

邹勇, 黄蔚虹, 陈永杰, 等. 金霉素胁迫下室内粪土模型中菌群多样性与四环素类抗生素耐药基因丰度研究[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(5): 65-73.

# 金霉素胁迫下室内粪土模型中菌群多样性与四环素类抗生素耐药基因丰度研究

邹勇<sup>†</sup>, 黄蔚虹<sup>†</sup>, 陈永杰, 冯慧君, 李金红, 任海鑫, 孙永学

(国家兽药安全评价(环境评估)实验室/广东省兽药研制与安全评价重点实验室/华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

**摘要:**【目的】探究金霉素在粪土环境中对土壤微生物群落结构多样性和四环素类耐药基因 (TRG) 丰度的影响。【方法】分别设置金霉素质量 0(对照)、10、100、1 000  $\mu\text{g}$  作为胁迫剂量, 在处理后的第 1、7、14、28、56 天采集样品, 使用高通量测序和 qPCR 技术研究群落结构多样性和 TRG 丰度的变化。【结果】厚壁菌门能耐受低剂量 (10  $\mu\text{g}$ ) 金霉素的毒害作用, 对中、高剂量 (100、1 000  $\mu\text{g}$ ) 敏感; 放线菌门能耐受中、高剂量的毒害作用, 生存繁殖具有一定优势; 变形菌门的相对丰度除第 28 天各剂量组均显著低于对照组外, 其余时间多显著高于对照组。金霉素-猪粪-土壤模型样品中共检测出 3 种四环素类抗生素耐药基因 (TRGs): *tetO*、*tetT* 和 *tetW*, 3 个基因丰度变化趋势相似: 与第 1 天相比, 第 56 天各组 TRGs 相对含量均显著减少; 低剂量组 TRGs 相对含量的日消减率在 II 期高于对照组和中、高剂量组, 第 7 天 TRGs 相对含量显著高于对照组以及中、高剂量组; 中剂量组 TRGs 相对含量的日消减率在 IV 期低于其余组, 第 56 天 TRGs 相对含量显著高于其余组。【结论】在猪粪-土壤环境中, 不同菌群对金霉素敏感程度不同, 金霉素可改变优势菌群的相对丰度, 从而引起菌群群落结构的变化。金霉素可改变 TRGs 相对含量的日消减率, 从而影响 TRGs 相对含量。本研究可为下一步养殖源性抗菌药物残留的生态风险评估提供一定依据。

**关键词:** 金霉素; 菌群多样性; 四环素类抗生素; 耐药基因; 丰度; 日消减率

中图分类号: Q89

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2018)05-0065-09

## Microbial community diversity and tetracycline resistance gene abundance in manure-soil model under chlortetracycline stress

ZOU Yong<sup>†</sup>, HUANG Weihong<sup>†</sup>, CHEN Yongjie, FENG Huijun, LI Jinhong, REN Haixin, SUN Yongxue  
(National Laboratory of Veterinary Drug Safety Evaluation (Environment Estimation)/Guangdong Provincial Key Laboratory for Veterinary Pharmaceutics Development and Safety Evaluation/College of Veterinary, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** 【Objective】To explore the effects of chlortetracycline on microflora diversity and tetracycline resistance gene (TRG) abundance in manure-soil environment. 【Method】Four different chlortetracycline dosages were adopted, including 0 (control), 10, 100, 1 000  $\mu\text{g}$ . Samples were collected on the 1st, 7th, 14th, 28th and 56th day. High-throughput sequencing and qPCR were utilized to investigate the changes of microbial community diversity and TRG abundance. 【Result】Firmicutes could tolerate toxic effect of 10  $\mu\text{g}$  chlortetracycline, and was sensitive to 100 and 1 000  $\mu\text{g}$  chlortetracycline. Actinobacteria could tolerate toxic effects of 100 and 1 000  $\mu\text{g}$  chlortetracycline, its survival and reproduction had some advantages. The relative abundances of proteobacteria in all chlortetracycline groups on the 28th day were significantly lower than that of

收稿日期: 2018-01-31 网络首发时间: 2018-07-09 17:50:06

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20180707.1635.034.html>

作者简介: 邹勇 (1993—), 男, 硕士研究生, E-mail: [zouyong8898@163.com](mailto:zouyong8898@163.com); 黄蔚虹 (1995—), 女, E-mail: [mishelle-cat@163.com](mailto:mishelle-cat@163.com); <sup>†</sup>对本文贡献相同; 通信作者: 孙永学 (1969—), 男, 教授, 博士, E-mail: [sunyx@scau.edu.cn](mailto:sunyx@scau.edu.cn)

基金项目: 广东省自然科学基金重点项目 (2016A030311029); 广东省大学生科技创新训练项目 (201610564119)

control group, and usually significantly higher than control group on other sampling dates. Three TRGs (*tetO*, *tetT* and *tetW*) were detected in chlortetracycline-manure-soil model, their changing trends of abundance were similar. Compared with the 1st day, the relative abundances in all groups on the 56th day decreased significantly. The day dissipation rates in 10  $\mu\text{g}$  chlortetracycline group were significantly higher than other groups in period II, while their relative abundances on the 7th day were significantly higher. The day dissipation rates in 100  $\mu\text{g}$  chlortetracycline groups were significantly lower than other groups in period IV, while the relative abundances on the 56th day were significantly higher. 【Conclusion】 In manure-soil environment, the sensitivity degrees of different bacterium communities to chlortetracycline stress were different, chlortetracycline can change microbial community composition by changing the relative abundances of dominant bacteria. Chlortetracycline stress can change the day dissipation rates of TRGs, thereby affect the relative abundances of TRGs. The results can provide a basis for further research on ecological risk evaluation of antibiotic residue in poultry raising.

