

DOI:10.11766/trxb202402180072

崔格格, 张耀中, 杨天杰, 王世梅, 黄艺烁, 高阳, 韦中, 徐阳春, 沈其荣. 菌渣有机肥对番茄生长及土壤抗生素抗性基因累积的影响[J]. 土壤学报, 2025.

CUI Gege, ZHANG Yaozhong, YANG Tianjie[†], WANG Shimei, HUANG Yishuo, GAO Yang, WEI Zhong, XU Yangchun, SHEN Qirong. Effects of Bacterial Residue Organic Fertilizer on Tomato Growth and Soil Antibiotic Resistance Genes Accumulation[J]. Acta Pedologica Sinica, 2025.

菌渣有机肥对番茄生长及土壤抗生素抗性基因累积的影响

*

崔格格, 张耀中, 杨天杰[†], 王世梅, 黄艺烁, 高阳, 韦中, 徐阳春, 沈其荣

(江苏省固体有机废弃物资源化高新技术研究重点实验室, 国家有机类肥料工程技术研究中心, 江苏省有机固体废弃物资源化协同创新中心, 南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

摘要: 菌渣是抗生素合成中间体(6-氨基青霉烷酸)发酵过程中产生的固体废弃物, 可能具有增加抗生素抗性基因(ARGs)传播的风险。目前, 堆肥化处理具有无害化和资源化等特点, 已成为菌渣处理的主要手段。本研究旨在探究菌渣有机肥对番茄生长及土壤 ARGs 累积的影响, 以评估菌渣有机肥的生态风险。以经济作物番茄为研究对象, 通过田间试验, 分析以菌渣为原料制备的有机肥施入土壤后, 对番茄生理指标、土壤理化性质、细菌群落结构及 ARGs 的多样性和丰度变化的影响。结果表明, 施用菌渣有机肥可提升田间番茄地上部干物质量, 连续两季施用可增加番茄维生素 C 含量, 增加土壤硝态氮含量。菌渣有机肥处理后根际土壤细菌群落多样性无显著变化, 但与常规施肥相比, 变形菌门丰度显著升高, 绿湾菌门丰度显著降低。施用菌渣有机肥后番茄土壤中 ARGs 种类多样性无显著变化, 但氨基糖苷类抗性基因 *aadA1*、磺胺类抗性基因 *sul(II)* 显著高于常规复合肥处理。藤黄单胞菌(*Luteimonas*) 丰度与四环素类、氨基糖苷类和磺胺类抗性基因丰度均具有显著正相关性。施用菌渣有机肥番茄根际土壤中未富集 β -内酰胺类 ARGs, 四环素类、氨基糖苷类和磺胺类等 ARGs 在根际微生物中积累的风险有待进一步评估。

关键词: 菌渣; 有机肥; 番茄; 抗生素抗性基因 (ARGs); 微生物群落

中图分类号: S144; S154.3 文献标志码: A

Effects of Bacterial Residue Organic Fertilizer on Tomato Growth and Soil Antibiotic Resistance Genes Accumulation

CUI Gege, ZHANG Yaozhong, YANG Tianjie[†], WANG Shimei, HUANG Yishuo, GAO Yang, WEI Zhong, XU Yangchun, SHEN Qirong

(Jiangsu Provincial Key Lab for Solid Organic Waste Utilization, National Engineering Research Center for Organic-based Fertilizers, Jiangsu Collaborative Innovation Center for Solid Organic Waste Resource Utilization, College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

*国家自然科学基金项目(42090064)和阜阳市重点研究与开发计划项目(FYSKJJ202256001)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 42090064), and the Key Research and Development Program of Fuyang City, China (No. FYSKJJ202256001)

[†] 通讯作者 Corresponding author, E-mail: tjyang@njau.edu.cn

作者简介: 崔格格(1999—), 女, 河南郑州人, 硕士研究生, 主要研究根际微生物与植物互作。E-mail: 2021103127@stu.njau.edu.cn

收稿日期: 2024-02-18; 收到修改稿日期: 2024-06-07; 网络首发日期(www.cnki.net):

Abstract: 【Objective】 Bacterial residue is a solid waste produced during the fermentation process of antibiotic synthesis intermediate (6-aminopenicillanic acid). Improper treatment will endanger environmental safety and increase the risk of the spread of antibiotic resistance genes (ARGs). At present, composting is the main method for treating residues due to its harmless and resourceful characteristics. Thus this study was designed to investigate the effects of composted bacterial residue organic fertilizer on tomato growth and soil ARGs accumulation and to assess the ecological risks of residue organic fertilizer. 【Method】 In a field experiment, the tomato plant was used as the research object and the effects of organic fertilizer fermented from bacterial residue of penicillin synthesis intermediates on tomato growth, soil physicochemical properties, bacterial community structure, and the diversity and abundance of antibiotic resistance genes were analyzed. 【Result】 The results showed that the application of residue organic fertilizer can increase the aboveground dry biomass of tomatoes in the field, and continuous application for two seasons can increase the vitamin C content of tomato fruits and soil nitrate nitrogen content. After being treated with organic fertilizer, there was no significant change in the diversity of bacterial communities in the rhizosphere soil. However, compared with conventional fertilization, the abundance of Proteobacteria significantly increased, while the abundance of Chloroflexi significantly decreased. There was no significant change in the diversity of ARGs in tomato soil after the application of residue organic fertilizer, but the amino glycoside resistance gene *aadA1* and sulfonamide resistance gene *sul* (II) were significantly higher than those in conventional compound fertilizer treatment. Also *Luteimonas* sp. was positively correlated with tetracycline, aminoglycoside, and sulfonamide resistance genes. 【Conclusion】 After applying microbial residue organic fertilizer in tomato rhizosphere soil, there was no enrichment of β -lactam ARGs. However the risk of accumulation of tetracycline, aminoglycoside, and sulfonamide ARGs in rhizosphere microorganisms needs further evaluation.

Key words: Bacterial residue; Organic fertilizer; Tomato; Antibiotic resistance genes (ARGs); Microbial community

中国是世界上最大的抗生素研发国和出口国, 抗生素年产量占全球产量的 70% 左右^[1]。抗生素及其中间体生产过程中产生了大量固体废弃物—抗生素菌渣, 每年菌渣废弃物产量达 200 万 t^[2]。抗生素菌渣富含蛋白质、维生素和多种微量元素, 有机质含量达 35%~70%, 氮磷钾养分为 5% 左右, 具有较高的资源化利用价值^[3]。然而菌渣中残留了大量的抗生素或抗生素抗性基因 (Antibiotic resistance genes, ARGs), 直接进入环境后危害“一体化健康”^[4]。因此, 在生态环境安全的发展需求下, 寻找合理的菌渣资源化利用方式, 逐渐成为研究的热点。

将菌渣进行肥料化处理是常用的方法之一, 该技术可实现菌渣的资源化和减量化利用^[5]。在微生物的作用下, 菌渣中的复杂有机物进行代谢分解、矿化、腐化, 最终形成腐殖质等有机质, 提升土壤有机质^[6], 促进植物生长^[7]。菌渣制备成有机肥后, 残留的抗生素含量和 ARGs 丰度均显著下降^[8]。张红娟等^[9]发现堆肥处理的林可霉素菌渣有机肥中 ARGs 丰度显著降低, 且对植物基本无毒害作用。但由于土壤和作物类型多样, 累积施用抗生素菌渣肥料对植物根际土壤微生物群落及其 ARGs 的影响尚不得知, 其生态风险也尚未知晓^[10]。

