

恩诺沙星残留对土壤中固氮细菌固氮基因(*nifH*)多样性的影响

马 驿^{1,2}, 陈杖榴^{1,*}

(1. 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; 2. 广东海洋大学动物医学系, 湛江 524088)

摘要: 为了了解恩诺沙星在环境中残留对土壤微生物的影响, 通过 PCR 扩增、基因克隆、RFLP 分析法对恩诺沙星影响下的土壤微生物固氮酶 *nifH* 基因的分子多样性进行了分析。结果表明, 恩诺沙星作用于土壤后第 35 天, I—VI 组的 OTUs 与克隆子的百分比分别为: 34.31%、32.18%、26.04%、20.83%、19.09%、20.00%; 第 70 天, I—VI 组的 OTUs 与克隆子的百分比分别为: 23.85%、20.75%、18.26%、16.67%、14.58%、11.67%。对照组多样性指数均高于添加药物组, 第 35 天, 对照组的 Margalef 指数与添加药物各组差异均显著 ($P < 0.05$), 第 70 天, 仅与 10 $\mu\text{g/g}$ 和 50 $\mu\text{g/g}$ 两组差异显著; 第 35 天, 除了 0.01 $\mu\text{g/g}$ 组, 对照组的 Shannon-Wiener 指数与其他添加药物组差异均显著, 第 70 天, 仅与 10 $\mu\text{g/g}$ 和 50 $\mu\text{g/g}$ 两组差异显著。由此可见, 随着药物作用的时间延长, 药物含量 0.01—1 $\mu\text{g/g}$ 组土壤固氮微生物的多样性与对照组之间的差异变小。

关键词: 恩诺沙星; 土壤微生物多样性; 固氮细菌; RFLP

Effects of enrofloxacin on molecular diversity of nitrogenase reductase genes (*nifH*)

MA Yi^{1,2}, CHEN Zhangliu^{1,*}

1 Guangdong Key Laboratory for Veterinary Pharmaceuticals Development and Safety Evaluation, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

2 Department of Veterinary Medicine, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China

Abstract: The experiment was aimed to investigate the effects of ENR (enrofloxacin) on microbial community diversity in soil. The molecular diversity and community structure of nitrogen-fixing microbes were analyzed by PCR-based cloning and RFLP (restriction fragment length polymorphism) approach. PCR-RFLP analysis revealed that the percentages of OTUs to total clones among groups I to VI were 34.31%, 32.18%, 26.04%, 20.83%, 19.09% and 20.00%, respectively after 35 days' incubation, and that the percentages of them were 23.85%, 20.75%, 18.26%, 16.67%, 14.58% and 11.67% after 70 days' incubation, respectively. The effects of ENR on molecular diversity of nitrogen-fixing microbial communities were enhanced with the increasing ENR concentrations. The results showed that the Margalef Index in CK was significantly ($P < 0.05$) higher than that in the soils in which ENR was added after 35 days. However, the Margalef Index in CK was only significantly higher than that in the soils treated with 10 g/g and 50 g/g of ENR after 70 days, respectively. As for the Shannon-Wiener Indexes, CK was significantly higher than those in the groups treated with ENR except for 0.01 g/g after 35 days. The Shannon-Wiener Indexes were the same as Margalef Indexes after 70 days. It was indicated that the effects of ENR on molecular diversity of nitrogen-fixing microbial communities in the treated groups with ENR at the concentrations of 0.01 g/g to 1 g/g were not significantly distinguished from that of CK with the increasing of treatment time.

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (30130140)

收稿日期: 2008-09-24; **修订日期:** 2008-12-01

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: chenzt@scau.edu.cn

Key Words: Enrofloxacin; soil microbial community diversity; nitrogen-fixing bacterium; RFLP

