



# 金霉素添加对有机培肥土壤中磷循环微生物介导的磷素转化和有效性的影响

尹江琴<sup>1,2</sup>, 李佳颖<sup>1,2</sup>, 刘顺莉<sup>1,2</sup>, 谢小雨<sup>1,2</sup>, 陈新平<sup>1,2,3,4</sup>, 郎明<sup>1,2,3,4\*</sup>

- 1 西南大学 资源环境学院, 重庆市土肥资源高效利用重点实验室, 重庆 400715
- 2 西南大学, 长江经济带农业绿色发展研究中心, 重庆 400715
- 3 西南大学, 西南山地绿色低碳重点实验室, 重庆 400715
- 4 西南大学, 农业科学研究院, 重庆 400715

尹江琴, 李佳颖, 刘顺莉, 谢小雨, 陈新平, 郎明. 金霉素添加对有机培肥土壤中磷循环微生物介导的磷素转化和有效性的影响[J]. 微生物学报, 2024, 64(10): 3980-3997.

YIN Jiangqin, LI Jiaying, LIU Shunli, XIE Xiaoyu, CHEN Xinping, LANG Ming. Effects of chlortetracycline addition on phosphorus transformation and availability mediated by phosphorus cycling microorganisms in soil applied with organic fertilizer[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(10): 3980-3997.

**摘要:** 【目的】探究不同浓度金霉素的添加对有机培肥土壤中参与无机磷溶解和有机磷矿化微生物群落特征及其介导的土壤磷素转化和有效性机制的影响。【方法】选取重庆市潼南区紫色土为基质土进行盆栽试验, 外源添加有机肥(鸡粪), 设置3个浓度的金霉素处理: 不添加金霉素(0.0 mg/kg, No-CTC), 低浓度金霉素(0.1 mg/kg, Low-CTC), 高浓度金霉素(4.0 mg/kg, High-CTC)处理, 在辣椒(‘辛香8号’)种植后第7天和第30天采集土样, 利用 Real-time qPCR、Illumina MiSeq 高通量测序技术, 结合基于生物有效性磷组分(biologically based phosphorus, BBP)的磷分级等方法, 探究不同浓度金霉素添加对无机磷溶解和有机磷矿化关键基因(分别为 *pqqC* 和 *phoD* 基因)细菌的群落特征及其介导的土壤磷素转化机制的影响。【结果】在第7天仅高浓度金霉素处理增加了土壤 Citrate-P 和 Enzyme-P 含量, 相对于未添加金霉素分别增加了 8.2%和 44.0%; 高、低浓度金霉素处理在第30天均增加了 Enzyme-P 含量, 相较于未添加金霉素处理分别增加了 65.6%和 44.0%。金霉素抑制了土壤碱性磷酸酶(alkaline

资助项目: 国家自然科学基金区域联合基金(U20A2047); 国家自然科学基金(32272800, 32002126); 重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2023NSCQ-MSX0507)

This work was supported by the Regional Joint Fund of National Natural Science Foundation of China (U20A2047), the National Natural Science Foundation of China (32272800, 32002126), and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTB2023NSCQ-MSX0507).

\*Corresponding author. E-mail: langming@swu.edu.cn

Received: 2024-04-27; Accepted: 2024-07-19; Published online: 2024-07-24

phosphatase, ALP)活性, 显著影响了含 *pqqC* 和 *phoD* 基因细菌的群落结构。基于 Mantel 检验结果表明, 第 7 天 Citrate-P 与含 *pqqC* 基因的优势物种假单胞菌属(*Pseudomonas*)、地嗜皮菌属(*Geodermatophilus*)和糖丝菌属(*Saccharothrix*)显著相关, 而含 *phoD* 基因的优势物种慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、剑菌属(*Ensifer*)和斯克尔曼氏菌属(*Skermanella*)与 Enzyme-P 显著相关, 随着处理时间的增加, 其相关性均减弱。含 *pqqC* 基因细菌群落的网络平均度(average degree)在第 7 天低浓度金霉素处理时增加, 高浓度时则降低, 在第 30 天高、低浓度金霉素处理下其网络平均度均降低; 然而, 含 *phoD* 基因细菌群落的网络平均度在第 7 天随金霉素浓度增加而减弱, 而第 30 天呈相反趋势。【结论】金霉素添加通过调控含 *pqqC* 和 *phoD* 基因细菌群落结构, 以及酸、碱性磷酸酶活性, 显著影响了土壤 Enzyme-P, 进而影响了土壤中磷素的形态和有效性。本研究加深了金霉素污染对土壤-植物系统中磷循环相关微生物群落变化的认识, 对抗生素施用下土壤中养分的高效利用提供科学依据。

关键词: 金霉素; 有机培肥; *pqqC* 基因; *phoD* 基因; 网络特征; 有机磷矿化; 无机磷溶解

## Effects of chlortetracycline addition on phosphorus transformation and availability mediated by phosphorus cycling microorganisms in soil applied with organic fertilizer

YIN Jiangqin<sup>1,2</sup>, LI Jiaying<sup>1,2</sup>, LIU Shunli<sup>1,2</sup>, XIE Xiaoyu<sup>1,2</sup>, CHEN Xinping<sup>1,2,3,4</sup>, LANG Ming<sup>1,2,3,4\*</sup>

1 Chongqing Key Laboratory of Efficient Utilization of Soil and Fertilizer Resources, College of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 Interdisciplinary Research Center for Agriculture Green Development in Yangtze River Basin, Southwest University, Chongqing 400715, China

3 Key laboratory of Low-carbon Green Agriculture in Southwestern, Southwest University, Chongqing 400715, China

4 Academy of Agricultural Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract: [Objective]** To explore the effects of different concentrations of chlortetracycline on the characteristics of microbial communities involved in inorganic phosphorus (Pi) dissolution and organic phosphorus (Po) mineralization in the soil applied with organic fertilizer, focusing on soil P transformation and availability. **[Methods]** The purple soil collected from Tongnan District of Chongqing was used for a pot experiment with the addition of chicken manure as the organic fertilizer. Three chlortetracycline treatments (No-CTC, Low-CTC, and High-CTC) were designed with the addition levels of 0.0, 0.1, and 4.0 mg/kg, respectively. The soil samples were collected on days 7 (D7) and 30 (D30) after pepper ('Xinxiang 8') was planted. Real-time qPCR and Illumina MiSeq high-throughput sequencing were employed to analyze the community characteristics of the bacteria carrying the key genes (*pqqC* and *phoD*) of Pi

dissolution and Po mineralization, respectively. Furthermore, the sequencing results and biologically based P (BBP) fractionation were employed to examine the effects of CTC addition on soil P transformation. **[Results]** High-CTC increased the content of Citrate-P and Enzyme-P by 8.2% and 44.0%, respectively, compared with No-CTC on D7. Low-CTC and High-CTC increased the content of Enzyme-P by 44.0% and 65.6%, respectively, compared with No-CTC on D30. The addition of CTC suppressed alkaline phosphatase (ALP) activity and affected the community structures of *pqqC* and *phoD*-harboring bacteria in the soil. The Mantel test results showed that Citrate-P was significantly associated with the dominant *pqqC*-carrying taxa *Pseudomonas*, *Geodermatophilus*, and *Saccharothrix* on D7. The dominant *phoD*-carrying taxa *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, and *Skermanella* exhibited notable correlations with Enzyme-P on D7, and such correlations weakened over time. The average degree of the community network of the bacteria carrying *pqqC* increased in the Low-CTC treatment and decreased in the High-CTC treatment on D7. The average degree of this network decreased in High-CTC and Low-CTC treatments on D30. The average degree of the community network of the bacteria carrying *phoD* decreased with the increase in CTC addition on D7, while this trend was opposite on D30. **[Conclusion]** The addition of CTC significantly affected soil Enzyme-P by regulating the community structure of *pqqC*- and *phoD*-carrying bacteria as well as acid phosphatase (ACP) and ALP activities, thereby affecting the P forms and availability in the soil. This study contributes to a deeper understanding of alterations in microbial communities associated with P cycling in the soil-plant system contaminated by CTC. Moreover, it lays a scientific foundation for enhancing nutrient utilization efficiency in the soil applied with antibiotics.

**Keywords:** chlortetracycline; application with organic fertilizer; *pqqC*; *phoD*; network characteristics; organic phosphorus mineralization; inorganic phosphorus dissolution

有机培肥是提高耕地质量的重要手段之一。在农业生产中，有机无机肥配施可抑制土壤中病原物的滋生，同时激活有益微生物群<sup>[1]</sup>，促进土壤团聚体的形成<sup>[2]</sup>，并通过提升土壤有机质含量<sup>[3]</sup>等途径提升土壤质量、提高土壤肥力，从而维持农业生态系统的生产力和可持续性。因此，合理配施有机肥是降低肥料投入，提高肥料养分利用率，促进农业可持续健康发展的关键措施。然而，施用有机肥会直接导致土壤中存在大量的抗生素<sup>[4]</sup>。中国位列全球抗生素产量之首，消费占比高达全球一半，是最

大的抗生素生产国和出口国。据报道，2020年中国抗生素需求量为13.8万t，其中兽用抗生素使用量达3.3万t<sup>[5]</sup>。Li等<sup>[6]</sup>对北京地区畜禽粪便中四环素类抗生素进行调查发现，土霉素、四环素、金霉素的检出率分别为100.0%、84.2%、99.0%，平均含量分别为2.1、0.4、2.5 mg/kg。Hou等<sup>[7]</sup>检测到天津地区施用了粪肥的农田土壤中的金霉素含量最高达10 967.1 μg/kg，抗生素的残留浓度远远超过了欧盟规定的100 μg/kg的阈值。总体来说，这些抗生素随畜禽粪肥等进入到土壤与河流等自然环境中，造成农田土

