

氨氮对牛粪厌氧消化中四环素类抗性基因丰度及其驱动因子的影响

王秀君, 朱文博, 朱天娇, 张秋萍, 庞小可, 许继飞

引用本文:

王秀君, 朱文博, 朱天娇, 张秋萍, 庞小可, 许继飞. 氨氮对牛粪厌氧消化中四环素类抗性基因丰度及其驱动因子的影响[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(5): 1139–1147.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2022-0918>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

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

农业环境科学学报. 2021, 40(8): 1808–1817 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0033>

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>

钒胁迫对紫花苜蓿生长及钒积累与转移的影响

武振中, 杨金燕, 张有贤

农业环境科学学报. 2021, 40(6): 1198–1207 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1165>

消毒剂卫可施用对猪粪污厌氧消化系统运行及微生物多样性的影响

邓冕, 钟华, 夏嵩, 吴永明, 李荣富, 金丹凤, 梁培瑜

农业环境科学学报. 2023, 42(4): 891–900 <https://doi.org/10.11654/jaes.2022-0706>

稻田土壤 CH_4 排放及其关联微生物功能基因丰度对磺胺二甲嘧啶和铜污染的响应

程粟裕, 朱长俊, 李昕钰, 董宁, 周金蓉, 蒋静艳

农业环境科学学报. 2021, 40(10): 2246–2256 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0212>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

王秀君, 朱文博, 朱天娇, 等. 氨氮对牛粪厌氧消化中四环素类抗性基因丰度及其驱动因子的影响[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(5): 1139–1147.

WANG X J, ZHU W B, ZHU T J, et al. Effects of ammonia nitrogen on the abundance of tetracycline resistance genes and its driving factors during anaerobic digestion of dairy manure[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2023, 42(5): 1139–1147.

氨氮对牛粪厌氧消化中四环素类抗性基因丰度及其驱动因子的影响

王秀君^{1,2}, 朱文博¹, 朱天娇¹, 张秋萍³, 庞小可⁴, 许继飞^{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. 山西师范大学生命科学学院, 太原 030031; 4. 南开大学环境科学与工程学院, 天津 300350)

摘 要:为探究氨氮浓度对高温厌氧消化中四环素类抗生素抗性基因(Tetracycline resistance genes, TRGs)绝对丰度变化及其微生物生态机制, 设置氨氮浓度为 600、1 100 mg·L⁻¹ 和 1 600 mg·L⁻¹ 的牛粪高温厌氧消化体系, 分析了 TRGs、可移动遗传元件和细菌群落结构的变化特征及三者之间的关系。结果表明:氨氮浓度为 600 mg·L⁻¹ 和 1 100 mg·L⁻¹ 时, 高温厌氧消化的产气速率和总产气量相似; 氨氮浓度为 1 600 mg·L⁻¹ 时, 二者均受到抑制。*tetC*、*tetO*、*tetQ*、*tetT* 和 *tetX* 的丰度在不同氨氮浓度条件下均减少, 但 *tetA* 和 *tetG* 的丰度在氨氮浓度为 1 600 mg·L⁻¹ 条件下增加了 1.05 倍和 1.85 倍。不同处理中细菌群落差异明显, TRGs 潜在宿主菌的种类和数目均改变。相关性分析表明 TRGs 潜在宿主菌的差异可一定程度解释 TRGs 的丰度变化, 但 *tetA* 和 *tetG* 丰度在氨氮浓度为 1 600 mg·L⁻¹ 条件下的增加主要与 *intI1* 和 *intI2* 的增长有关。综上所述, 牛粪中较高的氨氮浓度会增加高温厌氧消化过程中 TRGs 通过水平基因转移途径增殖的可能性, 从而增加 TRGs 传播的风险。

关键词:四环素类抗性基因; 牛粪; 厌氧消化; 氨氮浓度; 水平基因转移

中图分类号: X713 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2023)05-1139-09 doi:10.11654/jaes.2022-0918

Effects of ammonia nitrogen on the abundance of tetracycline resistance genes and its driving factors during anaerobic digestion of dairy manure

WANG XiuJun^{1,2}, ZHU Wenbo¹, ZHU Tianjiao¹, ZHANG Qiuping³, PANG Xiaoke⁴, XU Jifei^{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. School of Life Science, Shanxi Normal University, Taiyuan 030031, China; 4. College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300350, China)

Abstract: To reveal the effects of different concentrations of ammonia nitrogen (600, 1 100 mg·L⁻¹ and 1 600 mg·L⁻¹) on the changes in the abundances of tetracycline resistance genes (TRGs) during thermophilic anaerobic digestion (TAD) of dairy manure, the variations of TRGs, mobile genetic elements, and bacterial community were compared and analyzed. The results showed that biogas production rates and total biogas yields were similar among TAD with ammonia nitrogen concentrations of 600 mg·L⁻¹ and 1 100 mg·L⁻¹, but they were inhibited in TAD under an ammonia nitrogen concentration of 1 600 mg·L⁻¹. *tetC*、*tetO*、*tetQ*、*tetT* 和 *tetX* reduced in all TADs. However, *tetA* and

收稿日期: 2022-09-17 录用日期: 2022-11-30

作者简介: 王秀君(1998—), 女, 内蒙古呼和浩特人, 硕士研究生, 主要从事粪便处理与资源化方面的研究。E-mail: XiuJunWW@163.com

*通信作者: 许继飞 E-mail: Jifeixu@imu.edu.cn

基金项目: 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); 国家自然科学基金项目(51768048)

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

tetG increased by 1.05 times and 1.85 times after TAD with an ammonia nitrogen concentration of $1\ 600\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Differences in bacterial communities were observed among three treatments. The kind and number of potential host bacteria of TRGs changed as well. Correlation analysis demonstrated that the differences in potential host bacteria of TRGs could be the reason for the changes of TRGs at a certain level; however, the increase in *tetA* and *tetG* was related to the increase in *intI1* and *intI2*. In summary, high concentrations of ammonia and nitrogen in dairy manure might enhance the horizontal gene transfer of TRGs during TADs, leading to an increased risk of the spread of TRGs.