**Key words:** chlortetracycline; microbial community diversity; tetracycline antibiotic; resistance gene; abundance; day dissipation rate

目前,我国养殖业每年抗生素的消耗量高达8万t,然而抗生素在动物体内并不能完全代谢,约60%~90%以原型或代谢产物的形式随粪尿排至环境中<sup>[1-2]</sup>。同时,我国作为世界第一养猪大国,每年可产生猪粪8.64亿t<sup>[3]</sup>,猪粪中残留量最大的抗生素为四环素类抗生素,占抗生素总残留量的73.5%<sup>[4]</sup>。金霉素属于四环素类抗生素,常作为饲料添加剂大量应用于畜禽养殖。调查福建省猪场附近耕地土壤中四环素类抗生素残留量,发现金霉素平均残留量最高,为55.6  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,检出率达75%<sup>[5]</sup>。残留在土壤中的四环素类抗生素会改变土壤微生物原有的群落结构,但牛粪可削弱四环素类抗生素的毒害作用<sup>[6]</sup>。相对于金霉素,四环素类抗生素耐药基因(Tetracycline resistance gene, TRG)是一种潜在危害更大的污染物。TRGs不仅能在细菌间通过质粒转移,而且在细菌死亡裂解被释放到外环境后仍能保持稳定继续传播<sup>[7]</sup>。土壤中的TRGs可能是土壤微生物自身携带,也可能是经畜禽粪便引入土壤中。在山东省9个猪场的TRGs相对含量检测中,土壤中TRGs相对含量为 $9.9\times 10^{-5}\sim 1.1\times 10^{-2}$ ,猪粪中TRGs相对含量为 $3.3\times 10^{-5}\sim 5.2\times 10^{-18}$ <sup>[8]</sup>。堆放或者作为肥料施用携带四环素类抗生素和TRGs的猪粪,是其进入土壤环境的主要途径。目前有关猪粪中残留的四环素类抗生素和TRGs影响土壤微生物的研究尚少且不够深入。

本研究以金霉素作为胁迫因子,构建室内粪土金霉素暴露胁迫模型,模拟金霉素残留给土壤微生物带来的生态毒性效应,利用高通量测序技术研究菌群群落结构多样性的变化,通过qPCR技术研究

TRGs相对含量的改变,为下一步养殖源性抗菌药物残留的生态风险评估提供一定依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

金霉素购自大连美仑生物技术有限公司,纯度(w)95%;10 $\times$ PCR Buffer、dNTP Mixture、rTaq DNA聚合酶和SYBR Premix Ex Taq II(宝生物染料法荧光定量试剂盒)等均由TaKaRa公司提供。猪粪采自广州市钟落潭镇某猪场(喂养的饲料不添加抗生素),土壤采自华南农业大学树木园无抗生素污染的5~20 cm表层,两者经检测均无抗生素残留。供试土壤为砂质粘壤土,pH 5.77、含水量(w)12.5%、总碳77  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、全氮660  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、总磷270  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

### 1.2 方法

1.2.1 金霉素-猪粪-土壤模型构建 土壤过2 mm筛后于黑暗条件下室温孵育7 d,猪粪于室温条件下平铺风干,粉碎过2 mm筛后置于-20  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。使用超纯水将金霉素配制成相应浓度的母液,并与猪粪、土壤充分混匀,分装到直径10 cm、高15 cm的棕色塑料花盆中,每个花盆土壤用量0.5 kg、猪粪用量10 g,设对照组和金霉素低、中、高剂量组,金霉素用量分别为0、10、100和1 000  $\mu\text{g}$ ,各组均设3次重复。各处理花盆置于25  $^{\circ}\text{C}$ 的室温条件下培养,每天定时浇超纯水,使土壤含水量为最大持水量的50%,每天光照时间为12 h。在处理第1、7、14、28和56天的20:00—21:00采集样品并置于-20  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。试验分4期: I期(第1~7天)、II期(第8~14天)、III期(第15~28天)和

IV期(第29~56天)。

1.2.2 TRGs 定性及定量检测 称取 0.9 g 样品,依据 E.Z.N.A<sup>®</sup>土壤 DNA 提取试剂盒 (Omega Biotek, 美国) 的方法提取总 DNA。PCR 反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 退火 30 s (温度见表 1),

72 °C 延伸 45 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min<sup>[9]</sup>。目标 TRGs 和 16S rDNA 的引物设计如表 1 所示。采用 25 μL 的 PCR 反应体系: ddH<sub>2</sub>O 18.375 μL、10×PCR Buffer 2.5 μL、dNTP Mixture 2 μL、上下游引物各 0.5 μL、DNA 模板 1 μL 和 rTaq DNA 聚合酶 0.125 μL。

