

牛粪原料浓度对厌氧消化削减四环素类抗性基因的影响

朱文博, 张秋萍, 许继飞, 庞小可, 刘建国, 赵吉

引用本文:

朱文博, 张秋萍, 许继飞, 等. 牛粪原料浓度对厌氧消化削减四环素类抗性基因的影响[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(8): 1808-1817.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0033>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

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>

蚯蚓对金霉素污染土壤酶活性和微生物群落的影响

杨思德, 常兴平, 潘政, 李明堂, 翁莉萍, 李永涛, 赵丽霞

农业环境科学学报. 2021, 40(6): 1268-1280 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1470>

土壤真菌对威百亩熏蒸的响应特征

赵晓东, 赵鹏宇, 李晓晶, 燕平梅, 任天志, 李永涛

农业环境科学学报. 2021, 40(3): 580-590 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1333>

三格式化粪池出水水质特征及对周边土壤环境的影响

蒯伟, 李厚禹, 高艺, 杨波, 张春雪, 徐艳, 郑向群

农业环境科学学报. 2021, 40(5): 1051-1061 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1231>

猪场废水处理系统出水及周边河流中噬菌体携带抗性基因的污染特征

杨亦文, 陈颖熙, 蔡影峰, 邢斯程, 吴芮庭, 陈凝雪, 廖新伟

农业环境科学学报. 2020, 39(11): 2631-2639 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0659>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

朱文博, 张秋萍, 许继飞, 等. 牛粪原料浓度对厌氧消化削减四环素类抗性基因的影响[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(8): 1808–1817.

ZHU W B, ZHANG Q P, XU J F, et al. Role of substrate concentrations in the removal of tetracycline resistance genes in anaerobic digestion of dairy manure[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2021, 40(8): 1808–1817.



开放科学 OSID

牛粪原料浓度对厌氧消化削减四环素类抗性基因的影响

朱文博¹, 张秋萍¹, 许继飞^{1,2*}, 庞小可¹, 刘建国³, 赵吉^{1,2}

(1. 内蒙古大学生态与环境学院, 呼和浩特 010021; 2. 内蒙古自治区环境污染控制与废物资源化重点实验室, 呼和浩特 010021; 3. 内蒙古工业大学能源与动力工程学院, 呼和浩特 010051)

摘要: 为了探究不同原料浓度厌氧消化体系中四环素类抗性基因(Tetracycline resistance genes, TRGs)的变化, 设置牛粪原料浓度为100%、75%、50%和25%, 分析了TRGs、理化因子和微生物群落的变化特征及三者之间的相互关系。结果表明: 不同处理之间产气速率相似, 原料浓度从100%降低至25%时总产气量从358.83 mL·g⁻¹·d⁻¹增加至400.89 mL·g⁻¹·d⁻¹。消化后的大部分处理中tetO、tetQ和tetT相对丰度减小为原料的1.04%~87.06%, 而tetC、tetG、tetW和tetX相对丰度增加至原料的1.32~34.99倍。与100%原料浓度相比, 较低原料浓度消化后多数TRGs如tetC、tetG、tetO和tetX以及int I 1的相对丰度更高。不同条件下微生物群落差异明显, 较低浓度原料(50%和25%)消化后优势菌门从Firmicutes变为Proteobacteria, 且TRGs潜在宿主菌属的种类和数目均随着原料浓度的改变而改变。冗余分析表明, 理化因子通过影响潜在宿主菌的变化从而影响TRGs的变化。综上, 由废水干预的牛粪原料浓度较低的情况可能有利于TRGs潜在宿主菌的增殖, 从而增加TRGs传播的风险。

关键词: 厌氧消化; 原料浓度; 牛粪; 四环素类抗性基因; 微生物群落

中图分类号: X713; X703 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2021)08-1808-10 doi:10.11654/jaes.2021-0033

Role of substrate concentrations in the removal of tetracycline resistance genes in anaerobic digestion of dairy manure

ZHU Wenbo¹, ZHANG Qiuping¹, XU Jifei^{1,2*}, PANG Xiao-ke¹, LIU Jianguo³, ZHAO Ji^{1,2}

(1. School of Ecology and Environment, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China; 2. Inner Mongolia Key Laboratory of Environmental Pollution Control and Waste Resource Recycle, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China; 3. College of Energy and Power Engineering, Inner Mongolia University of Technology, Hohhot 010051, China)

Abstract: This study investigated the changes in tetracycline resistance genes (TRGs) in thermophilic anaerobic digestion with different substrate concentrations of 100%, 75%, 50%, and 25%, and the changes in TRGs, physical and chemical factors, and microbial communities and their relationships were analyzed. The results showed that the biogas production rates were similar among four treatments, and the total biogas yields increased from 358.83 mL·g⁻¹·d⁻¹ to 400.89 mL·g⁻¹·d⁻¹ as substrate concentration decreased from 100% to 25%. After anaerobic digestion, the relative abundances of tetO, tetQ, and tetT decreased by 1.04%~87.06%, whereas those of tetC, tetG, tetW, and tetX increased by 1.32~34.99 times. Compared with 100% substrate concentration, relatively lower substrate concentrations had the higher relative abundances of target genes after anaerobic digestion, such as tetC, tetG, tetO, tetX, and int I 1. Differences in microbial

收稿日期: 2021-01-11 录用日期: 2021-03-02

作者简介: 朱文博(1996—), 女, 黑龙江伊春人, 硕士研究生, 主要从事粪便处理与资源化方面的研究。E-mail: 18845896107@163.com

*通信作者: 许继飞 E-mail: Jifeixu@imu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金项目(51768048); 内蒙古自然科学基金项目(2020MS05003); 内蒙古自治区科技计划项目(2020GG0015, 2020GG0081)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China (51768048); The Natural Science Foundation of Inner Mongolia, China (2020MS05003); The Inner Mongolia Science & Technology Plan (2020GG0015, 2020GG0081)

communities were observed among the four treatments. The dominant phylum changed from Firmicutes to Proteobacteria after digestion with lower substrate concentrations (50% and 25%). The species and number of potential host bacteria of TRGs also altered with the changes in substrate concentrations. Redundancy analysis demonstrated that physicochemical parameters affected the changes in TRGs by affecting their potential host bacteria. In conclusion, a low concentration of substrate due to the intervention wastewater might benefit the proliferation of potential host bacteria, thereby increasing the risks of transmission of TRGs.