Keywords: tetracycline resistance genes; dairy manure; thermophilic anaerobic digestion; concentrations of ammonia nitrogen; horizontal gene transfer

畜禽粪便作为抗生素抗性基因(Antibiotic resistance genes, ARGs)的储存池已成为当下的研究热点^[1]。四环素类 ARGs(Tetracycline resistance genes, TRGs)在畜禽粪便中频频检出,为粪源 ARGs 的主要门类^[2-3]。同时,畜禽粪便也是一种应用价值高且常见的农业有机肥料^[4]。由此,粪源 ARGs 可能会随着畜禽粪便应用和养殖废水排放进入土壤、水体等自然环境,并经食物链传递等途径进入植物、动物体中,进而对生态环境和人体健康造成潜在威胁。

厌氧消化是粪便资源化的常用方式之一,可对粪源 ARGs 在环境中的传播和扩散起控制作用^[5]。作为消化基质,畜禽粪便的理化性质将影响厌氧消化对粪源 ARGs 的作用效果,其中,氨氮可为 ARGs 宿主微生物提供氮源,也可作为厌氧消化系统的缓冲剂,增强消化系统稳定性,然而,氨氮浓度高会抑制微生物的生命活动,进而导致消化失败^[6]。朱文博等^[7]的研究表明氨氮浓度对厌氧消化中粪源 ARGs 的相对丰度变化有显著影响。Zhang 等^[8]的研究发现猪粪中的 ARGs 经中温厌氧消化后的总相对丰度随粪便中氨氮浓度的升高而升高,且 ARGs 发生水平基因转移的概率也随之增加。对于养殖场中的畜禽粪便,其氨氮浓度可能会随着养殖单元、养殖规模和清粪方式的不同而有差异。美英等^[9]研究发现从产奶牛舍和待产牛舍收集的粪便中氨氮浓度高于其他养殖单元,且大规模养殖场的氨氮浓度高于中小规模养殖场。此外,高温会促进畜禽粪便中氨氮的释放,夏季奶牛粪便中氨氮浓度高于冬季。于厌氧消化而言,高温厌氧消化较中温厌氧消化更有利于减少 ARGs 的丰度^[10-11],然而,畜禽粪便中氨氮浓度对高温厌氧消化中粪源 ARGs 丰度变化及其驱动因子的影响尚有待阐明。

本研究以 TRGs 为目的基因,以牛粪为消化基质,并外源添加尿素以形成牛粪氨氮浓度梯度;在确保高温厌氧消化可运行的情况下,探究氨氮浓度对牛粪高温厌氧消化系统中 TRGs 丰度变化的影响,分析 TRGs、可移动遗传元件(Mobile genetic elements, MGEs)和微

生物群落结构的相关性以揭示 TRGs 丰度变化的驱动因子,以期进一步加深对畜禽粪便理化性质与厌氧消化工艺削减 ARGs 效果相互作用关系的理解。

1 材料与方法

1.1 试验材料与设计

本试验利用无菌聚乙烯塑料瓶于内蒙古呼和浩特某规模化奶牛养殖场采集新鲜牛粪(记为 U0), $4\ ^\circ\text{C}$ 保存运回实验室。牛粪理化性质于 48 h 内测定,其余样品于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存。新鲜牛粪初始理化性质:可溶性 COD(SCOD)浓度为 $7\ 575.00\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;氨氮浓度为 $595.30\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;pH 为 6.08;总挥发酸(TVFs)浓度为 $3\ 092.47\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。为避免引入其他化学元素,采用尿素($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$)为外源添加物调节牛粪中氨氮浓度,并以牛粪和尿素的混合物作为厌氧消化基质。一般认为,当厌氧消化中的氨氮浓度超过 $1\ 500\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时会对厌氧消化产生不利影响^[12],基于此,本试验消化基质中氨氮浓度最终设定为 600 、 $1\ 100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1\ 600\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,记为 U1、U2 和 U3。选用 500 mL 厌氧培养瓶为厌氧消化反应器。培养瓶内添加 400 mL 新鲜牛粪和尿素混合物后通氮气 5~8 min。发酵浓度为 8%。以未检出 ARGs 的厌氧微生物菌剂(广州微生源,中国)为接种物,接种率为 0.1%(m/m)。利用水浴法保证反应温度为 $(55\pm 1)\ ^\circ\text{C}$,每组处理设置 3 个重复。

1.2 样品采集与理化性质测定

采用排水法收集气体,并每日记录日产气量。当日产气量小于 5% 反应体积($25\ \text{mL}\cdot\text{d}^{-1}$)时,视作厌氧消化反应终点。在反应前、反应第 6 天、第 16 天、第 28 天和第 45 天(反应结束)时采集样品。将 1 mL 样品收集于离心管内, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,上清液用于理化性质测定,沉淀物于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 保存,用于 TRGs、MGEs 和 16S rRNA 的定量分析以及微生物群落分析。

沼气成分采用沼气分析仪(MRU Optima7,德国)分析测定;SCOD 采用重铬酸钾法测定;氨氮采用纳

氏试剂光度法测定;pH值采用pH计(PHS-3E,上海雷磁)测定;TVFAs采用酸性氯化铁比色法测定;碱度采用滴定法测定。

1.3 ARGs与MGEs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,详细步骤参见试剂盒说明书。所提取的DNA用超微量紫外分光光度计(Nanodrop-2000,美国)检测其含量和纯度($A_{260/280}$ 为1.7~2.0)。

