

# 长期施用粪肥的土壤中抗生素耐药基因的消减规律

何轮凯<sup>1,3</sup>, 张敏<sup>1,3</sup>, 刘有胜<sup>1,2</sup>, 何良英<sup>1\*</sup>, 应光国<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国科学院广州地球化学研究所//有机地球化学国家重点实验室, 广州 510640;

2. 华南师范大学环境研究院, 广州 510631; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:**为研究长期施用粪肥的土壤中抗生素耐药基因(ARGs)的消减规律,分别采集长期施用与从未施用粪肥的农田土壤,进行培养对照实验,探究土壤含水率及生物质炭的添加对土壤中可移动元件(MGEs)及耐药基因在310 d内的丰度变化的影响。结果表明:长期施用粪肥提高了耐药基因与可移动元件在土壤中的污染水平;长期施用粪肥的土壤在实验室培养条件下,耐药基因与可移动元件呈现指数消减的趋势;添加生物质炭的土壤中耐药基因和可移动元件消减较慢,含水率较高的土壤中耐药基因和可移动元件消减较快;可移动元件相对丰度在一定程度上反映土壤培养过程中耐药基因的消减。实验结果揭示了受污染的农田土壤中耐药基因的动态变化规律,可以为土壤耐药基因污染风险评估提供基础数据,为我国抗生素耐药性防控提供科学参考。

**关键词:**粪肥; 耐药基因; 可移动元件; 土壤

中图分类号: O43

文献标志码: A

文章编号: 1000-5463(2018)01-0001-10

## Dynamics of Antibiotic Resistance Genes in Soil Chronically Fertilized by Swine Manure

HE Lunkai<sup>1,3</sup>, ZHANG Min<sup>1,3</sup>, LIU Yousheng<sup>1,2</sup>, HE Liangying<sup>1\*</sup>, YING Guangguo<sup>1,2\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Organic Geochemistry//Guangzhou Institute of Geochemistry, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China;

2. The Environmental Research Institute, South China Normal University, Guangzhou 510631, China;

3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** Soil incubation experiments were conducted to study the dynamics of antibiotic resistance genes (ARGs) in soil chronically fertilized by swine manure. The dynamic changes of ARGs and mobile genetic elements (MGEs) were investigated within 310 d. The impacts of soil water content and addition of biochar were studied. The results showed that long-term manure fertilization contributed to significant increase of ARGs and MGEs in soil. In soil chronically fertilized with manure amended with different treatments, ARGs and MGEs decreased exponentially with incubation time. The degradation of ARGs and MGEs in soil was slower with added biochar. Higher water content could significantly enhance the degradation of ARGs and MGEs. The significant correlation between ARGs and MGEs indicated that MGEs can serve as an indicator of ARG reduction in soil. The results revealed the dynamic changes of ARGs in contaminated farmland soils induced by the application of swine manure, providing basic data for risk assessment of ARG contamination in soils and scientific reference for antibiotic resistance control.

**Key words:** manure; antibiotic resistance genes; mobile genetic elements; soil

抗生素常以亚治疗的剂量被添加入饲料<sup>[1]</sup>,在全球养殖业内被广泛使用<sup>[2]</sup>。进入动物体内约25%~75%的抗生素会以母体化合物的形式随粪尿排出体外<sup>[2]</sup>。抗生素对原著微生物和菌落产生选择压力,导致粪便中微生物耐药基因(Antibiotic Resistance

Genes, ARGs)的出现和高浓度残留<sup>[3]</sup>。养殖场的动物粪便、废水一般由储污池或沼气池处理后排入环境中,甚至未经有效处理便直接排放至环境,将大量耐药基因和耐药菌输入到受纳环境中。抗生素、耐药菌及耐药基因进入农田土壤中,可能会导致土壤微生物

收稿日期: 2017-11-12

《华南师范大学学报(自然科学版)》网址: <http://journal.scnu.edu.cn/>

基金项目: 国家自然科学基金项目(41703117); 中国科学院前沿科学重点研究项目(QYZDJ-SSW-DQC029); 中国博士后科学基金项目(2016LH0021, 2017M612773)

\* 通讯作者: 何良英, 博士后, Email: heliangying@163.com; 应光国, 研究员, Email: guangguo.ying@gmail.com.

的抗生素耐药性增强<sup>[4]</sup>. 在可移动元件(Mobile Genetic Elements, MGEs)(如质粒、转座子、整合子等)的参与条件下,耐药基因能够在同种甚至不同种菌株间发生水平扩散,这也极大地促使耐药基因在群落菌株间的传播扩散<sup>[5]</sup>. 研究显示<sup>[6-7]</sup>,在土壤中,仅四环素类耐药基因就有40余种,其中*tetA*、*tetO*、*tetW*以及*tetZ*基因检出率较高. 而磺胺类耐药基因(*sul*)、红霉素耐药基因(*erm*)、多重耐药基因(*cfr*)等其他耐药基因也被多次检出. 前期研究集中关注耐药基因的产生及传播机制、环境污染等,缺乏对长期使用粪肥的土壤中耐药基因消减规律的研究.

生物质炭是有机资源变性的一种重要形式,其回田利用对农田土壤肥力和环境将产生重要影响<sup>[10]</sup>. 生物质炭不仅可以改良土壤理化性状,提高土壤中酶的活性<sup>[11]</sup>,还可以为微生物繁殖提供理想场所<sup>[12]</sup>. 研究表明,生物质炭的添加会对土壤中微生物的种群结构产生影响<sup>[12]</sup>,如生物质炭可以提升土壤中细菌、真菌以及放线菌的数量<sup>[13]</sup>. 然而生物质炭对长期施用粪肥的土壤中耐药基因变化趋势的影响目前还缺乏研究. 提高土壤含水率可改变土壤间隙度、离子电位和吸附系数等理化性质,对抗生素降解速率产生影响<sup>[14]</sup>,可影响耐药基因的存在水平<sup>[15]</sup>,同时制造了厌氧环境,进而改变土壤微生物群落结构,如提高厌氧氨氧化细菌的含量<sup>[16]</sup>. 然而,土壤含水率对长期施用粪肥的土壤中耐药基因变化趋势的影响缺乏相关研究.

