

硫酸黏菌素残留对土壤微生物群落结构特征的影响*

马 驿¹ 彭金菊¹ 陈进军¹ 范萆莉¹ 孙永学^{2**}

(¹广东海洋大学农学院动物医学系, 广东湛江 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)

摘 要 采用氯仿熏蒸法和磷脂脂肪酸(phospholipid fatty acid, PLFA)方法, 分析了硫酸黏菌素(colistin sulfate, CS)残留后土壤微生物群落结构的变化. 结果表明: 硫酸黏菌素($w_{CS} \geq 5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)对土壤微生物生物量碳影响显著, 土壤中硫酸黏菌素浓度愈高, 微生物生物量碳愈低, $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的硫酸黏菌素处理使土壤微生物生物量碳下降 52.1%. 在整个采样周期中, 每克土壤总 PLFA 含量在硫酸黏菌素胁迫下出现明显降低, 且存在一定的剂量依赖效应. 第 7、49 天时, 低浓度组($w_{CS} = 0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和对照组分异不明显, 第 21、35 天时, 处理间土壤微生物群落结构多样性类型分异显著, 其中高浓度组($w_{CS} = 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)与对照组分异最大. 表明硫酸黏菌素可致土壤微生物群落结构多样性改变, 并表现出时间差异. 这可能与硫酸黏菌素在土壤中化学结构发生了改变和降解有关.

关键词 硫酸黏菌素 土壤微生物生物量碳 群落结构 磷脂脂肪酸

文章编号 1001-9332(2014)06-1780-05 **中图分类号** S154.37 **文献标识码** A

Effects of colistin sulfate residue on soil microbial community structure. MA Yi¹, PENG Jin-ju¹, CHEN Jin-jun¹, FAN Ting-li¹, SUN Yong-xue² (¹Department of Veterinary Medicine, College of Agricultural, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, Guangdong, China; ²Guangdong Key Laboratory for Veterinary Pharmaceuticals Development and Safety Evaluation, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China). -Chin. J. Appl. Ecol., 2014, 25(6): 1780-1784.

Abstract: By using fumigation extraction and phospholipid fatty acid (PLFA) methods, the change of characteristics of soil microbial community structure caused by residue of colistin sulfate (CS) was studied. The results showed that the CS ($w_{CS} \geq 5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) had a significant effect on the microbial biomass carbon (MBC) and it was dose-dependent where MBC decreased with the increase of CS concentration in soil. The MBC in soil decreased by 52.1% when the CS concentration reached $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. The total PLFA of soil in each CS treatment was significantly decreased during the sampling period compared with the control group and showed a dose-dependent relationship. The soil microbial community structure and diversity in the low CS group ($w_{CS} = 0.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) were not significantly different from the control group on 7th and 49th day. However, they were significantly different on 21st and 35th day especially in the high CS group ($w_{CS} = 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). It was concluded that CS could change the structure of soil microorganisms and varied with time which might be caused by the chemical conversion and degradation of CS in soil.

Key words: colistin sulfate; soil microbial biomass carbon; community structure; phospholipid fatty acid.

黏菌素(colistin)属于多肽类抗生素,已广泛用于动物感染性疾病的治疗;黏菌素还作为饲料添加

剂,广泛用于畜禽养殖生产中. 2012 年我国硫酸黏菌素市场供给量为 234.5 万 t,较 2011 年增长 21.9%. 硫酸黏菌素内服胃肠道不易吸收,几乎全部以原形随动物粪便排出^[1]. 兽药随动物粪、尿等排泄物进入生态环境,污染环境土壤、表层水体等,并

* 国家自然科学基金项目(31172368)和广东省自然科学基金项目(S2012010010628)资助.

** 通讯作者. E-mail: sunyx@scau.edu.cn

2013-09-16 收稿,2014-03-10 接受.

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^[2-3].

