

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第37卷 第5期

Vol.37 No.5

2016

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

2015年12月北京市空气重污染过程分析及污染源排放变化	薛亦峰,周震,聂滕,潘涛,齐璐,聂磊,王占山,李云婷,李雪峰,田贺忠(1593)
北京 APEC 期间大气颗粒物中类腐殖酸的污染特征及来源	周雪明,仝雪娇,项萍,谭吉华,段菁春,何晓明,贺克斌,马永亮(1602)
利用 SPAMS 分析北京市硫酸盐、硝酸盐和铵盐季节变化特征及潜在源区分布	刘浪,张文杰,杜世勇,侯鲁健,韩斌,杨文,陈敏东,白志鹏(1609)
兰州城区大气 $PM_{2.5}$ 污染特征及来源解析	王新,聂燕,陈红,王博,黄韬,夏敦胜(1619)
成都市西南郊区春季大气 $PM_{2.5}$ 的污染水平及来源解析	林瑜,叶芝祥,杨怀金,张菊,殷蔚雯,李晓芬(1629)
中亚热带背景区重庆四面山大气气态总汞含量变化特征	刘伟明,马明,王定勇,孙涛,魏世强(1639)
固定源排放污染物健康风险评价方法的建立	陈强,吴焕波(1646)
北京市典型燃烧源颗粒物排放水平与特征测试	胡月琪,郭晓东,王琛,梁云平,马召辉(1653)
南京公园降尘中重金属污染水平及风险评价	王呈,钱新,李慧明,孙一轩,王金花(1662)
CoCuMnO ₂ 光催化氧化多组分 VOCs 特性及其动力学	孟海龙,卜龙利,刘嘉栋,高波,冯奇奇,谭娜,谢帅(1670)
大辽河感潮河段及近岸河口氮、磷的分布及潜在性富营养化	张雷,曹伟,马迎群,韩超南,秦延文,赵艳民,刘志超,杨晨晨(1677)
典型温冰川区湖泊的稳定同位素空间分布特征	史晓宜,蒲焘,何元庆,陆浩,牛贺文,夏敦胜(1685)
利用 $\delta^{15}N-NO_3^-$ 和 $\delta^{18}O-NO_3^-$ 示踪北京城区河流硝酸盐来源	赵庆良,马慧雅,任玉芬,王效科,彭剑锋,贺成武,武俊良,刘梦贞,闫苗苗(1692)
柳江盆地浅层地下水硝酸盐分布特征及影响因素分析	王贺,谷洪彪,迟宝明,李海君,姜海宁(1699)
三峡库区小流域不同土地利用类型对氮素流失影响	陈成龙,高明,倪九派,谢德体,邓华(1707)
亚热带农区生态沟渠对农业径流中氮素迁移拦截效应研究	王迪,李红芳,刘锋,王毅,钟元春,何洋,肖润林,吴金水(1717)
平原河网典型污染物生物降解系数的研究	冯帅,李叙勇,邓建才(1724)
沉水植物对沉积物微生物群落结构影响:以洪泽湖湿地为例	张丁予,章婷曦,董丹萍,李德芳,王国祥(1734)
苏南水库硅藻群落结构特征及其控制因素	任杰,周涛,朱广伟,金颖薇,崔扬,许海,朱梦圆,夏明芳,陈伟民(1742)
河北衡水湖湿地汞污染现状及生态风险评价	王乃姗,张曼胤,崔丽娟,马牧源,颜亮,穆泳林,秦鹏(1754)
顺德水道土壤及沉积物中重金属分布及潜在生态风险评价	蔡怡敏,陈卫平,彭驰,王铁宇,肖荣波(1763)
台州电子垃圾拆解区水和沉积物中多溴联苯醚污染特征与生态风险	陈香平,彭宝琦,吕素平,陈强,张勇,黄长江,董巧香(1771)
乌江中上游段河水主要离子化学特征及控制因素	黄奇波,覃小群,刘朋雨,蓝芳宁,张连凯,苏春田(1779)
岩溶流域地下水 TOC 输出及影响因素分析:以重庆丰都雪玉洞地下河流域为例	王巧莲,蒋勇军,陈宇(1788)
广东英德宝晶宫洞穴滴水元素季节变化与影响因素	黄嘉仪,陈琳,陈琼,刘淑华,杨亮,童晓宁,贺海波,米小建,邓肖敏,彭小桃,李汉杰,杨琰,周厚云(1798)
基于 PCR-DGGE 和拟杆菌(<i>Bacteroides</i>) 16S rRNA 的岩溶地下水粪便污染源示踪研究:以重庆南山老龙洞地下河系统为例	张弘,蒋勇军,张远瞩,段逸凡,吕现福,贺秋芳(1805)
典型岩溶区地下河中溶解态脂类生物标志物来源解析及其变化特征	梁作兵,孙玉川,李建鸿,王尊波,谢正兰,张媚,廖昱,江泽利(1814)
钴活化过一硫酸盐氧化过程中卤代副产物的生成	刘阔,金浩,董为,季跃飞,陆隽鹤(1823)
天冬氨酸在氯化过程中生成消毒副产物二氯乙腈的研究	丁春生,李乃军,张涛,章梦青(1831)
臭氧氧化饮用水过程中可同化有机碳生成的影响因素	董秉直,张佳丽,何畅(1837)
污水管网典型混流制区域水量水质波动特征解析	程珣,张明凯,刘艳臣,施汉昌(1845)
HDTMA 改性沸石的制备及吸附废水中对硝基苯酚的性能和动力学	郭俊元,王彬(1852)
放射性废水处理中吸附铀的优势藻种筛选	李鑫,胡洪营,余骏一,赵文玉(1858)
微米 Fe ₃ O ₄ 磁粉调理-压力电场污泥脱水工艺过程研究	钱旭,王毅力,赵丽(1864)
间歇曝气 SBR 处理养猪沼液的短程脱氮性能	宋小燕,刘锐,税勇,川岸朋树,占新民,陈吕军(1873)
不同灌溉方式对华北平原冬小麦田土壤 CO ₂ 和 N ₂ O 排放通量的影响	郭树芳,齐玉春,尹飞虎,彭琴,董云社,贺云龙,闫钟清(1880)
卫河新乡市区段春季溶解 CH ₄ 与 N ₂ O 浓度特征	侯翠翠,张芳,李英臣,王奇博,刘赛(1891)
模拟氮沉降对内蒙古克氏针茅草原 N ₂ O 排放的影响	杨涵越,张婷,黄永梅,段雷(1900)
土壤呼吸与土壤有机碳对不同秸秆还田的响应及其机制	曹湛波,王磊,李凡,付小花,乐毅全,吴纪华,陆兵,徐殿胜(1908)
黑土丘陵区小流域土壤有机质空间变异及分布格局	高凤杰,马泉来,韩文文,单培明,周军,张少良,张志民,王宏燕(1915)
耕作方式对紫色水稻土团聚体中有机质及重金属的分布特征影响	史琼彬,赵秀兰,常同举,卢吉文(1923)
北京东南郊典型地层重金属分布特征与潜在生态风险	赵倩,马琳,刘翼飞,何江涛,李广贺(1931)
准东煤田露天矿区土壤重金属污染现状评价及来源分析	刘巍,杨建军,汪君,王果,曹月娥(1938)
纳米 TiO ₂ 对土壤重金属释放及形态变化的影响	张金洋,王定勇,梁丽,李楚娟,张成,周雄,刘娟(1946)
纳米零价铁铜双金属对铬污染土壤中 Cr(VI) 的还原动力学	马少云,祝方,商执峰(1953)
低分子有机酸对硫杆菌活性的抑制作用及对土壤重金属脱除的影响	宋永伟,王鹤茹,曹艳晓,李飞,崔春红,周立祥(1960)
粒径和包裹物对纳米银在海洋微藻中的毒性影响	黄俊,衣俊,强丽媛,程金平(1968)
萱草修复石油烃污染土壤的根际机制和根系代谢组学分析	王亚男,程立娟,周启星(1978)
高温堆肥过程对猪粪来源抗生素抗性基因的影响	郑宁国,黄南,王卫卫,喻曼,陈晓旻,姚燕来,王卫平,洪春来(1986)
磺胺抗性消长与堆肥进程交互特征	林辉,汪建妹,孙万春,符建荣,陈红金,马军伟(1993)
《环境科学》征订启事(1830) 《环境科学》征稿简则(1977) 信息(1698,1851,1992)	

磺胺抗性消长与堆肥进程的交互特征

林辉¹, 汪建妹², 孙万春¹, 符建荣¹, 陈红金³, 马军伟^{1*}

(1. 浙江省农业科学院环境资源与土壤肥料研究所, 杭州 310021; 2. 浙江省农业科学院质量标准研究所, 杭州 310021; 3. 浙江省种植业管理局, 杭州 310020)

摘要: 基于添加和不添加磺胺药[m (磺胺二甲嘧啶 SM2): m (磺胺-6-甲氧嘧啶 SMM) = 1:1]的好氧堆肥试验, 分析堆肥过程中鸡粪理化性质、微生物群落代谢特征、磺胺抗生素以及 5 种抗性基因变化, 探明磺胺抗性消长与堆肥过程的交互特征。结果表明, 磺胺药添加抑制了堆肥基础呼吸, 延长了堆体达到高温的时间, 减缓了养分转化速度, 显著影响堆肥中期微生物群落结构特征。鸡粪中 SMM 和 SM2 在堆肥 14 d 内即可完全降解, 且 SMM 降解速率高于 SM2。随堆肥进行, *sul1* 和 *sul2* 呈先下降后轻微回升的趋势, 磺胺药添加对 *sul1* 和 *Int1* 丰度无明显提高作用, 但可促进 *sul2* 扩散。堆肥过程中, *tetQ* 和 *tetW* 变化与磺胺抗性基因不同, 但磺胺药添加亦增加 *tetQ* 和 *tetW* 相对丰度。冗余分析结果显示, 温度与 *sul1*、*sul2* 和 *Int1* 明显负相关, 与 *tetQ* 和 *tetW* 无明显相关性; 5 种抗性基因相对丰度均与碳氮比和硝态氮含量负相关, 与 pH、含水率和铵态氮含量正相关。

