

氟苯尼考胁迫对土壤解磷菌解磷能力的影响

陶松若¹, 廖翠怡¹, 彭金菊¹, 张腾月¹, 戴悦¹, 马驿^{1,2,3*}

(1. 广东海洋大学滨海农业学院动物医学系, 广东湛江 524088; 2. 岭南现代农业科学与技术广东省实验室茂名分中心, 广东茂名 525032; 3. 粤西地区畜禽遗传资源与种质创新重点实验室, 广东湛江 524088)

摘要 从土壤中分离得到 10 株解磷菌, 将菌株接种至 LB 液体培养基中, 30 ℃ 培养 24 h 作为种子液。在无机磷液体培养基中加入氟苯尼考, 使培养基含药浓度分别为 0、0.1、1.0、10.0、50.0 μg/mL。按照 1% 的接种量接种种子液, 30 ℃ 培养 5 d, 每 24 h 取 2 mL 培养液, 利用钼锑抗分光光度法测定培养液中速效磷含量。结果表明, 10 株解磷菌在 50.0 μg/mL 药物浓度下, 培养基中速效磷含量明显低于其他药物浓度组; 大部分菌株在药物浓度 0~50.0 μg/mL 菌液中细菌数量变化不明显。说明氟苯尼考对解磷菌的解磷能力产生了抑制作用, 但与细菌的生长繁殖并无明显相关性。

关键词 解磷菌; 氟苯尼考; 解磷能力

中图分类号 X 171.5 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2023)04-0054-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2023.04.013



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Effect of Florfenicol Stress on Phosphate-solubilizing Ability of Soil Phosphate-solubilizing Bacteria

TAO Song-ruo, LIAO Cui-yi, PENG Jin-ju et al (Department of Veterinary Medicine, College of Coastal Agricultural Sciences, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088)

Abstract 10 phosphate-solubilizing bacteria were isolated from soil, inoculated into LB liquid medium, and cultured at 30 ℃ for 24 h as seed solution. Florfenicol was added to the inorganic phosphorus liquid medium, and the drug concentrations in the medium were 0, 0.1, 1.0, 10.0 and 50.0 μg/mL, respectively. Seed solution was inoculated with 1% inoculum, cultured at 30 ℃ for 5 d, and 2 mL culture medium was taken every 24 h. The content of available phosphorus in culture medium was determined by molybdenum antimony anti-spectrophotometry. The results showed that the content of available phosphorus in the medium of 10 phosphate-solubilizing bacteria at 50.0 μg/mL was significantly lower than that of other drug concentrations. Most of the strains in the bacterial solution with drug concentration range of 0-50.0 μg/mL, the number of bacteria did not change significantly. This indicated that florfenicol inhibited the phosphate-solubilizing ability of phosphate-solubilizing bacteria, but had no significant correlation with the growth and reproduction of bacteria.

Key words Phosphate-solubilizing bacteria; Florfenicol; Phosphate-solubilizing ability

土壤环境中存在着大量具有解磷能力的微生物, 能够为难溶性磷酸盐转化为植物可吸收利用的磷素^[1]。据研究报道, 施入解磷菌群能有效提高土壤中的有效磷、全磷含量以及碱性磷酸酶活性, 进而促进油菜的生长发育, 其中细菌的促进效果最明显^[2]。将解磷菌制成解磷菌肥施入土壤能提高玉米株高、氮磷含量, 增加土壤的可溶性磷含量^[3]。此外, 解磷微生物释放的磷素还可以降低土壤中重金属的活性, 减弱因外部环境使用含磷物质而导致的污染^[4]。

