

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第38卷 第4期

Vol.38 No.4

2017

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

西宁近郊大气氮干湿沉降研究	许稳, 金鑫, 罗少辉, 冯兆忠, 张霖, 潘月鹏, 刘学军 (1279)
兰州春夏季 PM ₁₀ 碳组分昼夜变化特征与来源分析	马丽, 余晔, 王博, 赵素平, 李刚 (1289)
海南三亚大气颗粒物中水溶性无机离子浓度及其粒径分布特征	王璐, 刘子锐, 温天雪, 苗红妍, 王跃思 (1298)
2015年北京城区大气 PM _{2.5} 中 NH ₄ ⁺ 、NO ₃ ⁻ 、SO ₄ ²⁻ 及前体气体的污染特征	丁萌萌, 周健楠, 刘保献, 王焱, 张博韬, 石爱军, 杨懂艳, 常森 (1307)
北京市某垃圾焚烧厂周边大气二噁英污染特征及暴露风险	齐丽, 任玥, 刘爱民, 黄业茹, 赵震, 王江, 李泓 (1317)
北京和保定地区大气细颗粒物中可培养细菌的种群特征	胡亚东, 马安周, 吕鹏翼, 张杨, 庄国强 (1327)
基于实时交通数据的南京市主次干道机动车排放特征分析	李笑语, 吴琳, 邹超, 张意, 毛洪钧, 荆博宇 (1340)
过渡金属掺杂对铜锡烧绿石催化碳烟燃烧性能的影响	李曦峰, 孙宇琦, 王仲鹏, 牟宗刚, 崔兆杰 (1348)
南水北调中线北京段水质状况分析	徐华山, 赵磊, 孙昊苏, 任玉芬, 丁涛, 常帅, 王海东, 李森, 果钊 (1357)
三峡前置库汉丰湖试运行年水文水质变化特征	杨兵, 何丙辉, 王德宝 (1366)
基于偏最小二乘模型的河流水质对土地利用的响应	李琳琳, 张依章, 唐常源, 郑磊, 孟伟, 卢少勇, 敦宇 (1376)
抚仙湖夏季热分层时期水温及水质分布特征	王琳杰, 余辉, 牛勇, 牛远, 张有林, 刘倩, 吉正元 (1384)
千岛湖溶解氧与浮游植物垂向分层特征及其影响因素	俞焰, 刘德富, 杨正健, 张佳磊, 徐雅倩, 刘晋高, 严广寒 (1393)
高通量测序技术研究辽河真核浮游藻类的群落结构特征	王靖淇, 王书平, 张远, 林佳宁, 高欣, 臧小苗, 赵茜 (1403)
三门湾近海有机污染对浮游细菌群落的影响	戴文芳, 郭永豪, 郁维娜, 熊金波 (1414)
沉积物-水界面氮的源解析和硝化反硝化	金赞芳, 龚嘉临, 施伊丽, 金漫彤, 李非里 (1423)
广州南沙红树林湿地水体和沉积物中有机氯农药的残留特征	丁洋, 黄焕芳, 李绘, 罗杰, 郑煌, 孙焰, 杨丹, 张原, 祁士华 (1431)
太湖西岸河网沉积物中重金属污染特征及风险评价	边博, 周燕, 张琴 (1442)
锁磷剂对杭州西湖底泥磷释放的控制效果	朱广伟, 李静, 朱梦圆, 龚志军, 许海, 杨桂军, 张运林, 秦伯强 (1451)
超滤处理东江水不可逆膜污染物的识别和活性炭对其吸附去除	杨海燕, 王灿, 鄢忠森, 李冬平, 赵焱, 瞿芳术, 梁恒, 徐叶琴, 李圭白 (1460)
UV/SPS 降解水中三氯生的效能及动力学	李青松, 李学艳, 姚宁波, 骆靖宇, 李国新, 陈国元, 高乃云 (1467)
真空紫外-亚硫酸盐法降解 PFOS 影响因素	韩慧丽, 王宏杰, 董文艺 (1477)
g-C ₃ N ₄ 协同光催化还原 Cr(VI) 及氧化磺基水杨酸	李莉莉, 陈翠柏, 兰华春, 刘菲, 安晓强 (1483)
锆改性硅藻土吸附水中磷的研究	范艺, 王哲, 赵连勤, 吴德意 (1490)
3 种常规消毒方法对磺胺类抗性基因削减效果的比较	郑吉, 周振超, 陈芳, 陈涛, 魏媛媛, 韩玥, 陈红 (1497)
典型生活污水处理工艺对雌激素效应的去除	张秋亚, 马晓妍, 王晓昌, 游猛 (1506)
SRT 对酵母-SBR 处理油脂废水稳定性的影响	吕文洲, 张树林, 乔宇祥, 刘英 (1513)
分散染料 neocron black (NB) 的生物降解特性	杨波, 丁凤友, 徐辉, 李方, 田晴, 马春燕 (1520)
多聚磷酸盐激酶基因在污水生物除磷中的功能	南亚萍, 周国标, 袁林江 (1529)
生物膜短程硝化系统的恢复及其转化为 CANON 工艺的过程	付昆明, 周厚田, 苏雪莹, 王会芳 (1536)
厌氧氨氧化反应器脱氮性能及细菌群落多样性分析	曹雁, 王桐屿, 秦玉洁, 韩彬, 任君怡 (1544)
内环境调节层对厌氧生物反应器填埋场中氮转化的影响	何正坤, 宋博宇, 朱南文, 董军 (1551)
矿化垃圾中 Fe(III) 还原耦合 CH ₄ 厌氧去除特性	王立立, 何婷, 龙焰, 刘常宝 (1558)
应用铅同位素示踪研究泉州某林地垂直剖面土壤中重金属污染及来源解析	孙境蔚, 于瑞莲, 胡恭任, 苏光明, 王晓明 (1566)
畜禽粪便有机肥中重金属在土壤剖面中积累迁移特征及生物有效性差异	何梦媛, 董同喜, 茹淑华, 苏德纯 (1576)
山东省农田土壤多环芳烃的污染特征及源解析	葛蔚, 程琪琪, 柴超, 曾路生, 吴娟, 陈清华, 朱祥伟, 马东 (1587)
江汉平原典型土壤环境中有机磷农药的分布特征及影响因素	王建伟, 张彩香, 潘真真, 廖小平, 刘媛, 吕曲, 汤蜜 (1597)
基于生物有效性的农田土壤磷素组分特征及其影响因素分析	蔡观, 胡亚军, 王婷婷, 袁红朝, 王久荣, 李巧云, 葛体达, 吴金水 (1606)
秸秆还田对外源氮在土壤中转化及其微生物响应的影响	陈珊, 丁咸庆, 祝贞科, 王娟, 彭佩钦, 葛体达, 吴金水 (1613)
生物炭输入对城郊农业区农田地表反照率及土壤呼吸的影响	张阳阳, 胡学玉, 邹娟, 张迪, 陈威, 王向前, 陈窈君, 刘扬 (1622)
淹水水稻土消耗 N ₂ O 能力及机制	王玲, 邢肖毅, 秦红灵, 刘毅, 魏文学 (1633)
不同污水处理工艺非二氧化碳温室气体的释放	李惠娟, 彭党聪, 刘文博, 姚倩, 卓杨 (1640)
施用不同污泥堆肥品对土壤温室气体排放的影响	杨雨滢, 易建婷, 张成, 陈宏, 木志坚 (1647)
不同镉水平下纳米沸石对土壤 pH、CEC 及 Cd 形态的影响	迟苏琳, 徐卫红, 熊仕娟, 王卫中, 秦余丽, 赵婉伊, 张春来, 李彦华, 李桃, 张进忠, 熊治庭, 王正银, 谢德体 (1654)
不同作物对外源硒动态吸收、转运的差异及其机制	彭琴, 李哲, 梁东丽, 王梦柯, 郭璐 (1667)
褪黑素对水稻幼芽镍胁迫的缓解作用	刘仕翔, 黄益宗, 罗泽娇, 黄永春, 蒋航 (1675)
不同形态磺胺类药物在根-土界面的空间分布及毒性评价	金彩霞, 司晓薇, 王万峰, 王春峰, 王子英, 张琴文, 王婉 (1683)
三峡库区消落带沉积物对鱼体富集率的影响	孙松, 李楚娟, 张成, 王永敏, 王定勇 (1689)
重庆市居民头发重金属富集特征及其相关性分析	何明靖, 李琦, 王登祥, 赵佳渊, 杨婷 (1697)
16S rRNA 高通量测序研究集雨窖水中微生物群落结构及多样性	杨浩, 张国珍, 杨晓妮, 武福平, 赵炜, 张洪伟, 张翔 (1704)
石墨烯掺杂聚苯胺阳极提高微生物燃料电池性能	黄力华, 李秀芬, 任月萍, 王新华 (1717)
美国污染场地清理的风险评估简介及政策制定	容跃 (1726)
《环境科学》征稿简则 (1505) 《环境科学》征订启事 (1682) 信息 (1339, 1459, 1612)	

