



请通过网上投稿系统投稿 网址:http://www.aes.org.cn

# 磺胺二甲嘧啶对稻田土壤微生物的中长期效应

徐佳迎,周金蓉,吴杰,王珏,程粟裕,赵鸽,蒋静艳

引用本文:

徐佳迎,周金蓉,吴杰,等.磺胺二甲嘧啶对稻田土壤微生物的中长期效应[J].农业环境科学学报,2020,39(8):1757-1766.

在线阅读 View online: https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0123

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

洪湖养殖区水环境中微生物的耐药性及其群落功能多样性研究

关川, 童蕾, 秦丽婷, 刘慧 农业环境科学学报. 2018, 37(8): 1748-1757 https://doi.org/10.11654/jaes.2017-1460

水力停留时间对猪粪厌氧发酵残留物中磺胺类抗生素分布的影响

许彩云, 靳红梅, 杜静, 常志州, 黄红英, 周立祥 农业环境科学学报. 2016, 35(11): 2187-2194 https://doi.org/10.11654/jaes.2016-0488

植物修复重金属和抗生素复合污染 土壤微生物数量和酶活性的变化

周显勇, 刘鸿雁, 刘艳萍, 刘青栋, 涂宇, 顾小凤, 吴龙华 农业环境科学学报. 2019, 38(6): 1248-1255 https://doi.org/10.11654/jaes.2019-0029

外源土霉素和磺胺二甲嘧啶对土壤活性有机碳含量的影响

凌德, 李婷, 张世熔, 李云, 贾永霞, 徐小逊 农业环境科学学报. 2015(2): 297-302 https://doi.org/10.11654/jaes.2015.02.013

纳米银对四种不同性质土壤微生物量及酶活性的影响

舒昆慧,张丽,伍玲丽,司友斌,刘沁雪 农业环境科学学报.2018,37(5):907-914 https://doi.org/10.11654/jaes.2017-1325



关注微信公众号,获得更多资讯信息

徐佳迎,周金蓉,吴杰,等.磺胺二甲嘧啶对稻田土壤微生物的中长期效应[J].农业环境科学学报,2020,39(8):1757-1766. XU Jia-ying, ZHOU Jin-rong, WU Jie, et al. Medium- and long-term effects of the veterinary antibiotic sulfadiazine on soil microorganisms in a rice field[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(8): 1757-1766.



# 磺胺二甲嘧啶对稻田土壤微生物的中长期效应

徐佳迎,周金蓉,吴杰,王珏,程粟裕,赵鸽,蒋静艳\*

(南京农业大学资源与环境科学学院,南京 210095)

摘 要:为了研究兽用抗生素磺胺二甲嘧啶(SMZ)对稻田土壤微生物的中长期效应,本文采用HPLC-MS和Illumina Miseq高通量测序技术,对比分析了磺胺二甲嘧啶(30 mg·kg<sup>-1</sup>)与不同基肥(猪粪和复合肥)同步输入稻田土壤47 d和61 d后,其在土壤中的降解情况和对土壤微生物的影响,并开展了磺胺二甲嘧啶单一降解产物相应室内纯培养验证研究。结果表明:无论基肥是猪粪还是复合肥,磺胺二甲嘧啶输入土壤47 d和61 d后均降解产生了2-氨基-4,6-二甲基嘧啶和4-[2-亚氨基-4,6-二甲基嘧啶-1(2H)-基]苯胺这两种降解产物,且以前者为主。在两个研究时间点,无论肥源是猪粪还是复合肥,磺胺二甲嘧啶对土壤微生物群落多样性和丰富度变化均无显著影响(P>0.05)。但从微生物优势群落组成上来看,磺胺二甲嘧啶输入47 d后,相对于猪粪对照,猪粪+SMZ处理中芽单胞菌门和芽单胞菌属相对丰度显著降低了0.81%和0.70%(P<0.05),Subgroup6\_norank菌属相对丰度显著增加了0.54%(P<0.05),表明此时猪粪+SMZ处理对芽单胞菌门和芽单胞菌属有显著抑制作用,对Subgroup6\_norank菌属有显著促进作用,培养试验证实了此作用效果主要来自于磺胺二甲嘧啶的降解产物2-氨基-4,6-二甲基嘧啶;磺胺二甲嘧啶输入61 d后,猪粪+SMZ处理对放线菌门和厚壁菌门有显著促进作用(P<0.05),对伯克氏菌属有极显著促进作用(P<0.01),复合肥+SMZ处理对热脱硫杆菌属起显著抑制作用(P<0.05),相对于同种肥源对照,猪粪+SMZ处理中放线菌门、厚壁菌门和伯克氏菌属相对丰度分别提高了2.66%、0.71%和0.25%,复合肥+SMZ处理中热脱硫杆菌属相对丰度降低了0.43%。因此,磺胺类兽用抗生素在土壤中的中长期效应不可忽视。

关键词:磺胺二甲嘧啶;降解产物;土壤微生物;群落组成 中图分类号:S154.3 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2020)08-1757-10 doi:10.11654/jaes.2020-0123

#### Medium- and long-term effects of the veterinary antibiotic sulfadiazine on soil microorganisms in a rice field

XU Jia-ying, ZHOU Jin-rong, WU Jie, WANG Jue, CHENG Su-yu, ZHAO Ge, JIANG Jing-yan\*

(College of Resource and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The veterinary antibiotic sulfamethazine (SMZ) can enter into paddy soil with animal excrement, where it subsequently has a long biological half-life. In order to investigate the medium – and long-term effects of SMZ on soil microorganisms, HPLC-MS and Illumina MiSeq with high-throughput sequencing techniques were used to analyze the degradation products of SMZ and the effects on soil microorganisms after 47 d and 61 d of SMZ (30 mg  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>) being synchronous applied to paddy soil with different basal fertilizers (pig manure and compound fertilizer). The corresponding indoor pure incubation study of the single degradation products of SMZ was also carried out. The results showed that two degradation products, 2-amino-4, 6-dimethylpyrimidine and 4 – (2-imino4, 6-dimethylpyrimidine–1(2*H*)-base) aniline, were produced after 47 d and 61 d of SMZ application, with the former being the dominant intermediate product regardless of which basal fertilizer was used. At the two sampling time points, SMZ had no significant effect on the diversity and richness of the soil microbial community for both basal fertilizers (*P*>0.05). However, in terms of the microbial dominant community composition, the soil treated with SMZ and pig manure significantly decreased the relative abundances of Gemmatimonadetes

