

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20171130002

范萁莉, 孙永学, 彭金菊, 等. 硫酸粘菌素对土壤反硝化细菌 *nirS*、*nosZ* 基因多样性的影响[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(6): 157-165

Fan T L, Sun Y X, Peng J J, et al. Effects of colistin sulphate on *nirS*, *nosZ* gene diversity of soil denitrification bacteria [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(6): 157-165 (in Chinese)

硫酸粘菌素对土壤反硝化细菌 *nirS*、*nosZ* 基因多样性的影响

范萁莉^{1,3}, 孙永学², 彭金菊¹, 牛金利¹, 钟晓霞², 王勉之², 马驿^{1,*}

1. 广东海洋大学农学院动物医学系, 湛江 524088

2. 华南农业大学广东省兽药研制与安全评价重点实验室, 广州 510642

3. 沧州职业技术学院畜牧兽医系, 沧州 061001

收稿日期: 2017-11-30 录用日期: 2018-01-29

摘要: 建立室内的土壤硫酸粘菌素暴露胁迫模型, 采用末端限制性片段长度多态性分析(terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)技术分析不同浓度硫酸粘菌素残留对土壤反硝化细菌的影响。结果表明, 每个处理组 *nirS*、*nosZ* 基因的分类操作单元(Operational Taxonomic Units, OTU)总数均比对照组低, 且 *nirS* 基因呈现剂量依赖效应; 各组优势细菌 *nirS* 基因主要集中在 10 个片段中, *nosZ* 基因主要集中在 18 个片段中, *nirS* 基因较 *nosZ* 基因丰度变化大; 多样性指数分析表明, *nirS* 基因 Shannon 指数在 7 d 时, 高浓度组较对照组差异显著($P < 0.05$); Simpson 指数在各浓度处理组较对照组差异均显著($P < 0.05$); Pielou 指数在 7 d、49 d 时, 高浓度处理组与对照组差异显著($P < 0.05$); *nosZ* 基因 Shannon 指数在 35 d 时, 中浓度组与对照组差异显著($P < 0.05$); 49 d 时, 低浓度组与对照组差异显著($P < 0.05$); Simpson 指数在 21 d、35 d 时, 低浓度组与对照组差异显著($P < 0.05$); Pielou 指数在各处理组之间差异均不显著($P > 0.05$)。当药物含量 $\geq 5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, 反硝化细菌的均匀度、群落多样性降低, 优势度升高, 群落结构特征均发生改变, 其中对 *nirS* 基因影响显著。 *nirS* 基因更适合作为硫酸粘菌素污染的指示基因。

关键词: 硫酸粘菌素; 反硝化细菌; 多样性; 兽药; 残留

文章编号: 1673-5897(2018)6-157-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of Colistin Sulphate on *nirS*, *nosZ* Gene Diversity of Soil Denitrification Bacteria

Fan Tingli^{1,3}, Sun Yongxue², Peng Jinju¹, Niu Jinli¹, Zhong Xiaoxia², Wang Mianzhi², Ma Yi^{1,*}

1. Department of Veterinary Medicine of Agricultural College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

2. Guangdong Key Laboratory for Veterinary Pharmaceutics Development and Safety Evaluation, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

3. Department of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Cangzhou Technical College, Cangzhou 061001, China

Received 30 November 2017 accepted 29 January 2018

Abstract: Based on the colistin sulphate exposure experiments, the *nirS*, *nosZ* gene diversity of soil denitrification

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2017A030313133); 广东省自然科学基金重点项目(2016A030311029)

作者简介: 范萁莉(1990-), 女, 硕士, 助教, 研究方向为兽医药理学与毒理学, E-mail: ftl2015@126.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: mayi761@163.com

bacteria exposed were analyzed by using the terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) methods. The total Operational Taxonomic Units (OTU) of *nirS* and *nosZ* gene is lower than that of the control group. Furthermore, the changes of *nirS* gene diversity were dependent on the dose of colistin sulphate. The *nirS* genes of dominant bacteria mainly concentrated in 10 segments while *nosZ* genes in 18 segments in each group. The richness of *nirS* gene has larger changes than that of *nosZ* gene. There exist significant differences for the Shannon index of *nirS* genes between high concentration groups and the control groups on the 7th day of incubation ($P < 0.05$). On the 7th day, 49th day, there exist significant differences for Pielou index between the high concentration groups and the control group ($P < 0.05$). On the 35th day, there are significant differences for the Shannon index of *nirS* gene between the intermediate concentration groups and the control groups ($P < 0.05$). The Simpson index on 21st day, 35th day for the low concentration groups is significantly different from those of the control group ($P < 0.05$). However, the differences in Pielou index are not significant among each group ($P > 0.05$). When the drug concentration $\geq 5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, the evenness and diversity of the soil denitrification bacteria decreased and the community dominance increased simultaneously, which affected the *nirS* gene significantly. Our results suggested *nirS* genes were suitable as a reporter gene for colistin sulfate pollution.

