# 及业环境计学学报 JOURNAL OF AGRO-ENVIRONMENT SCIENCE

## 中文核心期刊/CSCD

请通过网上投稿系统投稿 网址: http://www.aes.org.cn

#### 长期植稻年限序列土壤耐药组演替特征

林辉, 成琪璐, 邹平, 孙万春, 俞巧钢, 叶静, 陈照明, 马军伟

#### 引用本文:

林辉,成琪璐,邹平,孙万春,俞巧钢,叶静,陈照明,马军伟.长期植稻年限序列土壤耐药组演替特征[J].农业环境科学学报,2022,41(12):2711-2721.

在线阅读 View online: https://doi.org/10.11654/jaes.2022-1022

#### 您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

#### 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 农业环境科学学报. 2021, 40(11): 2503-2512 https://doi.org/10.11654/jaes.2021-1044

#### 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

#### 生物菌剂对土壤微生物群落结构和功能的影响

沙月霞,黄泽阳,李云翔,赵沛

农业环境科学学报. 2022, 41(12): 2752-2762 https://doi.org/10.11654/jaes.2022-1042

#### 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

#### 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



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

林辉, 成琪璐, 邹平, 等. 长期植稻年限序列土壤耐药组演替特征[J]. 农业环境科学学报, 2022, 41(12): 2711-2721.

LIN H, CHENG Q L, ZOU P, et al. Succession characteristics of soil resistome in paddy soil chronosequences [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2022, 41(12): 2711–2721.



开放科学 OSID

### 长期植稻年限序列土壤耐药组演替特征

林辉,成琪璐,邹平,孙万春,俞巧钢,叶静,陈照明,马军伟\*

(农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室, 浙江省农业科学院环境资源与土壤肥料研究所, 杭州 310021)

摘 要:以杭州湾南岸两个前期已鉴定的跨2000 a的水稻土序列(上虞:30~2000 a; 慈溪:9~2000 a)为模型,探究长期植稻下稻田土壤耐药组演替特征,以期拓展对人为水耕土土壤耐药组形成与发展趋势的科学认识。研究采用了高通量荧光定量PCR(HT-qPCR)技术,分析了不同土壤深度(耕作层、犁底层、母质层)下水稻土序列中320个耐药基因(ARGs)的检出情况、丰度、多样性及其随植稻年限的变化规律。结果表明:两个水稻土序列共检出289种ARGs,以氨基糖苷类和多重耐药类ARGs最为丰富多样,两个地区共有181种ARGs。主坐标分析(PCoA)结果指出,上虞和慈溪水稻土序列的ARGs组成存在显著差异,部分体现在ARGs亚型数量上。慈溪持有108种在上虞水稻土序列中不存在的ARGs,但85%的慈溪特有ARGs在植稻100 a后消失。因此,随植稻年限增加,不同地区水稻土序列在ARGs亚型数量上的差异缩小,在植稻千年后趋于接近。同时,随着植稻年限增加,水稻土耕作层、犁底层和母质层土壤间的ARGs亚型数量差异缩小。进一步研究发现,杭州湾南岸水稻土序列的ARGs丰富度和多样性随耕作年限的增加整体呈衰减趋势,同时伴随ARGs相对丰度的上升,其中相比耕作层和犁底层,母质层ARGs与植稻年限间的相关性达到了显著(P<0.05)或极显著(P<0.01)水平。综上,时间驱动了稻田土壤耐药组发展,而植稻年限对母质层中ARGs组成有强烈的塑造作用。在杭州湾南岸,新生稻田土壤(≤50 a)比成熟稻田土壤(≥1 000 a)拥有更为丰富的ARGs亚型但更低的ARGs相对丰度。水稻土序列中细菌丰度与ARGs相对丰度呈显著负相关,进一步暗示成土过程中ARGs演替与微生物间的密切关联。

关键词:水稻土;土壤序列;土壤耐药组;抗生素抗性基因;演替

中图分类号:S151.9 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2022)12-2711-11 doi:10.11654/jaes.2022-1022

#### Succession characteristics of soil resistome in paddy soil chronosequences

LIN Hui, CHENG Qilu, ZOU Ping, SUN Wanchun, YU Qiaogang, YE Jing, CHEN Zhaoming, MA Junwei\*

(State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-products, Institute of Environment, Resource, Soil & Fertilizer, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract: Two paddy soil chronosequences in the south bank of Hangzhou Bay (Shangyu: 30–2 000 a; Cixi: 9–2 000 a), which had been previously identified, were used to characterize the succession of paddy soil resistome during long-term rice planting, to expand the scientific understanding of the formation and development of paddy soil. The occurrence, abundances, and diversity of 320 antibiotic resistance genes (ARGs) in different soil depths (arable layer, plow pan, and C-horizon) and their succession were studied using high-throughput quantitative polymerase chain reaction (HT-qPCR). Results indicated that 289 ARGs were detected in two paddy soil chronosequences with aminoglycosides and multidrug resistant ARGs as the most diverse. A total of 181 ARGs were shared between both soil chronosequences. The principal coordinate analysis (PCoA) result showed that the composition of ARGs in Shangyu and Cixi paddy soil sequences were significantly different, partly reflected in the number of ARGs subtypes. Cixi had 108 unique ARGs, which did not

收稿日期:2022-10-12 录用日期:2022-11-22

作者简介: 林辉(1986—), 女, 浙江温州人, 博士, 研究员, 主要从事环境污染物的生物降解与修复研究。 E-mail: lin82774872@163.com

<sup>\*</sup>通信作者:马军伟 E-mail:majw@zaas.ac.cn

1日3 2712 农业环境科学学报 第41卷第12期

exist in Shangyu soil samples; however, 85% of those ARGs disappeared after 100 a of rice planting. Therefore, long-term rice planting reduced the difference in the number of ARGs subtypes between different regions, but became closer after thousands of years of soil development. With the increase in rice planting years, the difference in the number of ARGs subtypes among different soil depths also reduced. Our results further showed that the richness and diversity of ARGs in paddy soil chronosequences declined after thousands of years of rice planting, whereas the ARGs abundance showed an increasing trend. The relationship between ARGs and time was more significant in the C-horizon compared with that in the arable layer and plow pan soils, and it reached a significant (P<0.05) or extremely significant (P<0.01) level. Overall, soil age has driven the development of paddy soil resistome, and the effect is strong in the soil resistome of the C-horizon. On the south bank of Hangzhou Bay, the young paddy soils ( $\leq$ 50 a) have a soil resistome with higher ARGs richness and lower relative abundance than the mature paddy soil ( $\geq$ 1 000 a). There is a significant negative correlation between the bacterial abundance and relative abundance of ARGs in paddy soil sequences, implying a close relationship between ARGs succession and microorganisms during rice planting.