本研究通过田间试验, 以番茄为研究对象, 以制备青霉素合成中间体 (6-氨基青霉烷酸) 的菌渣为原料制备有机肥, 旨在探究堆肥处理后的菌渣有机肥对作物生长和品质、土壤肥力以及施用菌渣有机肥后土壤环境中的抗生素与 ARGs 传播的影响, 研究结果将为菌渣废物资源化利用及环境风险的评估提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

供试番茄及肥料: 田间试验供试番茄品种为 GBS-极品 903。菌渣为生产 6-氨基青霉烷酸 (青霉素合成中间体) 的发酵废弃物, 经脱盐、烘干等工艺处理后制备成有机肥, 其 pH 为 6.5, 有机质含量为

401.8 g·kg⁻¹, 全氮 73.43 g·kg⁻¹, 全钾 47.10 g·kg⁻¹, 全磷 9.18 g·kg⁻¹, 无青霉素残留。试验用基肥复合肥 (13-7-21) 和追肥复合肥 (10-6-32)。

供试地点及土壤理化性质: 田间试验地点为南京市麒麟镇后村蔬菜大棚 (32°03'N, 118°57'E), 田间土壤 pH 为 6.37, 有机质 14.74 g·kg⁻¹, 全氮 1.27 g·kg⁻¹, 速效钾 254.2 mg·kg⁻¹, 有效磷 150.4 mg·kg⁻¹。

1.2 试验方案及样品采集

番茄苗长出三片真叶后移栽至田间大棚, 设置不施肥 (CK)、常规复合肥 (CF)、菌渣有机肥 (JZ) 3 个处理。常规复合肥处理肥料施用情况如下: 在 2 月上旬施用 1 000 kg·hm⁻² 复合肥 (13-7-21) 作为基肥; 在 3 月下旬施用 500 kg·hm⁻² 复合肥 (10-6-32) 作为追肥。菌渣有机肥处理肥料施用情况如下: 菌渣有机肥作为基肥施入, 替代常规复合肥处理中基肥含氮量的 20%, 确保两个处理土壤中氮、磷、钾含量基本一致 (表 1)。每个处理设置 4 个重复 (4 个小区), 共计 12 个小区, 随机区组排列。每个小区面积为 45 m², 种植 240 株番茄。两季 (2019 年秋季和 2020 年春季) 均在同一小区进行相同施肥处理。移栽 14 周后, 每个小区随机采集 3 棵番茄植株及其根际土壤, 用于后续检测: 采集两季番茄果实、植株、根际土壤样品, 用于检测番茄生物量、果实品质、根际土壤理化性质; 采集春季番茄根际土壤样品, 用于分析施用两季菌渣有机肥对根际土微生物群落结构及 ARGs 相对丰度的影响。

表 1 各处理氮磷钾养分投入量

Table 1 Nitrogen, phosphorus, and potassium nutrient inputs in each treatment

处理 Treatment	基肥 Base fertilizer/(kg·hm ⁻²)		追肥 Top dressing/(kg·hm ⁻²)	总养分投入 Total nutrient input/ (kg·hm ⁻²)		
	复合肥 Chemical fertilizer (13- 7-21)	菌渣有机肥 Bacterial residue organic fertilizer	复合肥 Chemical fertilizer (10-6- 32)	氮 Nitrogen	磷 Phosphorus	钾 Potassium
不施肥 ^①	0	0	0	0	0	0
常规复合肥 ^②	66.67	0	33.33	12.00	6.67	24.67
菌渣有机肥 ^③	53.34	23.61	33.33	12.00	6.85	22.08

①Control, CK, ②Chemical fertilizer, CF, ③Bacterial residue organic fertilizer, JZ.

1.3 番茄生理指标测定

从番茄始果期开始采摘各处理番茄果实, 计算各处理果实生物量并换算为每公顷产量。每个处理取 3 个成熟的番茄果实, 使用阿贝折射仪 (WAY-2S 型, 仪电, 上海) 测定可溶性固形物^[11], 以蒽酮法测定可溶性糖含量^[12], 酸碱滴定法测定可滴定酸含量^[13], 2,6-二氯酚法测定维生素 C 含量^[14]。移栽 14 周后, 各小区随机选择 3 株番茄测定株高、地上部鲜物质量。将连带土壤的番茄根部取出并轻摇, 黏附在根部的土壤视为根际土, 一部分根际土放入 -80 °C 冰箱, 用于土壤微生物群落高通量测序; 一部分根际土存放于 4 °C 冰箱用于土壤铵态氮和硝态氮检测, 另一部分根际土风干, 用于土壤其他理化性质的检测。番茄植株 105 °C 杀青 30 min 后置于 50 °C 烘箱烘至恒重, 测定地上部干物质量。

1.4 土壤理化性质测定

将各处理获得的根际土壤进行土壤理化性质的测定, 指标包括土壤 pH、电导率 (EC)、硝态氮含量、铵态氮含量、有效磷含量、速效钾含量、有机质含量。采用 pH 计测定土壤 pH。采用电导率仪测定土壤 EC 值, 使用流动分析仪 (SUPEC5013 型, 诺普, 杭州) 测定土壤铵态氮、硝态氮含量, 采用钼锑抗比色法测定土壤有效磷含量, 火焰光度计 (FP6410 型, 精密, 上海) 测定土壤速效钾, 采用重铬酸钾外加热法测定土壤有机质^[15]。

1.5 根际土壤 DNA 提取及高通量测序

称取 0.3 g 番茄根际土壤, 采用 PowerSoil 土壤 DNA 提取试剂盒 (MoBio, Carlsbad, CA, 美国) 提取土壤 DNA。详细的操作步骤按 DNA 提取试剂盒说明书进行, 提取后的 DNA 用 Nanodrop (ND2000, Thermo Scientific, DE, 美国) 检测浓度, 并于 -20 °C 保存备用。土壤微生物群落高通量测序使用细菌 16S rRNA (V4 区) 通用引物 (515F 5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3' 和 806R 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 进行测序^[16], 由上海凌恩生物有限公司 (Shanghai Biozeron Biological Technology Co. Ltd) 完成。

1.6 根际土壤 ARGs 丰度检测

根际土壤 ARGs 丰度通过荧光定量 PCR 进行检测, 由上海启因生物科技有限公司完成。荧光定量 qPCR 检测仪器: Step One Plus™ 实时荧光定量 PCR (Thermo), 试剂盒: TB Green™ Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus, Takara, Code No. RR820A), 采用 Step One Plus™ 实时荧光定量 PCR (ABI7500, Thermo, 美国)。本研究检测了目前我国土壤中常见的高危 ARGs^[17], 共 19 种基因, 包括 β -内酰胺类抗性基因 (*blaCTX-M*、*blaTEM*、*ampc*)、氨基糖苷类抗性基因 (*aacc2*、*aada1*、*aada5*)、大环内酯类抗性基因 (*ermA*、*ermB*、*ermF*)、四环素类抗性基因 (*tetM*、*tetO*、*tetW*)、磺胺类抗性基因 (*sul(I)*、*sul(II)*、*sulA*) 和喹诺酮类抗性基因 (*pbp5*、*pbp*、*pbp2X*、*pena*)。

