

## 手性三唑类杀菌剂氟环唑对土壤微生物的立体选择性影响

薛鹏飞, 刘潇威, 赵刘清, 贺泽英

### 引用本文:

薛鹏飞, 刘潇威, 赵刘清, 贺泽英. 手性三唑类杀菌剂氟环唑对土壤微生物的立体选择性影响[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(6): 1284-1295.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-1396>

## 您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

### 畜禽粪污抗生素对土壤生物学效应的Meta分析

曾悦, 黄红英, 吴华山

农业环境科学学报. 2021, 40(5): 1043-1050 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1044>

### 基于宏基因组方法分析养猪发酵床微生物组季节性变化

陈倩倩, 刘波, 王阶平, 朱育菁, 张海峰

农业环境科学学报. 2018, 37(6): 1240-1247 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-1330>

### 单壁碳纳米管对紫花苜蓿根际土壤中PAHs降解及微生物群落的影响

王慧敏, 陈莉荣, 任文杰, 郑春丽, 黄怡雯, 滕应, 张铁军

农业环境科学学报. 2021, 40(12): 2647-2659 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0332>

### 苯并芘[a]不同污染方式对黄褐土微生物区系的影响

葛高飞, 张鸣帅, 姚时, 咎萱, 张芳

农业环境科学学报. 2018, 37(5): 941-947 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-1176>

### 四种生物炭对潮土土壤微生物群落结构的影响

陈义轩, 宋婷婷, 方明, 于志国, 李洁, 赖欣, 张贵龙

农业环境科学学报. 2019, 38(2): 394-404 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0966>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

薛鹏飞, 刘潇威, 赵刘清, 等. 手性三唑类杀菌剂氟环唑对土壤微生物的立体选择性影响[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(6): 1284–1295.

XUE P F, LIU X W, ZHAO L Q, et al. Stereoselective effects of the chiral triazole fungicide epoxiconazole on soil microbes[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2022, 41(6): 1284–1295.



开放科学 OSID

# 手性三唑类杀菌剂氟环唑对土壤微生物的立体选择性影响

薛鹏飞<sup>1,2</sup>, 刘潇威<sup>1,2</sup>, 赵刘清<sup>1,2</sup>, 贺泽英<sup>1,2\*</sup>

(1. 农业农村部农产品质量安全环境因子控制重点实验室, 天津 300191; 2. 农业农村部环境保护科研监测所, 天津 300191)

**摘要:** 为了研究土壤微生物对手性三唑类杀菌剂氟环唑的立体选择性响应, 通过非靶向代谢组学和高通量测序联合技术探究了土壤代谢组和微生物群落对氟环唑外消旋体及对映体的响应机制。结果表明: 氟环唑及其对映体处理4周后, 土壤中氟环唑降解不显著, 其残留能够引起土壤代谢组和土壤微生物群落组成的显著变化。土壤代谢组、细菌和真菌群落组成、PICRUSt基因功能预测的代谢途径均表现出由2R, 3S-(+)-氟环唑驱动的立体选择性响应。PICRUSt基因预测表明, 细菌中被显著影响的MetaCyc通路有10条, 真菌中比对出22条。氟环唑外消旋体和(+)-对映体比(-)-对映体表现出对土壤微生物更显著的干扰作用( $P < 0.05$ )。氟环唑暴露引起了土壤环境中细菌和真菌群落、代谢、基因功能预测通路不同程度的立体选择性响应。鉴于土壤环境在农业生产中的重要性, 土壤微生物组和代谢组的表征可以为暴露于手性三唑类农药顺式氟环唑及其对映体所带来的生态风险提供新的见解。

**关键词:** 非靶向代谢组学; 高通量测序; 立体选择性; 细菌; 真菌; 土壤代谢组; 系统发育树; PICRUSt; 杀菌剂

中图分类号: X592; X172 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2022)06-1284-12 doi:10.11654/jaes.2021-1396

## Stereoselective effects of the chiral triazole fungicide epoxiconazole on soil microbes

XUE Pengfei<sup>1,2</sup>, LIU Xiaowei<sup>1,2</sup>, ZHAO Liuqing<sup>1,2</sup>, HE Zeying<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory for Environmental Factors Control of Agro-product Quality Safety, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Tianjin 300191, China; 2. Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Tianjin 300191, China)

**Abstract:** This study aimed to explore the response mechanism of the soil metabolome and microbial communities to epoxiconazole racemates and their enantiomers based on the stereoselective response of soil microorganisms to the chiral triazole fungicide epoxiconazole, using a combination of non-targeted metabolomics and high-throughput sequencing. No significant degradation of epoxiconazole and its enantiomers in the soil was observed after 4 weeks of treatment. This residue could cause significant changes in the soil metabolome and soil microbial community composition. The soil metabolome, bacterial and fungal community composition, and metabolic pathways predicted by the PICRUSt gene showed stereoselective responses driven by 2R, 3S-(+)-epoxiconazole. The MetaCyc pathways of the significant responses of 10 and 22 strips were observed in bacteria and fungi, respectively, as shown by the results of PICRUSt gene prediction. The interference in soil microorganisms by ( $\pm$ )-epoxiconazole and (+)-enantiomers was more significant than by (-)-enantiomers. The bacterial and fungal communities, metabolism profile, and prediction pathways of gene function in the soil environment showed varying degrees of stereoselective response to *cis*-epoxiconazole. Given the importance of the soil environment in agricultural production, characterization of the soil microbiome and metabolome can provide new insights into the ecological risks posed by exposure to the chiral triazole pesticide *cis*-epoxiconazole and its enantiomers.

**Keywords:** non-targeted metabolomics; high-throughput sequencing; stereoselectivity; bacteria; fungi; soil metabolome; phylogenetic tree; PICRUSt; fungicide

收稿日期: 2021-12-01 录用日期: 2022-01-28

作者简介: 薛鹏飞(1993—), 男, 陕西延安人, 硕士研究生, 从事农药的环境风险评估。E-mail: 13669297967@163.com

\*通信作者: 贺泽英 E-mail: hezeying222308@163.com

基金项目: 中央级科研院所基本科研业务费专项(2021-jbkyywf-hzy)

Project supported: Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund(2021-jbkyywf-hzy)

氟环唑是世界范围内最畅销的三唑类杀菌剂之一,用于预防和治疗水果、蔬菜、茶和谷物中的各种真菌病害<sup>[1-2]</sup>。其作用机理是阻碍病原菌中铁卟啉铁氧络合物的形成,进而强烈地抑制麦角甾醇的生物合成,从而达到抑制病原菌细胞膜合成的目的<sup>[3]</sup>。氟环唑分子具有2个手性中心,4种立体异构体,其商业化产品顺式-氟环唑外消旋体含有一对具有2R,3S-(+)-和2S,3R-(-)-构型的对映体<sup>[4]</sup>(图1)。在提高农作物产量的同时,未被有效利用的氟环唑会进入土壤和水体,且其降解非常缓慢,降解半衰期根据不同的环境类型、特性和条件从几周到2 a以上不等<sup>[5-7]</sup>。有关氟环唑在土壤中的持久性残留对土壤微生物的影响报道较少,其不同对映体对土壤环境的潜在威胁值得关注。

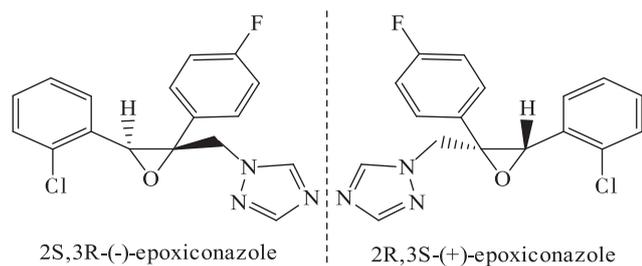


图1 顺式-氟环唑不同对映体结构式

Figure 1 The structure of different enantiomers of *cis*-epiconazole

土壤微生物在维持土壤质量和作物产量方面有着至关重要的作用。然而,农药残留可能会对土壤微生物生物量和活性,以及非靶标微生物的生物多样性产生负面影响<sup>[8]</sup>。近年来,已有三唑类杀菌剂对土壤细菌和非靶标真菌影响的研究报道。四氟醚唑的施用可显著改变苹果园土壤的微生物群落结构<sup>[9]</sup>。戊唑醇显著降低了研究结束时土壤中氨氧化细菌和古细菌的相对丰度,而对硫化细菌表现出试验期间持续减少的趋势<sup>[10]</sup>。对于丙环唑,土壤微生物生长和土壤酶活性表现出浓度依赖性反应,即低浓度的丙环唑促进土壤微生物的生长,而高浓度的丙环唑抑制微生物生长<sup>[11]</sup>。以上研究都是针对农药外消旋体,而对于包括三唑类杀菌剂在内的手性农药,其生物活性、吸附、转移降解、对非靶标生物的毒性等均存在较强的对映体选择性<sup>[12-14]</sup>。对于氟环唑,其(+)-对映体比(-)-对映体在土壤中的降解半衰期更长,生物活性更高,环境毒性(对大型蚤)也更高<sup>[7]</sup>。同时,在蔬菜-土壤-蚯蚓系统中氟环唑存在较显著的立体选择性富集和降解<sup>[4]</sup>。三唑类杀菌剂对非靶标生物存在潜

