

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第38卷 第7期

Vol.38 No.7

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

基于船载走航气溶胶质谱技术的海洋气溶胶研究	颜金培, 陈立奇, 林奇, 赵淑惠, 李磊, 朱大勇 (2629)
利用 MODIS C6 数据分析中国西北地区气溶胶光学厚度时空变化特征	赵仕伟, 高晓清 (2637)
秋冬季节华北背景地区 PM ₁ 污染特征及来源	张周祥, 张养梅, 张小曳, 王亚强, 沈小静, 孙俊英, 周怀刚 (2647)
杭州市 PM _{2.5} 中水溶性离子的污染特征及其消光贡献	吴丹, 蔺少龙, 杨焕强, 杜荣光, 夏俊荣, 齐冰, 刘刚, 李凤英, 杨孟, 盖鑫磊 (2656)
青岛不同强度霾天气溶胶中二次无机离子的生成及粒径分布	谢丹丹, 祁建华, 张瑞峰 (2667)
西安市重污染与清洁天 PM _{2.5} 组分及其活性氧物质对比	王堃, 韩永明, 何世恒, 张婷, 刘随心, 曹军骥 (2679)
黄山 PM ₁₀ 中二元羧酸类化合物的季节变化特征及其来源	孟静静, 侯战方, 张二勋, 董杰, 刘晓迪, 邢继钊, 刘加珍 (2688)
泉州市大气 PM _{2.5} 铜系元素组成特征及来源解析	张云峰, 于瑞莲, 胡恭任, 孙境蔚, 许文质, 张棕巍 (2698)
西北石化区周围毒害类空气污染物污染特征及健康风险评价	许亚宣, 李小敏, 于华通, 董林艳, 赵玉婷, 姚懿函, 邹广迅, 张新民 (2707)
G20 峰会期间宜兴市大气 VOCs 特征及来源分析	张璘, 张祥志, 秦玮, 茅晶晶, 秦艳红, 谢卫平, 史文科, 陈文泰 (2718)
四川省 2005 ~ 2014 年农业源氨排放清单及分布特征	冯小琼, 陈军辉, 姜涛, 钱骏, 叶宏 (2728)
长三角地区典型城市非道路移动机械大气污染物排放清单	鲁君, 黄成, 胡馨遥, 杨强, 井宝莉, 夏阳, 卢滨, 唐伟, 楼晨荣, 陶士康, 李莉 (2738)
我国城市饮用水中 N-亚硝基二甲胺的健康风险评估及水质标准制定	张秋秋, 潘申龄, 张昱, 杨敏, 安伟 (2747)
地下水污染风险评价中污染源荷载量化方法的对比分析	赵鹏, 何江涛, 王曼丽, 崔亚丰 (2754)
胶州湾表层海水中的正构烷烃及其来源解析	张倩, 宋金明, 彭全材, 李学刚, 袁华茂, 李宁, 段雨琴, 曲宝晓, 王启栋 (2763)
桂江流域夏季水-气界面 CO ₂ 脱气的空间变化及其影响因素	张陶, 李建鸿, 蒲俊兵, 吴飞红, 李丽, 袁道先 (2773)
都柳江水系沉积物锑等重金属空间分布特征及生态风险	宁增平, 肖青相, 蓝小龙, 刘意章, 肖唐付, 赵彦龙, 吴世良 (2784)
太湖表层水体及沉积物中双酚 A 类似物的分布特征及潜在风险	陈政宏, 郭敏, 徐怀洲, 刘丹, 程杰, 李江, 张圣虎, 石利利 (2793)
洱海沉积物水提取态有机氮特征及与其他来源溶解性有机氮的差异	李文章, 张莉, 王圣瑞, 肖尚斌, 钱伟斌, 席银, 许可宸, 史玲珑 (2801)
阿哈水库沉积物-水界面磷、铁、硫高分辨率空间分布特征	孙清清, 陈敬安, 王敬富, 杨海全, 计永雪, 兰晨, 王箫 (2810)
北京市水环境中精神活性物质污染特征	张艳, 张婷婷, 陈卫平, 郭昌胜, 花镇东, 张远, 徐建 (2819)
降雨特征及污染物赋存类型对路面径流污染排放的影响	陈莹, 王昭, 吴亚刚, 赵剑强, 杨文娟 (2828)
CaO ₂ 不同投加方式对黑臭河道底泥内源磷释放抑制作用	徐焱, 李大鹏, 韩菲尔, 宋小君, 李鑫, 周婧, 黄勇 (2836)
坡耕地薄层紫色土-岩石系统中氮磷的迁移特征	鲜青松, 唐翔宇, 朱波 (2843)
微生物强化组合浮床净化微盐碱水体的效果	陈友媛, 吴亚东, 孙萍, 吴丹 (2850)
氧化镁基生物炭高效去除水体中磷的特性	王彬斌, 林景东, 万顺利, 何锋 (2859)
Pd/Fe ⁰ 双金属复合催化纤维降解水中痕量亚硝基二甲胺	张环, 傅敏, 魏俊富, 王一冰, 安慧颖, 沈书怡 (2868)
针铁矿、磁铁矿和石膏对 2,4-二氯苯酚厌氧降解的影响	孔殿超, 周跃飞, 陈天虎, 王进, 李碧 (2875)
污水再生过程中消毒副产物前体物转化规律	韩慧慧, 缪恒峰, 张雅晶, 陆敏峰, 黄振兴, 阮文权 (2883)
微生物燃料电池改性阳极处理 PTA 废水	孙靖云, 范梦婕, 陈英文, 祝社民, 沈树宝 (2893)
水稻秸秆浸泡液对蓝藻和绿藻生长选择性抑制作用	苏文, 陈洁, 张胜鹏, 孔繁翔 (2901)
沼液 SBR 处理出水养殖螺旋藻	蔡小波, 郁强强, 刘锐, 赵远, 陈吕军 (2910)
K ⁺ 强化高盐环境下厌氧氨氧化脱氮效能	吴国栋, 于德爽, 李津, 周同, 王晓静 (2917)
包埋氨氧化细菌短程硝化的高效稳定运行	于濛雨, 刘毅, 田玉斌, 石欢, 徐富, 杨宏 (2925)
ANAMMOX 的快速启动及 EPS 在 ANAMMOX 颗粒污泥中的空间分布	李惠娟, 彭聪聪, 陈国燕, 姚倩, 卓杨, 王彬斌 (2931)
厌氧氨氧化污泥中氨氧化的潜在电子受体	李祥, 林兴, 王凡, 袁砚, 黄勇, 袁怡, 毕贞, 刘忻, 杨朋兵 (2941)
基于厌氧氨氧化的含氨废气原位处理	林兴, 王凡, 袁砚, 李祥, 黄勇, 袁澄伟 (2947)
基于污泥资源化利用的粗放型绿色屋顶生长基质的组成	沈庆然, 李田, 曹熠, 潘奥 (2953)
罗红霉素短期冲击对活性污泥中氨氧化微生物丰度和多样性的影响	高景峰, 孙丽欣, 樊晓燕, 潘凯玲, 李定昌 (2961)
不同盐度下活性污泥中微生物群落变化规律及其处理模拟染料废水	周贵忠, 许硕, 姚倩, 银钗 (2972)
CO ₂ -咸水-砂岩相互作用过程中微生物群落结构动态变化特征	王博强, 李晨阳, 卢伟, 樊昊, 张冬至, 汪治, 吕聪, 沈福东 (2978)
油菜/玉米轮作农田土壤呼吸和异养呼吸对秸秆与生物炭还田的响应	田冬, 高明, 黄容, 吕盛, 徐畅 (2988)
模拟气候升温对湿地土壤微生物群落及磷素形态的影响	腾昌运, 沈建国, 王忠, 王行, 李鸿毅, 张志剑 (3000)
秦岭红桦林土壤细菌群落剖面分布特征及其影响因素	杜璨, 许晨阳, 王强, 张帆, 马武功, 和文祥, 侯琳, 耿增超 (3010)
微生物对汞矿区农田土壤汞甲基化的影响	贾钦, 朱雪梅, 王琪, 傅海辉, 郝亚琼, 何洁, 杨子良 (3020)
施用海泡石对铅、镉在土壤-水稻系统中迁移与再分配的影响	方至萍, 廖敏, 张楠, 吕婷, 黄小斌 (3028)
BS + CTMAB 复配修饰在黄棕壤吸附苯酚上的应用	刘伟, 孟昭福, 任爽, 李文斌 (3036)
1999 年与 2014 年贡嘎山峨眉冷杉枝和叶中常见重金属的生物富集特征对比	李芬, 王训, 罗辑, 袁巍, 喻子恒, 商立海 (3045)
铅锌尾矿污染区 3 种菊科植物体内重金属的亚细胞分布和化学形态特征	朱光旭, 肖化云, 郭庆军, 张忠义, 杨曦, 孔静 (3054)
膨润土调质对污泥堆肥的脱毒及重金属钝化和雌酮消除作用	周莉娜, 蔡函臻, 李荣华, 王美净, 赵军超, 王权, 张增强 (3061)
餐厨垃圾与秸秆混合中温和高温厌氧消化对比	郭香麟, 左剑恶, 史绪川, 王凯军, 李静 (3070)
我国村镇生活垃圾可燃组分基本特征及其时空差异	晏卓逸, 岳波, 高红, 李志龙, 黄启飞, 聂小琴, 汪群慧 (3078)
甲烷催化还原 NO _x 中 Co 基/分子筛催化剂的助剂和载体优化	潘华, 建艳飞, 陈宁娜, 刘红霞, 何焱, 贺亚飞 (3085)
《环境科学》征稿简则 (2737) 《环境科学》征订启事 (2809) 信息 (2867, 2971, 3027)	

罗红霉素短期冲击对活性污泥中氨氧化微生物丰度和多样性的影响

高景峰, 孙丽欣, 樊晓燕, 潘凯玲, 李定昌

(北京工业大学环境与能源工程学院, 城镇污水深度处理与资源化利用技术国家工程实验室, 北京 100124)

