

长期有机/无机肥配施对褐土细菌群落 及抗生素抗性基因赋存的影响

刘志平,解文艳,杨振兴,胡雪纯,马晓楠,周怀平

(山西农业大学资源环境学院,省部共建有机旱作农业国家重点实验室(筹),山西太原 030001)

摘要:为探明长期有机/无机肥配施对土壤细菌及抗生素抗性基因多样性的影响,以山西寿阳褐土长期定位试验为依托,采集5个有机/无机肥配施处理($N_0P_0M_0$, $N_2P_1M_1$, $N_4P_2M_2$, $N_3P_2M_3$ 和 $N_0P_0M_6$) 0~20 cm 土层土壤样品,采用宏基因组测序技术研究有机/无机肥配施条件下褐土中细菌群落和抗生素抗性基因的差异。结果表明:长期有机/无机肥配施显著改变了土壤细菌及抗生素抗性基因的多样性,细菌优势门为变形菌门、酸杆菌门、放线菌门、芽单胞菌门和绿弯菌门。不同处理土壤共同抗性基因亚型有256个,土壤特有抗生素抗性基因亚型随施肥量的增加均呈现先增加后降低的趋势,且在 $N_3P_2M_3$ 处理中达到最高。土壤中丰度较高的抗生素抗性基因种类有大环内酯类、多药类、万古霉素类、四环素类、氯霉素类,其中含量最高的抗性基因亚型为 *MacB*、*BcrA*、*MexW*、*MexF* 和 *pbp1a*。皮尔森相关性分析表明:土壤理化性质直接或间接地影响着细菌群落及 ARGs 的组成和变异,冗余分析进一步表明,抗生素抗性基因的变化受细菌群落结构的影响。抗生素抗性基因已经成为威胁人类健康的潜在污染物,农业生产中施用畜禽粪污时应充分腐熟并与化肥配合施用,以保障生态环境安全。

关键词:有机/无机肥配施;褐土;宏基因组;细菌群落;抗生素抗性基因

中图分类号:S365;S154.3 **文献标志码:**A

Effects of long-term combination of organic and inorganic fertilizer on bacterial community and antibiotic resistance genes in cinnamon soil

LIU Zhiping, XIE Wenyan, YANG Zhenxing, HU Xuechun, MA Xiaonan, ZHOU Huaiping

(Institute of Resources and Environment, Shanxi Agricultural University, State Key Laboratory of Sustainable Dryland Agriculture (in preparation), Taiyuan, Shanxi 030031, China)

Abstract: To explore the effects of long-term organic and inorganic fertilizer combined application on soil bacterial and antibiotic resistance gene diversity, 0~20 cm layer soil of five organic and inorganic fertilizer combined application treatments ($N_0P_0M_0$, $N_2P_1M_1$, $N_4P_2M_2$, $N_3P_2M_3$ and $N_0P_0M_6$) were collected based on the long-term location test of cinnamon soil in Shouyang, Shanxi Province. Metagenomic sequencing technology was applied to study the difference of bacterial community and antibiotic resistance genes in cinnamon soil under combined organic/inorganic fertilizer conditions. Results showed that the diversity of bacteria and antibiotic resistance genes in soil was significantly changed by long-term organic/inorganic fertilizer combination. The dominant bacteria phyla were Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Gemmatimonadetes and Chloroflexi. There were 256 soil common resistance gene subtypes in different treatments. Soil specific antibiotic resistance gene subtypes increased at first and then decreased with the increase of fertilizer application amount, reaching the highest in $N_3P_2M_3$ treatment. The antibiotic resistance genes with high abundance in soil were macrolides, multidrugs, vancomycin, tetracycline and chloramphenicol. Among them, the resistance gene subtypes with the highest content were *MacB*, *BcrA*, *MexW*,

收稿日期:2021-12-30

修回日期:2022-05-07

基金项目:山西省青年科技研究基金(201901D211557);山西省农业科学院博士研究基金(YBSJJ2012);山西农业大学省部共建有机旱作农业国家重点实验室自主研发项目(202001-7)

作者简介:刘志平(1988-),女,山西繁峙人,助理研究员,主要从事土壤微生物研究。E-mail:lzp.19881006@163.com

通信作者:周怀平(1964-),男,山西昔阳人,研究员,主要从事耕地质量保育研究。E-mail:huaipingzhou@126.com

MexF and *pbp1a*. Pearson correlation analysis showed that soil physical and chemical properties directly or indirectly affected the composition and variation of bacterial community and ARGs. Redundancy analysis further showed that the changes of antibiotic resistance genes were affected by bacterial community structure. Antibiotic resistance genes have become potential pollutants threatening human health. Livestock and poultry manure should be fully decomposed and combined with chemical fertilizer in agricultural production to ensure ecological environment safety.

Keywords: combination of organic and inorganic fertilizer; cinnamon soil; metagenomic; bacterial community; antibiotic resistance gene

有机肥与无机肥配合施用是目前农业生产中所推崇的一种施肥方法,既可以改良培肥土壤又可以提高作物产量,这是因为有机肥可将大量的有益微生物带入土壤。作为土壤的重要组成部分,微生物是土壤有机质和养分循环的主要驱动力,在土壤养分转化、能量流动和土壤有机质形成中具有关键作用^[1-4]。细菌常因对土壤环境变化反应迅速而被作为土壤质量的早期生物指标^[5-6]。细菌多样性和群落组成受土壤 pH、有机质、土壤水分、矿物质等因素影响^[7-8],而这些因素又受施肥管理措施的影响。因此,研究细菌群落及多样性对于指导合理施肥具有重大意义。

