑制白菜根和芽伸长,且复合溶液对根和芽的伸长抑制作用明显高于3种单体和 Ca^{2+} ,其生态毒性大小顺序为 Ca^{2+} 和抗生素的复合体溶液 > 3种抗生素单体溶液 > Ca^{2+} 溶液,并且根长 > 芽长。3种抗生素对白菜种子根伸长的影响顺序为金霉素 > 四环素 > 土霉素。当抗生素单体溶液处于低浓度 (<5 mg/L)时,对芽伸长有一定的促进作用。

关键词:四环素类抗生素; Ca^{2+} ; 发芽率; 土壤解吸液; 生态毒性; 白菜

中图分类号: S351.1; S634.301; X592 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)17-0141-04

抗生素作为促生长剂和预防、治疗人类及畜禽等动物疾病的特效抗菌药而在全球范围内广泛使用。但这些抗菌药有30%~90%不能被机体的组织细胞吸收,以药物原液或其代谢物的形成随粪便排出^[1]。畜禽粪便作为有机肥料是目前改善耕作土壤的主要和最前景的方法之一^[2],广泛应用于果蔬生产。抗生素进入土壤后易被吸附而长期滞留,危害环境和生态系统,干扰生态系统物质循环和能量流动^[3-4],降低土壤肥力,甚至会被农作物吸收富集^[5-6]而危害农产品安全。

四环素类抗生素(TCs)是一种使用非常普遍、价格低廉、副作用小且强有效的人畜共用抗菌药。据统计,2013年我国抗生素的总产量达248 000 t,消耗总量达162 000 t,其中用于动物的消耗量为84 240 t,用于人类的消耗量为77 760 t^[7]。白菜是人们最常食用的蔬菜且被大面积种植,它具有对污染物敏感、易于栽培、生命周期短等特性,常被用作评价生态毒

性的受试植物^[8-9]。因此,本研究选择常用的3种四环素类抗生素[四环素(TC)、土霉素(OTC)和金霉素(CTC)],研究钙离子(Ca^{2+})与四环素类抗生素单体、复合溶液以及广东省广州市北郊供试土壤解吸液对白菜(*Brassica campestris* ssp. *chinensis*)种子的萌发、根和芽伸长的影响,旨在评价复杂体系四环素类抗生素对生态环境的影响,为其风险评价提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

3种四环素类抗生素:四环素、金霉素和土霉素,均购买于CATO(美国),纯度均>96.2%。 CaCl_2 、次氯酸钠溶液等试剂购买于广州化学试剂厂。白菜种子购买于当地市场上的种子。公司。

1.2 仪器设备

本试验所用仪器设备包括培养箱、离心机、高压灭菌锅、直径90 mm的玻璃培养皿、容量瓶(50、100 mL)、10 mL量筒、10 mL移液管、100 mL烧杯、温度计、玻璃棒、镊子、剪刀、刻度尺、保鲜膜、纱布、定性滤纸(90 mm定性滤纸)。

1.3 样品采集

供试土壤采集于广东省广州市北郊区域典型蔬菜基地,均为0~20 cm土层样品,风干磨细过60目筛,经检测后筛选

收稿日期:2017-04-18

基金项目:国家自然科学基金(编号:41471215);广东省科技计划(编号:2016A020210107);东莞市社会发展项目(编号:2016108101012)。

作者简介:朱秀辉(1990—),男,湖南永州人,硕士研究生,研究方向为有机污染控制技术。E-mail: zghnjyzzh@163.com。

通信作者:曾巧云,博士,副教授,研究方向为农业生态系统有机污染行为及调控。E-mail: qiaoyunzeng@126.com。

学报,2017,7(4):51-57.

[26] 高建国,徐根娣,李文巧,等. 濒危植物长序榆(*Ulmus elongata*)幼苗光合特性的初步研究[J]. 生态环境学报,2011,20(1):66-71.

[27] 王玉佳,姜华,毕玉芬,等. 紫花苜蓿光合作用对干热条件的生理响应[J]. 云南农业大学学报(自然科学版),2011,26(2):

190-193.

[28] Ouzounis T, Razi Parjikolaie B, Fretté X, et al. Predawn and high intensity application of supplemental blue light decreases the quantum yield of PS II and enhances the amount of phenolic acids, flavonoids, and pigments in *Lactuca sativa* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 19.

