



养殖池塘底泥中恩诺沙星对氮转化的影响

刘立早, 张玉平, 张玲玲

(上海市水产研究所, 上海市水产技术推广站, 上海 200433)

摘要 为了研究水产养殖池塘底泥中抗生素残留对氮赋存形态及氮转化功能微生物的影响。选取养殖环境中常见的恩诺沙星(ENR)为目标污染物,设置0、1.0、2.0、5.0 mg/kg 4个梯度开展模拟试验。结果显示:底泥中 NH_4^+ -N和 NO_3^- -N含量随试验开展呈下降趋势,添加ENR后,底泥中 NO_2^- -N含量增加7.55%~15.30%;底泥氮转化相关基因中,*anammox*相对丰度最高,占比60.0%~78.4%。厌氧氨氧化是底泥中氮转化的主要途径,底泥中 NH_4^+ -N含量与*anammox*丰度呈极度负相关;底泥中低含量ENR(1.0 mg/kg)会促进*nrrA*基因的生长或繁殖,但含量超过2.0 mg/kg时对反硝化基因*nirK*有明显抑制作用。

关键词 养殖池塘;底泥;恩诺沙星;氮转化;功能基因

氮作为水生生态系统的重要营养元素,是其新陈代谢的关键元素之一^[1]。由于底泥是水生生态系统中氮的重要源和汇^[2],所以现有的氮素在底泥-间隙水-上覆水之间的迁移转化研究中,多以大湖、海湾作为研究对象,较少涉及水产养殖池塘这种浅水塘的底泥氮转化研究。水产养殖池塘底泥中氮含量过高,会引起池塘水中氨氮含量升高,从而可能对养殖生物的生长构成威胁^[3]。微生物在氮转化过程中起到重要作用,如厌氧氨氧化细菌、硝化细菌和反硝化细菌等,微生物的硝化、反硝化作用已被证实是池塘底泥中氮转化的主要机制^[4]。

为减少水产养殖生物生病,提高养殖经济效益,抗生素在养殖过程中被大量甚至过度使用^[5],过量使用的抗生素最终会沉降并吸附在底泥中。恩诺沙星(ENR)属于最常用的氟喹诺酮类抗生素,在水产养殖过程中被广泛使用。对珠江口水产养殖区的调查显示,在4大类抗生素中,氟喹诺酮类抗生素的残留浓度和检出率最高,在底泥检出率高于80%,其中又以ENR占比最高^[6]。残留于水产养殖池塘底泥中的ENR可能会抑制氮转化功能微生物的生长,从而影响水产养殖环境中的氮转化过程。研究表明,在用木屑生物反应器处理污水时,ENR会对污水中的反硝化作用产

生阶段性抑制作用^[7]。在用厌氧氨氧化工艺处理养猪废水时,废水里的ENR短期和长期作用均会对厌氧氨氧化细菌产生抑制作用,且抑制作用的强弱与其浓度有关^[8]。目前,ENR影响氮转化微生物方面的研究主要集中在可调控的污水处理装置中,而在有机质含量高且厌氧的养殖池塘底泥中,ENR影响氮形态转化方面的研究还比较缺乏。因此,残留于池塘底泥中的ENR引起研究者高度重视,可能对底泥中的氮转化过程及功能微生物产生影响。

本研究采用室内静态模拟的方法,在池塘底泥中添加不同含量的ENR,通过分析池塘底泥和间隙水中的氮形态变化,及底泥中氮转化基因的绝对含量变化,探讨水产养殖池塘底泥中不同含量ENR残留对氮转化过程的影响。

1 材料与方 法

1.1 研究方法

试验在12个尺寸为40 cm×40 cm×60 cm的PVC水箱中进行,每个水箱中放置1个PVC柱子(柱子直径25 cm,高40 cm),每个柱子添加湿质量约7.16 kg的底泥,厚度约12 cm,底泥取自南美白对虾养殖池塘。底泥中凯氏氮(TTN)和可提取态氮(TF-N)含量分别为

收稿日期:2022-04-26 修回日期:2022-07-14

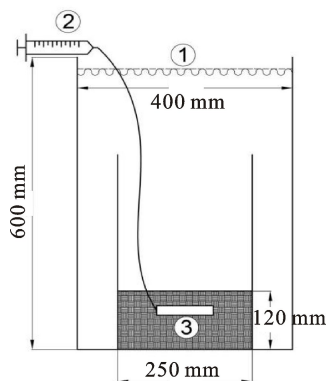
基金项目:上海市自然科学基金项目(20ZR1450800);国家自然科学基金(51709172,31900097)。

第一作者:刘立早,男,硕士,工程师,主要从事渔业环境生态修复研究。E-mail:236291925@qq.com

通信作者:张玲玲,女,博士,工程师,主要从事渔业环境生态修复研究。E-mail:13818353541@163.com

($1\ 496.67 \pm 45.54$) mg/kg 和 (463.94 ± 35.10) mg/kg, 底泥中 NH_4^+ -N 含量为 (445.67 ± 28.23) mg/kg, 占 TF-N 的 96.06%。

试验设置 1 个对照组和 3 个处理组, 每个试验组 3 个平行, 编号为对照组、T1、T2 和 T3, 3 个处理组分别添加恩诺沙星 (ENR), 检测含量分别为 (1.29 ± 0.15)、(2.06 ± 0.27)、(4.13 ± 0.64) mg/kg, 在每个柱子底泥中间高度位置水平放置间隙水采样器, 水箱加水至水深 60 cm, 如图 1 所示。试验在温室大棚中进行, 透光性良好, 避免降雨对试验造成的影响, 试验周期为 2021 年 4 月 27 日至 6 月 30 日, 水温为 $19.9\text{ }^\circ\text{C} \sim 32.3\text{ }^\circ\text{C}$ 。



