

我国不同利用方式土壤四环素类抗性基因积累的研究

龚小雅, 宋建宇, 吴凤芝

引用本文:

龚小雅, 宋建宇, 吴凤芝. 我国不同利用方式土壤四环素类抗性基因积累的研究[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(1): 87-100.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2022-0234>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

长期施肥对设施菜田土壤氮、磷时空变化及流失风险的影响

石宁, 李彦, 井永苹, 薄录吉, 张英鹏, 孙明, 仲子文

农业环境科学学报. 2018, 37(11): 2434-2442 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-1065>

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>

洪泽湖沉积物中四环素土霉素及相关抗性基因的分布特征及潜在风险分析

罗方园, 潘根兴, 李恋卿, 张俊, 王娜, 焦少俊, 张旭辉

农业环境科学学报. 2017, 36(2): 369-375 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-1237>

种植年限对京郊设施菜地温室气体排放的影响

王学霞, 张磊, 张卫东, 倪小会, 王甲辰, 曹兵, 刘东生

农业环境科学学报. 2021, 40(7): 1601-1610 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1276>

米林县不同种植年限蔬菜大棚土壤pH和无机氮变化特征研究

杨红, 徐唱唱, 曹丽花, 石玉龙, 赛曼, 刘合满

农业环境科学学报. 2016, 35(12): 2397-2404 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-0782>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

龚小雅, 宋建宇, 吴凤芝. 我国不同利用方式土壤四环素类抗性基因积累的研究[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(1): 87–100.

GONG X Y, SONG J Y, WU F Z. Study on the accumulation of tetracycline resistance genes in soil with different utilization patterns in China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2023, 42(1): 87–100.



开放科学 OSID

我国不同利用方式土壤四环素类抗性基因积累的研究

龚小雅, 宋建宇, 吴凤芝*

(东北农业大学园艺园林学院, 哈尔滨 150030)

摘要:为研究我国不同地区的不同利用方式和不同种植年限土壤中抗生素抗性基因绝对丰度的变化,揭示抗性基因在农田土壤中的积累情况,以黑龙江(HLJ)、吉林(JL)、辽宁(LN)、内蒙古(NMG)、新疆(XJ)、甘肃(GS)、云南(YN)、江苏(JS)、湖北(HB)、广东(GD)、海南(HN)、山西(SX)、河南(HEN)、山东(SD)14个省份的土壤为试材,依据土壤利用方式(露地粮田、露地菜田和设施菜田土壤)和种植年限(1~3、7~10 a和15 a以上)设置9个处理,共378个样品。采用普通PCR和荧光定量技术对四环素类抗性基因进行定性和定量分析。四环素类抗生素的4种抗性基因(*tetM*, *tetO*, *tetQ*, *tetW*)在设施菜田土壤中的绝对丰度显著高于露地粮田和露地菜田,设施菜田绝对丰度范围为 $3.96 \times 10^4 \sim 6.36 \times 10^8$ copies $\cdot g^{-1}$,露地粮田为 $2.16 \times 10^3 \sim 2.18 \times 10^6$ copies $\cdot g^{-1}$,露地菜田为 $1.16 \times 10^4 \sim 2.48 \times 10^7$ copies $\cdot g^{-1}$ 。4种抗性基因的最高丰度出现在不同种植年限、不同土壤利用方式中的不同省份,但设施菜田3、7 a和15 a的各省份土壤均显著高于相同年限的露地粮田和露地菜田,设施菜田7 a和15 a显著高于3 a。露地粮田、露地菜田的4种抗性基因积累与利用年限无显著线性关系,而设施菜田的抗性基因积累与利用年限存在显著正相关关系。研究表明,四环素类抗性基因已在我国不同地区的粮田、露地菜田和设施菜田土壤中普遍存在,其丰度在设施菜田土壤中显著高于露地菜田和露地粮田土壤,且在设施菜田中与利用年限显著正相关。

关键词:四环素类抗性基因;设施菜田;露地菜田;露地粮田

中图分类号:X53 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2023)01-0087-14 doi:10.11654/jaes.2022-0234

Study on the accumulation of tetracycline resistance genes in soil with different utilization patterns in China

GONG Xiaoya, SONG Jianyu, WU Fengzhi*

(College of Horticulture and Landscape, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Variations in the absolute abundance of antibiotic resistance genes in different regions of China under different land-use modes and planting years were explored. The purpose of this study is to reveal the accumulation of resistant genes in cropland. Soil from 14 provinces, including Heilongjiang (HLJ), Jilin (JL), Liaoning (LN), Inner Mongolia (NMG), Xinjiang (XJ), Gansu (GS), Yunnan (YN), Jiangsu (JS), Hubei (HB), Guangdong (GD), Hainan (HN), Shanxi (SX), Henan (HEN), and Shandong (SD) were used in this study. There were nine treatments in total based on different land-use modes (open grain fields, open vegetable fields, and facility vegetable fields) and planting years (1–3, 7–10 years, and more than 15 years). Tetracycline resistance genes were qualitatively and quantitatively analyzed by polymerase chain reaction (PCR) and quantitative PCR. The absolute abundance of tetracycline resistance genes (*tetM*, *tetO*, *tetQ*, and *tetW*) in facility soil was significantly higher than that in open grain and vegetable field soil. The absolute abundance in facility vegetable soil was $3.96 \times 10^4 \sim 6.36 \times 10^8$ copies $\cdot g^{-1}$; in open grain fields, it was $2.16 \times 10^3 \sim 2.18 \times 10^6$ copies $\cdot g^{-1}$. In open vegetable fields, it was $1.16 \times 10^4 \sim 2.48 \times 10^7$ copies $\cdot g^{-1}$. The highest absolute abundance of resistance genes appeared in different provinces under different land-use

收稿日期: 2022-03-11 录用日期: 2022-06-21

作者简介: 龚小雅, 女, 重庆奉节人, 博士研究生, 主要研究方向为设施蔬菜与生理生态。E-mail: GXY152104@163.com

*通信作者: 吴凤芝 E-mail: fzwu2006@aliyun.com

基金项目: 财政部、农业农村部国家大宗蔬菜产业技术体系项目(CARS-23-B09)

Project supported: China Agricultural Research System(CARS-23-B09)

modes and planting years, respectively. However, the greenhouse soil of year 3, 7, and 15 in provinces was significantly higher than that of open grain and vegetable fields for the same years. The facility vegetable soil in years 7 and 15 was significantly higher than in year 3. There was no significant linear relationship between gene accumulation and planting life in open grain and vegetable fields, despite a significantly positive correlation in facility vegetable soil. Tetracycline resistance genes have been ubiquitous in Chinese soil under different land-use modes and planting years. Its abundance was significantly higher in facility vegetable field soil than in open vegetable and open grain field soil. The abundance of facility vegetable fields was significantly positively related to soil planting life.

Keywords: tetracyclines resistance gene; facility vegetable field; open vegetable field; open grain field

农田土壤中抗生素抗性基因(Antibiotic resistance genes, ARGs)外源输入的主要方式是污水与再生水的灌溉^[1]以及畜禽粪便作为有机肥的施用^[2]。目前污水处理系统可去除氨氮和总磷等物质,但无法有效去除高浓度的ARGs,从而使得农田灌溉再生水中ARGs浓度较高^[3]。此外,应用于畜牧养殖业的抗生素有90%不能被动物肠道吸收,其会以原形或者代谢物的形式随动物粪便排出体外^[4],因此,畜禽粪便中积蓄着大量ARGs,随着有机肥替代化肥农业技术的推行^[5],畜禽粪便以有机堆肥的形式广泛施用于农田。ARGs从再生水和有机堆肥这两种“源”通过灌溉和施用的方式输入到农田土壤的“库”^[6-7],导致大量ARGs在农田土壤积累^[8],这些ARGs通过受污染作物和地下水系统重新进入食物链,对人体健康造成危害^[9-10]。因此,探讨土壤中抗生素抗性基因绝对丰度的变化,以此揭示抗性基因在土壤中的积累情况具有重要意义。

影响ARGs积累的因素包括气候、土壤空间属性、有机肥来源和用量^[11]。长三角红壤农田土壤中总ARGs相对丰度范围为 $2.26 \times 10^{-4} \sim 1.16 \times 10^{-1}$ ^[12],东北黑土地地区农田土壤中总ARGs绝对丰度范围是 $2.59 \times 10^7 \sim 1.14 \times 10^8$ copies $\cdot$ g⁻¹^[13]。还有研究发现,施用畜禽粪便的农业土壤中ARGs的水平显著提高^[14-15],其中,设施菜田土壤ARGs的种类和丰度高于农田土壤^[16],施加有机肥的农田土壤ARGs数量和丰度显著高于施加化肥的农田土壤,并在施肥10 a后ARGs数量显著增加^[11]。研究表明,在水稻田施用畜禽粪便几十年后,土壤中ARGs的丰度较未施用畜禽粪便的稻田显著增加^[17],因此,土壤ARGs的积累量随着年份的增加出现累加效应。

在农田土壤中,几乎所有类别的ARGs均显著增加,尤其是四环素类(Tetracyclines)抗生素抗性基因增加最多^[18]。四环素类抗生素抗性基因是一种新型的环境污染物^[19-20],在银川、重庆和沈阳的设施菜地和露地中均有检出,且设施菜地的四环素类抗生素抗

