

# 环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第35卷 第10期

Vol.35 No.10

**2014**

中国科学院生态环境研究中心 主办

科学出版社 出版



目次

基于虚拟撞击原理的固定源 PM<sub>10</sub>/PM<sub>2.5</sub> 采样器的研制 ..... 蒋靖坤, 邓建国, 段雷, 张强, 李振, 陈小彤, 李兴华, 郝吉明 (3639)

1992~2012年福州市和厦门市酸雨变化特征及影响因素 ..... 郑秋萍, 王宏, 陈彬彬, 隋平, 林文 (3644)

青岛近海不同天气状况下大气气溶胶中金属元素浓度分布特征研究 ..... 陈晓静, 祁建华, 刘宁, 张翔宇, 申恒青, 刘明旭 (3651)

化学合成类制药行业工艺废气 VOCs 排放特征与危害评估分析 ..... 李嫣, 王浙明, 宋爽, 徐志荣, 许明珠, 徐威力 (3663)

烧结过程 NO<sub>x</sub> 和 SO<sub>2</sub> 形成规律及烧结料组成对 NO<sub>x</sub> 排放的影响 ..... 任重培, 朱天乐, 朱廷钰, 吕栋 (3669)

废茶活性炭脱硫脱硝性能的应用研究 ..... 宋磊, 张彬, 邓文 (3674)

黑河中游边缘荒漠-绿洲非饱和带土壤质地对土壤氮积累与地下水氮污染的影响 ..... 苏永中, 杨晓, 杨荣 (3683)

海河流域河流生态系统健康评价 ..... 郝利霞, 孙然好, 陈利顶 (3692)

台州长潭水库铁锰质量浓度变化特征及其成因分析 ..... 刘树元, 郑晨, 袁琪, 王先兵, 王稀炎 (3702)

山地城市新建湖库氮磷营养盐时空特征研究 ..... 包静玥, 鲍建国, 李立青 (3709)

岩溶地下水水文地球化学对降雨的响应: 以重庆雪玉洞地下河系统为例 ..... 王凤康, 梁作兵, 于正良, 江泽丽 (3716)

岩溶地下河流域水中多环芳烃污染特征及生态风险评价 ..... 蓝家程, 孙玉川, 田萍, 卢丙清, 师阳, 徐昕, 梁作兵, 杨平恒 (3722)

废旧电器拆解区河流沉积物中多溴联苯醚 (PBDEs) 的污染特征与生态风险 ..... 陈宣宇, 薛南冬, 张石磊, 李发生, 龚道新, 刘博, 孟磊 (3731)

海河流域中南部河流沉积物的重金属生态风险评价 ..... 王瑞霖, 程先, 孙然好 (3740)

大辽河口 COD 与 DO 的分布特征及其影响因素 ..... 杨福霞, 简慧敏, 田琳, 姚庆祯 (3748)

辽河下游 CDOM 吸收与荧光特性的季节变化研究 ..... 邵田田, 赵莹, 宋开山, 杜嘉, 丁智 (3755)

伊乐藻和氮循环菌技术对太湖氮素吸收和反硝化的影响 ..... 刘丹丹, 李正魁, 叶忠香, 张万广 (3764)

地表水体放线菌分离鉴定与致嗅能力研究 ..... 陈娇, 白晓慧, 卢宁, 王先云, 章永辉, 吴潘成, 郭心驰 (3769)

地下水循环井技术修复硝基苯污染含水层效果模拟 ..... 白静, 赵勇胜, 孙超, 秦传玉, 于凌 (3775)

茶叶基水合氧化铁吸附水体中 Pb(II) 的性能 ..... 万顺利, 薛瑶, 马钊钊, 刘国斌, 余艳霞, 马明海 (3782)

紫外辐射对小分子有机酸化学凝聚性作用途径探讨 ..... 王文东, 王亚博, 范庆海, 丁真真, 王文, 宋珊, 张银婷 (3789)

水中普萘洛尔的紫外光降解机制及其产物毒性 ..... 彭娜, 王开峰, 刘国光, 曾令泽, 姚锟, 吕文英 (3794)

二氧化钛 (P25) 光催化降解二苯砷酸的研究 ..... 王阿楠, 滕应, 骆永明 (3800)

碳氮比对聚氨基酯生物膜反应器短程硝化反硝化的影响 ..... 谭冲, 刘颖杰, 王薇, 邱珊, 马放 (3807)

城市污泥中温厌氧消化过程中厌氧耐药菌的分布与去除研究 ..... 佟娟, 王元月, 魏源送 (3814)

快速城市化区域表层土壤中杀虫剂的空间分布及风险评估 ..... 韦燕莉, 鲍志君, 巫承洲, 曾永平 (3821)

重庆铁山坪马尾松林土壤汞排放特征的现场测试 ..... 杜宝玉, 王琼, 罗遥, 段雷 (3830)

应用 X 射线吸收近边结构谱研究东北农耕地土壤中的氯种态及含量 ..... 李晶, 郎春燕, 马玲玲, 徐殿斗, 郑雷, 路雨楠, 崔丽瑞, 张晓萌 (3836)

植被重建下煤矿排土场土壤熟化过程中碳储量变化 ..... 李俊超, 党廷辉, 郭胜利, 薛江, 唐骏 (3842)

硫素对氧化还原条件下水稻土氧化铁和砷形态影响 ..... 唐冰培, 杨世杰, 王代长, 饶伟, 张亚楠, 王丹, 朱云集 (3851)

外生菌根真菌对 Al<sup>3+</sup> 胁迫和低钾土壤的响应 ..... 张薇, 黄建国, 袁玲, 李阳波, 何林卫 (3862)

长期施用猪粪水稻土抗生素抗性基因污染研究 ..... 黄福义, 李虎, 韦蓓, 欧阳纬莹, 苏建强 (3869)

外源添加磷和有机酸模拟铅污染土壤钝化效果及产物的稳定性研究 ..... 左继超, 高婷婷, 苏小娟, 万田英, 胡红青 (3874)

污染场地六价铬的还原和微生物稳定化研究 ..... 郑家传, 张建荣, 刘希雯, 许倩, 施维林 (3882)

热强化气相抽提对不同质地土壤中苯去除的影响 ..... 李鹏, 廖晓勇, 阎秀兰, 崔晓勇, 马栋 (3888)

O<sub>3</sub> 浓度升高对南方城市绿化树种氮素的影响 ..... 杨田田, 张巍巍, 胡恩柱, 王效科, 田媛, 冯兆忠 (3896)