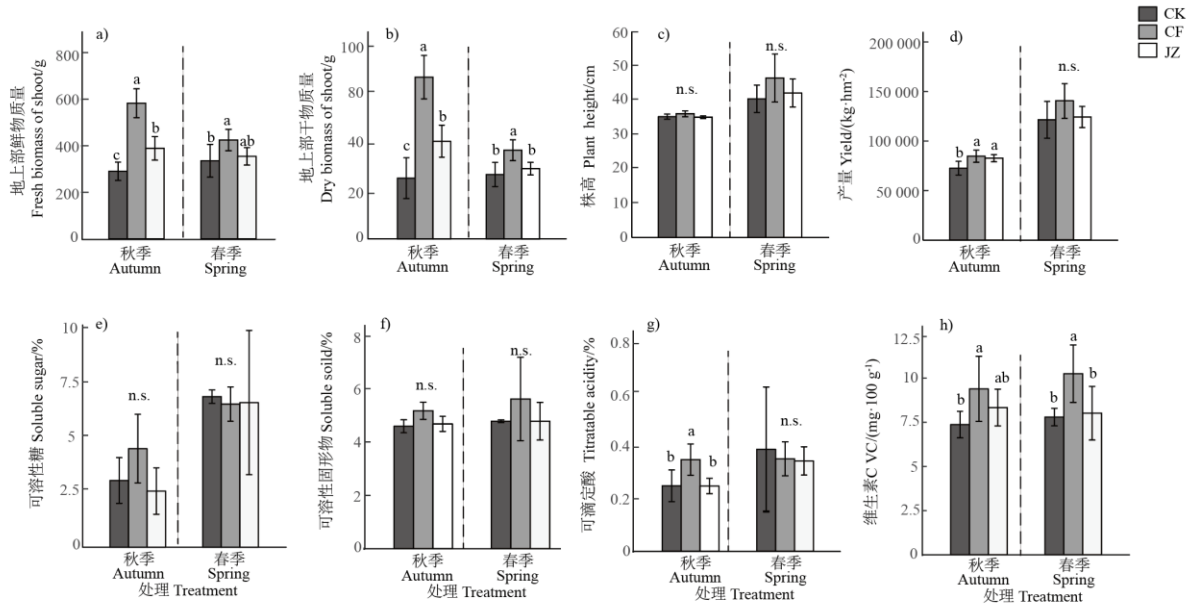
1.7 数据统计与分析

数据 R 语言 4.2.2 (R 包: *vegan*、*picante*、*ggbiplot*、*ggsci*、*psych*、*igraph*、*ggplot2*) 进行处理和统计分析。基于归一化的 *otu_taxa_table* 的置换多元方差分析 (PERMANOVA) 利用 R 平台采用软件包 *vegan* 进行 Adonis 分析, 邓肯 (Duncan) 多重检验法检验处理间的差异显著性 ($P \leq 0.05$)。通过 *silva* (SSU138.1) 16S rRNA 数据库对扩增子代表性序列进行注释^[18]。使用线性判别分析 (Linear discriminant analysis Effect Size, LefSe) 筛选线性判别分析 (LDA) 效应值大于 3.5 的属作为两组差异菌属。基于 *igraph* 包实现属水平网络及模块的可视化, 基于斯皮尔曼 (Spearman) 相关性 (阈值: $|R| > 0.6$ 和 $P \leq 0.05$) 的属水平物种进行网络构建, 使用 *igraph* 包中的 *cluster_fast_greedy* 函数计算聚类模块。

2 结果

2.1 菌渣有机肥对番茄生长和果实品质的影响

菌渣有机肥对田间番茄生长的影响结果见图 1。两个季节中, 相较于常规复合肥 (CF), 秋季 (第一季) 中菌渣有机肥处理番茄地上部鲜物质显著增加, 春季 (第二季) 中无显著变化, 施用菌渣有机肥 (JZ) 连续两季均显著增加番茄地上部干物质质量 (图 1a 和图 1b), 但对番茄株高和产量无显著影响 (图 1c 和图 1d)。不同处理对田间番茄果实可溶性糖含量和可溶性固形物含量无显著影响 (图 1e 和图 1f)。与常规复合肥相比, 秋季中菌渣有机肥处理番茄果实可滴定酸含量显著增加, 但春季无显著变化 (图 1g); 与常规复合肥相比, 春季 (第二季) 菌渣有机肥处理番茄维生素 C 含量显著增加, 但秋季 (第一季) 无显著变化 (图 1h)。



注: n.s.表示处理间差异不显著,不同字母代表相同季节不同处理在 $P \leq 0.05$ 的水平上有显著差异。图中的缩写如下: CK, 不施肥处理; JZ, 菌渣有机肥处理; CF, 常规复合肥处理。使用阿贝折射仪测定可溶性固形物,以蒽酮法测定可溶性糖含量,酸碱滴定法测定可滴定酸含量。下同。Note: n.s., no significant; Different letters indicate statistical significance among different treatments in the same season at $P \leq 0.05$ levels (Duncan's Multiple Range Test); CK: no fertilizers, JZ: application of organic fertilizer fermented from antibiotic residues, CF: application of chemical fertilizer. The soluble solid was determined by Abbe refractometer, the content of soluble sugar was determined by anthrone method, and the content of titratable acid was determined by acid-base titration. The same as below.

图1 不同肥料对田间番茄地上部鲜物质量和干物质量 (a、b)、株高 (c)、产量 (d)、果实品质 (e-h) 的影响
Fig. 1 Effects of different fertilizers on fresh biomass of shoot (a), dry biomass of shoot (b), plant height (c), yield (d), and fruit quality (e-h) of tomato in the field

2.2 菌渣有机肥对土壤理化性质的影响

不同施肥处理对土壤理化性质的影响结果如图2所示。施用菌渣有机肥 (JZ)、常规复合肥 (CF) 和不施肥处理 (CK) 对土壤有机质含量和 EC 无显著影响 (图 2a 和图 2c)。与常规复合肥相比,两个季节中使用菌渣有机肥对土壤 pH 均无显著影响 (图 2b), 秋季中菌渣有机肥处理土壤的铵态氮和有效磷含量显著增加,但春季无显著变化 (图 2d 和图 2g); 与常规复合肥相比,春季菌渣有机肥处理土壤硝态氮含量显著增加,但秋季无显著变化 (图 2e); 两个季节中,施肥均能提升土壤速效钾含量,但菌渣有机肥处理与常规复合肥相比无显著差异 (图 2f)。

