

抗生素(CIP)-土壤相互作用过程荧光组分识别意义

邓政锐¹ 钱永^{2,*}

1 长江大学 2 中国地质科学院水文地质环境地质研究所

DOI:10.12238/eep.v7i10.2274

[摘要] “抗生素”是环境中的一种有机物质,由微生物通过次级代谢自然合成的,主要用于治疗因微生物感染引起的动物和人类的各种疾病。目前,抗生素引起的水、土环境问题受到关注。本研究基于吸附解吸试验,结合三维荧光光谱分析和紫外参数分析对抗生素(CIP)-土壤相互作用过程荧光组分进行划分,对组分荧光强度与CIP浓度关系进行分析其相互影响机理。研究发现,CIP与土壤DOM发生相互作用使土壤类蛋白质组分的荧光强度值最小。结合CIP的荧光特性和土壤DOM组分的荧光强度特征表明,CIP浓度与荧光组分C1的强度呈正比,而与其他组分的强度呈反比。此外,CIP对荧光组分和紫外参数的影响受时间变化较小,但受CIP浓度影响较大。特别是在低浓度范围内(1–10 mg/L),CIP对土壤荧光峰位的变化有显著影响,而在高浓度下,CIP的荧光信号成为主导因素。随着CIP浓度增加,释放出的土壤的DOM芳香性增大,荧光强度降低,表明土壤DOM产生淬灭效应越显著。深入研究CIP在土壤中的吸附解吸作用及其影响因素对于理解环境中抗生素污染的迁移转化过程,以及制定有效的修复策略至关重要。

[关键词] 抗生素; 三维荧光光谱; 土壤有机质

中图分类号: R978.1 文献标识码: A

Significance of fluorescent component identification in antibiotic (CIP) –soil interaction processes

Zhengrui Deng¹ Yong Qian^{2*}

1 Yangtze University

2 Institute of Hydrogeology and Environmental Geology, Chinese Academy of Geological Sciences

[Abstract] Antibiotic" is an organic substance in the environment, naturally synthesized by microorganisms through secondary metabolism. It is mainly used to treat various diseases in animals and humans caused by microbial infections. At present, the water and soil environment caused by antibiotics are attracted concerned. In this study, based on the adsorption desorption test and the fluorescence components of antibiotic and CIP) –soil interaction process were divided, and the mechanism of the relationship between fluorescence intensity and CIP concentration was analyzed. It was found that CIP and soil DOM interactions minimize the fluorescence intensity value of soil-like protein components. Combining the fluorescence characteristics of CIP and the fluorescence intensity characteristics of the soil DOM components showed that the CIP concentration is directly proportional to the intensity of the fluorescent component C1 and inversely proportional to the intensity of the other components. Moreover, the effect of CIP on fluorescence components and UV parameters was less affected by temporal variation but greatly by CIP concentration. Especially in the low concentration range (1–10 mg/L), CIP has a significant effect on the change of soil fluorescence peak level, while at high concentrations, the fluorescence signal of CIP becomes the dominant factor. As the CIP concentration increased, the DOM aromatic increased and the fluorescence intensity decreased, indicating the more significant quenching effect of soil DOM. Further investigation of the adsorption and desorption of CIP in soil and its influencing factors is crucial to understand the migration and transformation process of antibiotic contamination in the environment and to develop effective remediation strategies.

[Key words] antibiotics, three-dimensional fluorescence spectrum, soil organic matter

引言

近年来,抗生素作为一种新污染物引起了国际社会的广泛关注(Barathe, Pramod et al., 2024)。“抗生素”是通过微生物次级代谢自然合成的,主要用于防治人类和动物病菌性疾病,以及促进动物生长的一大类化学品(Perry, Elena K et al., 2022)。抗生素或其衍生物可能会发生荧光,这一特性为环境和医学研究提供了新的检测手段。荧光光谱技术因其高灵敏度和操作简便性,已成为检测土壤中抗生素污染的一种有效方法(Li, Yuxin et al., 2024)。特别是对于环丙沙星(CIP)通过分析荧光信号的变化,包括荧光强度的变化和可能的猝灭效应,可以推断出抗生素与土壤中溶解性有机质(DOM)之间的相互作用。(刘欣雨等人,2021)。

