

李盼盼, 宋雯, 谷洁, 等. 含四环素沼肥对蔬菜品质及抗性基因的影响[J]. 环境科学研究, 2016, 29(6): 907-915.

LI Panpan, SONG Wen, GU Jie, *et al.* Effects of biogas fertilizers containing tetracycline on vegetable quality and resistance genes [J]. Research of Environmental Sciences, 2016, 29(6): 907-915.

含四环素沼肥对蔬菜品质及抗性基因的影响

李盼盼¹, 宋雯¹, 谷洁^{2*}, 张凯煜², 张社奇¹, 王小娟², 高华²

1. 西北农林科技大学理学院, 陕西 杨凌 712100

2. 西北农林科技大学资源环境学院, 陕西 杨凌 712100

摘要: 为探讨含四环素沼肥的生态毒性, 采用盆栽试验研究了含四环素沼肥对小白菜品质、土壤微生物群落代谢功能多样性及抗性基因的影响. 结果表明: 与 CK 相比, 添加高浓度 (15 mg/kg) 四环素沼肥处理下, 小白菜鲜质量和 *w* (维生素 C) 分别降低了 5.7% 和 16.7%, *w* (硝酸盐) 增加了 34.3%. Biolog 微平板分析显示, 添加高浓度四环素的沼肥显著提高了土壤微生物群落碳源利用多样性和物种丰富度. 实时荧光定量 PCR 分析发现, 在小白菜幼苗期, 添加高浓度四环素的沼肥处理下, 土壤中四环素类抗性基因相对丰度比 CK 高出 0.69~4.03 倍. 无论沼肥中是否添加四环素, 施肥后小白菜内生菌中均存在抗性基因, 并且小白菜内生菌抗性基因相对丰度均以 CK 最高, 比其他处理高出 0.55~325.72 倍. 研究显示, 添加四环素的沼肥改变了小白菜品质和产量以及土壤微生物群落碳源利用多样性和物种丰富度, 增加了土壤中四环素类抗性基因丰度, 降低了小白菜内生菌的抗性基因水平.

关键词: 四环素; 蔬菜品质; 代谢功能多样性; 抗性基因

中图分类号: X503.231

文章编号: 1001-6929(2016)06-0907-09

文献标志码: A

DOI: 10.13198/j.issn.1001-6929.2016.06.16

Effects of Biogas Fertilizers Containing Tetracycline on Vegetable Quality and Resistance Genes

LI Panpan¹, SONG Wen¹, GU Jie^{2*}, ZHANG Kaiyu², ZHANG Sheqi¹, WANG Xiaojuan², GAO Hua²

1. College of Science, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

2. College of Resource and Environment, Northwest A&F University, Yangling 712100, China

Abstract: To explore the ecotoxicity of biogas fertilizer containing tetracycline, a pot experiment was conducted to investigate the effects of biogas fertilizer containing different concentration levels of tetracycline on bak choy quality, functional diversity of soil microbial community and tetracycline resistance genes in bak choy. The biogas fertilizer containing high concentration of tetracycline (15 mg/kg) reduced the fresh weight and vitamin C content of bak choy by 5.7% and 16.7% respectively, whereas the nitrate content increased by 34.3%. Biolog analysis showed that the biogas fertilizer containing high concentration of tetracycline significantly improved the diversity and richness of soil microbe. Real-time quantitative PCR analysis indicated that the relative abundance of tetracycline resistance genes in soils of the treatment adding high concentration of tetracycline were 0.69-4.03 times higher than those in the control soil at the bak choy seedling stage. Tetracycline resistance genes in bak choy endophytes were observed among all treatments, and the relative abundance of tetracycline resistance genes of the control were 0.55-325.72 times higher than those of the other treatments. The study suggested that application of the biogas fertilizer containing tetracycline changed the yield and quality of bak choy and the diversity and richness of soil microbe, increasing the abundance of antibiotic resistance genes in soil, but reducing the abundance of resistance genes in bak choy endophytes.

Keywords: tetracycline; vegetables quality; metabolic functional diversities; resistance genes

收稿日期: 2015-11-24

修订日期: 2016-03-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (41171203); 引进国际先进农业科学技术计划 (948 计划) 项目 (2015-Z37); 陕西省科技统筹创新工程计划项目 (2015KTCL03-19)

作者简介: 李盼盼 (1990-), 女, 陕西户县人, 1184599208@qq.com.

* 责任作者, 谷洁 (1963-), 男, 陕西周至人, 教授, 博士, 博导, 主要从事环境微生物及农业固体废弃物的资源化利用研究, gujie205@sina.com

抗生素具有防治疾病、促进动物生长等作用, 被作为饲料添加剂广泛应用于畜禽养殖业^[1]. 研究表明, 抗生素类药物进入动物体内后, 约 30%~90% 以药物原形或代谢产物形式随动物粪便排出体外^[2-3],

使畜禽粪便成为环境中抗生素污染的主要来源。张树清等^[4]对我国七省规模化养殖场畜禽粪便的调查发现,猪粪中 w (四环素)平均值为5.2 mg/kg,最高达78.6 mg/kg。GUO等^[5]调查了广州市的猪粪样本, w (四环素)为28.31~326.15 mg/kg,平均值为15.21 mg/kg。随着大规模养殖业发展以及大中型沼气工程的发展,厌氧发酵成为畜禽粪便重要处理方式之一。畜禽粪便厌氧发酵的产物——沼肥(沼液和沼渣)常作为优质、高效的有机肥。但由于沼肥中有大量抗生素残留,残留抗生素通过施肥进入土壤、水体等环境介质^[6],会破坏环境微生物群落结构,并通过食物链影响高级生物,导致生态系统失衡^[7]。进入环境的抗生素还可通过低剂量长期作用,使细菌产生耐药性,对动物与人类的健康构成潜在威胁^[8]。