恩诺沙星(enrofloxacin)作为动物专用抗菌药,已广泛用于动物感染性疾病的治疗。兽药进入动物机体后,不仅会在畜禽产品中残留,并且药物将以原形化合物和代谢产物的方式经粪、尿等排泄物进入生态环境,污染环境土壤、表层水体等,并通过食物链影响植物、动物和微生物的正常生命活动,最终将影响人类的健康^[1-2],恩诺沙星对植物和土壤微生物等的影响已有报道^[3-4]。土壤微生物是土壤生态系统的重要组成部分,其中土壤固氮微生物在植物养分利用等过程中发挥着关键的作用。土壤固氮微生物具有生物固氮功能,生物固氮占全球固氮量的75%,具有经济无污染等优点。氮分子是合成蛋白质和核酸分子中不可缺少的部分,没有氮素就没有生命。古细菌、真细菌等多种不同微生物都具有固氮能力^[5]。这些氮的固定都是通过微生物体内存在的一种具有催化功能的蛋白质——固氮酶来完成的,所有固氮酶中都含有编码铁蛋白的*nifH*基因^[6]。目前对*nifH*基因的研究主要依赖于非培养的方法,例如PCR克隆、PCR-RFLP、DGGE等,这些方法有利于对固氮生物群落进行全面的研究^[7]。本文采用固氮酶*nifH*基因特异性引物扩增土壤总DNA,并对扩增产物进行RFLP(restriction fragment length polymorphism,限制性片段长度多态性)分析,探讨恩诺沙星对土壤固氮微生物多样性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

- (1)土壤 采自华南农业大学花园苗圃10—20cm土层的均质土壤,色深,质细。
- (2)药物 恩诺沙星(98.5%),浙江国邦兽药有限公司,批号:050821-2。
- (3)仪器 电泳凝胶成像系统,英国UVItec公司;PCR扩增仪,德国eppendorfMastercycler公司。

1.2 方法

1.2.1 试液配制

土壤微生物总DNA提取缓冲液:0.1mol/L磷酸钠(pH8.0)、0.1mol/L Tris-HCl(pH8.0)、0.1mol/L EDTA(pH8.0)、0.1mol/L NaCl、1.5% CTAB,灭菌备用。

50×TAE;1×TE;LB培养基;2×YT培养基;X-gal液(20mg/mL);IPTG液等按照分子克隆实验指南第3版^[8]配制。

1.2.2 土壤处理

新鲜土样过4mm筛后于室温下放置3d,分装到250mL三角瓶中,150g土/瓶,加入不同浓度的恩诺沙星溶液后使土壤中药物含量分别为:I组0μg/g、II组0.01μg/g、III组0.1μg/g、IV组1μg/g、V组10μg/g、VI组50μg/g,每个处理设3个重复。将土壤含水量调至饱和持水量的50%,用具有透气作用的塑料膜封口后将三角瓶置于28℃恒温培养。培养过程中为了保持土壤湿度不变,用称重差减法每隔3d调节一次土壤水分。

1.2.3 土壤细菌总DNA的提取

于用药前1天、用药后第35、70天采集样品进行分析。土壤细菌总DNA的提取采用SDS高盐法,参照Zhou等^[9]的方法,进行适当修改。具体步骤如下:土壤混匀后称取2g于研钵中,加入液氮并充分研磨,重复5次;用7.2mL DNA提取缓冲液将土壤尽量移入30mL离心管中,并加入0.8mL溶菌酶使其终浓度为5mg/mL,混匀,37℃,225r/min震荡30min;加入1mL 20% SDS,混匀,65℃温育2h,期间每隔15min轻摇试管一次,3000r/min,离心10min,收集上清于另一30mL离心管;土壤中再加入2.4mL提取缓冲液和0.3mL 20% SDS提取,收集并合并上清;加入等体积的去蛋白剂(饱和酚:氯仿:异戊醇=25:24:1)于上清中,混匀,离心,收集上清再加入等体积的氯仿,混匀,离心,收集上清;按体积比加入0.8的异丙醇,室温下静置沉淀1h,9000r/min离心10min。弃去上清,沉淀用75%乙醇清洗2次;最后沉淀用0.5mL TE缓冲液(pH8.0)进行溶解,-20℃保存。