氟苯尼考为动物专用抗生素, 广泛应用于动物细菌性疾病的防治^[5]。氟苯尼考进入动物机体后, 一部分药物会在动物体内残留, 另一部分药物及其代谢物随着动物排泄物进入土壤中, 给生态环境带来污染^[6]。抗生素进入土壤环境中能影响土壤微生物群落功能多样性^[7]。目前, 有关氟苯尼考对解磷菌解磷能力的影响鲜见报道。该试验利用钼锑抗分光光度法, 测定解磷菌在不同浓度氟苯尼考的条件下培养解磷能力之间的差异, 旨在为氟苯尼考在环境中残留对环境微生物产生的生态毒理影响提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试土壤。 采自广东海洋大学校内菜地, 经检测不含

氟苯尼考。土壤理化性质: pH 5.42、碱解氮 22.16 mg/kg、全氮 0.55 g/kg、速效磷 46.80 mg/kg、速效钾 263.25 mg/kg、有机质 10.97 g/kg、盐度 88 μS/cm。

1.1.2 药品与试剂。 氟苯尼考(含量 98%, 山东国邦药业有限公司, 批号 701-2005101); LB 液体培养基、固体培养基(北京路桥技术股份有限公司); 无机磷固体培养基(青岛海博生物技术有限公司); 无机磷液体培养基(北京酷来搏科技有限公司); 抗坏血酸、酒石酸锑钾、钼酸铵、KH₂PO₄(上海易恩化学技术有限公司); 无水乙醇、浓 H₂SO₄ 均为分析纯; 氟苯尼考药液(ρ=1 mg/mL): 称取 0.05 g 的氟苯尼考粉末, 加入无水乙醇溶解, 完全溶解后移入 50 mL 容量瓶中, 用蒸馏水稀释至刻度线。

1.1.3 钼锑抗分光光度法试剂。 钼锑抗分光光度法所需试剂参照王明欢等^[8]的方法进行配制。① 10% 抗坏血酸: 将 10 g 抗坏血酸(AR)用少量蒸馏水溶解后定容至 100 mL, 用棕色瓶保存于 4 ℃。② 13% 钼酸铵溶液: 将 13 g 钼酸铵(AR)用少量蒸馏水溶解后定容至 100 mL。③ 0.35% 酒石酸锑钾溶液: 将 0.35 g 酒石酸锑钾(AR)用少量蒸馏水溶解后定容至 100 mL。④ 硫酸溶液: 将 150 mL 的浓硫酸(AR)用玻璃棒缓缓流入 150 mL 蒸馏水中, 配制成 300 mL 的硫酸溶液。⑤ 钼酸盐溶液: 将 13% 钼酸铵溶液用玻璃棒引流徐徐加入硫酸溶液中, 再用玻璃棒搅拌充分混匀, 待溶液冷却后再缓缓加入 0.35% 酒石酸锑钾溶液, 冷却后储存在棕色玻璃瓶中于 4 ℃ 保存。⑥ 磷酸盐储备溶液(ρ=100 mg/L): 称取 0.439 0 g KH₂PO₄ 经 105 ℃ 烘干 2 h 后溶于 200 mL 蒸馏水

基金项目 广东省教育厅 2021 年度普通高校重点领域专项(2021ZDZX4003);

湛江市科技局 2021 年度省科技专项资金竞争性分配项目(2021A05231); 茂名实验室科研启动项目(2021TDQD002)。

作者简介 陶松若(1997—), 女, 广西柳州人, 硕士研究生, 研究方向: 动物生产学。* 通信作者, 教授, 博士, 硕士生导师, 从事兽医病理学与毒理学研究。

收稿日期 2022-04-22; **修回日期** 2022-05-19

中,加入 5 mL(1+1)浓硫酸,转入 1 000 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度。⑦磷酸盐标准使用液($\rho = 5 \text{ mg/L}$):量取 5 mL 的磷酸盐储备溶液于 100 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度,现配现用。