Keywords: colistin sulfate; denitrifying bacteria; diversity; veterinary drugs; residue

环境介质中兽药的种类和含量随着畜禽和水产养殖业的快速发展逐年增加,兽药已成为土壤及水环境中一类重要的新型污染物。进入环境的兽药包括抗生素、消毒药、驱虫药、重金属及性激素等,其中抗生素在环境中残留对生态系统和人类健康的影响已逐步得到认识^[1-4]。抗生素进入土壤、水和沉积物等环境介质,经吸附-解吸、迁移和降解等过程重新分配,已证实可影响环境介质中微生物的生物量、活性、功能和群落结构^[5-8]。

硫酸粘菌素是人和动物广泛使用的一种抗生素,在临床中可用于防治家畜细菌性感染疾病,又可促进动物生长,内服难以吸收,大部分随粪便排出体外进入环境中。同时,研究表明随粪便排入环境中的硫酸粘菌素可导致土壤微生物群落结构多样性的改变,增加了微生物耐药性产生的几率^[9]。土壤中氮素循环在生态环境中是一个不可或缺的过程,而反硝化作用又是氮素循环中的重要环节之一,研究反硝化细菌相应的编码基因就显得尤为重要。国内外已有报道利用 DGGE、RFLP、Biolog 等技术探讨反硝化细菌的群落结构多样性^[10-13]。但是,目前国内关于硫酸粘菌素残留对生态环境影响的报道较少,本研究通过建立室内的土壤硫酸粘菌素暴露胁迫模型,对反硝化基因 *nirS*、*nosZ* 基因进行扩增、酶切、毛细管电泳扫描,以及末端限制性片段长度多态性分析(terminal restriction fragment length polymorphism, T-RFLP)分析,探讨硫酸粘菌素残留对反硝化细菌多样性的

影响。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 材料

土壤:采于广东海洋大学实验菜地,表层 10 ~ 20 cm 土壤。硫酸粘菌素(含量 98%)购自山东鲁抗医药股份有限公司(批号 150092214)。

1.2 方法

1.2.1 土壤处理与样品采集

新鲜土壤采集过 4 mm 筛后,测定土壤理化性质如下:pH 6.98;有机质 $24.65 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$;全氮 $2.41 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$;全磷 $6.82 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$;全钾 $6.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$;速效磷 $11.58 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;速效钾 $134 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。阴干后平均分成 5 组,每组 3 kg。

加入硫酸粘菌素使土壤含药浓度分别为 $0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,每组 3 个重复,调节土壤含水量至田间最大持水量的 50%,置人工气候箱中培养,参数设为温度 $(28 \pm 1) \text{ }^\circ\text{C}$,湿度 $75\% \pm 7\%$,光照 1333 lx ,间歇光照 12 h : 12 h。分别于处理后第 7、21、35、49 天时采集土壤样品,各加药组均以同一采样时间的 $0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组做对照。

1.2.2 土壤微生物总 DNA 提取

使用 OMEGA 试剂盒(美国)对不同周期土壤样品进行土壤微生物总 DNA 提取。

1.2.3 反硝化细菌 *nirS*、*nosZ* 基因扩增

采用 PCR 对目的基因片段进行扩增。引物序列为: *NirS*-F: 5' -GTSAACG TSAAGGARACSGG (5' -FAM) 和 *NirS*-R: 5' -GASTTCGGRTGSGTCTT-

GA; *NosZ*-1211: 5' -CG (C/T) TGTTTC (A/C) TCGA-CAGCCA(5' -FAM)和 *NosZ*-1917: 5' -CATGTGCAG (A/C/GT)GC(A/G)TGGCAGAA。50 μ L 扩增体系: 25 μ L MIX rTaq (TaKaRa, 日本); 2 μ L Primer-F; 2 μ L Primer-R; 4 μ L 总 DNA; 17 μ L ddH₂O。

nirS 基因的 PCR 条件: 94 $^{\circ}$ C、2 min, 94 $^{\circ}$ C、3 min, 56 $^{\circ}$ C、1 min, 72 $^{\circ}$ C、1 min, 36 个循环, 72 $^{\circ}$ C、10 min, 14 $^{\circ}$ C 保存。 *nosZ*: 94 $^{\circ}$ C、5 min, 94 $^{\circ}$ C、3 min, 58 $^{\circ}$ C、1 min, 72 $^{\circ}$ C、1 min, 41 个循环, 72 $^{\circ}$ C、5 min, 14 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 PCR 产物限制性酶切及毛细管电泳扫描

对 *nirS*、*nosZ* 基因 PCR 产物限制性酶切, 体系为: 30 μ L PCR 产物, 2 μ L HaeIII (上海生工生物), 2 μ L 10 \times Buffer, 6 μ L ddH₂O。上述酶切产物送上海生工技术有限公司进行毛细管电泳扫描。

1.2.5 数据统计与分析

使用 Genemarker 软件分析毛细管电泳结果, 除去荧光信号小于 100 RFU 的峰, 并且选取在 3 个重

复中都出现的峰纳入统计^[14]。

酶切图谱进行多样性指数分析使用 Biodap 软件, 多样性指数进行方差分析采用 SPSS6.12 软件。

2 结果 (Results)

2.1 *nirS*、*nosZ* 基因 PCR 扩增

反硝化细菌 *nirS* 基因 PCR 扩增产物的目的片段大小为 480 bp。 *nosZ* 基因 PCR 扩增产物的目的片段大小为 700 bp 左右。

nirS 基因酶切产物扫描图谱(部分)如图 1 所示, 各处理设置的 3 组重复的酶切图谱检出覆盖率均在 90% 以上。

2.2 反硝化细菌功能基因电泳图谱分析

2.2.1 *nirS* 基因电泳图谱 OTU 个数与片段丰度

在酶切图谱中, 每一个限制性片段(T-RFs)可判定为 1 种分类操作单元(Operational Taxonomic Units, OTU), 对应的峰面积则反映出该种类的相对数量^[15]。计算 OTU 的相对丰度值, 公式: 相对丰度值