实时荧光定量PCR(qPCR):通过普通PCR仪(ABI 9902,美国)检测样品中的TRGs和MGEs,目的基因为编码外排泵基因(*tetA*、*tetC*、*tetG*),编码核糖体保护蛋白基因(*tetO*、*tetQ*、*tetT*),转座酶修饰基因(*tetX*)以及MGEs(*intI1*、*intI2*和*Tn916/1545*)。采用荧光定量系统(Bio-Rad CFX96,美国)对上述目的基因进行定量分析,qPCR所用引物序列、退火温度和反应程序等详见文献[10,13]。

1.4 高通量测序与微生物群落结构分析

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(ACTCCTACGGCAGGCAGCA)和806R(GGACTACHVGGGTWTCTAAT)。基于测序获

得的原始序列经Qiime 2平台中的dada 2软件质控去噪获得扩增子序列变异(Amplicon sequence variants, ASVs),将代表序列ASV与SILVA 16S rRNA数据库进行比对,使用Naïve Bayes分类器对物种进行注释,获得每个分类水平下的物种丰度信息。

1.5 数据分析

采用Microsoft Excel软件整理原始试验数据;利用SPSS 22.0进行单因素方差分析及Pearson相关性分析;采用Origin Pro 9.0绘制柱状图和折线图;采用R3.5.3绘制热图。

2 结果与讨论

2.1 氨氮浓度对牛粪厌氧消化性能的影响

图1为不同氨氮浓度下牛粪高温厌氧消化产气速率和氨氮累积情况。当氨氮浓度为 $600\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1\,100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,厌氧消化分别在第4天和第5天达到产气峰值,最大产气速率分别为 $933\text{ mL}\cdot\text{d}^{-1}$ 和 $800\text{ mL}\cdot\text{d}^{-1}$,总产气量分别为 $8\,036\text{ mL}$ 和 $7\,696\text{ mL}$ 。虽然氨氮浓度为 $1\,100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的厌氧消化较 $600\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的厌氧消化在产气性能方面略有降低,但未表现出显著差异($P>0.05$)。然而,当氨氮浓度升高至 $1\,600\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,厌氧消化的产气峰值推迟至第12天,其最大产

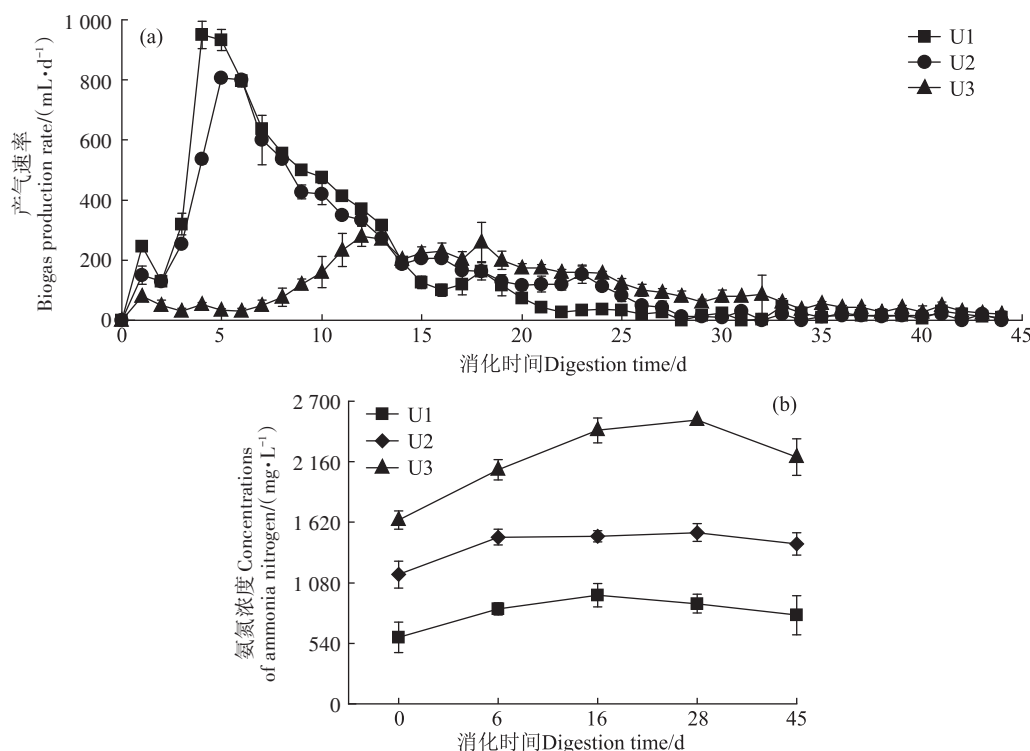


图1 牛粪高温厌氧消化过程中日产气速率和氨氮累积情况

Figure 1 Biogas production rate and the concentration of ammonia during thermophilic anaerobic digestion based on dairy manure

气速率($280 \text{ mL} \cdot \text{d}^{-1}$)与其余两试验组相比分别下降了70%和65%,且其总气量($4\,773 \text{ mL}$)较另两组厌氧消化也分别下降了40%和38%,这可能是因为牛粪中较高的氨氮浓度及其后续累积对系统中的产甲烷菌活性造成了不良影响,进而影响了厌氧消化性能^[14]。各试验组的产气速率均在第30天趋于稳定,并于第44天结束。消化结束时, 600 、 $1\,100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1\,600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理的氨氮浓度分别累积至 790 、 $1\,428 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $2\,201 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (图1b)。