由于土壤的理化性质和DOM组分不同,导致抗生素在土壤中的吸附/解吸行为产生一定的影响(曹驰程,2024)。在不同浓度的抗生素污染土壤中,荧光光谱技术可以检测到抗生素的荧光信号,这些信号会随着抗生素浓度的变化而变化。当抗生素与土壤DOM相互作用时,可能会发生荧光猝灭现象,这通常是由于荧光分子与猝灭剂分子之间的相互作用导致的。例如,当荧光分子与土壤中的其他有机质或矿物质结合时,可能会降低其荧光效率,导致荧光强度降低(韩雪娇,2024)。

目前,已经有大量研究者对抗生素污染进行研究,但关于DOM对抗生素在土壤环境中的吸附/解吸机理研究较少。鉴于此,本文以环丙沙星(CIP)为代表,以华北地区的献县和正定土壤为试验土壤,采用静态批平衡试验的方法,使用三维荧光光谱仪、紫外-可见分光光度计和TOC分析仪进行测定,对CIP在土壤中的荧光组分进行分解,获取CIP的荧光光谱图和土壤DOM的荧光图。通过分析CIP进入土壤后的荧光特性变化,结合时间增量和浓度增量变化,探讨CIP与土壤之间的相互作用机制。因此,对深入了解环境污染物的迁移转化提供重要的理论和实践指导意义。

1 研究区背景

华北平原自南向北发育着黄河、海河、滦河三大水系,地势平坦广阔坦荡。地势自北、西、南三个方向向渤海湾倾斜(秦耀民,2015)。河北平原区是华北平原的一部分,整体地势是西北高东南低,由西北向东南倾斜,海拔从约100米逐步降低到渤海沿岸的3米左右。河北气候属于典型四季分明的温带湿润半干旱大陆性季风气候,年降水量在400—800毫米之间,但分布不均,随季节的变化而变化,当地大部分农田采用灌溉来种植作物。

2 材料与方法

2.1 样品采集与处理

本研究选择正定和献县两个地区的地下水灌溉麦田,选择了0—25cm表层的耕作土壤作为采样对象。使用铁锹铲取样并去除土壤中的多余砂砾、根系植物、秸秆等杂质,将样品分别装入密封的袋子中,并在低温条件下保存,运回实验室。为了确保样品的质量,在无阳光直射的条件下自然风干,过40目筛将其充分混合后,放入冰箱冷藏避光保存,在实验之前从冰箱拿出土壤恢复室温,准备进行后续实验研究。

2.2 吸附解吸试验

2.2.1 吸附解吸动力学试验

根据OECD guideline 106,参照批平衡吸附试验方法进行实验(Lees, Katherine et al., 2024)。分别称取3g的XX与ZD土样于50mL离心管中,按照水土比10:1(30mL:3g)向离心管中加入30mL浓度为10mg·L⁻¹CIP溶液。在恒温摇床中以220r/min的转速避光振荡,于5min、10min、30min、1h、2h、4h时分别取出离心管(每次取出3个离心管)。每个时间点样品做2个平行,同时做空白样(不含土壤)和对照样(不含抗生素)。将离心管以7000r·min⁻¹的速度离心10分钟后,取上清液,并用0.45μm水系滤膜过滤到1.5mL的棕色小瓶中。通过高效液相色谱(HPLC)测定滤液中CIP的浓度,并根据抗生素峰面积与浓度的关系计算吸附量。

在确定吸附平衡时间后,进行解析实验,并以平衡条件进行操作。对平衡土壤悬浊液离心后弃去上清液,向离心管中加入30mL含水溶液振荡解吸,于30min、1h、2h、4h、6h、8h时分别取出离心管(3个/次)。同上操作,离心并取上清液过滤,然后分装于1.5mL棕色小瓶中,采用HPLC测定抗生素浓度。

2.2.2 吸附解吸等温试验

根据吸附解吸动力学试验方法,分别加入不同浓度的CIP溶液(使用0.01M NaNO₃抑制微生物的影响),使土壤悬浊液中CIP浓度分别达到1、10、20、40、100mg·L⁻¹。在恒温避光条件下进行振荡使其达到吸附平衡状态后,以7000r/min的速度离心10min,取上清液过0.45μm滤膜,取过滤液于1.5mL棕色玻璃瓶,上机测定CIP浓度。

在吸附等温试验离心后倒去上层清液,保留离心管中的土样,再加入30mL纯水溶液,继续在恒温避光条件下振荡至解吸平衡后,同上操作在7000r/min离心10min,取上清液过0.45μm滤膜,测定CIP浓度,研究其解吸等温线。

