

# 环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第36卷 第5期

Vol.36 No.5

**2015**

中国科学院生态环境研究中心 主办  
科学出版社 出版



目次

深圳大气颗粒物中卤代多环芳烃污染研究 ..... 孙建林,常文静,陈正侠,曾辉(1513)

北京市典型餐饮企业 VOCs 排放特征研究 ..... 崔彤,程婧晨,何万清,任培芳,聂磊,徐东耀,潘涛(1523)

2006~2010年珠三角地区 SO<sub>2</sub> 特征分析 ..... 李菲,谭浩波,邓雪娇,邓涛,徐婉筠,冉靓,赵春生(1530)

环境空气 PM<sub>2.5</sub> 连续监测系统手工采样比对测试 ..... 王强,钟琪,迟颖,张杨,杨凯(1538)

燃煤电厂可凝结颗粒物的测试与排放 ..... 裴冰(1544)

南海水域不同深度非光合微生物的固碳潜能及其对不同电子供体的响应 ..... 方峰,王磊,席雪飞,胡佳俊,付小花,陆兵,徐殿胜(1550)

基于 GOCI 影像和水质光学分类的内陆湖泊叶绿素 a 浓度遥感估算 ..... 冯驰,金琦,王艳楠,赵丽娜,吕恒,李云梅(1557)

贵州清水江流域丰水期水化学特征及离子来源分析 ..... 吕婕梅,安艳玲,吴起鑫,罗进,蒋浩(1565)

东莞石马河流域水化学特征时空差异及来源辨析 ..... 高磊,陈建耀,王江,柯志庭,朱爱萍,许凯(1573)

河南鸡冠洞洞穴水对极端气候的响应及其控制因素研究 ..... 刘肖,杨琰,彭涛,赵景耀,任小凤,张银环,聂旭东,李建仓,凌新有,张志钦(1582)

石漠化治理对岩溶地下水水化学和溶解无机碳稳定同位素的影响 ..... 肖时珍,熊康宁,蓝家程,张晖,杨龙(1590)

旱季不同土地利用类型下岩溶碳汇效应差异 ..... 赵瑞一,梁作兵,王尊波,于正良,江泽利(1598)

有机氯农药在岩溶区上覆土壤中的垂直迁移特征及对地下水的影响 ..... 孙玉川,王永启,梁作兵,袁道先(1605)

山东南四湖沉积物中汞的污染现状及迁移研究 ..... 曹霏霏,杨丽原,庞绪贵,王炳华,王云倩(1615)

摇蚊幼虫扰动下沉沉积物微环境和微界面对物理扰动强度的响应 ..... 史晓丹,李勇,李大鹏,王忍,邓猛,黄勇(1622)

南方红壤区氮湿沉降特征及其对流域氮输出的影响 ..... 郝卓,高扬,张进忠,徐亚娟,于贵瑞(1630)

不同紫色母岩对景观水体氮磷及有机物去除的影响 ..... 黄雪娇,刘晓晨,李振轮,石纹豪,杨珊(1639)

荔枝落叶对铜绿微囊藻生长和光合作用的影响 ..... 汪小雄,姜成春,李锦卫,汪晓军(1648)

黄连根茎浸提物对绿藻的毒理作用 ..... 陈亚楠,袁玲(1655)

饮用水中消毒副产物 1,1-二氯丙酮的形成机制 ..... 丁春生,孟壮,徐洋洋,缪佳(1662)

水中利谷隆氯化降解动力学和消毒副产物生成特性 ..... 凌晓,胡晨燕,程明,谷建(1668)

化学消毒的中和剂对水中内毒素活性检测的影响 ..... 张灿,刘文君,史文,安代志,白森,徐稳(1674)

牛粪生物炭对水中氨氮的吸附特性 ..... 马锋锋,赵保卫,刁静茹,钟金魁,李安邦(1678)

丁二酸改性茶油树木屑吸附附的研究 ..... 张晓峰,陈迪云,彭燕,刘永胜,熊雪莹(1686)

SPG 膜表面润湿性对膜污染和化学耐受性的影响 ..... 张静,肖太民,张晶,曹丽亚,杜亚威,刘春,张磊(1694)

TiO<sub>2</sub> 诱导下左旋氧氟沙星的可见光降解及其机制 ..... 郭宏生,刘亚楠,乔琪,魏红,董呈幸,薛洁,李克斌(1700)

新型高分子絮凝剂对废水中 Cr(VI) 的捕集性能 ..... 王刚,杜凤龄,常青,徐敏(1707)

基于 OUR-HPR 测量在线估计活性污泥合成 PHA 量 ..... 曾善文,王泽宇,高敬,刘东,张代钧,卢培利(1713)

分离高浓度污泥产酸发酵液的自生动态膜形成机制 ..... 黄帅,刘宏波,殷波,马惠君,符波,刘和,白洁(1720)

通风强度对市政污泥生物干化中试效果的影响 ..... 张喻,韩融,陆文静,王洪涛,明中远,王强,夏伟(1727)

生物可降解螯合剂谷氨酸 N,N-二乙酸四钠对污泥中重金属萃取效率的研究 ..... 吴青,崔延瑞,汤晓晓,杨慧娟,孙剑辉(1733)

百乐克(BIOLAK)活性污泥宏基因组的生物多样性及功能分析 ..... 田美,刘汉湖,申欣,赵方庆,陈帅,姚永佳(1739)

异养硝化-好氧反硝化菌 YL 的脱氮特性 ..... 梁贤,任勇翔,杨垒,赵思琪,夏志红(1749)

菌株 *Arthrobacter* sp. CN2 降解对硝基苯酚的特性与动力学 ..... 任磊,史延华,贾阳,姚雪松,Ruth Nahurira,弥春霞,闫艳春(1757)

短短芽胞杆菌及其芽胞对苾的降解 ..... 刘芷辰,叶锦韶,彭辉,刘则华,邓庭进,尹华,廖丽萍(1763)

垃圾填埋场抗生素抗性基因初探 ..... 李蕾,徐晶,赵由才,宋立岩(1769)

不同构型人工湿地基质中土著菌的耐药性及整合子丰度调查 ..... 麦晓蓓,陶然,杨扬,张敏,林剑华,满滢(1776)

硝酸盐和甲烷对覆土中苯系物厌氧氧化的影响 ..... 柳蓉,龙焰,王立立,何婷,叶锦韶(1785)

山西高原落叶松人工林土壤呼吸的空间异质性 ..... 严俊霞,李洪建,李君剑,武江星(1793)

施氮对黄土旱塬区春玉米土壤呼吸和温度敏感性的影响 ..... 姜继韶,郭胜利,王蕊,刘庆芳,王志齐,张彦军,李娜娜,李如剑,吴得峰,孙棋棋(1802)

宣威街道尘中重金属的分布特征及其健康风险评估 ..... 张文超,吕森林,刘丁或,刘品威,米持真一,王效举,王青耀(1810)

宝鸡市街道尘埃磁学特征空间分布及环境意义 ..... 张俊辉,王瑾,张健,房妮,夏敦胜(1818)

长期施肥下浙江稻田不同颗粒组分有机碳的稳定特征 ..... 毛霞丽,陆扣萍,孙涛,张小凯,何丽芝,王海龙(1827)

矿区植被恢复方式对土壤微生物和酶活性的影响 ..... 李君剑,刘峰,周小梅(1836)

三江平原典型湿地类型土壤微生物特征与土壤养分的研究 ..... 肖焯,黄志刚,武海涛,吕宪国(1842)

钠盐类型对表面活性剂清洗煤油污染土壤的强化效应 ..... 黄昭露,陈泉源,周娟,谢墨函(1849)

石油污染土壤的生物修复技术及微生物生态效应 ..... 杨茜,吴蔓莉,聂麦茜,王婷婷,张明辉(1856)

可生物降解螯合剂 GLDA 诱导东南景天修复重金属污染土壤的研究 ..... 卫泽斌,陈晓红,吴启堂,谭蒙(1864)

绿洲土 Pb-Zn 复合胁迫下重金属形态特征和生物有效性 ..... 金诚,赵转军,南忠仁,王胜利,武文飞,王厚成(1870)

硫酸对水稻根系铁锰胶膜形成及吸收的影响 ..... 王丹,李鑫,王代长,饶伟,杜光辉,杨军,化党领(1877)

臭氧对几种楠木气体交换参数的影响 ..... 李苗苗(1888)

某货车侧翻水污染事件的环境损害评估方法探索 ..... 蔡锋,赵士波,陈刚才,鲜思淑,杨清玲,周贤杰,余海(1902)