施氮强度对不同土壤有机碳水平按树林温室气体通量的影响 ..... 李睿达, 张凯, 苏丹, 逯非, 万五星, 王效科, 郑华 (3903)

<sup>13</sup>C<sub>2</sub>O 示踪臭氧胁迫对水稻土壤微生物的影响 ..... 陈展, 王效科, 尚鹤 (3911)

表面活性剂 *Burkholderia xenovorans* LB400 体系对低氯代 PCBs 的好氧强化降解 ..... 陈少毅, 张静, 汪涵, 任源 (3918)

耐高氨氮异养硝化-好氧反硝化菌 TN-14 的鉴定及其脱氮性能 ..... 信欣, 姚力, 鲁磊, 冷璐, 周迎芹, 郭俊元 (3926)

微氧环境中电化学活性微生物的分离与鉴定 ..... 吴松, 肖勇, 郑志勇, 郑越, 杨朝晖, 赵峰 (3933)

电极活性菌分离过程中微生物群落结构动态特征解析 ..... 王敏, 赵阳国, 卢珊珊 (3940)

铜对草鱼及花鲢的毒性预测: 基于生物配体模型 ..... 王万宾, 陈莎, 吴敏, 赵婧 (3947)

天鹅洲故道底栖动物群落特征及水质生物学评价 ..... 马秀娟, 沈建忠, 王腾, 王海生, 黄丹, 孙广文, 龚成 (3952)

水生生物基准推导中物种选择方法研究 ..... 张铃松, 王业耀, 孟凡生, 周岳溪, 于海斌 (3959)

生产源区人血清中六溴环十二烷水平与甲状腺激素相关性研究 ..... 李鹏, 杨从巧, 金军, 王英, 刘伟志, 丁问微 (3970)

金属氧化物-Laponite 黏土复合材料负载氧化钴催化剂的制备及对苯的催化消除性能 ..... 牟真, 麻春艳, 程杰, 李进军 (3977)

CuO(-CeO<sub>2</sub>)/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 催化剂对苯催化氧化性能研究 ..... 查键, 周宏仓, 何都良, 单龙, 张露, 谢婕 (3984)

生物毒性检测在水质安全评价中的应用 ..... 徐建英, 赵春桃, 魏东斌 (3991)

某城市城镇污水处理厂 COD 排放现状评价分析 ..... 周羽化, 卢延娜, 张虞, 朱静, 雷晶, 申晨, 武雪芳 (3998)

北京市再生水利用生态环境效益评估 ..... 范育鹏, 陈卫平 (4003)

我国持久性有机污染物污染事故预警指标体系构建 ..... 王琳, 吕永龙, 贺桂珍, 王铁宇 (4009)

环境损害评估: 构建中国制度框架 ..... 张红振, 王金南, 牛坤玉, 董璟琦, 曹东, 张天柱, 骆永明 (4015)

《环境科学》征稿简则 (3887)      《环境科学》征订启事 (4008)      信息 (3730, 3739, 3774, 3895)

# 长期施用猪粪水稻土抗生素抗性基因污染研究

黄福义<sup>1,2</sup>, 李虎<sup>1,2</sup>, 韦蓓<sup>1,2</sup>, 欧阳纬莹<sup>1,2</sup>, 苏建强<sup>1\*</sup>

(1. 中国科学院城市环境研究所, 厦门 361021; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要:** 为了全面研究猪粪有机肥对水稻土抗生素抗性及其分布格局的影响, 选择 295 对抗生素抗性基因引物, 采用高通量荧光定量 PCR 对水稻土中的抗生素抗性基因污染情况进行了研究. 结果表明, 未施用猪粪水稻土检测出 66 种抗性基因, 而施用猪粪水稻土则检测出 107 种抗生素抗性基因, 施用猪粪后水稻土中抗生素抗性基因种类显著增加 ( $P < 0.05$ ). 相对于未施用猪粪水稻土, 施用猪粪水稻土有 49 种抗生素抗性基因丰度显著增加 ( $P < 0.05$ ), 其中施用猪粪水稻土中喹诺酮类/氯霉素类抗性基因的 *mexF* 的丰度相对于未施用猪粪水稻土增加 1 791 倍. 高通量定量结果表明, 施用猪粪的水稻土抗生素抗性基因分布格局发生显著变化, 高通量定量技术是研究环境抗生素抗性基因的一个非常实用的工具.

**关键词:** 猪粪; 水稻土; 抗生素; 抗生素抗性基因; 高通量定量 PCR

中图分类号: X53 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2014)10-3869-05 DOI: 10.13227/j.hjxx.2014.10.032

## Long-Term Manure Application Induced Shift of Diversity and Abundance of Antibiotic Resistance Genes in Paddy Soil

HUANG Fu-yi<sup>1,2</sup>, LI Hu<sup>1,2</sup>, WEI Bei<sup>1,2</sup>, OUYANG Wei-ying<sup>1,2</sup>, SU Jian-qiang<sup>1</sup>

(1. Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract:** To investigate the effect of long-term manure application on the profiles of antibiotic resistance genes (ARGs) in paddy soil, the abundance of ARGs targeted by 295 primers sets were measured by using high-throughput quantitative PCR technique. A total of 107 types of ARGs were detected in long-term manured paddy soil, which is significantly higher than that in control paddy soil ( $P < 0.05$ ). PCA analysis and UPGMA cluster demonstrated that long-term manure application significantly changed the ARGs diversity and abundance in paddy soils. There were 49 types antibiotic resistance genes were enriched significantly in paddy soil applied with manure ( $P < 0.05$ ), especially the *mexF*, which belongs to quinolones-chloramphenicol resistance genes, increased 1 791-fold compared with paddy soil of no manure application. Our results showed that long-term application of manure in paddy soil resulted in the shift of abundance and diversity of ARGs, high-throughput quantitative PCR could be a powerful tool concerning the environmental ARGs dimensions.

**Key words:** manure; paddy soil; antibiotic; antibiotic resistance genes; high-throughput qPCR

抗生素抗性基因 (antibiotic resistance genes, ARGs) 作为一种新型环境污染物, 自 Pruden 等<sup>[1]</sup> 首次将其作为环境污染物被提出以来, 引起了全球范围内广泛的关注. 因抗生素在医疗和养殖业的大量使用而造成的环境污染问题日趋严重<sup>[2]</sup>. 美国每年受到抗性病原体感染的人超过两百万, 最终死亡 14 000 人<sup>[1]</sup>, 且越来越多的研究表明, 致病菌耐药性的扩散与环境微生物抗性和抗生素抗性基因有关<sup>[3]</sup>.