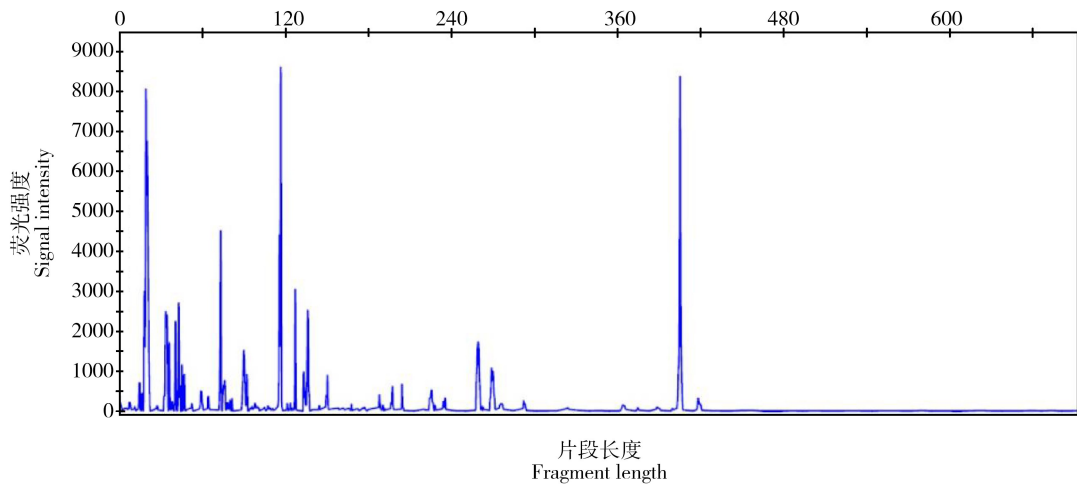


图 1 反硝化细菌 *nirS* 基因末端限制性片段长度多态性分析(T-RFLP)分析图谱(部分)

Fig. 1 Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) profiles of *nirS* gene (part)

表 1 反硝化细菌 *nirS* 基因总分类操作单元(OTU)个数与优势菌群个数

Table 1 Total Operational Taxonomic Units (OTU) and dominant bacteria of *nirS* gene

浓度/ (mg·kg ⁻¹)	第 7 天		第 21 天		第 35 天		第 49 天	
	总 OTU	优势菌群	总 OTU	优势菌群	总 OTU	优势菌群	总 OTU	优势菌群
(mg·kg ⁻¹)	Total OTU	Dominant bacteria	Total OTU	Dominant bacteria	Total OTU	Dominant bacteria	Total OTU	Dominant bacteria
0	91	7	78	5	77	6	68	7
0.5	85	6	79	8	73	6	55	5
5	82	5	61	3	68	6	54	6
50	78	5	73	4	54	2	59	5

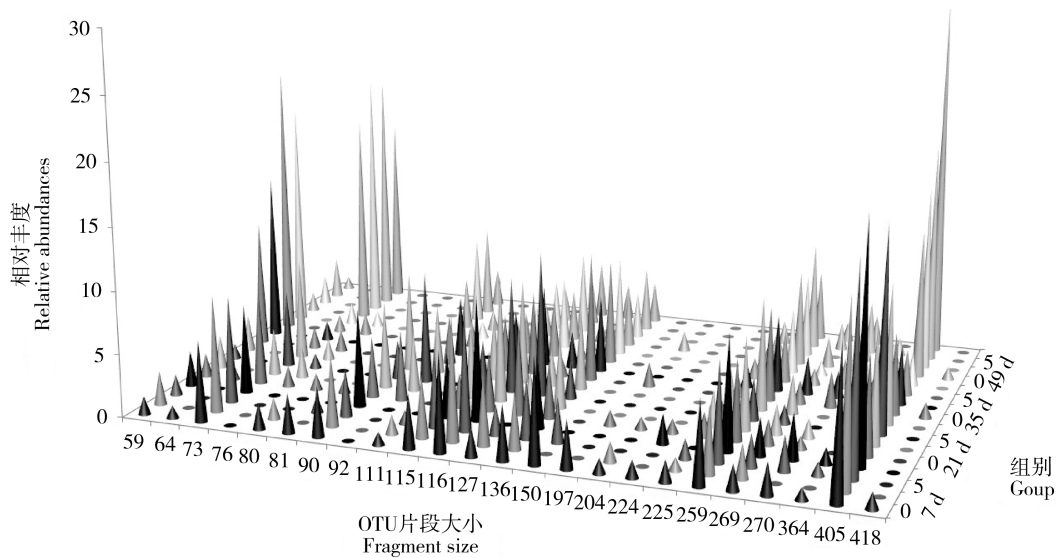


图2 *nirS* 基因优势菌群限制性片段(T-RFs)相对丰度

注:图中组别中0,5表示硫酸粘菌素浓度,单位为 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。下同。

Fig. 2 Histograms of Terminal Restriction Fragments (T-RFs) relative abundances in dominant populations of *nirS* gene

Note: the scale values on the axis of "Groups" mean 0, 5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ colistin sulphate. The same below.

