

硫酸黏菌素残留对土壤固氮微生物 *nifH* 基因多样性的影响^{*}

范萆莉^{1,2} 彭金菊¹ 孙永学³ 牛金利¹ 钟晓霞³ 王勉之³ 苏 恺¹ 马 驿^{1#}

(1.广东海洋大学农学院,广东 湛江 524088;2.沧州职业技术学院畜牧兽医系,河北 沧州 061001;

3.华南农业大学广东省兽药研制与安全评价重点实验室,广东 广州 510642)

摘要 为了探讨硫酸黏菌素残留对土壤固氮微生物 *nifH* 基因多样性的影响,在土壤中添加 0、0.5、5.0、50.0 mg/kg 质量浓度的硫酸黏菌素,分别于 7、21、35、49 d 时采集土壤样品,提取土壤总 DNA,采用末端限制性片段长度多样性分析技术对土壤固氮微生物 *nifH* 基因进行多样性分析。结果表明,添加硫酸黏菌素处理的 *nifH* 基因分类操作单元数均比不添加硫酸黏菌素处理的少。硫酸黏菌素影响土壤固氮微生物 *nifH* 基因的多样性,使土壤固氮微生物的丰富度和均匀度降低。主成分分析发现,21 d 时,硫酸黏菌素对土壤微生物群落结构改变的影响最大,随着时间的延长,硫酸黏菌素对土壤固氮微生物群落结构多样性的影响有所减弱。

关键词 硫酸黏菌素 固氮微生物 基因多样性 土壤

DOI:10.15985/j.cnki.1001-3865.2019.06.009

Effects of colistin sulfate residue on the *nifH* gene diversity of soil nitrogen-fixing microorganisms FAN Tingli^{1,2}, PENG Jinju¹, SUN Yongxue³, NIU Jinli¹, ZHONG Xiaoxia³, WANG Mianzhi³, SU Kai¹, MA Yi¹. (1.Agricultural College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang Guangdong 524088; 2.Department of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Cangzhou Technical College, Cangzhou Hebei 061001; 3.Guangdong Key Laboratory for Veterinary Pharmaceuticals Development and Safety Evaluation, South China Agricultural University, Guangzhou Guangdong 510642)

Abstract: The effects of colistin sulfate on the *nifH* gene diversity of soil nitrogen-fixing microorganisms were investigated. Colistin sulfate was added in the soil with mass concentrations of 0, 0.5, 5.0 and 50.0 mg/kg. Soil samples were collected at 7, 21, 35 and 49 d, respectively. Total DNA was extracted and the diversity of *nifH* genes was analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism. Results showed that operational taxonomic units for *nifH* gene of colistin sulfate added treatments were lower than that of colistin sulfate not added treatment. Colistin sulfate affected the *nifH* gene diversity, making it abundance and homogeneity decreasing. Principal component analysis showed that colistin sulfate had the most significant effects on soil microbial community structure at 21 d. With time going on, the effects weakened.

Keywords: colistin sulfate; nitrogen-fixing microorganisms; gene diversity; soil

环境介质中兽药的种类、含量随着畜禽和水产养殖业的快速发展逐年增加,兽药残留已成为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、性激素等,其中抗生素残留对生态系统和人类健康的影响已越来越明显^[1-4]。兽药抗生素随动物排泄物进入土壤中,经吸附、解吸、迁移和降解过程可影响土壤中微生物的生物量、活性、功能和群落结构^[5-8],还可能诱导微生物产生耐药性。硫酸黏菌素是一种碱性多肽类抗生素,多用于治疗家畜细菌性感染,同时又因可促进生长而被广泛添加于畜禽的养殖饲料中。硫酸黏菌素易溶

于水,化学性质稳定,内服该药后大部分随着肠内容物排出体外进入到环境中。硫酸黏菌素很难降解^[9],土壤中硫酸黏菌素浓度越高,细菌数量就会越少^[10]。

氮是生物大分子蛋白质和核酸的关键组成元素。生物固氮约占全球植物需氮量的 75%(质量分数),土壤中多种微生物具有固氮能力^[11]。固氮微生物主要靠固氮酶来完成固氮,*nifH* 基因负责编码固氮酶组分铁蛋白亚基^[12]。本研究通过提取土壤总 DNA,扩增 *nifH* 基因,并采用一种新兴的研究微生物多样性的分子生物学方法末端限制性片段