\*通信作者:蒋静艳 E-mail:lilacjjy@njau.edu.cn

收稿日期:2020-02-04 录用日期:2020-03-30

作者简介:徐佳迎(1993—),女,江西樟树人,硕士研究生,主要研究方向为环境污染与全球变化。E-mail:xjy\_amal@163.com

基金项目:国家自然科学基金项目(41675148,41375150)

Project supported : The National Natural Science Foundation of China (41675148, 41375150)

and *Gemmatimonadaceae* by 0.81% and 0.70% (P<0.05), respectively, and significantly increased the relative abundance of *Subgroup6\_norank* by 0.54% (P<0.05) after 47 d in comparison to the pure manure control. This indicated that SMZ had a significant inhibitory effect on Gemmatimonadetes and *Gemmatimonadaceae*, but a significant promoting effect on *Subgroup6\_norank* bacteria. The incubation experiment confirmed that these effects mainly related to the SMZ degradation product 2-amino-4, 6-dimethylpyrimidine. Moreover, in comparison to the pure fertilizer control, the soil treated with SMZ and manure significantly promoted the relative abundances of Actinobacteria, Firmicutes (P<0.05), and *Burkholderiaceae* (P<0.01) by 2.66%, 0.71%, and 0.25%, respectively, after 61 d of SMZ application. In contrast, the soil treated with SMZ and compound fertilizer significantly decreased the relative abundance of *Thermodesul fovibrionia* (P<0.05) by 0.43% after 61 d. Therefore, the medium – and long-term effect of veterinary antibiotics in soil, especially sulfonamides, should not be ignored.

Keywords: sulfamethazine; degradation products; soil microorganisms; community composition

磺胺类药物是使用最广泛的兽用抗生素品种之 一回。其进入动物体内并不能被动物体吸收代谢完 全,约有50%~90%以母体化合物或其代谢产物的形 式经由动物粪尿排出体外,再随畜禽粪便的施用进入 环境[2]。有报道指出猪粪中磺胺类药物的含量为20~ 40 mg·kg<sup>-1[3]</sup>, Ji 等<sup>[4]</sup>也指出施用过猪粪的农田土壤中 磺胺类药物含量范围可高达4.54~24.66 mg·kg<sup>-1</sup>。磺 胺类药物是广谱抑菌抗生素,可抑制叶酸途径中二氢 蝶酸合成,进而抑制细菌的繁殖。因此,当磺胺类抗 生素进入土壤后,土壤中的微生物种群数量和结构组 成都会受到影响[5-6]。目前已有大量文献报道了磺胺 二甲嘧啶(SMZ)施入土壤后短期内对土壤微生物活 性和群落多样性有抑制作用,如刁晓平等四采用室内 培养法,研究了10、100 mg·kg<sup>-1</sup>和500 mg·kg<sup>-1</sup>磺胺二 甲嘧啶培养24h和48h后对不同土壤微生物种群数 量的影响,结果表明磺胺二甲嘧啶短期培养后对所测 的4种土壤中的细菌均具有抑制作用,且这种抑制作 用随浓度的降低而出现下降的趋势。张敏等<sup>181</sup>采用 Biolog法,研究了磺胺二甲嘧啶对沼气发酵过程中微 生物群落的影响,结果表明在沼气发酵第6d,20、60 mg·kg<sup>-1</sup>和120 mg·kg<sup>-1</sup>磺胺二甲嘧啶对微生物群落功 能多样性和物种丰富度均有抑制作用,且浓度越高抑 制作用越显著。磺胺类抗生素在土壤中的降解是一 个先快后慢的过程,在光照条件下磺胺类抗生素在江 西红壤中降解半衰期为20~58.5 d,在太湖水稻土和 东北黑土中降解半衰期为5.3~16.5 d,90%降解率所 需时长均大于180 d<sup>19</sup>。目前关于磺胺二甲嘧啶对土 壤微生物影响的研究多围绕其输入后的短期效应,缺 乏其输入后对土壤微生物中长期影响的研究,关于磺 胺二甲嘧啶降解产物的研究也多集中在水体中,对其 在土壤中降解产物的研究较为鲜见。因此,结合磺胺 二甲嘧啶在土壤中降解半衰期,有必要开展其对土壤 微生物中长期效应的研究。

本课题组前期工作表明在稻田试验中输入30 mg·kg<sup>-1</sup>磺胺二甲嘧啶47 d和61 d后,磺胺二甲嘧啶 对稻田 N<sub>2</sub>O(由硝化或反硝化作用产生)排放仍具有 显著促进作用(P<0.05),但是磺胺二甲嘧啶残留率仅 为1.8%~5.2%<sup>100</sup>。该阶段磺胺二甲嘧啶在土壤中的 降解转化及其对土壤微生物群落结构的影响值得深 入探索,故本文结合 HPLC-MS分析和Illumina Miseq 测序两种技术研究磺胺二甲嘧啶母体及其降解产物 对土壤微生物的影响,以期深入了解磺胺二甲嘧啶输 入土壤后的中长期效应,为了解其环境生态风险提供 科学依据。