3 种常规消毒方法对磺胺类抗性基因削减效果的比较

郑吉¹, 周振超¹, 陈芳², 陈涛¹, 魏媛媛¹, 韩玥¹, 陈红^{1*}

(1. 浙江大学环境与资源学院环境工程研究所, 杭州 310058; 2. 杭州市环境监测中心站, 杭州 310007)

摘要: 近年来, 抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)对人类和环境的潜在风险引起了广泛关注. 本研究从 1 家城市污水处理厂二级出水中分离出两株磺胺类抗性细菌, 控制浓度投加到灭菌后的出水中, 分别进行氯消毒、紫外消毒、臭氧消毒处理, 采用菌落计数法、qPCR 法对消毒后目标细菌及磺胺类抗性基因(*sulI*、*sulII*)进行分析比较. 同时采用“消毒 + DNase I 酶”实验研究磺胺类抗性基因在各消毒过程中的行为特征. 结果表明, 3 种消毒均有效削减细菌浓度, 但对抗性基因削减程度不高. 结合“消毒 + DNase I 酶”实验分析, 氯消毒削减磺胺类抗性基因与微生物量的降低有关; 紫外消毒能直接破坏抗性基因; 而臭氧消毒在大量削减细菌量的同时, 抗性基因进入到胞外环境中, 其潜在环境风险不容忽视.

关键词: 消毒; 磺胺类; 抗生素抗性基因; DNase I 酶; 荧光定量 PCR

中图分类号: X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2017)04-1497-09 DOI: 10.13227/j.hjxx.201610059

Reducing Effect of Three Disinfection Technologies for Sulfonamides Resistance Genes

ZHENG Ji¹, ZHOU Zhen-chao¹, CHEN Fang², CHEN Tao¹, WEI Yuan-yuan¹, HAN Yue¹, CHEN Hong^{1*}

(1. Institute of Environmental Engineering, College of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. Hangzhou Environmental Monitoring Center, Hangzhou 310007, China)

Abstract: Antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment have gradually engendered extensive concern recently due to the harm caused to environment and human beings. In this study, two sulfonamides resistant bacteria isolated from secondary effluents of a municipal wastewater treatment plant were used to compare the efficacy of three different disinfection processes (chlorination, ultraviolet and ozone) in reducing sulfonamides resistance pollution using serial dilution plate counting method and qPCR. The behavior characteristics of sulfonamides resistance genes during the disinfection process were elucidated using disinfection + DNase I treatment. The results showed that all three disinfection techniques could reduce the concentration of target bacteria, but the abundance of sulfonamides resistance genes was still at a high level. Furthermore, chlorination disinfection might reduce sulfonamides resistance genes by reducing microbial biomass. Ultraviolet disinfection could damage genes directly. However, during ozone disinfection, sulfonamides resistance genes would escape to environment, and its potential environmental risks could not be ignored.

Key words: disinfection; sulfonamides; antibiotic resistance genes; DNase I; real-time quantitative PCR

抗生素自 19 世纪末被发现以来, 广泛应用于人类感染性疾病的控制和畜禽养殖、水产养殖. 但抗生素的不合理使用和长期滥用使得环境中微生物耐药性产生的选择压力增强, 导致环境中抗生素抗性细菌(antibiotic resistance bacteria, ARB)和抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)含量不断增加, 且抗性基因能通过遗传和水平基因转移在亲代和其他菌种间传播扩散, 对人类健康和生态平衡造成危害. 抗生素和抗生素抗性基因已经被认为是新型环境污染物^[1,2]. 污水处理厂是人类活动产生污水的交汇点, 同样也是抗性细菌和抗性基因的储存库^[3]. 目前的研究表明, 现有的各类污水处理厂工艺对抗性基因有一定的去除效果, 但是出水中抗性基因仍处于一个较高的丰度^[3~5], 存在一定的环境风险. 故需要有针对性地研究抗性基因污染问题, 结合现有的污水处理工艺, 提出合适的控制技术^[6~8].

消毒是污水处理过程中杀灭微生物的水处理过程, 是保障污水处理厂尾水水质安全必不可少的环节. 消毒处理在杀灭微生物的同时, 也可能削减抗性基因^[9,10]. 但是, 目前对不同消毒削减抗性基因的影响因素和具体机制仍尚不明确. 此外, 消毒对抗性基因的削减效果还受到其抗性细菌影响, 不同抗性细菌对其携带的抗性基因可能有不同的保护作用^[10]. Huang 等^[11]对 1 株未携带抗性基因的大肠杆菌和携带 *tetA* 的大肠杆菌进行紫外和氯消毒研究发现, 携带抗性基因的菌株表现出更高的消毒耐受性. 虽然目前对于氯消毒、紫外消毒、臭氧消毒等

收稿日期: 2016-10-12; 修订日期: 2016-11-17

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2014ZX07101-012); 国家自然科学基金项目(21271117, 21210008)

作者简介: 郑吉(1992~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为环境抗生素抗性基因污染及控制, E-mail: zhengji@zju.edu.cn

* 通信作者, E-mail: chen_hong@zju.edu.cn

常规消毒方法杀灭细菌的机制有了较为成熟的理论^[12,13],但抗性基因在消毒过程中的行为特征有待讨论. 本研究采用“消毒 + DNaseI 酶”实验来研究抗性基因在各消毒过程中的行为特征. 有研究表明,DNA 可游离于细胞体之外,成为游离态 DNA,并在环境中维持较长时间^[14]. 游离态 DNA 上的抗性基因则可能通过基因水平转移途径重新进入细菌,继续产生环境危害^[15]. DNaseI 酶是 1 种 DNA 降解酶,应用其对水环境中胞外游离态 DNA 进行降解,有助于了解消毒方法削减水中抗性基因的机制^[16].

磺胺类药是人工合成的抗生素,自 1935 年临床应用以来,仅 80 余年就已产生明显的环境耐药性问题^[17,18]. 本研究从磺胺类抗性基因入手,分析氯消毒、紫外消毒、臭氧消毒等常规消毒方法对抗性基因的削减作用. 从某污水处理厂二级出水中分离出磺胺类抗性细菌,并挑取典型的革兰氏阳性菌和阴性菌各 1 株,确定其中的磺胺类抗性基因种类及菌株种类. 以上述两株细菌为实验对象,污水厂二级出水灭菌后作为实验水样,控制上述细菌浓度投加到实验水样中,比较研究消毒对抗性细菌和抗性基因的削减效果. 同时,利用“消毒 + DNaseI 酶”实验研究磺胺类抗性基因在消毒过程中的行为特征,以期理解消毒削减抗性基因的机制,并为污水中抗性基因污染的控制方法提供新思路.

1 材料与方法

1.1 实验菌株筛选

采集浙江临安某污水处理厂氧化沟出水(二级出水),采用稀释、涂布分离方法在磺胺类选择培养基平板上筛选磺胺类抗性细菌. 磺胺类选择培养基

配置方法为:蛋白胨 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,酵母提取物 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,氯化钠 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,调节 pH 至 7 后 121°C 、20 min 高压灭菌,在完全凝固前趁温加入磺胺甲噁唑母液至浓度为 $50.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[17,19]. 母液浓度 $40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,采用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液在避光条件下溶解配置. 30°C 、24 h 培养后,挑取单菌落分离纯化,采用细菌基因组提取试剂盒 TIANamp Bacteria DNA Kit (TIANGEN, China) 提取细菌 DNA,由上海睿迪生物科技有限公司测定 16S rRNA 序列,测序结果通过使用 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 的 BLAST 进行序列同源性检索比对,确定单菌株菌种. 选择典型革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌各 1 株,采用普通 PCR 法对两株细菌分别进行磺胺类抗性基因(*sulI*、*sulII*、*sulIII*、*sulA*)及 16S rRNA、*intII* 基因进行定性检测,分析其基因类型.

PCR 体系为: $10 \times \text{PCR buffer (Mg}^{2+})$ $2.5 \mu\text{L}$, $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP $2.0 \mu\text{L}$, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 上游引物 $1.0 \mu\text{L}$, $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 下游引物 $1.0 \mu\text{L}$, 5U *Taq* 酶 $0.3 \mu\text{L}$, ddH₂O $17.2 \mu\text{L}$, DNA 样品 $1.0 \mu\text{L}$. 各基因引物见表 1. 在 PCR 循环仪 (TIANLONG, China) 中进行扩增,PCR 扩增条件为: 95°C 预变性 5 min 后, 95°C 变性 15 s, 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 共 35 个循环,最后 72°C 下延伸 7 min. 普通 PCR 完成后,取 $5 \mu\text{L}$ PCR 反应产物,与 $6 \times \text{Loading buffer Dye}$ 混合均匀后,使用经 EB 染色的 1.5% 的琼脂糖凝胶,在 120 V 电压下电泳 30 min 检测扩增条带. 使用全自动凝胶成像仪 (PEIQING, China) 对琼脂糖凝胶进行拍照,分析所得 PCR 产物长度并与表 1 中提供的扩增片段相比较.

