

DOI: 10.11766/trxb202002200514

陈欣瑶, 肖祖飞, 祝妍华, 武剑, 华倩雯, 张园. 铜和强力霉素复合污染对土壤微生物与酶活性的影响[J]. 土壤学报, 2021, 58 (4): 957–967.

CHEN Xinyao, XIAO Zufei, ZHU Yanhua, WU Jian, HUA Qianwen, ZHANG Yuan. Impacts of Combined Pollution of Copper and Doxycycline on Activities of Soil Microbes and Enzymes[J]. Acta Pedologica Sinica, 2021, 58 (4): 957–967.

铜和强力霉素复合污染对土壤微生物与酶活性的影响*

陈欣瑶^{1, 2}, 肖祖飞¹, 祝妍华³, 武 剑¹, 华倩雯¹, 张 园^{1†}

(1. 苏州科技大学环境科学与工程学院, 江苏苏州 215009; 2. 苏州工业园区环境监测站, 江苏苏州 215027; 3. 苏州高新区环境监测大队, 江苏苏州 215000)

摘 要: 当前土壤环境中重金属和抗生素的广泛共存及二者复合存在所诱导出的细菌抗性, 与单一物质的污染相比, 均能够加剧对土壤质量和作物安全的破坏。在实验室模拟培养条件下, 向土壤中加入不同浓度的重金属(铜)和抗生素(强力霉素), 探讨抗生素和重金属复合污染对土壤微生物呼吸、脲酶、蔗糖酶和过氧化氢酶活性和四环素抗性基因的丰度等土壤微生物指标的影响。结果显示, 在整个培养期(30 d)内, 铜和强力霉素单一及复合污染均会显著抑制土壤微生物呼吸强度, 对脲酶活性主要表现为促进作用, 对蔗糖酶、过氧化氢酶活性主要为抑制作用, 对过氧化氢酶活性的抑制强度明显大于蔗糖酶。综合而言, 铜和强力霉素的复合污染相对于单一污染对上述微生物指标的影响较大, 强力霉素的加入可以促进铜对微生物呼吸或酶活性的初始影响。此外, 该研究还表明添加为 400 mg·kg⁻¹ 铜可以提高强力霉素在土壤培养中后期诱导的抗性基因相对丰度的能力水平。本研究从微生物角度定量探讨铜与强力霉素单一及复合污染对土壤微生物指标的影响程度, 以期为重金属与抗生素协同污染的土壤构建微生物预警体系, 并为土壤修复和风险评估工作提供理论依据。

关键词: 强力霉素; 铜; 土壤微生物呼吸; 酶活性; 抗生素抗性基因

中图分类号: X53 **文献标志码:** A

Impacts of Combined Pollution of Copper and Doxycycline on Activities of Soil Microbes and Enzymes

CHEN Xinyao^{1, 2}, XIAO Zufei¹, ZHU Yanhua³, WU Jian¹, HUA Qianwen¹, ZHANG Yuan^{1†}

(1. School of Environmental Science and Engineering, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou, Jiangsu 215009, China; 2. Environmental Monitoring Station of Suzhou Industrial Part, Suzhou, Jiangsu 215027, China; 3. Environmental Monitoring Brigade of Suzhou High-tech District, Suzhou, Jiangsu 215000, China)

Abstract: 【Objective】 Nowadays, more attention should be paid to the situation of agricultural environment and the quality and safety issues of agricultural produces because more and more various pollutants are entering into the agricultural soil. Among the

* 国家自然科学基金青年项目(41701564)、苏州市科技计划项目(SNG201613)和江苏省高校自然科学基金(17KJB610010)共同资助
Supported by the Youth Program of National Natural Science Foundation of China (No. 41701564), the Suzhou Science and Technology Plan Program (No. SNG201613), and the Natural Science Foundation of Higher Education institutions of Jiangsu Province (No. 17KJB610010)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: yuanzhang_1001@mail.usts.edu.cn

作者简介: 陈欣瑶(1995—), 女, 安徽宿州人, 硕士研究生, 主要从事土壤污染及其修复研究。E-mail: chenxinyao_1995@163.com

收稿日期: 2020-02-20; 收到修改稿日期: 2020-04-20; 网络首发日期(www.cnki.net): 2020-12-01

pollutants, heavy metals and antibiotics are two of the most important types of pollutants in the farmland soil. In this study, soil microorganisms are used as indicators to illustrate impacts of combined pollution of heavy metals and antibiotics on soil environment. 【Method】An in-lab analogue incubation experiment was conducted in this study, with the soil spiked with doxycycline (DOX, 0, 8 and 15 mg·kg⁻¹) and copper (Cu, 0, 100 and 400 mg·kg⁻¹), singly or combinedly, at a varying rate as the representative pollutants of antibiotic and heavy metal, respectively. Effects of the pollutants on respiration of soil microbes, activities of soil enzymes, like urease, sucrase and catalase, and abundance of *tet* ARGs (tetracycline-resistance genes) were investigated. 【Result】Results show that throughout the whole incubation period (30 days), the pollution of DOX and Cu, either singly or combinedly, inhibited significantly respiration of soil microbes in intensity, and activities of sucrase and catalase, but stimulated that of urease, and the effect was apparently catalase than on sucrase. To sum up, the effects of combined pollutions is much higher than that of single pollutions and the addition of DOX stimulated the initial effect of Cu on respiration of soil microbes or activities of soil enzymes. Correlation analysis shows that the activity of catalase/urease was significantly and negatively related to Cu concentration and urease activity significantly and negatively correlated with sucrase activity. Besides, it was also found that the total relative abundance of four types of antibiotic resistance genes (ARGs) decreased first and then turned backwards, which was probably owing to the time lag of about 7-15 days the soil system needs to adapt and age after the addition of the pollutants. Compared with other treatments, the addition of high concentrations of Cu and DOX significantly increased the abundance of ARGs at the mid- and late-stages of the incubation, especially the relative abundance of *tetA* and *tetW*. The addition of a high concentration (400 mg·kg⁻¹) of Cu improved the ability of DOX to induce high relative abundance of *tet* ARGs. 【Conclusion】All the findings in this study indicate that combined pollution of Cu and DOX has dramatic impacts on functions of the soil microbial system.