# 1 材料与方法

### 1.1 试验设计

田间试验位于江苏省南京市江宁区典型稻麦轮 作区(118°59′E,31°57′N),试验田土壤有机碳含量 为29.39 g·kg<sup>-1</sup>,全氮含量为1.93 g·kg<sup>-1</sup>,pH为7.67,土 壤容重为1.30 g·cm-3。供试抗生素为上海麦克林公 司生产的磺胺二甲嘧啶试剂。供试猪粪为经堆置的 从未接触过任何抗生素的家猪排泄物,全氮含量为 8.82 g·kg<sup>-1</sup>,有机质为752.03 g·kg<sup>-1</sup>。试验处理设置 为:以猪粪(M)为基肥,尿素为追肥,有无30 mg·kg<sup>-1</sup> 磺胺二甲嘧啶(M和M+SMZ)和以复合肥(F)为基肥, 尿素为追肥,有无30 mg·kg<sup>-1</sup>磺胺二甲嘧啶(F和F+ SMZ)。本试验供试水稻品种为南粳55号,水稻于 2017年6月4日播种,2017年11月11日收获。4个处 理施氮总量(UN)均为220 kg·hm<sup>-2</sup>,按基肥:追 肥=1:1比例撒施,磺胺二甲嘧啶随基肥一次性施入, 追肥时不再添加。基追肥时间分别为2017年6月4 日和2017年7月29日。试验田采用微区设计,小区 面积为3m×2m,每个处理设置3个重复,随机排列。 各小区之间设有80 cm宽、30 cm高的田埂,田埂用塑 料薄膜覆盖,且每个小区都有各自独立的灌排水系

#### 2020年8月 徐佳迎,等:磺胺二甲嘧啶对稻田土壤微生物的中长期效应

统,以防止水肥串流。整个水稻生育期N:P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>:K<sub>2</sub>O 施肥比例为2:1:1。猪粪处理不足的磷钾以过磷酸 钙(P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>,12%)和氯化钾(K<sub>2</sub>O,60%)补充。除肥料外, 试验田按照当地常规措施进行水药管理。采集磺胺 二甲嘧啶输入稻田47 d和61 d后的4个处理表层(0~ 20 cm)土壤样品,用于磺胺二甲嘧啶及其降解产物残 留测定、DNA的提取和测序分析。

在田间试验结果明确了降解产物为2-氨基-4, 6-二甲基嘧啶(ADPD)和4-[2-亚氨基-4,6-二甲基 嘧啶-1(2H)-基]苯胺(AN)的基础上,为了进一步明 确磺胺二甲嘧啶输入土壤47 d和61 d后是否是其降 解产物在土壤中起主导作用,本文进行了室内模拟 验证培养试验。处理设置同田间试验,将1 mg·kg<sup>-1</sup> ADPD(上海麦克林生化科技有限公司,97%)分别与 猪粪(M)或复合肥(F)(N,50 mg·kg<sup>-1</sup>干土)同步添加 于土壤中(M+ADPD和F+ADPD),同时做无 ADPD对 照(M和F),每个处理3个重复,在恒温恒湿(25℃、 95%水分)条件下进行室内模拟培养。培养48 h后采 集土样,进行 DNA的提取和测序分析。因无4-[2-亚 氨基-4,6-二甲基嘧啶-1(2H)-基]苯胺化学纯品销 售,故未能进行此降解产物验证试验。

#### 1.2 分析方法

1.2.1 磺胺二甲嘧啶残留和降解产物提取测定

用HPLC(美国Agilent)进行磺胺二甲嘧啶残留 检测。磺胺二甲嘧啶提取方法参考文献[11], HPLC 参数为流动相:0.1%甲酸溶液:乙腈=83:17;紫外检 测器: 270 nm; 柱温: 25 ℃; 进样量: 20 µL; 流速 0.8 mL·min<sup>-1</sup>,色谱柱:C<sub>18</sub>柱。磺胺二甲嘧啶降解产物提 取方法同磺胺二甲嘧啶提取方法<sup>III</sup>,利用HPLC-MS (美国 Agilent, 1200-6410B 三重串联四极杆液质连 用仪)进行降解产物鉴别。流动相:0.1%甲酸溶液: 乙腈=83:17;紫外检测器:270 nm;柱温:25 ℃;进样 量:10 μL;正离子模式(ESI+);喷雾器压力为30 psi (1 psi=6.895 kPa);拉伸电压:125 V;扫描范围:m/z 50~500。通过外标法利用 HPLC-MS 对磺胺二甲嘧 啶降解产物2-氨基-4,6-二甲基嘧啶进行定量分析, 外标物为0.01 mg·mL<sup>-1</sup>2-氨基-4,6-二甲基嘧啶标准 溶液。由于没有4-[2-亚氨基-4,6-二甲基嘧啶-1 (2H)-基]苯胺标品,所以4-[2-亚氨基-4,6-二甲基 嘧啶-1(2H)-基]苯胺浓度是其质谱中离子丰度与 0.01 mg·mL<sup>-1</sup> 2-氨基-4,6-二甲基嘧啶离子丰度换算 得到的相对值。

1.2.2 土样 DNA 的提取与检测

DNA的提取步骤根据E.Z.N.A.<sup>®</sup>土壤DNA试剂盒 (OMEGA)操作,完成基因组DNA抽提后,利用1%琼 脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组DNA。

1.2.3 PCR扩增和测序

以土样提取的DNA为模板,使用细菌通用引物 341F和806R扩增样品中16SrRNA基因。PCR扩增 体系是 20 µL:4 µL 5×FastPfu 缓冲液、2 µL dNTPs  $(2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1})$ , 0.8 µL Forward Primer $(5 \text{ µmol} \cdot \text{L}^{-1})$ , 0.8 μL Reverse Primer (5 μmol·L<sup>-1</sup>), 0.4 μL FastPfu 聚 合酶、10 ng DNA 模板,补灭菌水至 20 µL。PCR 扩增 程序为:95 ℃预变性5 min,27个循环(95 ℃变性30 s, 55 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 45 s), 最后 72 ℃延伸 10 min,每个样本3个重复。将同一样本的PCR产物混 合后用2%琼脂糖凝胶电泳检测,使用AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒(AXYGEN公司)切胶回收PCR产 物,用Tris HCl洗脱,最后再用2%琼脂糖电泳检测。 参照电泳初步定量结果,将PCR产物用QuantiFluor™-ST蓝色荧光定量系统(Promega公司)进行检测定量, 按照每个样本的测序量要求,进行相应比例的混合。 之后构建 Illumina PE250 文库,使用 Illumina PE250平 台进行高通量测序,测序工作由上海凌恩生物科技有 限公司完成。