随着畜禽养殖的集约化,作为亚治疗剂量的食品添加剂,抗生素被广泛应用于畜禽养殖业以防治动物疾病、促进动物生长及提高饲料利用率。我国是世界上最大的抗生素生产国和消费国之一,统计表明,2013 年中国的抗生素生产量为 2.48×10^5 t, 使用量达 1.62×10^5 t,居世界第一,约占世界总量的一半,其中约 7.8×10^4 t 为人类使用,占比 48%,其余 8.4×10^4 t 用于畜禽养殖^[9]。大约 30%~90% 兽用抗生素通过粪便或尿液以母体化合物或代谢产物的形式排出^[10-12]。未经充分腐熟的畜禽粪污还田又将抗生素带入土壤,虽然抗生素可以通过生物降解和光解等作用进行转化,但低浓度抗生素残留也会对微生物群落产生选择性压力,诱导产生抗生素抗性基因 (Antibiotic Resistance Genes, ARGs),一些 ARGs 甚至能够在选择性压力消失后持续存在,使得土壤成为丰富的 ARGs 储存库^[13-15]。土壤中赋存的 ARGs 可以通过食物链的传递对人体健康造成潜在危害。与其他污染物相比,ARGs 分布范围更广、传播速度更快、环境风险更高,是人类面临的最严峻的生态环境问题^[16],已被世界卫生组织列为 21 世纪威胁公共健康的最重大挑战之一^[17]。随着检测技术的发展,越来越多的 ARGs 在污水处理厂、动物粪便、土壤、河流、饮用水、冰川等不同环境样品中被检测出来^[18-22]。

研究土壤细菌及 ARGs 的方法众多,其中宏基因组技术作为一种新兴技术可直接从样品中提取总 DNA 构建宏基因组文库进行测序,进而获得样品中所包含的全部微生物及其遗传基因信息^[23],有助于全面了解不同环境中细菌群落及 ARGs 的多样性与丰度变化。在耕地中,检测长期施用有机肥对土壤中 ARGs 赋存特征的影响具有重大意义,可以从食物链源头评估施用有机肥对生态安全及食品安全的潜在风险,但目前此类研究尚较为缺乏。本研究以山西寿阳长达 30 年的有机/无机肥配施试验为基础,基于宏基因组测序技术分析耕层土壤 ARGs 及细菌多样性,旨在研究不同有机/无机肥配施对褐土中细菌群落及 ARGs 赋存特征的影响,为今后农业生产中有机肥的投入量提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

本研究中长期定位试验位于山西省晋中市寿阳县宗艾镇宗艾村国家农业环境寿阳观测实验站 ($37^{\circ}58'23''N$, $113^{\circ}06'38''E$),海拔 1 130 m,土壤类型为褐土,系统分类为简育干润锥形土^[24]。该区域属中纬度暖温带半湿润偏旱区大陆性季风气候区,年均气温 $7.4^{\circ}C$,年均降水量 500 mm。试验地初始 pH 为 8.4,有机质 $23.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$;碱解氮 $117.69 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;有效磷 $4.84 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;有效钾 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[25]。

该长期定位试验从 1992 年开始种植春玉米直至 2021 年,历时 30 a。试验采用氮(N)、磷(P)、有机肥(M)三因素四水平正交设计,另设有对照和大量有机肥区,共 18 个处理,各处理 3 次重复,小区面积 66.7 m^2 ,随机排列。玉米品种为‘大丰 30’,播种密度为 $66\ 000 \text{ 株} \cdot \text{hm}^{-2}$,玉米播种前进行旋地和施肥,方式为全部播前基施。本研究依据腐熟牛粪用量梯度,选择其中 5 个处理,即 $N_0P_0M_0$, $N_2P_1M_1$, $N_4P_2M_2$, $N_3P_2M_3$ 和 $N_0P_0M_6$,研究长期施用牛粪对土壤 ARGs 及细菌多样性的影响,具体施肥量见表 1。

表 1 不同试验处理施肥量

Table 1 Amount of fertilizer applied in different experimental treatments

处理 Treatment	化肥/(kg·hm ⁻²) Chemical fertilizer			有机肥/(kg·hm ⁻²) Organic fertilizer			总养分/(kg·hm ⁻²) Total nutrient		
	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
N ₀ P ₀ M ₀	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N ₂ P ₁ M ₁	120	37.5	0	88	31	317	208	68.5	317
N ₄ P ₂ M ₂	240	75	0	176	62	633	416	137	633
N ₃ P ₂ M ₃	180	75	0	265	93	950	445	168	950
N ₀ P ₀ M ₆	0	0	0	530	185	1900	530	185	1900

1.2 样品采集

于 2021 年 6 月在各小区采用 5 点“S”取样法,用土钻采集 0~20 cm 的土壤样品,将同一小区的 5 个样混合为一个样品,去掉明显的石砾和残枝败叶等杂物后将土壤分成两部分,一部分风干用于土壤理化性质的检测,另一部分用无菌袋装好,并置于冰盒带回实验室,进行土壤 DNA 的提取及后续宏基因组测序。

1.3 测定方法

1.3.1 土壤理化性质测定

土壤理化性质的测定方法按照《土壤农业化学分析方法》^[26]进行。其中,pH 采用酸度计检测,水土比为 2.5:1;碱解氮(AN)采用比色法检测;有效钾(AK)采用 1 mol·L⁻¹乙酸铵火焰光度计检测;有效磷(AP)采用 NaHCO₃(pH 8.5,0.05 mol·L⁻¹)浸提法测定;有机质(OM)采用重铬酸钾容量法检测;全氮(TN)采用凯氏定氮仪检测;全磷(TP)采用钼锑抗比色法检测;全钾(TK)采用火焰光度法检测。