表 1 目的基因引物信息  
Table 1 Primers of target genes

目的基因	引物序列(5'→3')	片段大小/bp	退火温度/°C	参考文献
<i>tetA</i>	F: GCTACATCCTGCTTGCCCTC R: CATAGATCGCCGTGAAGAGG	210	55/60	[11]
<i>tetB</i>	F: AAAACTTATTATATTATAGTG R: TGGAGTATCAATAATATTCAC	169	40/47	[12]
<i>tetT</i>	F: AAGGTTTATTATATAAAAAGTG R: AGGTGTATCTATGATATTTAC	167	45/40	[13]
<i>tetM</i>	F: ACAGAAAGCTTATTATATAAC R: TGGCGTGTCTATGATGTTTAC	171	45/57	[13]
<i>tetO</i>	F: ACGGARAGTTTATTGTATACC R: TGGCGTATCTATAATGTTGAC	171	60/60	[13]
<i>tetW</i>	F: GAGAGCCTGCTATATGCCAGC R: GGGCGTATCCACAATGTAAAC	168	60.5/60	[13]
16S rDNA	F: CCTACGGGAGGCAGCAG R: TTACCGCGGCTGCTGGCAC	193	58/58	[14]

经 PCR 产物回收、纯化、克隆、连接和质粒提取<sup>[10]</sup>, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

对测序合格的质粒进行纯度和浓度检测,  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$  在 1.8~2.0 之间, 说明所提取的 DNA 纯度较高。对质粒进行 10 倍梯度稀释, 计算质粒拷贝数, 做 qPCR 标准曲线。采用 20 μL 的 qPCR 反应体系: SYBR Premix Ex Taq II 10 μL、ddH<sub>2</sub>O 7.4 μL、上下游引物各 0.8 μL 和 DNA 模板 1 μL。每个样品设置 3 次重复, 在 LightCycler<sup>®</sup>96 实时荧光定量 PCR 仪 (Roche, 瑞士) 上反应。

1.2.3 高通量测序 将第 1、7、14、28、56 天的对照组和金霉素低、中、高剂量组中设置的 3 次重复样品混合, 提取 DNA, 送往金唯智广州公司测序。

### 1.3 数据分析

采用 ACE 和 Chao1 指数评估群落丰富度, Shannon 指数反映群落多样性。利用 SPSS 23.0 单因素方差分析对 TRGs 相对含量 (TRGs 相对含量=TRGs 基因拷贝数/16S rDNA 拷贝数) 进行差异显著性分析, Fisher's 精确检验进行菌群丰度差异显著性分析, SigmaPlot 进行图表绘制。TRGs 相对含量的日消减率 (Day dissipation rate, DDR) 计算公

式如下:

$$\text{DDR} = \frac{N_1 - N_2}{N_1 T} \times 100\%,$$

式中,  $T$  为相邻 2 个采样时间点的间隔时间,  $N_1$  为 TRGs 在较前采样时间点样品中的相对含量,  $N_2$  为 TRGs 在较后采样时间点样品中的相对含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 金霉素胁迫下粪土模型中菌群多样性的变化

2.1.1  $\alpha$  多样性指数分析 通过对各采样时间对照组和金霉素不同剂量组的宏基因组 DNA 进行高通量测序分析, 每组均获得约 32 000 条克隆序列, 在 97% 序列相似性水平上共获得 456 个不同种类的操作分类单元 (OTU)。所有试验组的覆盖率均高于 90%(表 2), 表明测序得到的 OTU 序列覆盖率高, 能反映样品中绝大部分菌群的真实情况。随时间延长, 各组 OTU 数量、ACE 指数、Chao1 指数和 Shannon 指数整体均呈上升趋势。第 1 天金霉素组的 ACE 指数和 Chao1 指数高于对照组, 其余采样时间金霉素组的 ACE 指数和 Chao1 指数与对照组相近, 可能提示金霉素在第 1 天对群落丰富度有促

表 2 金霉素胁迫下粪土模型中菌群 α 多样性指数分析

Table 2 Analysis of α diversity index of microflora in manure-soil model under chlortetracycline stress

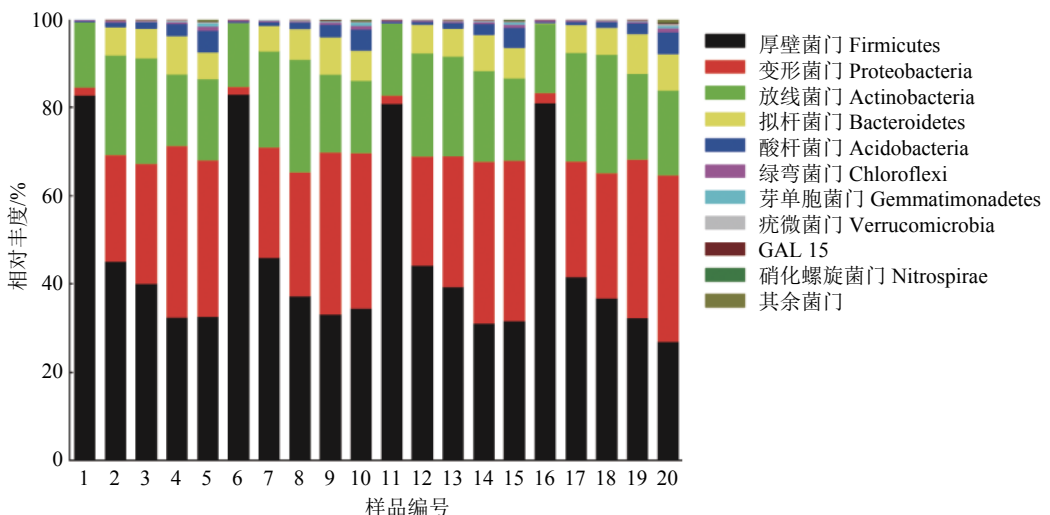
采样时间	m(金霉素)/ μg	OTU 数量 <sup>1)</sup>	ACE 指数	Chao1 指数	Shannon 指数	覆盖 率/%
第1天	0(对照)	214	259	249	2.853	99.8
	10(低)	216	271	286	2.819	99.8
	100(中)	229	289	290	2.952	99.8
	1 000(高)	239	302	310	3.224	99.8
第7天	0(对照)	367	390	391	5.414	99.9
	10(低)	382	416	437	5.410	99.8
	100(中)	361	393	395	5.285	99.8
	1 000(高)	345	374	388	5.278	99.9
第14天	0(对照)	370	380	382	5.474	99.9
	10(低)	376	397	405	5.518	99.9
	100(中)	379	395	398	5.605	99.9
	1 000(高)	375	399	406	5.408	99.9
第28天	0(对照)	396	409	414	6.319	99.9
	10(低)	390	397	398	6.124	99.9
	100(中)	387	397	404	6.152	99.9
	1 000(高)	388	412	419	6.010	99.9
第56天	0(对照)	396	407	411	6.476	99.9
	10(低)	385	395	398	6.435	99.9
	100(中)	391	403	416	6.467	99.9
	1 000(高)	387	400	404	6.552	99.9

