

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897-20140317003

周志强, 王淑平, 郭丽, 等. 鸭粪和环丙沙星对潮土微生物群落功能多样性的影响[J]. 生态毒理学报, 2014, 9(6): 1118-1125

Zhou Z Q, Wang S P, Guo L, et al. Influences of duck feces and ciprofloxacin on soil microbial community functional diversity in ustic cambosols [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2014, 9(6): 1118-1125 (in Chinese)

# 鸭粪和环丙沙星对潮土微生物群落功能多样性的影响

周志强, 王淑平\*, 郭丽, 董俊夫, 张娜

中国科学院大学资源与环境学院, 北京 100049

收稿日期: 2014-03-17 录用日期: 2014-05-16

**摘要:** 为了评价鸭粪中残留的环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)对土壤微生物群落功能多样性的影响, 布置培养试验, 设五个处理, 分别是: I: CK(对照)、II: CIP(人工添加的CIP)、III: DF(添加不含抗生素的鸭粪)、IV: DF + CIP(在III的基础上再外源添加CIP)、V: DF(CIP)(粪源CIP即含有CIP的鸭粪), 培养81 d。借助Biolog技术研究了不同来源的CIP对土壤微生物功能多样性的影响。结果表明, 培养1 d后, 反映土壤微生物活性的平均颜色变化率(AWCD)表现为DF > DF + CIP > DF(CIP) > CK > CIP, 说明环丙沙星对土壤微生物活性具有一定的抑制作用, 且随着培养时间的延长其抑制作用减弱; 添加鸭粪显著增强了土壤微生物活性和群落功能多样性; 与人工添加进鸭粪中的环丙沙星相比, 粪源环丙沙星对微生物活性的抑制作用更强, 并显著降低了土壤中利用碳源微生物的物种丰富度指数(H)、均匀度指数(E)、优势度指数(Ds)和碳源利用丰富度指数(S); 在培养过程中, 土壤微生物利用的主要碳源种类随培养时间延长有所变化, 初期利用的主要是糖类、羧酸类、聚合物类、胺类以及氨基酸类, 后期主要是糖类和羧酸类。

**关键词:** 环丙沙星; 鸭粪; 土壤微生物群落; 功能多样性; Biolog

文章编号: 1673-5897(2014)6-1118-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Influences of Duck Feces and Ciprofloxacin on Soil Microbial Community Functional Diversity in Ustic Cambosols

Zhou Zhiqiang<sup>1</sup>, Wang Shuping<sup>1,\*</sup>, Guo Li<sup>1</sup>, Dong Junfu<sup>1</sup>, Zhang Na<sup>1</sup>

College of Resources and Environment, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Received 17 March 2014 accepted 16 May 2014

**Abstract:** A 81-day soil culture experiment was conducted with 5 treatments: CK (control), CIP (ciprofloxacin), DF (duck feces), DF + CIP (DF adding CIP) and DF(CIP) (DF containing CIP), through which functional diversity of soil microbial communities was studied using the BIOLOG Microbial Identification System to evaluate the effects of ciprofloxacin from different sources. Results showed that AWCD (Average Well Color Development) after incubation for 1 day followed order as DF > DF + CIP > DF(CIP) > CK > CIP, indicating soil microbial activity was inhibited by CIP whose influence decreased in subsequent experiment. Addition of duck feces significantly enhanced soil microbial activity and community functional diversity. Compared with ciprofloxacin added into duck feces, the inhibition effect of duck fecal-borne ciprofloxacin on microbial activity was stronger. Also duck fecal-borne ciprofloxacin caused significant reduces of several diversity indices such as Shannon index (H), substrate richness

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(41230750); 国家重点基础研究发展计划课题(2010CB428804-2); 国家高技术研究发展计划课题(2011AA050105); 中国科学院知识创新工程方向项目(KZCX2-EW-QN606)

作者简介: 周志强(1987-), 男, 硕士, 研究方向为土壤生态, E-mail: cheerzzq@hotmail.com;

\* 通讯作者(Corresponding author) E-mail: wshuping@ucas.ac.cn

(S), substrate evenness (E) and Simpson's dominance (Ds). During incubation period, the main carbon sources utilized by microorganisms in soil changed from carbohydrates, carboxylic acids, polymers, amines and amino acids to carbohydrates and carboxylic acids.

**Keywords:** ciprofloxacin; duck feces; soil microbial communities; functional diversity; Biolog

抗生素主要用于人类和畜禽动物疾病的预防与治疗,在促进畜禽养殖业发展、保障人类健康等方面起到了很重要的作用。另一方面,随着集约化养殖业的快速发展和人类对抗生素使用需求的增加,出现了抗生素大量使用和滥用的现象;而绝大部分抗生素在机体中并不能被完全吸收,其中40%~90%以母体或代谢物形式随粪尿直接排出体外<sup>[1-3]</sup>,这些抗生素经由施粪肥等方式直接或间接地进入生态环境中,并通过食物链对生态环境和人类健康产生潜在的危害。近年来,兽药抗生素在抗生素使用中占的比例越来越大,引起的生态环境问题也越来越严重,也因此受到了国内外更多人的关注和研究<sup>[4-8]</sup>。

