

高温持续时间对鸡粪堆肥中多重耐药菌、接合型质粒及耐药基因消减特征的影响

尹天奇, 孙兴滨, 高浩泽, 申磊, 姜欣然, 郭雅杰, 王旭明, 仇天雷

引用本文:

尹天奇, 孙兴滨, 高浩泽, 申磊, 姜欣然, 郭雅杰, 王旭明, 仇天雷. 高温持续时间对鸡粪堆肥中多重耐药菌、接合型质粒及耐药基因消减特征的影响[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(9): 2108–2119.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2023-0410>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

鸡粪-堆肥中重金属残留、抗生素耐药基因及细菌群落变化研究

邓雯文, 陈姝娟, 何雪萍, 晋蕾, 杨盛智, 余秀梅, 刘书亮, 邹立扣

农业环境科学学报. 2019, 38(2): 439–450 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0716>

规模化畜禽养殖场粪便中多重耐药菌分离鉴定及其耐药特征

唐伟欣, 孙兴滨, 高浩泽, 程首涛, 仇天雷, 王旭明

农业环境科学学报. 2020, 39(1): 207–216 <https://doi.org/10.11654/jaes.2019-0749>

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>

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>

堆肥过程中抗生素和耐药基因消减研究进展

王晓醒, 郭雪琦, 冯瑶, 冀拯宇, 刘聪, 李兆君

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



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

尹天奇, 孙兴滨, 高浩泽, 等. 高温持续时间对鸡粪堆肥中多重耐药菌、接合型质粒及耐药基因消减特征的影响[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(9): 2108–2119.

YIN T Q, SUN X B, GAO H Z, et al. Effects of continuous thermophilic phase on removal of multidrug-resistant bacteria, its conjugative plasmids and antibiotic resistance genes during chicken-manure composting[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2023, 42(9): 2108–2119.

高温持续时间对鸡粪堆肥中多重耐药菌、接合型质粒及耐药基因消减特征的影响

尹天奇^{1,2}, 孙兴滨^{1*}, 高浩泽², 申磊³, 姜欣然¹, 郭雅杰², 王旭明², 仇天雷^{2*}

(1. 东北林业大学林学院, 哈尔滨 150040; 2. 北京市农林科学院北京农业生物技术研究所, 北京 100097; 3. 廊坊师范学院, 河北廊坊 065000)

摘要: 为研究堆肥过程中高温持续时间对多重耐药大肠杆菌及其携带的接合型质粒和抗生素耐药基因 (Antibiotic resistance gene, ARGs) 消减规律的影响, 本研究在鸡粪堆肥初始物料中外源添加多重耐药大肠杆菌菌液, 并设置延长高温时间组 (CT组) 和常规堆肥组 (NT组) 两种堆肥条件处理, 利用选择性培养及 16S rRNA 基因扩增子测序技术检测多重耐药菌群变化规律, 同时利用数字 PCR 定量检测大肠杆菌 16S rRNA 基因、接合型质粒转移酶基因 (*MOBP*)、氨基糖苷类耐药基因 [*APH(3)-Ib*] 及磺胺类耐药基因 (*sul2*) 和 I 类整合子-整合酶基因 (*intI1*) 等污染物相对丰度变化, 对比获得了延长高温时间对多重耐药菌及其 ARGs 消减速率的影响。结果表明, 高温堆肥能够明显抑制堆肥中多重耐药菌的生长, 并且 CT 组对其的抑制效果明显好于 NT 组。堆肥结束后, 五种基因在 CT 组的相对丰度消减率为 79.82%~99.99%, 但 NT 组中腐熟期结束后 *APH(3)-Ib*、*sul2*、*intI1* 等基因相对丰度均高于初始物料。多重耐药大肠杆菌及其接合型质粒的消减规律均符合一级动力学方程, 但 *APH(3)-Ib*、*sul2* 和 *intI1* 等基因在 NT 组的消减动力学却呈现明显的两段化特征, 延长高温时间 (CT 组) 能够抑制腐熟期出现的反弹。细菌群落结构分析表明, NT 组中 ARGs 丰度再次增加与 *Moheibacter*、*Halomonas* 等菌属的富集相关。本研究表明, 在堆肥过程中, 延长高温持续时间, 可降低堆体中部分 ARGs 潜在宿主菌的丰度, 阻断其垂直传播的作用, 最终减少成品肥中 ARGs 的丰度。

关键词: 堆肥; 多重耐药菌; 耐药基因; 高温持续时间

中图分类号: S141.4 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2023)09-2108-12 doi:10.11654/jaes.2023-0410

Effects of continuous thermophilic phase on removal of multidrug-resistant bacteria, its conjugative plasmids and antibiotic resistance genes during chicken-manure composting

YIN Tianqi^{1,2}, SUN Xingbin^{1*}, GAO Haoze², SHEN Lei³, JIANG Xinran¹, GUO Yajie², WANG Xuming², QIU Tianlei^{2*}

(1. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 2. Institute of Biotechnology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China; 3. Langfang Normal University, Langfang 065000, China)

Abstract: To investigate the effect of continuous thermophilic phase on multidrug-resistant (MDR) *Escherichia coli*, its conjugative plasmid, and its antibiotic resistance genes (ARGs) during composting, MDR *E. coli* was inoculated into chicken-manure-composting raw material. Two treatments, namely normal thermophilic (NT) and continuous thermophilic (CT) composting treatments, were set up. Selective cultivation of MDR bacteria and 16S rRNA gene amplicon sequencing were used to monitor the variations in MDR bacteria.

收稿日期: 2023-05-26 录用日期: 2023-07-13

作者简介: 尹天奇 (1998—), 女, 黑龙江北安人, 硕士研究生, 从事环境抗生素耐药菌与耐药基因研究。E-mail: 1771312804@qq.com

*通信作者: 孙兴滨 E-mail: sunxingbin1025@163.com; 仇天雷 E-mail: qiutianlei@babrc.ac.cn

基金项目: 北京市自然科学基金面上项目 (6222013, 5222005); 北京市农林科学院创新能力建设专项 (KJCX20210424); 现代农业产业技术体系北京市创新团队专项 (BJJQ-G08)

Project supported: The Natural Science Foundation of Beijing, China (6222013, 5222005); Special Program for Creative Ability of Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences (KJCX20210424); Beijing Agriculture Innovation Consortium (BJJQ-G08)

Digital droplet PCR was used to quantify the relative abundance of 16S rRNA genes of *E. coli*, namely the mobility proteins (*MOBP*), aminoglycoside resistance gene (*APH(3)-Ib*), sulfonamide resistance gene (*sul2*), and class I integrase gene (*intl1*). The effects of the CT treatment on MDR bacteria and the ARG reduction rate were obtained by comparison. According to the results, high-temperature composting could inhibit MDR bacteria growth significantly, and the inhibitory effect of the CT treatment was superior to that of the NT treatment. After composting, the reduction rate of the five detected genes in CT treatment was from 79.82% to 99.99%, however, the relative abundance of *APH(3)-Ib*, *sul2*, *intl1* in NT treatment after ripening period was greater than that in the raw material. Reduction kinetics analysis of ARGs showed that the reduction of MDR *E. coli* and its conjugative plasmids conformed to the first-order reaction kinetics; however, the reduction kinetics of *APH(3)-Ib*, *sul2*, and *intl1* showed obvious two-stage characteristics. Prolonging the thermophilic phase could inhibit the rebound of ARGs (CT treatment) significantly and restrain the rebound in the maturing period. Finally, shifts in bacterial community structure during composting were analyzed. The increase in relative abundance of ARGs in the NT treatment was related to the enrichment of specific genera, such as *Moheibacter* and *Halomonas*. The results show that during composting, prolonging the thermophilic phase could reduce the abundance of bacteria, which could be potential hosts to drug resistance genes; inhibit the vertical transmission of ARGs; and finally reduce ARG abundance in the finished fertilizer.