表 1 各基因引物序列及退火温度

Table 1 Primer sequence and annealing temperature of each gene

基因	引物	序列(5'-3')	扩增片段/bp	退火温度/ $^\circ\text{C}$	扩增效率/%	文献
<i>sulI</i>	<i>sulI</i> -F	CACCGGAAACATCGCTGCA	158	55	98.05	[20]
	<i>sulI</i> -R	AAGTTCCGCCGCAAGGCT				
<i>sulII</i>	<i>sulII</i> -F	CTCCGATGGAGGCCGTAT	190	60	96.45	[20]
	<i>sulII</i> -R	GGGAATGCCATCTGCCTTGA				
<i>sulIII</i>	<i>sulIII</i> -F	TCCGTTTACGCAATTGTTGCAG	128	60	/	[17]
	<i>sulIII</i> -R	TTCGTTTACGCCTTACACCAGC				
<i>sulA</i>	<i>sulA</i> -F	TCTTGAGCAAGCACTCCAGCAG	299	60	/	[17]
	<i>sulA</i> -R	TCCADCTTAGCAACCACATGG				
16S rRNA	1369F	CGGTGAATACGTTTCYCGG	143	55	101.16	[21]
	1492R	GGWTACCTTGTTACGACTT				
<i>intII</i>	<i>intII</i> -F	CCTCCCGCACGATGATC	280	63	98.37	[22]
	<i>intII</i> -R	TCCACGCATCGTCAGGC				

本研究采用菌株为: ① 琼氏不动杆菌, *Acinetobacter junii*, 革兰氏阴性, 16S rRNA 序列 NCBI 登录号: KY120958; ② 枯草芽孢杆菌, *Bacillus subtilis*, 革兰氏阳性, 16S rRNA 序列 NCBI 登录号: KY121111. 两者均含有 *sulI*、*sulII*, 不含有 *sulIII*、*sulA*, 故下文对磺胺类抗性基因的研究主要集中于 *sulI*、*sulII*。

1.2 实验水样准备

将实验菌株培养 30℃、24 h 后的菌液 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 弃上清液收集菌体, 用无菌 PBS 重悬, 利用 0.5 号麦氏比浊管控制细菌浓度约为 1.5 × 10⁸ CFU·mL⁻¹. 污水处理厂二级出水采用 0.22 μm 膜进行过滤灭菌后, 将细菌 PBS 溶液以 1:14 的比例投加至水样中, 使最终实验水样细菌浓度约为 10⁷ CFU·mL⁻¹ (模拟现实水样细菌浓度)。

1.3 氯消毒

氯消毒剂采用次氯酸钠溶液, 将其稀释至有效氯 10 g·L⁻¹, 并置于棕色试剂瓶中在 4℃ 下避光保

存, 实验前测定实际有效氯含量后立即使用. 取 1 L 水样, 滴加次氯酸钠溶液, 使样品中的有效氯浓度依次达到设定值 (1、2、3、4、5 mg·L⁻¹). 实验水样体积为 1 L, 氯消毒接触时间为 30 min. 在氯消毒完成后, 投加 5 mg·L⁻¹ 的硫代硫酸钠溶液终止消毒反应. 每次消毒实验重复 3 次, 下同。

1.4 紫外消毒

紫外线消毒处理在实验室自主设计的紫外线平行光束仪装置内进行, 平行光束仪内含有 5 根不同功率的低压紫外 UV₂₅₄ 灯管, 灯光水平中心线距离实验水样表面 50 cm. 紫外线平行光束仪装置示意图如图 1 所示, 从灯管发出的紫外线经平行光柱, 均匀地辐照到反应容器 (20 cm × 20 cm × 5 cm). 实验水样体积为 1 L, 控制紫外灯强度不变, 通过调节照射时间以获得不同的紫外剂量 (5、10、15、20、25 mJ·cm⁻²). 为避免光复活效应, 经紫外消毒处理后, 立即进行下一步的样品处理和检测。

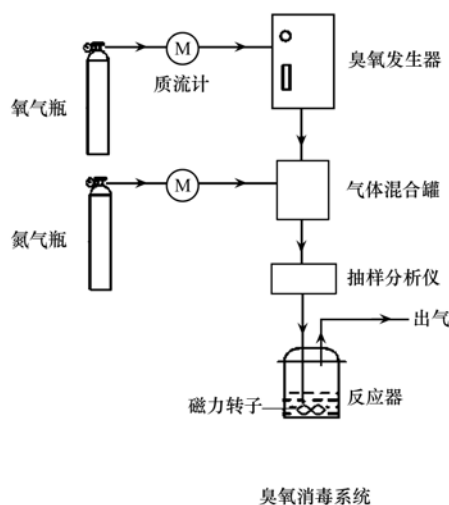
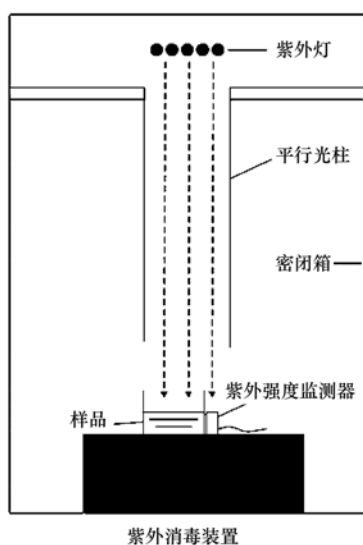


图 1 紫外消毒与臭氧消毒装置示意

Fig. 1 Set-up diagram used in ultraviolet and ozone disinfection

1.5 臭氧消毒

臭氧消毒处理采用 VMUS-DG 臭氧发生器 (AZCO, Canada). 气路上装有流量计和臭氧分析仪 UV100 (ECO, USA), 用以测量进出气体中的臭氧浓度, 如图 1 所示. 实验水样体积为 1 L, 通过调节气体流速和臭氧浓度, 使臭氧消毒接触时间为 10 min 时, 臭氧投加量达到目标设定值 (2、4、6、8、10 mg·L⁻¹).

1.6 DNaseI 处理

向消毒处理后的水样中加入 500 U 单位 DNaseI

(约可降解 250 μg DNA, 大于水样中总 DNA 含量), 15℃ 反应振荡 2 h.

1.7 菌落计数法

本研究使用菌落计数法来确定水样中的磺胺类抗性细菌数目. 用无菌水对水样进行梯度稀释, 各取 100 μL 水样稀释液于磺胺类选择培养基平板上, 用玻璃刮刀涂布均匀, 平行 3 份, 30℃、24 h 培养后, 进行菌落计数 (CFU·mL⁻¹).

1.8 荧光定量 PCR

本研究使用荧光定量 PCR 法检测抗性基因的

绝对丰度. 水样采用 FastDNA Spin Kit for soil 试剂盒(MP, USA)提取 DNA, 使用微量蛋白质核酸分析仪(Nanodrop, USA)测定 DNA 浓度, 置于 -85°C 保存.

荧光定量 PCR 标准曲线的建立: 普通 PCR 扩增得到的目的基因序列使用 Biospin 凝胶回收试剂盒(BIOER, China)进行纯化回收 PCR 产物, 后测量 DNA 含量、纯度并调节至合适浓度后, 连接 pMD19-T 载体, 转化入 *E. coli* 感受态细胞 DH5 α , 将感受态细胞涂于含有氨苄青霉素、X-gal 和 IPTG 的 LB 固体培养基上培养 12 ~ 16 h; 通过蓝白斑筛选挑取白色重组菌斑, 挑选阳性克隆子用 LB 培养液扩大培养, 待菌液混浊后, 取 1 mL 菌液测序插入基因片断. 测序结果通过使用 BLAST 进行序列同源性检索比对; 其余 3 ~ 4 mL 菌液用来提取质粒, 使用 QIAGEN 质粒专用提取试剂盒(QIAPREP, Germany)进行质粒抽提, 确保质粒 DNA 的 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8 左右. 符合要求的质粒, 作为标准品计算其浓度[质粒浓度的计算公式为: 浓度 = (质量 $\div$ 相对分子质量) $\times 6.02 \times 10^{23}$]. 将已知拷贝数的质粒标准品依次进行 10 倍稀释, 并且保持质粒浓度在 $10^8 \sim 10^2$ 之间. 标线扩增效率见表 1.