关键词: 磺胺抗生素; 抗性基因; 粪便堆肥; HPLC-MS/MS; 荧光定量 PCR

中图分类号: X171.5; X713 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2016)05-1993-10 DOI: 10.13227/j.hjxx.2016.05.050

Interaction Between Sulfonamide Antibiotics Fates and Chicken Manure Composting

LIN Hui¹, WANG Jian-mei², SUN Wan-chun¹, FU Jian-rong¹, CHEN Hong-jin³, MA Jun-wei^{1*}

(1. Institute of Environment, Resources, Soil and Fertilizers, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; 2. Institute of Quality and Standard for Agro-products, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; 3. Plant Management Bureau of Zhejiang Province, Hangzhou 310020, China)

Abstract: Based on aerobic manure composting with or without the addition of a mixture of sulfadimethoxine SM2 and sulfamonomethoxine SMM (1:1, m/m), changes in the physico-chemical properties of manure compost, the microbial community physiological profiles, the antibiotics concentration and the abundances of five antibiotic resistance genes (ARGs) during the composting were tracked. The results indicated that the introduction of sulfonamide antibiotics led to inhibition on the basal respiration of manure compost during the early composting period, delayed the formation of thermophilic temperature and reduced the conversion of nutrients such as organic matter, ammonia nitrogen and nitrate nitrogen. Meanwhile, the introduction of sulfonamide antibiotics dramatically affected the physiological profile of microbial community in manure in the middle stage of composting. HPLC-MS/MS results showed that both SMM and SM2 in manure were completely degraded within 14 days, while the degradation rate of SMM was faster than that of SM2. For both composting treatments with or without addition of exogenous antibiotics, the relative abundance of *sul1* and *sul2* showed an initial decline in the first 14 or 21 days and a slight increase thereafter. The addition of exogenous antibiotics showed insignificant enhancement on increasing the relative abundance of *sul1* and *Int1* in manure, but resulted in an apparent increase in *sul2* relative abundance. Although the fates of *tetQ* and *tetW* during composting were different from that of sulfonamide ARGs, the introduction of sulfonamide antibiotics into manure increased the relative abundance of tetracycline ARGs. Redundancy analysis indicated that composting temperature correlated negatively with *sul1*, *sul2* and *Int1* relative abundance in manure but had no obvious relationship with *tetQ* and *tetW* relative abundance. All the ARGs detected in this work correlated negatively with C/N ratio and the nitrate nitrogen concentration of manure compost but positively correlated with pH, moisture and ammonia nitrogen concentration of manure compost.

Key words: sulfonamide antibiotics; antibiotic resistance gene; manure composting; HPLC-MS/MS; real-time PCR

磺胺类抗生素是最早得到应用的抗生素之一。尽管目前有效的抗生素很多, 但磺胺类药在控制各种细菌性感染的疾病中仍有其重要价值, 依旧是目前人类和动物最常用的抗生素。据统计, 磺胺类药是全球销售总量最大的兽用抗生素之一, 年销售量仅次于四环素^[1,2]。然而, 动物体对抗生素的吸收有限, 30%~80% 的抗生素及其代谢产物最终会随粪

便等排泄物排出体外, 影响生态环境及人类健

收稿日期: 2015-11-05; 修订日期: 2015-12-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(41401542); 浙江省自然科学基金项目(LY14C150002); 浙江省重点科技创新计划项目(2013TD12); 浙江省农业科学院青年人才培养项目(2015R20R08E03)

作者简介: 林辉(1986~), 女, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为农业环境微生物, E-mail: linhui@mail.zaas.ac.cn

* 通讯联系人, E-mail: majw@mail.zaas.ac.cn

康^[3]. 在目前常用的几类兽用抗生素中,磺胺类抗生素具有较大的生态毒性和环境持久性^[4,5]. 此外,抗生素污染最可怕还是其对抗性基因和抗性菌的选择. 事实上,越来越长的超级细菌清单表明,可怕的病原菌正在通过水平基因转移积累着越来越多的耐药基因^[6]. 磺胺抗性基因是目前环境中检出频率和检出丰度均较高的抗性基因之一^[7,8]. 因此,探索降低畜禽粪便磺胺抗生素残留,减少其抗性基因储存量,控制其向土壤环境扩散的风险迫在眉睫.

堆肥是目前处理畜禽粪便最普遍的方式之一. 在堆肥化过程中,抗生素与微生物相互作用,能被微生物降解,同时也能影响微生物的活性^[9,10]. 粪便中残留抗生素会诱导抗性基因和抗性菌传播^[11],但近期研究者也发现抗性基因扩散能通过堆肥得到遏制^[12]. 目前已有较多国内外研究报道证实^[10,13],好氧堆肥方式可以有效降低多种抗生素残留量,但有关抗生素对堆肥的影响及堆肥过程中 ARGs 的消长行为还有待明确. 特别堆肥对磺胺 ARGs 的影响情况在不同研究中存在一定的差异. Selvam 等^[12]研究证明堆肥可以降低磺胺 ARGs 丰度;而 Zhu 等^[14]则发现不同地区的堆肥对磺胺 ARGs 的影响效果有所不同. 因此,还需要开展更多的研究明确堆肥过程中 ARGs 的丰度变化,同时明确堆肥影响 ARGs 消长的机制. 本研究借助 HPLC-MS/MS、荧光定量 PCR、MicroRESPTM等多项技术,分析对比外源磺胺抗生素添加和不添加堆肥过程中理化性质演变、养分转化、抗生素降解及抗性基因消长行为,以期对堆肥质量控制及抗生素阻断技术研究提供参考.

1 材料与方法

1.1 试验材料

粪便原料由慈溪中慈生态肥料有限公司提供,以鸡粪为主,含有垫料,基本理化指标如下:含水率 61.05%; pH 7.76; EC 3 000 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$; 碳氮比 17.89; 有机质 61.21%; 总氮 1.98%; 总磷 1.45%; 总钾 2.23%; 铵态氮 NH_4^+-N 755.75 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; 硝态氮 NO_3^--N 181.79 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. 磺胺-6-甲氧嘧啶 (SMM) 和磺胺二甲嘧啶 (SM2) 由 Sigma-Aldrich 公司提供,纯度 >98%.

1.2 堆肥试验和取样

SM2 和 SMM 在国内养殖畜禽粪便中检出频率较高,其在鸡粪中的残留含量可在 0.08 ~ 6.00 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 之间^[15]. 本试验通过外源添加抗生素设置两个浓度处理: (CK) 不添加抗生素; (SA) 添加

2.00 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ SMM 和 2.00 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ SM2. 原料堆肥前先经过反复翻堆混匀,保证原料的均一性. 堆体粪使用量在 1.5 t 左右,堆肥周期 28 d,平均室温 25℃,定期翻堆. 每隔一周采样 1 次直到堆肥结束,采集堆体不同部位样品进行混合,保证采样代表性. 每个处理 3 次重复.

1.3 基本理化指标分析

新鲜样本用于测定含水率、pH 值、电导率 (EC); 风干样品用于测定总碳、总氮等其他养分指标. 采用烘箱干燥法测含水率; 按 1:10 固液比浸提后,分别用 pH 计测 pH 值和电导仪测 EC; 采用元素分析仪测总碳、总氮; 铵态氮采用靛酚蓝比色法测定; 硝态氮采用酚二磺酸比色法测定^[16]; 采用钒钼黄比色法测总磷; 利用精密数字温度计测定堆温.

1.4 MicroRESPTM 分析

MicroRESPTM 技术是研究原位土壤、堆肥微生物群落水平生理特征 (CLPP) 的一种较为灵敏、快捷的测定方法^[17]. 将甲酚红 (12.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、氯化钾 (150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和碳酸氢钠 (2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 混合制成指示剂. 同时配制 3% 的纯化琼脂,加入 2 倍胶体积的指示剂,然后将指示琼脂添加到检测板的微孔中,配制好的检测微孔板存放于含碱石灰的干燥器中待用. 将待测肥料均匀添加到深孔板中,随后加入水和 15 种碳源底物^[18],将配制好的检测板倒扣在深孔板上,25℃ 培养 6 h 后,利用酶标仪读取 570 nm 波长下检测板的吸光值. 测定检测板在样品培养前和培养 6 h 后的吸光值,通过吸光值差异计算 CO_2 产生率. 具体步骤和计算方法见文献^[18].

1.5 有机肥中抗生素提取和测定

样品采集后 -20℃ 保存备用. 称取 1.00 g 样品 (精确至 0.01 g) 至 50 mL 聚丙烯离心管中,加入内标溶液,放置 10 min. 加入 15 mL 含有体积比为 3:7 的乙腈和 EDTA-McIlvaine 缓冲溶液 (pH:4.0) 的提取液,涡旋 1 min,超声 30 min,7 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 5 min,将上清液转移至圆底烧瓶中;残渣再用 15 mL 提取液提取一次;合并两次上清液于圆底烧瓶中. 将圆底烧瓶放于旋转蒸发仪上除去有机相,水浴温度为 40℃,将剩余溶液转移至 50 mL 离心管中,用去离子水定容至 40 mL,使溶液中的有机相 (乙腈) 比例降至 $\leq 10\%$,离心后取 20 mL 过 SPE 固相萃取小柱. 收集洗脱液于玻璃刻度管中,45℃ 氮气吹干,用体积比为 1:1 的甲醇-水溶液定容至 1 mL,过 0.22 μm 有机滤膜,液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS)

测定,内标法定量。

色谱条件:Phenomenex C₁₈柱(3 μm, 2.0 mm × 150 mm), Thermo Finnigan Surveyor HPLC 系统(Thermo Scientific, USA); 流速:0.25 mL·min⁻¹;

柱温:30℃; 进样量:5 μL. 流动相 A:甲醇,B:甲酸-水(1:1 000,体积比),等度洗脱:0 min(40% A)→5.0 min(40% A). 磺胺二甲嘧啶和磺胺-6-甲氧嘧啶的回收率和定量限如表 1 所示.

