

土壤反硝化对磺胺嘧啶及抗性基因消减的影响^①

刘 款¹, 孙明伟^{1,2}, 刘满强^{1,3}, 焦加国^{1,3}, 田 达¹, 陈 旭¹,
武 俊¹, 李辉信¹, 胡 锋^{1*}, A. Paul Schwab⁴

(1 南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095; 2 中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室(南京土壤研究所), 南京 210008;

3 江苏省有机固体废弃物资源化协同创新中心, 南京 210095; 4 美国德州农工大学土壤与作物科学系, 德克萨斯州大学城 77843-2474)

摘要: 农田土壤中抗生素及抗性基因的复合污染已给生态环境安全和人体健康带来了全新隐患。针对厌氧条件下, 反硝化作用过程对土壤抗生素乃至抗性基因消减影响的研究一直相对较少。因而, 本研究采集牛粪堆积池塘周边底层农田土壤作为目标污染土壤, 重点研究反硝化作用过程对土壤磺胺嘧啶及抗性基因消减动态的影响。结果表明: 相较于原始污染土壤处理(T1), 添加了 NO_3^- -N 的处理(T2)可以显著强化土壤和水相中反硝化速率, 提升 N_2O 的产气速率, 促进土壤中磺胺嘧啶浓度和抗性基因丰度的快速降低; 同时发现土壤反硝化基因(*nirK*、*nirS* 和 *nosZ*)与磺胺类抗性基因(*sulI* 和 *sulII*)呈显著负相关($P<0.05$), 说明当 NO_3^- -N 底物越充足, 土壤反硝化细菌活性往往被激活, 其反硝化功能基因表达就越活跃, 土壤反硝化作用过程就越强烈, 从而反馈作用促进磺胺嘧啶抗生素的厌氧消减, 进而有助于 *sul* 系列抗性基因丰度的显著衰减; 同时通过高通量测序技术及对反硝化细菌的分离筛选后, 发现变形菌门(*Proteobacteria*)赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)的细菌是土壤厌氧反应前后的主导优势菌群, 对于强化反硝化过程和促进磺胺嘧啶及 *sul* 抗性基因的消减发挥了潜在的积极作用。本研究结果可为探明土壤中抗生素的厌氧消减过程和缓解抗性基因的扩散传播提供新颖的认知基础。

关键词: 厌氧反硝化; 磺胺嘧啶; 反硝化基因; 抗性基因

中图分类号: X53

文献标识码: A

抗生素(antibiotics)是由微生物(包括细菌、真菌、放线菌)产生的一类具有显著抑制或杀灭其他类型微生物生长或生存的代谢产物^[1-2]。近年来为了进行预防大规模畜禽疾病的爆发和保障畜禽的产量及健康, 大量兽用抗生素药物常作为抗菌剂和促生长剂, 被广泛应用于畜牧养殖业的全生产过程^[3-4], 但由于畜禽往往难以在短期内将体内抗生素兽药完全代谢吸收, 因而含有抗生素母体化合物或次生代谢产物的畜禽粪便常作为有机肥, 被长期反复地施入农田土壤环境, 并逐渐诱导和筛选出大量抗生素抗性细菌(*antibiotic resistance bacteria*, ARB)^[5], 从而致使 ARB 体内抗生素抗性基因(*antibiotic resistance genes*, ARGs)丰度的过量异常表达, 进而可以通过食物链的传递和积累作用, 对人体健康和环境安全带来了较为

严重的生态风险^[6]。因而, ARGs 作为一种新型的环境大分子生物污染物已受到学术界越来越多的关注^[7]。尤其是前期研究表明土壤介质是 ARGs 的巨大贮藏库, 在影响抗性基因漂移、扩散和传播的过程中扮演了重要的媒介作用^[8-9]。

目前, 在好氧条件下, 国内外学者针对土壤中抗生素的自然消减过程或应用特殊功能微生物菌群强化消减抗生素的研究已有较多报道^[10-12], 但由于厌氧环境中土壤抗生素的微生物消减难度较大, 所以国内外相关研究进展相对缓慢^[13]。同时在实际的自然条件下广泛存在着被抗生素污染的厌氧环境, 如城市河道或污水处理厂底泥、淹水水稻土和底层土壤等在广义上都属于较为厌氧的环境^[14]。孙明伟等^[15]在前期研究中发现, 反硝化过程有助于促进土壤中非极性有

基金项目: 中央高校基本科研业务费自主创新重大专项(KYTZ201404)、中央高校基本科研业务费青年项目(KJQN201517)、2014 年度中国科学院土壤环境与污染修复重点实验室开放基金课题(SEPR2014-01)、国家自然科学青年基金项目(41401347)和国家重点研发计划项目(2016YFD0200106)资助。

* 通讯作者(fenghu@njau.edu.cn)

作者简介: 刘款(1993—), 女, 浙江余姚人, 硕士研究生, 主要从事污染土壤中抗生素/抗性基因消减管控及微生物生态响应过程研究。
E-mail: 2015103016@njau.edu.cn

机污染物多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)的厌氧消减，在此厌氧反应体系中， NO_3^- -N 作为替代氧气的电子受体或激发厌氧微生物活性的共代谢底物有效促进了作为电子供体的PAHs被厌氧消减。土壤氮素循环重硝化和反硝化作用是重要的反应过程，而反硝化细菌是反硝化过程中起驱动作用的一类微生物，可促进 NO_3^- -N 还原成 N_2 。但针对实际的污染土壤，反硝化过程能否促进土壤中抗生素的微生物厌氧消减，非常值得深入研究。尤其是在电子链传递的厌氧反硝化作用和抗生素消减作用的耦合过程中，土壤反硝化基因(denitrifying functional genes, DNGs)和 ARGs 的丰度表达存在怎样的交互影响，同样值得进一步探明。