本团队已对典型畜禽养殖环境及接纳环境中耐药基因的多样性分布特征进行了研究<sup>[17]</sup>. 结果表明,养猪粪肥的长期施用已导致农田土壤耐药基因丰度明显高于附近未施用畜禽粪肥的土壤本底值. 为了阐明耐药基因在受污染农田土壤中的消减规律,本文采集长期施用粪肥的农田土壤,并进行培养实验,考察土壤含水率及生物质炭的添加对耐药基因消减规律的影响,以揭示受污染的农田土壤中耐药基因的动态变化规律. 实验结果可以为土壤耐药基因污染风险评估提供基础数据,为我国抗生素耐药性防控提供科学参考.

## 1 研究方法

### 1.1 供试材料

长期施用粪肥的土壤采自开平市龙尾岗猪场浇灌的葱田. 该猪场建于1991年,总存栏9706头猪,每年出栏至少16600头育肥猪,废水处理采用还田模式. 该葱田常年种植小葱,每天使用养猪粪水灌溉1~2次. 选用附近多年未施用过粪肥的葱田土壤

作为对照土壤. 采用多点采样法采集土壤,并混合均匀,去除植物根系等杂物,经风干、粉碎过筛(孔径2 mm)备用.

### 1.2 土壤实验方案

土壤培养试验于2016年11月—2017年9月在中国科学院广州地球化学研究所的温室(25℃)中进行. 实验设置如表1所示,其中A~D组为长期施用粪肥的葱田土壤, E~H组为对照土壤,即未施用畜禽粪肥的葱田土壤.

表1 土壤培养实验设置

Table 1 Setting of the soil incubation experiments

分组	相对含水率/%	生物质炭质量分数/%
A*	20	1
B*	20	0
C*	70	1
D*	70	0
E**	20	1
F**	20	0
G**	70	1
H**	70	0

注: \* 长期施用粪肥的葱田土壤; \*\* 对照土壤(未施用粪肥的葱田土壤).

相对含水率及生物质炭添加量(质量分数)的计算方法:相对含水率(20%或70%)=土壤持水量/土壤最大持水量;生物质炭质量分数(1%或0)=生物质炭质量/(土壤干质量+生物质炭质量). 添加的生物质炭为果木制成的高纯度黑炭粉末.

水分控制和生物质炭添加方法:将不同质量生物质炭与土壤(30 kg)混合均匀后置于40 L白色PVC箱. 生物质炭添加方式:根据土壤干质量,加入一定质量黑炭,混匀(A、C、E、G组). 水分添加方式:根据土壤最大持水量与风干后土壤含水量,加入纯净水控制土壤相对含水率为20%或70%,进行土壤培养.

样品采集:在第0、8、24、32、63、94、125、155、185、219、310 d采集土壤样本. 采集方式:使用无菌不锈钢土钻以5点取样法采集250 g样品,混合均匀后分成3等份装入密封袋中. 冷冻干燥后磨碎,置于冰箱(-20℃)中保存备用.

### 1.3 主要仪器与试剂

所用仪器及耗材有DNA提取试剂盒(Power Soil® DNA Isolation Kit, 美国)、NanoDrop™ One超微量紫外分光光度计(Thermo, 美国)、荧光定量仪(ViiA™ 7, ABI, 美国)、SYBR® Premix Ex Taq™ II(TliRNaseH Plus, Takara, 大连)、ROX Reference Dye II(Takara, 大连)、引物合成(华大基因).

## 1.4 测定方法和条件

1.4.1 DNA 提取及质量检测 称取一定量冷冻干燥并研磨后的样品,按照试剂盒 PowerSoil® DNA Isolation Kit 说明书操作提取和纯化样品总 DNA. 总 DNA 提取质量检测方法:取 2  $\mu$ L DNA 样品,测定 OD<sub>260</sub>和 OD<sub>280</sub>值(NanoDrop™ One 超微量紫外分光光度计),OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>比值应在 1.6~1.8. OD<sub>260</sub>反映溶液中核酸浓度,OD<sub>280</sub>反映溶液中蛋白质或氨基酸浓度. 比值过高表明有 RNA 污染;比值过低表明有蛋白质、酚等污染. 纯度不高的样品总 DNA 可直接影响下游对目的基因的荧光定量分析.

1.4.2 耐药基因荧光定量 PCR 检测(SYBR® Green I 染料法) 本实验采用的定量策略是绝对定量,即用已知浓度的标准品绘制标准曲线来推算未

知模板中目标基因的浓度. 本实验室已建立抗生素耐药基因绝对定量的荧光定量(qRT-PCR)方法<sup>[14]</sup>. 目前已建立 32 个基因 qRT-PCR 标准曲线<sup>[18-19]</sup>,可表征细菌总量、可移动元件以及环境中常见耐药基因的丰度,包括:表征细菌总量 16S rRNA 基因;可移动元件 *ISCR1*、*Tn916*、*int11*、*int12*、*Trbc*;四环素类 *tetC*、*tetG*、*tetO*、*tetW*、*tetB/P*、*tetH*;氯霉素类 *fexA*、*fexB*、*cmlA*、*cfr*、*floR*;大环内酯类 *ermA*、*mefe*、*ereA*;喹诺酮类 *qnrA*、*qnrD*、*qnrS*、*qepA*、*oqxA*、*oqxB*;磷霉素 *fosA3*;黏菌素 *mcr1*;氨基糖苷类 *aadA*、*rmtB*;磺胺类 *sul1*、*sul2*. 本实验首先采用定性 PCR,筛选实验样品中阳性基因,其次对阳性基因进行 qRT-PCR 定量. 经筛查,实验体系中阳性基因共 12 个,其引物序列及片段大小见表 2.