2.2 氨氮浓度对 TRGs 绝对丰度的影响

图2为TRGs的绝对丰度在厌氧消化中的变化。如图2a所示,7种目的基因均在牛粪中检测出,包括*tetA*、*tetC*、*tetG*、*tetO*、*tetQ*、*tetT*和*tetX*,总绝对丰度为 $5.02 \times 10^9 \text{ copies} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。*tetQ*的绝对丰度在7种目的基因中占比最大,为53%。这可能与多数*tetQ*潜在宿主菌能够在常温环境下存活有关^[15]。消化过程中,不同氨氮浓度条件下TRGs的总绝对丰度均随消化反应的进行先下降后升高,但氨氮浓度为 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的拐点发生在消化晚期(第28~45天),而氨氮浓度为 $1\,100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1\,600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的拐点发生在消化初期(第6~16天),且 $1\,600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的反应体系中TRGs总绝对丰度始终高于 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1\,100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的反应体系($P < 0.05$)。这可能与在较高氨氮浓度($1\,600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的厌氧消化体系中微生物的停滞期延长有关^[16]。各TRG在氨氮浓度为 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1\,100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的消化过程中均被削减,但*tetA*和*tetG*却在氨氮浓度为 $1\,600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的消化过程中大量增加。消化结束后,TRGs的总绝对丰度在氨氮浓度为 $1\,600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 条件下最高,为 $1.70 \times 10^9 \text{ copies} \cdot \text{mL}^{-1}$;在氨氮浓度为 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1\,100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 条件下TRGs的总绝对丰度接近,

分别为 $4.56 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $4.6 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。箱线图的中位数可表示TRGs绝对丰度在厌氧消化后的平均水平(图2b)。在氨氮浓度为 $1\,600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,厌氧消化后TRGs的平均水平最高,为7.50 logs,该水平与氨氮浓度为 $1\,100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的试验组接近(7.36 logs),当氨氮浓度为 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,厌氧消化后TRGs的平均水平最低,为6.67 logs,该结果表明高氨氮浓度的厌氧消化削减的TRGs较少($P < 0.05$)。此外,对各TRG在不同条件下厌氧消化后的绝对丰度进行对比可知,*tetA*、*tetG*、*tetQ*、*tetT*和*tetX*的绝对丰度在氨氮浓度为 $1\,600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的条件下最高,特别是*tetA*和*tetG*,这两个基因经此条件下的厌氧消化后变为消化前的1.05倍和1.85倍。*TetO*的绝对丰度在氨氮浓度为 $1\,100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的条件下最高。仅*tetC*的绝对丰度在氨氮浓度为 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的条件下最高,但其绝对丰度在数值上与其他条件下的结果无显著差异($P > 0.05$)。

2.3 氨氮浓度对 MGEs 绝对丰度的影响

MGEs是ARGs在不同微生物之间转移的重要媒介,对ARGs在环境中的扩散起重要作用,因此,检控其在厌氧消化中的绝对丰度变化十分重要。如图3a所示,在牛粪原料中,目的MGEs(*intI1*、*intI2*和*Tn916/1545*)均存在,其总绝对丰度为 $1.46 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \text{mL}^{-1}$,其中*Tn916/1545*的占比最高,为66%。随着消化反应的进行,MGEs的总绝对丰度均先升高后下降。消化过程中,氨氮浓度为 $1\,600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的试验组中MGEs的总绝对丰度始终显著高于其他两试验组。消化结束时,氨氮浓度为 600 、 $1\,100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1\,600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 条件下的总绝对丰度分别为 3.40×10^7 、 $2.26 \times 10^7 \text{ copies} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $6.01 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。图3b为各

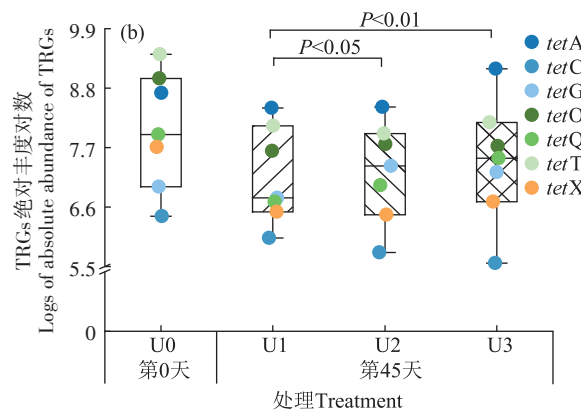
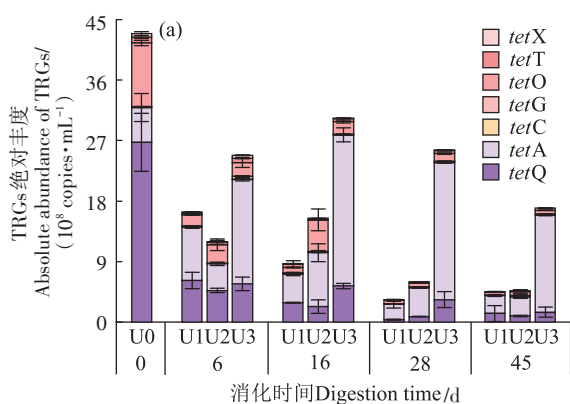


图2 牛粪厌氧消化过程中不同时间和不同处理的TRGs绝对丰度

Figure 2 Absolute abundance of TRGs during anaerobic digestion based on dairy manure

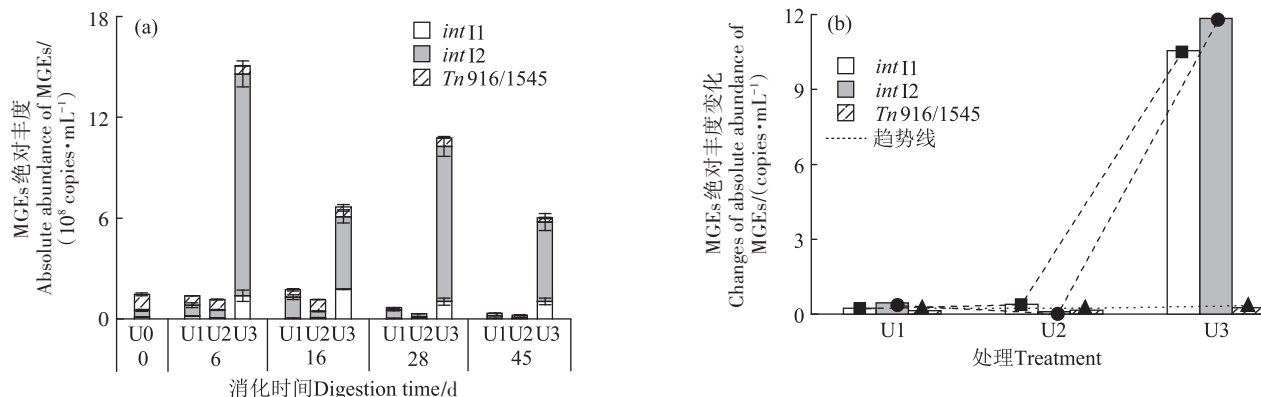


图3 厌氧消化过程中MGEs绝对丰度及其变化

Figure 3 Absolute abundance of MGEs and their changes during anaerobic digestion based on dairy manure

