

恩诺沙星残留对土壤中反硝化细菌氧化二氮还原酶基因(*nosZ*)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反硝化细菌氧化二氮还原酶 *nosZ* 基因的分子多样性进行了研究。结果表明, 恩诺沙星作用于土壤后第 35 天, I—VI 组 (I 组 0 $\mu\text{g/g}$ 、II 组 0.01 $\mu\text{g/g}$ 、III 组 0.1 $\mu\text{g/g}$ 、IV 组 1 $\mu\text{g/g}$ 、V 组 10 $\mu\text{g/g}$ 、VI 组 50 $\mu\text{g/g}$) 的 OTUs 与克隆子的百分比分别为: 48.30%、41.88%、34.78%、33.62%、25.42%、23.81%; 第 70 天, I—VI 组的 OTUs 与克隆子的百分比分别为: 29.66%、24.24%、18.10%、16.67%、15.83%、14.39%。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 50 $\mu\text{g/g}$ 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—10 $\mu\text{g/g}$ 组土壤反硝化细菌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; 反硝化细菌; RFLP

Effects of enrofloxacin on molecular diversity of nitrous oxide reductase genes (*nosZ*)

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 of denitrifying bacteria was analyzed by PCR-based cloning and RFLP (restriction fragment length polymorphism) methods. PCR-RFLP analysis revealed that the percentages of OTUs to total clones among groups I to VI (0, 0.01, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/g}$ and 50 $\mu\text{g/g}$, respectively) were 48.30%, 41.88%, 34.78%, 33.62%, 25.42% and 23.81%, respectively after the ENR addition for 35 days, and that the percentages were 29.66%, 24.24%, 18.10%, 16.67%, 15.83% and 14.39% after the ENR addition for 70 days, respectively. The effects of ENR on diversity of denitrifying bacteria were enhanced with the increasing ENR concentrations. The results showed that the Margalef Index in CK was significantly ($P < 0.05$) higher than those from soils amended with ENR after 35 days. The Margalef Index in CK was only significantly higher than those in soils treated with 10 $\mu\text{g/g}$ and 50 $\mu\text{g/g}$ of ENR after 70 days, respectively. Shannon-Wiener Indexes in CK were significantly higher than those treated with ENR except 0.01 $\mu\text{g/g}$ after 35 days, but the Shannon-Wiener Index in CK was only significantly higher than that in the soils treated with 50 $\mu\text{g/g}$ of ENR after 70 days. Our data indicated that the effects of ENR on diversity of denitrifying bacteria in soils at lower concentrations (0.01 $\mu\text{g/g}$ to 10 $\mu\text{g/g}$) were decreased with incubation time.

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (30130140)

收稿日期: 2008-12-22; **修订日期:** 2009-03-22

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

Key Words: enrofloxacin; soil microbial community diversity; denitrifying 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,其中土壤反硝化细菌在保持土壤肥力等过程中发挥着关键的作用。从根际土壤分离的细菌,65%具有反硝化能力,反硝化细菌通过异化作用使硝酸盐最终转化为氮气,这就是反硝化作用。没有反硝化作用,大气将成为无氮的气体,氮饥饿将使地球上生物停止生长,同时,反硝化作用可以去除硝酸污染物,加速对污染环境进行生物修复,有助于污水纯化和饮用水的净化^[5]。氧化二氮还原酶(*nosZ*)是反硝化细菌的重要酶^[6],目前已有不少研究者通过研究 *nosZ* 基因的多样性来探讨反硝化细菌的群落结构和多样性,主要的技术包括 PCR 扩增、基因探针杂交、PCR-RFLP、T-RFLP 等,这些研究对不同环境中的 *nosZ* 基因进行了分析,例如森林土壤、草地、海底沉积物、耕地等^[7-8],研究发现反硝化细菌具有明显的多样性。本文采用氧化二氮还原酶(*nosZ*)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反硝化细菌多样性的影响。旨在了解兽药残留的生态效应及对生态环境的潜在危害,为抗菌药物的科学管理、合理使用、环境监测与保护提供理论依据。