Pruden等^[9]指出,抗生素污染诱导产生的抗性基因可能成为一种新型环境污染物,其风险比抗生素药物本身的污染风险更高。CHENG等^[10]通过研究我国杭州的8个养殖场,证实四环素类抗性基因的存在;WU等^[11]分析北京、天津及浙江嘉兴三地的猪饲养场周边土壤时发现了15种四环素类抗性基因;邹世春等^[12]在珠海某养殖场周边土壤检测到多种四环素类抗性基因。抗性基因可以在土壤、地下水及各环境介质中迁移、转化,并很可能通过基因横向转移进入食物链并最终进入人体,使人体携带的微生物产生抗生素耐药性。一旦这些抗性基因从环境微生物进入致病菌中,就会对人类健康构成潜在威胁^[13]。

食物链是抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)进入人体最直接的途径,因此,在食品领域开展相关研究显得非常必要^[14]。植物内生菌指在生活史的某一阶段或者全部阶段生活在健康植物组织和器官内的真菌、细菌或放线菌,被感染的宿主植物不表现外在症状^[15]。Johnston等^[16]从美国西南部收获的新鲜芹菜、香菜、菠菜等蔬菜中分离出了大量对常用抗生素耐药的肠球菌,如果蔬菜内生菌携带的抗性基因随着人类的食用进入体内,便会威胁人类健康。鉴于此,该研究采用盆栽试验,分析含四环素沼肥对蔬菜品质、土壤微生物群落代谢功能多样性、土壤酶活性及四环素类抗性基因的影响,旨在探讨含四环素沼肥的生态毒性效应,以期为沼肥在无公害蔬菜生产上的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试蔬菜为四季小白菜(*Brassica campestris* L.

ssp. *Chinensis* Makino),由陕西咸阳市四季种苗有限公司提供。供试土壤取自西北农林科技大学新天地试验地,沼肥取自陕西杨凌五泉镇某农家猪粪沼肥。沼渣(烘干)与土壤(风干)的 w (TP)分别为4.79和1.13 g/kg, w (TN)分别为21.67和1.32 g/kg, w (TK)分别为6.90和12.45 g/kg。沼渣中 w (四环素)为1.83 mg/kg(以鲜质量计),沼液中 ρ (四环素)为0.96 mg/L。

1.2 试验设计

盆栽试验于2014年9—10月在西北农林科技大学温室大棚内进行,网棚由透明塑料覆盖,阳光可以穿透。试验共设4个处理,每个处理设3个重复,包括:①CK,即不添加四环素;②T1处理,沼渣、沼液中四环素添加量(以鲜质量计)分别为5 mg/kg、5 mg/L;③T2处理,沼渣、沼液中四环素添加量分别为10 mg/kg、10 mg/L;④T3处理,沼渣、沼液中四环素添加量分别为15 mg/kg、15 mg/L。每盆装风干土壤3 kg,施0.3 kg沼渣(鲜样,含水率59.6%)与土壤充分混匀。每盆播撒10粒小白菜种子,随时浇水、除虫、除草,使土壤含水量保持在田间持水量的80%左右。播种两周后间苗,一个月后沼液追肥,追肥时将沼液与水混合(体积比为1:3)施入,每盆追施500 mL。

1.3 样品采集

分别在小白菜的发芽期(播种9 d后)、幼苗期(播种27 d后)、成熟期(播种47 d后)取土样,剔除其中的石砾等杂物;成熟期取蔬菜样洗净,用滤纸吸干表面水分。土壤和蔬菜样品均各取一份保存于4℃冰箱,另一份保存于-80℃冰箱。

1.4 测定项目与方法

1.4.1 小白菜产量和品质的测定

在小白菜成熟期,采小白菜鲜样洗净,用滤纸吸干表面水分,通过称重法测定单株鲜质量,用游标卡尺测定株高;小白菜中 w (维生素C)和 w (硝酸盐)均采用紫外分光光度法测定^[17-18]。

1.4.2 土壤微生物群落代谢功能多样性指数的计算

采用Biolog生态测试板测定微生物群落代谢功能多样性。取小白菜成熟期的土壤样品5 g(以干质量计)装入锥形瓶中,加入45 mL无菌生理盐水,160 r/min振荡30 min,静置后取上清液,在超净工作台上,将其用无菌生理盐水稀释至 10^{-3} 倍,接种悬浮液于ECO微孔板中,每孔150 μ L。将接种的ECO微孔板装入聚乙烯盒中,置于27℃暗箱中培养,连续培养240 h,每24 h用ELISA微平板读数器在590 nm处读

数一次,采集读数^[19].

平均每孔颜色变化率(AWCD)的计算公式:

$$AWCD = [\sum_{i=1}^{31} (C_i - R)] / 31 \tag{1}$$

式中: C_i 为反应孔*i*在590 nm下的光密度值; R 为ECO微孔板对照孔A1的光密度值; $C_i - R$ 小于0者,记为0,即 $C_i - R \geq 0$. 由于120 h时平均每孔颜色变化率数值趋于平稳,所以选取120 h时ECO微孔板的读数结果,对其进行微生物群落碳源利用多样性分析.

群落 Shannon-Wiener 多样性指数(H)计算公式:

$$H = - \sum_{i=1}^{31} (P_i \times \ln P_i) \tag{2}$$

$$P_i = (C_i - R) / (\sum_{i=1}^{31} (C_i - R)) \tag{3}$$

群落丰富度指数(S)用碳源代谢孔的数目来表示,如果平均每孔颜色变化率大于0.25,则该孔为碳源代谢孔.

群落 Shannon 均匀度指数(E)计算公式:

$$E = H / \ln S \tag{4}$$

1.4.3 土壤酶活的测定

土壤酶活的测定方法见文献[20]. 土壤脲酶活性采用苯酚钠-次氯酸钠比色法测定,以24 h后1 g土壤中 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的质量(mg)来表示,mg/g;土壤碱性磷酸酶活性采用磷酸苯二钠比色法测定,以24 h后1 g土壤中释出酚的质量(mg)来表示,mg/g;土壤过氧化氢酶活性采用高锰酸钾滴定法测定,以20 min后1 g土壤中0.01 mol/L高锰酸钾的体积(mL)来表示,mL/g.