Keywords: composting; multi-drug resistant bacteria; antibiotic resistance gene; continuous thermophilic phase

21世纪以来,抗生素耐药性严重威胁着全球人类的健康,美国每年约有2.3万人因感染抗生素耐药细菌而死亡^[1]。据WHO预测,到2050年因抗生素耐药性的全球死亡人数将达到1 000万^[2]。畜禽养殖业的抗生素使用量是人类医疗使用量的两倍^[3],多重耐药菌在畜禽粪便中的检出率越来越高^[4],因而畜禽粪便是环境中耐药细菌和抗生素耐药基因(Antibiotic resistance gene, ARGs)的重要来源^[5]。耐药细菌和ARGs会随畜禽粪便排出后通过有机肥料或者土壤传播到环境中,再通过食物链传播到人体,对人类健康造成潜在威胁^[6]。

高温堆肥是畜禽粪便无害化处理的有效途径,堆肥过程中温度、微生物群落组成、理化性质等都能够影响ARGs的丰度^[7],尤其是堆肥的高温对于畜禽粪便中ARGs的消减十分重要。当堆肥进入高温期后,ARGs丰度会出现明显下降,同时也能有效降低基因水平转移的风险^[8],但Liao等^[7],Sardar等^[9]发现部分基因的相对丰度在高温期结束后出现了增长趋势,而该增长与ARGs的宿主菌在降温期的增长密切相关。近期有研究发现延长堆肥高温持续时间能够提高抗生素的降解效率,且持续的高温处理也能够显著降低堆肥产品中部分ARGs的相对丰度^[10]。延长堆肥高温持续时间能否有效控制耐药菌及其ARGs在堆肥降温期的反弹是改进现有堆肥工艺和有效控制ARGs水平转移的关键问题。因此,本研究设置延长高温时间(CT)和常规堆肥(NT)两种鸡粪堆肥处理,同时在堆肥原料中外源添加携带接合型耐药质粒的多重耐药大肠杆菌,利用选择性培养、数字PCR以及16S rRNA基因扩增子测序技术,分析延长高温时间对多

重耐药大肠杆菌及其接合型质粒与ARGs的消减规律的影响,同时解析两种堆肥方式对定量ARGs相关宿主菌群演替规律的影响,以期为更好地利用堆肥技术控制畜禽养殖粪便中的ARGs污染,阻控其在相关环境内的传播奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 堆肥系统和原料

堆肥试验在6台50 L台式圆柱形不锈钢堆肥反应器中进行,反应器底部连接气泵,通过气体流量计可控制通风供氧速率。反应器内温度主要采用外围电阻控制加温。同时,设有多个传感器和智能监测系统,可实时监测反应器内部多点温度、压力、气流等。

堆肥原料由鸡粪和玉米秸秆粉(粒径为2~3 cm)组成,均取自北京市平谷区某蛋鸡养殖场。将鸡粪和玉米秸秆按5:1质量比例混合,混合均匀后加水调节含水率至60%。用五点取样法取出14 kg混合物加入大肠杆菌XT13A1菌液搅拌均匀,XT13A1菌株分离自养殖场鸡粪,其携带接合型转移质粒携带有I类整合子-整合酶基因(*intl1*,简称为I类整合酶基因)、代表接合型质粒的转移酶基因*MOBP*、氨基糖苷类耐药基因*APH(3)-Ib*及磺胺类耐药基因*sul2*^[11],使其终浓度达到 4.77×10^7 CFU·g⁻¹,使用透水透气的尼龙隔离网袋(长40 cm,宽30 cm,孔径2 mm)分装成7袋(2 kg·袋⁻¹)。

1.2 堆肥试验设计

本次堆肥历时40 d,试验设置两个处理组,分别为常规堆肥组(NT)和延长高温时间组(CT),每个处理组设3个重复。NT组0~27 d进行自然堆肥过程,

CT组0~11 d自然堆肥,12~27 d设置温度55 ℃,延长堆肥高温期。堆肥过程中曝气速率保持在0.05 L·(min·kg)⁻¹。6台堆肥反应器中分别加入27 kg堆肥原料混合物,堆体内部埋入尼龙隔离网袋样品,保证其与反应器内未加菌堆体隔离。同时反应器外放置一个网袋,不参与堆肥过程(CK组)。分别在堆肥的第0、4、11、27、40天进行翻堆混匀并采集网袋内样品,样品命名分别为:第0天取样(初始物料)、第4天CT取样(CT-高温期)、第4天NT取样(NT-高温期)、第4天CK取样(CK-前期)、第11天NT取样(NT-高温期结束)、第27天CT取样(CT-高温期结束)、第27天NT取样(NT-腐熟期结束)、第27天CK取样(CK后期)、第40天CT取样(CT-腐熟期结束)。采集样品后在24 h内进行总菌和耐药菌的计数,另一部分于-20 ℃保藏,用于样品DNA提取和数字PCR实验。

1.3 总菌及多重耐药菌计数

称取10 g堆肥样品,倒入已灭菌的90 mL生理盐水三角瓶中,摇床振荡15 min使堆肥样品均匀分散,吸取悬浮液进行梯度稀释。稀释液涂布对应培养基:细菌总数采用普通LB营养琼脂固体培养基,多重耐药菌的计数采用添加抗生素的LB固体培养基,每组3个重复。添加的抗生素包括四环素(16 μg·mL⁻¹)、恩诺沙星(1 μg·mL⁻¹)、磺胺甲噁唑(76 μg·mL⁻¹)、泰乐菌素(1 μg·mL⁻¹)、庆大霉素(20 μg·mL⁻¹)。抑菌浓度参考2011年美国临床实验室标准化协会(CLSI)规定值^[12]。涂布后平板倒置于28 ℃恒温箱中,培养48

h,选取菌落数为30~300的平板进行计数,刮取菌体于保藏-80 ℃。

1.4 DNA提取及数字PCR定量检测

1.4.1 多重耐药细菌DNA提取及测序

使用TIANamp Bacteria DNA Kit试剂盒,从多重耐药菌混菌中提取细菌DNA,经检测后送往上海美吉生物科技有限公司进行16S rRNA基因扩增子测序。

1.4.2 耐药基因引物设计与数字PCR定量检测

根据多重耐药大肠杆菌XT13A1的基因设计肠杆菌16S rRNA基因特异性引物;同时,根据耐药菌携带的质粒序列,设计I类整合子-整合酶基因(*intI1*, 简称为I类整合酶基因)、大肠杆菌16S rRNA基因、代表接合型质粒的转移酶基因的*MOBP*基因、氨基糖苷类耐药基因*APH(3)-Ib*及磺胺类耐药基因*sul2*对应的Taqman探针引物。*intI1*和细菌16S rRNA基因引物参照文献[13]。数字微滴式PCR反应在QX200 Droplet Digital PCR Systems中完成,选用Trans PCR SuperMix,反应条件:95 ℃预变性5 min;95 ℃变性1 min,58 ℃退火30 s,72 ℃延伸60 s,共30个循环;72 ℃延伸5 min。引物名称及引物序列见表1。

1.5 数据统计分析

利用软件Origin(v9.6.5)进行试验数据的整理和作图。根据时间与定量基因相对丰度变化,进行非线性回归分析,使用一级动力学反应方程对试验数据进行拟合,方程如下:

$$C = C_0e^{-kt}$$

表1 引物名称及引物序列
Table 1 Primer and primer sequences

目标基因 Target gene	引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence
<i>BACT16S rRNA</i> 基因	<i>BACT1369F</i>	5'-CGGTGAATACGTTTCYCGG-3'
	<i>PROK1492R</i>	5'-CGWTACCTTGTACGACTT-3'
	<i>Tm1389F</i>	5' FAM-CTTGTACACACCGCCCGTC-BHQ13'
<i>intI1</i>	<i>intI1-LC1</i>	GCCTTGATGTTACCCGAGAG
	<i>intI1-LC5</i>	GATCGGTGCAATGCGTGT
	<i>IntI1-probe</i>	5' FAM-ATTCTGCGCCGTGGTTCCTGGGTTTT-BHQ1 3'
<i>APH(3)-Ib</i>	<i>APH(3)-Ib-F</i>	CCGAACCTCATGGTGGACCC
	<i>APH(3)-Ib-R</i>	CTCTGCTTCATCTGGCGCTG
	<i>APH(3)-Ib-probe</i>	AATGCACGGGTCTGATCGACCTTGGGC
<i>sul2</i>	<i>sul2-F</i>	GGTATCAAACGCAACCGCCT
	<i>sul2-R</i>	AAACAGACAGAAGCACCGGC
	<i>sul2-probe</i>	TCGGTGCTGGCGCGGTTCGATGAAT
<i>MOBP</i>	<i>MOBP-F</i>	GTGATCTCGAGGCCCGTTTG
	<i>MOBP-R</i>	CCTGTTTATCTGCCAGCGCA
	<i>MOBP-probe</i>	ACGGGAGTGTTCTGTTCCGTGACCGT
肠杆菌 16S rRNA 基因	肠杆菌 16S rRNA 基因-F	TCGCTTTGGCATCCGAACTC
	肠杆菌 16S rRNA 基因-R	GCATTGGGAAGAAGCGCTCA
	肠杆菌 16S rRNA 基因-probe	ACTACCTACGCCCCACGGCGTGGT