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:0.1M 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^[9]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 1d、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^[10]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 1 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;加入 0.8 体积的异丙醇,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 5 μ L 在 0.6% 琼脂糖凝胶中进行电泳,电泳时使用 λ DNA/Hind III 作为 DNA 标准分子量,紫外灯下观察电泳结果。

1.2.4 氧化二氮还原酶 *nosZ* 基因的 PCR 扩增

引物 *NosZ*-1211 F 5'-CG(C/T)TGTTC(A/C)TCGACAGCCA-3' 和 *NosZ*-1917 R CATGTGCAG(A/C/G/T)GC(A/G)TGGCAGAA-3'^[11] 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/ μ L) 0.5 μ L,引物 F 和 R(20pmol/ μ L)各 0.5 μ L,dNTP(10mmol/L)0.5 μ L,Buffer(Mg²⁺ 20mmol/L) 2.5 μ L,Taq 聚合酶(购自 TaKaRa 公司)(2U/ μ L)0.5 μ L,补水至 25 μ L。PCR 扩增反应程序:采用“降落”PCR 扩增,94℃预变性 5min,94℃40s,60℃30s,72℃1 min,2 个循环,94℃40s,59℃30s,72℃1min,2 个循环,94℃40s,58℃30s,72℃1min,2 个循环,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,30 个循环,最后 72℃延伸 6min。

1.2.5 扩增产物的克隆和 RFLP 分析

1.0% 琼脂糖凝胶(含 0.5 μ g/mL EB)电泳 PCR 扩增产物,试剂盒(购自 TaKaRa 公司)回收纯化目的片段。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 PCR 产物进行克隆。各处理重复 3 次,分别挑取 3 次的所有白色单菌落,用载体 pMD20-T Vector 的特异性引物 M13 对克隆产物进行 PCR 扩增,筛选有期望大小片段(约 700bp)的克隆。

将载体引物 M13 扩增所获得的产物用限制性内切酶 *MspI* 和 *RsaI* 在 37℃ 酶切 2—3 h。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。

1.2.6 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 分析不同浓度药物处理的反硝化细菌群落结构多样性,采用以下指标度量:

$$\text{多样性用 Shannon-Wiener 指数}(H') \quad H' = - \sum_{i=1}^S P_i \ln P_i, P_i = \frac{ni}{N}$$

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

$$\text{物种丰富度用 Margalef 指数}(d_{Ma}) \quad d_{Ma} = \frac{S-1}{\ln N}$$

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富度^[12]。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 氧化二氮还原酶 *nosZ* 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氧化二氮还原酶 *nosZ* 基因引物的选择性扩增,并获取具正确长度(约 700bp)的 PCR 产物(图 2)。

将纯化的 *nosZ* 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。

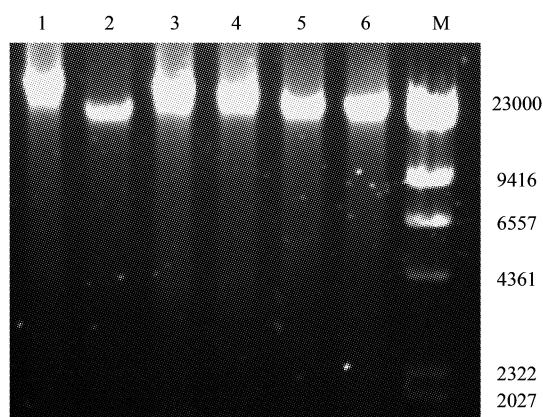
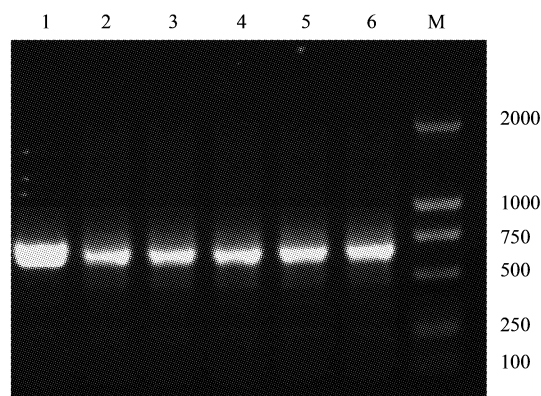