不含3种目标抗生素的土壤样品。供试土壤地理位置:113°17'46"E、23°29'16"N,理化性质:全氮含量为1.70 g/kg,有机质含量为36.55 g/kg,有效磷含量为21.78 mg/kg,速效钾含量为108.91 mg/kg,pH值为7.28,阳离子交换量(CEC)为9.13 cmol/kg。

1.4 试验方法

1.4.1 解吸液的获取 参照 OECD guideline 106(2000) 批量平衡法对供试土壤进行吸附解吸试验,准确称取若干份相同质量的土样0.500 0 g(精确至0.499 5~0.500 5 g)于100 mL玻璃离心管中,高压湿法间歇灭菌3次(121 °C,100 kPa,20 min),烘箱中于60 °C烘干;加入过滤法灭菌的CTC、OTC溶液及背景电解质溶液CaCl₂,使最终溶液体积为20 mL,CaCl₂溶液浓度为0.01 mol/L。系列TC、CTC、OTC浓度均为1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 mg/L。旋涡混匀,在(25±1) °C及150 r/min条件下,于恒温振荡箱中黑暗条件下振荡24 h,之后在4 500 r/min条件下离心10 min,去其上清液。然后重新加入0.01 mol/L CaCl₂溶液20 mL,继续振荡24 h,离心后取其上清液供后续试验。以上处理均做3个重复,其中不含抗生素的处理作为空白,不含土壤的处理作为对照(CK)。

1.4.2 种子发芽率试验 4种供试液CaCl₂溶液、抗生素溶液、含0.01 mol/L CaCl₂抗生素溶液及解吸溶液均用去离子水配制。CaCl₂溶液浓度设置为5×10⁻⁵、1.0×10⁻⁴、2.0×10⁻⁴、1.0×10⁻³、2.5×10⁻³、1.0×10⁻² mol/L(0.01 mol/L),抗生素溶液和含0.01 mol/L CaCl₂的抗生素溶液的浓度设置同吸附解吸试验浓度,以去离子水为对照(CK)。

将白菜种子在0.2%次氯酸钠溶液中浸泡消毒15 min,然后用去离子水冲洗3~5遍。在40 °C温水中浸泡种子2~3 h直至水冷,重复2次,白菜种子发芽试验采用保湿培养法,取2层灭菌后的滤纸平铺在玻璃培养皿(直径D=90 mm)中,吸取10 mL供试溶液后,将筛选好的种子随机取20粒平放在滤纸上,设置3个重复。在黑暗(可防止抗生素发生光水解)的培养箱内于25 °C培养48 h后,取出并记录种子的发芽率并测量各处理浓度下种子芽长及根长(芽长:下胚轴基部至芽顶端的长度;根长:下胚轴基部至主根尖端的长度)。

1.4.3 剂量-效应曲线拟合 不同四环素类抗生素对白菜种子根和芽伸长的抑制性的剂量-效应关系曲线借鉴 Logistic 分布模型,将模型转化为对数进行拟合:

$$y = a \ln(x) + b。$$

式中:y为抑制长度,cm;x为培养试液的有效浓度,mg/L;a、b为常数。

1.5 数据分析

采用 Excel 2010 进行数据分析,计算3次重复的平均值及标准偏差,绘制图形,并用 SPSS 17.0 对数据进行显著性分析,差异显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 Ca²⁺ 单体溶液对白菜种子发芽率和根、芽伸长的影响

不同浓度Ca²⁺中白菜种子发芽率在71.67%~88.33%(表1),方差分析发现,Ca²⁺浓度对白菜种子发芽率有极显著影响($P<0.01$),对芽伸长和根伸长具有显著影响($P<0.05$,图1)。

表1 不同浓度Ca²⁺溶液处理下白菜种子的发芽率

Ca ²⁺ 浓度(mol/L)	发芽率(%)
0	88.33±2.89a
5×10 ⁻⁵	73.33±2.89d
1.0×10 ⁻⁴	81.67±0.58abc
2.0×10 ⁻⁴	76.67±2.89bcd
1.0×10 ⁻³	75.00±5.00cd
2.5×10 ⁻³	83.33±2.89ab
1.0×10 ⁻²	71.67±2.89d