壤抗生素污染积累,对生态环境和人体健康构成了潜在的威胁。

金霉素(chlortetracycline, CTC)作为四环素类抗生素残留在土壤中会影响酶活性和微生物的群落组成。刘吉强等<sup>[8]</sup>研究表明,在种植油菜的土壤中添加四环素溶液,对土壤蛋白酶、脲酶、过氧化氢酶的活性具有阶段性的抑制作用。杨思德等<sup>[9]</sup>研究表明,在玉米种植体系中,随着金霉素浓度的增加,其对土壤中碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性抑制越来越明显。Zielezny 等<sup>[10]</sup>研究发现,金霉素在培养基中抑制了部分土壤细菌分离株的生长。Santás-Miguel 等<sup>[11]</sup>对金霉素在土壤细菌群落的毒性进行了 42 d 的研究发现,金霉素对细菌群落的生长有负效应,这种效应随培养时间的延长而减弱。Fang 等<sup>[12]</sup>研究了金霉素对土壤微生物群落的影响,结果发现 5 个潜在优势的金霉素耐药菌属:芽孢杆菌属(*Bacillus*)、放线杆菌属(*Actinobacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、棒杆菌属(*Corynebacterium*),这 5 个菌属的丰度随金霉素浓度增加而增加。然而 Song 等<sup>[13]</sup>发现,金霉素诱导了潮土中原生生物:链霉菌属(*Streptomyces*)、*Pseudomonas*、*Bacillus*、红球菌属(*Rhodococcus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)产生耐药性。总之,土壤中金霉素的存在抑制了酶活性,影响了土壤中微生物的群落结构以及特殊菌群的功能。土壤 C:N:P 是驱动微生物群落组成和限制生物地球化学循环的一个重要因素,目前关于金霉素与最重要的能量(C)和养分(N、P)循环相关的特定微生物类群的活性,以及微生物群落结构方面的信息比较匮乏,所以金霉素如何影响土壤中养分循环的微生物种群,并最终影响土壤 C:N:P 是至关重要的<sup>[14-15]</sup>,而且金霉素随着时间的变化特性仍需要进一步探究,因此,

探究金霉素添加随着时间对土壤养分循环有关的特定微生物组成及结构的影响,对于发挥土壤功能具有重要意义。

微生物能通过溶解无机磷和矿化有机磷过程获取磷<sup>[16]</sup>,土壤中磷素溶解以及矿化过程对微生物群落在驱动土壤磷素转化和调节磷素有效性方面发挥着至关重要的作用。此前,*pqq*和*pho*基因分别被确定为磷素溶解菌和磷素矿化菌的潜在生物学指标,土壤*pqqC*基因被普遍用作无机溶磷菌的有效标记基因,它有助于葡萄糖酸的产生,对于土壤无机磷溶解起着至关重要的作用<sup>[17]</sup>。Hu 等<sup>[18]</sup>研究发现,*pqqC*基因丰度与土壤中磷酸酶活性、玉米植株吸磷量和产量具有显著相关性,表明*pqqC*基因与土壤磷素的转化和吸收密切相关。有机磷矿化过程主要由含编码碱性磷酸酶基因(*phoD*)的微生物介导,研究发现在水稻体系中参与有机磷矿化过程的含功能基因*phoD*细菌的丰度和群落组成会直接影响土壤中的磷酸酶活性,进而影响土壤中磷的有效性<sup>[19]</sup>。因此,*pqqC*和*phoD*基因对于土壤磷循环具有重要意义,此外,目前金霉素对土壤磷循环相关的微生物类群的研究较少,对磷循环功能基因及磷循环功能微生物的影响机制暂不明确,因此探究金霉素施用如何对与磷循环有关的*pqqC*和*phoD*基因微生物群落产生影响的机理非常关键。

在本研究中,主要关注了金霉素对土壤中磷循环相关的微生物类群的影响,在有机培肥条件下研究低浓度金霉素和高浓度金霉素添加对作物生长、土壤性质、磷素形态的影响,并分析不同浓度、不同时期金霉素对土壤无机磷溶解功能微生物(*pqqC*)和有机磷矿化功能微生物(*phoD*)群落特征变化的影响,本研究有助于更加深入地理解金霉素对磷相关细菌群落生长情况的影响,这对于研究金霉素对土壤养分循环的影响具有

重要意义,为抗生素施用下土壤中养分的高效利用提供科学依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验地概况

盆栽试验于 2023 年 4–8 月在西南大学国家紫色土肥力与肥料效益监测基地温室大棚进行(29°48'45"N, 106°24'31"E)。选取重庆市潼南区紫色土,研磨风干过 5 mm 筛备用。土壤基本理化性质: pH 7.8, 土壤有机碳(soil organic carbon, SOC) 3.8 g/kg, 速效磷(available phosphorus, AP) 15.1 mg/kg, 全氮(total nitrogen, TN) 1.2 g/kg。鸡粪有机肥过 5 mm 筛,底肥为尿素(含 N 46%),供试磷、钾肥分别为过磷酸钙(含 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 12%)和硫酸钾(含 K<sub>2</sub>O 50%)。

### 1.2 试验设计

抗生素选取四环素类抗生素金霉素(chlortetracycline, CTC),购自 Sigma-Aldrich 公司。试验设计 3 个金霉素浓度水平,浓度分别设置为不添加金霉素(No-CTC: 0.0 mg/kg)、低浓度金霉素(Low-CTC: 0.1 mg/kg)、高浓度金霉素(High-CTC: 4.0 mg/kg),供试作物为辣椒(品种为‘辛香 8 号’),育苗后待辣椒长至 6 叶期进行移栽,挑选长势均匀的辣椒幼苗,辣椒根系去除基质,蒸馏水清洗后移栽于盆钵。

试验采用塑料盆钵,内径 22 cm,每盆装土 4 kg。配制不同浓度金霉素标液,将风干土平铺于塑料布上,用喷雾器喷洒不同浓度的金霉素标液,同时不断翻搅,使土壤与金霉素充分混匀。加蒸馏水调节处理后的土壤含水量,水的质量分数为 65%,随后装入培养盆中。选择生长状况相同的辣椒幼苗进行移栽,每盆 3 株,每个处理 4 个重复,共计 12 盆。作物生长期定期浇水,使土壤田间持水量保持在 65%左右。

### 1.3 土壤样品采集及分析

盆栽试验开始后在第 7 天采集土壤样品,第 30 天采集土壤样品、植株样品。用 20 mm 孔径土钻采集盆栽中的土样,将同一个盆栽中采集到的土壤充分混匀即为一个样本,部分土样置于通风处风干,磨碎,过筛用于后续理化测定,部分土样放 -20 °C 保存。

### 1.4 土壤理化因子及磷酸酶测定

土壤 pH 值采用酸度计法测定,水土比为 2.5:1;土壤有机质采用重铬酸钾容量法测定;土壤速效磷采用钼锑抗比色法测定;土壤全氮采用凯氏定氮法测定<sup>[20]</sup>。土壤磷素分级采用结合基于生物有效性磷组分的磷分级方法(biologically based phosphorus, BBP)<sup>[21]</sup>。有 4 种不同的磷形态,分别为 CaCl<sub>2</sub>-P (氯化钙提取态磷)模拟自由扩散和根基截留的磷; Citrate-P (柠檬酸提取磷)模拟可被有机酸活化和无机酸弱结合的无机磷(包括 Ca-P、Al-P 和 Fe-P); Enzyme-P (酶提取态磷)模拟酶矿化的有机磷; HCl-P (盐酸提取态磷)模拟难利用磷库。土壤酸性磷酸酶和碱性磷酸酶分别参照土壤酸性磷酸酶(S-ACP)试剂盒及土壤碱性磷酸酶(S-AKP/ALP)测试盒说明书测定(苏州梦犀生物医药科技有限公司)。

### 1.5 土壤总 DNA 提取

参照 FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Bio 公司)说明书提取土壤总 DNA,然后取适量样品进行检测,进行琼脂糖凝胶电泳以检验 DNA 提取质量。使用 NanoDrop 2000 核酸检测仪(NanoDrop Technologies 公司)测定所提 DNA 样品浓度及纯度。

### 1.6 *pqqC* 与 *phoD* 功能基因实时荧光定量

采用 Real-time qPCR 法检测样本中 *pqqC* 与 *phoD* 基因的绝对含量。使用引物 *ApqqCF* (5'-AACCGCTTCTACTACCAG-3')和 *ARpqqCR* (5'-GCGAACAGCTCGGTCAG-3')<sup>[22]</sup>扩增 *pqqC*

基因, 扩增片段大小为 306 bp。PCR 反应体系 (20  $\mu$ L): 2 $\times$ ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix 10  $\mu$ L (南京诺唯赞生物科技股份有限公司), 正、反向引物(5  $\mu$ mol/L)各 0.8  $\mu$ L, 50 $\times$ ROX Reference Dye II 0.4  $\mu$ L, DNA 2  $\mu$ L, 灭菌水(ddH<sub>2</sub>O) 6  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 3 min; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 58  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 共 40 个循环。使用引物 ALPs-F730 (5'-CAGTGGGACGACCAC GAGGT-3')和 ALPs-1101 (5'-GAGGCCGATCGG CATGTCG-3')扩增<sup>[23]</sup> *phoD* 基因, 扩增片段大小为 371 bp。PCR 反应体系(20  $\mu$ L): 2 $\times$ ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix (南京诺唯赞生物科技股份有限公司) 10  $\mu$ L, 正、反向引物 (5  $\mu$ mol/L)各 0.8  $\mu$ L, 50 $\times$ ROX Reference Dye II 0.4  $\mu$ L, DNA 2  $\mu$ L, 灭菌水(ddH<sub>2</sub>O) 6  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 3 min; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 58  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 共 40 个循环。

### 1.7 土壤含 *pqqC* 与含 *phoD* 功能基因细菌群落 Illumina MiSeq 测序

使用 1%琼脂糖凝胶回收 PCR 产物, 随后采用 DNA 凝胶提取试剂盒(Axygen Biosciences 公司)进行纯化, 以 Tris-HCl 缓冲液洗脱, 最后以 2%琼脂糖电泳检测。使用 Illumina MiSeq 平台进行高通量测序, Illumina 测序得到的原始测序序列使用 fastp (v0.19.6)软件根据测序质量对双端 reads 进行质控和过滤质控, 同时根据双端 reads 之间的 overlap 关系使用 FLASH (v1.2.7)软件进行拼接, 获得质控拼接之后的优化数据。然后使用序列降噪方法(DADA2/Deblur 等)处理优化数据, 获得扩增子序列变体(amplicon sequence variant, ASV)代表序列和丰度信息。采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 ASV 代表序列进行分类学分析, 获得 ASV 在分类水平的注释信息, 原始数据提交到 NCBI 数据库, 序列号为 PRJNA1104379。