1.3.2 土壤宏基因组测序

准确称取 0.5 g 土样,采用 Fast DNA SPIN DNA 提取试剂盒(MP Biomedicals, Santa Ana, CA, United States),按照说明书的方法提取土壤 DNA,并用 0.7% 的琼脂糖凝胶进行电泳,观察条带是否清晰、完整,而后用微量紫外分光光度计 NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)测定 DNA 的浓度。将合格 DNA 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行宏基因组测序。

1.4 数据统计

对测序原始数据通过 FastQC 进行质量评估,并通过 Trimmomatic 进行过滤处理^[27],得到有效数据。使用 IDBA_UD 对各样本有效序列进行拼接组装成长序列 contigs,并对多个 Kmer 的组装结果进行综合评定,选择最佳 Kmer 组装结果。采用 Prodigal 对拼接结果进行 ORF 预测,选择长度 ≥ 100 bp 的基因并将其翻译成氨基酸序列,对于各样本的基因预测结果,采用 CD-HIT 软件进行去冗余,以获得非冗余

的基因集^[28]。使用 DIAMOND 将基因集与 ARDB (Antibiotic Resistance Genes Database)数据库进行比对,获得基因的物种注释信息和功能注释信息,并根据基因集丰度得到功能丰度和物种丰度^[29]。利用 QIIME 计算 Chao1、ACE、Simpson 和 Shannon 指数。利用 MEGAN^[30]进行细菌群落分类组成和丰度可视化。采用 R 软件绘制不同处理 ARGs 维恩图,采用主成分分析(Principal component analysis, PCA)法研究不同样品间 ARGs 的变化。采用置换多元方差分析(PERMANOVA)^[31]评估各组间 ARGs 组成差异的显著性,通过 CANOCO 软件进行门水平细菌与 ARGs 的冗余分析(Redundancy analysis, RDA)。

采用 SPSS 19.0 软件进行单因素方差分析,检验土壤理化性质、细菌 α-多样性指数等的正态分布和方差同质性。采用 LSD 检验分析数据间的显著性差异($P < 0.05$),并进行细菌门及 ARGs 与土壤理化性质间的皮尔森相关性分析。

2 结果与分析

2.1 土壤理化性质分析

不同有机/无机肥配施对土壤理化性质的影响如表 2 所示,与对照处理 N₀P₀M₀相比,施肥显著降低了土壤 pH 值,且随总施肥量增加呈现显著降低趋势。与此相反,随施入养分量的增加,土壤 OM、TN、TP、AN 和 AP 的含量均呈增加趋势($P < 0.05$)。

2.2 土壤细菌多样性分析

2.2.1 细菌 α-多样性

α 多样性指数反映了细菌物种的丰富度及均匀度,是鉴定土壤肥力的有效指标之一。由表 3 可见,不同有机/无机肥配施处理下,细菌 Chao1 指数在 N₂P₁M₁处理和 N₀P₀M₆处理中显著高于 N₄P₂M₂处理($P < 0.05$),ACE 指数在 N₂P₁M₁处理中显著高于 N₄P₂M₂处理($P < 0.05$),Simpson 指数和 Shannon 指数在 4 个处理中无显著差异。

表 2 各处理土壤理化性质

Table 2 Soil physicochemical properties in each treatment

处理 Treatment	pH	有机质 OM /(g · kg ⁻¹)	全氮 TN /(g · kg ⁻¹)	全磷 TP /(g · kg ⁻¹)	全钾 TK /(g · kg ⁻¹)	碱解氮 AN /(mg · kg ⁻¹)	有效磷 AP /(mg · kg ⁻¹)	有效钾 AK /(mg · kg ⁻¹)
N ₀ P ₀ M ₀	8.65±0.03a	22.10±0.03e	0.83±0.01e	0.50±0.01e	15.67±0.05b	32.76±0.02e	4.56±0.06e	75.15±0.08e
N ₂ P ₁ M ₁	8.38±0.03b	26.62±0.01d	1.34±0.01d	0.83±0.01d	15.67±0.03b	85.05±0.05d	24.74±0.04d	93.20±0.05d
N ₄ P ₂ M ₂	8.30±0.03c	31.96±0.03c	1.93±0.03c	0.95±0.02c	15.29±0.03d	101.66±0.09c	86.97±0.10c	128.94±0.03c
N ₃ P ₂ M ₃	8.16±0.05d	40.32±0.04b	2.17±0.04b	1.24±0.02b	16.19±0.02a	126.230.12b	170.51±0.09b	277.92±0.09a
N ₀ P ₀ M ₆	7.82±0.02e	49.86±0.05a	2.69±0.05a	1.48±0.03a	15.59±0.05c	150.80±0.13a	211.24±0.12a	266.59±0.10b

注: 同列数据后不同小写字母表示处理间差异达到显著水平 ($P < 0.05$)。下同。

Note: Different lowercase letters after the same column of data indicate significant difference between treatments ($P < 0.05$). The same below.