2.3 光谱分析方法

基于平行因子分析的三维荧光光谱分析、紫外光谱分析和DOC的测量,并进行光谱数据分析。三维荧光分光光度计(日立F7000)进行荧光测量,荧光扫描速度为1200nm/min,波长范围设置为250—450nm,波长间隔为4nm,发射范围为300—550nm,波长间隔为2nm。采用紫外-可见分光光度计,对样品进行扫描在200—700nm波长范围内,以获得样品DOM对应的吸光度(周萌等人,2020)。常用总有机碳(TOC,溶解相等效DOC)的浓度近似表示DOM总量,所以采用有机碳(TOC)分析仪测定提取样品的DOC。

平行因子法是用于表征DOM的一种方法之一,通过对三维荧光光谱进行分析(沈海东等人,2017)。它被广泛应用于研究DOM的荧光成分、组成结构、来源与归宿,并揭示DOM在水生生态系统中的迁移转化机制。EEM-PARAFAC分析模型基于三线性分析原理,将EEM图谱按照数学规律划分为独立的组分,从而获得定量分析结果(刘小静等人,2012)。PARAFAC的矩阵公式为:

$$x_{ijk} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} + e_{ijk} \quad (2-1)$$

公式中 $i=1, 2, 3, \dots, I$; $j=1, 2, 3, \dots, J$; $k=1, 2, 3, \dots, K$;

其中 X_{ijk} 是矩阵 X 的元素, 表示 k 个样品在激发波长 i 发射波长 j 时的荧光强度; a_{in} , b_{jn} , c_{kn} 分别代表 I^*N , J^*N , K^*N 相对激发光谱矩阵中的 A, B, C 元素; e_{ijk} 为残差矩阵 $E(I^*J^*K)$ 的元素; N 为因子数。

采用 Matlab 软件进行 3DEEM-PARAFAC 分析, 需要先对数据进行处理。由于样本的荧光受到拉曼和瑞利散射的影响, 需要扣除空白样本以消除散射的影响, 并将荧光强度归一化为拉曼单位 ($R.U. nm^{-1}$) (黄冬兰等人., 2017)。然后提取模型分半检验确定最优组分数, 以最大荧光强度 F_{max} ($R.U.$) 表示相对浓度。

3 结果与讨论

3.1 土壤有机质及 CIP 的荧光组分分解

采用三维荧光分光光度计, 以 $1200 nm/min$ 的荧光扫描速度分别对土壤有机质与 CIP 以及土壤与 CIP 混合样品进行测试。从抗生素 CIP 的三维荧光光谱图 3-1 可见, 存在 2 个荧光峰分别为 $Ex/Em=275/445 nm$ 、 $Ex/Em=315/445 nm$, 因可归类为类腐殖质组分。通过对土壤有机质组分的三维荧光光谱图分析如图 3-1, 共检验出 3 个组分。根据 Coble (1996) 提出的各类荧光组分划分方法, 可得出组分 C1 (266/420 nm) 峰位相似类腐殖质中类富里酸 A 峰; 组分 C2 (366/460 nm) 属于高激发波长 (UVA) 腐殖质类的 C 峰; 组分 C3 (250/364 nm) 表示低激发类蛋白质中色氨酸物质的 T 峰。

根据吸附解吸动力学试验, 对 CIP 与土壤 DOM 混合物质的荧光光谱数据进行平行因子分析, 共检验出 3 个组分见表 3-1。发现土壤 CIP 混合样中的组分 C1 与土壤有机质组分 C1 和 CIP 的荧光峰位相似, 但其荧光强度在 CIP 进入土壤后发生变化。这表明抗生素进入土壤后促使荧光组分 F_{max} 值发生变化。从组分荧光强度 F_{max} 值与吸附解吸时间关系图 3-2 进一步的分析表明, 无论在正定或献县样品中, 组分 C1 的荧光强度值在吸附解吸时间变化过程中始终最高, 这表明 C1 可能是抗生素主导的组分。同时, 随着吸附解吸时间的增加, 土壤组分荧光强度值只有小幅度的变动, 表明组分 C1、C2、C3 的 F_{max} 值受时间影响较小甚至没有影响。

