

方知库
Eco-Environmental
Knowledge Web

环境科学

ENVIRONMENTAL SCIENCE

ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV

HUANJING KEXUE

■ 主办 中国科学院生态环境研究中心

■ 出版 科学出版社



2019

Vol.40 No.7

第40卷 第7期

目次

《大气污染防治行动计划》实施的环境健康效果评估	武卫玲, 薛文博, 王燕丽, 雷宇, 冯涛, 蔡泽林 (2961)
基于达标约束的南京市环境空气质量情景模拟	谢放尖, 史之浩, 李婧祎, 郑新梅, 胡建林, 刘春蕾, 杨峰 (2967)
郑州市 PM _{2.5} 中水溶性离子特征及来源分析	杨留明, 王申博, 郝祺, 韩士杰, 李晨, 赵庆炎, 燕启社, 张瑞芹 (2977)
能见度与 PM _{2.5} 浓度关系及其分布特征	王继康, 张恒德, 桂海林, 饶晓琴, 张碧辉 (2985)
基于扩散模式反演的橡胶轮胎制造行业 VOCs 排放特征	白红祥, 魏巍, 王雅婷, 任云婷, 臧佳欣, 程水源 (2994)
太原市环境空气中挥发性芳香烃碳同位素组成及来源	李颖慧, 闫雨龙, 李志生, 郝爱胜, 李如梅, 杨帆, 彭林 (3001)
办公楼聚集区空气中 PBDEs 谱分布与污染特征	王琳, 邓雅佳, 廖晓勇, 曹红英, 焦杏春 (3008)
南北水调东线中游枢纽湖泊有色可溶性有机物来源组成特征	张柳青, 彭凯, 周蕾, 石玉, 李元鹏, 周永强, 龚志军, 张运林, 杨艳 (3018)
黄土丘陵沟壑区小流域不同水体氢氧同位素特征	张荷惠子, 于坤霞, 李占斌, 李鹏, 赵宾华, 柯浩成, 蒋凯鑫 (3030)
基于碳氮同位素的澜沧江水库 TOC 来源差异性分析	王从锋, 胡子龙, 杨正健, 丹勇, 赵萍, 郝文超, 聂小芬, 聂睿, 徐刘得, 刘德富 (3039)
李家河水库污染物来源及水体分层对水质的影响	徐进, 黄廷林, 李凯, 杨尚业, 温成成, 林子深, 李衍庆, 刘雪晴 (3049)
水库淹没带土壤有机氯农药分布特征及风险评价	王霞, 张青琢, 赵高峰, 王晓燕 (3058)
银川市湿地表层水中多环芳烃的分布、来源及生态风险评价	田大年, 党丽慧, 丁润梅, 蔡倩, 张鹏举, 汪岭, 杨慧芳 (3068)
人类活动影响下的垂直气候带岩溶泉地球化学特征对比: 以重庆金佛山水房泉、碧潭泉为例	谢国文, 杨平恒, 盛婷, 邓书金, 洪爱花 (3078)
漓江冲洪积扇地下水化学特征及控制因素分析	唐金平, 张强, 胡漾, 张宇, 聂保伟 (3089)
三峡库区蓄水期和非蓄水期附石藻类群落变化及其影响因子分析	付君珂, 刘黎, 贺新宇, 张红波, 董聪聪, 杨燕君, 施军琼, 吴忠兴 (3099)
降雨对香溪河库湾主要藻种原位生长的影响	翁传松, 刘德富, 张佳磊, 龚川, 沈旭舟 (3108)
绿狐尾藻分解及其氮磷释放特征	童雄, 罗沛, 刘锋, 黄敏, 陈哲, 肖润林, 吴金水 (3118)
微藻固定化条件优化及其污水氨氮去除潜力分析	刘祥, 王婧瑶, 吴娟娟, 彭飞, 王凯军 (3126)
钛酸盐纳米管对水中氨氮的吸附特性	张政, 冯长生, 张晓瑞, 郑建奎, 蒋彩云, 李攀杰, 王玉萍 (3135)
基于缺陷重构的类芬顿光催化剂在降解染料废水中的应用	唐清文, 安晓强, 兰华春, 刘会娟, 李海翔 (3146)
N 原子杂化石墨烯高效活化过一硫酸盐降解 RBK5 染料废水	于永波, 黄湾, 董正玉, 吴丽颖, 张倩, 洪俊明 (3154)
Cu ²⁺ 对以 NO ₃ ⁻ 为电子受体反硝化过程的影响	买文可, 彭永臻, 吉建涛 (3162)
CANON 中试反应器启动及性能优化	孙庆花, 吴迪, 周家中, 郑志佳 (3169)
好氧段碳源浓度对同步去除和富集磷酸盐生物膜的影响	徐林建, 潘杨, 章豪, 冯鑫, 魏攀龙, 尤星怡 (3179)
有机物特性对 AAO 系统污泥沉降性能的影响	刘小博, 袁林江, 陈希, 薛欢婷 (3186)
不同污泥浓度下缺氧 FNA 对硝化菌活性的影响	吕心涛, 周桐, 田夏迪, 谷鹏超, 杨岸明, 王佳伟, 张树军 (3195)
ANAMMOX 菌铁自养反硝化工艺的稳定性	张文静, 黄勇, 毕贞, 胡羽婷, 董石语 (3201)
在线 NaClO 反洗对倒置 A ² O-MBR 系统微生物群落的影响	王旭东, 高森, 王莹莹, 杨永哲, 刚家斌, 符国力, 王磊 (3208)
基于有机物释放和经济性的污泥预处理方法评价	袁悦, 谭学军, 郑舍予 (3216)
北京市清水与再生水协同利用优化模型	张田媛, 谭倩, 王淑萍 (3223)
N-亚硝胺在不同处理工艺污水处理厂中的分布及其去除	柳王荣, 赵建亮, 杨愿愿, 姚理, 刘有胜, 应光国 (3233)
北京市生活污水中曲马多和芬太尼的赋存	周子雷, 杜鹏, 白雅, 韩胜, 黄红梅, 徐泽琼, 李喜青 (3242)
贵阳市污水处理厂中典型抗生素的污染水平及生态风险	杨钊, 李江, 张圣虎, 向福亮, 唐涛涛, 杨娅红 (3249)
紫色土丘陵区畜禽养殖场土壤中抗生素抗性基因分布特征	程建华, 唐翔宇, 刘琛 (3257)
四环素对污泥蚯蚓粪中微生物种群和抗性基因的影响	陈景阳, 夏慧, 黄魁, 吴颖 (3263)
热水解污泥厌氧消化过程中肠球菌抗生素抗性基因与毒力基因的转归	李慧莉, 裴媛玫, 李姗, 何芙蓉, 杨月婷, 魏源送, 佟娟 (3270)
鸡粪与中药渣共堆肥对抗生素抗性基因的影响	武晋萍, 陈建文, 刘勇, 张红, 李君剑 (3276)
宁武亚高山湖泊细菌群落的时空格局及驱动机制	王雪, 刘晋仙, 柴宝峰, 罗正明, 赵鹏宇, 暴家兵 (3285)
石家庄市春季景观水体 nirS 型反硝化细菌群落特征分析	张艺冉, 李再兴, 孙悦, 霍然, 孟文茹, 王凌霄, 申邵恒, 杨子程, 周石磊 (3295)
磷差异性调控水稻根际 nirK/nirS 型反硝化菌组成与丰度	湛钰, 高丹丹, 盛荣, 魏文学, 秦红灵, 张文钊, 侯海军, 汤亚芳 (3304)
会仙岩溶湿地、稻田与旱地土壤细菌群落结构特征比较	贾远航, 靳振江, 袁武, 程跃扬, 邱江梅, 梁锦桃, 潘复静, 刘德深 (3313)
湘中典型稻田系统 Cd 平衡分析	蒋凯, 邓潇, 周航, 龙坚, 李欣阳, 董霞, 王树兵, 刘文辉, 侯红波, 彭佩钦, 廖柏寒 (3324)
改良剂对根际土壤-水稻系统中镉运移的影响	李义纯, 王艳红, 唐明灯, 巫彬芳, 李林峰, 艾绍英, 凌志祥 (3331)
重金属固定植物促生细菌的筛选及其阻控小麦富集重金属效应	韩辉, 王晓宇, 蔡红, 姚伦广, 蔡倩迪, 王逸雪, 陈兆进 (3339)
不同品种辣椒镉亚细胞分布和化学形态特征差异	彭秋, 李桃, 徐卫红, 焦璐琛, 邓继宝 (3347)
添加磷对水稻-油菜轮作土壤 N ₂ O 排放影响	孙正, 苏荣琳, 徐鹏, 吴宏涛, 胡金丽, 赵劲松, 胡荣桂 (3355)
渭北旱原土地利用方式对土壤团聚体稳定性及其有机碳的影响	刘杰, 马艳婷, 王宪玲, Sompouviset Thongsouk, 李利敏, 秦亚旭, 赵志远, 郑伟, 翟丙年 (3361)
不同土地利用类型的土壤中多环芳烃的纵向迁移特征	鲁垠涛, 向鑫鑫, 张士超, 刘明丽, 王静, 李爽, 姚宏, 孙绍斌 (3369)
西湖景区土壤中邻苯二甲酸酯污染水平、来源分析和空间分布特征	廖健, 邓超, 陈怡, 周文钊, 林春绵, 张辉 (3378)
生物炭对壤土土壤容重和团聚体的影响	李倩倩, 许晨阳, 耿增超, 张久成, 陈树兰, 王慧玲, 张妍, 负方悦, 杨林, 董胜虎 (3388)
《环境科学》征订启事 (3194)	《环境科学》征稿简则 (3222)
信息 (3256, 3284, 3323)	

