

不同施肥模式对洱海流域稻田土壤中耐药基因污染的影响

韩秉君, 沈仕洲, 杨凤霞, 高文萱, 丁永祯, 张克强

引用本文:

韩秉君, 沈仕洲, 杨凤霞, 等. 不同施肥模式对洱海流域稻田土壤中耐药基因污染的影响[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(11): 2503–2512.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-1044>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

粪源环丙沙星对潮土中抗生素抗性基因的影响

常旭卉, 贾书刚, 王淑平, 周志强

农业环境科学学报. 2018, 37(12): 2727–2737 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0401>

天津市畜禽粪污处理工艺对抗生素抗性基因的去除效果

闫雷, 丁工尧, 杨凤霞, 阮蓉, 韩秉君, 支苏丽, 张克强

农业环境科学学报. 2021, 40(9): 2021–2030 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1280>

华北地区不同规模畜禽养殖场粪便中抗生素抗性基因污染特征

邹威, 金彩霞, 魏闪, RamasamyRajeshKumar, 周启星

农业环境科学学报. 2020, 39(11): 2640–2652 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0403>

堆肥过程中抗生素和耐药基因消减研究进展

王晓醒, 郭雪琦, 冯瑶, 冀拯宇, 刘聪, 李兆君

农业环境科学学报. 2021, 40(11): 2383–2394 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-1119>

洱海流域不同施肥模式对稻田氮磷径流流失的影响

姜海斌, 沈仕洲, 谷艳茹, 于双, 邹洪涛, ArifHusain, 张磊, 张克强

农业环境科学学报. 2021, 40(6): 1305–1313 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1292>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

韩秉君, 沈仕洲, 杨凤霞, 等. 不同施肥模式对洱海流域稻田土壤中耐药基因污染的影响[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(11): 2503–2512.

HAN B J, SHEN S Z, YANG F X, et al. Effects of different fertilization modes on the pollution of antibiotic resistance genes in paddy soils of Erhai Lake basin[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2021, 40(11): 2503–2512.



开放科学 OSID

不同施肥模式对洱海流域稻田土壤中耐药基因污染的影响

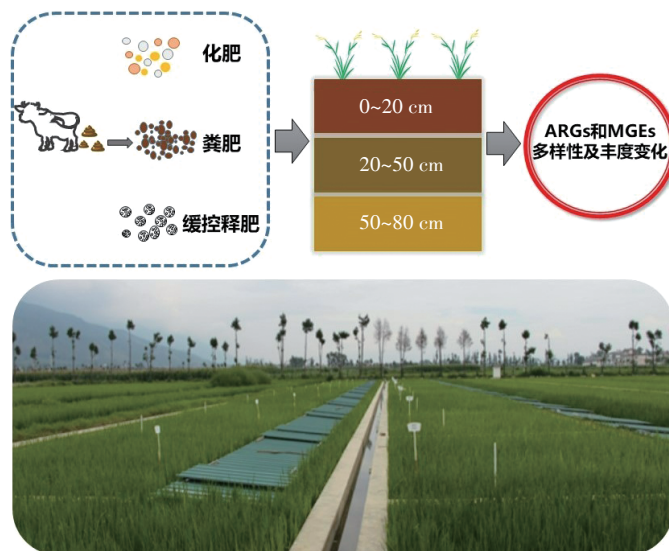
韩秉君¹, 沈仕洲^{1,2}, 杨凤霞^{1*}, 高文萱¹, 丁永祯¹, 张克强^{1*}

(1. 农业农村部环境保护科研监测所, 天津 300191; 2. 国家农业环境大理观测实验站, 云南 大理 671004)

摘 要:为探究不同施肥模式对洱海流域稻田土壤抗生素耐药基因(ARGs)和可移动遗传元件(MGEs)的影响,通过长期田间定位试验,采用高通量荧光定量PCR技术及实时荧光定量PCR技术相结合的方法,对不同施肥模式下稻田土壤中的144种ARGs和10种MGEs进行检测,全面解析了稻田ARGs的污染状况及空间分布规律。结果表明:不同施肥处理土壤中ARGs分布特征不同,其赋存绝对丰度水平整体呈现施用粪肥>施用缓控释肥>施用化肥>不施肥;施加粪肥土壤中的ARGs的赋存多样性和MGEs的种类显著高于其他处理土壤,不施肥模式则显著低于其他处理模式($P<0.05$)。不同ARGs的相对丰度在稻田土壤柱中出现垂直迁移富集趋势,但在不同土层中的富集程度存在差异。不同施肥模式稻田土壤各土层中的优势ARGs为多重耐药类(占比均值为60.3%)、氨基糖苷类(占比均值为10.5%)和四环素类(占比均值为7.5%),其水平多与MGEs丰度显著相关($P<0.05$),表明MGEs促进了稻田土壤中ARGs的传播,加剧了土壤中ARGs的积累富集。研究表明,不同施肥模式对稻田土壤中ARGs和MGEs的分布规律有显著影响,不同深度土层中ARGs的富集程度各异。

关键词:粪肥还田;施肥模式;抗生素耐药基因;污染谱图;分布模式

中图分类号:S511;X53 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2021)11-2503-10 doi:10.11654/jaes.2021-1044



Effects of different fertilization modes on the pollution of antibiotic resistance genes in paddy soils of Erhai Lake basin

HAN Bingjun¹, SHEN Shizhou^{1,2}, YANG Fengxia^{1*}, GAO Wenxuan¹, DING Yongzhen¹, ZHANG Keqiang^{1*}

(1. Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Tianjin 300191, China; 2. Dali Observation and

收稿日期:2021-09-08 录用日期:2021-09-27

作者简介:韩秉君(1996—),女,河北保定人,硕士研究生,主要从事养殖环境中抗生素耐药基因污染研究。E-mail:hanbingjun2018@163.com

*通信作者:杨凤霞 E-mail:yangfengxiacomeon@163.com; 张克强 E-mail:keqiangzhang68@163.com

基金项目:所级基础前沿任务资助项目(2021-jcqrw-yfx);国家自然科学基金项目(41807399,42077355);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(Y2021PT01);云南省重大科技专项计划项目(202102AE090011)

Project supported: The Fundamental Cutting-edge Projects of Research Institute (2021-jcqrw-yfx); The National Natural Science Foundation of China (41807399, 42077355); The Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund (Y2021PT01); The Major Science and Technology Special Plan Project of Yunnan Province(202102AE090011)

Experimental Station of National Agricultural Environment, Dali 671004, China)

Abstract: To explore the effects of different fertilization modes on antibiotic resistance genes (ARGs) and mobile genetic elements (MGEs) in paddy soils of Erhai Lake basin, 144 ARGs and 10 MGEs in paddy soil under different fertilization modes were detected using high-throughput quantitative PCR and real-time quantitative PCR to comprehensively analyze the pollution status and spatial distribution of ARGs in paddy fields. The results showed that the distribution patterns of ARGs were different in different fertilization treatments; the absolute abundance of ARGs in the soil was in the order of manure application > slow and controlled release fertilizer application > chemical fertilizer treatment > no fertilization. The occurrence and diversity of ARGs and the types of MGEs in soil with manure application were significantly higher than those in other treatments, whereas those in the non-fertilization treatment were significantly lower than those in other treatments. The relative abundance of different ARGs showed a vertical migration and enrichment trend in the paddy soil column, but their enrichment degree was different in different soil layers. The dominant ARGs in each paddy soil layer under different fertilization modes were multidrug (average proportion of 60.3%), aminoglycoside (average proportion of 10.5%), and tetracycline (average proportion of 7.5%). Their levels were significantly correlated with the abundance of MGEs ($P < 0.05$), thereby indicating that MGEs promoted the spread of ARGs and aggravated the accumulation and enrichment of ARGs in the soil. The distribution of ARGs and MGEs in paddy soil was significantly affected by different fertilization modes, and the enrichment degree of ARGs in different soil layers was different.

