

梁仪, 周童, 白玲, 等. 氟苯尼考联合铜环境胁迫对土壤固氮菌成膜能力及相关基因表达的研究 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(3): 402-409.
LIANG Yi, ZHOU Tong, BAI Ling, et al. Biofilm-forming capacity of soil nitrogen-fixing bacteria and related gene expression under florfenicol combined with copper environmental stress[J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(3): 402-409.

氟苯尼考联合铜环境胁迫对土壤固氮菌成膜能力 及相关基因表达的研究

梁 仪¹, 周 童¹, 白 玲², 王 美³, 孙永学¹

(1 华南农业大学 兽医学院/国家兽药安全评价(环境评估)实验室/广东省兽药研制与安全评价重点实验室, 广东 广州 510642; 2 怀化职业技术学院, 湖南 怀化 418400; 3 浙江农林大学 动物科技学院 动物医学院, 浙江 杭州 311300)

摘要:【目的】研究氟苯尼考和铜(Cu)残留对土壤固氮菌的生态毒性效应, 为评价兽药的环境风险提供依据。【方法】对从花生根际土壤中分离出一株优势固氮菌 RpEC2071 进行氟苯尼考和铜胁迫处理, 试验设置空白组(0 $\mu\text{g/mL}$)、氟苯尼考添加组(40 $\mu\text{g/mL}$)、Cu 添加组(200 $\mu\text{g/mL}$)和混合组(氟苯尼考 40 $\mu\text{g/mL}$ +Cu 200 $\mu\text{g/mL}$), 并于给药后采样。采用苯酚硫酸法和 96 孔法研究氟苯尼考和 Cu 单独或联合处理对固氮菌胞外多糖产生及生物膜形成能力的影响。采用 RT-qPCR 测定分析固氮菌生物膜及固氮相关基因的 mRNA 表达水平。【结果】氟苯尼考和 Cu 单独胁迫会促进生物膜的形成, 二者生物膜形成能力约为空白组的 2 倍; 混合胁迫会抑制生物膜的形成, 空白组生物膜形成能力是其 3.1 倍。胞外多糖分泌结果与生物膜形成能力测定结果基本一致。生物膜相关基因与氮代谢调控基因呈显著正相关, 氟苯尼考和 Cu 的添加改变了 *fliQ*、*nifH* 和 *nnrR* 等基因的表达水平, 且二者联合处理后会对其表达分别产生协同或拮抗作用。【结论】氟苯尼考与 Cu 的单独或联合胁迫影响固氮菌 RpEC2071 中生物膜相关基因表达, 进而对其生物膜形成能力产生影响。预示了以氟苯尼考和 Cu 为例的兽药及重金属残留胁迫会对土壤固氮菌产生潜在的生态毒性效应, 从而破坏土壤中固氮生态系统。

关键词: 氟苯尼考; 铜; 固氮菌; 胞外多糖; 生物膜; 生态毒性

中图分类号: S859.7

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)03-0402-08

Biofilm-forming capacity of soil nitrogen-fixing bacteria and related gene expression under florfenicol combined with copper environmental stress

LIANG Yi¹, ZHOU Tong¹, BAI Ling², WANG Mei³, SUN Yongxue¹

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University/National Laboratory of Veterinary Drug Safety Evaluation (Environment Estimation)/Guangdong Provincial Key Laboratory for Veterinary Pharmaceuticals Development and Safety Evaluation, Guangzhou 510642, China; 2 Huaihua Vocational and Technical College, Huaihua 418400, China; 3 College of Animal Science and Technology, College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, China)

Abstract: 【Objective】The ecotoxic effects of florfenicol and copper (Cu) residues on soil nitrogen-fixing bacteria were studied to provide a basis for evaluating the environmental risks of veterinary drugs. 【Method】A dominant nitrogen-fixing bacterium RpEC2071 was isolated from peanut root enclosure and treated under florfenicol and Cu stress. We set the blank group (0 $\mu\text{g/mL}$), florfenicol group (40 $\mu\text{g/mL}$), Cu group (200

收稿日期: 2022-05-25 网络首发时间: 2023-03-15 09:47:07

首发网址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20230314.0909.002.html>

作者简介: 梁 仪, 硕士研究生, 主要从事生态毒理学研究, E-mail: Liangyi1029@163.com; 通信作者: 孙永学, 教授, 博士, 主要从事生态毒理学研究, E-mail: sunyx@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(31772803)

μg/mL) and mixed group (flufenicol 40 μg/mL, Cu 200 μg/mL), and collected samples at multiple time points after dosing. The phenol-sulfuric acid method and 96-well microplate method were used to study the effects of florfenicol and Cu alone or in combination on the production of extracellular polysaccharides and biofilm formation of nitrogen-fixing bacterium. RT-qPCR was used to determine nitrogen-fixing bacterium biofilm formation and the mRNA expression levels of nitrogen fixation-related genes. 【Result】Florfenicol and Cu alone promoted the formation of biofilms, and the biofilm formation capacity of both was about twice that of the blank group. Under mixed stress, the biofilm formation was inhibited, and the biofilm formation capacity of the blank group was 3.1 times that of it. The results of extracellular polysaccharide secretion were basically consistent with the results of the determination of biofilm formation ability. Biofilm-related genes were significantly positively correlated with nitrogen metabolism regulatory genes, and the addition of florfenicol and Cu changed the expression levels of genes such as *fliQ*, *ntrX* and *ntrR*, and it would produce synergistic or antagonistic effects after the combination treatment of florfenicol and Cu. 【Conclusion】The individual or combined stress of florfenicol and Cu affects the expression of biofilm-related genes in nitrogen-fixing bacteria RpEC2071, which in turn affects its ability to form biofilm. This research reveals the ecotoxic potential of veterinary drugs and heavy metal residue stresses on soil nitrogen-fixing bacteria, using florfenicol and Cu as examples. As a result, this can lead to the impairment of the nitrogen-fixing ecosystem in soil.