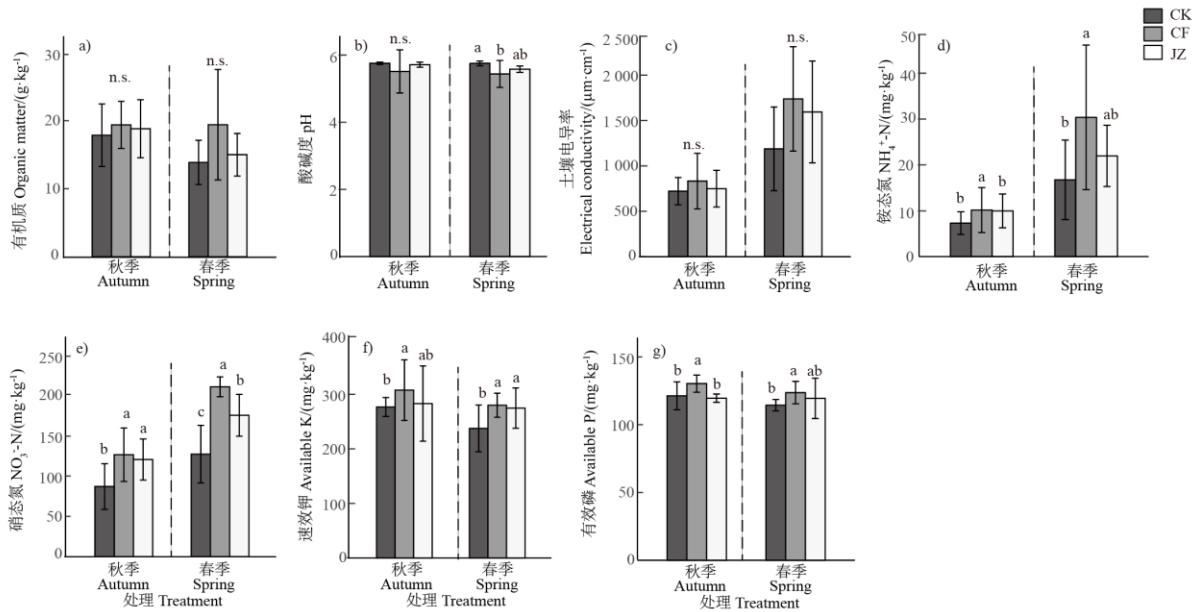


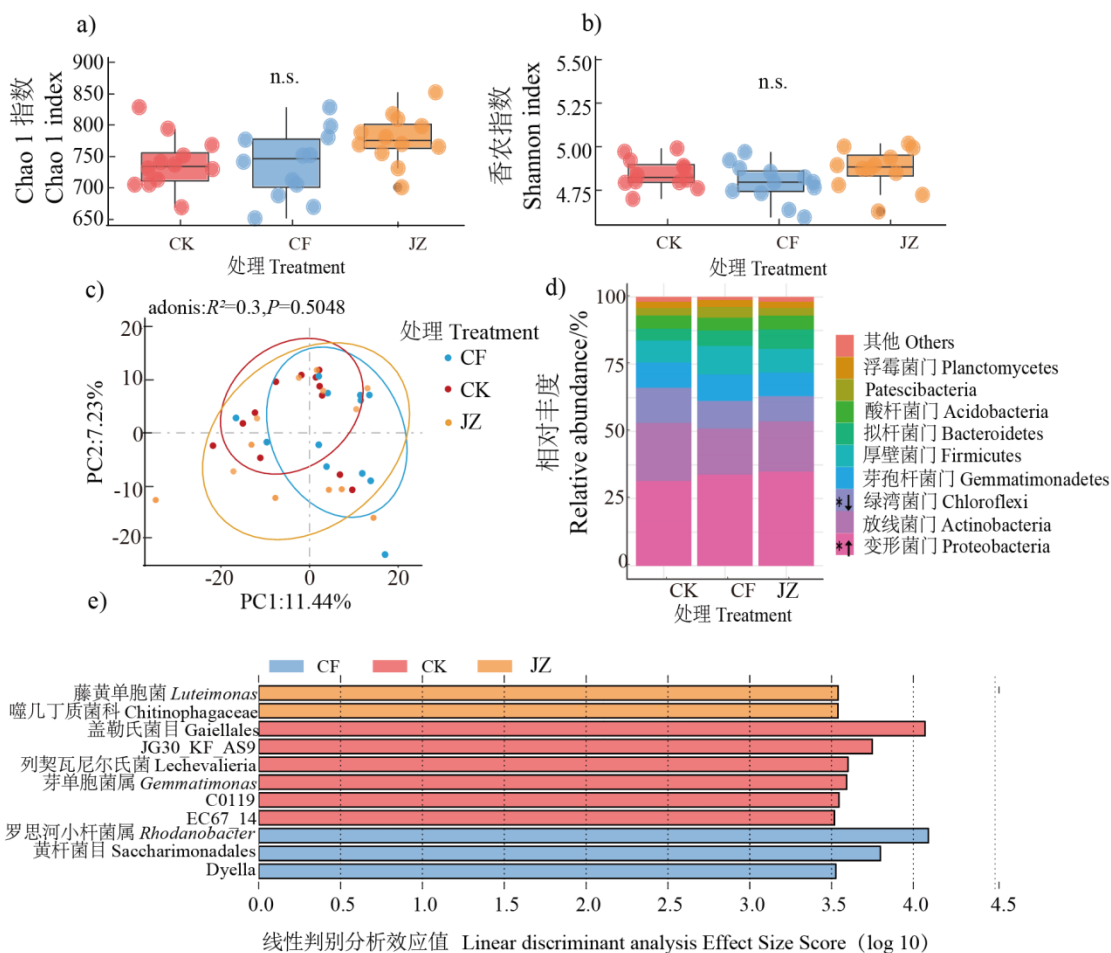
图 2 不同肥料处理对田间番茄土壤化学性质的影响

Fig. 2 Effects of different fertilizers on soil chemical properties of tomato in the field

2.3 菌渣有机肥对番茄根际微生物群落的影响

对不同施肥处理的番茄根际土壤进行扩增子测序，分析不同施肥处理对番茄根际细菌群落的影响，结果如图 3 所示。发现不同处理间根际细菌群落多样性相关 Chao1 指数和香农 (Shannon) 指数无显著差异，表明菌渣有机肥对土壤细菌群落 α 多样性无显著影响 (图 3a 和图 3b)。主成分分析结果显示，轴 1 和轴 2 对结果的解释度分别为 11.44% 和 7.23%，三种处理下的番茄农田土壤细菌群落 β 多样性无显著差异 ($P > 0.05$, 图 3c)。

番茄田间土壤的细菌群落在门水平下的构成结果如图 3d 所示。发现不同处理番茄根际土壤排名前 9 的细菌构成相同 (门水平)，按相对丰度依次排序为：变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、绿弯菌门 (Chloroflexi)、芽单胞菌门 (Gemmatimonadetes)、厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、Patescibacteria、浮霉菌门 (Planctomycetes)；施用菌渣有机肥后变形菌门相对丰度显著高于常规复合肥处理，而绿弯菌门显著低于常规复合肥。施用不同肥料的根际细菌群落 LefSe 分析结果如图 3e 所示，施用常规复合肥的番茄根际中的黄杆菌目 (Saccharimonadales) 和罗思河小杆菌属 (*Rhodanobacter*) 显著富集；施用菌渣有机肥的番茄根际中藤黄单胞菌 (*Luteimonas*) 和噬几丁质菌科 (Chitinophagaceae) 显著富集；CK 处理的番茄根际中列契瓦尼尔氏菌 (*Lechevalieria*) 和芽单胞菌属 (*Gemmatimonas*) 显著富集。



注：图 d 中箭头表示上升和下降，*号代表菌渣有机肥和常规复合肥处理在 $P \leq 0.05$ 水平具显著性差异，图 e 显示线性判别分析（Linear discriminant analysis Effect Size, LefSe）效应值大于 3.5 的菌群，即有统计学差异的生物标志物。Note: The arrows in panel d indicate rising and falling, * indicates a significant difference between the treatment of representative bacterial residue organic fertilizer and conventional compound fertilizer at $P \leq 0.05$ according to Ducan's test, Panel e shows Linear discriminant analysis Effect Size (LefSe) > 3.5, which is the biomarkers with statistical differences.