Keywords: anaerobic digestion; substrate concentration; dairy manure; tetracycline resistance genes (TRGs); microbial communities

在畜牧养殖业快速发展的同时,大量畜禽粪便产生,我国每年畜禽粪污产生量高达38亿t,其中牛粪占比最高,这些粪便若不能得到合理处置,将造成不容忽视的环境污染^[1-2]。近年来,畜禽粪便中的抗生素抗性污染问题日益凸显,抗生素抗性基因(Antibiotic resistance genes, ARGs)在畜禽粪便中被频繁检出,尤其是四环素类抗性基因(Tetracycline resistance genes, TRGs)^[3-5]。当粪便进入环境后,粪源 ARGs 会在环境微生物间转移和传播,从而对人类健康和生态系统造成长期、不可逆的危害^[6-7]。厌氧消化是粪便资源化利用的一种主要方式,也是在源头上削减环境抗生素抗性的管控措施之一^[8]。因此,许多研究关注厌氧消化对畜禽粪便中 ARGs 尤其是牛粪中 TRGs 的削减作用^[9-12]。

消化原料是畜禽粪便厌氧消化的一个重要因素^[13],对 ARGs 的削减效果有显著影响^[14]。CHENG 等^[14]的研究表明,来源于不同养殖场的猪粪经厌氧消化后 ARGs 的变化不同。CHEN 等^[15]和 SUI 等^[16]发现厌氧消化对同一养猪场不同时间段猪粪原料中 ARGs 的去除效果也具有显著差异。消化原料的差异实质上是理化性质的差异,其可能是养殖规模大小、牲畜饮水浪费水量、清粪方式(干清粪或水清粪)甚至季节间的差异等造成的^[17]。对于养殖场,无论是清粪方式还是牲畜饮水浪费水量的不同都将在粪便的收集过程中造成废水干预,直接影响消化原料的理化性质^[18]。另外,原料的差异也会影响厌氧消化过程中的微生物群落^[19],而微生物群落又是改变 ARGs 行为特征的主要因素^[19-21]。由此可知,废水干预必然会改变粪便的理化性质,进而影响厌氧消化对 ARGs 的去除效果。然而,以废水干预后的粪便为消化原料,对消化过程中 ARGs 丰度变化的研究鲜有报道。

温度也是影响厌氧消化和 ARGs 丰度变化的一个重要工艺参数,研究表明高温厌氧消化较中温相比产气量更高且在 ARGs 的削减方面更有优势^[9,22]。因此,本研究开展不同牛粪原料浓度的高温厌氧消化试验,以 TRGs 为研究对象,主要探究废水干预下的牛粪

原料在厌氧消化过程中 ARGs 的变化特征,并探寻不同原料浓度条件下 ARGs、微生物群落和理化因子间的相互关系,从 ARGs 削减角度为畜禽粪便的管理提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

在内蒙古呼和浩特某规模化奶牛养殖场的非冲洗时段采集粪便收集池中的牛粪,4℃保存运回实验室。牛粪样品总固体含量(TS)为3%,pH为6.86,氨氮(TAN)浓度为789.19 mg·L⁻¹,可溶性 COD(SCOD)浓度为6 828.57 mg·L⁻¹,总挥发酸(TVFAs)浓度为7 120 mg·L⁻¹,总磷(TP)含量为46.33 mg·L⁻¹。牛粪样品为液态,因此直接添加蒸馏水将牛粪分别稀释至原浓度的100%(不稀释)、75%、50%和25%,作为厌氧消化的不同原料。选用体积为1.1 L的厌氧瓶,加入1 L不同浓度消化原料后通氮气5~8 min。采用并未检测出 ARGs 的厌氧微生物菌剂(广州微生物,中国)作为接种物,其主要为水解发酵菌和产甲烷菌等厌氧微生物,接种率为0.1%。反应温度为(55±1)℃,每组处理设置3个重复。

1.2 样品的采集与测定

通过排水法收集气体,并记录每24 h的产气量。在反应前、第6 d、第14 d和反应结束时采集样品,每次采集样品1 mL于离心管内,12 000 r·min⁻¹离心5 min,上清液用于理化性质的测定,沉淀物于-80℃保存,用于 ARGs、*int I* 1 和 16S rRNA 的定量分析以及微生物群落分析。

甲烷含量采用沼气分析仪(MRU Optima7,德国)测定;SCOD采用重铬酸钾法测定;TAN采用纳氏试剂光度法测定;TVFAs通过酸性氯化铁比色法测定;pH通过pH计(PHS-3E,上海雷磁)测定;TP通过钼锑抗分光光度法测定。

1.3 ARGs、*int I* 1 和 16S rRNA 的定量分析

基因组DNA的提取:采用粪便基因组DNA提取试剂盒(天根DP-328,北京)提取每毫升样品沉淀物

中的DNA,具体步骤参照试剂盒说明书。所提取DNA用超微量紫外分光光度计(Nanodrop-2000,美国)检测其含量和纯度(A260/280为1.7~2.0)。

实时荧光定量PCR(qPCR):通过普通PCR仪(ABI 9902,美国)对粪便原料中17种ARGs(*tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetE*、*tetG*、*tetO*、*tetQ*、*tetT*、*tetW*、*tetX*、*sul1*、*sul2*、*dfrA1*、*dfrA7*、*ermB*、*ermC*和*ermF*)进行检测,共有7种TRGs呈阳性,包括编码外排泵基因(*tetC*、*tetG*)、编码核糖体保护蛋白基因(*tetO*、*tetQ*、*tetT*、*tetW*)和转座酶修饰基因(*tetX*)^[23]。接着采用荧光定量系统(Bio-Rad CFX96,美国)对7个TRGs、I类整合酶基因*int I 1*和16S rRNA基因进行定量分析,qPCR所用引物序列、退火温度和反应程序等详见文献[12,21]。

1.4 高通量测序

将提取的DNA委托上海派森诺生物公司,利用Illumina Novaseq平台进行16S rRNA高通量测序。测序区域为V3~V4区,引物为338F(ACTCCTACG-GCAGGCAGCA)和806R(GGACTACHVGGGTWTC-TAAT)。原始序列经质控后得到高质量序列,并在SILVA 16S rRNA数据库中进行比对。

1.5 数据分析

采用Microsoft Office 2013进行原始数据整理,SPSS 22.0进行单因素方差分析和Pearson相关性分析,Canoco 5.0完成冗余分析,Origin Pro 9.0和R 3.5.3作图。

2 结果与讨论

2.1 厌氧消化性能

不同厌氧消化过程中产沼气速率如图1所示。消化前期产气速率迅速上升,在第5~7 d达到产气高峰,随后逐渐下降,直至30 d以后产气速率稳定。不

同原料浓度厌氧消化之间产气速率相似,最大产气速率略有差异,100%、75%、50%、25%原料浓度条件下的最大产气速率分别为43.56、45.03、46.67 mL·g⁻¹·d⁻¹和54.00 mL·g⁻¹·d⁻¹。相应地,消化后总产气量分别为358.83、372.44、384.44 mL·g⁻¹和400.89 mL·g⁻¹。与其他关于牛粪高温厌氧消化的研究相比,本研究中100%原料浓度的最大产气速率高于其他研究^[24-25]的21.96 mL·g⁻¹·d⁻¹和32.78 mL·g⁻¹·d⁻¹,总产气量处于其总产气量182.28 mL·g⁻¹和388.24 mL·g⁻¹之间。原料浓度越低,单位质量总固体产气量越高,这可能是因为原料经稀释后有机物水解速率增大,产酸产气菌可利用的有机质增加。杜连柱等^[26]在关于猪粪原料浓度对厌氧消化产气性能影响的研究中也得出了相似结论,即随着原料浓度降低产气量升高。厌氧消化结束时NH₄⁺-N浓度为554.72~1 474.14 mg·L⁻¹,低于氨氮抑制浓度^[27-28],且整个厌氧消化过程中pH基本维持在7~8,表明不同原料浓度厌氧消化系统均稳定运行。

