

doi:10.16104/j.issn.1673-1891.2021.02.001

贡嘎山不同海拔土壤中抗生素抗性基因的多样性特征

刘 燕, 路 璐*

(西华师范大学环境科学与工程学院, 四川 南充 637009)

摘要: 抗生素抗性基因作为一种新型环境污染物,对生态环境安全和人类健康有严重的威胁。目前对抗生素抗性基因的研究大多是对城市土壤、污泥、农田土壤等受人为干扰较多的环境开展。然而,人为干扰少的土壤中抗性基因的背景值研究仍较为缺乏。针对贡嘎山不同海拔高度的土壤,采用高通量实时荧光定量 PCR 的方法,研究了其抗生素抗性基因和可移动遗传元件的多样性及丰度特征,并探究其与环境因子的相关性。结果发现:(1)贡嘎山海拔在 2 948~3 651 m 的 7 个土壤样品,共检测到 132 种不同的抗性基因和 10 种可移动遗传元件。每个样品中的抗性基因种数为 46~89 个,并随着海拔的升高呈增加趋势。抗性基因的相对拷贝数为 0.019~0.043 copies/cell,且不随海拔高度呈规律性变化。7 个土壤中检测到 intI-1(clinic)和 tnpA-02 等可移动遗传元件,表明抗性基因的水平转移可能为这些土壤中抗性基因迁移的途径之一。(2)7 种土壤的抗性基因种类组成差异有统计学意义($P < 0.05$),冗余分析表明 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 、 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、含水量、海拔和有机质等土壤理化性质的差异可能导致了不同土壤中抗性基因多样性的差异(解释率 97.1%)。综上,受人为干扰较少的高原土壤中存在多样性丰富的抗性基因,该研究为抗生素抗性基因的污染研究提供了基础参考数据。

关键词: 抗生素抗性基因多样性;高通量荧光定量 PCR;土壤;贡嘎山;海拔

中图分类号: S154.3; X53 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1891(2021)02-0001-07

Diversity of Antibiotic Resistance Genes in Soils along Elevations of the Gongga Mountain

LIU Yan, LU Lu*

(College of Environmental Science and Engineering, China West Normal University, Nanchong, Sichuan 637009, China)

Abstract: Antibiotic resistance genes (ARGs) are emerging pollutants which pose a serious threat to ecological environment and human health. Recently, most of the ARGs studies are focus on the samples from urban soils, sludge, and agricultural soils which are intensively influenced by humanity. However, the distribution of ARGs in the soils subjected to little disturbance of human activities is largely unexplored. The high-throughput real-time fluorescent quantitative PCR method was used to analyze the diversity and abundance of ARGs and mobile genetic elements (MEGs) in the 7 soil samples from different altitude of the Gongga Mountain. The correlation between ARGs diversity and environmental factors was also determined. A total of 132 ARGs and 10 mobile genetic elements (MGEs) were detected in soil samples at an altitude of 2 948~3 651 meters in the Gongga Mountain. There were 46~89 ARGs subtypes per samples. The relative copy number in the 7 soil samples ranged from 0.019 to 0.043 copies/bacterial cell, and did not change with the elevations. MEGs, including intI-1(clinic) and tnpA-02, were detected in all the 7 soil samples, suggesting that the horizontal transfer of ARGs contributed to the ARGs spread in the soils. The composition of the ARGs subtypes significantly differed among the 7 soil samples. Redundancy analysis showed that $\text{NO}_3^- - \text{N}$, $\text{NH}_4^+ - \text{N}$, water content, altitude and TOC explained 97.1% of the differences in the distribution of ARGs in different altitudes of the Gongga Mountain. To sum up, diverse and abundant ARGs exist in the natural and less disturbed soils. The study provides important data and reference to the ARGs pollution research.

Keywords: ARGs diversity; high-throughput fluorescent quantitative PCR; soil; Gongga Mountain; altitude

收稿日期:2021-05-17

基金项目:四川省科技厅重点项目(2020YJ0346);国家自然科学基金(41606142);西华师范大学英才科研基金和留学博士后基金(463140,416793)。

作者简介:刘燕(1996—),女,四川宜宾人,硕士研究生,研究方向:环境微生物学。*通信作者:路璐(1989—),女,河南周口人,副研究员,博士,研究方向:环境微生物学研究。