紫色土丘陵区畜禽养殖场土壤中抗生素抗性基因分布特征

程建华^{1,2}, 唐翔宇^{1*}, 刘琛¹

(1. 中国科学院、水利部成都山地灾害与环境研究所, 山地表生过程与生态调控重点实验室, 成都 610041; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 鉴于紫色土高垦殖丘陵区土壤中抗生素抗性基因的潜在生态环境风险, 本研究采用高通量荧光定量 PCR 技术, 分析了抗生素抗性基因在不同类型畜禽养殖场(养猪场、养鸡场和养牛场)土壤中的丰度和多样性。结果表明, 3 种养殖场土壤中共检出 79 种抗生素抗性基因和 5 种可移动基因元件, 其中多重耐药类基因是养殖场土壤中丰度最高的耐药基因。不同养殖场土壤中抗生素抗性基因的丰度和多样性均表现为养鸡场和养猪场样品高于养牛场土壤, 且 3 种养殖场土壤样品中的抗性基因表现出不同的类别分布特征。养殖场土壤中较高的可移动基因元件丰度, 及其与抗生素抗性基因丰度显著的相关性 ($P < 0.05$) 说明, 可移动基因元件可能促进了抗生素抗性基因在养殖场土壤中的迁移和扩散。

关键词: 紫色土; 畜禽养殖场; 抗生素抗性基因 (ARGs); 可移动基因元件 (MGEs); 高通量荧光定量 PCR (HT-QPCR)

中图分类号: X171.5; X53 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2019)07-3257-06 DOI: 10.13227/j.hjxx.201811086

Characteristics of Antibiotic Resistance Genes in Various Livestock Feedlot Soils of the Hilly Purple Soil Region

CHENG Jian-hua^{1,2}, TANG Xiang-yu^{1*}, LIU Chen¹

(1. Key Laboratory of Mountain Surface Processes and Ecological Regulation, Institute of Mountain Hazards and Environment, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Given the potential risk posed by antibiotic resistance genes (ARGs) to the eco-environment in the hilly purple soil region, which has been intensively utilized by human, surface soil samples were collected from feedlots of pig, chicken, and cattle farms and were analyzed for the diversity and abundance of ARGs using high-throughput QPCR. In total, 79 ARGs and 5 mobile genetic elements (MGEs) were detected across all samples. Among these genes, multidrug resistance genes were the most abundant type of ARGs. More abundant and diverse ARGs were observed in feedlot soil samples from pig and chicken farms than those from cattle feedlot soils, and these samples showed different distribution patterns of ARGs. High abundance of MGEs and their significant correlation with ARGs ($P < 0.05$) implied an important role of MGEs in the dissemination of ARGs in livestock feedlot soils.