《环境科学》征订启事(1543) 《环境科学》征稿简则(1756) 信息(1667,1726,1809,1848)

# 不同构型人工湿地基质中土著菌的耐药性及整合子丰度调查

麦晓蓓<sup>1</sup>, 陶然<sup>1,2</sup>, 扬扬<sup>1,2\*</sup>, 张敏<sup>1</sup>, 林剑华<sup>1</sup>, 满滢<sup>1</sup>

(1. 暨南大学水生生物研究中心, 广州 510632; 2. 热带亚热带水生态工程教育部工程研究中心, 广州 510632)

**摘要:** 采用 Kirby-Bauer 纸片琼脂扩散法分析了夏、冬季节 9 个不同构型人工湿地中的葡萄球菌 (*Staphylococcus*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*) 两种土著菌对 7 种常用抗生素的耐药性, 并通过荧光定量 PCR 检测人工湿地基质中 I 型整合子 (*intI*) 的丰度。结果表明, 共分离出的 522 株葡萄球菌和 543 株假单胞菌, 约 84% 的菌株对所测试的抗生素具有耐药性, 多重耐药率达到 68% 以上, MRI 指数平均为 0.22, 与某些环境中人源或动物源细菌耐药水平相当, 表明人工湿地基质土著菌具有较高水平的耐药性; 两种土著菌对氨苄西林和复方新诺明的耐药率较高, 四环素、庆大霉素和环丙沙星的耐药率均极低 (<3%), 而对头孢他啶和氯霉素的耐药性呈现差别。湿地基质中 *intI* 基因的浓度为  $1.14 \times 10^5 \sim 5.66 \times 10^5$  copies · g<sup>-1</sup>, 其相对丰度为 0.54% ~ 3.68%。季节和湿地工艺对细菌耐药和整合酶基因分布有较大影响。夏季 2 种细菌的抗生素耐药率、多重耐药指数和 *intI* 丰度均显著高于冬季; 下行垂直流湿地中的抗生素耐药率、多重耐药指数 (MRI) 最高, 而在水平潜流湿地中 *intI* 丰度最高。研究表明人工湿地基质的土著菌长期暴露在一定浓度抗生素和耐药肠道菌的生活污水环境下获得了耐药性, 人工湿地中抗生素耐药菌和耐药基因的污染及环境风险不容忽视。

**关键词:** 人工湿地; 环境土著菌; 葡萄球菌; 假单胞菌; 抗生素耐药性; I 型整合子 (*intI*)

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2015)05-1776-09 DOI: 10.13227/j.hjks.2015.05.037

## Investigation of Antibiotic Resistance of Indigenous Bacteria and Abundance of Class I Integron in Matrix of Constructed Wetlands of Different Configurations

MAI Xiao-bei<sup>1</sup>, TAO Ran<sup>1,2</sup>, YANG Yang<sup>1,2\*</sup>, ZHANG Min<sup>1</sup>, LIN Jian-hua<sup>1</sup>, MAN Ying<sup>1</sup>

(1. Research Center of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Engineering Research Center of Tropical and Subtropical Aquatic Ecological Engineering, Ministry of Education, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** Environmental indigenous bacteria (*Staphylococcus* and *Pseudomonas*) were isolated from 9 different constructed wetlands (CWs) in summer and winter. The antibiotic resistance analysis of the isolated bacteria was conducted by Kirby-Bauer disc agar diffusion method. And the quantitative PCR assay was used to quantify the abundance of class I integron (*intI*) in the matrix of CWs. The results indicated that over 84% of isolates among the 522 *Staphylococcus* strains and 543 *Pseudomonas* strains had antibiotic resistance and above 68% of isolates had multi-antibiotic resistance, the average of MRI index was 0.22. Antibiotic resistance of indigenous bacteria in CWs was at the same resistance level of human or animal bacteria in certain environment, indicating that indigenous bacteria from constructed wetlands had relatively high level of resistance. *Staphylococcus* and *Pseudomonas* strains had higher resistances to Ampicillin (AMP) and Sulfamethoxazole (SXT), and extremely low resistance rates of lower than 3% to Tetracycline (TE), Gentamicin (CN) and Ciprofloxacin (CIP). To Ceftazidime (CAZ) and Chloramphenicol (C), the two kinds of indigenous bacteria showed distinctly different resistances. Quantitative PCR revealed that the abundance of *intI* in CWs was  $1.14 \times 10^5 \sim 5.66 \times 10^5$  copies · g<sup>-1</sup>, and its relative abundance was 0.54% - 3.68%. Both of season and wetland type had important impact on antibiotic resistance and abundance of *intI*. The antibiotic resistance rate and the multiple resistance index (MRI) for the indigenous bacteria and the abundance of *intI* in summer were higher than those in winter. Among three types of CWs, the antibiotic resistance rate and the MRI value were the highest in the downward vertical flow, while the *intI* abundance was the highest in the sub-surface flow. The research indicated that indigenous bacteria acquired antibiotic resistance due to long term exposure to antibiotics of certain concentrations and antibiotic-resistant intestinal bacteria in sewage environment. The environmental risks of antibiotic resistant bacteria and resistant genes in CWs should not be ignored.

**Key words:** constructed wetland; indigenous bacteria; *Staphylococcus*; *Pseudomonas*; antibiotic resistance; class I integron

近年来,由于抗生素在临床上的不规范使用以及在养殖业中的滥用,大量的抗生素随生活污水和养殖废水进入环境,在地表水中已经很难找到检测不到抗生素的区域<sup>[1-3]</sup>。抗生素残留对水环境的潜在风险越来越受到关注<sup>[4-7]</sup>。除了抗生素类药物自

收稿日期: 2015-02-06; 修订日期: 2015-03-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(41201506); “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAJ21B07-04)

作者简介: 麦晓蓓(1989~),女,硕士研究生,主要研究方向为环境微生物耐药, E-mail: 609938617@qq.com

\* 通讯联系人, E-mail: yangyang@scies.org

身产生的化学污染以外,抗生素的使用还会加速抗生素耐药基因(antibiotic resistance genes, ARGs)和耐药菌(antibiotic-resistant bacteria, ARB)的产生,导致临床和环境微生物耐药水平不断上升,对人类健康和环境产生潜在的风险<sup>[8]</sup>.

人工湿地(constructed wetland, CW)是20世纪70年代发展起来的一种新型废水处理技术,具有工艺简单、经济高效等特点,已被广泛应用于环境修复和城镇生活污水、养殖废水的处理<sup>[9-12]</sup>. 人工湿地主要依靠基质生物膜上丰富的微生物群落来降解有机物和去除污染物,同时基质生物膜也为污水中耐药基因的传播提供适宜的场所,有研究表明人工湿地中存在着一定水平的耐药菌和耐药基因<sup>[13,14]</sup>. 整合子是一种基因重组表达系统,在整合酶的作用下,整合子能捕获、整合及表达耐药基因,此外,整合子可以随着质粒转座子在不同的菌株间转移,导致ARGs在微生物之间传播和扩散.

目前,对环境细菌耐药性的研究主要集中在养殖废水、污水处理厂以及河流水体等环境,其研究对象大多局限于人源或动物源的肠道菌和临床上常见的致病菌<sup>[15-17]</sup>;而对于人工湿地中微生物耐药特征的研究尚不多,已有的研究也仅针对大肠杆菌、肠球菌、异氧菌等微生物<sup>[13,18,19]</sup>. 对于在环境分布广泛且适应性强的土著菌的耐药特征则几乎没有研究. 葡萄球菌(*Staphylococcus*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)广泛分布于土壤、淡水、海水等环境中,专性需氧或兼氧,多数为非致病环境土著菌,少数为临床上的致病菌,并携带耐药性. 本研究选取不同构型人工湿地中葡萄球菌和假单胞菌为对象,

考察人工湿地环境土著菌的耐药特征及其基质中整合酶基因的丰度,揭示人工湿地中土著耐药菌和耐药基因转移元件在人工湿地中的分布规律和影响因素,以期评估人工湿地中耐药菌和耐药基因的环境风险提供依据,并为制定有效的ARGs环境污染控制方法提供理论基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 模拟人工湿地概况

试验装置为9个独立的构型模拟人工湿地(构造如图1所示),湿地床体为铸铁材质的方箱,规格为80 cm × 60 cm × 80 cm(长 × 宽 × 高),填充粒径10 mm左右的砾石(孔隙率 $\varepsilon$ 为0.4~0.5)作为基质,湿地进水为校园生活污水(污水的理化参数见表1),污水经粗、细格栅过滤后通过潜水泵进入各装置,流量为10 L·h<sup>-1</sup>,水力负荷为0.25 m·d<sup>-1</sup>,运行时间为07:00~19:00.