Key words: Florfenicol; Copper; Nitrogen-fixing bacteria; Extracellular polysaccharide; Biofilm; Ecotoxicity

氟苯尼考 (Florfenicol, FF) 属于酰胺醇类动物专用广谱抗生素, 广泛用于防治畜禽消化道和呼吸道感染性疾病^[1], 氟苯尼考经动物摄入后随排泄物进入环境中, 造成潜在的环境生态风险^[2-3]。呼秀智等^[4]研究表明, 氟苯尼考对土壤微生物的抑制作用随浓度增加而增强。硫酸铜 (CuSO₄) 作为一种促生长、防腹泻的添加剂用于养殖业, 并发挥细胞电子传递、氧化还原等重要生理作用^[5], 但动物摄入后随排泄物进入环境中的高含量 Cu 可影响土壤微生物丰度、群落结构及功能多样性, 导致土壤生态结构破坏^[6]。许多报道指出金属与抗生素联用后存在协同或拮抗作用, 如: 与单一处理相比, 土霉素与铅的交互作用使土壤细菌蔗糖酶活性明显下降, 表现为协同效应^[7]; Fe(II) 通过与土霉素形成复合物, 降低其生物利用度, 从而降低水稻对土霉素的吸收, 表现为拮抗作用^[8]。二者联用效果与相关酶活性变化、是否形成复合物以及目标物对重金属耐受性差异等因素均相关。Wang等^[9]报道, 动物粪便中氟苯尼考和 Cu 残留不仅阻碍环境中细菌正常代谢, 还可能增加细菌耐药基因 (Antibiotic resistance genes, ARGs) 传播到人类的风险。

土壤中固氮菌介导的生物固氮作用是生态系统中氮元素输入土壤的主要过程, 是全球氮循环至关重要的一步, 兽用抗生素和重金属残留可能对固氮菌产生潜在影响^[10]。本文对优势固氮菌 RpEC2071 进行氟苯尼考联合 Cu 胁迫处理, 研究胁迫条件下

对固氮菌胞外多糖产生及生物膜形成的影响, 并分析固氮酶结构基因、氮代谢调控基因以及生物膜基因 mRNA 表达水平, 将为评估兽药及添加剂的生态风险提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

固氮菌从华南农业大学广东生物防治教育部工程研究中心无抗生素污染的花生根部附近土壤中分离纯化后得到。

氟苯尼考原料药购自大连美伦生物技术有限公司, 纯度 99.5%; LB 肉汤、LB 琼脂均购自广州环凯微生物有限公司; 硫酸铜、异丙醇、NaOH、浓硫酸、葡萄糖、无水乙醇等均购自广州普智生物仪器有限公司, 纯度均为分析纯; 革兰氏染色液购自广州翔博生物科技有限公司。

1.2 固氮菌分离鉴定与纯化

1.2.1 花生根围土中固氮菌的分离培养 称 5.0 g 花生根围土壤, 加入 50 mL 无菌水振荡摇匀, 取 10 mL 悬浊液进行梯度稀释后分别取 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ g/mL 土壤悬液 0.1 mL 均匀涂布于 LB 琼脂培养基, 28 ℃ 培养 5~7 d 后进行纯化, 将纯化菌株加入 φ 为 10% 的甘油水中, -20 ℃ 条件下保存。

1.2.2 固氮菌镜检与 16S rDNA 菌种鉴定 制备固氮菌革兰氏染色涂片, 油镜 (100×) 观察染色后细菌形态。提取固氮菌 DNA 模板, 采用细菌 16S

rDNA 通用引物 27F/1492R 进行 PCR 扩增,产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后,送样广州擎科生物技术有限公司进行 DNA 测序。

1.3 固氮菌生物膜形成能力测试

供试菌活化:取保存的固氮菌划线接种 LB 板,经 28 ℃ 培养 48 h 后纯化 2 次备用。

生物膜生长情况观察:挑取固氮菌单菌落于 5 mL 改良 LB 肉汤,设置 3 个重复,28 ℃ 培养,记录 0、12、24、36、72、120、132、144、156 和 168 h 时的试管生物膜生长情况。

1.4 固氮菌生物膜形成变化

96 孔板内设置 4 组处理:空白组 (CK)、氟苯尼考组 (FF)、铜组 (Cu) 及混合组 (FF+Cu),各处理组分添加量见表 1,28 ℃ 条件下孵育 120、132、

144、156 和 168 h 进行采样。样品采用结晶紫法进行处理^[11],每组 3 个重复,使用酶标仪测定孔中溶液 $D_{590\text{ nm}}$ 。另外,以未接种供试菌的改良肉汤作为阴性对照,以阴性对照 $D_{590\text{ nm}}(D_c)$ 的 2 倍作为界限值,根据 $D_{590\text{ nm}}$ 进行生物膜形成能力结果判断:生物膜形成力强 ($D_{590\text{ nm}} > 2D_c$);生物膜形成力弱 ($D_c < D_{590\text{ nm}} \leq 2D_c$);没有生物膜形成 ($D_{590\text{ nm}} \leq D_c$)。