1) OTU为操作分类单元

进作用, 其余时间作用不明显。第 7 天随金霉素剂量升高, ACE 指数从 416 降低至 374, Chao1 指数从 437 降低至 388, 其余采样时间金霉素不同剂量作用下 ACE 指数和 Chao1 指数变化不大, 可能提示金霉素剂量升高在第 7 天减弱了金霉素对群落丰富度的促进作用。各采样时间金霉素组的 Shannon 指数均与对照组相近, 提示金霉素对群落多样性的选择作用可能不明显。

2.1.2 菌群群落结构分析 门水平群落结构组成如图 1 所示。试验第 1 天, 厚壁菌门 Firmicutes 菌群相对丰度最高, 其次为放线菌门 Actinobacteria 和变形菌门 Proteobacteria; 第 7 和 14 天, 厚壁菌门相对丰度>变形菌门相对丰度>放线菌门相对丰度; 第 28 和 56 天, 变形菌门相对丰度>厚壁菌门相对丰度>放线菌门相对丰度。整个试验过程中, 金霉素中、高剂量组放线菌门菌群的相对丰度显著高于对照组和低剂量组; 金霉素低剂量组厚壁菌门第 7、28 和 56 天的相对丰度显著高于对照组, 整个试验周期中、高剂量组相对丰度均显著低于对照组; 变形菌门相对丰度除第 28 天各剂量金霉素组显著低于对照组外, 其余时间多显著高于对照组 (表 3)。

属水平群落结构组成如图 2 所示。可能携带 TRGs 的菌属有梭菌属 *Clostridium*、链霉菌属 *Streptomyces*、链球菌属 *Streptococcus* 和棒状杆菌属 *Corynebacterium*, 梭菌属和链球菌属属于厚壁菌门, 链霉菌属和棒状杆菌属属于放线菌门。可能存在致病性的菌属有梭菌属、棒状杆菌属和鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas*, 鞘氨醇单胞菌属属于变形菌门。棒状杆菌属的相对丰度从第 1 天到第 56 天持



1~5、6~10、11~15、16~20 分别为 0、10、100、1 000 μg 金霉素剂量组, 各组中的样品编号依次代表在第 1、7、14、28、56 天采集的样品

图 1 金霉素胁迫下粪土模型中门分类水平上的优势菌群相对丰度

Fig. 1 Relative abundances of dominant bacteria at phylum level in manure-soil model under chlortetracycline stress

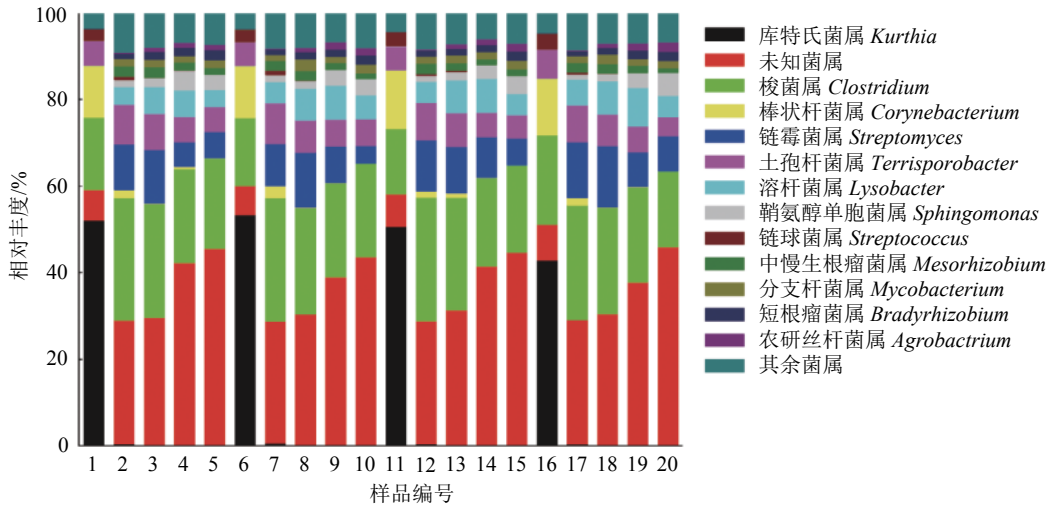


表3 金霉素胁迫下粪土模型中门分类水平上主要优势菌群的相对丰度差异<sup>1)</sup>

Table 3 Discrepancies of the relative abundances of dominant bacteria at phylum level in manure-soil model under chlortetracycline stress %

