环境科学
(HUANJING KEXUE)
ENVIRONMENTAL SCIENCE
第44卷　第1期
2023年1月15日

目　次

生方知库
Eco-Environmental
Knowledge Web

环 境 科 学
Environmental Science

第44卷第1期 2023年1月
Vol.44,No.1 Jan.,2023

青海湖周边地区表层土壤重金属含量和抗性基因丰度及相关性

胡石磊, 瞿剑里, 章丽, 赵美蓉*
(浙江工业大学环境学院, 杭州 310000)

摘要: 土壤重金属污染以及抗性基因的流行一直是全球关注的问题,已有许多研究报道了重金属和抗性基因在土壤中的含量,但是高原地区重金属和抗生素抗性基因(ARGs)在土壤中的含量并不清楚. 因此,调查分析了青海地区土壤中重金属和抗性基因的环境残留量和分布情况,并且探究了土壤中重金属含量和抗生素抗性基因之间的关系. 在土壤样品中,重金属 ω(Zn)最高[平均值:(50.27 ± 19.88) mg·kg^{-1}],其次是重金属 ω(Cd)[平均值:(30.27 ± 9.45) mg·kg^{-1}],重金属 ω(Hg) 最低[平均值:(0.027 ± 0.019) mg·kg^{-1}]. 土壤中重金属抗性基因的亚型主要是 *czcA*、*merA* 和 *merP*,它们主要功能是负责对 Hg 产生耐性. 土壤中 β-内酰胺酶抗性基因相对丰度(0.150 5)最高,占 ARGs 总丰度的 47.54%,四环素(tetracycline)耐药基因占 ARGs 总丰度的 16.93%, FCA 约占 14.56%, MLSB 约占 8.77%. 可移动的遗传元件(MGEs)多样性和相对丰度均较低,仅检测出 *tnpA01* 基因, *intI1* 和 *intI2* 未检出. 相关性研究表明,土壤中 Cu($r = -0.533$, $P = 0.006$)和 Hg($r = 0.692$, $P = 0.006$)含量与海拔高度呈显著负相关,其他重金属含量与海拔高度无显著相关性. 此外,重金属含量与土壤类型显著相关 ($P < 0.05$). 土壤中重金属 Hg 含量与 *czcA*($r = 0.692$, $P = 0.006$)、*merA*($r = 0.816$, $P = 0.007$)和 *merP*($r = 0.594$, $P = 0.02$)之间存在显著正相关. 研究结果阐明了重金属和 ARGs 在青藏高原地区的发生和分布,并发现土壤中重金属含量与抗性基因存在显著相关性.

关键词:重金属; 土壤污染; 抗生素; 抗生素抗性基因(ARGs); 海拔高度; 可移动遗传元件(MGEs)
中图分类号: X53 **文献标识码**: A **文章编号**: 0250-3301(2023)01-0336-11 **DOI**: 10.13227/j.hjkx.202202175

Heavy Metal Content and Resistance Gene Abundance and Related Properties in the Surface Soil around Qinghai Lake

HU Shi-lei, QU Jian-li, ZHANG Li, ZHAO Mei-rong*
(College of Environment, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310000, China)

Abstract: Soil heavy metal pollution and the prevalence of resistance genes have been a global concern, and thus many studies have reported the content of heavy metals and resistance genes in soils; however, the contents of heavy metals and antibiotic resistance genes (ARGs) in the soil in highland areas is still unclear. In this study, the environmental residues and distribution of heavy metals and resistance genes in the soil in Qinghai were analyzed, and the relationship between the concentration of heavy metals and antibiotic resistance genes in the soil was explored. Among the soil samples, the content of heavy metal zinc was the highest [mean: (50.27 ± 19.88) mg·kg^{-1}], followed by the content of heavy metal cadmium [mean: (30.27 ± 9.45) mg·kg^{-1}], and the content of heavy metal mercury was the lowest [mean: (0.027 ± 0.019) mg·kg^{-1}]. The subtypes of heavy metal resistance genes in soils were mainly *czcA*, *merA*, and *merP*, whose main function was to be responsible for developing mercury resistance. The relative abundance of β-lactamase resistance genes (0.150 5) was the highest in soil, accounting for 47.54% of the total abundance of ARGs; tetracycline resistance genes accounted for 16.93% of the total abundance of ARGs, FCA accounted for approximately 14.56%, and MLSB accounted for approximately 8.77%. The diversity and relative abundance of movable genetic elements (MGEs) were low, and only the *tnpA01* gene was detected; *intI1* and *intI2* were not detected. Correlation studies showed that Cu content ($r = -0.533$, $P = 0.006$) and Hg ($r = 0.692$, $P = 0.006$) in soil were significantly negatively correlated with altitude, whereas other heavy metals were not significantly correlated with altitude. In addition, heavy metal content was significantly correlated with soil type ($P < 0.05$). There was a significant positive correlation between heavy metal mercury content in soils and *czcA* ($r = 0.692$, $P = 0.006$), *merA* ($r = 0.816$, $P = 0.007$), and *merP* ($r = 0.594$, $P = 0.02$). The results of this study elucidated the occurrence and distribution of heavy metals and ARGs in the Tibetan Plateau region and found that the content of heavy metals in the soil was significantly related to resistance genes.

Key words: heavy metals; soil pollution; antibiotics; antibiotic resistance genes (ARGs); altitude; movable genetic elements (MGEs)

土壤重金属污染一直是环境治理的热点问题[1,2]. 重金属在各种环境介质中的含量较低,因此也被认为是微量元素[3]. 重金属污染已遍及世界许多地区,尤其是中国等发展中国家[4]. 与世界其他地区重金属污染相比,我国土壤重金属污染并不严重,然而,相较于某些重金属,我国似乎正在以更快的速度增加[5]. 此外,重金属污染是隐蔽的、持续的和不可逆的[6]. 中国是最大的砷矿开采国、生产国和使用国,土壤砷污染较为严重[7].

抗生素存在于多种环境介质中[8,9]. 抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)污染在近二十年逐渐走入大众视野. 因此, ARGs 被定义为一种新型的环境污染物[10]. 如今, ARGs 已成为全球环

收稿日期: 2022-02-23; 修订日期: 2022-04-24
基金项目: 第二次青藏高原综合科学考察研究项目(2019QZKK05010210)
作者简介: 胡石磊(1996~),男,硕士研究生,主要研究方向为土壤重金属污染, E-mail:664980239@qq.com
* 通信作者, E-mail:Zhaomr@zjut.edu.cn

境健康关注的焦点[11]. 有研究表明,环境中耐抗生素细菌可能会对人类健康产生风险[12,13]. 自 1940 年青霉素问世以来,抗生素在人类疾病的治疗和预防中发挥了至关重要的作用[14]. 我国每年使用抗生素总量约 16.2 万 t,其中兽用抗生素占总量的 52%,主要用于治疗动物疾病和促进动物生长[15,16]. 医用和兽用抗生素的滥用导致环境中 ARGs 的种类和数量不断增加,而 ARGs 也普遍存在于现代环境介质和人体微生物中[17,18]. 如今,抗生素耐药性已成为大多数人面临的重大公共卫生问题[19]. Knapp 等[20]的研究表明,自 1940 年以来,所测的各种 ARGs 明显增加,尤其是四环素.

随着抗生素污染问题的进一步加剧,有研究表明,土壤重金属含量与 ARGs 存在一定的相关性,并对 ARGs 丰度产生一定影响[21,22]. 早于抗生素时代的微生物群落对抗生素极为敏感,而它们的移动遗传元件(movable genetic elements, MGEs)含有很少的抗性基因[23]. 此外,有研究表明,环境中的耐药菌具有对抗生素产生耐药性的特征,这可能通过水平基因转移赋予病原体耐药性[24,25]. 因此,分析环境中 ARGs 和可移动遗传元件的综合分布,对了解现代抗生素耐药性的演化和传播具有重要意义.