式中: C 为 t 时基因的相对丰度, $\text{copies} \cdot 16\text{S rDNA copies}^{-1}$; C_0 为堆肥开始时基因的相对丰度, $\text{copies} \cdot 16\text{S DNA copies}^{-1}$; k 为耐药基因消减速率常数, d^{-1} 。

对于不符合一级动力学反应方程的基因运用R语言ggmisc包进行分段线性回归分析。

2 结果与讨论

2.1 高温堆肥过程中温度变化

温度是判断堆肥过程的重要参数^[14]。根据温度变化曲线图(图1)可以看出,CK处理组始终保持室温28~29℃左右,NT和CT处理组都经历了升温期、高温期和腐熟期3个典型阶段。堆肥初期升温较快,约1 d的时间升至50℃以上。NT处理组的高温阶段持续到第11天,最高温度为59.7℃,从第12天开始逐步下降至室温,第27天完成堆肥发酵过程。CT处理组通过额外的加热控制系统延长高温期,12~27 d温度始终保持55℃左右。27 d后温度开始逐步下降至室温,第40天完成发酵过程。

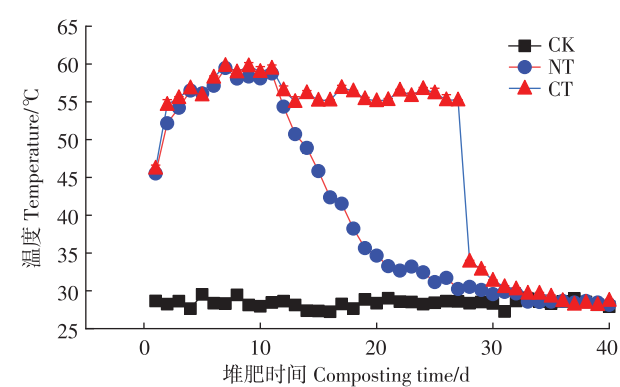


图1 不同处理组温度变化趋势

Figure 1 Temperature variation trend of different treatment groups

2.2 高温堆肥过程中细菌总数及多重耐药菌数的变化

如表2所示,在整个堆肥过程中,NT和CT组的总菌数变化趋势相同,CT组总菌数从初始的 $(4.0 \pm 0.30) \times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ 降低到 $(3.2 \pm 0.35) \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$,降低了2个数量级,消减率为99.2%;NT组总菌数从初始的 $(4.0 \pm 0.30) \times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ 降低到 $(1.1 \pm 0.41) \times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$,消减率为72.5%。CK组总菌数从前期 $(7.7 \pm 0.25) \times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ 增长到后期的 $(9.2 \pm 0.46) \times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$,增长率为16.3%。由此可见,对比不参与堆肥的CK组,堆肥可以有效降低总菌数,这与姜欣然等^[11]的堆肥模拟实验结果相类似。

初始物料中多重耐药菌数量为 $(9.2 \pm 0.35) \times 10^7$

$\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$,在第4天CK组多重耐药菌数量减少到 $(2.9 \pm 0.12) \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$;而处于堆肥高温期的NT组和CT组都未检出,说明堆肥高温可以有效灭活原料中的多重耐药菌,可以降低耐药致病菌随有机肥进入土壤的风险^[15]。然而,王瑶等^[16]发现堆肥后猪粪中红霉素、金霉素等抗生素耐药菌均能够在堆肥后继续存活,说明多重耐药菌比单一耐药菌更易被堆肥高温灭活。然而在第27天NT组(NT-腐熟期结束)又有多重耐药菌的出现,而延长高温的CT组即使在腐熟期结束后都始终没有多重耐药菌被检出,这说明了延长高温后能够明显抑制多重耐药菌的反弹。

表2 总菌数和多重耐药菌数量变化

Table 2 Changes in the number of multidrug-resistant bacteria and total bacterial count

样品名称 Sample name	总菌数 Total bacterial count/($\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$)	多重耐药菌数量 Count of MDRB/($\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$)	多重耐药菌比例 Proportion of MDRB/%
初始物料	$(4.0 \pm 0.30) \times 10^8$	$(9.2 \pm 0.35) \times 10^7$	23
NT-高温期	$(5.6 \pm 0.08) \times 10^4$	—	—
CT-高温期	$(5.1 \pm 0.24) \times 10^4$	—	—
CK-前期	$(7.7 \pm 0.25) \times 10^8$	$(2.9 \pm 0.12) \times 10^6$	0.37
NT-高温结束	$(5.9 \pm 0.45) \times 10^3$	—	—
NT-腐熟结束	$(1.1 \pm 0.41) \times 10^8$	$(2.5 \pm 0.21) \times 10^4$	0.023
CT-高温结束	$(2.6 \pm 0.17) \times 10^6$	—	—
CK-后期	$(9.2 \pm 0.46) \times 10^8$	$(9.8 \pm 0.25) \times 10^4$	0.011
CT-腐熟结束	$(3.2 \pm 0.35) \times 10^6$	—	—

2.3 多重耐药菌群落组成变化分析

收集初始物料、NT-腐熟期结束、CK的前期和后期样品中的多重耐药菌并进行16S rRNA扩增子测序,共获得有效序列168 327条,平均序列长度424 bp,共有239个OTU。从图2可以看出,由于在第0天初始样品中添加大肠杆菌XT13A1,所以初期*Escherichia*占绝对优势,相对丰度达到99.9%。从图中可以看出,CK前期样品中可能由于多重耐药质粒向其他细菌进行了转移,导致物种多样性相比原始物料明显增多,从组成分析可以看出主要有*norank_f_Sphingobacteriaceae* (8.99%)、*Halomonas* (8.89%)、*Ulvibacter* (6.81%)和*norank_f_Xanthomonadaceae* (5.62%)。然而在CK后期样品中多重耐药菌种类明显减少,主要以*Glutamicibacter* (51.9%)为优势属,其次为*Pseudomonas* (23.3%)、*Paenaltcaligenes* (16.39%)。该结果可以说明即使未进行堆肥,该耐药质粒也会随时间的延长而在缺少抗生素环境压力

的情况下被淘汰,导致整体菌群的多重耐药性下降。堆肥腐熟期结束后的 NT 样品中 *Paenaltcaligenes* 占明显优势,相对丰度为 96.87%,其次是 *Pusillimonas* 占 3.70%。但这两种菌属在第 0 天的检测中几乎没有。出现这种结果可能与 ARGs 的转移作用有关。一种可能是水平转移作用由于人为添加的多耐药菌株 XT13A1 所携带的多耐药质粒接合转移到了其他耐热菌属,从而导致多重耐药菌在堆肥结束后有所增长^[17]。另一种可能为堆肥高温会阻断多重耐药菌的水平转移作用,但 *Paenaltcaligenes* 和 *Pusillimonas* 多重耐药菌属本身就有这类多重耐药 ARGs,由于耐受高

温而在堆肥过程出现了富集,即垂直传播。因此,我们进一步对多重耐药菌及其质粒上携带的 ARGs 进行了定量分析,解析不同传播特征的 ARGs 在堆肥过程中的消减规律。

