

#### DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20200421001

綦峥, 齐越, 李芳, 等. 畜牧场土壤中重金属与抗生素抗性基因的分布规律研究[J]. 生态毒理学报,2021,16(1):204-214 Qi Z, Qi Y, Li F, et al. Distribution of heavy metals and antibiotic resistance genes in the soil of livestock farms [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(1):204-214 (in Chinese)

## 畜牧场土壤中重金属与抗生素抗性基因的分布规律研究

綦峥<sup>1,\*</sup>,齐越<sup>1,2</sup>,李芳<sup>2</sup>,杨红<sup>1</sup>,张铁林<sup>1</sup>,凌娜<sup>1</sup>

哈尔滨商业大学药物工程技术研究中心,哈尔滨 150076
 哈尔滨海关技术中心,哈尔滨 150028
 收稿日期:2020-04-21
 录用日期:2020-05-30

**摘要:**为研究畜牧场土壤中重金属和抗生素抗性基因(ARGs)的空间分布特点,揭示二者之间的相关性,为后续特色黑土的修 复治理提供基础理论依据。结合 GIS 优化布点,在黑龙江省大庆市杜尔伯特蒙古族自治县某畜牧场园区分别采集内部 10 cm 和 50 cm 深度的土壤。采用原子吸收光谱仪和原子荧光分光光度计检测 8 种重金属含量,用单因子污染指数法和内梅罗综合 污染指数法对重金属进行污染评价;通过实时荧光定量 PCR 技术检测土壤中的 28 种 ARGs,运用 Pearson 分析重金属与 ARGs 的相关性,同时对二者之间的相似性进行聚类分析。10 cm 和 50 cm 土壤的单因子污染指数分析显示,As 均属于重度 污染等级(*P<sub>i</sub>>3*),其他 7 种元素属于安全等级(*P<sub>i</sub>≤1*),内梅罗综合污染指数均属于重度污染等级(*P<sub>i</sub>>3*)。28 种 ARGs 污染分 布差异较大,除 β-内酰胺类 ARGs 随土壤深度的增加污染程度呈增大的趋势,其余都呈减小的趋势;50 cm 土层中 *blaTEM* 的 相对丰度较高,约为 0.65 拷贝数/16S rRNA 基因拷贝数。相关性分析表明,杜蒙园区土壤中 *sul2* 与 *tetX、tetR、tetW、tetC* 和 *tet34* 分别与重金属 Cr、As、Pb 和 Cd 存在一定程度的相关性(*P*<0.05);重金属污染程度较重的 As 和 Cr 对 ARGs 的选择压力相 似。畜牧场中重金属污染严重,ARGs 污染水平亟待推行评价标准,为后续恢复受污染的特色黑土的生态功能提供依据。 关键词: 重金属;抗生素抗性基因;黑土;分布特征

文章编号: 1673-5897(2021)1-204-11 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Distribution of Heavy Metals and Antibiotic Resistance Genes in the Soil of Livestock Farms

Qi Zheng<sup>1,\*</sup>, Qi Yue<sup>1, 2</sup>, Li Fang<sup>2</sup>, Yang Hong<sup>1</sup>, Zhang Tielin<sup>1</sup>, Ling Na<sup>1</sup>
1. Engineering Research Center for Medicine, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China
2. Technology Center of Harbin Customs, Harbin 150028, China
Received 21 April 2020 accepted 30 May 2020

**Abstract**: In order to study the spatial distribution characteristics of heavy metals and antibiotic resistance genes (ARGs) in the soil of livestock farms, reveal whether there is a correlation between the heavy metal and ARGs, and provide the basic theoretical basis for the subsequent restoration and treatment of characteristic black soil. GIS was used to optimize the sampling point design, soil samples both in 10 cm-depth and 50 cm-depth layer were collected in Daqing Duerbert Mongolian Autonomous County, Heilongjiang Province. The contents of eight heavy metals

基金项目:国家自然科学基金资助项目(41702368);黑龙江省自然科学基金资助项目(LH2019D007);黑龙江省省属高等学校基本科研业务 费资助项目(2020CX09; 2020CX10; 2020CX38);中央支持地方高校改革发展基金优秀青年人才项目(2020YQ12)

第一作者:素峥(1981—),女,博士,研究方向为环境毒理学,E-mail: 18645039597@163.com

<sup>\*</sup> 通讯作者(Corresponding author), E-mail: 18645039597@163.com

were detected by atomic absorption spectrometer and atomic fluorescence photometer, and the pollution of heavy metals was evaluated by single factor pollution index and Nemero comprehensive pollution index. Twenty-eight antibiotic resistance genes in soil were detected by real-time fluorescence quantitative PCR, Pearson index was used to analyze the correlation between heavy metals and ARGs, and the similarity between them was analyzed by clustering. In the single-factor pollution index of 10 cm-depth and 50 cm-depth soil, As elements all belong to the heavy pollution level ( $P_i>3$ ), the other 7 elements belong to the safety level ( $P_i \leq 1$ ), and the Nemerow comprehensive pollution index of 10 cm and 50 cm-depth soil all belonged to the heavy pollution level ( $P_{comprehensive}>3$ ). The distribution of 28 antibiotic resistance genes was significantly different, with the exception of  $\beta$ -lactams ARGs showing an increasing trend with the increase of soil depth, and all the others showed a decreasing trend with the increase of soil depth. The relative abundance of *blaTEM* in the 50 cm soil layer was high, approximately 0.65 copies of genes/copies of 16S rRNA genes. Correlation analysis showed that *sul2* and *tetX*, *tetR*, *tetW*, *tetC* and *tet34* were respectively correlated with heavy metals Cr, As, Pb and Cd to a certain extent in the soil of livestock farms (P<0.05). The selective pressure of As and Cr was similar to that of ARGs. Heavy metal pollution is serious in livestock farms, and the standard of ARGs pollution guidelines urgently need to be evaluated. This study can provide reference for restoring the ecological function of polluted black soil in the future.