### 1.8 数据分析

数据统计使用 Excel 2016 进行, 土壤理化等数据 Spearman 相关性分析、多因素方差分析、显著性检验基于 SPSS (v20)分析软件和 R (v4.1.1)分析软件。细菌群落的  $\alpha$  多样性基于 ASV 丰度矩阵计算细菌群落的香农指数。细菌群落结构基于 Bray-Curtis 在 ASV 水平上进行主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)。

用相对丰度>0.01%的 ASV 构建网络, 并通过 SparCC 相关矩阵计算相关系数; 对相关数据进行过滤, 将相关阈值为 0.8 且  $P<0.05$  数据进行网络构建, 之后通过 Gephi 软件可视化, 进而计算网络拓扑性质, 包括节点数、连接数、节点度、网络密度、聚类系数等。其中网络中节点的大小与节点度成比例呈现, 将网络节点排序前 10 的微生物类群作为关键类群。将细菌属水平上相对丰度排名前 10 的物种定义为优势类群。

## 2 结果与分析

### 2.1 金霉素对土壤理化性状的影响

同一时期内不同浓度的金霉素添加对土壤 pH 值无显著影响(图 1A)。土壤全氮含量仅在第 30 天时 High-CTC 显著高于 No-CTC 和 Low-CTC 处理, 相较于 No-CTC 和 Low-CTC 处理均增加了 20.3%(图 1B)。在第 7 天 High-CTC 的土壤速效磷含量相较于 No-CTC 增加了 16.6%, 而在第 30 天 High-CTC 的土壤速效磷含量相较于 No-CTC 增加了 26.6%, 在两个采样时期 No-CTC 处理速效磷含量均最低, 表明金霉素添加增加了土壤 AP 含量(图 1C)。土壤有机碳含量在第 7 天金霉素处理有增加趋势, 第 30 天 High-CTC 处理相较于 Low-CTC 增加了 16.1%(图 1D)。

### 2.2 金霉素对土壤磷素形态的影响

四种形态磷素组分含量由高到低为

Citrate-P、HCl-P、Enzyme-P、CaCl<sub>2</sub>-P。其中 Citrate-P 为活性无机磷，含量较高，HCl-P 为难溶磷组分，Enzyme-P 为活性有机磷组分，CaCl<sub>2</sub>-P 为土壤中水溶性磷组分，与其他组分相比含量较低。从采样时期上看，CaCl<sub>2</sub>-P、Citrate-P 和 Enzyme-P 这 3 种磷素组分随采样时期增加含量显著降低，而 HCl-P 含量在第 7 天不受金霉素添加影响，在第 30 天 High-CTC 处理较 No-CTC 降低了 30.0% (图 2)。其中 CaCl<sub>2</sub>-P 含量在第 7 天不受金霉素处理影响，第 30 天仅 Low-CTC

处理的 CaCl<sub>2</sub>-P 含量较 No-CTC 增加了 44.8%，而 High-CTC 处理较 No-CTC 和 Low-CTC 处理变化不显著；Citrate-P 含量在第 7 天 High-CTC 处理中显著高于 No-CTC 和 Low-CTC 处理，其含量分别增加了 8.2%和 7.6%。第 30 天金霉素添加对 Citrate-P 含量无显著影响；在第 7 天 High-CTC 的 Enzyme-P 含量相对于 No-CTC 增加了 44.0%，第 30 天 Low-CTC 和 High-CTC 的 Enzyme-P 含量较 No-CTC 分别增加了 44.0%和 65.6%。

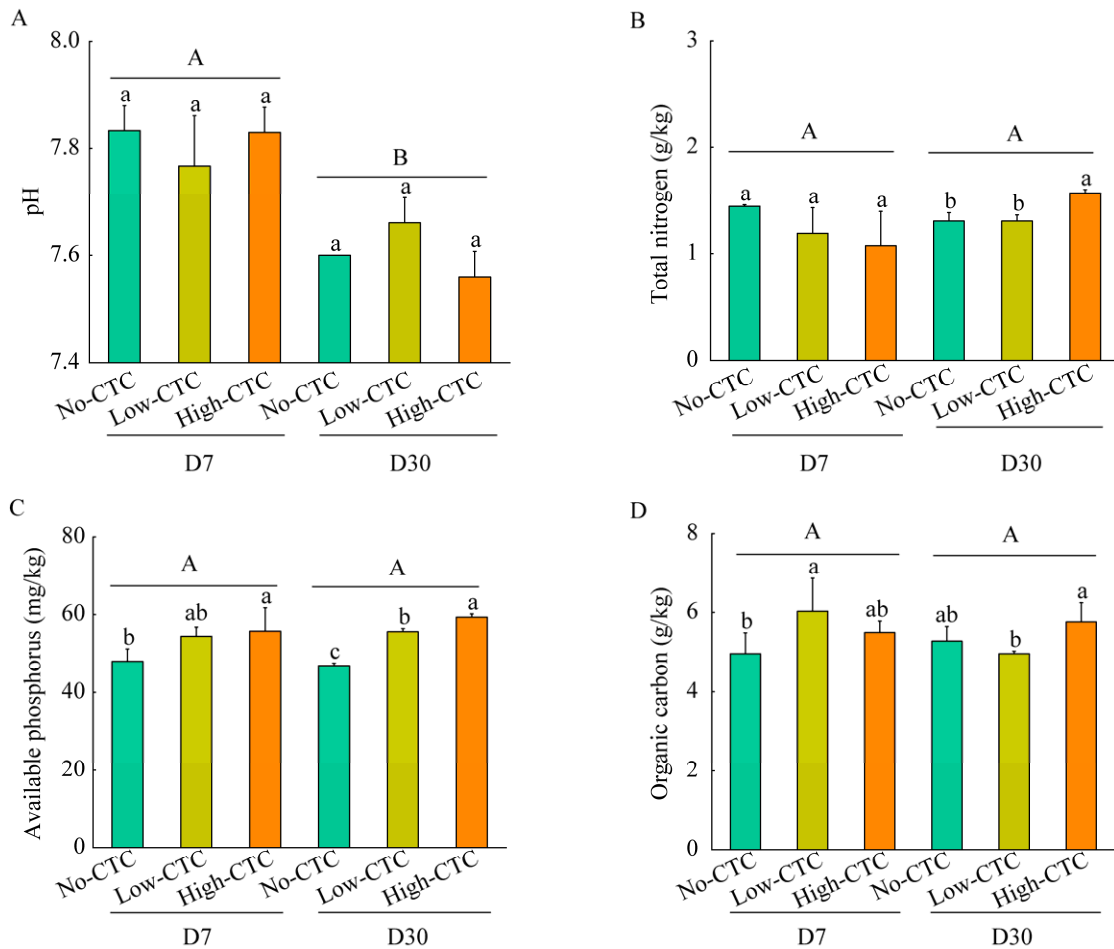


图 1 金霉素添加对土壤基础理化性质的影响

Figure 1 Effect of different periods of growth and CTC concentration on soil basic physical and chemical properties soil. A: pH. B: Total nitrogen. C: Available phosphorus. D: Organic carbon. Different capital letters (A, B) indicate the significant difference among the different sampling time, different lowercase letters (a, b, ab) above bars indicate the significant difference among the different concentrations of antibiotics at the same sampling time ( $P < 0.05$ ).

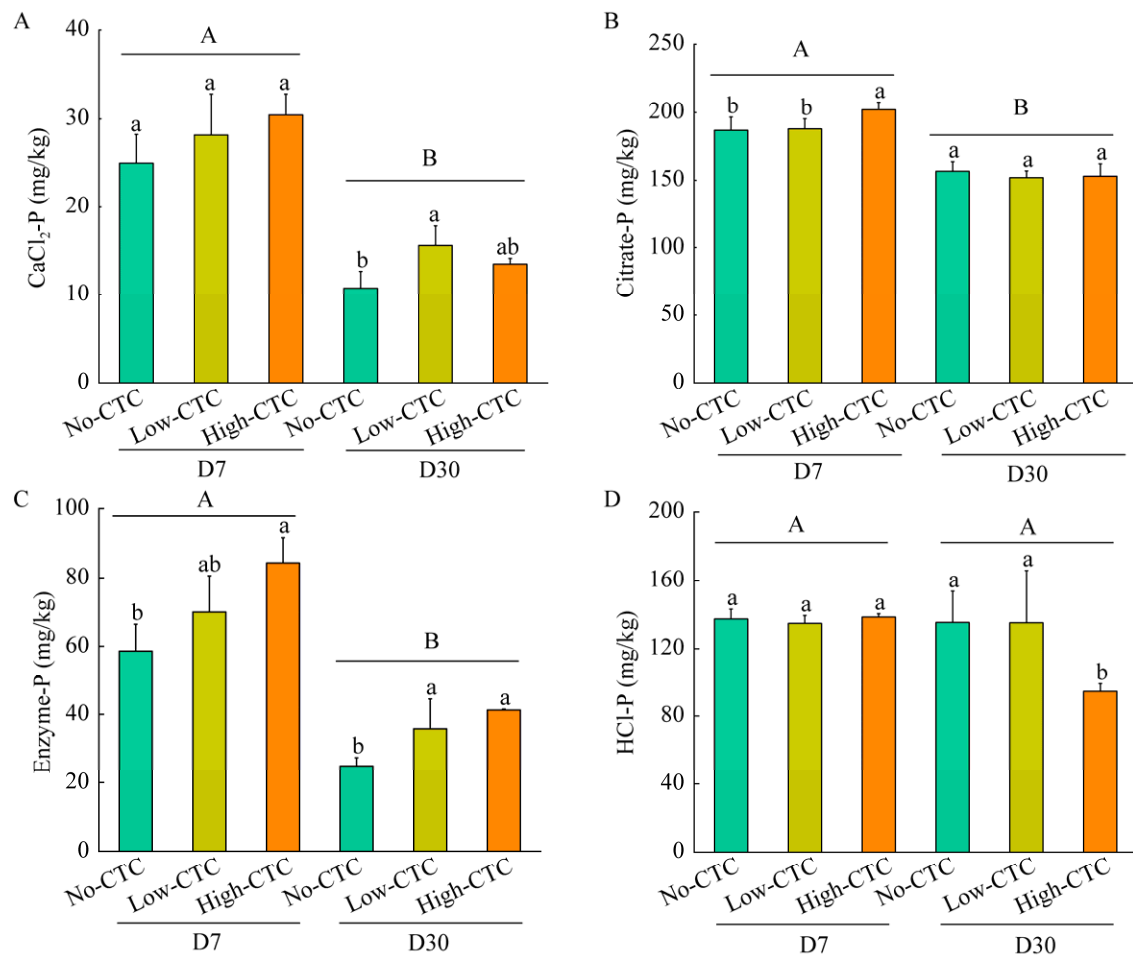


图 2 金霉素添加对土壤不同磷素形态的影响

Figure 2 Effect of different periods of growth and CTC concentration on different phosphorus forms in soil. A: CaCl<sub>2</sub>-P. B: Citrate-P. C: Enzyme-P. D: HCl-P. Different capital letters (A, B) indicate the significant difference among the different sampling time, different lowercase letters (a, b, ab) above bars indicate the significant difference among the different concentrations of antibiotics at the same sampling time ( $P < 0.05$ ).