表 1 SMM 和 SM2 的回收率和定量限

化合物	回收率(RSD, n = 5)/%(添加浓度/μg·kg ⁻¹)			定量限/μg·kg ⁻¹
	20	50	200	
SMM	77.8(9.6)	75.7(9.6)	79.7(8.5)	10.0
SM2	82.4(13.1)	88.5(7.9)	84.1(12.3)	10.0

1.6 有机肥基因组提取和抗性基因的定量分析

样品采集后 - 20℃ 保存,冷冻干燥后备用. 取冷冻干燥后的肥料样品 0.25g,按照 Omega EZNA™ soil DNA 试剂盒(Omega 公司)说明提取 DNA. 随后以有机肥基因组 DNA 为模板,采用表 2 中所示的引物进行 End-point PCR 和荧光定量 PCR(qPCR). 供试引物的 PCR 退火温度如表 2 所示.

End-point PCR 扩增采用北京全式金生物公司提供的 2 × EasyTaq PCR SuperMix, BioRAD T100 PCR 仪,反应在 20 μL 体系中进行,其中模板 0.5 μL,2 × EasyTaq PCR SuperMix 10 μL,引物各 1 μL(10 μmol·L⁻¹),超纯水补齐至 20 μL. 扩增反应如下:预变性 94℃ 5 min; 变性 94℃ 30 s, 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 kb·min⁻¹,30 个循环; 72℃ 延伸 5 min, 16℃ 5 min. PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后,割

胶回收、纯化. 将目的 DNA 片段与 PMD19-T 载体(Takara)连接后,转化进入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中并提取重组质粒. 将 PCR 验证后的质粒进行测序(上海生工生物技术有限公司),随后利用 NCBI 数据库中 BLAST 功能验证插入片段为目标基因. 本试验中构建的标准质粒为分别含有 *sul1*、*sul2*、*Int11*、*tetQ*、*tetW* 和 16S rRNA(有机肥来源)的重组 PMD19-T 载体.

荧光定量 PCR 扩增采用 Takara 公司提供的试剂盒 MightyAmp™ for Realtime PCR Kit, ABI StepOnePlus™ 实时荧光定量 PCR 仪,反应在 20 μL 的反应体系中进行. 其中模板 DNA 2 μL,10 μL 2 × MightyAmp for Real Time (SYBR plus) (2 ×),引物各 0.4 μL(10 μmol·L⁻¹),ROX reference Dye (50 ×) 0.4 μL,超纯水补齐至 20 μL. 扩增反应采用三

表 2 供试引物序列和 PCR 条件

引物	5'→3'方向	目标基因片段(End point PCR 和 qPCR 退火温度)
V3-FW(341F)	CCTACGGGAGGCAGCAG	细菌 16S rDNA V3 区段 (55℃,62℃)
V3-RV(518R)	ATTACCGCGGCTGCTGG	
sul1-F	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC	<i>sul1</i> (60℃,65℃) ^[19]
sul1-R	TGAAGTTCCGCGCAAAGGCTCG	<i>sul2</i> (60℃,62℃) ^[19]
sul2-F	TCCGGTGGAGGCCGTATCTGG	
sul2-R	CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG	<i>sul3</i> (60℃) ^[12]
sul3-F	TCCGTTACGCAATTGGTGCAG	
sul3-R	TTCGTTACGCCTTACACCAGC	<i>sulA</i> (60℃) ^[12]
sulA-F	TCTTGAGCAAGCACTCCAGCAG	
sulA-R	TCCAGCCTTAGCAACCACATGG	<i>Int11</i> (60℃,60℃) ^[14]
Int11-F	GGCTTCGTGATCICCTGCTT	
Int11-R	CATTCTGGCCGTGGTTCT	<i>Int12</i> (60℃) ^[14]
Int12-F	GTTATTTTATTGCTGGGATTAGGC	
Int12-R	TTTTACGCTGCTGTATAGGTGC	<i>tetQ</i> (58℃,58℃) ^[8, 20]
tet(Q)F	AGAATCTGCTGTTTGCCAGTG	
tet(Q)R	CGGAGTGTCAATGATATTGCA	<i>tetW</i> (58℃,58℃) ^[8, 20]
tet(W)F	GAGAGCCTGCATATGCCAGC	
tet(W)R	GGGCGTATCCACACTGTTAAC	<i>gyrA</i> (45℃) ^[12]
gyrAF	GA(T/C)GGN(C/T)TNAAG(G/A)CCNCTNCA	
gyrAR	GCCATNCCNACNGC(G/A/T)ATNCC	<i>parC</i> (55℃) ^[12]
PARC5-1	GCGAATAAGTTGAGGAATCAG	
PARC3-1	AGCTCGGAATATTTGACAAC	

步法,具体条件为:预变性 98℃ 2 min;变性 98℃ 10 s,退火 15 s,72℃ 30 s,40 个循环;熔解曲线程序.采用 NanoDrop 微量分光光度计对标准质粒 DNA 的浓度进行测定,建立质粒拷贝数与 CT 值对应关系的标准曲线.所有抗性基因标准曲线线性相关性良好($R^2 > 0.99$),qPCR 扩增效果(E)在 99% ~ 110% 之间,可以用于目标基因的定量分析.

1.7 统计分析

利用参照基因 16S rDNA 对样品中的抗性基因进行校正:

抗性基因相对丰度 = 抗性基因绝对拷贝数/16S rDNA 基因绝对拷贝数

应用统计软件 SPSS 15.0 进行显著性差异分析(One-way ANOVA,最小显著差法 LSD)和主成分分析(PCA);采用 Sigmaplot 10.0 软件作图;首先采用极差法对数据进行标准化,然后利用 Canoco 4.5 软件对生物信息矩阵进行冗余分析(RDA),同时利用 Monte Carlo permutation test 检验 RDA 排序轴特征值的显著性,置换次数为 999,将生成的数据文件应用 Canodraw 4.5 生成物种-环境排序图.

2 结果与讨论

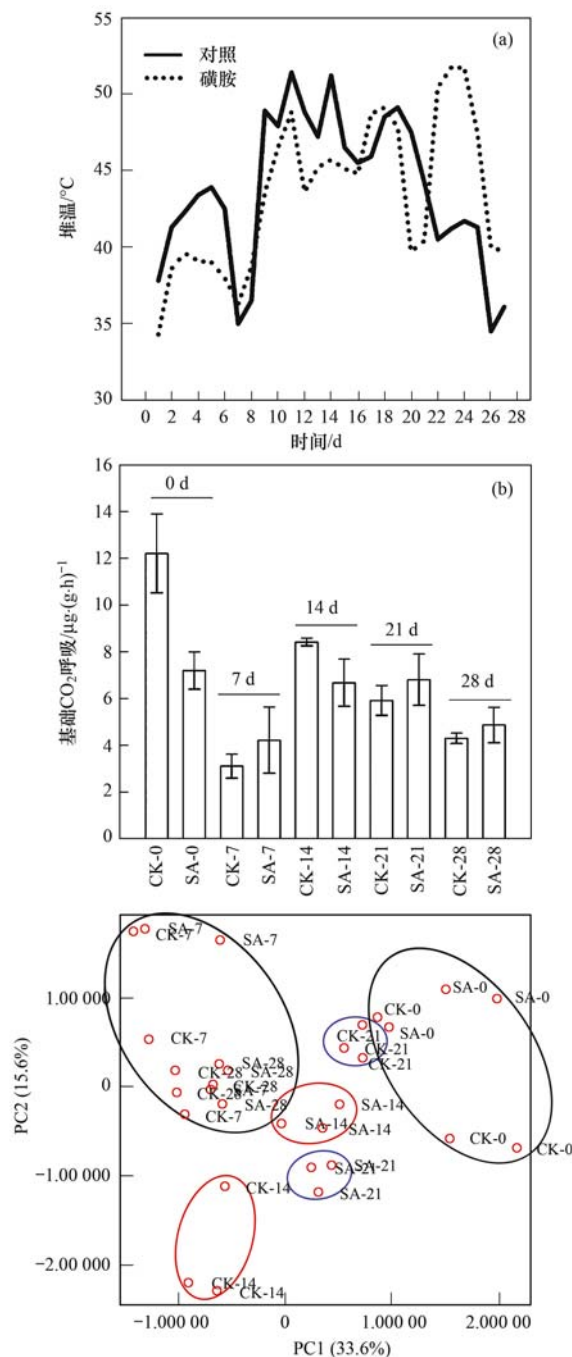
2.1 外源磺胺抗生素添加对堆肥进程的影响

2.1.1 堆温和基于 MicroResp™ 的微生物群落特征分析

对于堆肥系统而言,温度变化在一定程度上反映堆肥系统中的微生物活性,是堆肥化反应进程的直观表现.本试验中,磺胺组堆肥 0 ~ 14 d 的总体堆温低于对照组[图 1(a)].图 1(b)对比了磺胺组和对对照组堆肥的基础 CO₂ 呼吸,发现除堆肥 7 d 以外,堆肥 0 ~ 14 d 对照组的基础 CO₂ 呼吸基本高于磺胺组.因此,可认为磺胺添加抑制了堆肥早期微生物代谢,降低微生物发酵,导致堆肥达到高温时间延长.此外,堆肥过程中,微生物通过代谢呼吸提高堆温,而堆温升高反过来又会抑制微生物活动.因此,堆肥初期(0 ~ 7 d)堆温的骤升引发的大量微生物死亡和代谢抑制可以导致堆肥 7 d 基础 CO₂ 呼吸的剧烈下降[图 1(b)].堆肥早期对照组堆温高于磺胺组可能是堆肥 7 d 磺胺组基础 CO₂ 呼吸高于对照组的直接原因.堆肥 21 d 以后,对照组堆温下降,磺胺组堆温上升[图 1(a)],同时对照组和磺胺组堆肥基础 CO₂ 呼吸差异缩小[图 1(b)],表明高浓度磺胺抗生素对堆体发酵的抑制会随着其进入堆肥时间的延长而减弱.堆肥过程中磺胺抗生素的降解可能

是抑制作用减弱的一个重要原因^[4,9].