Keywords: heavy metal; antibiotic resistance genes; black soil; distribution characteristics

抗生素抗性基因 (antibiotic resistance genes, ARGs)在环境中的形成、传播和扩散作为一个新的 全球性污染问题正在引起高度重视<sup>[1]</sup>。抗生素的广 泛使用通常被认为是致病菌中 ARGs 水平升高的主 要原因<sup>[2]</sup>。环境抗生素残留可影响动物肠道菌群<sup>[3]</sup>, 显著增加细菌获得 ARGs 的频率,并通过基因水平 转移(horizontal gene transfer, HGT)加速 ARGs 的传 播,从而使畜禽粪便成为抗生素和 ARGs 的重要储 存库<sup>[4-5]</sup>,然而在我国畜禽粪便利用率不足 50%,含 有 ARGs 的粪肥很容易通过各种途径进入土壤,从 而威胁食物链,引起人类的健康风险,因此土壤被认 为是抗生素残留和 ARGs 的最重要受纳体之一<sup>[6]</sup>。

近年来,使用含有重金属元素的杀虫剂和促进 动物生长剂导致了更广泛的重金属非点源污染<sup>[7-8]</sup>。 越来越多的报道表明,ARGs 的丰度增加还可能是 由于重金属的废物排放,与抗生素不同的是,重金属 作为饲料添加剂广泛应用于畜牧场中,因其不易降 解,在暴露的生物体中会对 ARGs 产生长期的选择 压力,常常促进了 ARGs 在环境细菌种群中的传 播<sup>[9]</sup>。许多试验研究表明,重金属与 ARGs 之间存 在极大的相关性<sup>[10-11]</sup>。Ji 等<sup>[12]</sup>对上海地区 3 个典型 饲料厂采集土壤和肥料样品,发现某些 ARGs 与典 型重金属之间存在显著的相关性(P<0.05),如 sulA 和 sul III 与 Cu、Zn 和 Hg 的浓度水平高度相关。 Wang 等<sup>[13]</sup>在厌氧消化过程中,研究了金霉素和 Cu 对 ARGs 的影响,结果表明,Cu 对 ARGs 有一定的 选择压力,但金霉素和 Cu 共同作用会对 ARGs 有极 大的选择压力,特别是 tetA 和 int I1。Knapp 等<sup>[14]</sup>检 测了澳大利亚的西澳大利亚州的 90 个花园土壤,比 较 12 种重金属和 13 种四环素、内酰胺和磺胺类 AGRs 的相关性,除 Se 和 Co 外,所有重金属在绝 对基因数上与至少一个 ARGs 相关,但 Al、Mn 和 Pb 与多种 ARGs 的相关性显著。已有研究证实, Cu 和 Ni 的暴露增加了土壤中 ARGs 的多样性和 丰度<sup>[15-16]</sup>。

然而很少有研究调查大型畜牧场土壤中重金属 与 ARGs 的关系和分布,因此本研究以杜尔伯特蒙 古族自治县畜牧园区不同深度土壤为研究对象,采 用地理信息系统(Geographic Information System/ Geo-Information system, GIS)模型的空间分析和可 视化功能模拟污染物的污染范围和趋势,以此获得 ARGs 与重金属在畜牧场土壤中的空间分布规律及 相关性。为预测未来 ARGs 和重金属对北方特色黑 土的污染特征提供了理论依据,并为下一步寻找有 效的预防措施奠定基础,同时为相关部门提供基础 数据信息以制定控制 ARGs 污染的监管标准和指导 方针。

#### 1 材料与方法(Materials and methods)

#### 1.1 样品采集

杜尔伯特蒙古族自治县是黑龙江省唯一的少数 民族自治县(以下简称杜蒙)。地处松嫩平原、嫩江 东岸。在地层结构上,以大型杂色砾岩块为主的第

三系太康组和表层 1.0 m 为灰黑色腐殖土、砂砾层 等的第四系组成。在中部、北部和东部地区,经常形 成不同程度的盐化和碱化草甸土壤,因此,杜蒙在具 有我国特色的盐碱化土地上发展畜牧业,使畜牧业 成为杜蒙不可替代的支柱产业。本次研究的畜牧场 面积约7万m<sup>2</sup>,奶牛约200头,是国内某知名奶业 品牌奶源的提供基地。结合 GIS 优化布点,发现初 步调查第1阶段预设采样点与第2阶段实际采样点 因采样区域地貌存在些许偏差,因此10个实际土壤 采样点的布设如图1所示,采样点S01~S08为成牛 的自由活动区, S09 和 S10 为犊牛的自由活动区。 分别在每个采样点采集土壤表面以下 10 cm 和 50 cm的土壤样品各 500 g<sup>[17-18]</sup>。在每个采样点 1 m<sup>2</sup> 内采集3份土壤样品混匀,按照四分法缩减,过0.25 mm(20目)尼龙筛,共20份土壤样品。20份土壤样 品分别均匀分成2部分:一部分土壤过0.15 mm(100 目)筛,自然风干,用于后续重金属含量的测定;另一 部分土壤过 0.25 mm(60 目)筛,-80 ℃保存,用于后 续 DNA 的提取和 ARGs 的测定。样品的基本信息 如表1所示。

1.2 重金属含量的检测

土壤 pH 值的测定采用土壤的去 CO<sub>2</sub> 水悬浮 液,土液比为1:2.5,搅拌静置后用多参数测定仪测 定<sup>[19]</sup>;土壤中的 Cu、Zn、Pb、Ni、Cr 和 Cd 经 HNO<sub>3</sub>-HF-HClO<sub>4</sub>(体积分别为5 mL、2 mL 和1 mL)石墨消 解后用原子吸收光谱仪测定<sup>[20-21]</sup>;Hg 和 As 经(1+1) 王水(1 份硝酸与3 份盐酸混合,去离子水稀释1 倍) 沸水浴后用原子荧光分光光度计测定<sup>[22-23]</sup>;同时进 行空白试样的制备。为保证分析的准确性,对质控 样品(GBW07427)和试验样品进行平行样分析,并确 定了平均值,相对标准偏差<15%。