土壤微生物生物量碳作为土壤有机质中最活跃和最易变化的组分,能在很大程度上反映土壤质量和土壤微生物数量,因而是评价土壤微生物生物量和活性的重要指标^[4]. 土壤中的磷脂大部分以活体生物的组分形式出现,磷脂脂肪酸(PLFA)即为甲基化土壤中提取磷脂成分后得到的脂肪酸产物. 它具有属的特异性,不同的微生物能够通过不同生化途径形成不同的 PLFA,根据不同微生物特定磷脂脂肪酸标记物的种类和组成比例可了解土壤微生物群落结构多样性的变化^[5]. 相对于传统的微生物学分析方法,磷脂脂肪酸分析技术不需要分离和培养土壤微生物,并且能更全面揭示土壤中微生物的生物量和生态结构,是一种更为快速、简便、精确的微生物分析方法^[6]. PLFA 技术被广泛应用于土壤微生物群落结构的分析中,可动态检测土壤污染胁迫与恢复过程中微生物的变化,为污染土壤的修复提供了理论依据^[7]. 本试验通过在土壤中添加不同浓度硫酸黏菌素,借助氯仿熏蒸浸提法和磷脂脂肪酸方法,分析土壤微生物生物量碳和微生物群落结构的变化特征,明确土壤微生物群落结构多样性类型的分异程度,以揭示硫酸黏菌素在环境中残留对土壤微生物学性状的影响.

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试硫酸黏菌素由山东鲁抗医药股份有限公司提供. 土壤采自广东海洋大学实验菜地 10 ~ 20 cm 土层的均质土壤,色深,质细,基本理化性状:有机质 24.7 g · kg⁻¹,全氮 2.35 g · kg⁻¹,全磷 6.79 g · kg⁻¹,全钾 17.5 g · kg⁻¹,速效磷 11.7 mg · kg⁻¹,速效钾 126 mg · kg⁻¹,pH 6.71. 供试土壤中未检测出硫酸黏菌素残留.

1.2 研究方法

将新鲜土样过 4 mm 筛后于室温下放置 3 d,分装到 10 L 的塑料桶中,每桶装 5 kg 鲜土,加入硫酸黏菌素使药物浓度分别为:0 mg · kg⁻¹(对照)、0.5 mg · kg⁻¹(I 组)、5 mg · kg⁻¹(II 组)、50 mg · kg⁻¹(III 组),每处理 3 次重复. 将土壤含水量调至饱和持水量的 40%,并用湿布盖于土表,置于室温(20 ~ 25 ℃)下培养. 培养过程中为了保持土壤湿度不变,损失的水分通过称量法补充.

1.3 土壤微生物生物量碳的测定

于处理后第 21 天采取相当于 20 g 烘干质量的培养土壤,用氯仿熏蒸浸提法测定土壤微生物生物量碳^[8].

1.4 土壤微生物群落 PLFA 测定

1.4.1 磷脂脂肪酸分离和提取 分别于处理后第 7、21、35、49 天取样. 在 5 g 土样分别加入 4.0 mL 磷酸缓冲液、5.0 mL 氯仿、10 mL 甲醇,震荡 2 h,2500 r · min⁻¹离心 10 min,转移上清液,再向土样中加入相同体积的磷酸缓冲液、氯仿和甲醇溶液,震荡 1 h,离心,合并 2 次上清液,氮气吹干,过硅胶柱,洗脱液依次采用氯仿 5 mL、丙酮 10 mL 和甲醇 5 mL. 收集甲醇相,氮气吹干. 再加入 0.2 mol · L⁻¹的氢氧化钾、甲醇各 1 mL,最后用正己烷萃取,收集正己烷相,定容至 100 μL,用于气相色谱质谱仪测定.

1.4.2 气相质谱条件设置 2010QP,GC-MS 联用仪 GC 分析条件:色谱柱为 DB5MS,进样口温度 250 ℃,载气为氦气,采用无分流形式,流速 0.8 mL · min⁻¹. 升温程序:100 ℃ 保温 1 min;100 ~ 190 ℃ 1 min 升温 5 ℃;190 ℃ 保温 1 min;190 ~ 230 ℃ 1 min 升温 3 ℃;230 ℃ 保温 1 min;230 ~ 290 ℃ 1 min 升温 10 ℃;290 ℃ 保温 2 min.