2.4 堆肥过程中耐药基因相对丰度的变化

ARGs 的相对丰度通常表征菌群中相应耐药水平的高低^[18]。堆肥过程中,耐药基因、I 类整合子和代表型接合质粒的相对丰度和削减率的关系如图 3 所示,从图 3 可以看出,在堆肥过程中,肠杆菌特异的 16S rRNA 基因和代表多重耐药质粒的(MOBP 基因)消减良好。肠杆菌 16S rRNA 基因在 CT 组的相对丰

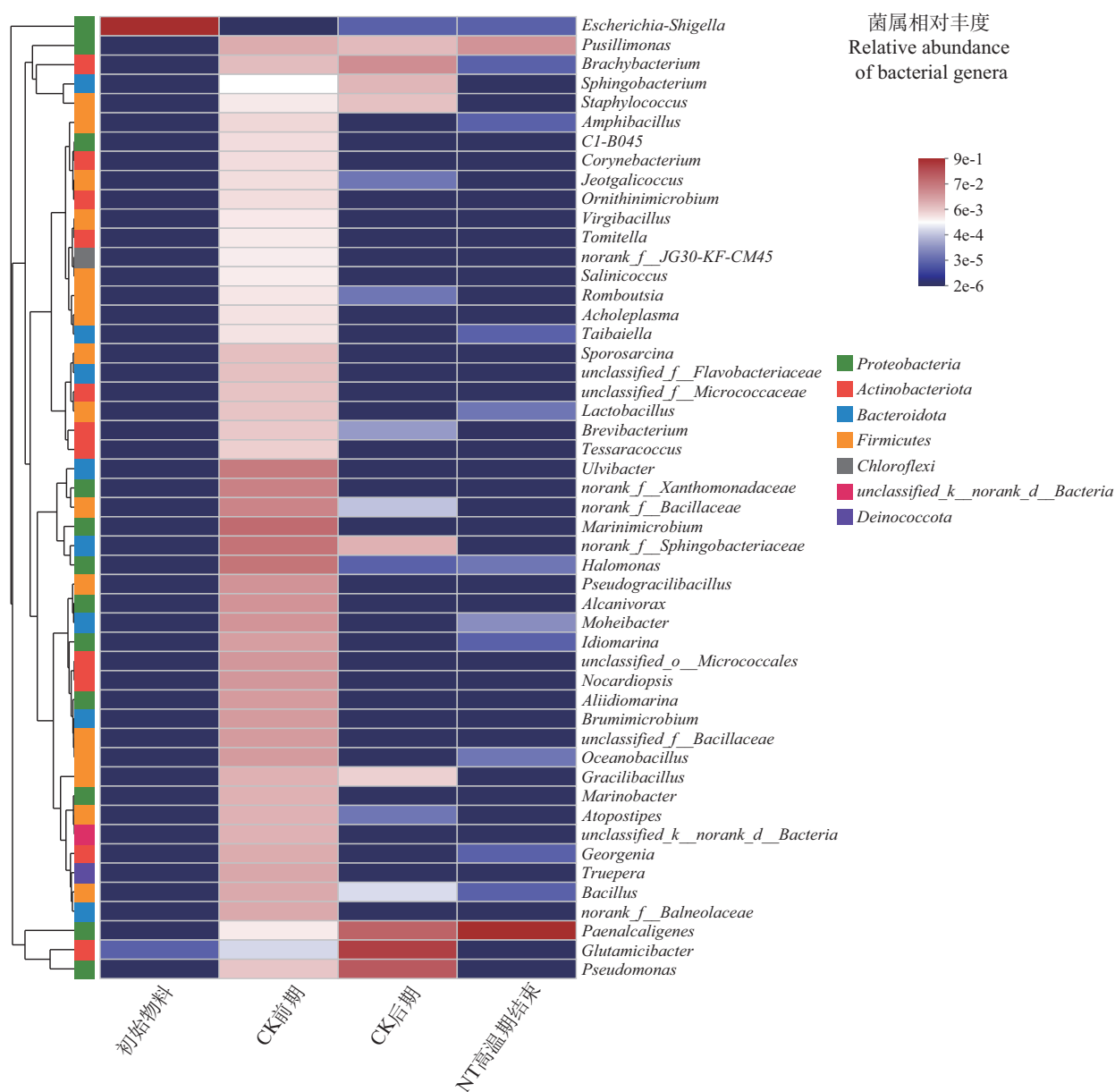


图2 多重耐药菌菌群在属水平上的分布

Figure 2 Distribution of multidrug-resistant bacterial flora at the genus level

度从初始原料中的 $8.61 \times 10^{-3} \text{ copies} \cdot 16\text{S rDNA copies}^{-1}$ 降低到堆肥腐熟期结束时的 $1.53 \times 10^{-5} \text{ copies} \cdot 16\text{S rDNA copies}^{-1}$, 消减率为 99.80%。在 NT 组相对丰度从初始原料中的 $7.06 \times 10^{-3} \text{ copies} \cdot 16\text{S rDNA copies}^{-1}$ 降低到 $1.47 \times 10^{-5} \text{ copies} \cdot 16\text{S rDNA copies}^{-1}$, 消减率为 99.79%。*MOBP* 基因 CT 组中相对丰度从初始原料中的 $6.04 \times 10^{-4} \text{ copies} \cdot 16\text{S rDNA copies}^{-1}$ 降低到腐熟期结束时的 $4.66 \times 10^{-7} \text{ copies} \cdot 16\text{S rDNA copies}^{-1}$, 消减率为 99.92%; NT 组中相对丰度从初始原料中的 $5.16 \times 10^{-4} \text{ copies} \cdot 16\text{S rDNA copies}^{-1}$ 降低到 $9.78 \times 10^{-7} \text{ copies} \cdot 16\text{S rDNA copies}^{-1}$, 消减率为 99.81%, 说明堆肥对于

添加的多重耐药菌及质粒均有良好的消减效果。

虽然大肠杆菌及耐药质粒的代表基因均出现明显下降, 但同为多重耐药菌携带的 *APH(3)-Ib*、*sul2* 和 *intI1* 三种耐药基因的相对丰度却未出现持续下降, 尤其在 NT 组, 反而随着堆肥高温期结束而逐渐升高。从图 3 可以看出在 CT 组中, *APH(3)-Ib*、*sul2* 和 *intI1* 在高温期结束时相对丰度明显降低, 经历腐熟期后, 相对丰度几乎不变。由于代表接合型耐药质粒的基因有明显下降, 说明这三种基因传播的增长不会来自于接合转移的水平转移作用, 而可能通过耐药基因随宿主增长的垂直传播作用, 因此延长高温的堆肥时间