性基因含量显著高于露地^[21-22]。四环素类抗性基因已经广泛存在于农田土壤中^[23],但对于四环素类抗生素抗性基因的探究多集中于狭窄范围的农田土壤中的积累和迁移,其结果依赖于特定的实验地点和条件,其结果虽有同一性,但因土壤利用方式和利用年限的差异,各地土壤无法进行比较,对全国各地四环素类抗生素抗性基因积累情况的判定也仍有较大偏差,对广泛地理范围下不同农业土地利用方式和不同年限土壤抗生素积累的研究远远不够。因此,本研究利用普通PCR和qPCR荧光定量技术,对不同地区、不同利用年限下的设施、露地菜田和粮田土壤中抗性基因绝对丰度进行研究,明确不同利用方式以及不同年限的土壤中抗性基因积累特征,为农业安全生产提供参考。

1 材料与方法

试验土壤样品中抗生素抗性基因的检测在东北农业大学园艺园林学院农业农村部东北地区园艺作物生物学与种质创新重点实验室完成。

1.1 试验材料

试验土壤于2017年7—8月取自我国黑龙江(HLJ)、吉林(JL)、辽宁(LN)、内蒙古(NMG)、新疆(XJ)、甘肃(GS)、云南(YN)、江苏(JS)、湖北(HB)、广东(GD)、海南(HN)、山西(SX)、河南(HEN)、山东(SD)共计14个省份具有代表性的不同种植年限(1~3、7~10 a和15 a以上)和不同土地利用方式(设施菜田、露地菜田和露地粮田)的土壤,取土深度为去除表面土壤后的5~20 cm。每个省份选取设施菜田(S)、露地菜田(L)和露地粮田(D)3种不同土地利用方式和3个种植年限的9种土壤作为研究对象,即9个处理。根据具体取样地点的气候环境以及我国土地资源的划分情况将14个取样地区又划分为5个地区^[24-25],即黑龙江、吉林、辽宁和内蒙古划分为北部地区,甘肃和新疆划分为西部地区,江苏和湖北划分为长江地区,山西、河南和山东划分为中部地区,海南和云南划分为南

部地区。

1.2 样品采集与处理

选取14个地区不同种植年限的典型温室蔬菜田(1~3、7~10 a、>15 a)、邻近温室的露地菜田以及粮田,在每种利用方式处采用5点取样法采集深度为5~20 cm的耕层土壤,土样过2 mm筛,去除样品中的残根、植株残体和石块等杂质,每5点混合为一个土样,作为一次重复,重复3次,共计378个(14个地区×3种土壤利用方式×3种使用年限×3次重复)土壤样品。将土样放入无菌自封袋中,带回实验室于-80℃冰箱中保存,用于提取土壤DNA。

1.3 试验方法

1.3.1 土壤总DNA的提取

取0.25 g土壤样品,用Power Soil® DNA Isolation Kit(MO BIO Laboratories, CA, 美国)按说明提取DNA。每个土壤样品平行提取3次,提取的溶液混合后待用。用1%琼脂糖凝胶电泳检测提取土壤中的DNA。使用NanoDropND-1000 UV-Vis分光光度计(Thermo Scientific, Rockwood, TN, 美国)检测提取物的DNA浓度和质量(A260/A280)。

1.3.2 普通PCR定性和qPCR定量分析

本研究选择了4种四环素类抗性基因(*tetM*、*tetO*、*tetQ*、*tetW*)进行定性PCR检测。在IQ5实时PCR系统(Bio-Rad Lab, LA, 美国)中测定4种四环素类抗性基因的丰度。所用引物设计主要来源于已发表的文献^[26-29],引物序列及目标基因片段大小如表1所示。引物由迈浦生物科技公司(Map Bio, 上海)设计。

普通PCR定性检测的反应体系为25 μL,包括12.5 μL Taq PCR Master Mix, 10.5 μL无菌去离子水, 0.5 μL上游引物(10 μmol·L⁻¹), 0.5 μL下游引物(10 μmol·L⁻¹)和1 μL模板DNA。普通PCR反应程序: 95℃预变性3 min; 94℃变性30 s, 55℃退火延伸30 s, 72℃延伸30 s, 35个循环; 72℃延伸10 min。

qPCR定量检测的反应体系为10 μL,主要包括5 μL 2×SYBR Green qPCR Master Mix, 3.0 μL无菌去

离子水, 0.5 μL上游引物(10 μmol·L⁻¹), 0.5 μL下游引物(10 μmol·L⁻¹)和1 μL模板DNA。qPCR反应程序: 95℃预变性3 min; 94℃变性20 s, *T*℃退火30 s(表2), 72℃延伸30 s, 40个循环; 72℃延伸7 min。溶解曲线在65℃至95℃之间,每5 s增加0.5℃,期间停留30 s。

表2 qPCR 的退火温度	
Table 2 qPCR annealing temperature	
抗性基因 Antibiotic resistance gene	退火温度 Annealing temperature/℃
<i>tetW</i>	57.5
<i>tetO</i>	57.0
<i>tetM</i>	59.0
<i>tetQ</i>	59.5

1.4 数据分析

采用Excel 2010进行数据处理,采用SPSS(Version 19.0)对试验的原始数据进行差异显著性分析,使用Graphpad Prism 7绘图。不同省份同一利用方式和同一年限土壤中四环素类抗性基因绝对丰度的差异分析,以14个省份作为方差的分析因素,通过单因素方差实现。箱线图分析采用R软件ggplot2包,线性回归分析采用R软件ggplot2和ggsci包^[30]。

2 结果与分析

2.1 不同土壤中抗性基因的定性检测

在14个省份的1~3(以3 a表示)、7~10 a(以7 a表示)和15 a以上(以15 a表示)的设施菜田土壤、露地菜田土壤和露地粮田土壤中四环素类抗性基因的检出率均为100%(表3)。

2.2 同一利用方式下不同年限土壤四环素类抗性基因差异分析

2.2.1 *tetM*绝对丰度差异分析

粮田土壤中的绝对丰度范围为1.60×10⁴~1.95×10⁶ copies·g⁻¹, 3、7 a和15 a露地粮田土壤中*tetM*绝对丰度均在黑龙江地区最高,在河南地区最低(图1a)。

表1 四环素类抗性基因引物序列			
Table 1 Primers of <i>tet</i> resistance genes			
抗性基因 Antibiotic resistance gene	正向引物(5'~3') Forward primer	反向引物(5'~3') Reverse primer	目的片段大小 Destination segment size/bp
<i>tetW</i> ^[26]	ATGAACATTCACCGTTATCTTT	ATATCGGCGGAGAGCTTATCC	101
<i>tetO</i> ^[27]	ATGTGGATACTACAACGCATGAGATT	TGCCTCCACATGATATTTTTCCT	101
<i>tetM</i> ^[28]	TCACTGGGAAAATACGAAGGTG	GAGTTTGTGCTTGTACGCCATC	140
<i>tetQ</i> ^[29]	AGAATCTGCTGTTTGCCAGTG	CGGAGTGTCATGATATTGCA	169

表3 不同地区土壤中四环素类抗性基因的检出情况

Table 3 Detection of *tet* in soil from different areas

省份Province	<i>tetM</i>	<i>tetO</i>	<i>tetQ</i>	<i>tetW</i>
黑龙江	+	+	+	+
吉林	+	+	+	+
辽宁	+	+	+	+
内蒙古	+	+	+	+
新疆	+	+	+	+
甘肃	+	+	+	+
云南	+	+	+	+
江苏	+	+	+	+
湖北	+	+	+	+
广东	+	+	+	+
海南	+	+	+	+
山西	+	+	+	+
河南	+	+	+	+
山东	+	+	+	+
检出数	52	52	52	52
检出率/%	100	100	100	100

注：“+”代表被检出。

Note: “+” delegates detected.

露地菜田土壤中的丰度范围是 $9.98 \times 10^4 \sim 5.97 \times 10^6$ copies·g⁻¹, 3、7 a 和 15 a 露地菜田土壤中丰度均在黑龙江地区最高, 均在湖北地区最低(图 1b)。设施菜田土壤中的丰度范围是 $3.45 \times 10^5 \sim 1.04 \times 10^7$ copies·g⁻¹, 3、7 a 和 15 a 设施菜田土壤中丰度均在黑龙江地区最高, 3 a 设施菜田土壤中为海南地区最低, 7 a 为河南地区最低, 15 a 为湖北地区最低(图 1c)。*tetM* 的绝对丰度在黑龙江地区的 15 a 设施菜田土壤中最高, 在河南地区的 15 a 粮田土壤中最低。

2.2.2 *tetO* 绝对丰度差异分析

粮田土壤中绝对丰度范围是 $1.11 \times 10^5 \sim 2.18 \times 10^6$ copies·g⁻¹, 在 3、7 a 和 15 a 粮田土壤中 *tetO* 的绝对丰度均在江苏地区最高, 均在辽宁地区最低(图 2a)。露地菜田土壤中丰度范围为 $3.79 \times 10^5 \sim 2.48 \times 10^7$ copies·g⁻¹, 3、7 a 和 15 a 露地菜田土壤中丰度均在黑龙江地区最高, 均在甘肃地区最低(图 2b)。设施菜田土壤中丰度范围为 $1.76 \times 10^6 \sim 6.36 \times 10^7$ copies·g⁻¹, 3、7 a 和 15 a 设施菜田土壤中丰度均在黑龙江地区最高, 均在甘肃地区最低(图 2c)。*tetO* 的绝对丰度在黑龙江地区的 15 a 设施菜田土壤中最高, 在辽宁地区的 7 a 粮田土壤中最低。

2.2.3 *tetQ* 绝对丰度差异分析

在粮田土壤中 *tetQ* 的绝对丰度范围为 $5.25 \times 10^3 \sim 2.40 \times 10^5$ copies·g⁻¹, 3、7 a 和 15 a 粮田土壤中绝对丰度