图 1(c)利用 PCA 分析不同堆肥进程下磺胺添加对微生物群落水平生理特征的影响,结果表明:堆体中微生物群落代谢特征随着堆肥的进行不断变化;在堆肥早期(0 ~ 7 d)和堆肥末期(28 d),磺胺



(a) 堆温; (b) 不同堆肥阶段的基础 CO₂ 呼吸;

(c) 不同时间下 CK 和 SA 组堆肥中 MicroRESP 数据的主成分分析

图 1 对照组 (CK) 和磺胺组 (SA) 堆温及微生物群落水平生理特征

Fig. 1 Composting temperature and microbial characteristics of the treatments with (SA) or without (CK) addition of sulfonamide antibiotics

组和对照组堆肥微生物群落代谢特征差异较小; 而堆肥中期(14~21 d), 磺胺组和对照组堆肥微生物群落代谢特征差异明显增大. 由上可知, 磺胺抗生素对堆肥微生物群落结构的影响主要反映在堆肥中期. 此外, 从堆肥 14~28 d, 对照组堆肥微生物群落代谢特征的时间变化趋势明显大于磺胺组. 堆肥微生物群落代谢变化可以从一定程度上反映堆肥微生物活动差异以及微生物群落结构的变化. 堆肥后期磺胺抗生素对微生物群落代谢特征影响的减小进一步反映了抗生素诱导产生的堆肥微生物群落结构和功能改变是短暂的, 会随着堆肥进程而逐步减弱甚至消失^[12].

2.1.2 pH、EC 和养分参数

不同处理堆体中基本养分、pH 和电导率在堆肥进程下的变化情况如图 2 所示. 研究结果表明, 对照组堆肥有机质(TOM)、总磷(TP)、铵态氮($\text{NH}_4^+\text{-N}$)和硝态氮($\text{NO}_3^-\text{-N}$)含量随时间的变化幅度明显大于磺胺组堆肥, 可知磺胺添加在一定程度上抑制了堆肥养分转化. 磺胺组有机质含量明显高

于对照组, 可认为高浓度磺胺药抑制了堆体微生物对碳源的利用^[9], 导致磺胺组有机质下降幅度减小, 这与磺胺组堆肥基础呼吸速率下降的结果相一致. 此外, 堆肥过程中, 水溶性的 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 一部分会转化为 NH_3 挥发, 一部分通过硝化作用形成 $\text{NO}_3^-\text{-N}$, 一定程度上降低堆肥中 $\text{NH}_4^+\text{-N}$, 增加 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ^[9]. 在本试验中, 尽管磺胺组和对照组的总氮含量时间曲线没有明显差异, 但对照组堆肥中 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 含量显著高于磺胺组, 这表明磺胺组中高浓度的磺胺抗生素对堆体中的微生物硝化作用产生了明显抑制. 由于 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 的硝化会导致堆肥 pH 降低, 因此磺胺组微生物硝化作用的减弱可能是对照组 pH 低于磺胺组的重要原因, 抗生素对 pH 的这种影响在王桂珍等^[9]的研究中也有发现. 此外, 由于磺胺组堆肥 pH 高于对照组, 因而磺胺组堆肥中的 NH_3 更容易挥发^[9], 这也是为何对照组堆肥硝态氮高于磺胺组, 但二者的总氮下降幅度却无明显差异的原因. 另外, 对照组与磺胺组在堆肥过程中的电导率-时间曲线也不同, 磺胺组的电导率总体高于对照组.

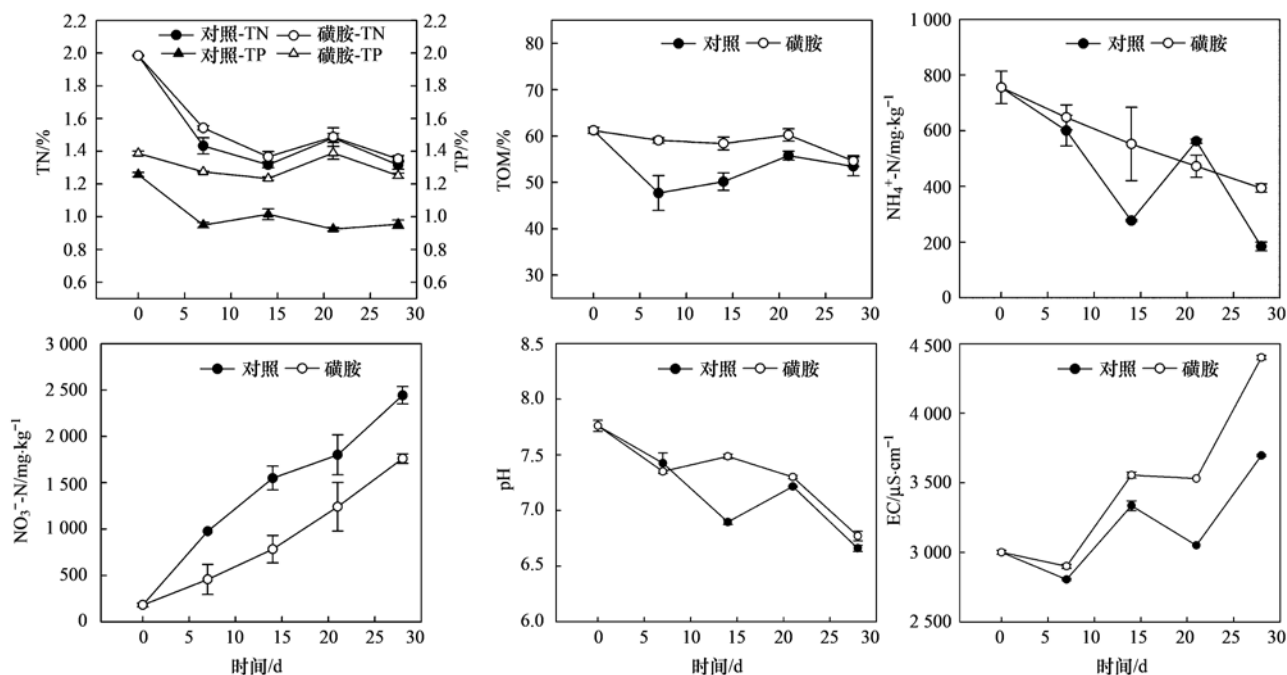


图 2 对照组和磺胺组堆肥中 pH、EC 和基本养分情况

Fig. 2 The pH, EC and nutrients of manure compost in treatments with or without addition of sulfonamide antibiotics

2.2 堆肥过程中内源和外源添加磺胺抗生素的降解

供试粪便原料无 SMM 检出, 但有少量 SM2 残留. 图 3(a) 描述了堆肥过程中对照组鸡粪内源残留 SM2 的降解行为, 发现 $0.21 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ SM2 在 7 d 内即可 100% 降解. 通过外源添加 SMM 和 SM2, 磺胺组堆肥原料中的 SMM 和 SM2 残留量分别提高至

$2.68 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $1.77 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. 由于翻堆和抗生素拌入过程中的人为误差, 堆体中实际抗生素浓度与理论计算值不完全相同. 图 3(b) 描述磺胺组堆肥中 SMM 和 SM2 降解的时间曲线, 结果指出尽管磺胺组堆肥中 SM2 残留量显著增加, 但鸡粪的好氧堆肥仍能有效去除 SM2, 堆肥 7 d 后 SM2 残留量降低

至 $0.84 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 降解率达 52.3%. 与内源 SM2 在对照组堆肥中的降解类似, 剩余的 $0.84 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ SM2 在 7 d 内 (堆肥第 14 d 时) 即可完全降解. 与 SM2 相比, 鸡粪中 SMM 的降解速度更快, 堆肥 7 d 降解率达 79.0%, 14 d 内降解率 100%, 残留浓度低于检出限 $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. 尽管需要进一步验证, 仍可推测鸡粪中 SMM 的快速降解能力可能是本试验鸡粪原料中无法检出 SMM 的一个重要原因. 综上, 好

氧堆肥可以有效去除堆肥中的 SM2 和 SMM, 这与其他学者的研究结果相一致^[10]. 事实上, 磺胺类药物例如 SMM 在土壤中比较难降解, 其去除速率往往低于四环素类药物等其它常见兽药^[3,4]. 根据本试验研究结果可推测, 与土壤环境相比, 磺胺类抗生素在堆肥环境中可能更容易降解. 因此, 可以通过堆肥强化养殖源有机肥中磺胺类抗生素的降解, 减少其在农田土壤中的累积.