菌门	<i>m</i> (金霉素)/ $\mu\text{g}$	第1天	第7天	第14天	第24天	第56天
放线菌门 Actinobacteria	0(对照)	14.69c	22.57c	22.55d	16.21d	18.35b
	10(低)	14.37c	21.65d	25.45b	17.55c	16.29c
	100(中)	16.16a	23.36b	23.79c	20.57a	18.57b
	1 000(高)	15.57b	24.58a	26.81a	19.41b	19.18a
厚壁菌门 Firmicutes	0(对照)	82.77a	45.12b	40.06a	32.54b	32.70b
	10(低)	82.95a	46.06a	39.41a	33.57a	34.49a
	100(中)	80.79b	44.18c	37.29b	31.12c	31.65c
	1 000(高)	80.91b	41.58d	36.81b	31.32c	26.96d
变形菌门 Proteobacteria	0(对照)	1.75c	24.12c	27.24c	38.74a	35.45c
	10(低)	1.72c	24.96b	28.07b	36.69b	35.23c
	100(中)	1.98b	24.94b	29.52a	36.58b	36.39b
	1 000(高)	2.38a	26.21a	28.33b	35.98b	37.75a

1)相同菌门同列数据后凡是有一个相同小写字母者,表示不同处理间差异不显著( $P>0.05$ , Fisher's精确检验法)



1~5、6~10、11~15、16~20 分别为 0、10、100、1 000  $\mu\text{g}$  金霉素剂量组, 各组中的样品编号依次代表在第 1、7、14、28、56 天采集的样品

图2 金霉素胁迫下粪土模型中属分类水平上的优势菌群相对丰度

Fig. 2 Relative abundances of dominant bacteria at genus level in manure-soil model under chlortetracycline stress

续减少;鞘氨醇单胞菌属的相对丰度从第1天到第56天持续增加,金霉素中、高剂量组第56天的相对丰度显著高于对照组;梭菌属相对丰度从第1天到第7天增加,之后持续降低,金霉素低剂量组第56天的相对丰度显著高于对照组和中、高剂量组(表4)。

### 2.2 金霉素胁迫下粪土模型中 TRGs 丰度变化

对所有样品进行目标 TRGs 检测,共检测出 3 种 TRGs: *tetO*、*tetT* 和 *tetW*, 检出率达 85%~100%。经 qPCR 检测得扩增效率为 101%~109%, 相关系数  $R^2$  均为 0.999。 *tetO*、*tetT* 和 *tetW* 基因丰

度变化趋势相似:相对于试验第1天,各组第56天的基因丰度均显著减少;金霉素低剂量组第7天的基因丰度显著高于同时期的对照组和中、高剂量组;金霉素中剂量组第56天的基因丰度显著高于同时期的其余各组。*tetT*、*tetO* 和 *tetW* 基因丰度的 DDR 变化也十分相似:各组 DDR 在 I 和 III 期相近,在 II 和 IV 期出现明显差异;II 期金霉素低剂量组 DDR 高于对照组与中剂量组,高剂量组 DDR 为负值,低于对照组与中剂量组;IV 期金霉素各剂量组 DDR 均低于对照组,且均为负值,中剂量组 DDR 最小,其次分别为低、高剂量组(表5,图3)。

表4 金霉素胁迫下粪土模型中属分类水平上主要优势菌群的相对丰度差异<sup>1)</sup>

Table 4 Discrepancies of the relative abundances of dominant bacteria at genus level in manure-soil model under chlortetracycline stress