Keywords: manure application; fertilization mode; antibiotic resistance gene; pollution spectrum; distribution patterns

随着规模化养殖业的快速发展,抗生素滥用导致的抗生素耐药基因(Antibiotic resistance genes, ARGs)污染问题日益突出^[1-2]。目前,粪污还田实现种养循环是各级农业部门主推的粪污处理模式,因此 ARGs 不可避免地发生水平转移而随施肥进入农田,进而对土壤环境造成严重污染^[3-4]。研究表明,粪肥施用可增加农田土壤中耐药基因的丰度,如在施用鸡粪肥的土壤中,喹诺酮类 ARGs(*qnrA*、*qnrD* 和 *oqxB*)和大环内酯类 ARGs(*ermA*、*ermB*)比不施肥的对照土中同类 ARGs 的丰度最高可增加 4 个数量级^[5]。LIU 等^[6]在猪粪、鸡粪和牛粪重复连续施用的农田土壤中发现 ARGs 丰度及多样性呈上升趋势。土壤环境中含有大量 ARGs 的耐药菌可能会通过水平转移由内生菌进入植物内部,从而将外源 ARGs 转移至植物的内生系统。现已在新鲜果蔬中发现的大量 ARGs 及多种相关整合子,增加了其通过食物链向人类传播的风险^[7]。

不同施肥模式可显著影响 ARGs 在土壤中的积累和传播。研究表明,施加化肥、粪肥可使 ARGs 水平相较不施肥土壤增加^[8-9]。尤其是粪肥施用能显著增加土壤中 ARGs 的丰度水平,引起土壤环境微生物抗性水平的提高。科学施用有机肥可能是限制 ARGs 在农田传播的有效途径。然而,目前对不同施肥模式下农田土壤 ARGs 的分布模式及传播研究较少,且长期施用粪肥对不同土壤深度 ARGs 垂直迁移的影响尚未得到重视,即缺乏不同施肥方式下不同土层中 ARGs 迁移富集的研究。因此,解析不同施肥方式下,农田土壤不同深度中 ARGs 的积累分布规律及其潜

在环境风险,对分析施肥方式对土壤中 ARGs 的污染及传播十分必要,同时也可进一步认识不同施肥处理模式对农田生态系统的影响。本研究选取云南大理市洱海流域某水稻田作为研究对象,在减氮条件下设置施用化肥、施用有机肥、施用缓控释肥处理,通过田间小区试验,探究土壤中各类 ARGs 在长期定量不同施肥方式下的组成及丰度变化特征,以及在受纳土壤不同土层中的迁移富集规律,并统计 ARGs 与可移动遗传元件(MGEs)的相关关系,分析土壤中 ARGs 多样性程度与丰度水平差异的影响因素及环境风险。本研究从 ARGs 防控角度为水稻肥料施用配比及用量提供科学依据和应用参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集及处理

长期定位试验田位于云南省大理市农业农村局环境保护科研监测所大理综合实验站内(25°53'34"N, 100°10'27"E)。水稻试验采用完全随机区组设计,共 8 个处理,即(1)CK:不施肥;(2)CF:常规施肥,尿素和普钙用量为 424 kg·hm⁻²和 450 kg·hm⁻²;(3)T1:常规施肥减量 20%,尿素和普钙用量分别为 339 kg·hm⁻²和 375 kg·hm⁻²;(4)T2:粪肥等氮替代 T1,粪肥用量为 6 500 kg·hm⁻²;(5)T3:粪肥等磷替代 T1,尿素补齐氮肥,粪肥和尿素用量分别为 2 609 kg·hm⁻²和 203 kg·hm⁻²;(6)T4:考虑粪肥矿化率 25%,以氮计粪肥替代 T1,粪肥用量为 26 000 kg·hm⁻²;(7)T5:考虑粪肥矿化率 25%,以磷计有机肥替代 T1,尿素补齐氮肥,粪肥和尿素用量分别为 10 435 kg·hm⁻²和 203 kg·

hm⁻²; (8) T6: 缓控释肥, 缓控释肥用量为 678 kg·hm⁻²。每个处理 3 次重复, 共 24 个小区, 种植方式和农田管理方式相同。2019 年 10 月水稻收获后采集土壤样品, 分别按 0~20、20~50 cm 和 50~80 cm 不同剖层采集。每个小区采取梅花采样法, 现场均匀混合, 去除水稻根和可见有机物残体后, 采取四分法, 留样 1 kg 左右, 并将土样保存于 -20 °C 冰箱, 待 DNA 提取。

1.2 土壤样品 DNA 的提取

称取约 0.5 g 土壤样品, 所有样品采用 Fast DNA SPIN Kit for soil 试剂盒 (MP Bio-medicals, LLC, Santa Ana, CA, 美国) 并按生产商提供的操作手册进行总 DNA 提取, 每个土壤样品 3 个重复。提取后用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳验证 DNA 的质量。提取的 DNA 样品浓度使用超微量核酸蛋白检测仪 (Nanodrop 2000, 德国) 进行测定, 所提取的 DNA 样品的 A260/A280 值在 1.8 左右。提取后的 DNA 样品置于 -20 °C 的冰箱中保存, 用于后续的检测分析。

1.3 高通量荧光定量 PCR 与实时荧光定量检测方法

使用 WafergenSmartchip 超高通量荧光定量 PCR 系统检测 ARGs 及 MGEs, 共设置 144 对引物, 其中包括 1 对 16S rRNA 内参引物。反应体系为 1×LightCycler 480 SYBR Green I Master; 引物浓度为 500 nmol·L⁻¹; DNA 模板 2 ng·μL⁻¹, 扩增反应体系为 100 nL。反应程序: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火处理, 30 s, 40 个循环; 最后系统自动进行熔解曲线分析。使用 7500 实时荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国) 对 16S rRNA 进行实时 qPCR 分析。反应体系为 20 μL, 包括 16S rRNA 上下游引物各 0.4 μL、ddH₂O 6.8 μL、TB Green Premix Ex Taq (Tli RNase H Plus, Takara) 10.0 μL、ROX Reference Dye II 0.4 μL 以及 DNA 模板 2 μL。qPCR 扩增过程: 95 °C 预变性 30 s; 然后为 40 个循环, 包括 95 °C 变性 5 s 和 60 °C 退火持续 34 s, 熔解曲线分析在 60~95 °C 之间进行。其中无菌水为阴性对照, 每个 DNA 模板设置 3 个平行, qPCR 反应程序和标准曲线的制作参照文献[10]。

1.4 数据分析

使用 Excel 2007 计算数据的绝对丰度、相对丰度、平均值和标准差等。采用 SPSS 22.0 对数据进行相关分析和 ANOVA 方差分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。采用 Origin 2021 软件绘制柱状图、热图和维恩图。