由于抗生素具有预防疾病和刺激生长的作用, 常以亚治疗的剂量长期添加于饲料中, 在全球范围内广泛应用于养殖业中<sup>[4~6]</sup>. 猪饲料中的抗生素会显著改变猪肠道中的微生物群落结构, 肠道中含有抗生素抗性基因的微生物群落显著增加. 同时研究证明大部分抗生素难以被动物吸收利用, 约 25% ~ 75% 的抗生素未经代谢而随粪尿排出体外进入周围

环境<sup>[7]</sup>. 进一步的研究表明, 动物肠道内的抗性细菌排出体外后, 其携带的抗生素抗性遗传信息可以通过水平基因转移 (horizontal gene transfer, HGT) 机制转移到外部环境的微生物中<sup>[8,9]</sup>. 一旦抗生素抗性基因从环境微生物中进入致病菌, 就可能对人类健康造成潜在的巨大风险.

目前, 国内外关于抗生素抗性基因在城市污泥<sup>[3]</sup> 污水<sup>[10]</sup>、猪场土壤<sup>[11]</sup>、养殖水体<sup>[12]</sup> 和河流入海口<sup>[13]</sup> 等环境中的污染分布情况及抗性基因多样性有较多相关研究, 但是这些研究主要针对磺胺类抗生素抗性基因和四环素类抗性基因等有限的几种

收稿日期: 2014-03-13; 修订日期: 2014-04-17

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2012J01156); 国家自然科学基金项目 (21210008); 科技部国际科技合作项目 (2009DFB90120, 2011DFB91710)

作者简介: 黄福义 (1987 ~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为环境抗生素抗性基因污染, E-mail: fyhuang@iue.ac.cn

\* 通讯联系人, E-mail: jqsu@iue.ac.cn

抗性基因,而且关于水稻土中的抗生素抗性基因的相关研究在国内外鲜见. 高通量定量研究可以从整体角度对环境抗生素抗性基因进行全面研究,并深入地寻找挖掘富集的基因. 本研究选用长期施用猪粪和未施用猪粪水稻土作为供试土壤,采用高通量荧光定量技术对水稻土的整体抗生素抗性基因的丰度和多样性进行全面研究,并对各富集的抗生素抗性基因深入分析,以期对水稻土中抗生素抗性污染情况有较全面的认识并为可能的潜在生态环境风险评估提供理论支持.

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集及处理

水稻土是 2013 年 10 月采集自秋季水稻刚刚收割后的水稻田,位于福建省连城县. 连城县是福建省九龙江、闽江和汀江的上游地区,是福建省水稻种植和生猪养殖大县. 长期施用猪粪的水稻土采样点 15 m 附近有一个建于 2001 年生猪养殖场,生猪粪尿和养殖废水常直接排入周围水稻土壤作为肥料,此外还采集了距离该养殖场约 920 m 外一处地势较高未施用猪粪的水稻土作为对照土样,这两块水稻田同属于一个农户,种植方式和农田管理方式相同. 两块水稻田面积分别约为 0.000 6 km<sup>2</sup> (0.9 亩) 和 0.008 km<sup>2</sup> (1.2 亩),各都采集了 3 个重复水稻土样品约 1 kg,土壤采集深度为 20 cm,并且每个采样重复由 5 个小样组成,并现场均匀混合. 采集的水稻土去除水稻根和可见有机物残体后,存放于 -20℃ 冰箱内用于 DNA 提取.

### 1.2 DNA 提取

称取约 0.5 g 水稻土,采用 FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) 试剂盒,按照生产商提供的方法提取水稻土总 DNA,随后用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳验证. 所提取的 DNA 样品用微量核酸蛋白质分析仪 (Nanodrop ND1000, NanoDrop Technologies Inc.) 测定浓度以及相应的纯度,所提取的 DNA 样品的 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 值在 1.8 ~ 2.0 之间,表明用试剂盒提取的 DNA 纯度较高.

### 1.3 抗生素抗性基因 (ARGs) 高通量荧光定量

采用 SmartChip Real-time PCR Systems (WaferGen 公司,美国) 高通量荧光定量的反应平台. 荧光定量试剂是 LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche 公司,美国). 定量体系体积 100 nL,其中各试剂终浓度为: LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix 1 ×, Nuclease-free PCR-Grade water, BSA

1 μg·μL<sup>-1</sup>, DNA 浓度 5 ng·μL<sup>-1</sup>, 引物 1 μmol·L<sup>-1</sup>. 定量 PCR 反应程序: 95℃ 预变性 10 min; 95℃ 变性 30s, 60℃ 退火延伸 30s, 40 个循环; 程序自动升温进行熔解曲线分析. 抗性基因引物参照文献 [11], 该文献使用了 334 对引物, 根据 WaferGen 公司的 SmartChip Real-Time PCR System 仪器设置选择了 295 对抗性基因引物和一对细菌通用 16S rRNA 基因引物.

定量 PCR 数据处理根据文献 [11, 14] 进行. 根据 SmartChip Real-Time System 的检测限和灵敏度, 确定 C<sub>T</sub> 值为 31 时作为仪器的检测阈值. 每个样品进行 3 次技术重复试验, 3 次技术重复都扩增出来时认为是阳性; 同个采样点的 3 个采样重复至少有两个扩增出来, 认为样品的目的基因被有效检出; 当 C<sub>T</sub> 值超出 31 时, 对应的 C<sub>T</sub> 值被替换为 31. 相对定量的统计方法用公式 (1)、(2) 和 (3) 进行计算:

$$\Delta C_T = C_T(\text{ARGs}) - C_T(16S) \quad (1)$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{test}) - \Delta C_T(\text{control}) \quad (2)$$

$$FC = 2^{[-(\Delta\Delta C_T)]} \quad (3)$$

式中, ARGs 是所要测定的 295 种抗生素抗性基因, 16S 是指待测样品的 16S rRNA 基因, C<sub>T</sub> 是高通量荧光定量所测定的循环阈值, ΔC<sub>T</sub> 某样品的目标基因 C<sub>T</sub> 值与 16S rRNA 基因 C<sub>T</sub> 值的差值, ΔΔC<sub>T</sub> 是指待测 (test) 样品的目标基因 ΔC<sub>T</sub> 值与对照 (control) 样品的 ΔC<sub>T</sub> 差值, FC 值是指待测 (test) 样品的目的基因是对照 (control) 样品的富集倍数.