表 3 不同处理细菌 α 多样性Table 3 Bacterial α -diversity under different treatments

处理 Treatment	Chao1 指数 Chao1 index	ACE 指数 ACE index	Simpson 指数 Simpson index	Shannon 指数 Shannon index
N ₀ P ₀ M ₀	2931.36±482.38ab	3019.21±594.90ab	0.99±0.01a	10.71±0.08a
N ₂ P ₁ M ₁	3928.89±185.22a	4077.03±205.85a	1.00±0.01a	10.52±0.24a
N ₄ P ₂ M ₂	2601.14±253.66b	2665.69±361.60b	1.00±0.01a	10.62±0.06a
N ₃ P ₂ M ₃	3458.50±363.60ab	3650.17±476.71ab	1.00±0.01a	10.59±0.17a
N ₀ P ₀ M ₆	3666.56±555.03a	3786.31±456.91ab	1.00±0.01a	10.69±0.07a

2.2.2 土壤门水平细菌丰度 由图 1 可见(见 172 页),不同处理土壤样品中门水平细菌种类相似,相对丰度前五位的分别为变形菌门(Proteobacteria, 48.6%~59.1%)、酸杆菌门(Acidobacteria, 7.19%~16.4%)、放线菌门(Actinobacteria, 8.61%~15.1%)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes, 5.19%~6.97%)和绿弯菌门(Chloroflexi, 2.53%~4.21%),平均相对含量占总量的 82.6%~85.9%。变形菌门、放线菌门和绿弯菌门的相对丰度随着养分投入量的增加呈先升高后降低的趋势, N₃P₂M₃处理变形菌门相对丰度最高且显著高于其他处理($P < 0.05$); N₄P₂M₂处理放线菌门和绿弯菌门相对丰度最高,且显著高于其他处理($P < 0.05$)。酸杆菌门的相对丰度随牛粪施用量的增加呈下降趋势,且 N₀P₀M₀处理显著高于 N₂P₁M₁处理,但在 N₄P₂M₂、N₃P₂M₃和 N₀P₀M₆处理中无显著差异。芽单胞菌门的相对丰度随牛粪施用量增加呈升高趋势,且 N₀P₀M₆处理显著高于 N₀P₀M₀处理。

2.3 土壤抗生素抗性基因分析

2.3.1 抗生素抗性基因 Venn 图 由图 2 可见(见 172 页),5 个处理土壤样品共有 256 个共同 ARGs 亚型, N₀P₀M₀、N₂P₁M₁、N₄P₂M₂、N₃P₂M₃和 N₀P₀M₆处理含有的独特 ARGs 亚型个数分别为 0, 0, 1, 5 和 3,说明高量施用牛粪可增加土壤独特 ARGs 亚型的数量,且随着养分投入量的增加呈先增加后降低趋

势,并在 N₃P₂M₃处理达到峰值。

2.3.2 抗生素抗性基因组成 15 个土壤样品中检测到的 ARGs 亚型共有 318 个,共分为 12 个种类。其中亚型较多的种类有大环内酯-林可霉素-链阳性霉素 B 类(48 个)、氨基糖苷类(39 个)、四环素类(34 个)、万古霉素类(34 个)、多药类(31 个)。图 3 展示了相对丰度前 30 位的 ARGs 亚型,平均相对丰度 >3% 的抗性基因亚型有 13 种,按照含量高低依次为 *MacB*、*BcrA*、*MexW*、*MexF*、*pbp1a*、*CarA*、*VanSD*、*CeoB*、*VanRE*、*VanRC*、*VanRA*、*tetPB* 和 *otrA*,其中万古霉素类抗性基因居多,*MacB* 基因和 *BcrA* 基因在 N₃P₂M₃处理中含量最高、在 N₀P₀M₀处理中含量最低。

2.3.3 主成分分析及置换多元方差分析 将注释到的 ARGs 进行降维处理,提取主成分进行分析。由图 4 可知,三个主成分共解释了 62.71% (PC1: 31.97%, PC2: 15.86%, PC3: 14.88%) 的 ARGs 组成及变化。每个处理的三个重复聚拢在一起,说明样品平行性良好。置换多元方差分析进一步显示(图 5),不同施肥处理中土壤 ARGs 差异显著,检验结果可信度高 ($R = 0.9926, P = 0.001$)。

2.3.4 抗生素抗性基因与门水平细菌的冗余分析 为了评价 ARGs 与细菌群落结构之间的关系,选择相对丰度前十位的 ARGs 和门水平细菌进行冗余分析。由图 6(见 172 页)可知,细菌群落可以解释 89.8% (RDA1: 80.7%, RDA2: 9.1%) 的 ARGs 变化。变形菌门与 *MacB*、*CarA*、*BcrA*、*VanRC*、*VanRA* 等之间的夹角均为锐角,表明它们之间呈正相关关系;酸杆菌门(Acidobacteria)与 *tetPB*、*MexF*、*pbp1a* 等呈正相关关系,芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)与 *MexW*、*CarA*、*MacB*、*BcrA* 等呈正相关关系,表明这些细菌门中的某些物种可能是相应 ARGs 的重要宿主菌。综上所述,ARGs 的变化受细菌群落结构的影响。