Key words: Doxycycline; Copper; Soil microbial respiration; Enzyme activity; Antibiotic resistance genes

农业土壤污染已成为当前亟待解决的问题之一,多种污染物在土壤共存并互相作用促使土壤污染趋于多样化和复杂化,导致复合污染逐渐成为土壤污染的研究重点^[1-2]。其中重金属(包括Cu、Zn)和抗生素常被广泛应用为饲料添加剂^[3-6],但二者的施用可能导致特定微生物对其敏感性降低,减少畜禽对其他抗菌药物的易感性^[4, 6-7]。粪便改良农田可能具有加快土壤中抗生素和重金属共存积累和刺激土壤菌群抗生素抗性基因(Antibiotic resistance genes, ARGs)传播转移的风险^[2, 7-10],使土壤成为重金属、抗生素和ARGs的重要储存库之一,进而增加农作物和蔬菜的潜在健康风险^[9-12]。此外,土壤生物活动主要由生态系统最重要组分之一的微生物来控制,从而导致微生物活性、多样性、群落结构和酶活性等常被建议作为土壤生态系统功能的评价指标^[1, 6, 13-15]。

相关研究表明,重金属污染会明显影响土壤微生物、酶的活性,且不同类型、浓度重金属对土壤微生物多种功能的影响效果也会显现出较大差异性^[16-17]。低浓度抗生素能促进土壤微生物呼吸,而环境浓度抗生素则不会显著影响微生物呼吸^[18-19]。抗生素与

重金属的络合、交互可能会对土壤微生物造成更大的毒性影响^[4, 9, 11]。刘爱菊等^[20]发现磺胺甲基嘧啶与Cu低剂量复合可能诱导土壤微生物对二者产生交互抗性,而高剂量复合污染则可能显著性地协同抑制土壤微生物生态功能。此外,环境中抗生素和重金属的释放均能够促进ARGs丰度增加;重金属与抗生素耐药性的传播间存在一定的联系^[20-22]。Knapp等^[21]对苏格兰土壤分析表明,土壤Cu浓度与*tetM/W*、*bla_{OXA}*、*ermB/F*丰度有显著性相关关系。Cheng等^[22]发现种植蔬菜、黑麦草土壤中*tet* ARGs丰度与四环素类抗生素浓度显著相关。

目前,国内外针对抗生素与重金属复合污染的研究所选取的抗生素类型多是青霉素、四环素、土霉素等,对强力霉素(Doxycycline, DOX)的研究还比较少^[23-25]。DOX作为兽药因在抗菌效果、口服生物利用度等方面明显优于传统四环素类抗生素,与Cu一样被广泛应用于畜牧养殖业,导致其随畜禽粪便代谢的产物与残留在粪肥改良周围土壤中大量累积^[26]。因此,研究DOX和Cu复合污染对土壤微生物呼吸、酶(脲酶、蔗糖酶和过氧化氢酶)活性、ARGs(*tetA/C/G/M/W/X*)丰度等土壤生态指标的影响,以

期为土壤重金属和抗生素复合污染的生态风险评估和微生物预警体系建立等工作提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试土壤样品为南京农业大学（32°01'46"N，118°50'22"E）采集的非农用裸土，随机选择三个间隔 10 m 的地块（范围 0.5 m×0.5 m），去除 1 cm 表层土，收集 1~20 cm 土壤，风干研磨过 2 mm 筛备用^[14-15]。土壤 Cu 背景值为 47.71 mg·kg⁻¹，pH 为 5.48±0.23，总有机碳为 18.61±0.57 mg·kg⁻¹，全氮为 1.19±0.21 mg·kg⁻¹，碳氮比为 21.48±0.42，CEC 为 23.12±0.74 mol·kg⁻¹。pH 采用 PHS-3E 测定，土水比 1：5（w/v）；全碳、全氮采用元素分析仪测定；CEC

采用乙酸铵交换法测定^[14-15, 27]。

1.2 实验设计

土壤样品分为三部分，加入并充分混合氯化铜溶液，使土壤中添加的 Cu 分别为 0、100 和 400 mg·kg⁻¹（以下记作 Cu0、Cu100 及 Cu400），土壤含水量调整为 18%，然后在 25℃下活化 48 h。将三个上述 Cu 处理的土壤分为三部分，加入 DOX 溶液（98%美国药典级）使其浓度分别为 0、8 和 15 mg·kg⁻¹（以下记作 DOX0、DOX8 及 DOX15），调整含水量至 25%^[15, 27]。将处理后土壤样品放入宽口塑料瓶中，纤维膜密封，确保通风，减少水分蒸发，期间保持 25℃和 25%含水率恒温恒湿培养^[14-15, 27]。分别在培养 1、3、7、15、22、30 d 分析土壤微生物指标，不添加外源污染物的土壤定义为 CK 空白对照，处理方式及其标记见表 1。

表 1 外源污染物的添加浓度与处理组的标记方式

Table 1 Concentration of exogenous pollutants added and labeling of the treatments

处理编号 Treatment	处理标记 Label of the treatment	污染物浓度 Pollutants concentration / (mg·kg ⁻¹)	
		铜 Cu	强力霉素 DOX
CK	Cu0+DOX0	0	0
A-1	Cu0+DOX8	0	8
A-2	Cu0+DOX15	0	15
B-0	Cu100+DOX0	100	0
B-1	Cu100+DOX8	100	8
B-2	Cu100+DOX15	100	15
C-0	Cu400+DOX0	400	0
C-1	Cu400+DOX8	400	8
C-2	Cu400+DOX15	400	15

1.3 微生物呼吸分析

本研究采用底物诱导呼吸速率实验进行土壤样品培养。在培养 1、3、7、15、22、30 d 从各处理组分别称取 12 g 土样于塑料瓶中，加入葡萄糖（30 mg·g⁻¹ 土样）与土壤充分混合以促进微生物呼吸，随后放置装有 5 mL 0.2 mol·L⁻¹ NaOH 的玻璃瓶于塑料瓶中并密封，在 28℃ 恒温培养 12 h，呼吸剩余 NaOH 加入 1.0 mol·L⁻¹ BaCl₂ 溶液后，用 0.05 mol·L⁻¹ HCl 溶液进行滴定^[14-15, 27-28]。分别对各取样点土壤进行底物诱导呼吸速率实验，每次实验设置无土壤空白对照，每组 3 个重复。微生物呼吸

强度（mg·12h⁻¹）的计算公式表示为：

$$\text{微生物呼吸度}=\frac{V\times C}{n\times M\times t}\tag{1}$$

式中，V 为 HCl 溶液的滴定值（L）；C 为盐酸溶液的摩尔浓度（mol·L⁻¹）；n 为 NaOH 吸收溶液相对 HCl 滴定溶液的浓度倍数，取值 4；M 为 CO₂ 分子质量（mg·mol⁻¹）；t 为底物诱导微生物呼吸实验的培养时间，12 h。

1.4 土壤酶活性分析

通过 3,5-二硝基水杨酸比色法测定蔗糖酶活

性,以通过每克干土 24 h 内产生的葡萄糖 (mg) 的量来表示^[28-30]。通过苯酚钠比色法测定脲酶活性,表示为每克土壤 24 h 后残留 $\text{NH}_3\text{-N}$ 的质量 (mg)^[29]。通过高锰酸钾滴定检测过氧化氢酶活性,表示为每克干土 1 h 内小消耗 KMnO_4 体积 (mL)^[30]。