### 1.4 数据分析

数据分析采用 Excel 2010 进行, 计算 FC 下限值  $FC = 2^{[-(\Delta\Delta C_T + s)]}$ , s 是 3 个采样平行的功能基因 C<sub>T</sub> 标准方差同 16S rRNA 基因 C<sub>T</sub> 标准方差之间的平方和的根.  $s = (s_1^2 + s_2^2)^{1/2}$ . 式中, s<sub>1</sub> 为 3 个采样平行的功能基因 C<sub>T</sub> 值的标准方差, s<sub>2</sub> 为同一个采样位点的 16S rRNA 基因 C<sub>T</sub> 值的标准方差. 当  $FC = 2^{[-(\Delta\Delta C_T + s)]} > 1$ , 且 student t 检验具有显著性时认为待测样品相对于参照样样品显著富集; Origin 9.0 用于作图; 采用 R3.0.0 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) vegan 数据包 (2.0 ~ 10) [15] 进行 PCA 分析, Pheatmap 数据包 (0.7.7) 进行热图分析 [16].

## 2 结果与讨论

### 2.1 水稻土中抗生素抗性基因的多样性

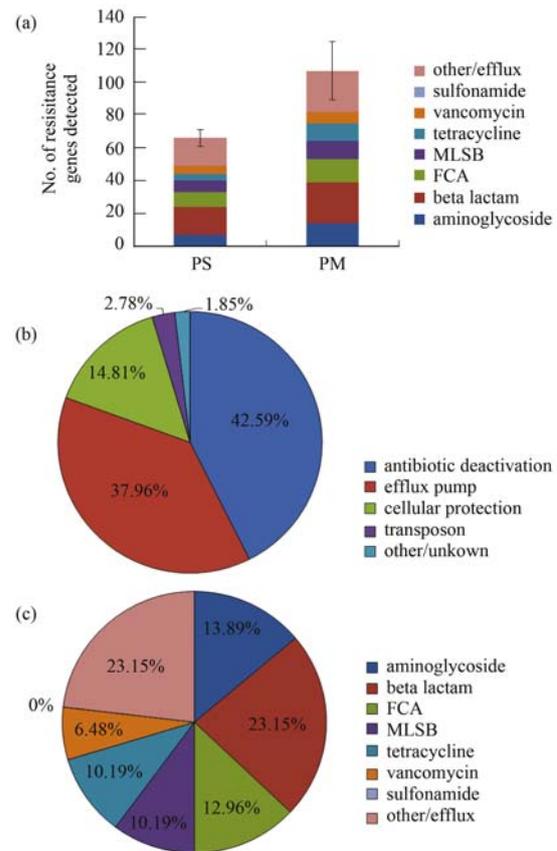
施用猪粪的水稻土 (PM) 和未施用猪粪水稻土 (PS) 两种土壤中, 总共检测到 108 种抗生素抗性基

因. 其中未施用猪粪的水稻土(PS)中检测到了 66 种抗生素抗性基因[图 1(a)], 施用猪粪水稻土(PM)则检测到了 107 种抗性基因[图 1(a)], 两种水稻土中检测到的抗生素抗性基因主要包括抗生素失活(antibiotic deactivation)、抗生素外排泵(efflux pump)、细胞核糖体保护(cellular protection)和转座子移动元件(transposon)四类抗生素抗性机制[图 1(b)], 这四类抗生素抗性机制在整体中比例分别为 42.59%、37.96%、14.81% 和 2.78%. 水稻土中微生物对氨基糖苷类抗生素(aminoglycoside)、 $\beta$ -内酰胺类抗生素(beta Lactam)、喹诺酮类氯霉素类(FCA)、大环内脂类林肯酰胺类链阳性菌素 B(MLS B)、四环素类抗生素(tetracycline)和万古霉素类抗生素(vancomycin)等表达出相应的抗生素抗性, 分别占整体的 13.89%、23.15%、12.96%、10.19%、10.19% 和 6.48% [图 1(c)]. 其它或者发挥外排泵机制的抗生素抗性基因则占到 23.15% [图 1(c)]. 施用猪粪水稻土(PM)中检测到的抗性基因种类数目显著多于未施用猪粪水稻土(PS)中的抗性基因 ( $P < 0.05$ ). 检测到的抗生素抗性类型涵盖了目前已知的主要类型. 一般情况下, 猪饲料中添加的抗生素主要包括氨基糖苷类的新霉素、大观霉素, 林肯酰胺类的林可霉素, 大环内酯类的泰乐菌素、北里霉素、四环素类的土霉素、金霉素等<sup>[17]</sup>. 但是施用猪粪的水稻土 PM 发现了  $\beta$ -内酰胺类抗生素抗性基因的 *cphA*、*pbp* 等抗生素抗性基因, 然而通常猪饲料中并未添加  $\beta$ -内酰胺类抗生素. Looff 等<sup>[18]</sup> 也发现未使用研究中涉及到的抗生素作为添加剂/催肥剂的情况下, 生猪肠道微生物仍能发现一些新的抗生素抗性基因.

施用猪粪水稻土(PM)相较于未施用猪粪水稻土(PS), 检测出了 41 种后者不具有的抗生素抗性基因, 而未施用猪粪水稻土所检出的抗生素抗性基因中仅有 *aac(6')-Ib* (aka *aacA4*) 基因在施用猪粪水稻土(PM)中未检出. 主成分分析表明, 施用猪粪水稻土(PM)的长期猪粪施用显著改变了水稻土中抗生素抗性基因结构, PC1 解释了抗性基因结构变化的 89.7%, 施用猪粪水稻土和对照水稻土沿第一轴分为两个簇, 表明抗生素抗性基因在施用猪粪水稻土和未施用猪粪水稻土中有着不同的分布格局(图 2).

## 2.2 抗生素抗性基因在水稻土中的污染分布格局

施用猪粪有机肥的水稻土(PM)相对于未施用猪粪水稻土(PS)的抗生素抗性基因的丰度和多样性均



FCA: 喹诺酮类氯霉素类抗性基因;

MLSB: 大环内脂类林肯酰胺类链阳性菌素 B 抗性基因

图 1 水稻土中抗生素抗性基因种类

Fig. 1 Variety of antibiotic resistance genes in rice paddy soil

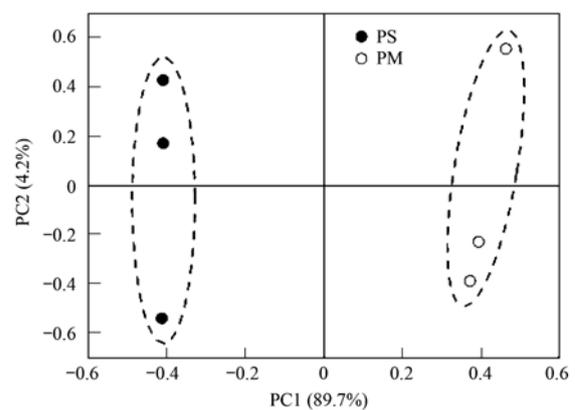


图 2 水稻土中抗生素抗性基因多样性主成分分析

Fig. 2 Principle component analysis of diversity of antibiotic resistance genes in rice paddy soil

发生了明显变化, 施用猪粪水稻土(PM)中抗生素抗性基因的种类和丰度显著增加, UPGMA cluster 表明两类水稻土分别形成两个簇, 施用猪粪水稻土中形成了新的抗生素抗性基因分布格局, 表明施用猪粪有机肥的水稻土抗生素抗性基因污染加剧(图 3).