定量 PCR 反应在 Bio-rad IQ5 荧光定量 PCR 仪器(Bio-Rad, USA)中进行. 定量 PCR 反应的反应液体系: 7.5 μL SYBR Premix Ex Taq 溶液, 0.3 μL ROX Reference 溶液, 0.3 μL 浓度为 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的正向引物, 0.3 μL 浓度为 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的反向引物, 4.6 μL ddH $_2\text{O}$. 反应液体系在 100 μL 96 孔反应板的反应孔中进行. 定量 PCR 反应程序为预变性 95°C 下热变性 30 s; 然后进入 40 个循环的扩增阶段, 包括 95°C 变性 5 s, 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 延伸的同时扫描荧光信号. 溶解曲线程序为 $55 \sim 95^{\circ}\text{C}$ 之间, 每 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 读数, 其间停留 30 s. 每个样品做 3 次重复.

1.9 数据处理

数据采用 Excel 2010 和 Origin 9.0 软件进行分析.

2 结果与讨论

2.1 3 种消毒方法对磺胺类抗性细菌的削减效果

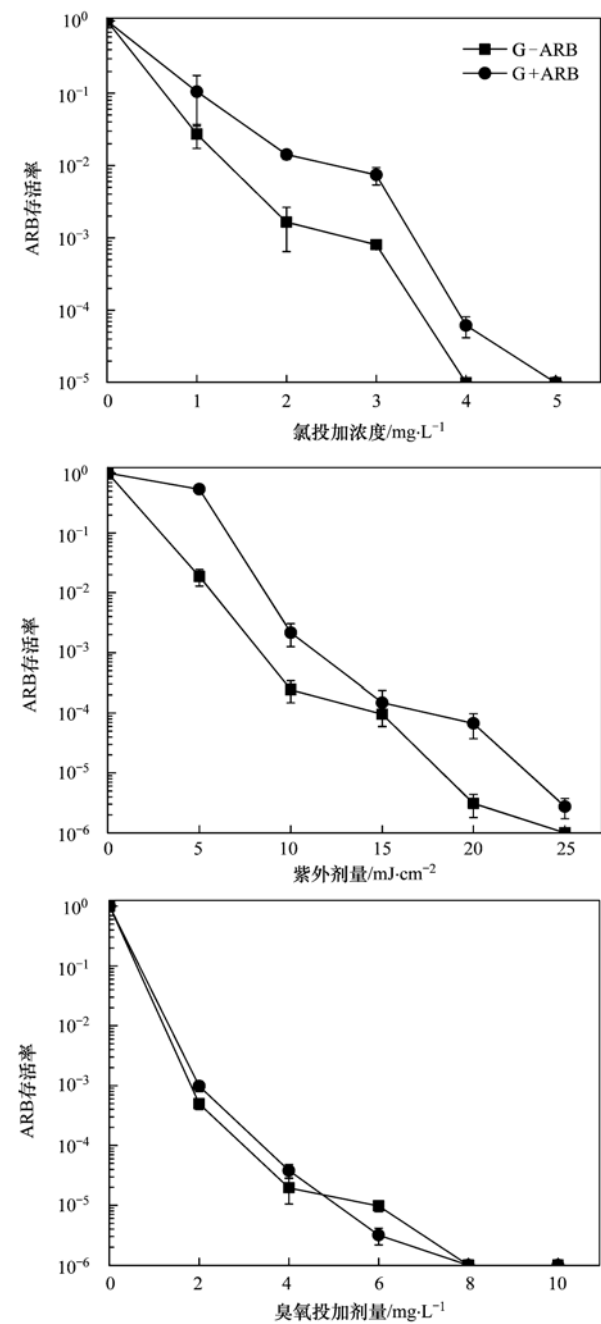
不同消毒方法对实验水样中的磺胺类抗性菌株均有一定的去除效果, 且在低剂量浓度下, 抗性细菌的削减效果随着消毒剂量的增加而提高, 在实验设置的最高剂量(5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯投加浓度, 25 $\text{mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$

紫外剂量, 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 臭氧投加浓度)下, 实验水样中的抗性细菌大多已被灭活, 如图 2 所示. 当消毒剂量达到一定水平后, 抗性细菌均不能被菌落计数法检测. 在两种细菌的比较中, 实验发现枯草芽孢杆菌(革兰氏阳性菌)的耐受性强于琼氏不动杆菌(革兰氏阴性菌), 这可能与革兰氏阳性菌的细胞壁保护作用有关, 其能阻碍自由氯和臭氧分子的穿透, 一定程度上保护细菌. 在紫外消毒中, McKinney 等^[10]也发现了类似现象, 他们深入研究后认为, 这可能与两种细菌基因序列中总基因组大小不同有关. 紫外消毒导致 DNA 中的嘧啶经过光化学的破坏, 相邻胸腺嘧啶产生二聚作用. 细菌的 DNA 中多数胸腺嘧啶二聚物的形成阻止了 DNA 复制和最终导致细胞死亡, 达到消毒的目的. 革兰氏阳性菌的总基因组更小, 意味着它们有更少的潜在嘧啶二聚体目标, 所以枯草芽孢杆菌对紫外的敏感性更低.

对消毒剂消毒效果的比较, 可以采用 CT 值(concentration-time value)来衡量^[23]. CT 值是消毒剂的浓度和作用时间的乘积, 用于比较消毒剂杀菌作用的指标, CT 值越低消毒效果越好. 将氯消毒和臭氧消毒相对比, 当琼氏不动杆菌的削减率达到 3 个数量级左右时, 氯消毒的 CT 值为 90 $\text{mg} \cdot (\text{min} \cdot \text{L})^{-1}$, 而臭氧消毒的 CT 值为 20 $\text{mg} \cdot (\text{min} \cdot \text{L})^{-1}$, 可以看出, 臭氧的 CT 值远远小于氯. 因此臭氧削减目标细菌所需时间更短, 效率更高. 此外, 污水厂常使用紫外消毒作为深度处理工艺, 使用的辐照剂量在 30 $\text{mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ 以下^[24, 25]. 本研究中, 25 $\text{mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ 消毒剂量下, 琼氏不动杆菌和枯草芽孢杆菌基本灭活, 研究表明通常污水厂所设置的辐射剂量能灭活磺胺类抗性细菌.

2.2 3 种消毒方法对磺胺类抗性基因的削减效果

目前各消毒方法的评价都是以微生物的削减程度来衡量的, 但是根据实验结果, 发现削减微生物的量并不直接等同于削减抗性基因的量. 图 3 为实验水样在不同消毒剂量下磺胺类抗性基因的变化情况, 可知在消毒过程中, 磺胺类抗性基因大体上是随着消毒剂量的增加而下降的. 氯消毒中削减效果较为明显, 在本实验设置的最低浓度 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 琼氏不动杆菌水样的 *sulII* 绝对丰度削减率为 78.9%, 枯草芽孢杆菌水样的 *sulII* 绝对丰度削减率为 70.5%. *sulIII* 的削减率要高于 *sulI*, 但是随着消毒剂量的上升, *sulI* 基因丰度也有明显的下降, 氯消毒浓度达到 3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 枯草芽孢杆菌水样的 *sulI* 绝对丰度削减率由 2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 29.7% 上升到 77.9%.



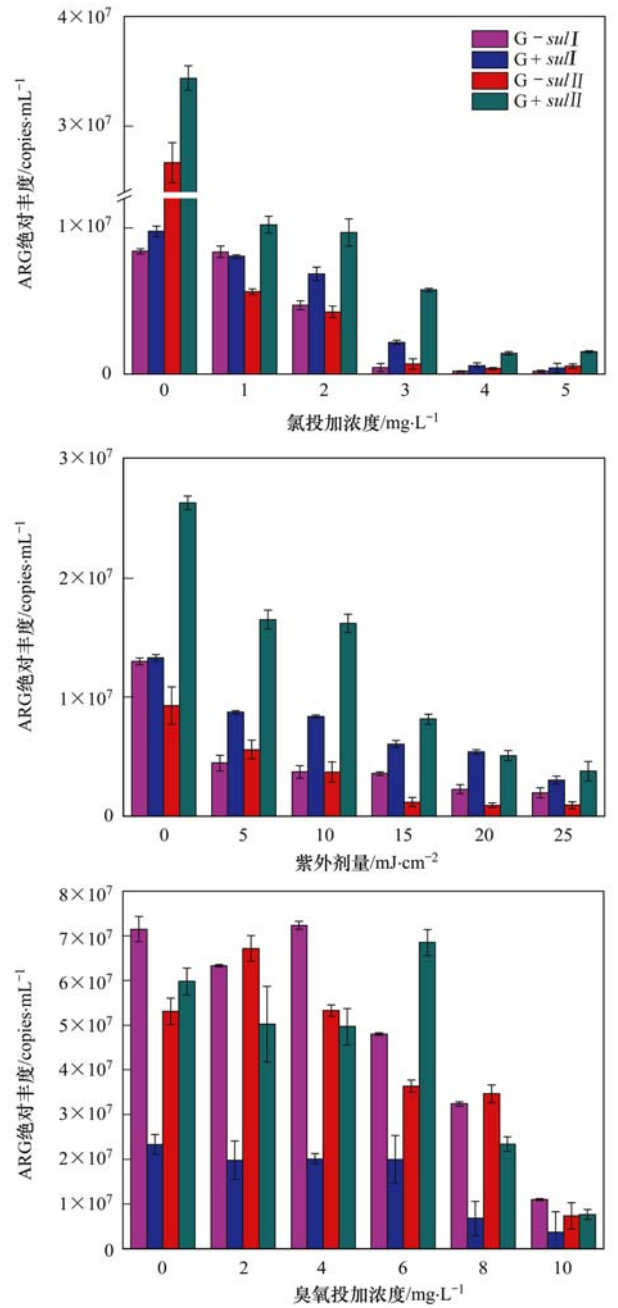
G - ARB: 琼氏不动杆菌水样; G + ARB: 枯草芽孢杆菌水样; ARB 存活率为存活量与初始量的比值, 两者单位为 CFU · mL⁻¹