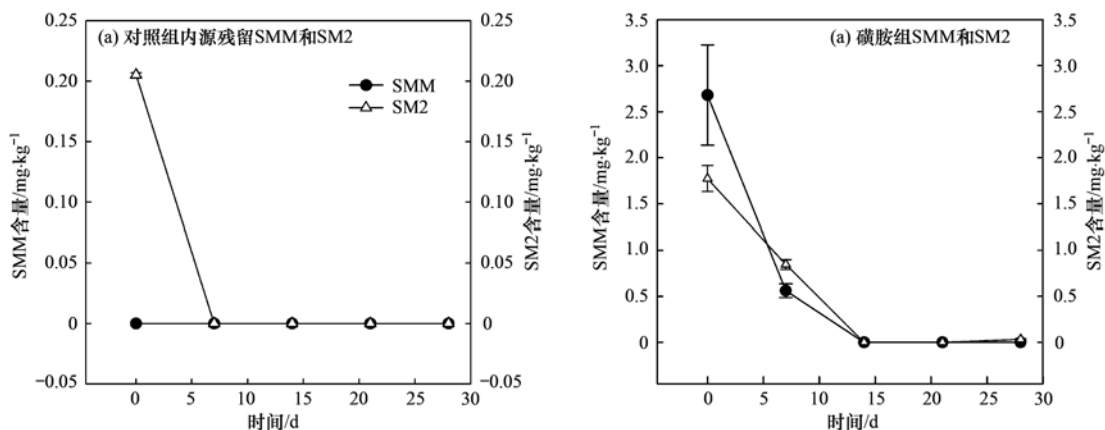


图 3 堆肥原料中 SMM 和 SM2 在好氧堆肥中的降解曲线

Fig. 3 Degradation of SMM and SM2 in chicken manure during aerobic composting

2.3 堆肥过程中抗性基因的消长过程

2.3.1 磺胺抗性基因及相关整合子基因

本试验首先通过 end-point PCR 检测粪便原料和有机肥样品中 *sul1*、*sul2*、*sul3*、*sulA*、*IntI1* 和 *IntI2* 的存在情况, 电泳结果表明所有样品中均无法检出 *sul3*、*sulA* 和 *IntI2*, 但有与 *sul1*、*sul2* 及 *IntI1* 相同大小的 DNA 产物检出 (图 4), 经过割胶回收、片段纯化及测序鉴定可以确定以上 DNA 产物为目标抗性基因片段. 根据以上结果, 初步判断供试粪便中的磺胺抗性基因以 *sul1*、*sul2* 为主, 整合子以 *IntI1* 为主. 随后, 采用 qPCR 对堆肥过程中的 *sul1*、*sul2* 和 *IntI1* 进行定量分析.

随堆肥进行, 鸡粪中 *sul1* 和 *sul2* 相对丰度基本呈现先下降后上升的变化趋势 (图 5), 研究结果与 Selvam 等^[12] 的报道类似. 在堆肥早期, 磺胺抗性基因相对丰度的降低表明堆肥启动后磺胺抗性基因携带菌在细菌群落中的比例下降, 暗示了堆肥早期非抗性细菌的生长能力可能高于抗性细菌. 对堆体中 16S rDNA 和磺胺抗性基因的绝对拷贝数进行分析, 发现 16S rDNA 的绝对拷贝数在堆肥启动后 (7 d) 显著上升, 而磺胺抗性基因的绝对拷贝数下降. 因此可认为, 堆肥的启动可诱导堆体中非抗性细菌大量

生长, 但抑制抗性宿主菌的繁殖或相关抗性基因的水平转移. 堆肥进入中期 (14 ~ 21 d) 后, 堆体中的 *sul1* 和 *sul2* 相对丰度降至最低值, 最高消减率分别达 52.1% 和 65.4%. 由于在本试验中, 无论是内源还是外源添加的磺胺类抗生素在堆肥 14 d 内均可完全降解, 因此推测鸡粪中磺胺类抗生素降解导致的抗性选择压力的下降和消失是 *sul1* 和 *sul2* 相对丰度降低的诱因之一. 然而, 堆肥后期 (21 ~ 28 d), 鸡粪中 *sul1* 和 *sul2* 相对丰度又有所回升, 特别是 *sul1*. 而在此期间, 总细菌数量随时间下降, 大量正常细菌的死亡可能直接导致堆体细菌群落中磺胺抗性宿主菌比例增加. 此外, 堆肥后期温度的下降也可能诱导部分在高温期被抑制的抗性基因宿主菌复苏^[12].

相关分析结果进一步指出 *IntI1* 与 *sul1* 相对丰度高度显著相关 (Pearson Correlation = 0.816, $P < 0.01$). 堆体中 *sul1* 和 *IntI1* 可能存在于同一个抗性质粒中或者抗性菌内, 在这种情况下 *sul1* 在 *IntI1* 的介导下可以在不同个体的细菌之间水平转移扩散^[21,22]. *sul2* 与 *IntI1*, *sul2* 与 *sul1* 相关性不显著 (Pearson Correlation = 0.509, $P = 0.162$; Pearson Correlation = 0.579, $P = 0.103$). *sul1* 相对丰度在堆肥 21 d 就上升到一个小高峰 [图 5(b)], 而 *sul2* 的

这个小高峰在堆肥 28 d 时才出现[图 5(c)],推测部分 *sul2* 宿主菌与 *sul1* 宿主菌可能属于不同细菌种属. 因此,堆肥内源细菌可能拥有多种不同的磺胺抗性基因,并且不同磺胺抗性菌可以拥有不同的抗性机制.

随后对比磺胺组和对照组(图 5)发现:外源磺胺类抗生素的添加抑制了 0~7 d 堆肥细菌数量的增加,但 7 d 后磺胺组中细菌数量可以高于对照组,28 d 内趋于一致,该结果与堆温和基础呼吸数据结果一致,表明磺胺类抗生素倾向抑制堆肥早期微生物,抑制作用随堆肥进行而减弱;堆肥前中期,磺胺组 *sul1* 和 *Int11* 相对丰度与对照组相比无明显提高,对照组堆肥 21 d 的 *sul1* 和 *Int11* 相对丰度甚至还高于磺胺组;到堆肥 28 d,磺胺组的 *sul1* 和 *Int11* 才明显高于对照组,而此时堆体中已无法检出磺胺类抗生素.

上述结果说明,*sul1* 和 *Int11* 及其宿主菌在堆肥中的变化可能与抗生素浓度没有明显相关性,即其在堆体中的传播或增长不依赖于抗生素. 类似的现象在前期多项研究报道中被提及,例如 Ji 等^[19]对粪便和粪便施肥土壤中抗性基因丰度与多种重金属和抗生素的相关性进行分析发现,抗性基因丰度与抗生素浓度的相关性较弱,而与重金属 Cu、Zn、Hg 等显著相关;Heuer 等^[23]通过室内培养试验建立 *sul1* 和 *sul2* 丰度与磺胺嘧啶浓度之间的定量模型,发现 *sul1* 传播不依赖于磺胺嘧啶浓度,但明显影响 *sul2* 丰度. 本试验中,磺胺组 *sul2* 相对丰度总体高于对照组,尤其是堆肥 7 d 磺胺添加显著提高 *sul2*. 因此,与前期研究报道相一致^[23],本试验也证实 *sul2* 宿主菌生长或 *sul2* 转移频率与磺胺类抗生素选择压力的相关性更强.

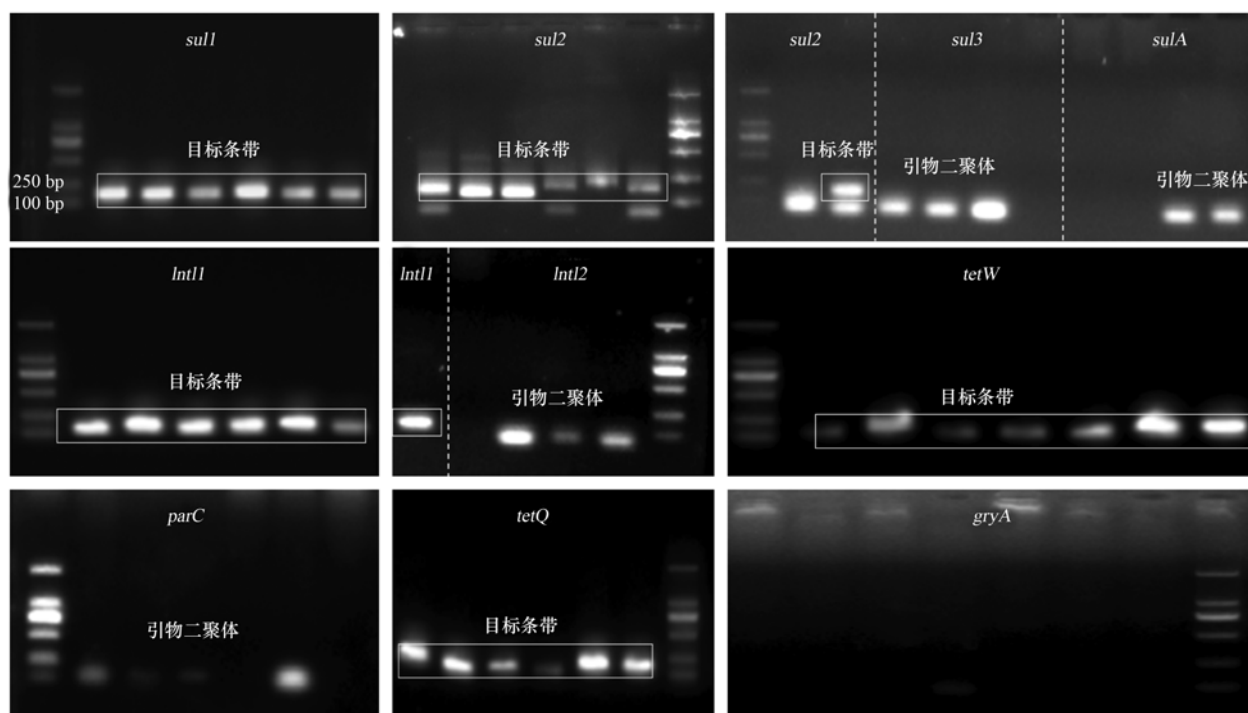


图 4 部分堆肥样品的抗性基因 PCR 扩增结果

Fig. 4 PCR detection results of ARGs in part of manure compost samples

2.3.2 其他抗性基因

初步的 End-point PCR 表明堆体样品中无法检出 *gyrA* 和 *parC*,但有 *tetQ* 和 *tetW* 检出(图 4). *tetQ* 和 *tetW* 抗性基因属于 RPP(核糖体保护蛋白)组的四环素抗性基因,Yu 等^[24]研究发现它们在猪粪中的绝对拷贝数是通道运输相关 *tet* 抗性基因(*tetC*、*tetG*)的 10~1 000 倍. 本试验鸡粪原料中的 *tetQ* 和 *tetW* 相对丰度分别为 1.31% 和 0.31%,大大高于