1.5 固氮菌胁迫模型构建

设置 4 组处理:空白组 (CK)、氟苯尼考组 (FF)、铜组 (Cu) 及混合组 (FF+Cu),各处理组分添加量见表 2,每组 3 个重复,于给药后 0、12、24、36、72、120、132、144、156 和 168 h 测定各组菌液的 $D_{600\text{ nm}}$,并采集后 5 个时间点的细菌沉淀和上清液于-80 ℃ 保存,用于后续测定固氮菌胞外多糖含量。

表 1 96 孔板中处理组各组分添加量

Table 1 Addition of each component in a 96-well plate of treatment group					μL
组别 Group	改良肉汤 Improved broth	菌液 Bacterial solution	甲醇 Methanol	氟苯尼考 ¹⁾ Florfenicol	CuSO ₄ ²⁾
空白组 Blank(CK)	170	20	10	0	0
氟苯尼考组 Florfenicol(FF)	170	20	0	10	0
铜组 Cu(Cu)	160	20	10	0	10
混合组 Mixed(FF+Cu)	160	20	0	10	10

1) ρ (氟苯尼考)=0.8 mg/mL; 2) ρ (CuSO₄) = 4 mg/mL
1) ρ (Florfenicol) = 0.8 mg/mL; 2) ρ (CuSO₄) = 4 mg/mL

表 2 胁迫模型组各组分添加量

Table 2 Addition of each component in stress model groups					mL
组别 Group	改良肉汤 Improved broth	菌液 Bacterial solution	甲醇 Methanol	氟苯尼考 ¹⁾ Florfenicol	CuSO ₄ ²⁾
空白组 Blank(CK)	40.1	0.1	0.1	0	0
氟苯尼考组 Florfenicol(FF)	40.1	0.1	0	0.1	0
铜组 Cu(Cu)	40.0	0.1	0.1	0	0.1
混合组 Mixed(FF+Cu)	40.0	0.1	0	0.1	0.1

1) ρ (氟苯尼考)=16 mg/mL; 2) ρ (CuSO₄)= 80 mg/mL
1) ρ (Florfenicol) = 16 mg/mL; 2) ρ (CuSO₄) = 80 mg/mL

1.6 固氮菌胞外多糖含量测定

分别取“1.5”各样品上清液 2 mL 至离心管中,加入乙醇,4 ℃ 条件下静置 24 h 后离心,洗涤沉淀后 60 ℃ 干燥至恒质量。将各组干燥样品溶于 2 mL 蒸馏水中,另以蒸馏水作为阴性对照,使用苯酚硫酸法及紫外分光光度计估算胞外多糖浓度^[12]。

1.7 实时荧光定量 PCR 检测

采用 TRIzol 法^[13] 抽提固氮菌样品 RNA 后反转录合成 cDNA。参考全基因组测序结果设计引

物,引物序列见表 3,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以获得的 cDNA 为模板,16S rDNA 为内参基因,采用 Bio-Rad CFX96 检测系统进行实时荧光定量 PCR (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 试验,所得数据运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行分析计算。

1.8 试验数据处理

用 Excel 对数据进行初步整理,用 SPSS 25.0 软件进行数据分析和统计,GraphPad Prism 7.0 软件绘图,各指标用 One-way ANOVA 进行显著性分析,

表 3 引物序列
Table 3 Primer sequences

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequence	基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequence
<i>flaF</i>	F: GCGAGCGACAGGCGTTGA R: TGATTATCCGGCTGCTTGAGATC	<i>ntrX</i>	F: ACTTGTCGGTGCGTCACTTGC R: GATGGGCTTCTTCCAGTGCG
<i>flhL</i>	F: AAAACGAACAGGCAGAGGGC R: GGGAAACGGTGCGGACATAG	<i>glnK</i>	F: TGACCGTGACCGAAGTAAAGGG R: TGCCGTCGCCGATCTGCC
<i>flhA</i>	F: ACCACCAGTCATTTCTTGCCC R: CCGCCGTCGGACCCTCAT	<i>nnrR</i>	F: GCTGGACGGATTGCTGACCC R: GCCACCCGACGCTCTACCTC
<i>flhQ</i>	F: ATCGTCGGTGTGCCATCG R: CGTCATTTCTGAACCTGCGTC	<i>nifH</i>	F: CGGATTATCGCAGTAGCAAACC R: TCTGTCGTCTCCATCGCTTCAC
<i>ntrY</i>	F: CGCTGACACCAAGTTCACGACG R: GCATCATGGAGTTCCAGATACCC	<i>Rp16S-1</i>	F: AGATGCTCTACCTTGATGTCCCTG R: AGATGCGTTGCGCCACCT

结果采用平均数±SD 表示, $P < 0.05$ 为差异显著性标准。所有数据均为 3 次或 3 次以上试验的结果。

2 结果与分析

2.1 革兰氏染色与菌种鉴定

2.1.1 革兰氏染色镜检 经革兰氏染色后, 染色结果如图 1, 在 100 倍光学显微镜下镜检细菌呈红色、棒状, 判定该菌为革兰阴性菌。

2.1.2 16S rDNA 菌种鉴定 将分离得到的菌株序列上传至 NCBI 数据库进行比对, 发现其与固氮菌的匹配度最高, 将该菌命名为 RpEC2071。绘制系统发育树 (图 2), 发现固氮菌 RpEC2071 与根瘤菌