1.3 DNA 的提取

土壤基因组 DNA 的提取使用快速提取试剂盒 TIANNAMP Soil DNA Kit(DP336,天根生化科技(北京)有限公司,中国),按照说明书要求提取。提取完 毕后,超微量紫外分光光度计(Q3000,Quawell,美国)检测含量及纯度, $A_{260}/A_{280}$ 在 1.8~2.0之间,-80 °C保存,进行后续定量分析。

1.4 ARGs 相对丰度的实时荧光定量 PCR 检测

标准 PCR 定性检测 ARGs 后,采用 StepOne-Plus<sup>™</sup> 实时荧光定量 PCR 仪(Thermo,美国)对 β-内 酰 胺 类 (*ampC2、ampC4、blaOXA1/blaOXA30、 blaOXA10、blaPSE、blaTEM、cfxA*和 *fox5*)、磺胺类 (sul1、sul2 和 sul3)、四环素类(tet32、tet34、tet36、 tetAP、tetB、tetC、tetG、tetM、tetO、tetPA、tetR、tetS、 tetT、tetW、tetX、tetY和 tetZ)共28种 ARGs及16S rRNA 进行靶向定量测定<sup>[24-25]</sup>。qPCR 采用10 µL 体系,包含5 µL 的 TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)(2×),2个引物各0.4 µL,0.2 µL 的 ROX Reference Dye(50×),1 µL 的 DNA 模板以及3 µL 的 ddH<sub>2</sub>O。反应体系为:95℃预变性10 min,95 ℃变性30 s,60 ℃退火30 s,共40个循环, $\Delta C_{T}$ 方 法计算 ARGs 的相对丰度。每个样品设置3个平行 样,同时做空白对照。



图1 采样点分布图



表1 样品编号和精确采样经纬度

 Table 1
 Sample numbers and sampling longitudes and latitudes

	样品编号			
采样点	(10 cm/50 cm)	经纬度		
Sampling points	Sample numbers	Latitude and longitude		
	(10 cm/50 cm)			
S01	T01/T11	N46.846332°, E124.604995°		
S02	T02/T12	N46.846246°, E124.604802°		
S03	T03/T13	N46.846060°, E124.604645°		
S04	T04/T14	N46.846053°, E124.604409°		
S05	T05/T15	N46.846610°, E124.604452°		
S06	T06/T16	N46.846417°, E124.604038°		
S07	T07/T17	N46.846817°, E124.604338°		
S08	T08/T18	N46.846546°, E124.603874°		
S09	T09/T19	N46.846481°, E124.602967°		
S10	T10/T20	N46.846353°, E124.603082		

### 1.5 数据分析

采用 ArcGIS 10.4.1 软件绘制重金属和 ARGs 空间污染云图,分析重金属和 ARGs 垂直、水平污染 空间分布特征;利用 Cluster 3.0 和 Java Treeview 软 件绘制热图,对比分析重金属对 ARGs 的选择压力 是否存在差异;采用 SPSS 23.0 对重金属和 ARGs 进行 Pearson 相关性分析;应用 Origin 2017 绘图软件 进行堆积柱状图的绘制。

#### 2 结果与讨论(Results and discussion)

#### 2.1 不同土层中重金属污染情况及污染评价

对不同土层样品进行 pH 值测定,结果所有样品 pH>8;对10 cm 和50 cm 土壤深度的 Cu、Zn、Pb、Ni、 Cr、Cd、Hg 和 As 含量进行描述性分析,统计结果如 表2 所示。以国家土壤环境质量农用地土壤污染风 险管控标准值(pH>7.5)为评价基准,采用单因子污染 指数法<sup>[26]</sup>和内梅罗综合污染指数法<sup>[27]</sup>对杜蒙园区土 壤重金属(10 cm 和50 cm)污染状况进行评价,并与黑 龙江省土壤重金属含量背景值进行对比。污染程度 等级为:单因子污染指数  $P_i \leq 1$  为不存在污染;  $P_i \geq 3$  为重度污染,内梅罗综合指数法  $P_{ss} \geq 3$  为重度污染。 由表 2 可知,检测的 As、Zn、Cu、Cr、Cd、Ni、Pb 和 Hg 这 8 种重金属中,As 处于重度污染,其余 7 种重金属 均为安全等级,其中,50 cm 土层的 As 的单因子污染 指数最高,达到 7.74,远高于其他 7 种重金属。从超 标率来看,10 cm 和 50 cm 的 As 远远高于黑龙江土 壤背景值<sup>[28]</sup>7.3 mg·kg<sup>-1</sup>和 11.4 mg·kg<sup>-1</sup>,10 cm 的 Zn 超背景值 1.26 倍,10 cm 的 Cd 超背景值 1.06 倍,且超 标率均  $\geq 60\%$ ,表明杜蒙畜牧园区土壤可能已受这 3 种重金属污染。内梅罗综合污染指数法的公式为:

$$P_{\rm kin} = \sqrt{\frac{P_{\rm imax}^2 + P_{\rm iave}^2}{2}}$$

式中: $P_{is}$ 为内梅罗综合污染指数; $P_i$ 为单因子污染 指数; $P_{imax}$ 为各重金属元素单因子污染指数的最大 值; $P_{iave}$ 为各重金属元素单因子污染指数的平均值。  $P_{is10 \text{ cm}} = 4.608 \ P_{is50 \text{ cm}} = 5.526$ ,同样表明杜蒙畜牧园 区土壤重金属污染已达到重度污染等级。