0 引言

抗生素抗性基因作为一种新型环境污染物,不同于传统的化学污染物,抗性基因可通过各种可移动遗传元件,如整合子、转座子或质粒等,通过基因水平转移的方式进入其它环境细菌和致病菌中^[1-2],对人类健康和生态环境造成潜在威胁^[3]。随着社会经济的快速发展,抗生素抗性基因在各种不同环境介质中检测出,人类活动的干预被认为是导致抗性基因显著富集的主要原因^[4-5]。一方面长时间的不合理使用抗生素,导致抗生素抗性细菌和抗生素抗性基因的富集和传播,以往的研究发现在城市河流^[6]、污水处理厂污泥^[4]、农田土壤^[7]等受人为干扰较多的环境中,抗性基因有高度的富集污染;另一方面人类活动造成的重金属以及有机物的污染,对抗性基因的富集有加剧作用^[8]。土壤中的抗性基因主要包括天然土壤环境中抗性基因背景值,以及通过有机肥施用、污水灌溉等人为活动带入土壤环境的抗性基因^[9-10]。对于受人为干扰较少对环境研究中,Zhang 等^[11]在冰川土壤和人类抗生素出现之前的深冻土中,均发现了多样性丰富的抗性基因和可移动遗传元件。在陆地表层深处^[12]和海洋深处^[13]均检测出多种抗性基因的存在。然而,随着大量关于人类活动对环境中抗生素抗性基因富集污染的研究^[4-5,14],受人为干扰较少的自然环境中,抗生素抗性基因的多样性和丰度水平研究仍存在很大空缺。

因此,本研究针对人为活动影响较小的贡嘎山区域,采集了 7 个不同海拔梯度(2 948 m~3 651 m)的典型代表土壤,采用高通量荧光定量 PCR 的方法,使用 296 对引物,对 283 对抗生素抗性基因和 12 对可移动遗传元件标记基因进行定量分析,探究贡嘎山各海拔梯度中抗性基因和可移动遗传元件的多样性和丰度,并耦合分析其与理化因子的关系,以期为评估高原土壤的微生物生态安全提供理论依据,也为未来评估不同土壤环境的抗生素抗性基因污染水平提供的参考数据。

1 材料与方法

1.1 采样点描述

贡嘎山位于青藏高原东南缘(北纬 29°33'12"~29°36'30",东经 101°57'50"~102°05'49"),在雅砻江与大渡河之间,横断山系大雪山脉的中南段,最高海拔 7 556 m^[15]。气候上处于我国东部季风区亚热带与青藏高原高寒区温带的过渡带上,由于受到季

风气候的影响,贡嘎山各海拔梯度的温度以及降水量均存在显著的不同,由于其特殊的山地生态系统,不同海拔梯度上的植被类型也存在差异^[16]。由于特定的地理环境和特殊的气候条件,相比于平原的人居聚集地,生态环境受人类活动的影响较小。因此,笔者选取了贡嘎山 7 个海拔梯度的土壤作为研究对象,进行其抗性基因和可移动遗传元件的分布特征进行了分析,具体样点描述如表 1 所示。

表 1 贡嘎山采样点描述

编号	经纬度	海拔/m
G1	北纬 30°35'429", 东经 102°23'182"	2 948
G2	北纬 30°35'643", 东经 102°23'75"	2 987
G3	北纬 30°37'383", 东经 102°23'657"	3 174
G4	北纬 30°37'443", 东经 102°22'533"	3 274
G5	北纬 30°41'03.16", 东经 102°27'48.65"	3 467
G6	北纬 30°41'2171", 东经 102°27'262"	3 493
G7	北纬 30°41'25.93", 东经 102°27'17.32"	3 651

1.2 样品采集

样品于 2016 年 10 月在贡嘎山(2 948~3 651 m)采集,沿海拔梯度由低到高进行的采集,沿途共设置了 7 个海拔梯度,每个采样点采集 3~5 个土壤样品混合(50 m×50 m 样方),依次编号为 G1、G2、G3、G4、G5、G6、G7(表 1),所有土壤样品采集土壤表层 10 cm,并去除可见植物根系和有机质残渣,土壤样品放置于无菌袋中,立即运回,过 2 mm 筛,冷藏保存(4 ℃),以备后续实验分析。

1.3 理化性质分析

1.3.1 土壤中 pH 的测定

采用 pH 仪(YSI 6600 multiparameter probe, USA)测定土壤的 pH 值。取 8 g 土壤于 150 mL 的锥形瓶中,加入水土质量比为 5:2 的超纯水,随后将样品放置于摇床上,用 180 r/min 的转速振荡 60 min,振荡结束后,静置 10~15 min 后,取其上清液,用 pH 计进行测定。

