

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2025.06.010

潘玮涵, 李佳颖, 刘顺莉, 等. 有机肥体系恩诺沙星的添加对微生物磷素转化机制的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2025, 47(6): 102-116.

有机肥体系恩诺沙星的添加对微生物磷素转化机制的影响

潘玮涵^{1,2,3}, 李佳颖^{1,2,3}, 刘顺莉^{1,2,3},
谢小雨^{1,2,3}, 陈新平^{1,2,3}, 郎明^{1,2,3}

1. 农业农村部西南山地农业绿色低碳重点实验室/西南大学 资源环境学院, 重庆 400716;
2. 西南大学 长江经济带农业绿色发展研究中心, 重庆 400716;
3. 西南大学 农业科学研究院, 重庆 400716

摘要: 通过研究有机肥体系恩诺沙星(Enrofloxacin, ENR)的添加对土壤中含有机磷矿化、无机磷溶解关键基因的微生物丰度和群落特征的影响, 揭示有机肥施用背景下抗生素的添加对磷循环微生物介导的土壤的磷素转化机制。选取重庆市潼南区紫色土为基质土壤, 外源添加 2% 有机肥(鸡粪), 设置 3 种恩诺沙星处理, 分别为 0 mg/kg(CK)、0.5 mg/kg(Low-ENR)、5 mg/kg(High-ENR), 种植辣椒(辛香 8 号), 利用基于生物有效性的(Biologically-Based Phosphorus, BBP)磷分级方法, 测定土壤中不同形态磷的含量, 并结合 Real-Time qPCR、Illumina Miseq 高通量测序技术, 探究不同恩诺沙星的添加对土壤中含有机磷矿化和无机磷溶解的关键基因(分别为 *phoD* 和 *pqqC*)的微生物丰度和群落特征的影响及其介导的土壤的磷素转化机制。结果表明: 抗生素的添加对氯化钙提取态磷($\text{CaCl}_2\text{-P}$)、酶提取态磷(Enzyme-P)以及盐酸提取态磷(HCl-P)的影响无统计学意义, 但在第 7 d Low-ENR 处理下土壤中柠檬酸提取态磷(Citrate-P)的含量显著增加。有机肥施用后的恩诺沙星添加在第 7 d 影响了土壤中含 *phoD* 和 *pqqC* 基因细菌的群落结构, 但对 *phoD* 和 *pqqC* 基因丰度的影响无统计学意义。恩诺沙星的添加主要抑制了含 *phoD* 基因的细菌群落的网络平均度(Average Degree), Alphaproteobacteria 和 Gammaproteobacteria 分别为土壤含 *phoD* 和 *pqqC* 基因细菌的关键类群, 均属于变形菌门, 与群落的复杂度密切相关。Mantel 检验结果表明: 优势类群中的 *Pseudolabrys* 和 *Pseudonocardia* 分别与土壤 Enzyme-P 和 Citrate-P 的相关性有统计学意义, 随着恩诺沙星处理时间的延长(第 30 d), 其相关性降低。恩诺沙星的添加显著抑制了辣椒植株的生长和磷吸收。一系列结果说明有机肥背景下, 恩诺沙星的添加通过影响含 *phoD* 和 *pqqC* 基因的细菌群落组成和网络特征, 调控了土壤磷酸酶的活性和磷的形态。

关键词: 抗生素; 有机磷矿化基因; 无机磷溶解基因; 基于生物有效性的磷分级方法; 网络分析; 群落稳定性; 磷素转化利用

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



中图分类号: S143.6

文献标识码: A

文章编号: 1673-9868(2025)06-0102-15

收稿日期: 2024-06-06

基金项目: 国家自然科学基金区域联合基金项目(U20A2047); 国家自然科学基金项目(32272800, 32002126); 重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2023NSCQ-MSX0507)。

作者简介: 潘玮涵, 硕士研究生, 主要从事土壤微生物磷循环研究。

通信作者: 郎明, 副教授。

Addition of Enrofloxacin in Organic Fertilizers: Impact on Phosphorus Transformation

PAN Weihai^{1,2,3}, LI Jiaying^{1,2,3}, LIU Shunli^{1,2,3},
XIE Xiaoyu^{1,2,3}, CHEN Xinping^{1,2,3}, LANG Ming^{1,2,3}

1. Key Laboratory of Low-Carbon Green Agriculture in Southwestern China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/ College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400716, China;
2. Interdisciplinary Research Center for Agriculture Green Development in Yangtze River Basin, Southwest University, Chongqing 400716, China;
3. Academy of Agricultural Sciences, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: By studying the effects of Enrofloxacin(ENR) addition on the abundance and community characteristics of microbes with the key genes involved in organic phosphorus mineralization and inorganic phosphorus dissolution in soil after organic fertilizer application, the mechanism of antibiotics addition on soil phosphorus transformation mediated by phosphorus cycling microorganisms under the background of organic fertilizer application was revealed. Purple soil in Tongnan District of Chongqing was selected as matrix soil, and organic fertilizer was added exogenously. Three concentrations of enrofloxacin treatments were set as 0 mg/kg(CK), 0.5 mg/kg(Low-ENR) and 5 mg/kg(High-ENR), and pepper plants were planted. The concentration of different forms of phosphorus in soil was determined by Biologically-Based Phosphorus(BBP) grading method, and combined with Real-Time qPCR and Illumina MiSeq high-throughput sequencing technology, the effects of different concentrations of enrofloxacin addition on the abundance and community characteristics of microbes with the key genes (*phoD* and *pqqC*) involved in organic phosphorus mineralization and inorganic phosphorus dissolution and their mediated soil phosphorus transformation mechanisms were investigated. Result: The addition of antibiotics had no significant effect on $\text{CaCl}_2\text{-P}$, Enzyme-P and HCl-P , but significantly increased the concentration of Citrate-P in the soil under Low-ENR at 7 days after treatment. The addition of enrofloxacin after organic fertilizer application mainly affected the community structure of *phoD*-harboring and *pqqC*-harboring bacteria in soil at 7 days, but had no significant effect on the abundance of *phoD* and *pqqC* genes. The addition of enrofloxacin mainly inhibited the Average Degree of the *phoD*-harboring bacteria. Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria was the key group of soil *phoD*-harboring and *pqqC*-harboring bacteria, respectively, which belonged to Proteobacteria, and were closely related to the complexity of the community. Based on the Mantel test results, *Pseudolabrys* and *Pseudonocardia* of the dominant groups were significantly related to the soil Enzyme-P and Citrate-P, respectively, and their correlation decreased with the extension of enrofloxacin treatment time (at 30 days). The addition of enrofloxacin significantly inhibited the growth and phosphorus uptake of pepper plants. Under the background of organic fertilizer, the addition of enrofloxacin regulated the soil phosphatase activity and phosphorus form by affecting the community composition and network characteristics of *phoD* and *pqqC* genes.

Key words: antibiotic; *phoD*; *pqqC*; biologically-based phosphorus; network analysis; community stability; P transformation and utilization

农田土壤中抗生素污染问题十分普遍,涉及到的抗生素种类较多,污染分布面广,且以复合污染为主^[1-2]。据统计,2017 年全球抗生素药物销售量约为 93 309 t,预计到 2030 年,全球抗生素销售量将达到 104 079 t,涨幅超过 11%^[3]。目前,磺胺类、四环素类抗生素对土壤的污染以及对作物生长的影响的研究较为广泛^[4],而作为应用最广泛的喹诺酮类抗生素之一的恩诺沙星对土壤性质和土壤微生物的影响的研究则相对较少^[5]。

抗生素的添加影响土壤中微生物的多样性和群落的稳定性。研究发现,在水稻土的稻田轮作体系中,加入环丙沙星和磺胺甲氧嘧啶后,土壤细菌多样性整体呈下降趋势^[6],在水稻体系中添加恩诺沙星,随着添加量的增加,土壤细菌和真菌的丰富度及多样性均显著下降^[7]。此外,抗生素进入土壤会影响土壤微生物群落的组成。水稻体系中,添加四环素后土壤 Xanthobacteraceae 门的相对丰度显著增加,在四环素、磺胺甲氧嘧啶、环丙沙星的共同处理下,Proteobacteria 门大量富集^[6]。文献[8]研究发现,氧氟沙星的添加显著抑制了真菌群落中 *Kathrablepharidae* 属的生长。而在温室大棚中,四环素等抗生素的大量残留对土壤真菌和细菌的施用多样性均具有显著抑制作用^[4]。同时,抗生素的添加还会影响微生物群落的稳定性,研究表明,在水稻体系中阿维菌素的施用显著降低了土壤微生物群落的复杂性和稳定性^[9]。土壤中抗生素的存在和积累不但会改变土壤微生物的群落特征,还会抑制微生物碳源的利用率及酶的活性等^[10]。因此,探究抗生素对土壤微生物组成及结构的影响,对于保持土壤健康,发挥土壤功能具有重要意义。