摘要: 本研究基于 *amoA* 基因, 结合实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 和高通量测序技术研究罗红霉素 (roxithromycin, ROX) 短期冲击对活性污泥中氨氧化古菌 (ammonia-oxidizing archaea, AOA) 和氨氧化细菌 (ammonia-oxidizing bacteria, AOB) 丰度和多样性的影响。本研究共设置 10 种 ROX 浓度, 不同浓度的 ROX 对氨氧化作用的影响差异明显, 环境浓度 ($0.3 \sim 30 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 与中等浓度 ($300 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $3000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 ROX 并未对氨氧化作用产生影响; 较高浓度 ($5000 \sim 12000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 ROX 对氨氧化作用产生明显的抑制作用。环境浓度和中等浓度的 ROX 刺激了 AOA 增长, 而较高浓度的 ROX 导致 AOA 的丰度下降。此外, 除了环境中的痕量浓度 ($0.3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 其余浓度的 ROX 均导致 AOB 丰度下降, 且下降趋势比 AOA 显著, 说明 AOA 对 ROX 的耐受性高于 AOB。高通量测序结果表明, 在 ROX 的选择压下, AOA 的 OTUs 多样性减少, AOB 的 OTUs 多样性增加; 但 3 个样品中最主要的 AOA *Candidatus Nitrososphaera gargensis* 的相对丰度随 ROX 浓度增加而增多, 最主要的 AOB *Nitrosomonas eutropha* 的相对丰度随 ROX 浓度增加而减少, 这同样说明了 AOA 对 ROX 的耐受性高于 AOB。冗余分析结果表明: AOA *Ca. Nitrososphaera gargensis*、*Candidatus Nitrosoarchaeum koreensis* 和 AOB *Nitrosomonas oligotropha*、*Nitrosomonas watsonii*、*Nitrosomonas halophilus* 均与 ROX 浓度呈正相关。

关键词: 罗红霉素; 活性污泥; 氨氧化古菌; 氨氧化细菌; 高通量测序

中图分类号: X172; X703.1 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2017)07-2961-11 DOI: 10.13227/j.hjxx.201612262

Short-term Effect of Roxithromycin on Abundance and Diversity of Ammonia-Oxidizing Microorganisms in Activated Sludge

GAO Jing-feng, SUN Li-xin, FAN Xiao-yan, PAN Kai-ling, LI Ding-chang

(National Engineering Laboratory for Advanced Municipal Wastewater Treatment and Reuse Technology, College of Environmental and Energy Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China)

Abstract: In this study, the short-term effect of roxithromycin (ROX) on the abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea (AOA) and ammonia-oxidizing bacteria (AOB) based on *amoA* gene in activated sludge were investigated by high-throughput sequencing and quantitative real-time PCR (qPCR). High-throughput sequencing overcomes the drawbacks of low sequencing depth, significant randomness and great bias of traditional Sanger sequencing. This approach can provide enough sequencing depth to comprehensively investigate the sensitive and insensitive ammonia-oxidizing microorganisms under ROX selective pressure. Lab-scale reactors were operated under ten different ROX levels. The results indicated that the environmental ($0.3\text{--}30 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and medium ($300 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $3000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) levels of ROX did not affect ammonia oxidation, while the higher concentration ($5000\text{--}12000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) of ROX showed a significant negative effect on ammonia oxidation. The environmental and medium levels of ROX stimulated the growth of AOA, however, the higher level of ROX decreased the abundance of AOA. In addition, different levels of ROX (except $0.3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) caused the decrease of the abundance of AOB, which suggested that AOA was less sensitive than AOB under ROX selective pressure. The results of high-throughput sequencing showed that ROX selective pressure caused the decrease of the numbers of OTUs for AOA and increase of that for AOB. The insensitive AOA, accounting for 57.70%–97.81% of the total sequences, were *Candidatus Nitrososphaera gargensis* and *Candidatus Nitrosoarchaeum koreensis*. The insensitive AOB were *Nitrosomonas oligotropha*, *Nitrospira multiformis*, *Nitrosomonas watsonii* and *Nitrosomonas halophilus*, accounting for 0.76%–5.10% of the total sequences. These results also indicated that AOA was insensitive to ROX, but AOB was sensitive to ROX. RDA analyses showed that AOA *Ca. Nitrososphaera gargensis*, *Ca. Nitrosoarchaeum koreensis* and AOB *N. oligotropha*, *N. watsonii*, *N. halophilus* were positively correlated with ROX concentrations.

Key words: roxithromycin; activated sludge; ammonia-oxidizing archaea (AOA); ammonia-oxidizing bacteria (AOB); high-throughput sequencing

收稿日期: 2016-12-30; 修订日期: 2017-02-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (51378027, 51578015); 北京市自然科学基金项目 (8162010)

作者简介: 高景峰 (1974 ~), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为水污染控制, E-mail: gao.jingfeng@bjut.edu.cn

在全球范围内,抗生素的广泛使用和过度使用导致环境中出现抗性细菌和抗性基因^[1]. 近年来,抗生素被定义为一种新型环境污染物质^[2]. 污水处理厂(sewage treatment plant, STP)是抗生素和抗性基因进入环境的主要途径之一. 目前,关于 STP 中抗生素的研究主要集中在它们的出现和去除等方面. 有研究表明,珠江三角洲地区 4 个 STPs 出水中罗红霉素(roxithromycin, ROX)的浓度为 $(35 \pm 8) \sim (278 \pm 46) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$,磺胺类抗生素的浓度为 $(9 \pm 4) \sim (346 \pm 54) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$,喹诺酮类抗生素的浓度为 $(27 \pm 6) \sim (165 \pm 15) \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[3]. Gao 等^[4]研究的北京 8 个 STPs 中的抗生素的情况发现,出水中 ROX 的浓度在 $0.054 \sim 0.36 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间,而磺胺类和喹诺酮类抗生素的浓度也都在 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 级别. 此外,STP 中左氧氟沙星、环丙沙星和恩氟沙星的去除率分别为 40%~90%、60%~83% 和 38%~74%,大环内酯类的克拉霉素(50%~88%)和阿奇霉素(34%~86%)的去除率比 ROX(59%)的去除率高^[5]. 然而,STP 的生物处理过程主要依赖微生物的丰度和多样性,所以有必要研究抗生素对活性污泥中微生物的影响.

本试验研究的抗生素为 ROX,ROX 属于大环内酯类抗生素,它能够抑制细菌蛋白质合成. 有研究表明红霉素和泰乐菌素的半衰期分别为 20 d 和 8 d,而 ROX 在土壤中存在 120 d 未降解^[6];因而 ROX 在环境中可以保持更长时间的活性. 氨氧化作用是 STP 生物脱氮作用的限速步骤,主要由氨氧化古菌(ammonia-oxidizing archaea, AOA)和氨氧化细菌(ammonia-oxidizing bacteria, AOB)承担. 两者虽然利用相同的底物进行能量代谢,但是在细胞结构和代谢途径上存在差异,这在一定程度上导致了 AOA 和 AOB 对抗生素的敏感度不同^[7]. Shen 等^[7]的研究表明,磺胺噻唑能够抑制 AOB *Nitrosospira multififormis* 的生长,但是对 AOA *Candidatus Nitrososphaera viennensis* 未产生影响. 不同浓度的磺胺嘧啶均降低了土壤中 AOA 和 AOB 丰度^[8,9]. Yu 等^[10]的研究发现,ROX 导致土壤中 AOB 的丰度下降. 但是,关于 ROX 对活性污泥中 AOA 和 AOB 丰度和多样性的影响少有报道.

目前,基于 *amoA* 基因研究 STP 中 AOA 和 AOB 多样性的方法主要集中于 PCR-克隆和 PCR-DGGE 等技术^[11,12]. 传统的测序技术通量低,很难检测到丰度较低的物种,不能准确描述活性污泥中微生物群落的复杂性;同时,传统的测序技术随机性较大,

对物种相对丰度的定量容易产生偏差. 而高通量测序技术则克服了传统测序的缺点,它具有足够的测序深度可以更准确反映微生物群落的多样性^[13]. 然而,还未有研究利用高通量测序基于 *amoA* 基因考察 AOA 和 AOB 的多样性.

本试验基于 *amoA* 基因,结合实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 和 Illumina 高通量测序技术研究 ROX 短期冲击对活性污泥氨氧化作用以及 AOA 和 AOB 丰度和多样性的影响,并进一步考察了环境因素与 AOA 和 AOB 群落结构之间的相关性.

1 材料与方法

1.1 反应器运行

本试验所用的活性污泥取自于某市政 STP 的曝气池. 种泥(seed sludge, SD)取回后空曝 24 h 去除其中的残余污染物质. 本试验的 ROX 购自 Sigma 公司,纯度大于 98%. 试验共设置 10 种不同的 ROX 浓度(共分为 4 组): $0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (对照); 0.3 、 3 和 $30 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (环境浓度); $300 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (中等浓度); 5000 、 7000 、 9000 和 $12000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (较高浓度).

采取小型批处理反应器进行本研究,反应器的有效体积为 0.2 L ,排水比为 50%. 每个反应器中污泥浓度维持在 $3000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,运行方式为:进水、曝气、沉淀、排水和闲置,曝气时间依据出水 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 而定. 反应器进水采用人工配水,其组份包括蔗糖(折合成 COD 为 $220 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) NH_4Cl ($0.16 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、 NaHCO_3 ($0.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、 KH_2PO_4 ($0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、 NaCl ($0.59 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、 KCl ($0.08 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、微量元素($1 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$)和 ROX. 微量元素的组成为:1 L 水含 4.29 g Na_2EDTA 、 1.99 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 0.08 g $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 0.02 g $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 0.02 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 0.02 g $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 0.07 g ZnCl_2 、 0.02 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 0.03 g $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 0.06 g H_3BO_3 . 曝气阶段维持溶解氧(dissolved oxygen, DO)在 $2 \sim 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,温度控制在 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$. 试验共运行 3 个周期,前 2 个周期只监测进出水的 $\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 、 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 和 COD,第 3 周期时监测过程中三氮和 COD 的变化.