表 2 耐药基因荧光定量引物设计

Table 2 Primers used for real-time quantitative PCR

目的基因	引物名称	序列(5'→3')	扩增子大小/bp	退火温度/°C	参考文献
16S rRNA	16S rRNA-F	TGTGTAGCGGTGAAATGCC	140	62	[20]
	16S rRNA-R	CATCGTTTACGGCGTGGAC			
<i>int11</i>	<i>int11</i> -F	GGCTTCGTGATGCCTGCTT	148	55	[21]
	<i>int11</i> -R	CATTCTGGCCGTGGTTCT			
<i>Tn916</i>	<i>Tn916</i> -F	GACAGTATTAAGCCATCAGAC	142	50	[22]
	<i>Tn916</i> -R	TCTTCCGAACACAATCATCT			
<i>sul1</i>	<i>sul1</i> -F	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC	163	62	[23]
	<i>sul1</i> -R	TGAAGTTCGCCCGCAAGGCTCG			
<i>sul2</i>	<i>sul2</i> -F	TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG	191	62	[23]
	<i>sul2</i> -R	CGGAATGCCATCTGCCTTGAG			
<i>tetG</i>	<i>tetG</i> -F	GCTCGGTGGTATCTCTGCTC	468	60	[24]
	<i>tetG</i> -R	AGCAACAGAATCGGGAACAC			
<i>tetO</i>	<i>tetO</i> -F	ACGGARAGTTTATTGTATACC	171	55	[25]
	<i>tetO</i> -R	TGGCGTATCTATAATGTTGAC			
<i>tetW</i>	<i>tetW</i> -F	GAGAGCCTGCTATATGCCAGC	168	55	[25]
	<i>tetW</i> -R	GGGCGTATCCACAATGTTAAC			
<i>tetC</i>	<i>tetC</i> -F	GCGGGATATCGTCCATTCCG	207	60	[24]
	<i>tetC</i> -R	GCGTAGAGGATCCACAGGACC			
<i>cmlA</i>	<i>cmlA</i> -F	GCCAGCAGTGCCGTTTAT	158	55	[26]
	<i>cmlA</i> -R	GGCCACCTCCCAGTAGAA			
<i>floR</i>	<i>floR</i> -F	CGGTCGGTATTGTCTTCACG	171	56	[26]
	<i>floR</i> -R	TCACGGGCCACGCTGTAT			
<i>aadA</i>	<i>aadA</i> -F	GCAGCGCAATGACATTCTTG	282	55	[26]
	<i>aadA</i> -R	ATCCTFCGGCCGATTTTG			

注:F 为上游引物,R 为下游引物.

qRT-PCR 反应体系为 20  $\mu$ L, 各组分加样量见表 3, 各基因退火温度见表 2. 每个目的基因的扩增均设置阳性对照(模板为含有目的基因的 DNA 溶液)和阴性对照(模板为无菌超纯水). 反应程序:

(1) 预变性, 95 °C 下变性 1 min; (2) 40 个循环扩增, 95 °C 下变性 15 s, 退火 30 s, 72 °C 下延伸 30 s; (3) 融解曲线检测. 反应结束后查看扩增曲线(反应效率)和融解曲线(扩增特异性). 根据荧光信号到达

域值时的循环数 CT 值,即可从标准曲线计算出样品中目标基因的含量(copies/ $\mu\text{L}$  DNA).

表3 qRT-PCR 反应体系

Table 3 qRT-PCR reaction solution  $\mu\text{L}$ 

qRT-PCR 反应组分	$V$
SYBR <sup>®</sup> Premix Ex Taq <sup>™</sup> II (TliRNaseH Plus) (2 $\times$ )	10.0
上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$ )	0.4
下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$ )	0.4
ROX Reference Dye II (50 $\times$ )	0.4
DNA	4.0
灭菌水	4.8

## 1.5 数据处理

**基因绝对丰度:**根据稀释倍数,换算荧光实时定量 PCR 所得基因拷贝数为基因绝对丰度,单位为 copies/g(土壤干质量). **基因相对丰度计算:**基因相对丰度=基因绝对丰度/16S rRNA 基因绝对丰度.

Pearson 相关性分析用于分析耐药基因之间、耐药基因与可移动元件、耐药基因与不同处理方法之间的相关性. 热图用于描述样品中各类基因的丰度

变化. 指数拟合用于描述耐药基因与可移动元件变化趋势. 线性拟合用于分析耐药基因相对丰度与可移动元件相对丰度之间的相关性. PCA 主成分分析用于描述各样品耐药基因与可移动元件污染特征之间的相似性. 以上分析基于 Origin8.5、IBM、Spss Statistics 19、R 语言、Excel2007、Canoco For Windows 4.5 等软件及系统.

## 2 结果与分析

### 2.1 16S rRNA 基因、耐药基因、可移动元件绝对丰度分析

以处理组代号+采样天数来编号样品,例如 A 组第 0 d 样品为 A0. 将施用粪肥土壤的 4 个实验组 A、B、C、D 统称为 M+实验组,未施用粪肥土壤的 4 个实验组 E、F、G、H 统称为 M-实验组. 各组样本中耐药基因分布及 16S rRNA、MGEs、总 ARGs 变化趋势如图 1 所示. 为更直观分析各类 ARGs 与 MGEs 在样品中的分布,作热图如图 2 所示.