目前国内外对抗性基因的研究主要集中在人为活动密切、海拔低的工业化地区,对于高海拔地区土壤重金属和抗性基因之间的关系研究较少. 因此,本研究目的是了解青海湖周边地区土壤中重金属和 ARGs 的污染水平和分布,分析环境因子和重金属与 ARGs 的关系.

1　材料与方法

1.1　研究区域概况

青海湖位于青海省西北部的青海湖盆地内,既是中国最大的内陆湖泊,也是中国最大的咸水湖. 青海湖具有高原大陆性气候,光照充足,日照强烈; 冬寒夏凉,暖季短暂,冷季漫长,春季多大风和沙暴; 雨量偏少,雨热同季,干湿季分明. 湖区东部和南部气温稍高,年均温在 0.3 ~ 1.1℃之间; 西部和北部稍低,年均温在 −0.8 ~ 0.6℃之间,平均最高气温在 6.7 ~ 8.7℃之间,平均最低气温在 −6.7 ~ 4.9℃之间,极端最高气温为 25℃和 24.4℃,极端最低气温为 −31 ~ −33.4℃. 湖区全年降水量偏少. 但东部和南部稍高于北部和西部,东部全年降水量是 412.8 mm,南部是 359.4 mm,西北部 370.3 mm,西部是 360.4 mm 和 324.5 mm. 全年蒸发量达1 502 mm,蒸发量远远超过降水量. 湖区降水量季节变化大,降水多集中在 5 ~ 9 月,雨热同季. 采样点环境因素如表 1 所示.

表 1　采样点位信息概述

Table 1　Overview of sampling site information

编号	点位名称	海拔/m	年均降雨量/mm	年均温度/℃	土壤 pH 值
S1	德令哈	2 586	169	5.3	8.2
S2	胡杨林保护区	2 787	25.2	5.1	8.7
S3	格尔木	2 815	41.5	4	8.7
S4	共和 2	2 732	400	3.2	8.39
S5	西海 1	3 310	366.4	4	7.8
S6	西海 2	3 210	350	4	7.5
S7	刚察	3 280	370.5	0.91	8.42
S8	共和(青海湖边)	3 215	450	3.2	8.2
S9	沱沱河	4 528	283.1	−4.4	7.5
S10	藏羚羊观景台	4 596	365	−6	8.9
S11	可可西里无人区	4 609	367.8	−5.8	9.1
S12	五道梁	4 613	301.4	−5.9	8.1
S13	沱沱河无人区	4 635	283.1	−4.5	7.8
S14	玛多	4 218	585.5	−4.1	7.6
S15	鄂陵湖	4 577	516.9	−5	7.8

1.2　重金属的测定

本研究分别测定了 Pb、Cu、Zn、Cr、Cd、Hg 和 As 这 7 种重金属在土壤中的含量与分布,方法如下.

样品的制备:除去样品中的枝棒、叶片和石子等异物,将采集的样品进行风干、粗磨和细磨至过孔径 0.15 mm(100 目)筛.

微波消解:用干净的药匙取适量的土壤样品于比色管(50 mL),加入新配王水 10 mL(3∶1, HCl∶HNO_3, 体积比),摇匀使其充分接触,放置 12 h 后加盖,在 100℃的水浴锅中进行消煮反应,反应时间为 2 h. 待其冷却后,用超纯水定容至 50 mL,混匀后过滤(0.45 mm).

电感耦合等离子体质谱法检测:过滤液用电感

耦合等离子体质谱仪(ICP-MS, Agilent 7500a, Agilent, Santa Clara, California)测量样品中重金属的浓度. 校准曲线的范围($R = 0.9997$)选自 0.05 ~ 10 $mg \cdot L^{-1}$. 所有化学分析均设置平行样品,以确保实验的准确性.

1.3 抗性基因的测定

本研究测定了氨基糖苷类(aminoglycoside)、β-内酰胺酶类(β-lactamase)、喹诺酮类氯霉素类(FCA)、重金属类(heavy metal)、遗传元件类(MGE)、大环内酯类林肯酰胺类链阳性菌素 B 抗性基因(MLSB)、其他类(other/efflux)、磺胺类(sulfonamide)、四环素类(tetracycline)、万古霉素类(vancomycin)共 10 类 80 种 ARGs. 其中,共检测了 3 种 MGE, *intI1* 和 *intI2* 未检出, *tnpA01* 基因仅在部分样品中检出. 土壤抗性基因的测定由启因生物科技有限公司完成,方法如下.

DNA 提取:根据制造商的使用说明,使用土壤基因组 DNA 快速提取试剂盒(TIANNAMP Soil DNA Kit)来进行土壤样品 DNA 的提取工作. 由于样品中的 DNA 含量较低,为了避免单一 DNA 样品提取过程产生偏差,所以进行多次 DNA 制备.

实时荧光定量 PCR:使用 Step OnePlus™实时荧光定量 PCR(Thermo)对 16S rRNA 基因和 ARGs 进行定量分析, 每个土壤样品均设 3 组平行样. 反应体系由 5 μL 的 TB Green™ Premix Ex Taq™ Ⅱ (Tli RNaseH Plus)(Takara, Code No. RR820A), 0.4 μL 正向引物(优化的最终浓度为 0.4 $mmol \cdot L^{-1}$), 0.4 μL 反向引物(优化的最终浓度为 0.4 $mmol \cdot L^{-1}$), 1 μL 模板 DNA、3 μL ddH_2O 组成. Real-time PCR 的升温程序为:在 95℃ 下初始变性 30 s,在 95℃ 下变性 5 s,在退火温度下退火 30 s,一共进行 40 个循环,最后在 72℃ 延伸 30 s. 通过溶解曲线验证扩增特异性,溶解曲线采集温度为 60 ~ 98℃,每次 0.5℃ 读数一次. 本研究制备了定量 PCR 的标准样品以进行阳性对照,通过标准曲线来计算每个样品目的基因拷贝数.

ARGs 丰度计算方法:ARGs 丰度的表现形式分为绝对定量和相对定量两种. 绝对定量是指单位样品中 ARGs 的基因拷贝数(对于土壤为每 g),计算方法见式(1)[26]. 相对定量是指单位菌体中 ARGs 所占的比例(无量纲),计算方法见式(2)[26].

$$\text{土壤中 ARGs 的绝对丰度} = \frac{\text{模板数} \times \text{DNA 总量}}{\text{土壤质量}} \tag{1}$$

$$\text{土壤中 ARGs 的相对丰度} = \frac{\text{土壤中 ARGs 的绝对丰度}}{\text{16S rRNA 拷贝数}} \tag{2}$$

1.4 统计分析

从各地区的气象局网站获取降雨、气温等数据,用于相关环境因素对微生物群落分布和 ARGs 相对丰度时空分布差异影响和探究. 采用地理信息系统绘图软件(ArcGIS 10.6, ESRI, Redlands, California)绘制青海采样点空间分布. 采用 Excel 2019 和 SPSS 25.0 对土壤重金属含量、理化性质、微生物相对丰度和抗性基因相对丰度数据进行处理,采用相关性分析和冗余分析分析土壤微生物与环境因子间的关系及抗性基因与微生物种群丰度间的关系.