NRCPB10 相似度高达 99%, 进一步鉴定其属于根瘤菌。



图 1 菌株 RpEC2071 的革兰氏染色结果 (×100 光学显微镜)
Fig. 1 Gram stain results of strain RpEC2071 (×100 light microscope)

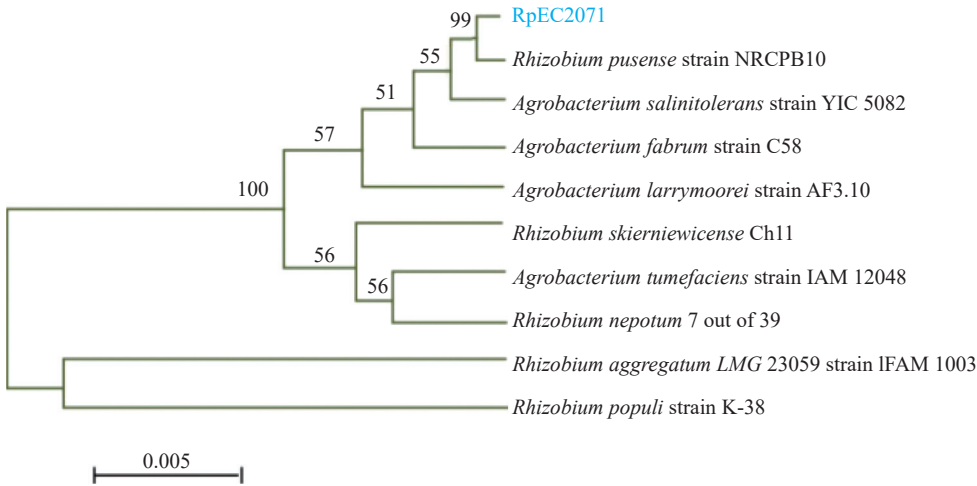


图 2 菌株 RpEC2071 的 16S rDNA 系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic tree of strain RpEC2071 16S rDNA

2.2 RpEC2071 生物膜形成能力表型分析

根据生物膜试管形成试验结果 (图 3), 发现 0~36 h 未能明显观察到生物膜, 表明分离菌株在前 36 h 生物膜形成能力弱; 培养至 72 h 时开始出现较为明显的生物膜, 且生物膜形成能力随培养时长增加而逐渐增强。

2.3 RpEC2071 生物膜形成能力分析

采集 4 种胁迫条件下 RpEC2071 菌液, 测定 $D_{600\text{ nm}}$ 得到生长曲线, 如图 4 所示, 4 组模型均表现为前期生长较为缓慢, 在 120 h 处生长速度明显加快, 之后逐渐趋于稳定, 最终呈现衰退现象, 故选取后面 5 个时间点做进一步分析。

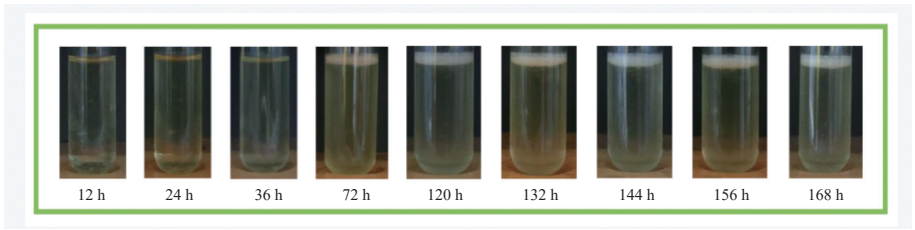


图 3 菌株 RpEC2071 的生物膜试管形成试验

Fig. 3 Biofilm formation experiment of strain RpEC2071 in test tube

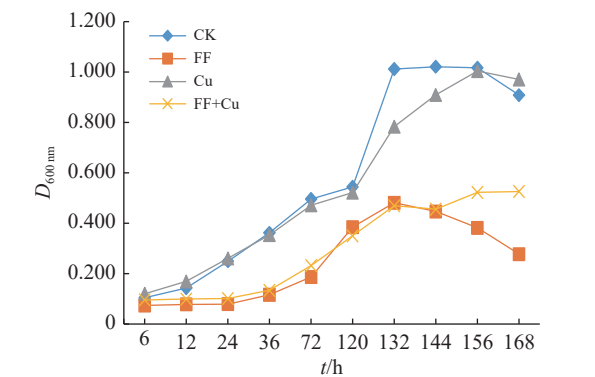


图 4 胁迫模型下的菌株 RpEC2071 生长曲线

Fig. 4 Growth curve of strain RpEC2071 under stress model

96 孔板内生物膜形成能力定量测定结果如图 5 所示。在 156 h 时, FF+Cu 组的生物膜形成能力最低, CK 组的生物膜形成能力最强, 是 FF+Cu 组的 3.1 倍; 在 168 h 时, FF+Cu 组生物膜形成能力最低, FF 组生物膜形成能力最强, 是 FF+Cu 组的 3.1 倍。进一步分析发现, FF 组和 CK 组生物膜形成能力均在 156 h 时急剧增强, Cu 组在 168 h 时急剧增强, 而 FF+Cu 组变化稳定且生物膜形成能力最低。综上生物膜的的形成能力: FF 组 > Cu 组 > CK 组 > FF+Cu 组。