因此，本研究基于前期南京城郊奶牛场附近，污染农田土壤中抗生素及抗性基因调查的结果^[16-17]，采集牛粪堆积池塘周边的底层农田土壤作为目标污染土壤。以磺胺嘧啶(sulfadiazine, SD)作为典型抗生素污染物代表，采用实验室模拟培养的方式，在厌氧培养箱中，淹水土壤条件下，重点开展土壤反硝化作用中氮素的转化过程对 SD 消减动态的影响，同时分析反硝化基因与抗性基因的交互作用及耦合关联性，并阐明反应前后关键反硝化细菌群落组成结构的特征变化。本研究结果可为探明土壤中抗生素的厌氧消减过程和缓解抗性基因的扩散传播风险提供科学的认知基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试土壤 采自南京城郊某奶牛场附近($32^{\circ}30'45''\text{N}$, $118^{\circ}94'7''\text{E}$)，牛粪堆积池塘周边的底层磺胺类抗生素污染农田土壤，采用五点取样法取 0~10 cm 牛粪堆积池塘周边的土壤共 1 kg，并混匀，存储于 4℃ 冰箱；试验前，将采集的土样风干磨细，过 2 mm 孔径筛后于阴处室温保存。测定土样基本理化性质：pH 7.83，全氮 1.83 g/kg，全磷 1.05 g/kg，全钾 17.94 g/kg。

1.1.2 试验试剂 分析纯盐酸盐/EDTA 缓冲液、硫酸镁/氨水(试验前配置)、甲醇、甲酸、氯化钙溶液、McIlvaine 缓冲液，具体配置方法参考 Awad 等^[18]的实验方法。磺胺嘧啶标准溶液：准确称取 SD 标准物质，用甲醇配成 100 mg/L 的标准储备液，-20℃ 避光保存。从上述储备液中准确吸取 0.1 ml 于 10 ml 容量瓶中，用甲醇定容，配成 1.0 mg/L 的标准溶液，并用甲醇稀释配置成 6~600 $\mu\text{g}/\text{L}$ 标准工作液，4℃

避光保存。

培养基：LB 培养基 (g/L)：10 g 胰蛋白胨、5 g 酵母提取物、10 g NaCl、15 g 琼脂糖，去离子水定容至 1 000 ml，pH 7.0~7.2；溴酚蓝 (bromothymol blue, BTB) 半固定培养基^[19]：1 g L-天冬酰胺、1 g KNO_3 、1 g KH_2PO_4 、0.05 g $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1 ml BTB 溴酚蓝(1% 酒精)、5 g 琼脂糖，去离子水定容至 1 000 ml，pH 7.0~7.3。

PCR 引物由上海英骏生物技术有限公司合成，DNA 基因组提取试剂盒购自美国 MP 公司，DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自杭州爱思进生物技术公司，Tiangen DNA 试剂盒购自天根生化科技有限公司。

1.1.3 仪器设备 NO_3^- -N 的分析采用德国布朗卢比 3-AA3 AutoAnalyzer 连续流动化学分析仪；氧化亚氮 (N_2O) 的分析采用 Agilent 7890A 气相色谱仪；磺胺嘧啶(SD)的分析采用 Agilent1290/6460 HPLC/MS/MS 高效液相色谱-串联四极杆质谱；样品冷冻干燥采用 Sigma Christ 高速冷冻离心机；反硝化基因及抗生素抗性基因的丰度分析采用 Applied Biosystems StepOnePlusTM 实时荧光定量 PCR 仪。

1.2 试验方法

1.2.1 试验处理 试验设置两个处理：T1：原始 SD 污染农田土壤；T2：原始 SD 污染农田土壤+20 mg/kg NO_3^- -N。每个处理重复 3 次，选用 250 ml 棕色瓶培养，每个培养瓶中添加 100 g 土壤及 120 ml 水，置于厌氧培养箱中常温培养 60 天，分别在第 1、3、7、15、23、60 天进行破坏性采样。采集水样及土样置于 4℃ 避光保存。

1.2.2 NO_3^- -N 及 N_2O 测定 土壤 NO_3^- -N 含量：水土比 5:1，2 mol/L KCl 浸提后用流动分析仪测定；水相 NO_3^- -N 含量：过滤后用流动分析仪测定。 N_2O 的测定：试验开始放入厌氧培养箱前，打开橡胶塞，向瓶内通高纯氮气，使瓶内的 CH_4 、 N_2O 、 CO_2 、 NO 等排出并保持厌氧培养环境，分别在 1、6、12、24、72、168、345 h 各采样一次，用 10 ml 注射性针筒采集气体样品，气相色谱仪测定 N_2O 样品浓度。

1.2.3 土壤中磺胺类抗生素测定 样品前处理：称取 2.0 g 土壤样品于 50 ml 棕色玻璃离心瓶中，加入盐酸盐/EDTA 缓冲液 15 ml、硝酸酶/氨水混合溶液 5 ml，涡旋 1 min，超声提取 15 min，5 000 r/min 离心 10 min，收集上清液。再按照上述方法重复提取 2 次，合并提取液，用滤膜(0.45 μm)过滤后超纯水稀释至 500 ml。固相萃取时，预先用 10 ml 甲醇和 10 ml 超纯水对 HLB

固相萃取柱进行活化，然后使提取液以 3~5 ml/min 的流速上柱，进行萃取富集。富集完毕后，用 10 ml 超纯水淋洗小柱，并用氮气吹干 20 min，除去柱中残留水分，之后用含 0.1% 甲酸的甲醇溶液进行洗脱，收集的洗脱液在氮吹仪上吹至近干，再用含 0.1% 甲酸的甲醇溶液定容至 1 ml，涡旋混匀后经 0.22 μm 针式滤器过滤至 2 ml 棕色小样瓶中，避光，-5℃，待测。

4 种形态 SD 提取。样品前处理：称取 2.0 g 土壤样品于 50 ml 棕色玻璃离心瓶中，加入超纯水 15 ml，涡旋 1 min，超声提取 15 min，5 000 r/min 离心 10 min，收集上清液，获得水溶态 SD；再向离心后土壤中加入 0.1 mol/L CaCl₂ 溶液 15 ml，涡旋 1 min，超声提取 15 min，5 000 r/min 离心 10 min，收集上清液，获得可交换态 SD；随后再向离心后土壤中加入 McIlvaine 缓冲液(1 000 ml 0.1 mol/L 柠檬酸溶液与 625 ml 0.1 mol/L 磷酸氢二钠)15 ml，超声提取 15 min，5 000 r/min 离心 10 min，收集上清液，获得松散结合态 SD；最后向剩余土壤加入磷酸盐/EDTA 缓冲液 15 ml，硝酸酶/氨水混合溶液 5 ml，涡旋 1 min，超声提取 15 min，