模拟人工湿地包括3种工艺类型: CW1~CW3为下行垂直流(DVF)、CW4~CW6为表面流(SF)、CW7~CW9为水平潜流(HF). DVF和HF的砾石基质填充高度为60 cm,水位为55 cm; SF基质填充高度为30 cm,水位为55 cm. DVF污水从基质表面的多孔布水管均匀分布在床体的整个表面上,随后污水垂直向下流过基质层,由底部出水口流出; SF污水由位于床体侧边的进水口流入,水平流过床体,再从位于另一侧的出水口流出; HF的构造与SF相同,差别为HF填满了基质. 湿地装置栽种了两种常见湿地植物(美人蕉 *Canna indica* 和再力花 *Thalia dealbata*),初始种植密度约16株·m<sup>-2</sup>,到装置运行3 a后采样,植物已达到100%覆盖.

表1 人工湿地进水的理化参数( $n=3$ )

Table 1 Physical and chemical parameters of influent wastewater in constructed wetlands ( $n=3$ )

季节	温度/°C	pH	DO /mg·L <sup>-1</sup>	COD /mg·L <sup>-1</sup>	SS /mg·L <sup>-1</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N /mg·L <sup>-1</sup>	TP /mg·L <sup>-1</sup>
夏季	27.8 ± 2.1	7.1 ± 0.1	0.8 ± 0.5	127.3 ± 1.9	47.8 ± 22.5	24.0 ± 1.6	3.2 ± 0.6
冬季	17.0 ± 1.4	7.0 ± 0.1	0.5 ± 0.1	134.2 ± 3.5	57.1 ± 20.2	27.5 ± 2.0	2.7 ± 0.4

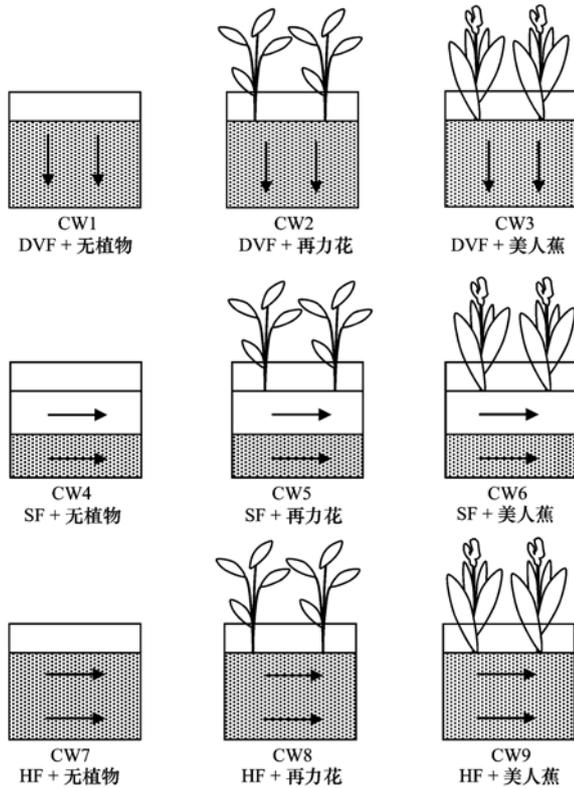
### 1.2 样品采集

在模拟人工湿地装置正常运行3 a后,于2014年1月中旬(冬季)和8月中旬(夏季)采样,分别在9个湿地各采集表(5 cm)、中(20 cm)和底(40 cm)层基质共约100 g,放于无菌封口袋内,于4℃冷藏保存,24 h内完成实验.

### 1.3 细菌的分离纯化和耐药性检测

称取100 g的基质样品,加入到装有100 mL无

菌生理盐水和数颗灭菌玻璃研磨珠的无菌聚乙烯瓶中,置于220转·min<sup>-1</sup>的摇床上摇匀30 min制成基质悬液,经适当稀释后分别涂布于葡萄球菌选择性培养基Baird-Parker琼脂和假单胞菌选择性培养基十六烷三甲基溴化铵琼脂(海博生物)平板上,37℃培养24 h. 葡萄球菌为具有沉淀环的黑色菌落,假单胞菌为黄色或绿色菌落,分别挑取两种特征菌落,用相应的选择性培养基进一步纯化后进行抗生素耐



DVF 为下行垂直流; SF 为表面流; HF 为水平潜流; 下同

图 1 9 个人工湿地构造示意

Fig. 1 Schematic diagram of nine constructed wetlands

药性检测.

细菌的药敏性测试采用 CLSI 2009 药敏标准推荐的 Kirby-Bauer 纸片琼脂扩散法. 所选用的抗生素纸片 (缩写及含量) 为: 氨苄西林 (AMP 10  $\mu\text{g}$ ), 四环素 (TE 30  $\mu\text{g}$ ), 氯霉素 (C 30  $\mu\text{g}$ ), 庆大霉素 (CN 10  $\mu\text{g}$ ), 环丙沙星 (CIP 5  $\mu\text{g}$ ), 头孢他啶 (CAZ 30  $\mu\text{g}$ ) 和复方新诺明 (SXT 25  $\mu\text{g}$ ). 用 *E. coli* ATCC25922 作为质控菌.

用耐药率表示不同采样点大肠杆菌对某种抗生素的耐药水平. 耐药率的计算公式为:  $A/B \times 100\%$ , 式中,  $A$  为对抗生素耐药的菌数,  $B$  为采样点中分离的细菌总数. 多重耐药指数 (MRI) 常用于评估环境中细菌的多重耐药特征和抗生素污染水平<sup>[20]</sup>, 其计算公式为:  $\text{MRI} = a/(b \times c)$ , 式中,  $a$  代表采样点分离细菌的总抗生素耐药值,  $b$  代表检测的抗生素种类数目,  $c$  代表采样点分离的目标细菌菌株数.  $0 < \text{MRI} < 1$ , MRI 值越大说明多重耐药水平越高.

#### 1.4 基质生物膜上 *int1* 和 16S rRNA 的荧光定量 PCR 检测

基质总 DNA 提取: 用孔径 0.45  $\mu\text{m}$  的醋酸纤维

滤膜过滤 50 mL 基质洗脱悬浊液得到基质沉淀<sup>[12]</sup>, 沉淀用 PowerSoil<sup>®</sup> DNA Isolation Kit 试剂盒 (MoBio, USA) 提取基质的细菌总 DNA, 提取的 DNA 样品经电泳和吸光值测定检测其浓度和纯度后  $-20^\circ\text{C}$  保存备用.

荧光定量检测的目标基因是湿地基质中的整合子 *int1* 基因, 并以 16S rRNA 基因作为参比基因, 所用引物见表 2, 方法参照文献[6]. 首先分别从 *int1* 阳性菌株和大肠杆菌 (*E. coli* ATCC25922) 克隆出 *int1*、16S rRNA 基因, PCR 产物经纯化后, 将获得的 *int1* 和 16S rRNA 基因片段根据 pTA2-vecTo 试剂盒操作说明书 (TOYOBO, Japan) 利用大肠杆菌 *DH5 $\alpha$*  感受态细胞进行克隆. 克隆成功后, 利用 AxyPrep Plasmid Miniprep Kit 试剂盒 (AXYGEN, USA) 提取目标基因的重组质粒, 纯化后测定 260 nm 吸光值得到质粒浓度, 根据重组质粒片段大小计算出目标基因的拷贝数, 经 10 倍稀释成一系列目标基因梯度标准品, 用于目标基因 QPCR 测定标准曲线的构建. QPCR 测定 *int1* 的标准曲线方程为:  $y = -3.643x + 39.018$  ( $R^2 = 99.8$ , 扩增效率 88.1%), 16S rRNA QPCR 测定的标准曲线方程为  $y = -3.486x + 38.403$  ( $R^2 = 99.9$ , 扩增效率 93.6%), 产物溶解曲线均为单一峰, 无非特异性扩增.

利用提取的总 DNA 作为荧光定量检测的 DNA 模板, 通过检测到的循环数, 对照标准曲线, 得到样品中目标基因的丰度. 荧光定量检测在 Bio-Rad CFX96 实时荧光定量仪运行 (Bio-Rad, USA), 使用 TaKaRa SYBR Premix Ex Taq II 染料法荧光定量试剂盒, 反应体系如下: SYBR Premix Ex Taq II 12.5  $\mu\text{L}$ , 正反引物 ( $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , 补足 ddH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu\text{L}$ . PCR 程序: ①94 $^\circ\text{C}$  预变性 30 s; ②94 $^\circ\text{C}$  变性 15 s, 退火 20 s (退火温度见表 2), 72 $^\circ\text{C}$  延伸 45 s, 40 个循环; ③溶解曲线检测. 每个样品设置 3 个平行. 用 *int1*/16S rRNA 比值表示样品中 *int1* 的相对丰度, 来矫正不同样品 DNA 提取效率的差异.