1.4.3 磷脂脂肪酸的鉴定 磷脂脂肪酸(PLFA)的鉴定参见文献[9]. 脂肪酸的命名以脂肪酸碳总数开始,常用的命名格式为 X:YωZ(c/t),其中:X 为总碳数,后面跟一个冒号;Y 为双键数;ω 表示甲基末端;Z 为距离甲基端的距离;c 表示顺式空间构造;t 表示反式空间构造;前缀“i”和“a”代表支链的顺式异构和反式异构;“Me”代表甲基;“OH”代表羟基;“cy”代表环丙基. 脂肪酸含量测定以正十九烷脂肪酸甲酯(19:0)为内标,色谱峰面积定量. 细菌总生物量以 PLFA i15:0、a15:0、15:03OH、i16:0、16:1ω7c、16:1ω9c、a17:0、i17:0、cy17:0、18:1ω7c、cy19:0之和估算;革兰氏阴性菌生物量以 16:1ω7c、16:1ω9c、cy17:0、18:1ω7c、cy19:0之和估算;革兰氏阳性菌生物量以 i15:0、a15:0、15:03OH、i16:0、a17:0、i17:0之和估算;真菌生物量根据 18:2ω6、18:1ω9c的总浓度来估算;放线菌生物量根据 18:10Me的总浓度来估算^[10-12].

1.5 数据处理

采用 Microsoft Excel 2007 处理数据,SPSS 11.5 软件进行统计分析和主成分分析,采用单因素方差分析检验不同处理之间的差异(LSD,α=0.05). 所

有数据均为平均值±标准误。

2 结果与分析

2.1 土壤微生物量碳的变化

硫酸黏菌素暴露胁迫 21 d 的结果较有代表性,故多采用该采样时间进行后续分析. 硫酸黏菌素暴露胁迫 21 d 土壤中微生物生物量碳如表 1 所示,与对照相比,5、50 mg · kg⁻¹ 硫酸黏菌素对土壤微生物生物量碳的影响显著 ($P<0.05$),处理组土壤微生物生物量碳均低于对照,且硫酸黏菌素浓度愈高,土壤微生物生物量碳愈低. 50 mg · kg⁻¹ 的硫酸黏菌素处理使土壤微生物生物量碳下降 52.1%.

2.2 PLFA 各指标的变化

硫酸黏菌素对土壤各类磷脂脂肪酸的影响如图 1 所示,与对照相比,硫酸黏菌素处理的各浓度组检测出的各标记脂肪酸都出现不同程度的减少,且 17 种脂肪酸含量的变化大多数与药物浓度的变化成反比.

2.3 PLFA 总量及不同土壤微生物 PLFA 表征含量的变化

硫酸黏菌素处理组在各采样点的 PLFA 总量变

化见图 2. 从中可以看出,在整个采样周期里,每克土壤的总 PLFA 含量在硫酸黏菌素的影响下明显减少,而且存在剂量依赖效应. 第 21、35 天时,添加硫酸黏菌素各组的 PLFA 总量均与对照差异显著 ($P<0.05$);第 7、49 天时,中、高浓度组 (5、50 mg · kg⁻¹) 的 PLFA 总量与对照均差异显著.

第 21 天的 PLFA 总量与土壤微生物生物量碳的相关分析表明,总磷脂脂肪酸与微生物生物量碳达到了显著相关水平 ($R^2=0.689, P<0.05$). 从表 1 可见,在硫酸黏菌素作用下,G⁺菌和 G⁻菌 PLFA 表征含量均随着药物浓度的增加而减少,而 G⁺菌含量高于 G⁻菌;各处理间的真菌与放线菌 PLFA 表征含量差异不显著. 表明硫酸黏菌素的土壤暴露胁迫对 G⁻菌的抑制作用比对 G⁺菌的抑制作用强,而对真菌和放线菌的影响不明显.

2.4 磷脂脂肪酸的主成分分析

土壤微生物种群结构是表征土壤生态系统群落结构和稳定性的重要参数,17 种脂肪酸含量的变化结果形成了描述微生物群落结构特征的多元向量,不易直观比较. 对 17 种脂肪酸进行主成分分析的结果表明,土壤微生物群落的结构多样性类型分明

表 1 不同处理土壤微生物生物量碳和 PLFA 含量(21 d)
Table 1 Contents of soil microbial biomass carbon and PLFA in different treatments (21 d)

处理 Treatment (mg · kg ⁻¹)	微生物生物量碳 MBC (mg · kg ⁻¹)	PLFA 表征含量 Content of PLFA biomarker (nmol · g ⁻¹)				
		G ⁺	G ⁻	G ⁺ /G ⁻	真菌 Fungi	放线菌 Actinobacteria
0	388.89±15.82a	9.37±0.78a	7.09±0.58a	1.32	4.87±0.48a	0.43±0.05a
0.5	353.78±19.11a	3.95±0.46b	3.25±0.32b	1.22	4.04±0.36b	0.45±0.07ab
5	280.00±15.45b	3.81±0.66b	2.10±0.35b	1.81	3.73±0.59b	0.36±0.06bc
50	186.22±3.56c	2.99±0.32b	2.19±0.22 b	1.37	4.52±0.67ab	0.33±0.04c

同列不同字母表示差异显著 ($P<0.05$) Different letters in the column meant significant difference at 0.05 level.