1.1.4 主要仪器。可调微量移液器(Eppendorf,德国);生化培养箱(SPX-250,上海福絮实验室仪器设备厂);不锈钢手提式灭菌器(DSX-280B,上海沪粤明科学仪器有限公司);超净工作台(SW-CJ-1D,上海博迅实业有限公司医疗设备厂);电子天平(JJ323BC,常熟市万杰测试仪器厂);台式恒温摇床(TS-100C,金坛市精达仪器制造有限公司);可见分光光度计(V-1000,上海翱艺仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 解磷菌的分离培养。称取土壤样品用蒸馏水稀释制备浓度适合的菌悬液,吸取菌悬液于无机磷固体培养基上,均匀涂布,30 ℃培养 72 h。挑取具有明显、透明溶磷圈的单一菌落,接种于 LB 液体培养基,30 ℃,180 r/min 摇床振荡培养 24 h 后加 30%甘油于-20 ℃保存。采用 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组并扩增 16S rDNA 片段,将扩增产物送至生物公司测序,测序结果在 NCBI 上 Blast 后对比分析。

1.2.2 绘制磷标准曲线。分别吸取 5 mg/L 磷标准储备液 0、1、2、3、4、5、6 mL 于 50 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度,得到 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 mg/L 系列标准磷溶液,加入 1 mL 抗坏血酸,充分混匀后加入 2 mL 钼酸盐,显色 20 min 后用分光光度计读取 700 nm 的吸光度。以蒸馏水作为参照,标准磷浓度作为横坐标、OD₇₀₀值作为纵坐标绘制标准曲线。

1.2.3 磷含量测定。将菌株接种至 LB 液体培养基中,30 ℃培养过夜,作为种子液。于 50 mL 无机磷液体培养基中加入氟苯尼考使培养基中含药浓度分别为 0、0.1、1.0、10.0、50.0 μg/mL,按照 1%的接种量将种子液加入药物培养基中,加入等体积的蒸馏水作为空白对照,每组 3 个重复;在 30 ℃的条件下,160 r/min 摇床振荡 5 d,每 24 h 取 2 mL 培养液 10 000 r/min 离心 10 min,取 1 mL 上清液移入 50 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度线,加入 1 mL 抗坏血酸,充分混匀后加入 2 mL 钼酸盐溶液,显色 20 min 后用分光光度计读取 700 nm 的吸光度。可溶性磷含量(mg/L)的计算公式为 $P=K \times V/V_1$,式中, P 为可溶性磷含量; K 为从标准曲线得到的速效磷含量(mg/L); V 为显色液总体积(mL); V_1 为上清液体积(mL)^[9]。

1.2.4 细菌浓度测定。于培养的第 5 天量取细菌培养液,用 LB 液体培养基稀释到适合的浓度。吸取不同浓度的细菌悬液各 10 μL 涂布于 LB 固体培养基上,30 ℃培养 72 h,之后选取菌落长势良好的平板进行细菌计数,菌液浓度计算公式:菌液浓度(CFU/mL)=(菌落数×稀释度)/0.01。

1.3 数据统计与处理 用 Origin 2021 函数绘图软件整理数据并作图;试验数据采用 IBM SPSS Statistics 23 统计软件进行解磷菌溶磷含量的差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 解磷菌 16S rDNA 鉴定结果 测序结果经 Blast 后对比分析,分离的 10 株土壤优势解磷菌主要为伯克霍尔德菌属、罗尔斯顿菌属和窄食单胞菌属细菌。

2.2 磷标准曲线的绘制 从图 1 可以看出,磷标准溶液浓度及对应的吸光度的标准曲线方程为 $y = 0.252 5x - 0.000 7$ ($R^2 = 0.998 9$),表明线性回归良好。

