

方知库
Eco-Environmental
Knowledge Web

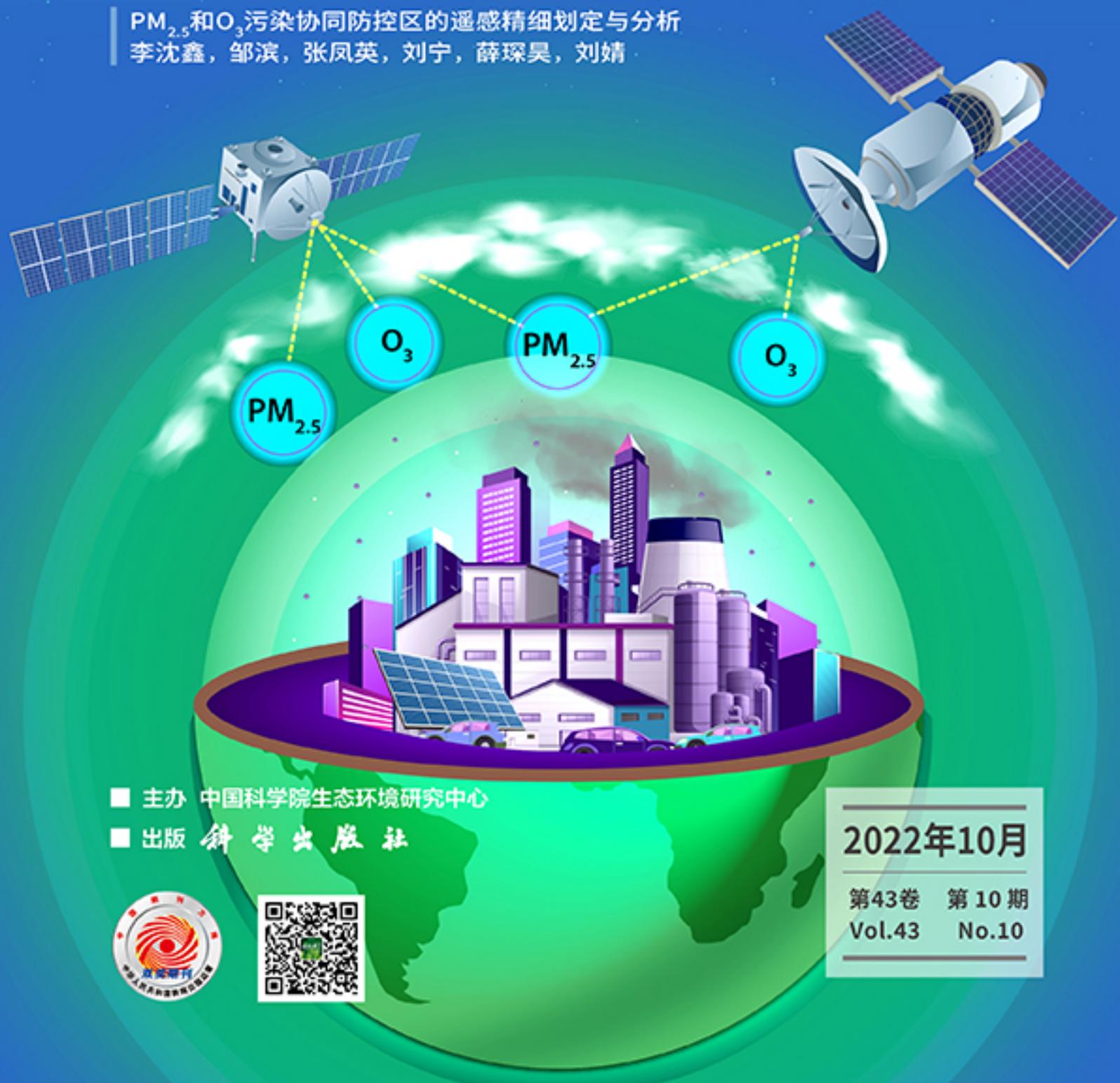
环境科学

ENVIRONMENTAL SCIENCE

ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV

HUANJING KEXUE

PM_{2.5}和O₃污染协同防控区的遥感精细划定与分析
李沈鑫, 邹滨, 张凤英, 刘宁, 薛琛昊, 刘婧



■ 主办 中国科学院生态环境研究中心

■ 出版 科学出版社



2022年10月

第43卷 第10期
Vol.43 No.10

目次

PM_{2.5}和O₃污染协同防控区的遥感精细划定与分析 李沈鑫, 邹滨, 张凤英, 刘宁, 薛琛昊, 刘婧(4293)

广州市冬季一次典型臭氧污染过程分析 裴成磊, 谢雨彤, 陈希, 张涛, 邱晓暖, 王瑜, 王在华, 李梅(4305)

佛山臭氧浓度预报方程的建立与应用 陈辰, 洪莹莹, 谭浩波, 司徒淑婷, 程银琳, 步巧利, 吴蒙, 潘巧英(4316)

乌海市高分辨率大气污染源排放清单构建及其在臭氧污染成因探究中的应用 张瑞欣, 楚波, 尚春林, 曹喜萍, 李光耀, 朱玉凡, 刘晓, 夏佳琦, 陈强(4327)

结合在线监测和自动识别系统分析东海沿岸船舶排放特征 邱浩, 刘丹彤, 吴杨周, 李思远, 丁朔, 胡康, 张家乐, 陈梅汀(4338)

机动车制动磨损颗粒物及挥发性有机物的组分特征 门正宇, 刘笃优, 郭全有, 张静, 彭剑飞, 吴琳, 毛洪钧(4348)

笼养鸡舍冬季挥发性有机物排放特征 曹甜甜, 郑云昊, 张羽, 王悦, 丛群欣, 王源昊, 董红敏(4357)

上海市生活垃圾房气溶胶中可培养细菌污染状况及种群特征 卢冰洁, 张翔, 王川, 邱俊, 李丹(4367)

浙江省2008~2018年人为源氨排放清单及分布特征 方利江, 杨一群, 叶观琼(4380)

“双碳”目标下钢铁行业控煤降碳路线图 薛英岚, 张静, 刘宇, 陈瑜, 孙健, 蒋洪强, 张伟, 曹东(4392)

空间关联网络结构特征的减排效应:基于城市群视角 郑航, 叶阿忠(4401)

中国对外直接投资的减污降碳效应及其实现机制 白梓函, 吕连宏, 赵明轩, 张楠, 罗宏(4408)

近年全国地表水水质变化特征 嵇晓燕, 侯欢欢, 王姗姗, 杨凯(4419)

湟水河流域地表水体微塑料分布、风险及影响因素 范梦苑, 黄懿梅, 张海鑫, 李好好, 黄倩(4430)

汾河流域地表水水化学同位素特征及其影响因素 赵春红, 申豪勇, 王志恒, 梁永平, 赵一, 谢浩, 唐春雷(4440)

城镇化进程中珠江三角洲高锰地下水赋存特征及成因 吕晓立, 刘景涛, 韩占涛, 朱亮, 李海军(4449)

喀什噶尔河下游平原区地下水咸化特征及成因分析 鲁涵, 曾妍妍, 周金龙, 孙英(4459)

重庆市老龙洞地下河流域硝酸盐来源和生物地球化学过程的识别 王雨吻, 杨平恒, 张洁茹(4470)

蓝藻水华过程中优势种群演替模式、效应及驱动因子分析 欧阳添, 赵璐, 纪璐璐, 杨宋琪, 郑保海, 杜雨欣, 李佳欣, 李玉鑫, 施军琼, 吴忠兴(4480)

珠海市磨刀门水道输水水源水库群浮游植物群落特征及其环境驱动因子 张茉莉, 王思瑞, 昌盛, 王山军, 金德才, 樊月婷, 张坤锋, 谢琼, 付青(4489)

营养物质对铜绿微囊藻生长和藻际细菌的影响 吕萍, 李慧莉, 徐勇, 郑效旭, 黄振华, 王聪, 徐圣君, 庄绪亮(4502)

老化作用对微塑料吸附四环素的影响及其机制 王林, 王姝歆, 曾祥英, 何杨, 黄雯, 郑世界, 张建强(4511)

沉积物和土壤中胶体对氯霉素吸附行为的影响 晏彩霞, 罗燕清, 聂明华, 周旋, 丁明军(4522)

历史抗生素胁迫改变磺胺甲噁唑和甲氧苄啶对活性污泥的影响:ARGs及其潜在宿主 张忠兴, 樊晓燕, 李星, 高玉玺, 赵君如(4536)

阳朔典型铅锌矿区流域土壤重金属空间分布特征及来源解析 陈盟, 潘泳兴, 黄奕翔, 王樞潼, 张睿东(4545)

白洋淀及周边土壤重金属的分布特征及生态风险评估 郑飞, 郭欣, 汤名扬, 朱冬, 董四君, 康乐, 陈兵(4556)

基于地理探测器的镇域尺度土壤重金属含量空间分异及其影响因素分析 龚仓, 王亮, 王顺祥, 张志翔, 董航, 刘玖芬, 王德伟, 严步青, 陈映(4566)

燃煤电厂重金属排放与周边土壤中重金属污染特征及健康风险 车凯, 陈崇明, 郑庆宇, 范辉, 魏明磊, 罗蓬, 郁金星(4578)

海南岛半干旱区农用地土壤重金属富集因素、健康风险及来源识别 杨剑洲, 龚晶晶, 王振亮, 高健翁, 杨建坤, 胡树起, 唐世新(4590)

九龙江口红树林表层沉积物重金属赋存形态及污染评价 张华兰, 于瑞莲, 万瑞安, 胡恭任, 黄华斌, 吴雅清(4601)

我国茶叶主产区有机肥重金属含量现状 伊晓云, 方丽, 杨向德, 马立锋, 刘美雅, 张群峰, 倪康, 石元值(4613)

甘肃省农业土壤邻苯二甲酸酯累积特征及来源分析 陈王玉, 张光全, 张杨, 李明凯, 郝佳欣, 熊有才, 李崇霄, 曹靖(4622)

三峡库区澎溪河不同高程消落带土壤磷形态及磷酸酶活性分布特征 高艺伦, 方芳, 唐子超, 张蕊, 蒋艳雪, 郭劲松(4630)

塔里木盆地北缘绿洲不同连作年限棉田土壤有机碳组分特征及其与理化因子的相关性 李昕竹, 贡璐, 唐军虎, 罗艳, 丁肇龙, 朱海强, 张涵, 李蕊希(4639)

黄土丘陵区柠条人工林不同深度土壤呼吸速率对土壤湿度的响应 孙亚荣, 王亚娟, 赵敏, 薛文艳, 梁思琦, 刘乐, 刘超, 陈云明(4648)

基于Meta-analysis的生物炭对土壤硝态氮淋失和磷酸盐固持影响 姜志翔, 崔爽, 张鑫, 郝敏, 孙德茂(4658)

低分子有机酸强化植物修复重金属污染土壤的作用与机制 方治国, 谢俊婷, 杨青, 卢焯桢, 黄海, 朱芸娟, 尹思敏, 吴鑫涛, 都韶婷(4669)

无机钝化剂对镉污染酸性水稻土的修复效果及其机制 张剑, 孔繁艺, 卢升高(4679)

改良铅锌矿渣对栎树幼苗铅锌富集与耐性机制 谢天志, 陈永华, 苏荣葵, 刘慧, 姚海松(4687)

CaO₂/FA复合材料富集磷效能及其回收物对土壤改良作用 岳薇, 李大鹏, 吴玲予, 王璐, 汤尧禹, 朱企, 黄勇(4697)

早稻秸秆还田和减钾对晚稻产量和土壤肥力的影响 黄巧义, 黄建凤, 黄旭, 吴永沛, 李苹, 付弘婷, 唐拴虎, 刘一峰, 徐培智(4706)

秸秆连续还田配施化肥对稻-油轮作土壤碳库及作物产量的影响 蔡影, 付思伟, 张博睿, 胡宏祥, 刘文雯, 俞金涛, 贾临东, 刘运峰(4716)

化肥减量配施秸秆对双季稻田固氮微生物群落的影响 陈凯鹏, 韦菊娟, 陈丹, 王聪, 沈健林, 李勇, 吴金水(4725)

化肥减量与有机物料添加对华北潮土微生物氮循环功能基因丰度和氮转化遗传潜力的影响 李胜君, 胡荷, 李刚, 王蕊, 赵建宁, 张贵龙, 修伟明(4735)

长期覆膜条件下农田土壤微生物群落的响应特征 胡志娥, 肖谋良, 丁济娜, 季剑虹, 陈剑平, 葛体达, 鲁顺保(4745)

长期秸秆还田对潮土真菌群落、酶活性和小麦产量的影响 马垒, 李燕, 魏建林, 李子双, 周晓琳, 郑福丽, 吴小宾, 王利, 刘兆辉, 谭德水(4755)

土壤改良剂对再生水滴灌根际土壤菌群多样性及病原菌和抗生素抗性基因丰度的影响 崔丙健, 崔二革, 刘春成, 胡超, 樊向阳, 李中阳, 高峰(4765)

氮素对苜蓿植物修复垃圾堆场镉-多环芳烃复合污染土壤及土壤细菌群落结构的影响 李怡佳, 马俊伟, 李玉倩, 肖琛, 沈心怡, 牛云, 陈家军(4779)

