

氧四环素对稻田土壤铁砷形态转化的影响^①

全运平^{1,2,4}, 谷成³, 高娟^{1,2*}

(1 中国科学院大学南京学院, 南京 211135; 2 中国科学院南京土壤研究所, 南京 211135; 3 南京大学环境学院, 南京 210023; 4 生态环境部南京环境科学研究所, 南京 210042)

摘要: 为探究稻田土壤中抗生素和 As 复合污染的相互作用, 选取湖南省湘潭市某稻田土壤进行微宇宙培养试验, 通过模拟稻田土壤淹水-排干过程, 探究氧四环素(OTC)在此过程中对 Fe、As 氧化还原转化的影响。结果表明, 在淹水培养阶段, OTC 能够促进土壤铁矿物的还原, 使得溶解态、可交换态和吸附态/弱结晶型矿物态 Fe(II) 含量显著增加, 因此在排干阶段能生成更多的 ·OH 自由基, 促进溶解态 As(III) 的氧化。OTC 对 Fe(III) 具有络合和还原作用, 能够促进土壤含 Fe 物质的还原; 同时, 作为一种广谱的抗菌剂, OTC 的选择作用提高了异化铁还原菌的相对丰度, 同样能够促进铁矿物的还原溶解。此外在淹水阶段, OTC 作用下硫酸盐还原菌相对丰度增加, 这使得硫化物结合态 As 的生成量增加, 因而溶解态 As 含量降低。总体而言, OTC 在淹水阶段会促进土壤含 Fe 物质的还原溶解, 但能够通过提高 As 硫化物的生成量减少 As 的溶出; 在排干阶段则有利于生成更多的 ·OH, 将溶解态 As(III) 快速氧化, 这能够降低水稻吸收和转运 As 的风险。

关键词: 抗生素; 无机砷; 复合污染; 水稻土; 活性氧物种

中图分类号: X53 文献标志码: A

Effects of Oxytetracycline on Transformation of Iron and Arsenic in Paddy Soil

TONG Yunping^{1,2,4}, GU Cheng³, GAO Juan^{1,2*}

(1 University of Chinese Academy of Sciences, Nanjing, Nanjing 211135, China; 2 Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 211135, China; 3 School of Environment, Nanjing University, Nanjing 210023, China; 4 Nanjing Institute of Environmental Sciences, MEE, Nanjing 210042, China)

Abstract: To explore the interaction between antibiotic and As concomitant contamination in paddy soil, a microcosmic cultivation experiment was conducted on a paddy soil in Xiangtan City, Hunan Province. By simulating the process of flooding and drainage in paddy soil, the effect of oxytetracycline (OTC) on the redox conversion of Fe and As was investigated. Results indicated that OTC could promote the reduction of Fe minerals in flooding incubation period, and the contents of dissolved, exchangeable and adsorbed/weakly crystalline Fe in soil significantly increased. Therefore, more ·OH radicals were detected in drainage incubation period, which accelerated the oxidation of dissolved As(III). It was proposed that the complexation between OTC and Fe(III) induced electron transfer and promoted the reductive dissolution of Fe minerals. At the same time, the presence of OTC increased the relative abundance of dissimilatory Fe-reducing bacteria, which also promoted the reductive dissolution of Fe minerals. In addition, the relative abundance of sulfate reducing bacteria increased in the presence of OTC, thus the formation of arsenic sulfide increased accordingly, which would decrease the content of dissolved As in flooding period. In general, OTC promoted the reductive dissolution of Fe minerals in the flooding period, but reduced the dissolved As contents by enhancing the production of arsenic sulfide. In drainage period, the formation of ·OH induced the rapid oxidation of dissolved As (III). These processes could decrease the uptake and transport risks of As in rice.

Key words: Antibiotics; Inorganic arsenic; Concomitant contamination; Paddy soil; Reactive oxygenic species

①基金项目: 国家自然科学基金委联合基金项目(U21A20293)和国家自然科学基金项目(22176193, 41991331)资助。

* 通讯作者(juangao@issas.ac.cn)

作者简介: 全运平(1996—), 女, 河南开封人, 博士研究生, 主要研究方向为土壤环境化学。E-mail: tongyunping@nies.org

自然过程和工业生产活动产生大量含 As 的废气、废水、废渣, 它们通过干湿沉降、污水排放等方式进入土壤, 引起 As 污染问题。根据 2014 年《全国土壤污染状况调查公报》^[1], 我国土壤 As 点位超标率为 2.7%^[2]。高 As 地下水的灌溉以及含 As 农药化肥的使用进一步加剧了农田土壤 As 污染, 其中稻田土壤 As 含量远高于旱地土壤^[3]。有研究报道, As 在稻田中以溶解态、吸附态、有机质结合态、铁锰铝矿物结合态、硫化物结合态和残渣态等形式存在, 其生物有效性取决于其赋存形态。一般认为溶解态和吸附态的 As 具有较高的生物有效性, 容易被植物吸收, 有机质结合态和弱结晶型矿物结合态 As 在一定条件下也可转化成为有效态 As; 而强结晶型矿物结合态和残渣态 As 的生物有效性最低, 难以发生转化, 不易进入土壤溶液^[4]。高浓度 As 会降低土壤肥力, 影响作物生长, 并会随着植物吸收累积和食物链传递而危害人体健康^[5]。因此, 探明 As 在土壤中的赋存形态和转化规律, 对于 As 的环境风险控制具有重要环境意义。

Fe 是土壤中重要的活性元素, 其氧化还原循环对 As 的赋存形态变化有重要影响。由于 As 与 Fe 之间有较强的亲和力, 土壤中大部分 As 都被吸附在铁矿物表面或者生成 Fe、As 共沉淀矿物^[6-7]。在含 Fe 矿物还原溶解过程中吸附和共沉淀的 As 则被释放到土壤溶液中; 同时还原态铁矿物被氧化后能促进活性铁物种或活性氧物种(ROS)生成, 这些活性物质能显著促进 As(III) 的氧化和固定^[8-9]。稻田土壤发生频繁的氧化还原变化(淹水和排干交替过程), 导致 Fe 和 As 的赋存形态发生转化。在淹水阶段, 稻田土壤中氧气逐渐耗尽, 部分微生物只能以土壤无机组分作为呼吸链末端电子受体, 分解有机质完成生命代谢过程, 其中异化铁还原菌和硫酸盐还原菌较为常见^[10-11]。异化铁还原菌还原溶解铁矿物的过程中, 释放出大量与铁矿物结合的 As; 硫酸盐还原菌还原硫酸盐生成 S²⁻, 反而使 As、Fe 硫化物的生成量增加。在排干阶段, 氧气浓度逐渐增加, 导致还原态 Fe 被氧化, 这个过程将促进 As 的氧化和固定^[7]。

畜禽和水产养殖业大量使用抗生素, 用于疾病预防和提高品质, 但进入生物体的抗生素只有少量能吸收利用, 大部分会随排泄物进入环境, 进而通过有机肥的施用进入土壤。四环素类抗生素(TCs)分子结构中有多个羟基官能团, 能够与土壤组分形成氢键, 易于被土壤颗粒吸附, 以较高的浓度残留在土壤中^[12]。因此在施用有机肥或者调理剂的土壤中, TCs 和 As