=单个峰面积/所有总峰面积。计算所得结果舍去小于50 bp和相对丰度小于1%的片段,并定义片段丰度值>4%为优势菌群,<1%为偶见菌群,其余则为非优势菌群^[16]。不同处理组各采样点的总OTU个数与优势菌群个数见表1。每个处理组OTU总数均比对照组低,且各组随着浓度的升高逐渐降低,呈现剂量依赖效应。采样后期第35、49天时的总OTU个数均比采样前期低。而优势细菌种类无明显变化,在5~8种之间,但在49 d时优势数量降低。

由图2可见,各组优势细菌主要集中在59 bp、73 bp、115 bp、116 bp、127 bp、132 bp、225 bp、259 bp、269 bp、405 bp片段中。81 bp、111 bp、364 bp片段的细菌只在采样前期的丰度较高,后期丰度检测

不到或者从优势菌群变成偶见菌群;64 bp、80 bp、150 bp、197 bp、204 bp、224 bp、418 bp片段只在对照组丰度较高,而各处理组丰度较低。

2.2.2 *nosZ* 基因电泳图谱 OTU 个数与片段丰度

由表2可见,各处理组OTU总数均比对照组低,但并未呈现剂量依赖效应。第35天、第49天的总OTU个数均比采样前期低,优势细菌种类无明显变化,在14~18种之间。

图3可见,各组在整个采样周期中都占有很高比例的片段有52 bp、96 bp、111 bp、112 bp、114 bp、133 bp、134 bp、209 bp;细菌只在采样前期的丰度较高的有79 bp、107 bp、212 bp,后期丰度检测不到或者从优势菌群变成偶见菌群;142 bp、151 bp片段只在对照组丰度较高,各处理组丰度较低。

表2 反硝化细菌 *nosZ* 基因总 OTU 个数与优势菌群个数
Table 2 Total OTUs and dominant bacteria of *nosZ* gene

浓度/ ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	第7天 7 th d		第21天 21 st d		第35天 35 th d		第49天 49 th d	
	总 OTU	优势菌群	总 OTU	优势菌群	总 OTU	优势菌群	总 OTU	优势菌群
/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Total OTU	Dominant bacteria	Total OTU	Dominant bacteria	Total OTU	Dominant bacteria	Total OTU	Dominant bacteria
0	53	14	49	18	89	3	70	14
0.5	49	16	34	17	73	14	67	13
5	44	14	47	17	58	12	68	15
50	52	17	55	18	79	14	68	13

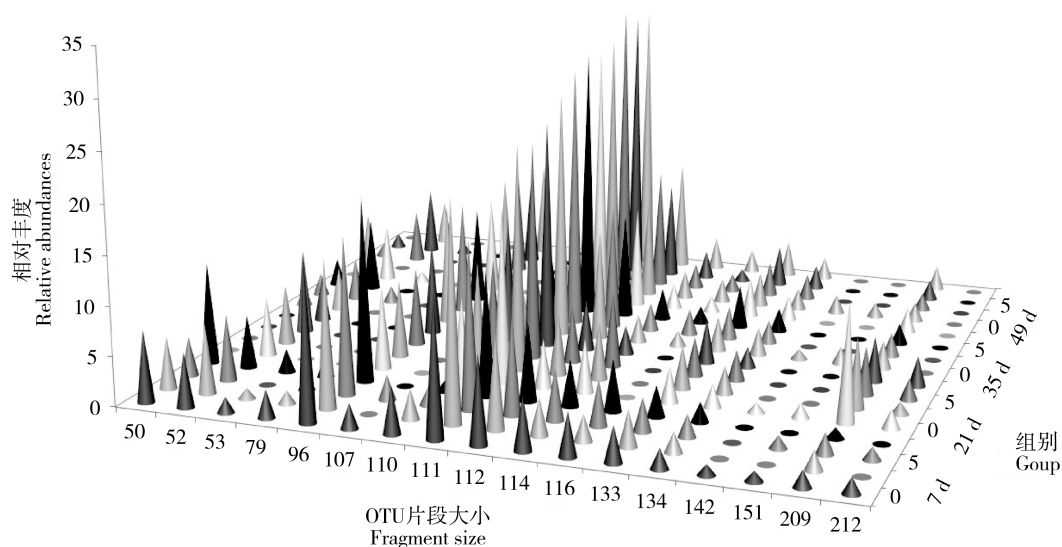


图 3 *nosZ* 基因优势菌群 T-RFs 相对丰度

Fig. 3 Histograms of T-RFs relative abundances in dominant populations of *nosZ* gene

2.3 反硝化细菌功能基因多样性指数

2.3.1 *nirS* 基因多样性指数

由表 3 可知,Shannon 指数在第 7 天时,高浓度组较对照组差异显著($P<0.05$);在第 21、35 天时,中、高浓度组较对照组差异显著($P<0.01$);第 49 天时,各处理组

较对照组差异均为显著($P<0.01$)。Simpson 指数在各处理组较对照组差异均显著($P<0.05$)。Pielou 指数在第 7、49 天时,高浓度处理组与对照组差异显著($P<0.05$);第 21 天时,中、高浓度组与对照组差异显著($P<0.05$);第 35 天时,中浓度组与对照组差异较明显($P<0.05$)。