抗生素降解剂对猪粪堆肥腐熟和细菌群落演替的影响 李玮琳, 张昕, 马军伟, 孙万春, 成琪璐, 林辉(4789)

《环境科学》征订启事(4337) 《环境科学》征稿简则(4407) 信息(4521, 4705, 4800)

土壤改良剂对再生水滴灌根际土壤菌群多样性及病原菌和抗生素抗性基因丰度的影响

崔丙健^{1,2}, 崔二苹^{1,2}, 刘春成^{1,2}, 胡超^{1,2}, 樊向阳^{1,2}, 李中阳^{1,2}, 高峰^{1,2*}

(1. 中国农业科学院农田灌溉研究所, 新乡 453002; 2. 中国农业科学院农业水资源高效安全利用重点开放实验室, 新乡 453002)

摘要: 基于再生水农业灌溉利用引发的人体健康和环境风险, 通过施用土壤改良剂揭示再生水灌溉根际土壤菌群组成与多样性变化特征, 并探讨土壤改良剂对根际土壤病原菌和抗生素抗性基因丰度变化的影响规律, 对于土壤改良剂的合理施用具有指导意义. 采用高通量测序技术和定量 PCR 检测方法, 研究了生物质炭、生物有机肥、腐植酸、松土精和玉米酒糟对再生水滴灌根际土壤细菌群落多样性及特定基因丰度的影响. 结果表明, 生物质炭处理显著增加根际土壤有机质和总氮含量; 生物有机肥处理显著增加 EC 值和有机质含量; 玉米酒糟处理显著增加 EC 值、总氮和总磷含量 ($P < 0.05$). 除生物质炭处理外, 其他各处理均能显著降低根际土壤 pH ($P < 0.05$). 5 种改良剂处理下根际土壤细菌群落组成与多样性在纲和属水平上较相似, 但其相对丰度存在差异. α -Proteobacteria、 γ -Proteobacteria、Bacteroidia、Actinobacteria、Acidimicrobiia 和 Anaerolineae 为所有处理中的优势菌纲, 优势菌属组成包括: *Pseudomonas*、*Sphingobium*、*Sphingomonas*、*Cellvibrio*、*Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*、*Flavobacterium* 和 *Algoriphagus* (相对丰度 $> 1\%$). 环境因子关联分析表明, 根际土壤细菌群落组成与 pH、EC、总氮和总磷含量之间存在较强的关联. 病原菌与抗生素抗性基因的检出丰度分别在 $10^3 \sim 10^7$ copies $\cdot g^{-1}$ 和 $10^4 \sim 10^8$ copies $\cdot g^{-1}$. 改良剂对病原菌和抗生素抗性基因检出水平存在较大差异, 生物有机肥、松土精和玉米酒糟处理均会导致部分抗生素抗性基因丰度显著增加, 而腐植酸和玉米酒糟处理下丁香假单胞菌、茄科雷尔氏菌和大肠菌群丰度显著降低 ($P < 0.05$). 弓形菌、蜡样芽孢杆菌、成团泛菌和粪拟杆菌与四环素类 (*tetA*、*tetB*、*tetO* 和 *tetQ*)、磺胺类 (*sulI*) 和红霉素类 (*ermB* 和 *ermC*) 抗性基因丰度存在显著相关性. 研究认为监测再生水灌溉下农业环境中病原菌和抗生素抗性基因的同时, 也要关注土壤改良剂的合理施用避免加剧生物污染的扩散.

关键词: 再生水; 土壤改良剂; 细菌群落; 病原菌; 抗生素抗性基因

中图分类号: X171.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2022)10-4765-14 DOI: 10.13227/j.hjxx.202111267

Effects of Soil Amendments on the Bacterial Diversity and Abundances of Pathogens and Antibiotic Resistance Genes in Rhizosphere Soil Under Drip Irrigation with Reclaimed Water

CUI Bing-jian^{1,2}, CUI Er-ping^{1,2}, LIU Chun-cheng^{1,2}, HU Chao^{1,2}, FAN Xiang-yang^{1,2}, LI Zhong-yang^{1,2}, GAO Feng^{1,2*}

(1. Institute of Farmland Irrigation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xinxiang 453002, China; 2. Key Laboratory of High-efficient and Safe Utilization of Agriculture Water Resources, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xinxiang 453002, China)

Abstract: Due to reclaimed water, irrigation can cause human health and environmental risks. Soil amendments are applied to reveal the abundance of pathogens and antibiotic resistance genes in rhizosphere soil irrigated by reclaimed water and to better understand the effects of environmental factors on the rhizosphere soil bacterial composition, which has guiding significance for the reasonable use of soil amendments. In this study, the effects of biochar, bioorganic fertilizer, humic acid, loosening soil essence, and corn vinasse on bacterial community diversity and certain gene abundances in rhizosphere soil under drip irrigation with reclaimed water were studied using high-throughput assays and quantitative PCR. The results showed that biochar significantly increased pH, organic matter, and total nitrogen contents in the rhizosphere soil. The corn vinasse significantly decreased soil pH and increased the contents of total nitrogen and total phosphorus but significantly increased the soil EC value ($P < 0.05$). The effects of the five soil amendments on the α -diversity of rhizosphere bacteria were not significantly different. The bacterial community structure and diversity of rhizosphere bacteria were similar at different taxonomic levels, but their relative abundance was different. α -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, Bacteroidia, Actinobacteria, Acidimicrobiia, and Anaerolineae were the dominant bacteria in all treatments. The dominant genera consisted of *Pseudomonas*, *Sphingobium*, *Sphingomonas*, *Cellvibrio*, *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*, *Flavobacterium*, and *Algoriphagus* (relative abundance $> 1\%$). Correlation analysis of environmental factors showed that the composition of the rhizosphere bacterial community was strongly correlated with pH, EC, total nitrogen, and total phosphorus content. The abundances of pathogenic bacteria and antibiotic resistance genes were $10^3 \sim 10^7$ copies $\cdot g^{-1}$ and $10^4 \sim 10^8$ copies $\cdot g^{-1}$, respectively. There were significant differences in the detection levels of pathogens and antibiotic resistance genes. Bioorganic fertilizer, loosening soil essence, and corn vinasse significantly increased the abundances of some antibiotic resistance genes, whereas humic acid and corn vinasse significantly decreased the abundances of *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, and total coliforms ($P < 0.05$). A significant correlation was found between pathogens (*Arcobacter*, *Bacillus cereus*, *Pantoea agglomerans*, and *Fecal bacteroidetes*) and antibiotic resistance genes (*tetA*, *tetB*, *tetO*, *tetQ*,

收稿日期: 2021-11-25; 修订日期: 2022-02-10

基金项目: 河南省自然科学基金青年项目 (202300410552); 河南省科技攻关项目 (202102110264); 国家重点研发计划项目 (2021YFD1700901); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (FIRI20210302, CX0003-ASTIP04-2021)

作者简介: 崔丙健 (1985 ~), 男, 博士, 副研究员, 主要研究方向为再生水农业安全利用, E-mail: ayangchj@126.com

* 通信作者, E-mail: gaofengcaas@sina.com

sul1, *ermB*, and *ermC*). In conclusion, while monitoring pathogens and antibiotic resistance genes in the agricultural environment under reclaimed water irrigation, attention should be paid to the rational application of soil amendments to avoid exacerbating the spread of biological contamination.

Key words: reclaimed water; soil amendments; bacterial community; pathogens; antibiotic resistance genes

再生水是缓解供水压力和补充农业灌溉用水不足的重要替代水源,其回用已成为水资源匮乏地区发展灌溉农业的有效途径.文献[1]明确提出了将污水资源化利用作为节水开源的重要内容,再生水纳入水资源统一配置,实现再生水规模化利用和试点示范.2018年,全国再生水利用量达到73.5亿 m^3 [2].预计到2030年,再生水农业灌溉利用量可达16.45亿 m^3 [3].随着污水处理工艺持续改进,再生水水质不断提高,有效降低了其利用的环境风险.利用再生水进行农业生产成为一种可行的选择,但再生水除了保留部分养分外,还含有盐分、痕量有毒有害物质和病原菌等风险因子,易造成潜在环境风险和人体健康风险,严重制约再生水灌溉农业的可持续发展.

再生水灌溉有利于土壤微生物生物量和酶活性的提高,促进了土壤细菌、真菌和放线菌数量的增加,其与土壤养分密切相关[4-6].然而,再生水中残留病原菌和抗生素抗性基因的释放可能导致其在灌溉土壤微环境中增殖和传播.再生水灌溉土壤中作为水平基因转移潜力的指示基因整合酶基因(*integrase gene*, *intI1*)与*tetG*、*sul1*和*sul2*基因呈显著正相关,*sul2*和*intI1*克隆与某些致病菌具有高度的同源性[7].施用土壤改良剂是土壤农艺调控措施的重要手段,在改善土壤结构、提高土壤水分和养分以及降低土壤环境危害方面表现出巨大潜力.生物质炭由于其其在固碳、培肥和固定污染物等方面的潜力而受到越来越多的关注.Duan等[8]报道了生物质炭可有效降低土壤和作物中人类条件致病菌的数量,崔二苹等[9]的研究发现生物质炭对再生水灌溉根际土壤病原菌的检出水平与其种类有关.然而,生物质炭会降低土壤中抗生素的表观分配系数使交换态或水溶态抗生素增多,增加了抗生素迁移性和抗性基因的传播风险[10].有研究表明,生物质炭、腐植酸和生物有机肥不仅可以改善土壤结构和提高作物产量[11-13],还能有效抑制土壤真菌病原对作物根部的侵袭[14-16].生石灰、松土精和腐植酸配施能提高作物抗病性和根部土壤酶活性[17].酒糟是富含有机质和含氧活性基团的生物质原料,可以促进土壤中无机磷的释放[18].综上,在利用不同土壤农艺调控措施时,需综合考虑改良剂的性质与可能引发的农业环境风险.

再生水灌溉下施用土壤改良剂可直接或间接通

过改变土壤理化性质而影响根际土壤细菌群落结构和多样性,合理选择土壤改良剂对阻控再生水灌溉下病原菌及抗性基因污染风险具有重要意义.目前针对再生水灌溉的环境效应研究相对较多,而关于生物质炭、生物有机肥、腐植酸、松土精和玉米酒糟对再生水灌溉土壤理化性质和微生物群落结构及多样性影响的研究报道较少.本研究基于高通量测序技术和定量PCR方法,综合分析了施用不同土壤改良剂处理条件下再生水灌溉根际土壤细菌菌群多样性及常见的抗生素抗性基因(四环素类、磺胺类、红霉素和氟苯尼考抗性基因)、人类条件致病菌和植物病原菌丰度水平,并结合相关环境因子探究影响细菌群落相对丰度和关键基因丰度变化的主要因素,以期深入了解再生水灌溉风险、合理施用土壤改良剂提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 供试材料与试剂

本试验采用5种常见土壤改良剂:花生壳生物质炭(BC)购自河南省商丘市三利新能源有限公司;生物有机肥(BF)、松土精(S)购自山东绿陇作物营养有限公司;腐植酸(HA,腐植酸 $\geq 65\%$ 、黄腐酸 $\geq 30\%$)购自深圳市杜高生物新技术有限公司;玉米酒糟(V)购自新乡市先丰医药新材料有限公司.FastDNA Spin Kit for Soil(MP Biomedicals公司,美国);TB GreenTM Premix Ex TaqTM、pMDTM 19-T Vector(Takara公司,大连);高纯质粒小量制备试剂盒(百泰克生物技术有限公司,无锡);LB液体和固体培养基(生工生物工程股份有限公司,上海).

1.2 试验设计

本试验于2020年6~8月在中国农业科学院新乡野外观测试验站阳光板温室进行.供试作物为矮生番茄,购自山东禾之元种业公司.试验土壤取自周边农田,类型为壤土,其基本理化性质如下:pH为8.22,电导率(EC)为 $314 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, ω [总氮(TN)]为 $0.48 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, ω [总磷(TP)]为 $0.42 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, ω [铜(Cu)]、 ω [锌(Zn)]、 ω [铅(Pb)]和 ω [镉(Cd)]分别为23.17、49.73、29.32和 $0.074 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.本试验用再生水取自某城市生活污水处理厂,采用“A²O+高效沉淀池+反硝化深床滤池”工艺,处理后的出水水质满足《城镇污水处理厂污染物排放标准》(GB 18918-2002)一级A排放标准

要求,同时也符合《农田灌溉水质标准》(GB 5084-2021). 试验期间污水处理厂出水池的再生水由罐车运输至试验站,储存于地下水水泥蓄水池中备用. 再生水蓄水池通过潜水泵将水抽入供水压力罐,再由管道分配输送至田间小区和温室大棚所需区域.

本试验在盛土 150 kg 的蔬菜种植槽(长 160 cm × 宽 40 cm × 高 38 cm)中进行,幼苗移栽前一次性施入底肥,所有处理施肥量相同(尿素 200 mg·kg⁻¹ + 过磷酸钙 150 mg·kg⁻¹ + 氯化钾 100 mg·kg⁻¹). 本试验设置 7 个处理,分别为:清水灌溉(PW)、再生水灌溉(RW)、再生水灌溉 + 生物质炭(RBC)、再生水灌溉 + 生物有机肥(RBF)、再生水灌溉 + 腐植酸(RHA)、再生水灌溉 + 松土精(RS)和再生水灌溉 + 玉米酒糟(RV). 生物有机肥、腐植酸和松土精施用量按使用说明(分别为 200、100 和 100 mg·kg⁻¹),酒糟按质量比 1% 施用量,生物质炭按质量比 2% 施用量. 灌溉方式采用浅埋地表滴灌,以清水和再生水为灌溉水源,滴灌带滴头流量 2.5 L·h⁻¹,每个处理重复 3 次.