Keywords: paddy soil; soil chronosequence; soil resistome; antibiotic resistance gene; succession

抗生素耐药基因(又称抗生素抗性基因,Antibiotic resistance genes,ARGs,简称耐药基因)是自然且古老的,不依赖于抗生素时代的到来而存在的,是自然界中的微生物应对竞争和逆境而产生的心。研究学者认为,抗生素时代之前的水平基因转移是任何种属细菌间的双向转移,而抗生素的应用所形成的选择压力则可能打破这种双向转移的平衡增加其在耐药菌中的转移,加速抗生素耐药性的发生和扩散心。因此,人类活动和自然环境变化都会影响环境耐药组(Resistome)的分布和组成,而这种变迁进化可能在一定程度上又加剧了抗生素耐药性危机。

水稻土是中国重要的土地资源,也是面积最大、分布最广的耕地土壤类型<sup>[3]</sup>。稻田作为一种典型的人为土壤,其生物理化性质受自然和人为活动的双重影响。ARGs在中国稻田土壤中具有普遍性,在ARGs组成和丰度上均与活性污泥、沉积物存在较大差异<sup>[4]</sup>。科学家已知施肥、灌溉等行为均会影响土壤ARGs多样性和丰度<sup>[5-6]</sup>,亦从空间尺度探究了稻田土壤分布规律<sup>[4,7]</sup>。但对于稻田土壤耐药组的演化研究还有待加强,相关研究有助于认识稻田土壤质量的培育方向和演变趋势,同时关系到健康水稻土生态系统的建设,但如何研究长达数百年至数千年的土壤耐药组进化过程是一个巨大的挑战。

土壤时间序列方法是一种以空间替代时间的方法,利用一系列发育于相同的气候、植被、地形和母质的土壤样品组成土壤序列,将土壤的空间差异转化为时间差异,这种土壤序列可以根据时间表来进行划分,给未知年代的土壤添加一个相对时间,由此研究特定地区环境下土壤特征随时间的变化,已被应用于推断植被发展、土壤发育、土壤微生物和动物群落、植物根际微生物组的演替<sup>[8-10]</sup>。土壤时间序列亦被应用

于土壤耐药组的进化研究。SHEN等<sup>111</sup>报道其采用新疆乌鲁木齐河源1号冰川一个跨越50 a 的冰川前沿退缩地土壤序列,揭示了耐药基因沿早期冰川时序变化的演替模式,指出在冰川演替的早期阶段,可移动元件(MGEs)的时序变化对耐药基因演替模式做出了重大贡献。CHEN等<sup>112</sup>借助16个全球分布、跨度从几个世纪到几千年、涵盖不同生态系统的土壤时间序列,揭示长时间尺度下成土过程中土壤耐药组变化。尽管土壤时间序列的构造存在一定问题,它所记录的历史只是过去的一部分,甚至带有一定的偏见,但毫无疑问,它仍是探测土壤演化速率和方向的强大工具<sup>113</sup>。目前认为结合分层取样、多元统计和数学建模的方法有助于弥补土壤序列的不足,更好地分析时间序列数据的离散性和进化中因素的复杂性,从而帮助反映土壤理化和生物过程的演变。

杭州湾南岸的慈溪、上虞一带分布着不同种植年限的水稻土时间序列(图1)。这些水稻土发育于同种浅海沉积物,有着相同的水(稻)-旱(作)轮作制度,是研究稻田土壤质量演变的珍贵材料。前期土壤学家们利用杭州湾南岸的水稻土时间序列,在土壤有机碳库、矿物及微生物群落的时空演化特征上获得了重要科学发现[14-18]。本研究利用杭州湾南岸的慈溪和上虞地区分布的水稻土时间序列,初步探讨杭州湾南岸水稻土序列剖面中土壤耐药组沿着植稻年限变化的演替特征,为拓展人类对围垦稻田土壤中耐药基因库变迁的科学认识提供支持。

#### 1 材料与方法

#### 1.1 研究区概况

杭州湾全境在公元前4000a前均位于海底,经过历代长时期围涂筑堤,形成了大量海塘,其中有两

条贯穿全境。第一条是在慈溪境内于公元1047开始 修建的大古塘,而此海塘的西段与始于夏盖山附近的 修建于公元821年唐朝的浙东海塘相连。而另一条 就是修建于公元1734年的四塘。在慈溪市,海塘截 止到2010年底,已达11条之多,而位于杭州湾西部的 上虞市,还有修建于1720年的石塘和百沥海塘,修建 于1926年的解放塘,修建于1976年的七六丘,修建于 1996年的九六丘等多条海塘(图1)。

该地区属亚热带季风性湿润气候,又带有海洋性 季风气候特征。气候温暖多雨,年均温16.0℃,无霜 期 244 d, 最热月均温 28.2 ℃, 最冷月均温 3.8 ℃, 年平 均日照时数2038h,年均降水量1273mm,年蒸发量 894 mm, 同时降水量季节波动性大, 雨季特征明显, 约60%的降水量分布于5-9月,每年夏秋间多热带 风暴或台风[19]。

#### 1.2 样品采集

分别选取了上虞(SY)和慈溪(CX)两个系列的水 稻土序列进行系统研究。确定了位于上虞市的植稻 年限分别为30、100、300、1000、2000 a的水稻土序 列,编号分别为SY30、SY100、SY300、SY1000和 SY2000,代表沉积物质地较粗的一组水稻土序列。位 于慈溪市的植稻年限分别为9、50、100、700、2000 a,

其编号分别为CX9、CX50、CX100、CX700和CX2000, 代表沉积物质地较细的另一组水稻十序列(表1)[16]。

#### 1.3 DNA 提取和 ARGs 测定

将采集获得的土样充分混匀, 去除根系和砾石 后,在-80℃下保存。采用 Fast DNA® Spin Kit for Soil (MP Biomedicals,美国)试剂盒提取土壤总DNA。以 土壤总 DNA 为模板,在 Wafergen SmartChip 实时 PCR 系统(Wafergen, Fremont, CA, 美国)上, 采用高通量荧 光定量 PCR (HT-qPCR) 检测各样品中不同类型