MGEs绝对丰度在厌氧消化前后的倍数变化值(值大于1表示基因增加,小于1表示基因减少)。氨氮浓度为 $1\ 100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $600\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的厌氧消化反应体系中各MGE及其总绝对丰度均表现为削减,而氨氮浓度为 $1\ 600\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的条件下MGEs的总绝对丰度在消化后增加了4.11倍,这是因为在该条件下*intI1*和*intI2*较厌氧消化前分别增加了10.55倍和11.85倍(图3b)。整合子(*intI1*和*intI2*)被认为是ARGs发生水平转移的关键因子^[17-18]。上述结果表明牛粪厌氧消化中氨氮浓度高时MGEs将增加,由此TRGs在不同微生物之间转移风险也将升高。

2.4 微生物群落结构变化

微生物是ARGs丰度变化的主要驱动因子^[19],其可能造成不同氨氮浓度条件下厌氧消化中TRGs绝对丰度变化差异。图4为厌氧消化过程中门水平微生物群落结构变化。在牛粪原料中,*Bacteroidetes*为优势菌门,占比为34%,其次为*Firmicutes*和*Proteobacteria*,占比分别为32%和17%。消化过程中,不同处理中的优势菌门发生改变。在消化初期(第6天),氨氮浓度为 $600\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1\ 100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的厌氧消化系统中*Firmicutes*变为第一优势菌门,占比高达71%和80%,而在氨氮浓度为 $1\ 600\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的条件下消化系统中第一优势菌门为*Proteobacteria*(51%),*Firmicutes*仅占34%。随着消化反应的进行,*Firmicutes*的占比逐渐增大并变为第一优势菌门,*Bacteroidetes*逐渐消失。这与*Firmicutes*对氨氮浓度的耐受性高而*Bacteroidetes*的生长会受到氨氮浓度的抑制有关^[20]。不同处理间微生物群落结构的差异主要由第二优势菌门造成。消化结束时,氨氮浓度为 $600\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系统中次要优势菌门为*Spirochaetes*,而氨氮浓度为 $1\ 600\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的

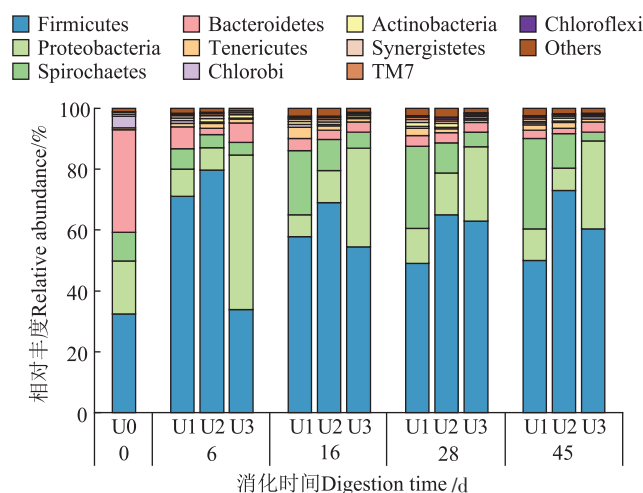


图4 厌氧消化过程中门水平细菌群落结构

Figure 4 Relative abundances of bacterial community at the phylum level during anaerobic digestion

系统中次要优势菌门为*Proteobacteria*。研究表明*Firmicutes*对厌氧消化中纤维素的分解起关键作用,其优势地位也反映出氨氮浓度较高时反应体系中乙酸的积累^[21]。*Spirochaetes*多出现在底物匮乏的厌氧消化器中,能够发酵葡萄糖为乙酸、乙醇等^[22],而*Proteobacteria*多为寡营养厌氧菌,其在有机质较少的环境中易生存^[7]。Wang等^[23]的研究表明上述菌门均为ARGs的常见潜在宿主菌门,其丰度的差异可能是不同氨氮水平下TRGs绝对丰度差异的原因。

图5为厌氧消化过程中属水平微生物(前50)的相对丰度变化,其中按行(样本)对数据进行标准化。经厌氧消化后,属水平微生物变化较为明显。一些菌属经厌氧消化后相对丰度显著降低甚至被消灭,如*Acinetobacter*、*Coprococcus*和*Clostridium*等,而一些菌

属经厌氧消化后相对丰度显著增加,如 *Syntrophomonas*、*Ruminococcus* 和 *Treponema* 等。不同氨氮浓度条件下厌氧消化体系中属水平微生物差异也较为明显。消化初期(第6天), *Comamonas*、*Pusillimonas* 和 *Sedimentibacter* 的相对丰度随氨氮浓度的升高而降低,而 *unidentified_Desulfovibrionaceae*、*unidentified_MBA08* 和 *Pusillimonas* 的相对丰度则呈相反趋势,且 *unidentified_Pseudomonadaceae* 和 *unidentified_Thermoanaerobacterales* 在氨氮浓度为 $1\ 100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的体系中最高。随着消化反应的进行,同一阶段不同处理的优势菌属均不同,表明微生物的群落结构受到了氨氮浓度的影响。消化结束时, *unclassified_Planococcaceae*、*unidentified_MBA08* 和 *Arcobacter* 为氨氮浓度 $1\ 600\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 条件下的优势菌属,而 *unidentified_Bacteroidales* 和 *BF311* 为氨氮浓度 $1\ 100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 条件下的优势菌属,

unidentified_Porphyrionadaceae 和 *Sphaerochaeta* 为氨氮浓度 $600\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 条件下的优势菌属。上述结果表明,不论消化过程中还是消化结束时,不同牛粪氨氮浓度条件下厌氧消化体系中的属水平微生物均存在差异。当这些微生物携带 TRGs 时,势必会在一定程度上造成 TRGs 的丰度差异。由此,微生物与 TRGs 的关系需进一步分析。