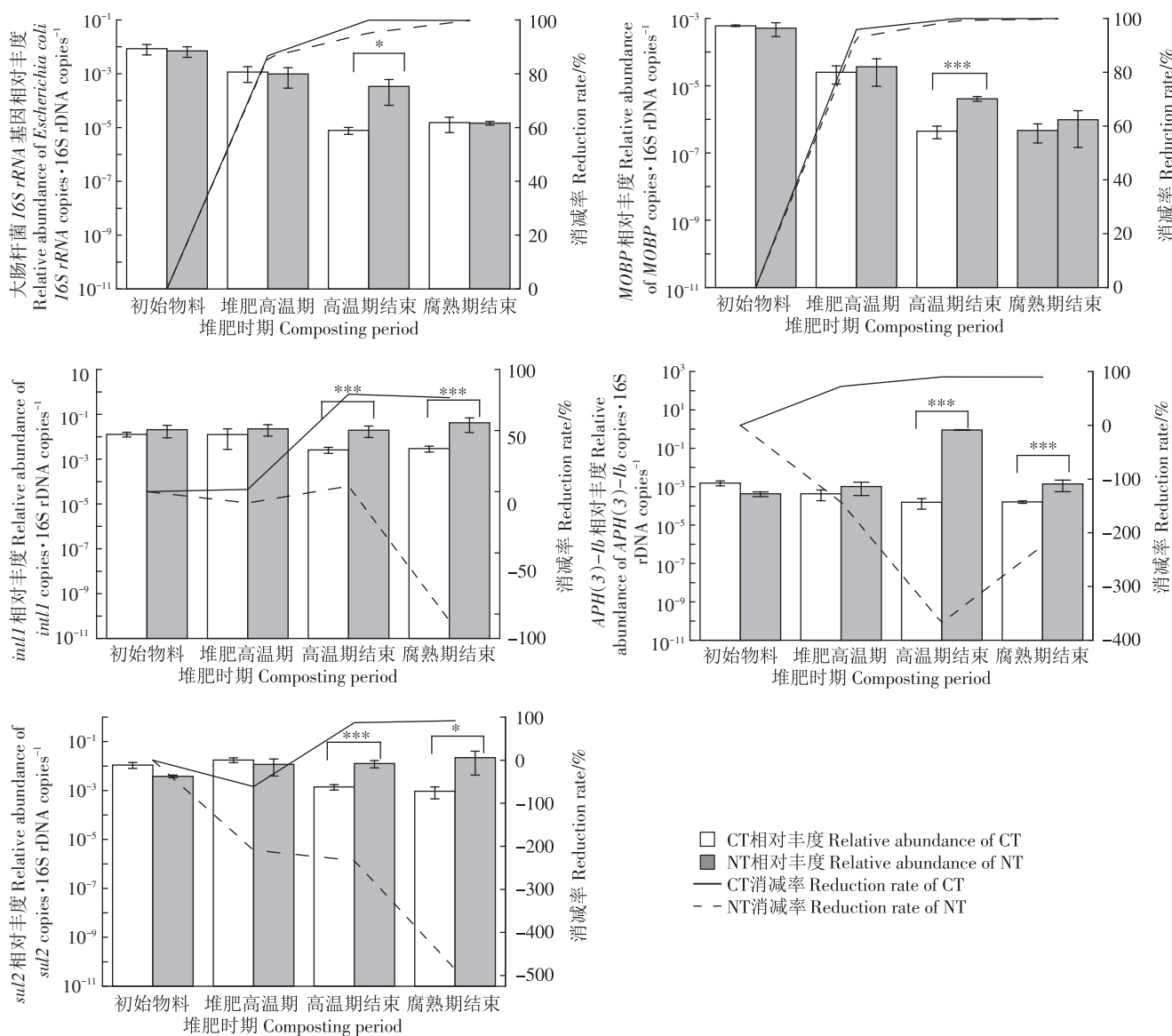


图3 堆肥不同时期耐药基因、I类整合子和代表型接合质粒的相对丰度和消减率

Figure 3 Relative abundance and reduction rate of drug resistance genes, and I integron-integratase gene representative conjugation plasmids in compost at different periods

是能够有效抑制耐药基因的垂直传播作用。具体来说,在CT组中,*APH(3)-Ib*基因的相对丰度从初始物料 1.55×10^{-3} copies · 16S rDNA copies⁻¹ 下降到 1.53×10^{-4} copies · 16S rDNA copies⁻¹,消减率为90.18%;*sul2*基因的相对丰度从初始物料 1.09×10^{-2} copies · 16S rDNA copies⁻¹ 下降到 0.14×10^{-2} copies · 16S rDNA copies⁻¹,消减率为87.19%。Qian等^[19]也发现延长高温持续时间可以使*sul2*基因的相对丰度较常规堆肥大幅下降。*intl1*从初始物料 1.28×10^{-2} copies · 16S rDNA copies⁻¹ 下降到 0.26×10^{-2} copies · 16S rDNA copies⁻¹,消减率为79.7%。但是在NT组中,三种基因在高温期结束时的相对丰度与和CT组相比都存在显著差异,*APH(3)-Ib*基因和*sul2*高温期结束时相对丰度分别为 9.01×10^{-1} copies · 16S rDNA copies⁻¹和 1.25×10^{-2} copies · 16S rDNA copies⁻¹,相比初始物料都有所上升。Sardar等^[9]的牛粪玉米秸秆的堆肥实验后期*sul1*基因相对丰度也出现了升高的现象。初始物料中*intl1*相对丰度为 2.05×10^{-2} copies · 16S rDNA copies⁻¹,在高温期结束后相对丰度较初始物料变化较小,但是在腐熟期结束后增长到 4.21×10^{-2} copies · 16S rDNA copies⁻¹。综合可培养耐药菌及ARGs的结果表明,由于延长高温持续时间,CT组中耐药基因在消减后没有出现明显上升;但是NT组在高温期结束后,携带ARGs的细菌获得恢复生长,导致相应ARGs相对丰度增加。

2.5 堆肥过程中耐药菌及耐药基因的消减动力学分析

为研究堆肥过程中耐药菌及其ARGs消减速率特征,按堆肥时间对堆肥过程中ARGs相对丰度数据进行拟合。首先对堆肥中的5种ARGs相对丰度进行非线性数据拟合,对比拟合曲线的决定系数(*R*²,表3)发现,肠杆菌特异的*16S rRNA*基因和质粒*MOBP*基

因消减规律符合一级动力学方程(*R*²值均大于0.99),而*sul2*、*intl1*和*APH(3)-Ib*消减规律并不符合一级动力学方程。肠杆菌特异的*16S rRNA*基因的CT组拟合曲线,消减速率常数为0.192,半消减期3.61 d。NT组消减速率常数为0.237,半消减期2.92 d,两者在15 d内相对丰度分别降低到 3.931×10^{-5} copies · 16S rDNA copies⁻¹和 4.860×10^{-5} copies · 16S rDNA copies⁻¹。说明常规堆肥能够在15 d内对肠杆菌产生有效消减,这与前期堆肥的模拟研究结果一致^[20]。*MOBP*在CT组中消减速率常数为0.277,半消减期2.50 d;NT组中消减速率常数为0.241,半消减期为2.87 d。两个处理中半消减期均小于3 d,且消减速率都快于肠杆菌,说明在堆肥高温环境下,多耐药质粒的稳定性差于肠杆菌,更容易丢失^[21]。消减规律符合一级动力学方程说明,堆肥使得多重耐药菌以及质粒的比例以稳定速率减少,即达到一定高温时间后污染物可被消除。然而,另一方面为质粒携带的*APH(3)-Ib*、*sul2*和*intl1*基因的消减规律并不符合一级动力学方程,主要原因是三者在高温期结束后(尤其是NT组)会出现明显的相对丰度反弹,由于质粒代表序列未出现同步反弹,此时增长的部分是与添加质粒无关的堆肥原料粪污所贡献,说明能够耐受高温的堆肥土著菌的垂直传播作用更为占优势,使得相关ARGs出现反弹^[22]。

采用分段法对*APH(3)-Ib*、*sul2*和*intl1*等三种不符合一级动力学的ARGs相对丰度进行线性直线回归分析(图4)。可以看出无论CT还是NT组高温期对三者均有一定消减效果,另外是否有额外的高温期,对三种基因的相对丰度是否反弹影响很大。从拟合结果可以看出,第15天后的曲线拟合结果NT与CT组相差较大。CT组中3种ARGs相对丰度在堆肥后

表3 堆肥中基因相对丰度的消减速率和半消减期

Table 3 Dissipation rate and elimination half-life of ARGs in compost based on relative abundance

ARGs	分组 Groupe	一级动力学方程 First-order dynamic equation	决定系数 <i>R</i> ²	消减速率常数/d ⁻¹ Elimination rate constant	半消减期/d ⁻¹ Half reduction period
<i>MOBP</i>	CT	$C=6.04\times10^{-4}\times e^{-0.277\ 4t}$	0.999	0.277	2.50
	NT	$C=5.16\times10^{-4}\times e^{-0.241\ 1t}$	0.998	0.241	2.87
<i>APH(3)-Ib</i>	CT	$C=1.55\times10^{-3}\times e^{-0.089\ 3t}$	0.218	—	—
	NT	$C=4.25\times10^{-4}\times e^{0.045\ 2t}$	-0.269	—	—
<i>sul2</i>	CT	$C=1.09\times10^{-2}\times e^{-0.079\ 1t}$	0.646	—	—
	NT	$C=3.78\times10^{-4}\times e^{0.068\ 1t}$	0.331	—	—
<i>intl1</i>	CT	$C=1.28\times10^{-2}\times e^{-0.061\ 5t}$	0.333	—	—
	NT	$C=6.04\times10^{-4}\times e^{0.027\ 6t}$	0.462	—	—
肠杆菌 <i>16S rRNA</i> 基因	CT	$C=1.15\times10^{-3}\times e^{-0.191\ 9t}$	0.999	0.192	3.61
	NT	$C=7.06\times10^{-3}\times e^{-0.237\ 3t}$	0.993	0.237	2.92