表1 上虞和慈溪水稻土序列中不同深度土壤采样信息(cm) Table 1 Soil sampling depth in Cixi and Shangyu (cm)

处理	耕作层	犁底层	母质层
Treatment	Arable layer	Plow pan	C-horizon
CX9	0~19	19~44	76~100
CX50	0~15	15~57	75~102
CX100	0~16	16~29	58-100
CX700	0~16	16~25	106~130
CX2000	0~21	21~39	57~100
SY30	0~20	20~75	75~100
SY100	0~20	20~43	57~100
SY300	0~15	25~59	59~110
SY1000	0~15	15~28	90~120
SY2000	0~19	19~27	90~120

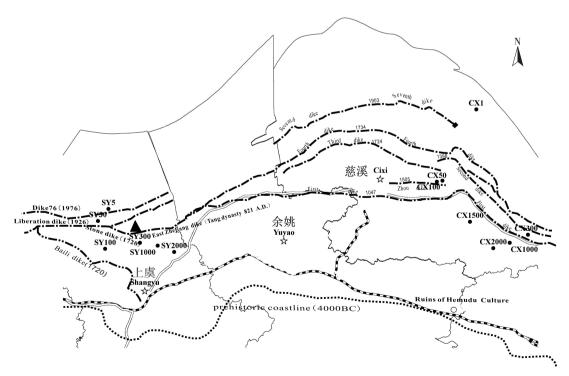


图 1 位于杭州湾南岸的主要海塘和两个水稻土序列分布示意图

Figure 1 Schematic diagram of the distribution of main seawalls in the south bank of Hangzhou Bay and the location of two paddy soil chronosequences

ARGs的丰度,包括 320个 ARGs、57个 MGEs 和 1个 16S rRNA 基因。HT-qPCR 的引物信息、试验操作及 相对基因拷贝数计算方法等见文献[20]。将每个 ARGs的相对基因拷贝数分别除以 16S rRNA 基因的 相对基因拷贝数,得到每个 ARGs的相对丰度。试验 数据以 3次重复的平均值表示。

#### 1.4 统计分析

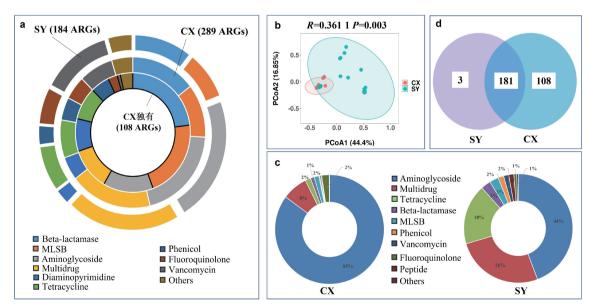
采用 Excel 计算 ARGs 的丰富度指数和 Shannon-Winner (Shannon)多样性指数。利用 ARGs 丰富度指数表征 ARGs 亚型数量的多少。利用 Shannon 多样性指数( $H' = \sum (Pi \times \ln Pi)$ , Pi 为此 ARGs 亚型丰度占 ARGs 总丰度的比例)表征 ARGs 亚型多样性。采用 R4.0.4的 vegan 数据包中 ANOSIM 函数计算慈溪和上虞水稻土序列 ARGs 组成相似度,为不同地区土壤序列间的 ARGs 差异显著性评价提供依据,并利用联川生物云平台中的云工具(https://www.omicstudio.cn/tool)绘制主坐标分析(PCoA)图。采用 R语言中 basicTrendline 数据包进行 ARGs 总相对丰度与 16S rRNA 丰度间的简单线性回归分析,原始数据在分析前进行 Log 转换。采用 Wilcox 检验筛选新生和成熟土壤中具有显著性 (P<0.05)差异的 ARGs 并选择丰度差异前 25 的指标

绘图。利用在线网站(http://www.ehbio.com/test/venn/#/)绘制维恩图。采用 GraphPad Prism 8.3.0绘制线图,Excel绘制饼图。

#### 2 结果与分析

#### 2.1 慈溪和上虞水稻土序列中ARGs组成差异

如图 2a 所示,在慈溪和上虞包括 3 个土壤深度的两个水稻土序列中,检测到的 ARGs 以β-内酰胺类、大环内酯-林可酰胺-链阳霉素 B类(MLSB)、氨基糖苷类、多重耐药类、四环素类、万古霉素类、二氨基嘧啶类β-内酰胺类等9大类为主,其中细沉积物发育而来的慈溪水稻土序列中最高能检出 289种 ARGs 亚型和51种与 ARGs 移动传播相关的遗传移动元件(MG-Es),而粗沉积物发育而来的上虞水稻土序列最高检出 184种 ARGs 亚型和 32种 MGEs。两个地区的水稻土序列在 ARGs 组成分布上存在显著(P<0.05)差异(图 2b)。从不同类型 ARGs 的丰度上看,慈溪水稻土序列中的氨基糖苷类 ARGs 占据绝对优势,上虞水稻土序列中优势 ARGs 相对均匀分布于氨基糖苷类、多重耐药类和四环素类中(图 2c)。但是,从亚型种类上看,慈溪和上虞水稻土序列中的 ARGs 均以氨基糖



Aminoglycoside: 氨基糖苷类; MLSB: 大环内酯-林可酰胺-链阳霉素 B类; Beta-lactamase: β-内酰胺类; Multidrug: 多重耐药类; Diaminopyrimidine: 二氨基嘧啶类; Tetracycline: 四环素类; Phenicol: 氯霉素类; Fluoroquinolone: 氟喹诺酮类; Vancomycin: 万古霉素类; Peptide: 多肽类; Others: 其他; 下同 The same below

- (a) 慈溪、上虞所有 ARGs 及慈溪特有 ARGs 的亚型分布;(b) PCoA 分析慈溪和上虞水稻土序列 ARGs 分布差异(Bray-Curtis 距离, ANOSIM);(c) 慈溪和上虞水稻土序列不同类型 ARGs 的相对丰度;(d) 慈溪与上虞土壤共有及特有的 ARGs 类型
- (a) The distribution of ARGs subtypes in total ARGs pools of Cixi and Shangyu as well as that in unique ARGs pool of Cixi; (b) PCoA analysis of ARGs profile in Cixi and Shangyu soil chronosequences based on the Bray-Curtis distance and ANOSIM test;
  - (c) The relative abundances of ARGs in Cixi and Shangyu soils; (d) The unique and shared ARGs between Cixi and Shangyu soils