#### 1.5 数据分析及处理

采用 Microsoft Excel 2010 和 SPSS 18.0 软件进行数据整理统计, 利用  $T$  检验比较分析不同基质采样点的耐药水平、多重耐药指数 MRI 和整合子丰度的差异性, 并借助单因素方差分析检验季节和人工湿地设计因素对耐药率、多重耐药指数 (MRI) 和整合子丰度的影响. 结果用 Origin 8.5 软件绘制图表.

表 2 本试验所用引物<sup>1)</sup>  
Table 2 Primers used in this study

靶基因	引物	基因序列(5'-3')	扩增长度/bp	退火温度/°C	文献
<i>int1</i>	Int1-F	ACGAGCGCAAGGTTTCGGT	565	52	[21]
	Int1-R	GAAAGGTCTGGTCATACATG			
16S rRNA	341-F	CATTTGTGTTGGACGGC	193	60	[22]
	434-R	GACAGATACGTGTTGGCAA			

1) F:正向引物;R:反向引物

## 2 结果与分析

### 2.1 不同季节细菌对 7 种抗生素的耐药率分析

从 9 个不同构型人工湿地基质中共分离到葡萄球菌 522 株(夏季 263 株,冬季 259 株),假单胞菌 543 株(夏季 217 株,冬季 326 株),其对 7 种测试抗生素的耐药水平如表 3 所示。

在测试的 7 种抗生素中,葡萄球菌主要对 AMP、CAZ、SXT 表现出较高的耐药水平,其耐药率分别为 33%、64%、50%;而假单胞杆菌主要对 AMP、C、SXT 表现出较高的耐药水平,其耐药率分别为 90%、27%、51%。而对于 TE、CN 和 CIP 3 种抗生素,两种土著菌的耐药率都极低(<3%),甚至部分装置中没有分离到其耐药菌。

两种土著菌对 AMP、C、CAZ 的耐药则表现出明显的差异,在夏冬两季,假单胞菌对 AMP 的耐药率均显著高于葡萄球菌( $P < 0.05$ ),而对 CAZ 的耐药率则低于葡萄球菌( $P < 0.05$ )。对于 C,则是冬季葡萄球菌耐药率高于假单胞菌,而夏季结果相反,葡萄球菌耐药率低于假单胞菌( $P < 0.05$ )。

总体上,人工湿地中土著菌的耐药性夏季高于冬季。具体表现为:葡萄球菌的 AMP、TE、CAZ、SXT 耐药率夏季显著或极显著高于冬季( $P < 0.05$ ),假单胞菌 AMP 和 C 的耐药率夏季极显著高于冬季( $P < 0.01$ )。两种土著菌的多重耐药指数均表现出夏季显著或极显著高于冬季( $P < 0.05$ )。但葡萄球菌对 C 的耐药率相反,冬季极显著高于夏季( $P < 0.01$ )。

表 3 人工湿地夏冬季基质生物膜上土著菌的耐药水平<sup>1)</sup>

Table 3 Antibiotic-resistant level of bacteria isolated from biofilms on matrix of constructed wetlands in summer and winter

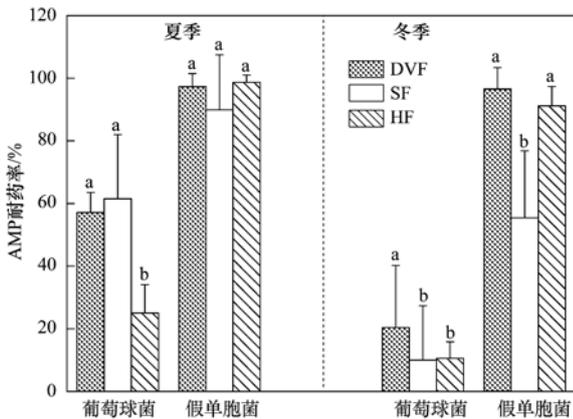
季节	采样点	2 种土著菌对 7 种抗生素的耐药率/%														MRI	
		AMP		TE		C		CN		CIP		CAZ		SXT			
		SA	PA	SA	PA	SA	PA	SA	PA	SA	PA	SA	PA	SA	PA		
夏季	CW1	62	92	0	4	4	45	6	17	0	0	92	0	72	63	0.34	0.32
	CW2	55	100	2	0	0	83	0	0	0	0	90	4	76	90	0.32	0.40
	CW3	55	100	2	5	0	75	5	5	2	5	90	5	72	73	0.32	0.38
	CW4	41	100	5	0	5	100	5	0	0	0	91	0	82	0	0.32	0.29
	CW5	62	100	5	0	0	88	5	0	0	0	14	0	10	8	0.14	0.28
	CW6	82	70	5	0	5	17	9	4	0	0	95	0	82	22	0.40	0.16
	CW7	23	96	14	4	9	63	0	0	0	4	68	0	59	63	0.25	0.33
	CW8	35	100	10	0	0	84	0	0	0	0	80	0	65	88	0.27	0.39
	CW9	17	100	0	0	0	24	4	0	0	0	70	0	61	24	0.22	0.21
	平均	50	96	4	2	2	65	4	4	0.3	1	80	1	66	55	0.29	0.32
冬季	CW1	3	98	0	8	35	2	0	0	0	0	43	0	49	52	0.19	0.23
	CW2	18	100	0	4	39	6	0	0	0	2	58	2	54	54	0.24	0.24
	CW3	40	92	0	10	10	9	0	2	3	0	77	7	30	81	0.23	0.29
	CW4	0	77	0	0	4	9	0	0	0	0	4	0	0	45	0.01	0.19
	CW5	30	35	0	0	15	0	0	4	0	4	50	0	50	12	0.21	0.08
	CW6	0	55	0	5	36	0	0	0	0	0	0	0	14	27	0.07	0.12
	CW7	5	96	5	0	9	0	5	0	0	0	59	4	59	89	0.20	0.27
	CW8	13	84	0	0	10	0	0	0	0	6	45	6	13	22	0.12	0.17
	CW9	14	93	0	4	0	7	0	0	0	4	29	4	5	21	0.07	0.19
	平均	15**	85**	0.4*	4	20**	4**	0.4	0.6	0.4	1	45**	3	34**	49	0.16**	0.21*

1) CW1~CW9:1~9 号模拟人工湿地基质生物膜;MRI:多重耐药性指数 SA:葡萄球菌属,PA:假单胞菌属;\*表示  $P < 0.05$ ,\*\*表示  $P < 0.01$ ,下同

2.2 不同构型人工湿地细菌对 7 种抗生素的耐药率分析

从表 3 中发现,两种土著菌对 AMP 和 SXT 均表现出较高的耐药水平,利用 LSD 多重比较分析人工湿地工艺和植被对其耐药率的影响(图 2、图 3),结果发现,工艺类型对细菌的 AMP 和 SXT 的耐药率有明显影响,而植物的影响不显著。

不同工艺对两种土著菌的 AMP 耐药率影响如图 2 所示,在夏季,葡萄球菌对 AMP 的耐药率在水平潜流显著低于下行垂直流和表面流( $P < 0.05$ ),而下行垂直流和表面流两种工艺之间差异不显著( $P > 0.05$ );在冬季,葡萄球菌对 AMP 的耐药率在下行垂直流显著高于表面流和水平潜流( $P < 0.05$ ),而表面流和水平潜流之间没有显著差异( $P > 0.05$ )。对于假单胞菌,在夏季,假单胞菌对 AMP 的耐药率表现为:下行垂直流 > 水平潜流 > 表面流,但差异不显著( $P > 0.05$ );在冬季,假单胞菌对 AMP 的耐药率表现为下行垂直流和水平潜流显著高于表面流( $P < 0.05$ )。



小写字母 a、b 代表差异显著,下同  
图 2 3 种工艺中对 AMP 耐药率的影响  
Fig. 2 Effect of three types of CW construction on AMP resistance rate

不同工艺对 SXT 的耐药率从图 3 可知,在夏冬两季,葡萄球菌对 SXT 的耐药率在不同工艺之间均表现为:下行垂直流 > 水平潜流 > 表面流,但差异不显著;假单胞菌对 SXT 的耐药率也表现出相同的趋势,但夏季表面流湿地中假单胞菌对 SXT 耐药率显著低于其他两种工艺( $P < 0.05$ )。