①液面;②间隙水采样器;③底泥
①Liquid level;②Pore water sampler;③Sediment

图 1 试验装置示意图

Fig. 1 Schematic of experimental setup

1.2 样品分析

利用间隙水采样器每隔 10 d 左右采集 1 次间隙水, 测定参数包括 TN、 NO_3^- -N 和 NH_4^+ -N 含量。其中 TN 采用碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法分析; NO_3^- -N 采用分光光度法测定; NH_4^+ -N 使用纳氏试剂分光光度法检测^[9]。

试验开始前采集底泥样品一份, 用于测定底泥中 TTN、三态氮 (NO_3^- -N、 NH_4^+ -N、 NO_2^- -N)、ENR 含量及氮转化功能基因含量。试验结束后, 将上覆水排空, 取装置内中心点位置泥厚一半处底泥约 100 g, 底泥样品经过冷冻干燥机 (FD-1A-50, 汗诺) 处理后, 研磨过 100 目筛。底泥中 TTN 采用凯氏定氮仪 (SKD-1000, 沛欧) 测定。氮素形态的测定采用改进的沉积物中氮连续分级浸取法^[10], 将 TF-N 分为: 离子交换态氮 (IEF-N)、弱酸可浸取态氮 (WAEF-N)、强碱可浸取态氮 (SAEF-N) 和强氧化剂可浸取态氮 (SOEF-N)。提取液中的 NH_4^+ -N 含量采用纳氏试剂分光光度

法测定; NO_2^- -N 含量采用萘乙二胺分光光度法测定; NO_3^- -N 含量采用镉柱还原法测定, 三者之和即为某一种 TF-N 含量。

底泥样品中氮转化功能基因含量通过荧光定量 PCR 分析, 由上海美吉生物医药科技有限公司 (上海, 中国) 检测完成。称取 0.5 g 底泥样品, 提取底泥氮转化 DNA。用 Nano-Drop 核酸蛋白仪 (NanoDropOne, Thermo, 美国) 和 10 g/L 的琼脂电泳测定 DNA 质量, 将通过质量检测的 DNA 样品于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存, 备用。测定的 16S rRNA 功能基因片段包括 *Bacterial*、*Archaeal*、*anam-mox*、*amoA*、*nxrA*、*narG*、*nirK*、*nirS*、*nosZ*。所用仪器为荧光定量 PCR 仪 (ABI 7300, Applied Biosystems, 美国), 扩增效率为 89%~110%, 且 $R^2 > 0.99$ 时默认数据合格, 氮转化功能基因引物序列信息见表 1。

1.3 数据统计分析

试验数据均使用 Excel 2016 处理, 采用 SPSS statistics 19.0 对数据进行统计分析和方差分析 (LSD, $P < 0.05$), 图表使用 origin 8.0 制作。

2 结果与分析

2.1 底泥中不同形态氮含量变化

处理前底泥中 4 种形态氮分布特征如图 2 所示, 含量大小表现为 $\text{SAEF-N} (39.57\%) > \text{IEF-N} (35.35\%) > \text{SOEF-N} (18.30\%) > \text{WAEF-N} (7.13\%)$ 。处理前 IEF-N 含量为 (164.42 ± 21.52) mg/kg, 占 TF-N 比例为 34.84%, 处理后降至 (49.24 ± 4.51)~(62.21 ± 8.04) mg/kg, 占比降为 14.78~21.48%。IEF-N 属于不稳定氮, 很容易进入水体中^[11]。试验中底泥完全被上覆水覆盖, 在处理过程中较易与上覆水发生交换, 这可能是导致 IEF-N 明显降低的原因^[12]。

WAEF-N 是 TF-N 中含量最低的氮形态。处理前 WAEF-N 含量为 (33.25 ± 8.80) mg/kg, 占 TF-N 比例为 7.27%, 处理后的 WAEF-N 含量为 (34.82 ± 8.37)~(54.33 ± 16.70) mg/kg, 占 TF-N 比例上升到 11.26~15.51%。WAEF-N 含量主要与底泥中的碳酸盐环境有关。本试验中除了对间隙水采样以外, 基本没有对底泥扰动, 碳酸盐环境较为稳定。

SAEF-N 易从还原态底泥中释放^[13]。由图 2 可知, 处理前的 SAEF-N 含量均值为 (182.07 ± 14.58) mg/kg, 是 TF-N 中最主要的赋存形态, 占

比达 39.80%。经过处理之后,各组 SAEF-N 含量下降为(83.82 ± 13.21)~(108.42 ± 22.25) mg/kg,占 TF-N 的比例下降为 26.93%~32.59%,其中 T2、T3 处理组的下降最为明显。SAEF-N 的形成和分布主要由底泥的氧化还原环境控制^[14],一般认为还原环境则会促进 SAEF-N 释放活动。由于本研究中底泥均处于较强的还原环境,有利于 SAEF-N 向水体释放。而 T2、T3 处理组中 SAEF-N 下降较多可能是因为更为强

烈的反硝化作用,反映在反硝化基因中 T2 和 T3 的反硝化基因丰度更高(图 5)。

SOEF-N 处理前含量为(84.20 ± 7.77) mg/kg,占 TF-N 的比例为 18.30%。处理后 SOEF-N 含量为(101.77 ± 23.48)~(137.83 ± 4.46)mg/kg,SOEF-N 变为占比最高的氮形态,上升为 34.85%~43.43%。SOEF-N 是有机形态氮,释放能力最弱,一般只有在氧气和好氧微生物存在的情况下才会释放,是最难参与氮循环的形态^[15]。