取总DNA产物5μL在0.6%琼脂糖凝胶中进行电泳,电泳时使用λDNA/HindⅢ作为DNA标准分子量,

紫外灯下观察电泳结果。

1.2.4 固氮酶 *nifH* 基因的 PCR 扩增

引物 *nifH*-34F(5'-AAAGG(C/T)GG(A/T)ATCGG(C/T)AA(A/G)TCCACCAC-3') 和 *nifH*-491R(5'-TTGTT(G/C)GC(C/G)GC(A/G)TACAT(G/C)GCCATCAT-3')^[10] 由上海英骏生物技术有限公司合成。PCR 反应体系: DNA 模板约(50ng/μL)0.5μL, 引物 F 和 R(20pmol/μL)各 0.5μL, dNTP(10mmol/L)0.5μL, Buffer(Mg²⁺ 20mmol/L)2.5μL, Taq 聚合酶(2U/μL)0.5μL, 补水至 25μL。PCR 扩增反应程序: 采用“降落”PCR 扩增, 94℃ 预变性 5min, 94℃ 40s, 57℃ 30s, 72℃ 1min, 2 个循环, 94℃ 40s, 56℃ 30s, 72℃ 1min, 2 个循环, 94℃ 40s, 55℃ 30s, 72℃ 1min, 2 个循环, 94℃ 40s, 54℃ 30s, 72℃ 1min, 2 个循环, 94℃ 40s, 53℃ 30s, 72℃ 1min, 2 个循环, 94℃ 40s, 52℃ 30s, 72℃ 1min, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 6min。

1.2.5 扩增产物的克隆

(1) 扩增产物的回收

利用 1.0% 琼脂糖凝胶(含 0.5μg/mL EB)电泳 PCR 扩增产物, 80V 恒压电泳 1.5h。然后在紫外透射仪上将相应的目标片段切下, 采用 DNA 快速纯化/回收试剂盒(购自 TaKaRa 公司)进行回收纯化。

取纯化产物 5μL 在 1.2% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 用 DL-2000 作为 DNA 标准分子量, 在紫外透射仪观察 DNA 片段的亮度, 与 Mark 的亮度对比, 粗略估计 DNA 含量。

(2) 纯化片断与 pMD20-T Vector 载体连接

根据厂商提供的说明书, 用 pMD20-T vector 载体试剂盒(购自 TaKaRa 公司)对回收的目标片断克隆。包括: 阳性对照 Control DNA 片段的克隆; 纯化片段(Insert DNA)的克隆; 感受态细胞的制备。

(3) 连接产物的转化

超净工作台内, 将感受态细胞在冰上溶解, 然后把连接产物全量(10μL)加入到 200μL 的感受态细胞中, 混匀, 置冰上 30min; 42℃ 加热 90s, 迅速放入冰浴中, 5min; 加入 800μL LB 液体培养基, 37℃ 震荡(150r/min)培养 1h; 3,500r/min, 5min, 弃去 860μL 上清, 将剩余的液体与沉淀混匀后全部(150μL)涂布于含 Amp(100μg/mL)的 LB 平板上(平板上预先加入 20μL X-gal 储存液和 5μL IPTG 溶液); 37℃ 遮光倒置培养过夜(14—16h), 观察转化效率。

1.2.6 阳性克隆的鉴定与目的片段扩增

(1) 裂解法快速鉴定重组质粒

将平板置于 4℃ 冰箱 1h, 使蓝色充分显现。用灭菌牙签挑选白色单菌落, 置于 1.5mL 含 Amp 的 LB 培养基中, 37℃ 震荡(180r/min)培养 8—12h, 用裂解法快速鉴定重组质粒是否有目的片段插入, 具体操作如下: 取 200μL 菌液于 1.5mL Eppendorf 离心管中, 12000r/min 离心 2min, 弃上清; 于沉淀中加入 20μL 溶液 I(10mmol/L EDTA), 剧烈振荡混匀; 加入 20μL 溶液 II(0.2mol/L NaOH, 1% SDS), 轻轻摇匀, 静置 5min; 加入 20μL 溶液 III(1mol/L KCl: 溴酚蓝 = 4:1), 轻轻摇匀, 冰浴 10min; 12000r/min 离心 5—6min, 取上清于点样孔, 80V 电压下 0.8% 琼脂糖电泳 1—2h, 白色菌落与蓝色菌落(没有插入片段)的电泳速率进行比较, 重组质粒中有插入片段的质粒电泳速率比没有插入片段的质粒慢, 条带滞后。

(2) 阳性克隆 *NifH* 片段的扩增

在 25μL 体系中加入 2μL 菌液直接进行 *nifH* 的 PCR 扩增, 用于扩增的引物为载体 pMD20-T Vector 的特异性引物 M13, 具体反应条件为 94℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 30s, 50℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 45s, 33 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min。