环丙沙星作为一种广谱、高效性氟喹诺酮类抗生素,被广泛地用于治疗细菌感染引起的疾病<sup>[9]</sup>,在畜禽养殖业中也有较多使用。研究发现,由于其不适当的使用,在污水处理厂、河流、水产养殖基地等均已检测到喹诺酮类抗生素<sup>[10-15]</sup>;这类抗生素进入环境后能够强烈固着在土壤基质中并在土壤环境中长期存留<sup>[16]</sup>,对生态环境产生了严重的威胁,同时也增强了环境中细菌耐药性,最终将危害人类健康<sup>[17-19]</sup>。

施用畜禽粪肥是很好的资源再利用方式,能够显著增加土壤中氮、磷和有机质含量,是提高土壤肥力的一项重要农业措施;但同时也使得残留于其中的抗生素带入到土壤中,对土壤中微生物群落结构产生一定的影响<sup>[20-21]</sup>,势必影响土壤微生物群落功能。目前,以群落水平碳源利用类型为基础的 BIOLOG 技术为研究土壤微生物群落功能多样性提供了一种简单、快速的方法,虽然在数据处理上较为繁琐,方法使用中存在一些不足之处<sup>[22-23]</sup>,但由于其具有易操作、培养周期短、鉴定的微生物种类多和获取的数据信息丰富等特点,仍被国内外众多研究者所使用<sup>[24-25]</sup>。因此,本研究采用 Biolog 技术研究了不同来源环丙沙星(粪源和外源添加)对土壤微生物群落功能多样性的影响,以期科学评价氟喹诺酮类抗生素的环境风险和粪肥施用安全提供理论依据。

## 1 材料与方法(Materials and methods)

### 1.1 供试材料

环丙沙星( $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ )标准品购自美国 Sig-

ma 公司,纯度 $\geq 98\%$ ,相对分子质量为 331.35。Biolog Ecoplate 微平板购自美国 BIOLOG 公司,上机仪器使用同一公司的 Microstation System。试验采用人工气候箱进行培养,型号为 RXZ-430E。

供试土壤为潮土,于 2012 年 7 月采自河北省安新县王家寨村 0~20 cm 土层,在土壤系统分类中为干润雏形土(Ustic Cambosols)。土壤样品中不含任何抗生素类药物。供试土壤有机质  $27.1 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,碱解氮  $103 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,有效磷  $3.26 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,pH 值 7.99。试验所使用的鸭粪是从同时饲养的两批鸭子获得,一种是不含抗生素的鸭粪;另一种是人工给鸭子喂食含适量环丙沙星的饲料所得到的鸭粪。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 土壤处理与试验设计

采集新鲜土样过 2 mm (10 目)筛,充分混匀后放置于人工气候箱中  $25^\circ\text{C}$  恒温培养一周,使土壤中微生物活化。然后取土装盆(培养盆规格为顶部直径 12.0 cm×底部直径 8.5 cm×高 10.0 cm,每盆装 350 g 鲜土,其中含鸭粪的处理则按干土 4% 比例添加;调节每个培养盆中土壤含水率至田间最大持水量 70% 左右,置于人工气候箱中  $25^\circ\text{C}$  非密闭培养,并模拟实际光照周期变化(昼夜各 12 h),每天通过称重法补充因蒸发损失的水分,以保持恒定的土壤含水量。

试验共设置 5 个处理,每个处理 3 次重复,分别是 I: CK(原始土壤,作对照)、II: CIP(土壤与人工添加的 CIP 混合)、III: DF(土壤与不含任何抗生素的鸭粪混合)、IV: DF + CIP(在 III 的基础上再外源添加 CIP)、V: DF(CIP)(土壤与含粪源 CIP 的鸭粪混合)。其中,含 CIP 的 3 个处理中每盆 CIP 的初始含量保持一致,均为  $17.15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。试验分别于土壤培养的第 1、3、9、27、54 和 81 天取样。

#### 1.2.2 土壤微生物群落功能多样性测定

最早应用 Biolog<sup>TM</sup> 技术来描述微生物群落水平多样性的是 Garland and Mills<sup>[26]</sup>。本试验使用 96 孔 Biolog EcoPlate 微平板,每 32 孔为 1 个重复,包含 31 种碳源和水空白,3 次重复。测定方法基于 Garland 和 Mills 方法并稍有变动,具体步骤如下:分别取 6 次不同采样时间的新鲜土样 10 g (去除杂

草、石子等)溶解于90 mL灭菌水中,超声波震荡5 min,再置于摇床震荡30 min;然后将所得溶液稀释1000倍,用排枪加到Biolog板中,每孔150  $\mu$ L。最后将Biolog板置于25  $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养,从0 h开始计时,每12 h在590 nm光波长下使用BIOLOG读数器读数,连续监测10 d。