注:表中数据为平均值±标准差。同列数据后标有不同大写、小写字母分别表示在0.01、0.05水平上差异显著。

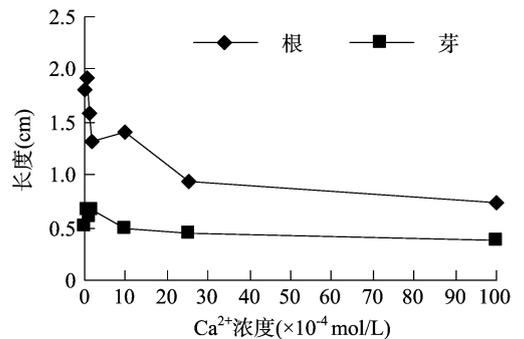


图1 不同浓度Ca²⁺溶液对白菜种子芽伸长和根伸长的影响

由图1可知,白菜种子发芽后根系长度随着Ca²⁺浓度增加呈先增大后逐渐减小的趋势。与CK(0 mol/L)相比,5×10⁻⁵ mol/L浓度条件促进根系增长,可能是由于Ca²⁺与细胞液进行物质交换,激活了细胞^[10]。随着Ca²⁺浓度的增加,根系长度相比于CK均出现抑制现象,且1.0×10⁻² mol/L浓度条件下根系长度约是CK的1/3,抑制了根的伸长。Ca²⁺浓度对芽生长影响较小,相比于CK,5×10⁻⁵~2.0×10⁻⁴ mol/L CaCl₂溶液处理的芽均有明显伸长,但1.0×10⁻³~1.0×10⁻² mol/L CaCl₂对芽伸长无明显影响。根伸长对Ca²⁺比芽伸长更为敏感。

2.2 3种四环素类抗生素单体溶液对白菜种子发芽率及根和芽伸长的影响

不同浓度梯度下,3种四环素类抗生素单体处理下白菜种子发芽率在61.67%~88.33%,结果见表2。方差分析发现,四环素和土霉素对白菜的发芽率有显著影响,金霉素对白菜种子发芽率的影响达极显著水平。

从图2可知,金霉素、土霉素、四环素对白菜根伸长表现为明显的抑制作用,且低浓度抗生素溶液对白菜根伸长的抑制强于高浓度。在低浓度抗生素处理下(0~5.0 mg/L),随着浓度的提高,根伸长抑制趋势越明显。而在抗生素浓度>5.0 mg/L时,根伸长抑制作用随浓度的提高有所降低。低浓度时,3种四环素类抗生素对根伸长的抑制作用有明显差异,白菜根伸长对金霉素最为敏感,与空白对照相比,金霉素浓度增至1.0 mg/L,白菜根伸长从1.81 cm缩短至0.93 cm,缩短近50%。而土霉素浓度达到5.0 mg/L时,才对白菜根伸长的抑制最为明显。高浓度时,3种四环素类抗生素对根伸长抑制作用无明显差异。

3种四环素类抗生素对白菜芽伸长抑制作用较小。在0~2.0 mg/L浓度范围内,四环素和土霉素对芽生长均具有

表2 抗生素单体溶液对白菜种子发芽率的影响

抗生素	不同抗生素浓度下的发芽率(%)					
	0 mg/L	1.0 mg/L	2.0 mg/L	5.0 mg/L	10.0 mg/L	20.0 mg/L
TC	88.33 ± 2.89Aa	78.33 ± 2.89Ab	75.00 ± 5.00Bbc	78.33 ± 2.89Ab	76.67 ± 2.89Bb	68.33 ± 5.77Bc
OTC	88.33 ± 2.89Aa	73.33 ± 5.77Bb	71.67 ± 5.77Bb	75.00 ± 5.00Bb	78.33 ± 2.89Ab	71.67 ± 2.89Bb
CTC	88.33 ± 2.89Aa	61.67 ± 2.89Cd	68.33 ± 2.89BCc	86.67 ± 5.77Aa	85.00 ± 0.00Aa	75.00 ± 5.00Bb