1.2.7 限制性酶切

将上述 PCR 扩增产物用限制性内切酶进行酶切, 选用 4 碱基限制性内切酶 *MspI* 和 *RsaI*。酶切反应为: 20μL 的反应体系含有纯化后的 PCR 产物 15μL(约 15μg), 10 × 缓冲液 2μL, *MspI* 内切酶和 *RsaI* 内切酶各 0.5μL(10U/μL), 去离子 H₂O 2μL, 37℃ 水浴 2—3h。

酶切产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 片段,经溴化乙锭染色和凝胶成像系统成像后,统计每个酶切图谱的 DNA 片段,对应于每一个菌株,有条带处以“1”表示,无条带处以“0”表示。小于 100bp 的片段在琼脂糖凝胶上难于辨别,均不统计,采用 SAS 数据分析软件中的聚类分析程序进行相似性聚类分析。

1.2.8 群落结构多样性的度量

对阳性克隆的 PCR 扩增产物进行酶切后,得到不同的谱带类型,每一特有的谱带类型代表了一个 OTU (operational taxonomic unit,操作分类单元),通过不同的 OTU 分析不同药物浓度组的细菌群落结构多样性,多样性采用以下指标度量:

Shannon-Wiener 多样性指数(H')

$$H' = - \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i, P_i = \frac{ni}{N}$$

式中, S 为 *nifH* 基因 RFLP 总类型数, ni 为第 i 种 *nifH* 基因 RFLP 类型克隆数, N 为总克隆数。

物种丰富度用 Margalef 指数(d_{Ma})

$$d_{Ma} = \frac{S-1}{\ln N}$$

2 结果与分析

2.1 土壤微生物总 DNA 的提取

环境样品总 DNA 的提取是微生物分子生态学研究中最基本的实验技术之一,从环境中获得高质量的微生物 DNA 是进行后续实验的基础,因此它必须真实而全面地反映环境微生物的多样性和丰度^[11]。本研究采用 SDS 高盐法提取的土壤细菌总 DNA 质量较好(图 1),其 DNA 片段约 23kb,且 DNA 产量较多,DNA 的提取量约为 10 μ g/g 干土。

2.2 固氮酶 *nifH* 基因的 PCR 扩增及克隆

SDS 高盐法所提取到的总 DNA 无需经任何的纯化处理,适当稀释后即可直接用于固氮酶 *nifH* 基因引物对的选择性扩增,并获取具正确长度(约 460bp)的 PCR 产物(图 2)。

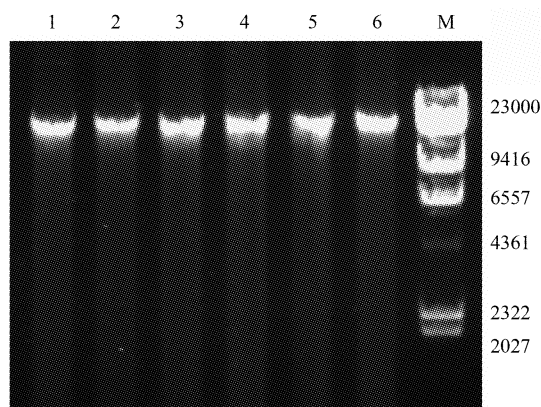


图 1 土壤微生物总 DNA 电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total DNA

1—6:总 DNA;M:λDNA/Hind III

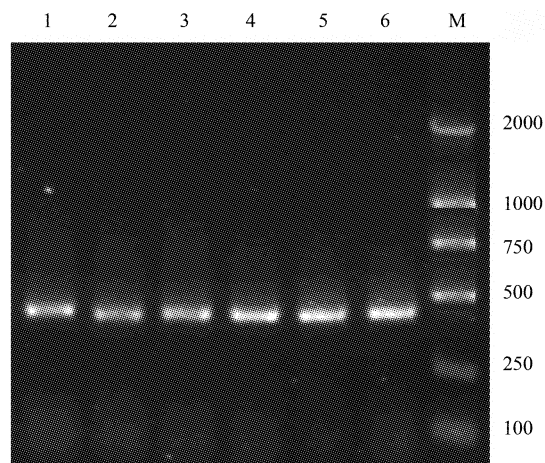


图 2 *nifH* 基因 PCR 产物电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR fragment of *nifH* gene