主要计算项目包括平均每孔颜色变化率(AWCD)、物种丰富度指数(H)、均匀度指数(E)、优势度指数(Ds)和碳源利用丰富度指数(S)。计算方法:(1)  $AWCD = \sum(C-R)/n$ ,式中C为每个有培养基孔的光吸收值;R为对照孔的光吸收值;n为培养基孔数值,Biolog EcoPlate板中有31种不同碳源,n值为31;(2) Shannon-Wiener物种丰富度指数H:  $H = -\sum(P_i \times \ln P_i)$ ,  $P_i$ 为有培养基的第i孔的相对吸光值与整个微平板相对吸光值总和的比值,即  $P_i = (C_i - R_i) / \sum(C_i - R_i)$ ;(3) 均匀度指数E,  $E = H/\ln S$ ;(4) 优势度指数Ds,  $D_s = 1 - \sum P_i^2$ ;(5) 碳源利用丰富度指数S指被利用的碳源的总数目,为每31孔中C-R值大于0的孔数。

数据处理所使用的软件为Microsoft Office2010、IBM SPSS Statistics 22、Origin 9.1和CANOCO 4.5。

## 2 结果与分析(Results and analysis)

### 2.1 土壤微生物群落平均颜色变化率

土壤微生物对BIOLOG微平板上每孔中碳源的利用程度,间接地反映在每孔的颜色变化上,平均颜色变化率(AWCD)能够很好地反映土壤微生物活性的大小,是描述微生物对碳源利用能力的一个重要指标<sup>[27]</sup>。

试验中不同处理对土壤微生物活性的影响程度在不同采样时间表现不一致,具体见图1。在试验初期(Day1),不同处理的AWCD值表现为DF > DF + CIP > DF(CIP) > CK > CIP。与CK相比,添加鸭粪则显著地增强了土壤中微生物的活性,而CIP的存在,对微生物的活性有一定的抑制作用;在含鸭粪的三个处理中,粪源环丙沙星即DF(CIP)中的CIP,对微生物活性的抑制作用最强,其次是DF + CIP处理,而只加鸭粪的处理即DF,其微生物活性最强,说明不同来源环丙沙星对土壤中对微生物活性的影响不同,其中粪源环丙沙星对土壤微生物的抑制作用大于人工添加环丙沙星的处理。

随着土样培养时间的延长,各处理AWCD值稍有变化。当土壤培养至9天时,鸭粪仍然对微生物活性的影响较大,DF、DF + CIP和DF(CIP)三处理

明显高于CK和CIP处理,但比较CIP和CK处理发现,CIP处理中土壤微生物的活性开始增强且略高于CK;从土壤培养27天开始,DF和DF + CIP处理的AWCD值明显高于DF(CIP)处理,说明粪源环丙沙星的抑制作用高于外源添加环丙沙星;当土壤培养至54 d时,DF(CIP)处理AWCD表现为最低;当土壤培养至84 d时,各处理间差异有所降低,说明鸭粪和环丙沙星对微生物活性的影响逐渐减小。

对不同培养时间不同处理下72 h的AWCD进行方差分析可知,处理、培养时间及二者互作均显著影响土壤微生物活性。但总的来看,CIP处理的AWCD值显著低于CK处理,说明环丙沙星对土壤微生物活性具有一定的抑制性;DF、DF + CIP和DF(CIP)处理均显著高于CK和CIP处理,说明添加鸭粪显著提高了土壤微生物活性,而DF(CIP)又显著低于DF + CIP处理,说明粪源环丙沙星处理对微生物活性的抑制作用大于人工添加环丙沙星的处理(见表1)。

### 2.2 土壤微生物群落功能多样性指数分析

在Biolog分析中,物种丰富度指数、均匀度指数、优势度指数和碳源利用丰富度指数能很好地描述土壤中微生物利用不同碳源的能力及其微生物群落优势程度和多样性。

表1中结果表明,DF和DF + CIP处理各指数均显著地高于其他所有处理,二者之间差异不显著;DF(CIP)处理与CK处理比较,各项指数差异不显著,但显著低于DF + CIP处理;人工添加环丙沙星的CIP处理各指标均显著地低于其他处理。说明加入鸭粪能够显著地提高土壤中微生物的活性,丰富了土壤中利用碳源微生物的种类、增加优势种群,同时也增强了对不同碳源的利用能力即功能多样性。而对比DF + CIP和DF(CIP)处理,粪源环丙沙星与人工添加的环丙沙星对微生物群落的影响差异显著,具有更强的抑制性。

### 2.3 土壤微生物碳源利用多样性的主成分分析

借助主成分分析方法,对Biolog板中31种碳源形成的多维变量数据进行降维以获得少数几个主要变量,而这些新的变量能够解释大部分原始数据中的变异。根据AWCD值的分析结果,本文选取比较典型的Day1和Day54两个时间点,对不同处理下土壤微生物利用碳源的结果进行了主成分分析。土壤培养1天后,共得到4个主成分,贡献率由大到小依次是60.5%、13.5%、5.9%、4.4%,累计贡献率达84.2%。