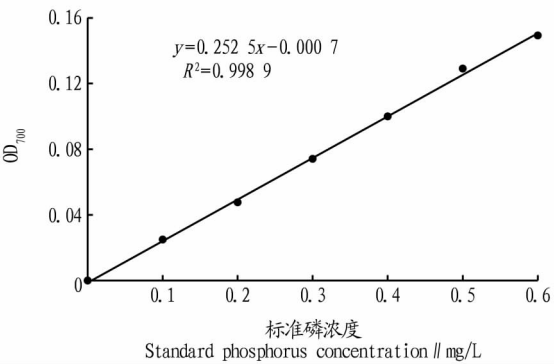


图 1 磷标准曲线
Fig.1 Phosphorus standard curve

2.3 磷含量 将从土壤中分离出的 10 株解磷菌于不同浓度氟苯尼考的条件下培养,每 24 h 测量其培养液中的速效磷含量,选取最具代表性的培养时间的测定值绘制曲线图,10 株解磷菌在不同药物浓度下的溶磷效果见表 1。从表 1 可以看出,10 株解磷菌在 50.0 μg/mL 药物浓度下,培养基中速效磷含量明显低于其他药物浓度组。其中,菌株 P64、P33、P51、P53、P32、P42 的溶磷含量随药物浓度的增加逐渐下降,与药物浓度呈反比;菌株 P35、P93 在药物浓度为 0~0.1 μg/mL 时,溶磷含量上升,药物浓度为>0.1~50.0 μg/mL 时,溶磷含量下降;而菌株 P62、P13 并没有表现出规律的溶磷效果,P13 的溶磷效果波动较大。

表 1 10 株解磷菌在不同药物浓度下培养的溶磷效果
Table 1 Phosphate solubilization effects of 10 phosphate-solubilizing bacteria cultured at different drug concentrations

药物浓度 Drug concentration // μg/mL	速效磷含量 Available phosphorus content//mg/L									
	P35	P64	P33	P51	P53	P32	P93	P62	P13	P42
0	218.66	226.87	196.27	200.83	193.21	166.48	199.94	228.56	189.84	191.33
0.1	233.51	210.63	186.57	172.62	193.60	159.94	212.71	227.27	203.41	188.06
1.0	219.25	209.74	158.85	155.09	183.20	141.13	198.16	211.63	166.18	165.88
10.0	124.30	181.33	120.14	114.40	91.63	127.86	125.29	213.21	193.21	85.59
50.0	1.62	2.61	22.12	0.93	5.69	2.12	0.83	37.67	6.87	21.23

2.3 细菌浓度 从 10 株解磷菌在第 5 天时菌液浓度 (表 2) 可以看出, 菌株 P42 的菌液浓度在药物浓度为 0~50.0 μg/mL 时整体呈上升趋势; 菌株 P64 在药物浓度为 0~10.0 μg/mL 时, 菌液浓度逐渐下降, 在 50.0 μg/mL 时反而回升; 菌株 P51 在药物浓度为 0~1.0 μg/mL 时菌液浓度逐渐下降, 在 10.0 μg/mL 时上升之后又回降; 菌株 P53 的菌液浓度

在药物浓度为 0~50.0 μg/mL 时呈逐渐下降趋势, 在 50.0 μg/mL 时降至 0; 而其他菌株在药物浓度 0~50.0 μg/mL 时, 菌液浓度并没有太大变化。

对 10 株解磷菌培养至第 5 天时的速效磷含量和菌液浓度进行相关性分析, 结果如图 2 所示。从线性方程可以看出, 10 株菌的速效磷含量与菌液浓度均无明显相关性, *r* 值

表 2 10 株解磷菌培养第 5 天时菌液浓度
Table 2 Concentration of 10 phosphate-solubilizing bacteria on the 5th day of culture