1.3.2 土壤中含水量的测定

使用烘干称重法测定土壤中的含水量。将小烧杯洗净烘干,称取烧杯质量记下质量为 m_1 。称取 8 g 新鲜土壤样品至烧杯中,把烧杯和土壤样品的总质量记为 m_2 ,然后放在 80 ℃ 烘箱内烘干 18 h 后,取出,盖好盖子后,放置于烘干器中,冷却至室温后,记下质量 m_3 。根据公式: $w(\text{H}_2\text{O}) = (m_2 - m_3) / (m_3 - m_1) \times 100\%$,计算其土壤的含水量 $w(\text{H}_2\text{O})$ 。

1.3.3 土壤有机碳的测定

取部分土壤样品进行风干,然后称取 100 mg 样品放入 50 mL 离心管中,加入少量去离子水,然后再

加入 10 mL 浓度为 1 mol/L 的盐酸溶液, 并将其混匀。混匀后把离心管移至 80 °C 水浴锅里加热 20~30 min, 之后取出, 冷却之后, 去离子水定容到 50 mL。以 4 000 r/min 的转速在离心机上离心 10 min, 去除上清液, 之后再加入 50 mL 去离子水, 重复以上操作 2 次。将离心管置于 70 °C 烘箱中 12 h 烘干后, 将其烘干的样品压碎至粉末状, 再用锡箔纸进行包样。使用碳氮分析仪 (Elementar-TOC, 德国) 测定土壤中的有机碳 (total organic carbon, TOC)。

1.3.4 土壤中的铵态氮和硝态氮的测定

采用 2 mol/L 氯化钾浸提的方法来测定土壤中的 NO_3^- -N 和 NH_4^+ -N。称取 5.0 g 土壤样品至 250 mL 的锥形瓶中, 加入 25 mL 的 2 mol/L 氯化钾溶液, 锥形瓶封口, 在室温条件下, 将样品放置于摇床以 180 r/min 的转速保持 60 min, 之后取出放在稳定的位置静置 30 min, 使用定量滤纸过滤后, 可得滤液。如果提取液的颜色较深, 可加入活性炭除色。采用全自动间断化学分析仪 (CleverChem200, 德国) 测定滤液中的 NO_3^- -N 和 NH_4^+ -N 的含量, 然后把测定结果换算成每克干重的无机氮含量, 每个土壤样品做 3 个重复。

1.4 总 DNA 的提取

采用 Fast DNA Spin Kit for Soil 试剂盒 (MP Biomedicals, Cleveland, OH, USA) 提取土壤中的微生物总 DNA, 每个样品 3 个重复。DNA 浓度和质量采用 NanoDrop 分光光度计 (Nanodrop Technologies Inc., Wilmington, DE) 进行测定和评估, 所提取的 DNA 样品的 A260/A280 值为 1.8~2.0, 提取的 DNA 保存于 -20 °C 以备后续分析。

1.5 高通量荧光定量 PCR 测定抗生素抗性基因和可移动遗传元件

土壤样品中的抗生素抗性基因在 SmartChip Real-Time PCR Systems (WaferGen Inc., USA) 高通量实时荧光定量 PCR 平台测定。抗性基因引物根据参考文献 [5], 使用了 283 对抗性基因引物, 8 对转座酶基因, 4 对整合酶-整合子基因和 1 对细菌通用 16S rRNA 基因引物。高通量荧光定量 PCR 扩增体系的体积为 100 nL, 其中各试剂终质量浓度为: $1 \times \text{LightCycler 480 SYBR}^\circledR \text{ Green I Master Mix}$ (Roche, USA), Nuclease-free PCR-Grade water, $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的牛血清蛋白 (BSA), $5 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 的 DNA 模板和 $1 \mu\text{mol}/\text{L}$ 的上下游引物。定量 PCR 反应条件为: 95°C 预变性 10 min; 95°C 变性 30 s, 60°C 退火延伸 30 s, 总共 40 个循环; 热循环仪 Cyler 的程序自动

升温进行熔解曲线分析。高通量荧光定量 PCR 每个芯片都有不添加 DNA 模板 (用灭菌超纯水代替) 的阴性对照。高通量荧光定量 PCR 反应得到的数据通过 Cyler 预设定的筛选条件 (扩增效率介于 1.8~2.2) 进行导出。根据 SmartChip Real-Time PCR Systems 的灵敏度和精确度, 确定循环次数 C_t 值为 31 时作为仪器的检测限, 每个样品的 2 个重复均被检测出, 且扩增效率在 90%~110% 内被视为有效数值。