Key words: purple soil; livestock feedlot; antibiotic resistance genes (ARGs); mobile genetic elements (MGEs); high-throughput QPCR (HT-QPCR)

作为一种新型的环境污染物^[1], 抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)所导致的抗生素耐药性问题已在全世界范围内引起极大的关注^[2, 3]。抗生素耐药性是一种自然的现象^[4], 然而自抗生素量产以来人类在医疗以及养殖业中无监管地滥用抗生素使得这一现象飞速发展, 最终导致严重的耐药性问题^[2, 5]。据报道, 引起 2011 年暴发的“毒黄瓜”事件的致病菌因携带多种耐药基因, 导致抗生素治疗失效, 最终造成 33 人死亡^[3]。如果不加以控制, 人类将进入无药可用的“后抗生素时代”^[2]。

除了治疗与预防疾病外, 抗生素因具有促进生长和提高饲料的转化率的作用而被广泛应用在养殖业中。抗生素在畜禽肠道内诱导出耐药菌株, 此外大部分抗生素难以被充分吸收利用, 耐药菌和未被代谢的抗生素 (25% ~ 70%) 一并随排泄物进入周

围环境^[6, 7]。残留的抗生素对环境微生物群落进化施加选择压力, 粪源抗性基因则有可能通过基因水平迁移 (horizontal gene transfer, HGT) 机制进入环境微生物^[8, 9]。环境微生物中的抗性基因还会迁移进入人类致病菌中, 对人类健康造成威胁^[10]。不同动物的生长周期和用药量不同, 粪便中 ARGs 的种类和丰度也不同^[11, 12], 因而不同动物粪便对其受纳环境的影响程度也有可能不同^[13]。然而已有的研究大多针对单一动物^[8, 14]或者有限的几种常报道的抗性基因^[9, 11], 对不同类型养殖场土壤中抗生素抗性基因的整体情况还鲜见报道。

四川是我国的农业大省, 其肉猪出栏量居全国

收稿日期: 2018-11-13; 修订日期: 2019-01-27

基金项目: 中国科学院成都山地所“一三五”方向性项目 (SDS-135-1702); 国家自然科学基金项目 (41471268, 41771521)

作者简介: 程建华 (1990 ~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为土壤微生物学, E-mail: chengjh@imde.ac.cn

* 通信作者, E-mail: xytang@imde.ac.cn

各省市之首. 据报道, 2010 年四川省畜禽粪便排放量为 18.8 亿 t, 总污染量 2.1 亿 t, 略低于河南省, 排在全国第二位^[15]. 此外, 四川省也是我国兽用抗生素消费大省^[16]. 紫色土丘陵区是四川盆地重要的农业区域, 其土层浅薄, 抗侵蚀能力弱, 易发生水土流失与污染物迁移^[17]. 然而目前关于该地区养殖场土壤中抗生素抗性基因的相关研究鲜有报道. 因此, 本研究选取紫色土丘陵区 3 个不同动物类型的养殖场土壤为研究对象, 采用高通量荧光定量技术对抗生素抗性基因丰度和多样性的整体情况进行分析, 以期对紫色土丘陵区养殖场土壤中耐药基因污染状况与生态风险的评价及其污染防治措施的制定提供基础数据和科学依据.

1 材料与方法

1.1 样品采集及处理

所研究的养殖场位于四川省绵阳市盐亭县内, 均为小型养殖场. 养牛场土壤为牛粪堆放地土壤, 仔鸡养殖场土壤为养殖场内仔鸡活动地土壤, 养猪场土壤为猪场排污沟渠周围土壤. 样品采集时间为 2017 年 9 月, 运用 5 点采样法, 采集这 3 家畜禽养殖场表层 0~10 cm 土壤, 现场混匀, 放入冰盒内带回实验室保存于 -20℃ 冰箱, 用于提取样品 DNA.

1.2 土壤 DNA 提取

称取 0.25 g 土壤鲜样按照 PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio Laboratories Inc. CA, 美国) 试剂盒的操作步骤提取土壤总 DNA, 随后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测. DNA 样品浓度和纯度用超微量分光光度计 (NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies Inc., DE, 美国) 检测, 所提取的 DNA 样品 A_{260}/A_{280} 均在 1.8~2.0 之间. DNA 样品用无菌水统一稀释至 $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 后置于 -20℃ 冰箱冷冻保存待测.

1.3 抗生素抗性基因测定

采样高通量荧光定量 PCR (high-throughput QPCR, HT-QPCR) 反应平台 (SmartChip Real-time PCR system, Wafergen Inc., 美国) 测定样品中 ARGs 的丰度和多样性. 高通量定量 PCR 的反应体系和反应条件参考文献^[18]. 本研究中所选取的 296 对引物均在已有文献中被有效验证过, 包括 285 对用于检测抗生素抗性基因, 10 对检测可移动基因元件 (mobile genetic elements, MGEs) 和 1 对检测 16S rDNA 的引物^[19]. 定量 PCR 的数据处理参照文献^[18]进行. 反应结束后, QPCR 的数据通过 Cycler 预设的筛选条件 (扩增效率介于 1.8~2.2 以及熔解曲线单峰) 进行导出. 根据 SmartChip Real-Time PCR

Systems 的仪器性能, 确定 C_T 值为 31 时作为仪器的检测限. 每个样品进行 3 次技术重复实验, 3 次技术重复都被扩增出来时认为是阳性扩增.

1.4 16S rRNA 基因丰度测定

本研究采用 Roche 480 II 荧光定量 PCR 仪 (Roche Diagnostics, 美国) 对样品中 16S rRNA 基因丰度进行绝对定量^[20]. QPCR 反应体系为 20 μL , 包括 10 μL 的 $2 \times \text{LightCycler 480 SYBR}^{\circledR} \text{ Green I Master Mix}$, 1 μL 的 DNA 模板, $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的上下游引物各 1 μL 和 7 μL 灭菌超纯水. QPCR 反应条件为: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 15 s, 60℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 15 s, 总共进行 40 个循环; 反应结束后仪器附带的程序自动添加熔解曲线程序进行分析. 阴性对照为灭菌的超纯水代替样品, 每个样品均做 3 次技术重复实验.

1.5 数据分析

样品中 ARGs 的相对拷贝数计算参照已有研究的方法^[18], 采用公式 (1) 进行计算. HT-QPCR 得到的 16S rRNA 基因相对拷贝数与 QPCR 得到的该基因绝对拷贝数极显著相关 ($P < 0.01$), 因此采用公式 (2) 计算样品中 ARGs 的绝对丰度.

$$\text{ARGs 相对拷贝数} = 10^{[(31-C_T)/(10/3)]} \quad (1)$$

$$\text{ARGs 绝对丰度} = \frac{\text{ARGs 相对拷贝数}}{16\text{S rRNA 基因相对拷贝数}} \times 16\text{S rRNA 基因绝对拷贝数} \quad (2)$$

高通量定量 PCR 的数据采用 Excel 2010 进行计算, OriginPro 9.0 进行相关作图. 采用 R3.5.0 的 vegan 数据包进行主坐标分析和聚类分析, ggplot2 数据包作图.