土壤中与磷循环相关的微生物的丰度和群落结构特征是影响土壤中磷素转化的关键。大多数农田土壤中的全磷较为丰富,但是只有少部分可溶性的有效磷可直接被植物吸收利用,大部分以难溶性的无机态和有机态固定于土壤中。通过微生物手段促进土壤中有有机磷的矿化和无机磷的溶解,是提高土壤中磷素有效性的重要途径之一。含 *phoD* 基因的细菌群落是土壤中矿化有机磷的重要类群。研究发现,水稻体系中含 *phoD* 基因的细菌群落的丰度和组成会直接影响土壤中的磷酸酶活性,具体表现为含有高丰度 *phoD* 基因的细菌群落的土壤中磷酸酶含量更高,土壤中磷的有效性也更高^[11]。含 *phoD* 基因的细菌群落的关键物种对土壤磷循环的调控具有重要作用。研究发现,草原土壤中含 *phoD* 基因的细菌群落中 *Dietzia* 属和 *Sphingomonas* 属与碱性磷酸酶活性的相关性有统计学意义,它们通过矿化有机磷来提高土壤中磷的有效性^[12]。此外,在高山森林土壤中,含 *phoD* 基因的细菌群落中 *Chrysosporum* 属和 *Anabaenam* 属与碱性磷酸酶的活性的相关性有统计学意义,而与 *phoD* 基因的丰度和多样性无关。吡咯喹啉醌是一种辅助因子,参与生成葡萄糖酸,用于难溶性无机磷的溶解,其中 *pqqC* 基因编码了吡咯喹啉醌的合成酶,催化了吡咯喹啉醌的产生,是溶解难溶性无机磷的微生物标记基因^[13]。研究发现,玉米体系中含 *pqqC* 基因的丰度与土壤中植株吸磷量和产量的相关性有统计学意义,表明 *pqqC* 基因与土壤磷素的转化和吸收密切相关^[14]。因此,研究含 *phoD* 和 *pqqC* 基因的土壤微生物的多样性、群落组成和土壤磷的有效性,对于探究土壤磷循环过程以及增加土壤可利用磷库具有重要意义。然而,目前与抗生素的添加介导的磷循环微生物对磷素转化的影响相关的研究较少,仍需要对其深入探究。

目前,有机肥替代化肥已在农田生态系统中广泛普及^[15-18],本研究通过盆栽试验,在有机肥体系中通过添加抗生素的模拟试验,利用 Real-Time qPCR 高通量测序技术,结合土壤酶的活性测定、BBP 磷分级法,探究不同恩诺沙星的添加对土壤微生物中含有机磷矿化(*phoD*)、无机磷溶解(*pqqC*)关键基因的微生物的丰度、群落特征的影响,及其对土壤磷素转化机制的影响。

1 材料与方法

1.1 基质土采集及性质

盆栽试验选取了重庆市潼南区紫色土, 研磨风干过 5 mm 筛备用。土壤 pH 值为 7.8, 有机碳含量为 3.8 g/kg, 速效磷含量为 15.1 mg/kg, 全氮含量为 1.2 g/kg。鸡粪有机肥过 5 mm 筛, 添加比例为土壤干重的 2%, 鸡粪中含磷 20.85 g/kg, 含钾 33.60 g/kg。底肥为尿素(46%), 供试磷、钾肥分别为过磷酸钙(12%)和硫酸钾(50%)。

试验设计 3 个抗生素水平, 设置为 0 mg/kg(CK), 0.5 mg/kg(Low-ENR), 5 mg/kg(High-ENR)。配置不同水平抗生素标液, 将风干土平铺于塑料布上, 用喷雾器喷洒不同水平的抗生素标液, 同时不断翻搅, 使土壤与抗生素充分混匀。加蒸馏水调节处理后的土壤初始含水量为 65%(质量含水量), 随后装入培养盆中。试验采用塑料盆钵, 内径 22 cm, 每盆装土 4 kg。供试作物为辣椒(品种为辛香 8 号), 育苗后待辣椒长至 6 叶期进行移栽, 挑选长势均匀的辣椒幼苗, 辣椒根系去除基质, 蒸馏水清洗后移栽于盆钵, 每盆 3 株, 每个处理设置 4 个重复。作物生长期定期灌溉, 使土壤田间持水量保持在 55%左右(质量含水量)。

试验开始后分别于第 7 d 和第 30 d 采集盆钵内土样。采样土样时, 用 20 mm 的土钻随机采取同一个盆栽中的土壤, 然后将土钻收集到的土壤混合均匀视为一个样品。部分土样风干磨碎后用于后续理化性质测定, 部分置于-20 °C 保存用于高通量测序及土壤酶活性的测定。

植株样采集时将样本分为根、茎、叶 3 部分, 用去离子水清洗, 擦干表面水分, 测定样本鲜重, 之后放置烘箱 121 °C 杀青, 60 °C 烘干 72 h, 称量各部位的生物量。将样本研磨至粉末, 采用微波消解 ICP-OES 测定其磷素含量。

1.2 土壤理化因子及磷酸酶测定

土壤 pH 值采用酸度计法测定, 水土质量比为 2.5 : 1。土壤有机质采用重铬酸钾容量法测定。土壤速效磷采用钼锑抗比色法测定。土壤全氮采用凯氏定氮法测定。通过测定对硝基苯基磷酸盐(p-Nitrophenyl Phosphate, PNPP)的释放量来估算土壤酸性磷酸酶(Acid Phosphatase, ACP)和碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, ALP)的活性, 在 420 nm 波长下比色测定, 酸、碱性磷酸酶活性以 $\mu\text{g PNP h/g soil}$ 计^[19]。

土壤磷素分级采用基于生物有效性的磷分级方法(Biologically-Based Phosphorus, BBP)^[20], 由 4 种不同的提取剂来提取, 分别为氯化钙提取态磷($\text{CaCl}_2\text{-P}$, 0.01 mol/L)模拟自由扩散和根基截留的磷、柠檬酸提取态磷(Citrate-P, 10 mmol/L)模拟可被有机酸活化和无机酸弱结合的无机磷(包括钙磷、铝磷和铁磷)、酶提取态磷(Enzyme-P, 0.02 EU/mL)模拟酶矿化的有机磷、盐酸提取态磷(HCl-P, 1 mol/L)模拟难利用的磷库。后续采用孔雀石绿法测定磷的含量。

1.3 土壤总 DNA 提取

利用 FastDNA SPIN Kit 试剂盒提取土壤总 DNA, 取适量样本进行琼脂糖凝胶电泳以检验 DNA 提取质量。使用 NanoDrop2000 核酸检测仪(NanoDrop Technologies, Wilmington, DE)测定所提 DNA 样本的纯度。

1.4 *phoD* 与 *pqqC* 功能基因实时荧光定量

采用 Real-time PCR 法检测样本中 *phoD* 与 *pqqC* 基因的绝对含量。引物使用 ALPs-F730(5'-CAGTGGGACGACCACGAGGT-3')和 ALPs-1101(5'-GAGGCCGATCGGCATGTCG-3')扩增 *phoD* 基因, 扩增片段大小为 371 bp。使用 A*pqqC*F(AACCGCTTCTACTACCAG)和 AR*pqqC*R(GCGAACAGCTCGGT-CAG)^[21]扩增 *pqqC* 基因, 扩增片段大小为 306 bp。每个 PCR 反应体系为 20 μL , 包含 10 μL 的 2X ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix、0.8 μL 引物 F(5 μM)、0.8 μL 引物 R(5 μM)、0.4 μL 的 50 X ROX Ref-

erence Dye 1、2 μL DNA、6 μL dd H_2O 。PCR 的扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 之后 40 个循环的反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s、58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s 和 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min。首先, 将 PCR 扩增产物克隆到 pMD18-T 载体质粒中, 然后将克隆的质粒插入正确的片段, 随后提取, 用 NanoDrop2000 分光光度计测定质粒含量。利用公式

$$\text{克隆质粒 DNA 拷贝数} = \frac{\text{克隆质粒含量} \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}}{\text{分子量} \times 660} \quad (1)$$

计算质粒 DNA 拷贝数, 同时根据质粒的连续稀释(10 倍)绘制标准曲线。

1.5 含 *phoD* 与含 *pqqC* 功能基因的 Illumina Miseq 测序

使用 1% 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物, 采用 DNA 凝胶提取试剂盒 (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA) 进行纯化, Tris-HCl 缓冲液洗脱, 2% 琼脂糖电泳检测。使用 Illumina Miseq 平台进行高通量测序, 测序得到的原始测序序列使用 fastp(v0.19.6) 软件根据测序质量对双端测序后读段 (Reads) 进行质控和过滤质控, 同时根据双端 Reads 之间的重叠 (overlap) 关系使用 FLASH(v1.2.7) 软件进行拼接, 获得质控拼接之后的优化数据。然后使用序列降噪方法 (DADA2、Deblur 等) 处理优化数据, 获得扩增子序列变体 (Amplicon Sequence Variant, ASV) 的代表序列和丰度信息。采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 ASV 代表序列进行分类学分析, 获得 ASV 在分类水平的注释信息。原始数据提交到美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 数据库, 序列号为 PRJNA1062280。