单位: CFU/mL

药物浓度 Drug conce- ntration// μg/mL	P35	P64	P33	P51	P53	P32	P93	P62	P13	P42
0	2.3×10 ¹⁹	3.8×10 ¹⁶	2.8×10 ¹⁹	7.3×10 ¹³	2.7×10 ¹⁹	4.2×10 ³¹	3.5×10 ¹⁸	2.1×10 ²²	8.0×10 ²⁴	2.0×10 ¹⁵
0.1	2.0×10 ¹⁹	2.6×10 ¹⁶	1.1×10 ¹⁹	7.0×10 ¹³	1.3×10 ¹⁹	4.4×10 ³¹	5.5×10 ¹⁸	1.8×10 ²²	1.4×10 ²⁵	1.8×10 ¹⁶
1.0	1.2×10 ¹⁹	1.2×10 ¹⁶	1.5×10 ¹⁹	3.3×10 ¹³	8.0×10 ¹⁸	4.7×10 ³¹	5.0×10 ¹⁸	4.4×10 ²²	2.0×10 ²⁵	4.1×10 ¹⁶
10.0	1.9×10 ¹⁹	3.0×10 ¹⁵	1.0×10 ¹⁹	7.2×10 ¹³	7.0×10 ¹⁸	4.8×10 ³¹	4.5×10 ¹⁸	2.3×10 ²²	1.0×10 ²⁵	4.0×10 ¹⁶
50.0	1.1×10 ¹⁹	8.0×10 ¹⁵	5.0×10 ¹⁸	2.2×10 ¹³	0	3.3×10 ³¹	3.5×10 ¹⁸	2.5×10 ²²	1.2×10 ²⁵	2.5×10 ¹⁶