1—6:PCR 产物;M:DL-2000

将纯化的 *nifH* 基因扩增片段与载体连接后,转化至感受态细胞,得到克隆子。裂解法和 PCR 扩增鉴定法都是快速鉴定阳性克隆的方法,但裂解法的特异性不高。结果表明,裂解法呈阳性的克隆用 PCR 法鉴定不一定全为阳性,而 PCR 鉴定法成本较高,在连接、转化率不高的情况下,直接用 PCR 法鉴定就比较盲目。因此,将两种方法相结合,先用裂解法鉴定,再挑取阳性结果用 PCR 法鉴定,可以快速、准确地得到阳性重组子。

2.3 克隆子 RFLP 分析

利用 RFLP 法对克隆的细菌固氮酶 *nifH* 基因序列的多样性进行初步分析, 阳性克隆的 PCR 产物采用 *MspI* 和 *RsaI* 两种限制性内切酶酶切分析, 获得较丰富的酶切指纹图谱。由于酶切总量较大, 只列出部分酶切分析凝胶电泳结果(图 3), 克隆子的酶切指纹图谱相同者则认为它们是相同的基因型, 每一特有的谱带类型代表了一个 OTU。

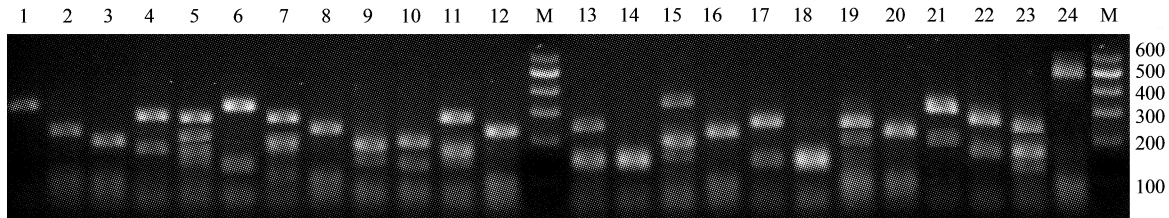


图 3 土壤细菌固氮酶 *nifH* 基因的 PCR-RFLP 图谱

Fig. 3 PCR-RFLP profiles of *nifH* gene of nitrogenase

1—24; RFLP 类型; M: 100bp DNA Ladder II

药物作用后第 35 天, 对照组 OTU 数量及 OTUs 与克隆子的百分比均高于添加药物组(表 1), I—VI 组的 OTUs 与克隆子的百分比分别为: 34.31%、32.18%、26.04%、20.83%、19.09%、20.00%。在各组中, 很大部分的 RFLP 谱带类型是由单个克隆子产生的, 也就是说, 大多数的克隆具有独特的 RFLP 谱带类型, 各组中单一克隆子占总克隆子的比例分别为: I 组 14.71%、II 组 16.09%、III 组 9.38%、IV 组 10.00%、V 组 5.45%、VI 组 4.44%, 对照组的单一克隆子所占比例明显高于添加药物组, 且随着药物浓度的增大而减小。

表 1 药物作用后第 35 天固氮酶 *nifH* 基因 RFLP 分析多样性指数

Table 1 Diversity of RFLP patterns of *NifH* gene of nitrogenase after the ENR addition for 35 days

组别 Group	药物含量 Concentration /($\mu\text{g/g}$)	克隆子 Clones /个	OTUs /个	OTUs 与克隆子百分比 Percentage of OTs and Clones/%	Margalef 指数 d_{Ma}	Shannon-Wiener 指数 H'
I	0.00	102	35	34.31	7.35a	3.27a
II	0.01	87	28	32.18	6.05b	2.89ab
III	0.1	96	25	26.04	5.26b	2.89bd
IV	1.0	120	25	20.83	5.01b	2.44bd
V	10.0	110	21	19.09	4.25b	2.54bd
VI	50.0	90	18	20.00	3.78b	2.44cd

同列数据无相同字母者, 表示差异显著 ($P < 0.05$)