根据等温吸附解吸试验的荧光光谱数据进行平行因子分析, 绘制组分荧光光谱图及载荷图图 3-3。发现不同浓度 CIP 与土壤 DOM 混合物质共同得出了 4 个组分。组分 C1, 其荧光峰位于 $Ex=270 nm/Em=416 nm$, 与 CIP 的荧光峰位相似。组分 C2, 其荧光峰位于 $Ex=258 nm/Em=408 nm$, 类似于紫外类腐殖质 A 峰富里酸, 为类富里酸组分。C3 其荧光峰位于 $Ex=274 nm/Em=454 nm$, 属于类腐殖 C 峰腐殖质, 为类腐殖 C 组分。组分 C4, 其荧光峰位于 $Ex=250 nm/Em=362 nm$, 类似于低激发光类色氨酸 S 峰, 为类色氨酸组分。土壤 DOM 与 CIP 抗生素都具有显著的荧光特征, 荧光特征峰

可能会出现部分重叠。在不同浓度的 CIP 进入土壤之后, 土壤中荧光组分的荧光强度发生变化, 这可能是 CIP 对土壤 DOM 产生的影响。

表 3-1 CIP 与土壤 DOM 混合物质的荧光组分及其定名

荧光组分	Ex/Em	定名
C1	270/410	类腐殖质组分
C2	274/545	类腐殖质组分
C3	250/364	类色氨酸组分

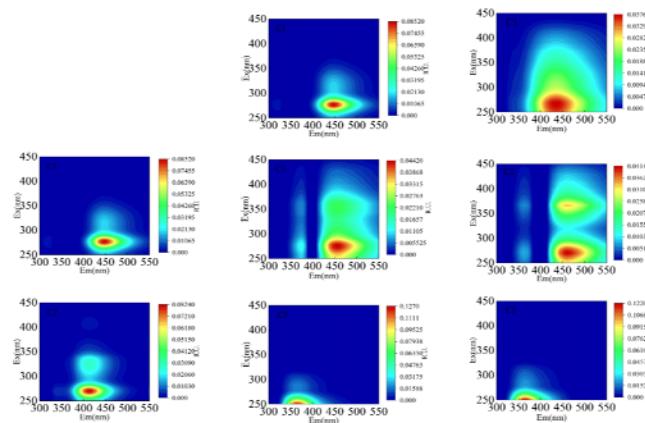
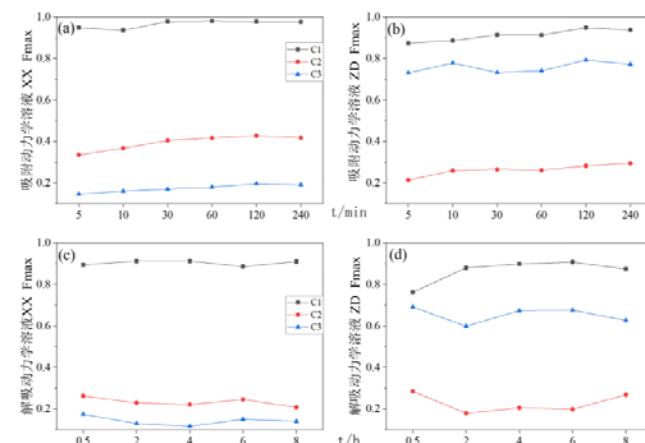


图 3-1 CIP、土壤有机质、CIP 与土壤有机质混合物质平行因子组分的三维荧光光谱图



土壤 DOM 与不同浓度 CIP 混合样品的组分荧光强度与 CIP 浓度增量的变化关系图如图 3-4。无论 ZD 还是 XX 土样, C2、C3、C4 的荧光强度均与 CIP 浓度呈反比的关系, 相反地, C1 组分荧光强度与浓度呈正比, 且组分 C1 的荧光峰位与 CIP 峰位相似, 说明 C1 可能是抗生素主导的组分, C2、C3、C4 为土壤 DOM 组分。解吸过程的组分荧光强度变化趋势与吸附过程一致, 解吸过程的变量对组分荧光变化的影响很小。