1.4.4 抗性基因的测定

1.4.4.1 土壤基因组总 DNA 的提取

将小白菜发芽期、幼苗期和成熟期的土样冷冻干燥后,分别称取0.5 g,按照Soil DNA Kit (OMEGA)试剂盒说明书提取土壤总DNA.

1.4.4.2 蔬菜内生菌 DNA 的提取

蔬菜内生菌DNA的提取方法见文献[21]. 取成熟期小白菜鲜样,清洗干净,用70%无水乙醇浸泡40 s,然后用2.5%的次氯酸钠(每100 mL加一滴吐温80)浸泡10 min,再用灭菌去离子水冲洗3遍,最后一遍超声波处理5 min. 称取处理之后的小白菜样品2 g,于研钵中剪碎并研磨至糊状后,用25 mL灭菌磷酸盐缓冲液冲洗至锥形瓶中,加入玻璃珠,150 r/min振荡1 h,静置后将悬浮液转入50 mL灭菌离心管中;12 000 r/min离心15 min,收集沉淀,再次洗涤

后离心,弃上清液,然后进行DNA的提取及纯化.

1.4.4.3 抗性基因定性检测

该试验共选取8种常见四环素类抗性基因,包括5个核糖体保护蛋白基因(*tetM*、*tetO*、*tetQ*、*tetT*、*tetW*)、2个外排泵基因(*tetC*、*tetG*)、1个酶修饰基因(*tetX*). 采用普通PCR技术对土壤DNA和小白菜内生菌DNA进行定性检测,均检测到5种抗性基因,其引物序列、片段大小及退火温度^[22]如表1所示.

表 1 抗性基因引物及退火温度

Table 1 Primers and annealing temperature of antibiotic resistance genes

四环素类 抗性基因	引物序列	片段大小 /bp	退火温度 /℃
<i>tetC</i>	GCGGGATATCGTCCATTCCG	207	61
	GCGTAGAGGATCCACAGGACG		
<i>tetM</i>	ACAGAAAGCTTATTATATAAC	171	52
	TGGCGTGTCTATGATGTTTAC		
<i>tetX</i>	CAATAATTGGTGGTGGACCC	468	56
	TTCTTACCTTGGACATCCCG		
<i>tetQ</i>	AGAATCTGCTGTTTGCCAGTG	169	56
	CGGAGTGTCATGATATTGCA		
<i>tetW</i>	GAGAGCCTGCTATATGCCAGC	168	56
	GGGCGTATCCACAATGTTAAC		

定性检测PCR反应体系20 μL,包括1 μL模板DNA,10 μL mix (CWbio,北京),正向引物和负向引物(均为10 μmol/L)各0.5 μL,ddH₂O 8 μL. PCR反应条件:94℃预变性4 min,94℃变性30 s,退火45 s(具体温度见表1),72℃延伸1 min,共30个循环,72℃延伸10 min. PCR产物采用1%的琼脂糖凝胶检测.

1.4.4.4 抗性基因定量测定

使用Bio-Rad IQ5 实时荧光定量PCR仪(Bio-rad,USA)进行定量测定,反应体系为10.5 μL,其中包含模板DNA(土壤DNA原液稀释50倍,内生菌DNA原液稀释5倍)5 μL,mix (CWbio,北京) 5 μL,正向引物和负向引物(均为10 μmol/L)各0.25 μL. 反应条件:95℃预变性10 min,95℃变性10 s,退火30 s(具体温度见表1),72℃延伸32 s,40个循环. 溶解曲线以退火温度为起始温度,每30 s降低0.5℃,溶解曲线峰单一,扩增效率为90%~110%. 每个样品均做3次重复,定量PCR产物用2%琼脂凝胶电泳检测.

基因拷贝数计算方法见文献[23],利用已知浓度的质粒DNA做标准曲线[即以拷贝数为横坐标、Ct

为纵坐标,其中 Ct (cycle threshold) 为每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数],从而求出未知样品的初始拷贝数. 分析过程通过 IQ5 软件完成.

$$\text{copy} = c_0 \times 6.02 \times 10^{14} / [660 \times (3\,015 + x)]$$

(5)

式中:copy 为基因拷贝数; c_0 为质粒 DNA 的初始含量,ng/ μ L; x 为目的基因片段大小,bp;3 015 为 pGEM-T 载体长度,bp.

1.5 数据处理

数据采用 SPSS v16.0 进行统计分析和方差分析;采用 LSD 法检验差异显著性;采用 Microsoft Excel 2003 进行制图.

2 结果与分析

2.1 含四环素沼肥对小白菜的影响

由表 2 可见,随着沼肥中 w (四环素) 的升高,单株小白菜鲜质量先升高再降低,其中 T1 处理下最高 (较 CK 增加 15.5%), T3 处理下最低 (较 CK 降低 5.7%). 相关研究认为,抗生素对植物的毒性和抗生素与叶酸的竞争有关^[24],抗生素对蔬菜的毒性主要是由于蔬菜吸收了抗生素而降低了对生长所需叶酸的吸收所致^[25]. 胡桂兵等^[26]研究表明,四环素类抗生素在低浓度下可促进植物生长,高浓度则会抑制植物生长.

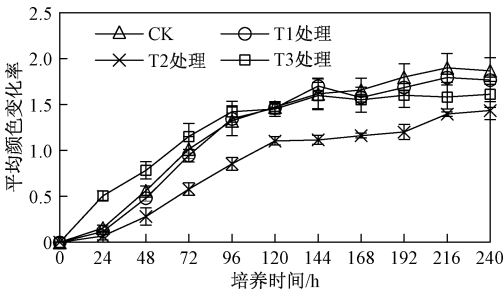
维生素 C 具有防止坏血病、增强机体抵抗能力的生理功能,是评价蔬菜品质的重要指标. 硝酸盐在一定条件下可转化成亚硝酸盐,亚硝酸盐摄入量达到一定值可直接使动物出现血液缺氧中毒反应,严重时甚至可导致死亡,硝酸盐含量是评价无公害蔬菜的重要指标. 由表 2 可见,随着沼肥中 w (四环素) 的升高,小白菜中 w (维生素 C) 逐渐降低,T3 处理下最低 (较 CK 降低 16.7%);而 w (硝酸盐) 表现为先降低再升高,其中,T1 处理下较 CK 降低 13.1%,T3 处理下最高 (较 CK 增加 34.3%). 表明随着 w (四环素)

升高,四环素对小白菜中 w (维生素 C) 的降低作用更显著. 含中、低浓度 (10、5 mg/kg) 四环素的沼肥可显著降低小白菜中的 w (硝酸盐),含高浓度 (15 mg/kg) 四环素的沼肥则可显著增加小白菜中的 w (硝酸盐). 因此,添加高浓度四环素的沼肥施用后显著降低了小白菜品质.