1.6 统计分析

抗生素抗性基因和可移动遗传元件的相对拷贝数参照 Zhu 等 [17] 的研究, 用公式 (1) 进行估算。根据 Stalder 等 [18] 计算其绝对丰度, 用公式 (2) 进行计算。

$$C = 10^{[(31-C_t) / (10/3)]} \quad (1)$$

$$A = \frac{C}{16S \text{ rRNA 基因的相对拷贝数}} \times 16S \text{ rRNA 基因绝对拷贝数} \quad (2)$$

式中: C 是抗生素抗性基因的相对拷贝数, copies/cell; C_t 是 PCR 反应收集到特定荧光时的循环次数; A 是抗生素抗性基因的绝对丰度, copies/g。

利用 Excel 2016 计算所有数据的平均值和标准差。采用 SPSS Statistics 23 (IBM, 美国) 进行高级数据统计分析。条形图是由 OriginPro 2018 (OriginLab, 美国) 生成的。采用冗余分析和 Procrustes 检验对抗性基因和细菌群落进行相关性分析, 使用 R 3.6.0 软件的 vegan, devtools 和 ade4 软件包进行制图 (Redundancy analysis, RDA)。使用 HemI 绘制热图。

2 结果与讨论

2.1 贡嘎山各海拔梯度的抗生素抗性基因和可移动遗传元件的检测个数比较分析

如图 1 所示, 在贡嘎山 2 948~3 651 m 海拔区间的 7 个土壤样品中, 总共检测到 132 种抗性基因和 10 种可移动遗传元件。在 7 个土壤样品中, 每个土壤中含有 46~89 种抗性基因和 3~7 种可移动遗传元件。在海拔 3 274 m 的土壤 (G4) 中检测到最高, 在海拔 2 987 m 的土壤 (G2) 中检测到最低, 并随着海拔的升高有增加趋势。并且这一结果与 McCann 等 [19] 研究的高北极土壤生态系统中检测到抗性基因种类数相当, 在高北极土壤中共检测到 131 种抗性基因, 并且各样品中检测到 19~89 种抗性基因。该数据显著低于受人为干扰较多的环境中的抗生素抗性基因种类个数。在这 7 个土壤中的检测

到的抗生素抗性基因个数(46~89种)显著低于河口底泥(200种)^[5]、养猪场以及周边土壤(149种)^[14]、活性污泥(156种)^[4]等受人为干扰多的环境中检测到抗性基因数量,该结果表明人类活动可能加剧了抗性基因的传播。

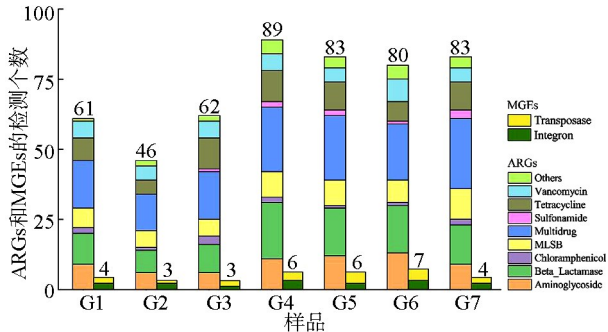


图1 贡嘎山各海拔梯度的土壤中检测到的抗性基因和可移动遗传元件的个数

从检测出的抗性基因个数来看,主导的抗性基因是多重耐药类,占整体的27.4%,其次是 β -内酰胺类、氨基糖类、四环素类和MLSB类,分别占整体的19.2%、13.1%、12.3%和11.1%。这一结果与Chen等^[20]在南极深海底泥检测的抗性基因抗性类型相似,表明在不受人活动排入环境的抗生素或污染物的胁迫下,抗生素抗性基因的自然背景组成在不同环境样品中有一定的相似性。

2.2 贡嘎山各海拔梯度土壤中的抗生素抗性基因和可移动遗传元件的检测丰度比较分析

为了评估抗性基因和可移动遗传元件在整个细菌群落中富集程度,计算了所有样品中每个细菌细胞中抗性基因和可移动遗传元件的基因相对拷贝数(图2),以表征该样品中抗生素抗性基因的富集程度和传播风险^[4]。由图2可知,贡嘎山各海拔梯度的土壤样品中抗生素抗性基因的相对丰度为0.019~0.043 copies/cell,可移动遗传元件的相对丰度为0.000~0.013 copies/cell,且其抗生素抗性基因的相对丰度则随着海拔高度的升高而增加。贡嘎山土壤中的抗生素抗性基因相对丰度与人为干扰少的地区南极深海沉积物^[20]的结果相似,而显著低于河口底泥^[5]、养猪场及周边土壤^[14]、稻田土壤^[7]等人为干扰多的地区。进一步表明人类活动是抗生素抗性基因传播和富集的重要因素。