是最常见的两类复合污染物。例如上海某养殖场周边稻田土壤中 TCs 和 As 检出浓度分别为 4.54~24.66 mg/kg 和 2.6~617.2 mg/kg^[13]; 北京等三地区 36 个土壤样本中 TCs 和 As 检出浓度分别为 0.78~15.20 mg/kg 和未检出~10.0 mg/kg^[14]; 浙江省部分养殖场周边稻田土壤中 TCs 和 As 检出浓度分别为 0.52~16.28 mg/kg 和 0.8~200.0 mg/kg^[15]。

TCs 对常见的革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、支原体和衣原体之类的微生物等有较强的抑制效果, 能影响土壤中微生物群落分布^[16]。由于微生物在稻田土壤淹水过程中对 Fe、As 的形态转化具有重要作用, 因此 TCs 作为抑菌剂或者杀菌剂, 能够通过改变铁还原菌、硫酸盐还原菌等微生物的种类或者丰度, 影响铁矿物或者硫酸盐的还原, 进而影响 Fe、As 的形态转化。另外根据本课题组前期的研究结果, TCs 具有还原性, 它们能够还原游离态 Fe(III)、无定形铁氧化物, 并生成的 ROS 显著促进 As(III) 的氧化和固定^[17-18]。基于 TCs 的多重作用, 研究其在实际土壤中对铁矿物还原和 As 转化的影响有重要的环境意义。

本研究选取湖南省湘潭市某稻田土壤作为供试土壤, 进行微宇宙培养试验, 模拟水稻生长阶段的淹水-排干过程, 探究 TCs 在此过程中对 Fe、As 氧化还原转化的影响。测定培养过程中土壤 pH, 氧化还原电位(Eh), 溶解态 Fe(II)、Fe(III) 和 As(III)、As(V) 的变化; 采用连续提取的方式, 提取并测定培养前后土壤固相中不同形态 Fe 和 As 的转化。使用灭菌后的土壤进行相同的淹水培养, 确定氧四环素(OTC)对土壤铁矿物的化学还原作用; 测定未灭菌土壤淹水培养后微生物群落多样性变化, 分析 OTC 对微生物群落分布的影响, 以期从化学还原作用和对微生物过程的影响两个方面阐明 OTC 在稻田土壤淹水-排干过程中对 Fe、As 形态转化的影响机制。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试土壤采集于湖南省湘潭市(27°44'25"N、112°52'6"E)某水稻田表层土(0~20 cm)。将土壤自然风干、剔除异物、碾碎和研磨、过筛, 其基本理化性质为 pH 5.72, 阳离子交换量 11.75 cmol/kg, 有机质含量 24.90 g/kg, 总 Fe 含量 24.02 g/kg, 总 As 含量 56.40 mg/kg。试验中氯化钙、乙二胺四乙酸二钠、柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸氢二钠、焦磷酸钠、盐酸羟胺、氢氟酸、乙酸、草酸铵和苯甲酸等均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司; 甲醇和乙腈为色谱纯,

购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 盐酸、硫酸和硝酸均为优级纯, 购自南京化学试剂股份有限公司。

1.2 试验设置

称取 4 g 土壤样品于 40 mL 棕色西林瓶中, 分别加入 10 mL 不同浓度 OTC 溶液, 使其在土壤中的浓度分别为 0、10、25 和 50 mg/kg, 记作 OTC-0、OTC-10、OTC-25 和 OTC-50。使用 PTFE 垫片和铝盖对西林瓶进行密封处理, 避光放置在振荡箱中培养 21 d(150 r/min, 25°C ± 1°C, 厌氧培养阶段)。土壤厌氧培养结束后, 将西林瓶开盖, 使用多孔透气膜(<0.2 μm)封口, 在保证与外界气体交换的同时可避免微生物污染, 继续避光放置在振荡箱中培养 9 d(好氧培养阶段)。采用破坏性取样的方式, 在第 0、3、6、9、15、21 天和第 24、27 和 30 天, 每一组处理取出 3 个样品瓶, 开盖后立即测定土壤 Eh 和 pH。随后将土壤离心过 0.22 μm 滤膜, 测定上清液中 Fe(II)、Fe(III) 和 As(III)、As(V) 浓度, 记作溶解态 Fe 和 As。将第 0、21 和 30 天的土壤悬液离心后的固体冷冻干燥, 提取土壤中不同形态 Fe(II)、Fe(III)、As(III)、As(V) 以及残留的 OTC, 并进行测定。

1.3 提取方法

1.3.1 土壤 OTC 提取 准确称取 1.0 g 土壤样品于 20 mL 玻璃离心管中, 加入 2.5 mL 纯甲醇和 2.5 mL EDTA-McIlvaine 缓冲溶液(0.1 mmol/L Na₂EDTA +

0.2 mmol/L 磷酸氢二钠 + 0.06 mmol/L 柠檬酸, pH = 4.0); 涡旋 1 min 使土壤与提取剂混合均匀, 然后超声 15 min, 使用 4 000 r/min 离心, 收集上清液过 0.22 μm 水系滤膜; 重复以上提取步骤 3 次, 将收集的上清液定容至 100 mL。使用 Poly-sery HLB 色谱柱(2.CA3154.0001, 500 mg, 6 mL)对收集液体进行纯化和富集^[19]。

1.3.2 土壤中不同形态 Fe 提取 使用分级提取的方法提取土壤中不同形态 Fe^[20]。为去除溶解氧, 所有提取剂在实验前均使用 99.99% 的氮气吹扫 1 h 以上, 以保证提取过程中 Fe(II) 不被氧化。具体步骤如下: 准确称取 0.200 0 ± 0.000 2 g 土壤, 加入 5 mL 氯化钙溶液(1 mol/L)振荡提取 2 h(200 r/min), 4 000 r/min 离心, 过 0.22 μm 滤膜, 加入 0.1 mol/L 的 HCl 溶液后保存, 记作可交换态 Fe; 上一步离心所得固体使用 5 mL 盐酸溶液(0.5 mol/L)分散, 振荡提取 2 h, 离心过滤, 记作吸附态/弱结晶型矿物态 Fe; 上一步离心固体使用 5 mL 盐酸溶液(5 mol/L)分散, 振荡提取 24 h, 离心过滤, 记作强结晶型矿物态 Fe; 上一步离心固体使用 1.3 mol/L 氢氟酸和 1.8 mol/L 硫酸溶液分散, 振荡提取 24 h, 离心过滤, 记作硅酸盐矿物态 Fe。

1.3.3 土壤中不同形态 As 提取 使用分级提取的方法连续提取土壤中不同形态 As。相应的提取剂和提取条件如表 1。该方法中所用的提取剂可以保证提取过程中 As 的形态不发生改变, 并且提取率大于 90%^[21]。

表 1 土壤中 As 的连续提取
Table 1 Sequential fractionation procedures for As speciation in soil