图3-2荧光组分的荧光强度随时间变化特征: a-b为吸附过程, c-d为解吸过程

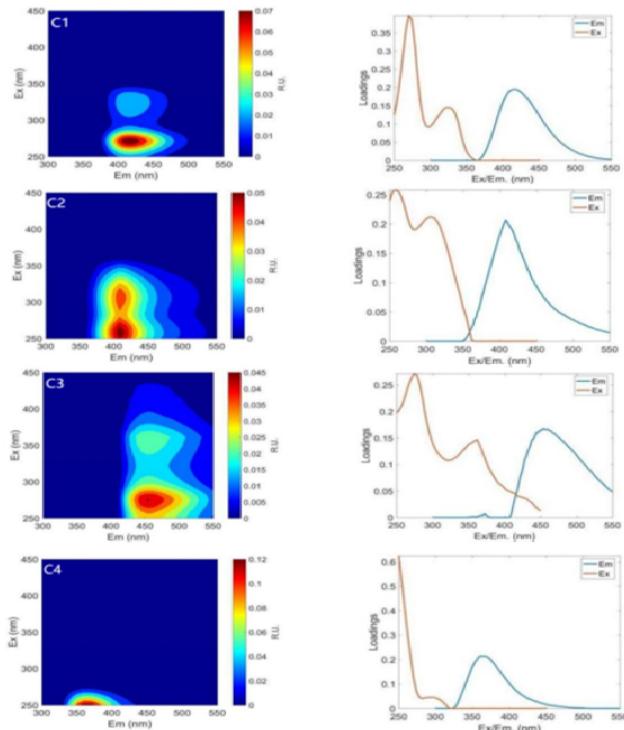


图 3-3平衡吸附解吸过程平行因子组分三维荧光光谱图及载荷图

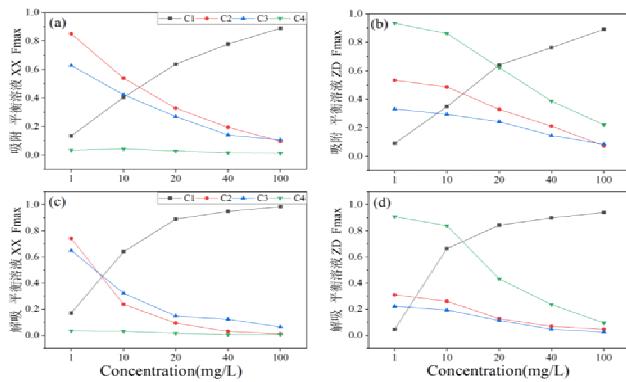


图 3-4平衡溶液吸附解吸过程组分荧光强度与CIP浓度关系图

3.2 随时间增量的反应作用过程

CIP与土壤DOM混合后随时间变化的荧光光谱图如图3-5所示,与献县和正定土壤三维荧光光谱图比, CIP对两种土壤有机质的荧光产生一定的影响,但随时间的变化荧光光谱产生的变化较小。从吸附解吸动力学过程紫外参数随时间增量的变化图3-6分析可知,紫外参数值在吸附解吸过程中随时间增量的变化较小。

E2/E3反映了分子量, A253/A203反映了取代基的浓度, SUVA254反映腐殖化程度。在抗生素浓度较低的时候,土壤有机质与抗生素发生反应,产生猝灭反应,荧光参数变化程度比较小,当抗生素浓度较大时,主要是抗生素起作用,具有丰富的官能团,参数