2.5 TRGs、MGEs 和微生物的相关性分析

在厌氧消化体系中 ARGs 可通过垂直基因转移 (Vertical gene transfer, VGT) 和水平基因转移 (Horizontal gene transfer, HGT) 两种方式在微生物间传播,其中, HGT 是 ARGs 在环境中被获得和传播的主要途径,具有更大环境危害性^[24]。为考察不同氨氮浓度条件下 TRGs 绝对丰度变化的驱动因子,对 TRGs 与 MGEs 和属水平微生物进行相关性分析(图6)。TRGs 与微生

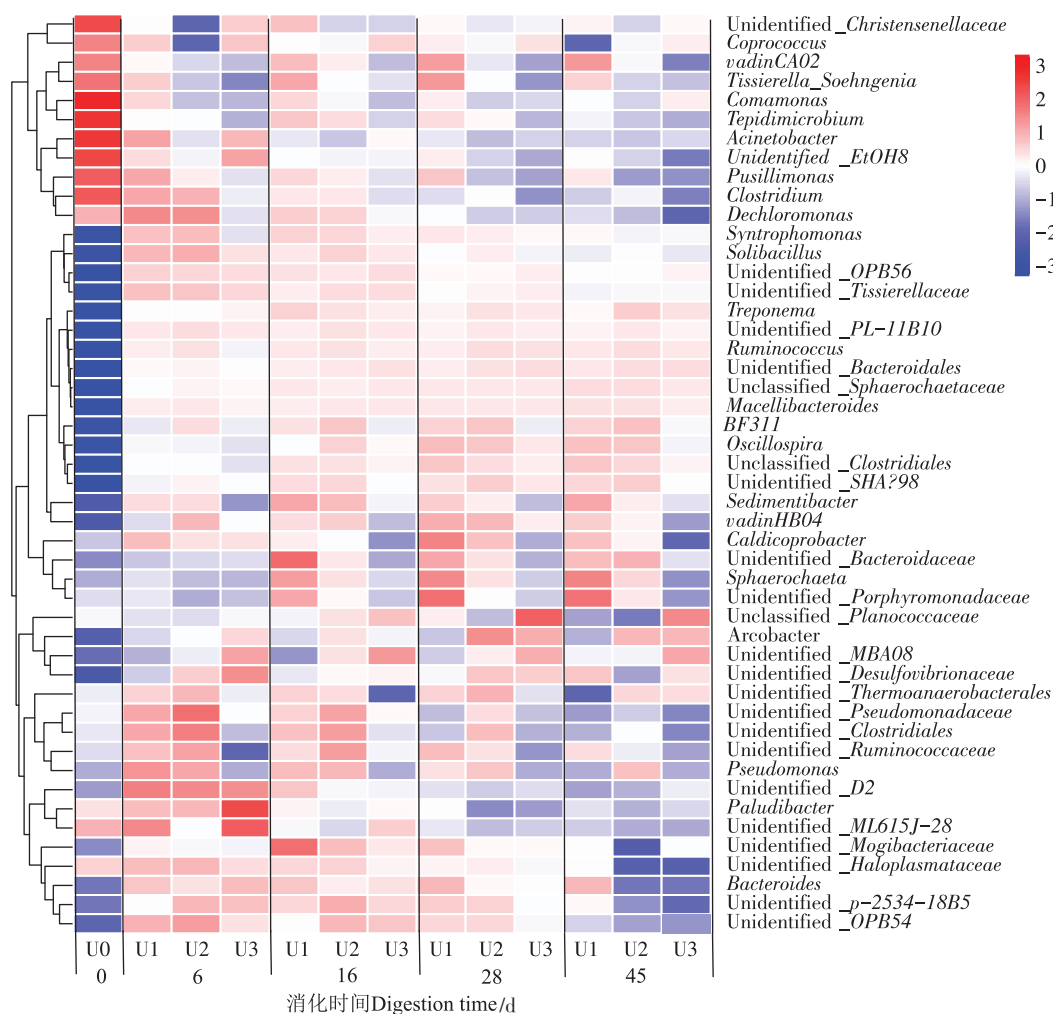


图5 厌氧消化过程中属水平细菌物种丰度

Figure 5 Relative abundances of bacteria the genus level during anaerobic digestion