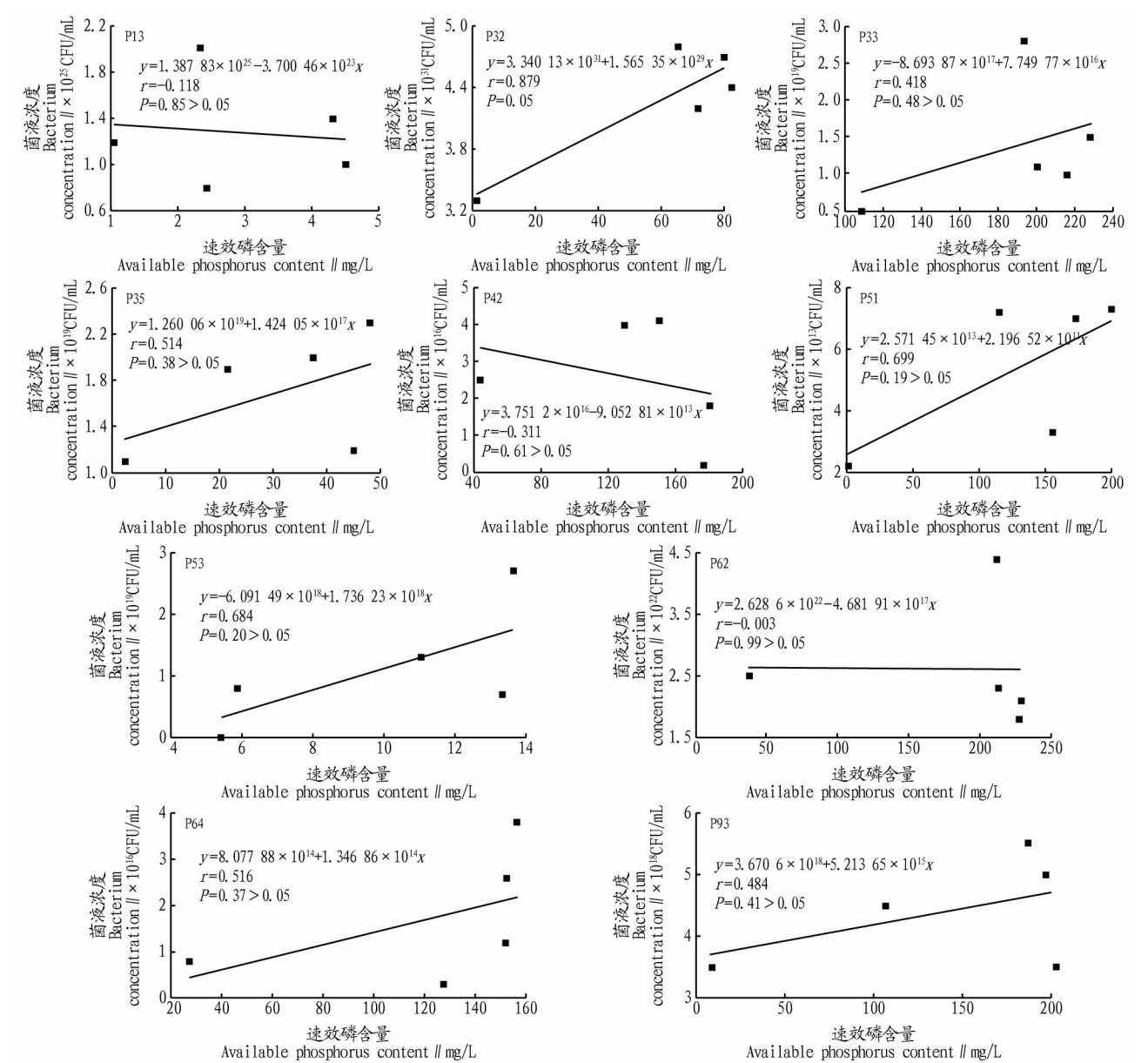


图 2 速效磷含量与菌液浓度相关性分析
Fig.2 Correlation analysis between available phosphorus content and bacterial solution concentration

为 $-0.311\sim 0.879$, $P\geq 0.05$, 说明 10 株解磷菌溶磷效果的降低与菌体的生长繁殖并无明显关联。

3 讨论与结论

解磷菌主要有 3 种不同的解磷机理:一是解磷菌自身能分泌大量酸性物质,包括柠檬酸、草酸、酒石酸、乙酸、甲酸和琥珀酸等,这些酸性物质能溶解土壤中的难溶性磷酸盐;二是解磷菌在进行呼吸作用时释放出二氧化碳等物质,能增加土壤的酸度,从而增强难溶性磷酸盐的溶解度^[10];三是通过分泌磷酸酶、植酸酶等物质使有机磷酸酯或有机磷酸盐降解,从而提高土壤中有效磷含量^[11]。有学者研究发现,生物炭理化性质能够刺激解磷微生物的生长与活性,增强解磷菌分泌磷酸酶的能力,从而提升解磷效果^[12]。罗利均^[13]通过紫外线-氯化锂对解磷菌诱导变异,结果显示,菌株的植酸酶基因 *phy C* 上的第 81、89、148 位氨基酸发生变异,该区域属于植酸酶的结构功能域,菌株增加了 2 个对 Ca^{2+} 的结合位点,进而增强了菌株的解磷能力。郭艺鹏等^[14]对解磷菌进行常规培养发酵和灭活后培养发酵,发现常规培养的解磷菌都表现出较好的解磷能力,灭活后的解磷菌解磷能力基本消失。张晶晶等^[15]将从土壤中分离得到的 14 株解磷菌用利福平进行标记,结果显示,大多数解磷菌的解磷能力下降,有些菌株甚至失去解磷能力。该研究设置不同浓度的氟苯尼考对解磷菌的生长进行胁迫,当药物浓度为 $50.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时,培养基中速效磷含量明显比其他药物浓度组的低;6 株菌(P64、P33、P51、P53、P32、P42)的溶磷含量随药物浓度的增加逐渐下降;菌株 P35、P93 在药物浓度为 $0\sim 0.1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时,溶磷含量上升,药物浓度为 $0.1\sim 50.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时,溶磷含量下降;而菌株 P62、P13 并没有表现出规律的溶磷效果,P13 的溶磷效果有较大的波动。在高浓度药物条件下,菌株的溶磷效果下降,然而对应的菌液浓度却没有太大的变化,相关性分析结果显示,10 株菌的培养液中速效磷含量与菌液浓度并无明显相关性,说明菌株溶磷效果的下降与菌液的生长繁殖关联并不大。