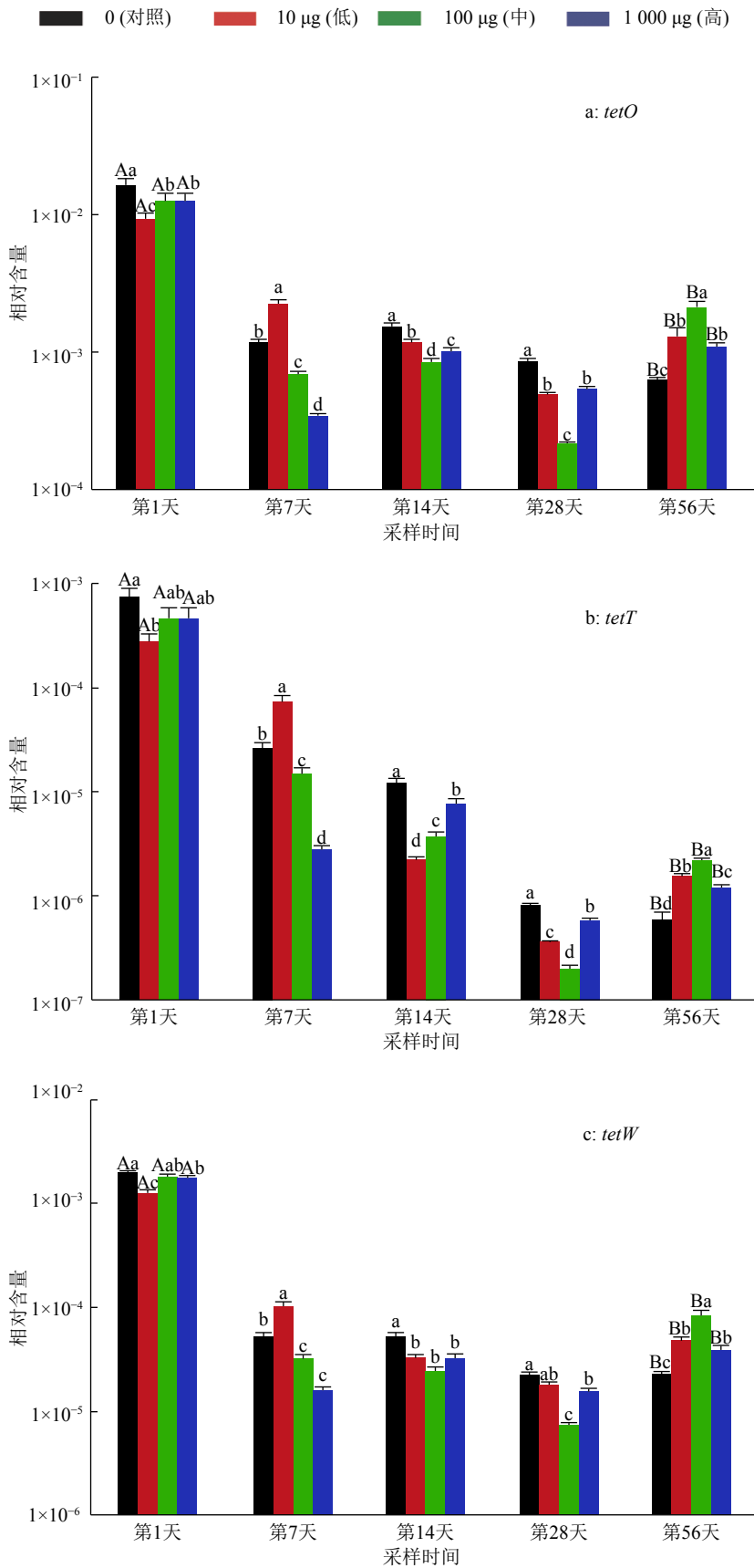
菌属	<i>m</i> (金霉素)/ $\mu\text{g}$	第1天	第7天	第14天	第24天	第56天	%
梭菌属 <i>Clostridium</i>	0(对照)	16.66b	28.23a	26.15a	21.72a	20.78b	
	10(低)	15.54c	28.42a	24.52b	21.70a	21.48a	
	100(中)	15.06c	28.60a	25.95a	20.50b	20.02c	
	1 000(高)	20.51a	26.44b	24.60b	21.88a	17.42d	
棒状杆菌属 <i>Corynebacterium</i>	0(对照)	12.00b	1.87b	0.18b	0.52a	0.02a	
	10(低)	12.10b	2.78a	0.15b	0.05b	0.02a	
	100(中)	13.53a	1.38d	0.96a	0.06b	0.02a	
	1 000(高)	13.08a	1.66c	0.07c	0.07b	0.03a	
鞘氨醇单胞菌属 <i>Sphingomonas</i>	0(对照)	0.07a	1.61a	2.06a	4.53a	3.53c	
	10(低)	0.06a	1.57a	1.78bc	3.62b	3.65c	
	100(中)	0.10a	1.36b	1.80b	3.22c	4.09b	
	1 000(高)	0.07a	1.18c	1.69c	3.35bc	5.25a	
链球菌属 <i>Streptococcus</i>	0(对照)	2.61c	0.81b	0.09b	0.06a	0a	
	10(低)	2.82c	1.02a	0.05b	0.01bc	0a	
	100(中)	3.17b	0.36c	0.27a	0.02b	0a	
	1 000(高)	3.56a	0.42c	0.05b	0c	0.01a	
链霉菌属 <i>Streptomyces</i>	0(对照)	0.06a	10.55c	12.43b	5.59d	6.14b	
	10(低)	0.07a	9.77d	12.63b	8.43b	4.21c	
	100(中)	0.06a	11.81b	10.69c	9.35a	6.29b	
	1 000(高)	0.04a	12.87a	14.14a	8.00c	8.07a	

1)相同菌属同列数据后凡是一个相同小写字母者,表示不同处理间差异不显著( $P>0.05$ , Fisher's 精确检验法)

表5 金霉素胁迫下粪土模型中3个四环素类抗生素耐药基因(TRGs)日消减率变化

Table 5 Day dissipation rate changes of three tetracycline resistance genes (TRGs) in manure-soil model under chlortetracycline stress

四环素类抗生素耐药基因	<i>m</i> (金霉素)/ $\mu\text{g}$	I 期	II 期	III 期	IV 期	%
<i>tetO</i>	0(对照)	13.28	-4.67	3.28	1.06	
	10(低)	10.88	6.81	4.19	-5.95	
	100(中)	13.51	-3.58	5.44	-34.47	
	1 000(高)	13.94	-31.32	3.35	-3.79	
<i>tetT</i>	0(对照)	13.73	8.07	6.67	0.83	
	10(低)	11.62	13.80	5.97	-11.49	
	100(中)	13.92	10.39	6.79	-36.98	
	1 000(高)	14.21	-24.66	6.58	-3.68	
<i>tetW</i>	0(对照)	13.92	-0.22	4.28	-0.26	
	10(低)	13.16	9.60	3.22	-6.22	
	100(中)	14.06	1.03	5.10	-36.41	
	1 000(高)	14.15	-14.80	3.78	-5.58	