2.2 ARGs和*int I 1*丰度变化

大规模养殖场牛粪中检出7种ARGs,包括*tetC*、*tetG*、*tetO*、*tetQ*、*tetT*、*tetW*和*tetX*,均为TRGs,这是因为四环素类药物在畜禽养殖业中使用量最大,在畜禽粪便中的残留也最高^[29]。ZHU等^[31]的研究也表明TRGs在动物粪便中检出频率最高。7种TRGs中,*tetW*的绝对丰度最高,为1.70×10⁹ copies·mL⁻¹,占总丰度的61.34%,这可能是由于*tetW*与一个编码功能蛋白的*mob*基因有关,从而使其更易在动物肠道菌和病原菌之间转移^[30],因此,*tetW*是厌氧消化过程中的重点关注对象。

为了在同一水平对比不同处理对TRGs的作用,用基因相对丰度(基因拷贝数与16S拷贝数的比值)

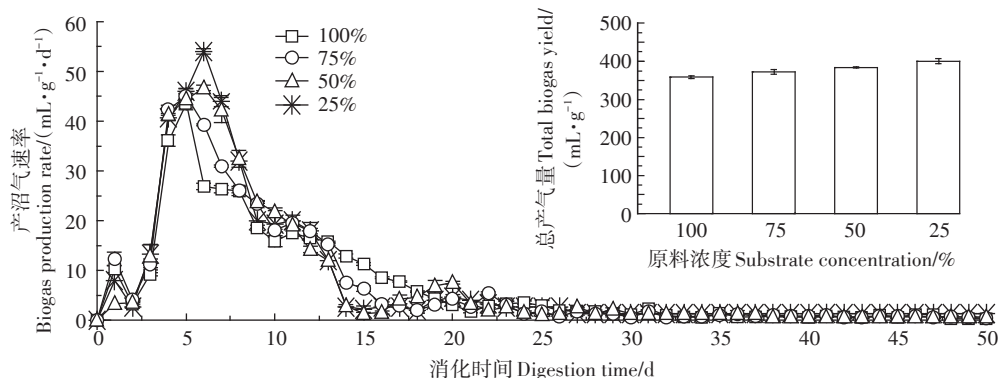


图1 厌氧消化产沼气速率和总产气量

Figure 1 Biogas production rates and biogas yields in anaerobic digestion

来反映 TRGs 的变化。如图 2 所示,牛粪原料中 7 种 TRGs 的总相对丰度为 3.59×10^{-2} ,随着厌氧消化反应的推进,总相对丰度显著增加。消化结束后,100%、75%、50%、25% 原料浓度条件下的总相对丰度分别为 7.10×10^{-1} 、 7.79×10^{-1} 、 5.55×10^{-1} 和 5.04×10^{-1} ,随着原料浓度的降低,总相对丰度呈先升高后降低的趋势,在 75% 和 25% 时分别达到最大值和最小值。*tetW* 在消化开始后相对丰度增加且占比增加,达到 94.84%~99.70%,这也是总相对丰度升高的主要原因。除去 *tetW*,6 种 TRGs 的总相对丰度均随消化过程进行而降低,且 100% 条件下最低,25% 条件下最高。由此可见,若要对比不同处理对 TRGs 削减的影响,还需分析单个 TRGs 的变化趋势。

图 3 为各 TRGs 相对丰度在厌氧消化前后的倍数变化值(消化后丰度与消化前丰度的比值),倍数变化值小于 1 表示基因被削减,大于 1 表示基因被富集。*tetC* 和 *tetG* 在厌氧消化后均被富集,相对丰度分别为消化前的 1.32~14.34 倍和 2.65~31.26 倍。随着原料浓度的降低,*tetC* 的倍数变化值呈锯齿状上升,*tetG* 则先降低后升高,且二者均在 25% 条件下富集程度最

高。*tetO*、*tetQ* 和 *tetT* 几乎在所有条件下被削减,只有 50% 条件下的 *tetO* 相对丰度升高至原来的 2.07 倍。对比不同处理可知,*tetO* 和 *tetQ* 的倍数变化值在 100% 条件下均最低,而 *tetT* 的倍数变化值在 25% 条件下最低,表明较低原料浓度抑制了 *tetO* 和 *tetQ* 的削减,但一定程度上促进了 *tetT* 的去除。如前所述,*tetW* 相对丰度的增加是总相对丰度增加的主导因素之一,其倍数高达 22 倍以上,其中 75% 和 25% 条件下的倍数分别为最大(34.99 倍)和最小(22.51 倍),与总相对丰度的规律一致。*tetX* 的相对丰度在 50% 条件下增加至原来的 2.25 倍,而在其他 3 种条件下降低,且 25% 时降低幅度最大。

由以上分析可知,不同原料浓度下的 TRGs 变化具有显著差异,且原料浓度对 TRGs 的削减规律不一致。整体来看,较低浓度的厌氧消化增加了大部分 TRGs 的富集程度。许多研究表明理化性质和微生物群落贡献了 ARGs 的变化^[19-21]。当原料浓度较低时,一些对氨氮耐受程度较低的微生物出现竞争优势,其有可能携带 ARGs 从而导致丰度升高^[31]。又或者原料含水量高时有机物水解能力增大,使得一些产酸产气