表 3 *nirS* 基因多样性指数

Table 3 Diversity index of *nirS* gene

时间 Time	药物浓度/(mg·kg ⁻¹) Concentration/(mg·kg ⁻¹)	Shannon index	Simpson index	Pielou index
第 7 天 7 th d	0	3.45±0.11 ^a	0.04±0.006 ^a	0.8±0.007 ^a
	0.5	3.4±0.04 ^{ab}	0.049±0.002 ^b	0.77±0.014 ^{ab}
	5	3.39±0.10 ^{ab}	0.045±0.003 ^b	0.79±0.035 ^{ab}
	50	3.05±0.09 ^b	0.07±0.003 ^b	0.75±0.035 ^b
第 21 天 21 st d	0	3.59±0.11 ^A	0.032±0.003 ^c	0.82±0.021 ^a
	0.5	3.46±0.08 ^{AB}	0.04±0.003 ^c	0.81±0.014 ^{ab}
	5	3.22±0.02 ^B	0.066±0.005 ^a	0.74±0.028 ^c
	50	3.21±0.04 ^B	0.049±0.002 ^b	0.78±0.028 ^{bc}
第 35 天 35 th d	0	3.33±0.13 ^A	0.064±0.005 ^a	0.74±0.036 ^a
	0.5	3.24±0.05 ^{AB}	0.056±0.001 ^b	0.75±0.014 ^{ab}
	5	2.83±0.03 ^{BC}	0.116±0.004 ^c	0.67±0.014 ^b
	50	2.78±0.04 ^C	0.104±0.002 ^c	0.7±0.028 ^{ab}
第 49 天 49 th d	0	3.29±0.01 ^A	0.057±0.003 ^d	0.78±0.035 ^a
	0.5	2.91±0.02 ^B	0.083±0.007 ^c	0.72±0.021 ^{ab}
	5	2.87±0.04 ^B	0.089±0.001 ^b	0.72±0.021 ^{ab}
	50	2.8±0.04 ^B	0.118±0.002 ^a	0.7±0.035 ^b

注:同列数据中,小写字母肩标不同,差异显著($P<0.05$);大写字母不同,差异显著($P<0.01$);相同字母或无字母,差异不显著($P>0.05$)。下表同。

Note: In the same column, different small letter superscripts indicate significant difference ($P<0.05$); different capital letters indicate significant difference ($P<0.01$); the same or no letter superscripts indicate no significant difference ($P>0.05$). The same as below.