### 2.3 金霉素对土壤碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性的影响

金霉素处理对碱性磷酸酶的影响大于酸性磷酸酶(图 3), 在第 7 天 Low-CTC 和 High-CTC 处理中碱性磷酸酶活性均显著低于 No-CTC, 分别降低了 35.0%、16.3%。在第 30 天 Low-CTC 和 High-CTC 的碱性磷酸酶活性较 No-CTC 分别降低了 14.6%、20.6%。酸性磷酸酶活性在第 7 天 Low-CTC 处理显著低于 No-CTC, 降低

了 37.5%, 第 30 天金霉素处理对酸性磷酸酶活性影响不大。

### 2.4 金霉素对含 *pqqC* 和 *phoD* 细菌丰度和群落特征的影响

#### 2.4.1 金霉素对 *pqqC* 和 *phoD* 基因拷贝数、 $\alpha$ 多样性的影响分析

Low-CTC 和 High-CTC 处理在第 7 天或第 30 天对 *pqqC* 基因拷贝数、*phoD* 基因拷贝数影响均不显著(图 4A、4B)。



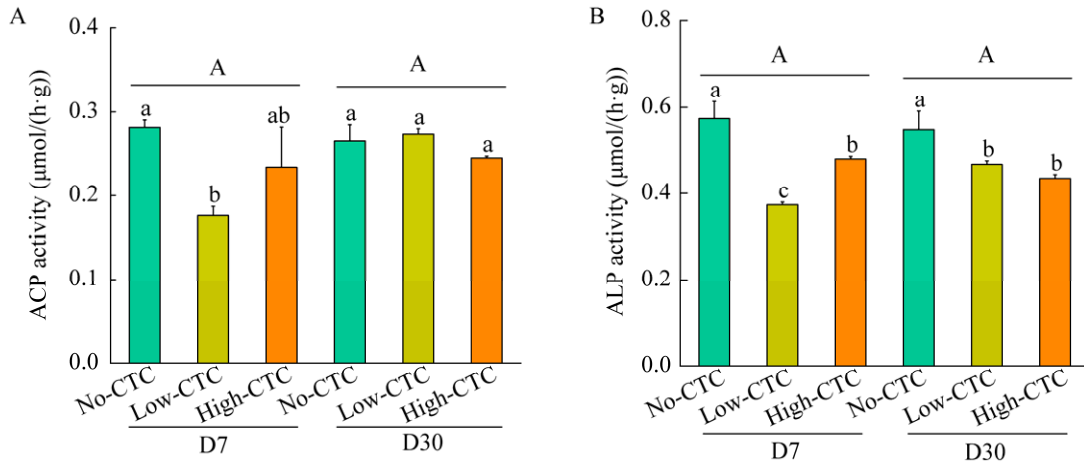


图3 金霉素添加对土壤磷酸酶活性的影响

Figure 3 Effect of different periods of growth and CTC concentration on phosphatase. A: Acid phosphatase (ACP) activity. B: ALP activity. Different capital letters indicate the significant difference among the different sampling time, different lowercase letters above bars indicate the significant difference among the different concentrations of antibiotics at the same sampling time ( $P < 0.05$ ).

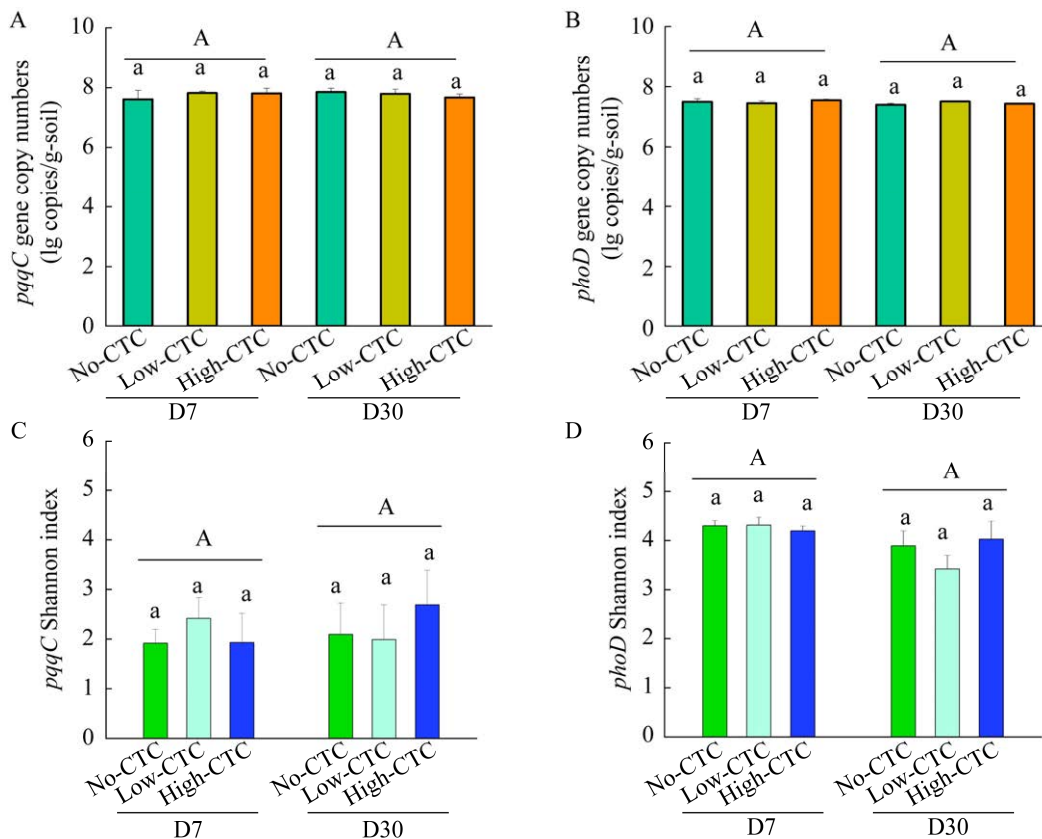


图4 不同采样时期金霉素添加对 *pqqC* (A)和 *phoD* (B)基因拷贝数及香农指数(C、D)的影响

Figure 4 Effect of different periods of growth and CTC concentration on *pqqC* (A) and *phoD* (B) gene copy numbers, and Shannon index (C, D). Different capital letters indicate the significant difference among the different sampling time, different lowercase letters above bars indicate the significant difference among the different concentrations of antibiotics at the same sampling time ( $P < 0.05$ ).

用香农指数表征含 *pqqC* 和 *phoD* 基因细菌群落  $\alpha$  多样性(图 4C、4D)。Low-CTC 和 High-CTC 添加在第 7 天和第 30 天对含 *pqqC* 和 *phoD* 基因细菌群落  $\alpha$  多样性影响均不显著。

#### 2.4.2 金霉素对土壤中含 *pqqC* 和 *phoD* 基因细菌群落结构的影响分析

基于 Bray-Curtis 距离进行主坐标分析, 结果发现金霉素处理在两个采样时期显著影响含 *pqqC* 细菌群落结构(Adonis:  $R^2=0.34$ ,  $P<0.01$ )。No-CTC 处理第 7 天与第 30 天明显聚类, High-CTC 处理在第 7 天与第 30 天分别聚类, Low-CTC 处理在第 7 天或第 30 天均介于 No-CTC 和 High-CTC 处理之间, 无明显聚类(图 5A)。

金霉素处理在两个采样时期显著影响含 *phoD* 细菌群落结构(Adonis:  $R^2=0.46$ ,  $P<0.01$ )。No-CTC 处理在第 7 天或第 30 天沿 PC2 轴明显聚类, High-CTC 处理在第 7 天与第 30 天分别聚类, Low-CTC 处理在第 7 天或第 30 天均沿 PC2 轴介于 No-CTC 和 High-CTC 处理之间(图 5B)。

#### 2.4.3 金霉素对土壤中含 *pqqC* 和 *phoD* 基因细菌群落组成、网络互作特征的影响分析

在属水平(图 6A), 假单胞菌属(*Pseudomonas*)、

红色杆形菌属(*Rubrobacter*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)、地嗜皮菌属(*Geodermatophilus*)、食烷菌属(*Alcanivorax*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、假桃红杆菌属(*Pseudopuniceibacterium*)、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)、根瘤杆菌属(*Rhizobacter*)、中华根瘤菌属(*Sinorhizobium*)是金霉素处理中含 *pqqC* 细菌的优势细菌类群。其中 *Pseudomonas* 属在第 7 天随金霉素浓度增加相对丰度增加( $P<0.05$ ), 而 *Geodermatophilus* 属、*Pseudonocardia* 属在 Low-CTC 以及 High-CTC 处理的相对丰度受到显著抑制( $P<0.05$ )。