程度更大。

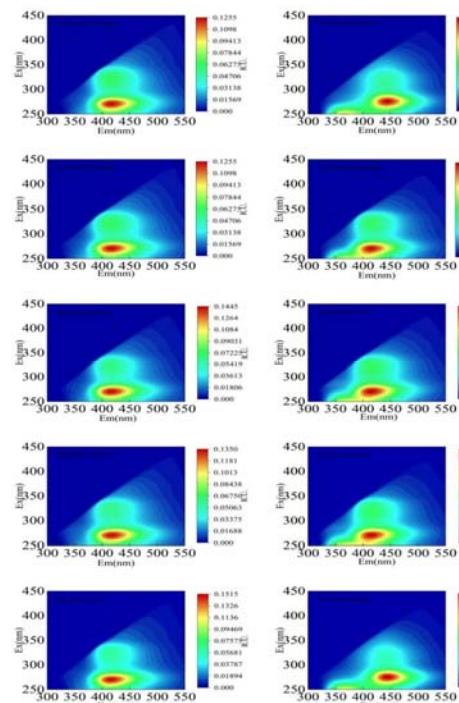


图3-5献县与正定土壤随时间增量变化的三维荧光图

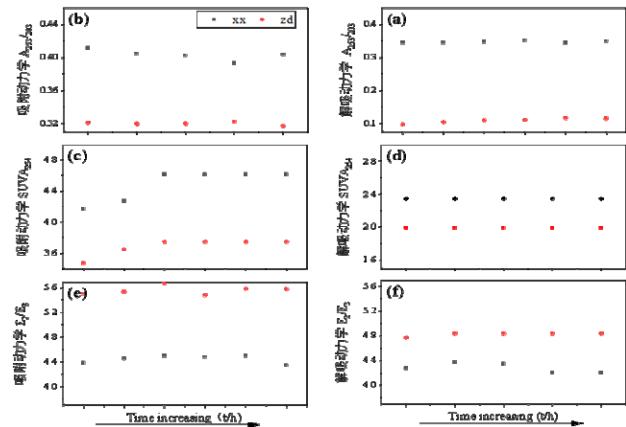


图3-6吸附解吸动力学过程紫外参数随时间增量的变化

3.3 随浓度增量的反应作用过程

不同浓度的CIP与土壤混合后的荧光光谱图如图3-7,从荧光的变化可以分析,当抗生素浓度较小时,荧光强度变化比较明显,土壤可能受到抗生素的影响,峰位发生移动。当抗生素浓度增加更高时,荧光强度虽然增加,但峰位基本不变,此时猝灭可能没有作用了,土壤吸附达到饱和。由于献县主要以类腐殖质为主,腐殖质中带有负电荷的官能团和CIP的酸性基团和碱性基团反应,并通过偶极距力、阳离子桥键作用、阳离子交换作用和氢键作用使CIP吸附在土壤中。类蛋白质组分受CIP的影响较慢,以类蛋白质组分为主的正定土壤对CIP的吸附量较少,进入土壤中的CIP含量较低对类蛋白组分荧光影响较缓慢。