# 1.2.4 数据处理

Illumina PE250测序序列:根据 barcode 得到所有 样品的有效序列,然后对 reads 的质量进行质控过滤, 再根据 PE reads 之间的 overlap 关系,将成对的 reads 拼接成一条序列,最后按照 barcode 和引物序列拆分 得到每个样本的优质序列,并在过程中根据正反 barcode 和引物方向校正序列方向以及去除嵌合体。利 用 Usearch 平台,根据 97% 相似性对非重复序列进行 OTU 聚类,采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 OTU 代 表序列进行物种分类分析,比对采用 Silva<sup>112</sup>数据库。 利用 R 语言进行 Alpha 多样性指数分析, Origin 软件 进行作图分析。

## 2 结果与分析

## 2.1 磺胺二甲嘧啶降解产物定性与定量

利用 HPLC-MS 对磺胺二甲嘧啶在土壤中的降解 产物进行鉴定,全扫描模式下化合物的总离子流如图 1 所示。与对照 M 或 F 处理对比, M+SMZ 或 F+SMZ 处 理在两个采样时间的 m/z 124 峰值和 m/z 215 峰值均 有明显增加。由此可知,磺胺二甲嘧啶在土壤中降解 产生了 m/z 124和 m/z 215两种物质。采用 MS-MS模式对这两种降解产物的分子结构进行分析,结果与水溶液中磺胺二甲嘧啶降解产物的研究比较,得到这两种降解产物的裂解途径和分子结构(图2)<sup>[13-14]</sup>。说明磺胺二甲嘧啶输入稻田 47 d 和 61 d 后,均降解产生了2-氨基-4,6-二甲基嘧啶和4-[2-亚氨基-4,6-二甲基嘧啶-1(2H)-基]苯胺<sup>[15-16]</sup>。定量分析结果(图3)表明,磺胺二甲嘧啶含量随输入土壤时间的延长而逐渐降低,2-氨基-4,6-二甲基嘧啶和4-[2-亚氨基-4,6-二甲基嘧啶-1(2H)-基]苯胺含量则呈现先增后减趋

势,且2-氨基-4,6-二甲基嘧啶是磺胺二甲嘧啶的主 要降解产物。

农业环境科学学报 第39卷第8期

### 2.2 土壤微生物群落多样性

2.2.1 Alpha多样性

稀释曲线是采用随机抽样的方法,以抽取到的序列数和它们所代表的OTU数目来构建曲线,它可以 用来比较各样本间物种的丰富度,也可以用来说明样 本的测序数据量是否合理。由图4可知,当随机抽取 的序列数达到30000条时,稀释曲线增加趋势均趋于 平缓,并且样本覆盖度(Coverage)均在95%以上,说



图1 SMZ输入稻田后47 d和61 d的总离子流图







Figure 2 Mass spectra of the degradation products of m/z 124 and m/z 215 in TIC

明样品测序数据量足够大,能够有效反映样品中绝大 多数微生物物种的信息。

基于 OUT 聚类分析结果,对 OUT 进行 Alpha 多样 性分析。表1是各处理 Alpha 多样性指数,与同种肥 源对照相比,除 ADPD 处理 Shannon 和 ACE 指数有显 著差异(P<0.05)外,其他处理 OTU、Shannon 和 ACE 指数均差异不显著(P>0.05),表明无论基肥是猪粪还 是复合肥,2-氨基-4,6-二甲基嘧啶对土壤微生物群 落丰富度和多样性均有显著影响,而磺胺二甲嘧啶对 土壤微生物群落丰富度和多样性影响差异不显著。 2.2.2 细菌群落结构组成

图 5 是各处理在门水平上有显著差异变化的优势细菌(放线菌门、芽单胞菌门、厚壁菌门和硝化螺旋菌门)的平均相对丰度。磺胺二甲嘧啶输入稻田 47 d 后 M+SMZ 与 M 处理比较,芽单胞菌门相对丰度显著降低了 0.81%(P<0.05),表明该阶段 M+SMZ 处理对芽单胞菌门有显著抑制作用。F+SMZ 与 F 处理比较,放



线菌门、芽单胞菌门、厚壁菌门和硝化螺旋菌门相对 丰度变化均无显著差异(P>0.05)。磺胺二甲嘧啶输 入稻田 61 d后 M+SMZ与 M处理对比,放线菌门、芽单 胞菌门、厚壁菌门和硝化螺旋菌门相对丰度也均表现 出不同程度的增加,其中放线菌门和厚壁菌门显著增 加2.66%和0.71%(P<0.05),表明此时 M+SMZ处理对







图3 不同处理 SMZ、ADPD 和 AN 含量变化

Figure 3 Variation of SMZ, ADPD and AN content in different treatments

	表1 不同处理 Alpha 多样性指数	
Table 1	Alpha diversity index for different treatment	s

时间Time	处理Treatments	OTU	香农指数Shannon	ACE	覆盖度Coverage
47 d	М	4 648.00±465.28a	7.38±0.09ab	5 772.82±61.69a	0.96±0.01ab
	M+SMZ	$4\ 220.00\pm274.36{\rm ab}$	7.33±0.15ab	5 653.07±146.47a	$0.95 \pm 0.00 \mathrm{b}$
	F	4 767.50±355.67a	7.43±0.04ab	5 726.87±47.33a	0.97±0.01ab
	F+SMZ	4 491.50±314.66ab	7.47±0.03ab	5 632.99±252.04a	0.96±0.00ab
61 d	М	$4 328.00 \pm 240.42 ab$	$7.30 \pm 0.06 \mathrm{bc}$	5 455.53±117.18ab	0.96±0.00ab
	M+SMZ	4 737.00±248.90a	7.40±0.01ab	5 523.57±154.95ab	0.97±0.00a
	F	4 744.00±283.55a	7.50±0.02a	5 760.75±35.27a	0.96±0.01ab
	F+SMZ	4 651.00±329.51a	7.50±0.10ab	5 634.64±118.29a	0.97±0.01ab
培养48 h	М	4 025.00±137.18ab	7.07±0.05cd	5 175.30±41.31bc	0.96±0.00ab
	M+ADPD	4 727.00±76.37a	7.34±0.02ab	5 630.79±21.08a	0.96±0.00ab
	F	$3771.00\pm738.22b$	7.06±0.23d	4 889.13±411.59c	$0.95 \pm 0.01 \mathrm{b}$
	F+ADPD	4 385.50±139.30ab	7.34±0.06ab	5 431.01±225.23b	$0.95 \pm 0.00 \mathrm{b}$

注:同一列相同字母表示差异不显著(P>0.05)。

Note: The same letter in the same column indicates no significant difference (P>0.05).