药物作用后第 70 天, 对照组 OTU 数量及 OTUs 与克隆子的百分比均高于添加药物组(表 2), I—VI 组的 OTUs 与克隆子的百分比分别为: 23.85%、20.75%、18.26%、16.67%、14.58%、11.67%。各组中单一克隆子占总克隆子的比例分别为: I 组 8.26%、II 组 7.55%、III 组 3.48%、IV 组 4.90%、V 组 3.13%、VI 组 0%。

2.4 群落结构多样性分析

细菌群落结构多样性通过多样性指数进行评价, 药物作用后第 35 天(表 1), 对照组的固氮酶 *nifH* 基因 RFLP 分析多样性指数都高于添加药物各组, 添加药物组的 Margalef 指数与对照组比, 均差异显著 ($P < 0.05$), 添加药物各组相互之间的 Margalef 指数差异不显著。除了 0.01 $\mu\text{g/g}$ 组, 其它各组的 Shannon-Wiener 指数与对照组比均差异显著 ($P < 0.05$), 0.1、1、10 $\mu\text{g/g}$ 和 50 $\mu\text{g/g}$ 各组相互之间 Shannon-Wiener 指数差异不显著。

药物作用后第 70 天(表 2), 对照组的固氮酶 *nifH* 基因 RFLP 分析多样性指数都高于添加药物各组。10 $\mu\text{g/g}$ 和 50 $\mu\text{g/g}$ 两组与对照组比多样性指数差异显著 ($P < 0.05$), 其它各组的 Margalef 指数和 Shannon-Wiener 指数与对照组比, 均差异不显著。

表 2 药物作用后第 70 天固氮酶 *nifH* 基因 RFLP 分析多样性指数Table 2 Diversity of RFLP patterns of *NifH* gene of nitrogenase after the ENR addition for 70 days

组别 Group	药物含量 Concentration /($\mu\text{g/g}$)	克隆子 Clones /个	OTUs /个	OTUs 与克隆子百分比 Percentage of OTs and Clones/%	Margalef 指数 d_{Ma}	Shannon-Wiener 指数 H'
I	0.00	109	26	23.85	5.33a	2.88a
II	0.01	106	22	20.75	4.50a	2.58a
III	0.10	115	21	18.26	4.22a	2.70a
IV	1.0	102	17	16.67	3.46ab	2.45a
V	10.0	96	14	14.58	2.85bc	2.06b
VI	50.0	120	14	11.67	2.72c	1.69c

同列数据无相同字母者,表示差异显著 ($P < 0.05$)

3 讨论

3.1 土壤微生物 DNA 的提取

从土壤微生物群体基因组的角度研究土壤微生物的多样性及其功能是一种可行的方法,并且近年来已经成为国内外研究的热点^[12-13]。传统方法研究微生物多样性有较大的困难,最主要的原因是对许多微生物物种难于培养分离,因为土壤中的微生物仅 0.01%—10% 可以培养,大部分微生物无法培养而未被人类所认识^[14]。从土壤中不经培养直接提取微生物的总 DNA,避免了在培养过程中的筛选和富集作用,能够更直接的反映土壤中的微生物多样性及种群分布情况,较之传统培养、分离、鉴定的全过程而言,更快也更准确,已经有多个报道指出,大约有 90% 以上的从提取的土壤总 DNA 中发现的菌种是以前未被分离得到或未经充分研究的^[15]。对土壤微生物进行分子生态学研究,关键是 DNA 的提取,目前,主要有两种方法提取土壤微生物 DNA,一是在土壤中直接裂解微生物,再提取 DNA;另一种是先将微生物菌体与土壤颗粒分开,再提取 DNA,一般认为第一种方法的提取效率高。本研究根据 Zhou 等人^[9]报道的 SDS 高盐法进行适当改良,提取土壤微生物 DNA 分子约 23kb,不仅提取的 DNA 含量高,且纯度也高,不需纯化适当稀释后就能作为模板直接用于 PCR 扩增,但未经稀释则无法扩增目的片段,可能是 DNA 提取物中残存的对 Taq 酶具有抑制作用的物质浓度较高。