第一作者:范萆莉,女,1990年生,硕士,助教,研究方向为动物营养与环境。# 通讯作者。

^{*} 广东省自然科学基金资助项目(No.2017A030313439);广东省自然科学基金重点资助项目(No.2016A020311029)。

长度多样性(T-RFLP)分析技术分析,探讨硫酸黏菌素对土壤固氮微生物 *nifH* 基因多样性的影响,以反映硫酸黏菌素对土壤固氮微生物多样性的影响。

1 材料与方法

1.1 土壤采集与处理

土壤采于广东海洋大学实验菜地(10~20 cm),过 4 mm 筛,土壤基本理化性质如下:pH 6.98、有机质 24.65 g/kg、全氮 2.41 g/kg、全磷 6.82 g/kg、全钾 6.2 g/kg、速效磷 11.58 mg/kg、速效钾 134 mg/kg。阴干后平均分成 4 组,每组分 3 份,每份 1 kg。每组的各份土壤中加入硫酸黏菌素,设定每组的硫酸黏菌素质量浓度分别为 0、0.5、5.0、50.0 mg/kg,每组 3 份为 3 个重复。调节土壤含水量至田间最大持水量的 50%^[13],置于人工气候箱中培养,温度(28±1)℃,湿度 75%±7%,每天光照 12 h,光照强度 1 333 lx。分别于 7、21、35、49 d 时采集土壤样品。

1.2 *nifH* 基因扩增

用 OMEGA 试剂盒对土壤样品进行总 DNA 提取。采用聚合酶链式反应(PCR)对 *nifH* 基因进行扩增^[14]。扩增引物为:*nifH*-F,5'-AAAGG(C/T)GG(A/T)ATCGG(C/T)AA(A/G)TCCACCAC-3'(5'端羧基荧光素标记);*nifH*-R,5'-TTGTT(G/C)GC(G/C)GC(A/G)TACAT(G/C)GCCATCAT-3'。50 μL 扩增体系:MIX rTaq(TAKARA,日本)25 μL;Primer-F 2 μL;Primer-R 2 μL;总 DNA 4 μL;双蒸水 17 μL。PCR 条件:94℃预变性 2 min,94℃变性 30 s,58℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,进行 36 个循环后,72℃延伸 10 min,14℃保存。

1.3 PCR 产物限制性酶切及毛细管电泳扫描

对 *nifH* 基因 PCR 产物进行限制性酶切,反应体系为:PCR 产物 30 μL,HaeIII 2 μL,10×Buffer 2 μL,双蒸水 6 μL。酶切产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行毛细管电泳扫描。

1.4 数据统计与分析

使用 Genemarker 软件分析毛细管电泳结果,除去相对荧光单位小于 100 的峰,并且选取各组 3 个重复中都出现的峰进行统计^[15]。每一个限制性片段可认为是一个分类操作单元(OTU),对应的峰面积反应该片段的相对数量^[16]。计算 OTU 相对丰度时舍去小于 50 bp 的片段,并且 OTU 相对丰度小于 1%的片段也舍去,定义 OTU 相对丰度>4%为优势菌群,OTU 相对丰度≤4%为非优势菌群^[17]。使用 Biodap 软件进行多样性指数分析,采用 SPSS 6.12 软件进行多样性指数方差分析。

2 结果与分析

2.1 *nifH* 基因电泳图谱分析

固氮微生物 *nifH* 基因 PCR 扩增产物的目的片段为 500 bp,检出率在 80%以上。不同硫酸黏菌素浓度处理的 OTU 数与优势菌群数见表 1。添加硫酸黏菌素处理后 OTU 数比不添加硫酸黏菌素总体有显著降低。优势菌群数在 2~10 之间,添加硫酸黏菌素的处理与不添加硫酸黏菌素的处理相比,前 35 天差异不大,但在 49 d 时出现极显著差异。

不同硫酸黏菌素浓度处理的 OTU 相对丰度如表 2 所示。优势菌群的碱基数集中在 50、52、59、60、93 bp 中。其中碱基数为 52 bp 时,添加硫酸黏菌素的处理的 OTU 相对丰度明显低于不添加硫酸黏菌素的处理,受硫酸黏菌素浓度影响较大;碱基数为 93、122、152、439 bp 时,在 50.0 mg/kg 硫酸黏菌素下 OTU 相对丰度也受到明显抑制;碱基数为 65、267、399 bp 时,OTU 相对丰度对硫酸黏菌素的作用也较为敏感。