1.6 数据分析

采用单因素方差分析检验不同时期不同恩诺沙星处理下土壤各项理化性质、细菌群落 α -多样性间差异的显著性, 在 $p=0.05$ 的水平上利用 Duncan 法进行比较。所有的统计分析均基于 SPSS 分析软件 (version 20) 和 R 分析软件 (4.2.2)。基于 ASV 丰度矩阵计算细菌群落的 α -多样性 (香农指数), 利用 origin 呈图, 香农指数计算公式为:

$$H_{\text{shannon}} = - \sum_{i=1}^{Sobs} \frac{n_i}{n} \ln \frac{n_i}{N} \quad (2)$$

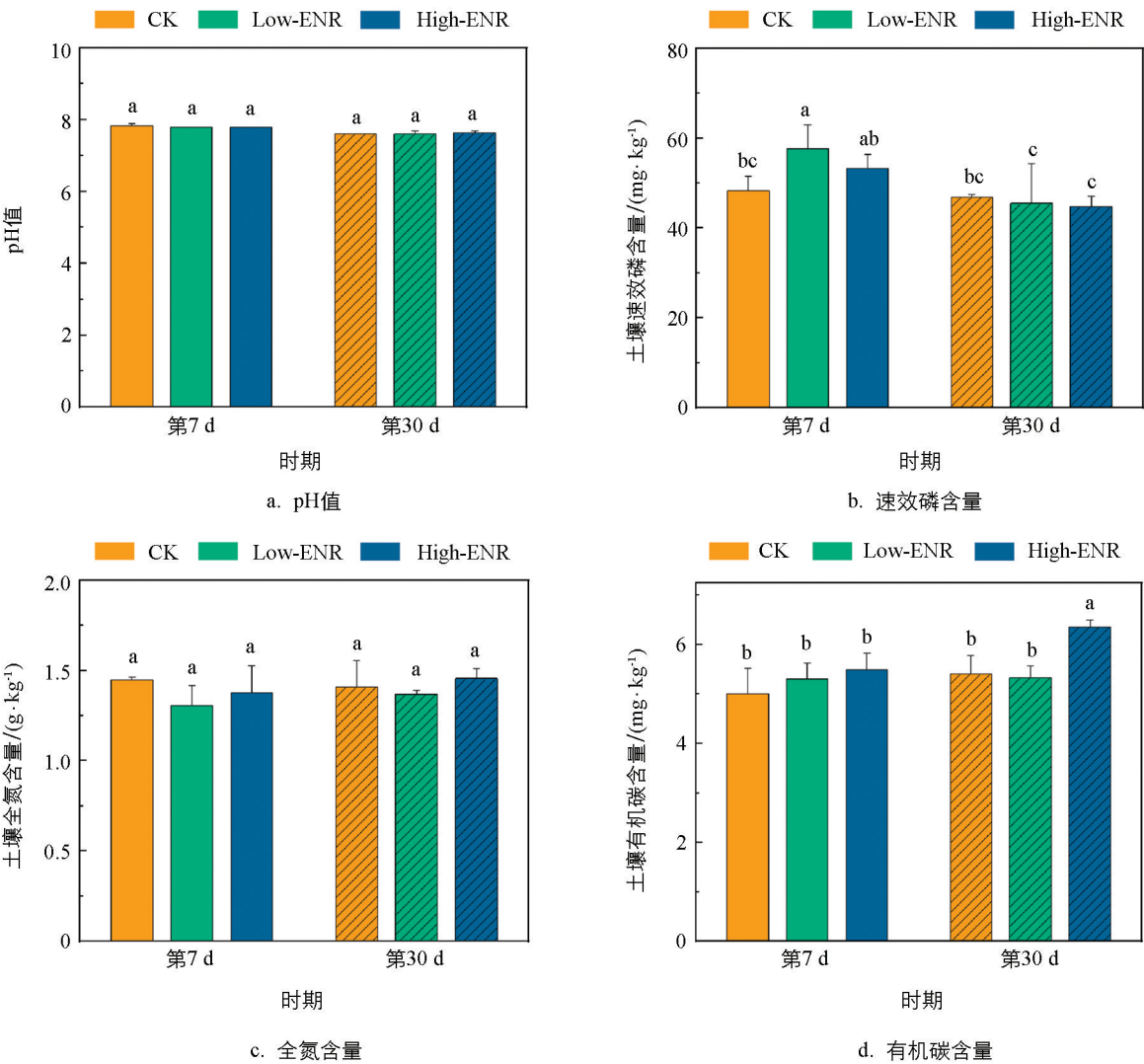
式中: $Sobs$ 为实际观测到的物种 (如 ASV) 数, n_i 为第 i 个物种 (如 ASV) 所含的序列数, N 为所有的序列数。

在 ASV 水平上基于 Bray-Curtis 距离对细菌群落进行主坐标分析 (Principal Coordinate Analysis, PCoA)。去除丰度较低的 ASV (丰度小于 0.01%) 后, 基于 SparCC 法计算微生物之间的相关性, 保留 $r > 0.8$, $p < 0.05$ 数据构建微生物共现网络, 之后通过 Gephi 软件可视化, 进而计算网络拓扑性质, 包括节点数、连接数、节点度、网络密度、聚类系数等。其中网络中节点的大小与节点度成比例呈现。通过 R 分析软件 (4.2.2) 进行细菌群落稳定性 (cohesion) 的计算, cohesion 指数可以量化微生物群落的连通性程度^[22]。使用 linkET 包进行 Mantel 检验和相关性的计算。

2 结果与分析

2.1 有机肥体系恩诺沙星的添加对土壤特性及磷素形态的影响

有机肥施用下, 恩诺沙星的添加对土壤 pH 值和全氮的含量在不同时期的影响均无统计学意义 (图 1a、c), 但分别在第 7 d 增加了土壤速效磷 (Available Phosphorous, AP) 的含量, 第 30 d 增加了土壤有机碳 (Soil Organic Carbon, SOC) 的含量 (图 1b、d)。恩诺沙星添加后土壤中 $\text{CaCl}_2\text{-P}$ 、Citrate-P、Enzyme-P 的含量在第 7 d 显著高于第 30 d ($p < 0.05$) (图 2a、b、c), 而土壤难利用的 HCl-P 的含量则在不同时期的相关性无统计学意义 (图 2d)。第 7 d, 土壤中 Citrate-P 的含量在添加恩诺沙星后显著增加 (图 2b); 而在第 30 d, 土壤中 Enzyme-P 的含量则随着恩诺沙星含量的增加而显著增加 (图 2c)。



不同小写字母表示不同采样时间、不同抗生素添加处理下实验结果之间的相关性($p < 0.05$), 下同。

图 1 恩诺沙星的添加对土壤理化性质的影响

2.2 有机肥体系恩诺沙星的添加对土壤碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性的影响

恩诺沙星添加前期(第 7 d), 土壤中 ALP、ACP 的活性在 High-ENR 处理下显著降低(图 3)。值得注意的是, 第 7 d Low-ENR 处理显著促进了土壤 ACP 的活性。随恩诺沙星处理时间的延长(第 30 d), 土壤 ACP 和 ALP 的活性在不同恩诺沙星处理下的差异无统计学意义。

2.3 有机肥体系恩诺沙星的添加对含 *phoD* 和 *pqqC* 基因的细菌群落的影响

为了探究恩诺沙星的添加对土壤磷循环功能微生物的影响, 我们对土壤中含 *phoD* 和 *pqqC* 基因的细菌群落进行了高通量测序。结果表明, 恩诺沙星的添加对土壤中含 *phoD* 和 *pqqC* 基因的细菌拷贝数影响不大(图 4a、b)。恩诺沙星添加在两个时期均显著影响了土壤中含 *pqqC* 基因细菌群落的组成多样性。随着恩诺沙星添加量的增加, *pqqC* 的香浓指数显著增加, 这一结果说明恩诺沙星的添加增加了土壤含 *pqqC* 基因细菌群落的 α -多样性(图 4d)。基于 Bray-Curtis 距离进行主坐标分析的结果表明, 恩诺沙星的添加在两个采样时期均显著影响含 *phoD* 和 *pqqC* 基因的细菌群落的结构。对于含 *phoD* 基因的细菌群落, 第 7 d 或第 30 d CK 处理和 Low-ENR 处理沿 PC2 轴明显聚类, High-ENR 处理沿 PC2 轴单独聚类。而对于含 *pqqC* 基因的细菌群落, 恩诺沙星添加后, CK 处理与 High-ENR 处理聚类明显(图 4e、f)。另外, 不同恩诺沙星处理在不同时期显著影响了土壤中磷循环功能微生物的群落组成。第 30 d 与第 7 d 相