工艺类型对两种土著菌 MRI 指数的影响如图 4,夏季时葡萄球菌的 MRI 指数在下行垂直流最高,其次是表面流,水平潜流最低,不同工艺之间差异不显著;冬季时则表现为下行垂直流 > 水平潜流 > 表

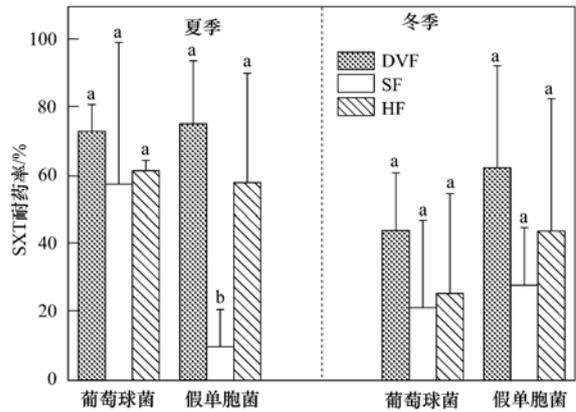


图 3 3 种工艺中对 SXT 耐药率的影响  
Fig. 3 Effect of three types of CW construction on SXT resistance rate

面流。而假单胞菌在夏冬两季皆表现为下行垂直流 > 水平潜流 > 表面流,冬季表面流显著低于下行流湿地( $P < 0.05$ )。

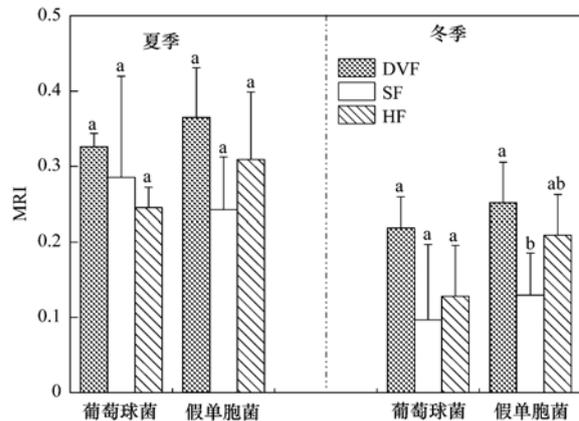


图 4 3 种工艺对 MRI 指数的影响  
Fig. 4 Effect of three types of CW construction on MRI index

2.3 细菌的多重耐药性分析

在检测到有耐药性的 410 株耐药葡萄球菌中,有 283 株表现出对 2 种或 2 种以上抗生素耐药;481 株耐药假单胞菌中,有 327 株表现出对 2 种或 2 种以上抗生素耐药,两种土著菌的多重耐药率达到 68% 以上,多重耐药情况如图 5 所示。

葡萄球菌在冬季主要表现为对 1 种、2 种和 3 种抗生素耐药,其比例分别为:46%、36% 和 18%,以对 1 种和 2 种抗生素耐药的菌株为主;而在夏季,对 3 种抗生素耐药的的比例上升到 40%,以对 2 种和 3 种抗生素耐药的菌株为主,并出现对 4 种抗生素耐药的菌株。对于假单胞菌,在冬季主要对 1 种(40%)和 2 种(54%)抗生素具有耐药性,少数对 3 种抗生素耐药(6%);在夏季则以对 3 种抗生素耐

药为主,其比例增加到 56%。

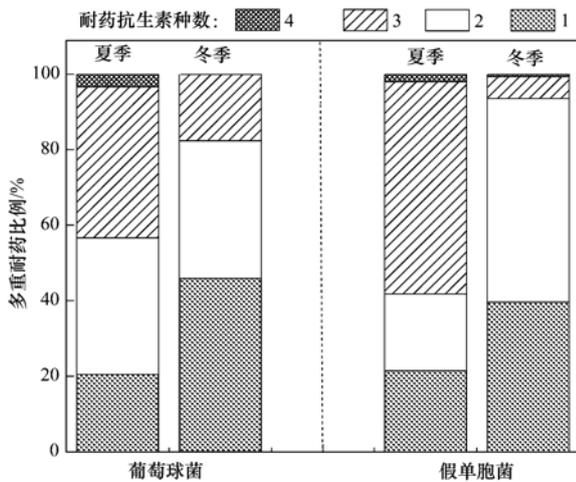


图 5 细菌多重耐药的组成

Fig. 5 Composition profile of multi-antibiotic resistance among resistant isolates

#### 2.4 *int1* 和 16S rRNA 荧光定量结果分析

根据荧光定量 PCR 检测结果可知:湿地基质中 *int1* 基因的绝对丰度范围为  $1.14 \times 10^5 \sim 5.66 \times 10^5$  copies  $\cdot$  g $^{-1}$ , 16S rRNA 基因的绝对丰度比 *int1* 约高两个数量级,为  $9.70 \times 10^6 \sim 3.91 \times 10^7$  copies  $\cdot$  g $^{-1}$ . *int1* 基因的相对丰度范围为 0.54% ~ 3.68%。

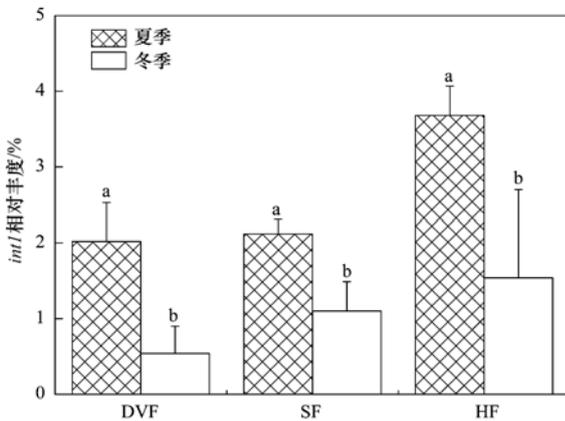


图 6 *int1* 的相对丰度

Fig. 6 Distribution of relative abundances of *int1* gene

*int1* 基因相对丰度在不同季节具有显著差异,夏季平均相对丰度为 2.61%,显著高于冬季的 1.06% ( $P < 0.05$ ),且 3 种不同工艺湿地均表现为夏季显著高于冬季 ( $P < 0.05$ ) (如图 6)。在不同工艺类型之间 *int1* 基因的相对丰度也具有明显差异,表现为水平潜流 > 表面流 > 下行垂直流,尤其在冬季水平潜流 (1.54%) 的 *int1* 基因相对丰度极显著高于表面流 (1.10%) 和下行垂直流 (0.54%) ( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

本文研究了人工湿地中葡萄球菌和假单胞菌的两种环境土著菌的耐药特征,发现两者耐药特征具有一定的差异,假单胞菌对 AMP 和 C 的耐药水平要远远高于革兰氏阳性的葡萄球菌,而对 CAZ 的耐药水平要远远低于葡萄球菌。其原因在于两种土著菌的细胞结构差异及抗生素的理化性质、作用机制的不同。假单胞菌为革兰氏阴性杆菌,而葡萄球菌为革兰氏阳性菌,两者细胞结构的差异以及抗生素的作用途径和机制的不同导致其耐药特征的差异。同时,人工湿地基质土著菌的耐药特征与已报道的肠道菌有明显的差别,对比杨芳等<sup>[18]</sup>、陆孙琴等<sup>[23]</sup>的研究结果发现,土著菌对 AMP、SXT 的耐药率与生活污水中的肠道细菌相当,均表现出较高的耐药水平;而对 TE、CIP、CN 耐药率要远远低于生活污水中的肠道细菌。分析其原因:AMP、SXT 使用历史较久、使用范围相当广泛,肠道菌的耐药水平普遍相当高,且本研究的人工湿地已经稳定运行 3 a,从而导致其环境土著菌对这两种抗生素有较高的耐药性;同时目前已有的研究发现环境中整合子基因盒中携带的耐药基因主要以磺胺类和氨基糖苷类抗生素的耐药基因为主<sup>[6,15]</sup>。此外,土著菌耐药性的获得与肠道菌的场所不同,人和动物体内抗生素的剂量水平 ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 要比环境中高几个数量级,土著菌在较低抗生素残留环境中获得耐药性的压力和概率要远远低于肠道菌,因此对某些抗生素的耐药率要远低于肠道菌。