在的影响,然而土壤微生物对氟环唑的对映体选择性响应尚未见报道。

目前基于高分辨质谱的代谢组学技术和基于高通量测序的微生物组学技术得到了广泛的应用,已成为评估污染物对土壤微生物影响的有效技术手段。为了探究氟环唑及其不同对映体暴露下土壤微生物群落组成和代谢的立体选择性响应,本研究基于非靶向代谢组学和微生物组学两大组学联合技术,通过土壤代谢组、系统发育树重建与PICRUSt基因功能预测来研究土壤微生物的立体选择性响应机制,为手性农药环境残留风险评估提供有力的理论支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器、试剂与材料

氟环唑含量分析使用超高效液相色谱三重四极杆质谱仪,Waters UHPLC系统串联QTRAP 4500(美国Sciex公司);非靶向代谢组学分析采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱仪(QTOF 6600,美国Sciex公司)。其他仪器包括自动管磨机(IKA,德国),涡旋振荡仪(Thermo,美国),高速离心机(Heal Force,中国香港)。

氟环唑[(±)-,纯度99.9%]、2S,3R-氟环唑[(-)-,对映体纯度>98%]和2R,3S-氟环唑[(+)-,对映体纯度>98%]购自上海勤路生物技术有限公司(中国上海)。HPLC级的丙酮、甲醇、乙腈和乙酸乙酯购自Merck(德国)。甲酸和醋酸铵购自Sigma Aldrich(德国)。无水MgSO<sub>4</sub>、分散固相萃取吸附剂C18和PSA购自Agilent公司(美国)。水由Milli-Q系统制备。

### 1.2 实验设计

农田表层土壤(5~20 cm)取自天津市(117°27'E, 38°90'N),土壤至少5 a未施用氟环唑。土壤在室温下风干,过2 mm筛。供试土壤为壤土(黏粒18.43%、沙粒50.04%、粉粒31.01%),pH值为7.81,总有机碳(TOC)、总氮、总磷含量分别为19 970、140.1 mg·kg<sup>-1</sup>和445 mg·kg<sup>-1</sup>。实验设计对照(CK)和(±)-、(-)-、(+)-氟环唑染毒共4个处理组,每组6个重复。染毒采用分步添加法,以确保染毒均匀。首先,在连续搅拌下将1 mL氟环唑丙酮溶液标品(2 mg·mL<sup>-1</sup>)缓慢加入到20 g土壤中,将初步染毒的土壤置于通风橱中过夜以挥发溶剂。然后加入80 g空白土壤彻底混合,最终氟环唑添加水平为20 mg·kg<sup>-1</sup>。最后,加水使土壤水分含量为18%。对照土壤使用等量的丙酮溶液,其他步骤相同。将土壤在20℃下避光培养4周,然后对

氟环唑含量、土壤性质、土壤微生物组成和土壤代谢物进行取样测定。将所有土壤分为4份:两份在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存用于测定土壤微生物组成和土壤代谢物,第三份在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存用于测定氟环唑含量,最后一份干燥后用于测定土壤性质。

### 1.3 氟环唑含量测定

氟环唑及其对映体的提取采用改进的 QuEChERS 法。称取 5 g 土壤至 50 mL 塑料离心管中,加入 5 mL 去离子水使样品水化 30 min。加入 20 mL 乙腈和一个陶瓷均质子,涡旋萃取 3 min。提取后,加入 5 g NaCl,将离心管剧烈振荡数次, $5\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min。取上清液 6 mL 转移至装有分散固相萃取吸附剂 (900 mg  $\text{MgSO}_4$ 、150 mg C18 和 150 mg PSA) 的 15 mL 离心管中,涡旋 1 min,取上清液通过 PTFE 微孔滤膜 ( $0.22\ \mu\text{m}$ ) 装入进样小瓶,用于 UPLC-MS/MS 分析。

氟环唑及其对映体分离使用 Lux 3u Cellulose-1 手性色谱柱 ( $150\ \text{mm}\times 2.0\ \text{mm}$ ,  $3\ \mu\text{m}$ , Phenomenex, 美国)。仪器参数为:离子喷雾电压 (ISVF)  $5\ 500\ \text{V}$ ; 温度  $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 雾化气 (GS1)  $3.45\times 10^5\ \text{Pa}$ ; 加热气 (GS2)  $3.45\times 10^5\ \text{Pa}$ ; 气帘气 (CUR)  $2.07\times 10^5\ \text{Pa}$ ; 碰撞气 (CAD) 中等。多反应监测 (MRM) 离子对以及相应参数见表 1。

液相条件:柱温  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 流速  $0.45\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 进样体积  $2\ \mu\text{L}$ 。流动相 A 为水相,含有  $2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  醋酸铵,流动相 B 为乙腈。梯度洗脱程序为:  $0\sim 2\ \text{min}$ , 50% B;  $2\sim 3.2\ \text{min}$ , 梯度增加至 65% B;  $3.2\sim 4.6\ \text{min}$ , 保持 65% B;  $4.6\sim 6\ \text{min}$ , 梯度下降至 50% B;  $6\sim 8\ \text{min}$ , 保留 50% B。

### 1.4 非靶向土壤代谢组学

土壤代谢物的提取参照先前的研究<sup>[15]</sup>并进行了一些修改。取液氮研磨土壤样品 2 g 于塑料离心管中,加入 2 mL 提取溶剂 (甲醇: $\text{H}_2\text{O}=3:1$ , V/V) 和 1 mL 乙酸乙酯。将离心管涡旋 3 min,然后超声 (冰浴) 提取 5 min。样品离心 ( $7\ 012\ g$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 15 min,将上清液转移至新管中,以上提取过程重复 3 次,将所有上清液混合后在  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴中氮气吹干,残渣再溶解于 0.5 mL 萃取溶剂中,通过 PTFE 微孔滤膜 ( $0.22\ \mu\text{m}$ ) 进行代谢组学分析。

质量控制 (QC) 样品通过混合所有样品制备,以进行数据采集过程中的质量控制。每 5 个实际样品进行一针 QC 样品采集,分别进行正负源分析。高分辨筛选和定性分析在 UPLC-QTOF-MS (Triple TOF 6600, SCIEX) 中进行,使用 Exion LC UPLC 系统配备 HSS T3 ( $2.1\ \text{mm}\times 100\ \text{mm}$ ,  $1.8\ \mu\text{m}$ ,  $100\ \text{\AA}$ , Waters, 美国) 色谱柱对样品进行色谱分离。柱温设置为  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,流速为  $0.3\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,进样量  $2\ \mu\text{L}$ 。流动相 A 为水相,含  $5\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  甲酸铵和 0.1% 的甲酸,流动相 B 为甲醇。梯度洗脱程序为:  $0\sim 1.5\ \text{min}$ , 3% B;  $1.5\sim 11\ \text{min}$ , 增加到 80% B;  $11\sim 14\ \text{min}$ , 增加到 97% B;  $14\sim 18\ \text{min}$ , 保持 97% B;  $18\sim 18.1\ \text{min}$ , 降低至 3% B;  $18.1\sim 21\ \text{min}$ , 保持 3% B。

质谱采集分别在 ESI+ 和 ESI- 电离模式下进行。电喷雾电离 (ESI) 源参数为:离子喷雾电压 (ISVF) 正离子模式  $5\ 500\ \text{V}$ , 负离子模式  $-4\ 500\ \text{V}$ ; 离子源温度  $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; 雾化气 (GS1)  $3.79\times 10^5\ \text{Pa}$ ; 加热气 (GS2)  $3.79\times 10^5\ \text{Pa}$ ; 气帘气 (CUR)  $2.41\times 10^5\ \text{Pa}$ 。采用 TOF-MS ( $70\sim 1\ 000\ m/z$ )-IDA-MS/MS ( $50\sim 1\ 000\ m/z$ ) 模式在单次运行中同时获得高分辨一级和二级全扫图。在全扫描 TOF-MS 实验中,去簇电压 (DP) 为  $60\ \text{V}$ ,碰撞能 (CE) 为  $10\ \text{eV}$ 。IDA-MS/MS 标准:采集响应超过 100 cps 的离子;CE 和碰撞能量扩散 (CES) 分别设置为  $35\ \text{eV}$  和  $15\ \text{eV}$ 。

### 1.5 高通量微生物测序

#### 1.5.1 细菌

使用 E.Z.N.A.™ Soil DNA Kit (Omega Bio-tek, Doraville, 美国) 提取总基因组 DNA,并储存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  待进一步分析。DNA 浓度和纯度使用 NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, 美国) 测定。使用 1% 琼脂糖凝胶通过电泳评估 DNA 提取的质量。使用 V3~V4 可变区引物进行 PCR 扩增,引物为: 341F ( $5' - \text{CCTAYGGGRBGCASCAG}-3'$ ) 和 806R ( $5' - \text{GGACTACHVGGGTWCTAAT}-3'$ )。PCR 扩增子用 Agen-court AMPure Beads (Beckman Coulter, 美国) 纯化,并使用 PicoGreen dsDNA 检测试剂盒 (Invitrogen, 美国) 进行定量。在单独的定量步骤之后,将等量的扩增子合并,并使用 Illumina MiSeq 平台和 MiSeq Reagent