2 结果与讨论

2.1 紫色土丘陵区畜禽养殖场土壤中抗生素抗性基因的多样性和丰度

采用 HT-QPCR 技术, 3 种养殖场土壤中共检出 79 种抗性基因和 5 种可移动基因元件. 根据其对应的抗生素类型, 可将检出的耐药基因分为 9 类^[20], 包括: 氟喹诺酮类/氯霉素类/酰胺醇类抗性基因 (fluoroquinolone/chloramphenicol/amphenicol, FCA)、氨基糖苷类抗性基因 (Aminoglycoside)、 β -内酰胺类抗性基因 (β -Lactamase)、大环内酯类-林肯酰胺类-链阳性菌素 B 类抗性基因 (Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B, MLSB)、多重耐药类 (Multidrug)、磺胺类抗性基因 (Sulfonamide)、四环素类抗性基因 (Tetracycline)、万古霉素类抗性基因 (Vancomycin) 和其他类 (other). 紫色土丘陵区 3 种养殖场土壤中主要的耐药基因类型为氨基糖苷类、

β -内酰胺类、多重耐药类和四环素类抗性基因，这 4 类基因数量占样品中总检出数的 77.27% ~ 77.78% [图 1(a)]。已有研究表明^[21]，氨基糖苷类、大环内酯类、林肯酰胺类和四环素类抗生素是常用的饲料添加剂，并不包含 β -内酰胺类抗生素。相关分析表明，养殖场土壤中 β -内酰胺类抗性基因丰度与 MLSB 类($r=0.801$, $P<0.01$)和万古霉素类($r=0.831$, $P<0.01$)基因极显著正相关。不同类型抗性基因间显著的正相关性说明这些基因可能共现在相同的可移动基因元件上^[9]，使得抗生素选

择压力可以同时促进其对应的和其他种类的抗性基因富集^[8]。因此本研究中较高的 β -内酰胺类抗性基因检出率可能与抗生素的共选择作用有关^[22]。已有的研究也发现了类似的现象，如 Looft 等^[6]研究了饲料中添加金霉素($100\text{ g}\cdot\text{t}^{-1}$)、磺胺甲噁啉($100\text{ g}\cdot\text{t}^{-1}$)和青霉素($50\text{ g}\cdot\text{t}^{-1}$)对猪肠道内抗性基因丰度的影响，发现加药组中氨基糖苷类抗性基因丰度约是对照组的 100 倍。Zhu 等^[8]的研究发现未使用氨基糖苷类药物的猪场样品中氨基糖苷类抗性基因丰度相比于对照样品最高富集了 10 000 倍。

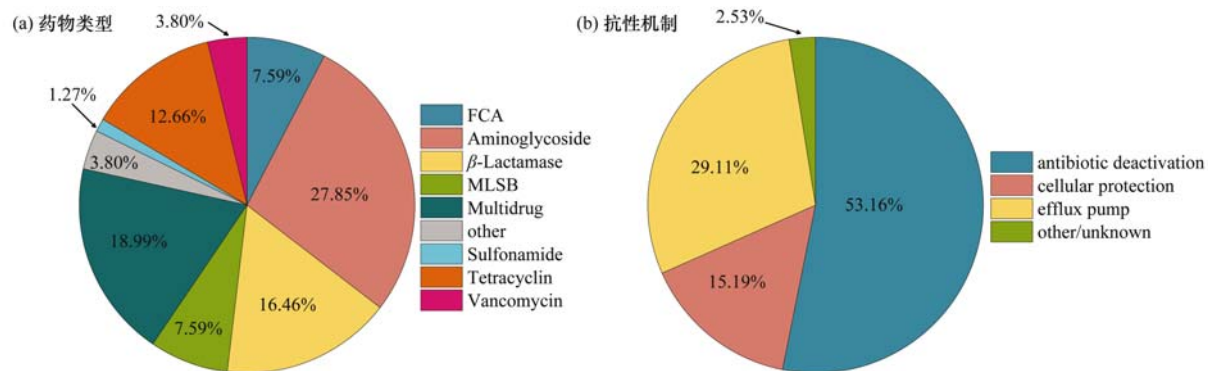


图 1 抗生素抗性基因种类
Fig. 1 Profile of detected antibiotic resistance genes

本研究检出的抗性基因按照抗性机制还可分为抗生素失活机制(antibiotic deactivation)、外排泵机制(efflux pump)、细胞核糖体保护机制(cellular protection)和其他或未知机制(other/unknown) [图 1(b)]，其中抗生素失活机制(53.16%)和外排泵机制(29.11%)是养殖场土壤中主要的耐药机制。这与已有研究的结果一致^[8, 20]，其原因可能是它们均能有效降低微生物胞内抗生素的浓度。抗生素失活酶可将胞内抗生素转换为低活性产物，因此是微生物适应抗生素选择压力的最有效方式之一^[22]，比如氨基糖苷类抗生素^[23]。外排泵机制则可介导抗生素和重金属等多种污染物排出细胞外，因而也是微生物适应环境胁迫条件的主要途径^[22]。

粪紫色土^[19]和施用鸡粪温室土^[25]的研究结果一致。值得注意的是，养殖场土壤中可移动基因元件的丰度较高，仅次于多重耐药类基因(图 2)，说明养殖场土壤中抗性基因发生水平迁移的可能性较高^[20]。

紫色土丘陵区 3 种养殖场土壤中抗生素抗性基因丰度见图 2。土壤样品中各类型抗性基因包括可移动基因元件的绝对丰度数量级范围为 $10^6 \sim 10^9\text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$ [图 2(a)]。其中，多种耐药类抗性基因的丰度最高 ($6.04 \times 10^7 \sim 1.15 \times 10^9\text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$)，其次是 β -内酰胺类抗性基因 ($5.90 \times 10^7 \sim 8.27 \times 10^8\text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$)，而万古霉素类抗性基因呈现出最低丰度 ($0 \sim 1.47 \times 10^7\text{ copies}\cdot\text{g}^{-1}$)。根据每个细菌具有的 16S rRNA 基因数^[24]，将检测到的 ARGs 和 MGEs 丰度进行归一化^[18]，计算 ARGs 的相对丰度 [图 2(b)]。与基因绝对丰度类似，多重耐药类抗性基因具有最高的相对丰度，这与已有关于施用猪

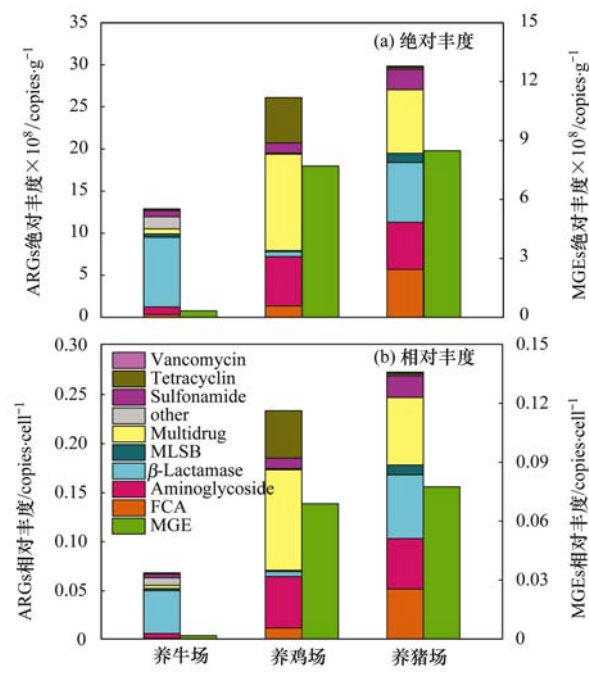


图 2 不同养殖场土壤中抗生素抗性基因丰度
Fig. 2 Abundance of ARGs detected in the soil samples of different livestock feedlots