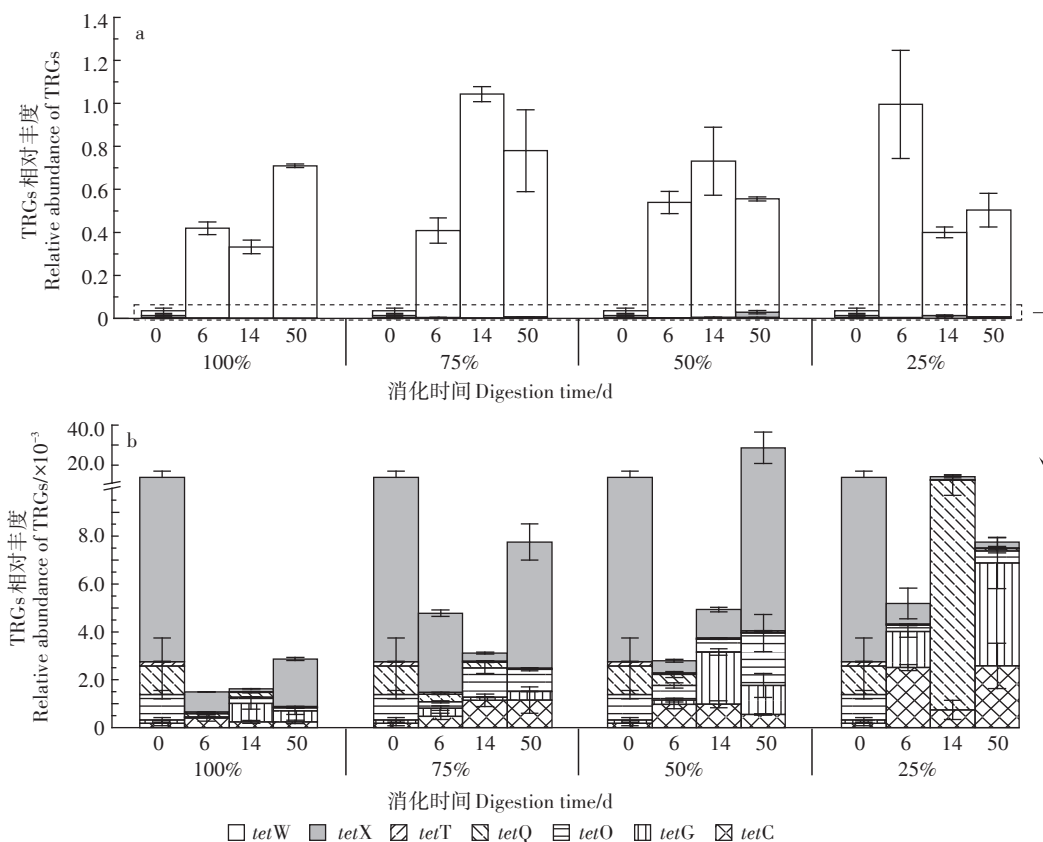


图2 不同原料浓度下厌氧消化过程TRGs相对丰度

Figure 2 Relative abundances of TRGs during anaerobic digestion under different substrate concentration

菌的代谢活动增强,这类微生物通常也携带 ARGs,从而导致 ARGs 富集程度明显增加^[32]。ARGs 在微生物间的传播也是 ARGs 富集的主要原因之一,*int I 1* 作为一类整合子通常参与 ARGs 的水平基因转移^[33]。如图 3 所示,*int I 1* 的相对丰度在消化后均增加,且较低原料浓度条件(75%~25%)下其倍数变化值远大于 1,这表明较低浓度的牛粪经厌氧消化后 TRGs 传

播的风险增强。从大部分 TRGs 以及 *int I 1* 变化的角度考虑,实际工程中废水的干预可能不利于厌氧消化对牛粪 TRGs 的削减作用。

2.3 微生物群落结构

前人研究表明微生物群落的变化是 ARGs 变化的驱动因子,因此,探究不同处理间 TRGs 变化的差异需从微生物群落入手,分析不同处理间微生物群落的

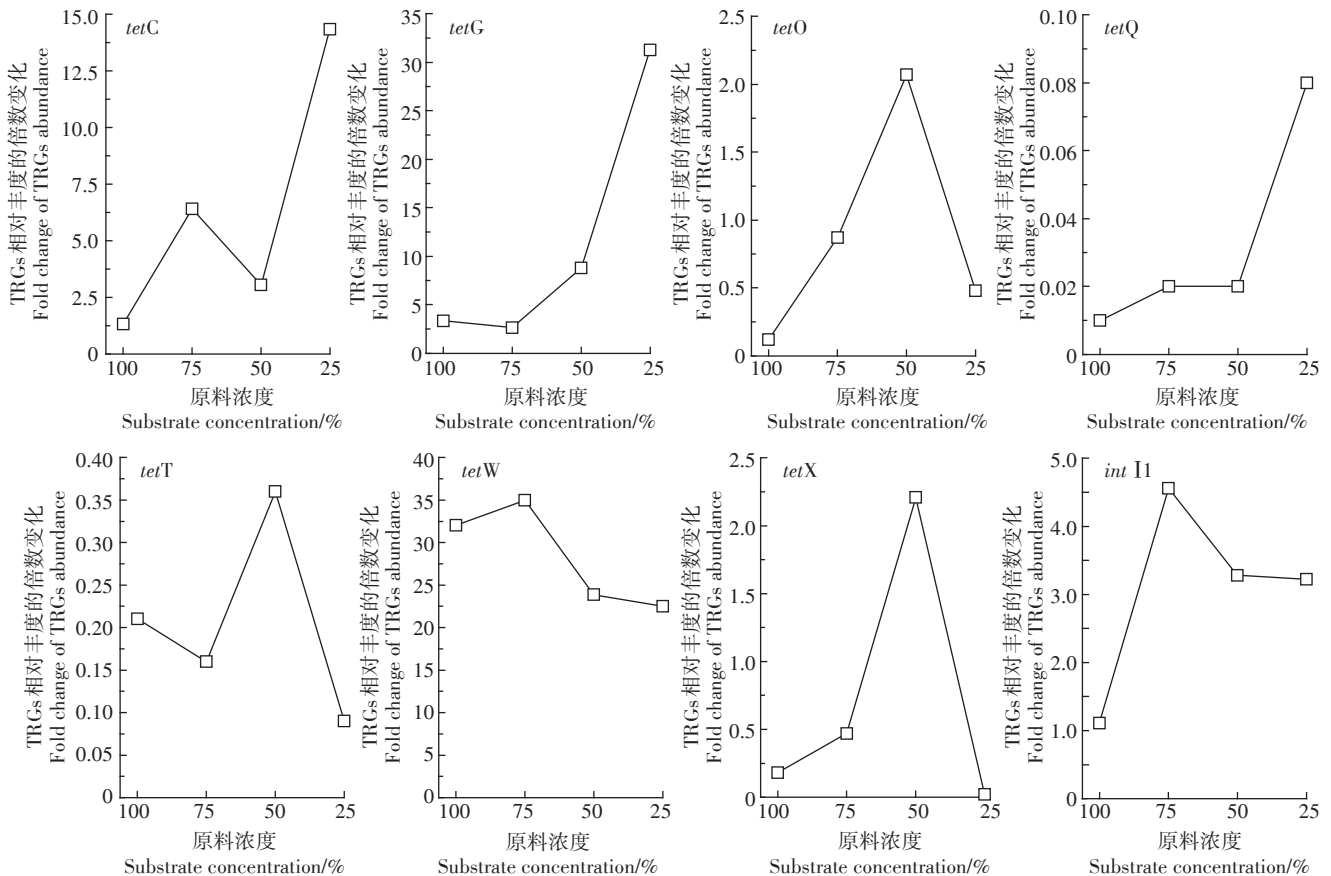


图3 TRGs和*int I 1*相对丰度的倍数变化值

Figure 3 Fold changes in relative abundances of TRGs and *int I 1*

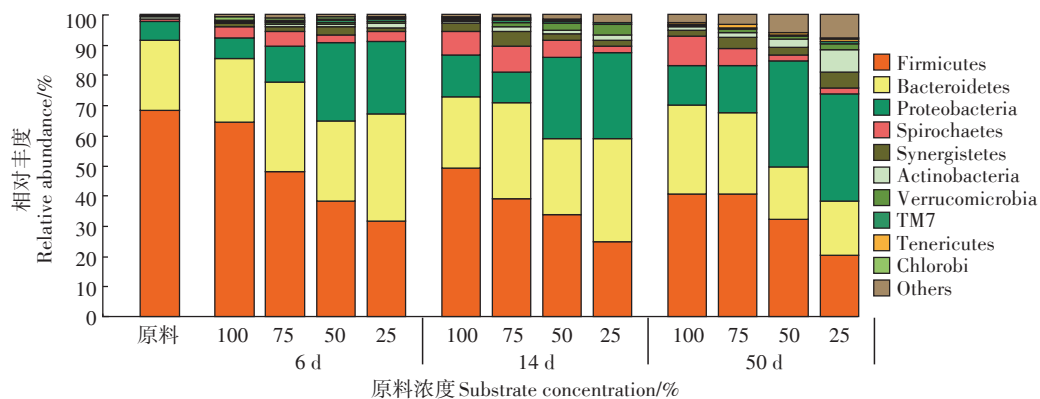


图4 不同消化时间下厌氧消化过程门水平微生物群落结构

Figure 4 Relative abundances at the phylum level during anaerobic digestion under different digestion time