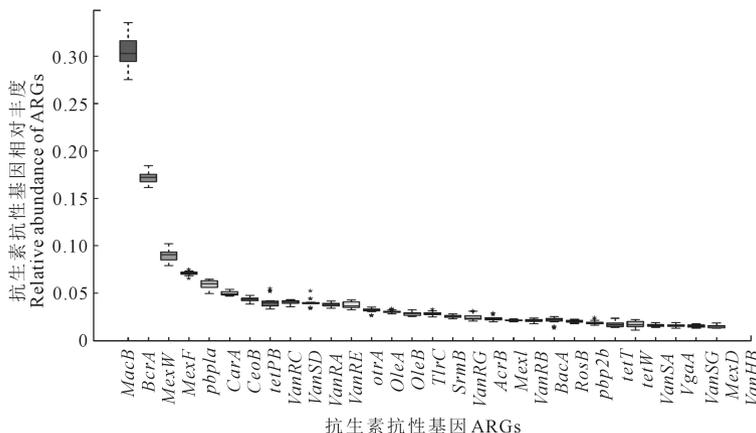


图 3 ARGs 相对丰度

Fig.3 Relative abundance of ARGs

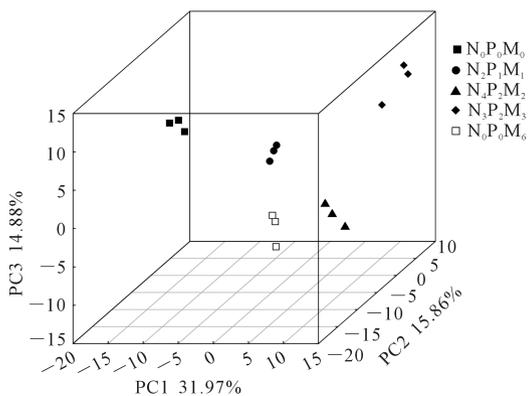


图 4 ARGs 主成分分析

Fig.4 Principal component analysis of ARGs

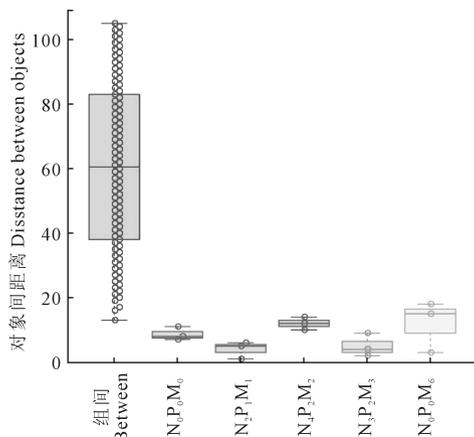


图 5 置换多元方差分析

Fig.5 Permutational multivariate analysis of variance

2.3.5 门水平细菌及 ARGs 与土壤理化性质的相关性分析 为了进一步揭示细菌及 ARGs 与土壤理化性质间的关系,对排名前十位的细菌门和 ARGs 与 8 项土壤理化性质进行皮尔森相关性分析。如表 4 所示,除了放线菌门(Actinobacteria)、*MexF* 和 *CeoB* 以外,其余细菌门及 ARGs 与某些理化性质均存在显著相关性。变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、*MacB*、*BcrA*、*MexW*、*CarA*、*VanRA* 和 *VanRC* 除了与土壤 pH 呈负相关外,与其余因子均呈正相关关系;与此相反,酸杆菌门(Acidobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)、Bacteria_noname、浮霉菌门(Planctomycetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、*MexF* 和 *tetPB* 除了与土壤 pH 呈正相关外,与其余因子均呈负相关关系。土壤 OM、TN 和 AN 与门水平细菌和 ARGs 的相关性呈现相似的规律;TP 和 AP 与门水平细菌和 ARGs 的相关性呈现相同的规律。综上所述,土壤理化性质直接或间接地影响着细菌群落和 ARGs 的组成和变异。

3 讨论

3.1 不同有机/无机肥配施对土壤细菌多样性的影响

不同有机/无机肥配施影响了细菌的 α -多样性,细菌 Chao1 指数和 ACE 指数在 $N_2P_1M_1$ 处理中高于其他处理,分析认为该施肥量下土壤环境(碳源、水分、pH)为细菌生长和繁殖提供了良好的条件,更有利于保持细菌多样性。土壤养分的可利用性通常与贫营养微生物向富营养微生物的转化有关。例如,土壤中较高的养分利用率促进了富营养微生物的生长和繁殖,而在营养有限的土壤环境中,生长缓慢的贫营养微生物的数量会增加^[32-33]。变形菌门、酸杆菌门、放线菌门、芽单胞菌门和绿弯菌门是本研究土壤样品中丰度最高的五大菌门,占细菌总数的 82% 以上,与之前不同系统报道的结果一致^[34-36]。在这些菌门中,变形菌门被认为是一种广泛存在于土壤中的富营养微生物,在粪便处理中

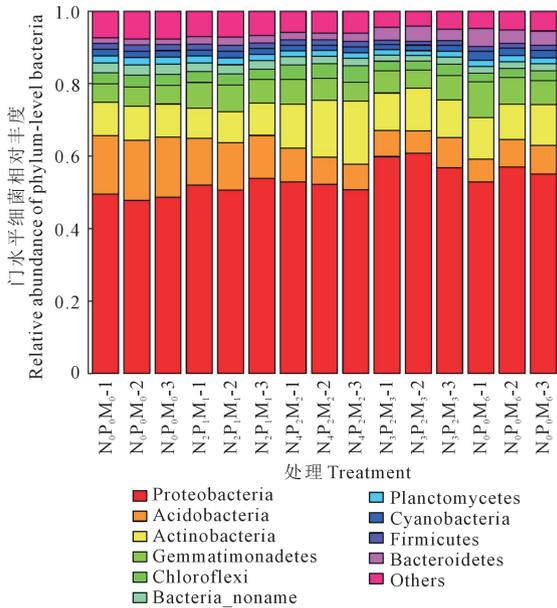


图 1 不同处理门水平细菌相对丰度
Fig.1 Relative abundance of bacteria at phylum level under different treatments