5 000 r/min 离心 10 min，收集上清液，获得紧密结合态 SD。SD 纯化富集方法同上。

1.2.4 土壤中反硝化基因及抗生素抗性基因测定 用 FastDNA 试剂盒提取土壤 DNA，用微量分光光度计 NanoDrop 测定提取的土壤 DNA 的纯度(OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.8~2.0 之间)和浓度。PCR 检测 6 种基因，包括 3 种反硝化基因 *nirK*、*nirS*、*nosZ*，两种磺胺类抗性基因 *sulI*、*sulII*，及一型整合子 *IntI1*，相关引物序列及 PCR 扩增条件在表 1 展示。采用 PCR 扩增后的产物，用 DNA 凝胶纯化回收试剂盒(AxyPrep DNA Gel)纯化目的基因片段，将片断连接在 pMDTM19-T 载体，利用感受态大肠杆菌细胞(Trans5α) 进行转化。在带有其他抗生素的平板上涂布后挑选阳性克隆子，用 LB 液体培养基进行扩大培养(约 6 ml)，取 2 ml 菌液送公司测序插入基因片段，剩余约 4 ml 菌液用来提取质粒，稀释标线备用，并用 NanoDrop 测定质粒浓度用以后续计算。用绝对定量进行反硝化基因及抗生素抗性基因丰度的测定，定量 PCR 反应在 StepOnePlusTM RealTime PCR system 仪器上进行。

表 1 反硝化基因与抗性基因的 PCR 扩增引物序列及扩增条件

Table 1 The primer sequences and amplicon conditions for denitrification genes, ARGs and *intI1* gene amplification

目标基因	引物	引物序列(5'-3')	退火温度 PCR(℃)	产物长度(bp)	反应程序		
<i>nirS</i>	<i>nirS</i> -F	GAS TTC GGR TGS GTC TTG A	60	425	94	预变性 5 min, 94	15 s, 60
	<i>nirS</i> -R	GTS AAC GTS AAG GAR ACS GG				30 s, 72	30 s, 35 个循环
<i>nirK</i>	<i>nirK</i> -F	ATY GGC GGV AYG GCG A	60	163	94	预变性 5 min, 94	15 s, 60
	<i>nirK</i> -R	GCC TCG ATC AGR TTR TGG				30 s, 72	15 s, 35 个循环
<i>nosZ</i>	<i>nosZ</i> -F	CGC RAC GGC AAS AAG GTS MSS GT	60	267	94	预变性 5 min, 94	15 s, 60
	<i>nosZ</i> -R	CAK RTG CAK SGC RTG GCA GAA				30 s, 72	25 s, 35 个循环
<i>sulI</i>	<i>sulI</i> -F	GACTGCAGGCTGGTGGTTAT	60	107	94	预变性 5 min, 94	15 s,
	<i>sulI</i> -R	GAAGAACCGCACAATCTCGT				60	30 s, 72
<i>sulII</i>	<i>sulII</i> -F	TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG	60	190	94	预变性 5 min, 94	15 s,
	<i>sulII</i> -R	CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG				60	30 s, 72
<i>intI1</i>	<i>intI1</i> -F	TAC GAA CCG AAC AGG CTT ATG	55	151	94	预变性 5 min, 94	15 s,
	<i>intI1</i> -R	TGA CGA TGC GTG GAG ACC				55	30 s, 72
						20 s, 35 个循环	

1.2.5 土壤中反硝化细菌分离及鉴定 将添加 NO₃⁻-N 的土壤以水土比 5:1 的悬浊液澄清后，取 100 μl 上清液涂在 LB 培养基上，置于 30℃ 培养箱中的厌氧培养袋中培养，7 天后，从平板中挑选出的单菌落转接到 BTB 半固体培养基中，并置于 30℃ 培养箱中，7~10 天后，筛选出产生气泡同时变蓝的试管，挑选菌落接种至 3 ml LB 液体 37℃ 培养 8 h，用 Tiangen 试剂盒提取细菌 DNA，进行 PCR 定性判断及测序鉴定。

1.2.6 高通量测序 针对第 1 天及第 60 天的土壤

样本所提取的 DNA，利用通用引物 319F (5'-ACT-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACT-ACHVGGGTWTCTAAT-3') 扩增其中土壤细菌的 16S rDNA 基因的 V3、V4 区域，扩增完成后的 PCR 产物使用 beads 纯化后利用杭州联川生物技术有限公司的 Illumina 测序仪上机测序。

1.3 数据分析

所用数据为 3 次重复采样的平均值，利用软件 OriginPro8.5 和 SPSS 21 进行数据统计分析。图表采用 Microsoft Excel 2013 和软件 OriginPro 8.5 绘制。

2 结果与讨论

2.1 土壤厌氧反硝化作用的动态变化过程

由于本研究中使用的土壤样品采集自奶牛场牛粪堆积池附近的底层土壤,其中氮素的本底含量较高,因此不同处理样品土壤中反硝化过程可能是氮素厌氧转化的主要途径之一^[20]。从图1可知,在60天的厌氧培养过程中,不同处理条件下土壤和水相中

NO_3^- -N浓度呈现先迅速降低再缓慢消减的趋势。T1和T2处理下土壤和水相中 NO_3^- -N含量在最初的7天内迅速降低(图1A、1B),土壤中分别由初始 NO_3^- -N含量7.3 mg/kg和24.3 mg/kg下降至第7天的1.6 mg/kg和1.9 mg/kg,水相中分别由初始 NO_3^- -N含量3.3 mg/kg和5.5 mg/kg下降至第7天的1.1 mg/kg和0.9 mg/kg,随后的培养时间内(第7~23天)土壤和水相中 NO_3^- -N含量消减速率逐渐变缓。