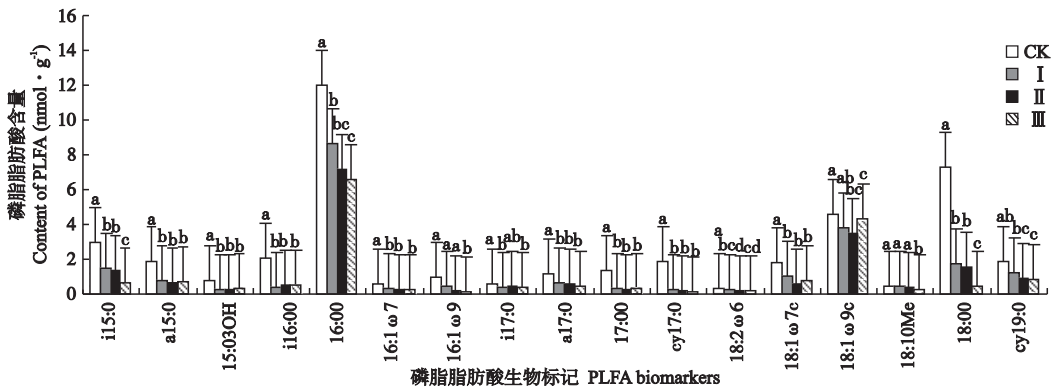


图 1 硫酸黏菌素对土壤各类磷脂脂肪酸的影响(21 d)

Fig.1 Effects of colistin sulfate on PLFA content (21 d).

CK; 0 mg · kg⁻¹ (对照 Control); I: 0.5 mg · kg⁻¹; II: 5 mg · kg⁻¹; III: 50 mg · kg⁻¹. 下同 The same below. 同磷脂脂肪酸不同字母差异显著 ($P<0.05$) Different letters in same PLFA meant significant difference at 0.05 level.

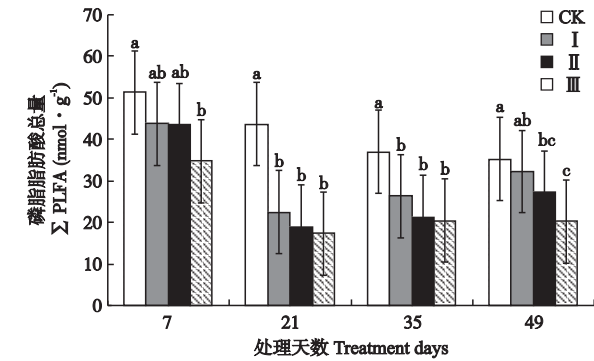


图2 不同处理的磷脂脂肪酸总量

Fig. 2 Content of total PLFAs in different treatments.

相同采样时间不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$) Different letters in the same time meant significant difference at 0.05 level.

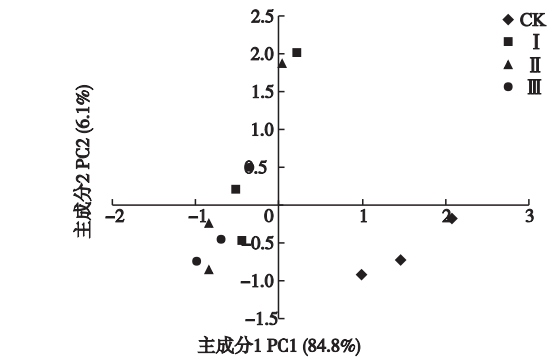


图3 不同处理土壤微生物群落结构主成分分析(21 d)

Fig. 3 Principal component analysis of soil microbial community structure in different treatments (21 d).

显. 第7天,第二主成分得分系数的差异达显著水平 ($P < 0.05$, 图略),硫酸黏菌素 $w_{CS} \geq 5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 在主成分2上与对照的土壤微生物群落结构多样性的类型分异显著;第21天(图3)和第35天(图略),第一主成分和第二主成分得分系数的差异均达极显著水平 ($P < 0.01$),硫酸黏菌素各处理组中土壤微生物群落结构多样性的类型均分异显著;第49天,第一主成分和第二主成分得分系数的差异均达显著水平 ($P < 0.05$, 图略),硫酸黏菌素各处理组与对照土壤微生物群落结构多样性的类型分异显著.