表 1 氮转化功能基因引物序列信息

Table 1 Primers for nitrogen transformation genes

基因名称 Gene	引物名称 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence	片段长度/bp Primer length
Bacterial 16S rRNA	338F_518R	ACTCCTACGGGAGGCAGCAG ATTACCGCGGCTGCTGG	180
Archaeal 16S rRNA	Ar109f_Ar344r	ACKGCTCAGTAACACGT TCGCGCCTGCTGCTCCCCGT	235
Anammox 16S rRNA	AMX809F_AMX1066R	GCCGTAAACGATGGGCACT AACGTCTCACGACACGAGCTG	257
amoA	AmoA-1F_AmoA-2R	GGGGTTTCTACTGGTGGT CCCCTCKGSAAGCCTTCTTC	491
nxrA	F1norA_R2norA	CAGACCGACGTGTGCGAAAG TCCACAAGGAACGGAAGGTC	322
narG	1960m2f_2050m2r	TA(CT)GT(GC)GGGCAGGA(AG)AAACTG CGTAGAAGAAGCTGGTGCTGTT	100
nirK	nirK-C2F_nirK-C2R	TGCACATCGCCAACGGNATGTWYGG GGCGCGGAAGATGSHRTGRTCNAC	448
nirS	nirScd3aF_nirSR3cd	GT(C/G)AACGT(C/G)AAGGAAC(C/G)GG GA(C/G)TTCGG(A/G)TG(C/G)GTCTTGA	425
nosZ	nosZ1527F_nosZ1773R	CGCTGTTCHTCGACAGYCA ATRTCGATCARCTGBTCGTT	250

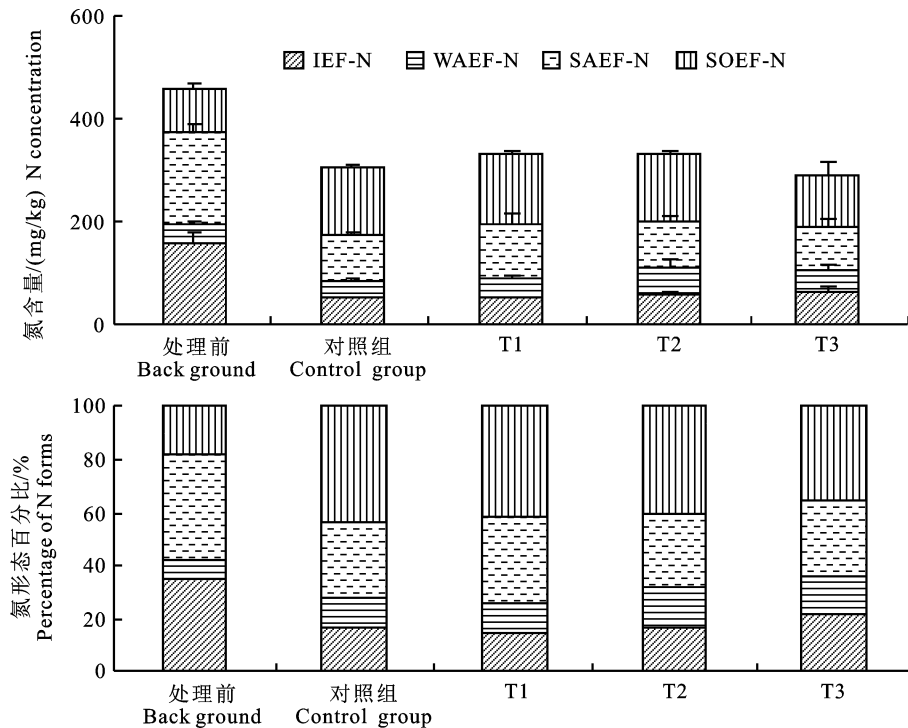


图 2 底泥中 4 种提取态氮含量
Fig. 2 Four forms of extractable nitrogen in sediment

在底泥的 4 种可提取态氮中, $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量 (445.67 ± 28.23) mg/kg 远高于 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (7.00 ± 0.79) mg/kg 和 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ (4.73 ± 0.74) mg/kg , 是底泥中最主要的无机态氮。经不同含量 ENR 处理后, 底泥中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量都发生明显下降(图 3), 分别降低 19.85%~37.34% 和 58.56%~68.15%, 且 4 个试验组之间没有显著差别($P > 0.05$)。试验结束时, $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 变成占比

最低的氮形态, 占比为 0.73%~0.98%。与对照组相比, 添加 ENR 处理后的 T1、T2 和 T3 组中 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 含量增加 7.55%~15.30% ($P < 0.01$), 这说明 ENR 的存在促进 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 的生成, 可能是由于 ENR 在厌氧环境中对厌氧氨氧化细菌存在促进作用, 而 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ 作为过程中的中间产物含量增加^[16]。

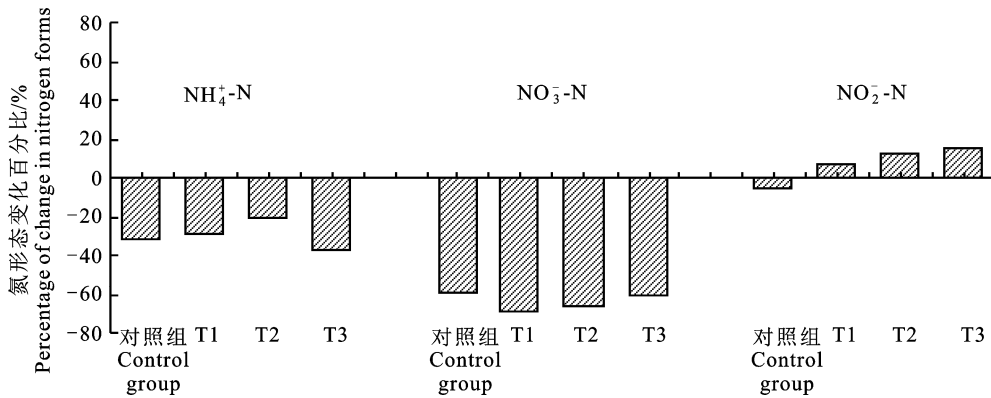


图 3 不同浓度恩诺沙星下底泥中三态氮含量

Fig. 3 Content of three forms of nitrogen in sediment under different ENR concentrations