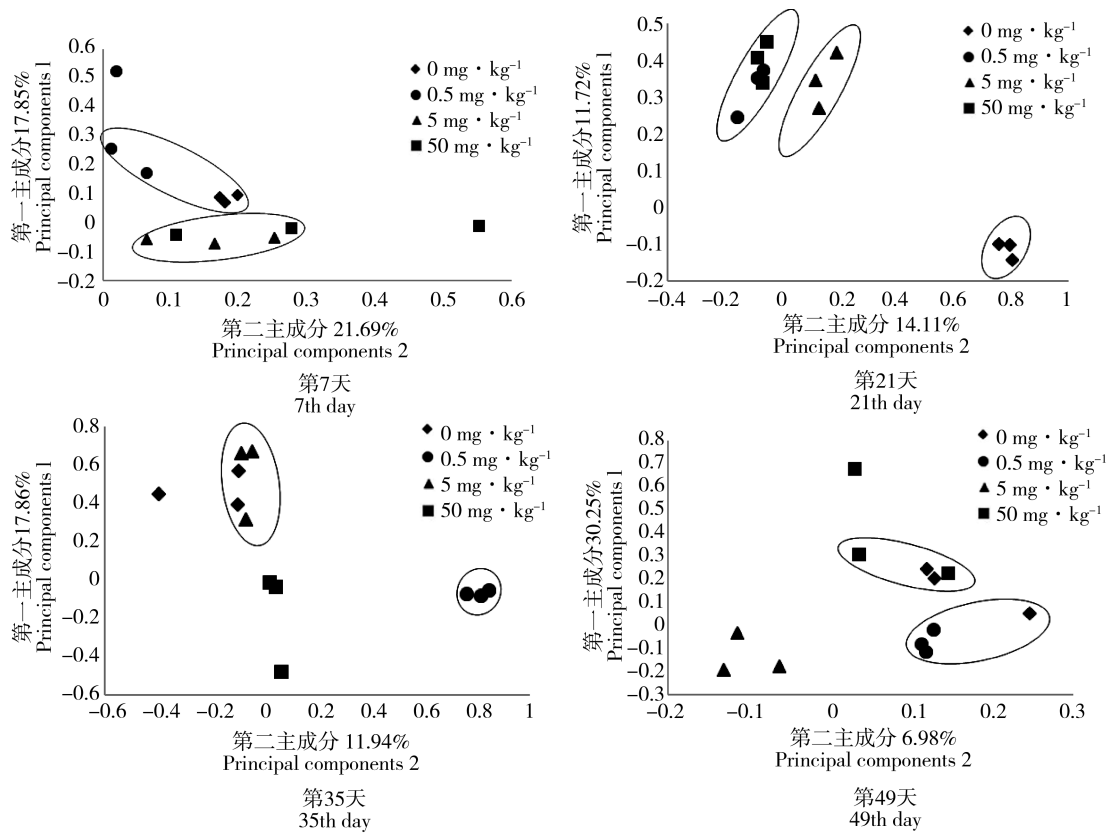


图4 *nirS* 基因主成分分析

Fig. 4 Principal components analysis of *nirS* gene

表4 *nosZ* 基因多样性指数

Table 4 Diversity index of *nosZ* gene

时间 Time	药物浓度/(mg·kg ⁻¹) Concentration/(mg·kg ⁻¹)	Shannon index	Simpson index	Pielou index
第7天 7 th d	0	3.077±0.076 ^a	0.069±0.007 ^a	0.78±0.017 ^a
	0.5	2.86±0.049 ^a	0.094±0.006 ^a	0.74±0.020 ^a
	5	2.94±0.091 ^a	0.078±0.009 ^a	0.77±0.028 ^a
	50	2.98±0.111 ^a	0.079±0.017 ^a	0.75±0.031 ^a
第21天 21 st d	0	2.97±0.098 ^a	0.07±0.011 ^b	0.76±0.017 ^a
	0.5	2.54±0.111 ^a	0.11±0.008 ^a	0.72±0.011 ^a
	5	2.85±0.064 ^a	0.086±0.008 ^b	0.74±0.028 ^a
	50	2.88±0.106 ^a	0.092±0.007 ^{ab}	0.72±0.023 ^a
第35天 35 th d	0	3.08±0.076 ^a	0.107±0.006 ^a	0.71±0.025 ^a
	0.5	2.92±0.106 ^{ab}	0.096±0.008 ^b	0.69±0.028 ^a
	5	2.75±0.085 ^b	0.123±0.011 ^a	0.68±0.025 ^a
	50	2.96±0.021 ^{ab}	0.106±0.011 ^{ab}	0.67±0.007 ^a
第49天 49 th d	0	2.93±0.028 ^a	0.108±0.004 ^a	0.7±0.023 ^a
	0.5	2.79±0.035 ^b	0.128±0.018 ^a	0.66±0.016 ^a
	5	2.88±0.042 ^{ab}	0.114±0.004 ^a	0.68±0.028 ^a
	50	2.89±0.113 ^{ab}	0.115±0.012 ^a	0.69±0.024 ^a

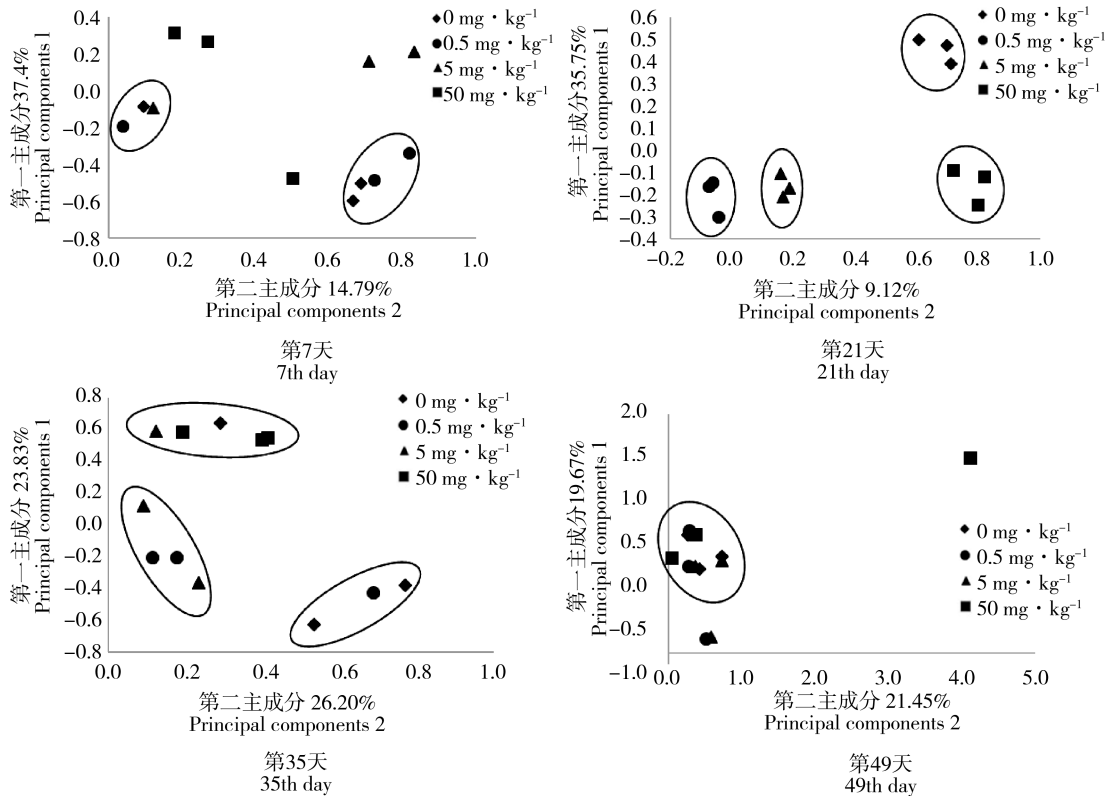


图 5 反硝化细菌 *norZ* 基因主成分分析

Fig. 5 Principal components analysis of *norZ* gene

2.3.2 *nosZ* 基因多样性指数

nosZ 基因多样性指数见表 4。*nosZ* 基因多样性在整个周期中呈现降低的趋势,但在第 7、21 天时,无显著差异($P>0.05$);第 35 天时,中浓度组与对照组差异显著($P<0.05$);第 49 天时,低浓度组与对照组差异显著($P<0.05$)。Simpson 指数在第 7、49 天时各组差异变化不显著($P>0.05$),低浓度组升高较明显;第 21、35 天时,低浓度组与对照组差异显著($P<0.05$);与 Shannon 指数结果相对应,说明硫酸粘菌素作用于土壤细菌对其优势度产生了影响。Pielou 指数在各处理组之间差异均不显著($P>0.05$),但各处理组较对照组均降低,说明硫酸粘菌素改变了土壤细菌的均匀度。