3.2 PCR-RFLP 分析土壤微生物固氮酶 *nifH* 基因多样性

目前,PCR-RFLP 已广泛用于微生物多样性及微生物生态研究中^[7]。PCR-RFLP 是对长度相近的 rDNA 序列,根据限制性内切酶酶切片段大小和数量的不同,通过电泳图谱的对比来分析微生物群落的组成。原理为电泳呈现的每种片段长度均为该样本的一个性状,依据每个出现的性状统计,可用作分类不同的样本,因此,愈多的性状则分类愈明显,将得到更高的分类可信度。固氮酶的多样性是由编码固氮酶的基因决定的,不同属种间固氮微生物的固氮基因(nitrogen fixation genes, *nif*)是有差异的,张于光等^[16-17]通过 PCR-RFLP 分析了不同植被土壤固氮微生物固氮基因(*nifH*)的多样性。本研究以土壤微生物总 DNA 为模板,PCR 扩增了固氮酶 *nifH* 基因,用 *MspI* 和 *RsaI* 两种限制性内切酶进行双酶切,电泳呈现的 DNA 片段较丰富,得到了较多的 OTU,可较好地微生物种群多样性的分析。

3.3 恩诺沙星对固氮微生物的生物多样性的影响

本研究通过在土壤中添加恩诺沙星,观察了药物作用下土壤固氮微生物的多样性,结果表明,药物作用后第 35 天和第 70 天对照组 OTU 数量及 OTUs 与克隆子的百分比均高于添加药物组,对照组的单一克隆子所占比例明显高于添加药物组。OTU 数量愈多、OTUs 与克隆子的百分比愈大,则微生物的种类多、物种丰富,单一克隆子虽然表示该 OTU 的丰富度很小,但也意味着该物种的存在,单一克隆子所占比例愈多,则物种越丰富。添加药物后 OTU 数量减少,OTUs 与克隆子的百分比降低,单一克隆子所占比例减少,都说明在药物的作用下,部分土壤固氮微生物被抑制,种类减少,微生物群落丰富度降低,且药物浓度越高影响越大。恩诺沙星的抗菌机理是能选择性地抑制细菌特别是革兰氏阴性菌的 DNA 回旋酶,使细菌无法繁殖,因此,恩诺沙星抑

制了土壤固氮菌 DNA 的复制,使细菌数量降低,恩诺沙星含量愈高,被抑制的固氮微生物愈多,则多样性愈小。第 35 天对照组的 OTUs 数以及 OTUs 与克隆子百分比(%)均比第 70 天多,这可能是土壤在三角瓶中放置时间较长,不利于部分固氮细菌的生长,从而使生物多样性下降的原故。

药物作用后第 35 天和第 70 天对照组多样性指数都高于添加药物各组。第 35 天,对照组与添加药物各组的 Margalef 指数差异均显著,第 70 天,仅与 10 $\mu\text{g/g}$ 和 50 $\mu\text{g/g}$ 两组差异显著;同样,第 35 天,除了 0.01 $\mu\text{g/g}$ 组,对照组与其它添加药物各组的 Shannon- Wiener 指数差异均显著,第 70 天,仅与 10 $\mu\text{g/g}$ 和 50 $\mu\text{g/g}$ 两组差异显著。Shannon- Wiener 指数反映物种多样性, Margalef 指数反映物种丰富度,恩诺沙星残留对土壤固氮细菌物种的多样性和丰富度均有影响。随着药物作用于土壤的时间延长,低浓度组(0.01—1 $\mu\text{g/g}$)的多样性指数与对照组之间的差异变小,说明药物浓度增加对土壤固氮微生物多样性的影响并没有随着时间延长而增强。原因是多方面的,首先,土壤是一个复杂的生态体系,任何一个生态系统的发展变化都是多因素综合作用的结果,各种理化因子如土壤含水量、温度、pH、有机质、无机质等均能对恩诺沙星的稀释、水解、氧化等降解作用有一定影响。另外,各种矿物质尤其是 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等金属离子可与恩诺沙星发生螯合,加上土壤对药物的吸附作用不利于药物的解离,致使土壤中实际药物浓度降低^[18]。更重要的是,土壤中微生物、原虫等土壤生物种类繁多,有些微生物对恩诺沙星不敏感,所以微生物也能降解土壤中的恩诺沙星,从而逐渐恢复土壤微生物生态平衡。因此,低浓度药物组的多样性指数与对照组之间的差异变得不显著。但恩诺沙星在环境中降解缓慢,如果土壤中长期保持着高浓度的恩诺沙星,则因为土壤微生物数量减少,多样性下降,而难以恢复土壤微生物生态平衡。