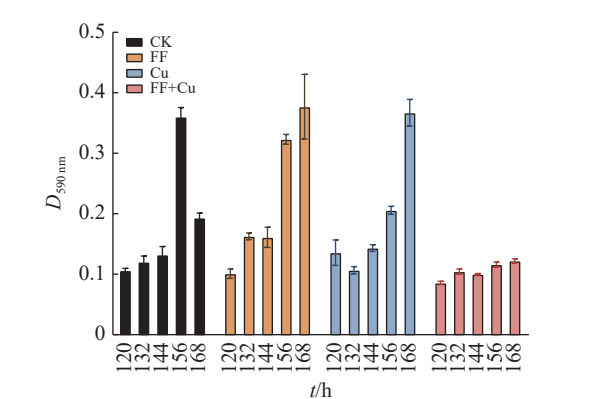


图 5 菌株 RpEC2071 的生物膜形成能力测定结果

Fig. 5 Test results of biofilm formation capacity of strain RpEC2071

2.4 胞外多糖含量测定

根据“2.3”生长曲线选择的 5 个时间点对胞外多糖含量进行定量测定, 结果如图 6 所示。由图 6

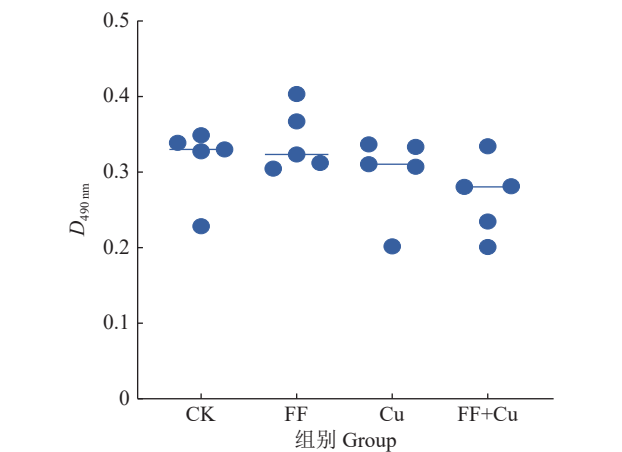


图 6 菌株 RpEC2071 胞外多糖含量测定分析图

Fig. 6 Analysis chart for determination of extracellular polysaccharide content of strain RpEC2071

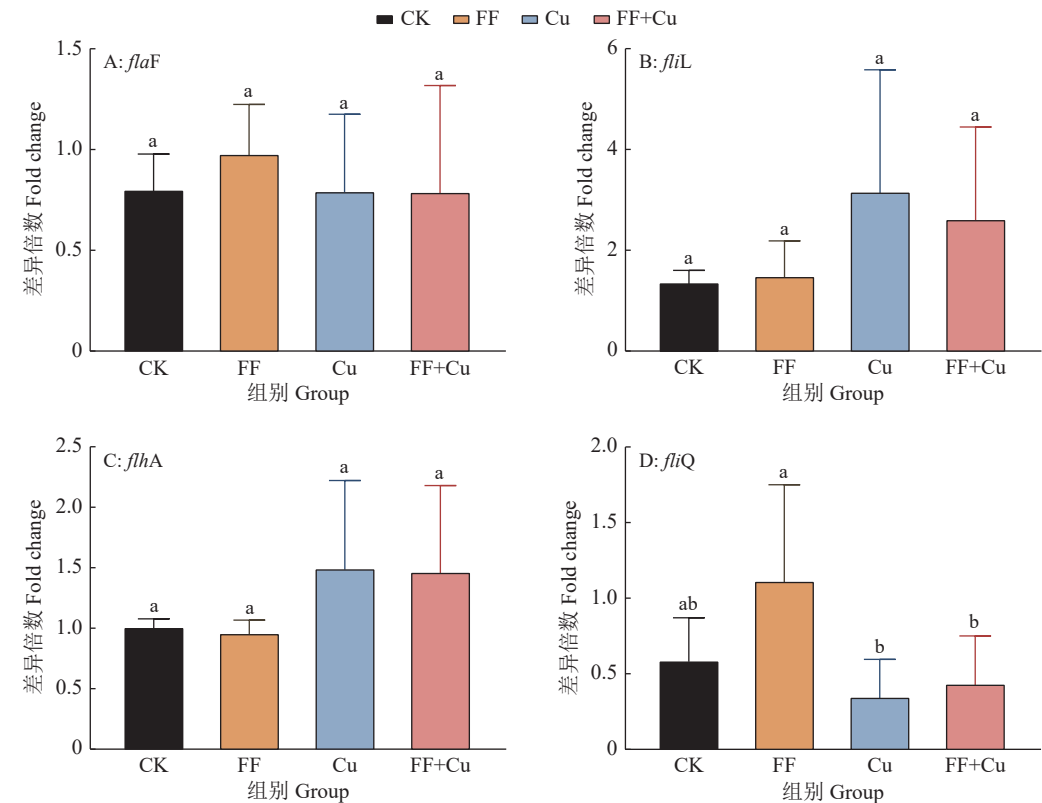
可得, 4 个试验组在 5 个时间点的胞外多糖平均分泌量表现为: FF 组 > CK 组 > Cu 组 > FF+Cu 组。表明 Cu 的添加对固氮菌存在抑制作用, 且氟苯尼考能促进 Cu 的抑制作用。