相同采样时间不同柱子上方凡是有有一个相同小写字母者, 表示相同采样时间不同处理组间差异不显著 ( $P > 0.05$ , Fisher's 精确检验法); 相同处理组第 1 天和第 56 天的柱子上方凡是有有一个相同大写字母者, 表示相同处理组第 1 天和第 56 天处理间差异不显著 ( $P > 0.05$ , Fisher's 精确检验法)

图 3 金霉素胁迫下粪土模型中 3 个四环素类抗生素耐药基因 (TRGs) 相对含量变化

Fig. 3 Relative abundance changes of three tetracycline resistance genes (TRGs) in manure-soil model under chlortetracycline stress

### 3 讨论与结论

在对菌群多样性影响方面,随培养时间的延长,各组 OTU 数量、ACE 指数、Chao1 指数和 Shannon 指数整体均呈上升趋势,大部分金霉素组的 ACE 指数、Chao1 指数和 Shannon 指数均与对照组相近,这可能与金霉素的降解或土壤吸附作用有关。Liu 等<sup>[15]</sup>研究表明土壤对金霉素有较强的吸附作用,从而降低其药效,削弱其对土壤微生物的毒害作用;Chessa 等<sup>[6]</sup>研究发现 TCs 只能短期影响菌群结构,7 d 后作用逐渐下降,60 d 内完全消失;Xiong 等<sup>[16]</sup>研究发现相对于金霉素,猪粪对土壤微生物群落结构具有更强的决定性作用,而且施加猪粪可为土壤微生物提供丰富的营养物质。基于以上报道,推测当金霉素和猪粪共同作用于土壤微生物时,金霉素对菌群的毒害作用受抑制,群落丰度与多样性的变化主要是猪粪促进作用的结果。

从试验各组菌群丰度和 TRGs 相对含量变化可发现厚壁菌门相对丰度持续减少,放线菌门相对丰度先增后减,各组 TRGs 相对含量总体表现为减少,提示 TRGs 相对含量变化可能与菌群丰度变化有关。有研究<sup>[16]</sup>表明带有 TRGs 的菌门相对丰度减少时,将有助于粪土环境及 TCs-粪土环境中 TRGs 的消减。

有研究表明耐药菌的丰度与抗生素含量有显著相关性<sup>[17]</sup>。Heuer 等<sup>[18]</sup>认为粪便中的耐药基因通过水平基因转移进入土壤菌群,获得耐药基因的菌群在抗生素环境下更具生存优势。本研究中厚壁菌门金霉素低剂量组的相对丰度高于或显著高于对照组和中、高剂量组,说明厚壁菌门菌群能耐受低剂量金霉素的毒害作用,对中、高剂量金霉素较敏感,从而在中、高剂量金霉素环境中逐渐失去生存优势。放线菌门金霉素中、高剂量组的相对丰度高于或显著高于对照组和低剂量组,可能是由于放线菌门自身可产生 TCs,能够适应被金霉素污染的生长环境<sup>[16]</sup>,因此在其他门菌群生存受到金霉素毒害时,放线菌门能耐受住这种毒害作用,生存繁殖更具优势。变形菌门第 28 天金霉素各剂量组的相对丰度均显著低于对照组,这与 Xiong 等<sup>[16]</sup>结果相似,其余时间金霉素各剂量组相对丰度多显著高于对照组,这可能是因为变形菌门是携带耐药基因的主要菌群之一,其生存与耐药基因的产生及产生时间相关<sup>[19]</sup>。

此外,金霉素也可能改变部分致病菌的相对丰度,低剂量金霉素有利于梭菌属相对丰度的增加,

而中、高剂量金霉素更有利于鞘氨醇单胞菌属相对丰度的增加。由此可见,金霉素能引起菌群群落结构发生变化,实质是不同菌群对金霉素敏感程度的差异。

在对 TRGs 相对含量影响方面, *tetO*、*tetT* 和 *tetW* 相对含量的变化趋势相似,各组第 56 天的 TRGs 相对含量均显著低于第 1 天,这可能是由于样品中的菌群结构发生明显变化。Sengeløv 等<sup>[20]</sup>研究发现由粪便引入的耐药菌大部分不适应土壤环境,只能短暂存活,耐药基因相对含量逐渐下降至未经粪便污染的原土水平。此外,施加粪便后 16S rDNA 拷贝数的增加也可能促使 TRGs 相对含量消减<sup>[12]</sup>。

II 期金霉素高剂量组和 IV 期金霉素各剂量组的 DDR 均为负值,这说明金霉素在此阶段不仅能延缓 TRGs 相对含量的消减,还能促进其积累,可能是因为水平基因转移是粪便与土壤之间菌群耐药性传播的重要途径<sup>[18]</sup>,TCs 可为土壤中水平基因转移或耐药基因增殖提供必需的抗生素胁迫压力<sup>[16]</sup>,所以在第 56 天,各剂量金霉素组的 TRGs 相对含量均高于对照组。