表 1 氟环唑的质谱法参数

Table 1 Mass spectrometric method parameters of epoxiconazole

分析物 Analyte	母离子 Precursor ion ( $m/z$ )	子离子 Product ion ( $m/z$ )	驻留时间 Dwell time/ms	去簇电压 DP/V	入口电压 EP/V	碰撞电压 CE/V	出口电压 CXP/V
氟环唑 1	330	121	50	76	10	27	4
氟环唑 2	330	101	50	76	10	63	4

Kit v3 进行双端 2×300 bp 测序。

### 1.5.2 真菌

使用 NucleoSpin® Soil 试剂盒 (Macherey-Nagel) 提取总 DNA, 并通过分光光度法 (novaseq 6000 PE250, Thermo Scientific) 计算 DNA 浓度。使用引物基因 ITS3~2024F (5'-GCATCGATGAACGCAGC-3') 和 ITS4~2409R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 进行内部转录间隔区 (ITS2) 的 PCR 扩增。扩增子用 Agencourt AMPure XP 试剂盒 (Beckman Coulter, 美国) 清洗, 用 Qubit dsDNA HS 检测试剂盒 (Life Technologies) 定量, 等量合并后使用 EZNA Cycle Pure 试剂盒 (Omega Bio-泰克) 进行测序。

### 1.6 多元统计分析

代谢组学原始数据使用 SCIEX OS (SCIEX, 美国) 软件处理分析, 并获取质谱峰面积。使用 MetaboAnalyst 5.0 (<http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/>) 对代谢组学数据进行多变量统计分析, 经标准化的数据进行单因子方差和热图分析。

扩增子序列变体 (ASV) 根据原始序列信息 (FASTQ 格式) 使用 QIIME2 推荐的 DADA2 方法进行质量控制、去噪和去除嵌合体后得到。一个操作分类单元 (OUT) 使用 RDP 分类器进行注释和分类, 以获得不同分类级别的编号。使用 Kruskal-Wallis 和 DESeq2 方法对组间和样品间丰度进行差异分析, 使用 Benjamini-Hochberg 方法调整 *P* 值。由 R 语言 ggtree 包绘制物种系统进化树, 选取丰度最高的前 50 个属。利用 PICRUSt2 对 16S rRNA 基因数据功能预测, 并结合 MetaCyc (<https://metacyc.org/>) 数据库进行代谢通路比对。经注释后的通路利用 ANOVA 和 Duncan 检验进行差异分析。其他不同分组间差异检验用 SPSS 23.0 完成。

## 2 结果与讨论

### 2.1 氟环唑的立体选择性降解

由表 2 可知, 土壤培育 4 周后未观察到氟环唑外消旋体及对映体的显著降解。实验结束时 (+)-、

(-)- 和 (±)- 氟环唑的含量分别为 (19.62±0.66) mg·kg<sup>-1</sup>、(18.63±1.43) mg·kg<sup>-1</sup> 和 (17.87±0.08) mg·kg<sup>-1</sup>, 与原始含量无显著差异 (*t* 检验)。此外, 通过氟环唑的 EF (对映体分数) 值, 未观察到显著的对映体选择性。

三唑类杀菌剂在土壤中的高持久性增加了其环境风险性<sup>[5]</sup>。与氟环唑类似, 其他三唑类杀菌剂在土壤中的降解半衰期也很长, 如腈菌唑的半衰期为 74~177 d、戊唑醇的半衰期为 86~247 d、四氟醚唑的半衰期为 69~87 d、苯醚甲环唑的半衰期为 169~239 d、烯唑醇的半衰期为 141~210 d<sup>[16-19]</sup>。由于不同对映异构体的高持久性和不同环境行为, 氟环唑对土壤微生物的对映体选择性影响值得进一步探究。

图 2A 显示了不同处理组在门水平上的相对分布情况。相对丰度排在前 20 的细菌物种中, 变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes)、放线菌门 (Actinobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、酸杆菌门 (Acidobacteria) 等是氟环唑暴露下土壤中的主要细菌。与 CK 相比, 变形菌门、酸杆菌门、绿弯菌门、芽单胞菌门等的相对丰度由于氟环唑及其对映体暴露而表现出明显的视觉差异。对于真菌, ITS2 基因测序揭示了真菌对氟环唑及其对映体的响应, 不同处理组在门水平上的相对分布情况如图 2B 所示。在相对丰度排名前 20 的真菌物种中, 子囊菌门 (Ascomycota)、壶菌门 (Chytridiomycota)、担子菌门 (Basidiomycota)、被孢霉门 (Mortierellomycota)、Aphelidiomycota 门、罗兹菌门 (Rozellomycota) 等是氟环唑暴露下土壤中的主要真菌。与 CK 相比, 氟环唑外消旋体和对映体暴露引起了土壤中子囊菌门、壶菌门、担子菌门等在视觉上的明显丰度差异。同时, 变形菌门、酸杆菌门、芽单胞菌门、放线菌门、子囊菌门、壶菌门、担子菌门等也是低灌木蓝莓土壤在丙硫菌唑等杀菌剂暴露下的主要菌群<sup>[20]</sup>, 其会因多效唑的处理而发生明显变化<sup>[21]</sup>。

氟环唑不同对映体暴露引起了部分细菌和真菌

表 2 土壤基本性质和氟环唑含量  
Table 2 Basic soil properties and epoxiconazole content

处理 Treatment	氟环唑含量 Epoxiconazole content/(mg·kg <sup>-1</sup> )	pH	土壤有机质 SOM/(g·kg <sup>-1</sup> )	总氮 TN/(mg·kg <sup>-1</sup> )	总磷 TP/(mg·kg <sup>-1</sup> )
CK	nd	7.95±0.08	19.97±0.19	140.10±0.80	445.0±12.5
(-)-	18.63±1.43	8.11±0.02	20.20±0.23	170.08±0.24	422.5±10.0
(+)-	19.62±0.66	8.11±0.07	18.67±0.70	160.42±0.14	515.0±42.5
(±)-	17.87±0.08	8.16±0.01	17.73±0.32	150.07±0.01	435.0±5.0

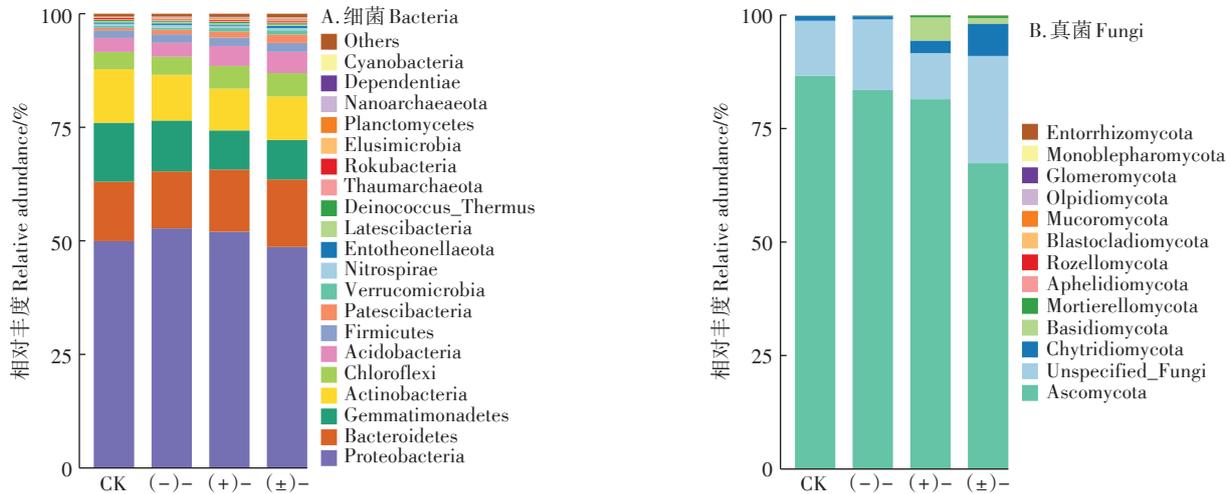


图2 不同处理组对土壤门水平群落结构组成的影响

Figure 2 Effects of different treatments on community structure at phylum level

的相对丰度变化。研究表明,三唑类杀菌剂会引起土壤微生物的应激反应。多效唑可改变土壤细菌和真菌的群落组成,如绿弯菌门和壶菌门的相对丰度先增加后降低,酸杆菌门的相对丰度先降低后增加<sup>[21]</sup>。苯醚甲环唑暴露引起了土壤细菌群落多样性的下降,同时能显著影响土壤中的细菌群落结构并表现出浓度依赖性<sup>[22]</sup>。不同对映体引起的微生物群落变化不同,即土壤微生物群落对氟环唑表现出立体选择性。