#### 图2 慈溪和上虞水稻土序列中ARGs分布与组成

Figure 2 Distribution and composition of ARGs in paddy soil chronosequences of Cixi and Shangyu

苷类和多重耐药类 ARGs 最为丰富多样(图 2a),且 二者共享181种ARGs亚型(图2d)。虽然慈溪水稻 土序列中还有108种特有的ARGs,以β-内酰胺类和 MLSB类ARGs 亚型的种类最多(图 2a 和图 2d),且在 新生耕作层土壤(≤50 a)中占41%左右,但从相对丰 度占比上看,仅为1.8%~6.4%,表明这些ARGs在新 生土壤群体中并不占优势,易在长期土壤发育过程 中消亡。

兹溪耕作层和母质层共享269种ARGs亚型,但 型底层ARGs亚型数量大幅低于耕作层和母质层(图 3a),几乎所有类型抗生素的 ARGs 亚型都在减少,数 量平均减少68%~69%, 看似于一项无明显选择偏好 的大过滤,但统计分析在犁底层保留下的ARGs的总 相对丰度可发现,型底层检出的99种ARGs在慈溪耕 作层土壤中的丰度占比为93.9%~99.6%(图3b),这暗 示型底层丢失的ARGs是耕作层中不占优势的类群。 与慈溪水稻土序列相比,上虞耕作层、犁底层和母质 层间的 ARGs 亚型数量较为接近, 三者共有的 ARGs 总体占各层土壤 ARGs 的 72%~84%(图 3c)。

#### 2.2 沿植稻年限土壤剖面中ARGs 多样性和丰度变化

分别采用丰富度和 Shannon 指数表征水稻土序 列中ARGs亚型的数量多寡和组成多样性。图4描述 了杭州湾南岸两个水稻土序列耕作层、犁底层和母质 层土壤中ARGs丰富度、Shannon指数和相对丰度沿 植稻年限的变化。结果表明,与犁底层比较,耕作层 和母质层 ARGs 沿植稻年限的变化规律更为相似,且 与植稻年限间的关系更加紧密,如耕作层和母质层的 ARGs 丰富度和 Shannon 指数整体随植稻年限的增加 而衰减,而ARGs相对丰度随植稻年限的增加而增 加,但仅有母质层的ARGs丰富度、Shannon指数以及 相对丰度与植稻年限间的回归系数全部达到了显著 (P<0.05)或极显著(P<0.01)水平(图4)。犁底层中 ARGs丰富度指数随植稻年限的增加有一定的增长趋 势,但未达显著(P>0.05)水平,且ARGs的Shannon指 数和相对丰度与年限间也未有明显联系。因此,相比 犁底层和耕作层的ARGs,母质层的ARGs与土壤年 龄间的关系显然更加紧密。

对比慈溪和上虞水稻土序列的ARGs可知,慈溪 新牛土壤(≤50 a)的ARGs亚型比上虞新牛土壤(≤30 a)更加丰富,但随着植稻过程进行,蒸溪和上虞水稻 土的 ARGs 亚型数量差异缩小,在植稻千年后,二者 之间在ARGs亚型数量上趋于接近(图5a)。事实上, 在水稻土发育初期,犁底层土壤的ARGs亚型数量大 幅低于耕作层土和母质层,但是随着耕作层和母质层 中ARGs 亚型数量下降,以及型底层土壤 ARGs 亚型 的增多,不同深度土壤间的差异持续缩小,在千年后 达到相近水平(图5b)。

将两个土壤时间序列合并后分为新生(≤50 a)和 成熟(≥1 000 a)土壤,发现新生土壤(288 个 ARGs)比 成熟土壤(148个ARGs)拥有更为丰富的ARGs(图 5a),分析从新生向成熟土壤转变中丢失的142种 ARGs,可知这些丢失的ARGs主要分布在β-内酰胺 类、氨基糖苷类和MLSB类,在所有丢失ARGs中的占 比依次为20.4%、15.5%和13.4%。但是若从ARGs丰 度上看,成熟土壤中的ARGs平均相对丰度是新生土 壤的7.76倍,其中氨基糖苷类ARGs相对丰度增长量 占总增长量的76.5%,其次为多重耐药类,相对丰度 增长量占比为14.8%(图6a)。总体来说,滩涂向成熟 稻田转变后,虽然ARGs大量丢失,但是那些保存下 来的ARGs在细菌群体中的相对丰度反而增加了,特

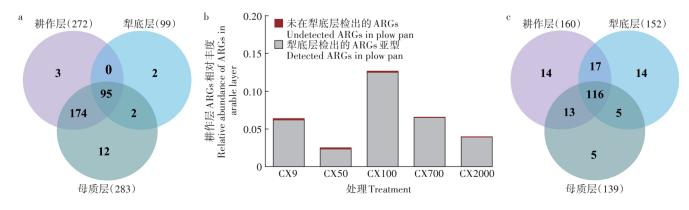
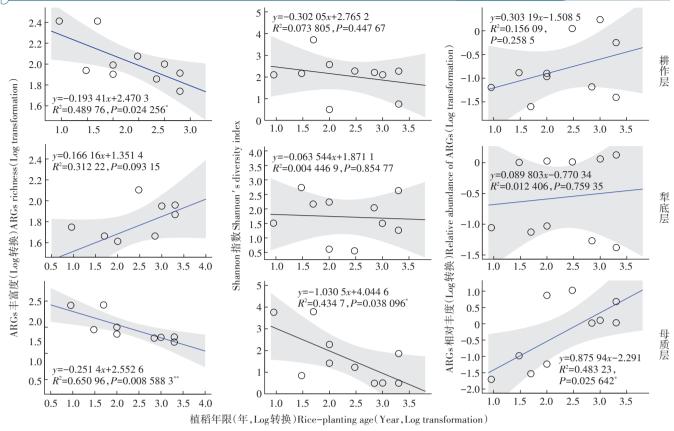


图3 慈溪和上虞不同深度土壤中检出的ARGs亚型分布

Figure 3 Distribution of ARGs subtypes in soils at different depths in Cixi and Shangyu

**文业环境科学学报** 第41卷第12期



\*\*:相关性达极显著水平(P<0.01);\*:相关性达显著水平(P<0.05)
\*\*:Correlation is extremely significant at the 0.01 level;\*:Correlation is significant at the 0.05 level