As 形态	提取剂	提取条件
可交换态	5 mmol/L 磷酸盐 + 0.2%(m/V)NaDDC 溶液 (pH = 7.0)	准确称取 0.200 0 ± 0.000 2 g 土壤加入 5 mL 提取剂, 200 r/min 振荡提取 2 h, 4 000 r/min 离心, 过 0.22 μm 滤膜(下同)
有机质结合态	0.1 mol/L 焦磷酸钠 + 0.2%(m/V)NaDDC 溶液(pH = 7.0)	上一步离心固体加入 5 mL 提取剂, 振荡提取 1 h, 离心过滤
锰矿物结合态	0.4 mol/L 盐酸羟胺溶液(pH = 3.2)	上一步离心固体加入 5 mL 提取剂, 振荡提取 0.5 h, 离心过滤
极弱结晶铁铝(氢)氧化物结合态	1 mol/L 盐酸和 10%(V/V)乙酸溶液	上一步离心固体加入 5 mL 提取剂, 振荡提取 1 h, 离心过滤
弱结晶铁铝(氢)氧化物结合态	0.2 mol/L 草酸铵缓冲液(pH = 3.25)	上一步离心固体加入 5 mL 提取剂, 振荡提取 2 h, 离心过滤(避光)
硫化物结合态	4 mol/L 硝酸	上一步离心固体加入 5 mL 提取剂, 65 °C 消煮 1 h, 离心过滤(重复一次)
强结晶铁铝(氢)氧化物结合态	4 mol/L 盐酸和 10%(V/V)乙酸溶液	上一步离心固体加入 5 mL 提取剂, 95 °C 消煮 1 h, 离心过滤(重复一次)
残渣态	50%(V/V)王水溶液	上一步离心固体加入 5 mL 提取剂, 95 °C 消煮 1 h, 离心过滤(重复一次)

注: NaDDC 为三水合二乙基二硫代氨基甲酸钠, 作为 As(III) 的络合剂, 保证 As(III) 在提取和测定过程中的形态稳定。

1.3.4 土壤微生物 DNA 提取及多样性测定 将 1 mL 厌氧培养 21 d 后的土壤悬液离心(4 °C, 14 000 r/min, 1 min)后冷冻干燥处理。使用 OMEGA Soil DNA Kit 试剂盒(OMEGA, 美国), 按照说明书要求和具体步骤提取土壤微生物总 DNA, 使用引物 515F(5'-GTG CCAGCMGCCGCGTAA-3')和 907R(5'-CCGTCAA TTCMTTTRAGTT-3')扩增微生物 16S rRNA 基因的 V4 ~ V5 区。使用 Illumina 平台对群落 DNA 片段进行双端(Paired-end)测序, 使用 QIIME2 (2019.4) 分析软件进行质控、去噪、拼接、去嵌合体, 选用 Greengenes 数据库进行物种注释。测序工作在南京派诺森基因科技有限公司进行。每个 OTC 浓度处理设置 4 个平行样品。

1.4 分析方法

采用氢化物发生-原子荧光分光光度法(HG- AFS, BAF-2000, 北京宝德仪器有限公司, 中国)分析样品中 As 的浓度。对样品中的 As(III) 测定前, 首先使用 0.4 mol/L 柠檬酸缓冲溶液(pH = 4.5)稀释样品。柠檬酸盐可以屏蔽测定过程中 As(V) 对 As(III) 信号的干扰。使用质量分数为 2% 的 KBH₄ 溶液(配制在 0.5% NaOH 溶液中)作为还原剂、0.1 mol/L 柠檬酸缓冲溶液(pH = 4.5)作为载流剂将体系中的 As 转化为 AsH₃, 并使用氩气(99.99%)作为载气, 将 AsH₃ 送入石英炉芯原子化器, 被火焰原子化后进行后续检测。对样品中总 As 测定前, 首先使用体积分数为 5% 的盐酸溶液稀释样品, 并加入硫脲-抗坏血酸溶液(质量分数 0.5%)作为还原剂, 将样品中的 As(V) 还原为 As(III)。将载流剂替换为 5% 的盐酸溶液, 其他测定步骤同 As(III)。

采用 Agilent 1200 高效液相色谱(HPLC)分析样品中 OTC 浓度, 配备二极管阵列检测器(DAD)和反

相 LC-18 色谱柱(25 cm × 4.6 mm, 5 μm)。流动相为 20% 乙腈溶液和 80% 草酸溶液(10 mmol/L), 流速为 0.8 mL/min, 检测波长为 365 nm^[22]。

采用邻菲罗啉-紫外分光光度法(UV-2700, Shimazu Co. Ltd, 日本)分析样品中 Fe 的浓度。将 0.35 mL 的样品溶液与 0.05 mL 醋酸-醋酸盐缓冲液(pH = 4.6)、0.05 mL 邻菲罗啉溶液(PHE)、0.05 mL NaF 溶液混合, 显色 15 min 后, 在 510 nm 的波长下测定紫外吸收光度的变化。NaF 溶液中的 F⁻ 能够与 Fe(III) 形成强络合物, 这可以减少测定过程中邻菲罗啉对 Fe(III) 的还原和对 Fe(II) 测定的干扰。总 Fe 的测定与 Fe(II) 相似, 将 NaF 溶液替换为质量分数为 10% 的盐酸羟胺溶液, 还原 Fe(III) 为 Fe(II) 后测定。Fe(III) 的浓度为总 Fe 和 Fe(II) 浓度的差值^[23]。

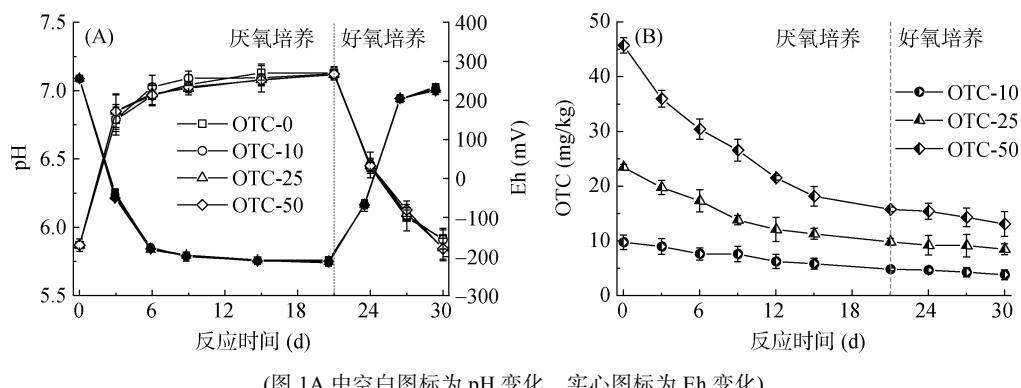
1.5 数据处理

所有数据采用 Origin 94 (2017) 处理与作图。采用 SPSS 20.0 对数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA model), 以 $P < 0.05$ (Duncan test) 为统计显著性标准。

2 结果与讨论

2.1 稻田土壤培养过程中 pH、Eh 变化及 OTC 转化

土壤在培养过程中 pH 和 Eh 随时间的动态变化如图 1A 所示。在厌氧培养的第 3 天, 土壤 pH 升高至近中性条件(6.78 ~ 6.84), 之后缓慢升高至中性偏碱性(7.12 ~ 7.13); 土壤 Eh 则迅速降低至 -200 mV 左右。氧气条件恢复后, 土壤 pH 和 Eh 恢复至初始状态。这与稻田土壤淹水-排干过程中 pH 和 Eh 随时间的动态变化是一致的^[24]。其中不同浓度 OTC 处理的土壤与对照土壤相比, pH 和 Eh 的变化趋势相同。