3 讨 论

土壤微生物生物量通常以熏蒸法测定的生物量碳、氮来表示. 磷脂脂肪酸分析则是通过提取微生物细胞膜中的磷脂成分,定量后得到总磷脂含量(单位: $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1}$),用于表征土壤微生物生物量. 这是一种新兴的表征微生物生物量的方法. 对 PLFA 法与熏蒸法得到的数据进行相关分析,总磷脂与土壤微生物生物量碳的变化达到了显著相关水平

($R^2 = 0.689, P < 0.05$),说明这两种用于表征土壤微生物生物量的方法,在探讨硫酸黏菌素残留下土壤微生物的响应时,可得到一致的结果. Fierer 等^[13]在研究微生物生物量随土层深度变化时也得出 PLFA 法与熏蒸法所得的生物量相关. 因此,用熏蒸法测定土壤微生物生物量仍不失为一种实用和经济有效的方法.

土壤微生物是土壤养分循环的推动力,土壤中的一系列生物、化学过程均以碳、氮循环为中心,土壤微生物生物量碳是评价微生物量和活性参数的重要指标,也是评价土壤碳库平衡和土壤化学、生物化学以及肥力保持的重要指标. 试验结果表明,硫酸黏菌素使土壤微生物生物量碳显著降低. 黏菌素属于多肽类抗生素,是兽医临床和动物生产中常用药物,其杀菌机理是:其带阳电荷的游离氨基能与革兰氏阴性菌胞质膜磷脂中带阴电荷的磷酸根结合,降低胞质膜的表面张力,通透性增加,使菌体内氨基酸、嘌呤、嘧啶、磷酸盐等成分外漏而死亡^[14]. 硫酸黏菌素使土壤微生物的数量和活性大大降低,所以土壤微生物生物量碳也相应减少.

在硫酸黏菌素的影响下,土壤中 G^- 菌 PLFA 表征的含量明显低于 G^+ 菌的含量,表明硫酸黏菌素对土壤中 G^- 菌的抑制作用明显大于 G^+ 菌,而在整个培养周期里硫酸黏菌素处理组的真菌和放线菌与对照均无显著差异,说明硫酸黏菌素对真菌和放线菌的抑制作用不明显. 这与硫酸黏菌的杀菌机理有关,黏菌素为窄谱杀菌药物,对革兰氏阴性菌的杀菌活性强^[14].

磷脂脂肪酸是除古细菌外几乎所有微生物细胞膜磷脂的组成成分,是构成活体生物细胞膜的重要组成部分. 不同类群微生物能通过相应生化途径形成特定的 PLFA,具有结构多样性和较高的生物学特异性. PLFA 作为区分活体微生物群落生物标记的基础,可以成为微生物分类的依据^[15]. 本试验整个采样周期中,每克土壤总 PLFA 含量在硫酸黏菌素胁迫影响下出现明显降低,且存在一定的剂量依赖效应,同时,各处理组土壤微生物群落结构分异显著,其中高浓度组与对照分异最大,表明硫酸黏菌素可致土壤微生物群落结构多样性改变,胁迫浓度越高,其作用越强. 这与 Kong 等^[16]测定兽用抗菌药土霉素对土壤微生物群落功能多样性影响的结果一致,土壤中土霉素浓度越高,土壤微生物群落功能多样性越显著降低. 暴露中期(第21、35天)各处理组 PLFA 表现明显的类型差异,后期(第49天)中、高

浓度组与对照差异显著,说明低浓度的硫酸黏菌素对土壤微生物影响较小,且随着时间的延长土壤微生物群落结构多样性逐渐恢复;高浓度的硫酸黏菌素对土壤微生物影响很大,土壤微生物群落结构多样性恢复较慢.这与环丙沙星对土壤微生物的碳源利用及代谢功能多样性影响的结果一致^[17].原因是硫酸黏菌素的杀菌作用导致土壤微生物量降低,浓度越大杀菌能力越强,故 PLFAs 出现不同程度的减少.在试验前、中期,各组土壤中 PLFA 总量随着培养时间的延长逐渐减少,后期(第 49 天)PLFA 总量有所回升.这种现象可能是土壤中一些对硫酸黏菌素有一定耐受性的细菌增殖,使微生物总量增加,同时,硫酸黏菌素在环境中不断降解或发生化学结构改变,使土壤微生物群落逐渐恢复.