图 2 不同消毒方法中磺胺类抗性细菌数量的变化

Fig. 2 Change of ARB's concentration in different disinfections

在氯消毒浓度达到 4 mg · L⁻¹ 时, 两种不同目标细菌 *sulI*、*sulIII* 绝对丰度削减率都能达到 95.0% 以上。琼氏不动杆菌水样与枯草芽孢杆菌水样磺胺类抗性基因的基因丰度随氯消毒浓度的变化规律基本一致, 但琼氏不动杆菌水样的削减率高于枯草芽孢杆菌水样。结合磺胺类抗性基因丰度和 16S rRNA 基因丰度之间的相关性分析发现, 氯消毒过程中, 琼氏不动杆菌水样中 *sulIII* 基因与 16S rRNA 基因呈现正相

关关系 ($P < 0.05$), R^2 为 0.90 (如图 4); 枯草芽孢杆菌水样中 *sulI*、*sulIII* 基因均与 16S rRNA 基因呈现正相关关系 ($P < 0.05$), R^2 分别为 0.77 和 0.59。16S rRNA 基因的丰度在一定程度上反映了样品中的微生物量, 这表明氯消毒削减磺胺类抗性基因主要和微生物量的降低有关。



G - *sulI*、G - *sulIII*: 琼氏不动杆菌水样中 *sulI*、*sulIII* 基因; G + *sulI*、G + *sulIII*: 枯草芽孢杆菌水样中 *sulI*、*sulIII* 基因

图 3 不同消毒方法中磺胺类抗性基因绝对丰度的变化

Fig. 3 Change of ARGs' abundance in different disinfections

紫外消毒和臭氧消毒对磺胺类抗性基因的削减效果一般, 在设置的最高剂量 (25 mJ · cm⁻² 紫外剂量, 10 mg · L⁻¹ 臭氧投加浓度) 下, *sulI* 绝对丰度削

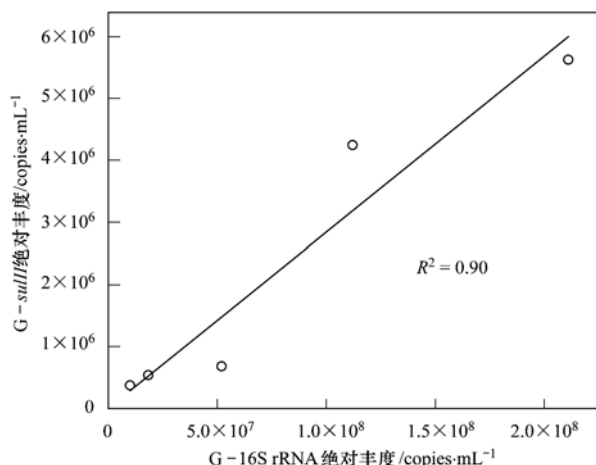


图4 氯消毒中琼氏不动杆菌16S rRNA与 *sulII* 拟合曲线

Fig. 4 Fitting curve for abundance of *Acinetobacter junii*'s 16S rRNA to abundance of *sulII* in chlorination

减率为 84.9%、84.6% (琼氏不动杆菌) 和 77.4%、84.3% (枯草芽孢杆菌), *sulII* 绝对丰度削减率为 89.9%、86.2% (琼氏不动杆菌) 和 85.7%、87.2% (枯草芽孢杆菌), 抗性基因绝对丰度仅下降不到一个数量级, 仍处于较高程度。同时, 有研究认为, 低剂量氯消毒 ($< 40 \text{ mg} \cdot \text{min} \cdot \text{L}^{-1}$) 促进细菌接合转移^[26], 在现实环境中, 消毒对抗性基因的抑制作用可能更弱。臭氧消毒过程中磺胺类抗性基因的削减规律呈现波动, 臭氧消毒浓度为 $0 \sim 6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 削减情况呈现波动, 对磺胺类抗性基因基本无削减效果 (平均削减率为 9.1%), 浓度达到 $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时平均削减率升至 55.3%, 呈现一定下降趋势, 可以认为低浓度臭氧消毒对磺胺类抗性基因的削减效果并不明显。比较臭氧消毒和氯消毒对磺胺类抗性基因的削减效果, 当枯草芽孢杆菌 *sulI* 绝对丰度削减率达到 80.0% 左右时, 氯消毒的 CT 值为 $90 \text{ mg} \cdot (\text{min} \cdot \text{L})^{-1}$, 而臭氧消毒的 CT 值为 $100 \text{ mg} \cdot (\text{min} \cdot \text{L})^{-1}$, 其他情况下也能分析到相似结论, 这与削减抗性细菌的结果截然相反。氯消毒过程中, 抗性基因的削减与微生物量减少相关, 这表明臭氧消毒中, 抗性基因的减少可能不是由于微生物量的减少, 抗性细菌减少时抗性基因仍得到一定程度的保存。同时, 磺胺类抗性基因丰度和 16S rRNA 基因丰度的相关性分析表明, 两种水样 *sulI*、*sulII* 基因均与 16S rRNA 基因相关性不显著 ($P > 0.05$)。臭氧消毒和紫外消毒中, 抗性细菌被杀灭后, 抗性基因的行为特征需要进行深入研究。

此外, 对两种细菌进行对比发现, 两者在氯消毒和紫外消毒过程中的变化规律基本一致, 但是琼氏不动杆菌 (革兰氏阴性菌) 中磺胺类抗性基因的削

减率高于枯草芽孢杆菌 (革兰氏阳性菌)。在 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯消毒浓度时, 琼氏不动杆菌 *sulI*、*sulII* 基因削减率分别为 94.8% 和 97.4%, 而枯草芽孢杆菌 *sulI*、*sulII* 基因削减率为 77.8% 和 83.3%, 表明磺胺类抗性基因在不同种类细菌中对氯消毒的耐受性有一定差别, 革兰氏阳性菌耐受性强于革兰氏阴性菌, 这与抗性细菌的削减情况相同, 符合氯消毒削减磺胺类抗性基因主要和微生物量的降低有关的结论。在 $10 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ 紫外消毒剂量时, 琼氏不动杆菌 *sulI*、*sulII* 基因削减率分别为 71.4% 和 60.0%, 而枯草芽孢杆菌 *sulI*、*sulII* 基因削减率为 37.2% 和 38.6%, 表明紫外消毒中抗性基因的削减仍受到细菌种类的影响。值得注意的是, 有研究对污水紫外消毒进行深入研究发现, UV 消毒在减小细菌多样性的同时, 会提高抗性基因在污水中的相对丰度^[27]。抗生素抗性细菌和非抗性细菌在紫外消毒过程中的不同表现同样会减少抗性基因的削减率。在臭氧消毒中, 两种细菌的削减率变化无明显规律, 臭氧消毒可能与细菌种类无明显关系。

2.3 应用 DNaseI 研究消毒中磺胺类抗性基因削减的机制

3 种消毒方法均能削减两种目标细菌丰度和抗性基因丰度, 但细菌和基因丰度的削减程度相差很多, 例如 $20 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ 紫外消毒下, 消毒前后细菌浓度相差 5 个数量级, 而抗性基因的丰度相差仅为 $0 \sim 1$ 个数量级, 磺胺类抗性基因丰度仍高达 $10^5 \sim 10^6 \text{ copies} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。表明基因在其细菌被杀死后可能仍独立于细胞体外存留, 抗生素抗性基因亦可能包含其中, 并在特定条件下, 又会进入其他细胞中重新表现出耐药性, 从而继续传播^[28]。本研究选择 $3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (氯消毒)、 $10 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2}$ (紫外消毒)、 $6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (臭氧消毒) 剂量消毒后实验水样, 进行 DNaseI 处理, 图 5 为 DNaseI 处理前后实验水样中磺胺类抗性基因丰度的变化情况。经过 DNaseI 处理后, 目标细菌磺胺类抗性基因丰度均有明显的下降。其中, 臭氧消毒前后磺胺类抗性基因丰度变化最大, 例如琼氏不动杆菌氯消毒、紫外消毒水样中 *sulI* 基因在 DNaseI 处理前后比例分别为 28.5% 和 67.5%, 而臭氧消毒水样在 DNaseI 处理后仅剩 4.3%, 即有 95.7% 的去除率, 明显高于氯消毒和紫外消毒。氯消毒水样中经过 DNaseI 处理后的去除率基本高于紫外消毒。实验表明, 臭氧消毒后, 磺胺类抗性基因主要存在于水环境中的游离态 DNA。