1.5 DNA 提取和定量实时 PCR (qPCR) 分析

对培养 1、7、15、30 d 的土壤样品提取 DNA 进行 ARGs 及微生物群落结构的测定。取约 0.5 g 土壤样品,根据 FastDNA®Spin Kit (MP Biomedical, Santa Ana, California, USA) 提供的实验操作流程提取土壤微生物 DNA。提取的 DNA 用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳,检测提取效果。并用紫外分光光度计 ND-1000 (Nano-Drop, 美国) 测定所提取 DNA 浓度及纯度^[7, 31-32]。提取所得到的有效 DNA 储存于 -20°C 冰箱,以备后续实验使用。

本次研究 ARGs 的测序采样 HT-qPCR, 选用 7 对引物, 包含 6 对 ARGs 引物 (*tetA/C*^[33]、*tetG/M/W/X*^[26]) 和 1 对 16S rRNA gene 引物 (515F 和 907R)^[32]。本实验采用 SmartChip Real-time PCR Systems (WaferGen, 美国) 高通量荧光定量的反应平台。PCR 定量体系为 100 nL (1×LightCycler 480 SYBR Green I Master、1 mg·mL⁻¹ 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)、500 nmol·L⁻¹ 引物以及 5 ng·μL⁻¹ DNA 样品)。混合好的 PCR 体系由 SmartChip 纳米分配器分加到一个待用的 SmartChip 中,将密封 SmartChip 装到 SmartChip 循环仪中运行。ARGs 定量 PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 10 min; 94℃ 变性 40 s, 退火温度对应上述顺序分别为 58、54、68、55、64 及 57℃ 延伸 30 s, 40 个循环, 72℃ 再延伸 10 min, 4℃ 保存^[26]。16S rRNA gene 定量 PCR 反应程序为: 95℃ 5 min; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 72℃ 20 s (40 个循环); 72℃ 4 min; 4℃ 保存^[7]。程序自动升温进行熔解曲线分析根据 SmartChip Real-Time System 的检测限和灵敏度。

将同一样本的 PCR 扩增的产物混合后用 2% 琼脂糖凝胶做电泳检测, 使用 DNA 凝胶回收试剂盒 (天根生化科技 (北京) 有限公司) 切胶回收 PCR 扩增得到的产物, 洗脱; 2% 琼脂糖电泳检测。提取的质粒用紫外分光光度计测定浓度后, 按 10 倍浓度梯度稀释系列 (拷贝数从 $n \times 10^{10}$ 系列稀释至 $n \times 10^2$), 以拷贝数为横坐标, Ct 值为纵坐标制作标准曲线。标准质粒拷贝数 (C_1) 计算公式如下:

$$C_1 = \frac{L \times C}{N \times M \times 10^9} \quad (2)$$

耐药基因拷贝数 (copies·g⁻¹) 的方法如下:

$$\text{耐药基因拷贝数} = \frac{C_1 \times V}{M_1} \quad (3)$$

式中, C_1 为标曲计算所得基因拷贝数 (copies·μL⁻¹); L 为阿弗加德罗常数 (6.02×10^{23}); C 为质粒 DNA 浓度 (ng·μL⁻¹); N 为目标基因的模板长度 (bp); M 为每对 DNA 的平均分子量 660; M_1 为土壤干重 (g); V 为洗脱 DNA 体积 (μL)。

1.6 数据处理

本研究数据统计结果用平均数±标准误 ($M \pm SE$) 表示, 运用 Excel 2016 及 SPSS 24.0 进行数据分析, 影响率 = (处理组 - CK) / CK × 100%。采用方差分析 (One-way ANOVA with LSD 多重方差分析, Kruskal-Wallis test) 进行差异显著性分析, 采用 Pearson 系数进行相关性分析, 显著水平 P 值设为 0.05, 极显著水平 P 值设为 0.01。运用 Origin 2017 进行图像处理。

2 结 果

2.1 铜和强力霉素污染对土壤微生物呼吸的影响

本研究通过室内培养实验测定 DOX、Cu 单一及复合胁迫下土壤微生物呼吸强度, 以此定量表征微生物活性。土壤微生物呼吸强度波动范围为 0.61~16.21 mg·kg⁻¹ (图 1)。研究结果表明不同浓度 DOX 与 Cu 单一及复合污染在培养期内均会显著抑制土壤微生物呼吸强度 ($P < 0.05$), 且对微生物呼吸的抑制作用均在培养 15/22 d 最弱。此外, 对于同一污染类型, 微生物在培养初期 (1 d) 的呼吸强度均大于其在培养终期 (30 d) 的呼吸强度。

DOX 单一污染在培养期会始终抑制对土壤微生物呼吸, 抑制率在培养 1 d 最大。对于 Cu 单一污染, 结果表明 Cu400 处理下微生物呼吸始终保持在较低水平, 而 Cu100 处理下微生物呼吸强度在培养期内虽均低于 CK, 但随培养时间不断恢复增强。

对于 Cu、DOX 复合污染 (见图 1), DOX8/15 (+Cu100) 单一/联合作用时的抑制率均在 1 d 达到

最大,抑制率范围为 81.47%~95.04%,且抑制强度均随时间先降低后加剧,DOX 存在会加剧 Cu100 胁迫对微生物呼吸的抑制,且该抑制作用随 DOX 浓度升高增强。当 DOX8/15+Cu400 作用时,其在培养期间对土壤微生物呼吸维持较高的抑制作用,抑制率始终高于 45%,且 DOX8 会加大 Cu400 对微生物呼吸的抑制作用,而 DOX15 培养期内一度缓解 Cu400 的该毒性作用。

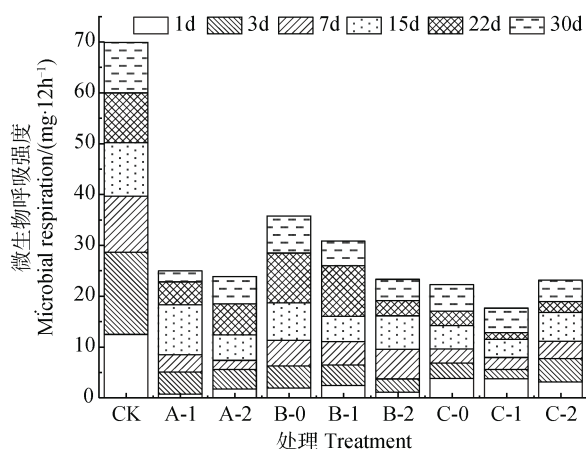


图1 铜和强力霉素单一及复合污染对土壤微生物呼吸的影响

Fig. 1 Impacts of Cu and/or DOX pollution on respiration of soil microbes

2.2 铜和强力霉素污染对土壤酶活性的影响

土壤酶活性常被用来衡量土壤中各种生化反应的动力和强度,是土壤肥力大小的重要标志^[33]。土壤酶活性的改变一定程度可用来判断土壤受污染程度^[26]。由上述污染对土壤微生物呼吸的影响可知,培养 3 d 多为微生物呼吸某一变化趋势的中间节点,故本研究通过在培养 1、7、15、22、30 d 测定脲酶、蔗糖酶及过氧化氢酶活性来比较处理间的效果差异。