差异。图4为消化过程中门水平微生物群落结构,从图中可以看出,消化原料中 Firmicutes 为第一优势菌门,相对丰度为 68.22%,其次为 Bacteroidetes 和 Proteobacteria,相对丰度分别为 23.32% 和 6.29%。消化后不同处理中优势菌门有所改变,100% 和 75% 原料浓度条件下 Firmicutes 仍为第一优势菌门,相对丰度均为 40.46%,而 50% 和 25% 原料浓度条件下的第一优势菌门变为 Proteobacteria,相对丰度分别为 34.98% 和 35.57%。另外,整个消化过程中 Firmicutes 的相对丰度均随着原料浓度的减小而降低,而 Proteobacteria 的相对丰度呈相反趋势。这是由于 Firmicutes 在纤维素的降解中起关键作用,随着有机物含量的减少,可供 Firmicutes 吸收利用的物质减少,其丰度不断减小^[34]; Proteobacteria 可能为兼性或专性厌氧细菌或寡营养菌,其在厌氧环境或有机物质含量较少的情况下

更易生存^[35]。

图5为厌氧消化过程中属水平微生物(前50)的丰度变化情况,其中按行(样本)进行标准化。经厌氧消化后,属水平微生物变化较为明显。一些菌属经消化后相对丰度显著降低甚至被杀灭,如 *Oscillospira*、*Sedimentibacter* 和 *Paludibacter* 等;而一些菌属经消化后相对丰度显著增加,如 *Rhodococcus*、*Bosea* 和 *unidentified_Christensenellaceae* 等。不同处理间属水平微生物差异也较为明显。消化初期(第6 d),*Sedimentibacter*、*unidentified_Peptostreptococcaceae* 和 *unclassified_Clostridiales* 等的相对丰度随着原料浓度的降低而减小,而 *Oscillospira*、*unidentified_p-2534-18B5* 和 *Aquabacterium* 的相对丰度呈相反趋势,且 *Pseudomonas*、*Comamonas* 和 *Brevundimonas* 等的相对丰度在 75% 条件下最高。随着消化反应的进行,第

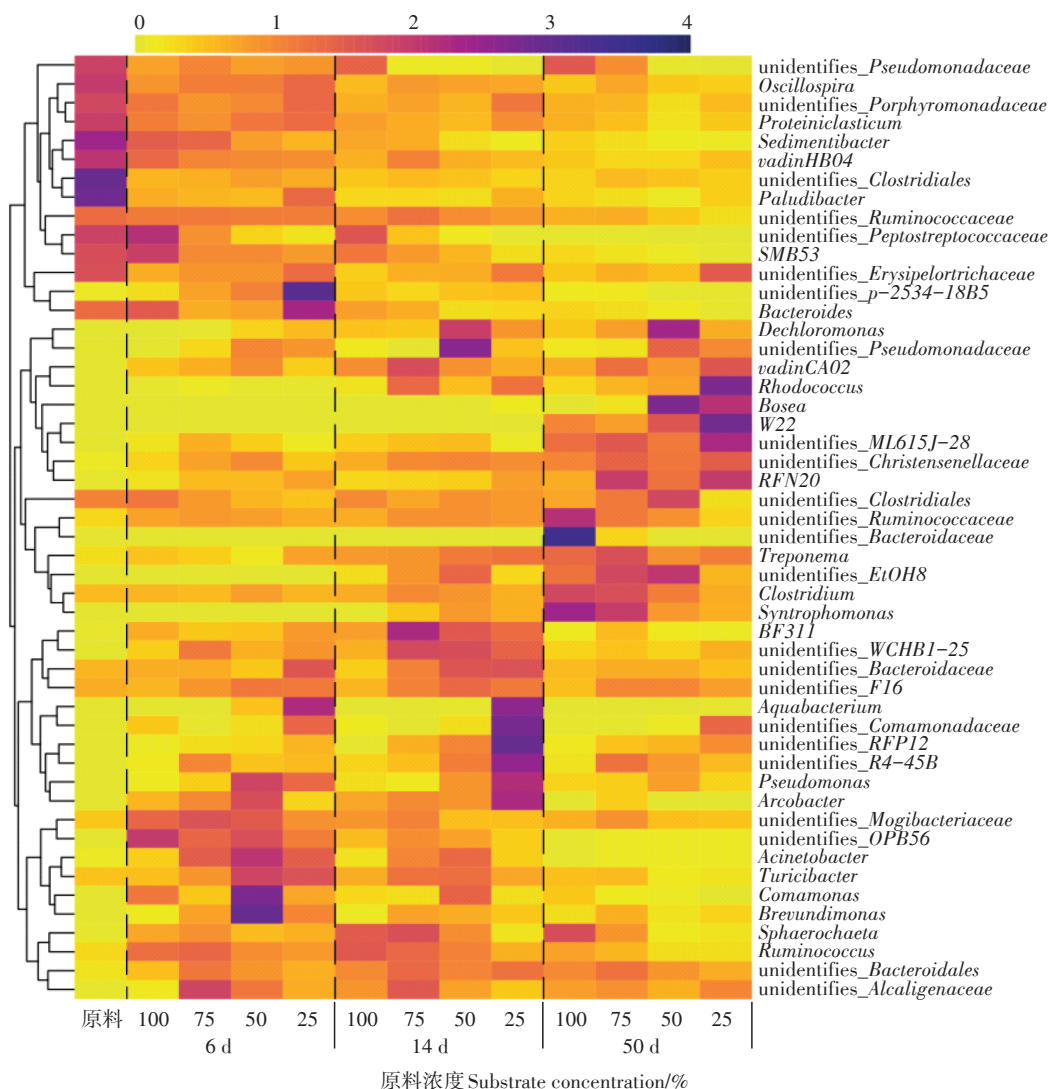


图5 不同消化时间下厌氧消化属水平微生物群落结构

Figure 5 Relative abundances at the genus level during anaerobic digestion under different digestion time

14 d时 *Aquabacterium*、*Pseudomonas* 和 *Arcobacter* 等的相对丰度随着原料浓度的降低而增加,且 *Dechloromonas* 和 unclassified_ *Pseudomonadaceae* 的相对丰度在 75% 时最高。直至消化结束,一些消化过程中相对丰度较高的菌属反而降低,如 *Aquabacterium*、*Pseudomonas*、*Comamonas* 和 *Brevundimonas* 等。较低原料浓度条件下(50% 和 25%)菌属 *Dechloromonas*、*Rhodococcus* 和 *Bosea* 的相对丰度较高,而较高原料浓度条件下(100% 和 75%)菌属 unclassified_ *Ruminococcaceae*、unclassified_ *Bacteroidaceae*、*Treponema*、*Clostridium* 和 *Syntrophomonas* 的相对丰度较高。