2.2 恩诺沙星对底泥中氮转化功能微生物的影响

2.2.1 细菌及古菌丰度 底泥中细菌(bacterial)绝对丰度从处理前 (7.07×10^9) copies/g 减少为处理后 ($3.68 \times 10^9 \sim 6.95 \times 10^9$) copies/g , 各处理组均有所下降, 但差异并不显著 ($P > 0.05$)。而底泥中古菌(archaeal)的绝对丰度则比 bacterial 低两个数量级, 从处理前 (7.21×10^7) copies/g 变为处理后 ($4.36 \times 10^7 \sim 7.54 \times 10^7$) copies/g , 其中 T3 明显低于其余各处理组 ($P < 0.05$), 可能较高的 ENR 含量对古菌(archaeal)有抑制作用。有研究表明, 尽管古菌在微生物群落中的丰度不高, 但是在氮的转化过程中起着重要作用^[17]。

2.2.2 底泥中氨氧化细菌及硝化细菌 7 种氮转化功能基因在底泥中的背景丰度为 1.05×10^9 copies/g , ENR 处理后对照组、T1、T2 和 T3 底泥中氮转化相关功能基因的绝对丰度分别为 8.71×10^8 、 6.14×10^8 、 9.66×10^8 和 7.65×10^8 copies/g , 各处理组间未见明显差异 ($P > 0.05$)。其中 *anammox* 基因是相对丰度最高的, 占比达 60.0%~78.4%。可见厌氧氨氧化作用是底泥中微生物转化氮的主要途径。

Anammox 和 *amoA* 是参与氨氧化反应的重要基因, 可以反映氨氧化微生物的数量和活

性^[18]。如图 4-a 显示, 处理前底泥中 *anammox* 的绝对丰度远大于 *amoA*, 为 7.55×10^8 copies/g , 处理后 4 组底泥中 *anammox* 的绝对丰度均有一定程度下降, 方差分析发现 T1 组绝对丰度 4.17×10^8 copies/g 明显低于其他处理组 ($P < 0.05$), 可能较低含量 ENR 会降低底泥中氨氧化细菌的数量。对底泥中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量与 *anammox* 绝对丰度进行相关性分析, 结果显示, 底泥中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 含量与 *anammox* 绝对丰度呈极显著负相关 ($P < 0.01$)。Gao 等^[19]对不同氮素含量影响下的氨氧化细菌 AOA、AOB 基因丰度研究发现, 其相对丰度随着氨氮含量升高而降低, 与本研究结果一致。底泥中 *amoA* 的背景丰度为 1.25×10^6 copies/g , 试验结束时, 4 个试验组中 *amoA* 绝对丰度依次增加, 为 $1.47 \times 10^6 \sim 3.65 \times 10^6$ copies/g , 其中 T2、T3 明显高于对照组 ($P < 0.05$)。可见, ENR 含量增加并未出现对 *amoA* 基因的抑制作用, 与 ENR 对硝化作用有抑制效果的结论不同^[20], 可能与本研究设计的 ENR 含量较低有关。吴银宝等^[21]的研究表明, 水生微宇宙中恩诺沙星的初始含量为 (0.2~5) mg/L , 仍不会影响到水体中氨化细菌以及硝化细菌数量的变化。

nxrA 基因是 NO_2^- 转化为 NO_3^- 的催化基因, 由图 4-b 可见, 处理前底泥中 *nxrA* 绝对丰度 2.69×10^5 copies/g, 经过处理后 4 个 ENR 试验组中 *nxrA* 的绝对丰度为 $(2.18 \times 10^5 \sim 4.03 \times 10^5)$ copies/g, 其中 T1 处理组显著高于其他处理

组 ($P < 0.01$), 说明低含量 ENR 会促进 *nxrA* 基因型微生物的生长或繁殖。*nxrA* 的绝对丰度在硝化基因中最低, 这可能是因为底泥中 NO_2^- -N 含量最低, 且整体底泥环境缺氧, 不利于该类微生物的生长和繁殖^[22]。