### 2.2 不同对映体暴露对土壤代谢组的影响

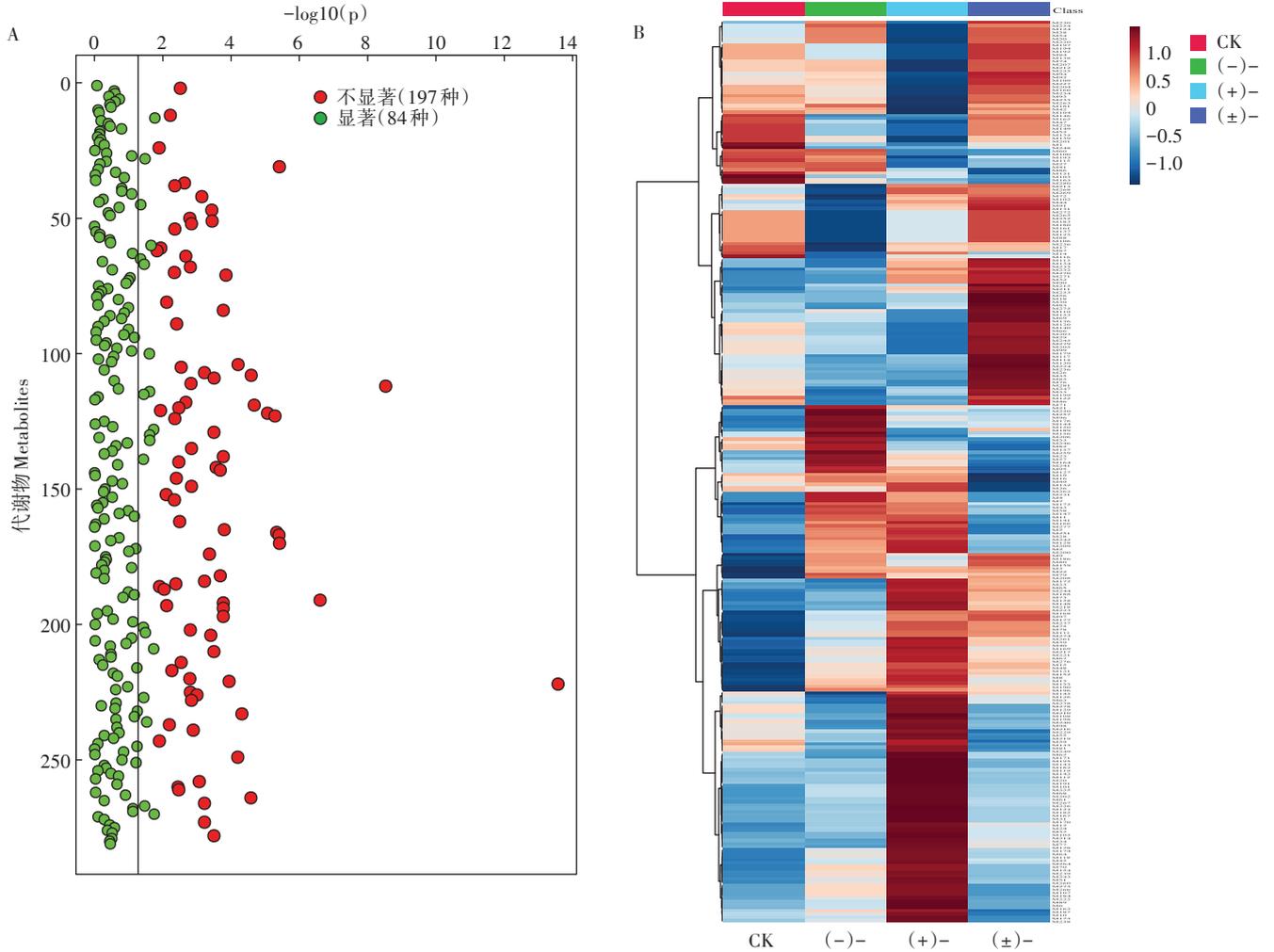
在不同对映体环境中,生物体的代谢物组成差异在分子水平上显示出对手性化合物的立体选择性代谢响应<sup>[23-24]</sup>。土壤中的氟环唑可直接或间接与土壤微生物相互作用,进而影响土壤微生物群落的代谢。土壤有机质(SOM)由溶解的细胞、植物和微生物释放的小分子代谢物组成<sup>[25-26]</sup>。土壤微生物分泌的细胞内和细胞外代谢物构成了SOM的代谢物库,因此监测土壤代谢物可以间接反映微生物代谢趋向的变化。通过使用基于LC-QTOF-MS的非靶向代谢组学,共筛查出281种代谢物。根据单因子方差分析获取差异代谢物,相比于CK,共得到84种显著差异代谢物( $P < 0.05$ ),表明氟环唑及其对映体暴露引起了土壤代谢组的显著改变(图3A)。图3B为基于VIP分值的PLS-DA区分的代谢物热图,不同处理组热图聚类表现出明显差异。(+)处理引起了部分代谢物的显著上调或下调,(-)处理引起的变化较(+)-弱,同时(±)-也引起了不同程度的代谢物改变。不同对映体表现出的聚类差异反映出由(+)-驱动的立体选择性代谢响应。土壤代谢组的改变可能部分归因于微生物被动释放的细胞外化合物,以及基于SOM中的代

谢物循环,氟环唑的暴露引起了土壤微生物群落组成和碳循环方式的改变<sup>[27]</sup>。

### 2.3 不同对映体暴露的系统发育重建

#### 2.3.1 细菌

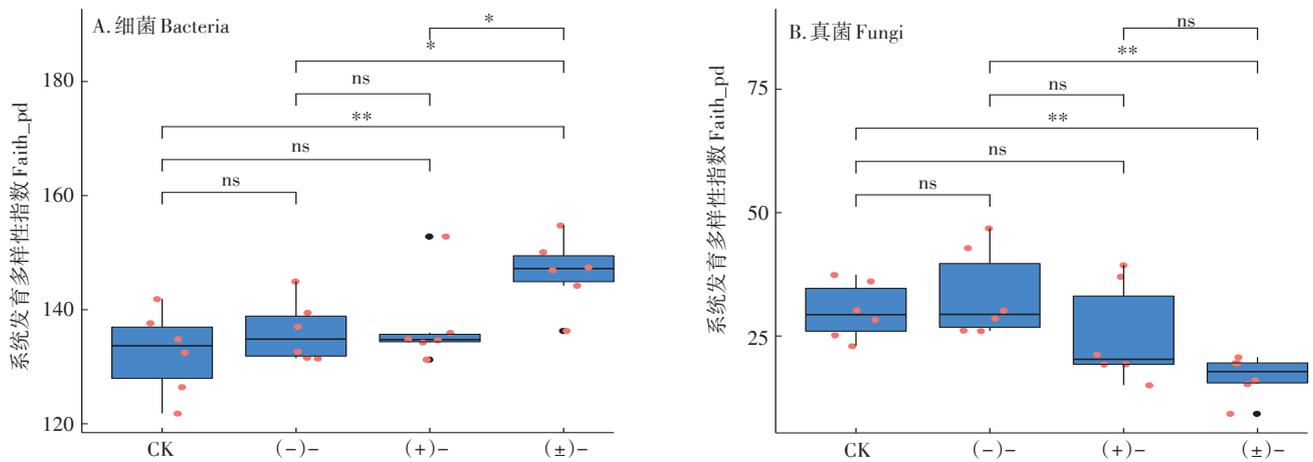
图4A为不同处理组细菌系统发育多样性指数(Faith\_pd)。经Wilcoxon检验,相比于CK、(-)-、(+)-、(±)-暴露的细菌系统发育多样性指数显著增加( $P < 0.05$ ),而其他组间两两比较的细菌系统发育多样性指数变化不显著( $P > 0.05$ )。如图5所示,细菌的系统发育进化树及组间丰度分布热图结果显示了不同处理的细菌相对丰度差异。其中,结肠杆菌(*Meridianimaribacter*)、绣色土生单胞菌(*Terrimonas*)、绿藻(*Chryseolinea*)具有最长的分支进化长度,结肠杆菌与*Salinimicrobium*属可能同源。相比于CK处理组,硝化螺旋菌属(*Nitrospira*)、费氏弧菌(*Echinicola*)、罗氏菌属(*Roseovarius*)、噬甲基菌属(*Methylophaga*)等在(-)-处理土壤中相对丰度明显增加;食草酸嗜氨菌(*Ammoniphilus*)、庞氏杆菌(*Pontibacter*)、甲基营养型菌(*Methylotenera*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas*)等在(+)-处理土壤中相对丰度明显增加;而(±)-暴露土壤中的布鲁氏菌(*Blastocatella*)、绣色土生单胞菌、*Bowmanella*属等相对丰度明显增加。相比于CK处理,氟环唑外消旋体及对映体暴露显著降低了链霉菌属(*Streptomyces*)、甲基黄杆菌(*Methyloceanibacter*)、罗尔斯通氏菌属(*Ralstonia*)、固氮弧菌属(*Azoarcus*)等的相对丰度。不同处理组的细菌系统进化物种组成明显不同,表明土壤细菌功能基因对氟环唑的立体选择性具有差异。这些被影响的细菌在门水平上主要为酸杆菌门、拟杆菌门、放线菌门等,这与陈丽君等<sup>[21]</sup>的