由图 2 可知,DOX 单一污染培养期内均能明显促进土壤脲酶活性,激活率随时间逐渐升高,但两者浓度不同造成的激活率差异性不大。Cu100 单一作用能促进脲酶活性;而 Cu400 单一作用对脲酶活性有抑制作用,抑制率在 1 d 达到最大,但脲酶活性随时间能够基本恢复。对于 Cu、DOX 复合污染,其在 1 d 对脲酶活性为弱抑制作用,其中 Cu100+DOX8/15 与 Cu400+DOX8 复合在培养后期对脲酶活性转化为激活作用,但 Cu400+DOX15 处

理后期仍表现出抑制作用。故上述类型污染对脲酶活性在培养期(1~30 d)均主要表现为促进作用,除 Cu400+DOX15 复合胁迫时在培养期对脲酶活性表现出较强的抑制作用,这可能是因为两者高浓度叠加所带来的毒性危害。

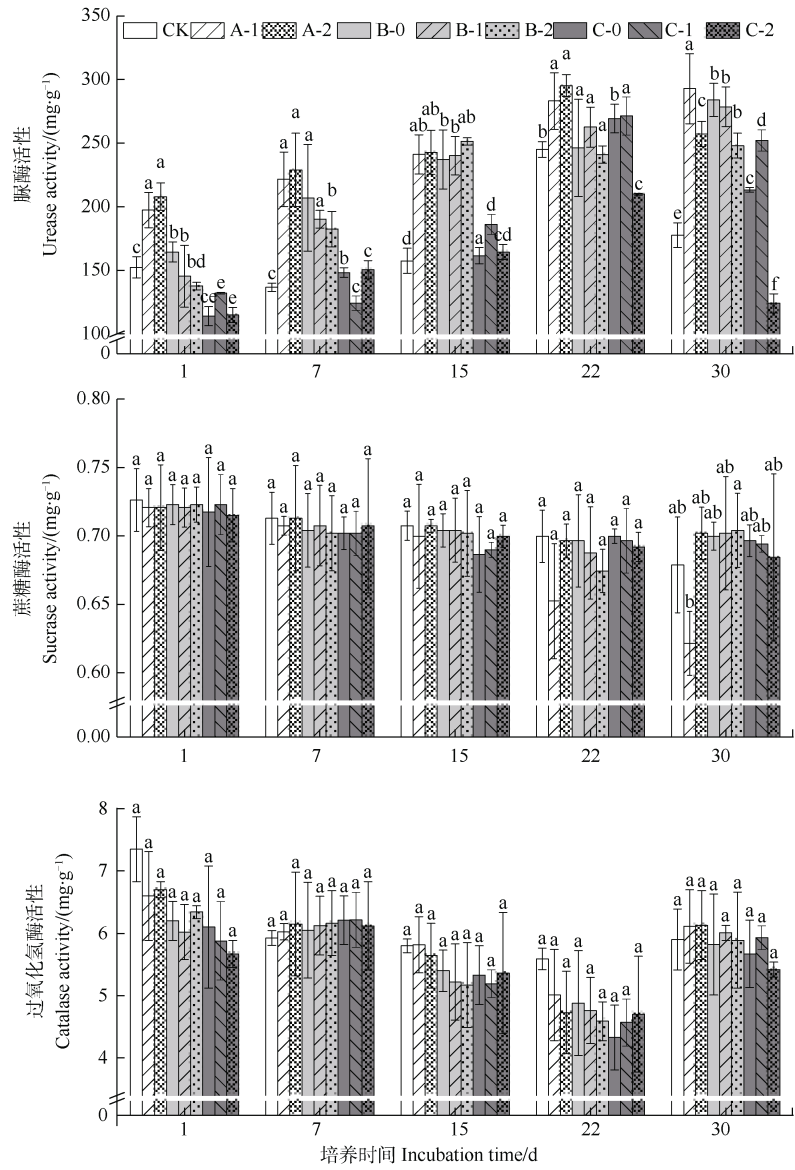
DOX、Cu 单一及复合污染对土壤蔗糖酶活性的影响见图 2。Cu、DOX 单一及复合污染对蔗糖酶在培养期内主要为抑制作用,抑制强度随时间推移逐渐减弱,30 d 基本恢复至初始水平。DOX 单一处理对蔗糖酶活性整体呈抑制作用,DOX8 对蔗糖酶活性的抑制率随时间逐渐增大;DOX15 前期抑制酶活性,终期(30 d)激活蔗糖酶活性。单一 Cu 胁迫及其与 DOX 复合胁迫对蔗糖酶活性均呈现“抑制-激活”趋势。研究还发现 Cu100+DOX8/15 复合作用的修复转折点是 22 d,而 Cu400+DOX8/15 复合作用修复转折点提前,为 15 d。

培养期内,Cu、DOX 单一及复合污染对过氧化氢酶活性主要表现为抑制作用,但该抑制强度要明显大于蔗糖酶(图 2),抑制强度随着培养时间逐渐减弱,且 30 d 基本均恢复至初始水平,即其能在 30 d 内恢复 DOX、Cu 单一及复合污染。培养期各处理方式下土壤过氧化氢酶活性的差异性并不显著,单一 Cu 胁迫使过氧化氢酶活性先降低后增加,激活转折点为 7d,且激活强度相对较弱。复合污染处理中,仅 Cu400+DOX15 在 30 d 仍保持抑制作用,即 DOX 与 Cu 高浓度复合给过氧化氢酶活性带来不可逆毒性影响。

2.3 铜和强力霉素污染对抗生素抗性基因相对丰度的影响

由于本研究对土壤系统中 ARGs 丰度的探究更强调 Cu、DOX 复合污染添加前后对其的影响差异性,但为确保该差异性的产生具有一定的合理性和过渡性,本研究又在培养前期和中期各增加一个检测点,即在培养 1、7、15、30 d 检测并计算各处理中的 6 种 *tet* ARGs 的相对丰度。本研究共检出 *tetA*、*tetC*、*tetG* 及 *tetW* 4 种 ARGs(见图 3)。

图 3 表明,DOX、Cu 单一及复合污染处理下,*tetA* 相对丰度随时间基本呈先降低后增加的趋势,相对丰度最高值出现在培养 1 d 的 CK 空白对照组,复合污染在培养 7 d、15 d 对 *tetA* 相对丰度的抑制大



注：不同小写字母表示同一时间节点不同污染处理方式之间的差异性显著 ($P<0.05$)。Note: Different lowercase letters represent significant differences between different treatments at the same time point ($P<0.05$) .