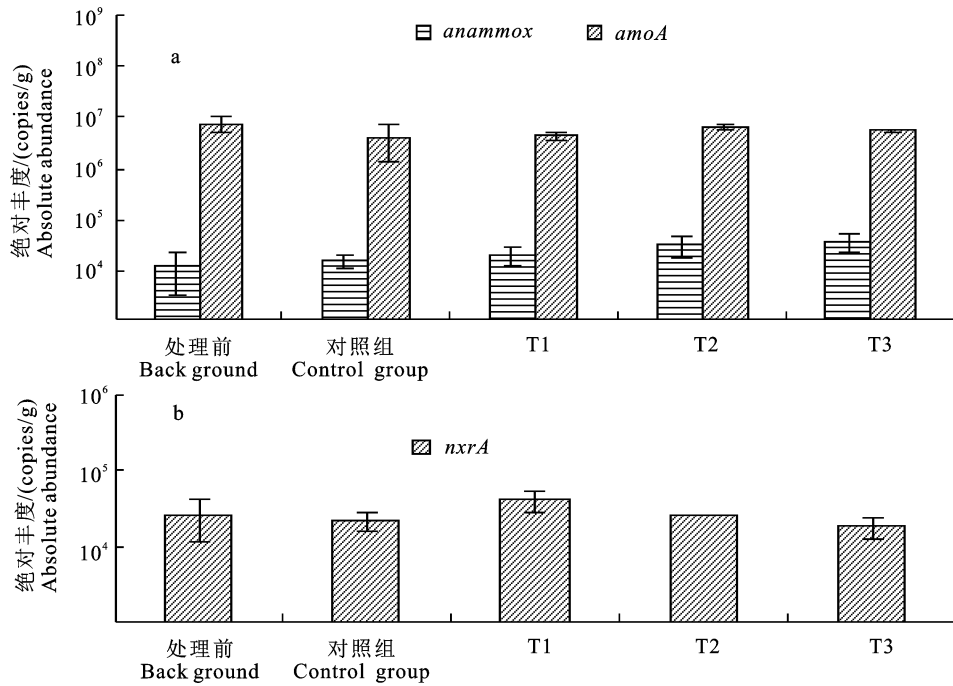


图 4 恩诺沙星影响底泥中硝化功能基因含量

Fig. 4 Absolute abundance of nitrification functional genes in sediment under effects of ENR

2.2.3 底泥中反硝化细菌 微生物反硝化作用由多种厌氧或兼性厌氧微生物参与的系列酶催化反应组成, 包括亚硝酸还原酶(Nir)、氧化亚氮还原酶(Nos)和硝酸还原酶(Nar)等, 相应的编码基因分别为 *nirK* 或 *nirS*、*nosZ*、*narG*^[23]。

nirK 和 *nirS* 基因是反硝化过程中将 NO_2^- -N 还原反应的标志物, 由图 5-a, 图 5-b 可知, 各处理组 *nirS* 的绝对丰度高于 *nirK*, 处理前底泥中 *nirS* 绝对丰度为 7.22×10^7 copies/g, 处理后添加较高含量 ENR 的 T2、T3 组中 *nirS* 绝对丰度显著提高 ($P < 0.05$), 为 1.11×10^8 和 1.66×10^8 copies/g。这与邹华^[24]的研究结果趋势类似, 在地下水中, $0.1 \sim 100 \mu\text{g/L}$ 范围内的 ENR 对反硝化细菌几乎以促进作用为主。处理前 *nirK* 的绝对丰度为 4.69×10^7 copies/g, 处理后对照组、T1、T2 和 T3 中 *nirK* 的绝对丰度分别为 3.86×10^7 、 3.29×10^7 、 1.94×10^7 和 2.43×10^7 copies/g。其中 T2、T3 组 *nirK* 绝对丰度显著低于对照组 ($P < 0.05$), 可能较高浓度 ENR 会抑制 *nirK* 型微生物生长, 有研究表明^[25], 底泥中反硝

化基因 *nirK* 丰度会随着磺胺嘧啶的浓度增加而逐渐降低。本研究中, *nirK* 和 *nirS* 出现两种相反变化趋势, 这与李筱宛等^[26]的研究结果类似, 随着上覆水中 C/N 的比例升高, *nirS* 和 *nirK* 基因丰度分别有增加和下降的趋势。在呼和等^[27]研究的撂荒地中, *nirK* 和 *nirS* 两种基因型反硝化微生物丰度之间有极显著线性负相关关系。有研究发现, 这两种基因型的反硝化菌有不同的栖息环境选择, 会产生生态位分化, *nirK* 基因对环境的敏感程度远大于 *nirS*^[28-29]。

nosZ 作为编码 N_2O 还原酶的基因, 能够表征系统彻底完成了反硝化过程。从图 5-c 看出, 处理前底泥中 *nosZ* 的绝对丰度为 3.19×10^6 copies/g, 4 种处理后底泥中 *nosZ* 的绝对丰度为 $3.48 \times 10^6 \sim 5.16 \times 10^6$ copies/g, 表现为 $\text{T1} > \text{T3} > \text{T2} > \text{对照组}$, 各添加 ENR 组间差异不显著 ($P > 0.05$)。利用 Pearson 相关性分析, 底泥中 NH_4^+ -N 含量与 *nosZ* 显著正相关 ($P < 0.05$)。虞泳等^[30]研究发现, 氨氧化细菌在将 NH_4^+ -N 氧化成 NO_3^- -N 的过程中, 会有 N_2O 作为中间产物释