2.2 *nifH* 基因多样性指数

固氮微生物 *nifH* 基因多样性指数的分析结果见表 3。7~21 d,Simpson 指数变化不明显,Simpson 指数在比较多样性时常与 Shannon 指数配合使用。21 d 时,硫酸黏菌素各浓度处理的 Shannon 指数与不添加硫酸黏菌素的处理差异不显著;50.0

表 1 不同硫酸黏菌素质量浓度处理的 *nifH* 基因 OTU 数与优势菌群数¹⁾
Table 1 OTU and dominate bacteria of *nifH* gene at different colistin sulfate mass concentrations

硫酸黏菌素 (mg·kg ⁻¹)	7 d		21 d		35 d		49 d	
	OTU	优势菌群	OTU	优势菌群	OTU	优势菌群	OTU	优势菌群
0	73.00±2.65a	4.67±0.58b	72.67±3.21a	7.67±0.58a	69.67±2.08a	8.33±1.53a	71.67±2.52a	9.33±2.3A
0.5	57.33±2.08b	6.33±0.58ab	59.67±3.79b	7.67±2.52a	60.67±2.08b	5.67±2.08a	61.67±1.53b	2.67±1.15B
5.0	52.00±1.00c	7.67±1.53a	62.67±1.58b	7.67±1.53a	62.67±5.86ab	7.33±2.52a	63.67±3.21b	3.33±1.15B
50.0	61.33±3.21b	5.67±2.08ab	60.67±2.08b	5.33±0.58a	61.67±3.06b	6.00±2.00a	61.67±2.52b	3.65±0.58B

注:1)同组数据中,标记相同字母表示差异不显著($P \geq 0.05$);标记不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$);标记不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。表 3 同。

表2 OTU 相对丰度
Table 2 Relative abundances of OTU

%

碱基数/bp	7 d				21 d			
	0 mg/L	0.5 mg/L	5.0 mg/L	50.0 mg/L	0 mg/L	0.5 mg/L	5.0 mg/L	50.0 mg/L
50	20.347	18.300	15.690	13.889	17.226	16.561	15.353	14.173
52	5.494	1.793	0.923	2.888	9.791	1.184	1.566	3.738
53	0.945	1.027	0.596	3.868	7.525	0	1.087	0
55	2.257	1.322	1.631	0	4.094	2.033	2.012	0
59	9.845	7.600	8.353	4.167	7.401	4.788	0	0
60	10.803	6.409	7.269	1.724	7.794	5.209	5.993	6.335
65	8.081	5.555	1.318	1.718	8.825	5.190	0.900	0.670
93	15.800	12.850	12.956	3.994	19.997	13.219	8.421	0.879
122	1.115	1.449	1.722	0	1.161	1.314	1.055	0
123	1.614	1.586	1.393	1.182	1.174	1.424	1.051	0
127	5.153	4.597	3.722	0	5.008	3.840	2.069	0
152	2.915	2.008	1.186	1.231	2.678	1.764	1.427	1.311
241	2.980	2.217	1.741	2.344	2.255	2.474	2.360	2.085
242	5.496	3.649	3.386	3.201	9.226	3.310	2.870	0
267	1.152	1.144	0.718	0.678	1.149	1.287	0	0
399	0.860	0.439	0.683	0.347	1.243	1.092	0	0
439	2.021	1.732	1.699	1.300	2.083	1.745	1.453	0.459
457	3.224	2.983	3.242	3.702	1.847	2.820	4.228	3.248