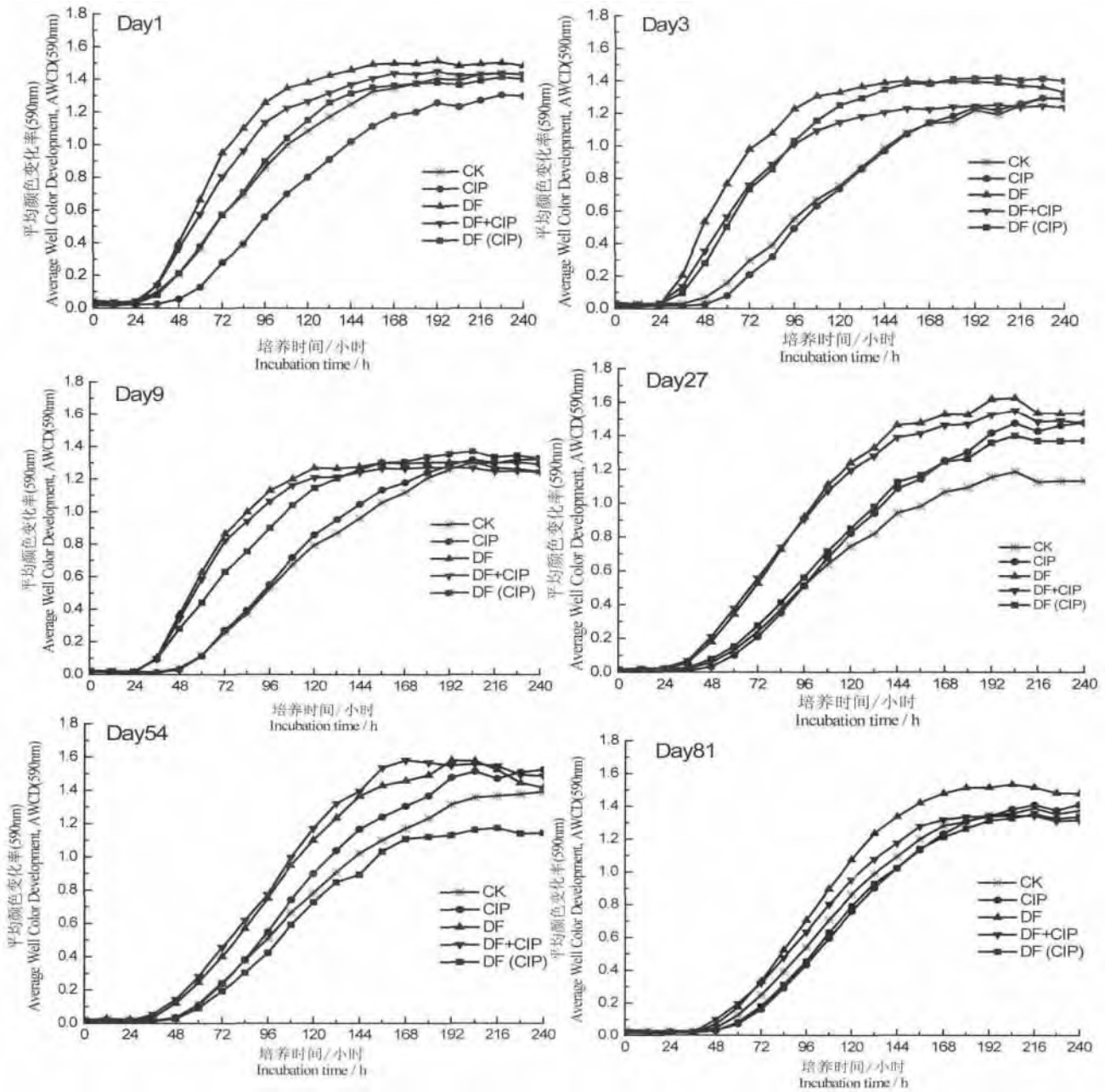


图 1 土壤培养 1、3、9、27、54、81 天的平均颜色变化率

Fig. 1 AWCD changes in soil after incubation for 1, 3, 9, 27, 54 and 81 days

表 1 土壤微生物利用碳源的多样性指数和 72 h AWCD 值

Table 1 Diversity indexes of different carbon resources of soil microbe utilization and AWCD (72 h)

处 理 Treatments	物种丰富度指数(H) Shannon index	均匀度指数(E) Substrate evenness	优势度指数(Ds) Simpson's dominance	碳源利用丰富度指数(S) Substrate richness index	平均颜色变化率 AWCD(72 h)
CK	2.743 ± 0.221 b	0.868 ± 0.209 bc	0.917 ± 0.221 b	24.056 ± 4.917 b	0.310 ± 0.148 d
CIP	2.648 ± 0.158 c	0.860 ± 0.313 c	0.908 ± 0.155 c	22.056 ± 3.621 c	0.228 ± 0.057 e
DF	3.023 ± 0.162 a	0.916 ± 0.379 a	0.942 ± 0.135 a	27.167 ± 2.203 a	0.676 ± 0.277 a
DF + CIP	2.996 ± 0.142 a	0.907 ± 0.301 a	0.940 ± 0.122 a	27.333 ± 2.449 a	0.621 ± 0.209 b
DF(CIP)	2.813 ± 0.257 b	0.878 ± 0.482 b	0.920 ± 0.288 b	24.944 ± 4.151 b	0.431 ± 0.234 c

注: 同一列中不同字母表示差异显著 (p < 0.05)。

Note: Different letters in the same column indicate statistically significant difference (p < 0.05).