贡嘎山各海拔梯度的土壤样品中抗性基因和可移动遗传元件的相对丰度差异均有统计学意义($P < 0.05$)。各海拔梯度上土壤环境的差异可能对其抗性基因和可移动遗传元件的丰度有显著的影响。

李超男等^[21]发现海拔的高度会影响地区的营养物质、pH、温度等环境因素,对土壤中的微生物群落结构有着显著的影响。已有大量的研究发现微生物的群落结构和抗生素抗性基因有显著相关性^[22],表明贡嘎山各海拔梯度土壤中微生物群落结构的不同,可能是造成抗生素抗性基因丰度的差异的原因之一。

从不同种类抗生素抗性基因的相对丰度来看,贡嘎山各海拔梯度的土壤样品中主导的抗性基因的类型为多重耐药类、 β -内酰胺类和万古霉素类,分别占总相对丰度的76.5%、7.5%和5.6%。有研究表明携带有多重耐药类基因的微生物可能对多种抗生素具有耐药性,进而形成“超级细菌”,多重耐药性类抗性基因的传播对人类和动物的抗感染治疗是极大的威胁^[23],一旦这些抗生素抗性基因进入致病菌,则可能通过食物链或者直接感染进入人体^[24],对人类健康会有潜在的威胁。万古霉素作为人类抵抗细菌感染的“最后一道防线”之一^[25]。在贡嘎山样品中检测出万古霉素抗性基因,表明高原土壤的微生物安全问题也亟待做科学评估,避免抗性基因的潜在传播。

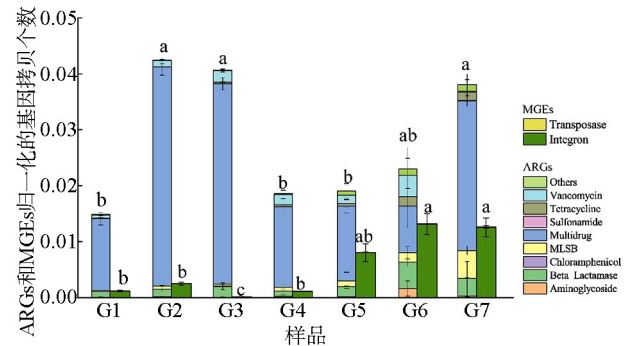


图2 贡嘎山各海拔梯度的土壤中抗性基因和可移动遗传元件的相对拷贝数

抗生素抗性基因在环境中的水平基因转移与可移动遗传元件密切相关,抗性基因可以随着可移动元件(如整合子、转座酶、质粒等)进行水平基因转移,使得抗性基因在不同种属微生物间传播,更是加剧了抗性基因在不同环境介质中的传播风险^[26]。如表2所示,在贡嘎山的土壤样品中,相关性分析发现总抗性基因与总可移动遗传元件差异无统计学意义($P > 0.05$),这一结果与以往对受人为干扰较大的环境的研究相反,如在城市河流沉积物^[6]、稻田土壤^[7]、粪肥^[27]等环境中,抗生素抗性基因和可移动遗传元件的丰度均呈显著正相关,预示着在这些环境中抗性基因的水平转移加剧抗性基因的迁移和传播风险。而在贡嘎山的土壤样品中

相反的结果可能表明高原土壤中的抗生素抗性基因的水平转移通量低于受人为干扰较多的环境。然而,其总的抗性基因与转座酶类可移动元件有显著相关性($r=0.81, P<0.05$),表明贡嘎山的抗性基因可能通过转座酶类移动元件进行水平基因转移,进而增加其传播风险。