Selvam 等^[12]研究中的猪粪(来源:香港; *tetQ*、*tetW*: 0.04%、0.02%),明显低于 *sul1*、*sul2* 等磺胺抗性基因,与大多畜禽粪便抗性基因相关报道一致^[12]. 此外,本试验结果(图 6)与 Selvam 等^[12]的报道类似,*tetQ* 和 *tetW* 随时间先增加后下降,堆肥 7 d 堆体中 *tetW* 相对丰度是鸡粪原料中的 4.7 倍左右. 显然 *tetQ* 和 *tetW* 宿主菌在堆肥启动后的一段时间内非常活跃. 事实上,供试鸡粪原料中没有检出四环素类

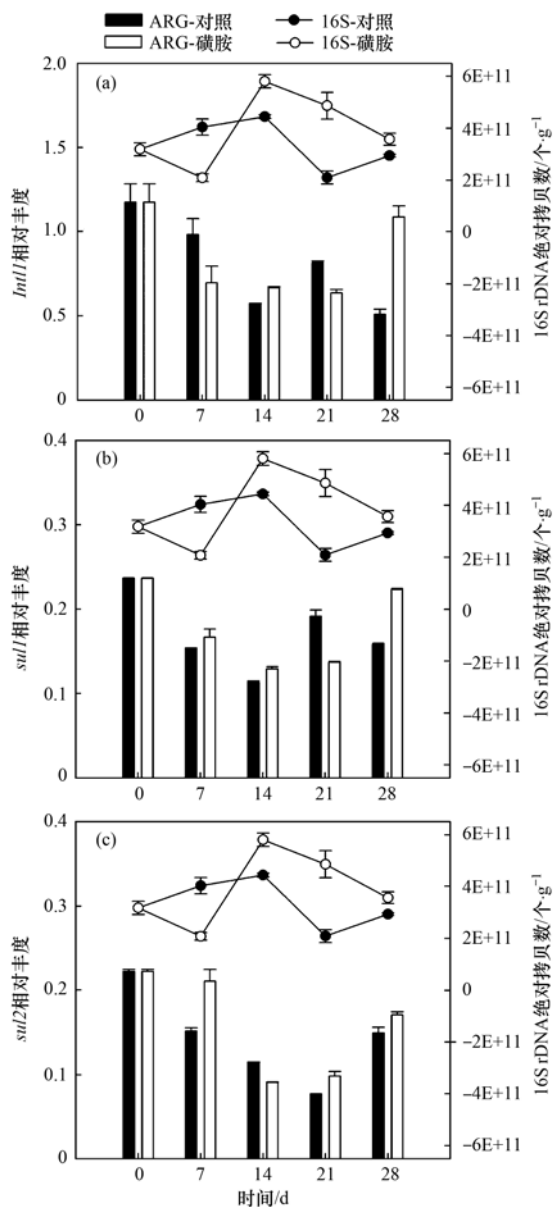


图5 堆肥过程中16S rDNA 绝对拷贝数和抗性基因 *Int11*、*sul1* 和 *sul2* 的相对丰度

Fig. 5 Absolute copy numbers of 16S rDNA and relative abundances of *Int11*, *sul1* and *sul2* during composting

抗生素,这些四环素抗性基因可能在鸡肠道中就已经进化出来.对比磺胺组和对照组可知,磺胺组中四环素抗性基因的相对丰度高于对照组,尤其是 *tetQ*,表明磺胺抗生素不仅促进磺胺抗性基因扩散,还可以增加四环素抗性基因的传播.因此,抗生素存在共选择或者交叉选择以产生抗性的机制^[25],也暗示着很多耐药细菌同时含有不同抗生素抗性基因^[26].例如, Arcangioli 等^[26]研究发现沙门氏菌中的 *sul1*、*Int11*、*tetA* 和 *tetR* 出现在同一个抗性质粒中.

2.4 基于 RDA 分析堆肥理化参数变化与抗性基因相对丰度的关联

ARGs 会受到环境中很多因素的影响,例如光照、温度、重金属存在、环境湿度等^[27].因此,除了磺胺抗生素浓度,堆肥进程中的堆体理化参数变化也会驱动堆体中抗性基因相对丰度发生改变.

RDA 冗余分析是基于排序技术的线性分析方法,不仅可以结合多个环境因子一起分析,而且能够独立保持每一个环境因子对物种变化的贡献率^[28].为了明确堆肥理化指标与 ARGs 相对丰度的关系,对水分、pH、EC、有机质等各项养分与 ARGs 进行 RDA 分析. RDA 分析结果表明,第一和第二排序轴分别对应 98.2% 和 89.6% 的抗性基因相对丰度与堆肥过程因子之间的关系,4 个排序轴共解释了 88.8% 的抗性基因相对丰度变化和 99.1% 的抗性基因-堆肥过程因子的关系,所选的堆肥过程因子解释了 88.8% 的总特征值. MonteCaHo 检验测得的显著值表明所选堆肥过程因子是堆肥中抗性基因相对丰度相关的主要特征参数 ($F = 8.781$, $P < 0.01$). 图 7 显示了各指标之间的关系,红色箭头连线的长度代表某个过程因子对物种影响的大小,连线越长,代表这个过程因子对物种的影响越大,因此堆肥过程因子对抗性基因的影响大小为:温度、铵态氮、硝态氮 > pH、含水率、碳氮比 > 总碳、总磷 > EC. 红色箭头和蓝色箭头之间的夹角小于 90° ,表示物种与环境因子正相关,相反则表示负相关,夹角越小,相关性越强.由图 7 可知,温度与 *sul1*、*sul2* 和 *Int11* 负相关.温度可能通过影响磺胺抗性质粒在堆肥中的存活能力和接合转移能力^[29],进而使得堆肥进程中抗性基因相对丰度发生改变.温度箭头与 *tetQ* 和 *tetW* 箭头的夹角约为 90° ,表明温度对 *tetQ* 和 *tetW* 的影响较小.此外,碳氮比和硝态氮与 *sul1*、*sul2*、*Int11*、*tetQ* 和 *tetW* 均呈负相关;而 pH、含水率和铵态氮浓度与抗性基因相对丰度成正相关;堆体 pH 和含水率对 *tetQ* 和 *tetW* 的影响比 *sul1* 和 *sul2* 要强烈. Knapp 等^[30]也发现 pH 与大部分抗性基因的相对丰度例如 *blaCTX*、*ermB* 显著相关,高 pH 环境利于抗性基因的扩散,但不同抗性基因之间存在差异.含水率、铵态氮、硝态氮等养分很有可能通过影响堆体微生物群落结构^[31],进而影响抗性基因相关丰度.由上可以明确堆肥过程中抗性基因消长的影响因素,通过调控主控因素可以帮助人们优化堆肥条件,从而降低有机肥成品中的抗性基因残留丰度.