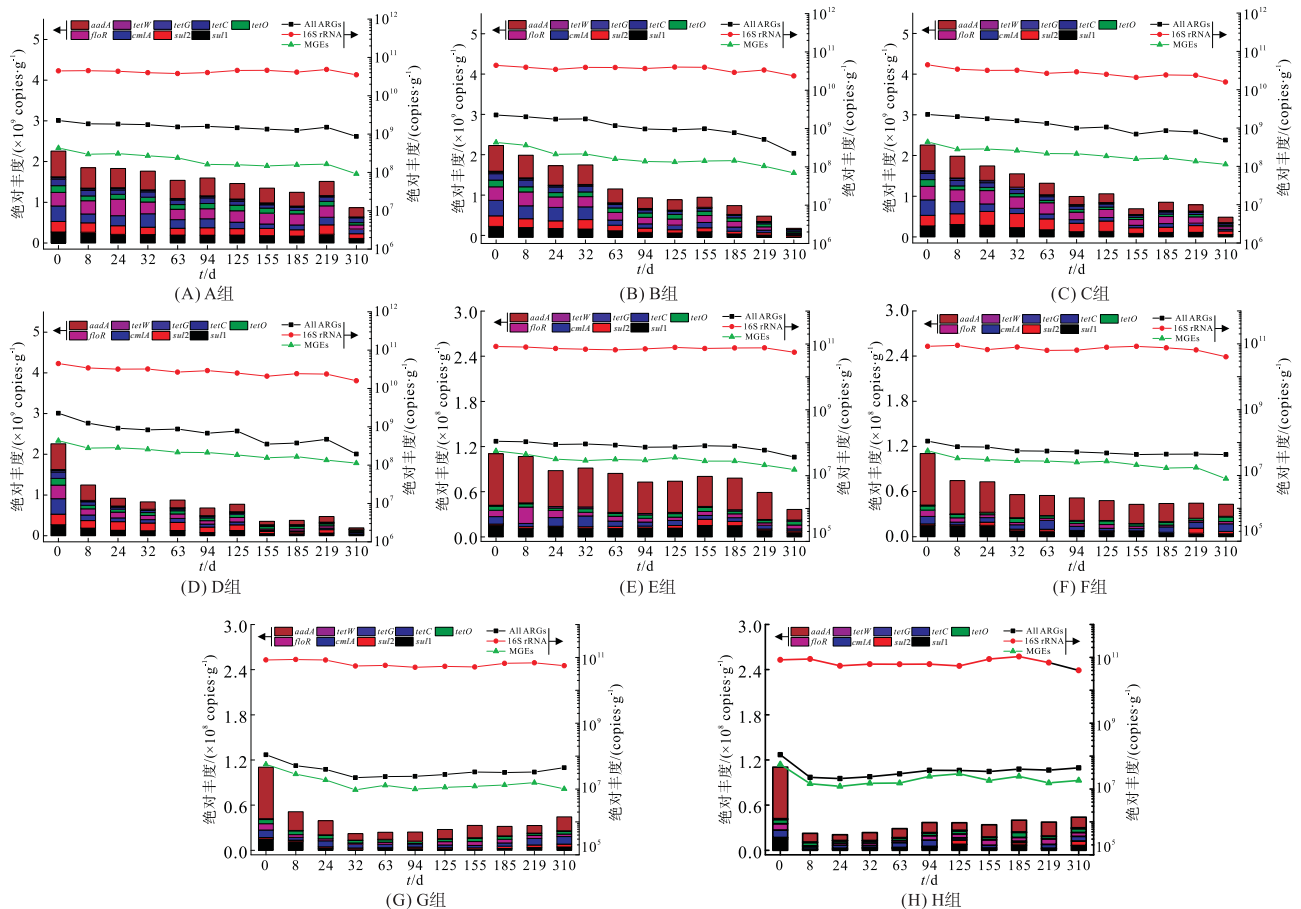


图1 土壤培养过程中 16S rRNA 基因、可移动元件、耐药基因绝对丰度的动态变化

Figure 1 Dynamic changes of 16S rRNA, MGEs and ARGs absolute abundance in soil incubation experiments

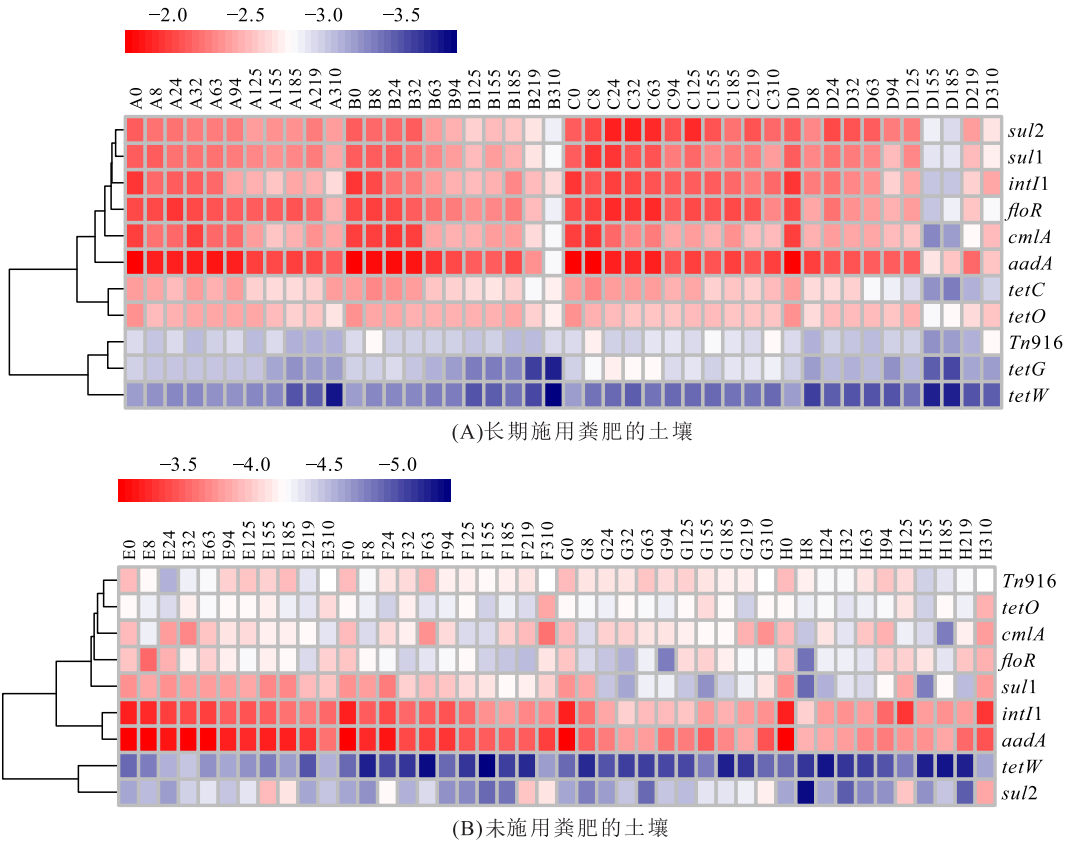


图 2 土壤培养实验中耐药基因与可移动元件相对丰度热图

Figure 2 Heat map of ARGs and MGEs in soil incubation experiments

从 M+实验组检出 *int11*、*Tn916* 两种可移动元件, *tetC*、*tetG*、*tetW*、*tetO* (四环素类)、*sul1*、*sul2* (磺胺类)、*aadA* (氨基糖苷类)、*cmlA*、*floR* (氯霉素类) 等 9 种耐药基因. M-实验组中检出了 *int11*、*Tn916* 两种可移动元件以及 *tetW*、*tetO* (四环素类)、*sul1*、*sul2* (磺胺类)、*aadA* (氨基糖苷类)、*cmlA*、*floR* (氯霉素类) 等 7 种耐药基因. M+组各耐药基因绝对丰度均远远高于 M-组. M+组的总 ARGs 起始丰度达到  $2.26 \times 10^9$  copies/g, 其中 *tetG*、*floR*、*cmlA*、*aadA* 占总耐药基因的比例较高. M-组 ARG 的起始丰度为  $1.18 \times 10^8$  copies/g, 远小于 M+组的起始丰度  $2.26 \times 10^9$  copies/g, 其中 *sul1*、*aadA*、*cmlA* 占总耐药基因比例较高. 同时, M+组和 M-组均检出了 2 种可移动元件 (整合子 *int11*, 转座子 *Tn916*), 其中整合子 *int11* 的丰度远高于转座子 *Tn916*. M+组 MGEs 的绝对丰度远远高于 M-组.