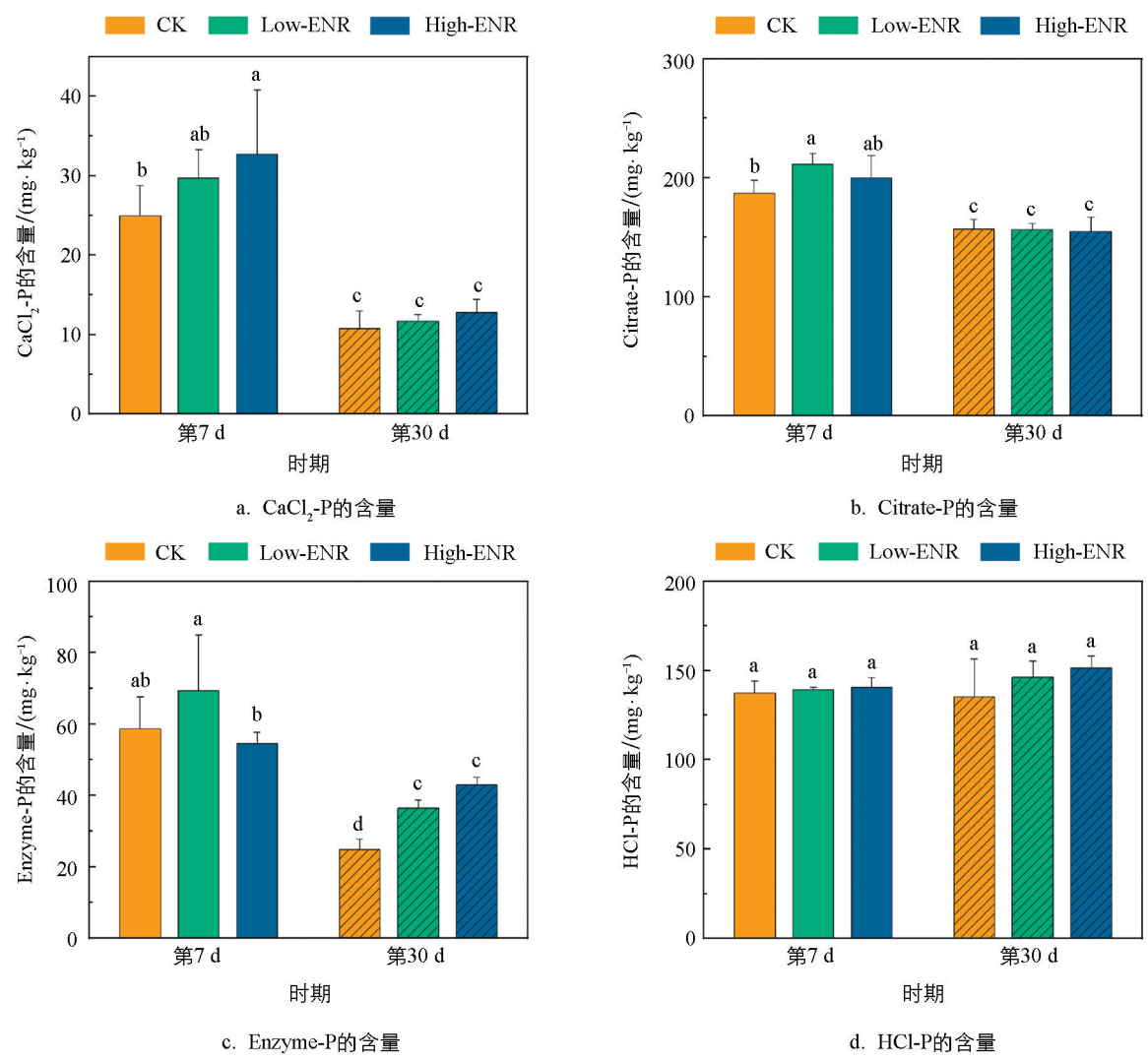


图 2 恩诺沙星的添加对土壤磷素形态的影响

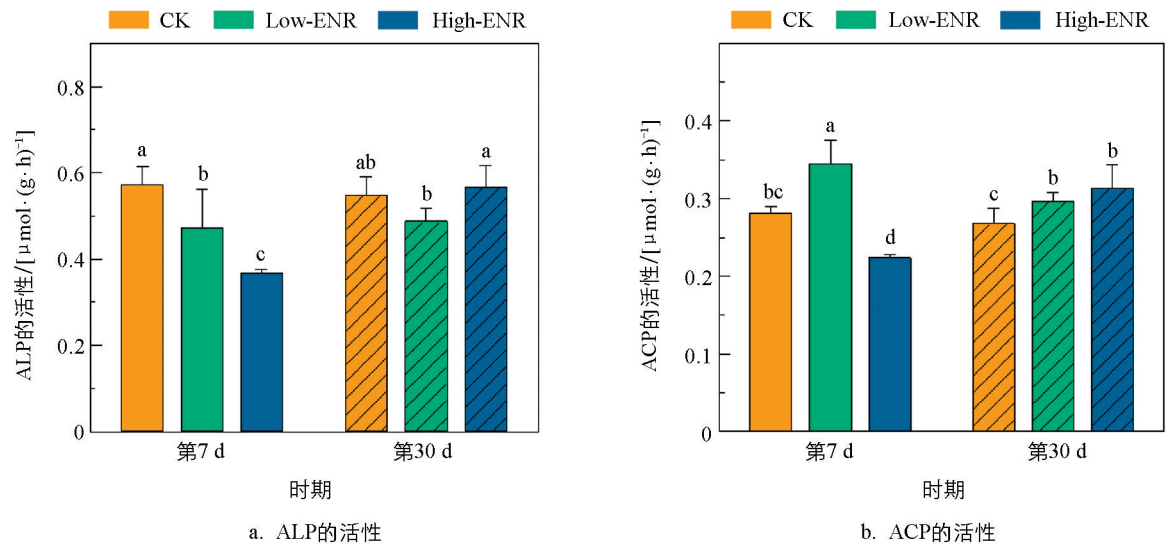
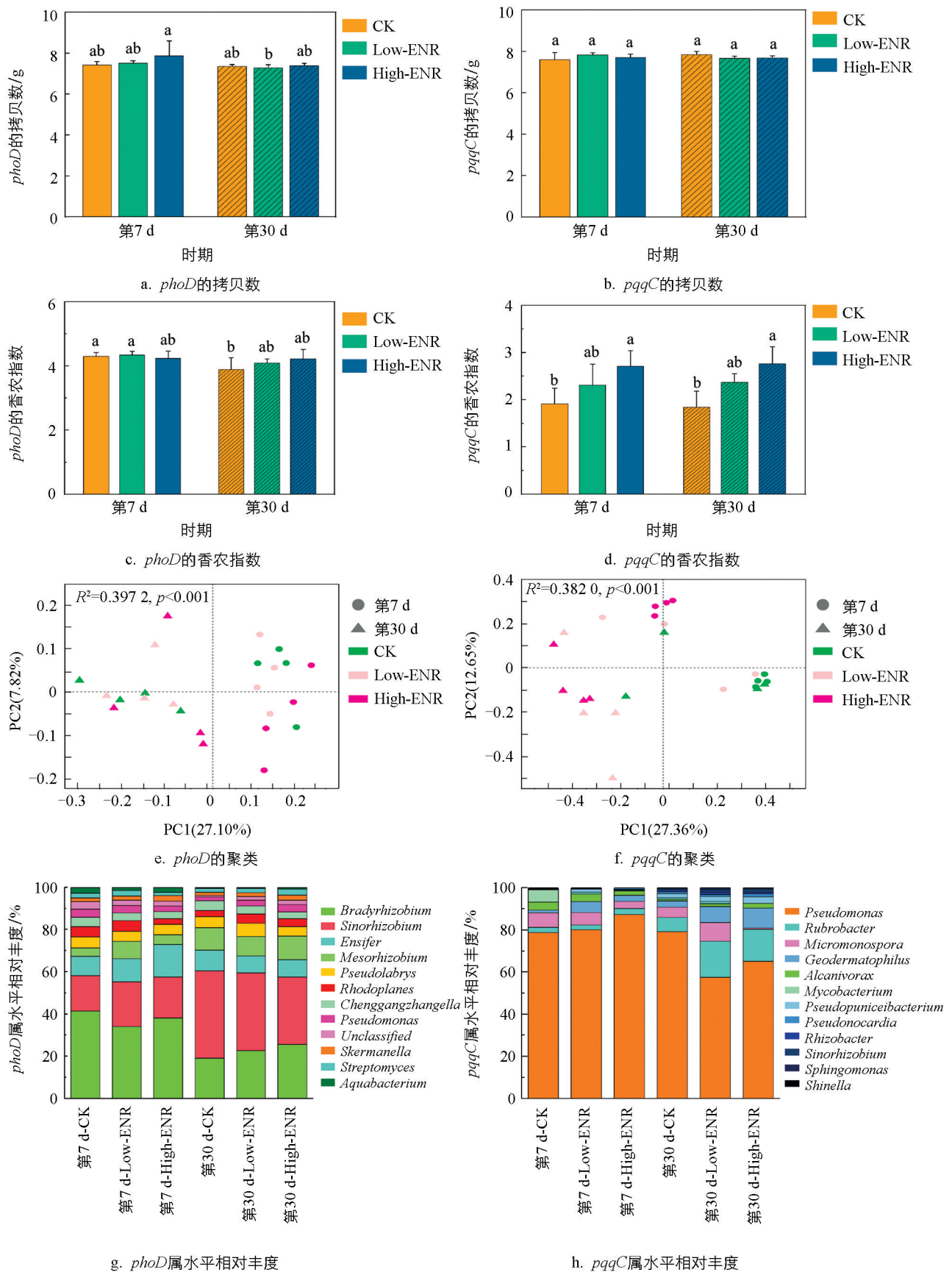