TRGs 相对含量随金霉素胁迫剂量的不同而产生差异。试验第 7 天金霉素低剂量组 TRGs 的相对含量显著高于对照组,中、高剂量组显著低于对照组,这可能是抗生素的毒物兴奋效应所致,其表现为低剂量促进,高剂量抑制<sup>[21]</sup>。金霉素中剂量组 IV 期的 DDR 最小,第 56 天 TRGs 相对含量显著高于其余各组,其原因可能是金霉素发生自然降解。据报道金霉素在粪(猪粪)土模型中自然降解 50 d 后,降解率可达 97%<sup>[18]</sup>,推测第 56 天土壤中残留的金霉素已至低剂量范围,促进了 TRGs 积累,金霉素低剂量组由于本身剂量较低,自然降解后削弱了其促进作用,所以此时各剂量金霉素对 TRGs 积累的促进效果为:中剂量>低剂量>高剂量。

综上所述,在猪粪-土壤环境中,不同菌群对金霉素敏感程度不同,金霉素可改变优势菌群的相对丰度,从而引起菌群群落结构的变化。金霉素可改变 TRGs 相对含量的日消减率,从而影响 TRGs 相对含量。

#### 参考文献:

- [1] 周志强,王淑平,郭丽,等.鸭粪和环丙沙星对潮土微生物群落功能多样性的影响[J].生态毒理学报,2014,9(6):1118-1125.
- [2] PAN X, QIANG Z, BEN W, et al. Residual veterinary antibiotics in swine manure from concentrated animal feeding operations in Shandong Province, China[J].



- Chemosphere, 2011, 84: 695-700.
- [3] 黄俐晔. 中国养猪业现状、问题与趋势[J]. 广东农业科学, 2015, 42(16): 175-179.
- [4] 郭冬生, 王文龙, 彭小兰, 等. 湖南省畜禽粪便抗生素排放量估算与治理策略[J]. 浙江农业学报, 2014, 26(5): 1315-1318.
- [5] HUANG X, LIU C, LI K, et al. Occurrence and distribution of veterinary antibiotics and tetracycline resistance genes in farmland soils around swine feedlots in Fujian Province, China[J]. Environ Sci Pollut Res, 2013, 20(12): 9066-9074.
- [6] CHESSA L, PUSINO A, GARAU G, et al. Soil microbial response to tetracycline in two different soils amended with cow manure[J]. Environ Sci Pollut Res, 2016, 23(6): 5807-5817.
- [7] 田甜甜, 王瑞飞, 杨清香. 抗生素耐药基因在畜禽粪便-土壤系统中的分布、扩散及检测方法[J]. 微生物学通报, 2016, 43(8): 1844-1853.
- [8] BEN W, WANG J, PAN X, et al. Dissemination of antibiotic resistance genes and their potential removal by on-farm treatment processes in nine swine feedlots in Shandong Province, China[J]. Chemosphere, 2017, 167: 262-268.
- [9] WANG M Z, LIU P, XIONG W G, et al. Fate of potential indicator antimicrobial resistance genes (ARGs) and bacterial community diversity in simulated manure-soil microcosms[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2018, 147: 817-823.
- [10] 钟晓霞. 鸭-鱼混养场养殖环境抗菌药物耐药基因污染及微生物群落特征[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [11] NG L K, MARTIN I, ALFA M, et al. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes[J]. Mol Cell Probes, 2001, 15(4): 209-215.
- [12] 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]. Environ Sci Technol, 2014, 48(22): 13120-13129.
- [13] AMINOV R I, GARRIGUES-JEANJEAN N, MACKIE R I. Molecular ecology of tetracycline resistance: Development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(1): 22-32.
- [14] KOIKE S, AMINOV R I, YANNARELL A C, et al. Molecular ecology of macrolide-lincosamide-streptogramin B methylases in waste lagoons and subsurface waters associated with swine production[J]. Microb Ecol, 2010, 59(3): 487-498.
- [15] LIU F, WU J, YING G G, et al. Changes in functional diversity of soil microbial community with addition of antibiotics sulfamethoxazole and chlortetracycline[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2012, 95(6): 1615-1623.
- [16] XIONG W, WANG M, DAI J, et al. Application of manure containing tetracyclines slowed down the dissipation of tet resistance genes and caused changes in the composition of soil bacteria[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2018, 147: 455-460.
- [17] GAO P, MUNIR M, XAGORARAKI I. Correlation of tetracycline and sulfonamide antibiotics with corresponding resistance genes and resistant bacteria in a conventional municipal wastewater treatment plant[J]. Sci Total Environ, 2012, 421/422: 173-183.
- [18] HEUER H, SCHMITT H, SMALLA K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields[J]. Curr Opin Microbiol, 2011, 14(3): 236-243.
- [19] ZHANG J, CHEN M, SUI Q, et al. Impacts of addition of natural zeolite or a nitrification inhibitor on antibiotic resistance genes during sludge composting[J]. Water Res, 2016, 91: 339-349.
- [20] SENGELOV G, AGERSO Y, HALLING-SORENSEN B, et al. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry[J]. Environ Int, 2003, 28(7): 587-595.
- [21] 葛会林, 罗金辉, 智霞, 等. 环境中的抗生素与毒物兴奋效应综述[J]. 热带作物学报, 2015, 36(9): 1719-1725.

【责任编辑 李庆玲】