表 2 可移动遗传元件与各抗性基因相对拷贝数的相关性分析

	总可移动遗传元件	整合子	转座酶
总抗性基因	-0.007	-0.006	0.810*

注:“*”表示 $P<0.05$ 。

2.3 贡嘎山各海拔梯度的土壤中抗生素抗性基因和可移动遗传元件的亚基组成分析

如图 3 所示,贡嘎山 7 个海拔梯度的土壤中抗性基因和可移动遗传元件亚基组成差异有统计学意义($P<0.05$)。7 个土壤样品中的主导抗性基因和可移动遗传元件亚基为 *mexF*、*oprJ*、*acrA-04*、*acrA-05* (多重耐药类), *vanC-03* (万古霉素类), *mphA-01* (MLSB 类), *fox5* (β -内酰胺类) 和 *intI-1* (*clintc*) (整合子类), 占总相对丰度的 1.5%~47.5%。黄福义等^[28]也研究发现施用了猪粪的水稻土壤中 *mexF* 基因的丰度,相对于对照组土壤增加 1 791 倍。随着人类医疗中万古霉素的广泛使用,已在很多环境中富集,如河口沉积物^[5]、土壤^[29]、水体^[30]。多重耐药类基因 *mexF* 和万古霉素类基因 *vanC* 在贡嘎山地区被检测出高的丰度,表明贡嘎山地区可能受到了轻微人类活动的影响,或是该高原环境选择出这些抗性基因。*intI-1* (*clintc*) 临床一类整合子是环境细菌 *int I1* 变体进化过程中的一个衍生物^[31]。*intI-1* (*clintc*) 基因作为可移动遗传元件亚基可能加剧其贡嘎山地区抗性基因的传播和扩散。

贡嘎山各海拔梯度的土壤中主导抗性基因和可移动遗传元件亚基有所不同。如低海拔 G1 (2 948 m) 主导的亚基型为 *mexF*、*oprJ*、*oprD* (多重耐药类), *cphA-01*、*fox5*、*blaSFO* (β -内酰胺类), *vanYB* (万古霉素类), *erm(36)* (MLSB 类) 和 *intI-1* (*clintc*) (整合子类), 占总相对丰度的 93%。高海拔 G7 (3 651 m) 主导的亚基型为 *mexF*、*acrA-04*、*mepA*、*acrA-05*、*qacEdelta1-02* (多重耐药类), *mphA-01* (MLSB 类), *tetG-01* (四环素类), *pncA* (其他类) 和 *intI-1* (*clintc*) (整合子类), 占总相对丰度的 84%。该结果表明,海拔高度是影响抗生素抗性基因多样性组成的因素之一。此前已有研究发现海拔是影响稻田土壤中抗生素抗性基因分布和组成差异的因素^[7]。

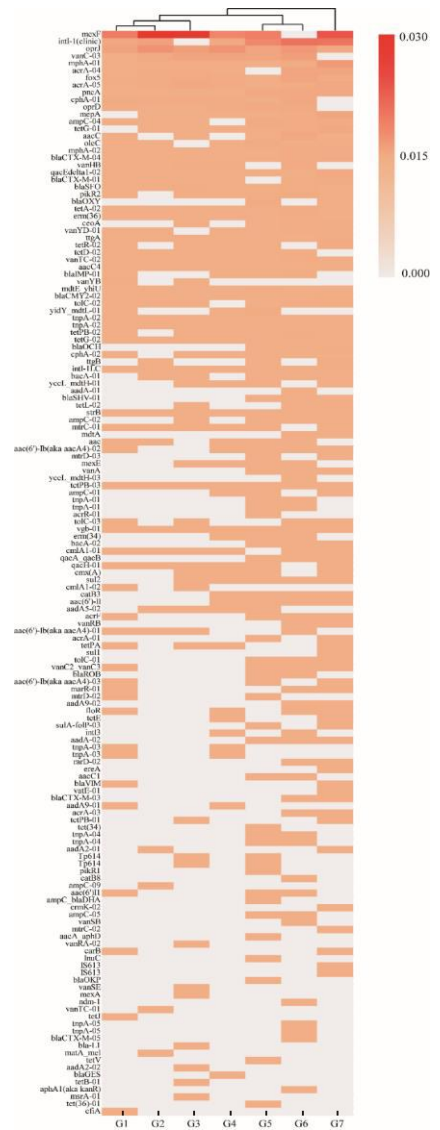


图 3 基于抗性基因和可移动遗传元件的相对拷贝数热图

2.4 贡嘎山海拔梯度的土壤中抗性基因与环境因子的冗余分析

如图 4 所示,利用贡嘎山不同海拔梯度的 7 个土壤样品抗性基因的相对丰度,以及 6 种理化因子 (pH、 NH_4^+-N 、 NO_3^--N 、海拔、TOC 和含水量) 做冗余分析。结果发现,贡嘎山各海拔梯度的土壤样品分散于 4 个象限中,进一步表明贡嘎山各海拔梯度土壤中的抗性基因多样性组成有所差异。冗余分析的总方差为 97.1%,表明能够真实地反映贡嘎山各海拔梯度中环境因子对抗性基因分布的影响 (图 4)。冗余分析表明,影响贡嘎山各海拔梯度中抗性基因的多样性和丰度的环境因子有 NO_3^--N 、 NH_4^+-N 、含水量、海拔和 TOC,然而,各理化性质与抗生素抗性基因差异无统计学意义 ($P>0.05$) (图 4、表 3)。很多研究表明抗生素抗性基因的组成和分布受到环境样品理化性质的显著影响^[7,32-33]。有研究表示