2.2 动物种类对畜禽养殖场土壤中抗生素抗性基因的影响

已有研究表明,动物种类对畜禽粪便和施粪肥土中抗生素抗性基因的多样性和丰度均有影响^[13]. 本研究中,养牛场、养鸡场和养猪场的土壤样品中分别检测到27、44和36种抗性基因[图3(a)],养鸡场和养猪场土壤中耐药基因种类数高于养牛场的样品. 相似地,不同养殖场土壤样品中 ARGs 的丰度也表现为养猪场和养鸡场高于养牛场(图2). 这与前人的研究结果一致^[26],其原因可能与养殖不同动物所使用的抗生素种类和使用量不同有关^[16]. 相对于养牛场,猪场和鸡场的养殖密度较大,出栏时间也更短,因此养猪场和养鸡场的抗生素使用量一般远大于养牛场^[27]. 这种差别导致猪粪和鸡粪中抗生素残留量^[28]和耐药基因丰度和种类^[13]均高于牛粪,从而使猪粪和鸡粪受纳环境中耐药基因多样性一般高于牛粪. Qian 等^[12]对陕西省12家规模化养殖场的调查结果显示畜禽粪便中抗性基因的多样性和丰度大小顺序为鸡粪>猪粪>牛粪. Peng

等^[13]分析了长期施用猪粪和牛粪土壤中38种抗性基因检出情况,发现猪粪和牛粪中分别有32种和23种抗性基因被检出,而在施肥土中这些数字分别为25种和10种. 他们还发现施用猪粪显著提高土壤中抗性基因丰度而施加牛粪并没有导致土壤中抗生素耐药性的扩散.

通过韦恩图进一步分析不同养殖场土壤中抗性基因的关系,结果表明土壤中检测到的抗性基因中3种养殖场共有基因仅5种(*aadA2-01*、*aadA2-03*、*cphA-01*、*qacEdelta1-01*和*sul2*),多数基因属于不同养殖场所独有[图3(b)]. 养牛场、养鸡场和养猪场独有的耐药基因分别占其总检出数的37.04%、59.09%和55.56%. 不同养殖场土壤中各类抗性基因的丰度占比也不同,如养牛场土壤的 β -内酰胺类抗性基因丰度最高而养猪场和养鸡场均以多重耐药类基因为最高(图2). 上述结果说明不同养殖场土壤中耐药基因分布情况也可能存在差别. 采用主坐标分析方法分析3种养殖场土壤中抗性基因的分布特征,结果表明不同养殖场样品存在

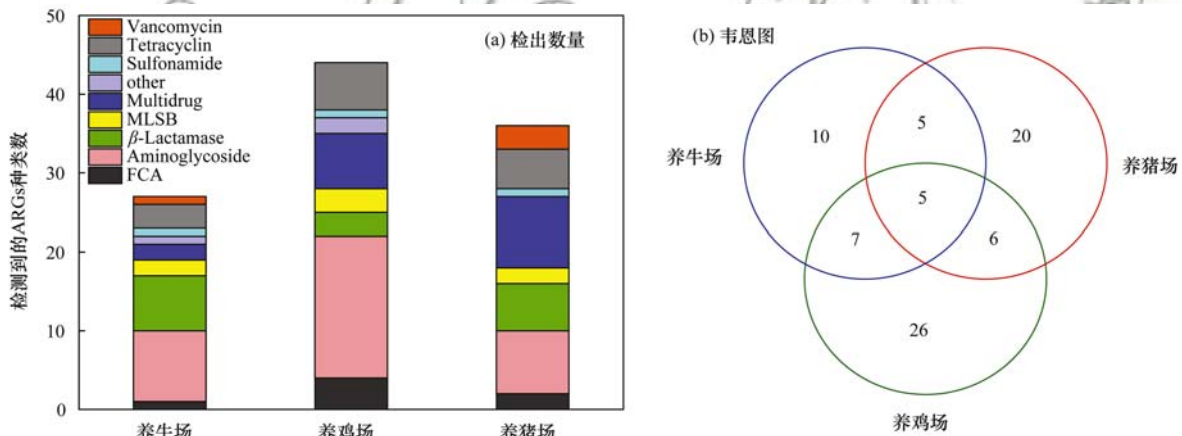


图3 不同类型畜禽养殖场土壤中抗生素抗性基因种类

Fig. 3 Numbers of ARGs detected in the soil samples collected from different livestock feedlots

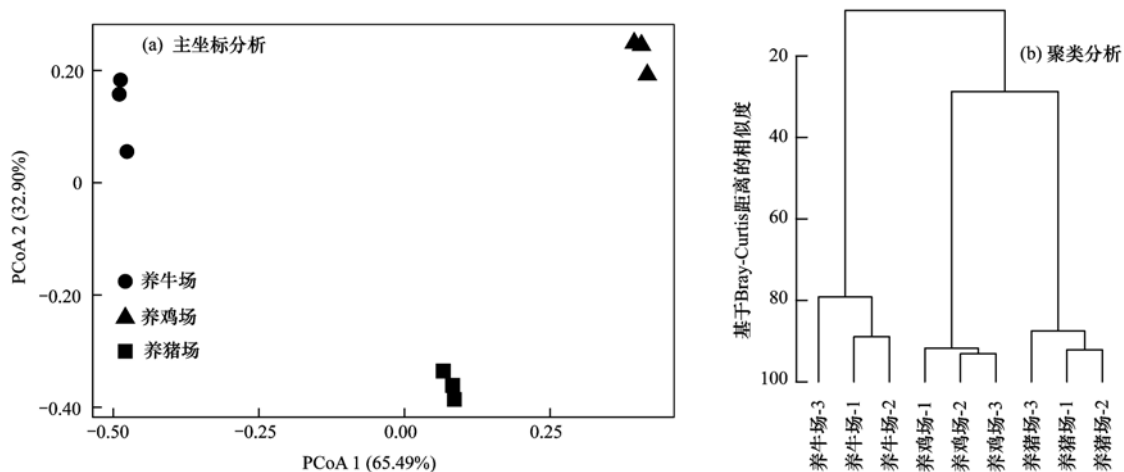


图4 养殖场土壤中抗生素抗性基因的主坐标分析和聚类分析

Fig. 4 PCoA analysis and hierarchical clustering of ARGs in the soil samples of livestock feedlots