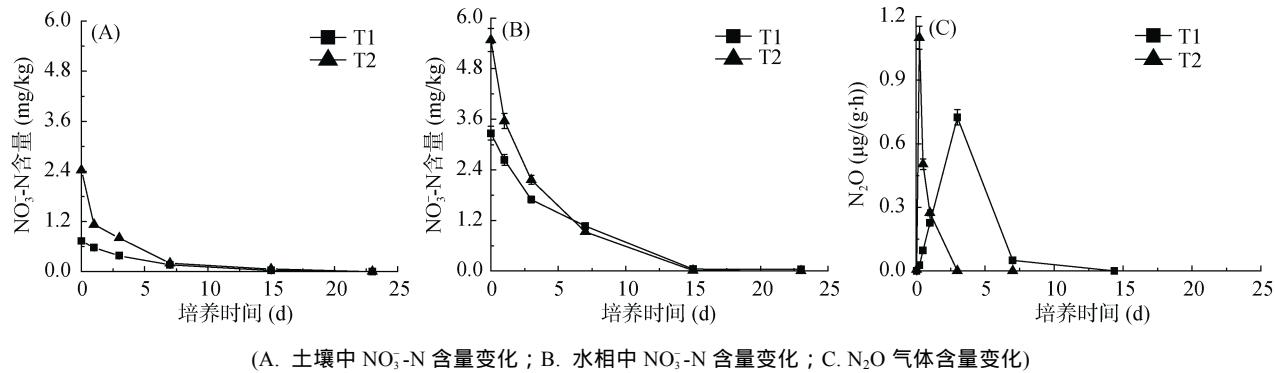


图1 土壤厌氧反硝化作用的动态变化

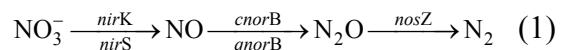
Fig.1 The dynamics of nitrate nitrogen

此外,添加 NO_3^- -N的T2处理其 N_2O 气体的产气速率显著高于原始污染土壤T1处理(图1C, $P<0.01$),并且在第12 h达到积累最高值0.8 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$,随后 N_2O 气体的累积浓度逐渐消减,同时在第72 h的取样时间点接近消减完毕。而T1处理中 N_2O 气体的产气积累量在72 h才达到最高积累值0.7 $\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$,在随后的350 h内逐渐消减完毕。图1结果显示出添加 NO_3^- -N底物,有助于激活土壤中厌氧反硝化作用的速率和进程,为模拟和营造强化的反硝化作用过程体系提供了活跃的反应条件。

2.2 反硝化功能基因丰度的动态变化过程

在微生物介导的土壤厌氧反硝化过程中,反硝化功能基因的丰度变化是决定反硝化速率和进程的关键要素。如公式(1)所示^[21],不同的反硝化作用环节

是受到了不同特征反硝化功能基因丰度变化的影响^[22]。在本研究中,选取了丰度表达稳定且具有限速作用的关键反硝化功能基因进行绝对丰度动态变化的测定分析^[23]。即:由硝酸盐向亚硝酸盐转化的还原酶编码基因 $nirS$ 和 $nirK$,以及由 N_2O 气体向 N_2 转化的还原酶编码基因 $nosZ$ 基因。



由图2可知,不同处理中反硝化基因绝对丰度均出现先上升后下降的趋势,尤其是在不同培养时间内,T2处理中 $nirK$ 、 $nirS$ 和 $nosZ$ 基因丰度显著高于T1处理中相关反硝化基因丰度($P<0.01$)。T2处理中 $nirK$ 与 $nirS$ 基因在第15天分别达到最高值 6.63×10^6 和 5.45×10^6 copies/g(图2A,2B), $nosZ$ 基因在第23

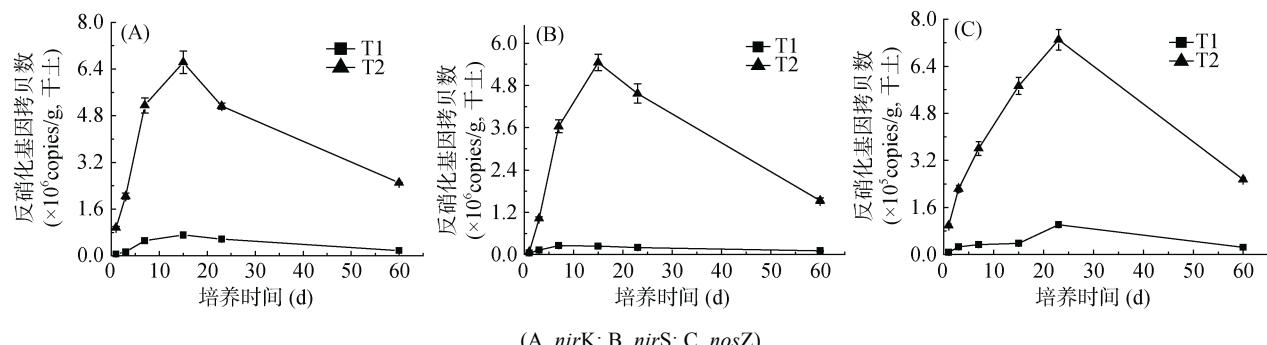


图2 反硝化功能基因绝对定量丰度变化

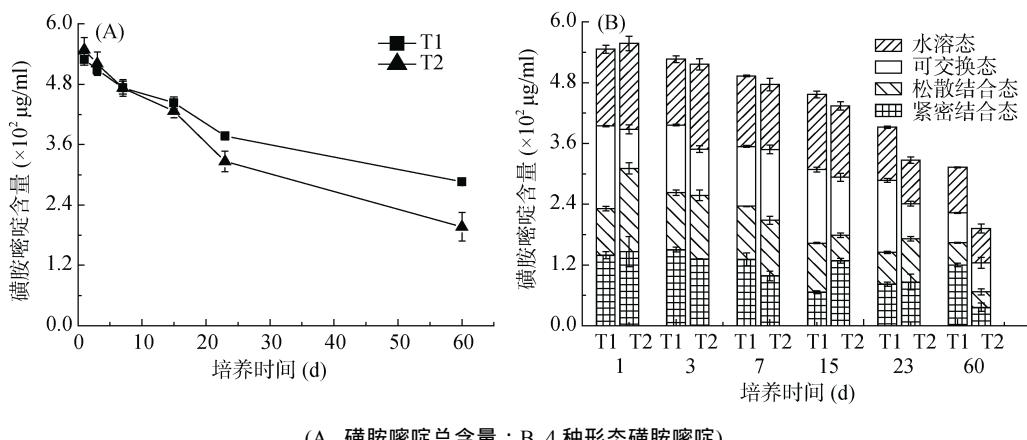
Fig.2 Changes of absolute abundance of denitrifying genes

天达到最高值 7.30×10^5 copies/g (图 2C)。该部分数据说明原始污染土壤中即存在特定丰度的反硝化功能细菌,当外界人为添加硝态盐底物后,土著反硝化细菌的代谢活性得到显著激活和促进,进而反硝化功能基因丰度的维持和增长也得到迅速强化,这与图 1 中 NO_3^- -N 的快速消减动态过程相呼应一致,随后伴随着 NO_3^- -N、 NO_3^- -N 底物及 N_2O 气体积累浓度的消减, *nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 基因丰度也在培养的后期逐渐衰减并趋于稳定。