重金属 Metal	土壤 深度/cm Soil depth/cm	最大值 /(mg·kg <sup>-1</sup> ) Max /(mg·kg <sup>-1</sup> )	最小值 /(mg·kg <sup>-1</sup> ) Min /(mg·kg <sup>-1</sup> )	平均值±标准差 /(mg·kg <sup>-1</sup> ) Average± standard deviation /(mg·kg <sup>-1</sup> )	黑龙江土壤背景值 /(mg·kg <sup>-1</sup> ) Background value of Heilongjiang soils/(mg·kg <sup>-1</sup> )	[ 标准值 /(mg·kg <sup>-1</sup> ) Standard values /(mg·kg <sup>-1</sup> )	单因子污染指数 (P <sub>i</sub> ) Single factor pollution index (P <sub>i</sub> )	数 变异系数 Coefficient of variation	超标率/% Qver-limit ratio/%
As	10	259.76	5.59	161.25±92.44	7.3	25	6.45	0.57	80
	50	313.22	6.02	$193.45 \pm 114.03$	11.4	25	7.74	0.59	80
Zn	10	174.60	49.14	$88.73 \pm 41.04$	70.7	200	0.30	0.46	60
	50	72.43	48.19	54.24±7.66	69.9	300	0.18	0.14	10
Cu	10	34.84	11.71	$19.13 \pm 7.28$	20.0	100	0.19	0.38	40
	50	16.20	9.96	$12.83 \pm 1.75$	21.0	100	0.13	0.14	0
Cr	10	78.71	16.15	45.11±19.20	58.6	250	0.18	0.43	20
	50	210.10	30.57	63.52±52.54	59.5	230	0.25	0.83	20
Cd	10	0.14	0.048	$0.091 \pm 0.025$	0.086	0.6	0.15	0.27	60
	50	0.11	0.0008	$0.070 \pm 0.035$	0.078	0.0	0.12	0.50	40
Ni	10	20.83	7.06	15.29±4.51	22.8	100	0.080	0.29	0
	50	50.53	8.26	24.19±11.68	24.3	190	0.13	0.48	40
Pb	10	13.47	3.08	$7.59 \pm 3.70$	24.2	170	0.045	0.49	0
	50	23.62	6.87	$10.51 \pm 5.00$	24.4	170	0.062	0.48	0
Hg	10	0.034	0.012	$0.019 \pm 0.0082$	0.037	2.4	0.0056	0.43	0
	50	0.028	0.011	$0.018 \pm 0.0055$	0.040	5.4	0.0053	0.31	0
	内梅罗纺	合指数		P <sub>综10 cm</sub>		4.608			
Nemerow index				$P_{ m Here 50~cm}$		5.526			

表 2 土壤重金属统计分析 Table 2 Statistical analysis of heavy metals in the soils

变异系数(coefficient of variation, CV)代表样本 中重金属含量的离散性,可反映人为活动对重金属 含量的影响,CV 值越大,说明受人为活动的干扰越 明显。Wilding<sup>[29]</sup>发现,CV<0.15 为轻度变异,0.15< CV<0.36 为中等变异,CV>0.36 为高度变异。在这 8 种重金属中,As、Cr 和 Pb 的变异系数均高于0.36, 说明土壤中 As、Cr 和 Pb 受外界干扰显著,空间分 散程度较大,很大程度上归结为畜牧业和交通等人 为活动的影响。

2.2 不同土层中重金属的空间分布特征

利用 ArcGIS 对土壤重金属进行反距离加权插 值,绘制杜蒙畜牧园区 10 cm 和 50 cm 土壤中 8 种 重金属空间分布云层图。由图 2 可知,8 种重金属 的分布差异较大,但仍存在一定的规律性。垂直剖



图 2 不同土层中重金属的空间分布图

注:同一元素,(a)图 10 cm 深土层,(b)图 50 cm 深土层。

Fig. 2 Spatial distribution of heavy metals in the different depths of soil Note: For the same element, (a) 10 cm-depth soil layer, (b) 50 cm-depth soil layer.

面分析来看,As、Hg、Cr、Ni 和 Pb 由上至下呈逐渐 增大的污染特征,但Cu、Zn和Cd随着土壤深度的 增加由上至下呈逐渐减小的污染特征,很大程度上 与牧场园区使用动物生长剂有关<sup>[30]</sup>,这与阮心玲 等<sup>[31]</sup>和梁玉峰等<sup>[32]</sup>研究得出的土壤中 Cu、Zn 和 Cd 更易在表层富集的结论一致。研究表明,多数重金 属不仅易在表层富集,且随着土壤深度的增加会逐 渐迁移及蓄积[33-34]。因此,重金属垂直分布变化的 原因有待进一步的深入研究。从水平结构分析来 看,As在10 cm和50 cm土层的水平结构类似,从 西向东污染特征呈先增加后减小再增加的趋势,且 污染主要集中于东南部地区,很大程度上与大气沉 降<sup>[5]</sup>及牧场园区施用杀虫剂和除草剂等有关。Pb 在 10 cm 和 50 cm 土层的水平结构类似,从西向东 呈先增加再减小的趋势,且在中部地区污染最严重; Hg 和 Cr 在 10 cm 土层的结构类似,主要污染特征 集中在东南部,由于该地区 Hg 的平均含量较低,推 测该分布特征与自然来源土壤母岩等有关<sup>[36]</sup>;Ni和 Zn 在 10 cm 土层的结构类似,污染特征在西部和中 部聚集;As 和 Ni、Pb 和 Zn、Cu 和 Cr 分别在 50 cm 土层水平结构类似,污染特征分别在东南部、中部和 西部地区较高。总体来说,畜牧场重金属污染呈重 度等级,很大程度上与天然矿石、大气沉降以及畜牧 场的养殖模式有关。同时,重金属之间存在同源性, 污染来源可能与畜牧场农业活动和土壤母质因素等 有关。