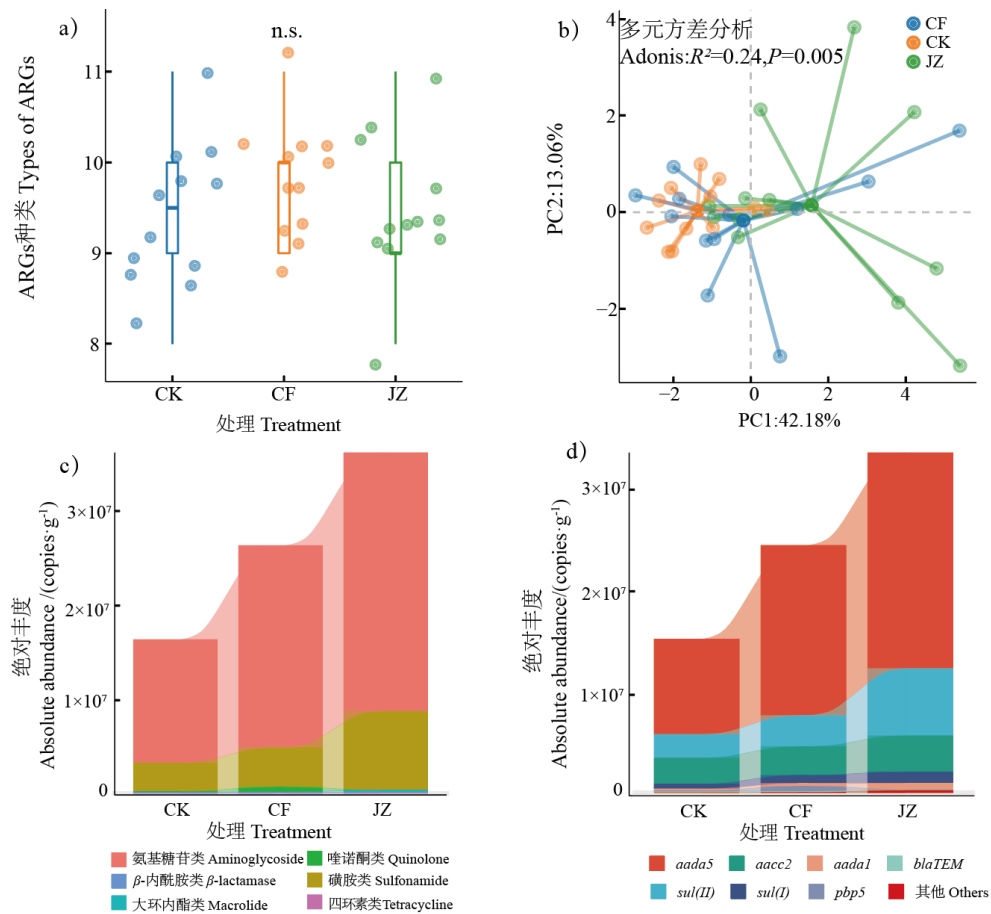
图 3 不同肥料对土壤微生物群落的影响 (a. Chao 1 指数; b. 香农指数; c. 番茄根际细菌群落主成分 (PC) 分析; d. 根际细菌在门水平上的相对丰度; e. 番茄根际细菌群落线性判别 (LefSe) 分析)

Fig. 3 Effects of different fertilizers on soil bacterial community(a. Chao 1 index; b. Shannon index; c. Principal component (PC) analysis of tomato rhizosphere bacterial community; d. Relative abundance of rhizosphere bacteria at the phylum level; e. Linear discriminant analysis Effect Size (LefSe) of tomato rhizosphere bacterial community)

2.4 菌渣有机肥对根际土壤 ARGs 丰度的影响

不同肥料对土壤 ARGs 绝对丰度的影响如图 4 所示。本研究基于 qPCR 技术共检测了 19 种常见高危 ARGs，分别为 β -内酰胺类抗性基因、四环素类抗性基因、氨基糖苷类抗性基因、大环内酯类抗性基因、磺胺类抗性基因和喹诺酮类基因。3 种处理下番茄土壤中 ARGs 种类多样性无显著差异 (图 4a, $P > 0.05$)。根据主成分分析结果可知，轴 1 和轴 2 对结果的解释度分别为 42.18% 和 13.06%，相较于不施肥处理，菌渣有机肥的施用显著影响番茄根际土 ARGs 的绝对丰度 (图 4b, $P < 0.01$)，与常规复合肥处理 (CF) 相比则无显著性差异 (图 4b, $P > 0.05$)。与不施肥处理 (CK) 相比，菌渣有机肥处理 (JZ) 土壤中氨基糖苷类、磺胺类和四环素类抗性基因绝对丰度显著增加，菌渣有机肥处理氨基糖苷类、磺胺类和喹诺酮类抗性基因显著高于常规复合肥处理 ($P < 0.05$, 图 4c)。与不施肥处理 (CK) 相比，菌渣有机肥处理 (JZ) 根际土壤中的氨基糖苷类抗性基因 *aada5*、*aada1* 和磺胺类抗性基因 *sul(II)* 以及四环素类

抗性基因 *tetM*、*tetW* 绝对丰度显著增加，菌渣有机肥处理根际土壤中氨基糖苷类抗性基因 *aada1*、磺胺类抗性基因 *sul(II)* 以及喹诺酮类抗性基因 *pbp5* 显著高于常规复合肥处理 ($P < 0.05$, 图 4d)。



注: β -内酰胺类抗性基因: *blaTEM*, 四环素类抗性基因: *tetM*、*tetO*、*tetW*, 氨基糖苷类抗性基因: *aacc2*、*aada1*、*aada5*, 大环内酯类抗性基因: *ermA*、*ermB*、*ermF*, 磺胺类抗性基因: *sul(I)*、*sul(II)*, 喹诺酮类基因: *pbp5*. Note: β -lactam type of resistance genes contain *blaTEM*, Tetracycline class resistance genes contain *tetM*, *tetO* and *tetW*, Aminoglycoside resistance genes contain *aacc2*, *aada1* and *aada5*, Macrolides resistance genes contain *ermA*, *ermB* and *ermF*, Sulfa resistance genes contain *sul(I)* and *sul(II)*, Quinolone resistance genes contain *pbp5*.