1.2 检测分析项目

$\text{NH}_4^+ - \text{N}$ 、 $\text{NO}_2^- - \text{N}$ 、 $\text{NO}_3^- - \text{N}$ 和 COD 采用分光光

度法进行检验分析;具体的分析方法如下: NH_4^+ -N 采用纳氏试剂显色法进行分析; NO_2^- -N 采用 *N*-(1-萘基)-乙二胺显色法进行分析; NO_3^- -N 采用麝香草酚显色法进行分析;COD 采用重铬酸钾法进行分析。

1.3 样品收集和 DNA 提取

在第 3 周期运行结束后分别收集每种处理下的活性污泥样品,冻干后于 -20°C 下保存。采用 Fast-DNA[®] Spin kit for soil (QIAGEN, CA, USA) DNA 提取试剂盒,按照操作说明提取活性污泥样品的基因组 DNA。通过 Nanodrop Spectrophotometer ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) 测定 DNA 浓度和纯度。提取的 DNA 保存于 -20°C 以待后续分析。

1.4 qPCR

本试验对 AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因进行 qPCR 分析,所用仪器为 Stratagene MX3005p thermocycler (Agilent Technologies, USA)。AOA 和 AOB 所用的引物分别为 Arch-*amoA*F (5'-STAATGGTCTGGCTTA GACG-3')/Arch-*amoA*R (5'-GCGGCCATCCATCT GTATGT-3') 和 *amoA*-1F (5'-GGGCTTTCTACTGGT GGT-3')/*amoA*-2R (5'-CCCCTCKGSAAAGCCTTC TTC-3'), 扩增的目的片段长度分别是 416bp 和 491bp。将含有 AOA 和 AOB *amoA* 基因的质粒作为 qPCR 分析的标准品,质粒提取方法参见文献[14]。测定质粒浓度换算成拷贝数,将质粒按 10 倍梯度稀释得到一系列已知拷贝数的标准品。把标准品和待测样品作为 DNA 模板,每个样品重复 3 次。阴性对照样品以无菌水代替。qPCR 的扩增体系按照 GoTaq Green Master Mix qPCR (Promega, Madison, USA) 说明书配制。qPCR 程序参见文献[12]。AOA 和 AOB 的扩增效率分别为 111.70% 和 102.80%。

1.5 AOA 和 AOB *amoA* 基因的 Illumina 高通量测序

本试验选取 SD、 $30\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (C1) 和 $7000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (C2) ROX 处理的样品进行 AOA 和 AOB *amoA* 基因的 Illumina 高通量测序。首先对 AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因进行 PCR 扩增(引物同 qPCR 分析)。AOA 的 PCR 扩增体系为 $15\ \mu\text{L}$ TransStart Fastpfu DNA Polymerase; $3\ \mu\text{L}$ 前向引物和 $3\ \mu\text{L}$ 反向引物; $20\ \text{ng}$ DNA; 不足部分用灭菌水补足至 $30\ \mu\text{L}$ 。扩增程序为: 95°C 预变性 2 min; 95°C 变性 20 s, 53°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72°C 最后延伸 10 min。AOB 的扩增体系为: $0.3\ \mu\text{L}$ Pyrobest DNA Polymerase; $5\ \mu\text{L}$ $10\times$ Pyrobest Buffer; $4\ \mu\text{L}$ dNTPs ($2.5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$); $2\ \mu\text{L}$ 前向引物和 $2\ \mu\text{L}$ 反向

引物; $30\ \text{ng}$ DNA; 灭菌水补足至 $50\ \mu\text{L}$ 。扩增程序为: 95°C 预变性 5 min, 95°C 变性 30 s, 56°C 退火 30 s, 72°C 延伸 40 s, 共 25 个循环; 72°C 最后延伸 10 min。将 PCR 产物纯化后用于克隆构建文库。AOA 和 AOB 的测序平台分别为 Illumina HiSeq 2500 和 MiSeq PE300, 双端的读长分别为 250bp 和 300bp。得到的原始序列去除引物和 barcodes 后, 将双端测序的序列进行合并^[15], 再去除嵌合体 and 低质量序列后得到的有效序列, 利用 Quantitative Insights into Microbial Ecology (QIIME) 进行分析, 根据序列 97% 的相似度划分操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU)。根据产生的 OTU 分类计算样品 α 多样性和 β 多样性。

1.6 序列登录号

本研究获得的所有 *amoA* 基因的数据上传至 NCBI Sequence Read Archive (SRA) 数据库。序列登录号为: SRP095228。

1.7 数据分析

本研究采用 R 语言 (3.2.2) 进行 Venn 分析、Heatmap 分析以及冗余分析 (redundancy analysis, RDA)。

2 结果与分析

2.1 ROX 短期冲击对氨氧化作用的影响

本试验每种处理分别运行 3 个周期, 周期时间以 NH_4^+ -N 完全去除的时间而定, 即每个周期结束后, 不同处理的反应器中出水 NH_4^+ -N 均降为 $0\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本试验的前 2 个周期内, 不同反应器的运行时间均为 6 h (数据未显示)。在第 3 周期时, 分别对每种处理的反应器监测周期内三氮和 COD 的变化规律 (每 0.5 h 取一次水样), 结果如图 1 所示: 与对照 ($0\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 相比, 环境浓度 (0.3 、 3 和 $30\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 和中等浓度 ($300\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $3000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 ROX 未对 NH_4^+ -N 去除造成明显的影响。在第 3 周期时, 这几种浓度 ROX 处理的反应器中 NH_4^+ -N 的去除时间均为 6 h; 而较高浓度 (5000 、 7000 、 9000 和 $12000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ROX 处理的反应器中 NH_4^+ -N 的去除时间分别延长至 16、28、34 和 32 h, 分别是对照组的 2.7、4.7、5.7 和 5.3 倍, 表明较高浓度的 ROX 对氨氧化产生明显的抑制作用。有趣的是, ROX 的抑制效果并未随着浓度的增加而明显增强, 在浓度为 $7000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, ROX 对氨氧化的抑制效果最显著。不同浓度 ROX 处理的反应器中 NO_2^- -N、 NO_3^- -N 和 COD 的变化规律与对照处理基本一致。综上所述

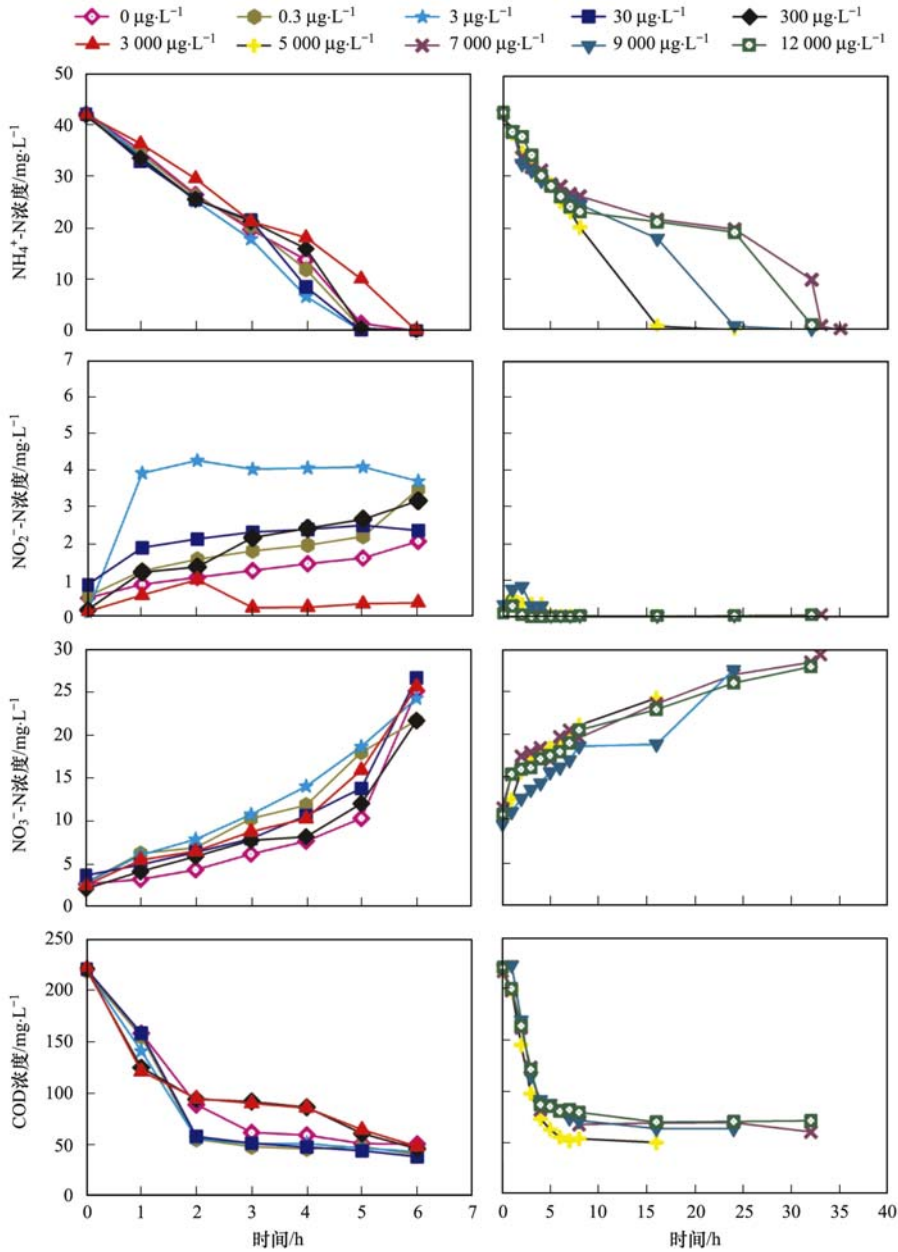


图 1 不同 ROX 浓度的反应器中三氮和 COD 在周期内的变化规律

Fig. 1 Concentrations variations of inorganic nitrogen and COD during one operation cycle under different ROX levels

述,本研究结果表明不同浓度的 ROX 对氨氧化作用的影响差异显著;环境浓度与中等浓度的 ROX 并未对氨氧化作用产生影响,而较高浓度的 ROX 对氨氧化作用产生明显的抑制作用.