2.2 含四环素沼肥对土壤微生物群落代谢功能多样性的影响

2.2.1 土壤微生物群落的平均颜色变化率

平均颜色变化率反映微生物对碳源的利用率,其值越大,表明微生物活性越高,密度越大^[27]. 由图 1 可见,各处理下土壤微生物群落的平均颜色变化率随着培养时间的延长而逐渐升高. 培养 0~24 h 内,除 T3 处理外,其余各处理下土壤微生物群落的平均颜色变化率均很小,说明 24 h 之内碳源基本未被微生物群落利用;24 h 后,各处理下的平均颜色变化率均出现明显变化,表明 24 h 后微生物群落活性增强,碳源被大幅利用. 与 CK 相比,0~120 h 内 T3 处理下的平均颜色变化率显著较高 ($P < 0.05$),T2 处理下显著较低 ($P < 0.05$);120 h 后,T2 处理下的平均颜色变化率显著较低 ($P < 0.05$),其他处理间则无显著差异.



注:误差棒表示标准偏差(n=3). 下同.

图 1 不同处理下土壤微生物群落的平均颜色变化率

Fig. 1 Average well color development of soil microbial communities under different treatments

2.2.2 土壤微生物群落的代谢功能多样性指数

土壤微生物群落代谢功能多样性与均匀度是衡量生态系统稳定和健康的指标. 由表 3 可见,与 CK 相比,T1、T2 处理显著降低了土壤微生物的碳源利用多样性和物种丰富度,而 T3 处理显著提高了土壤微生物碳源利用多样性和物种丰富度,各处理对土壤微生物 Shannon 均匀度均没有显著影响. 张健等^[28]研究发现,随着培养时间的延长,土壤中四环素

表 2 不同处理对小白菜的影响

Table 2 Effects of different treatment on Pakchoi

处理	单株鲜质量/g	株高/cm	w (维生素 C) / (mg/100 g)	w (硝酸盐) / (mg/kg)
CK	(33.5 ± 0.6) ^b	(27.8 ± 0.2) ^a	(37.8 ± 0.1) ^a	(2 814.2 ± 4.1) ^b
T1	(38.7 ± 0.4) ^a	(28.7 ± 0.1) ^a	(38.4 ± 0.1) ^a	(2 445.8 ± 4.5) ^c
T2	(31.8 ± 0.6) ^c	(27.6 ± 0.2) ^a	(34.2 ± 0.1) ^b	(2 294.7 ± 4.0) ^d
T3	(31.6 ± 0.4) ^c	(26.5 ± 0.2) ^a	(31.5 ± 0.2) ^c	(3 779.0 ± 5.4) ^a

注:数值为平均值 ± 标准差 (n=3). 同列不同字母表示差异显著. 下同.

类抗生素能随微生物降解作用而逐渐减少. 可能是由于小白菜成熟期土壤中四环素已经部分降解, 所以没有对土壤微生物均匀度构成影响.

表 3 不同处理下土壤微生物群落多样性指数
Table 3 Soil microbial diversity indices of different treatments

处理	Shannon-Wiener 多样性指数	丰富度指数	Shannon 均匀度指数
CK	(3.24 ± 0.01) ^b	(27.33 ± 0.58) ^b	(0.979 ± 0.006) ^a
T1	(3.19 ± 0.00) ^c	(25.00 ± 0.00) ^c	(0.990 ± 0.001) ^a
T2	(3.05 ± 0.01) ^d	(22.00 ± 1.00) ^d	(0.987 ± 0.015) ^a
T3	(3.33 ± 0.01) ^a	(29.00 ± 0.00) ^a	(0.988 ± 0.002) ^a

2.2.3 土壤微生物对不同种类碳源的利用程度

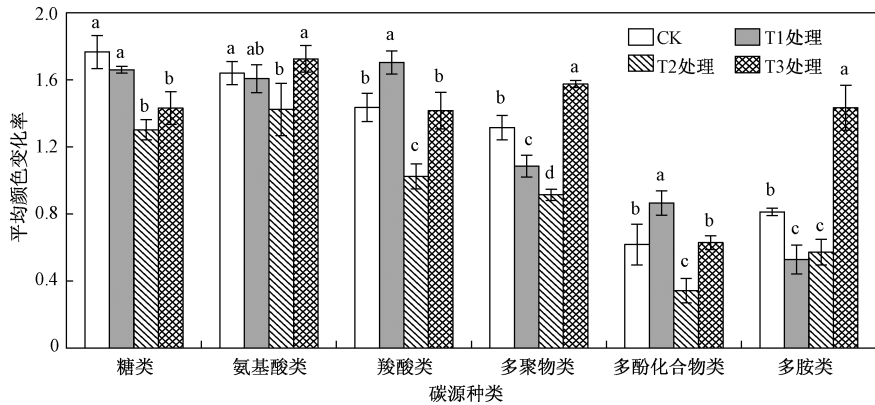


图 2 土壤微生物对不同种类碳源的利用程度

Fig. 2 Utilization of different group of carbon sources by soil microbe

2.3 含四环素沼肥对土壤酶活性的影响

脲酶能将土壤中的尿素水解成氨, 脲酶活性可反映微生物数量. 由图 3(A)可见, 与 CK 相比, T1 处理促进了小白菜发芽期和幼苗期土壤脲酶活性, T2 和 T3 处理仅显著增加了发芽期土壤脲酶活性, 土壤脲酶在发芽期出现短暂激活可能是由于外源四环素杀灭了部分土壤微生物, 导致微生物群落发生改变, 从而改变微生物利用氮的能力. 碱性磷酸酶是一类催