本试验结束后,采用抖落法将番茄根部松散的土壤去除后,使用无菌毛刷从根部收集黏附的根际土壤,真空冷冻干燥后过 2 mm 孔径尼龙筛,置于 -80℃ 冰箱保存,用于后续理化性质检测与微生物多样性分析.

1.3 测定方法

1.3.1 理化测试分析与土壤 DNA 提取

按土水比 1:2.5 混合剧烈振荡 30 min 后静置 3 h,利用 pH 计(Thermo Scientific Orion A211,美国)与电导率仪(雷磁 DDB,上海)分别测定根际土壤 pH 和电导率(EC). 采用低温外热重铬酸钾氧化-比色法测定有机质(OM)含量. 根际土壤经酸消煮后

利用连续流动分析仪(Seal-AA3,德国)测定总氮(TN)和总磷(TP),土壤加酸微波消解后利用原子吸收分光光度计(岛津 AA-6300,日本)测定 Cu、Zn、Cd 和 Pb 这 4 种重金属含量.

利用 FastDNA Spin Kit for Soil 试剂盒(MP Biomedicals,美国)从根际土壤中提取基因组 DNA. 利用超微量分光光度计(SpectraMax® QuickDrop™, Molecular Devices 公司,美国)检测 DNA 浓度及纯度.

1.3.2 高通量测序

利用 16S rRNA 基因 V3-V4 区引物 338F(CTCTACGGGAGGCAGCAG)和 806R(GGACTACHVGGGTWTCTAAT)^[19]在 ABI GeneAmp 9700 PCR 扩增仪上对根际土壤细菌 DNA 进行 PCR 扩增. PCR 反应体系如下:FastPfu Buffer(5 × TransGen)4 μL, 2.5 mmol·L⁻¹ dNTPs 2 μL, 5 μmol·L⁻¹ 正反向引物各 0.8 μL, FastPfu Polymerase 0.4 μL, 10 ng 模板 DNA, ddH₂O 补足至 20 μL. PCR 反应条件:95℃ 预变性 3 min; 随后 30 个温度循环(95℃ 变性 30 s, 50℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s); 最后 72℃ 延伸 10 min, 保持 10℃ 恒温孵育. 基于 Illumina MiSeq PE300 测序平台(Illumina Inc., 美国),利用 TruSeq™ DNA Sample Prep Kit 对 PCR 扩增产物构建 PE 文库进行双末端测序.

1.3.3 定量 PCR 检测

利用功能基因、病原菌毒力基因和抗生素抗性基因引物^[33]对根际土壤 DNA 进行定量 PCR 检测,部分引物信息详见表 1. 利用 TA 克隆方法将扩增的基因片段插入到 pMD™ 19-T Vector(Takara 公司,大连)中来分别制备相应的标准质粒,然后将已知质粒拷贝数进行 10 倍稀释 8 个梯度作为标准模板构

表 1 用于定量 PCR 检测的引物

Table 1 Primers for quantitative PCR detection

项目	目的基因	序列(5'-3')	产物长度 /bp	文献
Ammonia-oxidizing archaea	archaeal <i>amoA</i>	F:STAATGGTCTGGCTTAGACG; R:GCGCCATCCATCTGTATGT	635	[20]
Ammonia-oxidizing bacteria	bacterial <i>amoA</i>	F:GGGGTTTCTACTGGTGGT; R:CCCCTCKGSAAGCCTTCTTC	491	[21]
Nitrogen-fixing bacteria	<i>nifH</i>	F:AAAGGYGGWATCGGYAARTCCACCAC; R:TTGTTSGCSGRTACATSGCCATCAT	432	[22]
urease	<i>ureC</i>	F:TGGGCCTTAAAATHCAYGARGAYTGGG; R:GGTGGTGGCACACCATNANCATRTC	340	[23]
alkaline phosphatase	<i>phoD</i>	F:CAGTGGGACGACCACGAGGT; R:GAGCCGATCGGCATGTGC	370	[24]
<i>Arcobacter butzleri</i>	<i>rpo</i>	F:ATACTTCTTGGTCTTGTGCTGTA; R:CCACAAAGACACTGATAATCTTTTAC	132	[25]
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	23S	F:TGCTGGAGCGGATAGAAGTA; R:AACAACCTACGTCCTTCGAC	257	[25]
<i>Bacillus cereus</i>	Hemolysin	F:CTGTAGCGAATCGTACGTATC; R:TACTGTCCAGCCACATTAC	185	[26]
<i>Enterococcus faecium</i>	23S	F:AGAAATCCAAACGAACCTTG; R:CAGTGTCTACCTCCATCATT	92	[27]
<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>opf</i>	F:AACTGAAAAACACCTTGGGC; R:CCTGGGTGTTGAAGTGGTA	304	[28]
<i>Ralstonia solanacearum</i>	16S	F:AGTCGAACGGCAGCGGGGG; R:GGGGATTACATCGGTCTTGCA	553	[29]
Total coliforms	<i>lacZ</i>	F:ATGAAAAGCTGGCTACAGGAAGGCC; R:GGTTTATGCAGCAACGAGACGTCA	264	[30]
<i>Pantoea agglomerans</i>	16S	F:CTTAAAGCCAGGGAAGCCGGTCA; R:GAGCCGGCTCAGGGAAACCGGTC	121	[31]
<i>Fecal Bacteroidetes</i>	16S	F:AACGCTAGCTACAGGCTTAACA; R:ACGCTACTTGGCTGGTTC	380	[32]

建标准曲线. 基于美国伯乐 BIO-RAD CFX Connect™ 荧光定量 PCR 检测系统, 利用 TB Green™ Premix Ex Taq™ 染料法进行基因丰度的定量检测. 反应体系包括 10 μ L 2 \times TB Green™ Premix Ex Taq™, 0.4 μ L 正反向引物, 2 μ L 模板, 无菌水补足至 20 μ L. 最佳反应条件: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 40 个循环, 每个样品重复 3 次, 以无菌水作为阴性对照.

1.4 数据分析

基于美吉 I-Sanger 生信云平台分析根际土壤细菌群落多样性与结构变化特征, 具体步骤如下: ① 采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学聚类, 利用 mothur 计算 α 多样性指数; ② 利用 R 语言 (version 3.3.1) 工具绘制 Venn 图, 基于 Silva (Release138 <http://www.arb-silva.de>) 数据库比对分析各样本的群落物种组成; ③ 利用 R 语言进行环境因子关联分析和作图, 包括冗余分析 (RDA) 和相关性热图.

利用 Hem I 热图软件对定量基因丰度进行作图, 不同处理组的差异分析采用 SPSS 20.0 进行单

因素方差分析 (one-way analysis of variance, ANOVA) 和 LSD 多重比较检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义.

2 结果与分析

2.1 土壤理化性质

不同处理间根际土壤理化性质变化如表 2 所示. 与清水灌溉相比, 再生水灌溉显著增加了根际土壤 pH、EC 和 Pb 含量 ($P < 0.05$). 添加生物有机肥、腐植酸、松土精和玉米酒糟均会导致根际土壤 pH 显著降低 ($P < 0.05$); 不同土壤改良剂的添加均可增加再生水灌溉根际土壤 EC, 并且生物有机肥和玉米酒糟的作用效果更加显著 ($P < 0.05$); 施用生物炭和生物有机肥显著增加土壤有机质含量, 生物炭处理下总氮含量也显著增加 ($P < 0.05$); 玉米酒糟处理下根际土壤总氮和总磷含量显著增加 ($P < 0.05$); 各处理间重金属含量无显著变化. 上述分析表明, 不同土壤改良剂对根际土壤性质的影响是由其性质差异造成的, 施用土壤改良剂可以在一定程度上改善土壤结构并提高土壤养分.

表 2 根际土壤理化性质¹⁾

处理组	pH	EC / μ S·cm ⁻¹	OM/%	ω (TN) /mg·kg ⁻¹	ω (TP) /mg·kg ⁻¹	ω (Cd) /mg·kg ⁻¹	ω (Pb) /mg·kg ⁻¹
PW	8.11a	236a	1.88a	0.45a	0.25ab	0.19a	15.56a
RW	8.42b	460b	1.90a	0.45a	0.23ab	0.15a	26.02bc
RBC	8.39b	556bc	2.72b	0.71b	0.27a	0.15a	25.06bc
RBF	8.03a	677c	2.38b	0.47a	0.22b	0.17a	27.39c
RHA	8.17a	603bc	1.73a	0.43a	0.25ab	0.15a	24.32b
RS	8.16a	632bc	1.80a	0.47a	0.25ab	0.16a	23.89b
RV	7.62c	849d	1.85a	0.74b	0.40c	0.14a	24.36b

1) 同一列不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著, $n = 3$, 下同

2.2 根际土壤细菌群落结构与多样性分析

2.2.1 根际土壤细菌群落组成与 α 多样性

按照 97% 相似性对非重复序列进行 OTU 聚类, 得到 OTU 的代表序列, 所有处理按最小样本序列数抽平后的有效序列数为 19 146. 21 个根际土壤样品共获得 OTU 数目 4 131 个, 对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学划分, 统计各样本的群落物种

组成信息如下: 37 个门、106 个纲、271 个目、437 个科和 799 个属. 从表 3 可以看出, 处理间细菌 α 多样性比较分析结果表明不同处理对 Ace 指数、Chao1 指数和覆盖度无显著影响; 玉米酒糟处理增加了 Sob 指数和 Shannon 指数, 而降低了 Simpson 指数, 表明其处理的根际土壤细菌群落多样性高于其他处理.

表 3 不同处理细菌 α 多样性指数

处理组	Sob 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	Ace 指数	Chao1 指数	覆盖度
PW	1 958ab	6.35a	0.004 79a	2 604a	2 558a	0.967 1a
RW	1 845ab	6.18a	0.006 46ab	2 480a	2 480a	0.968 0a
RBC	1 747ab	6.04a	0.008 82ab	2 400a	2 440a	0.968 8a
RBF	1 829a	6.07a	0.006 92ab	2 578a	2 591a	0.965 7a
RHA	1 781ab	5.99a	0.009 04ab	2 482a	2 485a	0.967 1a
RS	1 784ab	5.89a	0.010 32b	2 621a	2 417a	0.967 4a
RV	2 002b	6.40a	0.004 42a	2 587a	2 560a	0.967 8a

各处理间共有和独有 OTU 的 Venn 图分析可以直观地展现物种组成的相似性和重叠情况,从图 1 可以看出 7 个处理组分别有 101、36、42、47、39、33 和 238 个独有 OTU,所有处理组共有 1 314 个核心 OTU. 结果表明施用土壤改良剂可以一定程度影响根际土壤细菌群落组成,各处理均聚集了相当数量的独有 OTU 数目,其中玉米酒糟处理中独有 OTU 数目高于其他处理.

在不同分类学水平上统计各样本中物种组成信息,分析优势物种多样性及其相对丰度,将相对丰度低于 1% 的物种合并为 others. 由图 2(a)可知,各处理纲水平优势细菌群落组成相同,而相对丰度存在差异. α -变形菌纲(α -Proteobacteria)和 γ -变形菌纲(γ -Proteobacteria)属于变形菌门,相对丰度分别为 16.75%~19.72% 和 19.4%~27.14%; 拟杆菌纲(Bacteroidia)属于拟杆菌门,相对丰度为 13.87%~19.79%; 放线菌纲(Actinobacteria)、嗜热油菌纲(Thermoleophilia)和酸微菌纲(Acidimicrobiia)均属于放线菌门,相对丰度分别为 4.84%~8.88%、0.61%~1.28% 和 2.49%~5.66%; 厌氧绳菌纲