2.2 ROX 短期冲击对 AOA 和 AOB *amoA* 基因丰度的影响

qPCR 的结果(以干泥计)如图 2 所示,SD 中 AOA 和 AOB 的 *amoA* 基因拷贝数分别为 1.02×10^9 copies·g⁻¹ 和 6.14×10^8 copies·g⁻¹,不同浓度 ROX 处理的 AOA 的拷贝数在 $9.39 \times 10^8 \sim 2.01 \times 10^9$ copies·g⁻¹ 范围内. 与 SD 和对照反应器(1.27×10^9

copies·g⁻¹)相比,环境浓度(0.3、3 和 30 μg·L⁻¹)和中等浓度(300 μg·L⁻¹和 3 000 μg·L⁻¹)的反应器中 AOA 拷贝数呈略微增长的趋势,其中 0.3 μg·L⁻¹ ROX 处理的 AOA 拷贝数(2.01×10^9 copies·g⁻¹)最高;较高浓度(5 000、7 000、9 000 和 12 000 μg·L⁻¹) ROX 处理的反应器中 AOA 拷贝数明显低于其它处理,当 ROX 浓度为 9 000 μg·L⁻¹ 时, AOA 拷贝数最低为 9.39×10^8 copies·g⁻¹,说明较高浓度(5 000 ~ 12 000 μg·L⁻¹)的 ROX 抑制了 AOA 增长. AOA 拷贝数的变化规律与全周期 NH₄⁺-N 变化规律一致,即较高浓度的 ROX 抑制 NH₄⁺-N 去除的同时也抑制了

AOA 的增长,意味着 AOA 可能在氨氧化过程中起一定作用.

AOB 的拷贝数随着 ROX 浓度的增加呈下降趋势,不同处理的 AOB 拷贝数范围在 $8.42 \times 10^7 \sim 7.10 \times 10^8 \text{copies} \cdot \text{g}^{-1}$ 之间;其中,与 SD 和对照相比, $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ROX 处理的 AOB 拷贝数最高,为 $8.24 \times 10^8 \text{copies} \cdot \text{g}^{-1}$. 这与 AOA 的定量结果一致,表明环境中的痕量 ROX 浓度刺激了 AOA 和 AOB 的增长. ROX 为 $12000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的反应器中 AOB 的拷贝数最低,为 $8.42 \times 10^7 \text{copies} \cdot \text{g}^{-1}$, 是对照处理的 AOB 拷贝数的 1/10. 不同浓度 ROX 处理的 AOA 的丰度均显著高于 AOB 的丰度, AOA 与 AOB 的比例在 1.66 ~ 11.91 之间,且 AOA/AOB 的数值随着 ROX 浓度增加而增加. 综上所述,环境浓度和中等浓度的 ROX 刺激了 AOA 增长,较高浓度的 ROX 对 AOA 产生抑制作用;而除了 $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ROX,其余浓度的 ROX 均对 AOB 产生抑制作用,且随着 ROX 浓度增加抑制作用越显著;这说明 AOA 对 ROX 的耐受性高于 AOB.

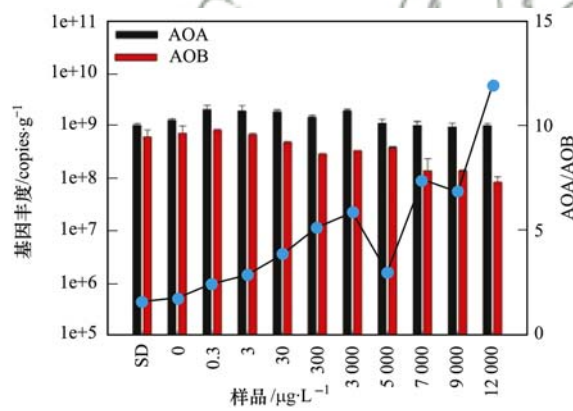


图2 不同 ROX 浓度的反应器中 AOA 和 AOB *amoA* 基因定量结果

Fig. 2 Quantitative analysis of AOA and AOB *amoA* genes under different ROX levels

2.3 ROX 短期冲击对 AOA 和 AOB *amoA* 基因多样性的影响

选取 SD、C1 和 C2 这 3 个样品进行 AOA 和 AOB *amoA* 基因的 Illumina 高通量测序. 3 个样品分别得到 50 819 ~ 66 095 条 AOA 和 45 693 ~ 76 716 条 AOB 高质量序列. 以最小的序列数为基础,将样品进行均一化后,每个样品分别得到 50 819 条 AOA 和 45 693 条 AOB 序列. 以 3% 的阈值计算每个样品中 AOA 和 AOB 的 α 多样性 (OTUs、Chao1、Shannon、PD_whole_tree 和观察到的物种),具体信息如表 1 所示. AOA 的稀缺性曲线如图 3(a) 所示,3 个样品的稀缺性曲线都达到了平台期,说明测序深度可以覆盖样品的多样性. SD 共得到 76 个 OTUs, C1 得到 68 个 OTUs, C2 仅得到 38 个 OTUs. SD 中的 OTU 数明显高于 C1 和 C2. 由 Venn 图可知[图 3(c)], C2 中的 OTUs 被 C1 和 SD 共有,同时 C1 中的 OTUs 又被样品 SD 共有,这说明 ROX 降低了 AOA 的多样性. 图 4(a) 为序列丰度大于 0.05% 的 AOA OTUs 的 heatmap 图,由该图可知,在 3 个样品中, OTU73 是最主要的 OTU,其它相对丰度较高的 OTUs 还有 OTU71、OTU158 和 OTU169. OTU33、OTU104、OTU121、OTU17、OTU290 和 OTU41 分别是 SD 或 C1 中丰度较高的 OTUs,但是它们在 C2 中相对丰度极低. 这进一步说明 ROX 的短期冲击影响降低了 AOA 的多样性. Shannon 指数一方面可以表示样品中含有物种的数目,即丰富度;另一方面可以表示样品中物种的均匀度. 物种的数目丰富可以增加 Shannon 指数值,同时物种之间的均匀度增加也会使 Shannon 指数提高. 本研究中 SD 的 Shannon 指数最高为 1.60, C1 的 Shannon 指数最低为 0.91, C2 的 Shannon 指数最高为 1.42; C1 的 Shannon 指数低于 C2,说明低浓度的 ROX 降低了 C1 中敏感菌属的数量,导致样品 C1 中物种的均匀度降低,从而 Shannon 指数较低.

表 1 3 个活性污泥样品的测序信息及多样性指数统计

Table 1 Raw and effective sequences, numbers of OTUs, Chao1, Shannon, PD_whole_tree and Observed-species of three activated sludge samples								
项目	样品名称	高质量序列数	均一化后序列数	OTUs	Chao1	Shannon	PD_whole_tree	观察到的物种
AOA	SD	50 819	50 819	76	247.63	1.60	3.10	137
	C1	66 095	50 819	68	215.33	0.91	2.95	146
	C2	53 257	50 819	38	212.62	1.42	2.30	147
AOB	SD	45 693	45 693	291	342.04	1.77	108.55	291
	C1	49 642	45 693	640	799.28	3.25	290.70	640
	C2	76 716	45 693	799	1031.23	2.84	281.56	799

本研究中 3 个样品的 AOA 序列可以分为 6 个 属[图 5(a)]: *Nitrosopumilus maritimus* (相对丰度为

0.17% ~ 5.79%)、*Candidatus Nitrososphaera gargensis* (57.61% ~ 90.57%)、*Candidatus Nitrosoarchaeum koreensis* (0.06% ~ 7.25%)、*Candidatus Nitrosopumilus* sp. AR2 (0.13% ~ 34.8%)、*Candidatus Nitrosopumilus koreensis* (0.01% ~ 0.02%) 和 *Candidatus Nitrososphaera evergladensis* (0.01% ~ 0.02%)。其中 *Ca. Nitrososphaera gargensis* 是 3 个样品中最重要的 AOA。在 C2 中, *Ca. Nitrososphaera gargensis* 的相对丰度最高, 高达 90.57%。而在 SD 中, *Ca. Nitrososphaera gargensis* 的相对丰度最低为 57.61%, 说明 ROX 刺激了 *Ca. Nitrososphaera gargensis* 增长(相对丰度增加了 32.96%), 在 SD 中, 其它优势的 AOA 为 *Ca. Nitrosopumilus* sp. AR2

(34.80%) 和 *Nitrosopumilus maritimus* (5.79%)。然而在 ROX 短期冲击影响下, *Ca. Nitrosopumilus* sp. AR2 在 C1 和 C2 中的相对丰度明显减少至 4.47% 和 0.13%。*Nitrosopumilus maritimus* 的相对丰度由 SD 中的 5.79% 减少至 C1 中的 4.53%, 甚至在 C2 中完全消失。这说明 *Ca. Nitrosopumilus* sp. AR2 和 *Nitrosopumilus maritimus* 对 ROX 的选择压较敏感。相反 *Ca. Nitrosoarchaeum koreensis* 在 SD 和 C1 中的相对丰度仅占 0.09% 和 0.06%, 然而, 在 C2 中的相对丰度增加至 7.25%, 说明 *Ca. Nitrosoarchaeum koreensis* 是对 ROX 耐受性较强的 AOA。本研究在 SD 和 C2 中检测到 *Ca. Nitrosopumilus koreensis* (0.02% 和 0.01%), 仅在 C2 中检测到 *Ca. Nitrososphaera evergladensis* (0.01%)。