利用标准曲线计算 16S rRNA 基因的绝对拷贝数, 经线性拟合分析可知其与高通量定量 PCR 检测

出的 16S rRNA 的相对拷贝数有较好的线性关系 ($r = 0.956$), 且极显著相关 ($P < 0.01$), 故可以使用公式 (1)^[11] 和公式 (2) 计算 ARGs 的绝对丰度, 进一步 ARGs 的相对丰度通过公式 (3) 可计算得到。

$$\text{基因的相对拷贝数} = 10^{(31-CT)/(10/3)} \quad (1)$$

$$\text{ARGs 的绝对丰度} = \text{ARGs 的相对拷贝数} / 16\text{S rRNA 基因的相对拷贝数} \times 16\text{S rRNA 基因的绝对拷贝数} \quad (2)$$

$$\text{ARGs 的相对丰度} = \text{基因的相对拷贝数} / 16\text{S rRNA 基因的相对拷贝数} \quad (3)$$

式中: ARGs 是所要测定的 144 种抗生素抗性基因; CT 是高通量荧光定量所测定的循环阈值。

2 结果与讨论

2.1 长期施用粪肥稻田土壤中抗生素耐药基因的赋存多样性特征

选取 7 大类 144 种常见的 ARGs 及 10 种与 ARGs 传播密切相关的 MGEs, 对其在长期施用粪肥的稻田土壤中的存在情况进行了分析检测, 结果如图 1 所示。在长期施肥土壤中, 共检出 100 种 ARGs 亚型和 9 种 MGEs 编码基因 (7 种转座子基因和 2 种整合子基因)。从不同类别与不同作用机制来看, 水稻土中检测到的 ARGs 包含了目前已知且常见的 ARGs 类型, 主要包括氨基糖苷类 *aac*-ARGs (13 种)、β-内酰胺类 *bla*-ARGs (16 种)、磺胺类 *sul*-ARGs (5 种)、大环内脂类林可酰胺类链阳性菌素 MLSB-ARGs (20 种)、多重耐药类 MDR-ARGs (9 种)、四环素类 *tet*-ARGs (18 种) 和万古霉素类 *van*-ARGs (8 种) 等 7 大类耐药基因, 另外还有 11 种其他类的 ARGs。其中, 四环素类 ARGs 和大环内脂类林可酰胺类链阳性菌素 B (MLSB) 的 ARGs 在水稻土中检出较多, 分别达 23.00% 和 22.13%; 其次是与人类危害息息相关的多重耐药类和 β-内酰胺类抗生素 ARGs^[12-15], 占比达 16.84% 和 13.12%, 值得引起注意。氨基糖苷类 ARGs 检出占比为 10.99%; 磺胺类和万古霉素类的数量较少, 占比仅为 6.17% 和 4.90%。所有水稻土处理中检测到 ARGs 的抗生素抗性机制主要是抗生素失活 (Antibiotic deactivation)、抗生素外排泵 (Efflux pump) 和细胞核糖保护 (Cellular protection), 这 3 类抗生素抗性机制在整体中的比例分别为 37.06%、37.60% 和 24.84%, 还有 0.50% 的其他或未知抗性机制 (图 2)。

值得注意的是, 不同施肥模式下, 稻田土壤中 ARGs 的赋存多样性存在差异, 其中施用粪肥土壤 (T2~T5 处理) 中 ARGs 的多样性最为丰富, 其检出种