本文只用 RFLP 方法研究了土壤固氮微生物 *nifH* 基因的多态性,要完整地了解药物影响下微生物群落结构的系统信息,还必须结合 *nifH* 序列测定等方法。

References:

- [1] Ma Y, Chen Z L, Zeng Z L. Effects of enrofloxacin on functional diversity of soil microbial communities. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(8): 3400-3406.
- [2] Vaccaro E, Giorgi M, Longo V. Inhibition of cytochrome P₄₅₀ enzymes by enrofloxacin in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Toxicology*, 2003, (62): 27-33.
- [3] Migliore L, Cozzolino S, Fiori M. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. *Chemosphere*, 2003, (52): 1233-1244.
- [4] Wang J L, Liu J Z, Chen Z L, Chen L. Effects of enrofloxacin residue on number and community function diversity of soil microbes. *Chin J Appl Environ Biol*, 2005, 11(1): 86-89.
- [5] Young J P W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms//G. Stacey, R. H. Burris, and H. J. Evans eds. *Biological nitrogen fixation*. Chapman and Hall, New York, N. Y., 1992, 43-86.
- [6] Zehr J P, Jenkins B D, Short S M. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environmental Microbiology*, 2003, 5: 539-554.
- [7] Grieg F S, Bethany D J, Bess B W. Development and testing of a DNA macroarray to assess nitrogenase (*nifH*) gene diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70 (3): 1455-1465.
- [8] Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab (CSHL) Press, 2001.
- [9] Zhou J Z, Mary A B, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diversity composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(2): 316-322.
- [10] Rosch C, Mergel A, Bothe H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (8): 3818-3829.
- [11] Hurt R A, Qiu X Y, Wu L Y. Simultaneous recovery of RNA and DNA from soil and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67: 4495-4503.
- [12] Abed M M, Safi M D, Koster J. Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(4): 1674-1683.
- [13] Mehta M P, Butterfield D A, Baross J A. Phylogenetic diversity of nitrogenase (*nifH*) genes in deep-sea and hydrothermal vent environments of the Juan de Fuca Ridge. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(2): 960-970.

- [14] Erb R W, Wanger D L. Detection of polychlorinated biphenyl degradation genes on polluted sediments by direct DNA extraction and polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(12): 4065-4073.
- [15] Dedysh S N, Ricke P, Liesack W. *NifH* and *NifD* phylogenies: an evolutionary basis for understanding nitrogen fixation capabilities of methanotrophic bacteria. *Microbiology*, 2004, 150: 1301-1313.
- [16] Zhang Y G, Wang H M, Li D Q, Xiao Q M, Liu X D. The community and structure of nitrogen_fixing micro- organism in Sanjiangyuan Natural Reserve. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(3): 420-425.
- [17] Zhang Y G, Wang H M, Li D Q, Xiao Q M, Liu X D. Molecular diversity and phylogenetic analysis of nitrogen_fixing(*nifH*) genes in alp prairie soil of Sanjiangyuan natural reserve. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(2): 166-171.
- [18] Johannes T. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. *Environmental Science and Technology*, 2001, 35(17): 3397-3406.

参考文献:

- [1] 马骅, 陈杖榴, 曾振灵. 恩诺沙星对土壤微生物群落功能多样性的影响. *生态学报*, 2007, 27(8): 3400-3406.
- [4] 王加龙, 刘坚真, 陈杖榴, 陈林. 恩诺沙星对土壤微生物数量及群落功能多样性的影响. *应用与环境生物学报*, 2005, 11(1): 86-89.
- [16] 张于光, 王慧敏, 李迪强, 肖启明, 刘学端. 三江源地区不同植被土壤固氮微生物的群落结构研究. *微生物学报*, 2005, 45(3): 420-425.
- [17] 张于光, 王慧敏, 李迪强, 肖启明, 刘学端. 三江源高寒草甸土固氮基因(*nifH*)的多样性和系统发育研究. *微生物学报*, 2005, 45(2): 166-171.