化土壤有机磷化合物矿化的酶, 其活性高低直接影响土壤中有有机磷的分解、转化及其生物有效性. 由图 3(B)可见, 在发芽期, 与 CK 相比, T1、T2 处理提高了土壤碱性磷酸酶活性, 而 T3 处理作用相反, 表现出低浓度促进、高浓度抑制的特征, 但均未达到显著水平; 在幼苗期, 各施肥处理下土壤碱性磷酸酶活性均低于 CK. 土壤过氧化氢酶是一种重要的生物酶, 它参与了土壤中许多重要的生物化学过程. 由图 3(C)可见,

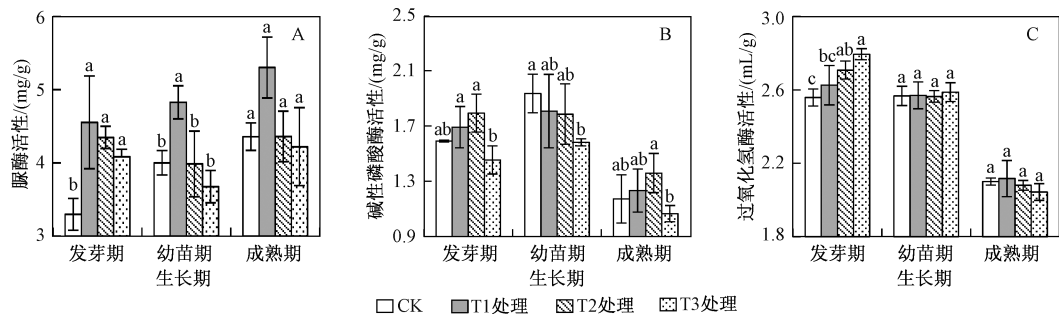


图 3 不同处理对土壤酶活性的影响

Fig. 3 Effects of different treatment on soil enzyme activities

在发芽期,随着沼肥中 w (四环素)的升高,各施肥处理下过氧化氢酶活性均逐渐升高. 随着小白菜的生长,四环素对土壤过氧化氢酶活性的促进作用逐渐消失.

2.4 含四环素沼肥对四环素类抗性基因的影响

2.4.1 含四环素沼肥对土壤中四环素类抗性基因的影响

由图4可见,酶修饰基因(*tetX*)的相对丰度(抗性基因拷贝数/16S rRNA 拷贝数)比外排泵基因

(*tetC*)和核糖体保护蛋白基因(*tetM*、*tetQ*、*tetW*)高1~2个数量级,这可能是因为酶修饰基因有广泛的宿主菌范围和较强的迁移转化能力^[29]. 在小白菜发芽期,T2处理土壤中四环素类抗性基因相对丰度最高,比CK高出1.09~5.20倍;在幼苗期,T3处理土壤中四环素类抗性基因相对丰度最高,比CK高出0.69~4.03倍. 随着小白菜的生长,5种四环素类抗性基因相对丰度逐渐降低,可能是由于土壤中四环素逐渐降解所致.

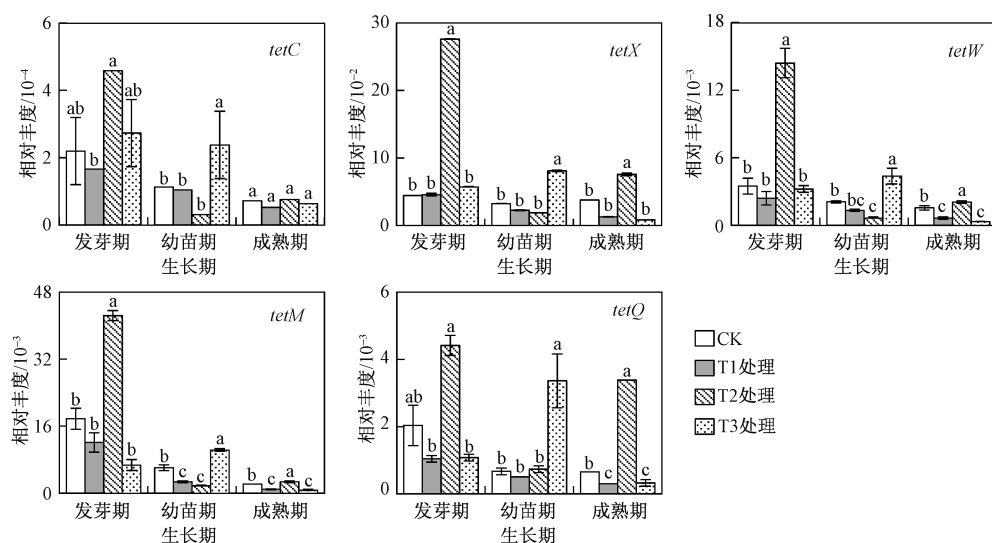


图4 不同处理下土壤中四环素类抗性基因的相对丰度

Fig. 4 Relative abundance of tetracycline resistant genes in soil of different treatments

2.4.2 含四环素沼肥对小白菜内生菌中四环素类抗性基因的影响

由图5可见,无论沼肥中是否添加四环素,施肥后小白菜内生菌中均存在抗性基因;*tetW*的相对丰度较其他4种抗性基因高出1~2个数量级;检测到的

5种四环素类抗性基因均以CK下内生菌抗性基因的相对丰度为最高,比其他处理高出0.55~325.72倍. 影响抗生素抗性基因发生水平转移的因素很复杂,如环境中的受体菌是否处于感受态, Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 浓度是否适宜,环境温度以及菌体所处环境的pH是否满