2.5 相关性分析

基于全基因组测序结果, 定量测定固氮基因 *nifH*、4 个氮代谢调控基因 *ntrY*、*ntrX*、*glnK*、*nnrR* 及 7 个生物膜相关功能基因 *flaF*、*fliL*、*flhA*、*fliP*、*fliQ*、*fliR*、*flbT*, 并进行相关性分析。结果显示, *flaF*、*fliL*、*flhA*、*fliQ* 这 4 种生物膜相关基因分别与固氮基因 *nifH*、氮代谢调控基因 *ntrX* 呈现正相关 ($r=0.548\sim0.832$, $P<0.05$); 另外发现 *nifH* 基因的表达可能受到 *ntrY*、*ntrX*、*glnK*、*nnrR* 这 4 种调控因子的调控 ($r=0.590\sim0.827$, $P<0.01$)。

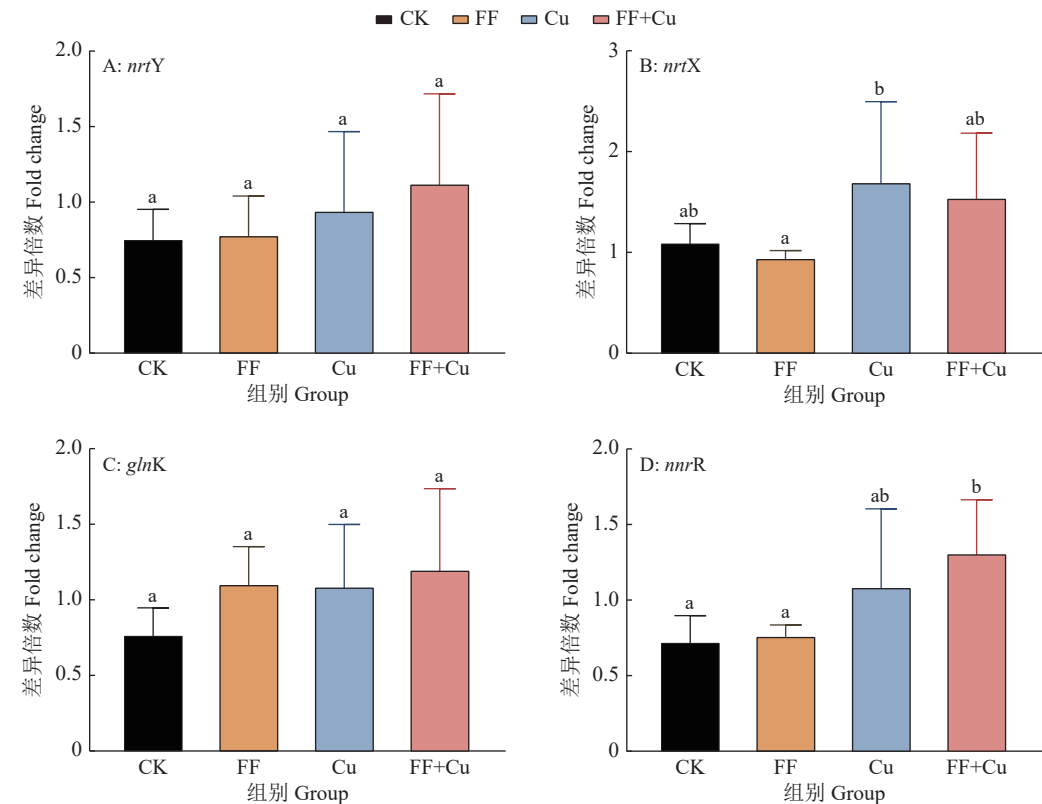
2.6 基因表达差异分析

基因荧光定量表达差异分析比较发现, 生物膜相关基因表达受 Cu 的影响不大, 然而其中的 *fliQ* 基因在混合或者 Cu 单独施压作用下, 与氟苯尼考单独施压作用下存在显著的差异 (图 7 D), 但均与 CK 组无明显差异。而在氮代谢相关基因的分析中, 发现氟苯尼考与 Cu 混合后显著促进了 *nnrR* 基因的表达 (图 8 D), 表明 Cu 与氟苯尼考对该调控基因存在协同作用, 然而它们对 *ntrX* 存在拮



各图中, 柱子上方凡是具有一个相同小写字母者, 表示差异不显著 ($P>0.05$, 单因素方差分析)
In each figure, the same lowercase letters above the column indicate that the difference is not significant ($P>0.05$, one-way ANOVA)

图 7 菌株 RpEC2071 的生物膜基因表达比较
Fig. 7 Expression comparison of biofilm gene of strain RpEC2071

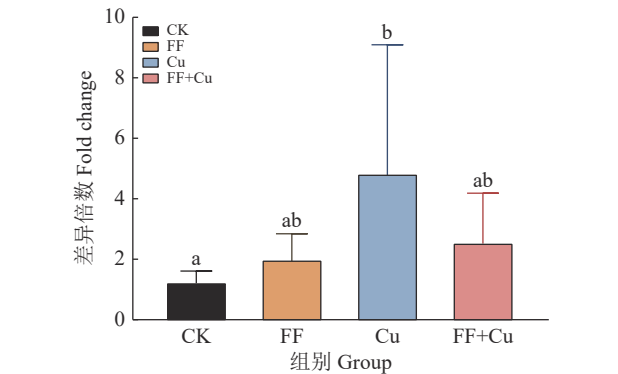


各图中, 柱子上方凡是具有一个相同小写字母者, 表示差异不显著 ($P>0.05$, 单因素方差分析)
In each figure, the same lowercase letters above the column indicate that the difference is not significant ($P>0.05$, one-way ANOVA)

图 8 菌株 RpEC2071 的氮代谢调控基因表达比较
Fig. 8 Expression comparison of nitrogen metabolism regulation gene of strain RpEC2071