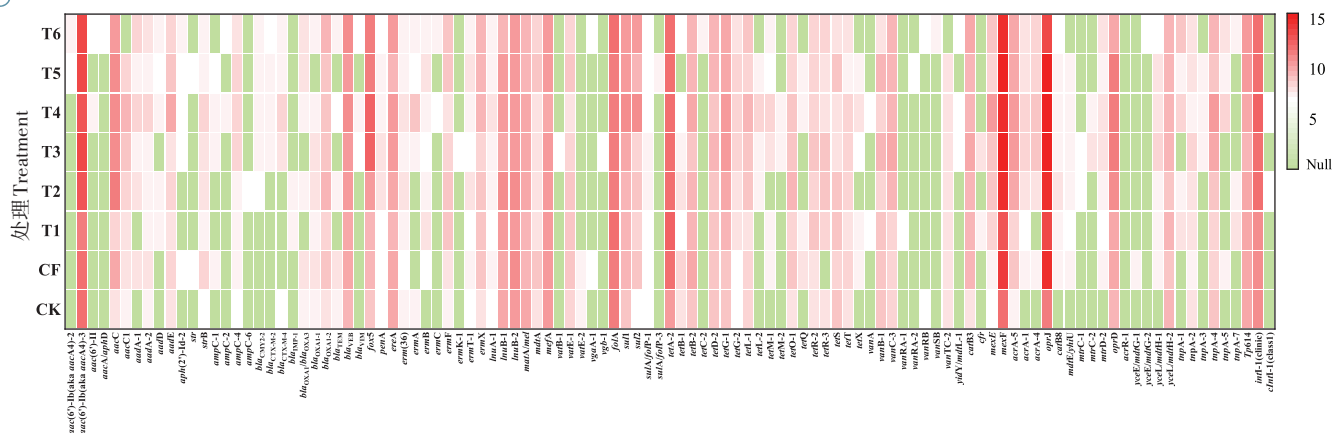


图1 稻田土壤中 ARGs 的绝对丰度

Figure 1 The absolute abundance of ARGs in paddy soil

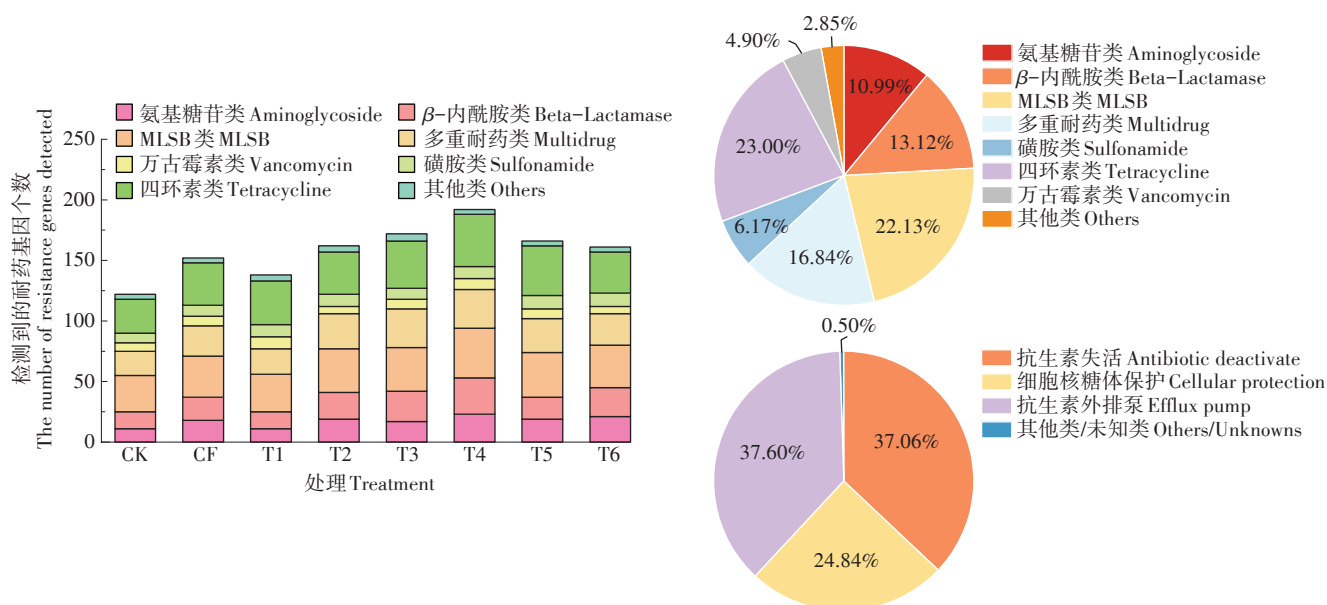


图2 稻田土中 ARGs 的检出种类

Figure 2 Profiles of detected ARGs in paddy soil

类可达88种;其次为长期施用缓控释肥的T6处理土壤(76种)和施用化肥(CF和T1处理)的稻田土壤(74种);而在CK土壤中也存在多种ARGs,种类亦达63种。同ARGs污染多样性特征相似,在施用粪肥量最大的T4处理中检测到的MGEs种类最多,达7种,显著高于其他施肥类型的土壤。由维恩图(图3)可以看出,有55种(50.5%)ARGs亚型为6种不同施肥模式稻田土壤中的核心ARGs(即共现ARGs)。其中,CK处理中ARGs的总检出数量最少,基因多样性最低;另外3种施用肥料的处理中ARGs的总检出数量均有增多。施用粪肥的处理中ARGs的总检出数量最多,其次是施用缓控释肥和施用化肥的处理,分别

是CK处理的1.3、1.2倍和1.1倍,均显著高于CK水稻土($P<0.05$)。施用化肥的处理中,T1处理的ARGs数量与CF处理相比有所降低。施用粪肥水稻土中独有的ARGs有7个(*bla_{ampC-6}*、*vatB-1*、*sulA/folP-3*、*tetL-2*、*tetM-2*、*vanRA-2*、*mtrC-2*)。从ARGs的检出数量来看,在4种不同用量的粪肥替代处理组中,T4处理田块中ARGs的总检出量最高,所有样品中总共有210个ARGs;其次是T3处理,检出185个ARGs;T2处理和T5处理的检出量相差较少,分别为176个和179个ARGs。施用粪肥土壤中的ARGs相对于CK土壤具有更复杂的多样性,施用粪肥显著改变了稻田土壤中的ARGs种类组成($P<0.05$)。

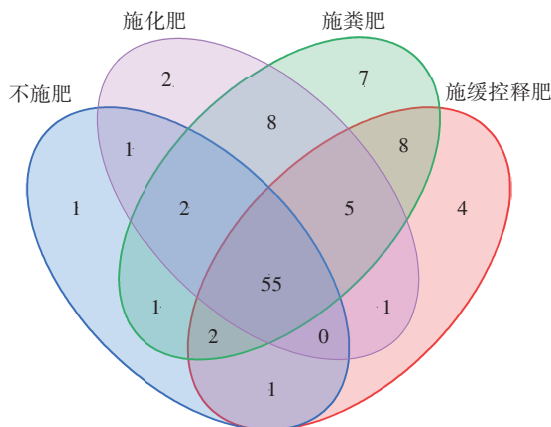


图3 不同施肥模式 ARGs 的维恩图

Figure 3 Venn diagram of ARGs in different fertilization patterns

2.2 不同施肥模式稻田土壤中抗生素耐药基因的污染水平及差异性

不同施肥模式下,稻田土壤中 ARGs 的污染水平见图 4。结果显示,不同处理模式下的稻田土壤 ARGs 污染水平在 $1.0 \times 10^7 \sim 1.3 \times 10^{10}$ copies $\cdot$ g $^{-1}$ 的范围内,且不同施肥模式的稻田土壤中 ARGs 的存在水平不同,整体呈现出施用粪肥>施用缓控释肥>施用化肥>不施肥的趋势,这与之前的研究结果一致^[16-17]。在 4 种施用粪肥的处理模式中,施用粪肥较多的 T3 处理中 ARGs 的丰度水平最高,ARGs 的总丰度达 9.6×10^{10} copies $\cdot$ g $^{-1}$;其次为 T4 和 T5 处理,ARGs 总丰度分别达 7.6×10^{10} copies $\cdot$ g $^{-1}$ 和 7.3×10^{10} copies $\cdot$ g $^{-1}$;施用粪肥量较少的 T2 处理中 ARGs 的总绝对丰度最低,是 T3 处理的 60%,其相应的 ARGs 种类数也较低。从 ARGs 的类别来看,不同施肥模式下稻田土壤中的优势基因主要包括多重耐药类和氨基糖苷类,且各模式

稻田中污染水平最高的类型均为多重耐药类,占 ARGs 总丰度的 62.9%~77.4%,为 $1.1 \times 10^7 \sim 1.3 \times 10^{10}$ copies $\cdot$ g $^{-1}$;其次为氨基糖苷类,占 ARGs 总丰度的 8.2%~12.3%,为 $1.0 \times 10^7 \sim 3.3 \times 10^9$ copies $\cdot$ g $^{-1}$ 。而四环素类和 MLSB 类 ARGs 在各处理稻田土壤中总丰度的占比较低,分别为 4.0%~9.2% 和 3.0%~8.2%。此外,虽然与人类健康密切相关的 β -内酰胺类和万古霉素类 ARGs 在所有稻田处理中的丰度水平较低,但其检出率较高,分布较为广泛,亦应引起重视。

为了规避不同处理中微生物量对 ARGs 的影响,又进一步从 ARGs 的相对丰度分析了不同模式下 ARGs 的污染水平,结果见图 4。当不同施肥土壤中 ARGs 的丰度水平统一到每个细胞中 ARGs 的拷贝数,即将 ARGs 的丰度归一到单个细菌水平时,所有处理稻田土壤中 ARGs 的相对丰度水平在 $1.7 \times 10^{-5} \sim 3.6 \times 10^{-2}$ 范围内。在施用粪肥的 4 个处理模式中,T4 处理稻田土壤中的 ARGs 总相对丰度最低,为 0.13,这可能是由于 T4 处理较大的粪肥施肥量显著增加了土壤中的微生物总量,从而使得 ARGs 的相对丰度低于其他粪肥施用量较少的处理;而 T3 处理总相对丰度水平稍高,是 T4 处理的 1.4 倍;而 T2 和 T5 处理中的 ARGs 总相对丰度水平相似,分别为 0.19 和 0.18。综上所述,施用粪肥处理的相对丰度水平与绝对丰度的赋存规律不一致,这主要是因为不同施肥模式下,稻田土壤中微生物量的不同所致。从相对丰度的角度来看,稻田土的主导 ARGs 类型与绝对丰度处理的规律一致,亦为多重耐药类、氨基糖苷类和四环素类。丰度最高的多重耐药类 ARGs 在 T5 处理中相对丰度最高 ($7.4 \times 10^{-5} \sim 2.5 \times 10^{-2}$),而氨基糖苷类和四