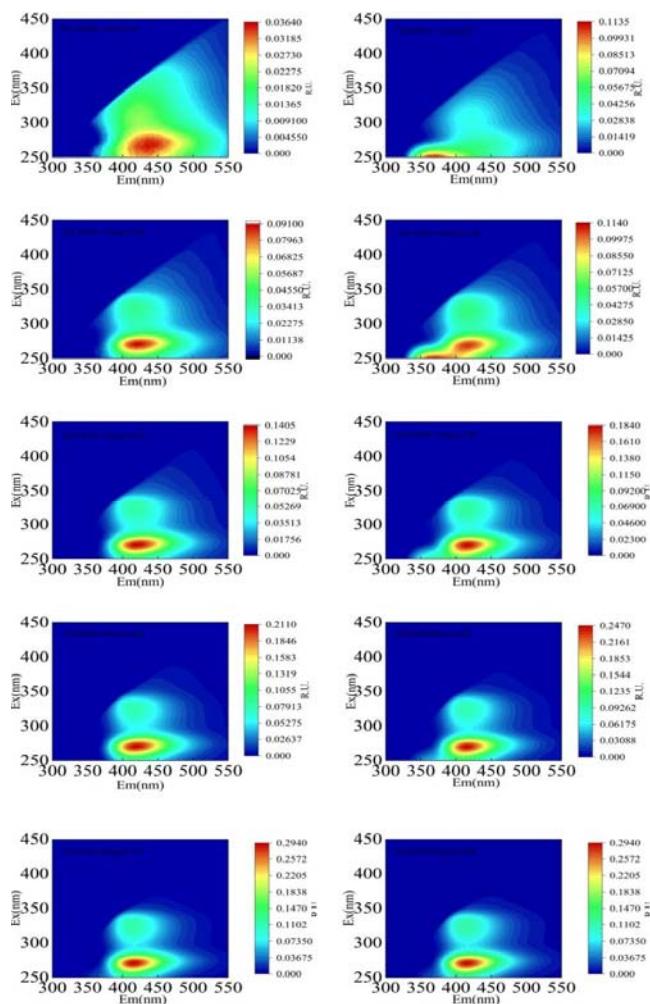


图3-7献县与正定土壤随CIP浓度增量变化的三维荧光图

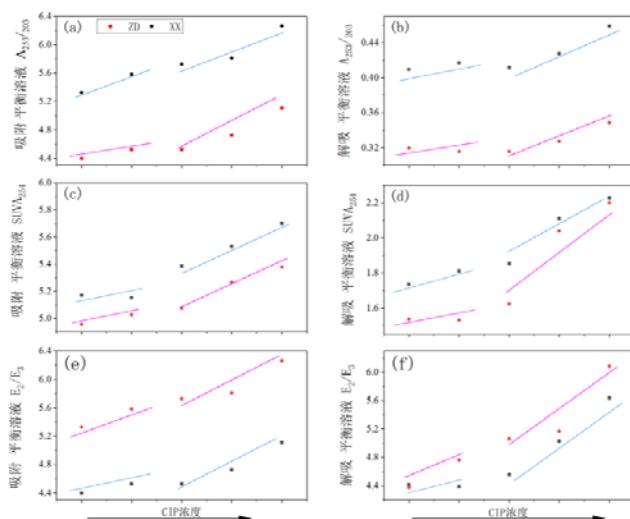


图3-8平衡溶液吸附解吸过程紫外参数随浓度增量的变化

从平衡溶液吸附解吸过程紫外参数随浓度增量的变化3-8分析,看出紫外荧光参数在CIP浓度为1-10mg/L时与20-100mg/L时变化趋势不同,结合荧光图,浓度较低CIP与土壤影响反应更

强烈,CIP浓度大于20mg/L时CIP的荧光信号更强荧光图峰位更偏向于抗生素峰位范围。随着CIP浓度增加,A253/A203、SUVA254增大,E2/E3减小分子量增大。

抗生素本身存在明显的荧光峰,与土壤有机质之间发生一定的相互作用。在抗生素初始浓度较低时对土壤有机质组分及荧光强度变化的影响较小,随着浓度的增加,土壤有机质组分的荧光强度降低,组分荧光的变化主要受抗生素CIP浓度的影响与土壤类型无关,表明抗生素的存在对土壤有机质产生荧光淬灭。

4 结论

(1)献县土壤以类腐殖组分为主,正定土壤以类蛋白质组分为主。(2)在CIP进入土壤后,组分C1的荧光强度与CIP浓度增量成正比,而其余组分的荧光强度与CIP浓度增量呈反比。

通过CIP进入土壤之后,各组分荧光强度随时间增量变化较小甚至无影响,受CIP浓度影响较大。抗生素组分的荧光强度与CIP浓度增量成正比,土壤DOM组分的荧光强度与CIP浓度增量呈反比。

参考文献

[1]Barathe, Pramod, Kawaljeet Kaur, Sagar Reddy, Varsha Shriram, and Vinay Kumar. "Antibiotic Pollution and Associated Antimicrobial Resistance in the Environment." [J].Journal of Hazardous Materials Letters.(2024):100105.

[2]Perry, Elena K.,Lucas A. Meirelles, and Dianne K. Newman. From the Soil to the Clinic: The Impact of Microbial Secondary Metabolites on Antibiotic Tolerance and Resistance.[J].Nature Reviews Microbiology.(2022):129–42.

[3]Li,Yuxin,Chengbin Liu,Qiuju Li, and Shun Mao. "Fluorescence Analysis of Antibiotics and Antibiotic-Resistance Genes in the Environment: A Mini Review." Chinese Chemical Letters.(2024):109541.

[4]刘欣雨,张建强,黄雯,等.中国土壤中抗生素赋存特征与影响因素研究进展.[J]土壤,2021,53(4):672–681.

[5]曹驰程.藻源溶解性有机质与抗生素的交互作用研究[D].东南大学,2024.

[6]韩雪娇.荧光猝灭法研究氟沙星与金属离子、DOM的相互作用[D].昆明理工大学,2024.

[7]李梓君.河流水质目标管理的实施及关键问题研究[J].中国资源综合利用,2019,37(03):111–113.

[8]Lees,Katherine,Mark Fitzsimons,Jason Snape,Alan Tappin, and Sean Comber. "Soil Sterilisation Methods for Use in OECD 106:How Effective Are They?" Chemosphere.(2018):61–67.

[9]周萌,肖扬,刘晓冰.土壤活性有机质组分的光谱分析方法及应用[J].土壤,2020,52(06):1093–1104.

[10]沈海东,白玉洪,郑华.三维荧光光谱分析技术和应用[J].海洋石油,2017,37(02):61–65.

作者简介:

邓政锐(2000--),汉族,河南省濮阳人,硕士研究生,研究方向:土壤有机质污染与修复。