图 4 不同肥料对番茄根际土壤抗生素抗性基因 (ARGs) 绝对丰度的影响 (a. 不同处理下番茄根际土壤 ARGs 种类; b. 番茄根际土壤 ARGs 主成分分析; c. 番茄根际土壤 ARGs 类型的绝对丰度; d. 番茄根际土壤 ARGs 基因水平的绝对丰度)

Fig. 4 The effect of different fertilizers on the absolute abundance of tomato rhizosphere soil antibiotic resistance genes(ARGs) (a. Types of tomato rhizosphere soil ARGs under different conditions; b. Principal component analysis of tomato rhizosphere soil ARGs; c. Absolute abundance of tomato rhizosphere soil ARGs (type level); d. Absolute abundance of tomato rhizosphere soil ARGs (gene level))

2.5 番茄根际微生物与 ARGs 的相关性

将 ARGs 种类丰度与排名前 30 的根际微生物属水平丰度进行相关性分析, 鉴定到多种与 ARGs 显著相关的核心属 (图 5): 藤黄单胞菌属 (*Luteimonas* sp.) 与四环素类、氨基糖苷类和磺胺类 ARGs 显著正相关 (图 5a); 芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 与四环素类和氨基糖苷类 ARGs 显著正相关 (图 5a)。普氏分析表明, 根际土壤中 ARGs 与微生物组成整体变化高度相关 (图 5b, $M^2=0.86$, $P = 0.018$, M^2 代表矢量残差, M^2 值越小, 组间数据一致性越强)。根际土壤微生物网络分析结果发现, 这些与 ARGs 显著相关的核心属主要聚集在节点数较多的网络模块中 (图 5c, 模块 2、3、4)。藤黄单胞菌属 (*Luteimonas*

sp.)、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas* sp.)、黄杆菌属 (*Flavisolibacter* sp.) 等与 ARGs 显著正相关 (图 5c, 网络中橙色节点)。综上, 施用菌渣有机肥后根际土壤中富集的藤黄单胞菌属为核心物种之一, 可能与根际土壤四环素类、氨基糖苷类和磺胺类 ARGs 的富集相关。

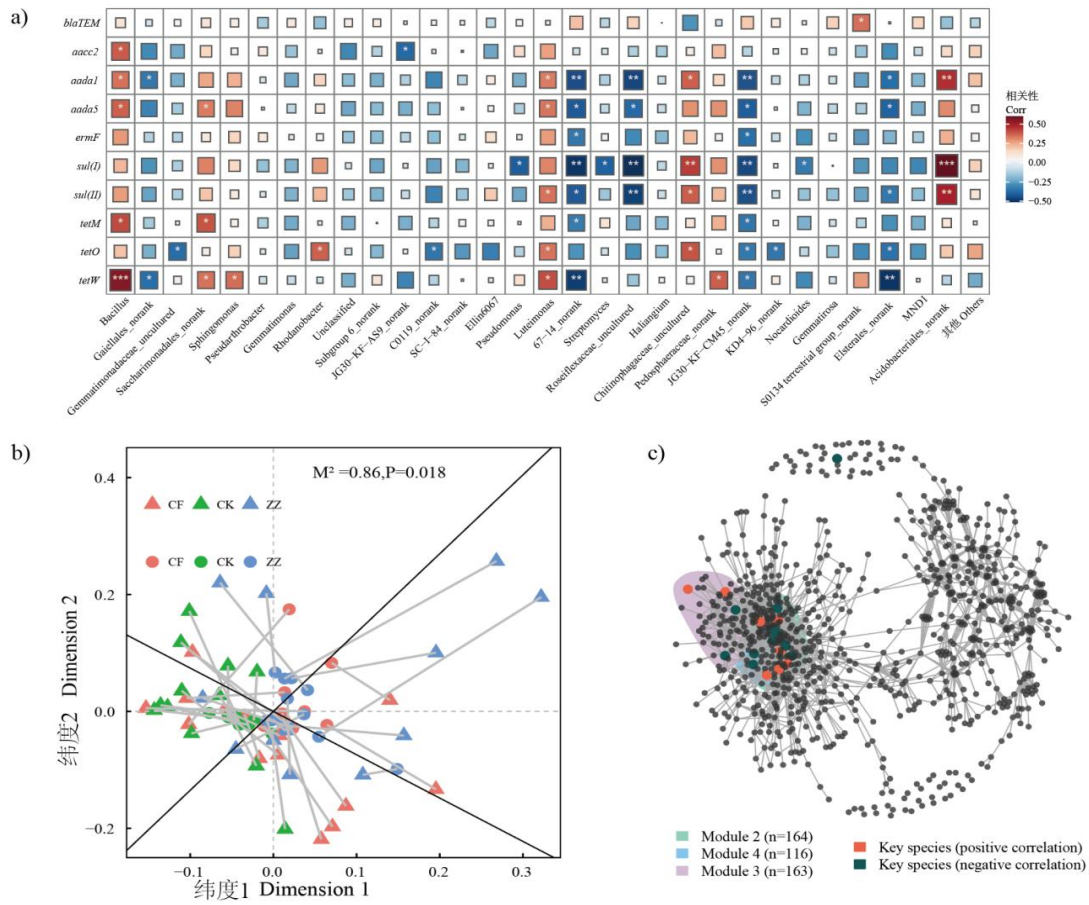


图 5 番茄根际微生物与 ARGs 的相关性及互作网络 (a. ARGs 与根际微生物相关性分析; b. ARGs 与根际微生物普氏分析; c. 番茄根际微生物网络分析)

Fig. 5 Correlation and interaction network between tomato rhizosphere microorganisms and ARGs(a. Correlation analysis between ARGs and rhizosphere microorganisms; b. Procrustes analysis between ARGs and rhizosphere microorganisms; c. Network analysis of tomato rhizosphere microorganisms)

3 讨论

3.1 菌渣有机肥对番茄生长及土壤性质的影响

大量研究表明, 菌渣有机肥可促进作物的生长发育 [19-20]。本研究施用的菌渣有机肥经农业农村部环境质量监测检验测试中心测试, 肥料产品中无青霉素残留, 通过两季番茄田间试验发现与常规复合肥相比, 田间施用菌渣有机肥可显著促进番茄地上部的生长, 提高果实品质, 尤其是番茄果实的维生素 C 含量显著增加 (图 1h)。连续施用两季菌渣有机肥还可显著提高土壤硝态氮的含量 (图 2e), 施用菌渣有机肥后土壤有机质虽然无显著差异, 但第二季土壤有机质含量有所提升 (图 2a), 预期在菌渣有机肥无生态风险的前提下持续施用可提升土壤有机质含量。王悦等 [21] 也发现相似的结果, 认为菌渣有机肥显著增加了土壤有机质、碱解氮、有效磷和速效钾含量。因此, 推测累计施用多季菌渣有机肥, 可逐渐提升土壤养分含量。

研究表明,植物根际是微生物活动的热区,肥料中携带 ARGs 的微生物经植物根系分泌物招募在根际富集,根际微生物获取和传播 ARGs 的概率更高^[22],进入植物体内后,可能增加植物果实内生菌携带 ARGs 的风险。因此本文通过分析根际微生物群落结构,发现与常规复合肥相比,施用菌渣有机肥对土壤微生物的 α 多样性和 β 多样性无显著影响(图 3a 和图 3b),但变形菌门(Proteobacteria)相对丰度显著上升,绿弯菌门(Chloroflexi)相对丰度则显著降低(图 3d)。有报道指出在堆肥过程中菌渣有机肥含有大量变形菌门微生物^[23],施入土壤后可能直接增加了土壤变形菌门微生物的丰度;此外,变形菌门包括多种固氮微生物,有机肥中速效养分相对化肥较少,施用有机肥后土壤中固氮微生物活性相对较高^[24],这也可以在一定程度上增加土壤中的供氮量,促进植物的生长。本研究还发现菌渣有机肥增加番茄根际中藤黄单胞菌和噬几丁质菌科的相对丰度(图 3e),它们均属于变形菌门,藤黄单胞菌具有促进植物生长的能力^[25],噬几丁质菌科具有固氮能力^[26],其显著增加的原因可能是在堆肥过程中为优势菌群^[27]。