横坐标 $-\log_{10}(p)$ 用来度量代谢物的显著性变化  
The  $-\log_{10}(p)$  of abscissa is used to measure the significant changes of metabolites

图3 单因素方差分析和基于VIP值的热图分析

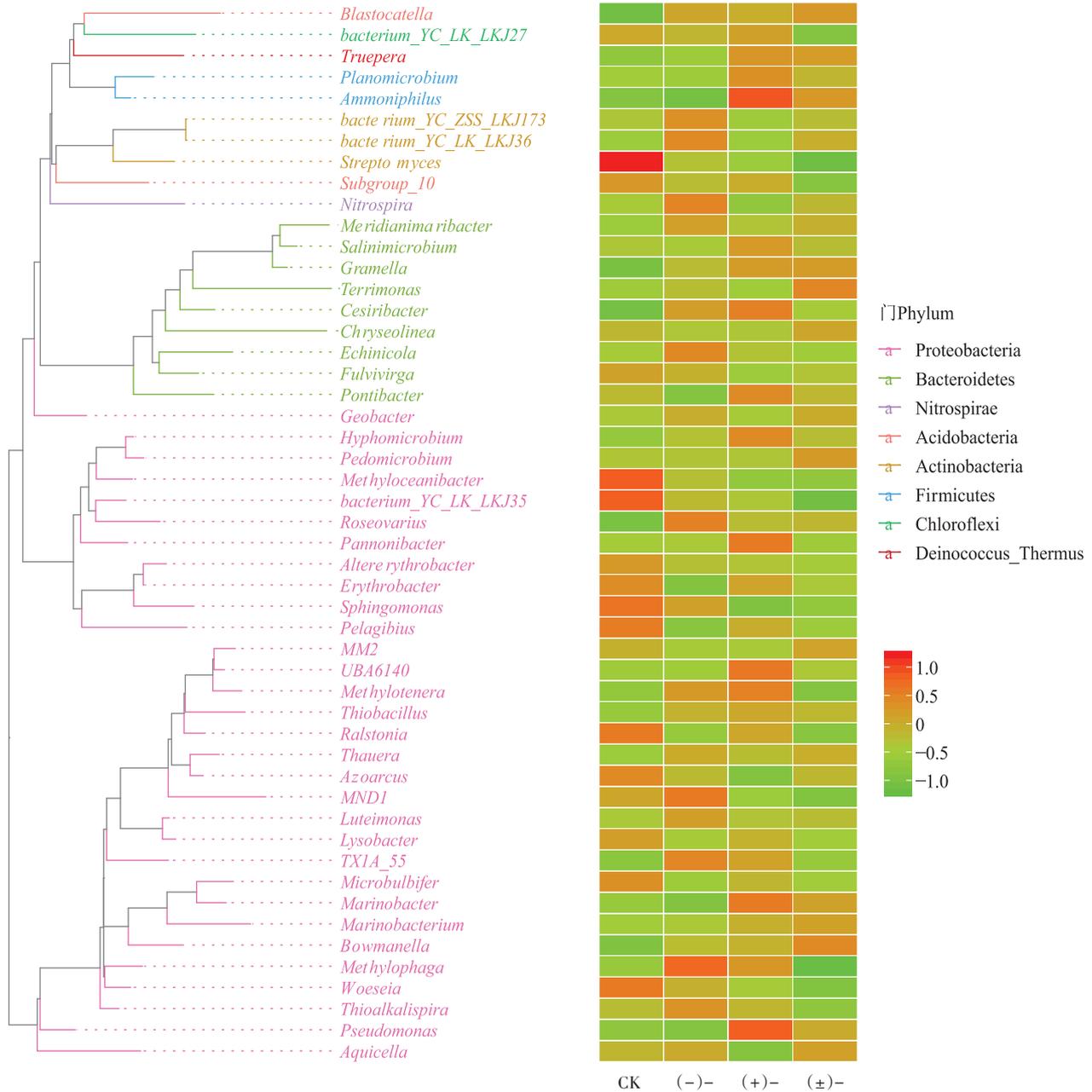
Figure 3 One-way ANOVA analysis and heatmap of the metabolites based on VIP values



组间多重比较, Wilcox\_Test, ns代表无显著差异, \*, \*\*, \*\*\*分别表示  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$   
Multiple comparisons between groups, Wilcox\_Test, ns indicates no significant difference, \*, \*\*, \*\*\* indicates significant difference ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), respectively

图4 Faith\_pd 指数的箱型图

Figure 4 Box plot of Faith\_pd index



不同的门用不同的颜色表示,对应 OTU 所属的属分类,右侧是标准化后的丰度热图,颜色梯度编码(-1.0~1.0)。下同  
Different phylum are represented by different colors, corresponding to the genus classification to which the OTU belongs. On the side is the normalized abundance heatmap, color gradient coding(-1.0~1.0). The same below

图5 系统发育进化树及组间丰度分布热图(细菌)

Figure 5 Phylogenetic tree and heatmap of abundance distribution between groups(bacteria)

研究结果相同。杀菌剂和杀真菌剂可抑制大多数微生物生长,但它们对呼吸和氮循环有混合影响,其中戊唑醇表现出较强的负面作用<sup>[28]</sup>。这可能与显著改变的细菌,如与氮循环有关的硝化螺旋菌属、食草酸嗜氨菌、固氮弧菌属等通过呼吸和氮循环来减弱氧化胁迫过程有直接联系<sup>[29-31]</sup>。

### 2.3.2 真菌

图4B为不同处理组真菌系统发育多样性指数

(Faith\_pd)。经 Wilcox 检验,相比于CK和(-)-, (±)-处理的真菌系统发育多样性指数显著减小( $P < 0.01$ ),而其他处理两两比较的真菌系统发育多样性指数变化不显著( $P > 0.05$ )。如图6所示,鳞球菌(*Plectosphaerella*)、*Cyphellophora*属、交链孢霉属(*Alternaria*)具有较长的分支进化长度,枝顶孢霉属(*Acremonium*)与鳞球菌(*Plectosphaerella*)可能同源,出芽短梗霉(*Aureobasidium*)与*Cyphellophora*属可能同源。与CK