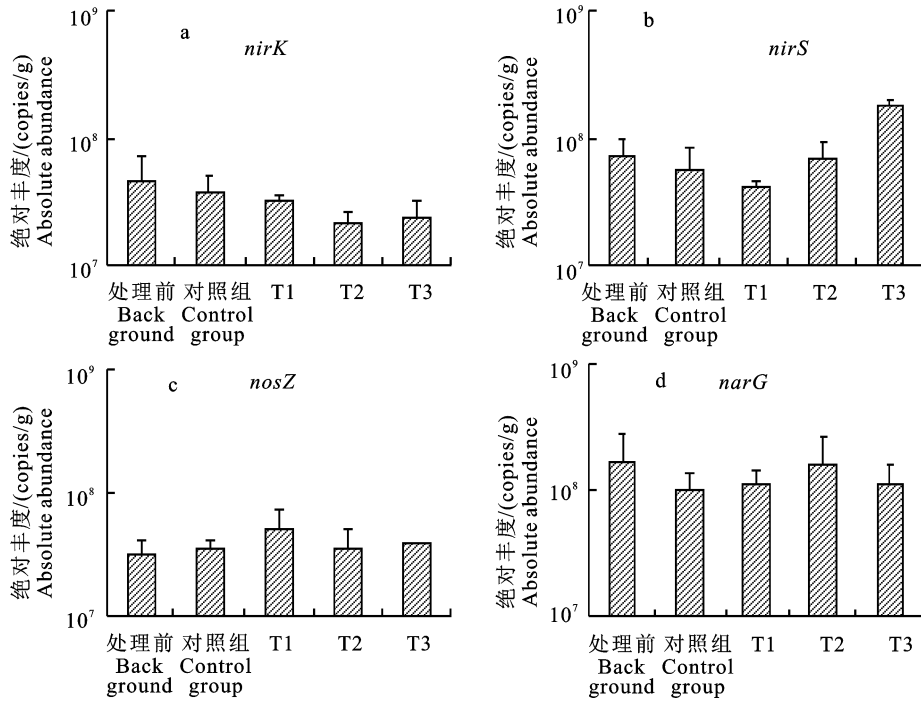


图5 底泥中反硝化功能基因绝对丰度

Fig. 5 Absolute abundance of denitrification functional genes in sediment

放出来, N₂O 作为 *nosZ* 基因编码的 N₂O 还原酶的原料, 能够促进 *nosZ* 的增长, 所以 NH₄⁺-N 间接地为 *nosZ* 提供生长原料。

narG 基因是将 NO₃⁻-N 厌氧转化为 NO₂⁻-N 的标志物。图 5-d 显示, 处理前底泥中 *narG* 的绝对丰度为 1.70 × 10⁸ copies/g, 处理后 *narG* 的绝对丰度为 1.00 × 10⁸ ~ 1.66 × 10⁸ copies/g, 各处理组间差异不显著 (P > 0.05), 添加 ENR 并未对底泥中 *narG* 基因产生明显影响。

2.3 间隙水中三态氮变化趋势

图 6-a 显示, 间隙水 TN 含量从初始 (2.13 ± 0.30) mg/L 极显著升至 (6.70 ± 0.57) ~ (7.54 ± 0.93) mg/L (P < 0.01), 说明在试验过程中, 底泥中的氮素逐渐释放, 进入到间隙水中, 且 4 个试验组的间隙水中 TN 含量并未见显著差异 (P > 0.05)。间隙水中 NH₄⁺-N、NO₃⁻-N 含量在试验过程中逐渐升高, 且 NH₄⁺-N 含量 (1.37 ± 0.43) ~ (6.04 ± 1.29) mg/L 远高于 NO₃⁻-N 含量 (0.47 ± 0.22) ~ (0.55 ± 0.21) mg/L, 间隙水中 NH₄⁺-N 含量随时间推移上升显著 (P < 0.05, 图 6-b、6-c)。这可能是由于底泥一直处于缺氧还原状态, 不利于微生物硝化反应的发生, 厌氧环境中 NH₄⁺-N 以铵离子的形式储存在间隙水中或吸附在底泥矿物表面, 提高底泥间隙水中

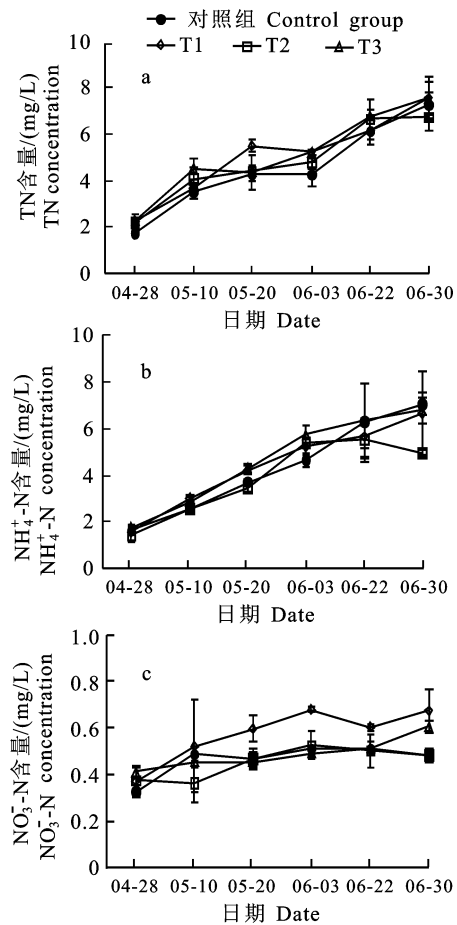


图6 底泥间隙水中的氮含量

Fig. 6 Nitrogen concentrations in pore water of sediment

NH_4^+ -N 含量, 可见 NH_4^+ -N 是间隙水中氮的主要迁移形态^[31]。图 6-c 显示, T1 处理组间隙水中的 NO_3^- -N 含量高于其他处理组, 而 *nxrA* 基因是 NO_2^- 转化为 NO_3^- 的催化基因, 由图 4-b 可见, T1 组底泥中 *nxrA* 基因绝对丰度高于其他处理组, 与 T1 间隙水中 NO_3^- -N 含量表现出极显著正相关 ($P < 0.01$)。

3 结论

水产养殖池塘底泥中无机氮形态以 NH_4^+ -N 为主, 经恩诺沙星处理后, NH_4^+ -N 含量降低了 19.8%~37.34%。底泥的氮转化功能基因中, *anammox* 相对丰度最高 (占比 60.0%~78.4%), 说明厌氧氨氧化作用是底泥中微生物转化氮的主要途径, 底泥 NH_4^+ -N 含量与 *anammox* 绝对丰度呈极度负相关 ($P < 0.01$)。底泥中低含量恩诺沙星 (1.0 mg/kg) 会促进 *nxrA* 基因的生长或繁殖, 恩诺沙星含量为 2.0 mg/kg 以上时, 对反硝化基因 *nirK* 有明显抑制作用。

参考文献 Reference:

- [1] 王高学, 姚嘉赞, 王绥标. 复合藻-菌系统水质净化模型建立与净化养殖水体水质的研究[J]. 西北农业学报, 2006, 15(2): 22-27.
WANG G X, YAO J Y, WANG S B. Study on establishment of water purification model of algae-bacteria system and its application in purifying the deteriorated aquacultural water[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2006, 15(2): 22-27.
- [2] GARDNER W S, YANG L Y, COTNER J B. Nitrogen dynamics in sandy freshwater sediments (Saginaw Bay, Lake Huron) [J]. *Journal of Great Lakes Research*, 2001, 27(1): 84-97.
- [3] 龚 龙. 池塘养殖废水净化及池塘底泥的氮素迁移、转化研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
GONG L. Study on the aquacultural wastewater purification and the transformation of nitrogen in aquaculture pond ecosystem [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015.
- [4] YIN X J, LU J, WANG Y C, et al. The abundance of *nirS*-type denitrifiers and *anammox* bacteria in rhizospheres was affected by the organic acids secreted from roots of submerged macrophytes[J]. *Chemosphere*, 2020, 240: 124903.
- [5] BROOKS B W, CHAMBLISS C K, STANLEY J K, et al. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2005, 24(2): 464-469.
- [6] 梁惜梅, 施 震, 黄小平. 珠江口典型水产养殖区抗生素的污染特征[J]. 生态环境学报, 2013, 22(2): 304-310.
LIANG X M, SHI ZH, HUANG X P. Occurrence of antibiotics in typical aquaculture of the Pearl River Estuary[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2013, 22(2): 304-310.
- [7] ILHAN Z E, ONG S K, MOORMAN T B. Dissipation of atrazine, enrofloxacin, and sulfamethazine in wood chip bio-reactors and impact on denitrification[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2011, 40: 1816-1823.
- [8] SGUANGI S, LOTTI T, CARETTI C, et al. Inhibitory effects of veterinary antibiotics on *anammox* activity: short and long-term tests[J]. *Environmental Technology*, 2017, 38(21): 2661-2667.
- [9] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. (第四版). 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
The State Environmental Protection Administration. Water and Wastewater Monitoring and Analysis Method [M]. Fourth Edition. Beijing: China Environmental Science Press, 2002.
- [10] 王圣瑞, 金相灿, 焦立新. 不同污染程度湖泊沉积物中不同粒级可转化态氮分布[J]. 环境科学研究, 2007, 20(3): 52-57.
WANG SH R, JIN X C, JIAO L X. Distribution of transferable nitrogen in different grain size from the different trophic level lake sediments[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2007, 20(3): 52-57.
- [11] 朱元荣, 张润宇, 吴丰昌. 滇池沉积物中氮的地球化学特征及其对水环境的影响[J]. 中国环境科学, 2011, 31(6): 978-983.
ZHU Y R, ZANG R Y, WU F CH. Geochemical characteristics and influence to overlying water of nitrogen in the sediments from Dianchi Lake [J]. *China Environmental Science*, 2011, 31(6): 978-983.
- [12] WANG S R, JIN X C, JIAO L X, et al. Nitrogen fractions and release in the sediments from the shallow lakes in the middle and lower reaches of the Yangtze River area, China [J]. *Water, Air and Soil Pollution*, 2008, 187(1/4): 5-14.
- [13] 任凌霄, 王沛芳, 王 超, 等. 望虞河表层沉积物中氮的分布与形态变化特征[J]. 环境工程学报, 2015, 9(3): 1201-1208.
REN L X, WANG P F, WANG CH, et al. Characteristics of distribution and variation of nitrogen species in surface sediments of Wangyu River[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2015, 9(3): 1201-1208.
- [14] 马红波, 宋金明, 吕晓霞, 等. 渤海沉积物中氮的形态及其在循环中的作用[J]. 地球化学, 2003, 32(1): 48-54.
MA H B, SONG J M, LÜ X X, et al. Nitrogen forms and their functions in recycling of the Bohai Sea sediment[J]. *Geochimica*, 2003, 32(1): 48-54.
- [15] ZHENG G X, SONG J M, SUN Y M, et al. Characteristics of nitrogen forms in the surface sediments of southwestern Nansha Trough, South China Sea [J]. *Chinese Journal of*