#### 图 4 水稻土序列中 ARGs 丰富度指数与植稻年限间的关系分析

Figure 4 Analysis of the relationship between the ARGs richness indexes in the paddy soil chronosequences and the rice-planting age

别是氨基糖苷类 ARGs 虽然在成土过程中也大量丢失,但却是成熟土壤 ARGs 丰度上升的主要驱动因子。进一步采用PCoA 和 ANOSIM 分析对比了新生和成熟水稻土 ARGs 分布,发现二者存在显著(P<0.05)差异(图 6b)。LEfSe 分析的 LDA 值分布柱状图(图 6c)指出,在新生土壤中起重要作用的 ARGs 包括了氟喹诺酮类、磺胺类以及氨基糖苷类中的 APH\_6\_Ic、APH\_9\_Ib、APH\_4\_Ib 和多重耐药类中的 mdtG、qa-cF\_H、qacH\_351、arsA、mexE、OprD等(图 6c),其中氨基糖苷类 ARGs 和多耐药类中 mdtG、OprD 的相对丰度在成熟土壤中增加,多耐药类中的 qacF\_H、qacH\_351、arsA、mexE以及磺胺类 sul1 相对丰度在成熟土壤中降低(图 6d)。

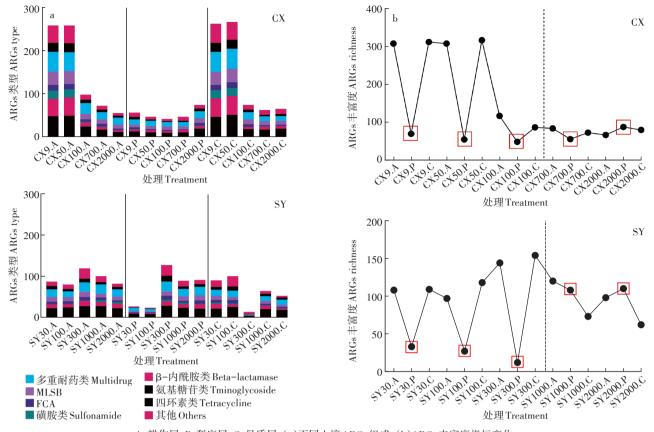
#### 2.3 沿植稻年限的细菌丰度变化及与 ARGs 的关系分析

通过 16S rRNA 丰度表征土壤细菌丰度,可知慈溪和上虞两个水稻土序列中细菌丰度总体表现为耕作层>犁底层>母质层,其中慈溪母质层中 16S rRNA 丰度随植稻年限增加而下降(图 7a 和图 7b)。简单线

性回归分析结果进一步表明,水稻土序列土壤中细菌 丰度与ARGs相对丰度间呈显著负相关(图7c)。

#### 2.4 消失的 ARGs 亚型

慈溪耕作层土壤中共检出 272 种 ARGs, 51 种 MGEs, 其中有 163 种 ARGs (59.9%) 及 28 种 MGEs (54.9%)在围垦植稻 100 a 土壤中开始消失,这些消失的 ARGs 中有 92 种为慈溪特有,在上虞水稻土序列中并不存在,占慈溪特有 ARGs 的 85%以上。相似地,慈溪母质层土壤中共检出 284 种 ARGs,51 种 MGEs,其中有 167 种 ARGs 和 27 种 MGEs 在围垦植稻 100 a 土壤中开始消失,此后不再检出。这些消失的 ARGs中,有 139 种同时在慈溪母质层和耕作层土壤中消失,可能这些 ARGs本身在 100 a 前的土壤中并不存在,也可能是这些 ARGs源于滩涂,但不能适应稻田环境,随植稻过程而消失。另外,有 24 种 ARGs 只在植稻 100 a 以上的耕作层土壤消失,包括 mecA、MCR-2.1 和 aacA\_aphD 等仅在耕作层土中检出的 ARGs。另外,部分 ARGs 从犁底层和母质层中最先消失,随



A:耕作层;P:犁底层;C:母质层;(a)不同土壤 ARGs组成;(b)ARGs丰富度指标变化 A:Arable layer;P:Plow pan;C:C-horizon;(a) ARGs profile of different soils;(b) Changes in ARGs richness

#### 图 5 慈溪和上虞水稻土剖面土壤中 ARGs 类型和丰富度随植稻时间的变化趋势

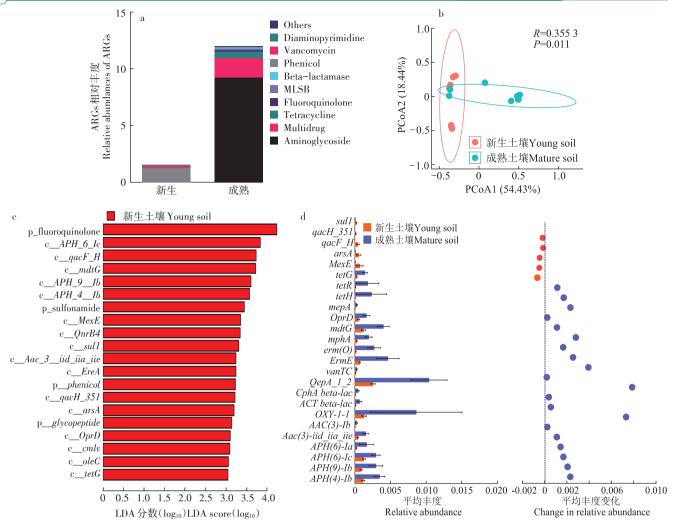
Figure 5 Change trend of ARGs types and richness in the paddy soil profiles with rice-planting years in Cixi and Shangyu

后沿着植稻年限从耕作层土中消失,例如 sul1 在新生土壤中(≤50 a)中检出,并且相对丰度较高(10<sup>-3</sup>~10<sup>-4</sup>),但其从植稻100 a开始,不再能从犁底层和母质层中检出,700 a后从耕作层土中消失。相似地,核糖体保护蛋白 tetA 在慈溪9 a土壤中检出,相对丰度为10<sup>-4</sup>~10<sup>-5</sup>,但随后依次从50 a土壤的犁底层、100 a土壤的母质层和700 a土壤的耕作层中消失。