明显差异，第一轴和第二轴共解释了 98.39% 的抗性基因分异，说明养殖的动物种类对养殖场土壤中耐药基因分布特征有明显的影响[图 4(a)]。聚类分析也得出了相似的结果，不同养殖场土壤按动物种类分别形成 3 簇，且养猪场和养鸡场土壤中抗性基因的差别没有它们与养牛场土壤样品的差别明显[图 4(b)]。

2.3 养殖场土壤中抗生素抗性基因与可移动基因元件的关系

耐药基因的水平迁移是导致抗生素耐药性在环境中快速传播和扩散的主要原因^[29]。已有的研究发现河水^[18]和施粪肥土^[13]中抗生素抗性基因与可移动基因元件，包括整合子和转座子间存在显著的正相关性。Pearson 相关分析表明(表 1)，养殖场土壤中氟喹诺酮类/氯霉素类/胺酰醇类抗性基因、氨基糖苷类抗性基因、多重耐药类抗性基因、磺胺类抗性基因的丰度和耐药基因总丰度与可移动基因元件的相对丰度和绝对丰度均显著正相关 ($P < 0.05$)。本研究中耐药基因与可移动基因元件之间显著的正相关关系以及样品中较高的可移动基因元件丰度说明养殖场土壤中抗性基因发生水平迁移的可能性较高，可移动基因元件可能促进了抗生素耐药性在养殖场土壤中的传播和扩散。然而考虑到本研究选取的采样点较少，且未包含未受污染的对照样品，上述现象是否具有普遍性，仍需进一步地以不同动物、不同养殖规模和不同养殖方式的多个畜禽养殖场为考察对象加以系统研究与确认。

表 1 抗生素抗性基因与可移动基因元件的相关关系¹⁾

Table 1 Relationship of between ARGs and MGEs		
项目	MGEs 相对丰度	MGEs 绝对丰度
FCA	0.740 *	0.716 *
Aminoglycoside	0.976 **	0.974 **
β -Lactamase	-0.050	-0.506
MLSB	0.485	0.319
Multidrug	0.898 **	0.895 **
other	-0.973 **	-0.975 **
Sulfonamide	0.835 **	0.761 *
Tetracyclin	0.420	0.424
Vancomycin	0.441	0.318
ARGs 总和	0.988 **	0.969 **

1) * 表示 $P < 0.05$, ** 表示 $P < 0.01$

3 结论

(1) 动物种类对紫色土丘陵区养殖土壤抗生素抗性基因有明显影响，表现为养猪场和养鸡场土壤中抗生素抗性基因丰度和多样性均高于养牛场。

(2) 可移动基因元件丰度与抗性基因丰度显著相关，说明样品中较高的可移动基因元件丰度可能促进了抗性基因在养殖场土壤环境中的传播和

扩散。

参考文献：

[1] Pruden A, Pei R T, Storteboom H, *et al.* Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado [J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, **40** (23): 7445-7450.

[2] 朱永官, 欧阳玮莹, 吴楠, 等. 抗生素耐药性的来源与控制对策[J]. *中国科学院院刊*, 2015, **30**(4): 509-516.

Zhu Y G, Ouyang W Y, Wu N, *et al.* Antibiotic resistance: sources and mitigation [J]. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2015, **30**(4): 509-516.

[3] 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 environment [J]. *Biodiversity Science*, 2013, **21**(4): 481-487.

[4] D'Costa V M, King C E, Kalan L, *et al.* Antibiotic resistance is ancient [J]. *Nature*, 2011, **477** (7365): 457-461.

[5] Knapp C W, Dolfing J, Ehler P A I, *et al.* Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940 [J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, **44** (2): 580-587.

[6] Looft T, Johnson T A, Allen H K, *et al.* In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, **109**(5): 1691-1696.

[7] Chee-Sanford J C, Mackie R I, Koike S, *et al.* Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste [J]. *Journal of Environmental Quality*, 2009, **38**(3): 1086-1108.

[8] Zhu Y G, Johnson T A, Su J Q, *et al.* Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, **110**(9): 3435-3440.

[9] He L Y, Liu Y S, Su H C, *et al.* Dissemination of antibiotic resistance genes in representative broiler feedlots environments: identification of indicator ARGs and correlations with environmental variables [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, **48**(22): 13120-13129.

[10] Forsberg K J, Reyes A, Wang B, *et al.* The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens [J]. *Science*, 2012, **337**(6098): 1107-1111.

[11] Cheng W X, Chen H, Su C, *et al.* Abundance and persistence of antibiotic resistance genes in livestock farms: a comprehensive investigation in eastern China [J]. *Environment International*, 2013, **61**: 1-7.

[12] Qian X, Gu J, Sun W, *et al.* Diversity, abundance, and persistence of antibiotic resistance genes in various types of animal manure following industrial composting [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, **344**: 716-722.

[13] Peng S, Feng Y Z, Wang Y M, *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.

[14] Zhou B R, Wang C, Zhao Q, *et al.* Prevalence and dissemination of antibiotic resistance genes and coselection of heavy metals in Chinese dairy farms [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, **320**: 10-17.

[15] 仇焕广, 廖绍攀, 井月, 等. 我国畜禽粪便污染的区域差异与发展趋势分析[J]. *环境科学*, 2013, **34**(7): 2766-2774.