2.3 土壤中磺胺嘧啶厌氧消减的动态变化

土壤中抗生素在好养或厌氧条件下,往往都存在物化和微生物联合作用下的水解、转化或降解等自然

消减过程^[24-26]。在本研究中,不同处理下,土壤中磺胺嘧啶(SD)在 60 天的厌氧培养周期内也出现了显著的消减过程。由图 3A 所示,人为添加了 NO_3^- -N 的处理(T2 处理)中 SD 的厌氧消减速率和程度都显著大于原始的污染土壤(T1 处理)。土壤中 SD 的浓度由初始值 550.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 分别消减至第 60 天的 286.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (T1 处理)和 196.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (T2 处理);该结果说明强化了的反硝化作用有助于土壤中 SD 的厌氧消减。这可能是由于在该厌氧反应体系中 NO_3^- -N 底物作为电子受体被还原,而 SD 作为电子供体被氧化,当体系中 NO_3^- -N 底物供给充足时,更加有利于电子链的传递过程,进而促进 SD 的消减。



(A. 磺胺嘧啶总含量; B. 4 种形态磺胺嘧啶)

图 3 磺胺嘧啶含量的消减动态

Fig. 3 Changes of the content of sulfadiazine

此外,在厌氧消减过程中,土壤中抗生素的赋存形态也同样值得关注。由于不同的赋存形态具有不同的环境迁移行为,不同的环境迁移行为又会显著影响抗生素的生物可汲性以及对土著细菌抗性诱导的胁迫压力。因而在本研究中,我们将土壤中抗生素划分为水溶态、可交换态、松散结合态及紧密结合态 4 种主要赋存形态,其中水溶态抗生素是生物可汲性相对较高的组分,其对土著细菌的抗性筛选具有持续的选择压力^[27]。而且反硝化作用有助于促进松散结合态和紧密结合态 SD 的消减,更有助于抗生素对土著细菌的胁迫压力。由图 3B 可知,尽管不同处理下,土壤 SD 浓度都出现显著的下降,但是在第 60 天时,T1 处理下土壤中水溶态 SD 的浓度是 90.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$,显著高于 T2 处理下土壤中水溶态 SD 的浓度 68.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$,说明反硝化作用有利于生物可汲性较高组分的抗生素深度消减,对于缓解抗生素对土著细菌的直接诱导压力具有积极的作用。

2.4 土壤中磺胺类抗性基因丰度厌氧波动变化

抗生素兽药的滥用会诱导出大量含有 ARGs 的抗

性细菌显现,前人研究表明部分携带 ARGs 的细菌死亡之后,其 ARGs 仍然能释放到环境中或者通过基因水平转移的方式进入到其他微生物体内^[28-29],从而增加了 ARGs 扩散传播的风险。因而,对土壤中磺胺类抗性基因丰度厌氧波动变化的监测也是本研究重点关注的内容之一。从图 4 可知, *sulI* 和 *sulII* 的丰度在厌氧条件下随着培养时间的延长而逐渐降低。T2 处理条件下, *sulI* 和 *sulII* 丰度在培养前后显著下降了近 2 个数量级,分别由初始的 3.41×10^6 、 1.57×10^6 copies/g 下降至第 60 天的 9.20×10^4 、 2.46×10^4 copies/g;然而 T1 处理条件下, *sulI* 和 *sulII* 丰度仅分别由初始的 3.20×10^6 、 1.50×10^6 copies/g 下降至第 60 天的 6.69×10^5 、 2.91×10^5 copies/g,说明强化后的反硝化作用也有助于土壤中磺胺类抗性基因的厌氧消减。添加 NO_3^- -N 促进了 SD 的消减,同时抗生素又是抗性基因丰度的选择压力之一,SD 的减少在一定程度上促进了抗性基因丰度的降低。

2.5 反硝化基因与抗生素抗性基因的相关性

为了进一步探究反硝化过程对土壤抗性基因的

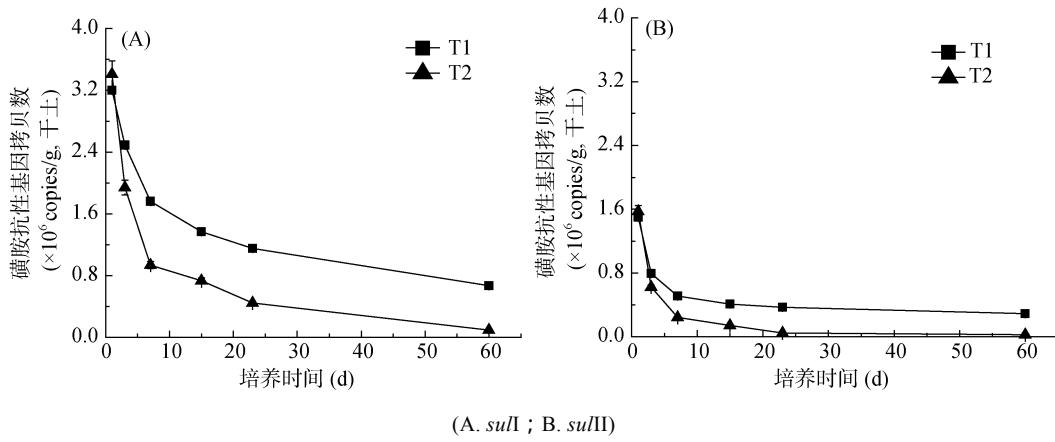
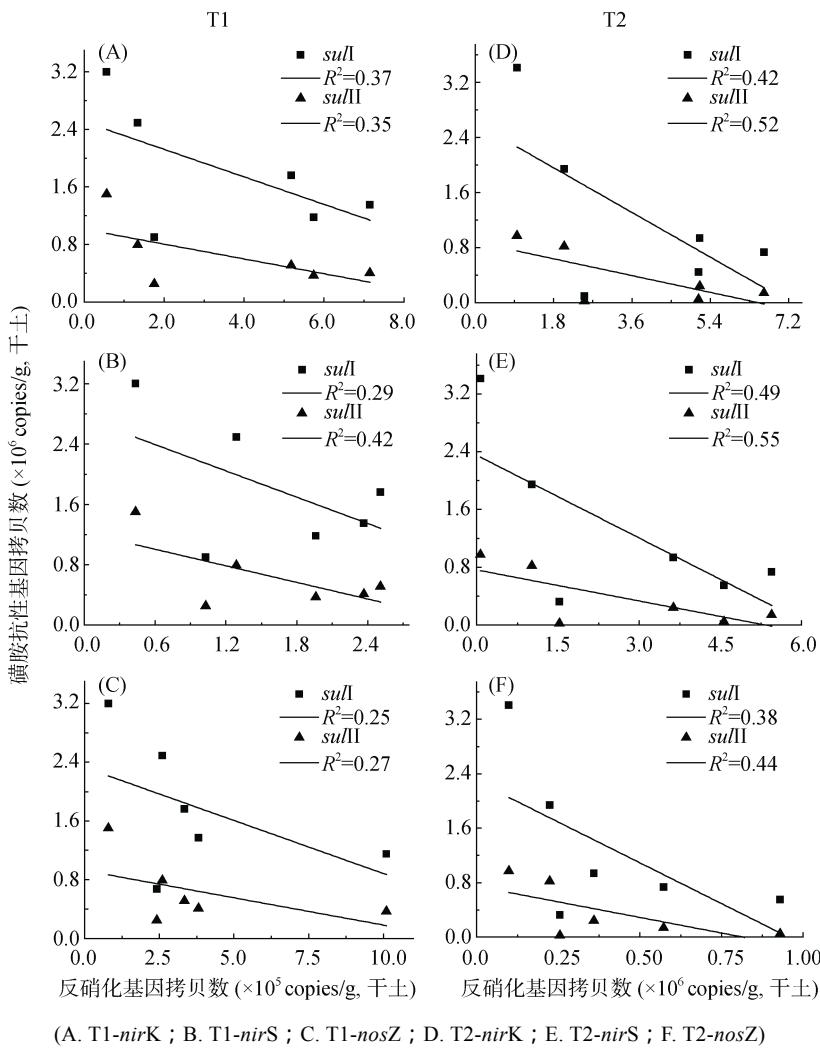