上虞土壤序列的衰减从300 a才开始逐步明显。 多重耐药类 oqxA、氨基糖苷类ANT(4')以及氟喹诺酮 类中 QnrS1\_S3\_S5 和 QnrD 是随植稻年限同时在耕作 层和母质层中消失的 ARGs,但它们的消亡在母质层 中更早发生,在耕作层中滞后。 oqxA、ANT(4')、 QnrS1\_S3\_S5 和 QnrD 在犁底层土壤中的存在较为随 机,无植稻年限无明显的关联,例如 oqxA 随着在耕作 层和母质层中消失了,但在2000 a 的犁底层土壤中 被检测到,犁底层可能具有保存一定消失 DNA 信息 的功能。事实上,上虞犁底层土壤中共检出152种 ARGs,29种 MGEs,其中仅有 ttgB 在1000 a 土壤序列 中开始消失,其余均持续或随机存在。上虞犁底层中 特有的 ARGs 有 13 种,包括 adeA、APH(2'')-Iva、AAC (6')-Ip、cmlA1、AcrF、catIII、SHV-11、cmlA5、dfrA15、 catB2、tetC、tetS 和 tetO;除 cmlA1、AcrF、catIII以外,其 余都仅在犁底层 300 a 存在,暗示着上虞 300 a 土壤的 特殊性以及曾经在母质层或耕作层土壤中的存在。

#### 3 讨论

时间对成土过程中土壤耐药组的发展有重要影响。在本研究中,发育于海相沉积物的水耕人为土的ARGs丰富度(亚型数量)和多样性随耕作年限的增加整体呈衰减趋势。这种ARGs亚型数量和多样性衰减的现象在一些较年轻的土壤序列(<50 a)以及千年、百万年尺度的土壤序列中都出现过。在SHEN等叫针对跨越0~50 a的冰川前沿退缩地土壤序列中ARGs演替研究中,ARGs亚型数量在冰川退缩早期(0~4 a)耕作层土壤虽然有短暂增加,但在4~50 a间整体呈衰减态势。相似地,CHEN等凹观察到在经过



(a)新生和成熟土壤中ARGs相对丰度;(b)PCoA分析新生和成熟土壤ARGs分布差异(Bray-Curtis距离,ANOSIM);(c)基于LEISe分析的LDA值分布柱状图筛选新生和成熟土壤中关键ARGs;

(d)基于Wilcox 检验筛选新生和成熟土壤中具有显著性(P<0.05)差异的ARGs并选择丰度差异前25的指标展示

- (a) Relative abundances of ARGs in young and mature soils; (b) PCoA analysis of ARGs profile in young and mature soil chronosequences based on the Bray-Curtis distance and ANOSIM test; (c) LDA score that is calculated by LEfSe to find key ARGs in young and mature soils, respectively;
- (d) Wilcox test was used to screen ARGs with significant difference (P<0.05) between young and mature soils and the top 25 abundant ARGs in the selected ARGs pool was displayed

#### 图 6 慈溪和上虞不同深度土壤中检出的 ARGs 亚型分布及相对丰度变化

Figure 6 Distribution of ARGs subtypes in soils at different depths in Cixi and Shangyu

数百万年的土壤发育后,土壤ARGs多样性有明显下降。抗生素耐药性本身是细菌为了适应环境而进化出的机制,但大多数细菌抗生素耐药性的形成需付出代价,例如生长速率降低等,这被称为适应性代价[21]。ARGs的形成或获得使得细菌能够适应所在的逆境,但同时逆境消失时,由于适应性代价,很快被其他敏感菌挤兑,并从群体中清除。因此,滩涂向稻田转变过程中ARGs亚型种类在耕作层和母质层土壤中的衰减可能与微生物的环境适应性和资源竞争有关,类似于ARGs宿主物种被选择的过程,以此适应水耕熟

化、pH下降、脱盐等土壤生态的改变。sull和tetA在环境中检出频繁,但从本研究上看,滩涂向成熟稻田转变过程中的脱盐、水耕熟化等长期的耕作活动促进稻田土壤中sull和tetA的消亡,二者在犁底层和母质层中的基因丢失比其在耕作层土壤中更早,这可能与不同土层的微生物群落演替相关。另外,相比母质层和犁底层,耕作层有更多机会接受外源的ARGs,从而补偿原有ARGs的丢失。大部分ARGs的丢失同时在耕作层和母质层中发生,但是也可发现一些ARGs仅在蒸溪耕作层土壤中消失,这里面包括仅存在于耕作

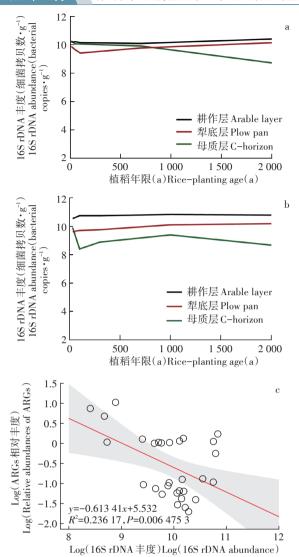


图 7 慈溪和上虞土壤剖面中 16S rDNA 丰度变化及与 ARGs 相对丰度的关系

Figure 7 Variation of 16S rDNA abundance and its relationship with the relative abundance of ARGs in the soil profiles of Cixi and Shangyu

层土中的β-内酰胺类 mecA、多肽类 MCR-2.1 和氨基糖苷类 aacA\_aphD,特别是 MCR-2.1 和 aacA\_aphD为 慈溪耕作层土特有,相对丰度在 10<sup>-7</sup>~10<sup>-8</sup>,推测其在 慈溪新生耕作层土壤中的存在跟外源输入有关,并非源自母质。 在慈溪和上虞耕作层特有的 ARGs 中仅有 mecA 是二者共有的。 mecA 是甲氧西林耐药葡萄球菌 (MRS)特有的耐药基因,且与青霉素的滥用密切相关,其仅存在于植稻 50 a 以内的慈溪和上虞水稻土序列中,在植稻超过 100 a 以上的土壤中均未检出。抗生素在国内的大量应用追溯到上世纪 70 年代,特别是 1971—1975 年达到顶峰,迄今 50 a 左右。但是,