图 3 恩诺沙星的添加对土壤碱性磷酸酶(ALP)与酸性磷酸酶(ACP)活性的影响

比, *Bradyrhizobium*、*Sinorhizobium* 和 *Pseudomonas* 的相对丰度显著降低, 而 *Rubrobacter* 的相对丰度则呈现一定程度的增加(图 4g、h)。



2.4 恩诺沙星的添加对辣椒植株生长的影响

为了探究恩诺沙星的添加对辣椒植株生长和磷吸收的影响, 对第 30 d 辣椒植株各部位的生物量和吸磷量进行了测量。结果发现, 恩诺沙星的添加显著降低了辣椒植株各部位的生物量, 与吸磷量的结果大体一致。这一结果说明, 抗生素恩诺沙星的添加对作物的生长起到了明显的抑制效果, 同时抑制了植株对磷的吸收(图 5)。

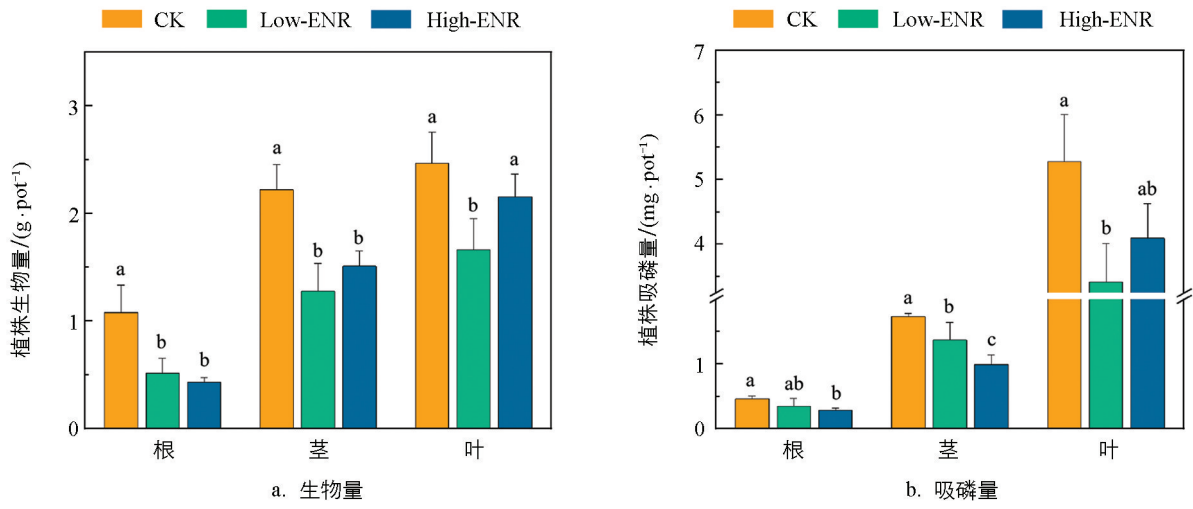


图 5 恩诺沙星的添加对辣椒植株不同部位生物量及吸磷量的影响

2.5 恩诺沙星的添加对土壤中含 *phoD*、*pqqC* 基因的细菌群落网络互作特征的影响

利用 SparCC 法计算微生物之间的相关性, 构建微生物共现网络, 计算网络拓扑性质, 探究恩诺沙星的添加对含 *phoD* 基因、*pqqC* 基因的细菌群落的网络互作功能的影响。结果表明, 恩诺沙星的添加影响了含 *phoD* 基因、*pqqC* 基因的细菌群落的网络互作(图 6)。恩诺沙星处理显著增加了网络的模块性(Modularity)。值得注意的是, 第 7 d 恩诺沙星的添加降低了含 *phoD* 基因细菌群落的网络平均度(Average Degree), 而在第 30 d 则增加了其网络平均度。含 *pqqC* 基因的细菌群落的网络平均度的影响与含 *phoD* 基因的细菌群落相反。

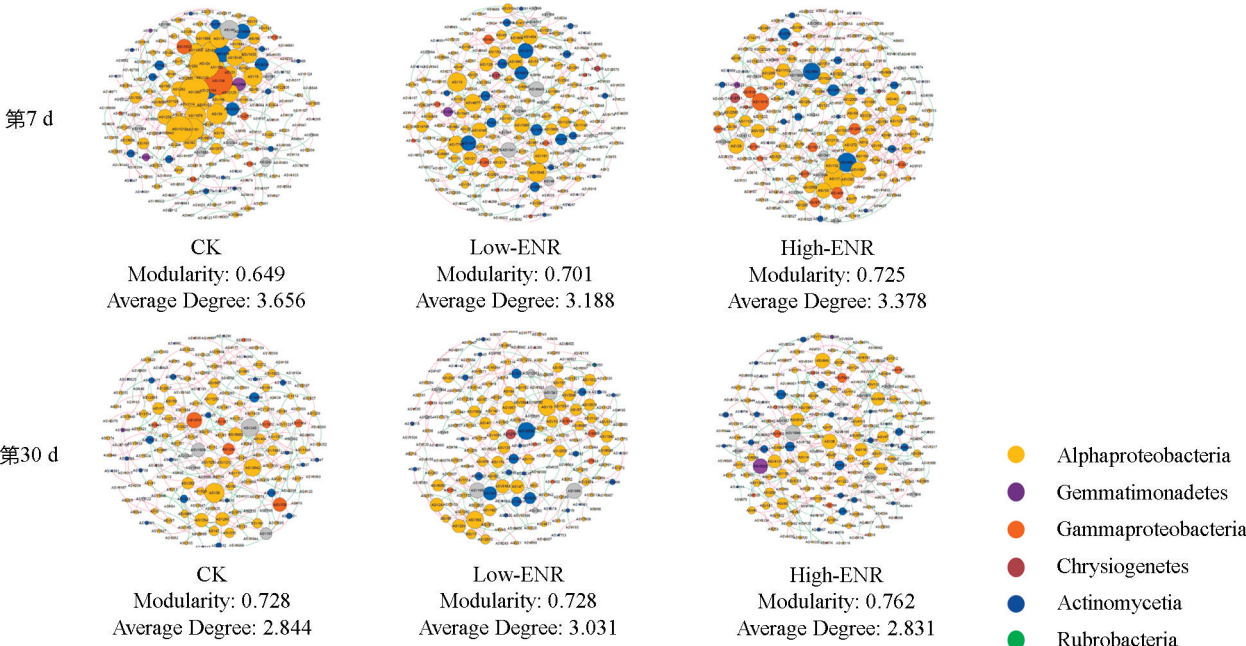
2.6 恩诺沙星的添加对含 *phoD* 和 *pqqC* 基因细菌群落 cohesion 指数的影响

继续探究恩诺沙星的添加对含 *phoD* 和 *pqqC* 基因的细菌网络的影响。计算其群落的 cohesion 指数, 表征其网络的凝聚度。结果显示, 恩诺沙星处理对含 *phoD* 基因细菌的 cohesion 指数并无显著影响。而显著降低了含 *pqqC* 基因细菌的 cohesion 指数(图 7a、b)。说明恩诺沙星的添加会显著降低 *pqqC* 基因细菌群落的凝聚度。同时, 第 30 d 与第 7 d 相比, 含 *pqqC* 基因细菌群落的 cohesion 指数显著下降。