图4 磺胺类抗性基因绝对丰度厌氧波动变化
Fig. 4 Changes of absolute abundance of antibiotic resistance genes

厌氧消减影响,本研究将反硝化基因丰度与磺胺类抗生素抗性基因丰度进行相关性拟合分析。

由图5可知:反硝化基因丰度与抗性基因丰度呈现显著的负相关,这一结果间接证明在厌氧条件

下,土壤中添加了 NO_3^- -N 以后,微生物反硝化功能基因逐渐被激活,反硝化作用强度逐渐加强,更多的电子在厌氧氧化还原反应中被传递,从而反馈作用于抗生素的厌氧消减,进而有助于促进抗性基因的深度



(A. T1-*nirK*; B. T1-*nirS*; C. T1-*nosZ*; D. T2-*nirK*; E. T2-*nirS*; F. T2-*nosZ*)

图5 磺胺类抗性基因丰度(*sulI*、*sulII*)与反硝化基因丰度的相关性

Fig. 5 Correlation between abundance of sulfanilamide resistance genes(*sulI*, *sulII*) and different denitrifying genes in soil

消减；*sulI/sulII* 与 *nirK/nirS* 的相关性 > *sulI/sulII* 与 *nosZ* 的相关性，这可能是由于随着反硝化过程的深入，完成整个反硝化过程的步骤环节逐渐增多，其反硝化基因的表达难度也在逐渐增加，因而反硝化基因的丰度可能会随着反硝化进程的深入与磺胺类抗生素抗性基因丰度的相关性逐渐降低。

2.6 厌氧反硝化过程中土壤细菌群落结构变化及特征反硝化细菌的环境意义

上述结果显示强化的反硝化作用在一定程度上可以促进土壤中抗生素及抗性基因的厌氧消减，其中一些具有反硝化功能的厌氧细菌可能发挥了重要的作用，因而本研究对第 1 天和第 60 天的土壤样品进

行高通量测序分析发现(图 6)，主要是 5 个门的细菌群落发生了较为明显的变化，分别是 *Proteobacteria*(变形菌门)、*Firmicutes*(厚壁菌门)、*Actinobacteria*(放线菌)、*Chloroflexi*(绿弯菌门)及 *Bacteroidetes*(拟杆菌)。前人研究表明变形菌门和厚壁菌门的细菌往往属于兼性厌氧或专性厌氧细菌，多数为化能异养型，此两类细菌对于土壤氮素的转化和利用具有较高的能力^[30-32]。从图 6 中可知，在 T2 处理下，60 天后，变形菌门的细菌丰度显著上升，并占据整个厌氧细菌群落的优势生态位，说明添加了 NO_3^- -N 的处理，有助于激活土壤中变形菌门细菌的活性，进而有助于土壤反硝化的进程。