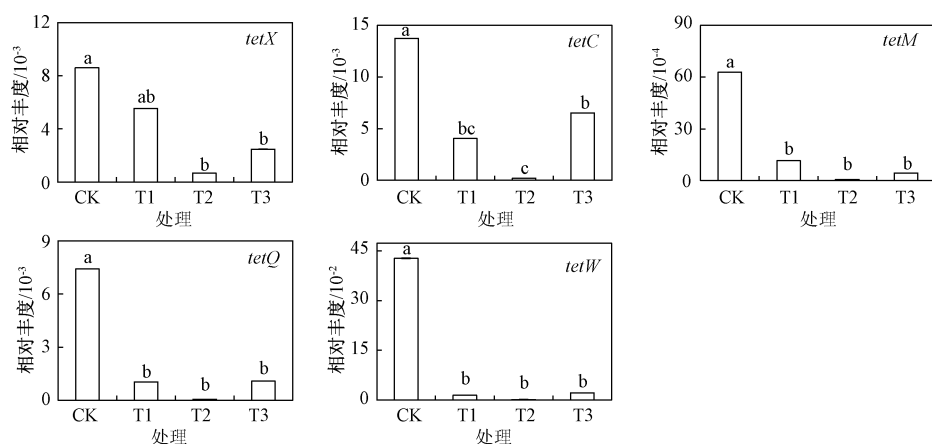


图5 不同处理下小白菜内生菌中四环素类抗性基因的相对丰度

Fig. 5 Relative abundance of tetracycline resistant genes in endophytes of pakchoi of different treatments

足要求等^[30]。同时,ZHANG等^[31]研究发现,金霉素浓度与 *tetO*、*tetQ* 丰度均呈显著正相关,泰乐菌素浓度与 *tetO*、*tetQ* 丰度均呈显著正相关,说明四环素类抗性基因的丰度可能和其他抗生素也相关。

3 讨论

沼肥作为优质、高效的有机肥料普遍应用于各种作物的生产中。由于畜禽粪便中抗生素的高残留,导致沼肥中也含有抗生素,施用含抗生素沼肥可能对蔬菜产生影响。该研究发现,含低浓度(5 mg/kg)四环素的沼肥可以增加小白菜产量,含高浓度(15 mg/kg)四环素的沼肥则降低小白菜产量。Ahmed等^[32]在土壤中添加5、10、20 mg/kg的四环素类(TCs)和磺胺类(SAs),发现二者对黄瓜、番茄、生菜的生长均有负面影响。这与该试验结果不一致,可能是由于抗生素添加量以及蔬菜种类不同,以及抗生素对不同类型蔬菜的相对毒性有所差异所致^[33]。魏瑞成等^[34]通过水培试验研究了金霉素对油菜生长的影响,结果表明,随着处理浓度的升高,植物株高和根系受到明显抑制。而该试验结果表明,不同添加量的四环素对小白菜株高均无显著影响,可能是由于土壤对抗生素具有吸附作用^[35],残留在土壤中的抗生素对作物的影响与水溶液中的抗生素行为有所不同。Migliore等^[36]发现,恩诺沙星对黄瓜、生菜、豆、萝卜的生长有毒物兴奋效应,即在低浓度时促进植物生长,而在高浓度时抑制植物生长,这与该试验结果相似。Bradel^[37]发现,四环素可以通过抑制植原体的活性而影响幼芽分枝,这些都有可能成为四环素污染胁迫下小白菜幼苗生长受限制的原因。

土壤微生物是土壤生态系统中的重要组成部分。Biolog微平板法广泛应用于环境微生物群落研究^[38]。该研究发现,四环素改变了土壤微生物群落的代谢功能多样性。陈智学等^[39]研究表明,土霉素可增加微生物群落的功能多样性,改变微生物利用碳源种类,这与该试验结果相一致。土壤酶是土壤生态系统变化的敏感指标,金兰淑等^[40]研究显示,在土壤中加入0.06 mg/kg的四环素可提高土壤脲酶与磷酸酶活性,加入0.12和0.24 mg/kg的四环素则会在整个培养过程中抑制这两种土壤酶活性,这与该研究结果相似。主要原因可能是低浓度四环素仅抑制部分较敏感微生物的活性,而促进了其他微生物的活性,从而提高了酶活性;高浓度四环素则会抑制多数土壤微生物,使得微生物生物量减少,导致酶活性降低。刘吉强等^[41]研究发现,四环素对土壤过氧化氢酶活性有

一定促进作用,随着时间的推移,各处理都趋于对照水平,与该研究结果相一致。可能是因为四环素的生物化学反应会产生大量的过氧化氢,土壤中的需氧生物通过提高过氧化氢酶活性来解除过氧化氢的毒害,从而使土壤过氧化氢酶活性升高^[41]。随着小白菜的生长,土壤中四环素发生水解或作为底物被微生物降解,含量下降,对土壤微生物和土壤酶活性的作用逐渐减弱。

抗生素抗性基因在环境中的持久性残留,以及在不同环境介质中的传播、扩散可能比抗生素本身的环境危害更大^[42]。Marti等^[43]研究发现,施肥增加了土壤中一些抗生素抗性基因的检出率。JI等^[44]在上海养猪场、家禽养殖场和养牛场畜禽粪便及其周围土壤中均检测到8类抗性基因,证明畜禽粪便抗生素抗性基因污染与土壤污染有明显关系,并且抗生素抗性基因丰度与其对应的抗生素含量呈微弱正相关。Joy等^[45]发现,猪粪中的*tetQ*和*tetX*抗性基因会随着金霉素的降解而逐渐消失。WANG等^[46]在收获期蔬菜根内生菌、叶内生菌和叶面微生物中均检测到抗性基因。该研究在施用沼肥的土壤及小白菜中均检测到了5种四环素抗性基因,表明未经处理的沼肥在生态农业中的应用存在潜在风险。影响抗生素抗性基因发生水平转移的因素很复杂,因此,抗生素抗性基因从沼肥到土壤再到蔬菜的转移机制还需进一步探索。

4 结论

a) 与CK相比,添加低浓度(5 mg/kg)四环素沼肥处理下,小白菜鲜质量提高了15.5%,*w*(硝酸盐)降低了13.1%,而添加高浓度(15 mg/kg)四环素沼肥处理下,小白菜鲜质量和*w*(维生素C)分别降低了5.7%和16.7%,*w*(硝酸盐)增加了34.3%。

b) 四环素改变了土壤微生物群落碳源利用多样性和物种丰富度,添加低浓度四环素的沼肥显著提高了微生物群落对羧酸类和多酚类碳源的利用,而添加高浓度四环素的沼肥则显著提高了对多聚物类和多胺类碳源的利用。

c) 施用含四环素的沼肥改变了土壤酶活性,随着施肥时间的延长,该影响逐渐消失。

d) 含高浓度四环素的沼肥显著增加了小白菜幼苗期土壤中四环素类抗性基因的相对丰度;无论沼肥中是否添加四环素,施肥后小白菜内生菌中均存在抗性基因,*tetW*的相对丰度最高。

参考文献(References):

- [1] 何金华.堆肥对畜禽养殖废物中磺胺类药物的降解研究[D].