最高地区均为黑龙江地区, 最低均为湖北地区(图 3a)。露地菜田土壤中丰度范围为 $1.16 \times 10^4 \sim 6.64 \times 10^5$ copies·g⁻¹, 3 a 露地菜田土壤中丰度最高地区为黑龙江地区, 7 a 为广东地区, 15 a 为甘肃地区, 3、7 a 和 15 a 露地菜田土壤中丰度最低地区均为湖北地区(图 3b)。设施菜田土壤中丰度范围为 $3.96 \times 10^4 \sim 3.71 \times 10^6$ copies·g⁻¹, 黑龙江地区的 3 a 和 7 a 设施菜田土壤 *tetQ* 的丰度均最高, 15 a 为甘肃地区, 3、7 a 和 15 a 设施菜田土壤中湖北地区的丰度显著低于其他地区(图 3c)。*tetQ* 的绝对丰度在甘肃地区的 15 a 设施菜田土壤中最高, 在湖北地区的 15 a 粮田土壤中最低。

2.2.4 *tetW* 绝对丰度差异分析

在粮田土壤中 *tetW* 的绝对丰度范围为 $2.16 \times 10^3 \sim 1.64 \times 10^5$ copies·g⁻¹, 3 a 粮田土壤中绝对丰度最高地区为云南地区, 7 a 和 15 a 为海南地区, 3、7 a 和 15 a 粮田土壤中绝对丰度最低地区均为新疆地区(图 4a)。露地菜田土壤丰度范围为 $1.32 \times 10^4 \sim 8.00 \times 10^5$ copies·g⁻¹, 3 a 和 7 a 露地菜田土壤中丰度最高地区为广东地区, 15 a 为黑龙江地区, 3、7 a 和 15 a 露地菜田土壤中丰度最低地区均为新疆地区(图 4b)。设施菜田土壤中丰度范围为 $6.07 \times 10^4 \sim 2.74 \times 10^6$ copies·g⁻¹, 3 a 和 7 a 设施菜田土壤丰度最高均为黑龙江地区, 15 a 为吉林地区, 3 a 设施菜田土壤丰度最低地区为江苏地区, 7 a 和 15 a 为新疆地区(图 4c)。*tetW* 的绝对丰度在吉林地区的 15 a 设施菜田土壤中最高, 在新疆地区的 3 a 粮田土壤中最低。

综上, 四环素类抗性基因的绝对丰度范围是 $2.16 \times 10^3 \sim 6.36 \times 10^7$ copies·g⁻¹, *tetM* 和 *tetQ* 中都有 9 个地区是 15 a 以上设施菜田的丰度最高。*tetO* 和 *tetW* 中都有 10 个地区是 15 a 以上设施菜田的丰度最高, 丰度最低的均在粮田土壤中, 四环素类抗生素抗性基因丰度在 15 a 以上设施菜田最高的比例为 67.9%(图 1~图 4)。

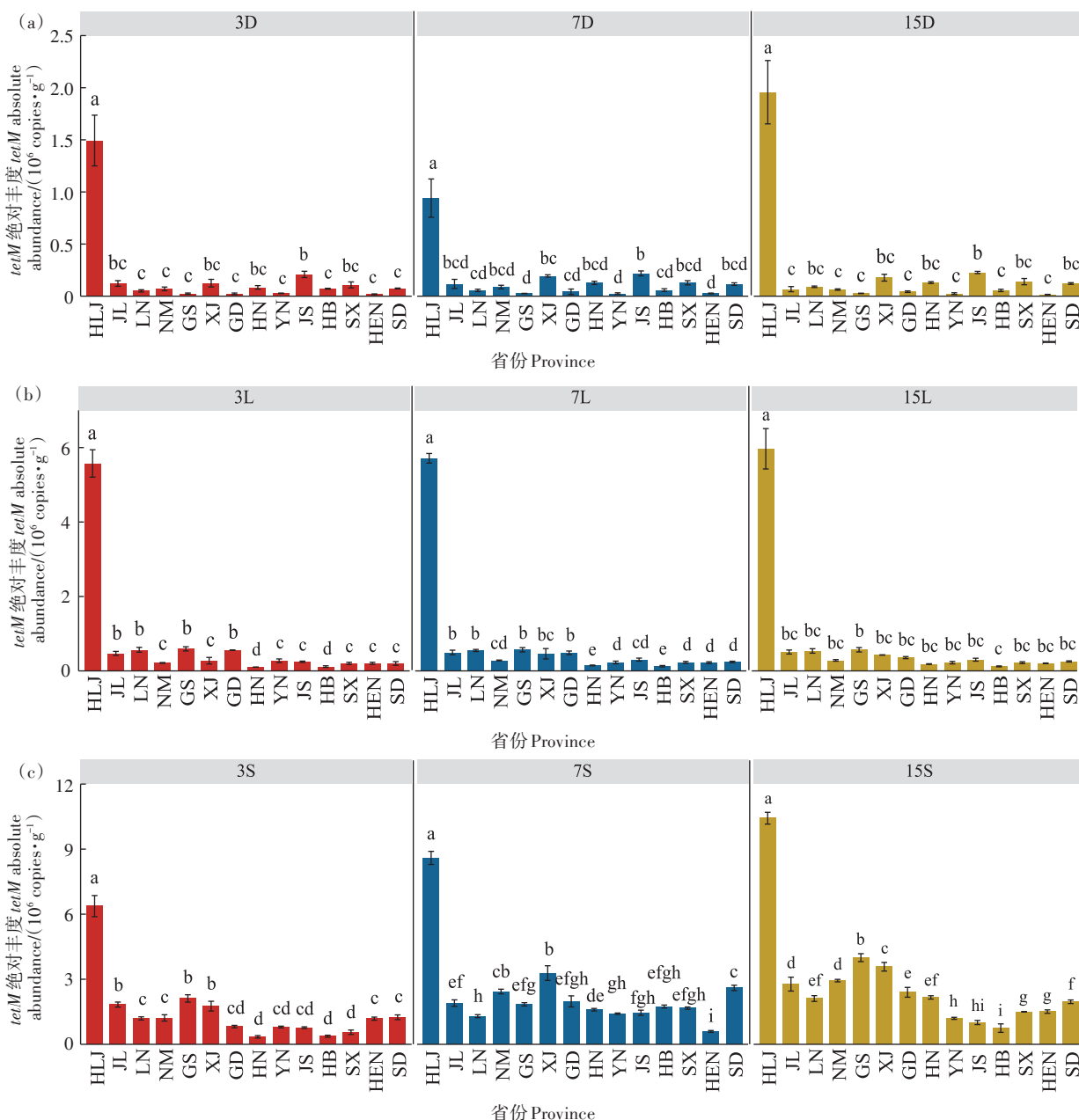
2.3 同一地区与同一利用年限下不同利用方式四环素类抗生素抗性基因差异分析

2.3.1 *tetM* 差异分析

北部地区设施菜田土壤的 *tetM* 绝对丰度显著高于露地粮田和露地菜田土壤, 且露地菜田显著高于露地粮田土壤(图 5a)。长江、南部、西部和中部地区设施菜田土壤的 *tetM* 绝对丰度显著高于露地粮田和露地菜田土壤, 而露地菜田和露地粮田土壤间无显著差异(图 5b~图 5e)。

2.3.2 *tetO* 差异分析

北部、南部和中部地区设施菜田土壤的 *tetO* 绝对丰度显著高于露地粮田和露地菜田土壤, 且露地菜田



3、7、15 分别表示种植年限为 1~3、7~10、15 a 以上;S 代表设施菜田土壤,L 代表设施菜田临近的露地菜田土壤,D 代表设施菜田临近的露地粮田土壤。不同小写字母表示在 0.05 水平上有显著差异。下同

3, 7, 15 represent planting years (1~3 years, 7~10 years and more than 15 years), S stands for facilities vegetable field, L stands for open grain field, D stands for open vegetable field, respectively. Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$). The same below

图1 不同地区同一利用方式土壤中 *tetM* 绝对丰度的差异

Figure 1 Difference of absolute abundance of *tetM* in soils with the same utilization pattern in different area

显著高于露地粮田土壤(图 6a、图 6c 和图 6e)。长江和西部地区设施菜田土壤的 *tetO* 绝对丰度显著高于露地粮田和露地菜田土壤,而露地菜田和露地粮田土壤间无显著差异(图 6b 和图 6d)。

2.3.3 *tetQ* 差异分析

北部和南部地区设施菜田土壤的 *tetQ* 绝对丰度显著高于露地粮田和露地菜田土壤,且露地菜田显著

高于露地粮田土壤(图 7a 和图 7c)。长江、西部和中部地区设施菜田土壤的 *tetQ* 绝对丰度显著高于露地粮田和露地菜田土壤,而露地菜田和露地粮田土壤间无显著差异(图 7b、图 7d 和图 7e)。