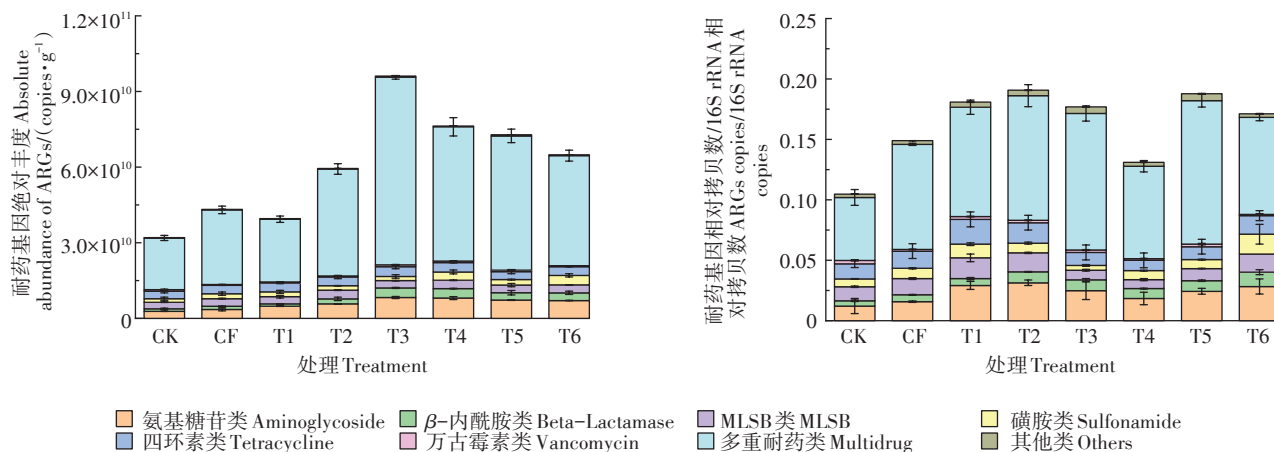


图4 不同施肥模式稻田土中各类 ARGs 的污染水平

Figure 4 Pollution levels of different ARGs types in paddy soils under different fertilization modes

环素类 ARGs 则分别在施用粪肥的 T2 处理和减量施用化肥的 T1 处理中丰度最高, 分别为 $6.2 \times 10^{-5} \sim 2.1 \times 10^{-2}$ 和 $8.9 \times 10^{-5} \sim 8.3 \times 10^{-3}$ 。MLSb 类和磺胺类 ARGs 在所有处理中分别占总丰度的 4.5%~11.1% 和 2.3%~9.6%, 分别在 T1 和 T6 处理中相对丰度最高; 与人类关系密切的 β -内酰胺类在各处理水稻田中也有检出, 但总丰度占比较低, 为 3.2%~6.9%; 万古霉素类的相对丰度在各处理中差异不显著 ($P>0.05$), 且丰度水平最低。

相比于 CK 处理的稻田土壤, 施用化肥、粪肥以及缓控释肥均明显增加了稻田土壤中 ARGs 的多样性与丰度。其中, 在施用粪肥处理中, ARGs 的丰度水平较施用化肥处理也有较大程度的增加, 多重耐药类、氨基糖苷类以及 β -内酰胺类 ARGs 水平增加较为明显。不同施用粪肥处理中 ARGs 含量的高低水平在绝对丰度与相对丰度中存在一定差异, 绝对丰度较高的 T4 处理, 其相对丰度水平最低, 这可能是由于 T4 处理施用粪肥量较大, 土壤中微生物量 (16S rRNA) 显著增加, 从而使得归一后的相对丰度水平降低。与 WANG 等^[8]的研究结果相似, 施用化肥或粪肥的土壤与不施肥土壤相比, 能够不同程度地提高 ARGs 的多样性及丰度。

2.3 长期不同施肥模式下稻田土壤中耐药基因的垂直积累分布规律

为了明确长期施肥稻田土壤中 ARGs 的垂直积累特征, 本研究又进一步调查了各施肥模式下不同土层中 ARGs 的积累富集规律。调查结果显示, 在不同施肥模式各土层中含量较高的 ARGs 依然是多重耐药类、氨基糖苷类以及四环素类, 但不同模式各土层中 ARGs 的迁移富集规律不同。如在长期施用粪肥的 4 个处理模式中, 稻田土壤中 ARGs 的绝对丰度总体呈现由表层向深层土壤递减的趋势, 这与 PAN 等在污水灌溉农田不同土层中 ARGs 的丰度变化一致^[18]。且 β -内酰胺类、磺胺类、多重耐药类和 MLSb 类 ARGs 在耕层 (0~20 cm) 中的丰度分别是底层 50~80 cm 的 2.3、1.8、1.7 倍和 1.5 倍。此外, 在施用粪肥量最大的 T4 处理中, 各类 ARGs 的绝对丰度从稻田土表层到底层逐渐减少 (图 5)。而在 CK 稻田土中, 多重耐药类 ARGs 在 20~50 cm 的丰度最高, 高达 1.3×10^{10} copies $\cdot$ g⁻¹, 分别是 50~80 cm 和 0~20 cm 土壤的 1.7 倍和 48.9 倍; 而四环素类、磺胺类以及 MLSb 类 ARGs 在 0~20 cm 的丰度最高; 万古霉素类、氨基糖苷类以及 β -内酰胺类 ARGs 的绝对丰度则出现向下累积的趋

势。施用化肥后的处理中丰度较高的多重耐药类、氨基糖苷类和四环素类 ARGs 在不同土层中的累积情况不同, 氨基糖苷类在 0~20 cm 的丰度最高, 多重耐药类则是在较深层的 50~80 cm 丰度最高, 而四环素类在各土层中无明显丰度变化差异 ($P>0.05$)。T6 处理稻田土壤中, 丰度最高的多重耐药类在 20~50 cm 的绝对丰度最高, 与 CK 处理规律一致, 达 1.0×10^{10} copies $\cdot$ g⁻¹, 不同深度土层中的各类 ARGs, 大部分都在施用缓控释肥后丰度增加。

而从相对丰度来看, CK、CF、T1 和 T6 处理的土壤中, 大多数 ARGs 在 50~80 cm 的深层土壤中的丰度相比 0~20 cm 和 20~50 cm 土层显著增高 ($P<0.05$), 其与绝对丰度中 20~50 cm 和 50~80 cm 的 ARGs 赋存规律不一致。ARGs 的相对丰度在深层土中更高的原因主要是因为深层土壤中微生物量含量较少, 从而导致归一后相对丰度水平较高。施用粪肥的稻田土壤中, ARGs 在 50~80 cm 土层中的相对丰度水平比 0~20 cm 高 (是 0~20 cm 的 1.2 倍)。施用粪肥量较少的 T2 处理中 ARGs 的丰度相较其他施肥处理在深层 50~80 cm 土层中累积显著 ($P<0.05$)。在 6 个不同施肥处理模式中, 心层土 (30~50 cm) 和底层土 (60~80 cm) 中 ARGs 的相对丰度与耕层土 (0~20 cm) 相比均较高, 不同类型 ARGs 从耕层 (0~20 cm) 经 20~50 cm 土层向 50~80 cm 的累积速度有一定差异。不同深度的稻田土中, 相对丰度呈现明显垂直向下层累积的现象, 这与之前的研究结果相同^[19]。可能是由于本研究于水稻收获后采集稻田土壤, 已超过施用肥料 1 个月的时间, 且经过了较长时间水稻种植的淹水时期, 携带 ARGs 的细菌由水分的渗透作用加快了向下层土迁移的速度^[20]。同时, 粪肥的施用年限、土壤理化性质和相关 MGEs 等因素的不确定性^[21], 可能导致不同土层中不同种类 ARGs 的分布累积具有差异, 部分在 20~50 cm 富集, 部分则主要在 50~80 cm。综上, 施肥方式会对 ARGs 在不同深度土层的分布产生一定的影响, 但具体的迁移机制有待进一步研究。