- 长沙:湖南农业大学,2012;3.
- [2] SARMAH A K, MEYER M T, BOXALL A B A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment[J]. *Chemosphere*, 2006, 65(5): 725-759.
- [3] ALCOCK R E, SWEETMAN A, JONES K C. Assessment of organic contaminant fate in waste water treatment plants. I: selected compounds and physicochemical properties [J]. *Chemosphere*, 1999, 38(10): 2247-2262.
- [4] 张树清, 张夫道, 刘秀梅, 等. 规模化养殖畜禽粪主要有害成分测定分析研究[J]. *植物营养与肥料学报*, 2005, 6(6): 822-829.
- ZHANG Shuqing, ZHANG Fudao, LIU Xiumei, *et al.* Determination and analysis on main harmful composition in excrement of scale livestock and poultry feedlots [J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2005, 6(6): 822-829.
- [5] GUO Bin, YAO Lixian, LIU Zhongzhen, *et al.* Environmental residues of veterinary antibiotics in Guangzhou City, China [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(5): 938-945.
- [6] DÍAZ-CRUZ M S, ALDA M J L D, BARCELÓ D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge [J]. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, 2003, 22(6): 340-351.
- [7] RICHARDSON B J, LAM P K S, MAETIN M. Emerging chemicals of concern: pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Asia, with particular reference to Southern China [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2005, 50(9): 913-920.
- [8] RYSZ M, ALVAREZ P J J. Amplification and attenuation of tetracycline resistance in soil bacteria: aquifer column experiments [J]. *Water Research*, 2004, 38(17): 3705-3712.
- [9] PRUDEN A, PEI R, STORTEBOOM H, *et al.* Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in Northern Colorado [J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(23): 7445-7450.
- [10] CHENG Weixiao, CHEN Hong, SU Chao, *et al.* Abundance and persistence of antibiotic resistance genes in livestock farms: a comprehensive investigation in eastern China [J]. *Environment International*, 2013, 61(4): 1-7.
- [11] WU Nan, QIAO Min, ZHANG Bing, *et al.* Abundance and diversity of tetracycline resistance genes in soils adjacent to representative swine feedlots in China [J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(18): 6933-6939.
- [12] 邹世春, 李青, 贺竹梅. 禽畜养殖场土壤抗生素抗性基因污染的初步研究[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2012, 51(6): 87-91.
- ZOU Shichun, LI Qing, HE Zhumei. A Preliminary study on the tetracycline resistance genes in the livestock soil, South China [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2012, 51(6): 87-91.
- [13] 周启星, 罗义, 王美娥. 抗生素的环境残留、生态毒性及抗性基因污染[J]. *生态毒理学报*, 2007, 2(3): 243-251.
- ZHOU Qixing, LUO Yi, WANG Mei'e. Environmental residues and ecotoxicity of antibiotics and their resistance gene pollution: a review [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2007, 2(3): 243-251.
- [14] 王丽梅, 罗义, 毛大庆, 等. 抗生素抗性基因在环境中的传播扩散及抗性研究方法[J]. *应用生态学报*, 2010, 21(4): 1063-1069.
- WANG Limei, LUO Yi, MAO Daqing, *et al.* Transport of antibiotic resistance genes in environment and detection methods of antibiotic resistance [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2010, 21(4): 1063-1069.
- [15] 魏宝阳, 曹亮, 李顺祥, 等. 内生菌与药用植物的关系及对次生代谢产物的影响[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(19): 83-88.
- WEI Baoyang, CAO Liang, LI Shunxiang, *et al.* The role of endophytes in medical plants and the effect of endophytes on secondary metabolites [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(19): 83-88.
- [16] JOHNSTON L M, JAYKUS L A. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species isolated from produce [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2004, 70(5): 3133-3137.
- [17] 郑京平. 水果、蔬菜中维生素 C 含量的测定: 紫外分光光度快速测定方法探讨[J]. *光谱实验室*, 2006, 23(4): 731-735.
- [18] 赵杰. 紫外可见分光光度法测定白菜中硝酸盐含量[J]. *安徽农业科学*, 2014, 42(27): 9553-9554.
- ZHAO Jie. Determination of nitrate in vegetables by ultraviolet spectrophotometry method [J]. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2014, 42(27): 9553-9554.
- [19] CLASSEN A T, BOYLE S I, HASKINS K E. Community-level physiological profiles of bacteria and fungi: plate type and incubation temperature influences on contrasting soils [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, 44(3): 319-328.
- [20] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1986: 294-323.
- [21] 罗胜联. 一种应用于群落分析的植物内生菌基因组总 DNA 提取及纯化方法: 中国, 201010602185. 5[P]. 2011-09-07.
- [22] AMINOV R I, CHEE-SANFORD J C, GARRIGUES N, *et al.* Development, validation, and application of PCR primers for detection of tetracycline efflux genes of gram-negative bacteria [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2002, 68(4): 1786-1793.
- [23] PEI R, KIM S C, CARLSON K H, *et al.* Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG) [J]. *Water Research*, 2006, 40(12): 2427-2435.
- [24] MIGLIORE L, GODEAS F, FILIPPIS S P D, *et al.* Hormetic effect(s) of tetracyclines as environmental contaminant on *Zea mays* [J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158(1): 129-134.
- [25] 金彩霞, 陈秋颖, 刘建军, 等. 两种常用兽药对作物发芽的生态毒性效应[J]. *环境科学学报*, 2009, 29(3): 619-625.
- JIN Caixia, CHEN Qiuying, LIU Junjun, *et al.* The eco-toxicological effect of two common veterinary drugs on crop germination [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2009, 29(3): 619-625.
- [26] 胡桂兵, 陈大成, 郑启发, 等. 抗生素对台湾青枣茎段和愈伤组织生长的影响[J]. *华南农业大学学报*, 2001, 22(2): 21-23.