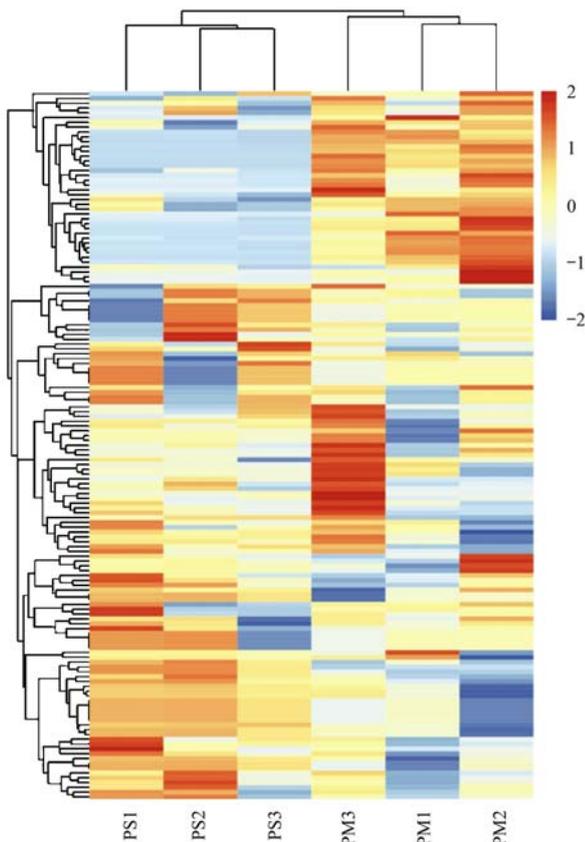


图3 水稻土中抗生素抗性基因污染分布格局

Fig. 3 Antibiotic resistance genes profile of sampling sites of rice paddy soil

### 2.3 施用猪粪水稻土中显著富集的抗生素抗性基因

施用猪粪水稻土 (PM) 除了检测到 41 种在未施用猪粪水稻土 (PS) 中未检出的抗生素抗性基因外, 还有 49 种抗生素抗性基因丰度相对于未施用猪粪水稻土 (PS) 显著富集 ( $P < 0.05$ ), 这些显著富集的抗生素抗性基因类型涵盖了图 1(c) 所描述的七大类抗生素抗性基因. 其中喹诺酮类/氯霉素类 (FCA) 抗性基因的 *mexF* 基因在施用猪粪水稻土 (PM) 中的丰度是未施用猪粪水稻土 (PS) 的 1 792 倍.  $\beta$ -内酰胺类抗生素 (beta lactam) 抗性基因中的 *blaSFO*、大环内脂类林肯酰胺类链阳性菌素 B (MLSb) 抗性基因中的 *oleC*、四环素类抗生素 (tetracycline) 抗性基因的 *tetD*、氨基糖苷类抗生素 (aminoglycoside) 抗性基因的 *aadE*、万古霉素类抗生素 (vancomycin) 抗性基因的 *vanHB* 的丰度分别是未施用猪粪水稻土 (PS) 的 101、22、12、8、2 倍 (图 4). 有研究表明, 禽畜养殖场周围土壤抗生素抗性基因丰度较于正常土壤显著偏高, 抗性基因污染严重<sup>[19]</sup>. Munir 等<sup>[20]</sup> 检测了猪粪和施用有机肥的土

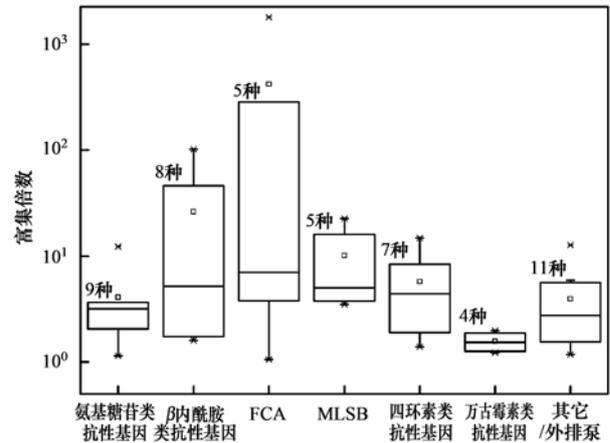


图4 施用猪粪水稻土丰度增加的抗生素抗性基因富集倍数

Fig. 4 Fold change of abundance of increased antibiotic genes in paddy soil amended with manure

壤, 结果表明, 四环素类抗生素抗性基因丰度在猪粪中显著高于施用有机肥的土壤, 但是土壤中抗生素抗性水平受到自然环境本底值和土壤性质的影响. 水稻土施用有机肥的土壤 (PM) 中, 检测到转座子基因 *tnpA* 和 *tp614* 的丰度分别是未施用猪粪水稻土的 15.5 倍和 2.2 倍, 表明转座子类基因在施用猪粪水稻土中富集. 还有研究表明, 作为饲料中抗生素添加剂的载体海泡石, 也会增加抗生素抗性基因在细菌种类之间的水平基因转移<sup>[21]</sup>. Marti 等<sup>[22]</sup> 研究表明, 施用猪粪的土壤以及土壤上种植的蔬菜都检测到了多种抗生素抗性基因, 在施用新鲜猪粪的土壤中收获的蔬菜检测到一些独有的抗生素抗性基因. 一旦水稻土中的这些抗生素抗性基因进入致病菌, 这种情况可能会对从事水稻种植的农民的健康造成潜在影响, 并可能影响水稻这种农产品的生物食品安全. 此外, 水稻土中的抗生素抗性基因可能会随着土壤微生物在农田雨水径流的冲刷下, 基于水平基因转移机制进入不同的微生物物种并扩散到周围的池塘, 河流水体和沉积物中, 使得抗生素抗性基因在更大尺度的环境中出现和富集. 为减少抗生素抗性基因在土壤环境中传播, 应当避免在农田土壤中施用含有抗生素残留的禽畜肥料<sup>[23]</sup>. 邵义萍等<sup>[24]</sup> 的研究表明, 长期施用粪肥菜地土壤中四环素类抗生素在土壤平面和土壤剖面造成明显的空间分布差异, 由此造成的潜在的生态毒性和抗生素抗性应引起高度重视. 越来越多的研究表明, 粪便是抗生素抗性和抗生素化合物的存储库 (reservoir), 禽畜粪便的施用造成土壤中抗生素抗性基因和抗性菌群的增加<sup>[25,26]</sup>. 因此, 有必要加强对猪粪的合理使用研究, 对水稻土中抗生素抗性基因污染状况做更深入的研究, 重点关注抗生素