抗作用。

对固氮菌中重要固氮酶的代表基因 *nifH* 进行差异性分析, 结果如图 9 所示。其中 Cu 的添加显著升高了 *nifH* 基因的表达, 而 Cu 与氟苯尼考联用时又减弱该过程。



图中柱子上方凡是具有一个相同小写字母者, 表示差异不显著 ($P>0.05$, 单因素方差分析)
In the figure, the same lowercase letters above the column indicate that the difference is not significant ($P>0.05$, one-way ANOVA)

图 9 菌株 RpEC2071 的固氮基因 *nifH* 表达比较
Fig. 9 Expression comparison of nitrogen fixation gene *nifH* of strain RpEC2071

3 讨论与结论

生物膜有助于细菌承受饥饿、干燥等恶劣环境条件, 使其能够适应变化的条件, 在其面对环境压力、免疫反应和抗生素时提供保护性环境^[14]。本研究结果表明, 4 种不同处理对生物膜的影响不同, FF 组生物膜形成能力最强, Cu 组次之, 说明在氟苯尼考和 Cu 单独加入时, 均对固氮菌产生压力, 且氟苯尼考对固氮菌的胁迫压力较大, 使固氮菌在胁迫环境下形成生物膜以保护自身, 与冯世文等^[15]的研究结果相符, 而在氟苯尼考和 Cu 混合添加时则会抑制固氮菌生物膜的形成, 其原因本试验没有阐明, 可以做进一步的深入研究。与此同时, 结果显示随胁迫时间增加固氮菌生物膜形成能力也逐步增强, 说明细菌在暴露于压力条件下会产生更多的生物膜。

在 4 种不同处理下, 固氮菌胞外多糖的分泌量明显不同, 氟苯尼考组最高, 混合组最低, 与生物膜测定结果基本吻合, 亦与杜心恬等^[16]的研究结果相符, 说明胞外多糖是生物膜重要组成部分^[17], 并与生物膜形成紧密相关。进一步分析 Cu 组发现, 由于胞外多糖形成是细菌的主要防御机制之一^[18], 固氮菌在 Cu 的单一胁迫下会对胞外多糖的合成产生轻微抑制作用, 但不对生物膜的形成能力产生抑制作用, 此现象可从另一个方面说明, 胞外多糖的分

泌会影响生物膜的形成, 但不是其决定性因素, 可能与载体表面性质及环境因素等因素相关。

对 4 种不同处理下不同类型基因的表达进行相关性分析, 结果表明, 生物膜与胞外多糖无明显的相关性, 再次验证胞外多糖对生物膜的形成有影响作用, 但不是其决定性因素这一观点。进一步分析发现固氮酶基因 *nifH* 的表达可能受到 *ntrY*、*ntrX*、*glnK*、*nnrR* 这 4 种调控因子的调控, 并与 *flaF*、*fliL*、*flhA*、*fliQ* 这 4 种生物膜相关基因呈现正相关。此外, 4 种生物膜相关基因还与氮代谢调控基因 *ntrX* 呈现显著正相关, 这与 Li 等^[19]的研究结果相符。说明氮循环功能跟生物膜形成之间有明显的相关性, 故评价氮循环的功能过程不仅应关注其遗传潜力, 还应关注其生物膜的生理活性。

差异性分析中, 与Ⅲ型分泌系统中鞭毛蛋白转运有关的生物膜相关基因 *fliQ*^[20], 在氟苯尼考和 Cu 混合作用或者 Cu 单独作用下, 与氟苯尼考单独作用存在显著的差异, 说明氟苯尼考与 Cu 对该基因表达的影响差异较大, 且对其表达存在明显拮抗作用。Cu²⁺可能使固氮菌鞭毛组成紊乱, 进而削弱 RpoN2 因子功能, 导致 *fliQ* 基因表达下降^[21]; 而氟苯尼考对固氮菌的胁迫使得其鞭毛运动增强, 进而使得 *fliQ* 基因表达上升。同理, 二者对参与控制鞭毛和胞外多糖的 *ntrX* 基因的表达同样存在拮抗作用^[22]。*nifH* 是负责编码固氮酶铁蛋白的基因^[23], Cu 的添加显著提高了 *nifH* 的表达, 而氟苯尼考会削弱这一过程, 存在拮抗作用。Cu 蓄积对固氮菌产生不利影响, 脱毒过程会增加能源消耗和氮需求, 从而可能通过其共生作用促进 *nifH* 表达; 而氟苯尼考可能与 Cu 形成络合物, 降低 Cu 浓度, 故相较于 Cu 组, FF+Cu 组 *nifH* 表达减弱。与之相反, 分析氮代谢相关基因发现, 氟苯尼考与 Cu 混合后显著促进了反硝化作用中负责催化 NO 转化为 N₂O 的反硝化酶的调控基因 *nnrR* 的表达, 表明 Cu 与氟苯尼考对该调控基因存在协同作用, 可能是由于在氟苯尼考联合 Cu 的双重胁迫下迫使固氮菌需要更加快速地进行反硝化作用以保护自身, 进而使得 *nnrR* 的表达增加^[24-25]。

本文通过从花生根围土中分离出一株优势固氮菌, 以养殖业中被广泛使用的广谱类抗菌药物氟苯尼考和饲料添加剂 Cu 作为胁迫因子, 分别从表型水平和基因水平探究二者单独或联合处理对优势固氮菌产生的影响以及生物固氮主要功能基因分子响应特征。发现二者单独使用均会使固氮菌生物膜形成能力增强, 但联用时产生拮抗作用; 二者

对胞外多糖形成的影响与生物膜测定结果基本一致; 二者单独或联用均改变相关功能基因表达水平, 且对 *fliQ*、*nifH* 基因产生拮抗作用、对 *nnrR* 基因产生协同作用。氟苯尼考及 Cu 均影响着固氮菌生物膜的形成, 说明二者的存在威胁着土壤中固氮菌的生存, 长期以往将破坏环境土壤生态系统。

参考文献:

[1] 牛金利, 彭金菊, 明月月, 等. 氟苯尼考胁迫对土壤细菌耐药性的影响[J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(4): 95-98.