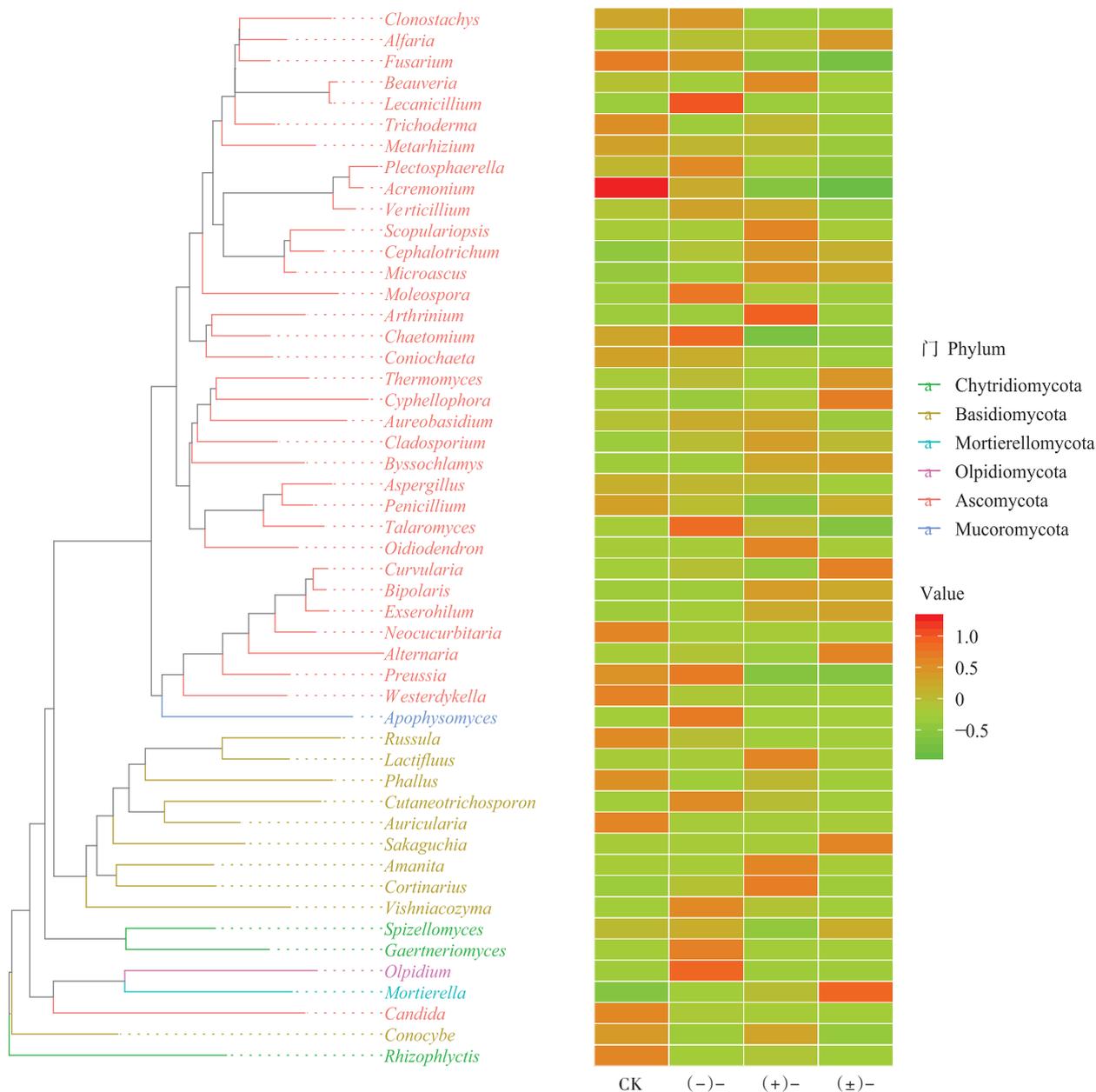
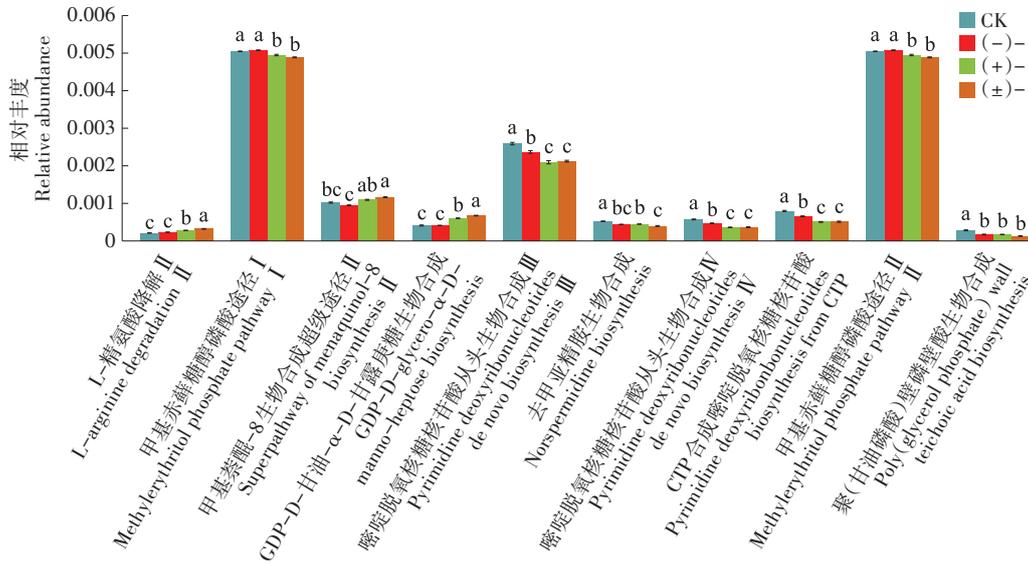


图6 系统发育进化树及组间丰度分布热图(真菌)

Figure 6 Phylogenetic tree and heatmap of abundance distribution between groups(fungi)

处理组相比,氟环唑外消旋体及对映体处理中的高丰度物种表现出明显差异,如 *Lecanicillium* 属、毛壳属 (*Chaetomium*)、马尔尼菲篮状菌 (*Talaromyces*)、油壶菌属 (*Olpidium*) 等仅在 (-)-处理土壤中相对丰度明显增加;白僵菌属 (*Beauveria*)、孢霉属 (*Arthrinium*)、树粉孢属 (*Oidiodendron*)、丝膜菌属 (*Cortinarius*) 等仅在 (+)-处理土壤中相对丰度明显增加;而 (±)-处理土壤中, *Cyphellophora* 属、疣孢霉 (*Curvularia*)、链格孢 (*Alternaria*)、被孢霉属 (*Mortierella*) 等相对丰度明显增加。同时相比于 CK 处理,氟环唑处理显著降低

了互生顶孢霉 (*Acremonium*)、*Neocucurbitaria* 属、念珠菌 (*Candida*)、玫瑰根霉菌 (*Rhizophlyctis*) 等真菌的相对丰度。氟环唑外消旋体及对映体暴露的真菌系统进化物种组成明显不同,并且存在立体选择性差异。在门水平上,这些被影响的真菌主要为子囊菌门、担子菌门、壶菌门等,多效唑也引起了这些真菌的显著变化<sup>[21]</sup>。土壤真菌,包括前面丰度显著增加的细菌,对氟环唑在土壤中的降解起到了重要作用,部分微生物可将氟环唑作为碳源来维持自身生长,从而为土壤中微生物组成和数量的改变提供了可能<sup>[32-33]</sup>。



ANOVA 和 Duncan 检验,不同通路上不同字母表示处理间差异显著( $P < 0.05$ )。下同  
ANOVA and Duncan test, different letters indicate significant differences among treatments at  $P < 0.05$  level. The same below

图7 丰度显著差异的 MetaCyc 通路(细菌)

Figure 7 MetaCyc pathways with significant differences in abundance (bacteria)

## 2.4 不同对映体暴露下 PICRUSt 基因预测

### 2.4.1 细菌

PICRUSt 基因预测分析应用于土壤细菌能较为准确地预测功能基因的存在与否及其丰度变化<sup>[34-35]</sup>。通过 PICRUSt 预测和列举不同处理组中显著变化的细菌代谢通路,表现出功能上的丰富性,并基于 MetaCyc 数据库比对出 10 条不同处理组间具有显著生物学差异的代谢途径(图 7)。在所列举的代谢途径中,氟环唑及其对映体暴露显著增加了 L-精氨酸降解 II (L-arginine degradation II)、甲基萘醌-8 生物合成超级通道 II (Superpathway of menaquinol-8 biosynthesis II)、GDP-D-甘油-α-D-甘露庚糖生物合成 (GDP-D-glycerol-α-D-manno-heptose biosynthesis) 通路的功能基因丰度,显著减少了甲基赤藓糖醇磷酸途径 I (Methylerythritol phosphate pathway I)、嘧啶脱氧核糖核苷酸从头生物合成 III (Pyrimidine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis III)、聚(甘油磷酸)壁磷壁酸生物合成 [Poly(glycerol phosphate) wall teichoic acid biosynthesis] 等通路的功能基因丰度。另外,除去甲亚精胺生物合成 (Norspermidine biosynthesis) 和聚(甘油磷酸)壁磷壁酸生物合成通路在两对映体处理中的功能基因丰度差异不显著外,其他途径两对映体均表现出显著差异,并且 (+)-氟环唑影响整体大于 (-)-氟环唑。多效唑对芒果园土壤微生物的 PICRUSt 功能预测分析结果表明,多效唑处理会降低土壤细菌的

整体代谢能力<sup>[36]</sup>。氟环唑处理引起了农田土壤中细菌代谢功能的改变,并且 (±)-和 (+)-引起的差异水平大于 (-)-,这种由 (+)-驱动的对细菌功能基因的影响可能是 (+)-毒性大于 (-)-毒性的直接结果。

### 2.4.2 真菌

根据 PICRUSt 预测结果,基于 MetaCyc 比对出 22 条不同处理组间具有显著生物学差异的真菌功能基因代谢途径(图 8),表现出了功能上的丰富性。三唑类杀菌剂的作用靶标是基于稻瘟病等植物疾病的病原真菌,因此被影响的真菌功能代谢途径多于细菌<sup>[37]</sup>。在所列举的代谢途径中,氟环唑及其对映体暴露增加了 15 条代谢途径的功能基因丰度,降低了 7 条途径的功能基因丰度。同时,氟环唑外消旋体能最大程度地引起功能基因丰度的增加或降低,如:L-蛋氨酸生物合成 III (L-methionine biosynthesis III)、有氧呼吸 I (细胞色素 c) [(Aerobic respiration I (cytochrome c)]、蔗糖降解 III (Sucrose degradation III) 等途径只在 (±)-处理中被显著影响 ( $P < 0.05$ )。而嘧啶脱氧核糖核苷酸从头生物合成 I (Pyrimidine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis I)、甲基酮生物合成 (Methyl ketone biosynthesis)、腺苷核苷酸从头生物合成的超通路 II (Superpathway of adenosine nucleotides de novo biosynthesis II) 等途径在两对映体处理中表现出显著差异。表明氟环唑影响了土壤真菌的代谢功能,并且 (±)-和 (+)-引起的差异水平大于 (-)-,这与在细菌中