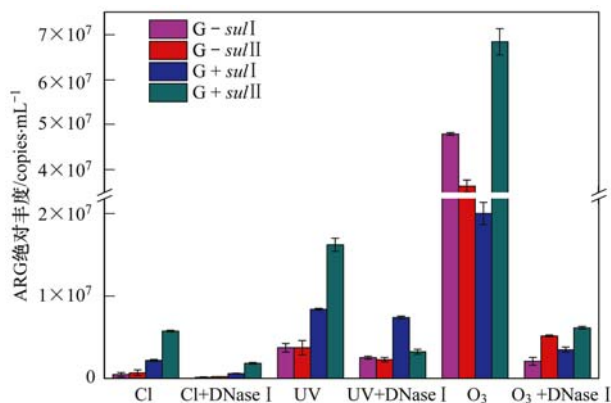
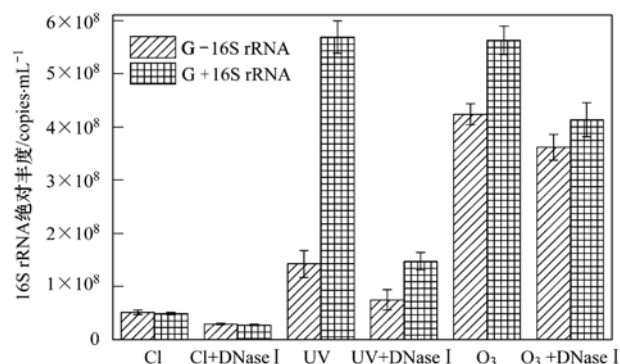


图5 DNaseI 处理前后磺胺类抗性基因丰度的变化

Fig. 5 Change of ARGs' abundance before and after disinfection + DNase I treatment



G-16S rRNA、G+16S rRNA: 琼氏不动杆菌水样中16S rRNA基因; G+ *intI1*、G+ *intI2*: 枯草芽孢杆菌水样中 *intI1* 基因

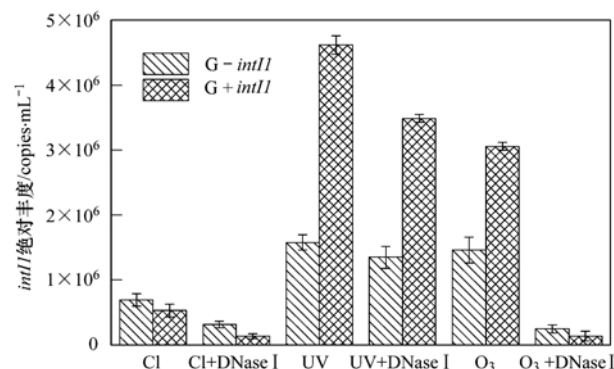
图6 DNaseI 处理前后实验水样中16S rRNA和 *intI1* 基因

Fig. 6 Change of 16S rRNA's and *intI1*'s abundance before and after disinfection + DNase I treatment

DNA 中磺胺类抗性基因的削减情况基本与 16S rRNA 的削减情况一致, 这均表明, 氯消毒对磺胺类抗性基因的削减主要与减少细菌量有关. 在紫外消毒方面, 游离态 DNA 中磺胺类抗性基因的含量不高, 而紫外消毒的机制主要是细胞的 DNA 中的胸腺嘧啶经过光化学的破坏, 相邻的嘧啶产生二聚作用. 细菌的 DNA 中多数胸腺嘧啶二聚物的形成阻止了 DNA 复制和最终导致细胞死亡, 达到消毒的目的^[10]. 之前的研究结果同样表明, 紫外消毒过程中不同种类细菌所携带抗性基因呈现不同的表现, 表明紫外消毒对磺胺类抗性基因的削减主要是直接破坏磺胺类抗性基因, 达到削减的效果.

值得关注的是, 臭氧消毒中, DNaseI 对 16S rRNA 基因丰度削减率不高 (琼氏不动杆菌水样和枯草芽孢杆菌水样分别为 14.6% 和 25.9%), 而对 *intI1* 基因丰度的削减相对较高 (琼氏不动杆菌水样和枯草芽孢杆菌水样分别为 83.0% 和 95.5%), 这表明游离态 DNA 中 16S rRNA 基因含量不高, *intI1* 基因含量高. 这与臭氧消毒能有效杀灭目标细

菌, 而对磺胺类抗性基因削减率不高的实验现象基本符合. 目前对臭氧消毒机制观点主要有以下两点: ① 臭氧能氧化分解细菌内部葡萄糖氧化酶, 破坏细胞的核酸, 分解 DNA、RNA、蛋白质、脂肪和多糖等大分子聚合物, 使细菌的物质代谢生长和繁殖过程遭到破坏. ② 臭氧能渗透细胞膜组织, 侵入细胞膜内作用于外膜脂蛋白和内部的脂多糖, 使细胞发生畸变, 导致细胞的溶解死亡^[23]. 这表明臭氧消毒的机制可能主要为侵入细胞膜内作用于外膜脂蛋白和内部的脂多糖, 使细胞发生畸变, 导致细胞的溶解死亡, 大量含有抗性基因的游离 DNA 就散逸到水环境中, 仍具有潜在的环境风险.



3 结论

(1) 氯消毒、紫外消毒、臭氧消毒对城市污水处理厂尾水中磺胺类抗性细菌有较好的灭菌效果, 受到消毒剂量和细菌种类的影响, 但对磺胺类抗性基因的控制效果不够理想.

(2) 氯消毒削减磺胺类抗性与细菌量的减少有

关,紫外消毒过程中磺胺类抗性基因可能被直接破坏而被削减,而臭氧消毒过程中磺胺类抗性基因随游离态 DNA 进入到环境中,存在潜在的环境问题,需要引起关注。

参考文献:

- [1] Pruden A, Pei R T, Storteboom H, *et al.* Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado [J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, **40** (23): 7445-7450.
- [2] 罗义,周启星. 抗生素抗性基因(ARGs)——一种新型环境污染[J]. *环境科学学报*, 2008, **28**(8): 1499-1505.
- Luo Y, Zhou Q X. Antibiotic resistance genes (ARGs) as emerging pollutants [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, **28**(8): 1499-1505.
- [3] Mao D Q, Yu S, Rysz M, *et al.* Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants [J]. *Water Research*, 2015, **85**: 458-466.
- [4] Chen H, Zhang M M. Occurrence and removal of antibiotic resistance genes in municipal wastewater and rural domestic sewage treatment systems in eastern China [J]. *Environment International*, 2013, **55**: 9-14.
- [5] Oh J, Salcedo D E, Medrano C A, *et al.* Comparison of different disinfection processes in the effective removal of antibiotic-resistant bacteria and genes [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2014, **26**(6): 1238-1242.
- [6] 佟娟,魏源送. 污水处理厂削减耐药菌与抗性基因的研究进展[J]. *环境科学学报*, 2012, **32**(11): 2650-2659.
- Tong J, Wei Y S. State-of-the-art removal of antibiotic resistance bacteria (ARB) and antibiotic resistance gene (ARG) in wastewater treatment plants (WWTPs) [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2012, **32**(11): 2650-2659.
- [7] Zhang Y Y, Zhuang Y, Geng J J, *et al.* Inactivation of antibiotic resistance genes in municipal wastewater effluent by chlorination and sequential UV/chlorination disinfection [J]. *Science of the Total Environment*, 2015, **512-513**: 125-132.
- [8] Pruden A, Larsson D G J, Amézquita A, *et al.* Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2013, **121**(8): 878-885.
- [9] Dodd M C. Potential impacts of disinfection processes on elimination and deactivation of antibiotic resistance genes during water and wastewater treatment [J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2012, **14**(7): 1754-1771.
- [10] McKinney C W, Pruden A. Ultraviolet disinfection of antibiotic resistant bacteria and their antibiotic resistance genes in water and wastewater [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, **46** (24): 13393-13400.
- [11] Huang J J, Hu H Y, Wu Y H, *et al.* Effect of chlorination and ultraviolet disinfection on tetA-mediated tetracycline resistance of *Escherichia coli* [J]. *Chemosphere*, 2013, **90**(8): 2247-2253.
- [12] Anastasi E M, Wohlsen T D, Stratton H M, *et al.* Survival of *Escherichia coli* in two sewage treatment plants using UV irradiation and chlorination for disinfection [J]. *Water Research*, 2013, **47**(17): 6670-6679.
- [13] Lee O M, Kim H Y, Park W, *et al.* A comparative study of disinfection efficiency and regrowth control of microorganism in secondary wastewater effluent using UV, ozone, and ionizing irradiation process [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, **295**: 201-208.
- [14] Niemeyer J, Gessler F. Determination of free DNA in soils [J]. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2002, **165**(2): 121-124.
- [15] Ferro G, Guarino F, Castiglione S, *et al.* Antibiotic resistance spread potential in urban wastewater effluents disinfected by UV/H₂O₂ process [J]. *Science of the Total Environment*, 2016, **560-561**: 29-35.
- [16] Romanowski G, Lorenz M G, Wackernagel W, *et al.* Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNase I [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, **57**(4): 1057-1061.
- [17] Pei R T, Kim S C, Carlson K H, *et al.* Effect of River Landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG) [J]. *Water Research*, 2006, **40**(12): 2427-2435.
- [18] 金明兰,刘凯,徐莹莹,等. 污水处理厂中磺胺类抗生素、抗性菌、抗性基因的特性 [J]. *环境工程*, 2015, **33**(11): 1-4.
- Jin M L, Liu K, Xu Y Y, *et al.* Characteristics of sulfonamide antibiotics, resistant bacteria, resistance genes in sewage treatment plant [J]. *Environmental Engineering*, 2015, **33** (11): 1-4.
- [19] Gao P, Munir M, Xagorarakis I. Correlation of tetracycline and sulfonamide antibiotics with corresponding resistance genes and resistant bacteria in a conventional municipal wastewater treatment plant [J]. *Science of the Total Environment*, 2012, **421-422**: 173-183.
- [20] Luo Y, Mao D Q, Rysz M, *et al.* Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China [J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, **44**(19): 7220-7225.
- [21] Gaze W H, Zhang L H, Abdoulsam N A, *et al.* Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment [J]. *The ISME Journal*, 2011, **5**(8): 1253-1261.
- [22] Goldstein C, Lee M D, Sanchez S, *et al.* Incidence of class 1 and 2 integrase in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, **45**(3): 723-726.
- [23] Pak G J, Salcedo D E, Lee H, *et al.* Comparison of antibiotic resistance removal efficiencies using ozone disinfection under different pH and suspended solids and humic substance concentrations [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, **50**(14): 7590-7600.
- [24] Hallmich C, Gehr R. Effect of pre-and post-UV disinfection conditions on photoreactivation of fecal coliforms in wastewater effluents [J]. *Water Research*, 2010, **44**(9): 2885-2893.
- [25] 景明,王磊. 污水回用中主要病原菌解析及其紫外消毒效应 [J]. *环境科学*, 2016, **37**(2): 622-629.
- Jing M, Wang L. Analysis of pathogenic bacteria in reclaimed water and impact of UV disinfection on the removal of pathogenic bacteria [J]. *Environmental Science*, 2016, **37**(2): 622-629.
- [26] Guo M T, Yuan Q B, Yang J. Distinguishing effects of ultraviolet exposure and chlorination on the horizontal transfer of antibiotic resistance genes in municipal wastewater [J]. *Environmental*

Science & Technology, 2015, **49**(9): 5771-5778.
[27] Hu Q, Zhang X X, Jia S Y, *et al.* Metagenomic insights into ultraviolet disinfection effects on antibiotic resistome in biologically treated wastewater[J]. Water Research, 2016, **101**: 309-317.

[28] 郭美婷, 袁青彬, 杨健. 环境中抗药细菌及其抗药基因的研究进展[J]. 环境科学与技术, 2012, **35**(11): 87-92.
Guo M T, Yuan Q B, Yang J. Antibiotic resistant bacteria and its antibiotic resistant genes in environment: a review [J]. Environmental Science & Technology, 2012, **35**(11): 87-92.

《环境科学》征稿简则

1. 来稿报道成果要有创新性,论点明确,文字精炼,数据可靠.全文不超过8 000字(含图、表、中英文摘要及参考文献).国家自然科学基金项目、国家科技攻关项目、国际合作项目或其它项目请在来稿中注明(在首页以脚注表示).作者投稿时请先登陆我刊网站(www.hjks.ac.cn)进行注册,注册完毕后以作者身份登录,按照页面给出的提示信息投稿即可.

2. 稿件请按GB 7713-87《科学技术报告、学位论文和学术论文的编写格式》中学术论文的规范撰写.论文各部分的排列顺序为:题目;作者姓名;作者工作单位、地址、邮政编码;中文摘要;关键词;中图分类号;英文题目;作者姓名及单位的英译名;英文摘要;关键词;正文;致谢;参考文献.

3. 论文题目应简练并准确反映论文内容,一般不超过20字,少用副标题.

4. 中文摘要不少于300字,以第三人称写.摘要内容包括研究工作的目的、方法、结果(包括主要数据)和结论,重点是结果和结论.英文摘要与中文对应,注意人称、时态和语言习惯,以便准确表达内容.

5. 前言包括国内外前人相关工作(引文即可)和本工作的目的、特点和意义等.科普知识不必赘述.

6. 文中图表应力求精简,同一内容不得用图表重复表达,要有中英文对照题目.图应大小一致,曲线粗于图框,图中所有字母、文字字号大小要统一.表用三线表.图表中术语、符号、单位等应与正文一致.

7. 计量单位使用《中华人民共和国法定计量单位》(SI).论文中物理计量单位用字母符号表示,如mg(毫克),m(米),h(小时)等.科技名词术语用国内通用写法,作者译的新名词术语,文中第一次出现时需注明原文.

8. 文中各级标题采用1,1.1,1.1.1的形式,左起顶格书写,3级以下标题可用(1),(2)……表示,后缩2格书写.

9. 文中外文字母、符号应标明其大小写,正斜体.生物的拉丁学名为斜体.缩略语首次出现时应给出中文全称,括号内给出英文全称和缩略语.

10. 未公开发表资料不列入参考文献,可在出现页以脚注表示.文献按文中出现的先后次序编排.常见文献书写格式为:

期刊:作者(外文也要姓列名前).论文名[J].期刊名,年,卷(期):起页-止页.

图书:作者.书名[M].出版地:出版社,年.起页-止页.

会议文集:作者.论文名[A].见(In):编者.文集名[C].出版地:出版社(单位),年.起页-止页.

学位论文:作者.论文名[D].保存地:保存单位,年份.

报告:作者.论文名[R].出版地:出版单位,出版年.

专利:专利所有者.专利题名[P].专利国别:专利号,出版日期.

11. 来稿文责自负,切勿一稿多投.编辑对来稿可作文字上和编辑技术上的修改和删节.在3个月内未收到本刊选用通知,可来电询问.

12. 投稿请附作者单位详细地址,邮编,电话号码,电子邮箱等.编辑部邮政地址:北京市2871信箱;邮编:100085;电话:010-62941102,010-62849343;传真:010-62849343;E-mail:hjks@rcees.ac.cn;网址:www.hjks.ac.cn