Figure 5 Relative abundance of Actinobacteria, Gemmatimonadetes, Firmicutes and Nitrospirae of different treatments

放线菌门和厚壁菌门均有显著促进作用。F+SMZ与 F处理相比,4个菌门相对丰度则均呈现出下降的趋势,降幅为0.09%~1.95%,硝化螺旋菌门相对丰度降低达显著水平(P<0.05)。ADPD培养验证试验结果与磺胺二甲嘧啶输入稻田47d后的田间试验结果一致,也表明了ADPD与猪粪同步输入土壤后对芽单胞菌门有显著抑制作用(P<0.05)。

图 6 是各处理在属水平上有显著差异变化的优势细菌(Subgroup6\_norank、芽单胞菌属、热脱硫杆菌属和伯克氏菌属)的平均相对丰度。磺胺二甲嘧啶输入稻田47 d后 M+SMZ和M处理比较,Subgroup6\_norank菌属相对丰度显著增加 0.54%(P<0.05),芽单胞菌

属、热脱硫杆菌属和伯克氏菌属相对丰度均有所下降,其中芽单胞菌属显著降低0.70%(P<0.05),表明此时M+SMZ处理对Subgroup6\_norank菌属有显著促进作用,对芽单胞菌属起显著抑制作用。F+SMZ和F处理比较,芽单胞菌属和热脱硫杆菌属相对丰度增加0.13%和0.12%,Subgroup6\_norank和伯克氏菌属相对丰度则分别下降1.50%和0.04%,增加和降低均不显著(P>0.05)。磺胺二甲嘧啶输入稻田61d后M+SMZ与M处理相比,伯克氏菌属相对丰度极显著增加0.25%(P<0.01)。该时段F+SMZ与F处理相比,热脱硫杆菌属相对丰度显著降低0.43%(P<0.05),表明以猪粪或复合肥为基肥时,磺胺二甲嘧啶对土壤微生物菌属的



图 6 不同处理 Subgroup6\_norank、芽单胞菌属、热脱硫杆菌属和伯克氏菌属的相对丰度 Figure 6 Relative abundance of Subgroup6\_norank, Gemmatimonadaceae, Thermodesulfovibrionia and Burkholderiaceae of different treatments

中长期效应不同。此外, ADPD 培养验证试验结果也证实了 ADPD 与猪粪同步输入土壤后对 Subgroup6\_norank有显著促进作用(P<0.05), 与复合 肥同步输入土壤后与猪粪趋势一致, 但未达显著作用 水平(P>0.05)。

# 3 讨论

## 3.1 磺胺二甲嘧啶降解转化途径

磺胺类抗生素在氧化过程中,其分子结构中的磺 酰胺键容易发生断裂生成小分子化合物<sup>[17]</sup>。在本研 究中,磺胺二甲嘧啶磺酰胺键断裂产生了2-氨基-4, 6-二甲基嘧啶,且与标准样品进行比较得到了证实, 这与水中活性氧作用下磺胺二甲嘧啶的降解产物一 致,也与磺胺二甲嘧啶光解过程中的降解产物一 致<sup>[18-19]</sup>。磺胺二甲嘧啶在水中化学降解和光降解得 到的产物与土壤中生物降解的相同,说明磺胺二甲嘧 啶的非生物降解和生物降解遵循一定的规律<sup>[20]</sup>。在 本研究中,磺胺二甲嘧啶降解还产生了4-[2-亚氨 基-4,6-二甲基嘧啶-1(2H)-基]苯胺,这与Gao等<sup>[21]</sup> 在紫外光作用下过硫酸盐氧化磺胺二甲嘧啶的研究 结果一致。磺胺二甲嘧啶分子上的苯氨基能够转化 为苯氨基阳离子,苯胺基阳离子对位遭受分子间嘧啶 氮亲核作用而发生分子间重排,导致O—S—O脱除, 生成4-[2-亚氨基-4,6-二甲基嘧啶-1(2H)-基]苯 胺<sup>[22-24]</sup>。由于缺少4-[2-亚氨基-4,6-二甲基嘧啶-1 (2H)-基]苯胺标准样品,所以本试验未对其进行确切 验证和深入研究。磺胺二甲嘧啶另外一个重要的转 化途径是其苯胺部分逐步氧化,生成N<sup>4</sup>-OH-SMZ、4-

#### 农业环境科学学报 第39卷第8期

NO<sub>2</sub>-SMZ和N-(4,6-二甲基嘧啶-2-基)苯磺酰胺等 中间产物,这些中间产物可进一步降解,最终分解为 二氧化碳和水<sup>[14-15,25]</sup>。目前本研究只鉴定到了2-氨 基-4,6-二甲基嘧啶和4-[2-亚氨基-4,6-二甲基嘧 啶-1(2*H*)-基]苯胺两种降解产物,磺胺二甲嘧啶其 他降解产物还需进一步研究。