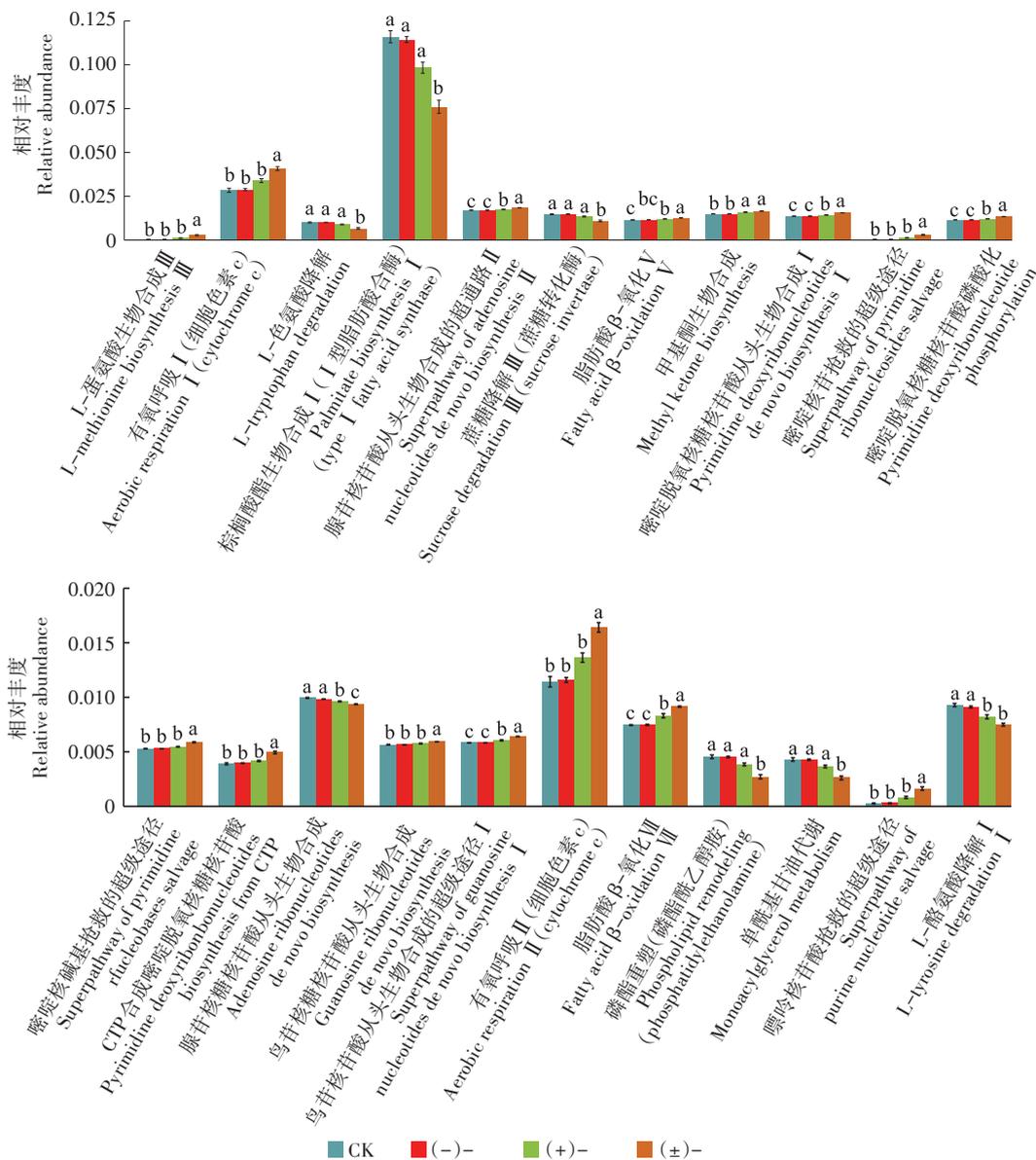


图8 丰度显著差异的MetaCyc通路(真菌)

Figure 8 MetaCyc pathways with significant differences in abundance(fungi)

观察到的结果相同。

基于PICRUSt的细菌和真菌功能基因的代谢途径预测结果表明,氟环唑及其对映体处理均引起了细菌和真菌相关功能基因代谢水平的改变。(+)驱动的立体选择性响应表明微生物对氟环唑胁迫执行了一定的氧化应激(ROS)措施。有氧呼吸途径在氟环唑及其对映体处理土壤中显著增强,是由于土壤细菌和真菌通过增强呼吸强度促进了胁迫反应<sup>[38-39]</sup>。与核糖核酸合成代谢有关的嘧啶、嘌呤、核苷和鸟苷等路径是被影响最多的一类功能途径。嘌呤和嘧啶代谢是控制细胞生化反应各个方面的重要因子<sup>[40-41]</sup>,其发生改变可能与氟环唑处理有直接关系。这些功能

的变化可能是因为微生物实施了与其他压力相关功能过程重新分配能量和资源的策略。与能量循环(TCA)有关的糖代谢和氨基酸代谢过程也被影响,这可能与和跨膜运输相关的蛋白质通道中的持续氧化应激有关<sup>[42]</sup>。同时,聚(甘油磷酸)壁磷壁酸、脂肪酸 $\beta$ 氧化和磷脂重塑过程是微生物为维持细胞膜完整性和细胞功能而对环境条件做出的直接反应<sup>[43]</sup>。这些过程预示着磷脂脂肪酸(PLFA)的改变,这可能是由于氟环唑诱导了ROS的过度生成,ROS可以氧化微生物细胞膜上的脂肪酸;或者,微生物群落内的群体可能会主动调整其膜的PLFA组成,以响应氟环唑诱导的压力<sup>[44]</sup>。总之,氟环唑的暴露影响了农田土壤

微生物群落相关功能基因的丰度,进而影响了微生物群落的生长代谢、信息传递等过程。

氟环唑及其对映体暴露后的农田土壤,在微生物群落的氧化应激过程中增强或减弱的代谢途径加剧了土壤代谢组向着氟环唑不同单体环境改变,从而表现出立体选择性,并且由(+)-驱动。值得注意的是,真菌群落比细菌群落对氟环唑的暴露更加敏感,氟环唑外消旋体更能引起土壤真菌代谢功能的改变。基于非靶向代谢组学、高通量测序结果的系统发育树重建和PICRUSt基因预测的联合分析,为三唑类杀菌剂氟环唑在农业土壤环境中的环境风险评估提供了有力的理论依据。

### 3 结论

(1)氟环唑在农田土壤中的降解不显著,该暴露过程可引起土壤代谢组的改变,细菌和真菌群落组成的改变,以及PICRUSt基因预测代谢途径的改变。

(2)PICRUSt基因功能预测结果表明,被影响的真菌功能代谢途径多于细菌,氟环唑外消旋体及对映体对土壤细菌和真菌功能基因的影响表现为外消旋体和(+)-对映体引起的差异水平大于(-)-对映体。

(3)三唑类杀菌剂氟环唑在土壤微生物群落中的立体选择性响应被揭示,并且在土壤代谢组、系统发育树重建及其组间丰度分布和PICRUSt基因预测代谢通路中表现出由(+)-对映体引起的一致性差异。