碱基数/bp	35 d				49 d			
	0 mg/L	0.5 mg/L	5.0 mg/L	50.0 mg/L	0 mg/L	0.5 mg/L	5.0 mg/L	50.0 mg/L
50	16.516	14.617	15.606	18.403	19.035	16.984	19.785	21.463
52	7.550	2.224	1.671	5.020	11.404	1.305	1.333	2.908
53	0	2.651	0	2.845	0	2.141	2.725	0
55	5.784	3.553	1.474	0	3.977	2.263	2.012	0
59	11.280	10.452	8.686	0	9.343	9.141	8.355	7.352
60	6.094	5.847	5.315	4.325	7.664	5.531	4.311	0
65	8.236	4.895	1.742	1.652	7.847	1.993	1.204	0.670
93	14.817	8.306	8.531	0.970	11.096	11.055	10.018	2.747
122	2.497	1.994	1.636	0	1.267	1.570	1.612	0
123	1.956	0	1.655	0	1.506	1.519	1.211	1.420
127	3.526	2.407	1.894	0	3.437	3.205	1.732	1.544
152	1.921	1.689	1.390	0.650	1.381	1.297	1.213	0.540
241	1.580	2.473	1.370	2.311	2.980	2.235	2.266	1.927
242	3.086	1.910	1.614	1.500	3.151	2.989	2.685	0
267	1.305	0	0	0	1.035	0	0	0
399	1.502	0	1.422	0	1.280	0	0	0
439	2.461	1.765	0.990	0.650	1.596	1.477	1.426	1.027
457	4.015	3.002	5.688	1.265	2.605	3.780	3.025	3.446

mg/kg处理的 Shannon 指数和 Simpson 指数在 35、49 d 时均与不添加硫酸黏菌素的处理差异极显著。Shannon 指数和 Simpson 指数越大,物种丰富度和均匀度越高,生物多样性越高。21 d 时,添加硫酸黏菌素处理的 Pielou 指数较不添加硫酸黏菌素的处理的显著降低;35、49 d 时,硫酸黏菌素 5.0、50.0 mg/kg 处理的 Pielou 指数与不添加硫酸黏菌素的处理的差异显著甚至极显著。由此可见,硫酸黏菌素会抑制固氮微生物生长,土壤固氮微生物群落多样性显著降低。

2.3 *nifH* 基因主成分分析

将各处理组的 *nifH* 基因 PCR 扩增产物进行

主成分分析,结果如图 1 所示。7、21、35、49 d 的主成分 1(PC1)与主成分 2(PC2)载荷贡献和分别为 63.21%、39.22%、53.75%、43.36%。硫酸黏菌素对 *nifH* 基因产生了较大影响。7 d 时 PC1 和 PC2 的载荷贡献均最高。21 d 时各浓度硫酸黏菌素处理的 PC1 和 PC2 组成发生了明显变化,说明硫酸黏菌素对土壤固氮微生物表现出了明显的影响,改变了土壤固氮微生物的群落结构。35、49 d 时 PC1 和 PC2 的载荷贡献也较 7 d 时明显偏低,但较 21 d 时高,可能与硫酸黏菌素在土壤中随着时间的迁移和转化有关,有待进一步探究。

表 3 *nifH* 基因多样性指数
 Table 3 Diversity index of *nifH* gene

时间/d	硫酸黏菌素/(mg·kg ⁻¹)	Simpson 指数	Shannon 指数	Pielou 指数
7	0	0.068±0.110AB	3.055±0.120a	0.790±0.0A
	0.5	0.084±0.035A	2.880±0.368b	0.785±0.035A
	5.0	0.067±0.010AB	3.025±0.078ab	0.795±0.007A
	50.0	0.077±0.103AB	2.960±0.509ab	0.765±0.120B
21	0	0.063±0.0C	3.060±0.004a	0.830±0.014a
	0.5	0.068±0.013B	2.945±0.233a	0.780±0.014b
	5.0	0.094±0.028A	2.935±0.191a	0.740±0.057c
	50.0	0.064±0.001BC	2.950±0.085a	0.770±0.014b
35	0	0.048±0.001C	3.255±0.014A	0.830±0.007a
	0.5	0.052±0.005BC	3.200±0.064AB	0.815±0.014a
	5.0	0.071±0.002B	3.025±0.035B	0.775±0.007b
	50.0	0.099±0.031A	2.820±0.156C	0.745±0.007c
49	0	0.052±0.028C	3.200±0.219A	0.800±0.057AB
	0.5	0.054±0.004BC	3.185±0.042A	0.815±0.0A
	5.0	0.071±0.001B	3.085±0.049B	0.770±0.007B
	50.0	0.135±0.125A	2.680±0.707C	0.725±0.191C