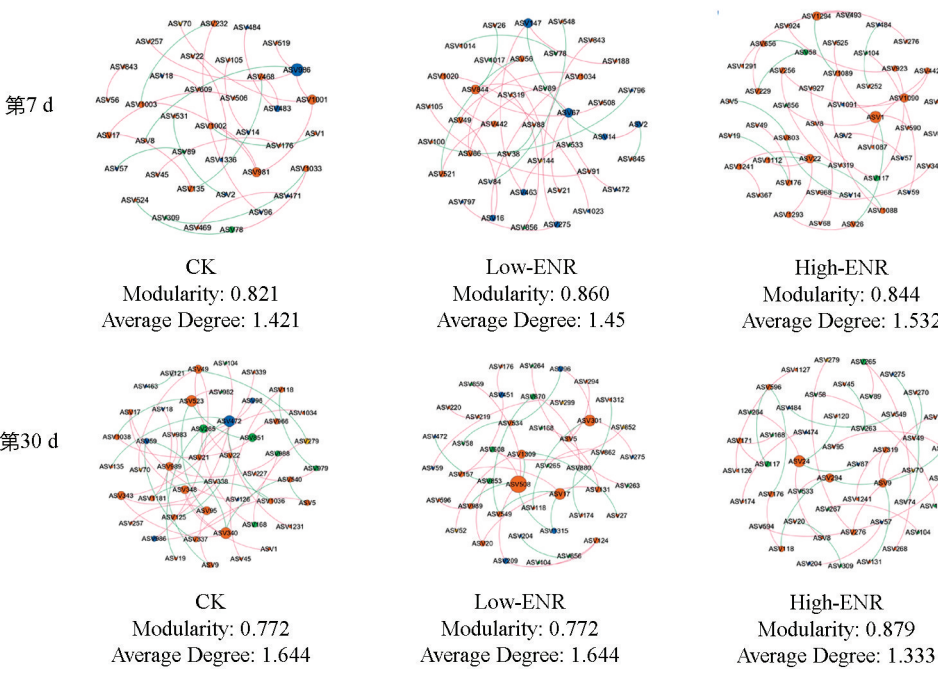
2.7 恩诺沙星添加条件下的磷形态与含 *phoD* 和 *pqqC* 基因的细菌优势属的相关性分析

将相对丰度前 10 的菌属定义为优势属, 利用蒙特检验进行磷形态与含 *phoD*、*pqqC* 基因细菌间的相关性分析(图 8)。结果显示, 在恩诺沙星添加的第 7 d, 含 *phoD* 基因的优势菌属中, *Bradyrhizobium* 与 *Pseudolabrys* 分别与土壤中 AP 和 Enzyme-P 的相关性有统计学意义, 同时, 土壤 ALP 与 *Pseudomonas* 的相关性有统计学意义, 到第 30 d 相关性无统计学意义。含 *pqqC* 基因的优势菌属中, 第 7 d *Pseudonocardia* 与土壤 Citrate-P 的相关性有统计学意义, *Alcanivorax* 与土壤 AP 的相关性有统计学意义, 第 30 d *Pseudomonas* 与土壤 AP 的相关性有统计学意义。恩诺沙星的添加改变了土壤中磷循环功能微生物与磷组分之间的相关性。

含*phoD*基因的细菌群落



含*pqqC*基因的细菌群落



不同颜色的点表示纲水平分类不同，点的大小基于点的节点度等比例缩放，网络的正负相关分别用红色连线和绿色连线表示。

图 6 恩诺沙星的添加在不同时期对含 *phoD* 基因和 *pqqC* 基因细菌群落的网络互作关系的影响

3 讨论与结论

3.1 讨论

3.1.1 有机肥体系下恩诺沙星的添加对土壤中磷的形态、有效性及磷酸酶活性的影响

农田生态系统中抗生素往往通过有机肥的施用在土壤中残留、累积^[23]。之前的研究发现，添加四环素后土壤中有有机磷的含量显著降低^[24]，而在猪粪改良的水稻土中，有机磷的含量显著增加^[25]，与