图 2 铜和强力霉素单一及复合污染对土壤脲酶、蔗糖酶及过氧化氢酶活性的影响
Fig. 2 Impacts of Cu and/or DOX pollution on activities of urease, sucrase and catalase in the soil

于其余污染组。复合污染处理下, *tetW* 相对丰度随时间先增加后降低, 且该基因相对丰度的整体水平偏低与其他基因。此外, 研究发现 Cu400+DOX15 在培养 15 d 其 *tetA*、*tetW* 相对丰度上升约 2 个数量级, 上升幅度远高于该时间点其余处理组。

对于检出的 4 种 ARGs 的总相对丰度 (图 4), 除 DOX8 与 Cu100 外, 其余处理随培养时间的变化趋势为“降低-升高”, 且 ARGs 总相对丰度在培养 1 d 的水平基本均高于其在培养 30 d 的水平, 仅

Cu400+DOX15 复合在培养 30 d 的 ARGs 总相对丰度略高于 1 d; 而对 DOX8、Cu100 两种单一污染, ARGs 总相对丰度随时间的变化趋势为“升高-降低-升高”。上述现象说明 Cu、DOX 单一及复合污染在培养中-后期均有一定的可能性会提高该 *tet* ARGs 的总相对丰度。所有处理中, Cu400+DOX15 复合污染处理能在培养 15 d、30 d 显著提高 ARGs 的总丰度, 且该丰度水平远高于其余处理。此外, 研究发现 *tetA* 丰度对检出 ARGs 总相对丰度的贡献率远大于其他 ARGs (图 3, 图 4)。

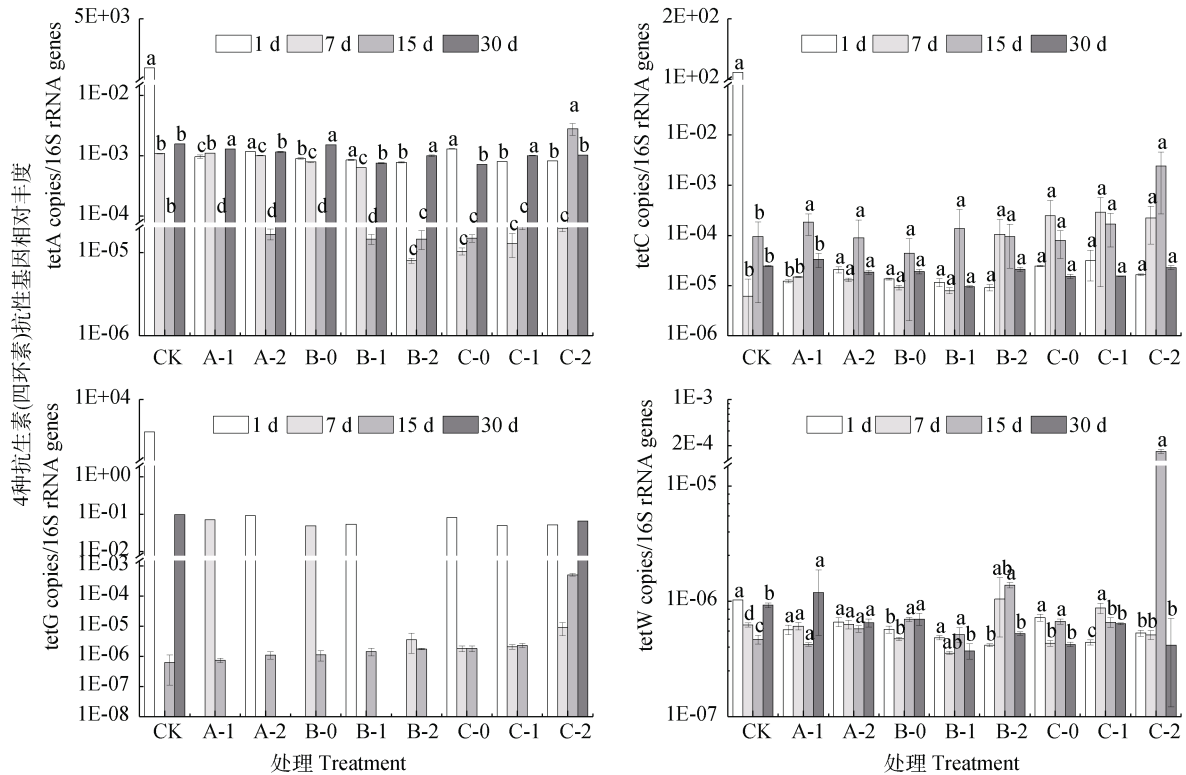


图3 铜和强力霉素单一及复合污染对土壤抗生素抗性基因相对丰度的影响

Fig. 3 Impacts of Cu and/or DOX pollution on relative abundance of tetracycline resistance genes

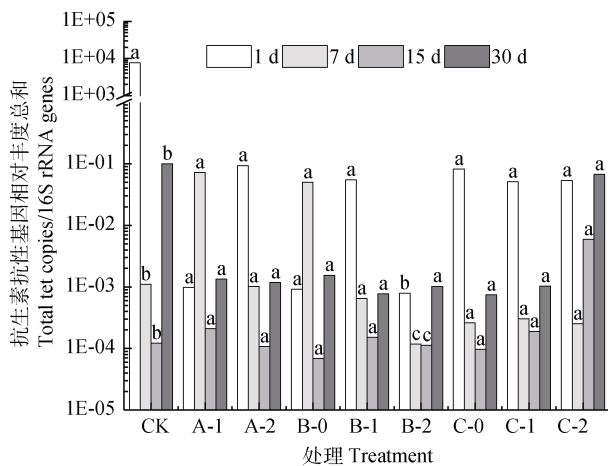


图4 铜和强力霉素单一及复合污染对土壤抗生素抗性基因相对丰度总和的影响

Fig. 4 Impacts of Cu and/or DOX pollution on relative abundance of total tetracycline resistance genes