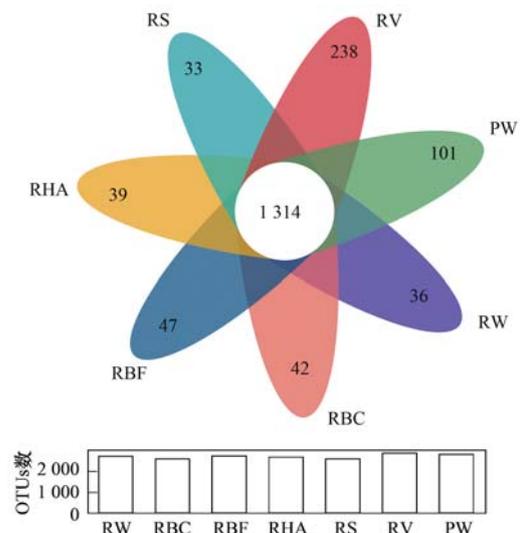
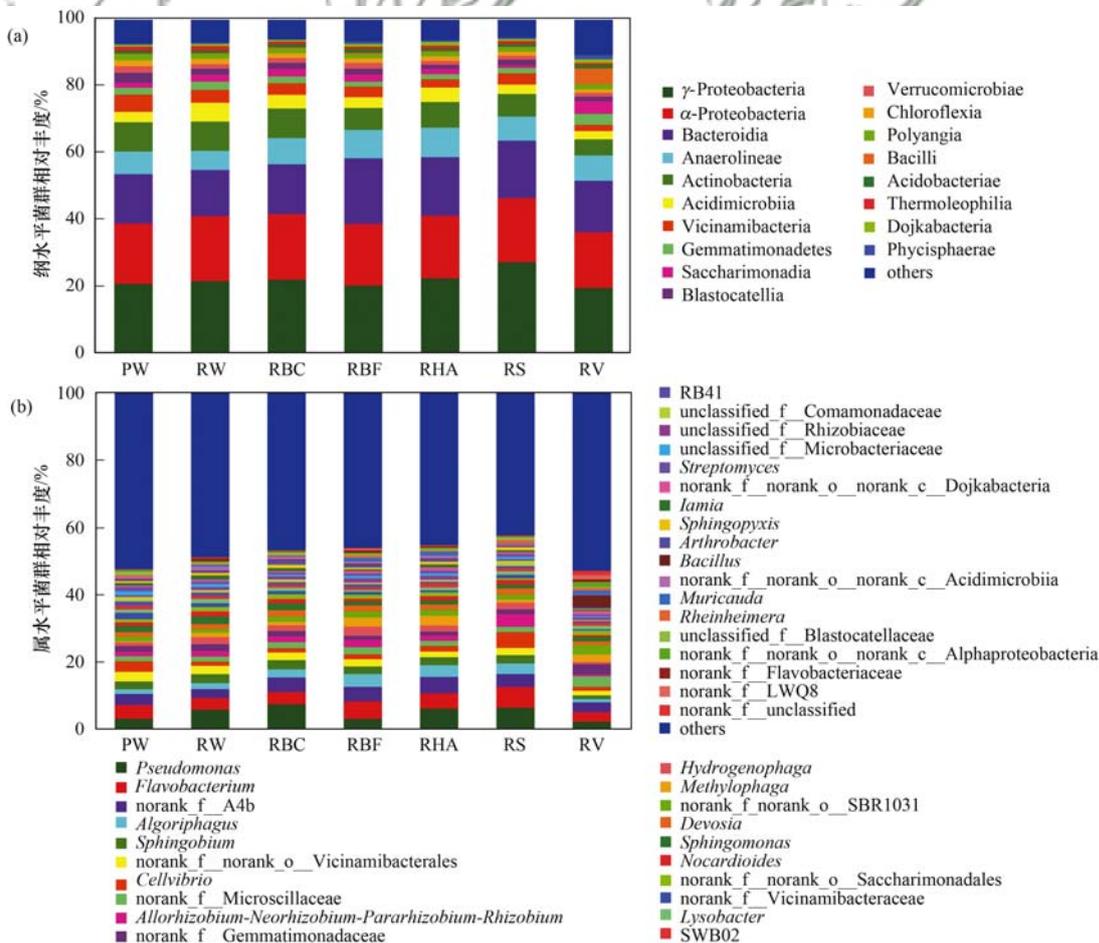


图 1 不同处理间根际土壤细菌 OTUs 组成 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of core OTUs among different treatments

(Anaerolineae) 和绿弯菌纲(Chloroflexia)属于绿弯菌门,相对丰度分别为 5.76%~8.86% 和 1.08%~1.79%; Vicinamibacteria 纲与 Blastocatellia 纲属于酸杆菌门,相对丰度分别为 1.86%~5.18% 和 1.15%~1.83%; 此外,还有酸杆菌纲



(a) 纲水平; (b) 属水平

图 2 纲水平和属水平根际土壤细菌群落组成相对丰度

Fig. 2 Bacterial community composition at the class level and genus level in rhizosphere soil

(Acidobacteriae)、芽孢杆菌纲(Bacilli)、芽单胞菌纲(Gemmatimonadetes)、多伊卡菌纲(Dojkabacteria)、Saccharimonadia纲、Phycisphaerae纲和疣微菌纲(Verrucomicrobiae)等一些相对丰度较低的物种类群,在细菌种群数量中的相对丰度均低于2%。变形菌门(Proteobacteria, 36.15%~46.44%)、拟杆菌门(Bacteroidetes, 13.87%~19.79%)、放线菌门(Actinobacteria, 7.93%~15.77%)、绿弯菌门(Chloroflexi, 7.38%~10.23%)和酸杆菌门(Acidobacteria, 4.26%~9.02%)均是各处理中最优势的5个类群,在每个样本中物种相对丰度均达到85%以上。再生水灌溉较清水灌溉增加了变形菌门(Proteobacteria)和放线菌门(Actinobacteria)相对丰度,降低了绿弯菌门(Chloroflexi)和酸杆菌门(Acidobacteria)相对丰度。土壤改良剂影响再生水灌溉根际土壤主要菌群相对丰度,其中玉米酒糟处理样本的Patensibacteria门、芽单胞菌门(Gemmatimonadota)和厚壁菌门(Firmicutes)在菌群中的相对丰度显著高于其他处理。

如图2(b)所示,属水平上细菌群落结构和相对丰度呈现动态变化趋势。丰度前36的优势属占总序列的比例超过45%,将在所有样本中相对丰度均小于1%的物种归为others。各处理细菌群落组成分析表明不同样本在属水平优势物种相同,但相对丰度呈现差异。优势菌属的相对丰度在各处理中的分布如下:假单胞菌属(*Pseudomonas*, 2.04%~7.25%)、黄杆菌属(*Flavobacterium*, 2.87%~6.2%)、食冷菌属(*Algoriphagus*, 0.97%~3.84%)、鞘脂菌属(*Sphingobium*, 1.1%~2.75%)、纤维弧菌属(*Cellvibrio*, 1.18%~4.74%)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*, 1.17%~2.25%)、*Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*(0.57%~3.82%)和类诺卡氏菌属(*Nocardioides*, 0.57%~1.53%)。与清水灌溉相比,再生水灌溉显著增加假单胞菌属(*Pseudomonas*)的相对丰度。生物有机肥和玉米酒糟处理能显著降低再生水灌溉根际土壤假单胞菌属(*Pseudomonas*)的相对丰度。除了玉米酒糟处理,施用土壤改良剂使再生水灌溉根际土壤中食冷菌属(*Algoriphagus*)的相对丰度显著提高。纤维弧菌属(*Cellvibrio*)和*Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*在松土精处理的根际土壤中维持较高的相对丰度。与其他处理相比,施用玉米酒糟对细菌群落组成的影响较大,食冷菌属(*Algoriphagus*)、*Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*和鞘脂菌属(*Sphingobium*)

显著降低,而未分类的芽单胞菌菌科(Gemmatimonadaceae)和Microscillaceae的相对丰度显著降低。

2.2.2 β 多样性与环境因子关联分析

通过主坐标分析(PCoA)发现,PC1轴和PC2轴对结果的解释度分别为29.13%和14.98%(图3)。生物质炭、生物有机肥、腐植酸和松土精处理的细菌菌群组成相似,清水灌溉及再生水灌溉配施玉米酒糟与其他处理的群落组成差异较大。PERMANOVA进一步分析结果显示,不同分组处理条件下根际土壤细菌组成呈现显著差异($F = 3.3398$, $R^2 = 0.5887$, $P = 0.0010$)。

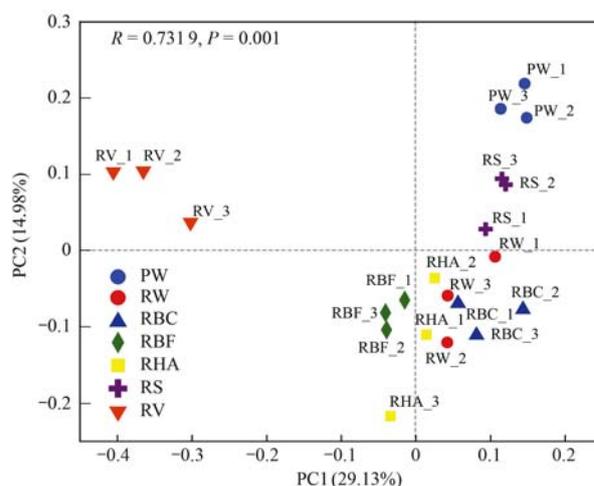


图3 不同处理样本间群落组成 PCoA

Fig. 3 Principal coordinates analysis (PCoA) of bacterial community composition in rhizosphere soil

细菌优势菌属与环境因子的相关性 Heatmap 图分析表明,环境因子与20个优势菌属丰度呈显著正相关($P < 0.05$),并与23个优势菌属丰度呈显著负相关($P < 0.05$)(图4)。土壤pH、EC、TN、TP和Cd与优势菌属丰度变化密切相关,pH与假单胞菌属(*Pseudomonas*)、类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)和鞘氨醇盒菌属(*Sphingopyxis*)呈极显著正相关($P < 0.01$),与链霉菌属(*Streptomyces*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、微杆菌属(*Microbacterium*)和*Iamia*呈显著正相关($P < 0.05$);EC与假单胞菌属(*Pseudomonas*)和鞘氨醇盒菌属(*Sphingopyxis*)呈极显著负相关($P < 0.01$),与芽孢杆菌属及一些未分类的菌科呈显著正相关($P < 0.05$);噬氢菌属(*Hydrogenophaga*)和未分类的微杆菌科均与TN和TP呈显著负相关($P < 0.05$),未分类的Gemmatimonadaceae、Proteobacteria和Saprospiraceae与TP呈显著正相关($P < 0.05$);Cd与*Fluvicola*呈显著正相关,而与未分类的Dojkabacteria和Proteobacteria呈显著负相关($P < 0.05$)。Mantel test

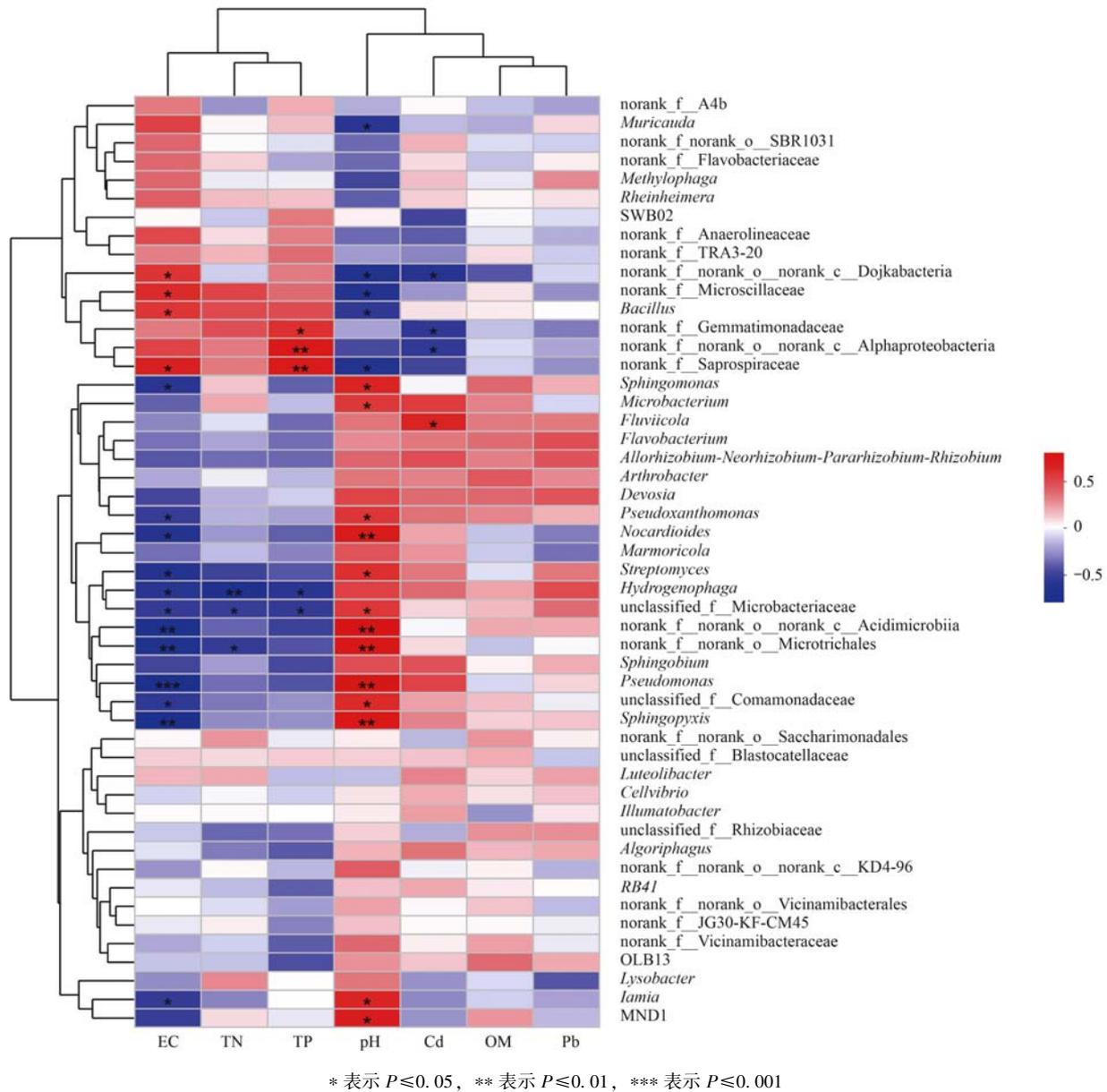


图4 环境因子与物种 Heatmap 分析

Fig. 4 Correlation heatmap of the top fifty genera and soil properties

和方差分解分析 (VPA) 表明, 有机质 (OM)、总氮 (TN) 和总磷 (TP) 对细菌群落结构有显著影响 ($R^2 = 0.3646$, $P = 0.0210$), 土壤养分指标 (贡献率 30.85%) 较其他指标更能影响细菌群落的变化。