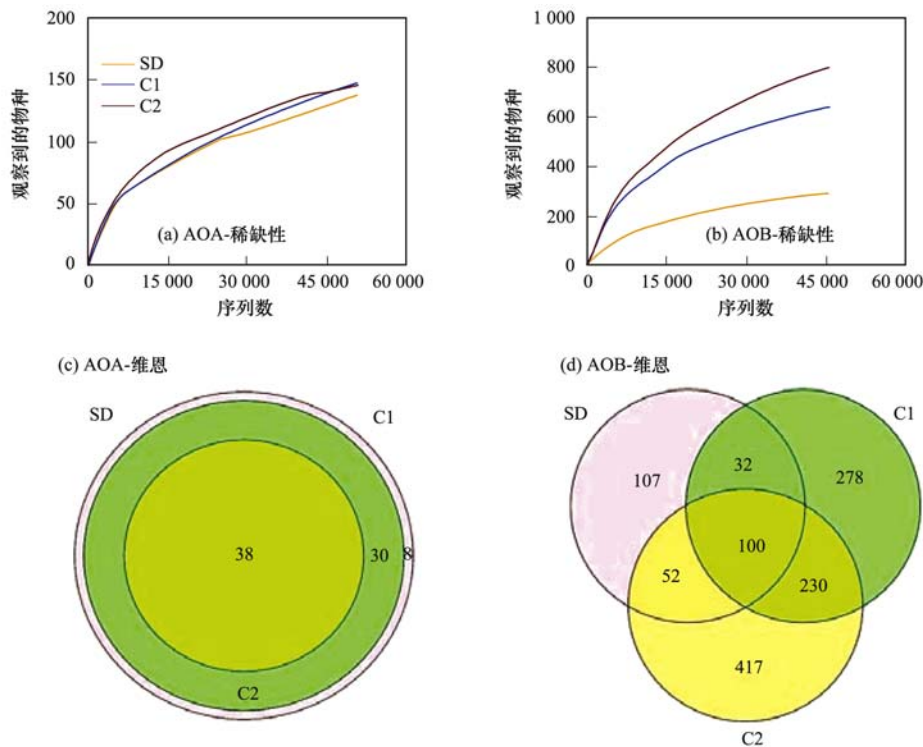


图3 3个样品的 AOA 和 AOB 的稀缺性分析和维恩分析

Fig. 3 Rarefaction curves and Venn analysis of AOA and AOB in three activated sludge samples

对于 AOB 而言, 3 个样品共得到 291 ~ 799 个 OTUs, 其中 C2 的 OTUs 最高为 799 个, SD 的 OTUs 最低为 291 个; C2 和 C1 的 OTUs (表 1 所示) 明显高于 SD, 说明环境浓度和较高浓度的 ROX 都不同程度地增加了 AOB 的多样性。AOB 稀缺性曲线如图 3(b) 所示, 3 个样品的稀缺性曲线都达到了平台期, 说明 AOB 的测序深度可以代表样品中 AOB 的多样性。由 Venn 分析[图 3(d)]可知, 有 100 个 OTUs 同时被 3 个样品共有; SD 与 C1 和 C2 共有的 OTUs 分

别是 32 个和 52 个, 而 C1 和 C2 之间共有的 OTUs 达 230 个。如图 4(b) 所示, 3 个样品中丰度最高的 OTU 是 OTU17, 其次是 OTU1168、OTU1228、OTU128 和 OTU605。OTU674 为样品 SD 和样品 C1 共有, 但在 SD 中的相对丰度较高。此外, OTU1041、OTU357、OTU483、OTU516、OTU532、OTU804、OTU610 和 OTU1050 仅出现在 SD 中; 而 OTU92、OTU886、OTU833、OTU501、OTU428、OTU218、OTU108 和 OTU1032 仅分布在 C1 中; C2 中相对丰

度较高的专有 OTUs 只有 OTU92 和 OTU915. 本研究中,虽然 C2 得到的 OTU 数最多,但由图 4(b)可知,C2 中相对丰度大于 0.05% 的 OTUs 明显少于 C1 和 SD. 这说明,ROX 处理虽然增加了 AOB 的 OTUs 的多样性,但是并未增加主要 OTUs 的丰度. 3 个样品的 Shannon 指数分别为 1.77 (SD)、3.25 (C1)和 2.84(C2).

对丰度均有所下降;这说明,*Nitrosomonas* 属中的 *N. eutropha*、*N. ureae* 和 *N. aestuarii* 是对 ROX 敏感的 AOB. 本研究中其它对 ROX 敏感的 AOB 为:*Nitrosomonas europaea* (0.00% ~ 0.56%)、*Nitrosomonas stercoris* (0.02% ~ 0.10%) 和 *Nitrosomonas nitrosa*(0.01% ~ 0.10%),它们的相对丰度随着 ROX 浓度的增加而下降. 除此之外,在 ROX 的选择压下,反应器中也存在对 ROX 耐受性较强的 AOB,例如;*Nitrosomonas oligotropha* (0.33%

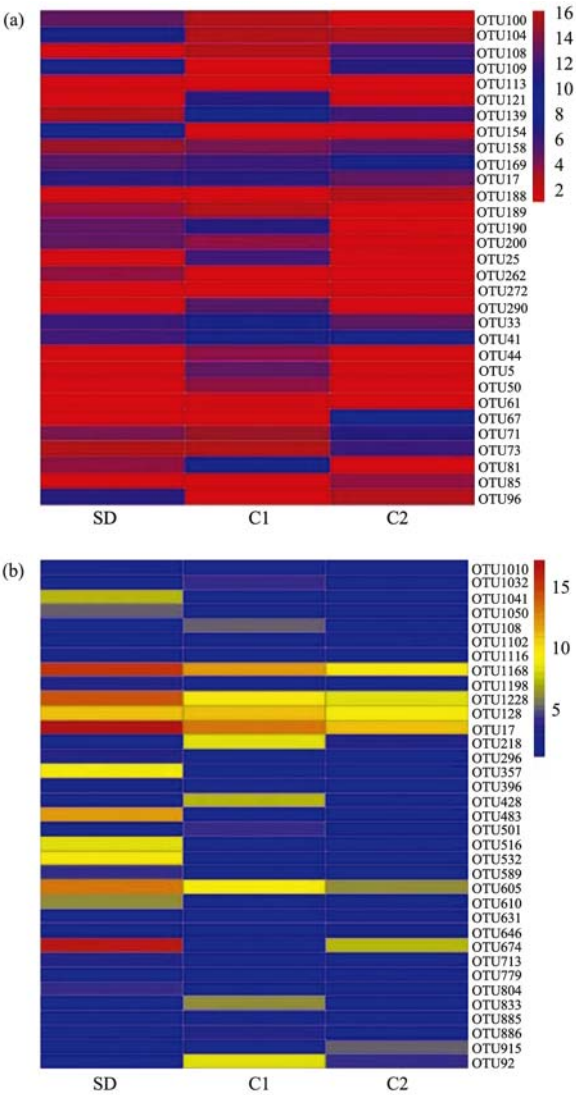


图 4 3 个样品 OTUs (>0.05%) 分布的 heatmap 分析
Fig. 4 Heatmap analysis of OTUs (>0.05%) in three activated sludge samples

本研究中共检测到 10 种 AOB [图 5 (b)], *Nitrosomonas eutropha* 是 3 个样品中最主要的 AOB; ROX 选择压使 *N. eutropha* 的相对丰度由 SD 中的 76.71% 分别下降至 54.22% (C1) 和 57.87% (C2). 此外, 其它重要的 AOB 有 *Nitrosomonas ureae* (7.58% ~ 14.17%) 和 *Nitrosomonas aestuarii* (1.84% ~ 2.72%); 在 ROX 的选择压下, 二者的相

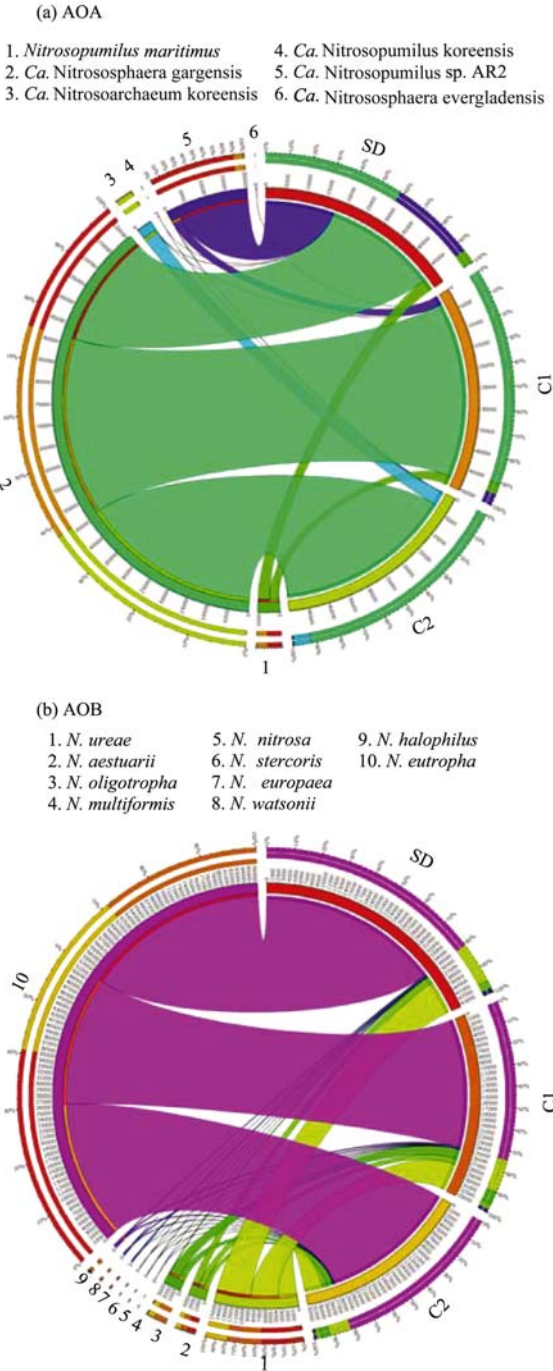


图 5 AOA 和 AOB 在种水平的相对丰度
Fig. 5 Relative abundance of AOA and AOB at genus level

~ 4.15%)、*Nitrosococcus halophilus* (0.37% ~ 0.52%)、*Nitrosococcus watsonii* (0.06% ~ 0.43%) 和 *N. multiformis* (0.00% ~ 0.08%)。其中, *N. oligotropha* 由 SD 中的 0.33% 增加至 4.15% (C1) 和 2.58% (C2)。综上所述, 在本研究中除了 *N. oligotropha*, *Nitrosomonas* 属的 AOB 都属于对 ROX 敏感的 AOB; 而 *N. oligotropha*、*N. halophilus*、*N. watsonii* 和 *N. multiformis* 则对 ROX 不敏感。