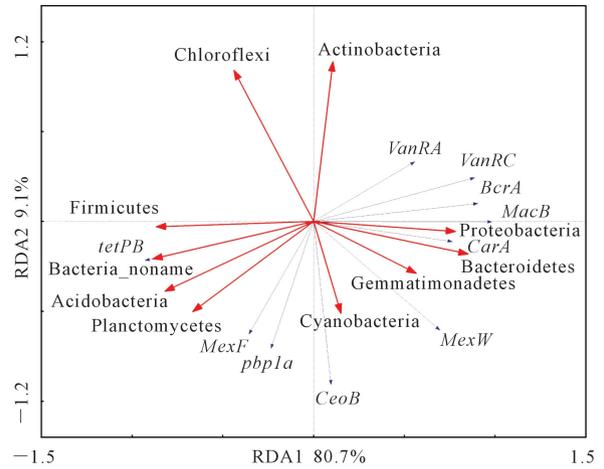


图 6 抗生素抗性基因与门水平细菌的冗余分析
Fig.6 Redundancy analysis of ARGs and bacteria at phylum level

表明,不同有机/无机肥配施处理 ARGs 存在显著差异 ($P < 0.001$), 分析认为施肥通过改变土壤养分影响了土壤中细菌的活性, 进而导致 ARGs 出现差异。

含量较多的 ARGs 有大环内酯类、多药类、万古霉素类、四环素类、氯霉素类, 这些 ARGs 普遍存在于畜禽粪便、草鱼肠道、土壤及水体中^[38-41], 相对应的这几类抗生素也是广谱性抗生素。其中万古霉素是一种临床上重要的糖肽类抗生素, 对革兰氏阳性菌和一些多重耐药菌具有极好的杀灭效果, 被称为人类健康的最后一道防线^[42-43], 但在本长期定位试验中, 万古霉素类的抗性基因亚型最多, 这不得不引起我们的警惕。

本研究中未施用牛粪的处理 $N_0P_0M_0$ 中仍然有大量的 ARGs, 这进一步说明 ARGs 的存在具有普遍性^[37]。分析其原因认为土壤微生物本底中含有 ARGs, 也有可能是长年累月施肥中, ARGs 通过水平转移到达空白土壤^[44]。ARGs 中的质粒、转座子、整合子等可移动因子可以通过接合、转化和转导等方式从一种菌株转移到其他菌种中, 从而使后者携带相应的抗性, 并通过微生物的大量繁殖将 ARGs 传递下去。因此当微生物菌群一旦建立对抗生素的抗性, 即便抗生素的选择压力消失, 这类菌群也会持续对此类抗生素产生抵抗作用^[45]。

4 结 论

(1) 不同有机/无机肥配施处理改变了细菌及 ARGs 的多样性, 且不同处理间 ARGs 差异显著 ($P < 0.001$)。

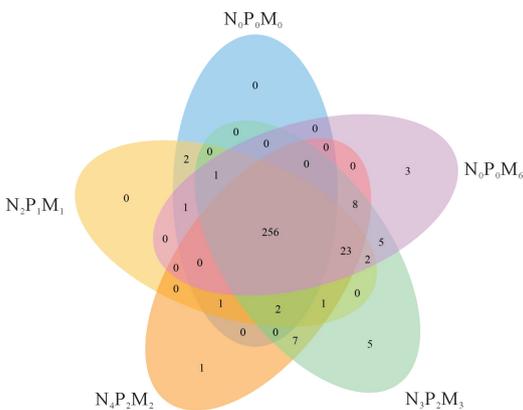


图 2 不同处理抗生素抗性基因 Venn 图
Fig.2 Venn diagram of antibiotic resistance for different treatments

其丰度相对较高; 酸杆菌门内的大多数类群被认为是生长缓慢的贫营养细菌^[32]。本研究中, $N_3P_2M_3$ 和 $N_0P_0M_6$ 处理中变形菌门的相对丰度显著高于 $N_0P_0M_0$ 处理 ($P < 0.05$); 与之相反, 随着养分投入量增加, 酸杆菌门丰度呈现下降趋势, 贫营养微生物绿弯菌门的相对丰度在 $N_0P_0M_6$ 处理中降到最低。

3.2 不同有机/无机肥配施对土壤抗生素抗性基因的影响

随着养殖业的集约化及兽用抗生素的广泛使用, 畜禽粪便已经成为残留抗生素的主要储存库, 其施用到耕地土壤后, 会明显激发土壤微生物的抗性及 ARGs 的丰度^[37]。本研究中, PCA 和 Permanova

表 4 优势细菌门及抗生素抗性基因与土壤理化性质的皮尔森相关性分析

Table 4 Pearson correlation analysis of dominant phylum-bacteria and ARGs with soil physicochemical properties