Qiu H G, Liao S P, Jing Y, *et al.* Regional differences and

- development tendency of livestock manure pollution in China[J]. Environmental Science, 2013, **34**(7): 2766-2774.
- [16] Van Boeckel T P, Brower C, Gilbert M, *et al.* Global trends in antimicrobial use in food animals[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, **112**(18): 5649-5654.
- [17] 鲜青松, 唐翔宇, 朱波. 坡耕地薄层紫色土-岩石系统中氮磷的迁移特征[J]. 环境科学, 2017, **38**(7): 2843-2849.
Xian Q S, Tang X Y, Zhu B. Transport of nitrogen and phosphorus from sloping farmland with thin purple soil overlying rocks[J]. Environmental Science, 2017, **38**(7): 2843-2849.
- [18] 张丹丹, 郭亚平, 任红云, 等. 福建省敖江下游抗生素抗性基因分布特征[J]. 环境科学, 2018, **39**(6): 2600-2606.
Zhang D D, Guo Y P, Ren H Y, *et al.* Characteristics of antibiotic resistance genes in downstream areas of the Aojiang river, Fujian province[J]. Environmental Science, 2018, **39**(6): 2600-2606.
- [19] Cheng J H, Tang X Y, Cui J F. Effect of long-term manure slurry application on the occurrence of antibiotic resistance genes in arable purple soil (entisol) [J]. Science of the Total Environment, 2019, **647**: 853-861.
- [20] 黄福义, 安新丽, 陈青林, 等. 梅花鹿养殖场抗生素抗性基因分布特征[J]. 环境科学, 2016, **37**(11): 4402-4409.
Huang F Y, An X L, Chen Q L, *et al.* Distribution characteristics of antibiotic resistance genes in sika deer farm [J]. Environmental Science, 2016, **37**(11): 4402-4409.
- [21] 魏光伟, 魏文康, 余永鹏, 等. 饲料抗生素添加剂的应用技术[J]. 广东饲料, 2007, **16**(3): 15-16.
Wei G W, Wei W K, Yu Y P, *et al.* The technique of antibiotics application in Feed[J]. Guangdong Feed, 2007, **16**(3): 15-16.
- [22] Chen B W, Lin L, Fang L, *et al.* Complex pollution of antibiotic resistance genes due to *beta*-lactam and aminoglycoside use in aquaculture farming[J]. Water Research, 2018, **134**: 200-208.
- [23] Zhang X X, Zhang T, Fang H H P. Antibiotic resistance genes in water environment [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, **82**(3): 397-414.
- [24] Klappenbach J A, Saxman P R, Cole J R, *et al.* rrnldb: the ribosomal RNA operon copy number database[J]. Nucleic Acids Research, 2001, **29**(1): 181-184.
- [25] 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 & Technology, 2015, **49**(2): 1095-1104.
- [26] 段曼莉. 生物炭对土壤中抗生素及其抗性基因变化的影响研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017. 23-24.
Duan M L. Effects of biochar application on variation of antibiotic and antibiotic resistance genes in soil[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2017. 23-24.
- [27] 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.
- [28] Hou J, Wan W N, Mao D Q, *et al.* Occurrence and distribution of sulfonamides, tetracyclines, quinolones, macrolides, and nitrofurans in livestock manure and amended soils of Northern China [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, **22**(6): 4545-4554.
- [29] Dantas G, Sommer M O A. How to fight back against antibiotic resistance[J]. American Scientist, 2014, **102**(1): 42-51.