3.2 菌渣有机肥对番茄根际微生物 ARGs 的影响

以菌渣为原料经堆肥过程制成的有机肥中可能会存在较高丰度的 ARGs,其中 ARGs 可能会通过水平基因转移等方式进入细菌^[28],进而可能造成 ARGs 的污染,有必要对其进行安全风险评估^[29]。本研究发现在检测出的 19 种 ARGs 中,供试有机肥 ARGs 种类与常规复合肥相同且绝对丰度无显著差异(图 4a)。施用菌渣有机肥后,根际土壤中氨基糖苷类抗性基因 *aadA1* 和 *aadA5*、磺胺类抗性基因 *sul(I)* 和 *sul(II)* 绝对丰度增加,而 β -内酰胺类抗性基因 *bla_{TX-M}* 绝对丰度下降(图 4c 和图 4d)。有研究表明土壤本身就携带一些抗性基因,常规复合肥的施入也会增加这些基因的绝对丰度^[30],这些基因的来源尚需进一步探究。进一步研究发现施入菌渣有机肥后根际变形菌门丰度显著增加,藤黄单胞菌(属变形菌门)与四环素类、氨基糖苷类和磺胺类 ARGs 显著正相关(图 5a)。研究发现变形菌门微生物自身携带多种 ARGs^[31-33],因此推测施用菌渣有机肥后根际土壤中富集的四类 ARGs 可能来自藤黄单胞菌基因组自带的抗性,但仍需进一步结合宏基因组数据对 ARGs 的来源进行溯源。与不施肥处理相比,本研究发现施入菌渣有机肥后的番茄土壤中 ARGs 的结构发生了显著的改变(图 4b)。微生物和 ARGs 的普氏分析也发现,ARGs 与微生物组成的变化高度相关(图 5b),进一步表明了微生物是 ARGs 的载体,其变化显著影响着土壤中 ARGs 的丰度和组成。土壤中人畜共患病原菌携带的 ARGs 具有更高的潜在环境风险^[34],藤黄单胞菌尚未报道具有人畜致病风险,但其携带的 ARGs 是否可通过水平基因转移,传播效率如何均有待进一步探究。结合宏基因组技术可溯源土壤中 ARGs 的高风险病原菌宿主^[35],更加全面地评估菌渣有机肥的潜在环境风险,并通过施用噬菌体等方式进行靶向消减^[36]。本研究还发现藤黄单胞菌属等微生物位于节点数较多的网络模块中(图 5c),表明该类微生物与其他物种互作关系密切,与其正相关的四环素类、氨基糖苷类和磺胺类 ARGs 来源及传播频率也有待进一步探明。当前,人类与环境一体化健康已成为关注热点,人类可能通过生食番茄果实摄入部分微生物,后续研究需进一步关注施用菌渣有机肥对番茄果实内部及表面微生物 ARGs 的影响^[37]。

4 结论

以青霉素合成中间体菌渣为原料经过堆肥处理后制成的有机肥可保证作物的产量,对果实品质尤其是维生素 C 含量有显著促进作用,增加土壤硝态氮含量。与不施肥处理相比,施入菌渣有机肥的番茄根际微生物 α 多样性及 ARGs 种类均无显著差异,但番茄土壤中 ARGs 的结构发生显著变化,藤黄单胞菌与四环素类、氨基糖苷类和磺胺类 ARGs 均具有正相关性。综上所述,菌渣有机肥尽管对土壤养分以及果实品质有一定的提升,但施用该有机肥的环境风险有待进一步系统评估。

参考文献 (References)

- [1] Gong P C, Cai C, Zhang B, et al. New progress of reseach on resource of antibiotic bacterial residue in China[J]. Environmental Engineering, 2017, 35(5): 107-111. [公丕成, 蔡辰, 张博, 等. 我国抗生素菌渣资源化研究新进展[J]. 环境工程, 2017, 35(5): 107-111.]

- [2] He L B, Li X X, Huang Z Z. Treatment technology of antibiotic pharmaceutical residue [J]. *Graziery Veterinary Sciences*, 2019, 6: 53-54.
[何鲁波, 李新新, 黄周珍. 抗生素制药菌渣处理技术[J]. *畜牧兽医科学*, 2019(6): 53-54.]
- [3] Chen G Y, Liu H B, Li J, et al. Treatment of antibiotic mycelial fermentation residue: The critical review[J]. *Environmental Chemistry*, 2021, 40(2): 459-473. [陈冠益, 刘环博, 李健, 等. 抗生素菌渣处理技术研究进展[J]. *环境化学*, 2021, 40(2): 459-473.]
- [4] Perković S, Paul C, Vasić F, et al. Human health and soil health risks from heavy metals, micro(nano)plastics, and antibiotic resistant bacteria in agricultural soils[J]. *Agronomy*, 2022, 12(12): 2945.
- [5] Wang F, Dou Q Y, Fu Y H, et al. Environmental fate and risk management of manure-borne antibiotic resistance genes in soil: A review[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2022, 41(12): 2563-2576. [王芳, 豆庆圆, 付玉豪, 等. 土壤中有肥源抗生素抗性基因环境归趋与风险管理研究进展[J]. *农业环境科学学报*, 2022, 41(12): 2563-2576.]
- [6] Deng P B, Guo L P, Yang H T, et al. Effect of an organic fertilizer of *Ganoderma lucidum* residue on the physical and chemical properties and microbial communities of saline alkaline soil[J]. *Water*, 2023, 15(5): 962.
- [7] Xu Y M, Li X G. Application status and prospect of edible fungus residue in crop production[J]. *Ginseng Research*, 2023, 35(2): 58-61.
[徐艺萌, 李翔国. 食用菌菌渣在农作物生产中的应用现状及展望[J]. *人参研究*, 2023, 35(2): 58-61.]
- [8] Liu S Y, Deng L J, Wu Z N. Research progress on harmless disposal and resource utilization of macrolide antibiotic residues[J]. *China Resources Comprehensive Utilization*, 2023, 41(5): 128-130. [刘淑云, 邓留杰, 吴忠楠. 大环内酯类抗生素菌渣无害化处置与资源化利用研究进展[J]. *中国资源综合利用*, 2023, 41(5): 128-130.]
- [9] Zhang H J, Guo X L, Wang Y. Study on co-composting of lincomycin fermentation dregs and cattle manure[J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2011, 5(1): 231-234. [张红娟, 郭夏丽, 王岩. 林可霉素菌渣与牛粪联合堆肥实验研究[J]. *环境工程学报*, 2011, 5(1): 231-234.]
- [10] Gu Y R, Shen S Z, Han B J, et al. Family livestock waste: An ignored pollutant resource of antibiotic resistance genes[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 197: 110567.
- [11] Pan L Q, Lu R F, Zhu Q B, et al. Measurement of moisture, soluble solids, sucrose content and mechanical properties in sugar beet using portable visible and near-infrared spectroscopy[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2015, 102: 42-50.
- [12] Lee F J. Measurement of soluble glycoprotein VI in studies of abacavir-based therapy: Concerns about test precision[J]. *AIDS*, 2018, 32(15): 2263-2264.
- [13] Zhang W, Wang A C, Lv Z Z, et al. Nondestructive measurement of kiwifruit firmness, soluble solid content (SSC), titratable acidity (TA), and sensory quality by vibration spectrum[J]. *Food Science & Nutrition*, 2020, 8(2): 1058-1066.
- [14] Nibbe P, Schleusener J, Siebert S, et al. Oxidative stress coping capacity (OSC) value: Development and validation of an in vitro measurement method for blood plasma using electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) and vitamin C[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2023, 194: 230-244.
- [15] Bao S D. Soil and agricultural chemistry analysis[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 2000. [鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2000.]
- [16] Li X R, Ma E B, Yan L Z, et al. Bacterial and fungal diversity in the starter production process of fen liquor, a traditional Chinese liquor[J]. *Journal of Microbiology*, 2013, 51(4): 430-438.
- [17] Zhao W X, Wang B, Yu G. Antibiotic resistance genes in China: Occurrence, risk, and correlation among different parameters[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(22): 21467-21482.
- [18] Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(D1): D590-D596.
- [19] Guo C M, Chen Y, Chen J F, et al. Combined hydrolysis acidification and bio-contact oxidation system with air-lift tubes and activated carbon bioreactor for oilfield wastewater treatment[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 169: 630-636.
- [20] Xu C, Wu D, Wang L, et al. Using mushroom residues improving soil physiochemical properties, wheat root growth and yield in low-yield cropland of ancient Yellow River Area[J]. *Soils*, 2021, 53(3): 491-498. [徐聪, 吴迪, 王磊, 等. 菌渣施用对黄河故道区低产田土壤理化性质、小麦根系生长和产量的影响[J]. *土壤*, 2021, 53(3): 491-498.]