2.4 不同施肥模式下主导 ARGs 的谱图特征及其与 MGEs 的关系

在水稻土中多重耐药类、氨基糖苷类、四环素类和 β -内酰胺类 ARGs 为主导基因类型, 占比较高; 多重耐药类不仅丰度高, 且其和 β -内酰胺类 ARGs 均与人类健康密切相关, 因此风险性较高。在多重耐药类 ARGs 的不同亚型中, *mexF* 和 *oprJ* 的丰度在各处理中检出量均较高, 其绝对丰度分别为 $7.3 \times 10^9 \sim 2.4 \times 10^{10}$

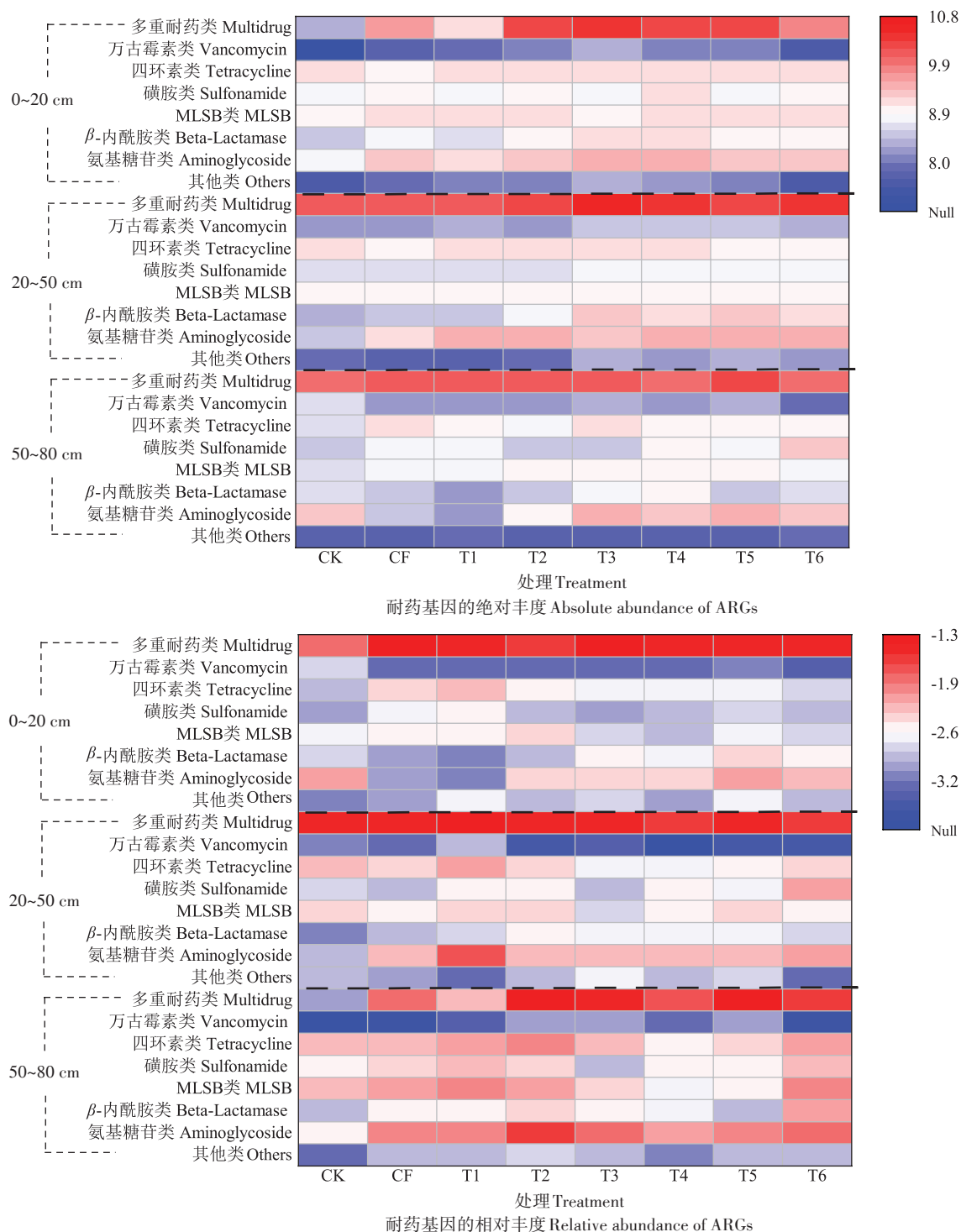


图5 不同土层中各类 ARGs 的绝对丰度与相对丰度的分布热图

Figure 5 Heatmaps of absolute abundance and the relative abundance of ARGs in different soil layers

$\text{copies} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $5.6 \times 10^9 \sim 2.4 \times 10^{10} \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$, 是稻田土中流行的 ARGs, 很多关于农田土壤的研究结果也表明多种耐药类的丰度较高^[22-24]; *acrA-1*、*acrA-4*、*acrA-5*、*catB3* 和 *mexE* 等基因在各处理中均有检出且丰度也较高, 平均丰度达 $10^8 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$; *cfr* 及 *yidY/mdtL-1* 的

丰度较低, 在施肥处理后才检出。氨基糖苷类 ARGs 中, *aac(6')-Ib* (aka *aacA4*)-3 的丰度最高, 其次为 *aacC*, 绝对丰度水平分别为 $2.5 \times 10^9 \sim 5.5 \times 10^9 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $8.7 \times 10^7 \sim 2.4 \times 10^9 \text{ copies} \cdot \text{g}^{-1}$; *aacC*、*aacC1*、*aadA-1*、*aadA-2*、*aadD*、*aadE* 和 *strB* 也在水稻土中普遍

