ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第35卷 第6期

Vol.35 No.6

2014

中国科学院生态环境研究中心 主办

科学出版社 出版

双奖期刊

环境科学
(HUANJING KEXUE)
ENVIRONMENTAL SCIENCE
第35卷 第6期
2014年6月15日

目 次

北京地区冬夏季持续性雾-霾发生的环境气象条件对比分析 …… 廖晓农,张小玲,王迎春,刘伟东, 杜佳,赵玲慧(2031)
阜康大气气溶胶中水溶性无机离子粒径分布特征研究 …… 苗红妍,温天雪,王跃思,刘子锐,王丽,兰中东(2045)
上海地铁站台大气颗粒物中过渡金属研究 …… 包良满,雷前涛,谈明光,李晓林,张桂林,刘卫,李燕(2052)
七一冰川地区苔藓中重金属元素含量研究 …… 马娟娟,李真(2060)
冬季东海、南黄海中DMS和DMSP浓度分布及影响因素研究 …… 宋以柱,张洪海,杨桂朋(2067)
大亚湾石化排污海域重金属污染及生态风险评价 …… 徐姗楠,李纯厚,徐娇娇,肖雅元,林琳,黄小平(2075)
深圳水库群表层水中全氟化合物的分布特征 …… 王鑫璇,张鸿,何龙,沈金灿,柴之芳,杨波,王艳萍(2085)
表层岩溶泉水中多环芳烃污染特征及来源解析 …… 孙玉川, 沈立成,袁道先(2091)
桂江主要离子及溶解无机碳的生物地球化学过程 …… 唐文魁,陶贞,高全洲,毛海若,姜光辉,焦树林,郑雄波,张乾柱,马赞文(2099)
汾河源区不同景观带水文过程研究 …… 杨永刚,李彩梅,秦作栋,邹松兵(2108)
北京市通州区地下水分层质量评价及水化学特征 …… 郭高轩,琚宜文,翟航,许亮,沈媛媛,纪轶群(2114)
光透法定量两相流中流体饱和度的模型及其应用 …… 章艳红,叶淑君,吴吉春(2120)
紫色土坡耕地氮淋溶过程及其环境健康效应 …… 陈维梁,高扬, 林勇明,朱波,徐亚娟,于贵瑞,吴承祯(2129)
基于非点源溶解态氮负荷估算的率水流域土地利用结构优化研究 …… 陆宇超,毕孟飞,李泽利,沙健,王玉秋,钱丽萍(2139)
镇江老城区古运河沉积物氮及有机质垂向分布及污染评价 …… 周晓红,李义敏,周艺,卫安平,周广顺, 肖思思(2148)
两种沉水植物对上覆水和间隙水中可溶性无机氮的影响 …… 杨文斌,李阳,孙共献(2156)
湖泊沉积物短时间反复扰动下悬浮物上生物有效磷的动态变化 …… 武晓飞,李大鹏(2164)
不同扰动强度下城市重污染河道底泥对磷吸收和固定的影响 …… 王尚, 李大鹏(2171)
池塘残饵对底泥氮、磷释放影响的模拟研究 …… 吕元蛟,李瑞娇,张念,赵峰,谢从新,张敏(2178)
再悬浮过程中河流底泥PAHs的迁移与释放 …… 王晓慧,毕春娟,韩景超(2185)
低分子有机酸对汞氧化还原反应的影响 …… 赵士波,孙荣国,王定勇,王小文,张成(2193)
活性炭催化过氧化氢去除荧光增白剂 …… 刘海龙,张忠民,赵霞, 焦茹媛(2201)
准分子灯光照降解水相中烷基酚的动力学 …… 刘玉海, 叶招莲, 文颖频,毕承路(2209)
AF+BAF用于处理树脂化工集中区废水厂尾水的研究 …… 涂勇,刘伟京,张耀辉,徐军,唐敏,陈勇,白永刚(2216)
镉(Ⅱ)-8-羟基喹啉分子印迹聚合物微球的合成及吸附性能研究 …… 杨春艳,陈复彬,赵慧,常自强,章竹君(2223)
微气泡曝气生物膜反应器同步硝化反硝化研究 …… 刘春,年永嘉,张静,张明,张磊,龚鹏飞,肖太民,李星(2230)
聚乳酸/淀粉固体缓释碳源生物反硝化研究 …… 唐丹琦,王娟,郑天龙,刘建国,汪群慧(2236)