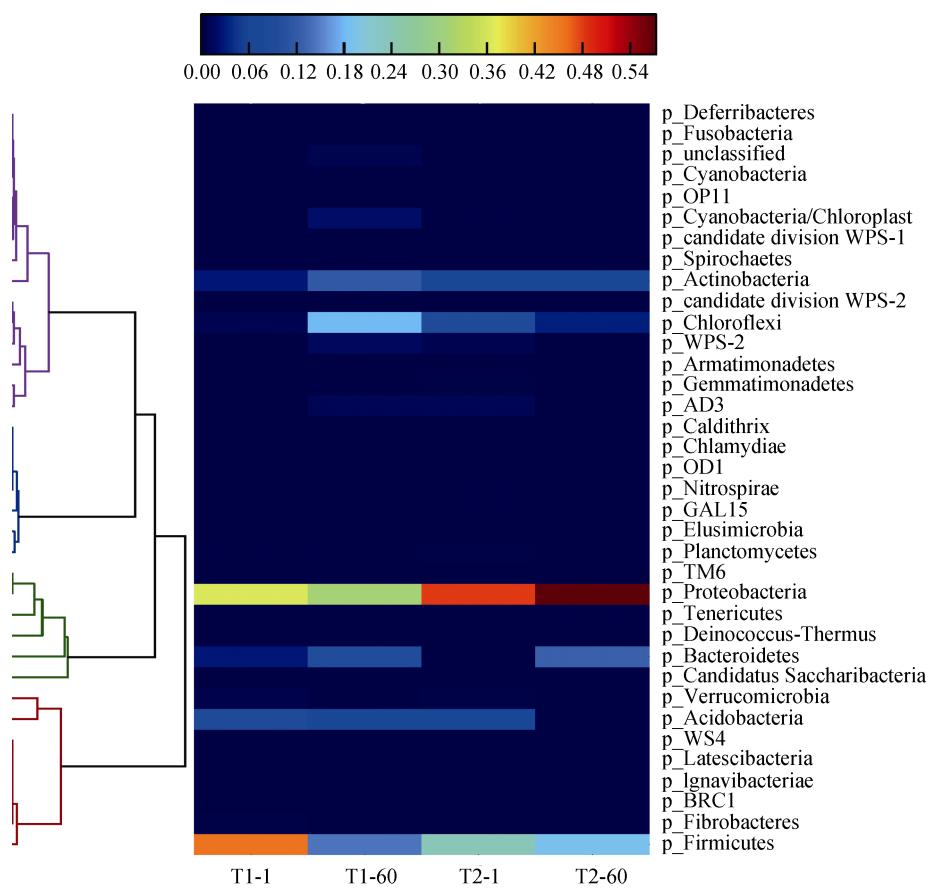


图 6 细菌群落结构热图(第 1 天和第 60 天)
Fig.6 Heatmap of the phylum-level taxonomic assignments of bacteria community

此外，针对 T2 处理，本研究还在厌氧环境中分离筛选到 16 株具有反硝化功能同源于变形菌门(*Proteobacteria*) 赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)的细菌，针对这些细菌进行反硝化功能基因和磺胺类抗性基因的 PCR 定性检测发现(表 2)：该 16 株细菌通常在含有某一类或两类反硝化功能基因的同时，也具备了 *sul* 类型的抗生素抗性基因，推测这些特殊的反硝化细菌，可能是在长期的自然进化中获得了这些

功能基因，表 2 中对这些细菌体内一型整合子 *intI* 基因的普遍检出，也可以间接验证此类假说。其中，整合子是一类与抗性基因水平转移相关的可移动基因元件，整合子通常由一个编码整合酶的 *intI* 基因、基因重组位点 *attI* 和 *attC*、启动子 *Pc* 构成，*intI1* 最为常见，在细菌传播中起重要作用^[33]。当此类细菌同时具备了反硝化基因和抗生素抗性基因后，可以在抵御抗生素胁迫的同时，不断地执行反硝化功能基因

的表达,提升反硝化作用的速率和进程,从而反馈强化抗生素的厌氧消减,并进而促进抗生素抗性基因丰

度的下降,最终有助于缓解土壤中抗生素抗性基因扩散传播的风险。

表2 反硝化细菌菌株中的反硝化功能基因及抗生素抗性基因的扩增
Table 2 Amplification of denitrifying genes and antibiotic resistance genes from denitrifying strains

菌株编号 (<i>Lysinibacillus</i>)	反硝化基因 (DNGs)			抗生素抗性基因 (ARGs)		整合子 <i>IntI1</i> (279 bp)
	<i>nirK</i> (162 bp)	<i>nirS</i> (410 bp)	<i>nosZ</i> (167 bp)	<i>sulI</i> (105 bp)	<i>sulII</i> (191 bp)	
1	+	-	-	+	+	+
2	+	+	+	+	-	+
3	-	+	+	+	-	+
4	+	+	+	-	-	-
5	-	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	-
7	+	-	-	-	-	+
8	+	+	+	-	-	+
9	-	+	+	-	+	-
10	+	+	+	+	-	-
11	-	+	+	+	+	+
12	-	-	-	+	+	+
13	+	-	-	-	+	-
14	-	+	+	+	+	+
15	-	-	+	+	-	+
16	+	-	+	+	-	+

注:+, PCR 产物含该基因; -, PCR 产物不含该基因。

3 结论

1) 添加 NO_3^- -N 处理可以显著强化土壤厌氧反硝化作用的速率和进程,同时土壤中磺胺嘧啶的消减速率和程度也得到显著提升,进而有利于促进土壤中磺胺类抗性基因 *sulI* 和 *sulII* 的快速消减。

2) 土壤反硝化基因丰度与磺胺类抗性基因丰度呈显著负相关,说明反硝化基因丰度表达越高,反硝化作用则越强,电子链的传递就越活跃,磺胺嘧啶的厌氧消减程度就越显著,抗性基因丰度衰减就越明显。同时分离筛选出的变形菌门细菌是土壤厌氧反应前后的主导优势菌群,对于强化反硝化过程和促进磺胺嘧啶及 *sul* 抗性基因的消减发挥了潜在的积极作用。

参考文献:

- 吴杭,白林泉,周秀芬,等.微生物药物产生菌功能基因组学研究进展[J].中国抗生素杂志,2013,38(3):175-184
- 代芳平,李师翁.链霉菌次级代谢物及其应用研究进展[J].生物技术通报,2014,(3):30-35
- Bu Q, Bin W, Jun H, et al. Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment in China: A

review[J]. Journal of Hazardous Materials, 2013, 262(22):189-211

- Phillips P J, Smith S G, Kolpin D W, et al. Pharmaceutical formulation facilities as sources of opioids and other pharmaceuticals to wastewater treatment plant effluents[J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44(13):4910-4916
- 高盼盼,罗义,周启星,等.水产养殖环境中抗生素抗性基因(ARGs)的研究及进展[J].生态毒理学报,2009(6):770-779
- Friedman M. Antibiotic-resistant bacteria: Prevalence in food and inactivation by food-compatible compounds and plant extracts[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2015, 63(15): 3805-3822
- Pruden A, Pei R, Heather Storteboom A, et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in Northern Colorado[J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40(23): 7445-7450
- 邵义萍,莫测辉,李彦文,等.长期施用粪肥土壤中喹诺酮类抗生素的含量与分布特征[J].中国环境科学,2010(6): 816-821
- Archundia D, Duwig C, Lehembre F, et al. Antibiotic pollution in the Katari subcatchment of the Titicaca Lake: Major transformation products and occurrence of resistance genes[J]. Science of the Total Environment, 2017, 576:671-682