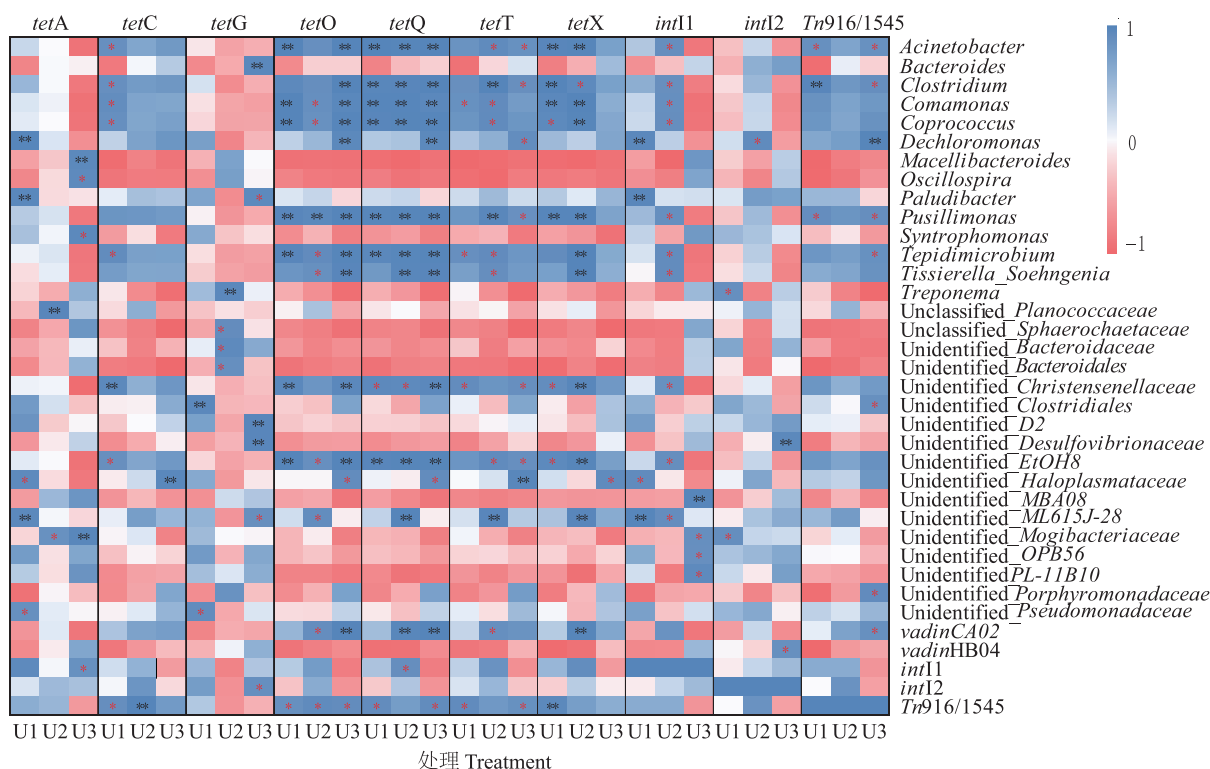
物之间的相关性分析可识别TRGs的潜在宿主菌。潜在宿主菌的相对丰度变化可在一定程度解释TRGs的丰度变化^[25]。如图6所示, *tetO*、*tetQ*、*tetT*和*tetX*拥有较多的潜在宿主,且多为共同宿主菌,如*Clostridium*、*Comamonas*和*Coprococcus*等。这些潜在宿主菌的相对丰度随着氨氮浓度的升高而降低(图5),与上述TRGs经不同氨氮浓度条件的厌氧消化之后绝对丰度的表现一致。*tetC*与其潜在宿主菌也具有类似关系。*tetA*和*tetG*拥有的潜在宿主较少。不同氨氮浓度厌氧消化体系中*tetA*和*tetG*的潜在宿主菌的分布情况也有较明显差异。*tetA*的潜在宿主菌主要存在于氨氮浓度为600 mg·L⁻¹的反应体系中,而*tetG*的潜在宿主菌则主要分布在氨氮浓度为1 100 mg·L⁻¹的反应体系中。*tetA*和*tetG*的大部分潜在宿主菌在氨氮浓度600 mg·L⁻¹条件下的相对丰度较高,在氨氮浓度为1 600 mg·L⁻¹的反应体系中较少,如*Paludibacter*和*Bacteroides*,这与厌氧消化后*tetA*和*tetG*的绝对丰度变化矛盾。对MGEs和TRGs进行相关性分析可知,在氨氮浓度为1 600 mg·L⁻¹的反应体系中,*tetA*与*intI1*呈显著正相关($P<0.05$),而*tetG*与*intI2*呈显著正

相关($P<0.05$),表明*tetA*和*tetG*的增加与*intI1*和*intI2*的增加有关。这可能是因为牛粪中较高的氨氮浓度对微生物的DNA造成了损伤,引发了微生物的SOS反应,因此,在形成质粒的过程中整合子及其上的TRGs也被快速复制^[26-27]。上述结果表明潜在宿主菌的相对丰度变化可在一定程度上解释TRGs绝对丰度的变化,但氨氮浓度为1 600 mg·L⁻¹的牛粪厌氧消化反应体系中部分TRGs可能主要以HGT途径增加,不利于通过厌氧消化方式控制TRGs在环境中的传播。

3 结论

(1)氨氮浓度为1 600 mg·L⁻¹时,*tetA*和*tetG*的绝对丰度在牛粪高温厌氧消化后增加。不同氨氮浓度条件下,*tetC*、*tetO*、*tetQ*、*tetT*和*tetX*的绝对丰度在消化后均减少。

(2)不同氨氮浓度条件下牛粪厌氧消化后体系中的第一优势菌门均为Firmicutes。氨氮浓度为1 600 mg·L⁻¹条件下消化后体系中的第二优势菌门为Proteobacteria,而氨氮浓度为1 100 mg·L⁻¹和600 mg·L⁻¹条件下



*为 $P<0.05$,表示存在显著相关关系;**为 $P<0.01$,表示存在极显著相关关系。

*means $P<0.05$, indicating that there is a significant correlation; **means $P<0.01$, indicating that there is a very significant correlation.