在属水平(图 6B), 慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、*Sinorhizobium*、剑菌属(*Ensifer*)、中慢生根瘤菌属(*Mesorhizobium*)、假双斧状菌属(*Pseudolabrys*)、红游动菌属(*Rhodoplanes*)、张成刚菌属(*Chenggangzhangella*)、*Pseudomonas*、斯克尔曼氏菌属(*Skermanella*)是金霉素处理中含 *phoD* 细菌的优势属。其中 *Ensifer* 属在第 7 天随金霉素浓度增加相对丰度增加( $P<0.05$ ), 而 *Bradyrhizobium* 属变化趋势与之相反, 在 Low-CTC 和 High-CTC 处理中受到显著抑制( $P<0.05$ )。第

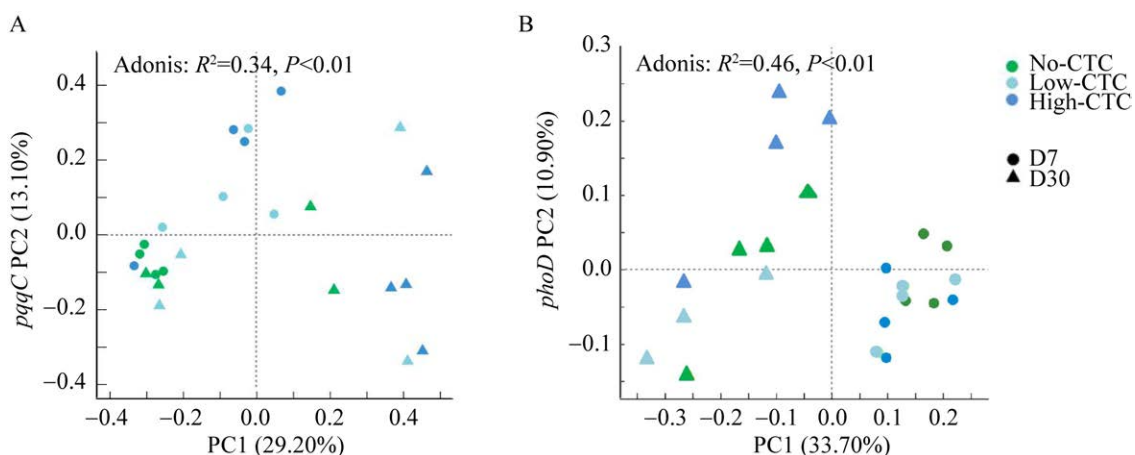


图 5 金霉素添加在不同采样时期的主成分分析

Figure 5 PCoA analysis of *pqqC* and *phoD* harboring bacterial communities of different periods of growth and CTC concentration. A: *pqqC*. B: *phoD*.

30 天金霉素处理对 *Pseudolabrys*、*Sinorhizobium* 和 *Pseudomonas* 属影响显著( $P<0.05$ ),其中 *Pseudolabrys* 属在 Low-CTC 处理丰度最高; *Sinorhizobium* 属在 No-CTC 处理丰度最高, 在 Low-CTC 处理丰度最低; *Pseudomonas* 属在 No-CTC 处理丰度显著高于 Low-CTC 和 High-CTC 处理。

网络拓扑参数显示, Low-CTC 和 High-CTC 处理在第 7 天和第 30 日均降低了含 *pqqC* 基因细菌群落的网络复杂度, 具体表现为第 7 天 No-CTC、Low-CTC、High-CTC 处理平均度 (average degree) 分别为 1.421、1.436、1.280, High-CTC 处理网络复杂度最低(图 7A–7C)。第 30 天 No-CTC、Low-CTC、High-CTC 处理平均度分别为 1.917、1.450、1.615, Low-CTC 网络复杂度最低(图 7D–7F)。

金霉素影响了含 *phoD* 细菌群落的网络互动, 网络拓扑参数显示, Low-CTC 和 High-CTC 处理在第 7 日均降低了含 *phoD* 基因细菌群落的网络复杂度。具体表现为第 7 天随金霉素浓度增加网络平均度降低: No-CTC (3.656)>Low-CTC (3.457)>High-CTC (3.054) (图 7G–7I)。第 30 天含 *phoD* 细菌群落的网络的复杂度在 High-CTC

处理最高, Low-CTC 处理最低, 具体表现为平均度: High-CTC (3.011)>No-CTC (2.844)>Low-CTC (2.676)(图 7J–7L)。

#### 2.4.4 含 *pqqC* 及 *phoD* 基因细菌群落优势物种与不同形态磷的相关性分析

将相对丰度前十的菌属定为优势物种, 由于 Citrate-P 是可以被有机酸活化或结合的无机磷, 可以与 *pqqC* (无机磷溶解微生物) 关联, Enzyme-P 是模拟酶矿化的有机磷, 这可以与 *phoD* (有机磷矿化微生物) 关联, 所以分别选择 Enzyme-P 与 Citrate-P 结合速效磷(AP)含量与含 *pqqC* 及 *phoD* 基因细菌群落的优势物种进行蒙特检验。结果发现, 对于含 *pqqC* 基因的细菌, 第 7 天 Citrate-P 与 *Pseudomonas*、地嗜皮菌属(*Geodermatophilus*)、糖丝菌属(*Saccharothrix*) 显著相关, AP 与 *Geodermatophilus* 极显著相关; 第 30 天无菌属与 Citrate-P 有显著相关性, *Geodermatophilus* 与 AP 有显著相关性。含 *phoD* 基因的优势菌属中, 第 7 天 Enzyme-P 与 *Bradyrhizobium*、*Ensifer*、*Skermanella* 显著相关, 且均属于变形菌门, 而 AP 无菌属与其有显著相关性; 而第 30 天无菌属与 Enzyme-P 和 AP 有显著相关性(图 8)。

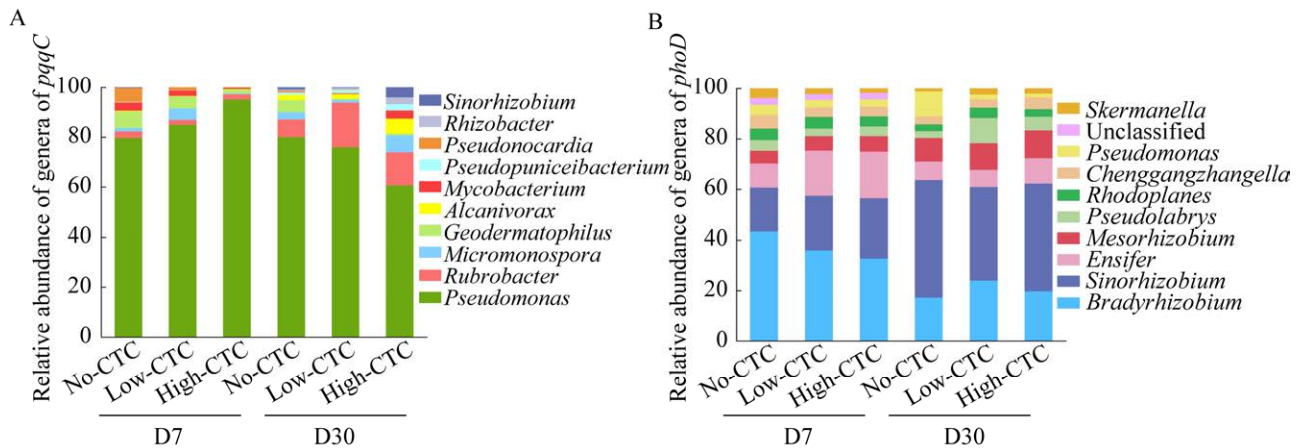


图 6 金霉素添加对含 *pqqC* 和 *phoD* 细菌属水平群落组成分析(相对丰度>0.01)

Figure 6 Effect of different periods of growth and CTC concentration of the *pqqC* and *phoD* harboring bacterial community composition on genus level (relative abundance>0.01). A: *pqqC*. B: *phoD*.