2.3.4 *tetW* 差异分析

北部、南部和中部地区设施菜田土壤的 *tetW* 绝对丰度显著高于露地粮田和露地菜田土壤,且露地菜田

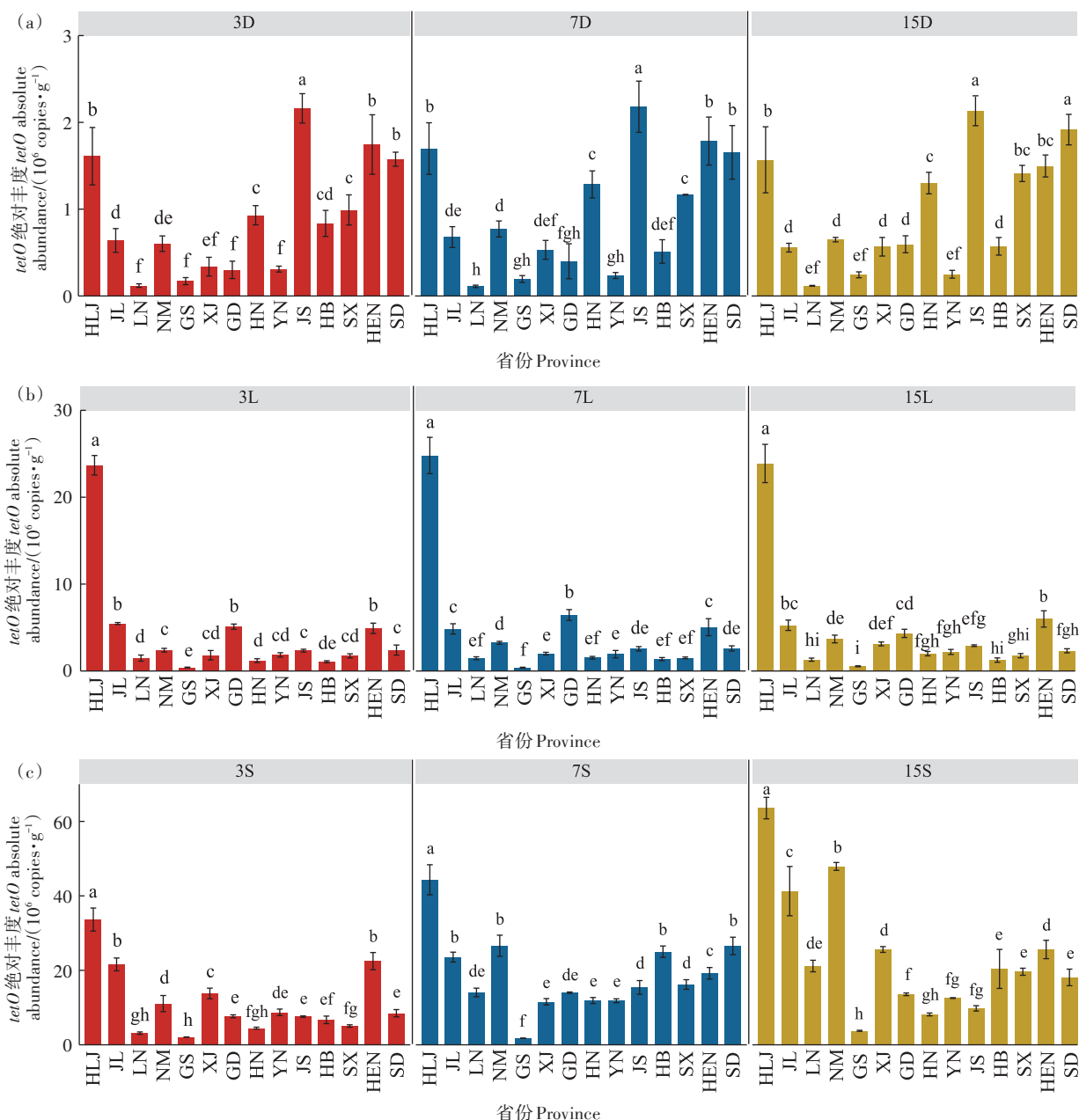


图2 不同地区同一利用方式土壤中 *tetO* 绝对丰度的差异

Figure 2 Difference of absolute abundance of *tetO* in soils with the same utilization pattern in different area

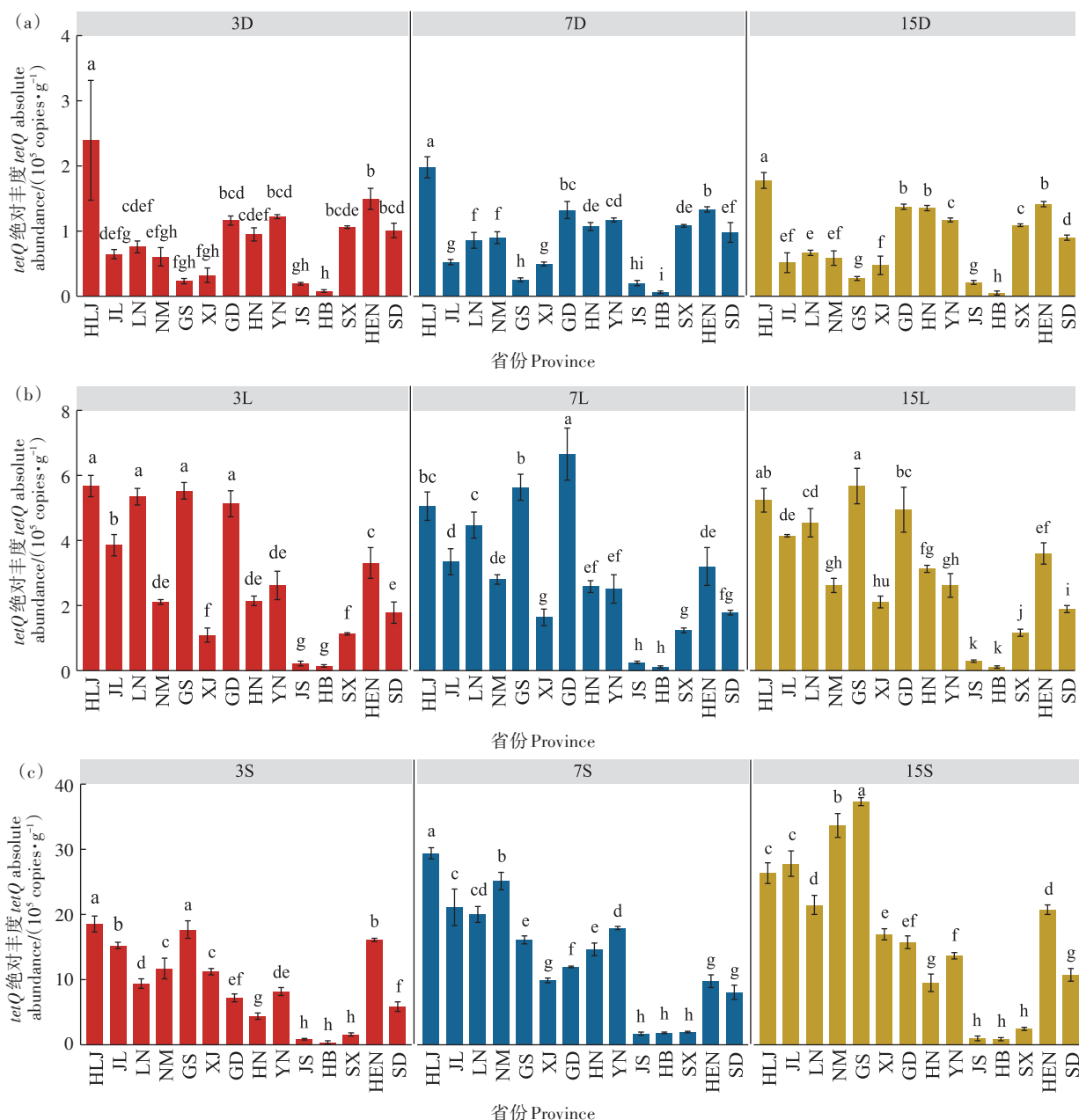
显著高于露地粮田土壤(图8a、图8c和图8e)。长江和西部地区设施菜田土壤的 *tetW* 绝对丰度显著高于露地粮田和露地菜田土壤,而露地菜田和露地粮田土壤间无显著差异(图8b和图8d)。

2.4 不同利用方式下土壤四环素类抗性基因与利用年限的线性分析

设施菜田土壤的 *tetO*、*tetQ*、*tetW* 基因与土壤利用年限呈显著线性正相关关系(图9),而露地粮田和露地菜田土壤的4个四环素类抗性基因与土壤利用年限无显著线性相关。

3 讨论

施用有机肥能够增加土壤中抗生素抗性基因的丰度,并带入土壤中本没有的抗生素抗性基因^[18,31-32]。本研究选取了在土壤环境中经常被检出的4种四环素类抗生素抗性基因(*tetM*、*tetO*、*tetQ*和*tetW*)作为本试验的目标基因,对其存在情况进行PCR检测,来自14个省份的土壤中均检出了上述基因,这一结果与前人研究基本一致^[33]。这可能是由于携带不同抗生素抗性基因的移动遗传元件广泛存在,且参与抗生

图3 不同地区同一利用方式土壤中 *tetQ* 绝对丰度的差异Figure 3 Difference of absolute abundance of *tetQ* in soils with the same utilization pattern in different area

素抗性基因的扩散^[34], *tet* 基因的宿主范围广, 更容易在土壤中传播^[35]。这也意味着四环素类抗性基因已经广泛分布于不同类型的农用土壤中, 具备潜在土壤和环境污染风险。抗生素的肆意滥用使抗性基因通过多种途径传播进入到环境中, 并通过食物链循环等因素进入人体, 从而产生危害^[36-37]。

由于我国不同省份的蔬菜播种面积明显不同^[33,38], 施肥量的差异^[39]和土壤特性的区域差异^[40]都会导致不同地区抗生素抗性基因有很大差异^[36]。在本试验中, 14个地区3种不同利用方式下土壤中四环

素类抗生素抗性基因存在显著差异, 但是均表现为设施菜田土壤中各抗性基因的绝对丰度显著高于相同年限下粮田和露地菜田土壤。粮田和露地菜田土壤中大量施用化肥, 而设施菜田多施用有机肥^[41], 这可能导致其土壤中抗生素的污染程度加剧, 大量的抗生素抗性基因积累^[6-7]。北部、西部、长江、中部和南部地区设施菜田土壤的 *tetM*、*tetO*、*tetQ*、*tetW* 均高于露地菜田和露地粮田土壤。一方面, 设施菜田与露地菜田和粮田相比, 具有很好的种植优势, 设施菜田每年可以种植多茬作物, 因此施用有机肥的次数增多, 从而