抗性基因潜在的农业环境风险并作出科学评估。

### 3 结论

(1) 施用猪粪改变了水稻土中抗生素抗性基因的多样性和丰度。

(2) 高通量荧光定量基于多个样品和多种基因同时进行定量的高通量优势, 从抗生素抗性基因集合的角度, 较全面表征了水稻土中抗性基因总体分布情况, 可以深入研究水稻中富集的抗性基因的污染状况。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Pruden A, Pei R, Storteboom H, *et al.* Antibiotic resistance genes as emerging contaminants; studies in northern Colorado [J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, **40** (23): 7445-7450.
- [ 2 ] 周启星, 罗义, 王美娥. 抗生素的环境残留、生态毒性及抗性基因污染[J]. *生态毒理学报*, 2007, **2**(3): 243-251.
- [ 3 ] Zhang X X, Zhang T, Zhang M, *et al.* Characterization and quantification of class 1 integrons and associated gene cassettes in sewage treatment plants [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, **82**(6): 1169-1177.
- [ 4 ] Chee-Sanford J C, Mackie R I, Koike S, *et al.* Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste [J]. *Journal of Environmental Quality*, 2009, **38**(3): 1086-1108.
- [ 5 ] Pan X, Qiang Z, Ben W, *et al.* Residual veterinary antibiotics in swine manure from concentrated animal feeding operations in Shandong Province, China [J]. *Chemosphere*, 2011, **84** (5): 695-700.
- [ 6 ] Hvistendahl M. China takes aim at rampant antibiotic resistance [J]. *Science*, 2012, **336**(6083): 795-795.
- [ 7 ] Chee-Sanford J C, Aminov R I, Krapac I J, *et al.* Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(4): 1494-1502.
- [ 8 ] El Salabi A, Walsh T R, Chouchani C. Extended spectrum  $\beta$ -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria [J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2013, **39**(2): 113-122.
- [ 9 ] Akhtar M, Hirt H, Zurek L. Horizontal transfer of the tetracycline resistance gene *tetM* mediated by pCF10 among *Enterococcus faecalis* in the house fly (*Musca domestica* L.) alimentary canal [J]. *Microbial Ecology*, 2009, **58** (3): 509-518.
- [ 10 ] Pruden A. Balancing water sustainability and public health goals in the face of growing concerns about antibiotic resistance [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, **48**(1): 5-14.
- [ 11 ] 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 of the United States of America*, 2013, **110**(9): 3435-3440.
- [ 12 ] 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, **4**(6): 770-779.
- [ 13 ] 梁惜梅, 聂湘平, 施震. 珠江口典型水产养殖区抗生素抗性基因污染的初步研究[J]. *环境科学*, 2013, **34**(10): 4073-4080.
- [ 14 ] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method [J]. *Nature Protocols*, 2008, **3** (6): 1101-1108.
- [ 15 ] Oksanen J, Kindt R, Legendre P, *et al.* vegan: Community Ecology Package [EB/OL]. <http://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>, 2013-12-12.
- [ 16 ] Kolde R. pheatmap: Pretty Heatmaps [EB/OL]. <http://CRAN.R-project.org/package=pheatmap>, 2013-09-19.
- [ 17 ] 魏光伟, 魏文康, 余永鹏, 等. 饲料抗生素添加剂的应用技术[J]. *广东饲料*, 2007, **16**(3): 15-16.
- [ 18 ] Looft T, Johnson T A, Allen H K, *et al.* In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, **109**(5): 1691-1696.
- [ 19 ] 邹世春, 李青, 贺竹梅. 禽畜养殖场土壤抗生素抗性基因污染的初步研究[J]. *中山大学学报(自然科学版)*, 2012, **51** (6): 87-91.
- [ 20 ] Munir M, Xagorarakis I. Levels of antibiotic resistance genes in manure, biosolids, and fertilized soil [J]. *Journal of Environmental Quality*, 2011, **40**(1): 248-255.
- [ 21 ] Rodríguez-Beltrán J, Rodríguez-Rojas A, Yubero E, *et al.* The animal food supplement sepiolite promotes a direct horizontal transfer of antibiotic resistance plasmids between bacterial species [J]. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 2013, **57**(6): 2651-2653.
- [ 22 ] Marti R, Scott A, Tien Y C, *et al.* Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, **79** (18): 5701-5709.
- [ 23 ] 吴楠, 乔敏. 土壤环境中四环素类抗生素残留及抗性基因污染的研究进展[J]. *生态毒理学报*, 2010, **5**(5): 618-627.
- [ 24 ] 邵义萍, 莫测辉, 李彦文, 等. 长期施用粪肥菜地土壤中四环素类抗生素的含量与分布特征[J]. *环境科学*, 2011, **32** (4): 1182-1187.
- [ 25 ] Heuer H, Schmitt H, Smalla K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2011, **14**(3): 236-243.
- [ 26 ] Jay-Russell M T, Madigan J E, Bengson Y, *et al.* Salmonella oranienburg isolated from horses, wild turkeys and an edible home garden fertilized with raw horse manure [J]. *Zoonoses and Public Health*, 2014, **61**(1): 64-71.