图1 土壤微生物总 DNA 琼脂糖电泳图

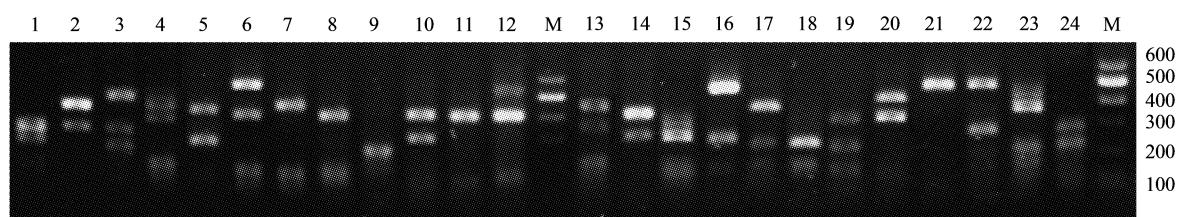
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of total DNA

1—6: 总 DNA total DNA; M: λ DNA/Hind III图2 *nosZ* 基因 PCR 产物琼脂糖电泳图Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PCR fragment of *nosZ* gene

1—6: PCR 产物 PCR fragment; M: DL-2000

2.3 克隆子 RFLP 分析

阳性克隆的 PCR 产物采用 *Msp*I 和 *Rsa*I 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 土壤细菌氧化二氮还原酶 *nosZ* 基因的 PCR-RFLP 图谱Fig 3 PCR-RFLP profiles of *nosZ* gene of nitrous oxide reductase1—24: RFLP 类型 RFLP patterns of *nosZ* gene; M: 100bp DNA Ladder II

添加 ENR 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:48.30%、41.88%、34.78%、33.62%、25.42%、23.81%。各处理中单一克隆子占总克隆子的比例分别为:I 组 31.29%、II 组 22.22%、III 组 19.57%、IV 组 14.66%、V 组 11.02%、VI 组 11.11%,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。

添加 ENR 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:29.66%、24.24%、18.10%、16.67%、15.83%、14.39%。各处理中单一克隆子占总克隆子的比例分别为:I 组 13.56%、II 组 11.36%、III 组 6.03%、IV 组 5.83%、V 组 5.00%、VI 组 2.27%。

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,添加 ENR 后第 35 天(表1),对照组的氧化二氮还原酶 *nosZ* 基因 RFLP 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($P < 0.05$),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($P < 0.05$),高浓度药物组($10 \mu\text{g/g}$ 和 $50 \mu\text{g/g}$)与其它低浓度药物组之间的 Margalef 指数和 Shannon-Wiener 指数差异显著。

添加 ENR 后第 70 天(表2),对照组的氧化二氮还原酶 *nosZ* 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 Margalef 指数差异显著($P < 0.05$),其它各组的 Margalef 指数与对

照组比,均差异不显著。50 $\mu\text{g/g}$ 组与对照组比 Shannon-Wiener 指数差异显著($P < 0.05$),其它各组的 Shannon-Wiener 指数与对照组比,均差异不显著。

表 1 添加 ENR 后第 35d 氧化二氮还原酶 *nosZ* 基因 RFLP 分析多样性指数

Table 1 Diversity of RFLP patterns of *nosZ* gene of nitrous oxide reductase after the ENR addition for 35 days

组别	药物含量 /($\mu\text{g/g}$)	克隆子 /个	OTUs /个	OTUs 与克隆 子百分比/%	Margalef 指数(d_{Ma})	Shannon-Wiener 指数(H')
I	0.00	147	71	48.30	14.03a	3.87a
II	0.01	117	49	41.88	10.08b	3.48ab
III	0.1	138	48	34.78	9.54b	3.25bc
IV	1.0	116	39	33.62	7.99b	3.21bc
V	10.0	118	30	25.42	6.08c	2.67cd
VI	50.0	126	30	23.81	6.00c	2.60d

同列数据无相同字母者,表示差异显著($P < 0.05$)

表 2 添加 ENR 后第 70 天氧化二氮还原酶 *nosZ* 基因 RFLP 分析多样性指数

Table 2 Diversity of RFLP patterns of *nosZ* gene of nitrous oxide reductase after the ENR addition for 70 days