4 结 论

硫酸黏菌素对土壤微生物生物量碳和微生物群落结构多样性有明显的抑制作用,且随药物浓度的增高而影响加大. $\geq 5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 硫酸黏菌素显著降低土壤微生物生物量碳、各类磷脂脂肪酸和 PLFA 总量,导致土壤微生物群落结构分异明显,其中 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的硫酸黏菌素处理影响最大.同时,硫酸黏菌素对土壤微生物群落结构多样性的影响还表现出时间差异,随着时间的推移,硫酸黏菌素的影响逐步减弱.

参考文献

- [1] Shu X-L (疏秀林), Shi Q-S (施庆珊), Li C-B (李诚斌), *et al.* Review on the pharmacology of colistin. *Chinese Journal of Veterinary Drug* (中国兽药杂志), 2006, **40**(10): 31–34 (in Chinese)
- [2] Ma Y (马 驿), Chen Z-L (陈杖榴). Effects of enrofloxacin on DNA sequence diversity of soil cultural bacterial community. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2009, **20**(4): 949–954 (in Chinese)
- [3] Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM. Trans. Wang L-S (王连生). *Environmental Organic Chemistry*. Beijing: Chemical Industry Press, 2004 (in Chinese)
- [4] Isam H, Domsch KH. Relationship between soil organic carbon and microbial biomass on chronosequence of reclamation sites. *Microbial Ecology*, 1988, **15**: 177–188
- [5] Paul EA. *Soil Microbiology and Biochemistry*. London: Academic Press, 1996: 35–70
- [6] Peterson SO, Klug MJ. Effect of sieving storage and in-

- cubation temperature on the phospholipid fatty acid profile of a soil microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, **60**: 2421–2430
- [7] Xia Z-C (夏志超), Kong C-H (孔垂华), Wang P (王 朋), *et al.* Characteristics of soil microbial community structure in *Cunninghamia lanceolata* plantation. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2012, **23**(8): 2135–2140 (in Chinese)
- [8] Wu J-S (吴金水), Lin Q-M (林启美), Huang Q-Y (黄巧云), *et al.* *Soil Microbial Biomass Determination and Its Applications*. Beijing: Meteorological Press, 2006: 65–74 (in Chinese)
- [9] Frostagård Å, Tunlid A, Bååth E. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally to different metals exposed heavy. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **59**: 3605–3617
- [10] Zelles L. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: A review. *Biology and Fertility of Soils*, 1999, **29**: 111–129
- [11] Findlay RH, Dobbs FC. Quantitative description of microbial communities using lipid analysis. *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993: 271–284
- [12] Zheng J (郑 佳), Zhang L (张 良), Shen C-H (沈才洪), *et al.* Characteristics of microbial community structure in Luzhou-flavor fermentation pits. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2011, **22**(4): 1020–1026 (in Chinese)
- [13] Fierer N, Schimel JP, Holden PA. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, **35**: 167–176
- [14] Chen Z-L (陈杖榴). *Veterinary pharmacology*. Beijing: Chinese Agriculture Press, 2002 (in Chinese)
- [15] Wu Y-P (吴愉萍), Xu J-M (徐建明), Wang H-Z (汪海珍), *et al.* Application of Sherlock MIS in identification of soil bacteria. *Acta Pedologica Sinica* (土壤学报), 2006, **43**(4): 642–647 (in Chinese)
- [16] Kong WD, Zhu YG, Fu BJ, *et al.* The veterinary antibiotic oxytetracycline and Cu influence functional diversity of the soil microbial community. *Environmental Pollution*, 2006, **143**: 129–137
- [17] Ma Y (马 驿), Peng J-J (彭金菊), Wang Y (王 芸), *et al.* Effects of ciprofloxacin on microbial biomass carbon and carbon metabolism diversity of soil microbial communities. *Acta Ecologica Sinica* (生态学报), 2013, **33**(5): 1506–1512 (in Chinese)

作者简介 马 驿,男,1976 年生,博士,教授.主要从事兽医药理学与毒理学的教学与科研工作. E-mail: mayi761@163.com

责任编辑 肖 红