以上证据皆表明不同原料浓度条件下的厌氧消化微生物群落差异较为明显,尤其是菌门 Firmicutes 和 Proteobacteria,及菌属 *Dechloromonas*、*Rhodococcus*、*Syntrophomonas* 和 *Treponema* 等。WANG 等^[36]的研究中表明 Firmicutes 和 Proteobacteria 通常是 ARGs 的潜在宿主菌门,*Treponema* 和 *Syntrophomonas* 等是 ARGs 的潜在宿主菌属。由此可知,这些微生物在不同处理间的差异可在一定程度上解释不同处理间 TRGs 变化的差异,微生物与 TRGs 间的相关关系需进一步确认。

2.4 TRGs 与 *int I* 1、理化性质和微生物间的相关关系

ARGs 与微生物之间的相关性($P < 0.05$)可以表示 ARGs 的潜在宿主信息^[37],当厌氧消化条件改变时,

ARGs 的潜在宿主也可能改变。不同处理条件下的 TRGs、*int I* 1 和微生物之间的相关性如图 6 所示。随着原料浓度从 100% 降低至 25%, *tetC* 的潜在宿主菌由 4 个逐渐减少为 1 个(unclassified_ *Pseudomonadaceae*), 尽管潜在宿主菌数目变少,但 25% 时 unclassified_ *Pseudomonadaceae* 较高的相对丰度造成了 *tetC* 在此条件下的相对丰度最大。*tetG* 的潜在宿主菌数目则随着原料浓度的降低而增加,且在 25% 时 *tetG* 与 *int I* 1 有相关关系,这可能是 *tetG* 的倍数变化值随原料浓度降低而增大的原因。在 50% 条件下, *tetO* 潜在宿主菌数目较多(3 个),且其相对丰度在消化后高于其他处理,反映了 *tetO* 只在此条件下被富集。*tetQ* 和 *tetT* 的潜在宿主菌相似,这些潜在宿主菌相对丰度经消化后减小则代表了 *tetQ* 和 *tetT* 的削减。对于 *tetW*, unidentified_ *Bacteroidales*、unidentified_ *Ruminococcaceae* 和 *Sphaerochaeta* 只在 50% 或 25% 条件下为其潜在宿主菌,这 3 种菌属在 50% 或 25% 条件下较低的相对丰度也代表了 *tetW* 较低的相对丰度。*tetX* 在 50% 条件下的潜在宿主菌为 unclassified_ *Clostridiales*, 同时此菌属也为 50% 条件下 *tetO* 的潜在宿主菌,这反映了 *tetX* 的相对丰度变化与 *tetO* 一致,即 50% 条件下的倍数变化值远高于其他条件。*int I* 1 与 TRGs 的潜在宿主菌几乎未有重合,说明厌氧消化过程中 TRGs 的变

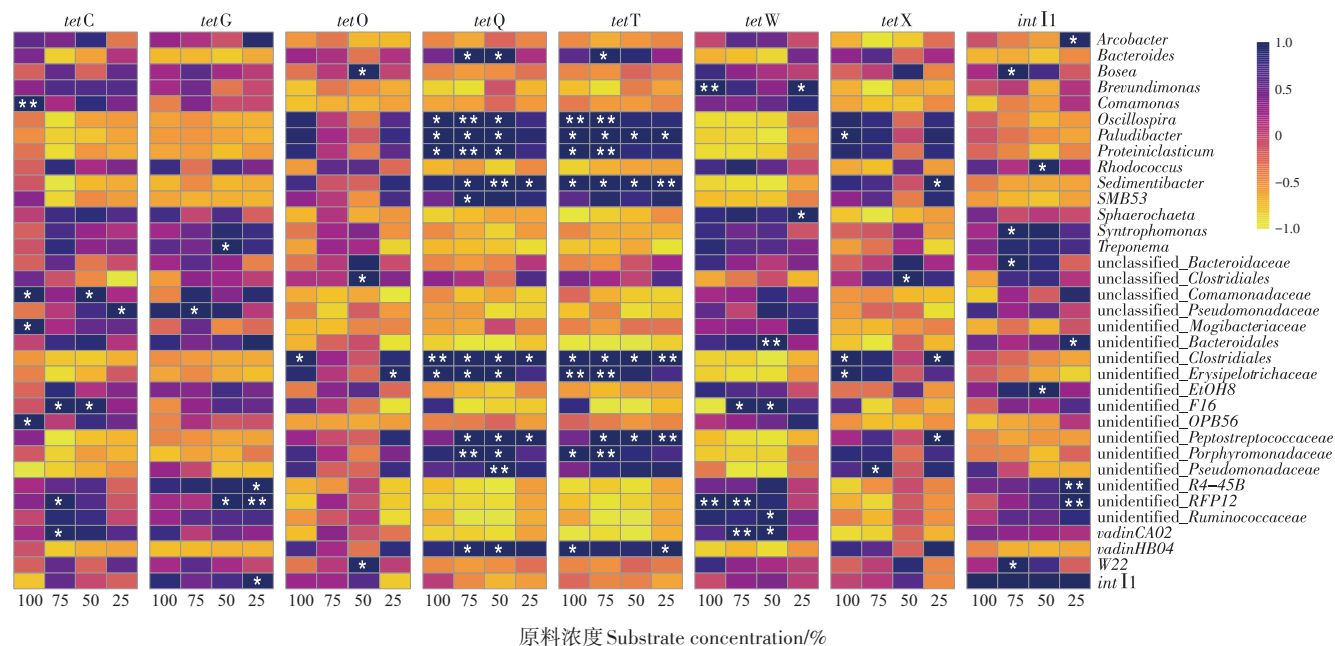


图6 ARGs、*int I* 1 和属水平微生物间的相关性分析

Figure 6 Correlation analysis among ARGs, *int I* 1 and genera

化更多地归因于微生物群落演替而不是水平基因转移。

宿主菌的变化代表了 ARGs 的变化,而理化性质的变化又影响了宿主菌的变化^[18,30]。因此,通过冗余分析来探究不同处理中影响宿主菌变化的关键理化因子(图7)。数据经标准化处理,一轴和二轴对潜在宿主菌变化的解释度占总变量的52.01%,不同处理之间潜在宿主菌的变化差异较为明显($P=0.001$)。原点与 unclassified_Pseudomonadaceae、unidentified_R4-45B 和 unidentified_RPF12 的连线指向 25% 条件,表示这几种菌属的相对丰度在此条件下较高,且它们为 *tetC* 和 *tetG* 在此条件下的潜在宿主菌,与 TAN 呈负相关,表明这些菌属可能不耐受高 TAN 浓度,25% 条件下 TAN 浓度较低时菌属相对丰度较高,从而解释了此条件下 *tetC* 和 *tetG* 富集程度最大的原因。TAN 和 pH 也与 *tetQ* 和 *tetT* 的潜在宿主菌 *Proteiniclasticum*、*Oscillospira* 和 *Paludibacter* 呈负相关,表明较高原料浓度条件下(100% 和 75%)TAN 和 pH 较高时菌属的相对丰度较低,反映了此条件下 *tetQ* 和 *tetT* 的削减效果较好。*tetO* 在 50% 条件下的潜在宿主菌 *Bosea* 和 W22 与 SCOD 和 TVFAs 呈负相关,表明此菌属可能为寡营