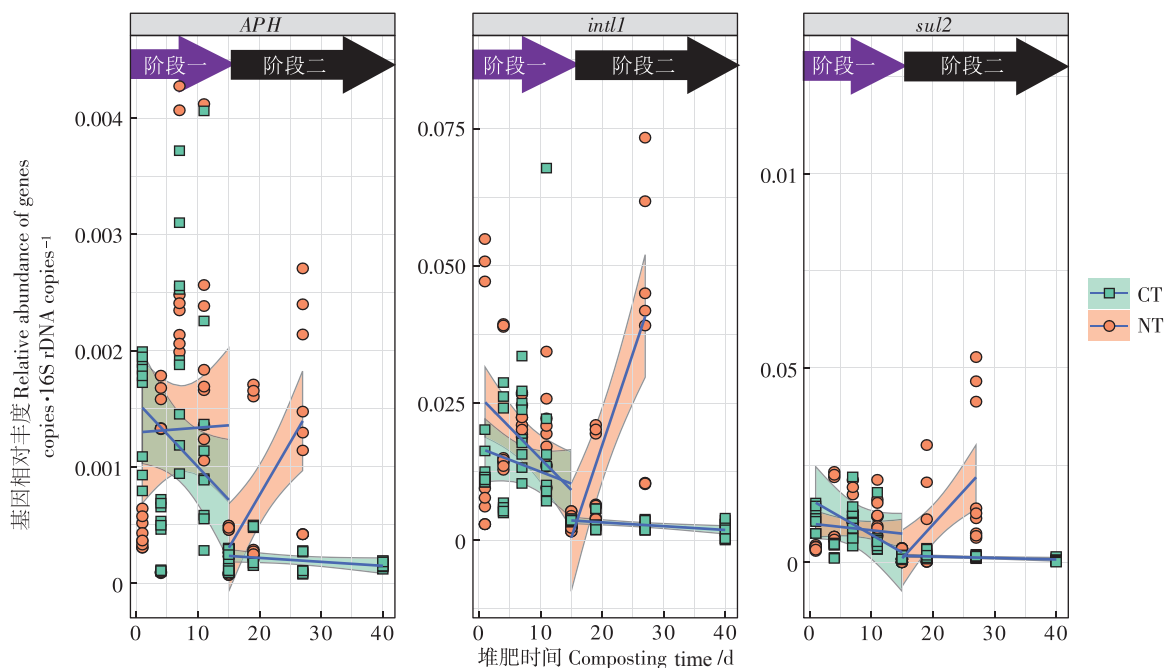


图4 堆肥过程中不同处理组中 I 类整合子和耐药基因相对丰度消减曲线

Figure 4 Relative abundance reduction curves of I integron-integratase gene and drug resistance genes in different composting groups

期过程中仍以一定的速率下降,消减速率从快到慢分别为 *int11* (6.94×10^{-5}) > *sul2* (3.7×10^{-5}) > *APH(3)-Ib* (3.42×10^{-6})。在腐熟期结束后对比第0天都有明显的去除效果。但NT组中 *APH(3)-Ib*、*sul2* 和 *int11* 在第15天后相对丰度都以一定的速率上升,增长速率分别为 9.09×10^{-5} 、 1.74×10^{-3} 、 3.37×10^{-3} ,在腐熟期结束后对比原料并没有明显的去除效果。综上,相关ARGs的宿主菌并未经过堆肥高温获得有效去除,而是随着高温结束后出现了明显富集,延长高温持续时间对控制ARGs在腐熟期的反弹具有良好效果。

2.6 延长高温持续时间对堆肥细菌群落结构的影响

微生物是影响堆肥腐熟进程的主要驱动力^[23],堆肥的高温期能更有效地杀死细菌宿主并破坏质粒^[24]。堆肥不同时期菌群在属水平上的分布如图5所示,在初始物料中优势菌属主要是厚壁菌门中的 *Pseudogracilibacillus*、*Lactobacillus*、*Oceanobacillus* 等以及放线菌门的 *Corynebacterium* 等。在堆肥高温期, *Bacillus*、*Sinibacillus* 等耐热或者嗜热细菌逐渐成为优势。*Bacillus* 属于厚壁菌门,厚壁菌在高温期可以形成耐热孢子以抵抗高温,还可以促进堆体中有机类物质的降解^[25]。但是由于CT和NT高温持续时间的不同,两组在高温期结束时优势菌属也有着显著区别, *Oceanobacillus*、*Sinibacillus*、*Thermobifida*、*unclassified_f_Bacillaceae* 和 *Gracilibacillus* 等在CT中的相对

丰度都高于NT组。其中 *Thermobifida* 的相对丰度差别最大,在CT组中为23.91%,远高于NT组的0.98%,说明延长高温时间有利于耐高温的 *Thermobifida* 的明显富集。Zhang等^[26]的堆肥研究中发现 *Thermobifida* 在高温期中丰度增加了1.8倍。*Halocella* 在两组中的相对丰度也存在明显差异,分别为0.67%和4.45%。*Thermobacillus* 在NT组中相对丰度为2.48%,但是在CT组中只有0.29%,说明延长堆肥高温期更有利于 *Halocella* 和 *Thermobacillus* 相对丰度的下降。在堆肥腐熟期结束时,CT处理组中 *norank_f_Limnochordaceae* 和 *Thermobifida* 两菌属占比最大,分别为23.24%和21.14%。而NT组中腐熟期结束时 *Moheibacter*、*Halomonas* 丰度出现明显增长,相对丰度占比分别为10.54%和5.31%,可以看出这两种菌群在NT-腐熟期间再次出现了富集,说明了延长高温持续时间的CT组对 *Moheibacter*、*Halomonas* 等常温菌有较好的抑制效果。

2.7 细菌群落与抗性基因的相关性分析

ARGs的变化更多地取决于潜在宿主细菌的动态变化,确定堆肥过程中与ARGs相关的潜在人类致病菌变化也具有重要意义^[27]。选择丰度前三十的菌属与大肠杆菌16S rRNA基因、*MOBP*、*APH(3)-Ib*、*sul2* 以及 *int11* 基因进行相关性分析见图6。氨基糖苷类和磺胺类抗生素是预防细菌感染和临床中常用的抗