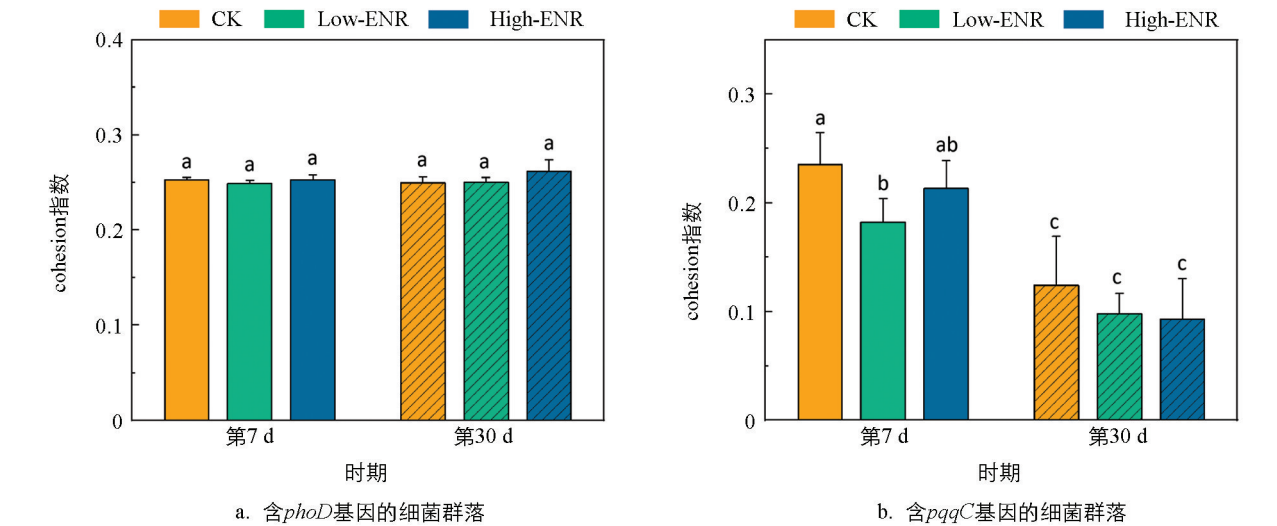


图 7 恩诺沙星的添加在不同时期对含 *phoD* 基因和 *pqqC* 基因细菌群落的 cohesion 指数的影响

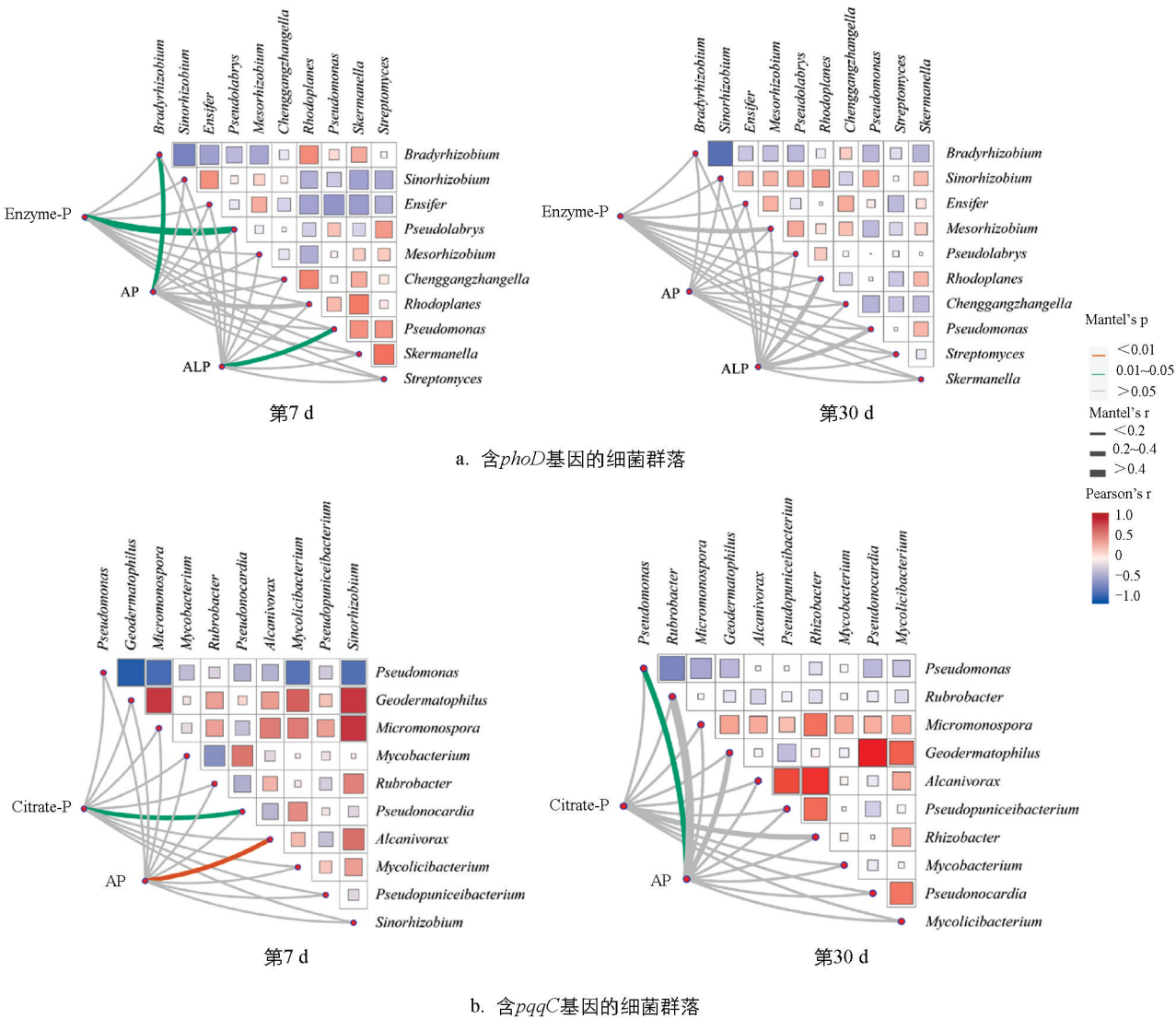


图 8 不同时期恩诺沙星的添加条件下不同磷形态、速效磷含量与含 *phoD* 和 *pqqC* 基因的细菌优势属 (相对丰度前 10 的类群) 之间的蒙特检验

本研究结果不同。在本研究中, 抗生素的添加整体对 $\text{CaCl}_2\text{-P}$ 、 Enzyme-P 以及 HCl-P 的影响较小, 主要在第 7 d 显著增加了 Low-ENR 处理下土壤中 Citrate-P 的含量(图 2)。我们推测, 抗生素对土壤有机磷的影响与抗生素的种类及作物体系密切相关。另外, 抗生素的施用会对土壤中特定酶的活性产生抑制作用。研究发现, 四环素类抗生素施用后, 马铃薯—小麦轮作体系土壤中脲酶的活性明显降低^[26]。同样, 盐酸土霉素、磺胺乙噻、盐酸环丙沙星、单霉素钠在豌豆体系土壤中抑制了氮同化酶的活性, 导致豌豆的氮利用率和产量的下降。磷酸酶是驱动土壤有机磷矿化的关键酶类, 土壤酸性磷酸酶与碱性磷酸酶的活性随多粘菌素和青霉素的添加呈低含量促进、高含量抑制的趋势^[27]。在本研究中, 前期恩诺沙星的添加抑制了土壤碱性磷酸酶的活性, 然而酸性磷酸酶的活性显著增加, 对土壤中 Enzyme-P 含量的影响无统计学意义。

Citrate-P 代表了土壤中能被有机酸溶解的无机磷。当有机肥施用后, Low-ENR 处理在第 7 d 显著增加了土壤 Citrate-P 的含量(图 2)。这可能是由于抗生素添加后, 会与土壤中的有机酸竞争矿物颗粒上的吸附位点^[28], 从而导致土壤中参与无机磷活化的有机酸含量增加, 导致 Citrate-P 含量的增加。同时, *pqqC* 基因参与了土壤有机酸的分泌, 抗生素添加后影响了土壤含 *pqqC* 基因的细菌群落, 群落稳定性显著降低(图 4), 由此抑制了土壤有机酸的分泌, 造成 Citrate-P 含量的增加。Enzyme-P 代表了土壤中能被酸性磷酸酶和植酸酶矿化的有机磷^[29], 本研究中恩诺沙星添加前期 Enzyme-P 的含量变化并不显著, Low-ENR 处理显著增加了土壤 ACP 的活性, 而对 ALP 的活性则表现出抑制效果, 二者的共同作用导致了 Enzyme-P 的含量变化并不显著。含 *phoD* 基因的细菌群落与土壤有机磷的矿化密切相关, 其编码了 ALP 的分泌^[30], 低浓度恩诺沙星添加后土壤含 *phoD* 基因的细菌群落发生变化, 其群落的复杂度显著降低, 抑制了 ALP 的分泌, 从而对土壤有机磷的矿化产生抑制作用。

3.1.2 有机肥体系恩诺沙星的添加对磷循环微生物群落特征的影响及其对作物生长的调控机制

抗生素的添加显著影响了微生物的丰度和组成。本研究中恩诺沙星添加后 *Rhodoplanes* 属和 *Pseudonocardia* 属的相对丰度显著降低(图 4)。之前的研究发现, 在湿地生态系统中, 氟喹诺酮类抗生素显著减少了变形菌门和厚壁菌门细菌的丰度, 其中 *Dechloromonas* 和 *Delftia* 两个物种的相对丰度明显降低^[31], 与本研究结果相似。同时, 微生物的群落网络特征也会受到抗生素的影响。本研究中恩诺沙星添加前期土壤含 *phoD* 基因的细菌群落平均度和模块性都显著下降(图 6)。文献[9]发现, 水稻体系中阿维菌素添加后土壤中细菌和真菌的群落网络复杂性和稳定性均显著下降, 与本研究结果相似。然而, 也有研究表明, 氟喹诺酮类抗生素增加了湿地生态系统中真菌和细菌的复杂性和网络互作, 这可能与氟喹诺酮类药物的添加含量较低($50\text{ }\mu\text{g/L}$)有关^[32]。

微生物分泌的碱性磷酸酶是土壤中有机磷矿化的关键酶类。微生物群落特征的改变是影响相关酶分泌的重要原因, 本研究中恩诺沙星的添加在前期显著抑制了土壤碱性磷酸酶的活性(图 3), 这一结果在含 *phoD* 基因的细菌群落复杂度和稳定性的降低这一表现中得到了验证。另外, 含 *phoD* 基因细菌的多样性和网络拓扑结构与土壤中 SOC 和 TN 密切相关^[33], 而本研究中土壤 SOC 和 TN 的综合变化使得恩诺沙星的添加对含 *phoD* 基因细菌的多样性影响并不显著(图 4)。土壤中 Citrate-P 模拟了可被有机酸活化和无机酸弱结合的无机磷, 而 *pqqC* 基因是调控微生物溶解无机磷的关键基因, *pqqC* 基因的变化可以通过 Citrate-P 的变化来验证^[34]。恩诺沙星添加后, 土壤含 *pqqC* 基因的细菌群落稳定性和多样性增加但复杂度降低, 综合导致了土壤中 Citrate-P 含量的显著增加(图 2)。

抗生素的滥用和残留会对作物的生长产生抑制效果。本研究中, 恩诺沙星添加后, 土壤的磷酸酶活性

增加, Enzyme-P 含量显著增加, 土壤的磷利用率增加, 但是辣椒植株的吸磷量在恩诺沙星添加后显著降低, 在文献[35]的研究中发现, 土壤添加土霉素后, 植株根鞘中与磷固定密切相关的羧酸盐酒石酸盐的含量降低, 从而导致了植株磷吸收的减少。抗生素对植物的毒性作用是影响作物生长的又一个重要因素^[36-37], 有研究指出, 高含量的抗生素会通过引起氧化应激来降低小麦的生长^[38], 同样在研究中发现磺胺嘧啶、四环素、恩诺沙星 3 种抗生素中, 恩诺沙星对白刺生长的毒性作用最强^[39]。说明恩诺沙星的添加虽然增加了土壤可利用磷的含量, 但是抗生素本身对作物生长的毒性作用不可忽略, 同时也会影响作物本身磷素的固定、转化等作用, 从而抑制植株磷的吸收, 并抑制作物的生长发育。因此, 我们认为恩诺沙星在对土壤中磷的形态转化和有效性产生影响的同时, 相应的毒性也会通过影响植物的代谢过程抑制作物的生长, 两者之间存在权衡的作用, 对作物的生长产生了负效应。

3.2 结论

有机肥体系恩诺沙星的添加影响了磷循环微生物群落的结构和网络特征, 在前期主要降低了含 *phoD* 基因的细菌的网络复杂度, 抑制了土壤碱性磷酸酶的活性, 从而影响土壤有机磷的矿化。同时, 恩诺沙星的添加降低了土壤含 *pqqC* 基因的细菌群落的 cohesion 指数, 其稳定性受到显著抑制, 而群落的复杂度增加, 影响了土壤无机磷溶解。本研究聚焦于磷循环功能基因 *phoD* 和 *pqqC*, 探究恩诺沙星的添加对土壤磷循环功能及辣椒生长的影响, 为后续提高土壤磷素利用率, 增加作物产量的研究提供了科学依据。

参考文献:

- [1] YANG L, LIU W X, ZHU D, et al. Application of Biosolids Drives the Diversity of Antibiotic Resistance Genes in Soil and Lettuce at Harvest [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2018, 122: 131-140.
- [2] WANG M, XIE X Y, WANG M Z, et al. The Bacterial Microbiota in Florfenicol Contaminated Soils: The Antibiotic Resistome and the Nitrogen Cycle [J]. Environmental Pollution, 2020, 259: 113901.
- [3] TISEO K, HUBER L, GILBERT M, et al. Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals from 2017 to 2030 [J]. Antibiotics, 2020, 9(12): 918.
- [4] ZHAO L X, PAN Z, SUN B L, et al. Responses of Soil Microbial Communities to Concentration Gradients of Antibiotic Residues in Typical Greenhouse Vegetable Soils [J]. Science of The Total Environment, 2023, 855: 158587.
- [5] GAO J P, WEI C, MO T J, et al. Effects of Enrofloxacin on Soil Nitrification and Denitrification: A Microbiological Study [J]. Environmental Technology & Innovation, 2023, 32: 103415.
- [6] LIN H, JIN D F, FREITAG T E, et al. A Compositional Shift in the Soil Microbiome Induced by Tetracycline, Sulfamonomethoxine and Ciprofloxacin Entering a Plant-Soil System [J]. Environmental Pollution, 2016, 212: 440-448.
- [7] 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 [J]. 生态学报, 2007, 27(8): 3400-3406.
- [8] DENG Y, DEBOGNIES A, ZHANG Q, et al. Effects of Ofloxacin on the Structure and Function of Freshwater Microbial Communities [J]. Aquatic Toxicology, 2022, 244: 106084.
- [9] QIU L L, DANIELL T J, BANWART S A, et al. Insights into the Mechanism of the Interference of Sulfadiazine on Soil Microbial Community and Function [J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 419: 126388.
- [10] LIU W, PAN N, CHEN W, et al. Effect of Veterinary Oxytetracycline on Functional Diversity of Soil Microbial Community [J]. Plant, Soil and Environment, 2012, 58(7): 295-301.
- [11] BI Q F, LI K J, ZHENG B X, et al. Partial Replacement of Inorganic Phosphorus (P) by Organic Manure Reshapes Phosphate Mobilizing Bacterial Community and Promotes P Bioavailability in a Paddy Soil [J]. Science of The Total Environment, 2020, 703: 134977.

- [12] ZHU X Y, ZHAO X R, LIN Q M, et al. Distribution Characteristics of phoD-Harboured Bacterial Community Structure and Its Roles in Phosphorus Transformation in Steppe Soils in Northern China [J]. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2021, 21(2): 1531-1541.
- [13] TOYAMA H, NISHIBAYASHI E, SAEKI M, et al. Factors Required for the Catalytic Reaction of PqqC/D which Produces Pyrroloquinoline Quinone [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 354(1): 290-295.
- [14] HU W, ZHANG Y P, RONG X M, et al. Coupling Amendment of Biochar and Organic Fertilizers Increases Maize Yield and Phosphorus Uptake by Regulating Soil Phosphatase Activity and Phosphorus-Acquiring Microbiota [J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2023, 355: 108582.
- [15] LIU B, XIA H, JIANG C C, et al. 14 Year Applications of Chemical Fertilizers and Crop Straw Effects on Soil Labile Organic Carbon Fractions, Enzyme Activities and Microbial Community in Rice-Wheat Rotation of Middle China [J]. *Science of The Total Environment*, 2022, 841: 156608.
- [16] HAN J Q, DONG Y Y, ZHANG M. Chemical Fertilizer Reduction with Organic Fertilizer Effectively Improve Soil Fertility and Microbial Community from Newly Cultivated Land in the Loess Plateau of China [J]. *Applied Soil Ecology*, 2021, 165: 103966.
- [17] 马群, 刘铭, 周玉玲, 等. 生物炭与有机无机肥配施对土壤质量的影响 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2024, 46(7): 115-126.
- [18] 李鸿, 史东梅, 盘礼东. 生物炭与化肥配施对紫色土坡耕地侵蚀性耕层土壤水分及入渗特性的影响 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2024, 46(4): 121-132.
- [19] IRIE M, UKITA T. A Modification of the Assay Methods Fornon-Specific Phosphomono- and Diesterases, Using p-Nitrophenyl Phosphate Derivatives as Substrates [J]. *Journal of Biochemistry*, 1965, 57: 142-146.
- [20] DELUCA T H, GLANVILLE H C, HARRIS M, et al. ANovel Biologically-Based Approach to Evaluating Soil Phosphorus Availability Across Complex Landscapes [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 88: 110-119.
- [21] ZHANG M, ZHANG R X, SONG R Q, et al. Soil PQQC-Harboring Bacterial Community Response to Increasing Aridity in Semi-Arid Grassland Ecosystems: Diversity, Co-Occurrence Network, and Assembly Process [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1019023.
- [22] HERREN C M, MCMAHON K D. Cohesion: A Method for Quantifying the Connectivity of Microbial Communities [J]. *The ISME Journal*, 2017, 11(11): 2426-2438.
- [23] MUHAMMAD J, KHAN S, SU J Q, et al. Antibiotics in Poultry Manure and Their Associated Health Issues: A Systematic Review [J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2020, 20(1): 486-497.
- [24] CUI H, OU Y, WANG L X, et al. Tetracycline Hydrochloride-Stressed Changes in Phosphorus Fractions During Swine Manure Composting: Emphasize on Phosphorus Functional Genes [J]. *Process Safety and Environmental Protection*, 2022, 168: 336-343.
- [25] YIN Y, LIANG C H. Transformation of Phosphorus Fractions in Paddy Soil Amended with Pig Manure [J]. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2013, 13: 1-15.
- [26] SANTÁS-MIGUEL V, DÍAZ-RAVIÑA M, MARTÍN A, et al. Soil Enzymatic Activities and Microbial Community Structure in Soils Polluted with Tetracycline Antibiotics [J]. *Agronomy*, 2021, 11(5): 906-1001.
- [27] TELESINSKI A, PLATKOWSKI M, CYBULSKA K, et al. Response of Soil Enzymes to Two Antibiotics: Polymyxin B and Penicillin G [J]. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2018, 27: 3837-3845.
- [28] HOU J, PAN B, NIU X K, et al. Sulfamethoxazole Sorption by Sediment Fractions in Comparison to Pyrene and Bisphenol A [J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158(9): 2826-2832.

[29] 蔡观, 胡亚军, 王婷婷, 等. 基于生物有效性的农田土壤磷素组分特征及其影响因素分析 [J]. 环境科学, 2017, 38(4): 1606-1612.

[30] WANG L, WANG J, YUAN J, et al. Long-Term Organic Fertilization Strengthens the Soil Phosphorus Cycle and Phosphorus Availability by Regulating thePQQC- and PhoD-Harboring Bacterial Communities [J]. Microbial Ecology, 2023, 86(4): 2716-2732.

[31] LI X H, LU S Y, LIU S D, et al. Shifts of Bacterial Community and Molecular Ecological Network at the Presence of Fluoroquinolones in a Constructed Wetland System [J]. Science of The Total Environment, 2020, 708: 135156.

[32] KERGOAT L, BESSE-HOGGAN P, LEREMBOURE M, et al. Environmental Concentrations of Sulfonamides Can Alter Bacterial Structure and Induce Diatom Deformities in Freshwater Biofilm Communities [J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 643719.

[33] WEI X M, HU Y J, CAI G, et al. Organic Phosphorus Availability Shapes the Diversity of PhoD-Harboring Bacteria in Agricultural Soil [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2021, 161: 108364.

[34] DENG P Y, ZHOU Y C, CHEN W S, et al. Microbial Mechanisms for Improved Soil Phosphorus Mobilization in Monoculture Conifer Plantations by Mixing with Broadleaved Trees [J]. Journal of Environmental Management, 2024, 359: 120955.

[35] ZHANG Z K, HAN T, HE H H. Plant Growth and Phosphorus Uptake of Wheat in Response to Oxytetracycline [J]. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 2023, 23(2): 2162-2173.

[36] 张银杰, 苗玉红, 盛开, 等. 配施有机肥调控农田土壤磷素有效性研究进展 [J]. 河南农业大学学报, 2025, 59(2): 189-198.

[37] 袁征, 郑志杰, 覃卫林, 等. 农田微塑料污染现状及对土壤生态系统的危害 [J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2024, 39(2): 176-184.

[38] RIAZ L, MAHMOOD T, COYNE M S, et al. Physiological and Antioxidant Response of Wheat (Triticum Aestivum) Seedlings to Fluoroquinolone Antibiotics [J]. Chemosphere, 2017, 177: 250-257.

[39] TIMMERER U, LEHMANN L, SCHNUG E, et al. Toxic Effects of Single Antibiotics and Antibiotics in Combination on Germination and Growth of *Sinapis alba* L. [J]. Plants, 2020, 9(1): 107-119.

责任编辑 廖坤

崔玉洁