2.3 不同土层中 ARGs 的空间分布特征

土壤中28种 ARGs 的检测结果如图3和图4 所示,可以看出,各类 ARGs 在不同土层中的含量有 较大差异。在磺胺类 ARGs 中, sul2 的相对丰度最 高,赵祥等<sup>[37]</sup>用 real-time qPCR 对土壤中 ARGs 的丰 度进行检测,发现磺胺类 ARGs 中 sul2 的含量较高, 与本研究结果相似。张兰河等<sup>[38]</sup>研究土壤 ARGs 的 分布特征发现磺胺类 ARGs 中 sull 和 sul2 的检出 率均为100%,与本实验结果相似。同样有研究表 明,磺胺甲噁唑的污染会引起土壤中磺胺抗性基因 sul1 的丰度显著增加且能提高 sul2 的丰度<sup>[39]</sup>、饲料 添加剂中的磺胺脒也可能是磺胺类 ARGs 丰度增加 的原因之一<sup>[40]</sup>。垂直方向上,磺胺类 ARGs 都随着 土壤深度的增加呈逐渐降低的趋势,水平方向上,从 西向东污染特征逐渐增大,主要污染特征集中在东 部地区;β-内酰胺类 ARGs 中,50 cm 中 blaTEM 的 相对丰度极大,主要集中在 S02~S04 的成牛自由 活动区和 S9~S10 犊牛自由活动区。这也是造成 50 cm 土层中 ARGs 明显升高的原因, 但在 10 cm 土层中,β-内酰胺类 ARGs 相对丰度含量极小,且随



图 3 抗生素抗性基因(ARGs)在不同土层的相对丰度

Fig. 3 Relative abundance of antibiotic resistance genes (ARGs) in the different depths of soil

土壤深度的增加有明显上升趋势,表明β-内酰胺类 ARGs 可能有垂直向下传播转移的风险,也可能是 杜蒙畜牧场奶牛食用头孢类抗生素治疗奶牛乳腺炎 的缘故,有研究表明,头孢菌素或重金属胁迫条件 下,β-内酰胺类 ARGs 的相对丰度逐渐升高<sup>[41]</sup>,例 如,袁晓春<sup>[42]</sup>在乳制品中检测出了头孢氨苄,含量为 45.0 μg·L<sup>-1</sup>。从水平方向看,β-内酰胺类 ARGs 污 染特征差异较大,主要集中于西部的犊牛活动区和 东北部成牛活动区, 推测 β-内酰胺类 ARGs 可能在 亲代和子代之间有传播转移的风险。四环素类 ARGs 的种类和相对丰度较高,这与 Zhou 等<sup>[43]</sup>研究 得出的我国农田土壤 ARGs 的分布结果一致,说明 四环素类 ARGs 在环境中的持久性强于磺胺类 ARGs<sup>[44]</sup>,且随着土壤深度的增加有逐渐降低的趋 势,其中,除 tet32、tet34、tet36、tetO、tetPA 和 tetR 外,其余四环素类 ARGs 的检出率均为 100%,且 tetAP和 tetX的相对丰度较高。蒋临正等[45]的研 究表明,长期使用四环素对奶牛乳房炎进行治疗 会导致耐药性的增加。水平方向上,四环素类 ARGs 从西向东污染特征逐步增大,主要集中于东 部地区。

不同奶牛场的 ARGs 分布特征各有不同。Liu 等[46]研究美国华盛顿州中部地区6个不同的住房区 域奶牛场粪便和土壤的 ARGs 分布时,发现犊牛区 域的土壤 ARGs 最高,特别是 rmtC 和 fosA3。与本 研究犊牛自由活动区的土壤中所含 blaTEM 较高的 结果有明显差异。Zhou 等[47]研究了中国山西省 17 个奶牛场的 ARGs 的分布,发现土壤中的四环素类 ARGs>磺胺类 ARGs>β-内酰胺类 ARGs, 与本研究 中 $\beta$ -内酰胺类 ARGs 的相对丰度最高的结论相反。 Sun 等[48] 对中国南京市郊区的7个奶牛场的土壤调 查发现, sull 和 sul2 在每一个奶牛场的检出率均为 100%,且相对丰度范围为4.5 10<sup>-7</sup>~5.5 10<sup>-4</sup> 拷贝 数/16S rRNA 基因拷贝数,远远小于本研究结果中 磺胺类 ARGs 的相对丰度。以上不一致的研究结果 表明,ARGs 差异较大的原因可能与不同区域的土 壤理化性质、历史抗生素使用背景及重金属、细菌群 落等其他因素有关<sup>[49-52]</sup>。

#### 2.4 重金属与 ARGs 的相关性分析

重金属与 ARGs 的相关性分析如表 3 所示,在 P<0.05 水平上,Cr 与 *sul2*、*tetX*和 As 与 *tetR*呈中度 正相关(*r*>0.5);Pb 与 *tetW*呈低度正相关(*r*=0.495); Cd 与 *tetC*呈低度正相关(*r*=0.463),但在 P<0.01 水

平上,Cd与 tet34 呈中度负相关(r=-0.590);总体而 言,重金属 As 对总四环素类 ARGs 呈低度正相关(r =0.469, P=0.037), 其他重金属与 ARGs 之间则没有 较明显的相关性。事实上,在某些情况下,重金属可 能比特定的抗生素对 ARGs 更有选择性<sup>[12]</sup>。而对于 重金属与 ARGs 之间关系的研究, 不同研究者得到 的结论也不尽相同。Zhao 等<sup>[53]</sup>对英国北爱尔兰地 区受金属污染的城市土壤金属含量和 ARGs 进行相 关性分析,发现24种金属与ARGs呈显著正相关, 其中,Cr、Zn与 $\beta$ -内酰胺类 ARGs 显著相关。Deng 等[54]研究重金属、抗生素和营养物质影响施肥土壤 中ARGs的结果表明,Cu与ARGs呈显著正相关。 Knapp 等<sup>[55]</sup>对英国苏格兰土壤重金属和 ARGs 的关 系进行定量研究,发现许多 ARGs 与 Cu 呈正相关, 而 Cr、Ni、Pb 和 Fe 也与特定的 ARGs 显著相关。而 Ding 等<sup>[56]</sup>的研究结果表明,当Zn或Cu与土霉素同 时存在时会对 ARGs 产生很强的协同作用。因此重 金属对土壤中 ARGs 有潜在的影响, 但多种因素联 合发挥作用往往是造成重金属对 ARGs 的选择差异 的原因。