2.4 AOA 和 AOB 的群落结构与环境参数的相关性

RDA 分析结果如图 6 所示, 对于 AOA 而言, 由于 *Ca. Nitrosopumilus koreensis* 和 *Ca. Nitrososphaera evergladensis* 的相对丰度很低 (0.01% ~ 0.02%), 因此数据分析中未把它们计算在内。如图 6(a) 所示, 主坐标轴 1 和主坐标轴 2 对于 AOA 群落结构变化的解释量为 99.10% 和 0.90%。SD、C1 和 C2 之间

的距离较远, 说明 3 个样品的 AOA 群落结构差异显著。 *Nitrosopumilus maritimus* 与进出水的 NO_2^- -N、进水 COD 和 AOA *amoA* 基因的丰度呈正相关。 *Ca. Nitrosopumilus* sp. AR2 与进出水的 NO_2^- -N、进水 COD、进水 NH_4^+ -N 和 AOA *amoA* 基因的丰度呈正相关。 *Ca. Nitrososphaera gargensis* 与出水 NH_4^+ -N、出水 COD、进出水 NO_3^- -N、ROX 浓度、周期时间和 AOA *amoA* 基因的丰度呈正相关。然而, *Ca. Nitrosoarchaeum koreensis* 与出水 NH_4^+ -N、ROX 浓度和周期时间几乎在同一个轴线上, 说明 *Ca. Nitrosoarchaeum koreensis* 与出水 NH_4^+ -N、ROX 浓度和周期时间显著正相关。此外, *Ca. Nitrosoarchaeum koreensis* 还与进出水 NO_3^- -N、出水 COD 和进水 NH_4^+ -N 呈正相关。4 种不同的 AOA 都与进水或出水的 COD 呈正相关。RDA 的分析结果表明, *Ca. Nitrososphaera gargensis* 和 *Ca. Nitrosoarchaeum koreensis* 都与 ROX 呈正相关, 进一步说明了 *Ca. Nitrososphaera gargensis* 和 *Ca. Nitrosoarchaeum koreensis* 对 ROX 的耐受性较强。

对于 AOB 而言, 同样地, 由于 *N. multiformis*、*N. nitrosa* 和 *N. stercoris* 的相对丰度较低, 因此 RDA 分析中未把它们计算在内。如图 6(b) 所示, 主坐标轴 1 和主坐标轴 2 对于 AOB 群落结构变化的解释量为 98.64% 和 1.36%。 *N. oligotropha*、*N. watsonii* 和 *N. halophilus* 与进出水 NO_2^- -N、进出水 NO_3^- -N、出水 NH_4^+ -N、进水 COD、周期时间和 ROX 浓度呈正相关。 *N. aestuarii* 和 *N. ureae* 与 AOB *amoA* 基因丰度、进出水 NO_2^- -N、进水 COD 和 NH_4^+ -N 正相关。而 *N. eutropha* 和 *N. europaea* 与进水 NH_4^+ -N、AOB *amoA* 基因丰度和出水 NO_2^- -N 呈正相关。

3 讨论

抗生素由于其特有的杀菌抑菌能力而被广泛应用甚至滥用, 传统污水处理工艺不仅不能将 ROX 等抗生素完全去除, 甚至抗生素还可能会对生物处理过程产生影响。本研究结果表明环境浓度 (0.3、3 和 $30 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 和中等浓度 ($300 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 ROX 处理虽未对氨氧化作用表现出抑制作用, 但较高浓度 (5000 、 7000 、 9000 和 $12000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 ROX 对氨氧化作用均表现明显的抑制作用, 且当 ROX 浓度为 $7000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时抑制作用最强; 这说明不同浓度的 ROX 对氨氧化作用的影响差异明显。以前的研究表明, $0.01 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 0.1

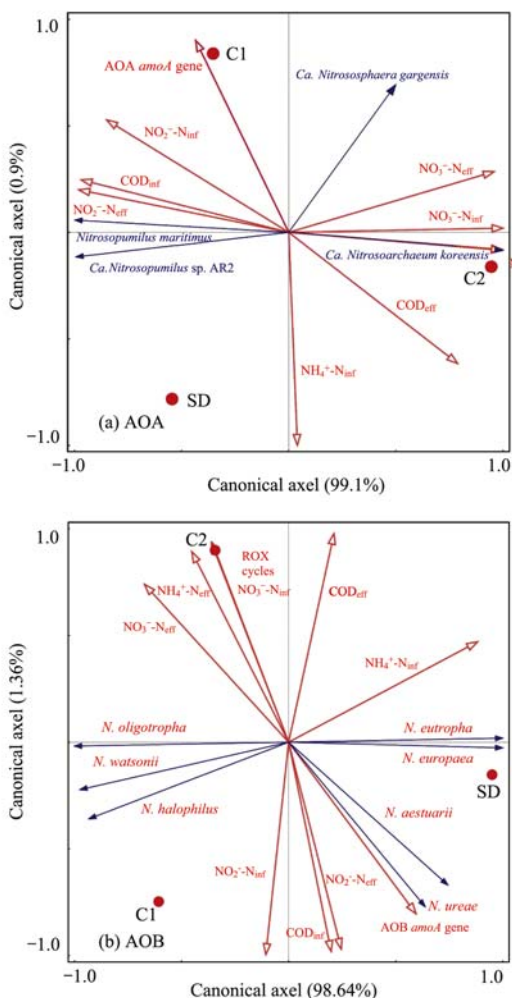


图 6 AOA 和 AOB 与环境变量之间的 RDA 分析
Fig. 6 Redundancy analysis triplot to investigate the ecological correlation between abundance of ammonia-oxidizing microorganisms and environmental factors

$\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的恩诺沙星能够刺激土壤的硝化作用, $1\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的恩诺沙星对土壤硝化作用产生抑制, 而 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 恩诺沙星则强烈抑制土壤硝化过程^[16].

本研究的 SD 中, AOA 的 *amoA* 基因丰度比 AOB 的丰度高 1 个数量级, 这与以前的研究结果相同, Bai 等^[17] 的研究发现 3 个 STPs 中 AOA 的丰度都高于 AOB. 在低浓度 (0.3 、 30 、 300 和 $3\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 ROX 短期冲击后, AOA 的丰度与 SD 和对照相比略微增加 $1\sim 2$ 倍; 而当 ROX 浓度 ($5\ 000$ 、 $7\ 000$ 、 $9\ 000$ 和 $12\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 增加后, AOA 的增长受到抑制. 此外, 除了环境中的痕量浓度 $0.3\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 其余浓度的 ROX 处理均明显降低了 AOB 的丰度, 且随着浓度的增加抑制作用增强. 类似的研究表明, 不同浓度 ($0.2\sim 10\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 的 ROX 均抑制了小麦根际土壤中 AOB 增长^[10]. 也有研究发现, 施用含有磺胺嘧啶的猪粪肥后导致玉米根际土壤中 AOA 和 AOB 的丰度下降, 但是 AOA 的下降程度不如 AOB 显著^[8, 9]. 对池塘底泥中氨氧化微生物的研究结果表明, 磺胺嘧啶对 AOA 的生长没有显著的影响, 但是 $100\sim 500\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的磺胺嘧啶对 AOB 的生长有显著抑制作用^[18]. 这些研究结果表明, AOA 对磺胺嘧啶的耐受性高于 AOB, 这与本文的研究结果相似, 即 AOA 对 ROX 的耐受性也高于 AOB; AOA 和 AOB 对抗生素的敏感度的差异性说明不同浓度的抗生素对古菌和细菌的作用不同. 此外, 有研究表明, AOA 利用 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate 途径进行无机碳代谢, 同时也具有同化有机碳的能力^[19]. 本研究的结果发现低浓度的 ROX 甚至使 AOA 的丰度增加, 说明 AOA 可能利用低浓度的 ROX 作为碳源进行代谢, 进而刺激了 AOA 增长; 相似的研究表明 *Ca. Nitrososphaera gargensis* 具有生物转化药物的能力^[20].

本研究应用高通量测序技术基于 *amoA* 基因研究 AOA 和 AOB 的多样性, 结果表明: 3 个样品分别得到 $38\sim 76$ 个 AOA OTUs 和 $291\sim 799$ 个 AOB OTUs, Gao 等^[12] 研究的 10 个 STPs 中 AOA 和 AOB 的多样性结果表明, 基于 *amoA* 基因的 PCR-克隆测序只得到 17 个 AOA OTUs 和 38 个 AOB OTUs. 此外, 在本研究中即便是相对丰度为 0.01% 的 OTUs, 高通量测序也能成功定量, 因此相比于传统的测序方法, 基于 *amoA* 基因的高通量测序能够更准确定量样品中耐受性较强和敏感的菌种的相对丰度, 从而可以更全面地分析 ROX 对氨氧化微生物的影响. 当环境中存在 ROX 选择压时, 微生物能够通过改变

群落结构以适应压力和维持自身功能, 由图 5(a) 可知, 在 ROX 的短期冲击后, AOA 的群落结构发生了明显的转变, 而 AOB 的群落结构变化不大; 这与 Tourna 的研究相似, 在不同的温度影响下土壤中 AOA 的群落结构发生明显的变化, 而 AOB 未变化^[21], 说明 AOA 可能是 ROX 选择压下的活性氨氧化者.

本研究中, 属于 groupI. 1b 的 *Ca. Nitrososphaera gargensis* 和 *Ca. Nitrosoarchaeum koreensis* 是对 ROX 耐受性较强的 AOA, 而属于 groupI. 1a 的 *Ca. Nitrosopumilus* sp. AR2 和 *Nitrosopumilus maritimus* 是对 ROX 敏感的 AOA. 类似的研究发现, 在施用含磺胺嘧啶猪粪肥处理的土壤样品中, 85% 的序列都属于 *Nitrososphaera* subclusters^[8, 9]. AOA 具有编码氨单加氧酶 (AMO) 各亚基的基因 (*amoA*、*amoB* 和 *amoC* 基因). 有研究表明, 在具有压力的环境中, *amoC* 基因具有稳定 AMO 的能力; 而且, groupI. 1b 的 *amoC* 基因的拷贝数比 groupI. 1a 和 AOB 的拷贝数多^[19]. 因此, 属于 groupI. 1b 的 AOA 要比 groupI. 1a 和 AOB 适应环境压力的能力强. 也有研究直接表明, *Ca. Nitrosoarchaeum koreensis* 可以适应抗生素的抗性压力^[22].