- [10] 秦丽婷, 童蕾, 刘慧, 等. 环境中磺胺类抗生素的生物降解及其抗性基因污染现状[J]. 环境化学, 2016(5): 875–883
- [11] 金彩霞, 高若松, 吴春艳. 磺胺类药物在环境中的生态行为研究综述[J]. 浙江农业科学, 2011(1): 127–131
- [12] Mohapatra D P, Brar S K, Tyagi R D, et al. Analysis and advanced oxidation treatment of a persistent pharmaceutical compound in wastewater and wastewater sludge—carbamazepine[J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 470–471(2): 58–75
- [13] Massé D I, Cata Saady N M, Gilbert Y. Potential of biological processes to eliminate antibiotics in livestock manure: An overview[J]. *Animals*, 2014, 4(2): 146–163
- [14] Dai X, Fan L, Jing Y, et al. Biodegradation of polyacrylamide by anaerobic digestion under mesophilic condition and its performance in actual dewatered sludge system[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 153(2): 55–61
- [15] 孙明明, 滕应, 骆永明. 厌氧微生物降解多环芳烃研究进展[J]. 微生物学报, 2012, 52(8): 931–939
- [16] 罗凯, 李文红, 章海波, 等. 南京典型设施菜地有机肥和土壤中四环素类抗生素的污染特征调查[J]. 土壤, 2014, 46(2): 330–338
- [17] Mu Q, Li J, Sun Y, et al. Occurrence of sulfonamide-, tetracycline-, plasmid-mediated quinolone- and macrolide-resistance genes in livestock feedlots in Northern China[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(9): 6932–6940
- [18] Awad Y M, Kim S C, El-Azeem S A M A, et al. Veterinary antibiotics contamination in water, sediment, and soil near a swine manure composting facility[J]. *Environmental Earth Sciences*, 2014, 71(3): 1433–1440
- [19] Takaya N, Catalansakairi M A B, Sakaguchi Y, et al. Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2003, 69(6): 3152–3157
- [20] 续勇波, 蔡祖聪. 亚热带土壤亚铁与厌氧反硝化[J]. 土壤, 2015, 47(1): 63–67
- [21] Guo G X, Deng H, Qiao M, et al. Effect of long-term wastewater irrigation on potential denitrification and denitrifying communities in soils at the watershed scale[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(7): 3105–3113
- [22] 张晶, 林先贵, 尹睿. 参与土壤氮素循环的微生物功能基因多样性研究进展[J]. 中国生态农业学报, 2009, 17(5): 1029–1034
- [23] 郭丽芸, 时飞, 杨柳燕. 反硝化菌功能基因及其分子生态学研究进展[J]. 微生物学通报, 2011, 38(4): 583–590
- [24] Zhang D Q, Tan S K, Gersberg R M, et al. Nutrient removal in tropical subsurface flow constructed wetlands under batch and continuous flow conditions[J]. *Journal of Environmental Management*, 2012, 96(1): 1–6
- [25] Zhou L J, Ying G G, Liu S, et al. Simultaneous determination of human and veterinary antibiotics in various environmental matrices by rapid resolution liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1244(12): 123–138
- [26] 齐会勉, 吕亮, 乔显亮, 等. 抗生素在土壤中的吸附行为研究进展[J]. 土壤, 2009, 41(5): 703–708
- [27] Liu Y, Bao Y, Cai Z, et al. The effect of aging on sequestration and bioaccessibility of oxytetracycline in soils[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(14): 10425–10433
- [28] Hill K E, Top E M. Gene transfer in soil systems using microcosms[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1998, 25(4): 319–329
- [29] Crecchio C, Ruggiero P, Curci M, et al. Binding of DNA from *bacillus subtilis* on montmorillonite-humic acids-aluminum or iron hydroxypolymers: Effects on transformation and protection against DNase[J]. *Soil Science Society of America Journal*, 2005, 69(3): 834–841
- [30] Fierer N, Lauber C L, Ramirez K S, et al. Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients[J]. *ISME Journal*, 2012, 6(5): 1007–1017
- [31] Mendes R, Raaijmakers J M. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria[J]. *Science*, 2011, 332(6033): 1097–1100
- [32] Stres B, Sul W J, Murovec B, et al. Recently deglaciated high-altitude soils of the himalaya: Diverse environments, heterogenous bacterial communities and long-range dust inputs from the upper troposphere[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): 1521–1525
- [33] Gillings M R, Gaze W H, Pruden A, et al. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution[J]. *ISME Journal*, 2015, 9(6): 1269–1279

Effects of Anaerobic Denitrification on the Dissipation of Sulfadiazine and Resistance Genes in Soil

LIU Kuan¹, SUN Mingming^{1,2}, LIU Manqiang^{1,3}, JIAO Jiaguo^{1,3}, TIAN Da¹, CHEN Xu¹, WU Jun¹, LI Huixin¹, HU Feng^{1*}, A. Paul Schwab⁴

(1 College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2 Key Laboratory of Soil Environment and Pollution Remediation, Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China; 3 Jiangsu Collaborative Innovation Center for Solid Organic Waste Resource Utilization, Nanjing 210095, China; 4 Department of Soil and Crop Sciences, Texas A & M University, College Station, Texas, United States 77843-2474)

Abstract: Mixed contamination with antibiotics and antibiotic resistance genes (ARGs) in farmland soil has become an emerging threat against human health and environmental security. However, little attention has been paid on the impact of anoxic denitrification on the dissipation of soil antibiotics and ARGs. Therefore, the present work collected the subsurface mixed-contaminated arable soil around dairy farm, and investigated the influence of denitrification process on the dissipation of soil sulfonamides and their correlated ARGs. The results indicated that nitrate addition to the soil clearly improved the nitrate transforming rate in both soil and water phases, the N₂O production, and the dissipation of soil sulfonamides and ARG abundance. In addition, the clearly negative correlation between the abundance denitrifying genes (*nirK*, *nirS*, and *nosZ*) and sulfonamide resistance genes (*sulI* and *sulII*) demonstrated that more sufficient the nitrate nitrogen, the stronger the express of denitrifying genes and the stronger the denitrification process; in order to promote the sulfonamide/ARG dissipation. Moreover, through high-throughput sequencing and the experiment of the separation of denitrifying bacteria, *Proteobacteria Lysinibacillus* were the predominant strains isolated from anoxic soil among various treatments, which likely played an important role in prompting denitrifying procedure and stimulating sulfonamide/ARG dissipation. This work provided novel information on the anoxic dissipation of soil antibiotics and the ARG proliferation.

Key words: Anaerobic denitrification; Sulfadiazine; Denitrifying genes; Antibiotic Resistance genes