组别	药物含量 /($\mu\text{g/g}$)	克隆子 /个	OTUs /个	OTUs 与克隆 子百分比/%	Margalef 指数(d_{Ma})	Shannon-Wiener 指数(H')
I	0.00	118	35	29.66	7.13a	3.10a
II	0.01	132	32	24.24	6.35a	2.85a
III	0.1	116	21	18.10	4.21a	2.34a
IV	1.0	120	20	16.67	3.97ab	2.34a
V	10.0	120	19	15.83	3.76b	2.24ab
VI	50.0	132	19	14.39	3.69b	2.08b

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^[13-14]。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^[15]。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,能够更直接地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,已有报道指出,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^[16]。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^[8]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 分析土壤微生物氧化二氮还原酶 *nosZ* 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^[17]。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此样本的一个性状,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。氧化二氮还原酶(*nosZ*)是反硝化细菌的重要酶^[6],张于光等通过 PCR-RFLP 分析了不同植被土壤反硝化菌氧化二氮还原酶 *nosZ* 基因的多样性^[16],本研

究以土壤微生物总 DNA 为模板,PCR 扩增了氧化二氮还原酶 *nosZ* 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,可较好地进行分析。

3.3 恩诺沙星对反硝化细菌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反硝化细菌的多样性,结果表明,用药后第 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,部分土壤反硝化细菌被抑制,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。王加龙等研究发现,土壤中添加恩诺沙星后,土壤细菌、放线菌、真菌的数量都比用药前有所降低,恩诺沙星对土壤微生物影响的强弱顺序为:细菌 > 放线菌 > 真菌,其影响作用随药物浓度从每克土 0.01 μg 至 10 μg 的增加而加大^[4]。因此,恩诺沙星抑制了土壤反硝化细菌 DNA 的复制,使细菌数量降低,恩诺沙星含量愈高,被抑制的反硝化细菌愈多,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,不利于部分反硝化细菌的生长,从而使生物多样性下降的原故。

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反硝化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—10 $\mu\text{g/g}$)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反硝化细菌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 方法研究了土壤反硝化菌氧化二氮还原酶 *nosZ* 基因的多样性,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 *nosZ* 基因序列测定等方法。

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. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2005, 11(1): 86-89.
- [5] Tiedje J M. Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium//Zehnder A J B. ed. *Biology of anaerobic microorganisms*. John Wiley&Sons, Inc., New York, N. Y. 1988: 179-244.
- [6] 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.
- [7] Liu X D, Tiquia S M, Holguin G. Molecular diversity of denitrifying genes in continental margin sediments within the oxygen deficient zone of the Pacific Coast of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(6): 3549-3560.

- [8] Stres B, Mahne I, Avgustin G. Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene fragments differ between native and cultivated Michigan soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(1): 301-309.
- [9] Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab (CSHL) Press, 2001.
- [10] 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.
- [11] Braker G, Zhou J Z, Wu L Y. Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific Northwest marine sediment communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 2096-2104.
- [12] 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.
- [13] Scala D J, Kerkhof L J. Horizontal heterogeneity of denitrifying bacterial communities in marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66: 1980-1986.
- [14] Scala D J, Kerkhof L J. Nitrous oxide reductase (*nosZ*) gene-specific PCR primers for detection of denitrifiers and three *nosZ* genes from marine sediments, *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 162: 61-68.
- [15] 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.
- [16] Dedysh S N, Rieke P, Liesack W. NifH and NifD phylogenies: an evolutionary basis for understanding nitrogen fixation capabilities of methanotrophic bacteria. *Microbiology*, 2004, 150: 1301-1313.
- [17] Zhang Y G, Wang H M, Li D Q, Xiao Q M, Liu X D. The diversity of denitrifying bacteria in the alpine meadow soil of Sanjiangyuan natural reserve in Tibet Plateau. *Chinese Science Bulletin*, 2006, 51(6): 715-723.
- [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] 马驿, 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.
- [17] 张于光, 李迪强, 王慧敏, 肖启明, 刘学端. 青藏高原三江源地区高寒草甸土反硝化细菌多样性的初步研究. *科学通报*, 2006, 51(6): 715-723.