指标 Index	pH	有机质 OM	全氮 TN	全磷 TP	全钾 TK	碱解氮 AN	有效磷 AP	有效钾 AK
变形菌门 Proteobacteria	-0.651 **	0.699 **	0.699 **	0.754 **	0.625 *	0.752 **	0.760 **	0.847 **
酸杆菌门 Acidobacteria	0.830 **	-0.827 **	-0.923 **	-0.878 **	-0.086	-0.917 **	-0.857 **	-0.798 **
放线菌门 Actinobacteria	-0.217	0.221	0.390	0.232	-0.441	0.300	0.270	0.145
芽单细胞菌门 Gemmatimonadetes	-0.622 *	0.532 *	0.520 *	0.560 *	-0.123	0.563 *	0.437	0.347
绿弯菌门 Chloroflexi	0.381	-0.418	-0.225	-0.384	-0.628 *	-0.288	-0.382	-0.488
Bacteria_noname	0.839 **	-0.863 **	-0.910 **	-0.908 **	-0.319	-0.922 **	-0.903 **	-0.897 **
浮霉菌门 Planctomycetes	0.578 *	-0.609 *	-0.722 **	-0.671 **	-0.210	-0.719 **	-0.687 **	-0.684 **
蓝藻细菌 Cyanobacteria	-0.521 *	0.490	0.359	0.401	-0.200	0.323	0.372	0.262
厚壁菌门 Firmicutes	0.768 **	-0.839 **	-0.824 **	-0.852 **	-0.526 *	-0.828 **	-0.897 **	-0.944 **
拟杆菌门 Bacteroidetes	-0.893 **	0.931 **	0.868 **	0.921 **	0.389	0.871 **	0.926 **	0.925 **
<i>MacB</i>	-0.705 **	0.724 **	0.735 **	0.794 **	0.547 *	0.801 **	0.763 **	0.827 **
<i>BcrA</i>	-0.800 **	0.801 **	0.816 **	0.844 **	0.328	0.851 **	0.815 **	0.816 **
<i>MexW</i>	-0.825 **	0.801 **	0.697 **	0.795 **	0.306	0.744 **	0.734 **	0.722 **
<i>MexF</i>	0.177	-0.282	-0.343	-0.284	-0.250	-0.287	-0.391	-0.430
<i>pbp1a</i>	0.494	-0.469	-0.619 *	-0.471	0.523 *	-0.530 *	-0.477	-0.303
<i>tetPB</i>	0.705 **	-0.677 **	-0.775 **	-0.791 **	-0.313	-0.847 **	-0.707 **	-0.719 **
<i>CarA</i>	-0.602 *	0.695 **	0.636 *	0.692 **	0.667 **	0.648 **	0.764 **	0.861 **
<i>CeoB</i>	-0.257	0.221	0.052	0.184	0.281	0.120	0.137	0.179
<i>VanRA</i>	-0.461	0.594 *	0.581 *	0.553 *	0.431	0.515 *	0.698 **	0.749 **
<i>VanRC</i>	-0.799 **	0.794 **	0.879 **	0.864 **	0.210	0.901 **	0.826 **	0.800 **

注: * 和 ** 分别代表在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平上显著相关。

Note: * and ** represent significant correlation at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ level, respectively.

(2) 不同有机/无机肥配施处理褐土中, 5 个主要的细菌门依次为变形菌门、酸杆菌门、放线菌门、芽单胞菌门和绿弯菌门。

(3) 不同有机/无机肥配施处理褐土中, 相对丰度较高的 ARGs 种类为大环内酯类、多药类、万古霉素类、四环素类、氯霉素类; 其中相对丰度最高的 ARGs 为 *MacB*、*BcrA* 和 *MexW*。

(4) 土壤理化性质直接或间接地影响着细菌群落及 ARGs 的组成和变异, 而 ARGs 的变化受细菌群落结构的影响。

ARGs 已经成为威胁人类健康的潜在污染物, 农业生产中施用畜禽粪污时应充分腐熟并与化肥配合施用, 以保障生态环境安全。在未来研究中, 探索有机肥与化肥的合理配比既可以保障粮食安全, 又可以合理规避 ARGs 带来的潜在风险。

参考文献:

[1] POSTMA-BLAAUW M B, DE GOEDE R G M, BLOEM J, et al. Soil biota community structure and abundance under agricultural intensification and extensification[J]. Ecology, 2010, 91(2): 460-473.

[2] OLLIVIER J, TÖWE S, BANNERT A, et al. Nitrogen turnover in soil and global change[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 78(1): 3-16.

[3] CHAPARRO J M, SHEFLIN A M, MANTER D K, et al. Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility[J]. Biology and Fertility of Soils, 2012, 48(5): 489-499.

[4] CUEVAS C N, HERNÁNDEZ T, GARCÍA C. Organic amendments as strategy to increase organic matter in particle-size fractions of a semi-arid soil[J]. Applied Soil Ecology, 2012, 57: 50-58.

[5] DEGENS B P, SCHIPPER L A, SPARLING G P, et al. Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2000, 32(2): 189-196.

[6] CHEN Z M, WANG H Y, LIU X W, et al. Changes in soil microbial community and organic carbon fractions under short-term straw return in a rice-wheat cropping system[J]. Soil and Tillage Research, 2017, 165: 121-127.

[7] BÜNEMANN E K, SCHWENKE G D, VAN ZWIETEN L. Impact of agricultural inputs on soil organisms—a review[J]. Australian Journal of Soil Research, 2006, 44: 379-406.

[8] STROM P F. Effect of temperature on bacterial species diversity in thermophilic solid-waste composting[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 50(4): 899-905.

[9] ZHANG Q Q, YING G G, PAN C G, et al. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(11): 6772-6782.

[10] HALLING-SØRENSEN B. Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming[J]. Chemosphere, 2000, 40(7): 731-739.

[11] JJEMBA P K. Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2006, 63(1): 113-130.

[12] QIAO M, YING G G, SINGER A C, et al. Review of antibiotic resistance in China and its environment[J]. Environment International, 2018, 110: 160-172.

[13] 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.

[14] JOHNSEN P J, TOWNSEND J P, BØHN T, et al. Retrospective evidence for a biological cost of vancomycin resistance determinants in the absence of glycopeptide selective pressures[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2011, 66(3): 608-610.

[15] MONIER J M, DEMANÈCHE S, DELMONT T O, et al.