2.4 反硝化细菌功能基因主成分分析

2.4.1 *nirS* 基因主成分分析

硫酸粘菌素对 *nirS* 基因的主成分分析(principal components analysis, PCA)结果见图 4。4 个图中的贡献和分别为 39.54%、25.83%、29.80%、37.23%。在 4 个采样日期样品中,土壤微生物的群落结构特征均不相同,可能是硫酸粘菌素的作用改变了土壤

微生物群落内部种群之间的关系。

2.4.2 *nosZ* 基因主成分分析

硫酸粘菌素对 *norZ* 基因 PCA 分析见图 5,4 个图中的贡献和分别为 52.19%、44.87%、50.03% 和 41.12%,基本可以代表整个系统状况。在前 21 天中,各处理组的差异均显著;第 49 天时,各处理组的主成分 1 和主成分 2 差异不显著($P>0.05$),说明在第 49 天时,可能因硫酸粘菌素的迁移或降解导致浓度降低使细菌的生长活性出现了缓解。

3 讨论 (Discussion)

土壤微生物是土壤环境生态系统的重要组成部分,在有机质分解、土壤养分循环等过程中具有重要作用^[17],施肥、植物不同连作茬次、外来物种、污染物等对土壤微生物的多样性均会造成显著影响^[18-19]。反硝化细菌群落丰度同样会受多种环境因素的影响,如 pH、O₂ 含量、含水量、养分状况、有机质含量、含氮量及其含氮素的种类等,具有不同功能基因型的反硝化细菌群落对环境因素的响应程度存在较大差异。本研究表明 *nirS*、*nosZ* 基因均受硫酸粘菌素

影响。处理组 *nirS*、*nosZ* 基因的 OTU 总数均比对照组低,且 *nirS* 基因呈现剂量依赖效应。可能是硫酸粘菌素抑制了土壤反硝化细菌的生长,硫酸粘菌素为杀菌药,对革兰氏阴性菌的抗菌活性强,土壤中硫酸粘菌素为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,被抑制或杀灭的细菌较多,多样性就越小。同时,分析结果显示 *nirS* 基因比 *nosZ* 基因丰度变化大。白玲^[20]研究表明在洛克沙肿残留的土壤中,反硝化细菌 *nosZ* 基因丰度变化更大,本次试验结果与其相比有差异,可能是反硝化细菌对不同的药物敏感性不同,洛克沙肿是促生长添加剂,而硫酸粘菌素是抗菌型添加剂。

多样性指数结果表明,群落整体多样性随着剂量升高而降低,且 *nirS* 基因呈现了剂量依赖效应。当硫酸粘菌素 $\geq 5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,各组指数与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$),高浓度组差异显著 ($P < 0.01$)。马驿和陈杖榴^[21]研究了恩诺沙星对土壤反硝化细菌基因多样性的影响;张草^[22]研究了洛克沙肿对池塘底泥微生物群落结构多样性的影响,结果显示药物作用致 *nirS* 基因多样性指数在采样前期均明显下降,而中后期群落结构出现一定程度的恢复现象。本次试验结果与上述研究结果相同,可能由于前期抗菌药导致土壤微生物数量减少,群落多样性降低,而随时间延长药物在土壤中降解,对土壤微生物的影响减弱,土壤微生物生态平衡逐渐恢复,*nirS* 基因多样性的变化与土壤微生物数量的变化一致。PCA 分析结果表明,硫酸粘菌素对 *nirS* 基因的群落结构影响更大。

T-RFLP 图谱分析表明,在 *nirS* 基因图谱中,至少有 3 种细菌受硫酸粘菌素的影响呈现时间效应;硫酸粘菌素 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组至少有 7 种细菌在第 7 天即被明显抑制。在 *nosZ* 基因图谱中,虽有 3 种细菌后期未检测到,但硫酸粘菌素抑制 2 种基因型细菌的种类并不相同。硫酸粘菌素浓度仅为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,根瘤菌属细菌 *nirS*、*nosZ* 基因丰度明显降低。土壤中的反硝化细菌主要有假单胞菌属 (*Pseudomonadaceae*)、产碱杆菌属 (*Chalmers*),还有科奈瑟菌科 (*Neisseriaceae*)、硝化细菌科 (*Nitrobacteriaceae*)、红螺菌科 (*Rhodospirillaceae*)、芽孢杆菌科 (*Bacillus*)、螺菌科 (*Spirillaceae*)、根瘤菌科 (*Rhizobiaceae*) 等,硫酸粘菌素对何种细菌影响最大,有待进一步对不同片段基因做克隆测序研究。

目前,研究抗生素的生态毒性多在实验室模拟的生态环境中进行,通常使用单因子变量来进行研

究,条件可控。但在自然环境中存在多种影响因素,条件往往不可控,室内模拟实验与自然条件的结果有一定的差异。因此,为进一步探究抗生素对土壤微生物多样性的影响,需采集畜禽养殖实地环境中土壤垂直分布样本,同步进行抗生素残留浓度与氮素循环中硝化反硝化路径主要功能基因响应之间的量效相关性分析,为养殖源性抗菌药物残留的生态风险评估提供依据。