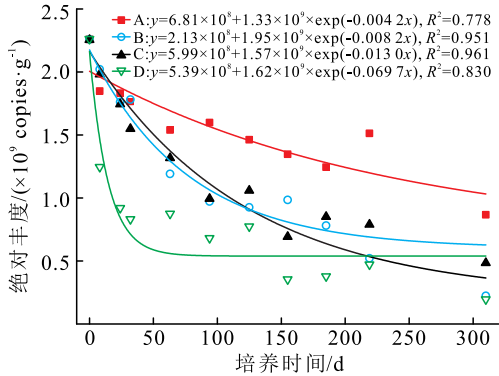
耐药基因和 16S rRNA 基因绝对丰度在各组土壤体系总体上呈现出不同变化趋势. M+组培养过程中, 16S rRNA 绝对丰度均呈缓慢下降的趋势, 其中 A、B 组下降趋势比相对含水率较高的 C、D 组更为缓慢. 各组总 ARG 的绝对丰度均随时间呈现下降的趋势. 分别对比 A、B 组及 C、D 组可以发现, 生物质炭的添加会有效减慢 ARGs 的消减速度. 分别对比

A、C 组及 B、D 组发现, 相对含水率较高的实验组耐药基因消减较快. M-组培养过程中, E、F 组 16S rRNA 基因的绝对丰度均呈平稳下降的趋势, G、H 组 16S rRNA 呈现类似的变化规律, 均在 125 d 前平稳下降, 155 d 处有上升的趋势, 而后再次下降. E、F 组耐药基因呈现平稳下降的趋势, 对比 E、F 组可以发现生物质炭的添加会有效减慢 ARG 的消减. G 组耐药基因在 0~94 d 时呈现消减的趋势, 而后绝对丰度在稳定中有所上升. H 组耐药基因在 0~8 d 迅速消减, 而后在稳定中缓慢上升.

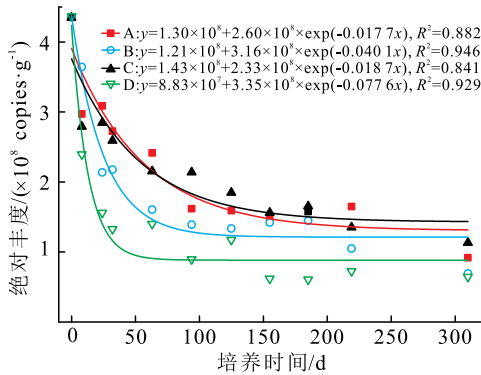
可移动元件在各组土壤实验中亦呈现一定的变化趋势. 分别对比 A、C 组和 B、D 组可发现, 相对含水率较高的实验组 MGEs 消减较快. 分别对比 A、B 组和 C、D 组可以发现, 生物质炭的添加会有效减慢 MGEs 的消减. 在 M-组培养过程中, MGEs 起始绝对丰度为  $5.62 \times 10^7$  copies/g, 远小于 M+组的 MGEs 起始丰度  $4.35 \times 10^8$  copies/g. E、F 组 MGEs 呈现平稳下降的趋势. G 组 MGEs 在 0~94 d 时呈现消减趋势, 然后趋于稳定. H 组 MGEs 在 0~8 d 迅速消减, 而后趋于稳定. 分别对比 E、G 组和 F、H 组可以发现, 相对含水率较高的处理组 MGEs 的下降比相对含水率较低的处理组更为明显.

## 2.2 长期施用粪肥土壤培养组中可移动元件、总耐药基因消减拟合曲线

在培养过程中, M+组 ARGs 及 MGEs 均呈下降的趋势(图 1、图 2), 作散点图并进行趋势拟合, 发现指数拟合较为符合耐药基因及可移动元件绝对丰度随时间的变化趋势(图 3)。



(A) 耐药基因



(B) 可移动元件

图 3 长期施用粪肥的土壤培养体系中培养时间与 ARGs、MGEs 总量的指数拟合曲线

Figure 3 Exponential fitting graphs of ARGs, MGEs absolute abundance in incubation experiments of soil chronically fertilized with manure

对 M+组 ARGs 和 MGEs 绝对丰度作指数拟合:

$$y = y_0 + A \exp(R_0 x),$$

其中,  $y$  为 ARGs 或 MGEs 的绝对丰度 (copies/g);  $x$  为采样日期 (d)。

为了比较各组土壤体系中耐药基因和可移动元件的消减速度, 根据拟合方程计算基因绝对丰度消减至起始浓度一半时所需时间 (half-time,  $t_H$ ):

$$t_H = \ln[(c - y_0)/A] / R_0,$$

其中  $c$  为 ARGs 或 MGEs 起始绝对丰度的一半。

ARGs 或 MGEs 绝对丰度的 HT 计算结果见表 4。相对含水率为 20% 的实验组中 ARGs 消减所需时间最长 (A 组: 253.1 d; B 组: 91.6 d)。相比之下, 当土壤相对含水率为 70% 时, 所需时间较短 (C 组: 83.4 d; D 组: 14.5 d)。综合图 3、表 4 可知, 对比 A、C 组以及 B、D

组可以发现, 在施用过粪肥的土壤实验组中, 相对含水率较高的实验组 MGEs 与 ARGs 消减较快。对比 A、B 两组以及 C、D 两组, 可以发现, 在施用粪肥的土壤实验组中, 添加生物质炭的实验组 MGEs 与 ARGs 消减较慢。这与 2.1 得出的结论一致。

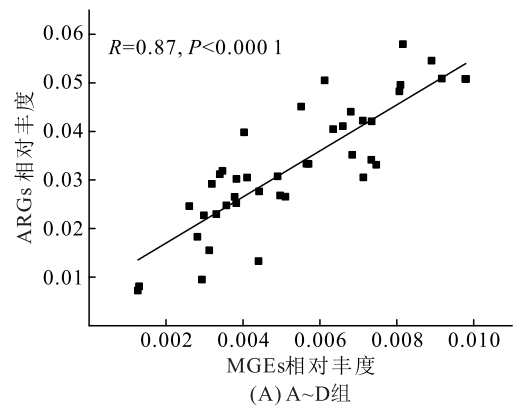
表 4 耐药基因与可移动元件消减一半时所需的时间

Table 4 Half-time of ARGs and MGEs

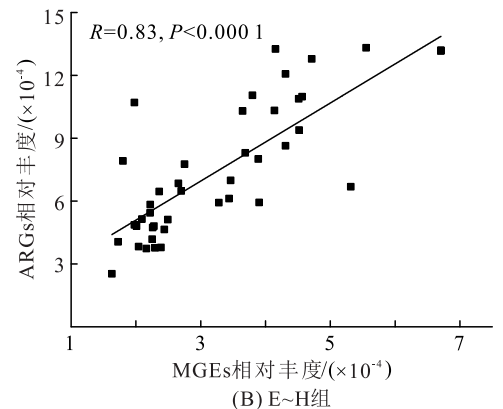
项目	$t_H$			
	A	B	C	D
ARGs	253.1	91.6	83.4	14.5
MGEs	61.2	29.5	60.6	12.2