## CONTENTS

Development of a Two Stage Virtual Impactor for Stationary Source PM <sub>10</sub> and PM <sub>2.5</sub> Sampling .....	JIANG Jing-kun, DENG Jian-guo, DUAN Lei, <i>et al.</i> (3639)
Characteristics and the Impact Factors of Acid Rain in Fuzhou and Xiamen 1992-2012 .....	ZHENG Qiu-ping, WANG Hong, CHEN Bin-bin, <i>et al.</i> (3644)
Concentration Distribution of Metal Elements in Atmospheric Aerosol Under Different Weather Conditions in Qingdao Coastal Region .....	CHEN Xiao-jing, QI Jian-hua, LIU Ning, <i>et al.</i> (3651)
Emission Characteristics and Hazard Assessment Analysis of Volatile Organic Compounds from Chemical Synthesis Pharmaceutical Industry .....	LI Yan, WANG Zhe-ming, SONG Shuang, <i>et al.</i> (3663)
NO <sub>x</sub> and SO <sub>2</sub> Formation in the Sintering Process and Influence of Sintering Material Composition on NO <sub>x</sub> Emissions .....	REN Zhong-pei, ZHU Tian-le, ZHU Ting-yu, <i>et al.</i> (3669)
Application of Activated Carbon from Waste Tea in Desulfurization and Denitrification .....	SONG Lei, ZHANG Bin, DENG Wen (3674)
Effect of Soil Texture in Unsaturated Zone on Soil Nitrate Accumulation and Groundwater Nitrate Contamination in a Marginal Oasis in the Middle of Heihe River Basin .....	SU Yong-zhong, YANG Xiao, YANG Rong (3683)
Health Assessment of River Ecosystem in Haihe River Basin, China .....	HAO Li-xia, SUN Ran-hao, CHEN Li-ding (3692)
Analysis on the Variation Characteristics of Iron and Manganese Concentration and Its Genesis in Changtan Reservoir in Taizhou, Zhejiang Province .....	LIU Shu-yuan, ZHENG Chen, YUAN Qi, <i>et al.</i> (3702)
Spatiotemporal Characteristics of Nitrogen and Phosphorus in a Mountainous Urban Lake .....	BAO Jing-yue, BAO Jian-guo, LI Li-qing (3709)
Formation of Geochemistry in Underground River Under Rainfall Conditions: An Example for Underground River at Xueyu Cave, Chongqing .....	WANG Feng-kang, LIANG Zuo-bing, YU Zheng-liang, <i>et al.</i> (3716)
Contamination and Ecological Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water and in Karst Underground River Catchment .....	LAN Jia-cheng, SUN Yu-chuan, TIAN Ping, <i>et al.</i> (3722)
Pollution Characteristics and Ecological Risk of Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in River Sediments from an Electrical Equipment Dismantling Area .....	CHEN Xuan-yu, XUE Nan-dong, ZHANG Shi-lei, <i>et al.</i> (3731)
Ecological Risk Assessment of Heavy Metals in Surface Sediments in the Southern and Central Haihe River Basin .....	WANG Rui-lin, CHENG Xian, SUN Ran-hao (3740)
Distribution Characteristics of COD and DO and Its Influencing Factors in the Daliaohe Estuary .....	YANG Fu-xia, JIAN Hui-min, TIAN Lin, <i>et al.</i> (3748)
Seasonal Variation in the Absorption and Fluorescence Characteristics of CDOM in Downstream of Liaohe River .....	SHAO Tian-tian, ZHAO Ying, SONG Kai-shan, <i>et al.</i> (3755)
Nitrogen Uptake and Denitrification Study on the Joint Treatment of Aquatic Vegetation and Immobilized Nitrogen Cycling Bacteria in Taihu Lake .....	LIU Dan-dan, LI Zheng-kui, YE Zhong-xiang, <i>et al.</i> (3764)
Actinobacteria and Their Odor-producing Capacities in a Surface Water in Shanghai .....	CHEN Jiao, BAI Xiao-hui, LU Ning, <i>et al.</i> (3769)
Laboratory Evaluation of Remediation of Nitrobenzene Contaminated Aquifer by Using Groundwater Circulation Well .....	BAI Jing, ZHAO Yong-sheng, SUN Chao, <i>et al.</i> (3775)
Sorption Characteristics of Tea Waste Modified by Hydrated Ferric Oxide Toward Pb(II) in Water .....	WAN Shun-li, XUE Yao, MA Zhao-zhao, <i>et al.</i> (3782)
Effects of UV Radiation on the Aggregation Performance of Small Molecular Organic Acids .....	WANG Wen-dong, WANG Ya-bo, FAN Qing-hai, <i>et al.</i> (3789)
UV Photolysis of Propranolol in Aqueous Solution: Mechanism and Toxicity of Photoproducts .....	PENG Na, WANG Kai-feng, LIU Guo-guang, <i>et al.</i> (3794)
Photo-catalytic Degradation of Diphenylarsinic Acid by TiO <sub>2</sub> (P25) .....	WANG A-nan, TENG Ying, LUO Yong-ming (3800)
Effect of Carbon/Nitrogen Ratio on Short-Cut Nitrification and Denitrification of Polyurethane Biofilm Reactor .....	TAN Chong, LIU Ying-jie, WANG Wei, <i>et al.</i> (3807)
Distribution and Removal of Anaerobic Antibiotic Resistant Bacteria During Mesophilic Anaerobic Digestion of Sewage Sludge .....	TONG Juan, WANG Yuan-yue, WEI Yuan-song (3814)
Spatial Distribution and Risk Assessment of Insecticides in Surface Soil from a Rapidly Urbanizing Region .....	WEI Yan-li, BAO Lian-jun, WU Cheng-zhou, <i>et al.</i> (3821)
Field Measurement of Soil Mercury Emission in a Masson Pine Forest in Tieshanping, Chongqing in Southwestern China .....	DU Bao-yu, WANG Qiong, LUO Yao, <i>et al.</i> (3830)
Chlorine Speciation and Concentration in Cultivated Soil in the Northeastern China Studied by X-Ray Absorption Near Edge Structure .....	LI Jing, LANG Chun-yan, MA Ling-ling, <i>et al.</i> (3836)
Soil Organic Carbon Storage Changes with Land Reclamation Under Vegetation Reconstruction on Opencast Coal Mine Dump .....	LI Jun-chao, DANG Ting-hui, GUO Sheng-li, <i>et al.</i> (3842)
Effect of Sulfur on the Species of Fe and As Under Redox Condition in Paddy Soil .....	TANG Bing-pei, YANG Shi-jie, WANG Dai-zhang, <i>et al.</i> (3851)
Response of Ectomycorrhizal Fungi to Aluminum Stress and Low Potassium Soil .....	ZHANG Wei, HUANG Jian-guo, YUAN Ling, <i>et al.</i> (3862)
Long-Term Manure Application Induced Shift of Diversity and Abundance of Antibiotic Resistance Genes in Paddy Soil .....	HUANG Fu-yi, LI Hu, WEI Bei, <i>et al.</i> (3869)
Effect of Phosphate and Organic Acid Addition on Passivation of Simulated Pb Contaminated Soil and the Stability of the Product .....	ZUO Ji-chao, GAO Ting-ting, SU Xiao-juan, <i>et al.</i> (3874)
Bioremediation of Chromium(VI) Contaminated Site by Reduction and Microbial Stabilization of Chromium .....	ZHENG Jia-chuan, ZHANG Jian-rong, LIU Xi-wen, <i>et al.</i> (3882)
Effect of Thermal Enhanced Soil Vapor Extraction on Benzene Removal in Different Soil Textures .....	LI Peng, LIAO Xiao-yong, YAN Xiu-lan, <i>et al.</i> (3888)
Effects of Elevated O <sub>3</sub> Concentration on Nitrogen in Greening Tree Species in Southern China .....	YANG Tian-tian, ZHANG Wei-wei, HU En-zhu, <i>et al.</i> (3896)
Effects of Nitrogen Application on Soil Greenhouse Gas Fluxes in <i>Eucalyptus</i> Plantations with Different Soil Organic Carbon Content .....	LI Rui-da, ZHANG Kai, SU Dan, <i>et al.</i> (3903)
Ozone Effects on Soil Microbial Community of Rice Investigated by <sup>13</sup> C Isotope Labeling .....	CHEN Zhan, WANG Xiao-ke, SHANG He (3911)
Enhanced Aerobic Degradation of Low Chlorinated Biphenyls by Constructing Surfactants <i>Burkholderia xenovorans</i> LB400 Based System .....	CHEN Shao-yi, ZHANG Jing, WANG Han, <i>et al.</i> (3918)
Identification of a High Ammonia Nitrogen Tolerant and Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Bacterial Strain TN-14 and Its Nitrogen Removal Capabilities .....	XIN Xin, YAO Li, LU Lei, <i>et al.</i> (3926)
Isolation and Identification of Electrochemically Active Microorganism from Micro-Aerobic Environment .....	WU Song, XIAO Yong, ZHENG Zhi-yong, <i>et al.</i> (3933)
Characteristics of Microbial Community Structure During Isolation of Electrical Active Bacteria .....	WANG Min, ZHAO Yang-guo, LU Shan-shan (3940)
Predicting Copper Toxicity to <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> and <i>Ctenopharyngodon idellus</i> Based on Biotic Ligand Model .....	WANG Wan-bin, CHEN Sha, WU Min, <i>et al.</i> (3947)
Macrozoobenthos Community Structure and Water Quality Evaluation of Tian'e Zhou Oxbows .....	MA Xiu-juan, SHEN Jian-zhong, WANG Teng, <i>et al.</i> (3952)
Species Selection Methods in Deriving Water Quality Criteria for Aquatic Life .....	ZHANG Ling-song, WANG Ye-yao, MENG Fan-sheng, <i>et al.</i> (3959)
Correlations Between HBCD and Thyroid Hormone Concentrations in Human Serum from Production Source Area .....	LI Peng, YANG Cong-qiao, JIN Jun, <i>et al.</i> (3970)
Preparation of Cobalt Oxide Mesoporous Metallic Oxide-Clay Composites and Their Catalytic Performance in the Oxidation of Benzene .....	MU Zhen, MA Chun-yan, CHENG Jie, <i>et al.</i> (3977)
Catalytic Degradation of Naphthalene by CuO(-CeO <sub>2</sub> )/Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	ZHA Jian, ZHOU Hong-cang, HE Du-liang, <i>et al.</i> (3984)
Toxicity Tests and Their Application in Safety Assessment of Water Quality .....	XU Jian-ying, ZHAO Chun-tao, WEI Dong-bin (3991)
Assessment on the COD Discharge Status of Municipal Wastewater Treatment Plant in a City of China .....	ZHOU Yu-hua, LU Yan-na, ZHANG Yu, <i>et al.</i> (3998)
Assessment of Ecological Environment Benefits of Reclaimed Water Reuse in Beijing .....	FAN Yu-peng, CHEN Wei-ping (4003)
Construction of Index System for Early Warning of Persistent Organic Pollutants (POPs) Pollution Incidents in China .....	WANG Lin, LU Yong-long, HE Gui-zhen, <i>et al.</i> (4009)
Environmental Damages Assessment: Establishment of System Framework in China .....	ZHANG Hong-zhen, WANG Jin-nan, NIU Kun-yu, <i>et al.</i> (4015)