2 结果与分析

2.1 青海湖周边土壤样品中重金属含量分布

15 个土壤样品中 Pb、Cu、Cr、Zn、Cd 和 Hg 等重金属的含量及分布见表 2. 土壤样品中 ω(Zn) 最高,范围为20 ~ 79 $mg \cdot kg^{-1}$,平均值为(50.27 ±

表 2 采样点土壤样品中重金属含量1) $/mg \cdot kg^{-1}$

Table 2 Heavy metal content in soil samples at sampling sites $/mg \cdot kg^{-1}$

采样点编号	Pb	Cu	Cr	Zn	Cd	Hg	As
S1	18	20.4	36	66	0.12	0.02	14.4
S2	10	10.6	22	22	0.09	0.077	10.1
S3	18	15.7	27	47	0.12	0.037	33.2
S4	16	14.9	38	72	0.12	0.033	12.5
S5	15	14.2	35	47	0.12	0.023	11.4
S6	16	16.7	40	59	0.14	0.024	13.4
S7	15	11.7	32	67	0.15	0.028	11.3
S8	20	19.4	46	74	0.14	0.062	14
S9	27	7.2	23	79	0.16	0.011	31.6
S10	8	5.9	18	20	—	0.027	10.4
S11	24	19.3	39	53	—	0.02	15.1
S12	7	5.1	17	28	—	0.005	7.11
S13	13	3.2	15	24	0.09	0.01	20.8
S14	16	17.0	35	56	0.17	0.021	19.6
S15	14	13.7	31	40	—	0.014	20.2

1)"—"表示污染物含量低于检出限

19.88) mg·kg^{-1}. ω(Hg) 最低,范围为 0.005 ~ 0.077 mg·kg^{-1}, 平均值为 (0.027 ± 0.019) mg·kg^{-1}. 土壤中 Pb 和 Cr 含量相对较高,这可能是由于 Pb 和 Cr 高积累因子导致的[27]. 在 Ogiyama 等[28]的研究中,粪肥改良的耕地中 Zn 和 Cu 含量分别为 72 ~ 170 mg·kg^{-1}和 18 ~ 109 mg·kg^{-1},显著高于青海地区土壤重金属含量,表明未受人为污染的土壤中重金属污染较低.

青海湖周边土壤样品中 ω(As) 较高,范围为 7.11 ~ 33.2 mg·kg^{-1}, 平均值为 (16.34 ± 7.59) mg·kg^{-1},部分地区高于国家标准[国家一级标准为 ω(As)≤15 mg·kg^{-1}]. 杜昊霖等[29]在西藏的研究也发现,土壤中的 As 含量为中国土壤背景值的 4.73 倍,世界土壤背景值的 8.82 倍. 根据表 2 可知,As 在不同采样点含量(mg·kg^{-1}):S3 为 33.2、S9 为 31.6、S11 为 15.1、S13 为 20.8、S14 为 19.6 和 S15 为 20.2. 以上采样点土壤中的 As 含量均高于国家一级标准,由此推测青海地区 As 污染较为严重.

2.2　重金属含量与海拔的关系

根据采样点海拔的不同,可将采样点分为 3 组(L: < 3 000 m、M: 3 000 ~ 4 000 m 和 H: > 4 000 m). 分别对应采样点为 L:S1 ~ S4、M:S5 ~ S8 和 H:S9 ~ S15. 计算各区域不同重金属的含量平均值(见表 3),土壤重金属 Hg 在不同组间差异明显,海拔较低的采样点重金属 Hg 含量较高,海拔较高的采样点重金属 Hg 含量较低. 本研究采用 SPSS 软件分析土壤重金属含量与海拔的相关性,结果表明土壤中重金属 Cu 和 Hg 的含量与海拔高度呈显著负相关(P < 0.05,如图 1),而其他重金属含量与海拔高度无显著相关性.

表 3　不同海拔区域重金属含量和标准差[1)]

Table 3　Heavy metal content and standard deviation at different altitudes

重金属	低海拔组	中海拔组	高海拔组
Pb	15.500(3.786)	16.500(2.380)	15.571(7.547)
Cu	15.400(4.016)	15.500(3.306)	10.200(6.374)
Cr	30.750(7.544)	38.250(6.131)	25.429(9.554)
Zn	51.750(22.515)	61.750(11.587)	42.857(21.169)
Cd	0.113(0.015)	0.138(0.126)	0.140(0.044)
Hg	0.042(0.025)	0.034(0.019)	0.015(0.008)
As	17.550(10.581)	12.525(1.379)	17.830(8.008)

1) 括号外数值表示含量,单位为mg·kg^{-1},内数值表示标准差

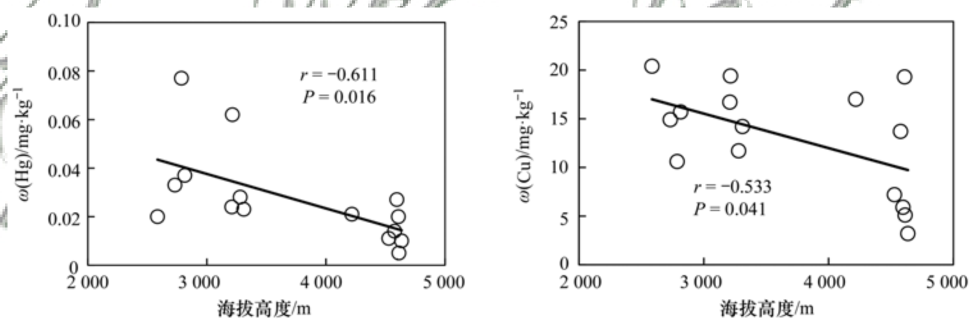


图 1　海拔高度与重金属含量的相关性

Fig. 1　Correlation between altitude and heavy metal content

2.3　影响青海湖周边土壤重金属含量差异的因素

2.3.1　土壤类型对重金属含量的影响

根据采样点土壤类型的不同,将土壤由含水率从高到低分为湖边(S15、S8)、草地(S1、S4、S5、S6、S7 和 S14)、土地(S9、S10、S11、S12 和 S13)和沙漠(S2)这 4 种土壤类型. 除重金属 Hg 以外,其余重金属含量均随土壤类型变化出现下降的趋势(如图 2). 沙漠土壤中 Hg 含量明显高于其他土壤,达到 0.077

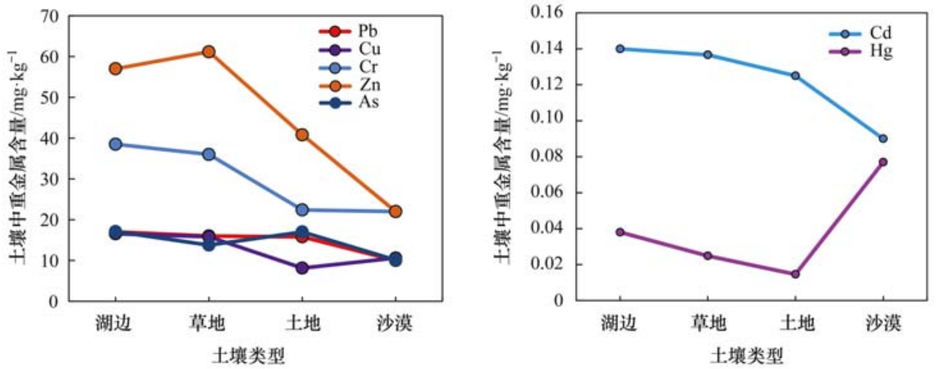
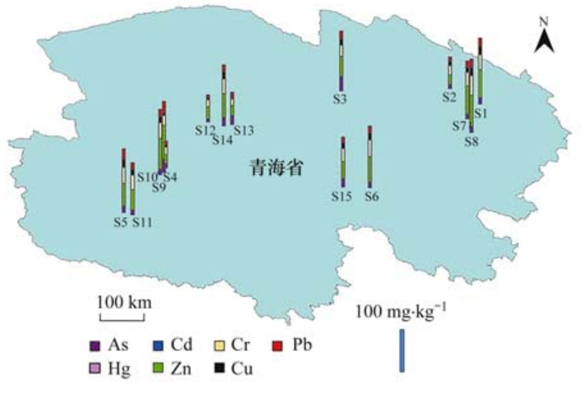


图 2　不同土壤类型重金属含量分布

Fig. 2　Distribution of heavy metal content by soil type mg·kg^{-1},其余重金属含量显著低于其他土壤类型.