图6 TRGs、MGEs和属水平微生物的相关性分析

Figure 6 Correlation analysis among TRGs, MGEs and bacterial community the genus level

消化后体系中的第二优势菌门为Spirochaetes。

(3)四环素类抗生素抗性基因(TRGs)潜在宿主菌的种类和数目差异可在一定程度上解释TRGs在消化过程中绝对丰度的变化。相关性分析表明,在氨氮浓度为 $1\ 600\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的厌氧消化反应中 $tetA$ 和 $tetG$ 的增加主要与 $int11$ 和 $int12$ 的增加有关,说明利用含有较高氨氮浓度的牛粪进行厌氧消化时,TRGs进行水平基因转移的可能性较大,TRGs在环境中进一步扩散的风险较高。

参考文献:

- [1] 李纤慧, 李建政, 张成成, 等. 畜禽粪便中抗生素抗性基因的分布特征及消减技术研究进展[J]. 微生物学报, 2022, 62(12): 4740-4755. LI X H, LI J Z, ZHANG C C, et al. Distribution characteristics of antibiotic resistance genes in livestock manure and the reduction techniques: A review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(12): 4740-4755.
- [2] MU Q H, LI J, SUN Y X, et al. Occurrence of sulfonamide-, tetracycline-, plasmid mediated quinolone- and macrolide-resistance genes in livestock feedlots in northern China[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(9): 6932-6940.
- [3] 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.
- [4] DO T T, NOLAN S, HAYES N, et al. Metagenomic and HT-qPCR analysis reveal the microbiome and resistome in pig slurry under storage, composting, and anaerobic digestion[J]. *Environmental Pollution*, 2022, 305: 119271.
- [5] 张俊亚, 隋倩雯, 魏源送, 等. 畜禽粪污处理处置中危险生物因子赋存与控制研究进展[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(11): 2342-2354. ZHANG J Y, SUI Q W, WEI Y S, et al. The fate and control of dangerous biological agents (DBAs) during the treatment and disposal of livestock manure: The State of Arts[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2021, 40(11): 2342-2354.
- [6] 卢振威, 孔德望, 张克强, 等. 不同温度下猪粪厌氧发酵的氨胁迫效应[J]. 环境工程学报, 2021, 15(10): 3297-3305. LU Z W, KONG D W, ZHANG K Q, et al. Ammonia inhibition effect of anaerobic digestion of swine manure at different temperatures[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2021, 15(10): 3297-3305.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 美英, 魏坤昊, 崔钠淇, 等. 集约化奶牛养殖场不同粪尿处理阶段氮素分布及氨排放特征[J]. 农业工程学报, 2018, 34(18): 261-267. MEI Y, WEI K H, CUI N Q, et al. Nitrogen distribution and ammonia emission characteristics in different livestock manure treatment processes in intensive dairy farms[J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2018, 34(18): 261-267.
- [10] 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.
- [11] 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(1): 5195-5204.
- [12] 张玉秀, 孟晓山, 王亚伟, 等. 畜禽废弃物厌氧消化过程的氨氮抑制及其应对措施研究进展[J]. 环境工程学报, 2018, 12(4): 985-998. ZHANG Y X, MENG X S, WANG Y W, et al. Research progress of ammonia inhibition and counter measures during anaerobic digestion of livestock wastes[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2018, 12(4): 985-998.
- [13] ZHANG K, GU J, WANG X, et al. Analysis for microbial denitrification and antibiotic resistance during anaerobic digestion of cattle manure containing antibiotic[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 291: 121803.
- [14] 李政伟, 尹小波, 王星, 等. 餐厨垃圾高温中试两相厌氧发酵的稳定性[J]. 环境工程学报, 2016, 10(11): 6662-6668. LI Z W, YI X B, WANG X, et al. A pilot-scale study on the stability of two-phase anaerobic digestion of food waste under thermophilic conditions[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2016, 10(11): 6662-6668.
- [15] SALYERS A A, SHOEMAKER N B, STEVENS A M, et al. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements[J]. *Microbiological Review*, 1995, 59(4): 579-590.
- [16] 张虹, 李蕾, 彭韵, 等. 氨氮对餐厨垃圾厌氧消化性能及微生物群落的影响[J]. 中国环境科学, 2020, 40(8): 3465-3474. ZHANG H, LI L, PENG Y, et al. Effects of ammonia on anaerobic digestion of food waste: Process performance and microbial community[J]. *China Environmental Science*, 2020, 40(8): 3465-3474.
- [17] THOMAS C M, NIELSEN K M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(9): 711-721.
- [18] CHEN B, 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*, 2015, 282: 61-67.
- [19] ZHANG Q, XU J, WANG X, 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 Tech-*

- nology, 2020, 320:124372.
- [20] 贾传钊, 李香真, 肖洪文, 等. 高氨氮浓度对产甲烷厌氧发酵过程中微生物活性及转录组的影响[J]. 中国沼气, 2019, 37(4):3-10. JIA C Z, LI X Z, XIAO H W, et al. Effects of high ammonium concentration on microbial community activity and metatranscriptome in biogas anaerobic digestion[J]. *China Biogas*, 2019, 37(4):3-10.
- [21] VRIEZE D J, SYLVIA G, RAMIRO V, et al. Inoculum selection is crucial to ensure operational stability in anaerobic digestion[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(1):189-199.
- [22] DOLLHOPF S L, HASHSHAM S A, DAZZO F B, et al. The impact of fermentative organisms on carbon flow in methanogenic systems under constant low-substrate conditions[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, 56(3/4):531-538.
- [23] 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.
- [24] SHAO S, HU Y, CHENG J, et al. Research progress on distribution, migration, transformation of antibiotics and antibiotic resistance genes (ARGs) in aquatic environment[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2018, 38(8):1195-1208.
- [25] ZHANG Q, XU J, WANG X, et al. Performance of full-scale aerobic composting and anaerobic digestion on the changes of antibiotic resistance genes in dairy manure[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 342:125898.
- [26] MEMAR M Y, YEKANI M, CELENZA G, et al. The central role of the SOS DNA repair system in antibiotics resistance: a new target for a new infectious treatment strategy[J]. *Life Sciences*, 2020, 262:118562.
- [27] KAJIHARA T, UCHINO S, SUZUKI M, et al. Human chorionic gonadotropin confers resistance to oxidative stress-induced apoptosis in decidualizing human endometrial stromal cells[J]. *Fertility and Sterility*, 2011, 95(4):1302-1307.