# 《环境科学》第6届编辑委员会

主 编: 欧阳自远

副主编: 赵景柱 郝吉明 田 刚

编 委: (按姓氏笔画排序)

万国江 王华聪 王凯军 王绪绪 田 刚 田 静 史培军  
朱永官 刘志培 汤鸿霄 陈吉宁 孟 伟 周宗灿 林金明  
欧阳自远 赵景柱 姜 林 郝郑平 郝吉明 聂永丰 黄 霞  
黄 耀 鲍 强 潘 纲 潘 涛 魏复盛

环 境 科 学

(HUANJING KEXUE)

(月刊 1976年8月创刊)

2014年10月15日 第35卷 第10期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 35 No. 10 Oct. 15, 2014

主 管	中国科学院	Superintended	by	Chinese Academy of Sciences
主 办	中国科学院生态环境研究中心	Sponsored	by	Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences
协 办	(以参加先后为序) 北京市环境保护科学研究院 清华大学环境学院	Co-Sponsored	by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection School of Environment, Tsinghua University
主 编	欧阳自远	Editor-in -Chief		OUYANG Zi-yuan
编 辑	《环境科学》编辑委员会 北京市2871信箱(海淀区双清路 18号, 邮政编码:100085) 电话:010-62941102, 010-62849343 传真:010-62849343 E-mail: hjkx@rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn	Edited	by	The Editorial Board of Environmental Science ( HUANJING KEXUE) P. O. Box 2871, Beijing 100085, China Tel:010-62941102, 010-62849343; Fax:010-62849343 E-mail: hjkx@rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn
出 版	科 学 出 版 社 北京东黄城根北街16号 邮政编码:100717	Published	by	Science Press 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷 装 订	北京北林印刷厂	Printed	by	Beijing Bei Lin Printing House
发 行	科 学 出 版 社 电话:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com	Distributed	by	Science Press Tel:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com
订 购 处	全国各地邮电局	Domestic		All Local Post Offices in China
国外总发行	中国国际图书贸易总公司 (北京399信箱)	Foreign		China International Book Trading Corporation (Guoji Shudian), P. O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号: ISSN 0250-3301  
CN 11-1895/X

国内邮发代号: 2-821

国内定价: 90.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发行