2.3.2 大气的长距离迁移对重金属含量的影响

青海省只有少数地方有重金属污染源,由此推测青海地区重金属污染可能是由远距离迁移造成的.从采样点的地理位置来看(如图3),甘肃省和四川省附近采样点重金属含量较高,如S1(154.94 mg·kg^{-1})、S6(145.264 mg·kg^{-1})、S4(153.553 mg·kg^{-1})、S8(173.602 mg·kg^{-1})、S3(141.057 mg·kg^{-1})和S14(143.791 mg·kg^{-1}).重金属含量低的采样点远离四川省和甘肃省,如S2(74.867 mg·kg^{-1})、S13(76.1 mg·kg^{-1})、S12(64.215 mg·kg^{-1})和S10(62.327 mg·kg^{-1}).李志涛等[30]的研究表明,四川省硫铁矿区周边土壤重金属ω(Cd)、ω(Hg)、ω(As)、ω(Pb)、ω(Cr)、ω(Cu)和ω(Zn)的平均值分别为:1.55、0.261、12.2、46.2、115、74和113 mg·kg^{-1}.陈文轩等[31]的研究同样测定了四川省农田土壤中不同种重金属的含量,ω(Cd)、ω(Hg)、ω(As)、ω(Pb)、ω(Cr)、ω(Cu)和ω(Zn)的平均值分别为0.268、0.108、9.65、32.28、60.87、30.89和107.58 mg·kg^{-1},甘肃省农田土重金属ω(Cd)、ω(Hg)、ω(As)、ω(Pb)、ω(Cr)、ω(Cu)和ω(Zn)的平均值分别为0.213、0.084、10.46、27.52、63.01、26.83和86.43 mg·kg^{-1}.本研究重金属As的含量与杜昊霖等[29]在西藏土壤中的研究结果接近,表明青藏高原地区土壤中As的含量背景值较高.青海地区土壤重金属含量分布符合远距离迁移趋势,即近距离高且远距离低.由此推断,除土壤本身含有的重金属外,青海地区土壤重金属来源还包括周边地区(如四川省和甘肃省等)的大气远距离迁移.



柱状图表示采样点重金属含量,不同颜色表示不同重金属种类

图3 采样点分布示意

Fig. 3 Sample site distribution plot

2.4 青海湖周边土壤样品中ARGs的含量分布

土壤样品中发现的ARGs按抗性类型分类(如图4),丰度最高的是β-内酰胺酶(β-lactamase)抗性基因(相对丰度为0.150 5),占总ARGs的47.54%.四环素(tetracycline)耐药基因占ARGs总丰度的16.93%,FCA约占14.56%,MLSB约占8.77%,其他种类耐药基因占比较低.四环素耐药基因显著高于磺胺类耐药基因,该结果与Hu等[32]的一致.对于磺胺类ARGs,相对丰度的变化趋势为*sul*Ⅰ > *sul*Ⅱ;对于四环素耐药基因的变化趋势为:*tetW* > *tetG* > *tetL* > *tetR* > *tetX* > *tetQ*,该结果与Ji等[33]的相似.有研究表明,磺胺类和四环素类抗性基因是牛粪中最常见的抗性基因.在美国,牛粪中磺胺和四环素抗性基因的相对丰度分别约为10^{-6} ~ 10^{-5}和10^{-3} ~ 10^{-2}[34].

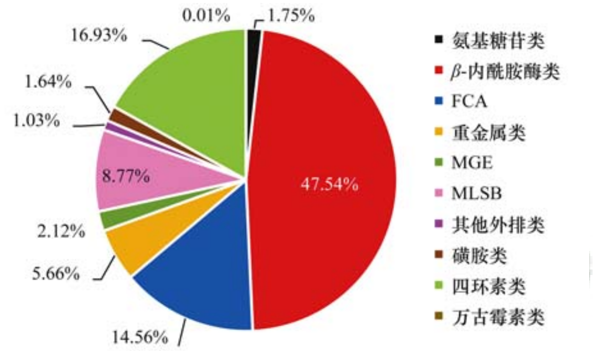


图4 不同种类ARGs的相对丰度

Fig. 4 Relative abundance of different types of ARGs

各采样点ARGs种类数分别为37、28、20、26、20、20、28、39、23、28、25、35、23、35和25,S1、S8、S12和S14号采样点显著高于其他点位,S1、S8和S14号采样点重金属含量相对较高,可能是导致这些点位ARGs种类较多的原因[35].维恩图显示了不同海拔[图5(a)]和不同土壤类型[图5(b)]样品中独特和共有的ARGs.3组海拔区域共有的ARGs有38种,低海拔、中海拔和高海拔地区分别观察到5、4和9种独特的ARGs.沙漠土壤中ARGs的多样性显著低于其他土壤类型,土壤类型对ARGs多样性的影响显著大于海拔高度.

2.5 影响青海湖周边土壤ARGs相对丰度差异的因素

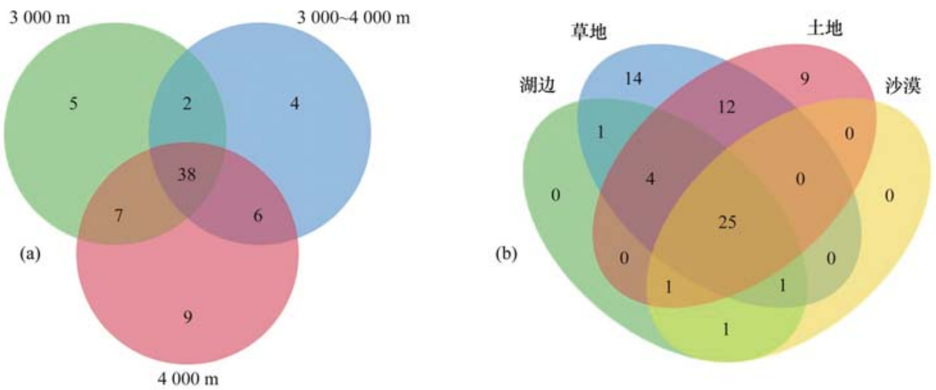
2.5.1 海拔对土壤ARGs相对丰度的影响

ARGs相对丰度与海拔高度呈显著负相关,ARGs丰度差异随海拔升高逐渐减小.氨基糖苷类(aminoglycoside)抗性基因的相对丰度与海拔高度呈显著负相关[$r = -0.762$, $P < 0.05$,图6(a)].由组间分析可知,H组土壤样品中检测到的ARGs相对丰度数量最少(在80个目标ARGs中,平均值为$0.005\,2 \pm 0.034$, $n = 15$).从图6(b)可以看出,抗性基因相对丰度与海拔显著相关.H组($0.005\,2 \pm 0.034$, $n = 7$)和M组($0.011\,1 \pm 0.008\,0$, $n = 4$)中检测到的ARGs平均数量显著低于L组($0.058\,8 \pm$

0.105 9, $n=4$). 这些结果表明海拔的变化会改变ARGs的相对丰度.