注:同行数据后标有不同大写、小写字母分别表示差异极显著($P < 0.01$)、显著($P < 0.05$)。表3同。

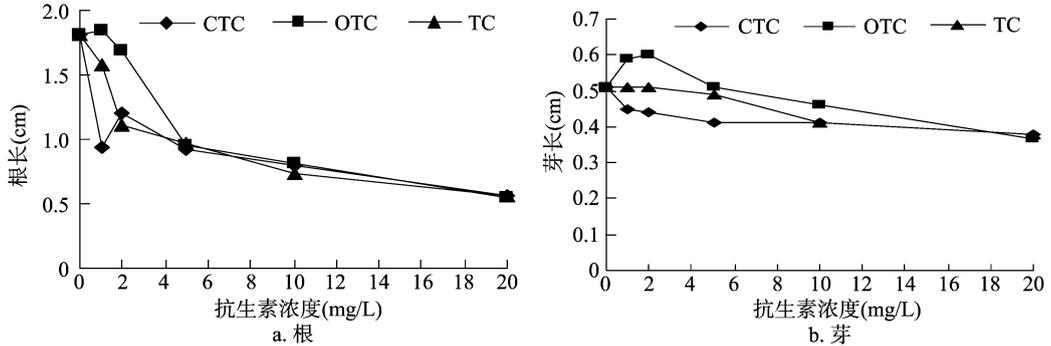


图2 不同浓度抗生素各单体溶液对白菜种子根和芽伸长的影响

一定的促进作用,其中土霉素的作用效果高于四环素。当浓度高于2.0 mg/L时,3种抗生素对芽伸长的影响开始出现差异,四环素浓度增至10.0 mg/L时,对芽长的抑制作用最为明显,土霉素浓度高于2.0 mg/L时,白菜芽生长随浓度的增加一直在减少;但金霉素对芽伸长在低浓度时稍有抑制作用,在5.0 mg/L时抑制效果最大,之后大约保持该抑制性。

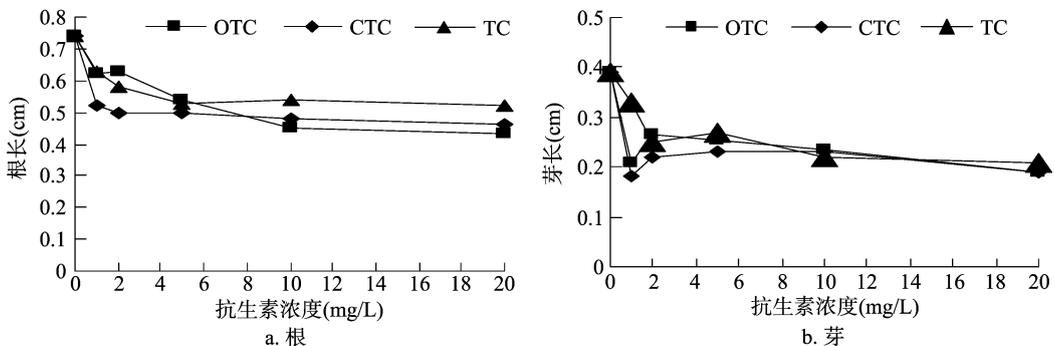
2.3 CaCl_2 溶液配制的抗生素溶液对白菜种子发芽率及根和芽伸长的影响

含0.01 mol/L Ca^{2+} 的抗生素各浓度处理结果表明,四环素和土霉素对白菜种子发芽有显著影响,金霉素对白菜种子发芽无显著影响。其发芽率在60.00%~81.67%(表3),略

低于只含抗生素单体的溶液。与0.01 mol/L CaCl_2 溶液相比,各浓度抗生素处理的白菜种子根长和芽长明显降低(图3)。 Ca^{2+} 和抗生素共存时,抗生素浓度由0增至5.0 mg/L,根长大幅度减小,当浓度大于5.0 mg/L,根长变化不明显。3种抗生素在5.0 mg/L的同浓度处理下,根长相差不大,与只含抗生素单体溶液的结果相似。0~5.0 mg/L浓度范围内,3种抗生素与 CaCl_2 复合溶液对根伸长的影响顺序为金霉素>四环素>土霉素。当浓度低于2.0 mg/L时,四环素处理下芽生长呈明显的下降趋势;而土霉素和金霉素处理的芽长在0~1.0 mg/L范围内大幅度下降,在1.0~2.0 mg/L浓度下呈微增长趋势,但依旧低于不含抗生素处理(0 mg/L)的芽长。