由 PC1( 60.5% )、PC2( 13.5% ) 进行排序( 图 2 ) , 可以对原方差变异进行很好的解释。图 2 可见 , 不同处理在 PC1 轴上出现了明显的分布差异 , 其中处理 DF 和 DF + CIP 之间差异不显著 , 在 PC1 轴的负方向上; DF( CIP ) 和 CK 之间差异不显著 , 接近 PC1 轴中心的正向上; CIP 处理则处在 PC1 轴的正向较远处; 进一步分析其 PC1 得分系数( 表 2 ) 可知 , CIP 处理与各处理之间差异显著 , DF( CIP ) 与 DF、DF + CIP 处理之间差异显著。而与主成分 1 相关性较高的主要碳源( 表 3 ) 是糖类、羧酸类、聚合物类、胺类以及氨基酸类。

对培养 54 d 的土壤微生物碳源利用结果进行主成分分析 , 同样得到 4 个主成分 , 累计贡献率达 81.5% 。其中 PC1( 42.8% )、PC2( 20.3% ) 的排序结果( 图 3 ) 显示 , 在 PC1 轴的正向主要分布的是 DF、DF + CIP 处理 , 而负方向上则主要是 CK、CIP 和 DF( CIP ) 处理; 其中影响 PC1 分异的碳源主要是糖类和羧酸类( 表 3 ) 。

表 2 不同处理主成分得分系数

Table 2 Principal components( PC ) scores of different treatments

处理 Treatments	PC1	PC2
CK	0.25 ± 0.53 b	0.21 ± 0.69 a
CIP	1.16 ± 0.41 a	-0.13 ± 0.37 a
DF	-0.97 ± 0.06 c	-0.30 ± 0.06 a
DF + CIP	-0.58 ± 0.17 c	-0.09 ± 0.35 a
DF( CIP )	0.14 ± 0.16 b	0.31 ± 0.06 a

注: 同一列中不同字母表示差异显著(  $p < 0.05$  )。

Note: Different letters in the same column indicate statistically significant differences (  $p < 0.05$  ) .

表 3 与 PC1 显著相关的碳源

Table 3 Main carbon source with high loading factors of 31 sole - carbon in PC1 axis

碳源类型 Carbon source	PC1		碳源类型 Carbon source	PC1	
	Day1	Day54		Day1	Day54
<b>糖类 Carbohydrates</b>			<b>聚合物类 Polymer</b>		
D-木糖 D-Xylose	-0.8697	0.7469	吐温-40 Tween 40	-0.7623	
D-甘露醇 D-Mannitol	-0.8558	0.8642	吐温-80 Tween 80	-0.7174	0.6781
N-乙酰基-D-葡萄糖胺 ( N-Acetyl-D-Glucosamine)			α-环式糊精( α-Cyclodextrin)		
D-纤维二糖 D-Cellobiose	-0.8666	0.8967	肝糖( 即糖原) Glycogen	-0.7155	
α-D-乳糖 α-D-Lactose	-0.7688		<b>胺类 Amine</b>		
<b>羧酸类 Carboxylic acids</b>			腐胺 Putrescine		
D-半乳糖酸-γ-内脂 D-galactonic Acid Lactone	-0.8991		苯基乙胺 Phenylethylamine	-0.7073	0.8766
D-半乳糖醛酸 D-galacturonic Acid	-0.8057	0.8359	<b>氨基酸类 Amino acids</b>		
4-羟基苯甲酸 4-Hydroxybenzoic Acid	-0.8483	0.8445	L-精氨酸 L-arginine	-0.7552	
衣康酸 Itaconic acid	-0.8497	0.8411	L-天门冬酰胺 L-Asparagine	-0.8268	
D-苹果酸 D-Malic acid	-0.6961	0.8411	L-丝氨酸 L-Serine	-0.8758	
α-丁酮酸 α-Ketobutyric acid	0.8095	0.7087	α-D-葡萄糖-1-磷酸( α-D-Glucose-1-Phosphate)	-0.6554	
			L-苏氨酸 L-Threonine		0.6980

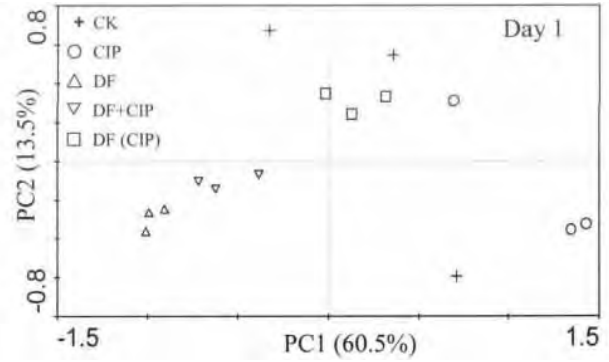


图 2 培养 1 天后不同处理下土壤微生物碳源利用主成分分析  
Fig. 2 PC analysis of carbon utilization of soil microbial communities among different treatments after incubation for 1 day