(图 1A 中空白图标为 pH 变化, 实心图标为 Eh 变化)

图 1 土壤培养过程中 pH、Eh(A)和 OTC(B)动态变化

Fig. 1 Temporal changes of soil pH, Eh (A) and OTC (B) during incubation

对土壤中残留的 OTC 进行提取, 测定其转化情况。结果表明, 经过 21 天的厌氧培养, 在 OTC-10、OTC-25 和 OTC-50 土壤中其转化率分别为 51.8%、60.7% 和 68.5%(图 1B); 好氧培养期间, OTC 也有一定的转化; 培养结束后, 其转化率分别增加至 61.9%、68.3% 和 73.9 %。

2.2 OTC 对稻田土壤 Fe、As 形态转化的影响

2.2.1 OTC 对稻田土壤厌氧过程中 Fe、As 形态转化的影响 随着土壤 Eh 下降, 铁矿物中 Fe(III) 被还原为 Fe(II), 部分以 Fe²⁺ 的形式释放到土壤溶液中。由图 2A 可知, 溶解态 Fe(II) 含量随着厌氧培养时间的延长逐渐增加, 第 3 天时对照土壤中 Fe(II) 含量为 9.5 mg/kg; 厌氧培养 21 天后, 溶解态 Fe(II) 含量可达 99.9 mg/kg。OTC 的加入显著促进了土壤中溶解态 Fe(II) 的增加, OTC-10、OTC-25 和 OTC-50 土壤中溶解态 Fe(II) 含量相比对照土壤分别提高了 8.4%、5.4%、14.1%。

对照土壤厌氧培养 21 d 后, 可交换态、吸附态/弱结晶型矿物态、强结晶型矿物态和硅酸盐矿物态 Fe(II) 的含量为 34.7、1 443.1、2 494.7 和 1 953.0 mg/kg (表 2), 分别占相应形态总 Fe 含量的 81.4%、40.4%、

18.2% 和 25.1%, 这说明土壤中可交换态和吸附态/弱结晶型矿物态 Fe 被大量还原。OTC 存在的情况下, 土壤中可交换态 Fe(II) 含量显著增加, 其中 OTC-10、OTC-25 和 OTC-50 土壤中 Fe(II) 相比于对照土壤分别提高了 19.8%、26.5% 和 32.3%; 吸附态/弱结晶型矿物态 Fe(II) 也显著增加, OTC-25 和 OTC-50 土壤中 Fe(II) 相比于对照土壤分别提高了 13.3% 和 25.9%。对于强结晶型矿物态 Fe 和硅酸盐矿物态 Fe, OTC 对其形态转化没有显著影响。

铁矿物的还原溶解通常伴随着吸附态或者共沉淀态 As 的释放, 并且在微生物作用下大多数 As(V) 被还原为 As(III)。第 21 天时, 其溶解态 As(III) 在对照土壤的含量为 2.82 mg/kg, 占总溶解态 As 含量的 71.9%(图 2B)。因为 OTC 能够促进土壤铁矿物的还原, 因此在有 OTC 存在的土壤中, 溶解态 As 的含量应高于对照土壤, 但是 OTC-25 和 OTC-50 土壤中溶解态 As(III) 含量反而低于对照土壤(图 2B)。可能是因为 OTC 处理土壤后, 促进了土壤中溶解态 As 向固相 As 的转化。因此进一步对土壤进行连续提取, 测定固相 As 的形态转化。

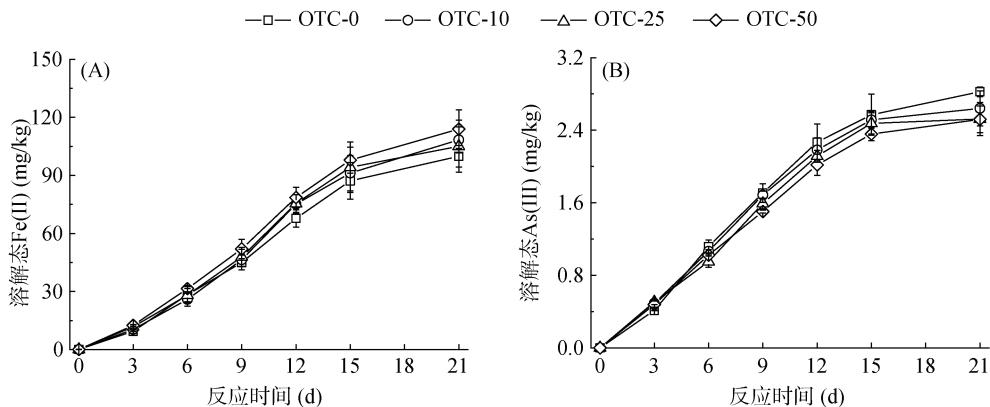


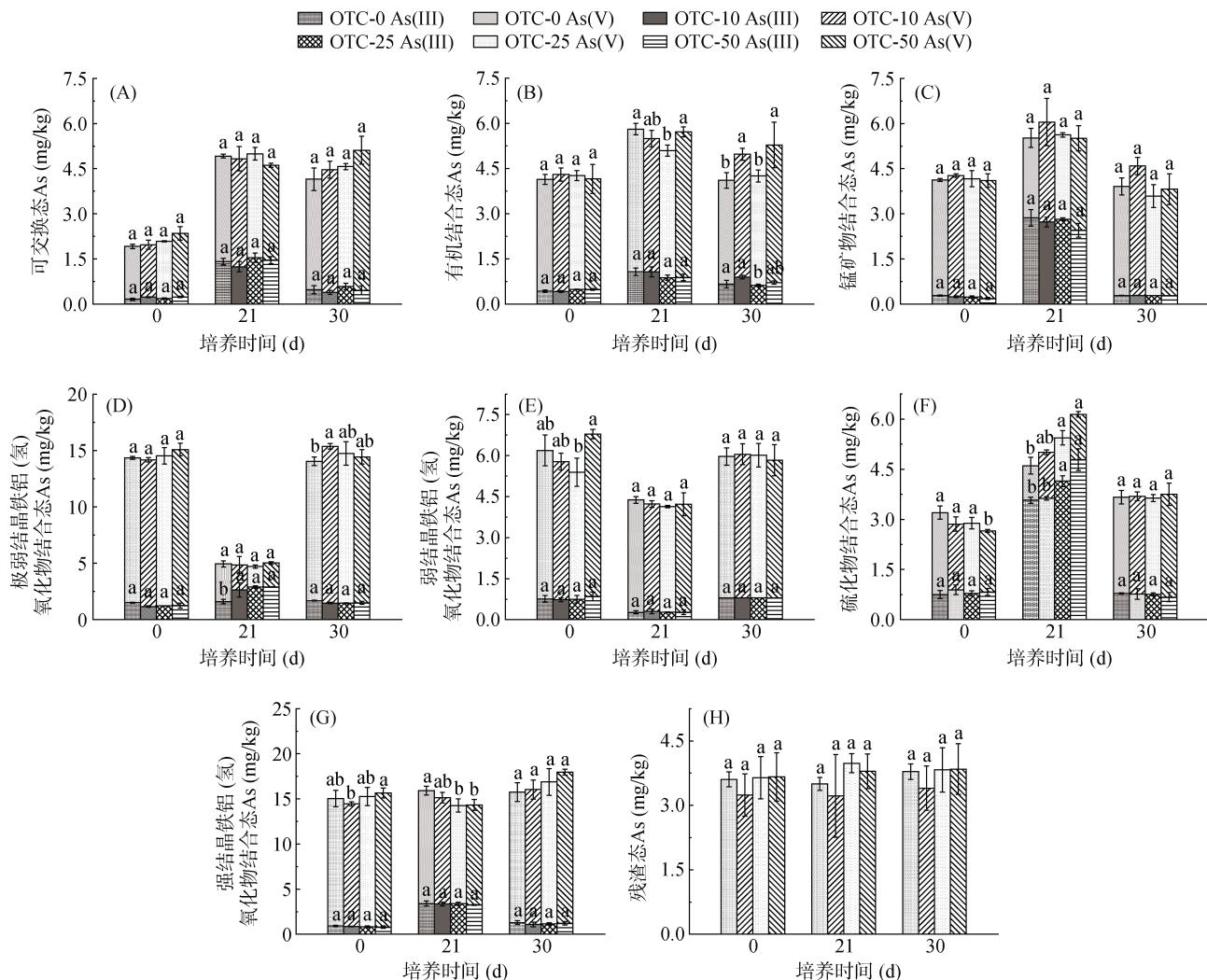
图 2 土壤厌氧培养过程中溶解态 Fe(II) 和 As(III) 变化
Fig. 2 Changes of aqueous Fe(II) and As(III) during anoxic soil incubation