表3 CaCl_2 和抗生素复合溶液处理对白菜种子发芽率的影响

抗生素	不同抗生素浓度下的发芽率(%)					
	0 mg/L	1.0 mg/L	2.0 mg/L	5.0 mg/L	10.0 mg/L	20.0 mg/L
TC	71.67 ± 2.89ABbc	75.00 ± 0.00ABab	66.67 ± 7.63Bc	68.33 ± 2.89Bbc	71.67 ± 2.89ABbc	80.00 ± 5.00Aa
OTC	71.67 ± 2.89ABab	81.67 ± 5.77Aa	68.33 ± 2.89ABb	66.67 ± 2.89Ab	60.00 ± 10.00Bb	70.00 ± 10.00ABab
CTC	71.67 ± 2.89Aa	73.33 ± 5.77Aa	66.67 ± 2.89Aa	73.33 ± 5.77Aa	71.67 ± 5.77Aa	71.67 ± 2.89Aa

图3 含 CaCl_2 溶液的不同浓度抗生素单体溶液对种子根和芽伸长的影响趋势

2.4 含 Ca^{2+} 的抗生素复合溶液和只含抗生素单体溶液处理的比较分析

0.01 mol/L CaCl_2 溶液配制的抗生素各处理浓度对根和芽伸长的抑制大于用去离子水配制的抗生素各标液,方差分

析表明,2种配制方法中3种抗生素均出现处理间的显著差异($P < 0.05$),且各浓度处理下,只含抗生素单体溶液处理的种子根和芽的长度约是含 Ca^{2+} 和抗生素复合溶液处理的2倍。因此, Ca^{2+} 和3种四环素类抗生素的复合溶液对白菜根

和芽伸长抑制明显大于只含抗生素单体溶液。另外,解吸液试验结果显示,除不含土壤的空白对照组种子发芽[发芽率在(50±5)%]外,其余试验组种子均未发芽。一方面是白菜种子对污染物极为敏感,另一方面可能是供试土壤中大量阳离子(9.13 cmol/kg)和金属离子随着解吸过程进入解吸溶液,并与抗生素形成毒性更大的螯合物^[11-12]。

2.5 Ca²⁺和3种四环素类抗生素单体溶液及其复合溶液对白菜种子根长和芽长的生态毒理效应

植物的半抑制浓度常用于评价污染物的毒性强弱。由表4可见,水溶液中含Ca²⁺和抗生素对白菜根长和芽长抑制作用最强,根长IC₅₀均小于0.1 mg/L,芽长IC₅₀小于12 mg/L,说明白菜种子的根长是含Ca²⁺和抗生素类有机污染生态毒理学的敏感生态学指标^[13],且对根长和芽长的毒性大小为

Ca²⁺和抗生素的复合溶液>3种抗生素单体溶液>Ca²⁺溶液,并且根长>芽长。这可能是由于植物对抗生素的吸收大部分在根部^[14],只有少部分转移到其他部分并积蓄^[15]。而且金属离子与有机污染的复合毒性大于单一污染物的毒性。从而使白菜种子在较低含量的复合污染胁迫下,根部首先受到影响被抑制时,芽吸收种子自身养分而不被抑制。当然,随着抗生素和Ca²⁺的单体及复合溶液浓度增加,污染物会被根部吸收,甚至通过胚进而影响芽伸长和植株的生长^[16]。这与林琳等的研究结果^[8,15,17]相似。在同等条件下,Ca²⁺和抗生素的复合溶液对白菜种子根长和芽长抑制效应最大,其次是3种四环素类抗生素的单体,Ca²⁺的抑制效应最小,且均为根长的抑制效应大于芽长。

表4 Ca²⁺和3种四环素类抗生素的单体及复合溶液对白菜种子根长和芽长的半抑制浓度

类别	半抑制浓度(mg/L)						
	Ca ²⁺	TC	OTC	CTC	TC(含Ca ²⁺)	OTC(含Ca ²⁺)	CTC(含Ca ²⁺)
根长	178.54	6.03	8.08	5.89	2.14×10 ⁻⁴	0.088	5.65×10 ⁻¹⁰
芽长	3 581.82	361.86	118.00	6 628.32	4.71	3.56	11.27