2.5.2　重金属含量对土壤ARGs相对丰度的影响

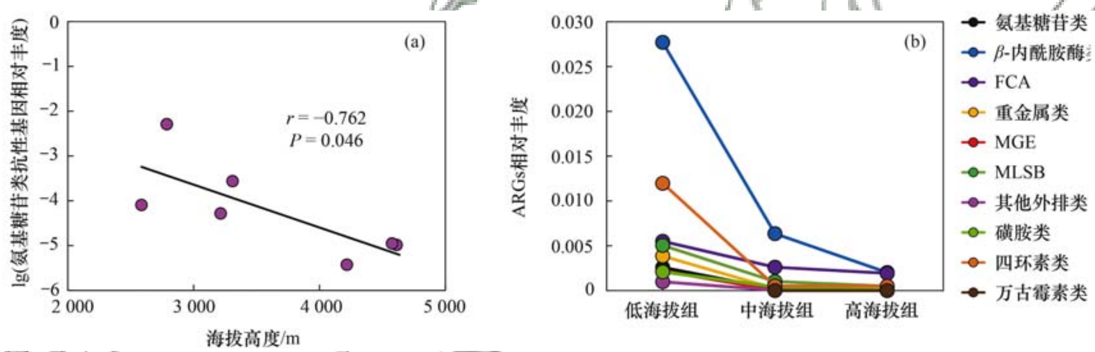
青海省土壤重金属Cd和Hg含量与ARGs存在显著相关性. 重金属Cd与四类(氨基糖苷类、β-内酰胺酶类、MLSB和四环素类) ARGs存在显著负相关(如表4), 相关性系数(r)分别为 −0.973、−0.685、−0.651 和 −0.658.



(a)不同海拔区域ARGs的种类数量, (b)不同土壤类型ARGs的种类数量

图5　不同海拔区域和土壤类型ARGs的数量

Fig. 5　Number of ARGs in different elevation zones



(a)氨基糖苷类抗性基因与海拔高度的相关性, (b)抗性基因在不同海拔区域的含量

图6　海拔高度与ARGs的相关性

Fig. 6　Correlation of altitude with ARGs

表4　重金属Cd含量与抗性基因相对丰度对数值相关性分析[1)]

Table 4　Cadmium content of heavy metals and relative abundance of resistance genes are analyzed as a numerical correlation

	Cd	氨基糖苷类	β-内酰胺酶类	MLSB	四环素类
Cd	1				
氨基糖苷类	−0.973**	1			
β-内酰胺酶类	−0.685*	0.915**	1		
MLSB	−0.651*	0.865*	0.810**	1	
四环素类	−0.658*	0.833*	0.745**	0.838**	1

1) * 为 $P<0.05$, ** 为 $P<0.01$, 下同

土壤中重金属Cd含量与抗性基因亚型 *blaSHV-02*、*blaTEM*、*cphA*、*ermK*、*tetW*、*acrA*、*cmlA1-01* 和 *mexA* 存在显著相关性(如表5), 与金属抗性基因相关性不显著. 除 *cphA* 抗性基因外, 重金属Cd含量与多种ARGs相对丰度对数值均为负相关性. 由此推测, 土壤中Cd含量升高可能会抑制ARGs的产生, 具体影响效应需后续实验证明.

青海省土壤重金属Hg含量与抗生素抗性基因存在显著相关性($P<0.05$). 3类抗生素抗性基因(重金属类、MLSB和磺胺类)与土壤Hg含量呈正相关(如图7), 相关系数(r)分别为0.638、0.602和0.867. 由此表明, 土壤中Hg含量的变化会对ARGs丰度产生一定影响.

土壤中重金属Hg的含量与重金属抗性基因亚型存在显著相关性(如图8), 尤其与抗汞基因相关($P<0.05$). 土壤重金属Hg的含量与 *cadB*、*czcA*、*merA* 和 *merP* 这4种重金属抗性基因呈显著正相关, 相关系数 $r=0.881$ ($P=0.004$)、$r=0.692$ ($P=$

表 5 重金属 Cd 含量与抗性基因亚型相对丰度对数值相关性分析

Table 5 Numerical correlation analysis of the relative abundance of cadmium content and resistance gene subtypes of heavy metals

	blaSHV-02	*blaTEM*	*cphA*	*ermK*	*tetW*	*acrA*	*cmlA1-01*	*mexA*
Cd	-0.904*	-0.710*	0.867*	-0.656*	-0.667*	-0.754*	-0.755*	-0.736**
blaSHV-02	1	0.930**	-0.083	0.645	0.851**	0.832*	0.645	0.823*
blaTEM		1	0.102	0.845**	0.957**	0.867**	0.772*	0.839**
cphA			1	-0.119	0.37	-0.368	-0.46	-0.469
ermK				1	0.915**	0.688*	0.803**	0.781**
tetW					1	0.795**	0.829**	0.762**
acrA						1	0.78	0.781**
cmlA1-01							1	0.814*

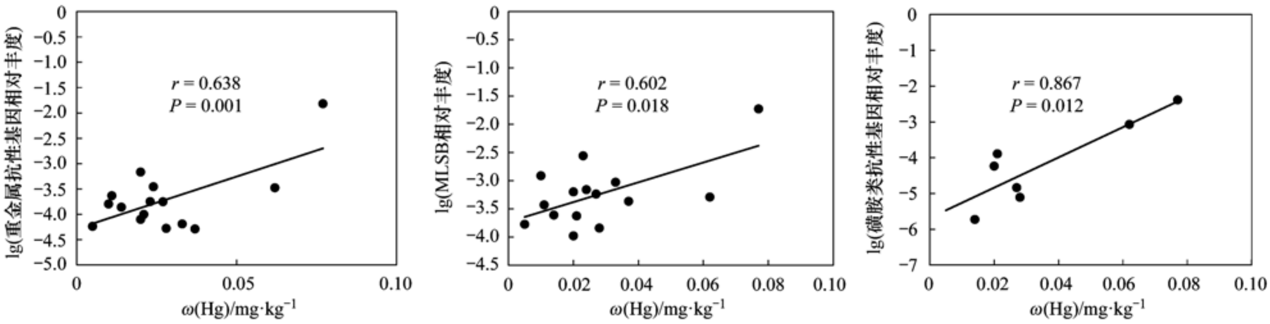


图 7 土壤中重金属汞含量与 ARGs 的相关性分析

Fig. 7 Correlation analysis of heavy metal mercury content in soil with ARGs

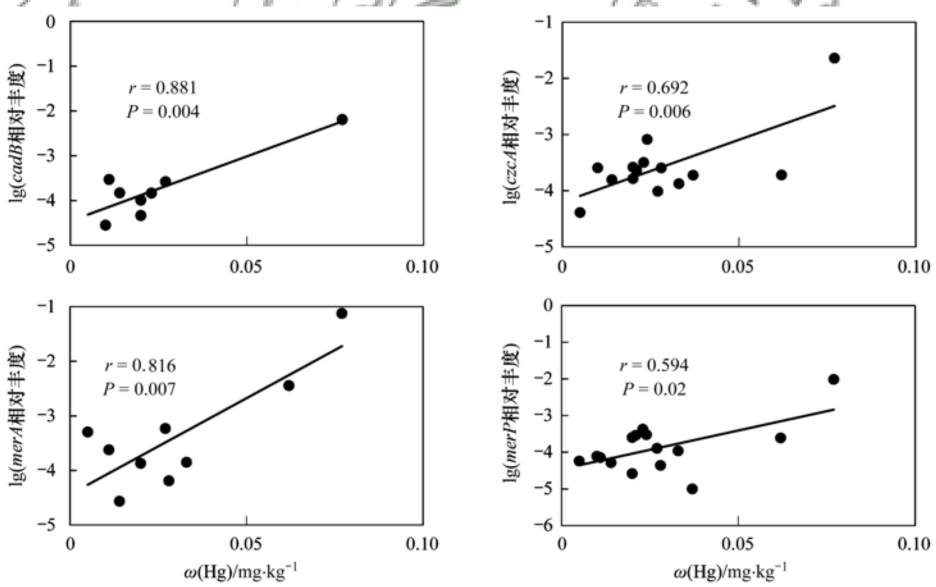


图 8 重金属汞含量与抗汞基因相对丰度相关性分析

Fig. 8 Correlation analysis of mercury content in heavy metals and relative abundance of anti-mercury resistance genes

0.006)、$r = 0.816$($P = 0.007$)和 $r = 0.594$($P = 0.02$). *czcA*、*merA* 和 *merP* 这 3 种 ARGs 相对丰度较高,是重金属抗性基因的主要亚型.