## 2.3 耐药基因、可移动元件相对丰度的相关性

为了分析土壤实验过程中耐药基因与可移动元件的相关性, 本实验计算了各基因绝对丰度与 16S rRNA 丰度的比值, 获得相对丰度, 可反映总耐药基因、总可移动元件等在总 DNA 中的比例。对 M+组及 M-组的 ARGs、MGEs 相对丰度进行相关性分析及线性拟合如图 4 所示。结果表明, M+组及 M-组中 ARGs 相对丰度与 MGEs 相对丰度均成正相关关系, Pearson's  $R$  分别达到 0.87 ( $P < 0.0001$ ) 和 0.83 ( $P < 0.0001$ ), 为显著相关。



(A) A~D组



(B) E~H组

图 4 土壤培养实验中 MGEs 与 ARGs 相对丰度线性拟合图  
Figure 4 Linear fitting of MGEs and ARGs by relative abundance in soil incubation experiments

## 2.4 样品主成分分析

以耐药基因与可移动元件作为分析指标,从主成分分析图(图 5)中可以看出,A、B、C、D 中样品的分布比 E、F、G、H 更为分散,且 A、B、C、D 污染程度远高于 E、F、G、H 组. 对比 A、B 组发现,B 组降解程

度高于 A 组;对比 C、D 组发现,D 组降解程度高于 C 组;对比 A、C 组发现,C 组降解程度高于 A 组;对比 B、D 组发现,D 组降解程度高于 B 组;对比 E、F、G、H 组发现,降解程度  $E > F > G \approx H$ .

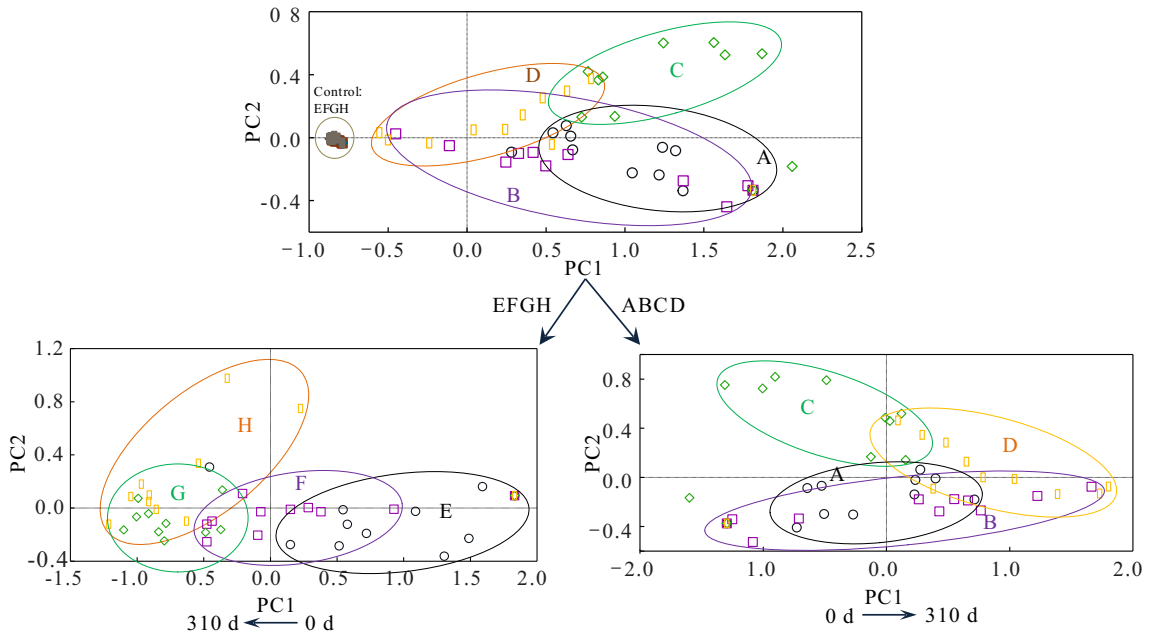


图 5 土壤培养实验 PCA 主成分分析图

Figure 5 Principal component analysis of soil incubation experiments

## 3 讨论

### 3.1 长期施用粪肥对土壤中耐药基因水平的影响

由于不同地区各类抗生素的使用量和传播环境条件不同,土壤中不同耐药基因残留水平与丰度也不尽相同. 在一些国家(如挪威、法国和中国),耕地土壤中的耐药基因丰度超过了  $10^7$  copies/g,有的甚至超过了  $3.16 \times 10^8$  copies/g,而在丹麦和英国,其土壤中耐药基因的水平相对较低,各类耐药基因残留丰度范围为  $(1.99 \times 10^4 \sim 1.58 \times 10^7)$  copies/g<sup>[27]</sup>. 由图 1、图 2 可以看出,长期施用粪肥的土壤中耐药基因绝对丰度远远高于长期施用化肥的土壤,超过了  $10^9$  copies/g,其中检出的 *tet*、*sul*、*aadA*、*cml* 四类耐药基因的绝对丰度均大于  $10^7$  copies/g. 而未施用粪肥的土壤中总耐药基因丰度也超过了  $10^8$  copies/g,与文献[28]、[29]报道的结果相符. 长期施用粪肥的过程中,残留抗生素进入土壤生态环境后,对土壤微生物群落会有较大影响:一方面,抗生素能直接杀死

或者抑制某些微生物的生长,影响微生物分布和群落功能<sup>[30]</sup>;另一方面,高浓度抗生素残留诱导了耐药菌株的出现和繁殖<sup>[31]</sup>,并且在这种诱导作用下,各类耐药基因逐渐出现.

### 3.2 生物质炭及土壤相对含水率对耐药基因及可移动元件消减规律的影响

在土壤培养过程中,长期施用粪肥的土壤中耐药基因与可移动元件的绝对丰度与采样日期呈指数拟合关系,可认为在实验室培养条件下,随着时间推移,长期施用粪肥土壤的耐药基因与可移动元件的绝对丰度呈指数下降趋势,最终稳定在某一水平上.