表 2 土壤培养期间不同形态 Fe 含量的变化
Table 2 Concentration changes of different Fe forms during incubation

培养时间(d)	处理	可交换态 Fe(II)	可交换态 Fe(III)	吸附态/弱结晶矿物态 Fe(II)	吸附态/弱结晶矿物态 Fe(III)	强结晶矿物态 Fe(II)	强结晶矿物态 Fe(III)	硅酸盐矿物态 Fe(II)	硅酸盐矿物态 Fe(III)
0		3.1 ± 0.1	0.8 ± 0.1	50.7 ± 2.4	4 007.8 ± 127.4	1 189.5 ± 64.7	7 889.6 ± 773.9	1 490.3 ± 157.4	9 794.3 ± 264.8
21	OTC-0	34.7 ± 2.9 b	7.9 ± 1.5 a	1 443.1 ± 56.4 c	2 128.9 ± 103.9 a	2 494.7 ± 226.1 a	7 239.6 ± 917.9 a	1 953.0 ± 64.5 a	9 844.5 ± 388.3 a
	OTC-10	41.5 ± 1.5 a	5.9 ± 0.7 bc	1 499.8 ± 43.2 bc	2 061.1 ± 45.3 a	2 244.4 ± 50.0 a	8 067.4 ± 726.2 a	1 803.2 ± 74.1 a	9 486.2 ± 565.2 a
	OTC-25	43.9 ± 2.9 a	6.6 ± 2.6 b	1 635.8 ± 42.0 b	1 907.4 ± 167.7 a	2 206.2 ± 64.8 a	7 791.6 ± 553.6 a	1 780.8 ± 59.3 a	9 473.5 ± 279.2 a
	OTC-50	45.9 ± 2.6 a	5.2 ± 1.8 c	1 817.3 ± 89.4 a	1 815.2 ± 21.3 a	2 095.7 ± 99.1 a	6 828.1 ± 590.7 a	1 858.4 ± 30.4 a	9 967.3 ± 266.8 a
30	OTC-0	3.6 ± 0.5 a	3.9 ± 0.5 a	611.4 ± 146.4 a	3 402.5 ± 196.2 a	1 450.4 ± 235.9 a	8 911.9 ± 192.9 a	1 652.2 ± 132.7 a	9 289.5 ± 86.2 a
	OTC-10	5.1 ± 1.3 a	4.6 ± 1.2 a	592.9 ± 67.5 a	3 858.5 ± 75.1 a	1 770.6 ± 115.2 a	9 253.9 ± 2 707.8 a	1 745.9 ± 43.6 a	9 446.1 ± 473.9 a
	OTC-25	4.0 ± 0.5 a	3.9 ± 1.2 a	571.9 ± 105.6 a	3 722.3 ± 236.4 a	1 785.7 ± 139.4 a	10 046.6 ± 821.3 a	1 600.1 ± 134.6 a	8 951.2 ± 387.2 a
	OTC-50	5.0 ± 0.6 a	4.9 ± 0.9 a	600.4 ± 81.9 a	4 046.2 ± 506.9 a	1 522.9 ± 228.5 a	9 691.5 ± 361.3 a	1 534.7 ± 92.9 a	9 432.2 ± 337.1 a

注: 表中同列数据小写字母不同表示同一培养时间内不同处理间差异达 $P < 0.05$ 显著水平, 下表同。

如图 3 所示, 厌氧培养期间不同浓度 OTC 处理的土壤中, 可交换态(图 3A)、有机质结合态(图 3B)和锰矿物结合态(图 3C)As(III) 和 As(V) 含量均有不同程度的增加。这是不同晶态铁矿物还原溶解释放的 As(V) 和其还原生成的 As(III) 在土壤不同组分间重新分配的结果, 但是不同浓度 OTC 处理土壤与对照土壤相比, 没有显著差异。极弱结晶型铁铝(氢)氧化物结合态和弱结晶型铁铝(氢)氧化物结合态总 As 含量分别降低了 64.2% 和 21.8%



(图中小写字母不同表示同一培养时间同一价态 As 在不同处理间差异达 $P < 0.05$ 显著水平)

图 3 土壤培养期间不同形态 As 含量的变化

Fig. 3 Concentration changes of different As forms during incubation

硫化物结合态 As 含量的变化与以上几种固相 As 不同, OTC 的加入显著促进 As 硫化物的增加(图 3F)。厌氧培养结束后, 对照土壤中硫化物结合态 As(III) 和总 As 的含量分别为 3.57 mg/kg 和 4.60 mg/kg, 而 OTC-50 土壤中, 硫化物结合态 As(III) 和总 As 含量为 4.79 mg/kg 和 6.14 mg/kg, 分别提高了 34.2% 和 33.5%。

以上, 这与弱结晶铁矿物的减少是一致的。此外, 极弱结晶型铁铝(氢)氧化物结合态 As(V) 的含量大大降低, 而 As(III) 的含量显著提高(图 3D)。这说明在稻田淹水厌氧的过程中, 主要是这种形态的 As(V) 首先被还原为 As(III)。强结晶型铁铝(氢)氧化物结合态总 As 含量基本不变, 部分 As(V)(15.5%~17.5%)被还原为 As(III)(图 3G)。残渣态 As 与土壤结合力强, 在土壤中活性最低, 因此在厌氧培养前后变化不显著(图 3H)。