养菌,当 SCOD 和 TVFAs 浓度较低时菌属的相对丰度较高,使得 *tetO* 在此条件下富集。*Sphaerochaeta* 和 unidentified_Bacteroidales 为 *tetW* 在 50% 和 25% 条件下的潜在宿主菌,其与 TAN 呈正相关,50% 和 25% 条件下 TAN 浓度较低,从而潜在宿主菌的丰度较低,*tetW* 的富集程度较弱。结合图6与图7,TAN 和 pH 与 *tetQ* 和 *tetT* 的潜在宿主菌 *Proteiniclasticum*、*Oscillospira* 和 *Paludibacter*, *tetC* 和 *tetG* 的潜在宿主菌 unclassified_Pseudomonadaceae、unidentified_R4-45B 和 unidentified_RPF12 以及 *tetW* 的潜在宿主菌 *Sphaerochaeta* 和 unidentified_Bacteroidales 均存在相关关系,SCOD 和 TVFAs 与 *tetO* 的潜在宿主菌 *Bosea* 和 W22 存在相关关系。由此可知,理化因子在一定程度上解释了潜在宿主菌的变化及其对 TRGs 变化的影响,即 TAN 和 pH 与大部分 TRGs 如 *tetC*、*tetG*、*tetQ*、*tetT* 和 *tetW* 的变化有关,而 SCOD 和 TVFAs 与 *tetO* 的变化有关。

3 结论

(1)原料浓度对产气速率无明显影响,但总产气量随着原料浓度的降低而逐渐增加。

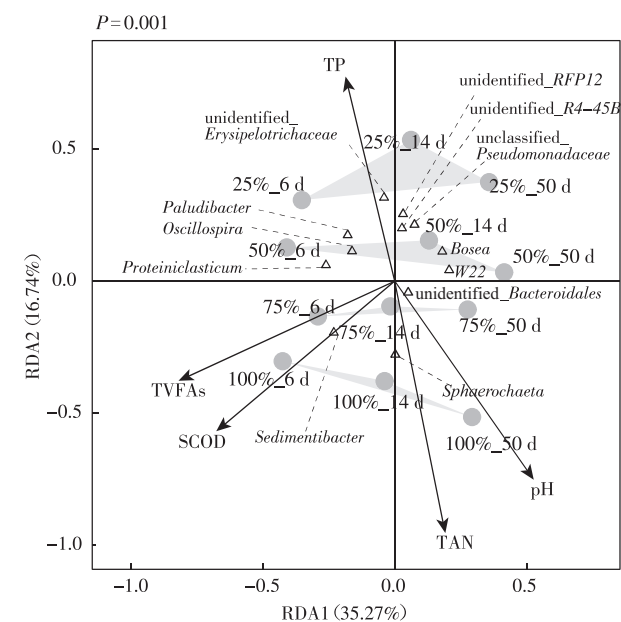
(2)经厌氧消化后,*tetC*、*tetG*、*tetO* 和 *tetX* 以及 *int I 1* 在较低原料浓度条件下(75%~25%)相对丰度更高,富集程度更明显。

(3)随着原料浓度的降低,优势菌门从 Firmicutes 变为 Proteobacteria,且 TRGs 潜在宿主菌的种类和数目均改变。理化因子通过影响潜在宿主菌的变化从而影响 TRGs 的变化,TAN 和 pH 与 *tetC*、*tetG*、*tetQ*、*tetT* 和 *tetW* 的变化有关,SCOD 和 TVFAs 与 *tetO* 的变化有关。

(4)与 100% 原料浓度相比,75%~25% 原料浓度条件下大部分 TRGs 和 *int I 1* 的相对丰度更高,说明废水的干预不利于粪便中 TRGs 的削减,从而增加粪便后续土地利用过程中 TRGs 的传播风险。

参考文献:

- [1] 吴浩玮,孙小淇,梁博文,等.我国畜禽粪便污染现状及处理与资源化利用分析[J].农业环境科学学报,2020,39(6):1168-1176. WU H W, SUN X Q, LIANG B W, et al. Analysis of livestock and poultry manure pollution in China and its treatment and resource utilization[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2020, 39(6):1168-1176.
- [2] 张藤丽,焉莉,韦大明.基于全国耕地消纳的畜禽粪便特征分布与环境承载力预警分析[J].中国生态农业学报,2020,28(5):745-755. ZHANG T L, YAN L, WEI D M. Characteristic distribution of livestock manure and warning analysis of environmental carrying capacity based on the consumption of cultivated land in China[J]. Chinese Journal of



实心圆形代表不同样点,空心三角形代表潜在宿主菌,
实心箭头代表理化因子

Solid circles represent different points, hollow triangles represent potential host bacteria, and solid arrows represent physical and chemical factors

图7 理化因子与潜在宿主菌之间冗余分析

Figure 7 Redundancy analysis between physicochemical parameters and potential host bacteria