## 3.2 磺胺二甲嘧啶及其降解产物对土壤微生物的影响

磺胺类抗生素的化学结构类似于对氨基苯甲酸, 能与对氨基苯甲酸竞争二氢叶酸合成酶,阻断细菌中 二氢叶酸的合成,抑制以二氢叶酸为底物的四氢叶酸 的合成,进而影响细胞中嘌呤和嘧啶的合成,抑制细 菌的正常生长和繁殖<sup>[26]</sup>。表2是牛粪(CM)和53.60 mg·kg<sup>-1</sup>磺胺二甲嘧啶单一和复合添加至T([意大利] 图拉)和S([意大利]萨萨里)两种土壤中,短期培养7 d,期间土壤微生物多样性的变化结果[27]。由此可知 短期培养期间,磺胺二甲嘧啶对添加牛粪的T土壤处 理微生物活性和丰富度有促进作用,对未添加牛粪的 T土壤处理微生物活性和丰富度起先抑后促作用;在 S土壤中,磺胺二甲嘧啶对各处理微生物活性和丰富 度均有抑制作用。这与本文磺胺二甲嘧啶对土壤微 生物群落多样性和丰富度的中长期效应结果不一致。 究其原因,是在本研究中磺胺二甲嘧啶已经降低至较 低水平,此时2-氨基-4,6-二甲基嘧啶和4-[2-亚氨 基-4,6-二甲基嘧啶-1(2H)-基]苯胺等中间产物在 土壤中起主要作用,中间产物结构与母体不同,不具 备类似对氨基苯甲酸的化学结构,所以其对微生物的 生态毒性要比母体低。Zessel等<sup>[28]</sup>研究表明磺胺二甲 嘧啶光解过程中降解产物对细胞增殖的影响低于母 体。Garcla-Galán等<sup>[29]</sup>利用单细胞绿藻检测磺胺二 甲嘧啶及其降解产物的毒性,结果证明磺胺二甲嘧啶 的中间产物毒性均低于母体。因此,在本研究中磺胺 二甲嘧啶及其降解产物对土壤细菌群落影响要小于 初期磺胺二甲嘧啶对土壤微生物的影响。抗生素在 土壤中的长期残留还会诱导产生大量的抗生素耐药 微生物及抗性基因,进一步导致磺胺二甲嘧啶及其降 解产物对土壤细菌群落的影响无显著差异, Zhang 等闷研究表明四环素在土壤中长期积累能够促进四 环素抗性基因产生和传播,Xi等<sup>311</sup>研究表明水产养殖 场沉积泥中微生物群落对抗生素长期残留能够产生 适应性。

本研究中,放线菌门、厚壁菌门、硝化螺旋菌门(硝化细菌)、Subgroup6\_norank和伯克氏菌属均具有一定生物降解作用。Lan等<sup>[32]</sup>最新研究指出

Subgroup6\_norank 菌属能够将复杂的有机物发酵成为酸,Gu等<sup>[33]</sup>研究指出厚壁菌门中大部分细菌能够通过发酵作用将多种碳源降解转化为乳酸、丙酮、丁醇和乙醇等小分子物质,蒋悦秋等<sup>[34]</sup>对农药毒死蜱降解菌研究表明伯克氏菌属CD5和CD7菌株均能高效降解土壤中的毒死蜱,吴凡等<sup>[35]</sup>的研究表明硝化细菌能够有效促进土壤中碘普罗胺降解。这些具有降解作用的细菌相对丰度显著增加,说明土壤微生物的功能性发生变化,这与磺胺二甲嘧啶在土壤中的降解转化有着密切的联系。而芽单胞菌门能够将各种糖分子转化为维生素,热脱硫杆菌属在土壤中起反硫化作用,两者相对丰度显著降低的原因还有待进一步研究。

本研究中,2-氨基-4,6-二甲基嘧啶对土壤微生物群落丰富度和多样性均有显著影响,而磺胺二甲嘧啶对土壤微生物群落丰富度和多样性影响差异不显著。降解产物2-氨基-4,6-二甲基嘧啶反而比母体磺胺二甲嘧啶对土壤微生物结构与功能的影响更大,其原因有待进一步研究。在磺胺二甲嘧啶输入稻田47 d后,M+SMZ处理对芽单胞菌门有显著抑制作用,对Subgroup6\_norank菌属有显著促进作用,这与培养试验中ADPD、猪粪同步输入土壤后,对芽单胞菌门相对丰度有显著抑制作用和对Subgroup6\_norank菌属相对丰度有显著促进作用结果一致。此时磺胺二甲嘧啶基本已经降解为2-氨基-4,6-二甲基嘧啶和4-[2-亚氨基-4,6-二甲基嘧啶-1(2H)-基]苯胺等中间产物,其中2-氨基-4,6-二甲基嘧啶质谱信号最

### 表2 不同土壤牛粪和磺胺二甲嘧啶单一和复合处理培养7 d 期间土壤微生物活性和丰富度变化<sup>[27]</sup>

Table 2 Changes of soil microbial activity and richness during 7 d of single and combination treatment of cow manure and SMZ for different soils<sup>[27]</sup>

处理	微生物活性M	icrobial activity	丰富度Richness	
Treatments	1 d	7 d	1 d	7 d
Т	0.35b	0.19a	7.60a	5.00a
T+CM	0.24ab	0.68bc	7.00a	17.30b
T+CM+SMZ	0.25b	0.87c	7.00a	$20.60\mathrm{b}$
T+SMZ	0.16a	0.67b	6.60a	14.30b
S	1.39d	0.79a	25.60c	25.60b
S+CM	0.90c	1.24b	24.00c	27.00b
S+CM+SMZ	0.72b	1.20b	$19.00\mathrm{b}$	22.60a
S+SMZ	0.47a	0.70a	13.30a	20.30a

注:同一土壤处理同一列不同字母表示差异显著(P<0.05)。

Note: Different letters in the same column for the same soil indicate significant difference (P<0.05).