土壤中汞含量的增加促进了 Hg 离子外排的机制. 土壤中重金属 Hg 的含量与其他外排基因呈显著正相关(如图 9),相关系数 $r = 0.708$($P = 0.022$). 这些基因的主要功能是产生一种排除对生物体造成损害的物质的流出机制. 根据土壤中重金属抗性基因的含量分布,S2 号样品中 Hg 含量最高,所有重金属抗性基因的丰度均增加,但 *czcA*(重金属排泄基因)、*merA*[汞(Ⅱ)还原酶]和 *merP*(抗汞结合蛋白)增加最为明显,说明土壤中 Hg 含量的增加促进了 Hg 离子外排的机制.

土壤中除重金属 Cd 和 Hg 外,其余重金属含量与 ARGs 也存在显著相关性. 例如,土壤中重金属 Pb 含量与 *cphA* 和 *floR* 存在显著相关性,相关系数分别为 $r = 0.708$($P = 0.033$)和 $r = -0.960$($P = 0.013$);重金属 Cu 含量与 *cphA* 和 *floR* 存在显著相关性,相关系数为 $r = 0.784$($P = 0.012$)和 $r = -0.987$($P < 0.001$);重金属 Cr 含量与 *cphA* 和

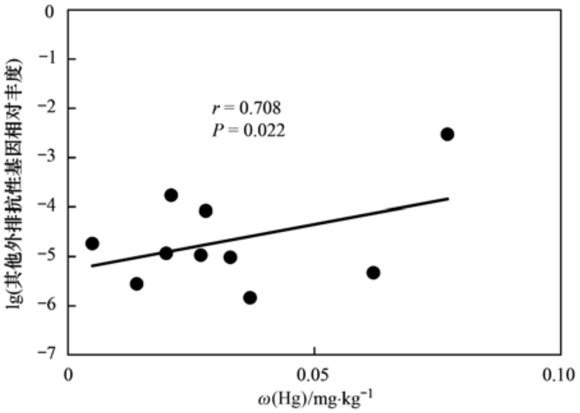


图 9 重金属汞含量与其他 外排基因的相关性分析

Fig. 9 Correlation analysis of heavy metal mercury with the other/efflux genes

floR 存在显著相关性，相关系数为 $r = 0.713$（$P = 0.031$）和 $r = -0.853$（$P = 0.031$）；重金属 Zn 含量与 *blaSFO* 存在显著相关性，相关系数为 $r = -0.997$（$P = 0.048$）；重金属 As 含量与 *arsM* 存在显著相关性，相关系数为 $r = -0.897$（$P = 0.015$）.

2.5.3 降雨量对土壤 ARGs 相对丰度的影响

年平均降雨量（MAP）与土壤中的 ARGs 存在显著相关性.采样点位 MAP 与氨基糖苷类抗性基因和 β-内酰胺酶类抗性基因存在显著负相关，相关系数为 −0.932 和 −0.585（如图 10）.

2.6 青海湖地区土壤 ARGs 水平转移潜力

基因水平转移是 ARGs 在细菌间传播的主要方式.MGEs是可移动的遗传元件，可以携带ARGs在细菌间传播，但不同的 MGEs 携带不同种类的 ARGs[36,37].青海环境中极少数 ARGs 由 MGEs 携带，表明这些 ARGs 在细菌间转移的可能性较低[38].为了研究 ARGs 和 MGEs 之间的关系，本研究分析了 ARGs 与 MGEs 相对丰度之间的关系.韩柳等[35]的研究发现 ARGs 与 MGEs 相对丰度呈显著正相关（$P < 0.05$）.Pearson 相关分析表明 ARGs 的相对丰度与 MGEs 的相对丰度呈显著正相关，结果表明 MGEs 的相对丰度升高有利于 ARGs 的总丰度升高（$P < 0.05$，见图 11），该结果与 Zhang 等[39]的一致.青海土壤样品中仅检测到 *tnpA01* 基因，未检测到 *intI1* 和 *intI2*，由于 *intI1* 和 *intI2* 基因负责复制、剪裁、运输和整合抗性基因，推测青海 ARGs 水平转移潜力较弱.

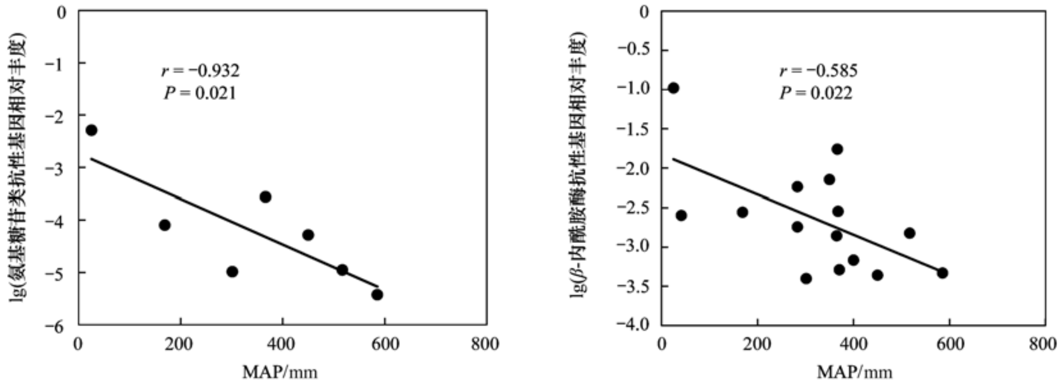


图 10 年平均降雨量与抗性基因的相关性分析

Fig. 10 Correlation analysis of annual mean temperature and resistance genes

在受人类影响的环境中，ARGs 的种类和丰度远高于环境背景值.此外，MGEs 的种类和丰度也高于没有人为影响的原始环境.由此推测人为活动不仅导致了环境中 ARGs 种类和相对丰度升高，更加快了 ARGs 在多种生物体间的快速传播，对此需严格控制抗生素类药品的滥用.