本研究中,葡萄球菌的多重耐药率达到 69%,高于 Faria 等<sup>[24]</sup>研究的自来水处理厂和污水处理厂葡萄球菌的多重耐药率 (53% 和 34%);假单胞菌主要对 AMP、SXT 表现出较高的耐药水平,耐药率分别为 90% 和 51%,而对于 TE、CAZ、CN 和 CIP 的耐药率极低 ( $< 3\%$ )。Ighinosa 等<sup>[25]</sup>从污水和淡水环境分离出来的假单胞菌对 TE、CAZ 和 AMP 的平均耐药率分别为 47%、82% 和 92%;对 CIP 和 CN 则 100% 敏感,AMP、CIP、CN 的耐药情况与本研究的结果一致,而 TE、CAZ 的耐药远高于本研究。两种土著菌的总体耐药率约为 84%,低于污水处理厂活性污泥中细菌的耐药率<sup>[17]</sup>和养殖场细菌的耐药率<sup>[26]</sup>,与某些自然水体中细菌的耐药水平相当,Su 等<sup>[27]</sup>检测东江水体中大肠杆菌的耐药率达到 89%,南非德班的两条河流分离菌株的耐药率为 71% ~ 97%<sup>[28]</sup>。此外,本研究人工湿地基质土著菌

的多重耐药指数 MRI 范围为 0.01 ~ 0.40, 平均 0.22, 低于畜禽粪便细菌的 MRI 值 0.56<sup>[26]</sup>, 与自然河流水体的 0.19 大致相当<sup>[29]</sup>, 但高于该人工湿地进水中大肠杆菌的多重耐药指数 0.14<sup>[18]</sup>, 表明在人工湿地基质的土著菌长期暴露在一定浓度抗生素和耐药肠道菌的生活污水环境下获得了耐药性, Gao 等<sup>[30]</sup>通过系统发育分析发现水体中 *sul1* 可以从肠道菌转移到土著菌中. 有研究表明当菌株暴露在抗生素频繁使用的环境中 MRI > 0.2, 而在抗生素很少使用或从不使用的环境中 MRI < 0.2<sup>[31]</sup>, 因此研究中的人工湿地所暴露的环境中抗生素水平较高. 而人工湿地能够有效地去除生活污水中抗生素<sup>[32,33]</sup>, 基质生物膜上的微生物在降解抗生素的过程中, 逐渐适应环境而获得耐药性.

本研究中, 微生物的耐药性和 *int1* 的丰度在人工湿地中呈现出季节性的差异. 细菌的耐药率和 MRI 在夏季居高, 且多重耐药的方式也说明了夏季基质生物膜上土著菌的多重耐药性比冬季更加复杂. 夏季湿地中 *int1* 的丰度也显著高于冬季. 其原因在于夏季较高的温度下, 微生物繁殖快, 催化整合酶基因表达的酶类活性高, 从而促进耐药基因的转移和表达. Hardwick 等<sup>[34]</sup>研究发现整合酶的表达与环境因子有关, 还有研究指出在一定范围内温度的升高可明显提高整合子对耐药基因的重组效率<sup>[35]</sup>, 使耐药基因的交流传播更活跃, 从而导致耐药率的升高.

工艺类型对湿地基质土著菌的耐药和基质中 *int1* 基因丰度也有一定程度的影响. 细菌对抗生素的耐药率总体表现为下行垂直流最高, 这可能由于下行垂直流湿地通气性能良好, 具有一定的富氧能力<sup>[36]</sup>, 有利于基质生物膜上好氧土著菌的生长, 从而使得下行垂直流湿地中细菌的耐药率较高, 这与杨芳等<sup>[18]</sup>的研究结论相似. 而 *int1* 基因丰度在水平潜流湿地中最高, 其原因在于水平潜流湿地的水流速度较慢, 具有相对稳定的生物膜环境<sup>[14]</sup>, 使得其中基因的整合与交流更容易发生, 有利于 *int1* 基因的表达. 有研究表明整合酶的表达跟所处环境有关, 杨维青指出铜绿假单胞菌在生物膜状态的 *int1* 表达量远远高于游离状态<sup>[37]</sup>.

平均每个细菌的染色体中携带 4 个 16S rRNA 基因拷贝<sup>[38-40]</sup>, 每个样本中细菌携带 *int1* 基因的比率约为 *int1* 相对丰度的 4 倍<sup>[34]</sup>, 本研究通过 *int1* 的相对丰度对人工湿地基质生物膜上的细菌 *int1* 携带率进行了有效的估计, 结果发现全部样品中平均约

有 7.3% 的细菌携带 *int1*, 且夏冬两季有 6 个样品的细菌 *int1* 携带率超过了 10%. 已有的研究揭示环境中 *int1* 的携带率约为 1% ~ 5%<sup>[15,41,42]</sup>, 例如, 悉尼河流沉积物样本中细菌 *int1* 携带率为 2.65%<sup>[34]</sup>, 珠江口典型水产养殖区中, 水体中的 *int1* 携带率为 0.22% ~ 19.28%, 沉积物中为 0.48% ~ 1.60%<sup>[43]</sup>, 本研究中人工湿地的基质土著菌的 *int1* 携带率在 2.16% ~ 14.72% 范围内, 高于河流等自然水体, 与养殖环境中细菌的 *int1* 携带率相当. *int1* 的存在导致 ARGs 的捕获和整合, 并在微生物之间转移, 导致微生物产生耐药性和多重耐药性, 有研究表明 *int1* 在环境中是介导 ARGs 水平传播的重要因素之一<sup>[44-46]</sup>. 本研究中的人工湿地基质微生物具有较高 *int1* 携带率, 耐药基因传播的污染风险较大.

#### 4 结 论

(1) 人工湿地基质中土著菌存在一定程度的耐药性, 其耐药率、MRI 处于较高的水平, 与环境中肠道菌相当, 但其耐药特征与肠道菌有一定的差异. 人工湿地基质的土著菌长期暴露在一定浓度抗生素和耐药肠道菌的生活污水环境下获得了耐药性.

(2) 季节差异对湿地中土著细菌耐药和整合基因 *int1* 分布均有较大影响, 夏季细菌的耐药率、MRI 值及 *int1* 丰度显著高于冬季.

(3) 细菌耐药和整合基因 *int1* 分布受湿地工艺的影响也不可忽视, 耐药率和 MRI 值在下行垂直流湿地中最高, 而 *int1* 相对丰度则在水平潜流湿地中最高.