通过聚类分析,进一步分析重金属与 ARGs 的 关系,如图 5 所示,热图的横向代表 ARGs 的相对丰 度,纵向代表 8 种重金属的聚类情况,可反映出重金 属对 ARGs 是否有选择压力的相似性,由图 5 可 知,重金属污染程度较重的 As 和 Cr 可以聚类,污 染程度一般的 Cd、Zn 和 Cu 可以聚类,污染程度较 轻的 Hg、Ni 和 Pb 可以聚类。这表明,As 和 Cr 对 ARGs 的选择压力相似,Cd、Zn 和 Cu 对 ARGs 的 选择压力相似,Hg、Ni 和 Pb 对 ARGs 的选择压力 相似。

综上所述,本研究结果表明:

(1)杜蒙畜牧园区不同土层重金属污染严重,内

#### 表 3 重金属与 ARGs 相对丰度的相关性

 
 Table 3
 Correlations between heavy metal content and relative abundances of ARGs

重金属	与 ARGs 的相关性		
Heavy metal	Correlation with ARGs		
C.	<i>tetX</i> ( <i>r</i> =0.507; <i>P</i> =0.023)		
CI	<i>sul2</i> ( <i>r</i> =0.502; <i>P</i> =0.024)		
As	<i>tetR</i> ( <i>r</i> =0.505; <i>P</i> =0.023)		
Pb	<i>tetW</i> ( <i>r</i> =0.495; <i>P</i> =0.027)		
	<i>tetC</i> ( <i>r</i> =0.463; <i>P</i> =0.040)		
Ca	<i>tet34</i> ( <i>r</i> =-0.590; <i>P</i> =0.006)		



#### 图 4 磺胺类、β-内酰胺类和四环素类 ARGs 在不同土层的空间分布图

注:同一 ARGs,(a)图 10 cm 深土层,(b)图 50 cm 深土层。 Fig. 4 Spatial distribution of sulfonamides, β-lactams and tetracyclines ARGs in the different depths of soil Note: For the same ARGs, (a) 10 cm-depth soil layer, and (b) 50 cm-depth soil layer.

梅罗综合污染指数等级为重度污染,其中 As 污染 最为严重,单因子污染指数为重度污染等级(P<sub>i</sub>>3), 其他 7 种元素属于安全等级(P<sub>i</sub>≤1)。

(2)杜蒙畜牧园区空间污染分布云层图显示重 金属 As 由上至下呈逐渐增加的垂直污染,而 Cu、 Zn 和 Cd 更易在表层富集,污染主要集中于东南部 地区。

(3)ARGs 污染特征明显,在不同土层中的相对 丰度有较大差异,其中, *blaTEM*在50 cm的土层污 染较为严重,主要集中于西部和东南部地区。

(4)杜蒙畜牧园区土壤中个别四环素类 ARGs 和磺胺类 ARGs 相对丰度与重金属 As、Pb、Cd 和 Cr



# 存在不同程度的相关性,同时重金属污染程度较重的 As 和 Cr 对 ARGs 的选择压力相似。

#### 图 5 重金属与 ARGs 的聚类分析



#### 参考文献(References):

- Pruden A, Pei R T, Storteboom H, et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in northern Colorado [J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40(23): 7445-7450
- [2] Ventola C L. The antibiotic resistance crisis: Part 1: Causes and threats [J]. P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management, 2015, 40(4): 277-283
- [3] Qiao M, Ying G G, Singer A C, et al. Review of antibiotic resistance in China and its environment [J]. Environment International, 2018, 110: 160-172
- [4] Qian X, Sun W, Gu J, et al. Variable effects of oxytetracycline on antibiotic resistance gene abundance and the bacterial community during aerobic composting of cow manure [J]. Journal of Hazardous Materials, 2016, 315: 61-69
- [5] Zhang J Y, Sui Q W, Tong J, et al. Soil types influence the fate of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes following the land application of sludge composts [J]. Environment International, 2018, 118: 34-43
- [6] Duan M L, Gu J, Wang X J, et al. Factors that affect the occurrence and distribution of antibiotic resistance genes in soils from livestock and poultry farms [J]. Ecotoxicolo-

gy and Environmental Safety, 2019, 180: 114-122

- Berendonk T U, Manaia C M, Merlin C, et al. Tackling antibiotic resistance: The environmental framework [J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(5): 310-317
- [8] Pal C, Asiani K, Arya S, et al. Metal resistance and its association with antibiotic resistance [J]. Advances in Microbial Physiology, 2017, 70: 261-313
- [9] Song J X, Rensing C, Holm P E, et al. Comparison of metals and tetracycline as selective agents for development of tetracycline resistant bacterial communities in agricultural soil [J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(5): 3040-3047
- [10] Pal C, Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, et al. Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential [J]. BMC Genomics, 2015, 16: 964
- [11] Yazdankhah S, Rudi K, Bernhoft A. Zinc and copper in animal feed—Development of resistance and co-resistance to antimicrobial agents in bacteria of animal origin [J]. Microbial Ecology in Health and Disease, 2014, 25: 1-7
- [12] 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
- [13] Wang R, Chen M X, Feng F, et al. Effects of chlortetracycline and copper on tetracyclines and copper resistance genes and microbial community during swine manure anaerobic digestion [J]. Bioresource Technology, 2017, 238: 57-69
- [14] 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 International, 2017, 24(3): 2484-2494
- [15] Hu H W, Wang J T, Li J, et al. Field-based evidence for copper contamination induced changes of antibiotic resistance in agricultural soils [J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(11): 3896-3909
- [16] Hu H W, Wang J T, Li J, et al. Long-term nickel contamination increases the occurrence of antibiotic resistance genes in agricultural soils [J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(2): 790-800
- [17] Mihailović A, Budinski-Petković L, Popov S, et al. Spatial distribution of metals in urban soil of Novi Sad, Serbia: GIS based approach [J]. Journal of Geochemical Exploration, 2015, 150: 104-114
- [18] Hou D Y, O' Connor D, Nathanail P, et al. Integrated GIS