- Eco-Agriculture*, 2020, 28(5):745-755.
- [3] 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.
- [4] CHENG W X, CHEN H, SU C, et al. Abundance and persistence of antibiotic resistance genes in livestock farms: A comprehensive investigation in eastern China[J]. *Environment International*, 2013, 61:1-7.
- [5] 邹威, 金彩霞, 魏闪, 等. 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[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(11):2640-2652. ZOU W, JIN C X, WEI S, et al. Occurrence of antibiotic resistance genes in livestock farms of different scales in north China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(11):2640-2652.
- [6] 隋倩雯, 张俊亚, 魏源送, 等. 畜禽养殖废水生物处理与农田利用过程抗生素抗性基因的转归特征研究进展[J]. 环境科学学报, 2016, 36(1):16-26. SUI Q W, ZHANG J Y, WEI Y S, et al. Fate of antibiotic resistance genes in the process of biological treatment and land application of animal wastewater: An overview[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2016, 36(1):16-26.
- [7] 邹威, 罗义, 周启星. 畜禽粪便中抗生素抗性基因(ARGs)污染问题及环境调控[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(12):2281-2287. ZOU W, LUO Y, ZHOU Q X. Pollution and environmental regulation of antibiotic resistance genes (ARGs) in livestock manure[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2014, 33(12):2281-2287.
- [8] 王瑞, 魏源送. 畜禽粪便中残留四环素类抗生素和重金属的污染特征及其控制[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(9):1705-1719. WANG R, WEI Y S. Pollution and control of tetracyclines and heavy metals residues in animal manure[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(9):1705-1719.
- [9] SUN W, QIAN X, GU J, et al. Mechanism and effect of temperature on variations in antibiotic resistance genes during anaerobic digestion of dairy manure[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6:30237.
- [10] MA J, GU J, WANG X, et al. Effects of nano-zerovalent iron on antibiotic resistance genes during the anaerobic digestion of cattle manure[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 289:121688.
- [11] GURMESSA B, PEDRETTI E F, COCCO S, et al. Manure anaerobic digestion effects and the role of pre- and post-treatments on veterinary antibiotics and antibiotic resistance genes removal efficiency[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 721:137532.
- [12] 朱文博, 许继飞, 张秋萍, 等. 不同温度牛粪厌氧消化中四环素类抗性基因的丰度变化特征[J]. 环境科学与技术, 2020, 43(2):108-114. ZHU W B, XU J F, ZHANG Q P, et al. Variation of tetracycline resistance genes during anaerobic digestion of dairy manure at different temperatures[J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 43(2):108-114.
- [13] 张翠丽, 杨改河, 任广鑫, 等. 温度对4种不同粪便厌氧消化产气效率及消化时间的影响[J]. 农业工程学报, 2008, 24(7):209-212. ZHANG C L, YANG G H, REN G X, et al. Effects of temperature on biogas production efficiency and fermentation time of four manures[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2008, 24(7):209-212.
- [14] ZHANG J Y, LU T D, SHEN P H, et al. The role of substrate types and substrate microbial community on the fate of antibiotic resistance genes during anaerobic digestion[J]. *Chemosphere*, 2019, 229:461-470.
- [15] CHEN J, MICHEL F C, SREEVATSAN S, et al. Occurrence and persistence of erythromycin resistance genes (*erm*) and tetracycline resistance genes (*tet*) in waste treatment systems on swine farms[J]. *Microbial Ecology*, 2010, 60(3):479-486.
- [16] SUI Q W, ZHANG J Y, TONG J, et al. Seasonal variation and removal efficiency of antibiotic resistance genes during wastewater treatment of swine farms[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(10):9048-9057.
- [17] 刘安芳, 阮蓉丹, 李厅厅, 等. 猪舍内粪污废弃物和有害气体减量化工程技术研究[J]. 农业工程学报, 2019, 35(15):200-210. LIU A F, RUAN R D, LI T T, et al. Research progress of in-house reduce engineering technology for piggery manure wastes and poisonous gas[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2019, 35(15):200-210.
- [18] 陈蕊, 高怀友, 傅学起, 等. 畜禽养殖废水处理技术的研究与应用[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(增刊1):374-377. CHEN R, GAO H Y, FU X Q, et al. Study and application of treatment technology on wastewater from livestock farm[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(Suppl 1):374-377.
- [19] 史宏伟, 邹德勋, 左剑恶, 等. 原料差异对厌氧消化微生物群落的影响[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(8):1675-1682. SHI H W, ZOU D X, ZUO J E, et al. The effect of feedstocks on microbial communities in anaerobic digesters[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(8):1675-1682.
- [20] ZHANG Q P, XU J F, WANG X J, et al. Changes and distributions of antibiotic resistance genes in liquid and solid fractions in mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of dairy manure[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 320:124372.
- [21] ZHANG K Y, GU J, WANG X J, et al. Analysis for microbial denitrification and antibiotic resistance during anaerobic digestion of cattle manure containing antibiotic[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 291:121803.
- [22] 钱燕云, 郑吉, 徐莉柯, 等. 温度对厌氧环境下污泥中抗生素抗性基因行为特征的影响[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(5):56-65. QIAN Y Y, ZHENG J, XU L K, et al. Effect of temperature on antibiotic resistance genes behavior during anaerobic treatment of sludge[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2015, 10(5):56-65.
- [23] ZHANG J Y, BUHE C L, YU D W, et al. Ammonia stress reduces antibiotic efflux but enriches horizontal gene transfer of antibiotic resistance genes in anaerobic digestion[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 295:122191.
- [24] 刘伟, 王欣, 徐晓秋, 等. 搅拌时间对高固含量奶牛粪高温厌氧消化的影响研究[J]. 应用能源技术, 2012(11):1-4. LIU W, WANG X, XU X Q, et al. Effect of different mixing times on high temperature anaerobic digestion of high solid content dairy manure[J]. *Applied Energy Technology*, 2012(11):1-4.
- [25] 许继飞, 张秋萍, 朱天骄, 等. 温度和搅拌对牛粪厌氧消化系统抗

- 生素抗性基因变化和微生物群落的影响[J]. 环境科学, 2021, 42(6):2992-2999. XU J F, ZHANG Q P, ZHU T J, et al. Effects of temperature and stirring on the changes of antibiotic resistance genes and microbial communities in anaerobic digestion of dairy manure[J]. *Environmental Science*, 2021, 42(6):2992-2999.
- [26] 杜连柱, 梁军锋, 杨鹏, 等. 猪粪固体含量对厌氧消化产气性能影响及动力学分析[J]. 农业工程学报, 2014, 30(24):246-251. DU L Z, LIANG J F, YANG P, et al. Influence of total solid content on anaerobic digestion of swine manure and kinetic analysis[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2014, 30(24):246-251.
- [27] CHEN Y, CHENG J J, CREAMER K S. Inhibition of anaerobic digestion process: A review[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99:4044-4064.
- [28] 孟晓山, 张玉秀, 隋倩雯, 等. 氨氮浓度对猪粪厌氧消化及产甲烷菌群结构的影响[J]. 环境工程学报, 2018, 12(8):2346-2356. MENG X S, ZHANG Y X, SUI Q W, et al. Effects of ammonia concentration on anaerobic digestion of swine manure and community structure of methanogens[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2018, 12(8):2346-2356.
- [29] 彭秋, 王卫中, 徐卫红. 重庆市畜禽粪便及菜田土壤中四环素类抗生素生态风险评价[J]. 环境科学, 2020, 41(10):4757-4766. PENG Q, WANG W Z, XU W H. Ecological risk assessment of tetracycline antibiotics in livestock manure and vegetable soil of Chongqing[J]. *Environmental Science*, 2020, 41(10):4757-4766.
- [30] BILLINGTON S J, SONGER J G, JOST B H. Widespread distribution of a *tetW* determinant among tetracycline-resistant isolates of the animal pathogen *Arcanobacterium pyogenes*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, 46(5):1281-1287.
- [31] SUI Q W, MENG X S, WANG R, et al. Effects of endogenous inhibitors on the evolution of antibiotic resistance genes during high solid anaerobic digestion of swine manure[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 270:328-336.
- [32] SUN W, GU J, WANG X J, et al. Solid-state anaerobic digestion facilitates the removal of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements from cattle manure[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 274:287-295.
- [33] CHEN B W, LIANG X M, NIE X P, et al. The role of class I integrons in the dissemination of sulfonamide resistance genes in the Pearl River and Pearl River Estuary, south China[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2014, 282:61-67.
- [34] WANG R, CHEN M X, FENG F, et al. Effects of chlortetracycline and copper on tetracyclines and copper resistance genes and microbial community during swine manure anaerobic digestion[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 238:57-69.
- [35] HYUN M J, HYUN K J, JEONG H H, et al. Bacterial and methanogenic archaeal communities during the single-stage anaerobic digestion of high strength food wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 165(8):174-182.
- [36] WANG P, CHEN X T, LIANG X F, et al. Effects of nanoscale zero-valent iron on the performance and the fate of antibiotic resistance genes during thermophilic and mesophilic anaerobic digestion of food waste[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 293:112092.
- [37] LIU J Y, GU J, WANG X J, et al. Evaluating the effects of coal gasification slag on the fate of antibiotic resistant genes and mobile genetic elements during anaerobic digestion of swine manure[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 271:24-29.