- [21] Wang Y, Meng Z H, Liu H L, et al. Effects of penicillin mycelial fertilizers on soil environment and quality of radishes[J]. Research of Environmental Sciences, 2017, 30(5): 737-743. [王悦, 孟昭虹, 刘惠玲, 等. 青霉素菌渣肥对土壤环境及萝卜品质的影响[J]. 环境科学研究, 2017, 30(5): 737-743.]
- [22] Li Y C, Deng X H, Zhang N, et al. Rhizosphere suppression hinders antibiotic resistance gene (ARG) spread under bacterial invasion[J]. One Health, 2023, 16: 100481.
- [23] Shi L H, Wu H, Tian S L, et al. Effect of β -lactam-based bacterial residue fertilizer on lettuce rhizosphere soil bacteria and antibiotic resistance genes[J]. Research of Environmental Sciences, 2023, 36(4): 773-782. [石礼虎, 吴昊, 田书磊, 等. β -内酰胺类菌渣肥对生菜根际土壤细菌及抗性基因的影响[J]. 环境科学研究, 2023, 36(4): 773-782.]
- [24] Duan H Y. Study on abundance, diversity and community structure of bacteria in penicillin fermentation fungi residue composting[D]. Nanjing: Southeast University, 2017. [段会英. 青霉素菌渣堆肥中细菌丰度、多样性及群落结构的研究[D]. 南京: 东南大学, 2017.]
- [25] Zhang S H. Taxonomic and biological analyses of *Luteimonas yindakuii* sp. nov. and *Nocardioides dongxiaopingii* sp. nov. isolated from plants on Qinghai-Tibetan Plateau[D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2020. [张思慧. 青藏高原植物中股大奎藤黄单胞菌和董小平类诺卡氏菌两个细菌新种的发现和生物学分析[D]. 太原: 山西医科大学, 2020.]
- [26] Liang X, Kong L L. On the research progress of *Chitinophaga* species and its natural products[J]. Industrial Microbiology, 2023, 53(1): 22-25. [梁幸, 孔令露. 噬几丁质菌属及其天然产物研究进展[J]. 工业微生物, 2023, 53(1): 22-25.]
- [27] Zhu T C, Li Z K, Ming Y F, et al. Effects of bentonite and humic acid on Zn and Cu passivation and microbial communities in pig manure composting[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2024, 43(4): 937-946. [朱桃川, 李泽康, 明玉飞, 等. 膨润土和腐植酸对猪粪堆肥Zn、Cu钝化和微生物群落的影响[J]. 农业环境科学学报, 2024, 43(4): 937-946.]
- [28] Zhao F J, Xie W Y, Wang P. Soil and human health[J]. Acta Pedologica Sinica, 2020, 57(1): 1-11. [赵方杰, 谢婉滢, 汪鹏. 土壤与人体健康[J]. 土壤学报, 2020, 57(1): 1-11.]
- [29] Gao X Y, Wang L. The accumulation, transfer and elimination of antibiotic resistance genes in soil: A review[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2023, 32(11): 2062-2071. [高晓宇, 王磊. 抗生素抗性基因在土壤中积累、转移与消减的研究进展[J]. 生态环境学报, 2023, 32(11): 2062-2071.]
- [30] Ben Y J, Fu C X, Hu M, et al. Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review[J]. Environmental Research, 2019, 169: 483-493.
- [31] Hu Y F, Yang X, Li J, et al. The bacterial mobile resistome transfer network connecting the animal and human microbiomes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2016, 82(22): 6672-6681.
- [32] Jian Z H, Zeng L, Xu T J, et al. Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control[J]. Journal of Basic Microbiology, 2021, 61(12): 1049-1070.
- [33] Yao Y Y. Isolation and screening of proteobacteria growth-promoting bacteria from rhizosphere of *Angelica sinensis* and effects of growth-promoting and stress-resistant[D]. Lanzhou: Gansu University of Chinese Medicine, 2022. [姚阳阳. 当归根际变形菌门促生菌的分离、筛选及促生抗逆效应研究[D]. 兰州: 甘肃中医药大学, 2022.]
- [34] Cui H L, Zhu D, Ding L J, et al. Co-occurrence of genes for antibiotic resistance and arsenic biotransformation in paddy soils[J]. Journal of Environmental Sciences, 2023, 125: 701-711.
- [35] Liao H P, Lu X M, Rensing C, et al. Hyperthermophilic composting accelerates the removal of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in sewage sludge[J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(1): 266-276.
- [36] Yuan X X, Liang J Y, Fan L X, et al. Effects of manure application on source and transport of antibiotic resistant genes in soil and their affecting factors[J]. Acta Pedologica Sinica, 2020, 57(1): 36-47. [苑学霞, 梁京芸, 范丽霞, 等. 粪肥施用土壤抗生素抗性基因来源、转移及影响因素[J]. 土壤学报, 2020, 57(1): 36-47.]
- [37] Zhang X X, Liu J S, Han L F, et al. One health: New evaluation framework launched[J]. Nature, 2022, 604(7907): 625.

(责任编辑: 陈荣府)