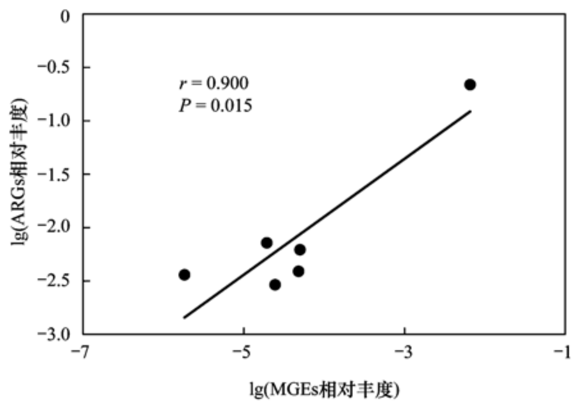
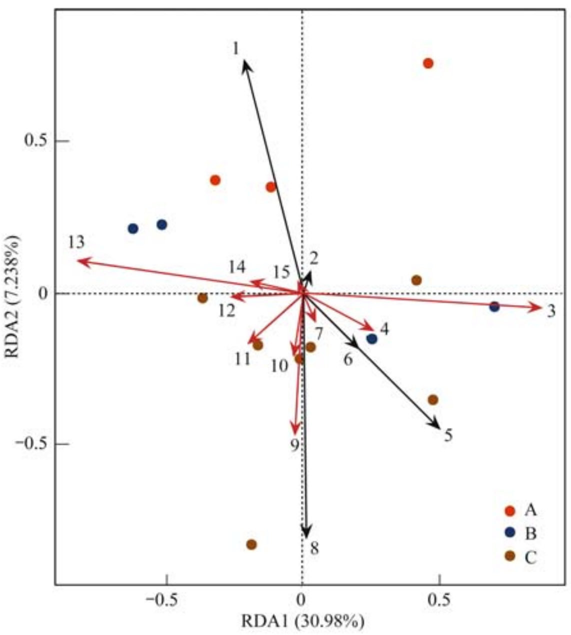


图 11 MGEs 与 ARGs 的相关性分析

Fig. 11 Correlation analysis of MGEs with ARGS

2.7 冗余分析

本研究通过多变量冗余分析方法来研究主要环境因子对土壤中 ARGs 的影响.如图 12 所示，第一轴主要由年平均降雨量（MAP）来解释，占 ARGs 总方差的 30.98%，第二轴由海拔高度和年平均温度（MAT）来解释，占 ARGs 总方差的 7.238%.本研究表明，ARGs 在第一轴上载荷率较高，表明该地区土壤样品中 ARGs 主要受到年平均降雨量的影响.



1. 年平均温度, 2. 重金属, 3. *mexF* 抗性基因, 4. *mexE* 抗性基因, 5. 年平均降雨量, 6. pH 值, 7. *merA* 抗性基因, 8. 海拔高度, 9. *aioA* 抗性基因, 10. *merC* 抗性基因, 11. *ermK* 抗性基因, 12. *tetW* 抗性基因, 13. *blateM* 抗性基因, 14. *mexA* 抗性基因, 15. *czcA* 抗性基因

图 12 RDA 分析

Fig. 12 RDA analysis

3 讨论

本研究对青海湖周边土壤中重金属和 ARGs 进行检测和痕量分析. 共检测了 7 种重金属在土壤中的含量,其中 Zn 含量最高,汞含量最低. 彭驰等[40]研究表明,我国城市土壤重金属 ω(Pb)、ω(Cd)、ω(Cu)和 ω(Zn)的平均值为 58.5、0.49、42.1 和 156.3 mg·kg^{-1},青海湖周边土壤样品中这 4 种重金属分别为 15.8、0.129 1、13.0 和 50.266 7 mg·kg^{-1}. 青海地区土壤重金属含量与其他城市差异较大,表明青海地区人为活动影响较小. 环青海湖土壤中重金属含量与海拔高度存在显著相关性,该结果与张利瑞[41]等的相似. 张利瑞等[41]对兰州市耕地土壤重金属进行研究,分析不同环境因子对土壤重金属及其风险的影响. 其结果表明,采样季平均降雨量、GDP 和海拔高度对耕地土壤重金属风险空间差异的影响最显著.

本研究共检测了 80 种 ARGs,与绵阳市的紫土丘陵区畜禽养殖土壤检出 79 种 ARGs 种类结果相似[42]. 通过皮尔森相关性分析发现,土壤中重金属含量与 ARGs 的相对丰度呈显著相关性,该结果与 Ji 等[33]的研究结果相符,其对上海养殖场畜禽粪便和周围土壤 ARGs 研究表明,重金属 Cu 与土壤微生物的多样性存在显著相关性,从而影响土壤中 ARGs 的种类和丰度. 除重金属外,其余环境因子与 ARGs 相对丰度间也存在显著相关性,例如海拔高度和年降雨量等.

4 结论

(1) 青海湖土壤样品中重金属 Cu 和 Hg 的含量与海拔高度存在显著相关性,其余重金属与海拔高度无著相关性. 重金属含量在土壤类型分布上差异较为明显,青海地区土壤重金属除了本身固有外,可能主要来源是大气的长距离迁移. 环青海湖土壤样品中重金属含量相对较低,所形成的生态风险相对较低.

(2) 土壤样品中共检测出 80 种 ARGs,其中 β-内酰胺酶类抗性基因丰度最高. 土壤中抗性基因的相对丰度受多种环境因素的影响,年均降雨量是土壤中 ARGs 相对丰度的主要影响因素.

(3) ARGs 与 MGEs 存在显著正相关. 由此表明,抗生素的滥用不仅会加大环境中耐药基因的储存量,还会增加耐药基因在生物链中的传播风险.

(4) 本文分析了环青海湖周边土壤样品重金属含量与 ARGs 的相对丰度,并与其他地区进行比对,表明青海地区土壤重金属及 ARGs 的污染相对较低,所造成的健康风险相对较低. 探究了重金属及环境因子与 ARGs 相对丰度的相关性,探寻了土壤 ARGs 可能的影响因素,对青海地区土壤 ARGs 污染做了系统的评估.

参考文献:

[1] Facchinelli A, Sacchi E, Mallen L. Multivariate statistical and GIS-based approach to identify heavy metal sources in soils[J]. Environmental Pollution, 2001, **114**(3): 313-324.

[2] Solgi E, Esmaili-Sari A, Riyahi-Bakhtiari A, *et al*. Soil contamination of metals in the three industrial estates, Arak, Iran [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2012, **88**(4): 634-638.

[3] Zhang Y, Gu A Z, He M, *et al*. Subinhibitory concentrations of disinfectants promote the horizontal transfer of multidrug resistance genes within and across Genera[J]. Environmental Science & Technology, 2017, **51**(1): 570-580.

[4] Li Z Y, Ma Z W, Van Der Kuijp T J, *et al*. A review of soil heavy metal pollution from mines in China: pollution and health risk assessment[J]. Science of the Total Environment, 2014, **468-469**: 843-853.

[5] Zhao F J, Ma Y B, Zhu Y G, *et al*. Soil contamination in China: current status and mitigation strategies [J]. Environmental Science & Technology, 2015, **49**(2): 750-759.

[6] Dong W Q Y, Cui Y, Liu X. Instances of soil and crop heavy metal contamination in China [J]. Soil and Sediment Contamination: an International Journal, 2001, **10**(5): 497-510.

[7] Shi Y L, Chen W Q, Wu S L, *et al*. Anthropogenic cycles of arsenic in mainland China: 1990- 2010 [J]. Environmental Science & Technology, 2017, **51**(3): 1670-1678.

[8] Heberer T, Massmann G, Fanck B, *et al*. Behaviour and redox sensitivity of antimicrobial residues during bank filtration[J]. Chemosphere, 2008, **73**(4): 451-460.

[9] Monteiro S C, Boxall A B A. Occurrence and fate of human pharmaceuticals in the environment[A]. In: Whitacre D M (Ed.). Reviews of Environmental Contamination and Toxicology[M]. New York: Springer, 2010. 53-154.

[10] 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.

[11] Rossolini G M, Arena F, Pecile P, *et al*. Update on the antibiotic resistance crisis[J]. Current Opinion in Pharmacology, 2014, **18**: 56-60.