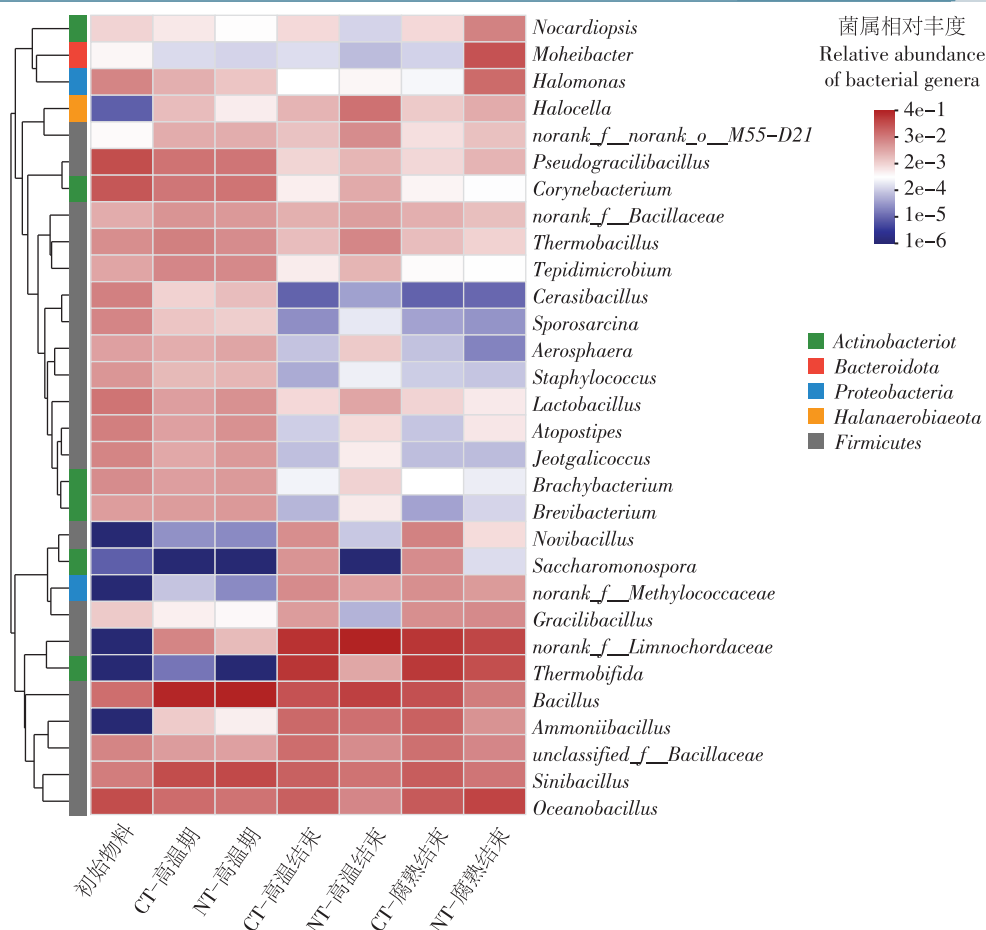


图5 两处理组堆肥不同时期菌群在属水平上的分布

Figure 5 Genus-level community composition heatmap of two treatment groups at different periods

生素类型^[28],与磺胺类耐药基因 *sul2* 相关的菌属有 *Pseudogracilibacillus*、*Aerosphaera*、*Sporosarcina* 等菌属,该类微生物随着高温持续时间延长而得到了有效控制,CT组四种菌属的相对丰度均低于NT组,分别相差0.36%、0.34%、0.041%,说明 *sul2* 基因在NT中的增长与这些潜在宿主是直接相关的。氨基糖苷类耐药基因 *APH(3)-Ib* 也观察到类似的规律,与 *APH(3)-Ib* 基因相对丰度相关的菌属有 *Lacobacillus*、*Corynebacterium*、*Thermobacillus*,这些潜在宿主在CT组中同样得到显著抑制,高温期结束后这些菌属的相对丰度NT较CT分别高出0.783%、0.749%、1.96%。与以上两种垂直传播的抗性基因不同,CT组中与 *intl1* 显著相关的 *Oceanobacillus*、*Gracebacillus*、*Saccharomonospora* 等3个菌属,在CT和NT最终堆肥产物中相对丰度组成特点各不相同,*Oceanobacillus*在NT中更多,*Gracebacillus*在两个处理中基本没有差异,而 *Saccaromonaspora*在CT组中更为丰富,可能原因是 *intl1* 为典型的

基因水平转移元件,分布更为广泛,很难用单一或少数菌体的丰度增加或减少来关联其潜在宿主。葡萄球菌是一种常见的病原菌,能够引起各种类型的炎症^[29]。Duan等^[30]发现葡萄球菌与 *tetX*、*ermX* 等 ARGs 和 MGEs (*intl1*、*ISCR1*) 显著相关,可能是这些 ARGs 和 MGEs 的宿主,控制这种细菌属可能有助于抑制 ARGs 的传播。本次实验在CT组中 *APH(3)-Ib* 和 *sul2* 相对丰度都与葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 有关,且经过延长高温后,葡萄球菌属相对丰度明显低于NT组,说明延长高温有利于减少 *APH(3)-Ib* 和 *sul2* 等 ARGs 潜在病原菌宿主-葡萄球菌属的相对丰度,有类似规律的还有 *Pseudogracilibacillus*、*Corynebacterium*、*Atopostipes* 等,我们在CT组腐熟过程中并未观察到 *APH(3)-Ib* 和 *sul2* 等基因相对丰度的明显反弹。因此,常规堆肥不足以完全消除通过鸡粪中耐药细菌和所携带的 ARGs,适当延长高温持续时间可以抑制堆肥高温期后 ARGs 相关细菌的生长,这为有效抑制

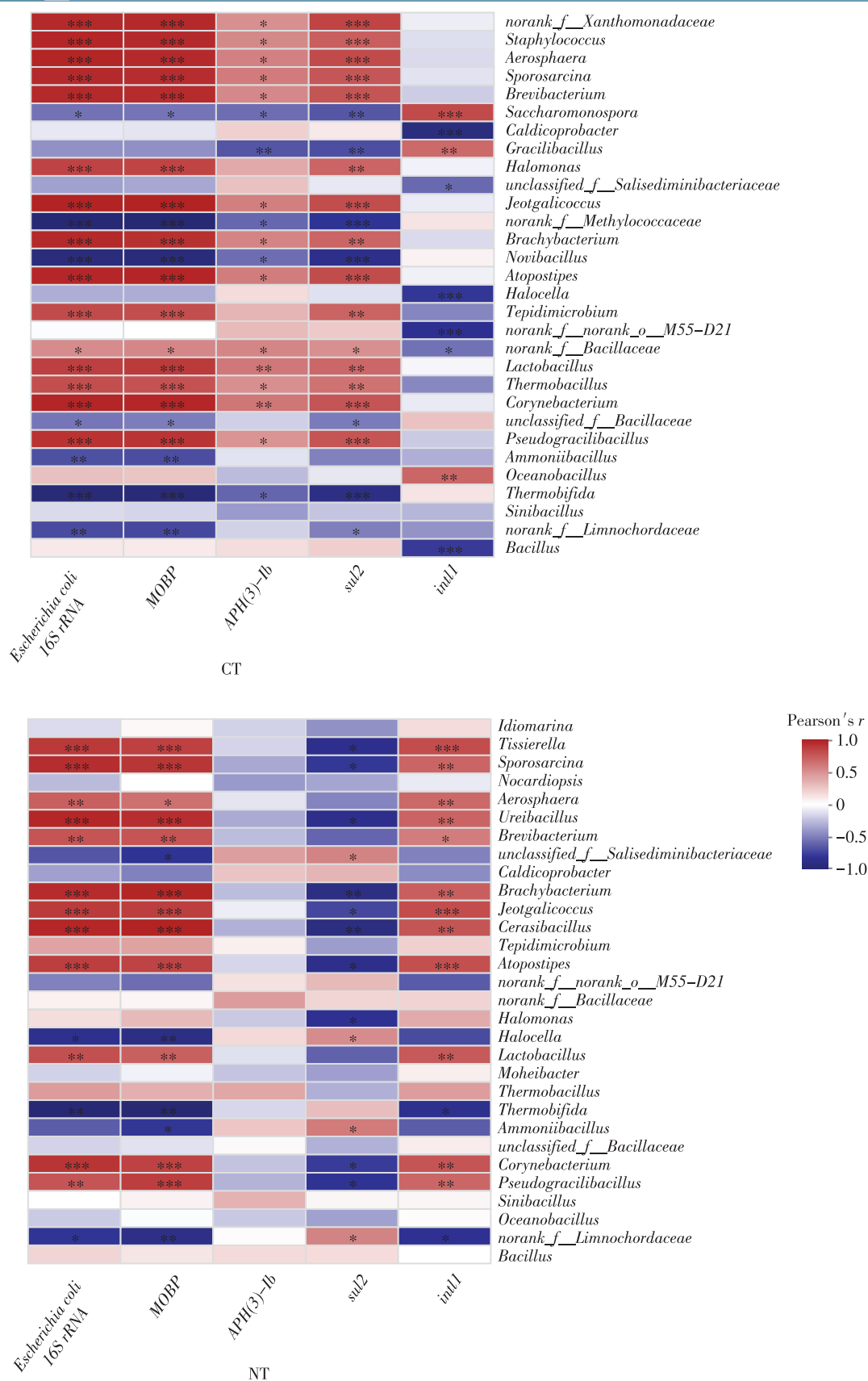


图6 两处理组基因相对丰度与细菌群落相关性热图

Figure 6 Heatmap of the correlation between relative gene abundance and bacterial community in the two control groups