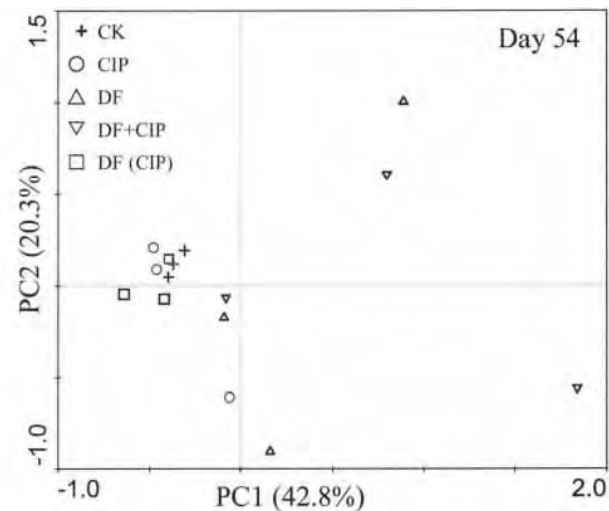


图 3 培养 54 天后不同处理下土壤微生物碳源利用主成分分析  
Fig. 3 PC analysis of carbon utilization of soil microbial communities among different treatments after incubation for 54 days

### 3 讨论(Discussion)

近年来,国内集约化畜禽养殖业发展迅速,农业收益不断增长,而同时由畜禽粪便和养殖污水引起的农业面源污染等环境问题也逐渐引起了人们的关注<sup>[28-29]</sup>。白洋淀区域作为典型湿地生态系统,该地区的鸭养殖业发展迅速,由此引起的水域污染问题也较为普遍。其中鸭粪的主要去向则是作为有机肥用于农业生产,但由于人们在鸭饲养过程中在饲料中不合理地添加或使用环丙沙星等抗生素类药物,致使鸭粪中残留着大量的抗生素,并最终通过食物链危及人类自身健康。

#### 3.1 粪源环丙沙星对土壤微生物活性的影响

在试验不同阶段,不同处理的平均颜色变化率(AWCD)结果存在一定的差异。初期的Day1结果显示:DF > DF + CIP > DF(CIP) > CK > CIP。可见,添加鸭粪后显著促进了土壤微生物的活性,其主要原因是由于鸭粪中含有丰富的有机质、氮磷等养分<sup>[30-31]</sup>,从而增强了土壤微生物的代谢活动;而CIP处理的微生物活性最低,说明外源添加的环丙沙星进入土壤后,对微生物的活性起到一定抑制的作用,这与以往的研究结果类似<sup>[32]</sup>;在含有环丙沙星的鸭粪处理中,其微生物活性低于只添加鸭粪的处理,同样说明环丙沙星对土壤中微生物活性存在一定的抑制。Liu等<sup>[33]</sup>研究了金霉素与猪粪中提取的可溶性有机物混合后对土壤微生物群落功能多样性的影响,同样发现猪粪中可溶性有机物大大增加了土壤微生物群落的功能多样性;当可溶性有机物与金霉素混合后,其功能多样性则受到抑制。但值得注意的是,粪源环丙沙星对微生物活性的抑制性则要高于鸭粪中外源添加环丙沙星的处理。而人们以往对于畜禽粪便中抗生素的研究多采用外源添加的方法进行,因此得出的结论与实际畜禽粪便中抗生素对土壤微生物的影响可能存在一定的差异。

随着培养时间的增加,DF(CIP)处理的AWCD值在Day3时间有一个小幅度上升,之后开始逐渐下降并在第54天时低于所有处理,说明粪源环丙沙星对微生物活性的抑制作用更强。其原因可能是粪源环丙沙星与人工添加环丙沙星两处理中环丙沙星的残留浓度与结构不同。研究表明进入到畜禽机体后的抗生素会改变肠道中微生物种类<sup>[34]</sup>,从而影响对食物的消化和利用效率并导致畜禽粪便的组成成分发生改变<sup>[35-38]</sup>。Lamshöft等<sup>[39]</sup>研究发现喂食磺胺嘧啶后的猪粪不仅含有母体抗生素,同时还有机体

中生物转化产生的惰性或具有生物活性的代谢产物,而这些次级产物的毒性甚至比母体抗生素的毒性还大<sup>[40-41]</sup>。而CIP处理的AWCD值从Day3开始抑制作用减弱,在CK上下波动,但始终低于DF和DF + CIP处理;说明环丙沙星对微生物影响复杂,在初期表现为抑制,之后可能存在短暂刺激作用。原因可能是环丙沙星进入土壤后可以被吸附<sup>[42]</sup>,同时微生物也逐渐适应新的土壤环境,而一些有抗性的微生物甚至以抗生素本身为碳源进行代谢分解,并产生一些优势微生物种群<sup>[43-44]</sup>。当试验进行至第81天时,不同处理之间微生物活性的差异减小,此时环丙沙星对微生物的影响作用逐渐减弱,这可能源于随着培养时间延长抗生素的浓度降低,土壤微生物群落功能有所恢复或者得到改善<sup>[45]</sup>,具体原因还有待进一步研究。