丝状菌膨胀对无纺布生物反应器处理效果及膜污染特征的影响 …… 侍宽,薛罡,高品,吴凡(2241)
聚合氯化铝去除污泥水中磷的工艺优化 …… 周振,胡大龙,乔卫敏,陈冠翰,蒋玲燕,李震,麦穗海(2249)
鄱阳湖持久性有机污染物(POPs)长距离传输潜力模拟 …… 弓晓峰,向洪锐,陈春丽,周文斌,王佳佳,刘春英,曾艳(2256)
基于不确定性分析的垃圾焚烧烟气中重金属的土壤沉积及生态风险评估 …… 廖志恒,孙家仁,吴兑,范绍佳,任明忠,吕家扬(2264)
农药企业场地土壤中苯系物污染风险及管理对策 …… 谭冰,王铁宇,李奇锋,张海燕,庞博,朱朝云,王道涵,吕永龙(2272)
渤海湾海域10种鱼类中二噁英类及指示性多氯联苯的污染特征研究及风险评价 …… 王莎莎,高丽荣,田益玲,朱帅,张芹(2281)
基于荧光传感器Frex的特性检测水质环境中生物毒性物质 …… 赵巍,汪钊,蔡强,欧文斌,孟凡国(2287)
对苯二酚抑制铜绿微囊藻生长下藻毒素的产生与释放 …… 张元春,梁文艳,赵远,李飞贞,曹敬灿,胡绍杰(2294)
基于沼液的培养基及产油小球藻藻种选育 …… 赵凤敏,梅帅,曹有福,丁进锋,徐嘉杰,李树君(2300)
酸性矿山废水库周边土壤微生物多样性及氨氧化菌群落研究 …… 刘莹,王丽华,郝春博,李璐,李思远,冯传平(2305)
河蚬(*Corbicula fluminea*)扰动对表层沉积物中氨氧化菌群落结构和丰度的影响 … 王雪,赵大勇,曾巾,余多慰,吴庆龙(2314)
海洋油气田沉积物产甲烷活性及微生物生态 …… 田琪,王佳,范晓蕾,罗生军,郭荣波,邱艳玲(2322)
DGGE及T-RFLP分析光照下电位对细菌群落的影响 …… 吴义诚,邓欢,肖勇,赵峰(2328)
重金属抗性解磷细菌的磷溶解特性研究 …… 田江,彭霞薇,李霞,孙雅君,冯红梅, 江泽平(2334)
1株耐冷兼性嗜碱好氧反硝化菌的分离鉴定及反硝化特性 …… 王兆阳,陈国耀,姜珂,许培雅(2341)
黑麦草-丛枝菌根对不同番茄品种抗氧化酶活性、镉积累及化学形态的影响 …… 江玲,杨芸,徐卫红,王崇力,陈蓉,熊仕娟,谢文文,张进忠,熊治庭,王正银,谢德体(2349)
黄河三角洲区土壤活性氮对盐分含量的响应 …… 李玲,仇少君,陈印平,赵西梅,刘京涛,陆兆华(2358)
宁南山区不同草地土壤原位矿化过程中氮素的变化特征 …… 蒋跃利,赵彤,闫浩,黄懿梅(2365)
长期施用四环素残留猪粪对土壤中耐药菌及抗性基因形成的影响 …… 张俊,杨晓洪,葛峰,王娜,焦少俊,叶波平(2374)
长期不同耕作方式对紫色水稻土重金属含量及有效性的影响 …… 常同举,崔孝强,阮震,赵秀兰(2381)
伊犁河流域土壤重金属环境地球化学基线研究及污染评价 …… 赵新儒,特拉津·那斯尔,程永毅,詹江渝,杨剑虹(2392)
江苏如东互花米草盐沼湿地重金属分布及其污染评价 …… 张龙辉, 杜永芬, 王丹丹, 高抒, 高文华(2401)
小流域农业面源氮污染时空特征及与土壤呼吸硝化关系分析 …… 欧阳威,蔡冠清,黄浩波,耿晓君(2411)
保护性耕作下小麦田土壤呼吸及碳平衡研究 …… 张赛,王龙昌, 黄召存,贾会娟,冉春燕(2419)
米槠天然林和人工林土壤呼吸的比较研究 …… 吴君君,杨智杰,翁发进,刘小飞,陈朝琪,林伟盛,王小红,陈坦(2426)
水力停留时间对复合式厌氧折流板反应器乙醇型发酵制氢系统的影响 …… 刘晓烨,张洪,李永峰(2433)
《环境科学》征订启事(2208) 《环境科学》征稿简则(2400) 信息(2084,2200,2229,2391)