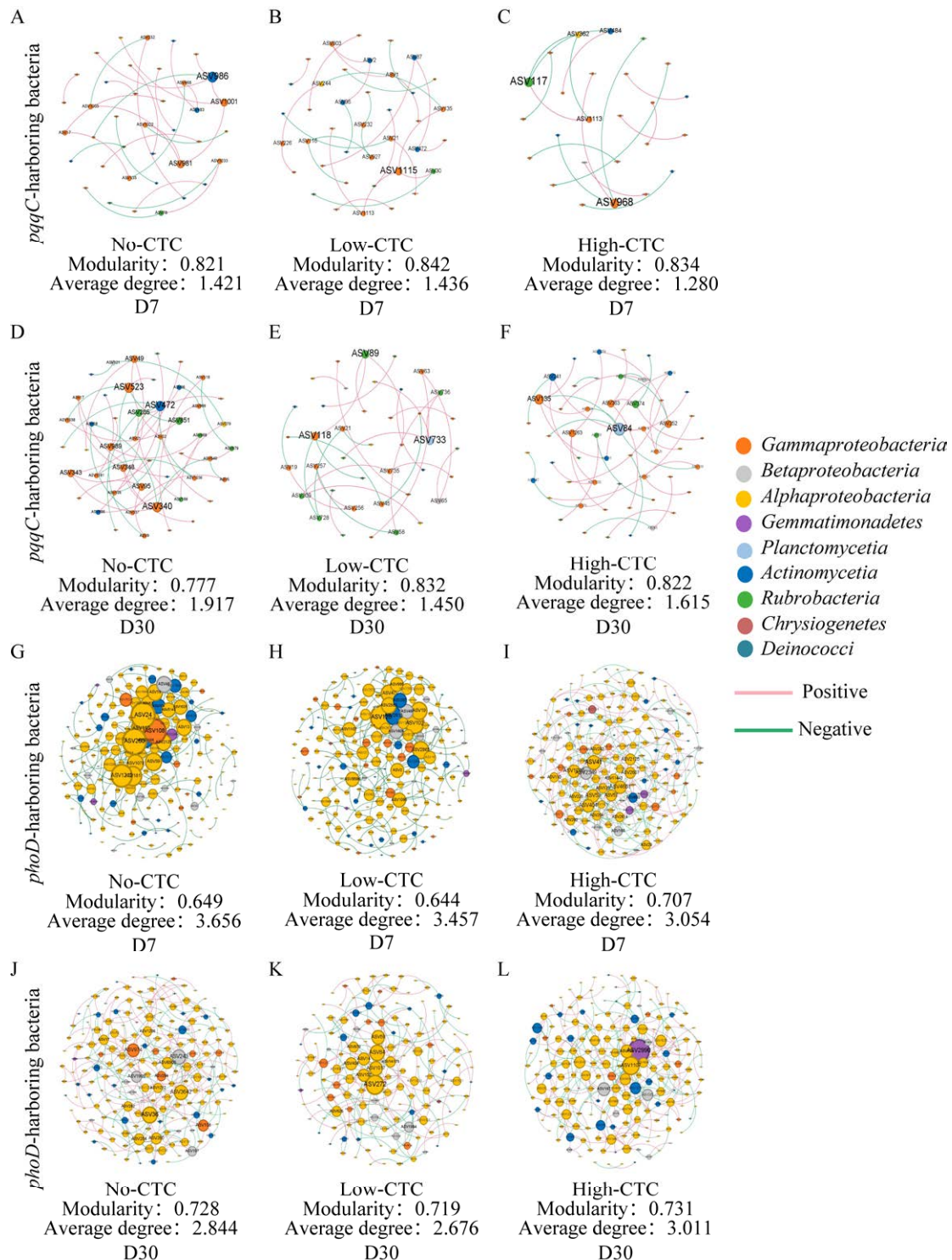


图 7 金霉素添加在不同时期对含 *pqqC* 基因和 *phoD* 基因细菌群落的网络互作关系

Figure 7 Microbial interaction network of *pqqC*-harboring and *phoD*-harboring bacterial community under different periods of growth and CTC concentration. The network of *pqqC*-harboring bacterial of No-CTC (A), Low-CTC (B), High-CTC (C) on D7. The network of *pqqC*-harboring bacterial of No-CTC (D), Low-CTC (E), High-CTC (F) on D30. The network of *phoD*-harboring bacterial of No-CTC (G), Low-CTC (H), High-CTC (I) on D7. The network of *phoD*-harboring bacterial of No-CTC (J), Low-CTC (K), High-CTC (L) on D30.

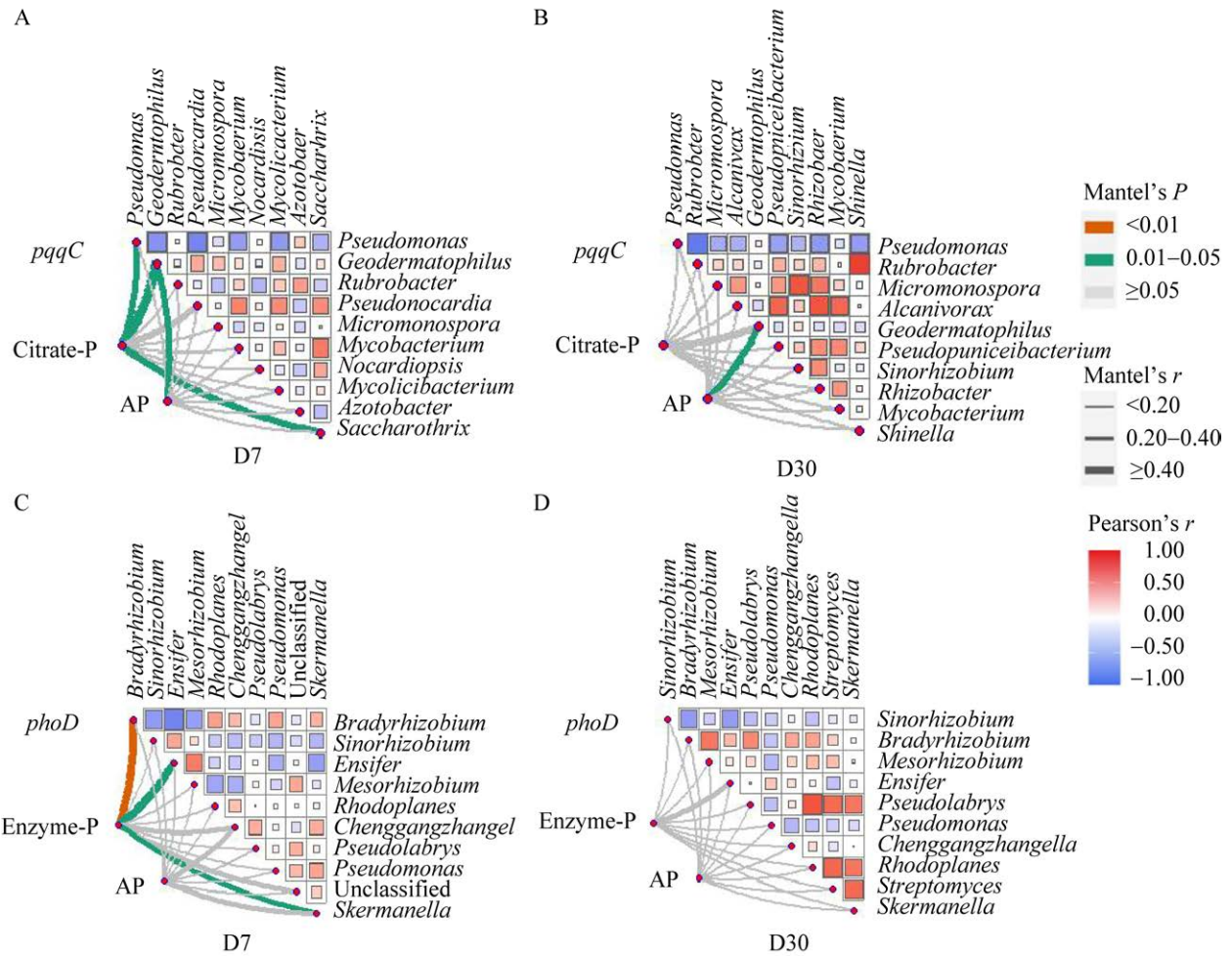


图 8 不同时期金霉素添加条件下不同磷形态、速效磷含量与含 *pqqC* 和 *phoD* 细菌优势属(相对丰度前 10)之间的蒙特检验

Figure 8 Mantel test between different phosphorus forms, available phosphorus content and *pqqC* and *phoD* bacteria dominant genera (relative abundance top 10) under different periods of CTC addition conditions. A: The Mantel test of *pqqC*-harboring bacterial on D7. B: The Mantel test of *pqqC*-harboring bacterial on D30. C: The Mantel test of *phoD*-harboring bacterial on D7. D: The Mantel test of *phoD*-harboring bacterial on D30.

### 3 讨论

#### 3.1 金霉素的添加对有机培肥土壤中磷的形态和有效性的影响

本研究中难利用 HCl-P 组分受金霉素添加影响较小, 而金霉素添加后期土壤活性有机磷 (Enzyme-P) 含量增加, 这可能是随着金霉素浓度的添加, 抑制了碱性磷酸酶活性有关。碱性磷酸酶活性 (ALP) 在不同采样时期受金霉素添加影响

活性降低, 从而影响有机磷的转化, 因此

Enzyme-P 含量在磷酸酶活性较低的处理中累积。Liu 等<sup>[24]</sup>报道了不同浓度 (1–300 mg/kg) 金霉素对磷酸酶活性有抑制作用, 抑制率高达 30%; 李梦云<sup>[25]</sup>报道了随着金霉素浓度 (0.1–40 mg/L) 及作用时间 (0–96 h) 的增加, 碱性磷酸酶活性逐渐降低, 这均与本研究结果相似。本研究的结果还发现, 金霉素的添加抑制了 ALP 活性, 但土壤中 AP 含量增加, 这与之前的研究发现 AP 的含

量在添加四环素后显著降低相反<sup>[26]</sup>。对水稻体系以及冬小麦-夏玉米轮作体系下的研究中均发现, 土壤中的 AP 含量与 ALP 活性呈显著正相关<sup>[27-28]</sup>, 表明土壤中除了 ALP 之外, 可能还有其他因素的影响使得 AP 含量不降反升, 比如有机肥的施用、作物类型、土壤类型等, 综合影响土壤中的 AP 含量。另外, 研究发现在施用金霉素第 7 天后对酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)活性有显著抑制作用, 然而在施用金霉素第 30 天后对酸性磷酸酶活性并无显著影响, 表明随着时间的延长, 金霉素的添加对土壤中酶活性的影响减弱, 这与曾悦等<sup>[29]</sup>发现抗生素在土壤中的存留时间越长对土壤微生物的影响越弱相似, 可能是由于随着时间的增加, 一些降解金霉素的细菌在长期暴露于金霉素的选择性压力下被诱导和增殖<sup>[30]</sup>, 导致金霉素在土壤中发生了降解, 并且土壤微生物对金霉素产生了适应和抗性<sup>[31-33]</sup>, 使得对酸性磷酸酶(ACP)活性抑制作用减小。

### 3.2 金霉素添加对有机培肥土壤磷循环微生物群落特征及土壤磷素转化和有效性的影响

土壤中磷的有效性是制约作物高产的关键因素之一<sup>[34]</sup>, 而有机肥的施用提高了土壤中参与磷循环的微生物的活性和丰度, 可以重塑参与磷循环细菌群落的结构, 从而加快土壤中磷循环、增加磷有效性<sup>[35]</sup>。同时, 有机肥的施用也带来了另一个问题, 即抗生素污染。前人研究发现向土壤中添加土霉素(160  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )对 *phoD* 基因丰度无显著影响, 与之前的研究发现四环素(50  $\text{mg}/\text{kg}$ )胁迫降低了与细菌有关的磷功能基因的丰度不同, 我们的研究发现在不同浓度金霉素处理下, 不同采样时期对含 *pqqC*、*phoD* 基因细菌的拷贝数和群落的  $\alpha$  多样性无显著影响, 这与研究发现添加四环素对大豆植株根际细菌群落的  $\alpha$  多样性(Shannon 指数和 Chao1 指数)