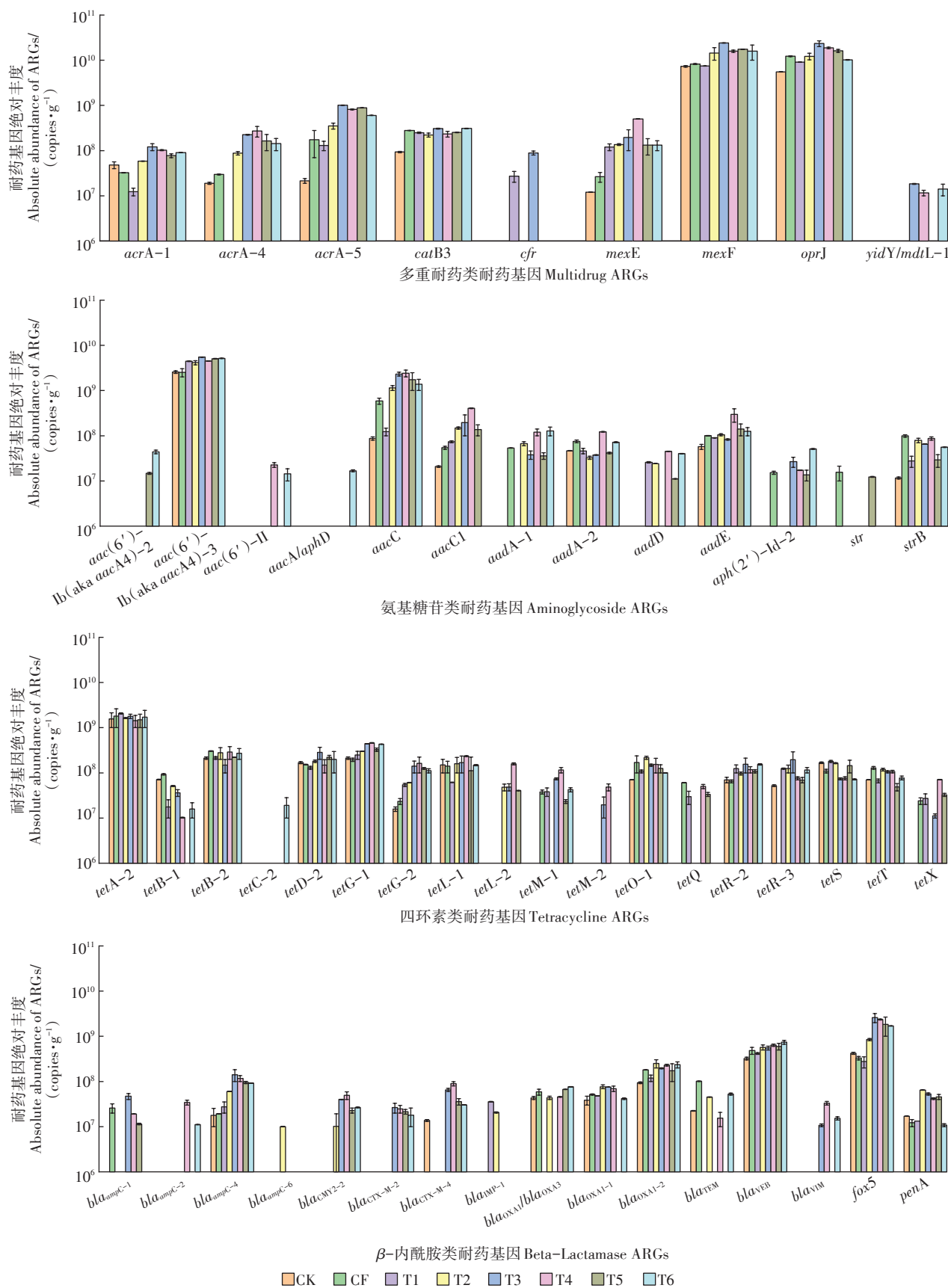


图6 不同施肥处理稻田土壤中主导ARGs的分布规律

Figure 6 Distribution of dominant ARGs in paddy soils under different fertilization treatments

存在。四环素类 ARGs 中,丰度最高的是 *tetA-2*,所有处理的平均丰度均达到 10^9 copies $\cdot$ g $^{-1}$;其次是 *tetG-1* 和 *tetB-2*,分别为 *tetA-2* 的 19% 和 14%。 β -内酰胺类 ARGs 在稻田土中丰度最高的是 *fox5*,为 $2.8 \times 10^8 \sim 2.6 \times 10^9$ copies $\cdot$ g $^{-1}$, *bla_{VER}* 和 *bla_{OXA1-2}* 丰度略低于 *fox5*,平均丰度在 10^7 copies $\cdot$ g $^{-1}$ 水平;*bla_{OXA-1}*/*bla_{OXA-3}*、*bla_{OXA1-1}*、*bla_{OXA1-2}*、*bla_{TEM}* 和 *penA* 也在各处理中普遍存在。多重耐药类、氨基糖苷类、四环素类以及 β -内酰胺类 ARGs 的总绝对丰度,施用化肥、粪肥以及缓控释肥的 3 种处理相对于未施肥土壤中均有增多,分别增加了 0.4、1.6 倍和 1.1 倍,其中施用粪肥和缓控释肥的水稻土显著富集了 ARGs。

研究表明,ARGs 在环境微生物间的传播和转移与 MEGs 紧密相关^[25-26],因此对 ARGs 的绝对丰度与 MEGs 之间的相关性进行分析,结果显示(表 1),部分 ARGs 与转座子基因、整合子基因存在显著相关性,表明 MEGs 可能促进了 ARGs 在稻田土壤中的迁移和传播。有研究发现环境微生物中的 *intI1*(clinic)与许多 ARGs 有关^[27],*aadA*、*tetG*、*acrA-1*、*mexE* 等均与 *intI1*(clinic)显著相关。本研究中 *intI-1*(clinic)与多重耐药类 ARGs(*acrA-1*、*acrA-4*、*acrA-5*、*mexF* 和 *oprJ*)以及 β -内酰胺类(*bla_{ampC-4}*、*bla_{CMY2-2}*、*bla_{CTX-M-2}*、*bla_{CTX-M-4}* 和 *fox5*)有显著正相关,进一步证明稻田土壤中 *intI1* 整合子基因对 ARGs 的传播转移起着重要作用。此外,转座子基因也与高丰度的基因显著相关,如 *tnpA-3* 与多重耐药类 ARGs 中的 *oprJ* 以及 *tnpA-3*、*tnpA-4* 与 β -内酰胺类 ARGs 中的 *fox5*。在施用粪肥及施用缓控

释肥的处理中,检测到 MGEs 的丰度分别是 CK 处理稻田土的 2.0 倍和 2.1 倍,表明 MGEs 在施用粪肥及缓控释肥的水稻土中富集。在 *intI-1*(clinic)、*tnpA-3* 和 *tnpA-4* 等主要 MGEs 的丰度较高的情况下,可能导致 ARGs 的基因水平转移速度加快,进而促进了其在稻田土中的进一步传播、富集和演化。ARGs 通过 MGEs 水平转移作为基因的重要转移方式应在施肥土壤环境中得到重视,并应加强农田土壤中 ARGs 的水平转移机制的研究。

3 结论

(1)不同施肥模式下,稻田土壤中 ARGs 具有不同的分布特征,其中 ARGs 绝对丰度呈现施用粪肥土壤>施用缓控释肥土壤>施用化肥土壤>不施肥对照土壤,但不同施肥处理模式下的稻田土中优势基因基本一致,多为多重耐药类、氨基糖苷类和四环素类 ARGs。

(2)不同施肥模式下,稻田土壤中 ARGs 和 MGEs 的赋存多样性存在显著差异,其中施加粪肥稻田土壤中的 ARGs 的赋存多样性和 MGEs 的种类显著高于不施肥、施加化肥和施加缓控释肥的田块,不施肥模式则显著低于其他处理模式。

(3)不同深度土层中稻田土壤 ARGs 的相对丰度呈现向下富集的趋势,转移传播的速度可能受水稻生长条件、可移动遗传元件、施肥方式等自然环境和人为因素影响,其在不同土层中的传播机制仍需进一步探究。