[2] CHOI J Y, KIM Y, KO E A, et al. *Acinetobacter* species isolates from a range of environments: Species survey and observations of antimicrobial resistance[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2012, 74(2): 177-180.

[3] 马驿, 彭金菊, 王芸, 等. 环丙沙星对土壤微生物量碳和土壤微生物群落碳代谢多样性的影响[J]. 生态学报, 2013, 33(5): 1506-1512.

[4] 呼秀智, 薛占永, 王绥华, 等. 氟苯尼考对土壤微生物活动影响研究[J]. 山东畜牧兽医, 2011, 32(2): 3-5.

[5] CAI L M, WANG Q S, LUO J, et al. Heavy metal contamination and health risk assessment for children near a large Cu-smelter in central China[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 650: 725-733.

[6] 施昊坤, 吴次芳, 张茂鑫, 等. 土地整治对工业区周边土壤微生物多样性和群落结构影响分析[J]. 环境科学学报, 2020, 40(1): 212-223.

[7] GAO M L, SONG W H, ZHOU Q, et al. Interactive effect of oxytetracycline and lead on soil enzymatic activity and microbial biomass[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2013, 36(2): 667-674.

[8] BAO Y Y, CHEN Q, MA W, et al. Influence of Fe addition on the accumulation of oxytetracycline in rice seedlings (*Oryza sativa* L.) growing in hydroponic and soil culture[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2018, 18(5): 1958-1970.

[9] WANG M, WU J, ZHOU T, et al. Effects of copper and florfenicol on *nirS*- and *nirK*-type denitrifier communities and related antibiotic resistance in vegetable soils[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 213: 112011.

[10] FALKOWSKI P G. Volution of the nitrogen cycle and its influence on the biological sequestration of CO₂ in the ocean[J]. *Nature*, 1997, 387(6630): 272-275.

[11] 鲁文茹, 刘广锋, 郭志勋, 等. 金银花、连翘对溶珊瑚弧菌及其生物膜活性的影响[J]. 广东药学院学报, 2014, 30(3): 297-300.

[12] 徐光域, 颜军, 郭晓强, 等. 硫酸-苯酚定糖法的改进与初步应用[J]. 食品科学, 2005, 26(8): 342-346.

[13] 邹晓蕾, 刘礼崔, 罗立新. 细菌总 RNA 提取方法的比较[J]. 现代食品科技, 2013, 29(8): 1948-1954.

[14] KARATAN E, WATNICK P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial

biofilms[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2009, 73(2): 310-347.

[15] 冯世文, 曾芸, 李军, 等. 细菌对氟苯尼考的耐药机制研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014(5): 52-54.

[16] 杜心恬, 宋馨, 刘欣欣, 等. 细菌胞外多糖生物合成转录调控因子研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(2): 573-581.

[17] BOGINO P C, DE LAS MERCEDES OLIVA M, SOR-ROCHE F G, et al. The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(8): 15838-15859.

[18] WANG D, XU A M, ELMERICH C, et al. Biofilm formation enables free-living nitrogen-fixing rhizobacteria to fix nitrogen under aerobic conditions[J]. *The ISME Journal*, 2017, 11(7): 1602-1613.

[19] LI S, PENG C, CHENG T, et al. Nitrogen-cycling microbial community functional potential and enzyme activities in cultured biofilms with response to inorganic nitrogen availability[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2019, 76: 89-99.

[20] YANG Z M, HAN Y L, MA Y, et al. Global investigation of an engineered nitrogen-fixing *Escherichia coli* strain reveals regulatory coupling between host and heterologous nitrogen-fixation genes[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 10913-10928.

[21] LI K H, WU G C, LIAO Y L, et al. RpoN1 and RpoN2 play different regulatory roles in virulence traits, flagellar biosynthesis, and basal metabolism in *Xanthomonas campestris*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2020, 21(7): 907-922.

[22] CALATRAVA M, NOGALES J, AMEZTOY K, et al. The *NtrY/NtrX* system of *Sinorhizobium meliloti* GR4 regulates motility, EPS I production, and nitrogen metabolism but is dispensable for symbiotic nitrogen fixation[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2017, 30(7): 566-577.

[23] HAO J, FENG Y, WANG X, et al. Soil microbial nitrogen-cycling gene abundances in response to crop diversification: A meta-analysis[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 838(4): 156621. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.156621.

[24] BUENO E, ROBLES E, TORRES M, et al. Disparate response to microoxia and nitrogen oxides of the *Bradyrhizobium japonicum* napEDABC, *nirK* and *norCBQD* denitrification genes[J]. *Nitric Oxide*, 2017, 68: 137-149.

[25] BUENO E, MANIA D, MESA S, et al. Regulation of the emissions of the greenhouse gas nitrous oxide by the soybean endosymbiont *Bradyrhizobium diazoefficiens*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(3): 1486. doi: 10.3390/ijms23031486.