- HU Guibing, CHEN Dacheng, ZHENG Qifa, *et al.* Effect of antibiotics on growth of stem segments and callus of Ber (*Ziziphus mauritiana* Lam.) [J]. Journal of South China Agricultural University, 2001, 22(2): 21-23.
- [27] CHOI K H, DOBBS F C. Comparison of two kinds of Biolog micro plates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities [J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 36(3): 203-213.
- [28] 张健, 关连珠. 猪粪中3种四环素类抗生素在土壤中的动态变化及降解途径[J]. 植物营养与肥料学报, 2013, 19(3): 727-732.
- ZHANG Jian, GUAN Lianzhu. Dynamics and mechanism of degradation of three tetracycline antibiotics from pig manures in soil [J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2013, 19(3): 727-732.
- [29] 吴楠, 乔敏, 朱永官. 猪场土壤中5种四环素抗性基因的检测和定量[J]. 生态毒理学报, 2009, 5(4): 705-710.
- WU Nan, QIAO Min, ZHU Yongguan. Quantification of five tetracycline resistance genes in soil from a swine feedlot [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2009, 5(4): 705-710.
- [30] 杨风霞, 毛大庆, 罗义, 等. 环境中抗生素抗性基因的水平传播扩散[J]. 应用生态学报, 2013, 24(10): 2993-3002.
- YANG Fengxia, MAO Daqing, LUO Yi, *et al.* Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the environment [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2013, 24(10): 2993-3002.
- [31] ZHANG Yuping, SNOW D D, DAVID P, *et al.* Intracellular and extracellular antimicrobial resistance genes in the sludge of livestock waste management structures [J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(18): 10206-10213.
- [32] AHMED M B M, ANUSHKA U R, JUNG E L, *et al.* Distribution and accumulative pattern of tetracyclines and sulfonamides in edible vegetables of cucumber, tomato, and lettuce [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2014, 63(2): 398-405.
- [33] 魏子艳, 王金花, 夏晓明, 等. 三种抗生素对蔬菜种子芽与根伸长的生态毒性效应[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(2): 237-242.
- WEI Ziyang, WANG Jinhua, XIA Xiaoming, *et al.* Ecotoxicity of three antibiotics to shoots and root elongation of cucumber, rape and Chinese cabbage [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2014, 33(2): 237-242.
- [34] 魏瑞成, 邵明诚, 陈明, 等. 金霉素和4-差向金霉素对油菜生长的影响及其在幼苗体内的积累[J]. 农业环境科学, 2012, 31(7): 1289-1295.
- WEI Ruicheng, SHAO Mingcheng, CHEN Ming, *et al.* Effects of chlortetracycline and 4-epi-chlortetracycline on the growth of rape and its accumulation in seedling [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2012, 31(7): 1289-1295.
- [35] TOLLS J. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review [J]. Environmental Science & Technology, 2001, 35(17): 3397-3406.
- [36] MIGLIORE L, COZZOLINO S, FIORI M. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants [J]. Chemosphere, 2003, 52(7): 1233-1244.
- [37] BRADEL B G. Remission of the free-branching pattern of euphorbia pulcherrima by tetracycline treatment [J]. Journal of Phytopathology, 2000, 148(11/12): 587-590.
- [38] 席劲瑛, 胡洪营, 钱易. Biolog 方法在环境微生物群落研究中的应用[J]. 微生物学报, 2003, 43(1): 138-141.
- XI Jinying, HU Hongying, QIAN Yi. Application of biolog system in the study of microbial community [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2003, 43(1): 138-141.
- [39] 陈智学, 谷洁, 高华, 等. 土霉素对堆肥过程中酶活性和微生物群落代谢的影响[J]. 生态学报, 2013, 33(21): 6957-6966.
- CHEN Zhixue, GU Jie, GAO Hua, *et al.* Effect of oxytetracycline (OTC) on the activities of enzyme and microbial community metabolic profiles in composting [J]. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(21): 6957-6966.
- [40] 金兰淑, 申龙, 刘艳茹, 等. 鸡粪与四环素对土壤脲酶和磷酸酶活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(5): 986-990.
- JIN Lanshu, SHEN Long, LIU Yanru, *et al.* Effect of chicken manure and tetracycline on soil urease and phosphatase activity [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2013, 32(5): 986-990.
- [41] 刘吉强, 诸葛玉平, 崔丽娜. 外源四环素对土壤酶活性和油菜品质的影响[J]. 应用生态学报, 2009, 20(4): 943-948.
- LIU Jiqiang, ZHUGE Yuping, CUI Lina. Effects of exogenous tetracycline on rape soil enzyme activity and rape quality [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2009, 20(4): 943-948.
- [42] 徐冰洁, 罗义, 周启星, 等. 抗生素抗性基因在环境中的来源、传播扩散及生态风险[J]. 环境化学, 2010, 29(2): 169-178.
- XU Bingjie, LUO Yi, ZHOU Qixing, *et al.* Sources, dissemination, and ecological risks of antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment [J]. Environmental Chemistry, 2010, 29(2): 169-178.
- [43] MARTI R, SCOTT A, TIEN Y C, *et al.* The impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2013, 79(18): 5701-5709.
- [44] JI Xiuling, SHEN Qunhui, LIU Fang, *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(20): 178-185.
- [45] JOY S R, LI X, SNOW D D, *et al.* Fate of antimicrobials and antimicrobial resistance genes in simulated swine manure storage [J]. Science of the Total Environment, 2014, 481(2): 69-74.
- [46] WANG Fenghua, QIAO Min, CHEN Zheng, *et al.* Antibiotic resistance genes in manure-amended soil and vegetables at harvest [J]. Journal of Hazardous Materials, 2015, 299: 215-221.

(责任编辑:周巧富)