#### 参 考 文 献:

- [1] Yang S, Carlson K. Evolution of antibiotic occurrence in a river through pristine, urban and agricultural landscapes [J]. *Water Research*, 2003, **37**(19): 4645-4656.
- [2] 徐维海, 张干, 邹世春, 等. 香港维多利亚港和珠江广州河段水体中抗生素的含量特征及其季节变化[J]. *环境科学*, 2006, **27**(12): 2458-2462.
- [3] 胡献刚, 罗义, 周启星, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定畜牧粪便中 13 种抗生素药物残留[J]. *分析化学*, 2008, **36**(9): 1162-1166.
- [4] Schwartz T, Kohnen W, Jansen B, et al. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, **43**(3): 325-335.
- [5] Baquero F, Martínez J L, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, **19**(3): 260-265.
- [6] 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.
- [7] Luo Y, Xu L, Rysz M, *et al.* Occurrence and transport of tetracycline, sulfonamide, quinolone, and macrolide antibiotics in the Haihe River Basin, China [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, **45**(5): 1827-1833.
- [8] Kemper N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment [J]. *Ecological Indicators*, 2008, **8**(1): 1-13.
- [9] 杨新萍, 周立祥, 戴媛媛, 等. 潜流人工湿地处理微污染河道水中有机物和氮的净化效率及沿程变化[J]. *环境科学*, 2008, **29**(8): 2177-2182.
- [10] 项学敏, 杨洪涛, 周集体, 等. 人工湿地对城市生活污水的深度净化效果研究: 冬季和夏季对比[J]. *环境科学*, 2009, **30**(3): 713-719.
- [11] Vymazal J. The use constructed wetlands with horizontal subsurface flow for various types of wastewater [J]. *Ecological Engineering*, 2009, **35**(1): 1-17.
- [12] Jia H F, Sun Z X, Li G H. A four-stage constructed wetland system for treating polluted water from an urban river [J]. *Ecological Engineering*, 2014, **71**: 48-55.
- [13] Sidrach-Cardona R, Bécares E. Fecal indicator bacteria resistance to antibiotics in experimental constructed wetlands [J]. *Ecological Engineering*, 2013, **50**: 107-111.
- [14] Nölvak H, Truu M, Tiirik K, *et al.* Dynamics of antibiotic resistance genes and their relationships with system treatment efficiency in a horizontal subsurface flow constructed wetland [J]. *Science of the Total Environment*, 2013, **461-462**(7): 636-644.
- [15] Rosser S J, Young H K. Identification and characterization of class I integrons in bacteria from an aquatic environment [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1999, **44**(1): 11-18.
- [16] Ash R J, Mauck B, Morgan M. Antibiotic resistance of gram-negative bacteria in rivers, United States [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2002, **8**(7): 713-716.
- [17] 葛峰, 郭坤, 周广灿, 等. 南京市 4 个污水处理厂的活性污泥中细菌的分离鉴定和抗生素耐药性分析[J]. *环境科学*, 2012, **33**(5): 1646-1651.
- [18] 杨芳, 陶然, 杨扬, 等. 人工湿地中抗生素抗性大肠杆菌和抗性基因的去 除与分布[J]. *环境工程学报*, 2013, **7**(6): 2057-2062.
- [19] Helt C D, Weber K P, Legge R L, *et al.* Antibiotic resistance profiles of representative wetland bacteria and faecal indicators following ciprofloxacin exposure in lab-scale constructed mesocosms [J]. *Ecological Engineering*, 2012, **39**: 113-122.
- [20] Mohanta T, Goel S. Prevalence of antibiotic-resistant bacteria in three different aquatic environments over three seasons [J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2014, **186**(8): 5089-5100.
- [21] Xu H X, Su Z L, Wang S J, *et al.* Four novel resistance integron gene-cassette occurrences in bacterial isolates from Zhenjiang, China [J]. *Current Microbiology*, 2009, **59**(2): 113-117.
- [22] Jung J, Yeom J, Han J, *et al.* Seasonal changes in nitrogen-cycle gene abundances and in bacterial communities in acidic forest soils [J]. *Journal of Microbiology*, 2012, **50**(3): 365-373.
- [23] 陆孙琴, 李轶, 黄晶晶, 等. 污水处理厂二级出水中总异养菌群对 6 种抗生素的耐受性研究[J]. *环境科学*, 2011, **32**(11): 3419-3424.
- [24] Faria C, Vaz-Moreira I, Serapicos E, *et al.* Antibiotic resistance in coagulase negative staphylococci isolated from wastewater and drinking water[J]. *Science of the Total Environment*, 2009, **407**(12): 3876-3882.
- [25] Igbinsola I H, Nwodo U U, Sosa A, *et al.* Commensal pseudomonas species isolated from wastewater and freshwater milieus in the Eastern Cape Province, South Africa, as reservoir of antibiotic resistant determinants[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2012, **9**(7): 2537-2549.
- [26] Su H C, Ying G G, Tao R, *et al.* Occurrence of antibiotic resistance and characterization of resistance genes and integrons in *Enterobacteriaceae* isolated from integrated fish farms in South China [J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2011, **13**(11): 3229-3236.
- [27] Su H C, Ying G G, Tao R, *et al.* Class 1 and 2 integrons, sul resistance genes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from Dongjiang River, South China [J]. *Environmental Pollution*, 2012, **169**: 42-49.
- [28] Olaniran A O, Naicker K, Pillay B. Antibiotic resistance profiles of *Escherichia coli* isolates from river sources in Durban, South Africa [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, **25**(10): 1743-1749.
- [29] Tao R, Ying G G, Su H C, *et al.* Detection of antibiotic resistance and tetracycline resistance genes in *Enterobacteriaceae* isolated from the Pearl rivers in South China [J]. *Environmental Pollution*, 2010, **158**(6): 2101-2109.
- [30] Gao P P, Mao D Q, Luo Y, *et al.* Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment [J]. *Water Research*, 2012, **46**(7): 2355-2364.
- [31] Krumpferman P H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods [J]. *Applied and Environmental Microbiology*. 1983, **46**(1): 165-170.
- [32] Dan A, Yang Y, Dai Y N, *et al.* Removal and factors influencing removal of sulfonamides and trimethoprim from domestic sewage in constructed wetlands [J]. *Bioresource Technology*, 2013, **146**: 363-370.
- [33] 李丽, 杨扬, 陶然, 等. 垂直流-水平潜流组合湿地对磺胺类抗生素的去除[J]. *安全与环境学报*, 2014, **14**(3): 233-239.
- [34] Hardwick S A, Stokes H W, Findlay S, *et al.* Quantification of class I integron abundance in natural environments using real-time quantitative PCR [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, **278**(2): 207-212.

- [35] 胡敏. 外界环境因素对细菌整合子捕获耐药性基因盒调控机制的研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2014.
- [36] Cooper P, Green B. Reed bed treatment systems for sewage treatment in the United Kingdom — The first 10 years' experience [J]. *Water Science and Technology*, 1995, **32**(3): 317-327.
- [37] 杨维青, 石磊, 谢轶, 等. 定量分析铜绿假单胞菌第一类整合酶基因的表达[J]. *中国抗生素杂志*, 2006, **31**(3): 149-153.
- [38] Fogel G B, Collins C R, Li J, *et al.* Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number; estimation of microbial relative abundance from a mixed population [J]. *Microbial Ecology*, 1999, **38**(2): 93-113.
- [39] Klappenbach J A, Saxman P R, Cole J R, *et al.* rrndb: the ribosomal RNA operon copy number database [J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, **29**(1): 181-184.
- [40] Case R J, Boucher Y, Dahllöf I, *et al.* Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, **73**(1): 278-288.
- [41] Gaze W H, Abdoulsam N, Hawkey P M, *et al.* Incidence of class I integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, **49**(5): 1802-1807.
- [42] Stokes H W, Nesbø C L, Holley M, *et al.* Class I integrons potentially predating the association with Tn402-like transposition genes are present in a sediment microbial community [J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, **188**(16): 5722-5730.
- [43] 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.
- [44] Hall R M, Collis C M. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons [J]. *Drug Resistance Updates*, 1998, **1**(2): 109-119.
- [45] Rowe-Magnus D A, Guerout A -M, Mazel D. Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes [J]. *Molecular Microbiology*, 2002, **43**(6): 1657-1669.
- [46] Xu Z B, Li L, Shirliff M E, *et al.* Occurrence and characteristics of class I and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in southern China [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, **47**(1): 230-234.