N. eutropha 是 3 个样品中占主导地位的 AOB; 以前的研究表明 *N. eutropha* 经常在污水处理设施和施用猪粪肥的土壤中被检测到^[23~25]; 还有研究表明仅在 *N. eutropha* 的基因组中发现了多药抗性基因和重金属抗性基因, 因而可能使 *N. eutropha* 在高污染的环境中生存力更强^[26]. 大部分 *Nitrosomonas* 属 (除了 *N. oligotropha*) 都属于对 ROX 敏感的 AOB. 而在 ROX 的选择压下, *N. oligotropha* 由 SD 中的 0.33% 分别增加至 4.15% (C1) 和 2.58% (C2), 对 ROX 的耐受性较强. 此外, 对 ROX 不敏感的 AOB 还有: *N. multiformis*、*N. watsonii* 和 *N. halophilus*. 而 Shen 等^[7] 的研究表明, 磺胺噻唑抑制了 *N. multiformis* 的生长. 因此, *N. multiformis* 对抗生素的敏感性还有待研究.

4 结论

(1) 较高浓度的 ROX 短期冲击使氨氧化作用明显受到抑制. 环境浓度和中等浓度的 ROX 刺激了 AOA 增长, 而较高浓度的 ROX 导致 AOA 的丰度下降; 此外, 除了环境中的痕量浓度 ($0.3\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 其余浓度的 ROX 短期冲击均导致 AOB 丰度下降, 且下降趋势比 AOA 显著.

(2) *Ca. Nitrososphaera gargensis* 和 *Ca. Nitrosoarchaeum koreensis* 为对 ROX 耐受性较强的 AOA; 而对 ROX 耐受性较强的 AOB 有: *N. oligotrophica*、*N. multiformis*、*N. watsonii* 和 *N. halophilus*.

(3) RDA 分析结果表明: AOA *Ca. Nitrososphaera gargensis* 和 *Ca. Nitrosoarchaeum koreensis* 与 ROX 浓度呈正相关. AOB *N. oligotrophica*、*N. watsonii* 和 *N. halophilus* 与 ROX 浓度呈正相关.

(4) AOA 对 ROX 的耐受性高于 AOB.

参考文献:

- [1] Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2010, **74** (3): 417-433.
- [2] 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.
- [3] Xu W H, Zhang G, Li X D, *et al.* Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in the Pearl River Delta (PRD), South China [J]. *Water Research*, 2007, **41** (19): 4526-4534.
- [4] Gao L H, Shi Y L, Li W H, *et al.* Occurrence of antibiotics in eight sewage treatment plants in Beijing, China [J]. *Chemosphere*, 2012, **86** (6): 665-671.
- [5] Ghosh G C, Okuda T, Yamashita N, *et al.* Occurrence and elimination of antibiotics at four sewage treatment plants in Japan and their effects on bacterial ammonia oxidation [J]. *Water Science and Technology*, 2009, **59** (4): 779-786.
- [6] Schlüsener M P, Bester K. Persistence of antibiotics such as macrolides, tiamulin and salinomycin in soil [J]. *Environmental Pollution*, 2006, **143** (3): 565-571.
- [7] Shen T L, Stieglmeier M, Dai J L, *et al.* Responses of the terrestrial ammonia-oxidizing archaeon *Ca. Nitrososphaera viennensis* and the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrospira multiformis* to nitrification inhibitors [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2013, **344** (2): 121-129.
- [8] Ollivier J, Schacht D, Kindler R, *et al.* Effects of repeated application of sulfadiazine-contaminated pig manure on the abundance and diversity of ammonia and nitrite oxidizers in the root-rhizosphere complex of pasture plants under field conditions [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, **4**: 22.
- [9] Ollivier J, Kleineidam K, Reichel R, *et al.* Effect of sulfadiazine-contaminated pig manure on the abundances of genes and transcripts involved in nitrogen transformation in the root-rhizosphere complexes of maize and clover [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, **76** (24): 7903-7909.
- [10] Yu B B, Wang X, Yu S, *et al.* Effects of roxithromycin on ammonia-oxidizing bacteria and nitrite-oxidizing bacteria in the rhizosphere of wheat [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, **98** (1): 263-272.
- [11] 叶磊, 祝贵兵, 王雨, 等. 白洋淀湖滨湿地岸边带氨氧化古菌与氨氧化细菌的分布特性 [J]. *生态学报*, 2011, **31** (8): 2209-2215.
- [12] Ye L, Zhu G B, Wang Y, *et al.* Abundance and biodiversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in littoral wetland of Baiyangdian Lake, North China [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, **31** (8): 2209-2215.
- [13] Gao J F, Luo X, Wu G X, *et al.* Abundance and diversity based on *amoA* genes of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in ten wastewater treatment systems [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, **98** (7): 3339-3354.
- [14] Li B, Zhang X X, Guo F, *et al.* Characterization of tetracycline resistant bacterial community in saline activated sludge using batch stress incubation with high-throughput sequencing analysis [J]. *Water Research*, 2013, **47** (13): 4207-4216.
- [15] 高景峰, 李婷, 张树军, 等. 两个 CANON 污水处理系统中氨氧化古菌的丰度和多样性研究 [J]. *环境科学*, 2015, **36** (8): 2939-2946.
- [16] Gao J F, Li T, Zhang S J, *et al.* Abundance and community composition of ammonia-oxidizing archaea in two completely autotrophic nitrogen removal over nitrite systems [J]. *Environmental Science*, 2015, **36** (8): 2939-2946.
- [17] Magoč T, Salzberg S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. *Bioinformatics*, 2011, **27** (21): 2957-2963.
- [18] 王加龙, 刘坚真, 陈杖榴, 等. 恩诺沙星残留对土壤微生物功能的影响 [J]. *生态学报*, 2005, **25** (2): 279-282.
- [19] Wang J L, Liu J Z, Chen Z L, *et al.* Effects of enrofloxacin residues on the functions of soil microbes [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2005, **25** (2): 279-282.
- [20] Bai Y H, Sun Q H, Wen D H, *et al.* Abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in industrial and domestic wastewater treatment systems [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, **80** (2): 323-330.
- [21] 张敏, 廖明军, 李大鹏, 等. 三种抗生素对池塘底泥氨氧化微生物生长及硝化作用的影响 [J]. *渔业现代化*, 2013, **40** (3): 25-30, 36.
- [22] Zhang M, Liao M J, Li D P, *et al.* Effects of three kinds of antibiotic on the nitrification and the growth of ammonia-oxidizing microorganism in freshwater aquaculture pond sediment [J]. *Fishery Modernization*, 2013, **40** (3): 25-30, 36.
- [23] Zhalnina K V, Dias R, Leonard M T, *et al.* Genome sequence of *Candidatus Nitrososphaera evergladensis* from group I.1b enriched from everglades soil reveals novel genomic features of the ammonia-oxidizing archaea [J]. *PLoS One*, 2014, **9** (7): e101648.
- [24] Men Y J, Han P, Helbling D E, *et al.* Biotransformation of two pharmaceuticals by the ammonia-oxidizing archaeon *Nitrososphaera gargensis* [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, **50** (9): 4682-4692.
- [25] Tournu M, Freitag T E, Nicol G W, *et al.* Growth, activity and temperature responses of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in soil microcosms [J]. *Environmental Microbiology*, 2008, **10** (5): 1357-1364.
- [26] Kim B K, Jung M Y, Yu D S, *et al.* Genome sequence of an ammonia-oxidizing soil archaeon, "*Candidatus Nitrosoarchaeum koreensis*" MY1 [J]. *Journal of Bacteriology*, 2011, **193** (19): 5539-5540.

- [23] Otawa K, Asano R, Ohba Y, *et al.* Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria community in intermittent aeration sequencing batch reactors used for animal wastewater treatment [J]. *Environmental Microbiology*, 2006, **8**(11): 1985-1996.
- [24] Hastings R C, Ceccherini M T, Miclaus N, *et al.* Direct molecular biological analysis of ammonia oxidising bacteria populations in cultivated soil plots treated with swine manure[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1997, **23**(1): 45-54.
- [25] Yamamoto N, Otawa K, Nakai Y. Diversity and abundance of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea during cattle manure composting[J]. *Microbial Ecology*, 2010, **60**(4): 807-815.
- [26] Stein L Y, Arp D J, Berube P M, *et al.* Whole-genome analysis of the ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosomonas eutropha* C91: implications for niche adaptation [J]. *Environmental Microbiology*, 2007, **9**(12): 2993-3007.

《环境科学》多项引证指标名列前茅

2016 年 10 月 12 日,中国科学技术信息研究所在中国科技论文统计结果发布会上公布了 2015 年度中国科技论文统计结果. 统计结果显示《环境科学》2015 年度总被引频次 8 844,影响因子 1. 617,多项引证指标位居环境科学技术及资源科学技术类科技期刊前列.