强,含量最高,且培养验证试验也进一步证实了2-氨 基-4,6-二甲基嘧啶在此阶段对土壤微生物起主要 影响作用。此外,M+SMZ处理中的放线菌门、厚壁菌 门和伯克氏菌属相对丰度变化趋势与M+ADPD处理 一致,F+SMZ处理中的放线菌门、硝化螺旋菌门、芽 单胞菌属和热脱硫杆菌属相对丰度变化趋势与F+ ADPD处理吻合,也说明了此时2-氨基-4,6-二甲基 嘧啶作为磺胺二甲嘧啶的主要降解产物在土壤中对 微生物起主要影响作用。而磺胺二甲嘧啶输入稻田 61 d后, M+SMZ处理对放线菌门和厚壁菌门有显著 促进作用,对伯克氏菌属有极显著促进作用,F+SMZ 处理对热脱硫杆菌属有显著抑制作用,各处理间其他 细菌相对丰度变化趋势也与ADPD处理不一致。可 能是因为2-氨基-4,6-二甲基嘧啶和4-[2-亚氨基-4,6-二甲基嘧啶-1(2H)-基]苯胺转化为其他降解产 物,其含量降低,新的降解产物在土壤中对微生物起 主要作用。Ana等[18]研究表明2-氨基-4,6-二甲基嘧 啶可以进一步羟基化为4,6-二甲基-2,5-二氢嘧啶-2,5-二醇。Fan 等<sup>[14]</sup>研究指出 4-[2-亚氨基-4,6-二 甲基嘧啶-1(2H)-基)]苯胺能继续氧化为亚硝基衍 生物和羟基化亚硝基衍生物。Dong 等[13]研究表明磺 胺二甲嘧啶中间降解产物会随时间变化而变化。土 壤中磺胺二甲嘧啶降解产物不同,其对土壤微生物的 生态毒性也不同。肖华花鸣研究发现磺胺二甲嘧啶 光解过程中母体与降解产物对明亮发光杆菌的毒性 随反应时间的变化而变化。魏子艳鸿研究发现抗生 素对土壤微生物的影响随染毒时间的延长而变化。 因此,磺胺二甲嘧啶降解产物的变化及其对微生物的 生态效应有待进一步研究。

本文试验结果还表明以猪粪和复合肥作基肥时, 磺胺二甲嘧啶对土壤微生物菌属的中长期效应不同。 这可能是由于粪肥的添加增加了土壤中有机质含量, 有机质中含有大量带负电荷的官能团,这些官能团能 够吸附带正电荷的兽用抗生素及其降解产物离子,或 通过氢键和富电子基团的亲核加成作用与兽用抗生 素及其降解产物结合,进而影响土壤中兽用抗生素及 其降解产物的生态毒性<sup>[37]</sup>。因此,需进一步探明不同 施肥处理对兽用抗生素及其降解产物的影响机制,为 降低其环境生态风险提供助力。

# 4 结论

无论基肥是猪粪还是复合肥,磺胺二甲嘧啶输入 土壤47 d和61 d后都降解产生了2-氨基-4,6-二甲 基嘧啶和4-[2-亚氨基-4,6-二甲基嘧啶-1(2H)-基] 苯胺,其中2-氨基-4,6-二甲基嘧啶为主要降解产 物。在本研究中,磺胺二甲嘧啶对土壤微生物群落多 样性和丰富度变化均无显著影响,但在微生物优势 群落组成上,磺胺二甲嘧啶与猪粪同步输入土壤47 d 后对芽单胞菌门和芽单胞菌属有显著抑制作用,对 Subgroup6\_norank菌属有显著促进作用,输入土壤61 d后对放线菌门和厚壁菌门有显著促进作用,就人土壤61 d后对放线菌门和厚壁菌门有显著促进作用,对伯克 氏菌属有极显著促进作用,而磺胺二甲嘧啶与复合肥 同步输入土壤仅在61 d后对热脱硫杆菌属有显著抑 制作用,原因在于该时段土壤中磺胺二甲嘧啶已降至 较低水平,2-氨基-4,6-二甲基嘧啶等中间产物起主 要作用。

#### 参考文献:

- [1] Sarmah A K, Meyer M T, Boxall A B. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics VAs in the environment[J]. *Chemosphere*, 2006, 65(5):725– 759.
- [2] Thiele B S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils: A review[J]. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 2003, 166:145–167.
- [3] Burkhardt M, Stoob K, Stamm C, et al. Veterinary antibiotics in animal slurries: A new environmental issue in grassland research[J]. Grassland Science in Europe, 2004, 9:322-324.
- [4] Ji X L, Shen Q H, Liu F, et al. Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai, China[J]. Journal of Hazardous Materials, 2012, 235:178–185.
- [5] 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.
- [6] Hammesfahr U, Heuer H, Manzke B, et al. Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2008, 40 (7) : 1583– 1591.
- [7] 刁晓平, 孙英健, 孙振钧, 等. 磺胺二甲基嘧啶对土壤微生物活动的 影响[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(4):694-697.
  DIAO Xiao-ping, SUN Ying-jian, SUN Zhen-jun, et al. Effects of sulfamethazine on microbial activity in different types of soil[J]. Journal of Agro-environmental Science, 2005, 24(4):694-697.
- [8] 张敏, 张俊, 钱金秋, 等. 磺胺二甲嘧啶对沼气发酵过程中酶活性和 微生物群落功能多样性的影响[J]. 生态与农村环境学报, 2017, 33 (7):653-659.

ZHANG Min, ZHANG Jun, QIAN Jin-qiu, et al. Effects of sulfadimidine on enzyme activity and microbial community functional diversity during biogas fermentation[J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2017, 33(7):653–659.

[9] 许静, 王娜, 孔德洋, 等. 磺胺类药物在土壤中的降解性[J]. 环境化 学, 2013, 32(12):2349-2356.

XU Jing, WANG Na, KONG De-yang, et al. Degradation of sulfa drugs

农业环境科学学报 第39卷第8期

in soil[J]. Environmental Chemistry, 2013, 32(12):2349-2356.

[10] 吴杰,李志琳,徐佳迎,等. 兽用抗生素磺胺二甲嘧啶对稻田 N<sub>2</sub>O 排放的影响及其微生物机制[J]. 环境科学, 2019, 40(6):2847-2857.

WU Jie, LI Zhi-ling, XU Jia-ying, et al. Effects of the veterinary antibiotic sulfadimidine on N<sub>2</sub>O emission in rice fields and its microbial mechanism[J]. *Environmental Science*, 2019, 40(6):2847–2857.

- [11] 李彦文, 莫测辉, 赵娜, 等. 高效液相色谱法测定水和土壤中磺胺 类抗生素[J]. 分析化学, 2008, 7(36):954-958.
  LI Yan-wen, MO Ce-hui, ZHAO Na, et al. Determination of sulfanilamide antibiotics in water and soil by high performance liquid chro-
- [12] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(D1):590-596.

matography[J]. Analytical Chemistry, 2008, 7(36):954-958.