致谢:感谢中国科学院生态环境研究中心郑华研究员在文章修改中给予的帮助。

通讯作者简介:马驿(1976—),男,动物医学博士,教授,主要研究方向为兽医药理学与毒理学,发表学术论文 60 余篇。

参考文献 (References):

- [1] Boxall A B, Fogg L A, Blackwell P A, et al. Veterinary medicines in the environment [J]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2004, 180: 1-91
- [2] Gamarra J S Jr, Godoi A F, de Vasconcelos E C, et al. Environmental risk assessment (ERA) of diclofenac and ibuprofen: A public health perspective [J]. *Chemosphere*, 2015, 120: 462-469
- [3] Zhang Y L, Lin S S, Dai C M, et al. Sorption-desorption and transport of trimethoprim and sulfonamide antibiotics in agricultural soil: Effect of soil type, dissolved organic matter, and pH [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2014, 21(9): 5827-5835
- [4] Arpin-Pont L, Bueno M J, Gomez E, et al. Occurrence of PPCPs in the marine environment: A review [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2016, 23(6): 4978-4991
- [5] Janecko N, Pokludova L, Blahova J, et al. Implications of fluoroquinolone contamination for the aquatic environment—A review [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2016, 35(11): 2647-2656
- [6] 马驿, 彭金菊, 王芸, 等. 环丙沙星对土壤微生物量碳和土壤微生物群落碳代谢多样性的影响 [J]. *生态学报*, 2013, 33(5): 1506-1512
Ma Y, Peng J J, Wang Y, et al. Effects of ciprofloxacin on microbial biomass carbon and carbon metabolism diversity of soil microbial communities [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(5): 1506-1512 (in Chinese)
- [7] Maselli Bde S, Luna L A, Palmeira Jde O, et al. Ecotoxicity of raw and treated effluents generated by a veterinary pharmaceutical company: A comparison of the sensitivities of different standardized tests [J]. *Ecotoxicology*,

- 2015, 24(4): 795-804
- [8] Rico A, Geng Y, Focks A, et al. Modeling environmental and human health risks of veterinary medicinal products applied in pond aquaculture [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2013, 32(5): 1196-1207
- [9] Le Devendec L, Mourand G, Bougeard S, et al. Impact of colistin sulfate treatment of broilers on the presence of resistant bacteria and resistance genes in stored or composted manure [J]. *Veterinary Microbiology*, 2016, 194: 98-106
- [10] Long A, Song B, Frیدی K, et al. Detection and diversity of copper containing nitrite reductase genes (*nirK*) in prokaryotic and fungal communities of agricultural soils [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2015, 91(2): 1-9
- [11] Cantera J J, Stein L Y. Molecular diversity of nitrite reductase genes (*nirK*) in nitrifying bacteria [J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(3): 765-776
- [12] Zhang L, Zeng G, Zhang J, et al. Response of denitrifying genes coding for nitrite (*nirK* or *nirS*) and nitrous oxide (*nosZ*) reductases to different physico-chemical parameters during agricultural waste composting [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(9): 4059-4070
- [13] Kandeler E, Deiglmayr K, Tschirko D, et al. Abundance of *narG*, *nirS*, *nirK*, and *nosZ* genes of denitrifying bacteria during primary successions of a glacier foreland [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(9): 5957-5962
- [14] 周慧. 云南高黎贡山自然保护区土壤微生物多样性研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2008: 40
Zhou H. Study on the soil microbial diversity in Gaoligongshan National Nature Reserve in Yunnan [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2008: 40 (in Chinese)
- [15] Clare E L, Chain F J, Littlefair J E, et al. The effects of parameter choice on defining molecular operational taxonomic units and resulting ecological analyses of metabarcoding data [J]. *Genome*, 2016, 59(11): 981-990
- [16] Zhang R, Thiagarajan V, Qian P Y, et al. Evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis in contrasting marine environments [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 65(1): 169-178
- [17] Steenwerth K L, Jackson L E, Calderon F J, et al. Soil microbial community composition and land use history in cultivated and grassland ecosystems of coastal California [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2002, 34(11): 1599-1611
- [18] Fauci M F, Dick R P. Soil microbial dynamics: Short and long-term effects of inorganic and organic nitrogen [J]. *Soil Science Society of America*, 1994, 58: 801-806
- [19] Marschner P, Kandeler E, Marschner B. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35(3): 453-461
- [20] 白玲. 洛克沙肿对土壤微生物结构与功能多样性的影响研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2013: 32-33
Bai L. Study on the influence of roxarsone on soil microbial structure and functional diversity [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2013: 32-33 (in Chinese)
- [21] 马驿, 陈杖榴. 恩诺沙星残留对土壤反硝化细菌氧化二氮还原酶(*nosZ*)基因多样性的影响[J]. *生态学报*, 2010, 30(4): 1011-1017
Ma Y, Chen Z L. Effects of enrofloxacin on molecular diversity of nitrous oxide reductase genes (*nosZ*) [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(4): 1011-1017 (in Chinese)
- [22] 张草. 洛克沙肿对池塘水生态功能及底泥微生物群落结构多样性的影响研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2014: 35-36
Zhang C. Influence of roxarsone on the ecological function of pond water and the diversity of microbial community structure in sediment [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2014: 35-36 (in Chinese) ◆