mecA 等部分 ARGs 在 0~50 a 新生土壤序列中的大量 检出是否与现代大量应用抗生素相关还需进一步 验证。

值得注意的是,这些丢失的ARGs虽然亚型数量 庞大,如在慈溪植稻100 a 土壤以上消失的 ARGs 占 慈溪9a耕作层土壤检出的ARGs的一半以上,但它 们中大部分的相对丰度较低,使得其整体相对丰度在 ARGs 群体中并不占优势,这可能是它们很快在自然 选择的作用下被清除的重要原因。因为自然界的空 间、食物等资源是有限的,尤其对于新生土壤,种群内 部的个体数量越多,种内竞争就越激烈,在长期的斗 争中,优胜者得以生存繁衍,而劣势一方必然被淘汰。 依据高斯假说,两个物种越相似,它们的生态位重叠 就越多,竞争就越激烈,ARGs间可能也存在类似的竞 争行为,例如细菌群落针对同一类抗生素往往可进化 出多种不同的耐药机制及相应的 ARGs, 而在竞争过 程中,多样化的ARGs库通过筛选得到精简,保留最 重要的ARGs亚型。有趣的是,这些ARGs的丢失并 不会使得土壤耐药组变小,相反那些保存下来的 ARGs在细菌群体中的丰度反而增加了。ARGs丢失 的过程亦可能是近海滩涂向成熟稻田土壤演变过程 中的重要环节,最终形成稻田生态系统独特的抗生素 耐药组。但是,人为水耕熟化活动引导稻田土壤 ARGs多样性和丰富度下降的同时伴随的部分ARGs 丰度的大量上涨让我们产生了新的担忧。近年来有 许多生态学家持有这样一种观点:生物多样性的丧失 与一些疾病暴发紧密相连,甚至随着一些物种的灭绝, 另一些倾向于生存或繁殖的物种,更可能携带对人类 产生更大威胁的病原菌[22]。从土壤耐药组的角度,我 们忧虑的是,伴随一些具有相同功能的ARGs的丢失, 那些具有优势而保存下来的ARGs会不会对人类有更 高的移动性和风险性?事实上,在SHEN等凹的研究 中,确实发现ARGs丰度的增加与MGEs有紧密关系, 而本研究中成熟稻田的MGEs相对丰度也的确高于新 生土壤,整体增加了5.4倍。因此,针对ARGs的风险 性和传播性的演替变化研究还需要加强。

对于慈溪和上虞两个气候相同,耕作活动和母质来源相似的水稻土序列,二者在土壤 ARGs 种类和分布存在一定差异,特别是在新生土壤的 ARGs 亚型数量上。例如,慈溪拥有100多种上虞水稻土序列没有的独特 ARGs,这些 ARGs 虽然囊括了几乎所有检出抗生素耐药类型,但仍以β-内酰胺类和 MLSB类 ARGs 的种类最多。慈溪新生土壤中丰富的β-内酰

**1日** 2720 农业环境科学学报 第41卷第12期

胺类和MLSB类ARGs是否与土壤的发育进程或当地的人为活动有关还需要进一步探索。事实上,慈溪水稻土中大部分在上虞水稻土中不存在的ARGs在新生土壤群体中并不占优势,在植稻100 a后消失,如92种ARGs(>85%)在植稻100 a以上的耕作层土壤序列中消失有89种(>82%),从而使得以上两个地区的水稻土序列ARGs亚型数量差异在长年植稻后缩小。

CHEN等[12]分析了全球87个地点的16个不同生 态系统的土壤时间序列耐药组,发现土壤序列中 ARGs 的丰度与土壤微生物生物量负相关。相似地, 在本研究中,土壤中细菌丰度与ARGs相对丰度显著 负相关。特别是在土壤剖面中,细菌丰度随深度增加 而下降,而ARGs相对丰度则表现出相反的趋势。我 们注意到这一些研究中,ARGs在深层土壤,如40 cm 以下土壤中的检出,仅被解释为ARGs垂直迁移造成 的。实际上与一般污染物不同,ARGs是古老的,并非 由人类输入产生的,这些ARGs可能一直存在于母质 层中,而非外源带入,它们的拷贝数随土壤深度的增 加而降低,也并非就与迁移有关,ARGs的宿主微生物 变化很可能起到关键作用,例如,随着滩涂向稻田转 变,耕作层和犁底层形成,母质层中原有的微生物群 落改变,大部分ARGs的微生物宿主因不适应缺氧等 新环境而死亡, ARGs 降解。目前大部分土壤耐药组 研究都关注于耕作层土壤,忽略了深层土壤特别是母 质层土壤的耐药组。事实上,母质层土壤已被发现随 着人为水耕熟化活动发生改变,但是相比耕作层土 壤,母质层土壤实际上受短期人为活动,例如肥料用 量、耕作制度等田间管理的影响更小,也更可能反映 长时间尺度下的水耕熟化、淋洗脱盐等水耕熟化作用 在土壤耐药库上留下的痕迹。

此外,在本研究的新生土壤中,犁底层土壤中的ARGs丰富度指数大幅低于母质层和耕作层,但这种差异随着耕作层和母质层土壤ARGs的丢失,以及犁底层土壤ARGs种类的增多,不同深度土壤间的差异持续缩小,在千年后基本趋近一致。这一结果很有趣,我们推测犁底层可能类似一个库,可接收耕作层向下迁移的ARGs,随着植稻年限的增加,犁底层形成并增厚,越来越多的ARGs适应犁底层,进入犁底层,因而犁底层很可能可以保藏一部分耕作层或母质层消失的ARGs。例如,在上虞土壤序列中,oqxA随植稻在耕作层和母质层中消失了,但在2000 a的犁底层土壤中仍被检测到,为犁底层保存了部分耕作层和母质层消失的ARGs信息提供了一定证据。此外,ad-

eA、APH(2'') – Iva、AAC(6') – Ip、SHV – 11、cmlA5、dfrA15、catB2、tetC、tetS、tetO 等上虞特异的 ARGs,仅 在犁底层 300 a 存在,也暗示着上虞 300 a 土壤的特殊 性以及它们曾经在母质层或耕作层土壤中的存在。

当然,植稻年限很可能不是驱动人为水耕土中耐药组演替发展的直接因素。前期研究已指出,海涂土壤在围垦初期由于伴随母质带来的碳酸钙、盐分等原因,序列起始点土壤的pH值较高,且在土壤剖面的不同层次较为均一,但随着植稻年限增加,加速脱钙,在剖面上出现分层<sup>[15,23]</sup>。同时,随着围垦植稻年限的增加,土壤耕作层及亚耕作层有机碳含量、胡敏酸、富里酸、大团聚体比例、微生物多样性等指标增加<sup>[16,24]</sup>,其中耕层土壤有机碳δ<sup>13</sup>C值的分布表现为距离海岸越远以及植稻年限越长而逐渐递减的变化趋势<sup>[15]</sup>。因此,可以推测滩涂围垦稻田土壤耐药组形成过程与其基本水耕熟化、固碳和土壤生物过程是高度耦合的,从而挖掘人为水耕土壤耐药组中多样性衰减和相对丰度上升的核心驱动力,揭示海涂围垦稻田土壤耐药组形成发展的生态机制。