抗生素在微生物环境中残留,会增加细菌产生耐药性的风险,抗生素的种类和浓度的增加也可能改变微生物群落结构多样性和功能^[16],还会对微生物的碳源利用率、特殊菌群的功能结构及酶活性等产生抑制作用^[17]。当土壤中磺胺甲噁唑的残留浓度达到 100 mg/kg 时,土壤中微生物种群密度

在 7 d 后能观察到明显下降,且对糖类的利用率也有抑制作用^[18]。土壤中土霉素的残留浓度达到 140 mg/kg 时,微生物利用碳源的种类被显著改变,土壤中脲酶活性及碱性磷酸酶活性受到明显抑制^[19]。该研究在培养基中加入不同浓度的氟苯尼考,当药物浓度为 $50.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时,解磷菌的解磷能力显著下降,说明高浓度氟苯尼考对解磷菌的解磷功能产生了抑制。

参考文献

- [1] 赵咏梅,李婷雨,阮倩.土壤解磷菌 RQ3-01 的筛选及初步鉴定[J].陕西农业科学,2021,67(4):19-21,34.
- [2] 刘玲利,卫迎,刘洋,等.不同解磷菌群对复垦土壤磷素形态及油菜产量的影响[J].华北农学报,2017,32(6):229-234.
- [3] 王向英,武欣,张杰,等.解磷菌在复垦土壤中的定殖及促生效果研究[J].东北农业大学学报,2021,52(7):40-47.
- [4] 李敏,滕泽栋,朱静,等.解磷微生物修复土壤重金属污染研究进展[J].生态学报,2018,38(10):3393-3402.
- [5] 李先强.氟苯尼考研究进展[J].中国兽药杂志,2016,50(11):5-8.
- [6] 李世宏,刘希望,杨亚军,等.氟苯尼考的应用与残留研究进展[J].安徽农业科学,2019,47(2):15-17.
- [7] 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[J].生态学报,2007,27(8):3400-3406.
- [8] 王明欢,刘莹,张英.中药药渣中的微生物固氮、解磷能力测定方法的改进[J].广东药科大学学报,2020,36(2):215-218.
- [9] 苏辉兰,莫雪雪,余炳锋,等.贡柑果园高效解磷菌的筛选及其解磷条件优化[J].北方园艺,2019(5):101-107.
- [10] 荣国强,秦欣科,姚全军,等.土壤解磷菌在现代农业中应用现状的研究[J].农产品加工,2021(13):86-89.
- [11] 王向英.解磷菌在采煤塌陷区复垦土壤中的解磷、定殖与应用研究[D].太谷:山西农业大学,2020.
- [12] 杜慧婷.生物炭对胶质芽孢杆菌(*Bacillus mucilaginosus*)和巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)活性的影响及解磷机制[D].沈阳:沈阳农业大学,2020.
- [13] 罗利均.蜡状芽孢杆菌 S458-1 解磷机理研究及变异菌选育[D].重庆:西南大学,2021.
- [14] 郭艺鹏,李静,杨越,等.枣根际解磷细菌解磷特性及影响因素分析[J].河南农业大学学报,2018,52(1):96-103.
- [15] 张晶晶,李建贵,郭艺鹏,等.新疆核桃根际土壤中解磷菌的分离筛选及鉴定[J].经济林研究,2015,33(2):57-62.
- [16] PROIA L, LUPINI G, OSORIO V, et al. Response of biofilm bacterial communities to antibiotic pollutants in a Mediterranean River[J]. Chemosphere, 2013, 92(9):1126-1135.
- [17] 刘蓓,李艳霞,张雪莲,等.兽药抗生素对土壤微生物群落的影响[J].生态毒理学报,2013,8(6):839-846.
- [18] LIU F, WU J S, YING G G, et al. Changes in functional diversity of soil microbial community with addition of antibiotics sulfamethoxazole and chlortetracycline[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2012, 95(6):1615-1623.
- [19] 陈智学.土霉素对酶活性及微生物群落代谢的影响[D].杨凌:西北农林科技大学,2013.