ARGs的腐熟期反弹提供了新思路。

3 结论

(1)延长堆肥高温时间(15 d)能够减少堆肥产品中细菌总数两个数量级以上,同时也可以抑制常规堆肥高温结束后多重耐药菌的反弹。

(2)堆肥对于多重耐药大肠杆菌及其接合型耐药质粒有良好的消减效果,相对丰度消减率均达到99%以上;虽然能够垂直传播的*APH(3)-Ib*、*sul2*和*int11*等ARGs相对丰度会随高温期结束而出现增长,但延长高温时间能够提高堆肥过程中ARGs的消减率。

(3)堆肥中肠杆菌*16S rRNA*基因及其接合型质粒代表基因*MOBP*消减规律符合一级反应动力学方程;但*APH(3)-Ib*、*sul2*和*int11*等基因相对丰度的消减动力学呈现高温期下降、二次腐熟期上升的特点,延长高温时间能够显著抑制第二阶段出现的反弹。

(4)延长15 d的高温时间,可降低堆体中*APH(3)-Ib*、*sul2*基因的潜在宿主菌的丰度从而阻断ARGs垂直传播作用,有利于减少最终堆肥产品中ARGs相对丰度。

参考文献:

- [1] SOLOMON S L, OLIVER K B. Antibiotic resistance threats in the United States: stepping back from the brink[J]. *American Family Physician*, 2014, 89(12):938-941.
- [2] HUANG S F, TANG Y W, et al. New threats of antibiotic-resistant bacteria and fungi[J]. *Frontiers in Medicine*, 2022, 9:107-113.
- [3] EFENDI R, SUDARNIKA E, WIBAWANI W T, et al. An assessment of knowledge and attitude toward antibiotic misuse by small-scale broiler farmers in Bogor, West Java, Indonesia[J]. *Veterinary World*, 2022, 15(3):707-713.
- [4] 侯金江, 孙兴滨, 高浩泽, 等. 促生长抗生素禁用后养猪场多重耐药菌群及耐药特征变化[J]. *农业环境科学学报*, 2023, 42(3):682-691. HOU J J, SUN X B, GAO H Z, et al. Changes in a multidrug-resistant bacterial community and its antibiotic resistance characteristics in pig farms after the ban on antibiotic growth promoters[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2023, 42(3):682-691.
- [5] XIE W Y, WANG Y T, YUAN J, et al. Prevalent and highly mobile antibiotic resistance genes in commercial organic fertilizers[J]. *Environment International*, 2022 (162):107-157.
- [6] LIU B, YU K, AHMED I, et al. Key factors driving the fate of antibiotic resistance genes and controlling strategies during aerobic composting of animal manure: a review[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 791:148-156.
- [7] LIAO H, FRIMAN V P, GEISEN S, et al. Horizontal gene transfer and shifts in linked bacterial community composition are associated with maintenance of antibiotic resistance genes during food waste composting[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 660:841-850.
- [8] TANG Z, XI B, HUANG C, et al. Mobile genetic elements in potential host microorganisms are the key hindrance for the removal of antibiotic resistance genes in industrial-scale composting with municipal solid waste[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 301:122723.
- [9] SARDAR M F, ZHU C, GENG B, et al. Enhanced control of sulfonamide resistance genes and host bacteria during thermophilic aerobic composting of cow manure[J]. *Environmental Pollution*, 2021, 275:116587.
- [10] SUN P Y, LIU B T, AHMED I, et al. Composting effect and antibiotic removal under a new temperature control strategy[J]. *Waste Management*, 2022, 153:89-98.
- [11] 姜欣然. 养殖源多重耐药菌质粒接合转移特性及堆肥高温影响研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学, 2022:12-31. JIANG X R. Characteristics of conjugation transfer of multidrug-resistant plasmids in livestock farms and its influence mechanism of composting temperature[D]. Harbin:Northeast Forestry University, 2022:12-31.
- [12] WAYNE P A. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[J]. *Clinical Microbiology Newsletter*, 2001, 23(6):49-56.
- [13] ZHANG L, LEVAK K, TRUEBA G, et al. Effects of selection pressure and genetic association on the relationship between antibiotic resistance and virulence in *Escherichia coli*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 59(11):6733-6740.
- [14] SELVAM A, XU D, ZHAO Z, et al. Fate of tetracycline, sulfonamide and fluoroquinolone resistance genes and the changes in bacterial diversity during composting of swine manure[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 126:383-390.
- [15] 邓雯文. 鸡粪堆肥中细菌群落变化规律及与重金属、抗生素和养分的相关性研究[D]. 成都:四川农业大学, 2019:6-15. DENG W W. Dynamics of bacterial communities and its correlation with heavy metals, antibiotics and nutrients in chicken manure composting[D]. Chengdu:Sichuan Agricultural University, 2019:6-15.
- [16] 王瑶, 马广玉, 温沁雪, 等. 猪粪堆肥过程中可培养耐药菌的抗性研究[J]. *哈尔滨工业大学学报*, 2021, 53(5):33-41. WANG Y, MA G Y, WEN Q X, et al. Study on antibiotic resistance of culturable resistant bacteria during pig manure composting[J]. *Journal of Harbin Institute of Technology*, 2021, 53(5):33-41.
- [17] GUAN J, WASTY A, GRENIER C, et al. Influence of temperature on survival and conjugative transfer of multiple antibiotic-resistant plasmids in chicken manure and compost microcosms[J]. *Poultry Science*, 2007, 86(4):610-613.
- [18] ZHOU Z, SONG Z, GU J, et al. Dynamics and key drivers of antibiotic resistance genes during aerobic composting amended with plant-derived and animal manure-derived biochars[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 355:127-236.
- [19] QIAN X, SUN W, GU J, et al. Reducing antibiotic resistance genes, integrons, and pathogens in dairy manure by continuous thermophilic composting[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 220:425-432.
- [20] 姜欣然, 李涛, 孙兴滨, 等. 鸡粪模拟堆肥中多重耐药菌、耐药基因和整合酶基因的消减动力学解析[J]. *环境科学研究*, 2022, 35(4):1045-1055. JIANG X R, LI T, SUN X B, et al. Dissipation kinetics

- of multidrug-resistant bacteria, antibiotic resistance genes and integrase genes during simulated composting of chicken manure[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2022, 35(4):1045–1055.
- [21] EZZARIAI A, HAFIDI M, KHADRA A, et al. Human and veterinary antibiotics during composting of sludge or manure: global perspectives on persistence, degradation, and resistance genes[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 359:465–481.
- [22] SUBIRAT J, MURRAY R, SCOTT A, et al. Composting of chicken litter from commercial broiler farms reduces the abundance of viable enteric bacteria, firmicutes, and selected antibiotic resistance genes[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 746:141113.
- [23] WAN L, WANG X, CONG C, et al. Effect of inoculating microorganisms in chicken manure composting with maize straw[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 301:122730.
- [24] ZHANG J, LIN H, MA J, et al. Compost-bulking agents reduce the reservoir of antibiotics and antibiotic resistance genes in manures by modifying bacterial microbiota[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 649:396–404.
- [25] WU N, XIE S, ZENG M, et al. Impacts of pile temperature on antibiotic resistance, metal resistance and microbial community during swine manure composting[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 744:140920.
- [26] ZHANG R, GU J, WANG X, et al. Contributions of the microbial community and environmental variables to antibiotic resistance genes during co-composting with swine manure and cotton stalks[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 358:82–91.
- [27] POVOL V R, ACKERMANN M. Disseminating antibiotic resistance during treatment[J]. *Science*, 2019, 364(6442):737–738.
- [28] MENDELSON M, MATSOSO M P. The World Health Organization global action plan for antimicrobial resistance[J]. *SAMJ: South African Medical Journal*, 2015, 105(5):325.
- [29] BRUCE S A, SMITH J T, MYDOSH J L, et al. Shared antibiotic resistance and virulence genes in *Staphylococcus aureus* from diverse animal hosts[J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1):4413.
- [30] DUAN M, ZHANG Y, ZHOU B, et al. Changes in antibiotic resistance genes and mobile genetic elements during cattle manure composting after inoculation with *Bacillus subtilis*[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 292:122011.

(责任编辑:叶飞)