2.2.2 OTC 对稻田好氧过程中 Fe、As 形态转化的影响 在好氧培养阶段, 土壤中溶解态 Fe(II) 被迅速氧化为 Fe(III), 因此在氧气恢复后的第 6 h, 土壤中已几乎测不到溶解态 Fe(II) 和 Fe(III) 存在(图 4A)。可交换态和吸附态/弱结晶型矿物态 Fe(II) 也被大量氧化, 好氧培养结束时, 其含量相较于厌氧培养

阶段分别降低了 87.8%~90.8% 和 57.6%~66.9%, 强结晶型矿物态和硅酸盐矿物态 Fe(II) 也分别有 19.1%~27.3% 和 10.1%~17.4% 被氧化(表 2)。溶解态和可交换态 Fe(II) 被氧化后生成 Fe(III) 会吸附在土壤矿物表面, 或者水解老化, 向弱结晶型矿物态 Fe 转化。因此在好氧培养结束时, 溶解态和可交换

态总 Fe 含量大大减少, 而吸附态/弱结晶型矿物态总 Fe 含量增加, 强结晶型矿物态和硅酸盐矿物态总 Fe 含量在整个培养期间没有明显变化。在好氧培养结束时, 不同形态的 Fe(II) 和总 Fe 含量在 4 个处理土壤中均没有显著性差异, 说明 OTC 对 Fe(II) 的氧化过程无显著性的影响。

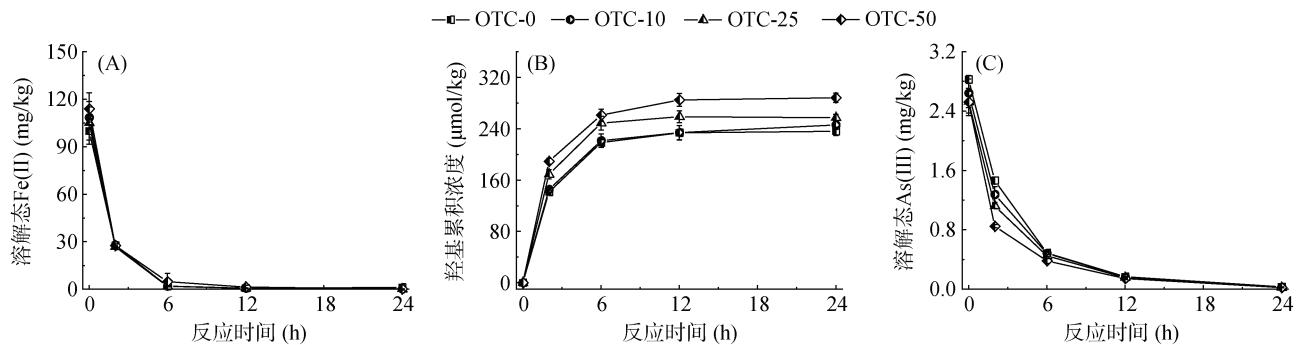


图 4 土壤好氧培养过程中溶解态 Fe(II) 变化 (A)、·OH 的生成 (B) 和溶解态 As(III) 变化 (C)

Fig. 4 Changes of aqueous Fe(II) (A), formation of ·OH (B) and aqueous As(III) (C) during aerobic incubation

在沿河海岸带和稻田土壤等氧化还原条件波动比较大的环境中, 淹水阶段产生的还原态 Fe(II) 在氧气条件恢复后, 会与 O₂ 反应生成 ·OH, 促进有机质分解或者污染物转化^[25]。使用苯甲酸作为分子探针, 测定土壤好氧培养过程中 ·OH 生成情况。如图 4B 所示, 在好氧阶段的前 2 h, 即有 148.1~182.5 μmol/kg 的 ·OH 生成, 24 h 后 ·OH 累积浓度分别为 235.9、245.8、257.1 和 288.1 μmol/kg。其中, OTC-25 和 OTC-50 土壤中 ·OH 含量显著高于对照土壤, 分别提高了 9.4% 和 22.6%。由 2.2.1 可知, OTC 处理土壤中溶液态、可交换态、吸附态/弱结晶型矿物态 Fe(II) 含量要显著高于对照土壤。因此, 在好氧阶段, Fe(II) 氧化产生的 ·OH 含量也高于对照土壤。

如图 4C 所示, 在好氧培养阶段, 土壤中溶解态 As(III) 在前 6 h 内被快速氧化, 24 h 后土壤中已无溶解态 As(III) 检出。由于 OTC 处理的土壤在好氧阶段生成更多的 ·OH, 能够促进 As(III) 的氧化, 因此溶解态 As(III) 的氧化速率在 OTC-25 土壤(0.278 h⁻¹)和 OTC-50 土壤(0.298 h⁻¹)中显著高于对照土壤(0.260 h⁻¹)。固相各形态 As(III) 的氧化受 OTC 影响较小, 在好氧

培养结束后 4 个处理土壤中 As(III) 和 As(V) 含量无显著差异(图 3)。

2.3 OTC 对稻田土壤 Fe、As 形态转化的影响机制

2.3.1 OTC 对稻田土壤铁矿物的化学还原 使用灭菌后的土壤进行相同的厌氧培养, 以排除微生物对铁矿物还原的影响, 探究 TCs 对土壤铁矿物的化学还原作用。如表 3 所示, 厌氧培养 21 d 后对照土壤中溶解态 Fe(II) 含量为 2.8 mg/kg, 占总溶出 Fe 含量的 93.2%。OTC 的加入显著促进了 Fe 的还原溶出, OTC-50 土壤中溶解态 Fe(II) 含量为 3.2 mg/kg, 相较于对照土壤提高了 13.4%。虽然土壤淹水过程中铁矿物的还原主要是微生物作用, 但是土壤中某些多酚、硫醇和小分子有机酸等, 具有氧化还原活性, 能够与铁矿物发生相互作用, 诱导铁矿物的还原溶解^[26]。TCs 作为外源污染物具有与小分子有机质相似的作用^[17-18], 因此能够显著促进土壤铁矿物的还原。此外根据已有研究, 其他多种抗生素或者有机污染物等也能够促进铁矿物的氧化还原转化^[27]。在微生物活动较弱的土壤中, 这些有机质和外源有机污染物在土壤 Fe 循环过程中可能发挥重要作用。

表 3 灭菌土壤厌氧培养后不同形态 Fe(II) 生成情况 (mg/kg)