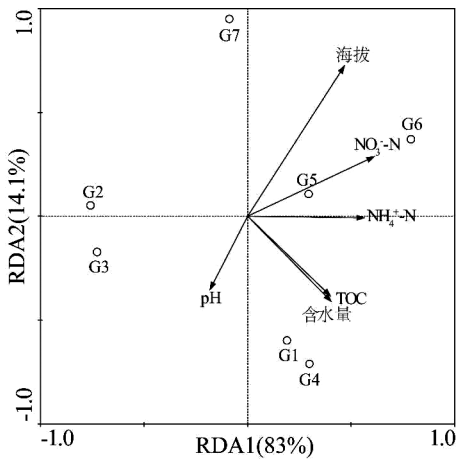


图 4 基于抗性基因的相对丰度和各环境因子的冗余分析

表 3 基于土壤样品的抗性基因相对丰度和各环境因子的冗余分析得到 Eigen、 F 和 P 值

变量	Eigen 值	变量解释率/%	F 值	P 值
$\text{NO}_3^- - \text{N}$	0.33	33	2.44	0.148
$\text{NH}_4^+ - \text{N}$	0.29	29	3.05	0.126
含水量	0.20	20	6.66	0.212
海拔	0.09	9	0.99	0.438
TOC	0.05	5	0.46	0.670

$\text{NO}_3^- - \text{N}$ 和 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 作为土壤中重要的营养物质,与土壤中抗生素抗性基因的分布情况呈显著相关^[7],pH 作为影响土壤微生物群落结构的重要环境因子,也对土壤的抗生素抗性基因的多样性有重要影响^[34]。

3 结论

本研究通过高通量荧光定量 PCR 的方法,对贡嘎山各海拔梯度的土壤中抗生素抗性基因的多样性特征进行分析,得出以下结论:(1)在贡嘎山不同海拔的土壤样品中抗性基因和可移动遗传元件的个数、丰度及种类组成有显著差异。所有样品中主导的抗性基因的类型均为多重耐药类、 β -内酰胺类和万古霉素类。(2)贡嘎山各海拔梯度的土壤样品中抗性基因和可移动遗传元件的种类个数和丰度都显著低于受人为干扰较多的环境样品,为研究抗生素抗性基因污染提供基础对照数据。(3)贡嘎山不同海拔土壤的理化性质的差异可能导致不同土壤中抗生素抗性基因多样性的差异。未来针对受人为干扰较少的自然环境中的抗生素抗性基因背景值的研究,可从广度和深度上比较不同高原土壤中抗生素抗性基因的分布规律。

参考文献:

- [1] ZHU Y G, GILLINGS M, SIMONET P, et al. Microbial mass movements[J]. Science, 2017, 357 (6356): 1099-1100.
- [2] STEVENSON C, HALL J P, HARRISON E, et al. Gene mobility promotes the spread of resistance in bacterial populations[J]. The Isme Journal, 2017, 11(8): 1930-1932.
- [3] 朱冬,陈青林,丁晶,等.土壤生态系统中抗生素抗性基因与星球健康:进展与展望[J]. 中国科学:生命科学, 2019, 49 (12): 1652-1663.
- [4] SU J Q, WEI B, OU-YANG W Y, et al. Antibiotic resistome and its association with bacterial communities during sewage sludge composting[J]. Environmental science & technology, 2015, 49 (12): 7356-63.
- [5] Finley R L, Collignon P, Larsson D G J, et al. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment[J]. Clinical Infectious Diseases, 2013, 57(5): 704-710.
- [6] ZHENG J, GAO R, WEI Y, et al. High-throughput profiling and analysis of antibiotic resistance genes in East Tiaoxi River, China[J]. Environmental Pollution, 2017, 230: 648-654.
- [7] 何燕,朱冬,王东,等.四川省稻田土壤的抗生素抗性基因多样性研究[J]. 农业环境科学, 2020, 39 (6): 1249-1258.
- [8] 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]. Sci Total Environ, 2019, 656:512-520.
- [9] TIEN Y C, LI B, ZHANG T, et al. Impact of dairy manure pre-application treatment on manure composition, soil dynamics of antibiotic resistance genes, and abundance of antibiotic-resistance genes on vegetables at harvest[J]. Science of the Total Environment, 2017, 581:32-39.
- [10] RIZZO L, MANAIA C, MERLIN C, et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment:a review[J]. Science of the Total Environment, 2013, 447:345-360.
- [11] ZHANG S, YANG G, HOU S, et al. Distribution of ARGs and MGEs among glacial soil, permafrost, and sediment using metagenomic analysis[J]. Environmental Pollution, 2018, 234:339-346.
- [12] BROWN M G, BALKWILL D L J. Antibiotic resistance in bacteria isolated from the deep terrestrial subsurface[J]. Microbial Ecology, 2009, 57 (3): 484-493.