and multivariate statistical analysis for regional scale assessment of heavy metal soil contamination: A critical review [J]. Environmental Pollution, 2017, 231(Pt 1): 1188-1200

- [19] 中华人民共和国农业部. 土壤检测 第2部分:土壤 pH 的测定: NY/T 1121.2—2006[S]. 北京:中国标准出版 社, 2006
- [20] 中华人民共和国生态环境部.土壤和沉积物 铜、锌、铅、镍、铬的测定 火焰原子吸收分光光度法: HJ 491—2019[S]. 北京:中国环境科学出版社, 2019
- [21] 中华人民共和国国家环境保护总局. 土壤质量 铅、镉 的测定 石墨炉原子吸收分光光度法: GB/T 17141— 1997[S]. 北京: 中华人民共和国国家环境保护总局, 1997
- [22] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.土壤质量总汞、总砷、总铅的测定原子荧光法第1部分:土壤中总汞的测定:GB/T 22105.1—2008[S].北京:中国标准出版社,2008
- [23] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.土壤质量总汞、总砷、总铅的测定原子荧光法第2部分:土壤中总砷的测定:GB/T 22105.2—2008[S].北京:中国标准出版社,2008
- [24] Zhao Y, Su J Q, An X L, et al. Feed additives shift gut microbiota and enrich antibiotic resistance in swine gut [J]. Science of the Total Environment, 2018, 621: 1224-1232
- [25] Zhu Y G, Zhao Y, Li B, et al. Continental-scale pollution of estuaries with antibiotic resistance genes [J]. Nature Microbiology, 2017, 2: 16270
- [26] 刘硕, 吴泉源, 曹学江, 等. 龙口煤矿区土壤重金属污染评价与空间分布特征[J]. 环境科学, 2016, 37(1): 270-279
  Liu S, Wu Q Y, Cao X J, et al. Pollution assessment and

spatial distribution characteristics of heavy metals in soils of coal mining area in Longkou City [J]. Environmental Science, 2016, 37(1): 270-279 (in Chinese)

[27] 张连科,李海鹏,黄学敏,等.包头某铝厂周边土壤重 金属的空间分布及来源解析[J].环境科学,2016,37(3): 1139-1146

Zhang L K, Li H P, Huang X M, et al. Soil heavy metal spatial distribution and source analysis around an aluminum plant in Baotou [J]. Environmental Science, 2016, 37 (3): 1139-1146 (in Chinese)

- [28] 中国环境监测总站.中国土壤元素背景值[M].北京: 中国环境科学出版社,1990:1-500
- [29] Wilding L P. Spatial variability: Its documentation, accommodation and implication to soil survey [M]// Nielsen D R, Bouma J. (Eds). Soil Spatial Variability. Wagenin-

gen: Pudoc Scientific Publishers, 1985: 166-193

[30] 茹淑华,苏德纯,张永志,等.河北省集约化养殖场畜 禽粪便中重金属含量及变化特征[J].农业资源与环境 学报,2016,33(6):533-539

Ru S H, Su D C, Zhang Y Z, et al. Contents and characteristics of heavy metals in the livestock and poultry manure from the large-scale farms in Hebei Province, China [J]. Journal of Agricultural Resources and Environment, 2016, 33(6): 533-539 (in Chinese)

[31] 阮心玲, 张甘霖, 赵玉国, 等. 基于高密度采样的土壤 重金属分布特征及迁移速率[J]. 环境科学, 2006, 27(5): 1020-1025

Ruan X L, Zhang G L, Zhao Y G, et al. Distribution and migration of heavy metals in soil profiles by high-resolution sampling [J]. Environmental Science, 2006, 27(5): 1020-1025 (in Chinese)

[32] 梁玉峰, 谭长银, 曹雪莹, 等. 不同土地利用方式下土 壤养分和重金属元素垂直分布特征[J]. 环境工程学报, 2018, 12(6): 1791-1799

Liang Y F, Tan C Y, Cao X Y, et al. Vertical distribution of soil nutrient and heavy metals in soil under different land use [J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2018, 12(6): 1791-1799 (in Chinese)

- [33] 刘娟, 王津, 陈永亨, 等. 云浮硫铁矿区冲积土壤重金 属垂直分布特征的研究[J]. 环境与健康杂志, 2013, 30 (7): 641-642
- [34] 李小刚,占长林,王路,等.大冶铁矿尾矿库区土壤重 金属垂直分布特征及污染评价[J].湖北理工学院学报, 2017, 33(3): 28-33

Li X G, Zhan C L, Wang L, et al. Distribution characteristic and assessment of heavy metal pollution in soils of Daye iron ore tailings [J]. Journal of Hubei Polytechnic University, 2017, 33(3): 28-33 (in Chinese)

 [35] 姚娜,张萌,刘足根,等. 冶炼行业大气排放对周边土 壤重金属污染的贡献率研究[J]. 江西科学, 2019, 37(5): 750-754
 Yao N, Zhang M, Liu Z G, et al. Research on the contri-

bution of heavy metals emission from the smelting industry to the surrounding soils [J]. Jiangxi Science, 2019, 37 (5): 750-754 (in Chinese)