#### 4 结论

- (1)杭州湾南岸水稻土序列的抗生素耐药基因 (ARGs)丰富度和多样性随耕作年限的增加整体呈衰减趋势,同时伴随ARGs相对丰度的上升,其中相比耕作层和犁底层,母质层ARGs与植稻年限间的相关性达到了显著或极显著水平。因此,新生滩涂稻田土壤比成熟稻田土壤拥有更为丰富的ARGs亚型但是更低的ARGs相对丰度。
- (2)上虞和慈溪水稻土序列的土壤ARGs组成存在显著差异,其中细沉积物发育而来的慈溪水稻土序列的ARGs在丰富度、多样性方面均高于粗沉积物发育而来的上虞水稻土序列。但随着植稻过程进行,慈溪和上虞水稻土的ARGs亚型数量差异缩小,在植稻千年后,二者之间在ARGs亚型数量上趋于接近。同时,随着植稻年限增加,耕作层、犁底层和母质层土壤间的ARGs亚型数量差异缩小。

#### 参考文献:

- [1] D' COSTA V M, KING C E, KALAN L, et al. Antibiotic resistance is ancient[J]. Nature, 2011, 477:457-461.
- [2] BLÁZQUEZ J, COUCE A, RODRÍGUEZ-BELTRÁN J, et al. Antimicrobials as promoters of genetic variation[J]. Current Opinion in Microbiology, 2012, 15:561-569.
- [3] 曹志洪. 中国灌溉稻田起源与演变及相关古今水稻土的质量[M].

- 北京:科学出版社, 2016. CAO Z H. Origin and evolution of irrigated paddy fields in China and the quality of ancient and modern paddy soils [M]. Beijing: Science Press, 2016.
- [4] XIAO K Q, LI B, MA L, et al. Metagenomic profiles of antibiotic resistance genes in paddy soils from South China[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2016:92.
- [5] LIN H, CHAPMAN S J, FREITAG T E, et al. Fate of tetracycline and sulfonamide resistance genes in a grassland soil amended with different organic fertilizers[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 170:39-46.
- [6] LIN H, SUN W C, ZHANG Z, et al. Effects of manure and mineral fertilization strategies on soil antibiotic resistance gene levels and microbial community in a paddy-upland rotation system[J]. Environmental Pollution, 2016, 211:332-337.
- [7] 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.
- [8] SCHLESINGER W H. Evidence from chronosequence studies for a low carbon-storage potential of soils[J]. Nature, 1990, 348:232-234.
- [9] MAPELLI F, MARASCO R, FUSI M, et al. The stage of soil development modulates rhizosphere effect along a high arctic desert chronosequence[J]. The ISME Journal, 2018, 12:1188-1198.
- [10] DELGADO-BAQUERIZO M, REICH P B, BARDGETT R D, et al. The influence of soil age on ecosystem structure and function across biomes[J]. Nature Communications, 2020, 11:4721.
- [11] SHEN J P, LI Z M, HU H W, et al. Distribution and succession feature of antibiotic resistance genes along a soil development chronosequence in Urumqi No.1 glacier of China[J]. Frontiers in Microbiology, 2019:10.
- [12] CHEN Q L, HU H W, YAN Z Z, et al. Cross-biome antibiotic resistance decays after millions of years of soil development[J]. The ISME Journal, 2022, 16:1864-1867.
- [13] HUGGETT R J. Soil chronosequences, soil development, and soil evolution: A critical review[J]. Catena, 1998, 32:155-172.

- [14] CAO Z H, FU J, ZOU P, et al. Origin and chronosequence of paddy soils in China[C]. Brisbane: 19th World Congress of Soil Science, Australia, 2010.
- [15] KÖLBL A, MÜLLER-NIGGEMANN C, SCHWARK L, et al. Spatial distribution of SOM parameters during paddy soil evolution[C]. Vienna: EGU General Assembly 2010, 2010.
- [16] ZOU P, FU J, CAO Z, et al. Aggregate dynamics and associated soil organic matter in topsoils of two 2,000-year paddy soil chronosequences[J]. Journal of Soils and Sediments, 2015, 15:510-522.
- [17] NAKAHARA S, ZOU P, ANDO H, et al. Stability of soil organic matter accumulated under long-term use as a rice paddy[J]. Journal of Geophysical Research: Biogeosciences, 2015, 121:67-77.
- [18] LI Y, LIU H, PAN H, et al. T4-type viruses: Important impacts on shaping bacterial community along a chronosequence of 2000-year old paddy soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2019, 128:89-99.
- [19] 汪峰, 姚红燕, 陈若霞, 等. 慈溪 1000 年时间序列农田土壤氮矿化 和硝化的变化[J]. 土壤学报, 2019, 56:1161-70. WANG F, YAO H Y, CHEN R X, et al. Variation of nitrogen mineralization and nitrification in agricultural soils in Cixi along a 1000-year chronosequence [J]. Acta Pedologica Sinica, 2019, 56:1161-1170.
- [20] ZHU Y G, ZHAO Y, LI B, et al. Continental-scale pollution of estuaries with antibiotic resistance genes[J]. Nature Microbiology, 2017, 2: 16270.
- [21] ANDERSSON D I, HUGHES D. Antibiotic resistance and its cost: Is it possible to reverse resistance? [J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, 8:260-271.
- [22] GIBB R, REDDING D W, CHIN K Q, et al. Zoonotic host diversity increases in human-dominated ecosystems[J]. Nature, 2020, 584:398-402
- [23] WISSING L, KÖLBL A, SCHAD P, et al. Organic carbon accumulation on soil mineral surfaces in paddy soils derived from tidal wetlands [J]. Geoderma, 2014, 228/229:90-103.
- [24] 刘琛. 水稻土演变过程中微生物组成与结构特征变化的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016. LIU C. Studies on the changes of microbial community composition and structure in evolution process of paddy soil[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.

(责任编辑:叶飞)