生物质炭的添加可有效延缓耐药基因及可移动元件的消减速度. 对比添加生物质炭的实验组(A、C、E、G)与不添加生物质炭的实验组(B、D、F、H),可发现生物质炭的添加实验组耐药基因与可移动元件的消减较慢. 其原因可能与生物质炭对土壤微生物活性的影响有关. 生物质炭的施用可以改良土壤理化性状(如疏松土壤、降低容重、增加保水能力、提高团聚性<sup>[32-33]</sup>),提高土壤中活性碳组分的含量

和土壤酶活性<sup>[10]</sup>,对土壤物理化学性质的改变均作用于微生物环境,为硝化菌、固氮菌等好氧微生物的生长繁殖提供了良好的环境<sup>[34]</sup>.同时,生物质炭可以改善微生物细胞附着性能,某些特殊类群的微生物也许能够进入生物质炭的孔隙<sup>[35]</sup>,为微生物提供了生长栖息的理想场所<sup>[11]</sup>,使土壤微生物生理活动更加活跃,而土壤微生物是耐药基因组及可移动元件的主要携带者和传播者,可通过多种途径获取耐药性.同时,添加生物质炭还可以显著影响土壤微生物的群落结构及活性,如有研究表明生物质炭的添加可以影响土壤中氨氧化菌的丰度和活性<sup>[36-37]</sup>.

土壤相对含水率可不同程度影响耐药基因及可移动元件的消减速度.对比不同相对含水率的实验组可发现,相对含水率较高的实验组耐药基因与可移动元件消减较快,这可能与土壤中抗生素的降解及耐药微生物的活性有关.相对含水率的改变引起土壤间隙、离子电位和吸附系数的改变<sup>[38]</sup>,可能影响土壤中抗生素的降解.已有研究表明,土壤的相对含水率也是影响抗生素去除效果的关键因素,相对含水率较高(80%)的土壤在消减速率和消减一半所需时间方面明显优于相对含水率较低(20%)的土壤<sup>[39]</sup>,而耐药基因含量与抗生素残留量显著相关<sup>[40]</sup>,相对含水率较高的实验组耐药基因消减较快,可能是因为其中的抗生素降解较快.提高土壤相对含水率还可影响土壤中厌氧微生物与好氧微生物的种群结构.有研究表明,相对含水率较高的土壤中厌氧氨氧化细菌含量较高<sup>[16]</sup>.

### 3.3 土壤耐药基因消减过程中可移动元件与耐药基因的相关性

实验结果表明,M+组及M-组中ARGs相对丰度与MGEs相对丰度均成正相关关系.近期研究显示,施用有机肥可以影响土壤中耐药基因与整合子的比例<sup>[30]</sup>,其丰度与整合子*int11*基因的相对丰度显著正相关<sup>[41]</sup>,也会引起转座子含量的升高<sup>[42]</sup>.在特殊环境下,携带耐药基因的游离分子能使受体细胞与土壤的细菌细胞之间发生基因的水平扩散转移,从而将耐药基因从游离DNA分子中完全转移到细菌体内,使该细菌获取耐药性,而细胞中的遗传物质通过载体(如质粒)、直接(如结合)或者间接(如转化)的形式进一步转移<sup>[43]</sup>.在移动遗传载体(如质粒、转座子、整合子等)的参与条件下,耐药基因能够在同种或不同种菌株间发生水平扩散,这可促

使耐药基因在群落菌株间的传播扩散<sup>[5]</sup>.因此,在土壤培养过程中,可移动元件在一定程度上可反映耐药基因丰度的消减.

## 4 结论

对比研究了长期施用粪肥和未施粪肥的土壤中耐药基因的消减规律,结果表明:长期施用粪肥可显著提高耐药基因及可移动元件在土壤中的丰度;实验室培养条件下,耐药基因及可移动元件的消减与培养时间之间符合指数拟合关系;生物质炭的添加可减缓耐药基因及可移动元件的消减;相对含水率的增加可加快耐药基因及可移动元件的消减;可移动元件相对丰度的变化在一定程度上可指示土壤中耐药基因相对丰度的消减;长期施用粪肥以及向土壤中添加生物质炭可能会造成耐药基因污染的加剧,具有较大的生态风险.

### 参考文献:

- [1] CABELLO F C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment[J]. *Environmental Microbiology*, 2006, 8(7): 1137-1144.
- [2] CHEE-SANFORD J C, AMINOV R I, KRAPAC I J, et al. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(4): 1494-1502.
- [3] HEUER H, SCHMITT H, SMALLA K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2011, 14(3): 236-243.
- [4] JECHALKE S, HEUER H, SIEMENS J, et al. Fate and effects of veterinary antibiotics in soil[J]. *Trends in Microbiology*, 2014, 22(9): 536-545.
- [5] DAVIES J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes[J]. *Science*, 1994, 264(5157): 375-382.
- [6] ROBERTS M C. Update on acquired tetracycline resistance genes[J]. *Fems Microbiology Letters*, 2005, 245(2): 195-203.
- [7] THOMPSON S A, MAANI E V, LINDELL A H, et al. Novel tetracycline resistance determinant isolated from an environmental strain of *Serratia marcescens*[J]. *Applied*