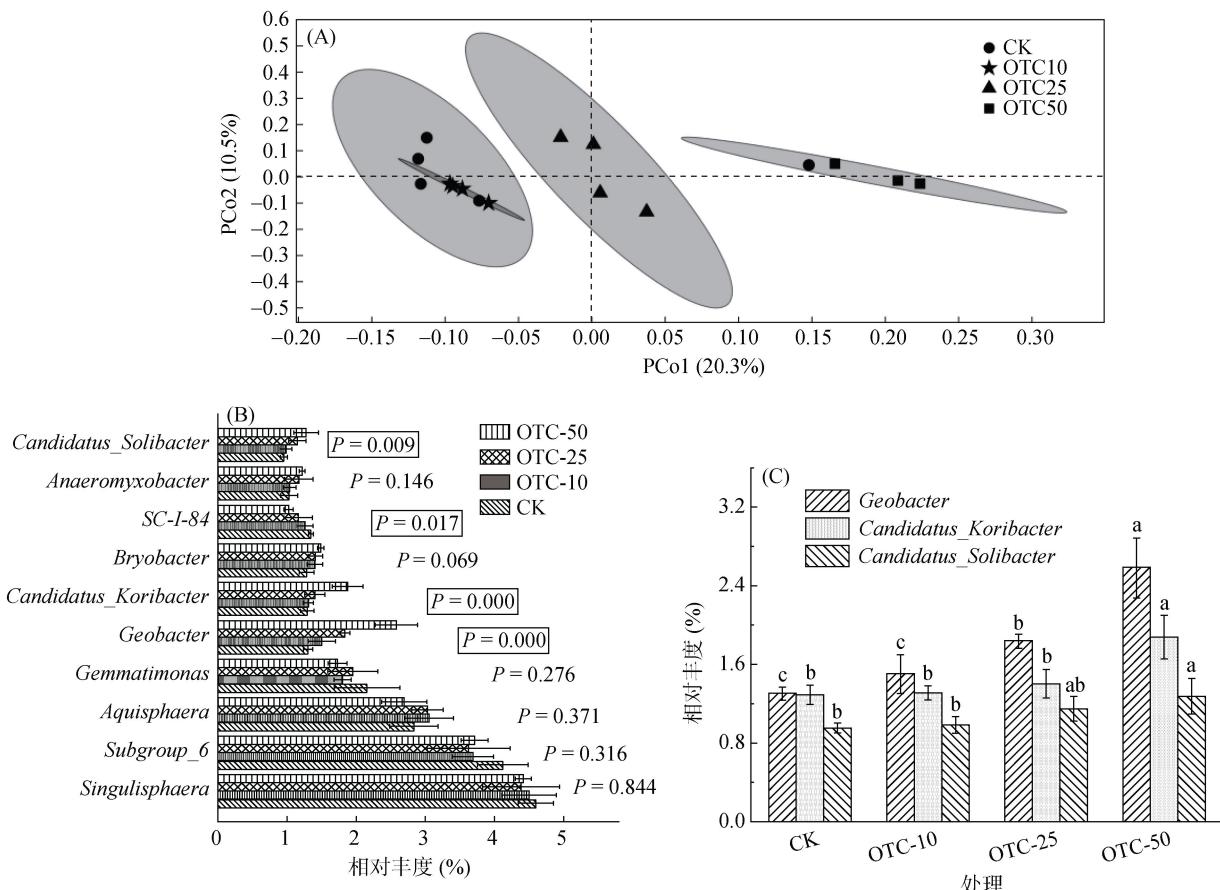
Table 3 Formation of Fe (II) with different forms after anoxic incubation

处理	溶解态	可交换态	吸附态/弱结晶矿物态	强结晶矿物态	硅酸盐矿物态
OTC-0	2.8 ± 0.2 c	13.8 ± 0.2 c	54.3 ± 3.8 a	1 256.1 ± 104.7 b	1 503.7 ± 139.1 a
OTC-10	2.9 ± 0.1 bc	14.2 ± 0.2 c	51.3 ± 14.1 a	1 360.7 ± 69.6 a	1 533.5 ± 42.3 a
OTC-25	3.1 ± 0.1 ab	15.1 ± 0.4 b	44.4 ± 6.9 a	1 346.5 ± 57.7 a	1 549.1 ± 80.7 a
OTC-50	3.2 ± 0.1 a	16.8 ± 1.1 a	44.3 ± 7.5 a	1 501.3 ± 100.5 a	1 521.7 ± 144.7 a

2.3.2 OTC 对稻田土壤微生物群落的影响 TCs 能够影响多种微生物生长, 测定 OTC 加入后土壤微生物群落多样性的变化。16 个土壤样本共得到 1 140 739 对高质量 16S rRNA 基因序列, 样品序列数量范围为 58 843 ~ 81 191。其中大多数序列长度集中在 370 ~ 379 bp。以 97% 的相似度划分, 共得到 68 901 个 OTU, 每个样品平均有 4 306 个 OUT。

主坐标分析(Principal coordinates analysis, PCoA)的结果表明, 不同浓度 OTC 处理土壤中微生物群落组成明显聚集, 其中, OTC-10 土壤与对照土壤无显

著性差异, OTC-25 和 OTC-50 土壤与对照土壤距离相对较远(图 5A)。这说明低浓度 OTC 的加入对土壤微生物群落没有显著影响, 较高浓度 OTC 可能会改变土壤微生物 β -多样性。为了进一步探究不同处理土壤微生物群落 β -多样性的差异来源, 在属的水平上分析了每种土壤样品中丰度最高的 10 种微生物相对丰度的变化。如图 5B 所示, 随着 OTC 浓度的增加, 其中有 6 种微生物相对丰度没有显著性变化, *SC-I-84* 的相对丰度显著减少, 而 *Candidatus_Koribacter*、*Candidatus_Solibacter* 和 *Geobacter* 相对丰度则显著增加。



(图 C 中小写字母不同表示同一菌属不同处理间差异达 $P < 0.05$ 显著水平)

图 5 不同浓度 OTC 处理土壤中微生物群落组成主坐标分析(A)、排名前十的微生物属组成(B)和
异化铁还原菌和硫酸盐还原菌相对丰度含量(C)

Fig. 5 Principal coordinates analysis of microbial compositions(A), top 10 microbial genus compositions of different soils(B) and relative abundance of dissimilatory Fe reducing bacteria and sulfate reducing bacteria (C) of soils treated by OTC

SC-I-84 是一种厌氧氨氧化菌, 能够利用 CO_2 作为碳源, 将 $\text{NH}_4^+ \text{--NO}_3^-$ 转化为 N_2 。*Geobacter* 是典型的异化铁还原菌, 属于 δ 变形菌纲, 是严格厌氧菌^[28]。它在缺氧或者厌氧的条件下, 能够以简单有机物作为电子供体, 以铁矿物中 $\text{Fe}(\text{III})$ 为电子受体, 将 $\text{Fe}(\text{III})$ 还原为 $\text{Fe}(\text{II})$ 。由图 5C 可知, 在 OTC-10 土壤中 *Geobacter* 的相对丰度提高了 15.4%, 而在 OTC-25 和 OTC-50 土壤中, *Geobacter* 的相对丰度分别提高

了 40.8% 和 121.5%。这说明 OTC 有助于异化铁还原菌的生长, 从而通过微生物过程促进土壤铁矿物的还原。*Candidatus_Koribacter* 和 *Candidatus_Solibacter* 都属于酸杆菌门, 是酸性土壤中常见微生物, 对抗生素有一定的抗性。Uddin 等^[29]的研究表明, 克拉霉素处理之后的土壤中这两种菌的相对丰度都有增加。有研究发现, 这两种菌属能够促进硫酸盐的还原^[30]。稻田土壤淹水过程中硫酸盐还原菌能够将硫酸盐还

原为 S^{2-} , 然后与多种金属离子生成硫化物沉淀, 如 As_2S_2 、 As_2S_3 和 $AsFeS$ 等。如图 5C 所示, 在 OTC-50 土壤中, 两种硫酸盐还原菌相对丰度相较于对照土壤分别提高了 44.9% 和 33.7%, 这能够显著促进硫酸盐还原生成 S^{2-} , 因而添加 OTC 的土壤在厌氧培养结束后, 其硫化物结合态的 As 含量显著高于对照土壤。