CONTENTS

Dry and Bulk Nitrogen Deposition in Suburbs of Xining City	XU Wen, JIN Xin, LUO Shao-hui, <i>et al.</i> (1279)
Day-Night Variation and Source Apportionment of Carbonaceous Aerosols in PM ₁₀ During Spring and Summer of Lanzhou	MA Li, YU Ye, WANG Bo, <i>et al.</i> (1289)
Characteristics of the Size Distribution of Water Soluble Inorganic Ions in Sanya, Hainan	WANG Lu, LIU Zi-rui, WEN Tian-xue, <i>et al.</i> (1298)
Pollution Characteristics of NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ in PM _{2.5} and Their Precursor Gases During 2015 in an Urban Area of Beijing	DING Meng-meng, ZHOU Jian-nan, LIU Bao-xian, <i>et al.</i> (1307)
Pollution Characteristics of PCDD/Fs in Ambient Air and Exposure Risk Assessment Around a Municipal Solid Waste Incinerator in Beijing	QI Li, REN Yue, LIU Ai-min, <i>et al.</i> (1317)
Community Characteristics of Cultivable Bacteria in Fine Particles (PM _{2.5}) of Beijing and Baoding	HU Ya-dong, MA An-zhou, LÜ Peng-yi, <i>et al.</i> (1327)
Emission Characteristics of Vehicle Exhaust in Artery and Collector Roads in Nanjing Based on Real-time Traffic Data	LI Xiao-yu, WU Lin, ZOU Chao, <i>et al.</i> (1340)
Catalytic Combustion of Soot Particulates over Rare Earth Pyrochlore Oxides Doped with Transition Metals	LI Xi-feng, SUN Yu-qi, WANG Zhong-peng, <i>et al.</i> (1348)
Water Quality Analysis of Beijing Segment of South-to-North Water Diversion Middle Route Project	XU Hua-shan, ZHAO Lei, SUN Hao-su, <i>et al.</i> (1357)
Hanfeng Pre-reservoir Commissioning Time Variation Feature of the Hydrology and Water Quality in Three Gorges Reservoir	YANG Bing, HE Bing-hui, WANG De-bao (1366)
Modeling of Water Quality Response to Land-use Patterns in Taizi River Basin Based on Partial Least Squares	LI Lin-lin, ZHANG Yi-zhang, TANG Chang-yuan, <i>et al.</i> (1376)
Distribution Characteristics of Water Temperature and Water Quality of Fuxian Lake During Thermal Stratification Period in Summer	WANG Lin-jie, YU Hui, NIU Yong, <i>et al.</i> (1384)
Vertical Stratification Characteristics of Dissolved Oxygen and Phytoplankton in Thousand-Island Lake and Their Influencing Factors	YU Yan, LIU De-fu, YANG Zheng-jian, <i>et al.</i> (1393)
Community Structure Characteristics of Eukaryotic Planktonic Algae in Liaoh River Through High-throughput Sequencing	WANG Jing-qi, WANG Shu-ping, ZHANG Yuan, <i>et al.</i> (1403)
Effects of Coastal Organic Pollution on Bacterioplankton Community in Sanmen Bay	DAI Wen-fang, GUO Yong-hao, YU Wei-na, <i>et al.</i> (1414)
Nitrate Source Identification and Nitrification-denitrification at the Sediment-water Interface	JIN Zan-fang, GONG Jia-lin, SHI Yi-li, <i>et al.</i> (1423)
Residues of Organochlorine Pesticides (OCPs) in Water and Sediments from Nansha Mangrove Wetland	DING Yang, HUANG Huan-fang, LI Hui, <i>et al.</i> (1431)
Pollution Characteristics and Risk Assessment of Heavy Metals from River Network Sediment in Western Area of Taihu Lake	BIAN Bo, ZHOU Yan, ZHANG Qin (1442)
Efficacy of Phoslock® on the Reduction of Sediment Phosphorus Release in West Lake, Hangzhou, China	ZHU Guang-wei, LI Jing, ZHU Meng-yuan, <i>et al.</i> (1451)
Identification and PAC Adsorption of Foulants Responsible for Irreversible Fouling During Ultrafiltration of Dongjiang River Water	YANG Hai-yan, WANG Can, YAN Zhong-sen, <i>et al.</i> (1460)
Efficiency and Kinetics of Triclosan Degradation in Aqueous Solution by UV/Sodium Persulfate	LI Qing-song, LI Xue-yan, YAO Ning-bo, <i>et al.</i> (1467)
Influencing Factors on the Degradation of PFOS Through VUV-SO ₃ ²⁻	HAN Hui-li, WANG Hong-jie, DONG Wen-yi (1477)
Simultaneous Photocatalytic Reduction of Cr(VI) and Oxidation of SSA by Carbon Nitride	LI Li-li, CHEN Cui-hai, LAN Hua-chun, <i>et al.</i> (1483)
Modification of Diatomite by Zirconium and Its Performance in Phosphate Removal from Water	FAN Yi, WANG Zhe, ZHAO Lian-qin, <i>et al.</i> (1490)
Reducing Effect of Three Disinfection Technologies for Sulfonamides Resistance Genes	ZHENG Ji, ZHOU Zhen-chao, CHEN Fang, <i>et al.</i> (1497)
Removal of Estrogenic Effect by Typical Domestic Wastewater Treatment Processes	ZHANG Qiu-ya, MA Xiao-yan, WANG Xiao-chang, <i>et al.</i> (1506)
Effect of SRT on Stability of Yeast-SBR in Treating Oil-containing Wastewater	LÜ Wen-zhou, ZHANG Shu-lin, QIAO Yu-xiang, <i>et al.</i> (1513)
Degradation of the Disperse Dye Neocron Black(NB) by Biological Treatment	YANG Bo, DING Feng-you, XU Hui, <i>et al.</i> (1520)
Function of Polyphosphate Kinase Gene in Biological Phosphate Removal During the Wastewater Treatment Process	NAN Ya-ping, ZHOU Guo-biao, YUAN Lin-jiang (1529)
Short-cut Nitrification Recovery and Its Transformation into CANON Process in a Biofilm Reactor	FU Kun-ming, ZHOU Hou-tian, SU Xue-ying, <i>et al.</i> (1536)
Nitrogen Removal Characteristics and Diversity of Microbial Community in ANAMMOX Reactor	CAO Yan, WANG Tong-yu, QIN Yu-jie, <i>et al.</i> (1544)
Effect of Environment Adjustment Layers on Nitrogen Transformation in Anaerobic Bioreactor Landfills	HE Zheng-kun, SONG Bo-yu, ZHU Nan-wen, <i>et al.</i> (1551)
Characteristics of Anaerobic Methane Removal Coupled to Fe(III) Reduction in Aged Refuse	WANG Li-li, HE Ting, LONG Yan, <i>et al.</i> (1558)
Assessment of Heavy Metal Pollution and Tracing Sources by Pb & Sr Isotope in the Soil Profile of Woodland in Quanzhou	SUN Jing-wei, YU Rui-lian, HU Gong-ren, <i>et al.</i> (1566)
Accumulation and Migration Characteristics in Soil Profiles and Bioavailability of Heavy Metals from Livestock Manure	HE Meng-yuan, DONG Tong-xi, RU Shu-hua, <i>et al.</i> (1576)
Pollution Characteristics and Source Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Agricultural Soils from Shandong	GE Wei, CHENG Qi-qi, CHAI Chao, <i>et al.</i> (1587)
Distribution Characteristics and Influencing Factors of Organophosphorus Pesticides in Typical Soil Environment of Jiangnan Plain	WANG Jian-wei, ZHANG Cai-xiang, PAN Zhen-zhen, <i>et al.</i> (1597)
Characteristics and Influencing Factors of Biologically-based Phosphorus Fractions in the Farmland Soil	CAI Guan, HU Ya-jun, WANG Ting-ting, <i>et al.</i> (1606)
Effect of Straw Application on the Dynamics of Exogenous Nitrogen and Microbial Activity in Paddy Soil	CHEN Shan, DING Xian-qing, ZHU Zhen-ke, <i>et al.</i> (1613)
Effects of Biochar on Surface Albedo and Soil Respiration in Suburban Agricultural Soil	ZHANG Yang-yang, HU Xue-yu, ZOU Juan, <i>et al.</i> (1622)
N ₂ O Consumption Ability of Submerged Paddy Soil and the Regulatory Mechanism	WANG Ling, XING Xiao-yi, QIN Hong-ling, <i>et al.</i> (1633)
Non-CO ₂ Greenhouse Gas Release from Different Biological Wastewater Treatment Processes	LI Hui-juan, PENG Dang-cong, LIU Wen-bo, <i>et al.</i> (1640)
Effect of Application of Sewage Sludge Composts on Greenhouse Gas Emissions in Soil	YANG Yu-han, YI Jian-ting, ZHANG Cheng, <i>et al.</i> (1647)
Effect of Nano Zeolites on pH, CEC in Soil and Cd Fractions in Plant and Soil at Different Cadmium Levels	CHI Sun-lin, XU Wei-hong, XIONG Shi-juan, <i>et al.</i> (1654)
Dynamic Differences of Uptake and Translocation of Exogenous Selenium by Different Crops and Its Mechanism	PENG Qin, LI Zhe, LIANG Dong-li, <i>et al.</i> (1667)
Alleviation Effects of Exogenous Melatonin on Ni Toxicity in Rice Seedlings	LIU Shi-xiang, HUANG Yi-zong, LUO Ze-jiao, <i>et al.</i> (1675)
Forms Distribution and Ecotoxicity of Three Forms of Sulfonamides in Root-Soil Interface of Maize	JIN Cai-xia, SI Xiao-wei, WANG Wan-feng, <i>et al.</i> (1683)
Effect of Sediments on Bioaccumulation of Mercury in Fish Body in the Water-Level-Fluctuating Zone of the Three Gorges Reservoir Area	SUN Song, LI Chu-xian, ZHANG Cheng, <i>et al.</i> (1689)
Bioaccumulation and Correlation of Heavy Metals in Human Hairs From Urban and Rural Areas of Chongqing	HE Ming-jing, LI Qi, WANG Deng-xiang, <i>et al.</i> (1697)
Microbial Community Structure and Diversity in Cellar Water by 16S rRNA High-throughput Sequencing	YANG Hao, ZHANG Guo-zhen, YANG Xiao-ni, <i>et al.</i> (1704)
Performance Improvement of Microbial Fuel Cell with Polyaniline Doped Graphene Anode	HUANG Li-hua, LI Xiu-fen, REN Yue-ping, <i>et al.</i> (1717)
Brief Introduction of Pollution Sites Remediation and Risk Assessment and Its Policy Making in United States	RONG Yue (1726)