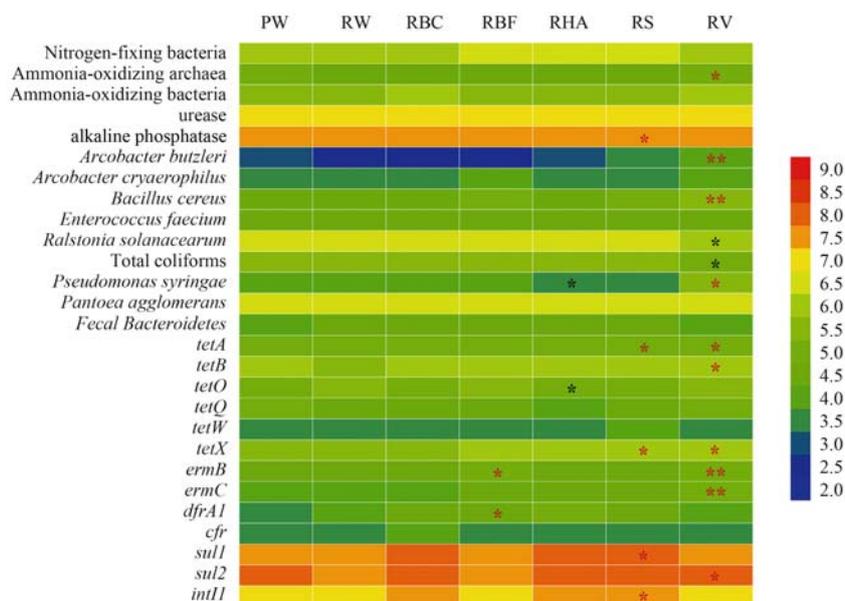
2.3 N 功能基因、病原菌及抗生素抗性基因丰度定量结果

各处理根际土壤选定基因丰度的定量结果如图 5 所示。与清水灌溉相比, 再生水灌溉使根际土壤丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 和 *dfrA1* 丰度显著增加, 而显著降低了氨氧化古菌和 *tetO* 丰度 ($P < 0.05$)。不同改良剂对根际土壤固氮菌、氨氧化细菌及脲酶等功能基因丰度无显著影响。与再生水灌溉相比, 施用松土精 (RS) 和玉米酒糟 (RV) 处理分别显著增加了碱性磷酸酶活性与氨氧化古菌丰度 (P

< 0.05)。选定基因的丰度变化在 RW 和 RBC 处理之间无显著差异, 土壤改良剂对病原菌和抗生素抗性基因丰度的显著影响主要体现在生物有机肥、腐植酸、松土精和玉米酒糟的施用。添加腐植酸处理显著降低了再生水滴灌根际土壤丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 丰度 ($P < 0.05$); 玉米酒糟处理下再生水灌溉根际土壤中布氏弓形菌 (*Arcobacter butzleri*)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 和丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 丰度显著增加, 而显著降低了茄科雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 和大肠菌群的丰度 ($P < 0.05$)。本文利用定量 PCR 技术分析了与 5 种抗生素有关的 12 种抗性基因。抗生素抗性基因在不同处理中的检出丰度存在明显的差异, 其数量级均

在 $10^4 \sim 10^8$ copies \cdot g $^{-1}$ 土样, 其中 *tetB*、*sul1*、*sul2* 和 *intI1* 在根际土壤中的检出水平较高. *tetQ*、*tetW* 和 *cfr* 在各处理之间的检出丰度无显著差异. 生物有机肥处理下再生水灌溉根际土壤中 *ermB* 和 *dfrA1* 丰度显著增加; 腐植酸处理使 *tetO* 丰度显著降低; 添加松土精显著增加了 *tetA*、*tetX*、*sul1* 和

intI1 丰度; 玉米酒糟处理导致 *tetA*、*tetB*、*tetX*、*ermB*、*ermC* 和 *sul2* 丰度显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). 值得注意的是玉米酒糟处理下根际土壤中多数抗生素抗性基因丰度均呈现显著增加, 表明抗生素抗性基因丰度与土壤改良剂自身性质及其调控土壤理化性质密切相关.



*表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$; 红色星号表示显著增加, 黑色星号表示显著降低; 色柱表示基因丰度大小

图5 不同处理条件下特定基因丰度变化

Fig. 5 Changes in certain gene abundances in different treatments

环境因子与病原菌、抗生素抗性基因之间相关性分析如表4所示, 可以看出土壤 pH 与布氏弓形菌 (*Arcobacter butzleri*)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 和 *ermC* 呈显著负相关, 与 *sul1* 呈显著正相关; 蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、*ermB* 和 *ermC* 与土壤 EC 呈显著正相关; TP 与布氏弓形菌 (*Arcobacter butzleri*)、丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*)、*tetA* 和 *tetB* 呈显著正相关, 而与茄科雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 和大肠菌群呈显著负相关; Cd 和 Pb 分别与大肠菌群和 *dfrA1* 呈显著正相关. 弓形菌与四环素抗性基因 (*tetA*、*tetB* 和 *tetO*)、红霉素抗性基因 (*ermB* 和 *ermC*) 及磺胺类抗性基因 (*sul1*) 都存在显著的相关性; 蜡样芽孢杆菌与 *tetA*、*ermB* 和 *ermC* 呈显著正相关; 大肠菌群与 *tetB*、*cfr* 呈显著负相关; 丁香假单胞菌与 *ermB* 呈显著正相关; *tetQ* 与成团泛菌和粪拟杆菌呈显著正相关; *intI1* 基因丰度与四环素抗性基因 (*tetQ* 和 *tetW*) 和磺胺类抗性基因 (*sul2*) 丰度之间有显著相关性. 综上所述可知, 病原菌和抗生素抗性基因普遍存在于根际土壤中, 表明抗生素抗性基因的散播可能导致某些病原菌抗生素抗性的增加.

3 讨论

3.1 不同土壤改良剂对再生水滴灌根际土壤理化性质的影响

有研究报道再生水灌溉使各种盐分离子在土壤中累积, 从而导致土壤 EC 值升高和 pH 降低^[34, 35], 其滴灌条件下土壤有机质和有效磷含量也显著提高^[36]. 生物质炭可以提高土壤对养分的吸持能力, 并对土壤碳具有增汇减排作用, 在农业生产和环境修复方面应用前景广阔^[37]. 生物质炭一般呈碱性, 可提高土壤 pH, 增加土壤交换性盐基阳离子含量^[38]. 本研究中添加生物质炭处理并未显著增加土壤 pH, 但显著增加了根际土壤的有机质含量, 这与已有的研究结果一致^[39]. 生物有机肥含有的活性菌可活化土壤中的氮、磷, 改善土壤理化性质. 王俊红等^[40]的研究表明施用生物有机肥提高了根际土壤有机质、总氮、速效磷和速效钾含量, 这主要是由于生物有机肥中含有丰富的养分及微生物, 通过改善根际环境促进了土壤养分循环利用. 松土精是一种高分子生物聚合物, 可改善土壤团粒结构, 并有效增加土壤的透气性和渗水能力. 罗俊等^[41]的研究发现添加松土精处理使土壤紧实度和容重降低, pH

表 4 土壤理化指标与病原菌和抗生素抗性基因的皮尔逊相关系数¹⁾

Table 4 Pearson's correlation coefficient of soil properties and pathogens and antibiotic resistance genes

	AB	BC	RS	TC	PS	PA	FB	tetA	tetB	tetO	tetQ	ermB	ermC	dfpA1	sul1	sul2	cfr	int11
pH	-0.709*	-0.750*	0.579	0.443	-0.655	0.289	0.250	-0.610	-0.594	-0.221	-0.361	-0.689	-0.746*	0.188	0.710*	0.327	-0.327	0.270
EC	0.466	0.751*	-0.391	-0.564	0.544	0.149	0.288	0.496	0.407	0.082	-0.261	0.746*	0.755*	0.535	-0.619	0.316	0.421	0.278
OM	-0.440	-0.001	0.064	0.244	-0.049	0.195	0.507	-0.013	-0.230	0.066	-0.307	0.085	-0.019	-0.023	-0.024	-0.078	-0.249	-0.121
TN	0.419	0.433	-0.621	-0.655	0.588	-0.406	-0.181	0.619	0.558	-0.148	0.134	0.426	0.313	-0.150	-0.146	-0.253	0.453	-0.289
TP	0.803*	0.577	-0.820*	-0.876**	0.771*	-0.606	-0.538	0.730*	0.799*	-0.099	0.420	0.547	0.515	-0.189	-0.329	-0.336	0.623	-0.333
Cd	-0.250	-0.195	0.458	0.760*	-0.381	0.074	-0.003	-0.181	-0.262	0.225	0.246	-0.279	-0.257	-0.576	0.087	-0.326	-0.483	-0.230
Pb	-0.180	0.231	-0.027	-0.141	0.194	0.456	0.602	-0.079	-0.189	0.252	-0.480	0.418	0.408	0.801*	-0.339	0.495	-0.109	0.379
AB	1.000	0.683	-0.457	-0.709*	0.632	-0.476	-0.571	0.877**	0.919**	-0.075	0.479	0.520	0.477	-0.164	-0.192	-0.076	0.651	-0.039
AC	0.636	1.000	-0.346	-0.047	0.669	0.067	0.024	0.211	0.118	0.813*	-0.389	0.730*	0.819*	0.046	-0.880**	-0.248	-0.326	-0.267
BC	1.000	1.000	-0.225	-0.331	0.698	0.142	0.103	0.721*	0.505	0.369	0.127	0.727*	0.710*	0.005	-0.631	0.086	0.239	0.075
EF	0.408	0.408	1.000	0.626	-0.096	0.742*	0.775*	-0.185	-0.472	0.472	-0.395	0.193	0.265	0.074	-0.551	0.156	-0.470	0.166
RS	1.000	0.683	1.000	0.745*	-0.755*	0.722*	0.566	-0.339	-0.496	-0.131	-0.544	-0.513	-0.526	0.156	0.432	0.626	-0.242	0.650
TC	1.000	0.636	1.000	1.000	-0.585	0.581	0.532	-0.578	-0.743*	0.345	-0.224	-0.369	-0.330	-0.116	0.065	0.059	-0.763*	0.083
PS	1.000	0.636	1.000	1.000	1.000	-0.387	-0.357	0.600	0.528	0.517	0.595	0.727*	0.696	-0.225	-0.606	-0.467	0.069	-0.525
PA	1.000	0.636	1.000	1.000	1.000	1.000	0.893**	-0.405	-0.648	0.172	-0.748*	-0.170	-0.108	0.414	-0.147	0.660	-0.317	0.627
FB	1.000	0.636	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-0.355	-0.597	0.176	-0.802*	0.041	0.069	0.566	-0.235	0.591	-0.343	0.550
tetA	1.000	0.636	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.922**	-0.032	0.386	0.386	0.622	0.493	-0.139	-0.124	-0.035	0.550	-0.016
tetB	1.000	0.636	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-0.229	0.463	0.463	0.526	0.426	-0.107	-0.016	-0.107	0.699	-0.066
tetO	1.000	0.636	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.412	0.412	0.508	0.540	-0.163	-0.689	-0.409	-0.768*	-0.463
tetQ	1.000	0.636	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.279	0.241	-0.676	-0.137	-0.807*	-0.147	-0.790*
ermB	1.000	0.636	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	-0.270	-0.294	0.557	0.508	0.883**	0.577	0.906**
ermC	1.000	0.636	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.440	0.492	0.818*	-0.263	0.672	0.428	0.697
dfpA1	1.000	0.636	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.972**	0.253	-0.745*	-0.135	0.039	-0.154
sul1	1.000	0.636	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.281	-0.857**	-0.145	0.004	-0.154
sul2	1.000	0.636	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.735*	0.171	0.171	0.696
cfr	1.000	0.636	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.250	0.261	0.261	0.264
int11	1.000	0.636	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

1) *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$; AB 表示布氏弓形菌 (*Arcobacter butzleri*); AC 表示嗜冷弓形菌 (*Arcobacter cryaerophilus*); BC 表示蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*); EF 表示粪肠球菌 (*Enterococcus faecium*); RS 表示茄科雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*); TC 表示总大肠菌群 total coliforms); PS 表示丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*); PA 表示成团泛菌 (*Pantoea agglomerans*); FB 表示粪拟杆菌 (fecal bacteroidetes)

值、孔隙度和有机质含量增加. 有研究表明酒糟中含有的有机酸能够中和盐碱土中的氢氧根离子而降低土壤 pH 值, 使其在碱性土壤改良方面具有显著的效果^[42]. 添加酒糟处理能显著增加再生水灌溉根际土壤总氮和总磷含量. 有研究发现施用酒糟增加了土壤微生物生物量, 其有机质矿化增加了土壤 NO_3^- -N 含量^[43]. 也有报道指出酒糟处理会增加土壤氮及交换性 Na^+ 、 K^+ 和有效 Mn 的含量^[44]. 针对不同土壤改良剂对土壤物化性质的负面效应研究还有待进一步探讨.