3 讨论

3.1 铜和强力霉素对土壤微生物呼吸的作用

目前, DOX 和 Cu 广泛应用于治疗各种感染病导致其在畜禽粪便大量累积, 且随着畜禽粪便作为有机肥料施用转移至农业土壤^[20, 26]。本研究中, 强

力霉素和铜单一和复合污染在培养期内均会显著抑制土壤微生物呼吸 ($P < 0.05$) (图 1), 其对微生物呼吸的抑制作用均在培养 15/22 d 表现最弱, 且对于同一污染类型, 微生物在培养末期的呼吸强度大于初期, 这可能是土壤微生物在接受外源污染物时需要 15 d 以上的时间才能逐步适应变化并削弱污染物的负面影响, 以在培养后期维持土壤生态系统的功能稳定^[14-15]。

研究发现, 相对于单一污染, 复合污染在培养期间对微生物呼吸具有更强的抑制作用, 且 Cu400+DOX8/15 复合污染对土壤微生物呼吸的抑制强度大于 Cu100+DOX8/15 (图 1), 这与前人的相关研究结果类似^[8, 19, 34]。这可能是由于复合污染条件下 DOX 能通过官能团与 Cu^{2+} 发生络合反应, 导致 Cu、DOX 与其形成的络合物能加大对土壤微生物的毒性作用, 促使微生物的数量随着 Cu100/400 的添加而降低, 降低幅度随 Cu 浓度增加而增大。另有相关研究表明土霉素、恩诺沙星、磺胺嘧啶与 Cu 复合能明显抑制细菌、真菌和放线菌的数量, 且微生物数量随着 Cu 浓度增加逐渐减少, 能有效支撑上述研究结果^[24]。此外, Cu400+DOX8 复合污染对土壤培养

期间总微生物呼吸的抑制效应大于 Cu400+DOX15, 这可能是由于 Cu400 和 DOX15 的高浓度叠加会使微生物积极维持甚至刺激其呼吸作用, 从而抵御高毒性或高浓度外源污染物的复合污染^[23, 35]。

3.2 铜和强力霉素对土壤酶活性的作用

本研究发现, Cu、DOX 单一污染在培养期内对脲酶活性主要为促进作用, Cu 添加浓度与脲酶活性极显著正相关 ($P<0.01$)。李晓阳^[26]施用含 DOX 粪肥改良土壤发现 DOX 能促进脲酶活性增高, 孟庆峰等^[28]发现低浓度 Cd、Pb 对脲酶活性有促进作用, 一定程度能支持上述结果。Cu、DOX 单一污染对蔗糖酶、过氧化氢酶活性主要为抑制作用, 抑制作用随时间减弱甚至转为激活作用, Cu 添加浓度与过氧化氢酶、蔗糖酶活性均显著负相关 ($P<0.05$, $P<0.01$)。这与闫雷等^[23]发现土壤培养实验中 Cd 对蔗糖酶活性的抑制率随时间先增大后减小, 且 Cu、Cd、Zn 及 Pb 对蔗糖酶、过氧化氢酶活性多表现为抑制作用的结果相似^[36-37]。此外, 有研究发现 OTC、SNR、SM2 及 ENR 等抗生素单一污染对蔗糖酶、过氧化氢酶活性均表现出抑制作用^[36, 38], 支持了本研究 DOX 污染能抑制蔗糖酶、过氧化氢酶活性的结论。

整体而言, 复合污染物对于土壤酶活性的污染效应较单一污染物高 (图 2), 这可能与 DOX 能通过官能团与 Cu^{2+} 发生络合反应, 互相影响并改变其存在形态, 从而使 DOX、Cu 复合时能对土壤酶活性产生协同促进/抑制作用^[36]。研究发现 Cu、DOX 复合污染对脲酶活性多表现为先抑制后促进, 但 Cu400+DOX15 复合胁迫对脲酶活性始终表现出强抑制作用, 这可能是因为两者高浓度叠加会降低土壤脲酶专性微生物的数量、有机质含量等, 导致脲酶难以修复该污染毒性。Cu、DOX 复合污染对蔗糖酶、过氧化氢酶活性表现出抑制作用, 这与前人通过土壤培养发现土霉素与 Cd 复合污染以及 OTC、SNR、SM2 与 Cu 复合污染对蔗糖酶、过氧化氢酶活性均表现出抑制作用, 且抑制强度相较于抗生素单一污染更大的研究结果类似^[23, 36]。但 DOX 和 Cu 对土壤酶活性的复合污染效应, 不管是协同作用还是拮抗作用, 都并非各单一污染物毒性作用的加和, 而是在各污染物间存在着复杂的交互作用, 因此复合污染产生的抑制作用强弱还应与二者的交互作用类型有关, 具体的影响机制有待进一步的研究。

3.3 铜和强力霉素污染条件下土壤微生物对污染物的适应性

本研究发现, 土壤微生物在应对 DOX、Cu 单一与复合外源胁迫时可能需要 7~15 d 的老化适应才能增强土壤微生物诱导产生抗性的能力, 促使 4 种检出 ARGs 总相对丰度整体呈先降低后升高的趋势 (图 4)。此外, 研究中 *tet* ARGs 总丰度最高值出现在 CK-1d (图 4), 这可能是因为培养初期 DOX 与 Cu 的添加带来的环境选择压力会使土壤微生物的数量和结构发生变化, 使抗性基因的潜在宿主减少^[39], 从而导致污染处理组 ARGs 的丰度在培养初期出现短暂降低。

在复合污染中, Cu400+DOX15 复合对 *tet* ARGs 丰度的影响远大于其余处理 (图 4), 高浓度 Cu 的添加在培养中后期具有增强 DOX 诱导产生 ARGs 以提高其相对丰度的潜在能力, 这可能是由于重金属在培养中后期适应环境后, 可以促进金属和抗生素之间的金属桥接功能, 使其能以存在共选择作用等方式降低外源抗生素的选择压力和丰度, 并刺激 ARG 的增加^[9, 40]。de la Iglesia 等^[41]研究发现 As、Cu 等重金属和抗生素的复合污染可以增加环境中 ARGs 的丰度。张佳奇等^[35]总结发现重金属污染地区的 ARGs 丰度随着重金属污染水平增加而增加。Wang 等^[42]类似研究表明恩诺沙星和 Cd 复合污染对氨氧化细菌 *amoA* 基因数的抑制率明显存在时间一效应关系, 且复合污染具有更高的抑制率。Lin 等^[43]表明施肥土壤中 ARGs 丰度上升可能与 Cu、Zn 的积累密切相关。以上研究均有效支撑本文上述结果。