CONTENTS

Health Benefit Evaluation for Air Pollution Prevention and Control Action Plan in China	WU Wei-ling, XUE Wen-bo, WANG Yan-li, <i>et al.</i> (2961)
Scenario Simulation Study Constrained by the Ambient Air Quality Standards in Nanjing	XIE Fang-jian, SHI Zhi-hao, LI Jing-yi, <i>et al.</i> (2967)
Characteristics and Source Analysis of Water-Soluble Ions in PM _{2.5} in Zhengzhou	YANG Liu-ming, WANG Shen-bo, HAO Qi, <i>et al.</i> (2977)
Relationship Between Atmospheric Visibility and PM _{2.5} Concentrations and Distributions	WANG Ji-kang, ZHANG Heng-de, GUI Hai-lin, <i>et al.</i> (2985)
Characteristics of VOCs Emitted from the Rubber Tire Manufacturing Industry Based on the Inverse-Dispersion Calculation Method	BAI Hong-xiang, WEI Wei, WANG Ya-ting, <i>et al.</i> (2994)
Stable Carbon Isotope Compositions and Source Apportionments of Volatile Aromatic Compounds in the Urban Atmosphere of Taiyuan, China	LI Ying-hui, YAN Yu-long, LI Zhi-sheng, <i>et al.</i> (3001)
Spectral Distribution and Pollution Characteristics of Polybrominated Diphenyl Ethers in the Air of an Office Building Clustered Area	WANG Lin, DENG Ya-jia, LIAO Xiao-yong, <i>et al.</i> (3008)
Characterizing Chromophoric Dissolved Organic Matter in Key Lakes in the Middle Reaches of the East Route of the South-North Water Diversion Project	ZHANG Liu-qing, PENG Kai, ZHOU Lei, <i>et al.</i> (3018)
Characteristics of Hydrogen and Oxygen Isotopes in Different Water Bodies in Hilly and Gully Regions of the Loess Plateau	ZHANG He-hui-zi, YU Kun-xia, LI Zhan-bin, <i>et al.</i> (3030)
Analysis of Total Organic Carbon Source Differences Between New and Old Cascade Reservoirs using Carbon and Nitrogen Isotopes	WANG Cong-feng, HU Zi-long, YANG Zheng-jian, <i>et al.</i> (3039)
Pollution Sources and the Stratification Effects on Water Quality in Lijiahe Reservoir	XU Jin, HUANG Ting-lin, LI Kai, <i>et al.</i> (3049)
Distribution and Potential Risk of Organochlorine Pesticides in the Soil of a Submerged Area Around Miyun Reservoir	WANG Xia, ZHANG Qing-zhuo, ZHAO Gao-feng, <i>et al.</i> (3058)
Distribution, Sources, and Ecological Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Surface Waters of the Yinchuan Wetlands	TIAN Da-nian, DANG Li-hui, DING Run-mei, <i>et al.</i> (3068)
Comparison of the Geochemical Characteristics of Karst Springs of a Vertically Zoned Climate Region under Human Activity: A Case of Shuifang Spring and Bitan Spring in the Jinfo Mountain Area, Chongqing	XIE Guo-wen, YANG Ping-heng, SHENG Ting, <i>et al.</i> (3078)
Groundwater Chemical Characteristics and Analysis of Their Controlling Factors in an Alluvial Fan of Jianjiang River	TANG Jin-ping, ZHANG Qiang, HU Yang, <i>et al.</i> (3089)
Dynamics of Epilithic Algae Communities and Their Relationship with Environmental Factors During Storage and Non-storage Periods in the Three Gorges Reservoir	FU Jun-ke, LIU Li, HE Xin-yu, <i>et al.</i> (3099)
Influence of Rainfall on the <i>in situ</i> Growth of Dominant Algae Species in Xiangxi River	WENG Chuan-song, LIU De-fu, ZHANG Jia-lei, <i>et al.</i> (3108)
Decomposition of <i>Myriophyllum aquaticum</i> and the Associated Release of Nitrogen and Phosphorus	TONG Xiong, LUO Pei, LIU Feng, <i>et al.</i> (3118)
Optimization of the Parameters for Microalgae Immobilization and Analysis of Its Recovery Potential for Ammonia Nitrogen in Wastewater	LIU Xiang, WANG Jing-yao, WU Juan-juan, <i>et al.</i> (3126)
Ammonium Adsorption Characteristics in Aqueous Solution by Titanate Nanotubes	ZHANG Zheng, FENG Chang-sheng, ZHANG Xiao-nui, <i>et al.</i> (3135)
Application of Fenton-like Photocatalysts Based on Defect Reconstruction in Degradation of Dye Wastewater	TANG Qing-wen, AN Xiao-qiang, LAN Hua-chun, <i>et al.</i> (3146)
Degradation of RBK5 with Peroxymonosulfate Efficiently Activated by N-Doped Graphene	YU Yong-bo, HUANG Wan, DONG Zheng-yu, <i>et al.</i> (3154)
Effect of Cu ²⁺ on Denitrification Using NO ₂ ⁻ as an Electron Acceptor	MAI Wen-ke, PENG Yong-zhen, JI Jian-tao (3162)
Start-up and Performance Optimization of a CANON Pilot Reactor	SUN Qing-hua, WU Di, ZHOU Jia-zhong, <i>et al.</i> (3169)
Effects of Aerobic Carbon Sources on Biofilm with Simultaneous Phosphate Removal and Enrichment	XU Lin-jian, PAN Yang, ZHANG Hao, <i>et al.</i> (3179)
Effect of Organic Characteristics on Sludge Settability in an AAO System	LIU Xiao-bo, YUAN Lin-jiang, CHEN Xi, <i>et al.</i> (3186)
Effect of Free Nitrous Acid on the Activity of Nitrifying Bacteria in Different Sludge Concentrations Under Anoxic Conditions	LÜ Xin-tao, ZHOU Tong, TIAN Xia-di, <i>et al.</i> (3195)
Stability of ZVI-dependent Autotrophic Denitrification by ANAMMOX Bacteria	ZHANG Wen-jing, HUANG Yong, BI Zhen, <i>et al.</i> (3201)
Effect of On-line NaClO Backwashing on Microbial Communities in an Inverted A ² O-MBR System	WANG Xu-dong, GAO Miao, WANG Ying-ying, <i>et al.</i> (3208)
Evaluation of Organic Matter Release and Economy for Various Pretreatments of Sewage Sludge	YUAN Yue, TAN Xue-jun, ZHENG She-yu (3216)
Model-based Optimization for the Coordinated Supply of Clear and Reclaimed Water in the Central Districts of Beijing, China	ZHANG Tian-yuan, TAN Qian, WANG Shu-ping (3223)
Occurrence and Removal of N-nitrosamines in the Wastewater Treatment Plants Using Different Treatment Processes	LIU Wang-rong, ZHAO Jiang-liang, YANG Yuan-yuan, <i>et al.</i> (3233)
Occurrence of Tramadol and Fentanyl Use in Domestic Wastewater in Beijing	ZHOU Zi-lei, DU Peng, BAI Ya, <i>et al.</i> (3242)
Pollution Level and Ecological Risk of Typical Antibiotics in Guiyang Wastewater Treatment Plants	YANG Zhao, LI Jiang, ZHANG Sheng-hu, <i>et al.</i> (3249)
Characteristics of Antibiotic Resistance Genes in Various Livestock Feedlot Soils of the Hilly Purple Soil Region	CHENG Jian-hua, TANG Xiang-yu, LIU Chen (3257)
Effects of Tetracycline on Microbial Communities and Antibiotic Resistance Genes of Vermicompost from Dewatered Sludge	CHEN Jing-yang, XIA Hui, HUANG Kui, <i>et al.</i> (3263)
Fate of Antibiotic Resistance Genes and Virulence Genes in Enterococci During Anaerobic Digestion Process of Thermal Hydrolyzed Sludge	LI Hui-li, PEI Yuan-mei, LI Shan, <i>et al.</i> (3270)
Effect of Co-composting of Chicken Manure with Chinese Medicinal Herbal Residues on Antibiotic Resistance Genes	WU Jin-ping, CHEN Jian-wen, LIU Yong, <i>et al.</i> (3276)
Spatio-temporal Patterns of Microbial Communities and Their Driving Mechanisms in Subalpine Lakes, Ningwu, Shanxi	WANG Xue, LIU Jin-xian, CHAI Bao-feng, <i>et al.</i> (3285)
Community Structure Characteristics of <i>nirS</i> Denitrifying Bacteria of Spring Typical Parkland Waterbodies in Shijiazhuang City	ZHANG Yi-ran, LI Zai-xing, SUN Yue, <i>et al.</i> (3295)
Differential Responses of Rhizospheric <i>nirK</i> - and <i>nirS</i> -type Denitrifier Communities to Different Phosphorus Levels in Paddy Soil	ZHAN Yu, GAO Dan-dan, SHENG Rong, <i>et al.</i> (3304)
Comparison of Soil Bacterial Community Structure Between Paddy Fields and Dry Land in the Huixian Karst Wetland, China	JIA Yuan-hang, JIN Zhen-jiang, YUAN Wu, <i>et al.</i> (3313)
Cd Balance Analysis of a Typical Rice Paddy System in Central Hunan	JIANG Kai, DENG Xiao, ZHOU Hang, <i>et al.</i> (3324)
Effects of an Amendment on Cadmium Transportation in the Rhizosphere Soil-Rice System	LI Yi-chun, WANG Yan-hong, TANG Ming-deng, <i>et al.</i> (3331)
Isolation of Heavy Metal Immobilizing and Plant Growth-Promoting Bacteria and Its Effects on Reducing Heavy Metal Accumulation in Wheat	HAN Hui, WANG Xiao-yu, CAI Hong, <i>et al.</i> (3339)
Differences in the Cadmium-Enrichment Capacity and Subcellular Distribution and Chemical Form of Cadmium in Different Varieties of Pepper	PENG Qiu, LI Tao, XU Wei-hong, <i>et al.</i> (3347)
Effect of Phosphorus Addition on N ₂ O Emissions from Rice-Rapeseed Rotation Soils	SUN Zheng, SU Rong-lin, XU Peng, <i>et al.</i> (3355)
Impact of Land Use Type on the Stability and Organic Carbon Content of Soil Aggregates in the Weibei Dryland	LIU Jie, MA Yan-ting, WANG Xian-ling, <i>et al.</i> (3361)
Vertical Distribution Characteristics of PAHs in Soils with Different Land Use Types During Rapid Urbanization	LU Yin-tao, XIANG Xin-xin, ZHANG Shi-chao, <i>et al.</i> (3369)
Pollution Levels, Sources, and Spatial Distribution of Phthalate Esters in Soils of the West Lake Scenic Area	LIAO Jian, DENG Chao, CHEN Yi, <i>et al.</i> (3378)
Impact of Biochar on Soil Bulk Density and Aggregates of Lou Soil	LI Qian-qian, XU Chen-yang, GENG Zeng-chao, <i>et al.</i> (3388)