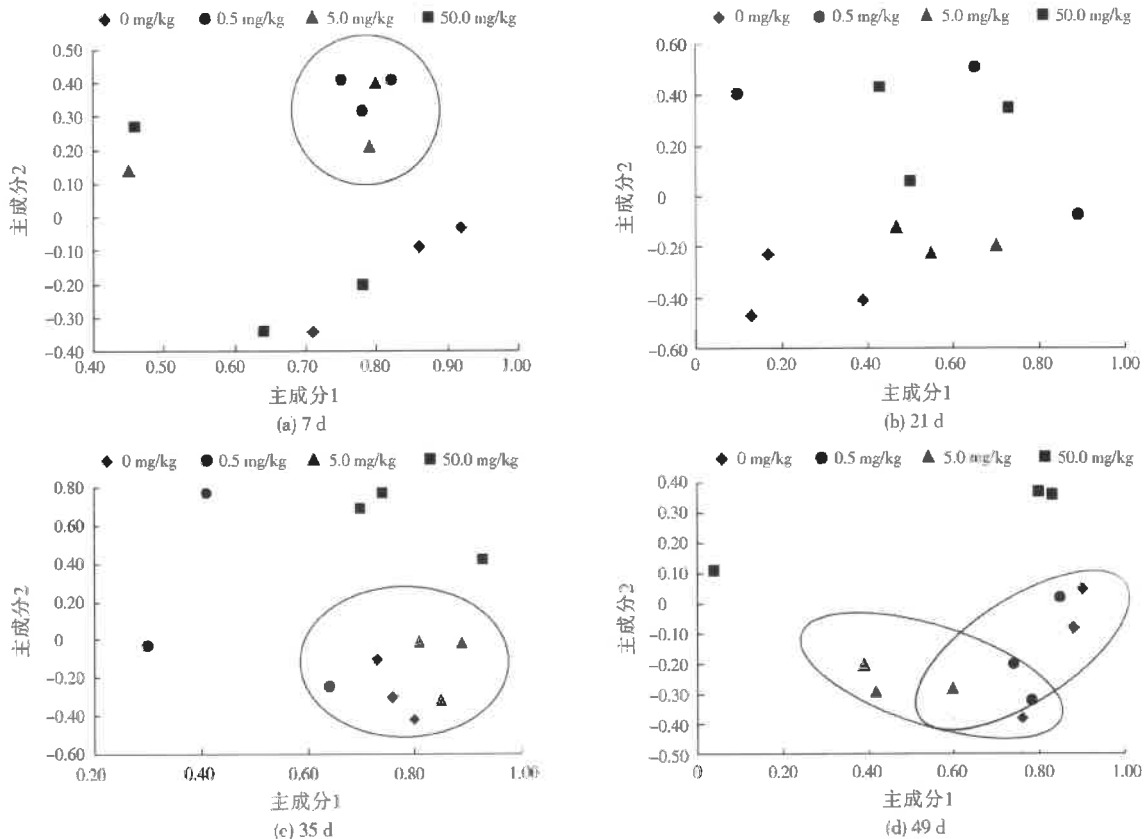


图 1 固氮微生物 *nifH* 基因主成分分析
 Fig.1 Principal component analysis for *nifH* gene of nitrogen-fixing microorganism

3 讨 论

采用分子生物学方法可以避开传统培养方法的局限性,极大丰富对土壤微生物多样性的认识,对于土壤微生物资源开发以及寻找敏感

的土壤固氮微生物,使用 Hae III 内切酶进行酶切后测

序、扫描,得到较多 OTU。共有 18 种微生物的 OTU 相对丰度 >1%,有 8 种对硫酸黏菌素的作用比较敏感,但并不是所有的微生物都受到硫酸黏菌素抑制生长,其中有些微生物在后期 OTU 相对丰度可能还有所升高。FAN 等^[18]的研究表明,硫酸黏菌素作用下的土壤中,35 d 时与 7 d 时相比,变形菌门菌群数(*Proteobacteria*)降低 15.11%,拟杆菌门(*Bacteroidetes*)降低 4.27%,放线菌门(*Actinobacteria*)降低 4.78%,浮霉菌门(*Planctomycetes*)降低 13.39%,芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)降低 25.45%,蓝藻菌门(*Cyanobacteria*)降低 16.67%,迷踪菌门(*Elusimicrobia*)降低 11.53%。由此可见,硫酸黏菌素确实可以改变土壤微生物群落结构。