- [13] Dong F L, Li C, He G L, et al. Kinetics and degradation pathway of sulfamethazine chlorination pilot-scale water distribution systems[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2017, 321:521-532.
- [14] Fan Y, Ji Y F, Kong D Y, et al. Kinetic and mechanistic investigations of the degradation of sulfamethazine in heat-activated persulfate oxidation process[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 300:39–47.
- [15] García-Galán M J, Rodríguez-Rodríguez C E, Vicent T, et al. Biodegradation of sulfamethazine by *Trametes versicolor*: Removal from sewage sludge and identification of intermediate products by UPLC-Qq-TOF-MS[J]. *Science of the Total Environment*, 2011, 409(24):5505-5512.
- [16] Sleman F, Mahmoud W M M, Schubert R, et al. Photodegradation, photocatalytic and aerobic biodegradation of sulfisomidine and identification of transformation products by LC-UV-MS/MS[J]. *Clean: Soil, Air, Water*, 2012, 40(11):1244-1249.
- [17] Zhang Y, Hu S H, Zhang H C, et al. Degradation kinetics and mechanism of sulfadiazine and sulfamethoxazole in an agricultural soil system with manure application[J]. Science of the Total Environment, 2017, 607/608:1348-1356.
- [18] Ana P S B, Flavio C C P, Antonio C S C T. The role of reactive oxygen species in sulfamethazine degradation using UV-based technologies and products identification[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology A*: *Chemistry*, 2014, 290(1):77–85.
- [19] 肖华花.磺胺二甲嘧啶在水环境中的光化学行为及光催化降解研究[D]. 广州:广东工业大学, 2015:47-48.
   XIAO Hua-hua. Photochemical behavior and photocatalytic degradation of sulfamethazine in water[D]. Guangzhou: Guangdong University of Technology, 2015:47-48.
- [20] Cao L J, Zhang J Y, Zhao R X, et al. Genomic characterization, kinetics, and pathways of sulfamethazine biodegradation by *Paenarthrobacter* sp. A01[J]. *Environment International*, doi:10.1016/j.envint. 2019. 104961.
- [21] Gao Y Q, Gao N Y, Deng Y, et al. Ultraviolet (UV) light-activated persulfate oxidation of sulfamethazine in water[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2012, 195:248–253.
- [22] Gao J, Hedman C, Liu C, et al. Transformation of sulfamethazine by manganese oxide in aqueous solution[J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(5):2642-2651.
- [23] Tentscher P R, Eustis S N, McNeil K, et al. Aqueous oxidation of sulfonamide antibiotics: Aromatic nucleophilic substitution of an aniline

radical cation[J]. Chemistry, 2013, 19(34):11216-11223.

- [24] Xie X F, Zhang Y Q, Huang W L, et al. Degradation kinetics and mechanism of aniline by heat-assisted persulfate oxidation[J]. *Jour*nal of Environmental Sciences, 2012, 24(5):821-826.
- [25] Sági G, Csay T, Szabó L, et al. Analytical approaches to the OH radical induced degradation of sulfonamide antibiotics in dilute aqueous solutions[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2015, 106:52-60.
- [26] Ola S. Sulfonamide resistance: Mechanisms and trends[J]. Drug Resistance Updates, 2000, 3(3):155-160.
- [27] Pinna M V, Castaldi P, Deiana P, et al. Sorption behavior of sulfamethazine on unamended and manure-amended soils and short-term impact on soil microbial community[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2012, 84:234-242.
- [28] Zessel K, Mohring S, Hamscher G, et al. Biocompatibility and antibacterial activity of photolytic products of sulfonamides[J]. *Chemosphere*, 2014, 100:167-174.
- [29] GarcÍa-Galán M J, Diaz-Cruz M S, Barcelo D. Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2008, 27 (11): 1008– 1022.
- [30] Zhang M Q, Yuan L, Li Z H, et al. Tetracycline exposure shifted microbial communities and enriched antibiotic resistance genes in the aerobic granular sludge[J]. *Environment International*, doi: 10.1016/ j.envint. 2019.06.012.
- [31] Xi X P, Wang M, Chen Y S, et al. Adaption of the microbial community to continuous exposures of multiple residual antibiotics in sediments from a salt-water aquacultural farm[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 290:96–105.
- [32] Lan H X, Yang D, Wang X Z, et al. Microbiological evaluation of nano-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> / GO enhanced the micro-aerobic activate sludge system for the treatment of mid-stage pulping effluent[J]. Applied Nanoscience, doi:10.1007/s13204-020-01314-0
- [33] Gu Y, Ding Y, Ren C, et al. Reconstruction of xylose utilization pathway and regulons in *Firmicutes*[J]. BMC Genomics, doi: 10.1186/ 1471-2164-11-255.
- [34] 蒋悦秋. 毒死蜱降解菌的分离, 鉴定以及联合植物促生菌对土壤的改良[D]. 上海:上海师范大学, 2015:7-20.
  Jiang Yue-qiu. The isolation and identification of chlorpyrifos degrading bacteria and its effect on soil amendment with PGPR[D]. Shanghai:Shanghai Normal University, 2015:7-20.
  [35] 吴凡,高品,薛罡,等. 硝化细菌对碘普罗胺的降解及作用机制[J].
- 环境工程学报, 2014, 6:2225-2230. WU Fan, GAO Pin, XUE Gang, et al. Biodegradation mechanism of iopromide by nitrobacteria[J]. *Journal of Environmental Engineering*, 2014, 6:2225-2230.
- [36] 魏子艳. 土霉素、恩诺沙星、磺胺二甲嘧啶与铜单一及复合污染对 土壤微生物的影响[D]. 泰安:山东农业大学, 2014:39-46.
  WEI Zi-yan. Single and Joint toxicity of oxytetracycline, enrofloxacin, sulfadimidine and Cu on soil microorganism[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2014:39-46.
- [37] Manuel C C, Gustavo F C, Avelino N D, et al. Competitive adsorption of tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline on soils with different pH value and organic matter content[J]. *Environmental Research*, doi:10.1016/j.envres. 2019.108669.