- Metagenomic exploration of antibiotic resistance in soil[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2011, 14(3): 229-235.
- [16] VON WINTERSDORFF C J H, PENDERS J, VAN NIEKERK J M, et al. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 173.
- [17] CHAGAS T P G, SEKI L M, CURY J C, et al. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 111(3): 572-581.
- [18] 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 & Technology*, 2010, 44(18): 6933-6939.
- [19] LI B, YANG Y, MA L P, et al. Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes[J]. *The Isme Journal*, 2015, 9(11): 2490-2502.
- [20] 吴楠,杨静慧,张伟玉,等.不同环境介质中抗生素耐药性的检测方法研究进展[J].*微生物学通报*,2016,43(12):2720-2729.
WU N, YANG J H, ZHANG W Y, et al. Progress in detection methods of antibiotic resistance in different environmental matrices[J]. *Microbiology*, 2016, 43(12): 2720-2729.
- [21] KARKMAN A, DO T T, WALSH F, et al. Antibiotic-resistance genes in waste water[J]. *Trends in Microbiology*, 2018, 26(3): 220-228.
- [22] 赵仁鑫.抗生素选择压力下抗性基因赋存特征及其宿主鉴定研究[D].北京:清华大学,2018.
ZHAO R X. Research on the occurrence of antibiotic resistance genes and their host identification under the selective pressure of antibiotics[D]. Beijing: Tsinghua University, 2018.
- [23] PODELL S, UGALDE J A, NARASINGARAO P, et al. Assembly-driven community genomics of a hypersaline microbial ecosystem[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e61692.
- [24] 陈志诚,龚子同,张甘霖,等.不同尺度的中国土壤系统分类参比[J].*土壤*,2004,36(6):584-595.
CHEN Z C, GONG Z T, ZHANG G L, et al. Correlation of soil taxa between Chinese soil genetic classification and Chinese Soil Taxonomy on various scales[J]. *Soils*, 2004, 36(6): 584-595.
- [25] 刘志平,周怀平,解文艳,等.长期氮磷施肥对褐土细菌多样性及土壤酶活性的影响[J].*干旱地区农业研究*,2022,40(2):163-171.
LIU Z P, ZHOU H P, XIE W Y, et al. Effect of long-term combined application of nitrogen and phosphorus on bacterial diversity and soil enzyme activities in cinnamon soil[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2022, 40(2): 163-171.
- [26] 鲍士旦.土壤农化分析[M].北京:中国农业出版社,2000:90-129.
BAO S D. Soil and agricultural chemistry analysis[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 90-129.
- [27] URITSKIY G V, DIRUGGIERO J, TAYLOR J. MetaWRAP-a flexible pipeline for genome-resolved metagenomic data analysis[J]. *Microbiome*, 2018, 6(1): 158.
- [28] LI W Z, GODZIK A. Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences[J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(13): 1658-1659.
- [29] PATRO R, DUGGAL G, LOVE M I, et al. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(4): 417-419.
- [30] MCARDLE B H, ANDERSON M J. Fitting multivariate models to community data: a comment on distance-based redundancy analysis[J]. *Ecology*, 2001, 82(1): 290-297.
- [31] RAMETTE A. Multivariate analyses in microbial ecology[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 62(2): 142-160.
- [32] FIERER N, BRADFORD M A, JACKSON R B. Toward an ecological classification of soil bacteria[J]. *Ecology*, 2007, 88(6): 1354-1364.
- [33] FIERER N, LAUBER C L, RAMIREZ K S, et al. Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients[J]. *The ISME Journal*, 2011, 6(5): 1007-1017.
- [34] BEI S K, ZHANG Y L, LI T T, et al. Response of the soil microbial community to different fertilizer inputs in a wheat-maize rotation on a calcareous soil[J]. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 2018, 260: 58-69.
- [35] BURNS K N, KLUEPFEL D A, STRAUSS S L, et al. Vineyard soil bacterial diversity and composition revealed by 16S rRNA genes: differentiation by geographic features[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 91: 232-247.
- [36] 向君亮,刘权,申永瑞,等.松嫩草原盐碱土细菌多样性分析[J].*干旱地区农业研究*,2020,38(2):62-68.
XIANG J L, LIU Q, SHEN Y R, et al. Variation of bacterial communities in the saline-alkaline soil of meadow on Songnen Plain[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2020, 38(2): 62-68.
- [37] 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.
- [38] 钱勋.好氧堆肥对畜禽粪便中抗生素抗性基因的削减条件探索及影响机理研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2016.
QIAN X. Mechanism and conditions for reducing antibiotic resistance genes during aerobic composting of livestock manure[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2016.
- [39] 赵帝,徐在言,吴山功,等.草鱼肠道微生物抗生素抗性基因研究[J].*水生态学杂志*,2019,40(6):111-116.
ZHAO D, XU Z Y, WU S G, et al. Antibiotic resistance genes in the intestinal microorganisms of grass carp[J]. *Journal of Hydroecology*, 2019, 40(6): 111-116.
- [40] RODRIGUEZ-MOZAS S, CHAMORRO S, MARTI E, et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river[J]. *Water Research*, 2015, 69: 234-242.
- [41] 姜午春.富营养条件下红树林土壤微生物多样性及功能基因研究[D].汉中:陕西理工大学,2018.
JIANG W C. Study on microbial diversity and functional gene from mangrove soil under the eutrophication[D]. Hanzhong: Shaanxi University of Technology, 2018.
- [42] JOVETIC S, ZHU Y, MARCONE G L, et al. β -Lactam and glycopeptide antibiotics: first and last line of defense? [J]. *Trends in Biotechnology*, 2010, 28(12): 596-604.
- [43] MCKENNA M. Antibiotic resistance: the last resort[J]. *Nature*, 2013, 499(7459): 394-396.
- [44] 苏建强,黄福义,朱永官.环境抗生素抗性基因研究进展[J].*生物多样性*,2013,21(4):481-487.
SU J Q, HUANG F Y, ZHU Y G. Antibiotic resistance genes in the environmental[J]. *Biodiversity Science*, 2013, 21(4): 481-487.
- [45] TAMMINEN M, KARKMAN A, LÖHMUS A, et al. Tetracycline resistance genes persist at aquaculture farms in the absence of selection pressure[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(2): 386-391.