## CONTENTS

Pollution of Halogenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Atmospheric Particulate Matters of Shenzhen .....	SUN Jian-lin, CHANG Wen-jing, CHEN Zheng-xia, <i>et al.</i> (1513)
Emission Characteristics of VOCs from Typical Restaurants in Beijing .....	CUI Tong, CHENG Jing-chen, HE Wan-qing, <i>et al.</i> (1523)
Characteristics Analysis of Sulfur Dioxide in Pearl River Delta from 2006 to 2010 .....	LI Fei, TAN Hao-bo, DENG Xue-jiao, <i>et al.</i> (1530)
Comparison Test Between PM <sub>2.5</sub> Continuous Monitoring System and Manual Sampling Analysis for PM <sub>2.5</sub> in Ambient Air .....	WANG Qiang, ZHONG Qi, CHI Ying, <i>et al.</i> (1538)
Determination and Emission of Condensable Particulate Matter from Coal-fired Power Plants .....	PEI Bing (1544)
Potential Carbon Fixation Capability of Non-photosynthetic Microbial Community at Different Depth of the South China Sea and Its Response to Different Electron Donors .....	FANG Feng, WANG Lei, XI Xue-fei, <i>et al.</i> (1550)
Remote Sensing Estimation of Chlorophyll-a Concentration in Inland Lakes Based on GOCI Image and Optical Classification of Water Body .....	FENG Chi, JIN Qi, WANG Yan-nan, <i>et al.</i> (1557)
Hydrochemical Characteristics and Sources of Qingshuijiang River Basin at Wet Season in Guizhou Province .....	LÜ Jie-mei, AN Yan-ling, WU Qi-xin, <i>et al.</i> (1565)
Temporal-spatial Variation and Source Identification of Hydro-chemical Characteristics in Shima River Catchment, Dongguan City .....	GAO Lei, CHEN Jian-yao, WANG Jiang, <i>et al.</i> (1573)
Response and Control Factors of Groundwater to Extreme Weather, Jiguan Cave, Henan Province, China .....	LIU Xiao, YANG Yan, PENG Tao, <i>et al.</i> (1582)
Impact of Rocky Desertification Treatment on Underground Water Chemistry and Dissolved Inorganic Carbon Isotope in Karst Areas .....	XIAO Shi-zhen, XIONG Kang-ning, LAN Jia-cheng, <i>et al.</i> (1590)
Difference of Karst Carbon Sink Under Different Land Use and Land Cover Areas in Dry Season .....	ZHAO Rui-yi, LIANG Zuo-bing, WANG Zun-bo, <i>et al.</i> (1598)
Vertical Migration Characteristics of Organochlorine Pesticides in Overlying Soil in Karst Terranes and Its Impact on Groundwater .....	SUN Yu-chuan, WANG Yong-qi, LIANG Zuo-bing, <i>et al.</i> (1605)
Pollution Status and Migration of Mercury in the Sediments of Nansi Lake in Shandong Province .....	CAO Fei-fei, YANG Li-yuan, PANG Xu-gui, <i>et al.</i> (1615)
Response of Sediment Micro Environment and Micro Interface to Physical Disturbance Intensity Under the Disturbance of <i>Chironomus plumosus</i> .....	SHI Xiao-dan, LI Yong, LI Da-peng, <i>et al.</i> (1622)
Characteristics of Atmospheric Nitrogen Wet Deposition and Associated Impact on N Transport in the Watershed of Red Soil Area in Southern China .....	HAO Zhuo, GAO Yang, ZHANG Jin-zhong, <i>et al.</i> (1630)
Effect of Different Purple Parent Rock on Removal Rates of Nitrogen, Phosphorus and Organics in Landscape Water .....	HUANG Xue-jiao, LIU Xiao-chen, LI Zhen-lun, <i>et al.</i> (1639)
Effects of <i>Litchi chinensis</i> Defoliation on Growth and Photosynthesis of <i>Microcystis aeruginosa</i> .....	WANG Xiao-xiong, JIANG Chen-chun, LI Jin-wei, <i>et al.</i> (1648)
Toxicity of <i>Coptis chinensis</i> Rhizome Extracts to Green Algae .....	CHEN Ya-nan, YUAN Ling (1655)
Formation Mechanism of the Disinfection By-product 1,1-Dichloroacetone in Drinking Water .....	DING Chun-sheng, MENG Zhuang, XU Yang-yang, <i>et al.</i> (1662)
Degradation Kinetics and Formation of Disinfection By-products During Linuron Chlorination in Drinking Water .....	LING Xiao, HU Chen-yan, CHENG Ming, <i>et al.</i> (1668)
Interference for Various Quench Agents of Chemical Disinfectants on Detection of Endotoxin Activities in Water .....	ZHANG Can, LIU Wen-jun, SHI Yun, <i>et al.</i> (1674)
Ammonium Adsorption Characteristics in Aqueous Solution by Dairy Manure Biochar .....	MA Feng-feng, ZHAO Bao-wei, DIAO Jing-ru, <i>et al.</i> (1678)
Absorption of Uranium with Tea Oil Tree Sawdust Modified by Succinic Acid .....	ZHANG Xiao-feng, CHEN Di-yun, PENG Yan, <i>et al.</i> (1686)
Effect of Membrane Wettability on Membrane Fouling and Chemical Durability of SPG Membranes .....	ZHANG Jing, XIAO Tai-min, ZHANG Jing, <i>et al.</i> (1694)
TiO <sub>2</sub> -Induced Photodegradation of Levofloxacin by Visible Light and Its Mechanism .....	GUO Hong-sheng, LIU Ya-nan, QIAO Qi, <i>et al.</i> (1700)
Performance of Novel Macromolecule Flocculant in the Treatment of Wastewater Containing Cr(VI) Ions .....	WANG Gang, DU Feng-ling, CHANG Qing, <i>et al.</i> (1707)
On-line Estimation for the Amount of Stored PHA in Activated Sludge Based on OUR-HPR Measurements .....	ZENG Shan-wen, WANG Ze-yu, GAO Jing, <i>et al.</i> (1713)
Formation Mechanism of Self-forming Dynamic Membrane During Separation of High-concentration Sewage Sludge Fermented for Acid Production .....	HUANG Shuai, LIU Hong-bo, YIN Bo, <i>et al.</i> (1720)
Influence of Air Flux on Municipal Sludge Biodrying in a Pilot Scale Test .....	ZHANG Yu, HAN Rong, LU Wen-jing, <i>et al.</i> (1727)
Extraction of Heavy Metals from Sludge Using Biodegradable Chelating Agent <i>N,N</i> -bis(carboxymethyl) Glutamic Acid Tetrasodium .....	WU Qing, CUI Yan-ru, TANG Xiao-xiao, <i>et al.</i> (1733)
Biodiversity and Function Analyses of BIOLAK Activated Sludge Metagenome .....	TIAN Mei, LIU Han-lu, SHEN Xin, <i>et al.</i> (1739)
Characteristics of Nitrogen Removal by a Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Bacterium YL .....	LIANG Xian, REN Yong-xiang, YANG Lei, <i>et al.</i> (1749)
Biodegradation Characteristics and Kinetics of <i>p</i> -nitrophenol by Strain <i>Arthrobacter</i> sp. CN2 .....	REN Lei, SHI Yan-hua, JIA Yang, <i>et al.</i> (1757)
Biodegradation of Pyrene by Intact Cells and Spores of <i>Brevibacillus brevis</i> .....	LIU Zhi-chen, YE Jin-shao, PENG Hui, <i>et al.</i> (1763)
Investigation of Antibiotic Resistance Genes (ARGs) in Landfill .....	LI Lei, XU Jing, ZHAO You-cai, <i>et al.</i> (1769)
Investigation of Antibiotic Resistance of Indigenous Bacteria and Abundance of Class I Integron in Matrix of Constructed Wetlands of Different Configurations .....	MAI Xiao-bei, TAO Ran, YANG Yang, <i>et al.</i> (1776)
Effects of Nitrate and CH <sub>4</sub> on Anaerobic Oxidation of BETX in Landfill Cover Soils .....	LIU Rong, LONG Yan, WANG Li-li, <i>et al.</i> (1785)
Spatial Heterogeneity of Soil Respiration in a Planted Larch Forest in Shanxi Plateau .....	YAN Jun-xia, LI Hong-jian, LI Jun-jian, <i>et al.</i> (1793)
Effects of Nitrogen Fertilization on Soil Respiration and Temperature Sensitivity in Spring Maize Field in Semi-Arid Regions on Loess Plateau .....	JIANG Ji-shao, GUO Sheng-li, WANG Rui, <i>et al.</i> (1802)
Distribution Characteristics of Heavy Metals in the Street Dusts in Xuanwei and Their Health Risk Assessment .....	ZHANG Wen-chao, LÜ Sen-lin, LIU Ding-yu, <i>et al.</i> (1810)
Spatial Distribution of Magnetic Properties of Street Dust in Baoji City and Its Implications of Environment .....	ZHANG Jun-hui, WANG Jin, ZHANG Jian, <i>et al.</i> (1818)
Effect of Long-term Fertilizer Application on the Stability of Organic Carbon in Particle Size Fractions of a Paddy Soil in Zhejiang Province, China .....	MAO Xia-li, LU Kou-ping, SUN Tao, <i>et al.</i> (1827)
Effects of Different Reclaimed Scenarios on Soil Microbe and Enzyme Activities in Mining Areas .....	LI Jun-jian, LIU Feng, ZHOU Xiao-mei (1836)
Soil Microorganism Characteristics and Soil Nutrients of Different Wetlands in Sanjinag Plain, Northeast China .....	XIAO Ye, HUANG Zhi-gang, WU Hai-tao, <i>et al.</i> (1842)
Strengthening Effects of Sodium Salts on Washing Kerosene Contaminated Soil with Surfactants .....	HUANG Zhao-lu, CHEN Quan-yuan, ZHOU Juan, <i>et al.</i> (1849)
Effects and Biological Response on Bioremediation of Petroleum Contaminated Soil .....	YANG Qian, WU Man-li, NIE Mai-qian, <i>et al.</i> (1856)
Enhanced Phytoextraction of Heavy Metals from Contaminated Soils Using <i>Sedum alfredii</i> Hance with Biodegradable Chelate GLDA .....	WEI Ze-bin, CHEN Xiao-hong, WU Qi-tang, <i>et al.</i> (1864)
Speciation Characteristics and Bioavailability of Heavy Metals in Oasis Soil Under Pb, Zn Combined Stress .....	JIN Cheng, ZHAO Zhuan-jun, NAN Zhong-ren, <i>et al.</i> (1870)
Influence of Sulfur on the Formation of Fe-Mn Plaque on Root and Uptake of Cd by Rice ( <i>Oryza sativa</i> L.) .....	WANG Dan, LI Xin, WANG Dai-chang, <i>et al.</i> (1877)
Effects of Ozone on Photosynthesis of Several Plants .....	LI Miao-miao (1888)
A Method Research on Environmental Damage Assessment of a Truck Rollover Pollution Incident .....	CAI Feng, ZHAO Shi-bo, CHEN Gang-cai, <i>et al.</i> (1902)

# 《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 刘 毅 汤鸿霄 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)

2015年5月15日 第36卷 第5期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 36 No. 5 May 15, 2015

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: 120.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发行