- and Environmental Microbiology, 2007, 73 (7): 2199–2206.
- [8] BYRNE-BAILEY K G,GAZE W H,KAY P, et al. Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the united kingdom[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, 53(2): 696–702.
- [9] LIU Y,WANG Y,DAI L, et al. First report of multiresistance gene *cf*r in Enterococcus species casseliflavus and gallinarum of swine origin[J]. Veterinary Microbiology, 2014, 170(3/4): 352–357.
- [10] 胡乃娟,韩新忠,杨敏芳,等. 秸秆还田对稻麦轮作农田活性有机碳组分含量、酶活性及产量的短期效应[J]. 植物营养与肥料学报, 2015(2): 371–377.
- [11] PRENDERGAST-MILLER M T,DUVALL M,SOHI S P. Biochar-root interactions are mediated by biochar nutrient content and impacts on soil nutrient availability[J]. European Journal of Soil Science, 2014, 65(1): 173–185.
- [12] 许泽宏,程晓丹,周明罗,等. 生物质炭对芥菜生长过程中根区土壤特性和微生物特性的影响[J]. 江苏农业科学, 2017(16): 104–109.
- [13] 李双喜,张兆辉,郑宪清,等. 秸秆生物质炭对菜田土壤微生物、理化性质及青菜生长的影响[J]. 上海农业学报, 2017(4): 48–54.
- [14] 王桂珍. 鸡粪堆肥中土霉素的快速降解及其微生态机理研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- WANG G Z. Microbial ecology mechanism for quick degradation of Oxytetracycline during chicken feces composting[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2013.
- [15] 易良银,梁玉婷,赵慧慧,等. 土壤中抗性基因的产生、扩散传播以及消减的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2015(9): 1752–1759.
- [16] GU C,ZHOU H,ZHANG Q, et al. Effects of various fertilization regimes on abundance and activity of anaerobic ammonium oxidation bacteria in rice-wheat cropping systems in China[J]. Science of the Total Environment, 2017, 599: 1064–1072.
- [17] 何良英. 典型畜禽养殖环境中抗生素耐药基因的污染特征与扩散机理研究[D]. 广州: 中国科学院研究生院(广州地球化学研究所), 2016.
- HE L Y. Contamination and spread of antibiotic resistance genes in the environment of representative livestock feedlots[D]. Guangzhou: China Academy of Sciences(Guangzhou Institute of Geochemistry), 2016.
- [18] HE L Y,YING G G,LIU Y S, et al. Discharge of swine wastes risks water quality and food safety: antibiotics and antibiotic resistance genes, from swine sources to the receiving environments[J]. Environment International, 2016, 92/93: 210–219.
- [19] HE L Y,LIU Y S,SU H C, et al. Dissemination of antibiotic resistance genes in representative broiler feedlots environments: identification of indicator ARGs and correlations with environmental variables[J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(22): 13120–13129.
- [20] DUAN Q J,SHANG S Q,WU Y D. Rapid diagnosis of bacterial meningitis in children with fluorescence quantitative polymerase chain reaction amplification in the bacterial 16S rRNA gene[J]. European Journal of Pediatrics, 2009, 168(2): 211–216.
- [21] DUAN M, GU J, WANG X, et al. Effects of genetically modified cotton stalks on antibiotic resistance genes, *int1*, and *int2* during pig manure composting[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017, 147: 637–642.
- [22] SCORNEC H, BELLANGER X, GUILLOTEAU H, et al. Inducibility of *Tn916* conjugative transfer in Enterococcus faecalis by subinhibitory concentrations of ribosome-targeting antibiotics[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2017, 72(10): 2722–2728.
- [23] PEI R, KIM S C, CARLSON K H, et al. Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG)[J]. Water Research, 2006, 40(12): 2427–2435.
- [24] NG L K, MARTIN I, ALFA M, et al. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes[J]. Molecular and Cellular Probes, 2001, 15(4): 209–215.
- [25] AMINOV R I, GARRIGUES-JEANJEAN N, MACKIE R I. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(1): 22–32.
- [26] LI J, SHAO B, SHEN J, et al. Occurrence of chloramphenicol-resistance genes as environmental pollutants from swine feedlots[J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(6): 2892–2897.
- [27] PATTERSON A J, COLANGELI R, SPIGAGLIA P, et al. Distribution of specific tetracycline and erythromycin resistance genes in environmental samples assessed by microarray detection[J]. Environmental Microbiology, 2007,

- 9(3):703-715.
- [28] ZHU Y G, JOHNSON T A, SU J Q, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(9): 3435-3440.
- [29] MU Q, LI J, SUN Y, et al. Occurrence of sulfonamide-, tetracycline-, plasmid-mediated quinolone- and macrolide-resistance genes in livestock feedlots in Northern China[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22(9): 6932-6940.
- [30] THIELE-BRUHN S, BECK I C. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass[J]. Chemosphere, 2005, 59(4): 457-465.
- [31] HAMMESFAHR U, HEUER H, MANZKE B, et al. Impact of the antibiotic sulfadiazine and pig manure on the microbial community structure in agricultural soils[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2008, 40(7): 1583-1591.
- [32] PICCOLO A, PIETRAMELLARA G, MBAGWU J S C. Effects of coal derived humic substances on water retention and structural stability of Mediterranean soils[J]. Soil Use and Management, 1996, 12(4): 209-213.
- [33] BRODOWSKI S, JOHN B, FLESSA H, et al. Aggregate-occluded black carbon in soil[J]. European Journal of Soil Science, 2006, 57(4): 539-546.
- [34] WAKELIN S A, GREGG A L, SIMPSON R J, et al. Pasture management clearly affects soil microbial community structure and N-cycling bacteria[J]. Pedobiologia, 2009, 52(4): 237-251.
- [35] PEI R, CHA J, CARLSON K H, et al. Response of antibiotic resistance genes (ARG) to biological treatment in dairy lagoon water[J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41(14): 5108-5113.
- [36] BALL P N, MACKENZIE M D, DELUCA T H, et al. Wildfire and charcoal enhance nitrification and ammonium-oxidizing bacterial abundance in dry montane forest soils[J]. Journal of Environmental Quality, 2010, 39(4): 1243-1253.
- [37] TAKETANI R G, TSAI S M. The influence of different land uses on the structure of archaeal communities in Amazonian anthrosols based on 16S rRNA and *amoA* genes[J]. Microbial Ecology, 2010, 59(4): 734-743.
- [38] INGERSLEV F, TORANG L, LOKE M L, et al. Primary biodegradation of veterinary antibiotics in aerobic and anaerobic surface water simulation systems[J]. Chemosphere, 2001, 44(4): 865-872.
- [39] 牛建平, 吴泽辉, 石起增. 磺胺二甲嘧啶在土壤中的降解动态研究[J]. 安徽农业科学, 2009(4): 1767-1769.
- [40] 徐晨光. 茶园土壤抗生素抗性细菌及抗性基因研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- XU C G. Research on tea garden soil antibiotic resistance bacteria and resistance genes[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014.
- [41] HU H W, HAN X M, SHI X Z, et al. Temporal changes of antibiotic-resistance genes and bacterial communities in two contrasting soils treated with cattle manure[J]. Fems Microbiology Ecology, 2016, 92(2): fiv169/1-13.
- [42] ZHAO Q, WANG Y, WANG S L, et al. Prevalence and abundance of florfenicol and linezolid resistance genes in soils adjacent to swine feedlots[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 32192/1-7.
- [43] 徐冰洁, 罗义, 周启星, 等. 抗生素抗性基因在环境中的来源、传播扩散及生态风险[J]. 环境化学, 2010(2): 169-178.

【责任编辑:谭春林 责任校对:谭春林 英文审校:李海航】