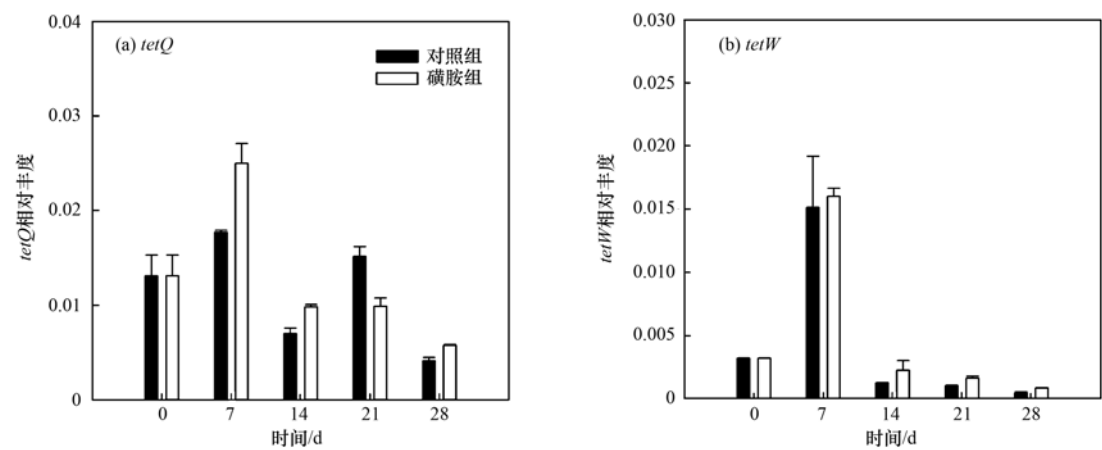


图 6 堆肥过程中四环素抗性基因相对丰度

Fig. 6 Relative abundances of *tetQ* and *tetW* during composting

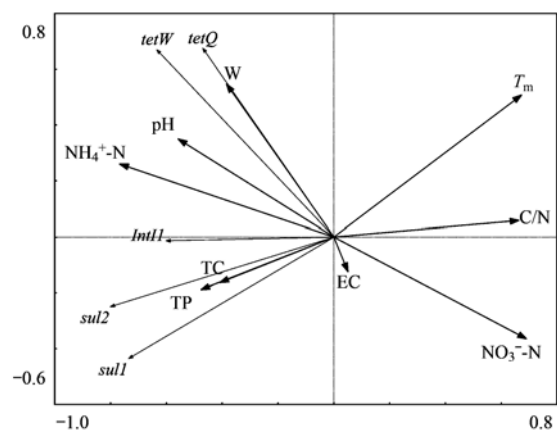


图 7 堆肥过程因子与 ARGs 相对丰度的二维排序图

Fig. 7 RDA biplot of ARGs relative abundances and the composting process factors

3 结论

(1)磺胺抗生素的添加抑制堆肥早期微生物代谢活动,减缓养分转化,延长了堆体达到高温的时间,但磺胺抗生素的抑制作用会随着其进入时间的延长而减弱。磺胺抗生素对堆肥微生物群落结构的影响主要反映在堆肥中期。

(2)好氧堆肥可以有效去除鸡粪中残留的 SM2 和 SMM,堆肥 14 d 内降解率均达 100% ,且堆体中 SMM 降解速率高于 SM2。

(3)磺胺抗生素添加明显增加堆体中 *sul2*、*tetQ* 和 *tetW* 的相对丰度,一类抗生素可以同时诱导多类抗性基因丰度的增加。除了抗生素,堆肥理化过程因子变化也是驱动堆体中抗性水平发生改变的重要原因。温度与 *sul1*、*sul2* 和 *Int1* 明显负相关,与 *tetQ* 和 *tetW* 无明显相关性。上述 5 种抗性基因与碳氮比

和硝态氮与均呈负相关,而与 pH、含水率和铵态氮含量正相关;堆体 pH 和含水率对 *tetQ* 和 *tetW* 的影响比 *sul1* 和 *sul2* 要强烈。

参考文献:

[1] Public Health England. UK one health report: joint report on human and animal antibiotic use, sales and resistance, 2013. https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/447319/One_Health_Report_July2015.pdf.

[2] Sarmah A K, Meyer M T, Boxall A B A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment [J]. Chemosphere, 2006, **65**(5): 725-759.

[3] Jechalke S, Heuer H, Siemens J, *et al.* Fate and effects of veterinary antibiotics in soil[J]. Trends in Microbiology, 2014, **22**(9): 536-545.

[4] Ma J W, Lin H, Sun W C, *et al.* Soil microbial systems respond differentially to tetracycline, sulfamonomethoxine, and ciprofloxacin entering soil under pot experimental conditions alone and in combination[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2014, **21**(12): 7436-7448.

[5] Ding G C, Radl V, Schlöter-Hai B, *et al.* Dynamics of soil bacterial communities in response to repeated application of manure containing sulfadiazine[J]. PLoS One, 2014, **9**(3): e92958.

[6] Forsberg K J, Reyes A, Wang B, *et al.* The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens[J]. Science, 2012, **337**(6098): 1107-1111.

[7] Fahrenfeld N, Knowlton K, Krometis L A, *et al.* Effect of manure application on abundance of antibiotic resistance genes and their attenuation rates in soil: field-scale mass balance approach[J]. Environmental Science & Technology, 2014, **48**(5): 2643-2650.

[8] Cheng W X, Chen H, Su C, *et al.* Abundance and persistence of antibiotic resistance genes in livestock farms: a comprehensive investigation in eastern China[J]. Environment International,

- 2013, **61**: 1-7.
- [9] 王桂珍, 李兆君, 张树清, 等. 土霉素在鸡粪好氧堆肥过程中的降解及其对相关参数的影响[J]. 环境科学, 2013, **34**(2): 795-803.
- [10] Selvam A, Zhao Z Y, Wong J W C, *et al.* Composting of swine manure spiked with sulfadiazine, chlortetracycline and ciprofloxacin[J]. Bioresource Technology, 2012, **126**: 412-417.
- [11] 张俊亚, 魏源送, 陈梅雪, 等. 畜禽粪便生物处理与土地利用全过程中抗生素和重金属抗性基因的赋存与转归特征研究进展[J]. 环境科学学报, 2015, **35**(4): 935-946.
- [12] Selvam A, Xu D L, Zhao Z Y, *et al.* Fate of tetracycline, sulfonamide and fluoroquinolone resistance genes and the changes in bacterial diversity during composting of swine manure[J]. Bioresource Technology, 2012, **126**: 383-390.
- [13] Ho Y B, Zakaria M P, Latif P A, *et al.* Degradation of veterinary antibiotics and hormone during broiler manure composting[J]. Bioresource Technology, 2013, **131**: 476-484.
- [14] Zhu Y G, Johnson T A, Su J Q, *et al.* Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, **110**(9): 3435-3440.
- [15] Zhao L, Dong Y H, Wang H. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China[J]. Science of the Total Environment, 2010, **408**(5): 1069-1075.
- [16] 中国科学院南京土壤研究所. 土壤理化分析[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1978. 1-250.
- [17] 陈晓娟, 吴小红, 刘守龙, 等. 不同耕地利用方式下土壤微生物活性及群落结构特性分析: 基于 PLFA 和 MicroRespTM 方法[J]. 环境科学, 2013, **34**(6): 2375-2382.
- [18] Campbell C D, Chapman S J, Cameron C M, *et al.* A rapid microtiter plate method to measure carbon dioxide evolved from carbon substrate amendments so as to determine the physiological profiles of soil microbial communities by using whole soil[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, **69**(6): 3593-3599.
- [19] Ji X L, Shen Q H, Liu F, *et al.* Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai, China[J]. Journal of Hazardous Materials, 2012, **235**-**236**: 178-185.
- [20] Aminov R I, Garrigues-Jeanjean N, Mackie R I. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, **67**(1): 22-32.
- [21] Ma Y J, Wilson C A, Novak J T, *et al.* Effect of various sludge digestion conditions on sulfonamide, macrolide, and tetracycline resistance genes and class I integrons[J]. Environmental Science & Technology, 2011, **45**(18): 7855-7861.
- [22] 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.
- [23] Heuer H, Focks A, Lamshöft M, *et al.* Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, **40**(7): 1892-1900.
- [24] Yu Z T, Michel F C Jr, Hansen G, *et al.* Development and application of real-time PCR assays for quantification of genes encoding tetracycline resistance[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, **71**(11): 6926-6933.
- [25] 李佳楠. 城市污水系统中典型抗生素、抗性基因和抗性细菌的丰度与关联性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2014.
- [26] Arcangioli M A, Leroy-Sétrin S, Martel J L, *et al.* A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in *Salmonella typhimurium* DT104[J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, **174**(2): 327-332.
- [27] 沈怡雯, 黄智婷, 谢冰. 抗生素及其抗性基因在环境中的污染、降解和去除研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2015, **21**(2): 181-187.
- [28] 胡春晓, 陈耀宁, 张嘉超, 等. 农业废物好氧堆肥中环境因子对 *nirK*、*nirS* 和 *nosZ* 数量的影响[J]. 环境科学, 2013, **34**(3): 1196-1203.
- [29] Guan J, Wasty A, Grenier C, *et al.* Influence of temperature on survival and conjugative transfer of multiple antibiotic-resistant plasmids in chicken manure and compost microcosms[J]. Poultry Science, 2007, **86**(4): 610-613.
- [30] Knapp C W, McCluskey S M, Singh B K, *et al.* Antibiotic resistance gene abundances correlate with metal and geochemical conditions in archived Scottish soils[J]. PLoS One, 2011, **6**(11): e27300.
- [31] 黄懿梅, 刘学玲, 姜继韶, 等. 葡萄籽对猪粪秸秆高温堆肥中微生物群落与碳氮含量的影响[J]. 应用生态学报, 2012, **23**(8): 2069-2076.