研究还发现, *tetA* 和另三种 *tet* 基因 (*tetC*、*tetG* 和 *tetW*) 的相对丰度存在显著正相关关系 ($P<0.05$), 表明 *tetA* 丰度变化在一定程度上可以表征其余三种抗性因的变化趋势。*tetC* 丰度和 *tetW* 丰度、*tetG* 丰度和 *tet* ARGs 总丰度存在极显著强正相关关系 ($P<0.01$), 其相关系数分别为 0.985 和 0.999, 表明上述两两基因类型在某种程度上可以互相表达其丰度水平, 但这些基因之间是否存在确切的指代关系仍需更多的研究来证明。

4 结 论

土壤培养条件下, Cu 与 DOX 单一及复合污染

会显著抑制土壤微生物呼吸 ($P < 0.05$), 其对脲酶活性主要为促进作用, 对蔗糖酶、过氧化氢酶活性主要表现为抑制作用。相对于单一污染, 复合污染对土壤微生物呼吸、酶活性及抗性基因丰度的影响程度更明显, 其中 Cu400+DOX8 复合对酶活性的影响程度更为明显。此外, 外源 DOX、Cu 添加带来的环境变化在培养初期会使土壤微生物数量和结构发生变化, 使抗性基因的潜在宿主减少, 从而导致培养初期抗性基因丰度会出现短暂降低, 且添加高浓度 Cu 会潜在提高 DOX 在培养终期诱导产生 ARGs 的能力水平, 提高 *tet* 基因的相对丰度。

参考文献 (References)

- [1] Zhou J H, Huang R X, Fan H B, et al. A review on the progresses of remediation technologies for contaminated soil[J]. Research of Soil and Water Conservation, 2016, 23 (3): 366—372. [周际海, 黄荣霞, 樊后保, 等. 污染土壤修复技术研究进展[J]. 水土保持研究, 2016, 23 (3): 366—372.]
- [2] Chen L K, Ma T T, Pan X, et al. Sorption behavior of oxytetracycline in complex contaminated soil and its effects on desorption of heavy metals in the soil[J]. Acta Pedologica Sinica, 2015, 52 (1): 104—111. [陈励科, 马婷婷, 潘霞, 等. 复合污染土壤中土霉素的吸附行为及其对土壤重金属解吸影响的研究[J]. 土壤学报, 2015, 52 (1): 104—111.]
- [3] Bernhardt E S, Palmer M A. The environmental costs of mountaintop mining valley fill operations for aquatic ecosystems of the Central Appalachians[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2011, 1223 (1): 39—57.
- [4] Ji X L, Shen Q H, Liu F, et al. Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai, China[J]. Journal of Hazardous Materials, 2012, 235/236: 178—185.
- [5] 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.
- [6] Poole K. At the nexus of antibiotics and metals: The impact of Cu and Zn on antibiotic activity and resistance[J]. Trends in Microbiology, 2017, 25 (10): 820—832.
- [7] Chen Q L, An X L, Li H, et al. Long-term field application of sewage sludge increases the abundance of antibiotic resistance genes in soil[J]. Environment International, 2016, 92/93: 1—10.
- [8] Xu Y G, Yu W T, Ma Q, et al. The combined effect of sulfadiazine and copper on soil microbial activity and community structure[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2016, 134: 43—52.
- [9] Xue X M, Zhu Y G. Arsenic biotransformation in soils and its relationship with antibiotic resistance[J]. Acta Pedologica Sinica, 2019, 56 (4): 763—772. [薛喜枚, 朱永官. 土壤中砷的生物转化及砷与抗生素抗性的关联[J]. 土壤学报, 2019, 56 (4): 763—772.]
- [10] Kyselková M, Kotrbová L, Bhumibhamon G, et al. Tetracycline resistance genes persist in soil amended with cattle feces independently from chlortetracycline selection pressure[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2015, 81: 259—265.
- [11] Hu X G, Zhou Q X, Luo Y. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, Northern China[J]. Environmental Pollution, 2010, 158 (9): 2992—2998.
- [12] Wang L L, Oda Y, Grewal S, et al. Persistence of resistance to erythromycin and tetracycline in swine manure during simulated composting and lagoon treatments[J]. Microbial Ecology, 2012, 63 (1): 32—40.
- [13] Zielezny Y, Groeneweg J, Vereecken H, et al. Impact of sulfadiazine and chlorotetracycline on soil bacterial community structure and respiratory activity[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2006, 38 (8): 2372—2380.
- [14] Chen X Y, Yang H Z, Chen Q J, et al. Correlation between microbial community structure and soil ecosystem functional stability under heavy metal stress[J]. Environmental Chemistry, 2017, 36 (2): 356—364. [陈欣瑶, 杨惠子, 陈楸健, 等. 重金属胁迫下不同区域土壤的生态功能稳定性与其微生物群落结构的相关性[J]. 环境化学, 2017, 36 (2): 356—364.]
- [15] Chen X Y, Yang H Z, Li M, et al. Mechanism of soil eco-functional stability under pyrene/cadmium simplex and combined pollution stress[J]. Environmental Science, 2017, 38 (1): 352—360. [陈欣瑶, 杨惠子, 李敏, 等. 芘、镉单一及复合污染胁迫下土壤生态功能稳定性的影响机制[J]. 环境科学, 2017, 38 (1): 352—360.]
- [16] Sun X B, Li Y C. Impact of heavy metal pollution on soil animal communities in abandoned coal mine area in Huainan City, Anhui Province[J]. Chinese Journal of Ecology, 2014, 33 (2): 408—414. [孙贤斌, 李玉成. 淮南煤矿废弃地重金属污染对土壤动物群落的影响[J]. 生态学杂志, 2014, 33 (2): 408—414.]
- [17] Tang W. Effects of copper pollution on soil respiration and enzyme activities[D]. Wuhan: Hubei University, 2014. [唐伟. 铜污染对土壤呼吸和酶活性的影响[D]. 武汉: 湖北大学, 2014.]