- Oceanology and Limnology*, 2008, 26(3): 280-288.
- [16] 聂三安, 於辰佳, 李 虎, 等. 水稻土厌氧氨氧化活性测定的同位素示踪法方法探讨[J]. 农业现代化研究, 2015, 36(4): 680-683.
NIE S A, YU CH J, LI H, *et al.* Determination of *anammox* activity in paddy soils with isotope-tracing technique [J]. *Research of Agricultural Modernization*, 2015, 36(4): 680-683.
- [17] PURKHOLD U, POMMERENING-RÖSER A, JURTSCHKO S, *et al.* Phylogeny of all recognized species of *ammonia* oxidizers based on comparative 16S RNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(12): 5368-5382.
- [18] ZHI W, YUAN L, JI G D, *et al.* Enhanced long-term nitrogen removal and its quantitative molecular mechanism in tidal flow constructed wetlands [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(7): 4575-4583.
- [19] GAO J, FAN X, WU G, *et al.* Changes of abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea(AOA) and bacteria(AOB) in three nitrifying bioreactors with different ammonia concentrations[J]. *Desalination and Water Treatment*, 2016, 57(45): 21463-21475.
- [20] 王加龙, 刘坚真, 陈仗榴, 等. 恩诺沙星对土壤微生物功能的影响[J]. 生态学报, 2005, 25: 307-311.
WANG J L, LIU J ZH, CHEN ZH L, *et al.* Effects of enrofloxacin residues on the functions of soil microbes[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25: 307-311.
- [21] 吴银宝, 汪植三, 廖新伟, 等. 恩诺沙星对小型模型水生态系统中微生物的影响[J]. 生态学报, 2006, 26(8): 2640-2645.
WU Y B, WANG ZH S, LIAO X D, *et al.* Effects of enrofloxacin on microorganisms in wetlands[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(8): 2640-2645.
- [22] FERAY C, MONTUELLE B. Competition between two nitrite-oxidizing bacterial populations; a model for studying the impact of wastewater treatment plant discharge on nitrification in sediment[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 42(1): 15-23.
- [23] 陈 亮, 刘 锋, 肖润林, 等. 人工湿地氮去除关键功能微生物生态学研究进展[J]. 生态学报, 2017, 37(18): 6265-6274.
CHEN L, LIU F, XIAO R L, *et al.* Research advances in microbial ecology for N-removal in constructed wetlands [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2017, 37(18): 6265-6274.
- [24] 邹 华. 典型抗生素对地下水反硝化过程的抑制效应研究[D]. 武汉: 中国地质大学, 2020.
- ZOU H. Inhibition effects of typical antibiotics on denitrification process in groundwater[D]. Wuhan: China University of Geosciences(Beijing), 2020.
- [25] 卿 叶, 李红芳, 张苗苗, 等. 养猪废水中磺胺嘧啶对湿地底泥中氮转化微生物及过程影响[J]. 环境科学研究, 2021, 34(9): 2192-2199.
QING Y, LI H F, ZHANG M M, *et al.* Effects of sulfadiazine in swine wastewater on microorganisms and nitrogen transformation processes in wetland sediment [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2021, 34(9): 2192-2199.
- [26] 李筱宛, 张亚平, 万 宇, 等. 上覆水不同 C/N 比条件下沉积物环境反硝化及氨氧化功能基因丰度变化特征[J]. 南京大学学报(自然科学), 2016, 52(1): 27-35.
LI X W, ZHANG Y P, WAN Y, *et al.* Abundance variations of denitrification and ammonium oxidation functional genes in sediments under different C/N ratios of overlying water[J]. *Journal of Nanjing University (Natural Sciences)*, 2016, 52(1): 27-35.
- [27] 呼 和, 陈先江, 程云湘. 撂荒地亚硝酸还原酶基因 *nirK* 和 *nirS* 丰度动态[J]. 草业科学, 2016, 33(7): 1253-1259.
HU H, CHEN X J, CHENG Y X. The dynamics for abundance of nitrite reductase genes *nirK* and *nirS* in abandoned land[J]. *Pratacultural Science*, 2016, 33(7): 1253-1259.
- [28] 张凯煜. 养殖场废弃物厌氧发酵过程中反硝化功能基因变化机理研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
ZHANG K Y. Variation mechanism of denitrification genes during anaerobic digestion with livestock waste[D]. Yangling Shaanxi: Northwest A&F University, 2019.
- [29] BREMER C, BRAKER G, MATTHIES D, *et al.* Impact of plant functional group, plant species and sampling time on the composition of *nirK*-type denitrifier community in soil [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73: 6876-6884.
- [30] 虞 泳, 曾光明, 陈耀宁, 等. 农业废物好氧堆肥中氨氧化细菌的群落结构[J]. 环境科学, 2011, 32(10): 3067-3072.
YU Y, ZENG G M, CHEN Y N, *et al.* Succession of ammonia-oxidizing bacteria community structure during agricultural waste composting [J]. *Environmental Science*, 2011, 32(10): 3067-3072.
- [31] 金赞芳, 龚嘉临, 施伊丽, 等. 沉积物—水界面氮的源解析和硝化反硝化[J]. 环境科学, 2017, 38(4): 1423-1430.
JIN Z F, GONG J L, SHI Y L, *et al.* Nitrate source identification and nitrification-denitrification at the sediment-water interface [J]. *Environmental Science*, 2017, 38(4): 1423-1430.

Effect of Enrofloxacin on Nitrogen Transformation in Sediment of Aquacultural Ponds

LIU Lizao, ZHANG Yuping and ZHANG Lingling

(Shanghai Fisheries Research Institute, Shanghai 200433, China)

Abstract To explore the effect of antibiotics on nitrogen forms and related microorganism in sediment of aquacultural ponds, enrofloxacin (ENR) was selected as object, four concentration gradients (0, 1.0, 2.0 and 5.0 mg/kg) were set up in this study. The concentrations of NH_4^+ -N and NO_3^- -N in the sediment decreased with the processing of the experiment. After addition of ENR, the NO_2^- -N concentrations in sediment increased by 7.55%—15.30%. The relative abundance of anammox in the sediment was the highest in the N transformation genes, accounting for 60.0%—78.4%. Anaerobic ammonia oxidation played dominant role in the sediment. The abundance of anammox had significantly negative correlation with NH_4^+ -N concentration. Low concentration of ENR (1.0 mg/kg) in the sediment promoted the growth of *nrrA* gene. The growth of *nirK* gene was inhibited when the concentration of ENR was more than 2.0 mg/kg.

Key words Aquaculture ponds; Sediment; Enrofloxacin; Nitrogen transformation; Functional genes

Received 2022-04-26

Returned 2022-07-14

Foundation item Natural Science Foundation of Shanghai (No. 20ZR1450800); National Natural Science Foundation of China (No. 51709172, No. 31900097).

First author LIU Lizao, male, master, engineer. Research area: ecological restoration of fishery environment. E-mail: 236291925@qq.com

Corresponding author ZHANG Lingling, female, Ph. D, engineer. Research area: ecological restoration of fishery environment. E-mail: 13818353541@163.com

(责任编辑: 顾玉兰 Responsible editor: GU Yulan)