无显著影响一致<sup>[15,36]</sup>, 可能是因为与磷循环相关的微生物丰度对该浓度金霉素添加并不敏感。

添加抗生素会影响土壤中磷循环有关微生物的网络特征。我们的研究表明, 添加金霉素后含 *pqqC* 基因细菌的网络复杂度(average degree)整体降低, 模块化(modularity)程度增加; 而含 *phoD* 基因细菌的网络复杂度在第 7 天降低, 这与 Qiu 等<sup>[37]</sup>在水稻土中添加阿维菌素使得土壤中细菌和真菌的群落复杂性显著下降一致, 说明金霉素添加以后可能会导致土壤中与磷循环有关的微生物复杂度降低, 这与前人研究发现添加四环素(25  $\text{mg}/\text{kg}$ )导致细菌网络更加松散, 生态系统稳定性降低<sup>[38]</sup>一致。我们的研究发现含 *phoD* 基因细菌的网络互作比 *pqqC* 基因细菌的网络互作更强烈(图 7), *phoD* 微生物群落之间的合作与联系更强烈, 微生物群落更复杂与稳定, 这说明可能含 *phoD* 基因细菌对于金霉素的适应性强于含 *pqqC* 基因细菌<sup>[39]</sup>。*Geodermatophilus* 和 *Ensifer* 分别为本研究中含 *pqqC* 和 *phoD* 基因细菌群落的关键类群, 分别属于放线菌门和变形菌门, 这与之前的研究一致<sup>[40-41]</sup>, 它们可以通过有机酸和酸化根茎层或者产生酸性或碱性磷酸酶实现对磷酸盐矿物的溶解实现磷的溶解, 在土壤磷循环中起着重要作用<sup>[42]</sup>。

在有机培肥的辣椒体系中, 添加金霉素影响了土壤中磷转化过程(图 9)。结果表明, 在金霉素处理下, 含 *pqqC* 以及 *phoD* 基因的微生物网络复杂度以及优势物种的群落结构随着时间的增加发生了相应的改变, 进而影响了土壤的磷酸酶活性, 改变了土壤中的磷素形态及有效性。本研究聚焦于金霉素对土壤中磷素养分及其特定微生物类群的影响, 为金霉素添加对磷循环微生物及其介导的磷素转化和有效性的影响提供了科学依据。

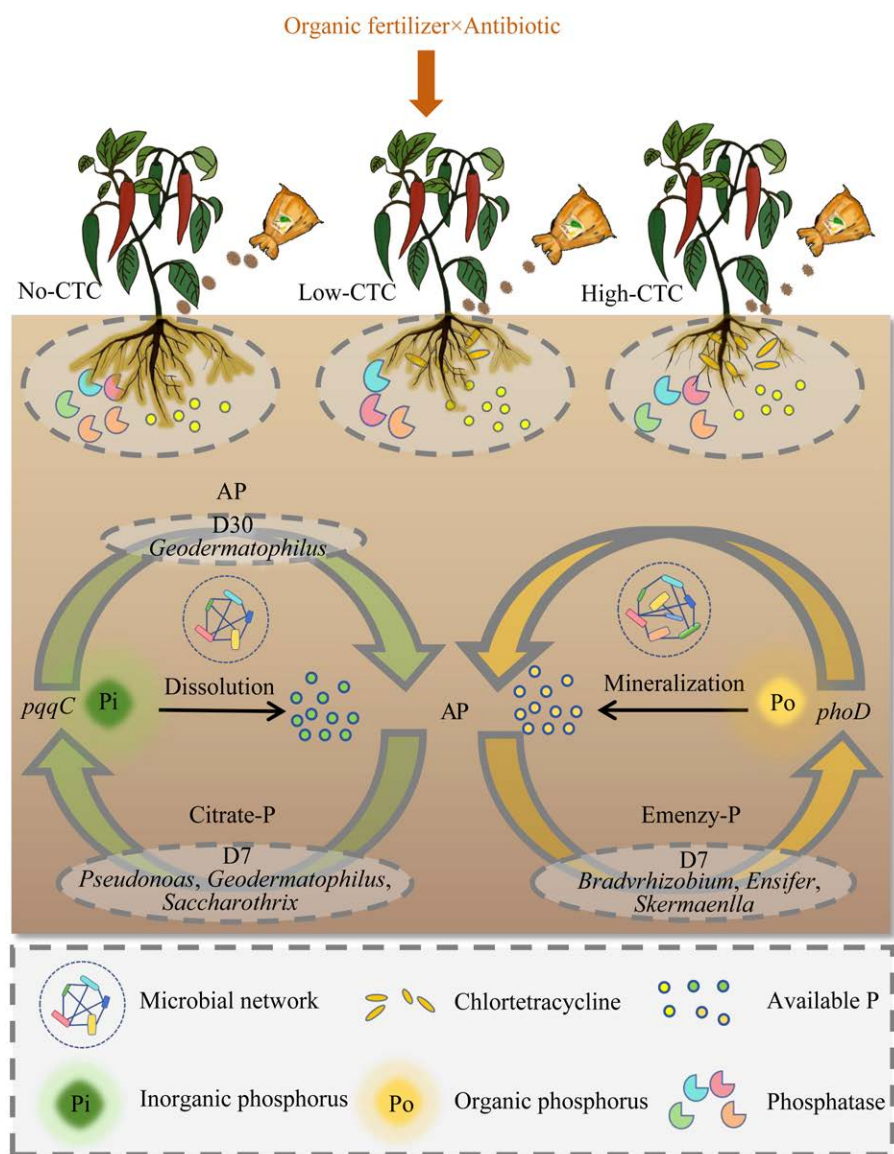


图 9 金霉素添加对土壤中与磷循环有关基因微生物以及土壤磷素影响过程模式图

Figure 9 Model diagram of the effect of CTC on soil microorganisms related to P cycle and soil P transformation.

## 4 结论

添加金霉素显著增加了有机培肥土壤中 AP、Enzyme-P 含量, 而  $\text{CaCl}_2\text{-P}$ 、Citrate-P 和 Enzyme-P 浓度在采样时期第 30 天显著低于第 7 天。两个采样时期中, 金霉素添加显著降低了土壤酸、碱性磷酸酶活性。高浓度或低浓度金霉素处理在第 7 天或第 30 天的采样时期均不影响 *pqqC*、*phoD*

基因拷贝数, 影响了含 *pqqC*、*phoD* 基因细菌的群落结构。金霉素添加影响了土壤中含 *pqqC*、*phoD* 基因细菌的网络互动, 其中, 含 *pqqC* 基因细菌的网络互动强度小于含 *phoD* 基因细菌; *Geodermatophilus*、*Ensifer* 分别是含 *pqqC* 和含 *phoD* 基因细菌群落关键类群, 与土壤无机磷的溶解和有机磷的矿化密切相关。金霉素添加后, 主要影响了含 *phoD* 基因细菌群落结构和网络特

性, 从而抑制了 ALP 活性, 进而影响对土壤中难溶性有机磷(Enzyme-P)的矿化。目前基于抗生素添加对磷循环研究结果较少, 因此, 探究金霉素对土壤磷循环微生物介导的磷素转化机制和有效性的影响, 对合理利用抗生素、提高土壤中养分的利用效率及提高土壤质量、保持土壤健康具有重要意义。

## 参考文献

- [1] TIAN SY, ZHU BJ, YIN R, WANG MW, JIANG YJ, ZHANG CZ, LI DM, CHEN XY, KARDOL P, LIU MQ. Organic fertilization promotes crop productivity through changes in soil aggregation[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2022, 165: 108533.
- [2] FAN KK, DELGADO-BAQUERIZO M, GUO XS, WANG DZ, ZHU YG, CHU HY. Biodiversity of key-stone phylotypes determines crop production in a 4-decade fertilization experiment[J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(2): 550-561.
- [3] SONG WF, SHU AP, LIU JA, SHI WC, LI MC, ZHANG WX, LI ZZ, LIU GR, YUAN FS, ZHANG SX, LIU ZB, GAO Z. Effects of long-term fertilization with different substitution ratios of organic fertilizer on paddy soil[J]. *Pedosphere*, 2022, 32(4): 637-648.
- [4] LI S, YAO Q, LIU JJ, WEI D, ZHOU BK, ZHU P, CUI XA, JIN J, LIU XB, WANG GH. Profiles of antibiotic resistome with animal manure application in black soils of Northeast China[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 384: 121216.
- [5] 王媛媛, 苏红, 刘德举, 王岩, 王伟涛, 贾智宁, 翟海华, 李卫华, 王储, 滕翔雁, 曲志娜. 2018-2020 年全球兽用抗菌药物使用情况分析[J]. *中国动物检疫*, 2022, 39(12): 72-77.  
WANG YY, SU H, LIU DJ, WANG Y, WANG WT, JIA ZN, CUI HH, LI WH, WANG C, TENG XY, QU ZN. Analysis on the Global Use of Veterinary Antibiotics from 2018 to 2020[J]. *China Animal Health Inspection*, 2022, 39(12): 72-77.
- [6] LI C, CHEN JY, WANG JH, MA ZH, HAN P, LUAN YX, LU AX. Occurrence of antibiotics in soils and manures from greenhouse vegetable production bases of Beijing, China and an associated risk assessment[J]. *The Science of the Total Environment*, 2015, 521/522: 101-107.
- [7] HOU J, WAN WN, MAO DQ, WANG C, MU QH, QIN SY, LUO Y. Occurrence and distribution of sulfonamides, tetracyclines, quinolones, macrolides, and nitrofurans in livestock manure and amended soils of Northern China[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(6): 4545-4554.
- [8] 刘吉强, 诸葛玉平, 崔丽娜. 外源四环素对土壤酶活性和油菜品质的影响[J]. *应用生态学报*, 2009, 20(4): 943-948.  
LIU JQ, ZHUGE YP, CUI LN. Effects of exogenous tetracycline on rape soil enzyme activity and rape quality[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2009, 20(4): 943-948 (in Chinese).
- [9] 杨思德, 常兴平, 潘政, 李明堂, 翁莉萍, 李永涛, 赵丽霞. 蚯蚓对金霉素污染土壤酶活性和微生物群落的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2021, 40(6): 1268-1280.  
YANG SD, CHANG XP, PAN Z, LI MT, WENG LP, LI YT, ZHAO LX. Effects of earthworms on soil enzyme activities and microbial communities of chlortetracycline-contaminated soils[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2021, 40(6): 1268-1280.
- [10] ZIELEZNY Y, GROENEWEG J, VERECKEN H, TAPPE W. Impact of sulfadiazine and chlortetracycline on soil bacterial community structure and respiratory activity[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2006, 38(8): 2372-2380.
- [11] SANTÁS-MIGUEL V, ARIAS-ESTÉVEZ M, DÍAZ-RAVIÑA M, FERNÁNDEZ-SANJURJO MJ, ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ E, NÚÑEZ-DELGADO A, FERNÁNDEZ-CALVIÑO D. Effect of oxytetracycline and chlortetracycline on bacterial community growth in agricultural soils[J]. *Agronomy*, 2020, 10(7): 1011.
- [12] FANG H, HAN LX, CUI YL, XUE YF, CAI L, YU YL. Changes in soil microbial community structure and function associated with degradation and resistance of carbendazim and chlortetracycline during repeated treatments[J]. *The Science of the Total Environment*, 2016, 572: 1203-1212.
- [13] SONG TT, MUHAMMAD FS, WANG R, LI BX, ZHANG ZY, WU DM, ZHU CX, LI HN. Distribution of antibiotic resistant bacteria in different soil types following manure application[J]. *Soil Ecology Letters*, 2024, 6: 230210.
- [14] ZHOU ZH, WANG CK, JIANG LF, LUO YQ. Trends in soil microbial communities during secondary succession[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 115: 92-99.