#### 3.2 粪源环丙沙星对土壤微生物功能多样性的影响

抗生素类药物进入土壤后,能够直接杀死某些微生物或者抑制其活性<sup>[46]</sup>,从而对微生物群落结构和功能等的多样性产生影响。由Biolog多样性指数分析结果可知,鸭粪对土壤中利用碳源微生物的丰富度、均匀度、优势度和碳源利用丰富度等指数均有显著影响,主要原因还是由于鸭粪中含有大量有机质和氮磷等养分引起的。而不同处理中,添加环丙沙星后使得微生物的各项指数均明显下降,结合主成分分析结果发现,添加鸭粪、环丙沙星后均会改变土壤中微生物的群落功能多样性,这种差异性表现在利用碳源微生物物种多样性、优势种群及其利用的碳源种类的不同。在各项指数中,CIP处理最低,而DF(CIP)处理则显著低于DF + CIP处理,说明粪源环丙沙星对微生物的影响有别于外源添加的DF + CIP处理,这与AWCD的研究结果基本一致。

综合本研究结果可得出以下几个结论:(1)鸭粪能够显著增强土壤中微生物活性,并提高其利用碳源微生物的物种丰富度指数、均匀度指数、优势度指数和碳源利用丰富度指数;(2)粪源环丙沙星与在鸭粪中人工添加的环丙沙星比较,两者对微生物活性和群落功能的影响存在一定的差异,主要表现为粪源环丙沙星对土壤微生物活性与功能抑制性更强;(3)培养期间,不同培养时间微生物对碳源利用的种类差异较大,前期主要是糖类、羧酸类、聚合物类、氨基酸类等,而后期利用的碳源主要为糖类和羧酸类。

## 参考文献:

- [1] Halling-Sørensen B, Nors Nielsen S, Lanzky P F, et al. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment—a review [J]. *Chemosphere*, 1998, 36(2): 357–393
- [2] Jjemba P K. The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: a review [J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2002, 93(1-3): 267–278
- [3] Kumar K, Gupta S C, Chander Y, et al. Antibiotic use in agriculture and its impact on the terrestrial environment [J]. *Advances in Agronomy*, 2005, 87: 1–54.
- [4] Sarmah A K, Meyer M T, Boxall A B A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment [J]. *Chemosphere*, 2006, 65(5): 725–759
- [5] Boxall A, Kay P, Blackwell P, et al. Fate of Veterinary Medicines Applied to Soils [M]. *Pharmaceuticals in the Environment*: Springer, 2004: 165–180
- [6] Liu L, Liu Y H, Liu C X, et al. Potential effect and accumulation of veterinary antibiotics in *Phragmites australis* under hydroponic conditions [J]. *Ecological Engineering*, 2013, 53(0): 138–143
- [7] 周启星, 罗义, 王美娥. 抗生素的环境残留、生态毒性及抗性基因污染[J]. *生态毒理学报*, 2007, 02(3): 243–251  
Zhou Q X, Luo Y, Wang M E. Environmental residues and ecotoxicity of antibiotics and their resistance gene pollution: A review [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2007, 2(3): 243–251 (in Chinese)
- [8] 孔维栋, 朱永官. 抗生素类兽药对植物和土壤微生物的生态毒理学效应研究进展[J]. *生态毒理学报*, 2007, 2(01): 1–9  
Kong W D, Zhu Y G. A review on ecotoxicology of veterinary pharmaceuticals to plants and soil microbes [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2007, 2(1): 1–9 (in Chinese)
- [9] Andreu V, Blasco C, Picó Y. Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2007, 26(6): 534–556
- [10] Hektoen H, Berge J A, Hormazabal V, et al. Persistence of antibacterial agents in marine sediments [J]. *Aquaculture*, 1995, 133(3-4): 175–184
- [11] Golet E M, Alder A C, Giger W. Environmental exposure and risk assessment of fluoroquinolone antibacterial agents in wastewater and river water of the Glatt Valley Watershed, Switzerland [J]. *Environmental Science & Technology*, 2002, 36(17): 3645–3651
- [12] Lindberg R H, Wennberg P, Johansson M I, et al. Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden [J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39(10): 3421–3429
- [13] Le T X, Munekage Y. Residues of selected antibiotics in water and mud from shrimp ponds in mangrove areas in Viet Nam [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2004, 49(11-12): 922–929
- [14] Kummer K. Antibiotics in the aquatic environment—a review—Part I [J]. *Chemosphere*, 2009, 75(4): 417–434
- [15] Xiao Y, Chang H, Jia A, et al. Trace analysis of quinolone and fluoroquinolone antibiotics from wastewaters by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1214(1-2): 100–108
- [16] Rosendahl I, Siemens J, Kindler R, et al. Persistence of the fluoroquinolone antibiotic difloxacin in soil and lacking effects on nitrogen turnover [J]. *J Environ Qual*, 2012, 41(4): 1275–1283
- [17] Zhu Y G, Johnson T A, Su J Q, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(9): 3435–3440
- [18] Shah S Q, Colquhoun D J, Nikuli H L, et al. Prevalence of antibiotic resistance genes in the bacterial flora of integrated fish farming environments of Pakistan and Tanzania [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(16): 8672–8679
- [19] Wichmann F, Udikovic-Kolic N, Andrew S, et al. Diverse antibiotic resistance genes in dairy cow manure [J]. *mBio*, 2014, 5(2): e01017–01013
- [20] Hammesfahr U, Kotzerke A, Lamshoff M, et al. Effects of sulfadiazine-contaminated fresh and stored manure on a soil microbial community [J]. *European Journal of Soil Biology*, 2011, 47(1): 61–68
- [21] Reichel R, Rosendahl I, Peeters E T H M, et al. Effects of slurry from sulfadiazine-(SDZ) and difloxacin-(DIF) medicated pigs on the structural diversity of microorganisms in bulk and rhizosphere soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2013, 62(0): 82–91
- [22] Pierce M L, Ward J E, Dobbs F C. False positives in Biolog EcoPlates™ and MT2 MicroPlates™ caused by calcium [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2014, 97(0): 20–24
- [23] 田雅楠, 王红旗. Biolog 法在环境微生物功能多样性研究中的应用[J]. *环境科学与技术*, 2011, 34(03): 50–57  
Tian Y N, Wang H Q. Application of Biolog to study of envi-