CONTENTS

Marine Aerosol Using On-board Aerosol Mass Spectrometry	YAN Jin-pei, CHEN Li-qi, LIN Qi, <i>et al.</i> (2629)
Analysis of Spatio-temporal Distribution and Variation Characteristics of Aerosol Optical Depth over the Northwest of China by MODIS C6 Product	ZHAO Shi-wei, GAO Xiao-qing (2637)
Sources and Characteristics of Regional Background PM ₁ in North China During the Autumn and Winter Polluted Period ...	ZHANG Zhou-xiang, ZHANG Yang-mei, ZHANG Xiao-ye, <i>et al.</i> (2647)
Pollution Characteristics and Light Extinction Contribution of Water-soluble Ions of PM _{2.5} in Hangzhou	WU Dan, LIN Shao-long, YANG Huan-qiang, <i>et al.</i> (2656)
Formation and Size Distribution of the Secondary Aerosol Inorganic Ions in Different Intensity of Haze in Qingdao, China	XIE Dan-dan, QI Jian-hua, ZHANG Rui-feng (2667)
Comparison of Characteristics and Reactive Oxidative Species of PM _{2.5} in Xi'an, China During Haze and Clean Days	WANG Kun, HAN Yong-ming, Ho Steven Sai Hang, <i>et al.</i> (2679)
Seasonal Variation and Sources of Dicarboxylic Acids and Related Compounds in PM ₁₀ from Mt. Huangshan	MENG Jing-jing, HOU Zhan-fang, ZHANG Er-xun, <i>et al.</i> (2688)
Composition Characteristics and Sources Apportionment of Lanthanoid in PM _{2.5} of Quanzhou	ZHANG Yun-feng, YU Rui-lian, HU Gong-ren, <i>et al.</i> (2698)
Pollution Characteristics and Health Risk Assessment of Hazardous Air Pollutants in the Surroundings of Three Petrochemical Industries in Northwest China	XU Ya-xuan, LI Xiao-min, YU Hua-tong, <i>et al.</i> (2707)
VOCs Characteristics and Sources Apportionment in Yixing City During the G20 Summit	ZHANG Lin, ZHANG Xiang-zhi, QIN Wei, <i>et al.</i> (2718)
Agricultural Ammonia Emission Inventory and Its Spatial Distribution in Sichuan Province from 2005 to 2014	FENG Xiao-qiong, CHEN Jun-hui, JIANG Tao, <i>et al.</i> (2728)
Air Pollutant Emission Inventory of Non-road Machineries in Typical Cities in Eastern China	LU Jun, HUANG Cheng, HU Qing-yao, <i>et al.</i> (2738)
Estimation of Health Risk and Enaction of Safety Standards of <i>N</i> -nitrosodimethylamine (NDMA) in Drinking Waters in China	ZHANG Qiu-qiu, PAN Shen-ling, ZHANG Yu, <i>et al.</i> (2747)
Comparison and Analysis of the Quantitative Methods for Pollutant Sources Load in Groundwater Contamination Risk Assessment	ZHAO Peng, HE Jiang-tao, WANG Man-li, <i>et al.</i> (2754)
Distribution and Sources of <i>n</i> -alkanes in Surface Seawater of Jiaozhou Bay	ZHANG Qian, SONG Jin-ming, PENG Quan-cai, <i>et al.</i> (2763)
Spatial Variations of CO ₂ Degassing Across Water-air Interface and Its Impact Factors in Summer in Guijiang River, China	ZHANG Tao, LI Jian-hong, PU Jun-bing, <i>et al.</i> (2773)
Spatial Distribution Characteristics and Potential Ecological Risk of Antimony and Selected Heavy Metals in Sediments of Duliujiang River	NING Zeng-ping, XIAO Qing-xiang, LAN Xiao-long, <i>et al.</i> (2784)
Distribution Characteristics and Potential Risk of Bisphenol Analogues in Surface Water and Sediments of Lake Taihu	CHEN Mei-hong, GUO Min, XU Huai-zhou, <i>et al.</i> (2793)
Characteristics of Water Extractable Organic Nitrogen from Erhai Lake Sediment and Its Differences with Other Sources	LI Wen-zhang, ZHANG Li, WANG Sheng-rui, <i>et al.</i> (2801)
High-resolution Distribution Characteristics of Phosphorous, Iron and Sulfur Across the Sediment-Water Interface of Aha Reservoir ...	SUN Qing-qing, CHEN Jing-an, WANG Jing-fu, <i>et al.</i> (2810)
Distribution Characteristics of Drugs of Abuse and Their Metabolites in Aqueous Environment of Beijing, China	ZHANG Yan, ZHANG Ting-ting, CHEN Wei-ping, <i>et al.</i> (2819)
Impacts of Rainfall Characteristics and Occurrence of Pollutant on Effluent Characteristics of Road Runoff Pollution	CHEN Ying, WANG Zhao, WU Ya-gang, <i>et al.</i> (2828)
Inhibition of Internal Phosphorus Release in the Black-Odor Channel Under Different Adding Methods of CaO ₂	XU Yao, LI Da-peng, HAN Fei-er, <i>et al.</i> (2836)
Transport of Nitrogen and Phosphorus from Sloping Farmland with Thin Purple Soil Overlying Rocks	XIAN Qing-song, TANG Xiang-yu, ZHU Bo (2843)
Purification of Slightly Salt-alkaline Water Bodies by Microorganism Enhanced Combined Floating Bed	CHEN You-yuan, WU Ya-dong, SUN Ping, <i>et al.</i> (2850)
MgO-Biochar for the Adsorption of Phosphate in Water	WANG Bin-bin, LIN Jing-dong, WAN Shun-li, <i>et al.</i> (2859)
Degradation of <i>N</i> -nitrosodimethylamine by Palladium/ Iron Bimetallic Composite Catalytic Fiber	ZHANG Huan, FU Min, WEI Jun-fu, <i>et al.</i> (2868)
Effects of Goethite, Magnetite and Gypsum on the Anaerobic Degradation of 2,4-Dichlorophenol	KONG Dian-chao, ZHOU Yue-fei, CHEN Tian-hu, <i>et al.</i> (2875)
Transformation of Disinfection Byproduct Precursors During the Wastewater Regeneration Processes	HAN Hui-hui, MIAO Heng-feng, ZHANG Ya-jing, <i>et al.</i> (2883)
Treatment of PTA Wastewater by Modified Anode Microbial Fuel Cell	SUN Jing-yun, FAN Meng-jie, CHEN Ying-wen, <i>et al.</i> (2893)
Selective Inhibition of Rice Straw Extract on Growth of Cyanobacteria and Chlorophyta	SU Wen, CHEN Jie, ZHANG Sheng-peng, <i>et al.</i> (2901)
Cultivation of <i>Spirulina platensis</i> in Digested Piggery Wastewater Pretreated by SBR with Operating Conditions Optimization	CAI Xiao-bo, YU Qiang-qiang, LIU Rui, <i>et al.</i> (2910)
Nitrogen Removal Performance of ANAMMOX Process with K ⁺ Addition in Saline Surroundings	WU Guo-dong, YU De-shuang, LI Jin, <i>et al.</i> (2917)
Efficient and Stable Operation of Shortcut Nitrification by Entrapping Ammonia Oxidizing Bacteria	YU Meng-yu, LIU Yi, TIAN Yu-bin, <i>et al.</i> (2925)
Fast Start-up of ANAMMOX and the Spatial Distribution of EPS in ANAMMOX Granules	LI Hui-juan, PENG Dang-cong, CHEN Guo-yan, <i>et al.</i> (2931)
Ammonia Oxidation with Potential Electron Acceptor in ANAMMOX Sludge	LI Xiang, LIN Xing, WANG Fan, <i>et al.</i> (2941)
Ammoniac Waste Gas in-situ Treatment Based on ANAMMOX Process	LIN Xing, WANG Fan, YUAN Yan, <i>et al.</i> (2947)
Extensive Green Roof Substrate Composition Based on Sludge Recycling	SHEN Qing-ran, LI Tian, CAO Yi, <i>et al.</i> (2953)
Short-term Effect of Roxithromycin on Abundance and Diversity of Ammonia-Oxidizing Microorganisms in Activated Sludge	GAO Jing-feng, SUN Li-xin, FAN Xiao-yan, <i>et al.</i> (2961)
Influence of Salinity on Microbial Community in Activated Sludge and Its Application in Simulated Dye Wastewater Treatment	ZHOU Gui-zhong, XU Shuo, YAO Qian, <i>et al.</i> (2972)
Shift of Microbial Communities During the CO ₂ -Brine-Sandstone Interaction Process	WANG Bo-qiang, LI Chen-yang, LU Wei, <i>et al.</i> (2978)
Response of Soil Respiration and Heterotrophic Respiration to Returning of Straw and Biochar in Rape-Maize Rotation Systems	TIAN Dong, GAO Ming, HUANG Rong, <i>et al.</i> (2988)
Effect of Simulated Climate Warming on Microbial Community and Phosphorus Forms in Wetland Soils	TENG Chang-yun, SHEN Jian-guo, WANG Zhong, <i>et al.</i> (3000)
Patterns of Bacterial Community Through Soil Depth Profiles and Its Influencing Factors Under <i>Betula albosinensis</i> Burkill in the Xinjiashan Forest Region of Qinling Mountains	DU Can, XU Chen-yang, WANG Qiang, <i>et al.</i> (3010)
Effects of Microbial Activities on Mercury Methylation in Farmland near Mercury Mining Area	JIA Qin, ZHU Xue-mei, WANG Qi, <i>et al.</i> (3020)
Effect of Sepiolite Application on the Migration and Redistribution of Pb and Cd in Soil Rice System in Soil with Pb and Cd Combined Contamination	FANG Zhi-ping, LIAO Min, ZHANG Nan, <i>et al.</i> (3028)
Application of Amphoteric-Cationic Combined Modification on Phenol Adsorption of Yellow Brown Soil	LIU Wei, MENG Zhao-fu, REN Shuang, <i>et al.</i> (3036)
Bioaccumulation of Heavy Metals in Twigs and Leaves of <i>Abies fabri</i> at Mount Gongga in China; A Comparison Study Between 1999 and 2014	LI Fen, WANG Xun, LUO Ji, <i>et al.</i> (3045)
Subcellular Distribution and Chemical Forms of Heavy Metals in Three Types of Compositae Plants from Lead-Zinc Tailings Area	ZHU Guang-xu, XIAO Hua-yun, GUO Qing-jun, <i>et al.</i> (3054)
Effects of Bentonite Amendment on Detoxification, Heavy Metal Passivation and Estrone Elimination of Sewage Sludge Compost	ZHOU Li-na, CAI Han-zhen, LI Rong-hua, <i>et al.</i> (3061)
Mesophilic and Thermophilic Anaerobic Co-Digestion of Food Waste and Straw	GUO Xiang-lin, ZUO Jian-e, SHI Xu-chuan, <i>et al.</i> (3070)
Basic Features of Combustible Rural Garbage Component and Its Spatial-temporal Difference in China	YAN Zhuo-yi, YUE Bo, GAO Hong, <i>et al.</i> (3078)
Optimization of Promoter and Support for Co-based/zeolites Catalysts in Catalytic Reduction of NO _x by CH ₄	PAN Hua, JIAN Yan-fei, CHEN Ning-na, <i>et al.</i> (3085)