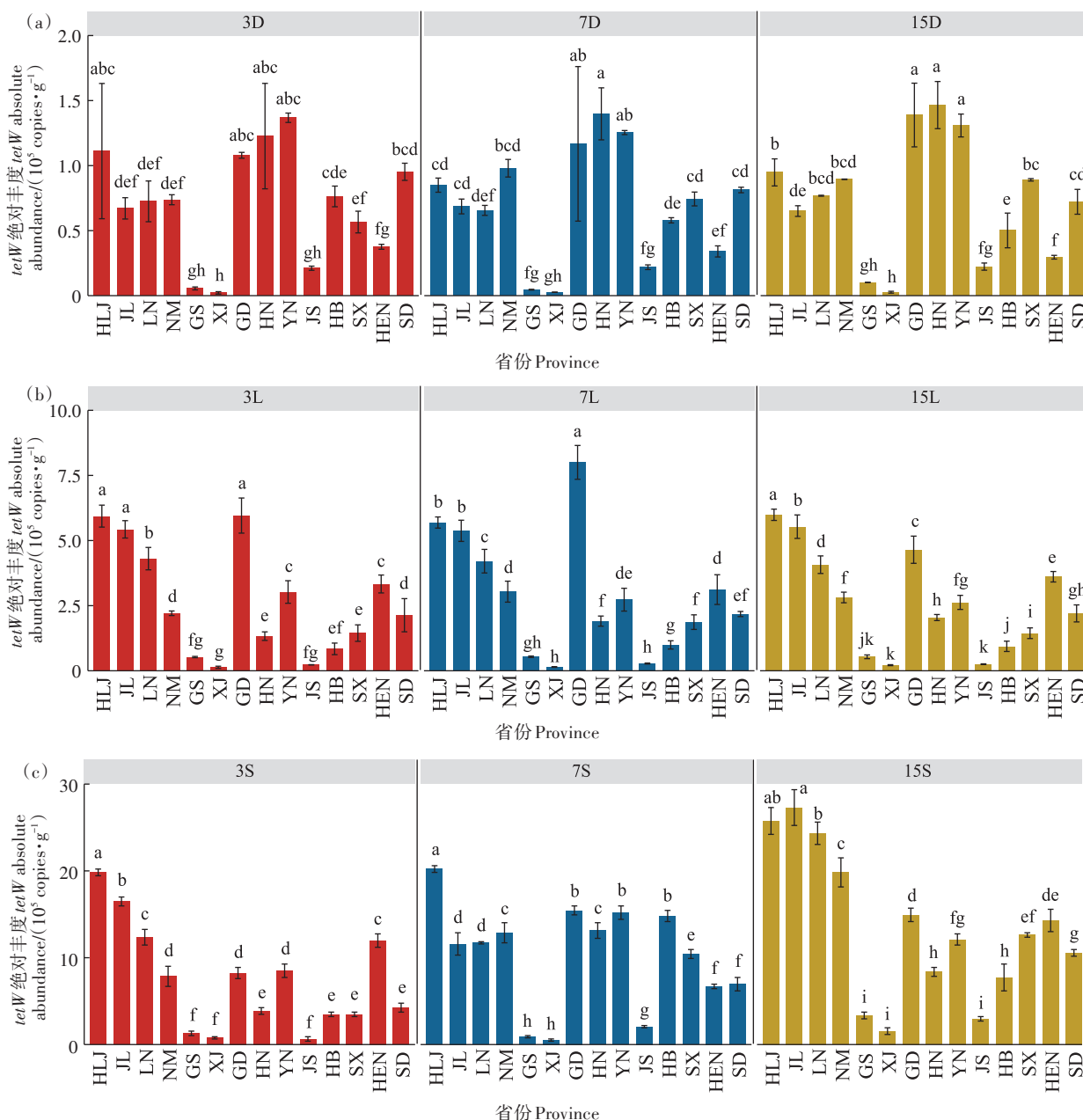


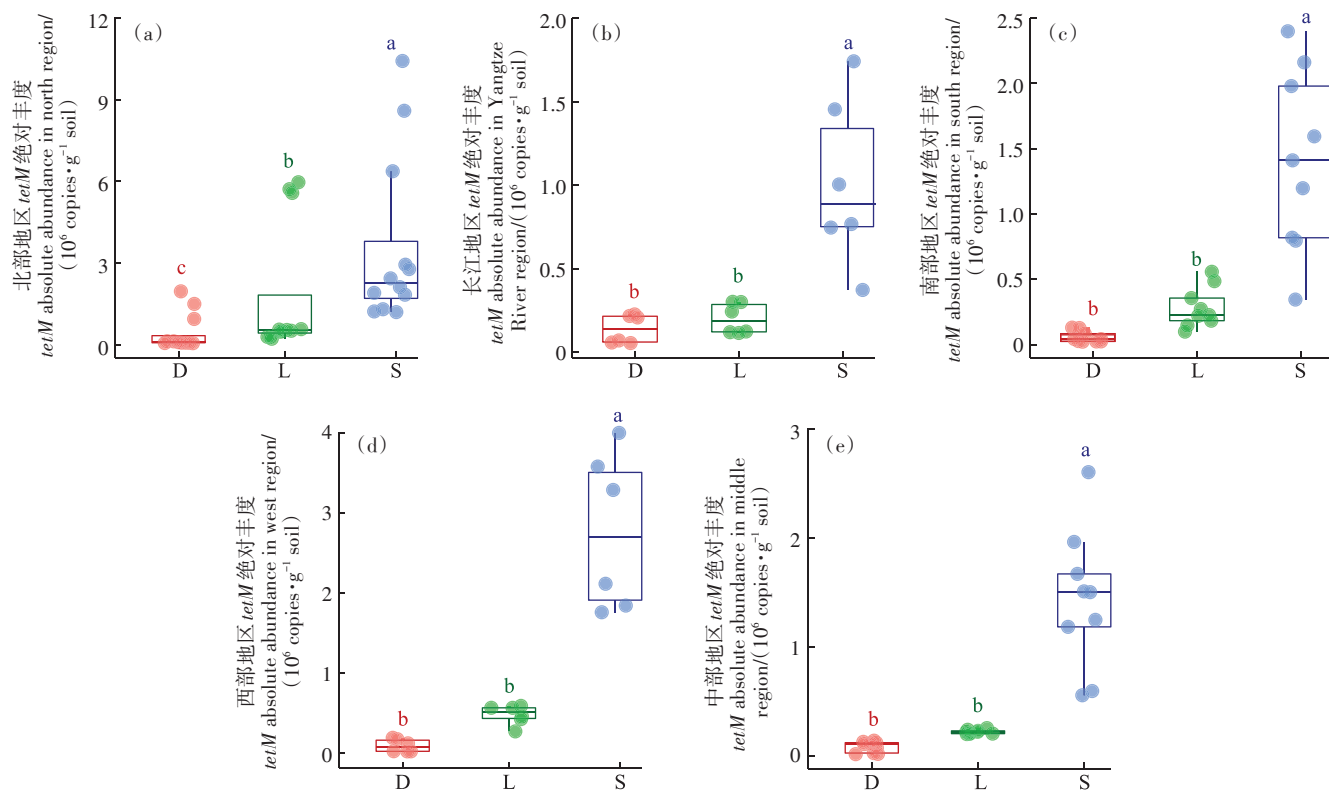
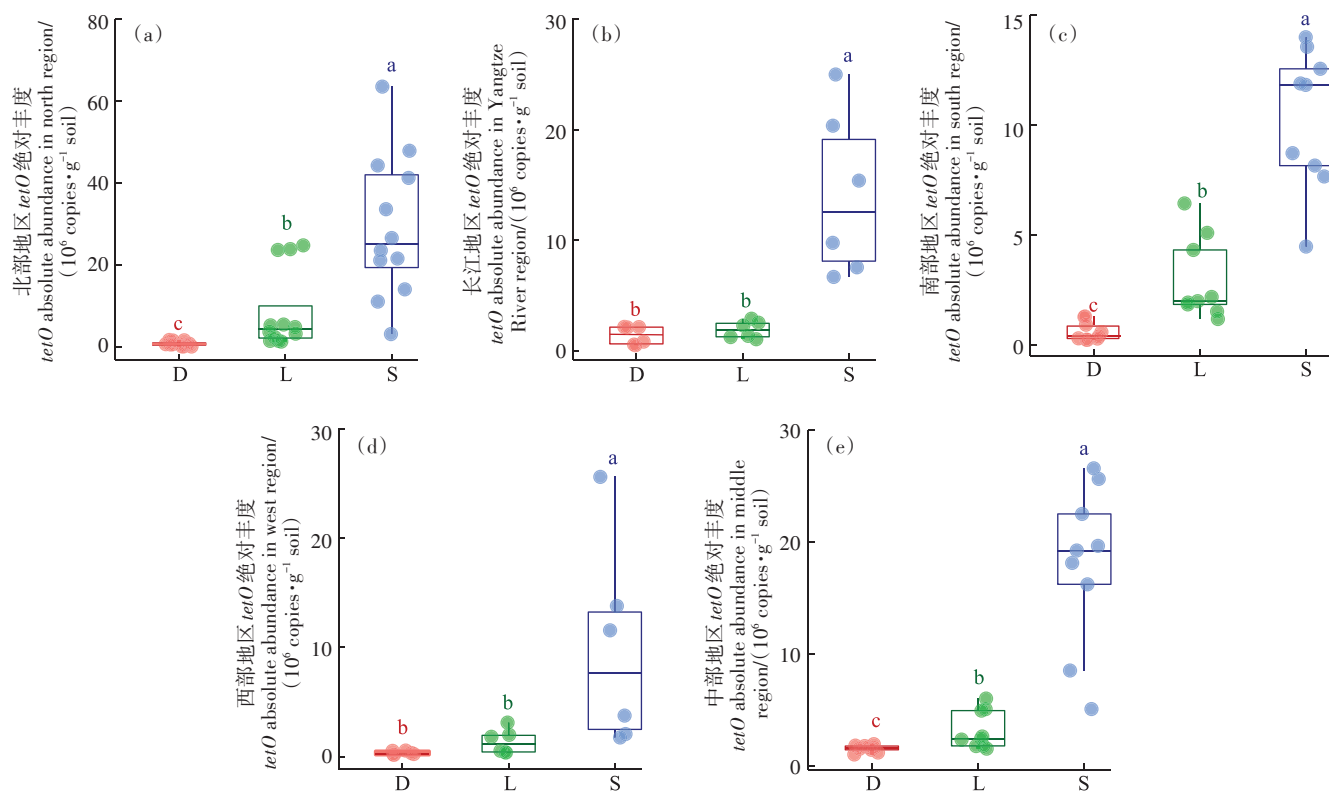
图4 不同地区同一利用方式土壤中 *tetW* 绝对丰度的差异