- ronmental microbial function diversity [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 34(3): 50–57 (in Chinese)
- [24] Yoshitake S, Fujiyoshi M, Watanabe K, et al. Successional changes in the soil microbial community along a vegetation development sequence in a subalpine volcanic desert on Mount Fuji, Japan [J]. *Plant and Soil*, 2013, 364(1–2): 261–272
- [25] Buyer J S, Zuberer D A, Nichols K A, et al. Soil microbial community function, structure, and glomalin in response to tall fescue endophyte infection [J]. *Plant and Soil*, 2011, 339(1–2): 401–412
- [26] Garland J L, Mills A L. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(8): 2351–2359
- [27] Zabinski C A, Gannon J E. Effects of recreational impacts on soil microbial communities [J]. *Environmental Management*, 1997, 21(2): 233–238
- [28] 高定, 陈同斌, 刘斌, 等. 我国畜禽养殖业粪便污染风险与控制策略 [J]. *地理研究*, 2006, 25(2): 311–319
- Gao D, Chen T B, Li B, et al. Releases of pollutants from poultry manure in China and recommended strategies for the pollution prevention [J]. *Geographical Research*, 2006, 25(2): 311–319 (in Chinese)
- [29] Xiong X, Yanxia L, Wei L, et al. Copper content in animal manures and potential risk of soil copper pollution with animal manure use in agriculture [J]. *Resources, Conservation and Recycling*, 2010, 54(11): 985–990
- [30] Hargreaves J C, Adl M S, Warman P R. A review of the use of composted municipal solid waste in agriculture [J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2008, 123(1–3): 1–14
- [31] Weber J, Karczewska A, Drozd J, et al. Agricultural and ecological aspects of a sandy soil as affected by the application of municipal solid waste composts [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(6): 1294–1302
- [32] Cui H, Wang S P, Jia S G, et al. Influence of ciprofloxacin on the microbial catabolic diversity in soil [J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 2013, 48(10): 869–877
- [33] Liu B, Li Y, Zhang X, et al. Combined effects of chlortetracycline and dissolved organic matter extracted from pig manure on the functional diversity of soil microbial community [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 74(0): 148–155
- [34] Raun A. Rumensin "then and now" [J]. *Rumensin in the 1990s* Elanco Animal Health, Denver, 1990, 1–20
- [35] Klopfenstein T, Purser D, Tyznik W. Influence of aureomycin on rumen metabolism [J]. *Journal of Animal Science*, 1964, 23(2): 490–495
- [36] Elmund G K, Morrison S, Grant D, et al. Role of excreted chlortetracycline in modifying the decomposition process in feedlot waste [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1971, 6(2): 129–132
- [37] Patten D, Wolf D, Kunkle W, et al. Effect of antibiotics in beef cattle feces on nitrogen and carbon mineralization in soil and on plant growth and composition [J]. *Journal of Environmental Quality*, 1980, 9(1): 167–172
- [38] Tedeschi L O, Fox D G, Tylutki T P. Potential environmental benefits of ionophores in ruminant diets [J]. *Journal of Environmental Quality*, 2003, 32(5): 1591–1602
- [39] Lamshöft M, Sukul P, Zühlke S, et al. Metabolism of <sup>14</sup>C-labelled and non-labelled sulfadiazine after administration to pigs [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 388(8): 1733–1745
- [40] Jiao S, Zheng S, Yin D, et al. Aqueous oxytetracycline degradation and the toxicity change of degradation compounds in photoirradiation process [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2008, 20(7): 806–813
- [41] Ebert I, Bachmann J, Khen U, et al. Toxicity of the fluoroquinolone antibiotics enrofloxacin and ciprofloxacin to photoautotrophic aquatic organisms [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2011, 30(12): 2786–2792
- [42] 崔皓, 王淑平. 环丙沙星在潮土中的吸附特性 [J]. *环境科学*, 2012, 33(8): 2895–2900
- Cui H, Wang S P. Adsorption characteristics of ciprofloxacin in ustic cambosols [J]. *Environmental Science*, 2012, 33(8): 2895–2900 (in Chinese)
- [43] 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
- [44] 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
- [45] Liu F, Wu J, Ying G G, et al. Changes in functional diversity of soil microbial community with addition of antibiotics sulfamethoxazole and chlortetracycline [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 95(6): 1615–1623
- [46] Colinas C, Ingham E, Molina R. Population responses of target and non-target forest soil organisms to selected biocides [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1994, 26(1): 41–47