CONTENTS

Exploring the Severe Haze in Beijing During December, 2015; Pollution Process and Emissions Variation	XUE Yi-feng, ZHOU Zhen, NIE Teng, <i>et al.</i> (1593)
Pollution Characteristics and Source of HULIS in the Fine Particle During the Beijing APEC	ZHOU Xue-ming, QI Xue-jiao, XIANG Ping, <i>et al.</i> (1602)
Seasonal Variation Characteristics and Potential Source Contribution of Sulfate, Nitrate and Ammonium in Beijing by Using Single Particle Aerosol Mass Spectrometry	LIU Lang, ZHANG Wen-jie, DU Shi-yong, <i>et al.</i> (1609)
Pollution Characteristics and Source Apportionment of PM _{2.5} in Lanzhou City	WANG Xin, NIE Yan, CHEN Hong, <i>et al.</i> (1619)
Pollution Level and Source Apportionment of Atmospheric Particles PM _{2.5} in Southwest Suburb of Chengdu in Spring	LIN Yu, YE Zhi-xiang, YANG Huai-jin, <i>et al.</i> (1629)
Variation Characteristics of Total Gaseous Mercury at Simian Mountain Background Station in Mid-subtropical Region	LIU Wei-ming, MA Ming, WANG Ding-yong, <i>et al.</i> (1639)
Establishment of Method for Health Risk Assessment of Pollutants from Fixed Sources	CHEN Qiang, WU Huan-bo (1646)
Testing of Concentration and Characteristics of Particulate Matters Emitted from Stationary Combustion Sources in Beijing	HU Yue-qi, WU Xiao-dong, WANG Chen, <i>et al.</i> (1653)
Pollution Evaluation and Risk Assessment of Heavy Metals from Atmospheric Deposition in the Parks of Nanjing	WANG Cheng, QIAN Xin, LI Hui-ming, <i>et al.</i> (1662)
CoCuMnO ₂ Photocatalyzed Oxidation of Multi-component VOCs and Kinetic Analysis	MENG Hai-long, BO Long-li, LIU Jia-dong, <i>et al.</i> (1670)
Distribution of Nitrogen and Phosphorus in the Tidal Reach and Estuary of the Daliao River and Analysis of Potential Eutrophication	ZHANG Lei, CAO Wei, MA Ying-qun, <i>et al.</i> (1677)
Spatial Distribution of Stable Isotope from the Lakes in Typical Temperate Glacier Region	SHI Xiao-yi, PU Tao, HE Yuan-qing, <i>et al.</i> (1685)
$\delta^{15}\text{N-NO}_3^-$ and $\delta^{18}\text{O-NO}_3^-$ Tracing of Nitrate Sources in Beijing Urban Rivers	ZHAO Qing-liang, MA Hui-ya, REN Yu-fen, <i>et al.</i> (1692)
Distribution Characteristics and Influencing Factors of Nitrate Pollution in Shallow Groundwater of Liujiang Basin	WANG He, GU Hong-biao, CHI Bao-ming, <i>et al.</i> (1699)
Nitrogen Losses Under the Action of Different Land Use Types of Small Catchment in Three Gorges Region	CHEN Cheng-long, GAO Ming, NI Jiu-pai, <i>et al.</i> (1707)
Interception Effect of Ecological Ditch on Nitrogen Transport in Agricultural Runoff in Subtropical China	WANG Di, LI Hong-fang, LIU Feng, <i>et al.</i> (1717)
Biodegradation Coefficients of Typical Pollutants in the Plain Rivers Network	FENG Shuai, LI Xu-yong, DENG Jian-cai (1724)
Influence of Submerged Plants on Microbial Community Structure in Sediment of Hongze Lake	ZHANG Ding-yu, ZHANG Ting-xi, DONG Dan-ping, <i>et al.</i> (1734)
Community Structure Characteristics of Diatom in Reservoirs Located in the South of Jiangsu Province, China and Its Control Factors	REN Jie, ZHOU Tao, ZHU Guang-wei, <i>et al.</i> (1742)
Contamination and Ecological Risk Assessment of Mercury in Hengshuihu Wetland, Hebei Province	WANG Nai-shan, ZHANG Man-yin, CUI Li-juan, <i>et al.</i> (1754)
Spatial Distribution and Potential Ecological Risk Assessment of Heavy Metals in Soils and Sediments in Shunde Waterway, Southern China	CAI Yi-min, CHEN Wei-ping, PENG Chi, <i>et al.</i> (1763)
Pollution Characteristics and Ecological Risk of PBDEs in Water and Sediment from an Electronic Waste Dismantling Area in Taizhou	CHEN Xiang-ping, PENG Bao-qi, LÜ Su-ping, <i>et al.</i> (1771)
Major Ionic Features and Their Controlling Factors in the Upper-Middle Reaches of Wujiang River	HUANG Qi-bo, QIN Xiao-qun, LIU Peng-yu, <i>et al.</i> (1779)
Export of Total Organic Carbon (TOC) from Karst Watershed and Its Influencing Factors; An Example from Xueyudong Underground River System, Chongqing	WANG Qiao-lian, JIANG Yong-jun, CHEN Yu (1788)
Seasonal Variations and Controlling Factors of the Element Contents in Drip Waters Collected from the Baojinggong Cave in Guangdong Province	HUANG Jia-yi, CHEN Lin, CHEN Qiong, <i>et al.</i> (1798)
Tracing the Fecal Contamination Sources Based on <i>Bacteroides</i> 16S rRNA PCR-DGGE in Karst Groundwater; Taking Laolongdong Underground River System, Nanshan, Chongqing as an Example	ZHANG Hong, JIANG Yong-jun, ZHANG Yuan-zhu, <i>et al.</i> (1805)
Sources and Variation Characteristics of Dissolved Lipid Biomarkers in a Typical Karst Underground River	LIANG Zuo-bing, SUN Yu-chuan, LI Jian-hong, <i>et al.</i> (1814)
Formation of Halogenated By-products in Co ²⁺ Activated Peroxymonosulfate Oxidation Process	LIU Kuo, JIN Hao, DONG Wei, <i>et al.</i> (1823)
Aspartic Acid Generated in the Process of Chlorination Disinfection By-product Dichloroacetonitrile	DING Chun-sheng, LI Nai-jun, ZHANG Tao, <i>et al.</i> (1831)
Influencing Factors of Assimilable Organic Carbon (AOC) Formation in Drinking Water During Ozonation Process	DONG Bing-zhi, ZHANG Jia-li, HE Chang (1837)
Wastewater Quantity and Quality Fluctuation Characteristics of Typical Area of Hybrid Sewage System	CHENG Xun, ZHANG Ming-kai, LIU Yan-chen, <i>et al.</i> (1845)
Preparation of HDTMA-modified Zeolite and Its Performance in Nitro-phenol Adsorption from Wastewaters	GUO Jun-yuan, WANG Bin (1852)
Selection of Suitable Microalgal Species for Sorption of Uranium in Radioactive Wastewater Treatment	LI Xin, HU Hong-ying, YU Jun-yi, <i>et al.</i> (1858)
Magnetic Fe ₃ O ₄ Microparticles Conditioning-Pressure Electro-osmotic Dewatering (MPEOD) of Sewage Sludge	QIAN Xu, WANG Yi-li, ZHAO Li (1864)
Stability of Short-cut Nitrification Nitrogen Removal in Digested Piggery Wastewater with an Intermittently Aerated Sequencing Batch Reactor	SONG Xiao-yan, LIU Rui, SHUI Yong, <i>et al.</i> (1873)
Effect of Irrigation Patterns on Soil CO ₂ and N ₂ O Emissions from Winter Wheat Field in North China Plain	GUO Shu-fang, QI Yu-chun, YIN Fei-hu, <i>et al.</i> (1880)
Characteristics of Dissolved CH ₄ and N ₂ O Concentrations of Weihe River in Xinxiang Section in Spring	HOU Cui-cui, ZHANG Fang, LI Ying-chen, <i>et al.</i> (1891)
Effect of Stimulated N Deposition on N ₂ O Emission from a <i>Stipa krylovii</i> Steppe in Inner Mongolia, China	YANG Han-yue, ZHANG Ting, HUANG Yong-mei, <i>et al.</i> (1900)
Response of Soil Respiration and Organic Carbon to Returning of Different Agricultural Straws and Its Mechanism	CAO Zhan-bo, WANG Lei, LI Fan, <i>et al.</i> (1908)
Spatial Variability and Distribution Pattern of Soil Organic Matter in a Mollisol Watershed of China	GAO Feng-jie, MA Quan-lai, HAN Wen-wen, <i>et al.</i> (1915)
Effects of Tillage on Distribution of Heavy Metals and Organic Matter Within Purple Paddy Soil Aggregates	SHI Qiong-bin, ZHAO Xiu-lan, CHANG Tong-ju, <i>et al.</i> (1923)
Distribution Characteristics and Potential Ecological Hazards Assessment of Soil Heavy Metals in Typical Soil Profiles in Southeast Suburb of Beijing	ZHAO Qian, MA Lin, LIU Yi-fei, <i>et al.</i> (1931)
Contamination Assessment and Sources Analysis of Soil Heavy Metals in Opencast Mine of East Junggar Basin in Xinjiang	LIU Wei, YANG Jian-jun, WANG Jun, <i>et al.</i> (1938)
Effect of Nano-TiO ₂ on Release and Speciation Changes of Heavy Metals in Soil	ZHANG Jin-yang, WANG Ding-yong, LIANG Li, <i>et al.</i> (1946)
Reduction Kinetics of Cr(VI) in Chromium Contaminated Soil by Nanoscale Zerovalent Iron-copper Bimetallic	MA Shao-yun, ZHU Fang, SHANG Zhi-feng (1953)
Inhibition of Low Molecular Organic Acids on the Activity of <i>Acidithiobacillus</i> Species and Its Effect on the Removal of Heavy Metals from Contaminated Soil	SONG Yong-wei, WANG He-ru, CAO Yan-xiao, <i>et al.</i> (1960)
Contribution of Particle Size and Surface Coating of Silver Nanoparticles to Its Toxicity in Marine Diatom <i>Skeletonema costatum</i>	HUANG Jun, YI Jun, QIANG Li-yuan, <i>et al.</i> (1968)
Rhizospheric Mechanisms of <i>Hemerocallis middendorffii</i> Trautv. et Mey. Remediating Petroleum-contaminated Soil and Metabonomic Analyses of the Root Systems	WANG Ya-nan, CHENG Li-juan, ZHOU Qi-xing (1978)
Effects of Thermophilic Composting on Antibiotic Resistance Genes (ARGs) of Swine Manure Source	ZHENG Ning-guo, HUANG Nan, WANG Wei-wei, <i>et al.</i> (1986)
Interaction Between Sulfonamide Antibiotics Fates and Chicken Manure Composting	LIN Hui, WANG Jian-mei, SUN Wan-chun, <i>et al.</i> (1993)

《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)

2016年5月15日 第37卷 第5期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 37 No. 5 May 15, 2016

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