- [15] HARTMAN WH, YE RZ, HORWATH WR, TRINGE SG. A genomic perspective on stoichiometric regulation of soil carbon cycling[J]. *The ISME Journal*, 2017, 11(12): 2652-2665.
- [16] VERSHININA OA, ZNAMENSKAYA LV. The phoregulons of bacteria[J]. *Microbiology*, 2002, 71(5): 497-511.
- [17] HU MJ, PEÑUELAS J, SARDANS J, TONG C, CHANG CT, CAO WZ. Dynamics of phosphorus speciation and the *phoD* phosphatase gene community in the rhizosphere and bulk soil along an estuarine freshwater-oligohaline gradient[J]. *Geoderma*, 2020, 365: 114236.
- [18] HU W, ZHANG YP, RONG XM, FEI JC, PENG JW, LUO GW. Coupling amendment of biochar and organic fertilizers increases maize yield and phosphorus uptake by regulating soil phosphatase activity and phosphorus-acquiring microbiota[J]. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2023, 355: 108582.
- [19] BI QF, LI KJ, ZHENG BX, LIU XP, LI HZ, JIN BJ, DING K, YANG XR, LIN XY, ZHU YG. Partial replacement of inorganic phosphorus (P) by organic manure reshapes phosphate mobilizing bacterial community and promotes P bioavailability in a paddy soil[J]. *The Science of the Total Environment*, 2020, 703: 134977.
- [20] OLSEN SR, SOMMERS LE. *Methods of Soil Analysis. Part 2: Chemical and Microbiological Properties*[M]//Agronomy No. 9. Madison, WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America, 1982: 403-430.
- [21] DELUCA TH, GLANVILLE HC, HARRIS M, EMMETT BA, PINGREE MRA, DE SOSA LL, CERDA-MORENO C, JONES DL. A novel biologically-based approach to evaluating soil phosphorus availability across complex landscapes, *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 88: 110-119.
- [22] ZHENG BX, HAO XL, DING K, ZHOU GW, CHEN QL, ZHANG JB, ZHU YG. Long-term nitrogen fertilization decreased the abundance of inorganic phosphate solubilizing bacteria in an alkaline soil[J]. *Scientific Report*, 2017, 7: 42284.
- [23] SAKURAI M, WASAKI J, TOMIZAWA Y, SHINANO T, OSAKI M. Analysis of bacterial communities on alkaline phosphatase genes in soil supplied with organic matter[J]. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2008, 54(1): 62-71.
- [24] LIU B, LI YX, ZHANG XL, WANG J, GAO M. Effects of chlortetracycline on soil microbial communities: comparisons of enzyme activities to the functional diversity via Biolog EcoPlates™[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2015, 68: 69-76.
- [25] 李梦云. 金霉素与土霉素对生物除磷效果及微生物活性的联合作用效应[D]. 合肥: 安徽建筑大学硕士学位论文, 2022.
- LI MY. Combined effect of chlortetracycline and oxytetracycline on biological phosphorus removal and microbial activity[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Jianzhu University, 2022 (in Chinese).
- [26] CUI H, OU Y, WANG LX, YAN BX, BAO MW, GUAN FC. Tetracycline hydrochloride-stressed changes in phosphorus fractions during swine manure composting: emphasize on phosphorus functional genes[J]. *Process Safety and Environmental Protection*, 2022, 168: 336-343.
- [27] HU YJ, XIA YH, SUN Q, LIU KP, CHEN XB, GE TD, ZHU BL, ZHU ZK, ZHANG ZH, SU YR. Effects of long-term fertilization on *phoD*-harboring bacterial community in Karst soils[J]. *The Science of the Total Environment*, 2018, 628/629: 53-63.
- [28] 苏卫华, 李昊明, 张春燕, 陈新平, 郎明. 供磷水平和根际效应协同影响含碱性磷酸酶基因细菌群落的网络复杂性和稳定性[J]. *微生物学报*, 2023, 63(7): 2776-2790.
- SU WH, LI HM, ZHANG CY, CHEN XP, LANG M. Phosphorus gradient fertilization and rhizosphere effect co-determine *phoD*-harboring bacterial network complexity and stability[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(7): 2776-2790 (in Chinese).
- [29] 曾悦, 黄红英, 吴华山. 畜禽粪污抗生素对土壤生物学效应的 Meta 分析[J]. *农业环境科学学报*, 2021, 40(5): 1043-1050.
- ZENG Y, HUANG HY, WU HS. Meta-analysis was used to analyze the biological effects of livestock manure antibiotics on soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2021, 40(5): 1043-1050 (in Chinese).
- [30] TOPP E, CHAPMAN R, DEVERS-LAMRANI M, HARTMANN A, MARTI R, MARTIN-LAURENT F, SABOURIN L, SCOTT A, SUMARAH M. Accelerated Biodegradation of Veterinary Antibiotics in Agricultural Soil following Long-Term Exposure, and Isolation of a Sulfamethazine-degrading sp.[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2013, 42(1): 173-178.

- [31] HUND-RINKE K, SIMON M, LUKOW T. Effects of tetracycline on the soil microflora: function, diversity, resistance[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2004, 4(1): 11-16.
- [32] SCHMITT H, MARTINALI B, van BEELEN P, SEINEN W. On the limits of toxicant-induced tolerance testing: cotolerance and response variation of antibiotic effects[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2006, 25(7): 1961-1968.
- [33] FANG H, HAN YL, YIN YM, PAN X, YU YL. Variations in dissipation rate, microbial function and antibiotic resistance due to repeated introductions of manure containing sulfadiazine and chlortetracycline to soil[J]. *Chemosphere*, 2014, 96: 51-56.
- [34] PEÑUELAS J, POULTER B, SARDANS J, CIAIS P, van der VELDE M, BOPP L, BOUCHER O, GODDERIS Y, HINSINGER P, LLUSIA J, NARDIN E, VICCA S, OBERSTEINER M, JANSSENS IA. Human-induced nitrogen-phosphorus imbalances alter natural and managed ecosystems across the globe[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2934.
- [35] WANG L, WANG J, YUAN J, TANG ZH, WANG JD, ZHANG YC. Long-term organic fertilization strengthens the soil phosphorus cycle and phosphorus availability by regulating the *pqqC*- and *phoD*-harboring bacterial communities[J]. *Microbial Ecology*, 2023, 86(4): 2716-2732.
- [36] LIU WB, LING N, LUO GW, GUO JJ, ZHU C, XU QC, LIU MQ, SHEN QR, GUO SW. Active *phoD*-harboring bacteria are enriched by long-term organic fertilization[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2021, 152: 108071.
- [37] QIU DY, XU NH, ZHANG Q, ZHOU WY, WANG Y, ZHANG ZY, YU YT, LU T, SUN LW, ZHOU NY, PEIJINBURG WJGM, QIAN HF. Negative effects of abamectin on soil microbial communities in the short term[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1053153.
- [38] ZHANG ZK, HE HH, HAN T, TIAN XM, PANG JY, LAMBERS H. Soil oxytetracycline alters the effects of phosphate fertilisation and *Bacillus amyloliquefaciens* on the bacterial community of *Medicago sativa* rhizosphere[J]. *Applied Soil Ecology*, 2023, 187: 104861.
- [39] MAKHALANYANE TP, VALVERDE A, BIRKELAND NK, CARY SC, MARLA TUFFIN I, COWAN DA. Evidence for successional development in Antarctic hypolithic bacterial communities[J]. *The ISME Journal*, 2013, 7(11): 2080-2090.
- [40] ZHUANG QL, YUAN HY, QI JQ, SUN ZR, TAO BX, ZHANG BH. Phosphorus fertiliser application mitigates the negative effects of microplastic on soil microbes and rice growth[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2024, 465: 133278.
- [41] CHEN YH, LI SS, LIU N, HE H, CAO XY, LV C, ZHANG K, DAI JL. Effects of different types of microbial inoculants on available nitrogen and phosphorus, soil microbial community, and wheat growth in high-P soil[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 28(18): 23036-23047.
- [42] 崔熙雯, 林小锐, 李家兵, 张虹, 韩永和. 抗逆放线菌的多样性、功能特性及其在环境修复中的应用[J]. *微生物学报*, 2023, 63(5): 1930-1943.
- CUI XW, LIN XR, LI JB, ZHANG H, HAN YH. Diversity, functional characteristics, and environmental remediation potential of stress-tolerant actinomycetes[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(5): 1930-1943 (in Chinese).