Figure 4 Difference of absolute abundance of *tetW* in soils with the same utilization pattern in different area

导致设施菜田土壤中抗生素抗性基因的绝对定量值高于露地菜田和粮田土壤^[36];另一方面,相对于露地菜田和粮田,设施菜田属于相对封闭的环境,不受外界因素的影响,从而有利于抗性的积累,这也可能是设施菜田土壤中四环素类抗性基因的绝对丰度高于露地菜田和粮田土壤的原因^[42]。从本试验结果来看,各地区土壤中四环素类抗生素抗性基因的绝对丰度存在显著差异。栽培方式也是影响抗性基因污染程度的因素之一^[40]。抗生素抗性基因独特的空间分布格局可能受土壤共存污染物、土壤特性和天气条件的区域

性差异的影响^[42]。因此我国不同地区 ARGs 的污染水平不同主要是由于人类活动、土壤类型和天气条件所造成的^[43]。

本试验的研究结果表明,四环素类抗性基因(*tetM*、*tetO*、*tetQ*、*tetW*)的绝对丰度在设施菜田 3 a 的土壤中显著低于设施菜田 7 a 和 15 a 的土壤,可见,其抗性基因会随土壤利用年限的增加而在土壤环境中积累,这与前人的研究结果一致^[44]。长期的粪便施用会使土壤中养分含量显著提升,从而提高土壤中微生物的数量^[45]。本课题组利用本试验土壤测定土壤养分,

图5 北部、西部、长江、中部和南部地区不同利用方式土壤中 *tetM* 的差异Figure 5 Differences of *tetM* in soils with different utilization patterns in the north, west, Yangtze River, central and southern region图6 北部、西部、长江、中部和南部地区不同利用方式土壤中 *tetO* 的差异Figure 6 Differences of *tetO* in soils with different utilization patterns in the north, west, Yangtze River, central and southern region

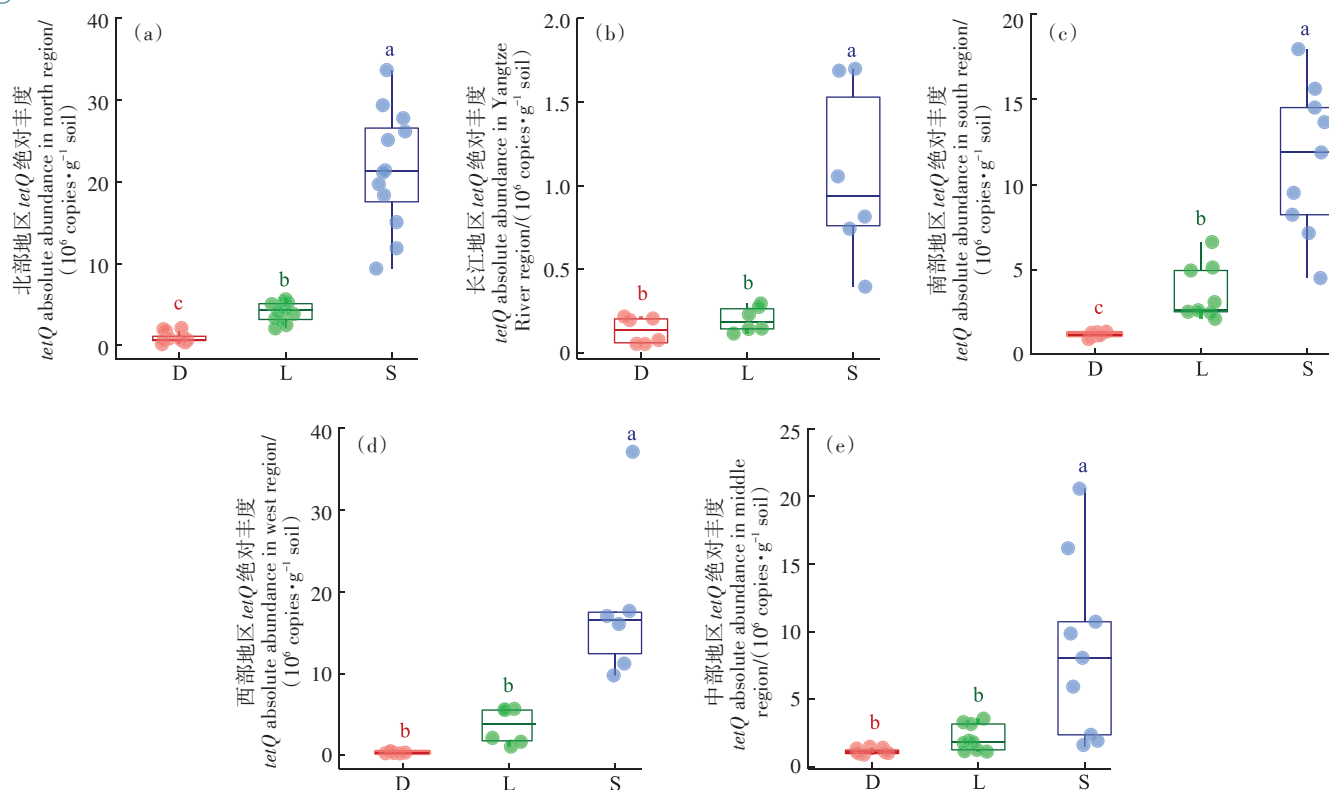


图7 北部、西部、长江、中部和南部地区不同利用方式土壤中 *tetQ* 的差异

Figure 7 Differences of *tetQ* in soils with different utilization patterns in the north, west, Yangtze River, central and southern region

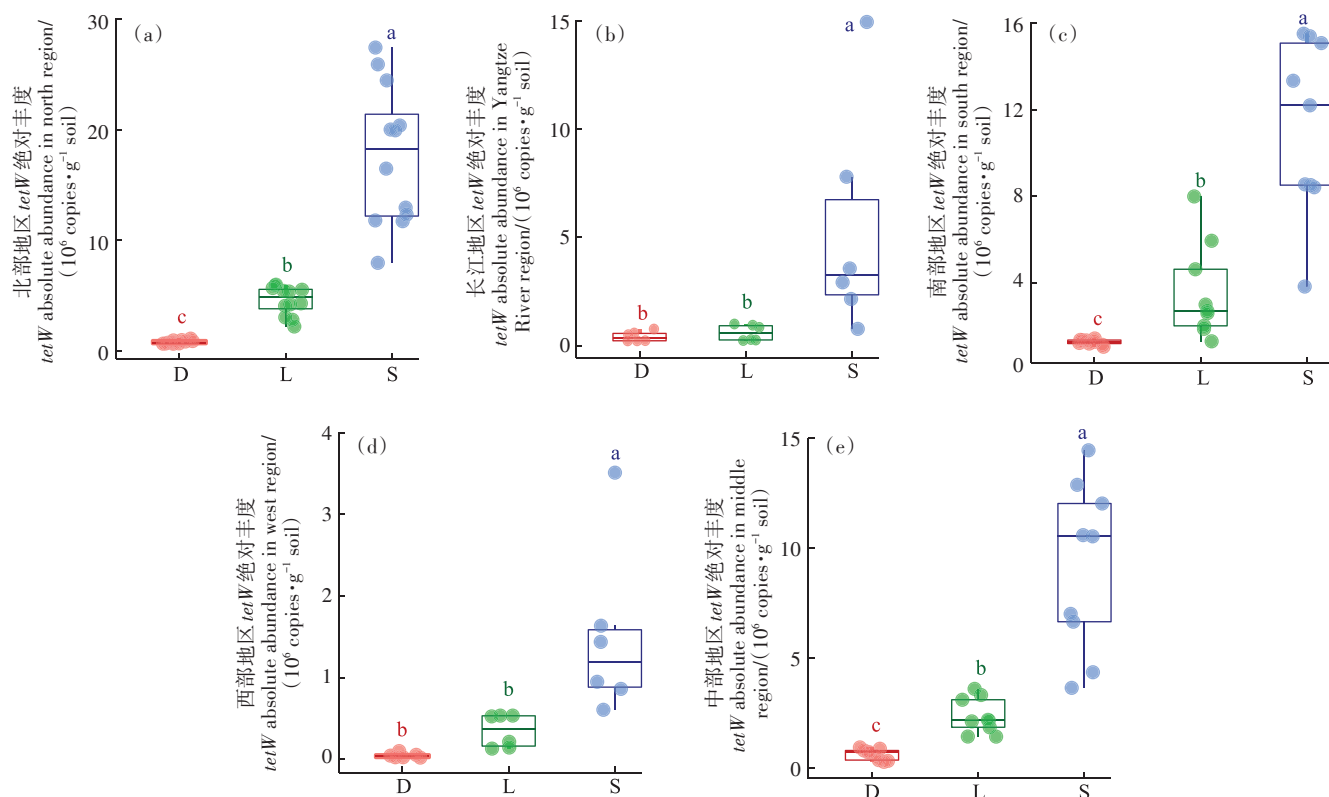


图8 北部、西部、长江、中部和南部地区不同利用方式土壤中 *tetW* 的差异

Figure 8 Differences of *tetW* in soils with different utilization patterns in the north, west, Yangtze River, central and southern region