[12] Ashbolt N J, Amézquita A, Backhaus T, *et al*. Human health risk assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance[J]. Environmental Health Perspectives, 2013, **121**(9): 993-1001.

[13] Wellington E M H, Boxall A B A, Cross P, *et al*. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria[J]. Lancet Infectious Diseases, 2013, **13**(2): 155-165.

[14] Brandt K K, Amezquita A, Backhaus T, *et al*. Ecotoxicological assessment of antibiotics: a call for improved consideration of microorganisms[J]. Environment International, 2015, **85**: 189-205.

[15] Boxall A B A, Kolpin D W, Halling-Sørensen B, *et al*. Are veterinary medicines causing environmental risks? [J]. Environmental Science & Technology, 2003, **37**(15): 286A-294A.

[16] Gustafson R H. Use of antibiotics in livestock and human health concerns[J]. Journal of Dairy Science, 1991, **74**(4): 1428-1432.

[17] Sommer M O A, Dantas G, Church G M. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora[J]. Science, 2009, **325**(5944): 1128-1131.

[18] D'Costa V M, McGrann K M, Hughes D W, *et al*. Sampling the antibiotic resistome[J]. Science, 2006, **311**(5759): 374-377.

[19] Chen B W, Yang Y, Liang X M, *et al*. Metagenomic profiles of antibiotic resistance genes (ARGs) between human impacted estuary and deep ocean sediments[J]. Environmental Science & Technology, 2013, **47**(22): 12753-12760.

[20] Knapp C W, Dolfing J, Ehlert P A I, *et al*. Evidence of Increasing Antibiotic Resistance Gene Abundances in Archived Soils since 1940[J]. Environmental Science & Technology, 2010, **44**(2): 580-587.

[21] Zhang Y, Gu A Z, Cen T Y, *et al*. Sub-inhibitory concentrations of heavy metals facilitate the horizontal transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance genes in water environment[J]. Environmental Pollution, 2018, **237**: 74-82.

[22] Gullberg E, Albrecht L M, Karlsson C, *et al*. Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals[J]. mBio, 2014, **5**(5), doi: 10.1128/mBio.01918-14.

[23] Hughes V M, Datta N. Conjugative plasmids in bacteria of the 'pre-antibiotic' era[J]. Nature, 1983, **302**(5910): 725-726.

[24] Guo J H, Li J, Chen H, *et al*. Metagenomic analysis reveals wastewater treatment plants as hotspots of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements[J]. Water Research, 2017, **123**: 468-478.

[25] Partridge S R, Kwong S M, Firth N, *et al*. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2018, **31**(4), doi: 10.1128/CMR.00088-17.

[26] 周雨婷. 中国农田土壤中抗生素抗性基因分布及典型污染物浓度特征、对其影响与风险评估[D]. 杭州: 浙江大学, 2020.

[27] 杨世琦, 刘国强, 张爱平, 等. 典型区域果园表层土壤5种重金属累积特征[J]. 生态学报, 2010, **30**(22): 6201-6207.
Yang S Q, Liu G Q, Zhang A P, *et al*. Analysis on accumulation characters of 5 kinds of heavy metals in orchard topsoil in typical production zone in China[J]. Acta Ecologica Sinica, 2010, **30**(22): 6201-6207.

[28] Ogiyama S, Sakamoto K, Suzuki H, *et al*. Accumulation of zinc and copper in an arable field after animal manure application[J]. Soil Science & Plant Nutrition, 2005, **51**(6): 801-808.

[29] 杜昊霖, 王莺, 王劲松, 等. 青藏高原典型流域土壤重金属分布特征及其生态风险评价[J]. 环境科学, 2021, **42**(9): 4422-4431.
Du H L, Wang Y, Wang J S, *et al*. Distribution characteristics and ecological risk assessment of soil heavy metals in typical watersheds of the Qinghai-Tibet Plateau[J]. Environmental Science, 2021, **42**(9): 4422-4431.

[30] 李志涛, 王夏晖, 何俊, 等. 四川省江安县某硫铁矿区周边农田土壤重金属来源解析及污染评价[J]. 农业环境科学学报, 2019, **38**(6): 1272-1279.
Li Z T, Wang X H, He J, *et al*. Source identification and pollution assessment of heavy metals in farmland soils around a pyrite mining area in Jiang'an County, Sichuan Province, China[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2019, **38**(6): 1272-1279.

[31] 陈文轩, 李茜, 王珍, 等. 中国农田土壤重金属空间分布特征及污染评价[J]. 环境科学, 2020, **41**(6): 2822-2833.
Chen W X, Li Q, Wang Z, *et al*. Spatial distribution characteristics and pollution evaluation of heavy metals in arable land soil of China[J]. Environmental Science, 2020, **41**(6): 2822-2833.

[32] Hu X G, Zhou Q X, Luo Y. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China[J]. Environmental Pollution, 2010, **158**(9): 2992-2998.

[33] Ji X L, Shen Q H, Liu F, *et al*. Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai; China[J]. Journal of Hazardous Materials, 2012, **235-236**: 178-185.

[34] Munir M, Xagoraraki I. Levels of antibiotic resistance genes in manure, biosolids, and fertilized soil[J]. Journal of Environmental Quality, 2011, **40**(1): 248-255.

[35] 韩柳, 楼倩, 乔敏, 等. 德兴铜矿区抗生素抗性基因污染特征及其驱动因子[J]. 环境科学, 2022, **43**(2): 1089-1096.
Han L, Lou Q, Qiao M, *et al*. Pollution characteristics and driving factors of antibiotic resistance genes in Dexing copper mine[J]. Environmental Science, 2022, **43**(2): 1089-1096.

[36] 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.

[37] Heuer H, Schmitt H, Smalla K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields[J]. Current Opinion in Microbiology, 2011, **14**(3): 236-243.

[38] Chen B W, Yuan K, Chen X, *et al*. Metagenomic analysis

revealing antibiotic resistance genes (ARGs) and their genetic compartments in the Tibetan environment [J]. Environmental Science & Technology, 2016, **50**(13): 6670-6679.

[39] Zhang Y J, Hu H W, Gou M, *et al*. Temporal succession of soil antibiotic resistance genes following application of swine, cattle and poultry manures spiked with or without antibiotics [J]. Environmental Pollution, 2017, **231**: 1621-1632.

[40] 彭驰, 何亚磊, 郭朝晖, 等. 中国主要城市土壤重金属累积特征与风险评价[J]. 环境科学, 2022, **43**(1): 1-10.
Peng C, He Y L, Guo Z H, *et al*. Characteristics and risk assessment of heavy metals in urban soils of major cities in China [J]. Environmental Science, 2022, **43**(1): 1-10.

[41] 张利瑞, 彭鑫波, 马延龙, 等. 兰州市耕地"五毒"重金属的风险评价与归因分析[J]. 环境科学, 2022, **43**(9): 4767-4778.
Zhang L R, Peng X B, Ma Y L, *et al*. Risk assessment and attribution analysis of "five toxic" heavy metals in cultivated land in Lanzhou[J]. Environmental Science, 2022, **43**(9): 4767-4778.

[42] 程建华, 唐翔宇, 刘琛. 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[J]. 环境科学, 2019, **40**(7): 3257-3262.
Cheng J H, Tang X Y, Liu C. Characteristics of antibiotic resistance genes in various livestock feedlot soils of the hilly purple soil region[J]. Environmental Science, 2019, **40**(7): 3257-3262.

HUANJING KEXUE

Environmental Science (monthly)

Vol. 44 No. 1

Jan. 15, 2023

CONTENTS