(4)长期施肥模式下,不同土层土壤中的 ARGs 水平与 MGEs 丰度显著相关,其中 *intI-1*(clinic)与丰度较高的多重耐药类和 β -内酰胺类中的多种 ARGs 有极显著正相关性($P < 0.01$),表明土壤中 MGEs 可能促进了 ARGs 的传播扩增,加剧了农田土壤的 ARGs 污染。

参考文献:

- [1] 周启星, 罗义, 王美娥. 抗生素的环境残留、生态毒性及抗性基因污染[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(3): 243-251. ZHOU Q X, LUO Y, WANG M E. Environmental residues and ecotoxicity of antibiotics and their resistance gene pollution: A review[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2007, 2(3): 243-251.
- [2] KNAPP C W, DOLFING J, EHLERT P A, et al. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 44(2): 580-587.
- [3] TIEN Y C, LI B, ZHANG T, et al. Impact of dairy manure pre-application treatment on manure composition, soil dynamics of antibiotic resis-

表 1 耐药基因与可移动遗传元件的相关性

Table 1 Correlation analysis between ARGs and MGEs

ARGs	MGEs	r
<i>acrA-1</i>	<i>intI-1</i> (clinic)	0.954**
<i>acrA-4</i>	<i>intI-1</i> (clinic)	0.945**
<i>acrA-5</i>	<i>intI-1</i> (clinic)	0.975**
<i>mexF</i>	<i>intI-1</i> (clinic)	0.969**
<i>oprJ</i>	<i>intI-1</i> (clinic)	0.850**
<i>oprJ</i>	<i>tnpA-3</i>	0.847**
<i>bla_{ampC-4}</i>	<i>intI-1</i> (clinic)	0.994**
<i>bla_{CMY2-2}</i>	<i>intI-1</i> (clinic)	0.930**
<i>bla_{CTX-M-2}</i>	<i>intI-1</i> (clinic)	0.939**
<i>bla_{CTX-M-4}</i>	<i>intI-1</i> (clinic)	0.831*
<i>fox5</i>	<i>intI-1</i> (clinic)	0.984**
<i>fox5</i>	<i>tnpA-4</i>	0.817*

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

- tance genes, and abundance of antibiotic-resistance genes on vegetables at harvest[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 581/582:32–39.
- [4] CHEE-SANFORD J C, MACKIE R I, KOIKE S, et al. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2009, 38(3):1086–1108.
- [5] 张昊. 抗生素及其耐药性在畜禽粪便-土壤-蔬菜中的传播和转移[D]. 新乡:河南师范大学, 2018. ZHANG H. Spread and transfer of antibiotics and antibiotic resistance in the livestock manure-soil-vegetable endophytic system[D]. Xinxing: Henan Normal University, 2018.
- [6] LIU W, LING N, GUO J, et al. Dynamics of the antibiotic resistome in agricultural soils amended with different sources of animal manures over three consecutive years[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 401:123399.
- [7] JONES-DIAS D, MANAGEIRO V, FERREIRA E, et al. Architecture of class 1, 2, and 3 integrons from gram negative bacteria recovered among fruits and vegetables[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7:1400.
- [8] WANG F, XU M, STEDTFELD R D, et al. Long-term effect of different fertilization and cropping systems on the soil antibiotic resistome[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(22):13037–13046.
- [9] 左金龙, 孙宇琪, 郭雅杰, 等. 不同施肥处理对蔬菜土壤中抗生素抗性基因多样性与丰度的影响[J]. *环境污染与防治*, 2021, 43(5):553–556, 561. ZUO J L, SUN Y Q, GUO Y J, et al. Effects of different fertilization treatments on the diversity and abundance of antibiotic resistance genes in vegetable[J]. *Environmental Pollution & Control*, 2021, 43(5):553–556, 561.
- [10] YANG F, ZHANG K, ZHI S, et al. High prevalence and dissemination of β -lactamase genes in swine farms in northern China[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 651:2507–2513.
- [11] LOOFT T, JOHNSON T A, ALLEN H K, et al. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(5):1691–1696.
- [12] GÓMEZ-GÓMEZ C, BLANCO-PICAZO P, BROWN-JAQUE M, et al. Infectious phage particles packaging antibiotic resistance genes found in meat products and chicken feces[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1):1–11.
- [13] LIU Y Y, WANG Y, WALSH T R, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2016, 16(2):161–168.
- [14] YANG F, GU Y, ZHOU J, et al. Swine waste: A reservoir of high-risk *bla_{NDM}* and *mcr-1*[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 683:308–316.
- [15] YANG F, ZHANG K, ZHI S, et al. High prevalence and dissemination of β -lactamase genes in swine farms in northern China[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 651:2507–2513.
- [16] WANG F, HAN W, CHEN S, et al. Fifteen-year application of manure and chemical fertilizers differently impacts soil ARGs and microbial community structure[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11:62.
- [17] XU Y, LI H, SHAO Z, et al. Fate of antibiotic resistance genes in farmland soil applied with three different fertilizers during the growth cycle of pakchoi and after harvesting[J]. *Journal of Environmental Management*, 2021, 289:112576.
- [18] PAN M, CHU L M. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in soils from wastewater irrigation areas in the Pearl River Delta region, southern China[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 624:145–152.
- [19] MCKINNEY C W, DUNGAN R S, MOORE A, et al. Occurrence and abundance of antibiotic resistance genes in agricultural soil receiving dairy manure[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2018, 94(3).
- [20] 彭双, 王一鸣, 林先贵. 连续施用发酵猪粪对土壤中四环素抗性基因数量的影响[J]. *中国环境科学*, 2015, 35(4):1173–1180. PENG S, WANG Y M, LIN X G. Abundance of the tetracycline resistance genes in a paddy soil after continuous application of composted swine manure for 6 years[J]. *China Environmental Science*, 2015, 35(4):1173–1180.
- [21] 何燕, 朱冬, 王东, 等. 四川省稻田土壤的抗生素抗性基因多样性研究[J]. *农业环境科学学报*, 2020, 39(6):1249–1258. HE Y, ZHU D, WANG D, et al. Diversity of antibiotic resistance genes in paddy soils in Sichuan Province, China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(6):1249–1258.
- [22] CHEN Q, AN X, LI H, et al. Long-term field application of sewage sludge increases the abundance of antibiotic resistance genes in soil[J]. *Environment International*, 2016, 92/93:1–10.
- [23] 张毓森, 叶军, 苏建强. 粪肥与铜一次性施用对农田土壤抗生素抗性基因的长期影响[J]. *应用与环境生物学报*, 2019, 25(2):328–332. ZHANG Y S, YE J, SU J Q. Long-term effect of one-time application of manure or copper antibiotic resistance genes in agricultural soil[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2019, 25(2):328–332.
- [24] 黄福义, 李虎, 韦蓓, 等. 长期施用猪粪水稻土抗生素抗性基因污染研究[J]. *环境科学*, 2014, 35(10):3869–3873. HUANG F Y, LI H, WEI B, et al. Long-term manure application induced shift of diversity and abundance of antibiotic resistance genes in paddy soil[J]. *Environmental Science*, 2014, 35(10):3869–3873.
- [25] 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*, 2013, 110(9):3435–3440.
- [26] ZHU Y G, ZHAO Y, ZHU D, et al. Soil biota, antimicrobial resistance and planetary health[J]. *Environment International*, 2019, 131:105059.
- [27] PARTRIDGE S R, TSAFNAT G, COIERA E, et al. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2009, 33(4):757–784.