3.2 土壤改良剂对根际土壤细菌群落多样性变化特征的影响

再生水灌溉对土壤、水源和公共卫生影响的严重程度不仅与水质有关, 还取决于土壤性质、植物种类、气候、灌溉类型和农业管理实践等, 应采取风险防控措施来缓解其负面影响. 施用土壤改良剂是农艺调控措施的重要手段, 在改善土壤结构、提高土壤养分、增加微生物多样性以及降低土壤环境危害等方面表现出巨大潜力. 施用土壤改良剂对再生水灌溉根际土壤微生物群落重塑作用缺乏系统研究, 生物信息学方法为拓展认识根际土壤微生物群落结构和多样性提供了分析手段. 通过细菌群落相对丰度分析, 各处理在门水平上的核心菌群组成相似, 变形菌门 (Proteobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、放线菌门 (Actinobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi) 和酸杆菌门 (Acidobacteria) 是共有的优势菌群. 门水平上, 各处理间细菌菌群组成与相对丰度变化较小. 属水平上再生水灌溉优势菌属 *Pseudomonas*、*Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*、*Sphingomonas*、*Lysobacter*、*Algoriphagus*、*Muricauda* 和 *Nocardioides* 的相对丰度增加, *Streptomyces* 和一些未分类菌群降低为非优势菌属. 再生水灌溉可显著增加土壤中 Acidobacteria 和 Planctomycetes 的相对丰度, 降低 Firmicutes 和 Tectomicrobia 的相对丰度, 菌群结构主要受 TN、TP、DOC 和 Eh 影响^[45]. 再生水灌溉可引起土壤环境因子的变化, 进而影响微生物群落结构和多样性. 有研究发现, 在半干旱土壤中长期利用再生水灌溉可以促进土壤微生物群落的活性, 土壤微生物的代谢效率及总水解酶和磷酸酶的活性显著提高^[46,47]. 土壤改良剂处理下优势菌群的丰度变化也各有不同, 低丰度物种组成有所差异, 其中添加松土精和玉米酒糟处理的影响作用更加显著. 施用生物质炭为根际土壤生境提供了足够的养分, 为微生物繁殖生长营造了适宜环境. 生物质炭配施有机肥处理显著提高了土壤放线菌、革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌

相对丰度, 施用生物有机肥会提高土壤芽孢杆菌和硝化螺菌相对丰度促进土壤硝化过程^[48,49]. 有研究发现, 添加生物质炭对土壤细菌丰富度影响不大, 而添加酒糟处理则使土壤细菌丰富度显著增加^[50]. 有研究发现, 添加松土精处理能提高土壤耕层细菌物种多样性和丰富度, 降低 Proteobacteria 和 Acidobacteria 的相对丰度, 增加 Actinobacteria 和 Chloroflexi 的相对丰度, 这与本研究的结果较一致^[41]. 土壤微生物群落对土壤养分循环和土壤结构维持具有重要作用, 生物有机肥调控土壤微生物群落的稳定. 生物有机肥可显著影响变形菌门和放线菌门的相对丰度, 通过调控土壤微生物群落来提高土壤的抑病能力^[51]. 腐植酸不仅可以改善土壤结构和提高作物产量, 还能有效抑制土传病菌对作物根部的侵袭^[13,16]. 各处理组间的优势菌属相似, 包括潜在的病原菌属、有益菌属和功能菌属. 假单胞菌属是根际土壤中重要的优势菌属, 具有促生、固氮和生物防治等功能特性, 其中的一些种类也是常见的植物病原菌. 再生水灌溉导致假单胞菌属在根际显著富集, 经玉米酒糟处理后可显著降低其相对丰度. 施用土壤改良剂使 *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*、*Cellvibrio*、*Bacillus* 和 *Nocardioides* 等有益菌属的相对丰度升高. 土壤细菌群落的重塑主要取决于土壤理化性质, 而土壤理化性质又受土壤改良剂的调控. 因此, 本研究中探讨的土壤性质、土壤改良剂与土壤微生物组成之间的联系, 为再生水灌溉农艺管控措施和调控策略的可行性提供了理论依据.

3.3 土壤改良剂对根际土壤特定基因丰度变化的影响

本研究在明确选用的土壤改良剂对土壤理化性质影响的基础上, 探讨再生水灌溉根际土壤功能菌群、病原菌和抗生素抗性基因丰度对施用不同土壤改良剂的响应变化. 有研究发现, 添加生物质炭会增加土壤养分, 并促进碱性环境形成, 从而降低了 AOA 菌群丰度^[52]. 另有研究表明施用生物有机肥可显著增加 AOB 丰度, 但对 AOA 丰度的影响并不显著^[53]. 董莲华等^[54]报道添加腐植酸可抑制土壤中 AOA 数量而调控其与植物竞争氨来减少氨的损失, 从而提高尿素利用率. 本研究的结果显示添加松土精和玉米酒糟处理使再生水滴灌根际土壤中 AOA 菌群丰度及碱性磷酸酶活性显著增加, 而其他改良剂处理对功能菌群的影响并不显著. 污水厂处理工艺可以有效去除大多数病原菌和抗生素抗性基因, 但是对于一些抗逆性强的种类去除效果不太理想, 因此再生水回用的潜在生物风险需要给予高度

重视. 2020 年 5 月欧盟发布了关于再生水回用最低质量要求 (minimum quality requirements, MQR) 的新法规, 明确再生水用于农业灌溉不仅要建立先进的消毒处理设施, 还要维护配送和储存系统^[55]. 滴灌是再生水最适宜的灌溉方式之一, 但再生水中病原菌易在根区环境定植并累积, 对农业环境与人类健康构成潜在危害. 弓形菌 (*Arcobacter*) 为变形菌门 (Proteobacteria) ϵ -变形菌纲 (ϵ -Proteobacteria) 弯曲菌目 (Campylobacterales) 弯曲菌科 (Campylobacteraceae) 的一个新属, 其中的嗜低温弓形菌 (*A. cryaerophilus*)、布氏弓形菌 (*A. butzleri*) 和斯氏弓形菌 (*A. skirrowii*) 被认为是人畜共患的新型食源性和水源性病原菌, 可通过水体媒介引起肠道疾病与菌血症等^[56, 57]. 添加玉米酒糟处理下布氏弓形菌、蜡样芽孢杆菌和丁香假单胞菌在根际土壤中显著富集, 而降低了茄科雷尔氏菌和大肠菌群的丰度. 植物病原可能存在于根际, 易导致作物减产和土壤传播疾病流行. 腐植酸由脂肪族和芳香族有机酸组成, 添加到土壤中可以直接或间接影响植物和根际环境的生理生化过程, 已有研究证实腐植酸在控制镰孢菌引起的植物枯萎病方面作用显著^[58]. 腐植酸处理显著降低了植物病原菌丁香假单胞菌的丰度. 细菌性青枯病是由茄科雷尔氏菌引起的一种危害多种农作物生产的常见土传植物病害, 有文献报道生物有机肥可通过影响青枯病菌群落组成和减少其种群数量来有效抑制青枯病^[59]. 尽管再生水灌溉没有显著增加土壤中茄科雷尔氏菌丰度, 但添加玉米酒糟处理对茄科雷尔氏菌有一定的阻控效果. 再生水作为抗生素抗性基因的一个重要储库, 尤其是再生水输入点和回用点观察到 ARGs 再生长可能导致土壤中其丰度增加. 再生水灌溉会导致 ARGs 持续释放到农业环境中对人类健康造成潜在风险, 这归因于与人类相关的易感致病菌可以通过获得抗性基因而产生抗性. 一项长期的田间试验研究表明, 再生水灌溉土壤中没有观察到 *sul1*、*sul2*、*tetO*、*ermB* 和 *ermF* 丰度增加^[60]. 再生水灌溉根际土壤抗生素抗性基因丰度变化随不同土壤改良剂的添加呈现较大差异. Liu 等^[61]首次证实溶解性生物炭中的腐植酸类物质可以显著提高 ARGs 在细菌之间的转移效率, 因此生物炭使用时应考虑其溶解的生物效应以降低生态和人类健康风险. Zhang 等^[62]的研究发现天然沸石可以降低污泥堆肥中 ARGs 的环境风险, 这可能与多孔隙结构和降低重金属选择压力的能力有关. 有机肥的施用增加了可移动遗传元件的丰度, 其与大多数 ARGs 呈显著正相关, 表明水平基因转移可能通过可移动遗传元件促进 ARGs 在土壤

细菌中传播^[63]. 施用土壤改良剂显著改变了土壤微生物群落, 这被认为是影响土壤 ARGs 分布的主要因素. *int11* 基因与 *tetW* 和 *sul2* 基因的检出丰度之间有显著正相关关系, 可能促进此类 ARGs 的水平转移. 玉米酒糟对病原菌和 ARGs 丰度的影响尚未有研究, 研究表明添加酒糟处理显著增加了大多数病原菌和 ARGs 在根际土壤中的丰度, 推测可能是其营造的酸性环境及本身大量含氧官能团为污染物提供了吸附位点. 添加松土精和玉米酒糟处理导致抗生素抗性基因富集的作用机制尚不清楚, 其与化肥的配施和混施还有待进一步探讨.

4 结论

(1) 再生水滴灌条件下生物有机肥、腐植酸、松土精和玉米酒糟处理能够显著降低根际土壤 pH; 土壤改良剂处理下根际土壤 EC 值均有不同程度增加, 生物有机肥和松土精处理 EC 值增加显著; 生物质炭处理显著提高有机质和总氮含量; 生物有机肥显著增加了根际土壤有机质含量, 而玉米酒糟提高了总氮和总磷含量. 可见, 土壤理化性质变化与土壤改良剂类型密切相关.

(2) 添加改良剂可通过改善土壤理化性质而影响土壤细菌群落结构与多样性. 不同土壤改良剂处理下根际土壤细菌物种丰富度无显著变化, 玉米酒糟处理增加了细菌群落多样性. 各处理间纲、属分类水平菌群组成相似, 纲水平优势菌群为: γ -Proteobacteria、 α -Proteobacteria、Bacteroidetes、Actinobacteria、Anaerolineae、Acidimicrobiia 和 Gemmatimonadetes, 优势菌属包括: *Pseudomonas*、*Sphingobium*、*Sphingomonas*、*Cellvibrio*、*Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium*、*Streptomyces* 和 *Flavobacterium*. 土壤 OM、TN 和 TP 含量变化是显著影响再生水灌溉根际土壤细菌菌群组成与多样性的关键因子. 相关性 Heatmap 图分析表明, 土壤 pH、EC、TN 和 TP 与优势菌属 *Pseudomonas*、*Hydrogenophaga*、*Devosia*、*Nocardioideis*、*Streptomyces* 和 *Microbacterium* 呈显著相关.

(3) 本研究表明, 添加玉米酒糟处理对功能菌群、病原菌和抗生素抗性基因丰度的影响较其他处理更显著. 与其他处理相比, 添加松土精处理下 *tetA*、*tetX*、*sul1* 和 *int11* 丰度显著增加, 添加玉米酒糟处理能够显著提高 *Arcobacter butzleri*、*Bacillus cereus*、*Pseudomonas syringae*、*tetA*、*tetB*、*tetX*、*ermB*、*ermC* 和 *sul2* 丰度. 土壤改良剂通过改变土壤理化性质影响根际土壤病原菌和抗生素抗性基因的丰度分

布,不当地施用土壤改良剂可能增加农业环境病原菌和抗生素抗性基因富集与传播的风险,土壤改良剂在农业生产实践中的影响因素也还需进一步验证。

参考文献:

- [1] 国家发展改革委,科技部,工业和信息化部,等. 关于推进污水资源化利用的指导意见[EB/OL]. https://www.ndrc.gov.cn/xwtd/tzgg/202101/t20210111_1264795.html?code=&state=123, 2021-01-11.
- [2] 郑锦涛,马涛,刘九夫,等. 基于 RDA-REM 模型的我国再生水开发利用潜力[J]. 环境科学, 2021, **42**(6): 2758-2768.
Zheng J T, Ma T, Liu J F, et al. China's reuse water development and utilization potential based on the RDA-REM model[J]. Environmental Science, 2021, **42**(6): 2758-2768.
- [3] 胡雅琪,吴文勇. 中国农业非常规水资源灌溉现状与发展策略[J]. 中国工程科学, 2018, **20**(5): 69-76.
Hu Y Q, Wu W Y. Review and development strategy of irrigation with unconventional water resources in China[J]. Engineering Science, 2018, **20**(5): 69-76.
- [4] Bastida F, Torres I F, Abadía J, et al. Comparing the impacts of drip irrigation by freshwater and reclaimed wastewater on the soil microbial community of two citrus species[J]. Agricultural Water Management, 2018, **203**: 53-62.
- [5] Pei L, Xiao J G, Sun L Y. The effects of reclaimed water irrigation on the soil characteristics and microbial populations of plant rhizosphere [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2022, **29**(12): 17570-17579.
- [6] 王宇,刘春成,李仁杰,等. 土壤酶活性对微咸水与再生水混合滴灌的响应与评估[J]. 排灌机械工程学报, 2022, doi: 10.3969/j.issn.1674-8530.21.0164.
Wang Y, Liu C C, Li R J, et al. Evaluation and effect of mixed irrigation of brackish water and reclaimed water on soil enzyme activity [J]. Journal of Drainage and Irrigation Machinery Engineering, 2022, doi: 10.3969/j.issn.1674-8530.21.0164.
- [7] Wang F H, Qiao M, Lv Z E, et al. Impact of reclaimed water irrigation on antibiotic resistance in public parks, Beijing, China [J]. Environmental Pollution, 2014, **184**: 247-253.
- [8] Duan M L, Li H C, Gu J, et al. Effects of biochar on reducing the abundance of oxytetracycline, antibiotic resistance genes, and human pathogenic bacteria in soil and lettuce[J]. Environmental Pollution, 2017, **224**: 787-795.
- [9] 崔二革,崔丙健,刘源,等. 生物炭对非常规水源灌溉下土壤-作物病原菌的影响[J]. 中国环境科学, 2020, **40**(3): 1203-1212.
Cui E P, Cui B J, Liu Y, et al. Effects of biochar supplementation on the behavior of pathogens in soil-plant system under unconventional water resources irrigation [J]. China Environmental Science, 2020, **40**(3): 1203-1212.
- [10] 张桂香,赵志华,韩志旺,等. 生物炭对农田土壤中抗生素消减和潜在风险的影响[J]. 环境科学学报, 2021, **41**(6): 2369-2378.
Zhang G X, Zhao Z H, Han Z W, et al. Effects of biochars on the dissipation and potential risk of antibiotics in an agricultural soil[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2021, **41**(6): 2369-2378.
- [11] Jaiswal A K, Frenkel O, Elad Y, et al. Non-monotonic influence of biochar dose on bean seedling growth and susceptibility to *Rhizoctonia solani*: the "Shifted R_{max}-Effect" [J]. Plant and Soil, 2015, **395**(1-2): 125-140.
- [12] Wang L, Li J, Yang F, et al. Application of bioorganic fertilizer significantly increased apple yields and shaped bacterial community structure in orchard soil [J]. Microbial Ecology, 2017, **73**(2): 404-416.
- [13] Yildirim E. Foliar and soil fertilization of humic acid affect productivity and quality of tomato [J]. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science, 2007, **57**(2): 182-186.
- [14] Xue C, Shen Z Z, Hao Y W, et al. Fumigation coupled with bio-organic fertilizer for the suppression of watermelon *Fusarium* wilt disease re-shapes the soil microbiome [J]. Applied Soil Ecology, 2019, **140**: 49-56.
- [15] Gu Y A, Hou Y G, Huang D P, et al. Application of biochar reduces *Ralstonia solanacearum* infection via effects on pathogen chemotaxis, swarming motility, and root exudate adsorption[J]. Plant and Soil, 2017, **415**(1-2): 269-281.
- [16] Abdel-Monaim M F, Abdel-Gaid M A, El-Morsy M E M A. Efficacy of rhizobacteria and humic acid for controlling *Fusarium* wilt disease and improvement of plant growth, quantitative and qualitative parameters in tomato [J]. International Journal of Phytopathology, 2012, **1**(1): 39-48.
- [17] 张猛,曹国璠,李金玲,等. 土壤改良剂对连作白术的品质、发病率及根部土壤酶活性的影响[J]. 中药材, 2021, **44**(4): 793-797.
- [18] 程佳丽,袁月,肖霄,等. 白酒酒糟生物炭的性质及对土壤无机磷释放的影响[J]. 化学研究与应用, 2021, **33**(5): 961-968.
Cheng J L, Yuan Y, Xiao X, et al. Characteristics and effects of biochar derived from distiller grains on the release of inorganic phosphorous in soil [J]. Chemical Research and Application, 2021, **33**(5): 961-968.
- [19] Mori H, Maruyama F, Kato H, et al. Design and experimental application of a novel non-degenerate universal primer set that amplifies prokaryotic 16S rRNA genes with a low possibility to amplify eukaryotic rRNA genes [J]. DNA Research, 2014, **21**(2): 217-227.
- [20] Francis C A, Roberts K J, Beman J M, et al. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, **102**(41): 14683-14688.
- [21] Rothauwe J H, Witzel K P, Liesack W. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, **63**(12): 4704-4712.
- [22] Rösch C, Mergel A, Bothe H. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, **68**(8): 3818-3829.
- [23] Reed K E. Restriction enzyme mapping of bacterial urease genes: using degenerate primers to expand experimental outcomes [J]. Biochemistry and Molecular Biology Education, 2001, **29**(6): 239-244.
- [24] Sakurai M, Wasaki J, Tomizawa Y, et al. Analysis of bacterial communities on alkaline phosphatase genes in soil supplied with organic matter [J]. Soil Science & Plant Nutrition, 2008, **54**(1): 62-71.
- [25] Brightwell G, Mowat E, Clemens R, et al. Development of a multiplex and real time PCR assay for the specific detection of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* [J]. Journal of

- Microbiological Methods, 2007, **68**(2): 318-325.
- [26] Wang R F, Cao W W, Cerniglia C E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods[J]. Journal of Applied Microbiology, 1997, **83**(6): 727-736.
- [27] Scott T M, Jenkins T M, Lukasik J, *et al.* Potential use of a host associated molecular marker in *Enterococcus faecium* as an index of human fecal pollution [J]. Environmental Science & Technology, 2005, **39**(1): 283-287.
- [28] Brouwer M, Lievens B, Van Hemelrijck W, *et al.* Quantification of disease progression of several microbial pathogens on *Arabidopsis thaliana* using real-time fluorescence PCR[J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, **228**(2): 241-248.
- [29] Pastrik K H, Maiss E. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase chain reaction [J]. Journal of Phytopathology, 2010, **148**(11-12): 619-626.
- [30] Maheux A F, Boudreau D K, Bisson M A, *et al.* Molecular method for detection of total coliforms in drinking water samples [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, **80**(14): 4074-4084.
- [31] Soto-Muñoz L, Teixidó N, Usall J, *et al.* Detection and quantification by PCR assay of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2 on apples[J]. International Journal of Food Microbiology, 2014, **175**: 45-52.
- [32] Dick L K, Field K G. Rapid estimation of numbers of fecal *Bacteroidetes* by use of a quantitative PCR assay for 16S rRNA genes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, **70**(9): 5695-5697.
- [33] 崔二苹. 生物质炭对粪肥堆肥过程中抗生素抗性基因行为特征的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
Cui E P. The effect of biochar addition on antibiotic resistance genes during manure composting [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.
- [34] 薛彦东, 杨培岭, 任树梅, 等. 再生水灌溉对土壤主要盐分离子的分布特征及盐碱化的影响[J]. 水土保持学报, 2012, **26**(2): 234-240.
Xue Y D, Yang P L, Ren S M, *et al.* Effects of treated wastewater irrigation strategies on the distribution of salt contents in soils cultivated with tomato and cucumber[J]. Journal of Soil and Water Conservation, 2012, **26**(2): 234-240.
- [35] 刘源, 崔二苹, 李中阳, 等. 再生水和养殖废水灌溉下生物质炭和果胶对土壤盐碱化的影响[J]. 灌溉排水学报, 2018, **37**(6): 16-23.
Liu Y, Cui E P, Li Z Y, *et al.* Effects of irrigating biochar-and pectin-amended soil with treated municipal wastewater and swine wastewater on soil salinity and sodicity[J]. Journal of Irrigation and Drainage, 2018, **37**(6): 16-23.
- [36] 裴亮, 张体彬, 陈永莲, 等. 农村生活污水再生水滴灌对根际土壤特性的影响研究[J]. 灌溉排水学报, 2012, **31**(4): 42-45.
Pei L, Zhang T B, Chen Y L, *et al.* Influence of reclaimed water drip irrigation with rural domestic sewage on soil peculiarity in rhizosphere[J]. Journal of Irrigation and Drainage, 2012, **31**(4): 42-45.
- [37] 袁金华, 徐仁扣. 生物质炭的性质及其对土壤环境功能影响的研究进展[J]. 生态环境学报, 2011, **20**(4): 779-785.
Yuan J H, Xu R K. Progress of the research on the properties of biochars and their influence on soil environmental functions[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2011, **20**(4): 779-785.
- [38] 卢再亮, 李九玉, 徐仁扣. 钢渣与生物质炭配合施用对红壤酸度的改良效果[J]. 土壤, 2013, **45**(4): 722-726.
Lu Z L, Li J Y, Xu R K. Amelioration effects of steel slag combined with biochar on red soil acidity[J]. Soils, 2013, **45**(4): 722-726.
- [39] 崔丙健, 崔二苹, 胡超, 等. 生物质炭施用对再生水灌溉空心菜根际微生物群落结构及多样性的影响[J]. 环境科学, 2020, **41**(12): 5636-5647.
Cui B J, Cui E P, Hu C, *et al.* Effects of selected biochars application on the microbial community structures and diversities in the rhizosphere of water spinach (*Ipomoea aquatica* Forssk.) irrigated with reclaimed water [J]. Environmental Science, 2020, **41**(12): 5636-5647.
- [40] 王俊红, 王星琳, 王康, 等. 生物有机肥替代化肥对小麦根际土壤环境的影响[J]. 华北农学报, 2021, **36**(4): 155-162.
Wang J H, Wang X L, Wang K, *et al.* Effects of replacing chemical fertilizers with bio-organic fertilizers on microenvironment of wheat rhizosphere soil [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2021, **36**(4): 155-162.
- [41] 罗俊, 林兆里, 李诗燕, 等. 不同土壤改良措施对机械压实酸化蔗地土壤理化性质及微生物群落结构的影响[J]. 作物学报, 2020, **46**(4): 596-613.
Luo J, Lin Z L, Li S Y, *et al.* Effects of different soil improvement measures on soil physicochemical properties and microbial community structures in mechanically compacted acidified sugarcane field[J]. Acta Agronomica Sinica, 2020, **46**(4): 596-613.
- [42] 潘保原, 曹越. 不同剂量的酒糟对盐碱土壤改良的作用[J]. 环境科学与管理, 2009, **34**(10): 135-137.
Pan B Y, Cao Y. Effect of different doses of lees on salinized soil [J]. Environmental Science and Management, 2009, **34**(10): 135-137.
- [43] Tejada M, Gonzalez J L. Beet vinasse applied to wheat under dryland conditions affects soil properties and yield[J]. European Journal of Agronomy, 2005, **23**(4): 336-347.
- [44] Gemtos T A, Chouliaras N, Marakis S. Vinasse rate, time of application and compaction effect on soil properties and durum wheat crop[J]. Journal of Agricultural Engineering Research, 1999, **73**(3): 283-296.
- [45] 王燕, 程东会, 檀文炳, 等. 土壤微生物群落结构对生活源和工业源再生水灌溉的差异化响应[J]. 环境科学, 2020, **41**(9): 4253-4261.
Wang Y, Cheng D H, Tan W B, *et al.* Different responses of soil microbial community structure to irrigation with treated wastewater from domestic and industrial sources [J]. Environmental Science, 2020, **41**(9): 4253-4261.
- [46] García-Orenes F, Caravaca F, Morugán-Coronado A, *et al.* Prolonged irrigation with municipal wastewater promotes a persistent and active soil microbial community in a semiarid agroecosystem[J]. Agricultural Water Management, 2015, **149**: 115-122.
- [47] Meli S, Porto M, Belligno A, *et al.* Influence of irrigation with lagooned urban wastewater on chemical and microbiological soil parameters in a citrus orchard under Mediterranean condition [J]. Science of the Total Environment, 2002, **285**(1-3): 69-77.
- [48] 沈芳芳, 张哲, 袁颖红, 等. 生物质炭配施有机肥对旱地红壤酶活性及其微生物群落组成的影响[J]. 中国农学通报, 2021, **37**(18): 65-74.
Shen F F, Zhang Z, Yuan Y H, *et al.* Effects of biochar and organic manure combined application on soil enzyme activities and microbial community component in upland red soil [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2021, **37**(18): 65-74.