- [13] TOTH M, SMITH C, FRASE H, et al. An antibiotic-resistance enzyme from a deep-sea bacterium[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132 (2): 816-823.
- [14] ZHU Y G, JOHNSON T A, SU J Q, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110 (9): 3435-3440.
- [15] LIU X Z, WANG G. Measurements of nitrogen isotope composition of plants and surface soils along the altitudinal transect of the eastern slope of Mount Gongga in southwest China[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2010, 24 (20): 3063-3071.
- [16] SUN H, WU Y, YU D, et al. Altitudinal gradient of microbial biomass phosphorus and its relationship with microbial biomass carbon, nitrogen, and rhizosphere soil phosphorus on the eastern slope of Gongga Mountain, SW China[J]. *PLoS One*, 2013, 8 (9): e72952.
- [17] ZHU Y G, ZHAO Y, LI B, et al. Continental-scale pollution of estuaries with antibiotic resistance genes[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2 (4): 16270.
- [18] STALDER T, BARRAUD O, JOVÉ T, et al. Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool[J]. 2014, 8 (4): 768-777.
- [19] McCANN C M, CHRISTGEN B, ROBERTS J A, et al. Understanding drivers of antibiotic resistance genes in High Arctic soil ecosystems[J]. *Environment International*, 2019, 125:497-504.
- [20] CHEN Baowei, YANG Ying, LIANG Ximei, et al. Metagenomic profiles of antibiotic resistance genes (ARGs) between human impacted estuary and deep ocean sediments[J]. *Environment Science Technology*, 2013, 47:12753-12760.
- [21] 李超男,李家宝,李香真.贡嘎山海拔梯度上不同植被类型土壤甲烷氧化菌群落结构及多样性[J].*应用生态学报*, 2017, 28 (3): 805-814.
- [22] JIA S, SHI P, HU Q, et al. Bacterial community shift drives antibiotic resistance promotion during drinking water chlorination [J]. *Environmental Science Technology*, 2015, 49 (20): 12271-12279.
- [23] OPPEGAARD H, STEINUM T M, WASTESON Y J. Horizontal transfer of a multi-drug resistance plasmid between coliform bacteria of human and bovine origin in a farm environment[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2001, 67 (8): 3732-3734.
- [24] CHEN Q L, AN X L, ZHU Y G, et al. Application of struvite alters the antibiotic resistome in soil, rhizosphere, and phyllosphere[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51 (14): 8149-8157.
- [25] 雷雨田.人类最后的武器——万古霉素[J].*慢性病学杂志*, 2008(6):52-53.
- [26] SU J Q, AN X L, LI B, et al. Metagenomics of urban sewage identifies an extensively shared antibiotic resistome in China[J]. *Microbiome*, 2017, 5 (1):1-15.
- [27] ZHANG Y J, HU H W, GUO M, et al. Temporal succession of soil antibiotic resistance genes following application of swine, cattle and poultry manures spiked with or without antibiotics-ScienceDirect[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 231 (2): 1621-1632.
- [28] 黄福义,李虎,韦蓓,等.长期施用猪粪水稻土抗生素抗性基因污染研究[J].*环境科学*, 2014, 35 (10): 3869-3873.
- [29] 张毓森,叶军,苏建强.粪肥与铜一次性施用对农田土壤抗生素抗性基因的长期影响[J].*应用与环境生物学报*, 2019, 25 (2): 328-332.
- [30] RODRIGUEZ-MOZAZ S, CHAMORRO S, MARTI E, et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river[J]. *Water Research*, 2015, 69:234-242.
- [31] GILLINGS M R, GAZE W H, PRUDEN A, et al. Using the class I integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution[J]. *ISME J*, 2015, 9 (6): 1269-1279.
- [32] LIU X, YANG S, WANG Y, et al. Metagenomic analysis of antibiotic resistance genes (ARGs) during refuse decomposition [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 634:1231-1237.
- [33] 王佳佳.北京地区蔬菜土壤抗生素抗性基因分布特征的研究[D].吉林:东北电力大学, 2016.
- [34] LI M M, RAY P, TEETS C, et al. Short communication: Increasing temperature and pH can facilitate reductions of cephalosporin and antibiotic resistance genes in dairy manure slurries[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103 (3):2877-2882.