3 结论

Ca²⁺对白菜种子萌发有显著影响,且对白菜种子根伸长有明显的抑制性,但对芽伸长的影响不明显。金霉素单体溶液对白菜种子萌发有极显著影响,其次为四环素和土霉素。Ca²⁺和四环素的复合溶液、Ca²⁺和土霉素的复合溶液对白菜种子发芽率有显著影响,而Ca²⁺和金霉素的复合溶液无显著影响。

在本试验浓度范围内,3种四环素类抗生素单体对白菜根伸长具有明显的抑制趋势。当浓度低于5.0 mg/L时,对根伸长抑制效应大小排序为金霉素>四环素>土霉素;当低于2.0 mg/L时,对芽伸长有促进作用,其中土霉素对芽长的影响最大。

Ca²⁺和3种四环素类抗生素的复合溶液对白菜根和芽伸长的抑制效应明显大于抗生素单体溶液。对根长和芽长的毒性大小排序为Ca²⁺和抗生素的复合溶液>3种抗生素单体溶液>Ca²⁺溶液,并且对根长的影响大于芽长。

参考文献:

- [1] Karci A, Balcioglu I A. Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey[J]. Science of the Total Environment, 2009, 407(16): 4652-4664.
- [2] Song K Y, Li Y, Ouyang W, et al. Manure nutrients of pig excreta relative to the capacity of cropland to assimilate nutrients in China[J]. Procedia Environmental Sciences, 2012, 13: 1846-1855.
- [3] 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 and Biochemistry, 2008, 40(7): 1583-1591.
- [4] Liu W, Pan N, Chen W, et al. Effect of veterinary oxytetracycline on functional diversity of soil microbial community[J]. Plant Soil and

- Environment, 2012, 58(7): 295-301.
- [5] Migliore L, Cozzolino S, Fiori M. Phytotoxicity to and uptake of enroxacin in crop plants[J]. Chemosphere, 2003, 52(7): 1233-1244.
- [6] Redshaw C H, Wootton V G, Rowland S J. Uptake of the pharmaceutical Fluoxetine Hydrochloride from growth medium by Brassicaceae[J]. Phytochemistry, 2008, 69(13): 2510-2516.
- [7] Zhang Q Q, Ying G G, Pan C G, et al. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(11): 6772-6782.
- [8] 林琳, 安婧, 周启星. 土壤四环素污染对小白菜幼苗生长发育的生态毒性[J]. 环境科学, 2011, 32(8): 2430-2435.
- [9] 肖明月, 安婧, 纪占华, 等. 六种常见抗生素对小白菜种子萌发及生理特性的影响[J]. 生态学杂志, 2014, 33(10): 2775-2781.
- [10] 贾如, 雷梦琦, 徐佳妮, 等. 植物细胞中钙通道的分布及其在植物抗逆机制中作用的研究进展[J]. 植物生理学报, 2014, 50(12): 1791-1800.
- [11] 王明. 抗生素及其与重金属复合污染的玉米吸收和毒性研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2010.
- [12] 陈小莹. 抗生素与重金属复合污染的土壤生态毒理学效应研究[D]. 天津: 天津工业大学, 2011.
- [13] 鲍艳宇, 周启星, 谢秀杰. 四环素类抗生素对小麦种子芽与根伸长的影响[J]. 中国环境科学, 2008, 28(6): 566-570.
- [14] 汤贝贝, 张振华, 卢信, 等. 养殖废水中抗生素的植物修复研究进展[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(1): 224-232.
- [15] 魏子艳, 王金花, 夏晓明, 等. 三种抗生素对蔬菜种子芽与根伸长的生态毒性效应[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(2): 237-242.
- [16] 金彩霞, 陈秋颖, 刘建军, 等. 两种常用兽药对蔬菜发芽的生态毒性效应[J]. 环境科学学报, 2009, 29(3): 619-625.
- [17] 魏瑞成, 邵明诚, 陈明, 等. 金霉素和4-差向金霉素对油菜生长的影响及其在幼苗体内的积累[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(7): 1289-1295.