- [49] 杨亚红, 薛莉霞, 孙波, 等. 解淀粉芽孢杆菌生物有机肥防控土壤氨挥发[J]. 环境科学, 2020, **41**(10): 4711-4718.
Yang Y H, Xue L X, Sun B, *et al.* *Bacillus amyloliquefaciens* biofertilizer mitigating soil ammonia volatilization [J]. Environmental Science, 2020, **41**(10): 4711-4718.
- [50] 查康. 土壤改良剂对农田土壤理化性质及小麦生长的影响研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2018.
Zha K. Effects of soil conditioner on physical and chemical properties of farmland soil and wheat growth[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2018.
- [51] 杨天杰, 王玉鑫, 王佳宁, 等. 不同基质生物有机肥防控番茄土传青枯病及促生效果研究[J]. 土壤, 2021, **53**(5): 961-968.
Yang T J, Wang Y X, Wang J N, *et al.* Effects of different bioorganic fertilizers on tomato bacterial wilt and plant growth promotion[J]. Soils, 2021, **53**(5): 961-968.
- [52] He L L, Shan J, Zhao X, *et al.* Variable responses of nitrification and denitrification in a paddy soil to long-term biochar amendment and short-term biochar addition [J]. Chemosphere, 2019, **234**: 558-567.
- [53] Geng Y J, Yuan Y M, Miao Y C, *et al.* Decreased nitrous oxide emissions associated with functional microbial genes under bio-organic fertilizer application in vegetable fields[J]. Pedosphere, 2021, **31**(2): 279-288.
- [54] 董莲华, 李宝珍, 袁红莉, 等. 褐煤腐植酸对土壤氨氧化古菌群落结构的影响[J]. 微生物学报, 2010, **50**(6): 780-787.
Dong L H, Li B Z, Yuan H L, *et al.* Effect of lignite humic acid on soil ammonia oxidizing archaea community [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, **50**(6): 780-787.
- [55] Truchado P, Gil M I, López C, *et al.* New standards at European Union level on water reuse for agricultural irrigation: are the Spanish wastewater treatment plants ready to produce and distribute reclaimed water within the minimum quality requirements? [J]. International Journal of Food Microbiology, 2021, **356**, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109352.
- [56] Houf K, Stephan R. Isolation and characterization of the emerging foodborn pathogen *Arcobacter* from human stool [J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, **68**(2): 408-413.
- [57] Ho H T K, Lipman L J A, Gaastra W. *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent! [J]. Veterinary Microbiology, 2006, **115**(1-3): 1-13.
- [58] Yigit F, Dikilitas M. Effect of humic acid applications on the root-rot diseases caused by *Fusarium* spp. on tomato plants[J]. Plant Pathology Journal, 2008, **7**(2): 179-182.
- [59] Wu K, Yuan S F, Wang L L, *et al.* Effects of bio-organic fertilizer plus soil amendment on the control of tobacco bacterial wilt and composition of soil bacterial communities[J]. Biology and Fertility of Soils, 2014, **50**(6): 961-971.
- [60] Negreanu Y, Pasternak Z, Jurkevitch E, *et al.* Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in agricultural soils [J]. Environmental Science & Technology, 2012, **46**(9): 4800-4808.
- [61] Liu X M, Wang D, Tang J C, *et al.* Effect of dissolved biochar on the transfer of antibiotic resistance genes between bacteria [J]. Environmental Pollution, 2021, **288**, doi: 10.1016/j.envpol.2021.117718.
- [62] Zhang J Y, Chen M X, Sui Q W, *et al.* Impacts of addition of natural zeolite or a nitrification inhibitor on antibiotic resistance genes during sludge composting[J]. Water Research, 2016, **91**: 339-349.
- [63] Wang F H, Han W X, Chen S M, *et al.* Fifteen-year application of manure and chemical fertilizers differently impacts soil ARGs and microbial community structure [J]. Frontiers in Microbiology, 2020, **11**, doi: 10.3389/fmicb.2020.00062.

CONTENTS

Regionalization and Analysis of PM _{2.5} and O ₃ Synergetic Prevention and Control Areas Based on Remote Sensing Data	LI Shen-xin, ZOU Bin, ZHANG Feng-ying, <i>et al.</i> (4293)
Analysis of a Typical Ozone Pollution Process in Guangzhou in Winter	PEI Cheng-lei, XIE Yu-tong, CHEN Xi, <i>et al.</i> (4305)
Establishment and Application of Foshan Ozone Concentration Forecast Equation	CHEN Chen, HONG Ying-ying, TAN Hao-bo, <i>et al.</i> (4316)
Establishment of High-Resolution Emissions Inventory in Wuhan and Its Application in Exploring the Causes of Ozone Pollution	ZHANG Rui-xin, CHU Bo, SHANG Chun-lin, <i>et al.</i> (4327)
Investigating the Pollutants of Marine Shipping Emissions Along the East China Sea by Combining in-situ Measurements and Automatic Identification System QIU Hao, LIU Dan-tong, WU Yang-zhou, <i>et al.</i> (4338)
Chemical Component of Particulate Matters and VOCs Characteristics During Vehicle Brake Processes	MEN Zheng-yu, LIU Du-you, GUO Quan-you, <i>et al.</i> (4348)
Characterization of VOCs Emissions from Caged Broiler House in Winter	CAO Tian-tian, ZHENG Yun-hao, ZHANG Yu, <i>et al.</i> (4357)
Concentrations and Community Structures of Culturable Bacteria in Aerosols of Household Garbage Stations in Shanghai	LU Bing-jie, ZHANG Xiang, WANG Chuan, <i>et al.</i> (4367)
Inventory and Distribution Characteristics of Anthropogenic Ammonia Emissions in Zhejiang Province from 2008 to 2018	FANG Li-jiang, YANG Yi-qun, YE Guan-qiong (4380)
Roadmap of Coal Control and Carbon Reduction in the Steel Industry Under the Carbon Peak and Neutralization Target	XUE Ying-lan, ZHANG Jing, LIU Yu, <i>et al.</i> (4392)
Carbon Emission Reduction Effect of Spatial Correlation Network Structure Characteristics: From the Perspective of Urban Agglomeration	ZHENG Hang, YE A-zhong (4401)
Pollution and Carbon Reduction Effect of OFDI in China and Its Mechanism	BAI Zi-han, LÜ Lian-hong, ZHAO Ming-xuan, <i>et al.</i> (4408)
Variation Characteristics of Surface Water Quality in China in Recent Years	JI Xiao-yan, HOU Huan-huan, WANG Shan-shan, <i>et al.</i> (4419)
Distribution, Risk, and Influencing Factors of Microplastics in Surface Water of Huangshui River Basin	FAN Meng-yuan, HUANG Yi-mei, ZHANG Hai-xin, <i>et al.</i> (4430)
Hydrochemical and Isotopic Characteristics in the Surface Water of the Fenhe River Basin and Influence Factors	ZHAO Chun-hong, SHEN Hao-yong, WANG Zhi-heng, <i>et al.</i> (4440)
Characteristics and Causes of High-manganese Groundwater in Pearl River Delta During Urbanization	LÜ Xiao-li, LIU Jing-tao, HAN Zhan-tao, <i>et al.</i> (4449)
Characteristics and Causes of Groundwater Salinization in the Plain Area of the Lower Kashgar River	LU Han, ZENG Yan-yan, ZHOU Jin-long, <i>et al.</i> (4459)
Sources and Biogeochemical Processes of Nitrate in the Laolongdong Karst Underground River Basin, Chongqing	WANG Yu-yang, YANG Ping-heng, ZHANG Jie-ru (4470)
Succession Pattern and Consequences of the Dominant Species During Cyanobacterial Bloom and Its Influencing Factors	OUYANG Tian, ZHAO Lu, Ji Lu-lu, <i>et al.</i> (4480)
Structural Characteristics of Phytoplankton Communities and Its Relationship with Environmental Factors in a Group of Drinking Water Reservoirs by Water Transmission from Modaomen Waterway in Zhuhai	ZHANG Mo-li, WANG En-rui, CHANG Sheng, <i>et al.</i> (4489)
Effects of Nutrients on the Growth of <i>Microcystis aeruginosa</i> and Bacteria in the Phycosphere	LÜ Ping, LI Hui-li, XU Yong, <i>et al.</i> (4502)
Effect of Aging on Adsorption of Tetracycline by Microplastics and the Mechanisms	WANG Lin, WANG Shu-xin, ZENG Xiang-ying, <i>et al.</i> (4511)
Effect of Colloids in Sediment and Soil on Their Sorption Behavior of Chloramphenicol	YAN Cai-xia, LUO Yan-qing, NIE Ming-hua, <i>et al.</i> (4522)
Historical Antibiotic Stress Changed the Effects of Sulfamethoxazole and Trimethoprim on Activated Sludge; ARCs and Potential Hosts ZHANG Zhong-xing, FAN Xiao-yan, LI Xing, <i>et al.</i> (4536)
Spatial Distribution and Sources of Heavy Metals in Soil of a Typical Lead-Zinc Mining Area, Yangshuo	CHEN Meng, PAN Yong-xing, HUANG Yi-xiang, <i>et al.</i> (4545)
Distribution Characteristics and Ecological Risk Assessment of Soil Heavy Metals in Baiyangdian Lake	ZHENG Fei, GUO Xin, TANG Ming-yang, <i>et al.</i> (4556)
Spatial Differentiation and Influencing Factor Analysis of Soil Heavy Metal Content at Town Level Based on Geographic Detector	GONG Cang, WANG Liang, WANG Shun-xiang, <i>et al.</i> (4566)
Heavy Metal Emissions from Coal-fired Power Plants and Heavy Metal Pollution Characteristics and Health Risks in Surrounding Soils CHE Kai, CHEN Chong-ming, ZHENG Qing-yu, <i>et al.</i> (4578)
Enrichment Factors, Health Risk, and Source Identification of Heavy Metals in Agricultural Soils in Semi-arid Region of Hainan Island YANG Jian-zhou, GONG Jing-jing, WANG Zhen-liang, <i>et al.</i> (4590)
Speciation and Pollution Assessment of Heavy Metals in Mangrove Surface Sediments in Jiulong River Estuary	ZHANG Hua-lan, YU Rui-lian, WAN Rui-an, <i>et al.</i> (4601)
Status of Heavy Metal in Organic Fertilizers in Main Tea Growing Regions of China	YI Xiao-yun, FANG Li, YANG Xiang-de, <i>et al.</i> (4613)
Accumulation Characteristics and Sources of PAEs in Agricultural Soils in Gansu Province	CHEN Yu-yu, ZHANG Guang-quan, ZHANG Yang, <i>et al.</i> (4622)
Distribution Characteristics of Soil Phosphorus Forms and Phosphatase Activity at Different Altitudes in the Soil of Water-Level-Fluctuation Zone in Pengxi River, Three Gorges Reservoir GAO Yi-lun, FANG Fang, TANG Zi-chao, <i>et al.</i> (4630)
Characteristics of Soil Organic Carbon Components and Their Correlation with Other Soil Physical and Chemical Factors in Cotton Fields with Different Continuous Cropping Years in the Oasis on the Northern Edge of Tarim Basin	LI Xin-zhu, GONG Lu, TANG Jun-hu, <i>et al.</i> (4639)
Response of Soil Respiration Rates to Soil Temperature and Moisture at Different Soil Depths of <i>Caragana korshinskii</i> Plantation in the Loess-Hilly Region SUN Ya-rong, WANG Ya-juan, ZHAO Min, <i>et al.</i> (4648)
Influence of Biochar Application on Soil Nitrate Leaching and Phosphate Retention: A Synthetic Meta-analysis	JIANG Zhi-xiang, CUI Shuang, ZHANG Xin, <i>et al.</i> (4658)
Role and Mechanism of Low Molecular-Weight-Organic Acids in Enhanced Phytoremediation of Heavy Metal Contaminated Soil	FANG Zhi-guo, XIE Jun-ting, YANG Qing, <i>et al.</i> (4669)
Remediation Effect and Mechanism of Inorganic Passivators on Cadmium Contaminated Acidic Paddy Soil	ZHANG Jian, KONG Fan-yi, LU Sheng-gao (4679)
Mechanism of Lead-zinc Enrichment and Resistance of Spent Mushroom Compost to Lead-Zinc Slag in <i>Koeleruteria paniculata</i>	XIE Tian-zhi, CHEN Yong-hua, SU Rong-kui, <i>et al.</i> (4687)
Phosphorus Enrichment Efficiency of CaO ₂ @FA Composites and the Effect of Its Recovered Material on Soil Improvement	YUE Wei, LI Da-peng, WU Ling-yu, <i>et al.</i> (4697)
Effects of Early Rice Straw Returning with Reducing Potassium Fertilizer on Late Rice Yield and Soil Fertility	HUANG Qiao-yi, HUANG Jian-feng, HUANG Xu, <i>et al.</i> (4706)
Effects of Continuous Straw Returning with Chemical Fertilizer on the Carbon Pool and Crop Yield of Rice-Rape Rotation Soils	CAI Ying, FU Si-wei, ZHANG Bo-rui, <i>et al.</i> (4716)
Effects of Chemical Fertilizer Reduction Combined with Straw Application on Diazotrophic Communities in a Double Rice Cropping System CHEN Kai-peng, WEI Ju-xian, CHEN Dan, <i>et al.</i> (4725)
Impacts of Co-application of Chemical Fertilizer Reduction and Organic Material Amendment on Fluvo-aquic Soil Microbial N-cycling Functional Gene Abundances and N-converting Genetic Potentials in Northern China	LI Sheng-jun, HU He, LI Gang, <i>et al.</i> (4735)
Response Characteristics of Soil Microbial Community Under Long-term Film Mulching	HU Zhi-e, XIAO Mou-liang, DING Ji-na, <i>et al.</i> (4745)
Effects of Long-term Straw Returning on Fungal Community, Enzyme Activity and Wheat Yield in Fluvo-aquic Soil	MA Lei, LI Yan, WEI Jian-lin, <i>et al.</i> (4755)
Effects of Soil Amendments on the Bacterial Diversity and Abundances of Pathogens and Antibiotic Resistance Genes in Rhizosphere Soil Under Drip Irrigation with Reclaimed Water CUI Bing-jian, CUI Er-ping, LIU Chun-cheng, <i>et al.</i> (4765)
Effect of Nitrogen on the Phytoremediation of Cd-PAHs Co-contaminated Dumpsite Soil by Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.) and on the Soil Bacterial Community Structure LI Yi-jia, MA Jun-wei, LI Yu-qian, <i>et al.</i> (4779)
Effect of Antibiotic-Degrading Bacteria on Maturity and Bacterial Community Succession During Pig Manure Composting	LI Wei-lin, ZHANG Xin, MA Jun-wei, <i>et al.</i> (4789)