#### 参考文献:

- [1] KONWICK B J, GARRISON A W, AVANTS J K, et al. Bioaccumulation and biotransformation of chiral triazole fungicides in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Aquat Toxicol*, 2006, 80(4):372-381.
- [2] YAN B P, YE F, GAO D P. Residues of the fungicide epoxiconazole in rice and paddy in the Chinese field ecosystem [J]. *Pest Manag Sci*, 2015, 71(1):65-71.
- [3] 刘传德, 王培松, 王继秋, 等. 三唑类杀菌剂及其在小麦病害防治中的应用研究进展 [J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2005, 36(1):157-160. LIU C D, WANG P S, WANG J Q, et al. Research advances in triazole fungicides and used to control wheat diseases [J]. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science)*, 2005, 36(1):157-160.
- [4] QI P, DI S, CANG T, et al. Enantioselective behaviors of cis-epoxiconazole in vegetables-soil-earthworms system by liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry [J]. *Sci Total Environ*, 2020, 706:136039.
- [5] BROMILOW R H, EVANS A A, NICHOLLS P H. Factors affecting degradation rates of five triazole fungicides in two soil types: 1. Laboratory incubations; 2. Field studies [J]. *Pestic Sci*, 1999, 55(12):1129-1134.
- [6] FOGG P, BOXALL A B A, WALKER A, et al. Pesticide degradation in a 'biobed' composting substrate [J]. *Pest Manag Sci*, 2003, 59(5):527-537.
- [7] KAZIEM A E, GAO B, LI L, et al. Enantioselective bioactivity, toxicity, and degradation in different environmental mediums of chiral fungicide epoxiconazole [J]. *J Hazard Mater*, 2020, 386:121951.
- [8] JU C, XU J, WU X, et al. Effects of hexaconazole application on soil microbes community and nitrogen transformations in paddy soils [J]. *Sci Total Environ*, 2017, 609:655-663.
- [9] SULOWICZ S, PIOTROWSKA-SEGET Z. Response of microbial communities from an apple orchard and grassland soils to the first-time application of the fungicide tetraconazole [J]. *Ecotox Environ Safe*, 2016, 124:193-201.
- [10] KARAS P A, BAGUELIN C, PERTILE G, et al. Assessment of the impact of three pesticides on microbial dynamics and functions in a lab-to-field experimental approach [J]. *Sci Total Environ*, 2018, 637:636-646.
- [11] SATAPUTE P, KAMBLE M V, ADHIKARI S S, et al. Influence of triazole pesticides on tillage soil microbial populations and metabolic changes [J]. *Sci Total Environ*, 2019, 651:2334-2344.
- [12] ALBUQUERQUE N C P D, CARRÃO D B, HABENSCHUS M D, et al. Metabolism studies of chiral pesticides: A critical review [J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2018, 147:89-109.
- [13] XU C, LIN X, YIN S, et al. Enantioselectivity in biotransformation and bioaccumulation processes of typical chiral contaminants [J]. *Environ Pollut*, 2018, 243:1274-1286.
- [14] 赵刘清. 三唑类手性杀菌剂氟环唑和戊唑醇对蔬菜代谢组和脂质组的立体选择性影响 [D]. 北京:中国农业科学院, 2021. ZHAO L Q. Stereoselective effect of chiral triazole fungicides epoxiconazole and tebuconazole on the metabolism and lipid metabolism of vegetables [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021.
- [15] LI X, QU C, BIAN Y, et al. New insights into the responses of soil microorganisms to polycyclic aromatic hydrocarbon stress by combining enzyme activity and sequencing analysis with metabolomics [J]. *Environ Pollut*, 2019, 255:113312.
- [16] DONG F, LI J, CHANKVETADZE B, et al. Chiral triazole fungicide difenoconazole: Absolute stereochemistry, stereoselective bioactivity, aquatic toxicity, and environmental behavior in vegetables and soil [J]. *Environ Sci Technol*, 2013, 47(7):3386-3394.
- [17] LI Y, DONG F, LIU X, et al. Enantioselectivity in tebuconazole and myclobutanil non-target toxicity and degradation in soils [J]. *Chemosphere*, 2015, 122:145-153.
- [18] WANG H, CHEN J, GUO B, et al. Enantioselective bioaccumulation and metabolization of diniconazole in earthworms (*Eisenia fetida*) in an artificial soil [J]. *Ecotox Environ Safe*, 2014, 99:98-104.
- [19] ZHANG W, XU J, DONG F, et al. Effect of tetraconazole application on the soil microbial community [J]. *Environ Sci Pollut R*, 2014, 21(13):8323-8332.
- [20] LLOYD A W, PERCIVAL D, YURGEL S N. Effect of fungicide application on lowbush blueberries soil microbiome [J]. *Microorganisms*,

- 2021, 9(7):1366.
- [21] 陈丽君, 周彦好, 靳晓拓, 等. 多效唑对热区土壤细菌和真菌的影响及网络互作分析[J]. 农药科学与管理, 2020, 41(10):35-45. CHEN L J, ZHOU Y Y, JIN X T, et al. Effect and network interaction analyses of paclobutrazol on bacteria and fungi in tropical soils[J]. *Pesticide Science and Administration*, 2020, 41(10):35-45.
- [22] ZHANG H, SONG J, ZHANG Z, et al. Exposure to fungicide difenoconazole reduces the soil bacterial community diversity and the co-occurrence network complexity[J]. *J Hazard Mater*, 2021, 405:124208.
- [23] HE Z, WANG Y, ZHANG Y, et al. Stereoselective bioaccumulation of chiral PCB 91 in earthworm and its metabolomic and lipidomic responses[J]. *Environ Pollut*, 2018, 238:421-430.
- [24] ZHAO L, ZHANG Y, WANG L, et al. Stereoselective metabolomic and lipidomic responses of lettuce (*Lactuca sativa* L.) exposing to chiral triazole fungicide tebuconazole[J]. *Food Chem*, 2022, 371:131209.
- [25] PELLITIER P T, ZAK D R. Ectomycorrhizal fungi and the enzymatic liberation of nitrogen from soil organic matter: Why evolutionary history matters[J]. *New Phytol*, 2018, 217(1):68-73.
- [26] SWENSON T L, JENKINS S, BOWEN B P, et al. Untargeted soil metabolomics methods for analysis of extractable organic matter[J]. *Soil Biol Biochem*, 2015, 80:189-198.
- [27] SWENSON T L, NORTHEM T R. Untargeted soil metabolomics using liquid chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Methods Mol Biol*, 2019:97-109.
- [28] ULLAH M R, DIJKSTRA F A. Fungicide and bactericide effects on carbon and nitrogen cycling in soils: A meta-analysis[J]. *Soil Syst*, 2019, 3(2):23.
- [29] DAIMS H, WAGNER M. Nitrospira[J]. *Trends Microbiol*, 2018, 26(5):462-463.
- [30] ZAITSEV G M, TSITKO K V, RAINE F A, et al. New aerobic ammonium-dependent obligately oxalotrophic bacteria: Description of *Ammoniphilus oxalaticus* gen. nov., sp. nov. and *Ammoniphilus oxalivorans* gen. nov., sp. nov.[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998, 48:151-163.
- [31] HUREK T, HANDLEY L L, REINHOLD-HUREK B, et al. Azoarcus grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2002, 15(3):233-242.
- [32] 陶龙兴, 王熹, 俞美玉, 等. 环境条件对烯效唑及多效唑在土壤中降解的影响[J]. 浙江农业学报, 1997, 9(5):246-250. TAO L X, WANG X, YU M Y, et al. Effect of environmental conditions on degradation of S-07 and PP<sub>333</sub> in soil[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 1997, 9(5):246-250.
- [33] MUNIER-LAMY C, BORDE O. Effect of a triazole fungicide on the cellulose decomposition by the soil microflora[J]. *Chemosphere*, 2000, 41(7):1029-1035.
- [34] LEBRUN E S, KANG S. A comparison of computationally predicted functional metagenomes and microarray analysis for microbial P cycle genes in a unique basalt-soil forest[J]. *Front Res*, 2018, 7:179.
- [35] 厉桂香, 马克明. 北京东灵山树线处土壤细菌的 PICRUSt 基因预测分析[J]. 生态学报, 2018, 38(6):2180-2186. LI G X, MA K M. PICRUSt-based predicted metagenomic analysis of treeline soil bacteria on Mount Dongling, Beijing[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2018, 38(6):2180-2186.
- [36] 靳晓拓, 周彦好, 夏杨荣畅, 等. 多效唑对芒果园土壤细菌多样性的影响及 PICRUSt 基因功能预测分析[J]. 热带作物学报, 2019, 40(4):807-814. JIN X T, ZHOU Y Y, XIA Y R C, et al. Effects of paclobutrazol on soil bacterial diversity in mango orchard and PICRUSt-based predicted metagenomic analysis[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2019, 40(4):807-814.
- [37] HE M, SU J, XU Y, et al. Discovery of broad-spectrum fungicides that block septin-dependent infection processes of pathogenic fungi[J]. *Nat Microbiol*, 2020, 5(12):1565-1575.
- [38] 崔淑华, 王开运, 洪营, 等. 戊唑醇对土壤微生物数量和呼吸强度的影响[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(5):865-869. CUI S H, WANG K Y, HONG Y, et al. Influence of tebuconazole on the population and respiration of the soil microbes[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2005, 24(5):865-869.
- [39] 袁传卫, 姜兴印, 殷万元, 等. 吡唑醚菌酯对土壤微生物呼吸作用及土壤酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(5):897-903. YUAN C W, JIANG X Y, YIN W Y, et al. Effects of pyraclostrobin on soil microbial respiration and enzymatic activities[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2015, 34(5):897-903.
- [40] KUNDU D, DUBEY V K. Purines and pyrimidines: Metabolism, function and potential as therapeutic options in neurodegenerative diseases[J]. *Curr Protein Pept Sc*, 2021, 22(2):170-189.
- [41] ROY-BURMAN S, VISSER D W. Transport of purines and deoxyadenosine in *Escherichia coli*[J]. *J Biol Chem*, 1975, 250(24):9270-9275.
- [42] LI X K, MU L, HU X G. Integrating proteomics, metabolomics and typical analysis to investigate the uptake and oxidative stress of graphene oxide and polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Environ Sci-Nano*, 2018, 5(1):115-129.
- [43] QUIDEAU S A, MCINTOSH A C S, NORRIS C E, et al. Extraction and analysis of microbial phospholipid fatty acids in soils[J]. *J Vis Exp*, 2016(114):e54360.
- [44] ZHANG H, HUANG M, ZHANG W, et al. Silver nanoparticles alter soil microbial community compositions and metabolite profiles in unplanted and cucumber-planted soils[J]. *Environ Sci Technol*, 2020, 54(6):3334-3342.

(责任编辑:李丹)