3 结论

本文通过水稻土微宇宙培养试验, 探究了稻田土壤淹水-排干过程中, OTC 对土壤中 Fe、As 氧化还原转化的影响, 从化学过程和对微生物过程的影响两个方面揭示了 OTC 对铁矿物还原和 As 形态转化的影响机制。在淹水过程中, OTC 可显著促进溶解态、可交换态和吸附态/弱结晶型矿物态 Fe(II) 的产生。一方面 OTC 可通过化学过程, 直接络合和还原土壤铁矿物中 Fe(III) 为 Fe(II), 另一方面 OTC 也能提高土壤异化铁还原菌相对丰度, 促进微生物介导的异化铁还原过程。淹水阶段 Fe(II) 生成量的增加使得 O_2 条件恢复后 Fe(II) 氧化生成更多·OH, 显著加速溶解态 As(III) 的氧化。此外 OTC 有助于硫酸盐还原菌的生长, 使得淹水阶段 As 的硫化物生成量增加, 因而 As 的溶出减少。总之, 稻田土壤中残留的抗生素在水稻淹水阶段能够促进铁矿物的还原, 但是不会造成溶解态 As(III) 的显著增加, 并且在好氧阶段能够促进溶解态 As(III) 的快速氧化, 因此将能够降低水稻吸收和转运 As 的风险。

参考文献:

- [1] 环境保护部, 国土资源部. 全国土壤污染状况调查公报 [EB/OL]. [2014-04-17]. http://www.zhb.gov.cn/gkmlhbb/qt201404/t20140417_270670.
- [2] 钟松雄, 尹光彩, 陈志良, 等. 水稻土中砷的环境化学行为及铁对砷形态影响研究进展[J]. 土壤, 2016, 48(5): 854-862.
- [3] 曾希柏, 徐建明, 黄巧云, 等. 中国农田重金属问题的若干思考[J]. 土壤学报, 2013, 50(1): 186-194.
- [4] Ackermann J, Vetterlein D, Kuehn T, et al. Minerals controlling arsenic distribution in floodplain soils[J]. European Journal of Soil Science, 2010, 61(4): 588-598.
- [5] 安礼航, 刘敏超, 张建强, 等. 土壤中砷的来源及迁移释放影响因素研究进展[J]. 土壤, 2020, 52(2): 234-246.
- [6] Aredes S, Klein B, Pawlik M. The removal of arsenic from water using natural iron oxide minerals[J]. Journal of Cleaner Production, 2013, 60: 71-76.
- [7] 邱丽娟. 硫酸盐对土壤中砷环境行为的影响[D]. 贵阳: 贵州大学, 2019.
- [8] Hua J, Fei Y H, Feng C H, et al. Anoxic oxidation of As(III) during Fe(II)-induced goethite recrystallization: Evidence and importance of Fe(IV) intermediate[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 421: 126806.
- [9] Liu K, Li F B, Pang Y, et al. Electron shuttle-induced oxidative transformation of arsenite on the surface of goethite and underlying mechanisms[J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 425: 127780.
- [10] 冯曦. 厌氧条件下土壤典型氧化还原过程对五氯酚还原转化的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- [11] 余丹. 铁氧化物异化还原驱动下的纤铁矿晶型转变及污染物降解特征与机制[D]. 西安: 西安建筑科技大学, 2016.
- [12] Jia W L, Song C, He L Y, et al. Antibiotics in soil and water: Occurrence, fate, and risk[J]. Current Opinion in Environmental Science & Health, 2023, 32: 100437.
- [13] Ji X L, Shen Q H, Liu F, et al. Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai, China[J]. Journal of Hazardous Materials, 2012, 235/236: 178-185.
- [14] Zhu Y G, Johnson T A, Su J Q, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms[J]. PNAS, 2013, 110(9): 3435-3440.
- [15] Qian M R, Wu H Z, Wang J M, et al. Occurrence of trace elements and antibiotics in manure-based fertilizers from the Zhejiang Province of China[J]. The Science of the Total Environment, 2016, 559: 174-181.
- [16] Thiele-Bruhn S, Beck I C. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass[J]. Chemosphere, 2005, 59(4): 457-465.
- [17] Tong Y P, Wang X L, Wang X H, et al. Oxytetracycline induced the redox of iron and promoted the oxidation of As(III)[J]. Science of the Total Environment, 2022, 828: 154381.
- [18] Tong Y P, Wang X L, Wang X H, et al. The oxidation and immobilization of As(III) by colloidal ferric hydroxide in the concomitant pollution of oxytetracycline[J]. ACS ES&T Engineering, 2023, 3(5): 627-637.
- [19] Zhan L, Xia Z W, Xu Z M, et al. Study on the remediation of tetracycline antibiotics and roxarsone contaminated soil[J]. Environmental Pollution, 2021, 271: 116312.
- [20] Chen N, Huang D Y, Liu G X, et al. Active iron species driven hydroxyl radicals formation in oxygenation of different paddy soils: Implications to polycyclic aromatic hydrocarbons degradation[J]. Water Research, 2021, 203: 117484.
- [21] Huang J H, Kretzschmar R. Sequential extraction method for speciation of arsenate and arsenite in mineral soils[J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(13): 5534-5540.
- [22] Chen N, Huang M Y, Liu C, et al. Transformation of tetracyclines induced by Fe(III)-bearing smectite clays under anoxic dark conditions[J]. Water Research, 2019, 165: 114997.
- [23] Yang Z C, Yan Y, Yu A Q, et al. Revisiting the phenanthroline and ferrozine colorimetric methods for quantification of Fe(II) in Fenton reactions[J]. Chemical Engineering Journal, 2020, 391: 123592.

- [24] Huang H, Ji X B, Cheng L Y, et al. Free radicals produced from the oxidation of ferrous sulfides promote the remobilization of cadmium in paddy soils during drainage[J]. *Environmental Science & Technology*, 2021, 55(14): 9845–9853.
- [25] Page S E, Kling G W, Sander M, et al. Dark formation of hydroxyl radical in Arctic soil and surface waters[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(22): 12860–12867.
- [26] Chen J, Gu B H, Royer R A, et al. The roles of natural organic matter in chemical and microbial reduction of ferric iron[J]. *The Science of the Total Environment*, 2003, 307(1/2/3): 167–178.
- [27] Yin R L, Chen Y X, Hu J Y, et al. Complexes of Fe(III)-organic pollutants that directly activate Fenton-like processes under visible light[J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2021, 283: 119663.
- [28] Song M K, Peng K, Jiang L F, et al. Alleviated antibiotic-resistant genes in the rhizosphere of agricultural soils with low antibiotic concentration[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(8): 2457–2466.
- [29] Uddin M, Chen J W, Qiao X L, et al. Bacterial community variations in paddy soils induced by application of veterinary antibiotics in plant-soil systems[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 167: 44–53.
- [30] Kirk M F, Roden E E, Crossey L J, et al. Experimental analysis of arsenic precipitation during microbial sulfate and iron reduction in model aquifer sediment reactors[J]. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2010, 74(9): 2538–2555.