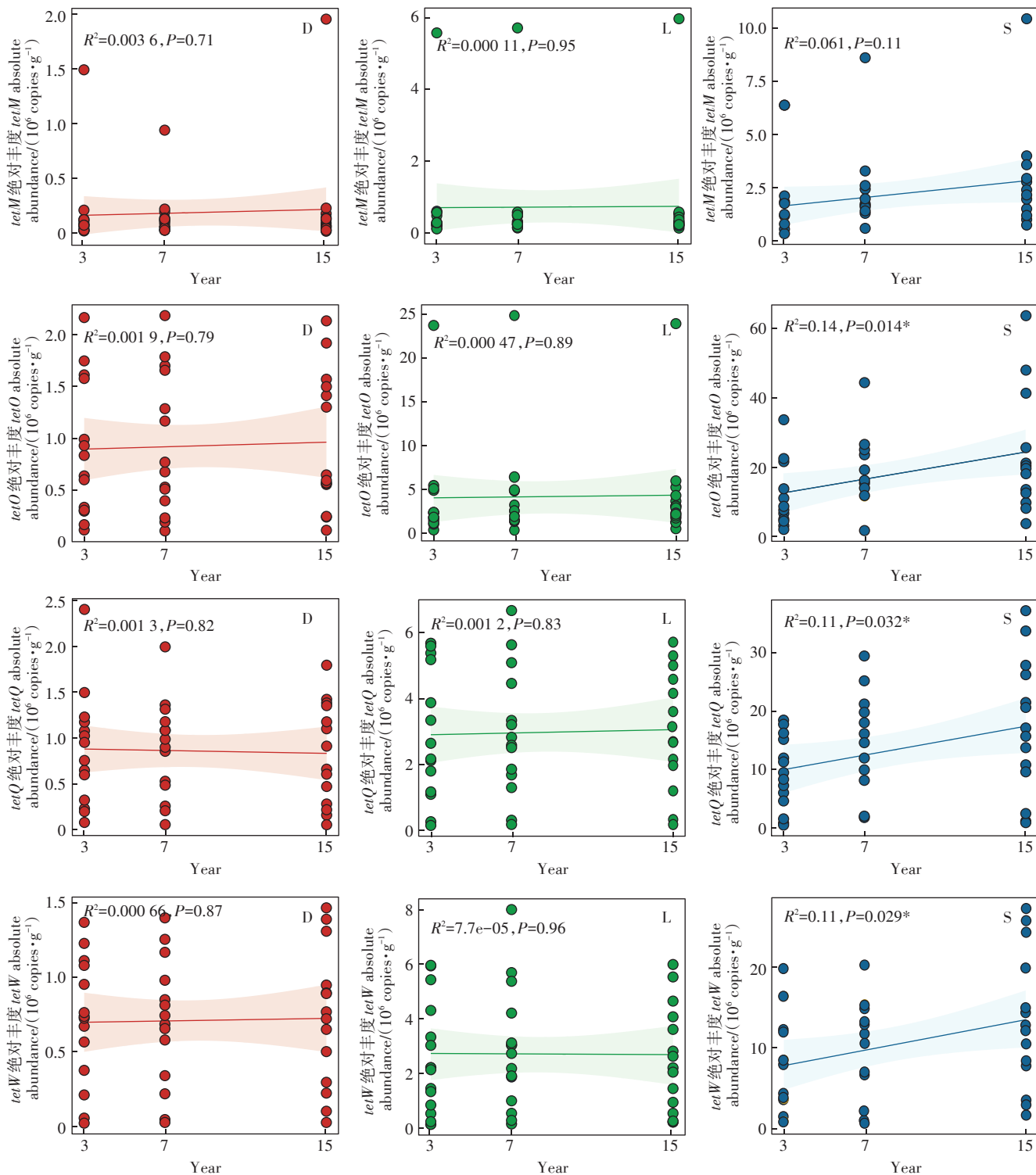


图9 四环素类抗性相关基因与利用年限的线性回归

Figure 9 Linear regression between tetracycline resistance genes and soil planting life

发现设施菜田 3 a 的土壤中的养分含量显著低于设施菜田 7 a 和 15 a 的土壤^[46]。随着宿主细菌多样性的增加和细菌间遗传物质的交换,无论是来自共生菌群间还是来自于外界环境的潜在抗生素抗性基因,均能够

增加土壤微生物区系对抗生素的抵抗能力,随之使抗生素抗性基因丰度显著提升^[47]。因此,造成本试验结果的原因可能是设施菜田 3、7 a 和 15 a 土壤中微生物的数量不同,导致微生物区系对抗生素的抵抗能力不

同,使得抗生素抗性基因的丰度存在差异。

将14个省份分为5个地区,发现北部和南部地区的设施菜田土壤的 *tetO*、*tetQ*、*tetW* 的绝对丰度显著高于露地菜田和露地粮田土壤,同时露地菜田显著高于露地粮田土壤,西部、长江和中部地区设施菜田土壤的 *tetM*、*tetO*、*tetQ* 的绝对丰度显著高于露地菜田和露地粮田土壤,但露地菜田和露地粮田土壤间无显著差异。土壤的空间属性成为最可能影响抗生素抗性基因积累的因素^[11]。对相同土壤进行微生物区系分析,发现土壤pH的降低导致细菌群落的随机聚集^[48],促使土壤环境中抗生素抗性基因的积累和传播,土壤酸度对土壤中抗生素的吸附和解吸行为具有重要作用^[49],因此,不同地区的土壤性质也会影响抗性基因丰度。

此外,对不同利用方式下土壤中4个四环素类抗性基因与土壤农作年限进行线性分析,发现设施菜田土壤中 *tetO*、*tetQ*、*tetW* 基因的绝对丰度随土壤利用年限的增加而积累,但露地菜田和粮田土壤的抗生素不存在这种线性关系。这一方面反映了土地利用方式影响四环素类抗性基因的积累,露地菜田和粮田土壤抗性基因独特的空间分布格局可能受土壤共存污染物、土壤特性和天气条件的区域性差异的影响^[42],因此,受年限的影响不显著。另一方面,由于设施菜田受到更少的外界因素影响,四环素类抗性基因表现为逐年积累的趋势,在设施菜田内更容易探究抗生素积累污染情况与年限的关系。

4 结论

(1)粮田、露地菜田和设施菜田土壤中四环素类抗性基因(*tetM*、*tetO*、*tetQ* 和 *tetW*)的检出频率均为100%。

(2)*tetM*、*tetO*、*tetQ* 和 *tetW* 在设施菜田土壤中的绝对丰度均显著高于粮田和露地菜田土壤。各地区3、7 a和15 a的设施菜田土壤均显著高于相同年限下的粮田和露地菜田土壤,且设施菜田土壤的 *tetO*、*tetQ*、*tetW* 基因与年限存在显著正相关关系。

(3)设施菜田抗生素抗性基因总体上随年限增加呈累积趋势,不同年限的露地菜田间以及粮田土壤间均无显著差异。

(4)北部、西部、长江、中部和南部地区设施菜田土壤的 *tetM*、*tetO*、*tetQ*、*tetW* 的绝对丰度显著高于露地菜田和露地粮田土壤,北部和南部地区的设施菜田土壤的 *tetO*、*tetQ*、*tetW* 的绝对丰度显著高于露地菜田和

露地粮田土壤,同时露地菜田显著高于露地粮田土壤,西部、长江和中部地区设施菜田土壤的 *tetM*、*tetO*、*tetQ* 的绝对丰度显著高于露地菜田和露地粮田土壤,但露地菜田和露地粮田土壤间无显著差异。

参考文献:

- [1] 崔二苹,高峰,陈红,等.再生水利用对抗生素抗性基因影响的研究进展[J].灌溉排水学报,2017,36(2):32-38. CUI E P, GAO F, CHEN H, et al. Occurrence of antibiotic resistance genes in environment with the application of reclaimed water: A review[J]. *Journal of Irrigation and Drainage*, 2017, 36(2): 32-38.
- [2] JAKOBSEN L, SANDVANG D, HANSEN L H, et al. Characterisation, dissemination and persistence of gentamicin resistant *Escherichia coli* from a Danish university hospital to the waste water environment[J]. *Environment International*, 2008, 34(1): 108-115.
- [3] 张明美.污水处理系统中抗生素抗性基因污染研究[D].杭州:浙江大学,2013. ZHANG M M. The pollution of antibiotic resistance genes in wastewater treatment systems[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013.
- [4] MASSÉ D L, SAADY N M C, GILBERT Y. Potential of biological processes to eliminate antibiotics in livestock manure: An overview[J]. *Animals*, 2014, 4: 146-163.
- [5] 王晓焕,李桦.社会经济地位对农户有机肥替代化肥行为的影响[J].西北农林科技大学学报(社会科学版),2022,22(2):86-97. WANG X H, LI H. Effects of farmers' social and economic status on the substitution behavior of organic fertilizer for chemical fertilizer[J]. *Journal of Northwest A&F University (Social Science Edition)*, 2022, 22(2): 86-97.
- [6] 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.
- [7] ZHAO Y, SU J Q, AN X L, et al. Feed additives shift gut microbiota and enrich antibiotic resistance in swine gut[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 621: 1224-1232.
- [8] GAO M, QIU T, SUN Y, et al. The abundance and diversity of antibiotic resistance genes in the atmospheric environment of composting plants[J]. *Environment International*, 2018, 116: 229-238.
- [9] PROSSER R, SIBLEY K. Human health risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in plant tissue due to biosolids and manure amendments and wastewater irrigation[J]. *Environment International*, 2015, 75: 223-233.
- [10] BOXALL A, JHONSON P, SMITH E, et al. Uptake of veterinary medicines from soils into plants[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(6): 2288-2297.
- [11] 冉继伟,肖琼,黄敏,等.施肥对农田土壤抗生素抗性基因影响的整合分析[J].环境科学,2022,43(3):1688-1696. RAN J W, XIAO Q, HUANG M, et al. Impacts of fertilization on soil antibiotic resistance genes across croplands: A meta-analysis[J]. *Environmental Science*, 2022, 43(3): 1688-1696.
- [12] 李文.长三角农田土壤中crAssphage与抗生素抗性基因共存关系

- 研究[D]. 杭州:浙江大学, 2021. LI W. Co-occurrence of crAss-phage and antibiotic resistance genes in agricultural soils of the Yangtze River Delta[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021.
- [13] 李森. 东北黑土农田抗生素抗性基因污染及调控研究[D]. 北京:中国科学院大学, 2021. LI S. Research on the contamination and regulation of antibiotic resistance genes in arable black soils of north-east China[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2021.
- [14] MARTI R, SCOTT A, TIEN Y C, et al. Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79 (18): 5701-5709.
- [15] ROSS J, TOPP E. Abundance of antibiotic resistance genes in bacteriophage following soil fertilization with dairy manure or municipal biosolids and evidence for potential transduction[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(22): 7905-7913.
- [16] 王百羽, 张珣, 王宝玉, 等. 沈阳蔬菜地土壤中典型抗生素抗性基因与可移动元件分布特征[J]. 生态学杂志, 2021, 40(7): 2113-2119. WANG B Y, ZHANG X, WANG B Y, et al. Distribution of typical antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in vegetable soils of Shenyang[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2021, 40(7): 2113-2119.
- [17] TANG X J, LOU C L, WANG S X, et al. Effects of long-term manure applications on the occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes (ARGs) in paddy soils: Evidence from four field experiments in south of China[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 90: 179-187.
- [18] KNAPP C W, DOLFING J, EHLERT P A I, et al. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940 [J]. *Environmental Science and Technology*, 2010, 44: 580-587.
- [19] XU L Y, ZHANG H, XIONG P, et al. Occurrence, fate, and risk assessment of typical tetracycline antibiotics in the aquatic environment: A review[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 753: 141975.
- [20] MUHAMMAD J, KHAN S, SU J Q, et al. Antibiotics in poultry manure and their associated health issues: A systematic review[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2020, 20(1): 486-497.
- [21] 张小红, 陶红, 王亚娟, 等. 银川市农田土壤中四环素类抗生素的污染特征及生态风险评估[J]. 环境科学, 2021, 42(10): 4933-4941. ZHANG X H, TAO H, WANG Y J, et al. Pollution characteristics and risk assessment of tetracycline antibiotics in farmland soil in Yinchuan[J]. *Environmental Science*, 2021, 42(10): 4933-4941.
- [22] 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.
- [23] 周雨婷. 中国农田土壤中抗生素抗性基因分布及典型污染物浓度特征、对其影响与风险评估[D]. 杭州:浙江大学, 2020. ZHOU Y T. Distribution of antibiotic resistance genes and concentration characteristics, influence on antibiotic resistance genes, and risk assessments of typical pollutants in agricultural soils in China[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2020.
- [24] 冯红燕, 谭永忠, 王庆日, 等. 中国土地利用分区研究综述[J]. 中国土地科学, 2010, 24(8): 71-76. FENG H Y, TAN Y Z, WANG Q R, et al. Review of the research on land use zoning in China[J]. *China Land Science*, 2010, 24(8): 71-76.
- [25] 付彦祥. 我国不同生态区及不同土地利用方式下土壤细菌群落结构的变化[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2020. FU Y X. Changes of soil bacterial communities by land-use intensity in different ecological regions in China[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2020.
- [26] JI X L, SHEN Q H, LIU F, et al. Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai, China[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 235/236: 178-185.
- [27] MILLER D N, JURGENS M E, DURSO L M, et al. Simulated winter incubation of soil with swine manure differentially affects multiple antimicrobial resistance elements[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 11: 611912.
- [28] SHENTU J L, ZHANG K, SHEN D S, et al. Effect from low-level exposure of oxytetracycline on abundance of tetracycline resistance genes in arable soils[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22: 13102-13110.
- [29] EITEL Z, SOKI J, URBAN E, et al. The prevalence of antibiotic resistance genes in bacteroides fragilis group strains isolated in different European countries[J]. *Anaerobe*, 2013, 21: 43-49.
- [30] WICKHAM H. Create elegant data visualization using the grammar of graphics[EB/OL]. R package version 3.2.1. 2016: <https://CRAN.R-project.org/package=ggplot2>.
- [31] WANG F H, HAN W X, CHEN S M, 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.
- [32] KHAN F A, SODERQUIST B, JASS J. Prevalence and diversity of antibiotic resistance genes in Swedish aquatic environments impacted by household and hospital wastewater[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 688.
- [33] KOIKE S, KRAPAC I G, OLIVER H D, et al. Monitoring and source tracking of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater adjacent to swine production facilities over a 3-year period[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(15): 4813-4823.
- [34] PENG S, FENG Y Z, WANG Y, et al. Prevalence of antibiotic resistance genes in soils after continually applied with different manure for 30 years[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2017, 340: 16-25.
- [35] GAO P P, MAO D Q, LUO Y, et al. Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment[J]. *Water Research*, 2012, 46: 2355-2364.
- [36] LING Z, YUAN H, HUI W. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China[J]. *Science of the Total Environment*, 2010, 408: 1069-1075.
- [37] GAO P, MUNIR M, XAGORAKI T. Correlation of tetracycline and sulfonamide antibiotics with corresponding resistance genes and resis-

- tant bacteria in a conventional municipal wastewater treatment plant[J]. *Science of the Total Environment*, 2012, 421/422:173-183.
- [38] 由海霞. 近十一年我国蔬菜播种面积的变化规律分析[J]. 北方园艺, 2016(6):168-170. YOU H X. Variation of vegetable sown areas in China during the past eleven years[J]. *Northern Horticulture*, 2016(6):168-170.
- [39] 李艳梅, 孙焱鑫, 邹国元, 等. 设施蔬菜经营主体施肥现状及有机肥替代化肥情况调研: 基于北京市顺义区的实证分析[J]. 中国蔬菜, 2021(9):84-90. LI Y M, SUN Y X, ZOU G Y, et al. Fertilization status of facility vegetable business entity and investigation on situation of replacing chemical fertilizer by organic fertilizer: Based on an empirical analysis for Shunyi District of Beijing[J]. *China Vegetables*, 2021(9):84-90.
- [40] ZHOU Y T, NIU L L, ZHU S Y, et al. Occurrence, abundance, and distribution of sulfonamide and tetracycline resistance genes in agricultural soils across China[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 599/600:1977-1983.
- [41] 文方芳, 张梦佳, 张卫东, 等. 北运河上游昌平区化肥面源污染年际间差异分析[J]. 环境科学学报, 2021, 41(1):15-20. WEN F F, ZHANG M J, ZHANG W D, et al. Analysis of inter-annual variation in chemical fertilizer non-point source pollution in upper stream of Beiyunhe River, Changping District[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2021, 41(1):15-20.
- [42] WU N, QIAO M, ZHANG B, et al. Abundance and diversity of tetracycline resistance genes in soils adjacent to representative swine feedlots in China[J]. *Environmental Science and Technology*, 2011, 44: 6933-6939.
- [43] FANG H, WANG H F, CAI L, et al. Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens in long-term manured greenhouse soils as revealed by metagenomic survey[J]. *Environmental Science and Technology*, 2015, 49(2):1095-1104.
- [44] XIE W Y, SHEN Q, ZHAO F J. Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: A review[J]. *European Journal of Soil Science*, 2018, 69(1):181-195.
- [45] PENG F J, ZHOU L J, YING G G, et al. Antibacterial activity of the soil-bound antimicrobials oxytetracycline and ofloxacin[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2014, 33(4):776-783.
- [46] 刘佳遥. 我国不同生态区和土地利用方式对真菌群落结构的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019. LIU J Y. The effect of ecological regions and land-use intensity on soil fungal community[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2019.
- [47] NASIR A N M, YAHAYA N, ZAIN N N M, et al. Thiol-functionalized magnetic carbon nanotubes for magnetic micro-solid phase extraction of sulfonamide antibiotics from milks and commercial chicken meat products[J]. *Food Chemistry*, 2019, 276:458-466.
- [48] ZHOU X G, MUHAMMAD K U R, LIU J J, et al. Soil acidification mediates changes in soil bacterial community assembly processes in response to agricultural intensification[J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(8):4741-4755.
- [49] HAN X M, HU H W, SHI X Z, et al. Impacts of reclaimed water irrigation on soil antibiotic resistome in urban parks of Victoria, Australia[J]. *Environmental Pollution*, 2016, 211:48-57.

(责任编辑:朱晓昱)