- [18] Liu W, Wang H, Chen X J, et al. Progress on degradation of antibiotics in environment[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2009, 30 (3): 89—94. [刘伟, 王慧, 陈小军, 等. 抗生素在环境中降解的研究进展[J]. *动物医学进展*, 2009, 30 (3): 89—94.]
- [19] Liu A J, Cao H S, Yang Y, et al. Combinational effects of sulfomethoxazole and copper on soil microbial community and function[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23 (5): 4235—4241.
- [20] Liu A J, Liu M, Li M H, et al. Collaborative effects of Cu and antibiotic on soil microbial activities[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2013, 22 (11): 1825—1829. [刘爱菊, 刘敏, 李梦红, 等. Cu、抗生素协同污染对土壤微生物活性的影响[J]. *生态环境学报*, 2013, 22 (11): 1825—1829.]
- [21] Knapp C W, Callan A C, Aitken B, et al. Relationship between antibiotic resistance genes and metals in residential soil samples from Western Australia[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24 (3): 2484—2494.
- [22] Cheng W X, Li J N, Wu Y, et al. Behavior of antibiotics and antibiotic resistance genes in eco-agricultural system: A case study[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 304: 18—25.
- [23] Yan L, Bi S X, Zhao Q H, et al. Effects of oxytetracycline and Cd pollution on soil respiration and enzyme activity[J]. *Bulletin of Soil and Water Conservation*, 2014, 34 (6): 101—108. [闫雷, 毕世欣, 赵启慧, 等. 土霉素及镉污染对土壤呼吸及酶活性的影响[J]. *水土保持通报*, 2014, 34 (6): 101—108.]
- [24] Wei Z Y. Single and joint toxicity of oxytetracycline, enrofloxacin, sulfadiazine and Cu on soil microorganism[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2014. [魏子艳. 土霉素、恩诺沙星、磺胺二甲嘧啶与铜单一及复合污染对土壤微生物的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.]
- [25] Zhao B Z. Study of the ecology toxic effects of single and combined pollution of Cu and sulfadiazine[D]. Xinxiang, Henan: Henan Normal University, 2012. [赵保真. Cu-磺胺嘧啶单一及复合污染的生态毒性效应研究[D]. 河南新乡: 河南师范大学, 2012.]
- [26] Li X Y. The interaction effects between doxycycline and soil microbial[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2016. [李晓阳. 兽用抗生素强力霉素与土壤微生物的互作效应[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.]
- [27] Zhang Y, Deng H, Xue H J, et al. The effects of soil microbial and physiochemical properties on resistance and resilience to copper perturbation across China[J]. *Catena*, 2016, 147: 678—685.
- [28] Meng Q F, Yang J S, Yao R J, et al. Influence of single and combined pollutions of heavy metal on soil enzyme activity[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2012, 21 (3): 545—550. [孟庆峰, 杨劲松, 姚荣江, 等. 单一及复合重金属污染对土壤酶活性的影响[J]. *生态环境学报*, 2012, 21 (3): 545—550.]
- [29] Zhou L K, Zhang Z M. Determination of soil enzyme activity[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 1980, 11 (5): 37—38, 49. [周礼恺, 张志明. 土壤酶活性的测定方法[J]. *土壤通报*, 1980, 11 (5): 37—38, 49.]
- [30] Zhang L D, Li C R, Liu Y, et al. Effects of different modes of vegetation restoration on soil heavy metal contents and soil enzyme activities: A case study in damaged mountain body in Sibaoshan County, Zibo City, Shandong Province[J]. *Science of Soil and Water Conservation*, 2012, 10 (3): 87—92. [张刘东, 李传荣, 刘云, 等. 植被恢复模式对土壤重金属质量分数和土壤酶活性的影响——以山东省淄博市四宝山破坏山体为例[J]. *中国水土保持科学*, 2012, 10 (3): 87—92.]
- [31] Wang F H. The impact of reclaimed water irrigation and manure application on antibiotic resistance genes in soil[D]. Beijing: University of Chinese Academy of Sciences, 2014. [王凤花. 再生水回用和畜禽粪便施用对土壤中抗生素抗性基因的影响[D]. 北京: 中国科学院大学, 2014.]
- [32] Ouyang W Y, Huang F Y, Zhao Y, et al. Increased levels of antibiotic resistance in urban stream of Jiulongjiang River, China[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99 (13): 5697—5707.
- [33] Lin K F, Xu X Q, Zheng L, et al. Eco-toxicological effects of Ge-pollution on soil enzyme activities in soil[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2005, 42 (1): 106—110. [林匡飞, 徐小清, 郑利, 等. 土壤镉污染对土壤酶活性的生态毒理效应[J]. *土壤学报*, 2005, 42 (1): 106—110.]
- [34] Efthimiadou E K, Sanakis Y, Raptopoulou C P, et al. Crystal structure, spectroscopic, and biological study of the copper (II) complex with third-generation quinolone antibiotic sparfloxacin[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006, 16 (14): 3864—3867.
- [35] Zhang J Q, Xu Y, Luo Y, et al. Co-selection mechanisms of bacterial resistance to heavy metals and antibiotics[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35 (3): 409—418. [张佳奇, 徐艳, 罗义, 等. 重金属协同选择环境细菌抗生素抗性及其机制研究进展[J]. *农业环境科学学报*, 2016, 35 (3): 409—418.]
- [36] Mao S S. Single and joint toxicity of three kinds of antibiotics and copper on soil enzyme activity and microbial community function diversity[D]. Taian, Shandong: Shandong Agricultural University, 2016. [毛书帅. 三种抗生素和铜单一及复合污染对土壤酶和微生物群落功能多样性的影响[D]. 山东泰安: 山东农业大学, 2016.]
- [37] Yang Z X, Liu S Q. Effects of single element and compound pollution of Cd, Zn and Pb on soil enzyme activities[J]. *Soil and Environmental Sciences*, 2000, 9

- (1): 15—18. [杨志新, 刘树庆. Cd、Zn、Pb 单因素及复合污染对土壤酶活性的影响[J]. 土壤与环境, 2000, 9 (1): 15—18.]
- [38] Yan S H. Single and joint toxicity of enrofloxacin and Cd on soil microbial community structure and function[D]. Taian, Shandong: Shandong Agricultural University, 2015. [闫赛红. 恩诺沙星与镉单一及复合污染对土壤微生物群落结构和功能的影响[D]. 山东泰安: 山东农业大学, 2015.]
- [39] Sun Y X. Effects of compost containing cadmium and ciprofloxacin on antibiotic resistance genes and microbial community in lettuce[D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A & F University, 2017. [孙依欣. 含镉和环丙沙星有机肥对生菜中抗性基因及微生物群落的影响[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2017.]
- [40] Zhang B, Wang M M, Wang B, et al. The effects of bio-available copper on macrolide antibiotic resistance genes and mobile elements during tylosin fermentation dregs co-composting[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 251: 230—237.
- [41] de la Iglesia R, Valenzuela-Heredia D, Pavissich J P, et al. Novel polymerase chain reaction primers for the specific detection of bacterial copper P-type ATPases gene sequences in environmental isolates and metagenomic DNA[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 50 (6): 552—562.
- [42] Wang J H, Wang L J, Zhu L S, et al. Individual and combined effects of enrofloxacin and cadmium on soil microbial biomass and the ammonia-oxidizing functional gene[J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 624 (6): 900—907.
- [43] Lin H, Sun W C, Zhang Z L, et al. Effects of manure and mineral fertilization strategies on soil antibiotic resistance gene levels and microbial community in a paddy—upland rotation system[J]. *Environmental Pollution*, 2016, 211: 332—337.

(责任编辑: 卢 萍)