本研究中,硫酸黏菌素 3 个添加浓度下均对固氮微生物的多样性造成影响。添加硫酸黏菌素的处理各项多样性指数基本都低于不添加硫酸黏菌素的处理,这可能与硫酸黏菌素对土壤微生物量碳的影响有关^[19]。随着硫酸黏菌素作用时间的延长,0.5 mg/kg 处理的固氮微生物多样性逐渐恢复,而 50.0 mg/kg 处理的恢复能力相对较弱。由于土壤生态系统受多种因素影响,硫酸黏菌素可能会发生降解,也可能部分微生物会对硫酸黏菌素产生抗性,因此数据具有一定的波动性。

PCA 结果表明,21 d 时,硫酸黏菌素对土壤固氮微生物的影响最大,而随后反而有所缓解。这与恩诺沙星对 *nifH* 基因多样性变化的影响相似^[20]。胡磊^[21]、王丽娟等^[22]也均发现,土壤处于不同的条件下固氮微生物的群落结构都会发生变化。由此可见,固氮微生物的群落结构易受环境因素的影响。

目前,研究抗生素的生态毒性多在实验室中模拟进行,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不可控的影响因素,因此为进一步探究抗生素对土壤微生物多样性的影响,还需在畜禽养殖实地环境中采集土壤样本,同步进行抗生素残留与氮素循环中硝化、反硝化路径主要功能基因响应之间的剂量-效应相关性分析。

4 结 论

硫酸黏菌素质量浓度为 0.5、5.0、50.0 mg/kg 时均对土壤固氮微生物产生抑制作用,OTU 数和优势菌群数总体降低。硫酸黏菌素影响土壤固氮微生物 *nifH* 基因的多样性,使土壤固氮微生物的丰富度和均匀度降低。硫酸黏菌素改变土壤固氮微生物

的群落结构,但随着时间的延长,硫酸黏菌素对土壤固氮微生物群落结构多样性的影响有所缓解。

参考文献:

- [1] KULLIK S A, BELKNAP A M. Flexing the PECs: predicting environmental concentrations of veterinary drugs in Canadian agricultural soils[J]. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 2017, 13(2): 331-341.
- [2] TANO K, HANS P B, HENRY B, et al. Presence and fate of veterinary antibiotics in age-dated groundwater in areas with intensive livestock farming[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 241: 988-998.
- [3] KESHAVA B, AMLAN R, YERABHAM P, et al. A review of the occurrence of pharmaceuticals and personal care products in Indian water bodies[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, 137(1): 113-120.
- [4] ALYSON R R, BERND S, TORSTEN C S. Cephalosporin antibiotics in the aquatic environment: a critical review of occurrence, fate, ecotoxicity and removal technologies[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 241: 1153-1166.
- [5] ANDRIEU M, RICO A, PHU T M, et al. Ecological risk assessment of the antibiotic enrofloxacin applied to *Pangasius* catfish farms in the Mekong Delta, Vietnam[J]. *Chemosphere*, 2015, 119: 407-414.
- [6] NORDKVIST E, ZUIDEMA T, HERBES R G, et al. Occurrence of chloramphenicol in cereal straw in north-western Europe[J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2016, 33(5): 798-803.
- [7] 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*, 2014, 21(9): 5827-5835.
- [8] 马骅, 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.
- [9] 陈勇, 张小华, 卓文海. 硫酸粘杆菌素的稳定性研究[J]. *齐鲁药事*, 2012, 31(8): 440-441.
- [10] 马骅, 孙永学, 彭金菊, 等. 硫酸黏菌素对培养分离的土壤优势细菌的影响[J]. *中兽医医药杂志*, 2013, 32(6): 19-22.
- [11] 张晶, 张惠文, 苏振成, 等. 长期有机污水灌溉对土壤固氮细菌种群的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2007, 26(2): 662-666.
- [12] 张苗苗, 刘毅, 盛荣, 等. 稻草还田对水稻土固氮基因(*nifH*)组成结构和多样性的影响[J]. *应用生态学报*, 2013, 24(8): 2339-2344.
- [13] 袁娜娜. 室内环刀法测定土壤田间持水量[J]. *中国新技术新产品*, 2014(9): 184.
- [14] ROSCH C, MERGEL A, BOTHE H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(8): 3818-3829.
- [15] 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.
- [16] 白玉涛. 基于 T-RFLP 技术的内蒙古高原河湖湿地反硝化细菌群落分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2012.

(下转第 671 页)