- [36] 侯沁言, 张世熔, 马小杰, 等. 基于 GIS 的凯江流域农 田重金属污染评价研究[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(7): 1514-1522
  Hou Q Y, Zhang S R, Ma X J, et al. Evaluation of heavy metal pollution in farmland soil of the Kaijiang watershed based on GIS [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2019, 38(7): 1514-1522 (in Chinese)
- [37] 赵祥, 王金花, 朱鲁生. 设施菜地土壤中抗生素及抗性

基因多样性及丰度的研究[C]// 中国土壤学会. 中国土 壤学会土壤环境专业委员会第二十次会议暨农田土 壤污染与修复研讨会论文集. 合肥: 中国土壤学会, 2018: 208-209

[38] 张兰河, 王佳佳, 哈雪姣, 等. 北京地区菜田土壤抗生素抗性基因的分布特征[J]. 环境科学, 2016, 37(11):
 4395-4401

Zhang L H, Wang J J, Ha X J, et al. Distribution characteristics of antibiotic resistance genes in vegetable soils in Beijing [J]. Environmental Science, 2016, 37(11): 4395-4401 (in Chinese)

[39] 张海丰, 史明明, 孙艳梅, 等. 磺胺甲噁唑污染土壤中 微生物群落结构与抗生素抗性基因的分布特征[J]. 环 境科学, 2019, 40(10): 4678-4684

Zhang H F, Shi M M, Sun Y M, et al. Microbial community structure and the distribution of antibiotic resistance genes in soil contaminated by sulfamethoxazole [J]. Environmental Science, 2019, 40(10): 4678-4684 (in Chinese)

- [40] 孙佳丽, 刘怡, 郑英帅, 等. Ni(IV)配合物-鲁米诺化学 发光新体系测定饲料中的磺胺脒[J]. 分析测试学报, 2015, 34(10): 1200-1203
  Sun J L, Liu Y, Zheng Y S, et al. Determination of sulfaguanidine in feed sample by Ni(IV) complex-luminol chemiluminescence system coupled with flow-injection [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2015, 34(10): 1200-1203 (in Chinese)
- [41] 李亚飞, 许燕滨, 凌嘉茵, 等. 头孢噻肟钠与重金属对 AmpC β-内酰胺酶类抗性基因转移的影响[J]. 环境科 学学报, 2017, 37(9): 3327-3334

Li Y F, Xu Y B, Ling J Y, et al. Impacts of cefotaxime sodium and heavy metals on AmpC  $\beta$ -lactamase resistance gene transfer [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2017, 37(9): 3327-3334 (in Chinese)

[42] 袁晓春. 多重胶体金免疫层析法检测乳品中β-内酰胺 类、四环素类、头孢氨苄抗生素残留[J]. 饲料博览, 2019(7): 41-47

Yuan X C. Multiplex colloidal gold immunochromatographic assay for simultaneous detection of  $\beta$ -lactamstetracyclines-cefalexin in dairy products [J]. Feed Review, 2019(7): 41-47 (in Chinese)

- [43] Zhou Y T, Niu L L, Zhu S Y, et al. Occurrence, abundance, and distribution of sulfonamide and tetracycline resistance genes in agricultural soils across China [J]. Science of the Total Environment, 2017, 599-600: 1977-1983
- [44] Sengeløv G, Agersø Y, Halling-Sørensen B, et al. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry [J]. Environment International, 2003, 28(7): 587-595

- [45] 蒋临正,徐悦,林志平,等. 苏北地区某奶牛场乳房炎 顽固病原菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 江西农业学报, 2020, 32(2): 115-119
  Jiang L Z, Xu Y, Lin Z P, et al. Isolation and antibiotic-resistance analysis of cow mastitis related persistent pathogens on dairy farm in north Jiangsu Province [J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2020, 32(2): 115-119 (in Chinese)
- [46] Liu J X, Zhao Z, Avillan J J, et al. Dairy farm soil presents distinct microbiota and varied prevalence of antibiotic resistance across housing areas [J]. Environmental Pollution, 2019, 254: 113058
- [47] Zhou B R, Wang C, Zhao Q, et al. Prevalence and dissemination of antibiotic resistance genes and coselection of heavy metals in Chinese dairy farms [J]. Journal of Hazardous Materials, 2016, 320: 10-17
- [48] Sun M M, Ye M, Wu J, et al. Positive relationship detected between soil bioaccessible organic pollutants and antibiotic resistance genes at dairy farms in Nanjing, Eastern China [J]. Environmental Pollution, 2015, 206: 421-428
- [49] 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
- [50] Ohore O E, Addo F G, Zhang S H, et al. Distribution and relationship between antimicrobial resistance genes and heavy metals in surface sediments of Taihu Lake, China

[J]. Journal of Environmental Sciences, 2019, 77: 323-335

- [51] 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]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(22): 13120-13129
- [52] Forsberg K J, Patel S, Gibson M K, et al. Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats [J]. Nature, 2014, 509(7502): 612-616
- [53] Zhao Y, Cocerva T, Cox S, et al. Evidence for co-selection of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in metal polluted urban soils [J]. Science of the Total Environment, 2019, 656: 512-520
- [54] Deng W W, Zhang A Y, Chen S J, et al. Heavy metals, antibiotics and nutrients affect the bacterial community and resistance genes in chicken manure composting and fertilized soil [J]. Journal of Environmental Management, 2020, 257: 109980
- [55] Knapp C W, McCluskey S M, Singh B K, et al. Antibiotic resistance gene abundances correlate with metal and geochemical conditions in archived Scottish soils [J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27300
- [56] Ding J, An X L, Lassen S B, et al. Heavy metal-induced co-selection of antibiotic resistance genes in the gut microbiota of collembolans [J]. Science of the Total Environment, 2019, 683: 210-215