长期施用四环素残留猪粪对土壤中耐药菌及抗性基因形成的影响

张俊[1],杨晓洪[1],葛峰[2],王娜[2,3],焦少俊[2,3]*,叶波平[1]*

(1. 中国药科大学生命科学与技术学院,南京 210000; 2. 环境保护部南京环境科学研究所,南京 210042; 3. 国家环境保护农药环境评价与污染控制重点实验室,南京 210042)

摘要: 探讨了长期施用含兽用四环素药物残留的畜禽粪便对土壤环境中耐药菌及抗性基因形成的影响. 分秋季和夏季两次采集苏北黄淮地区沭阳市某养猪场周边长期用含有四环素残留的猪粪作为肥料的耕地土壤,并采集当地没有施加过猪粪的耕地土壤作为对照. 分析样品中耐药菌的组成,同时利用 PCR 技术研究 3 种目前常见的四环素抗性基因(*tetA*、*tetC*、*tetE*). 结果表明,从秋季土壤样品中共分离出 59 株耐药菌,属于 13 个菌属,夏季土壤中共分离出 35 株耐药菌,属于 10 个菌属,其中致病菌数占总耐药菌数的比例高达 38.14%,而对照组中的 3 株耐药菌只属于一个菌属(*Streptomyces*). PCR 结果显示所有的耐药菌上都携带了抗性基因,*tetC* 是含量最高的抗性基因. 施用过含有四环素残留猪粪的土壤样品中四环素的残留含量为 41.1 ~ 61.9 μg·kg^{-1},干土中四环素抗性基因含量为 4.63×10^5 ~ 37.42×10^5 copies·g^{-1},通过将土壤中四环素的残留量与土壤中抗性基因的量进行拟合,结果发现在一定范围内,四环素残留量与四环素抗性基因量存在着显著的正相关关系. 研究还发现合适的气候条件对耐药菌和抗性基因的形成有较好的促进作用.

关键词: 土壤; 四环素; 耐药菌; 抗性基因; PCR; R-T PCR

中图分类号: X53 **文献标识码**: A **文章编号**: 0250-3301(2014)06-2374-07 **DOI**: 10.13227/j.hjkx.2014.06.046

Effects of Long-Term Application of Pig Manure Containing Residual Tetracycline on the Formation of Drug-Resistant Bacteria and Resistance Genes

ZHANG Jun[1], YANG Xiao-hong[1], GE Feng[2], WANG Na[2,3], JIAO Shao-jun[2,3], YE Bo-ping[1]

(1. Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210000, China; 2. Nanjing Institute of Environmental Sciences, MEP, Nanjing 210042, China; 3. State Environmental Protection Pesticide Environmental Assessment and Pollution Control Key Laboratory, Nanjing 210042, China)

Abstract: The effect of residual veterinary tetracycline on the formation of drug-resistant bacteria and corresponding resistance genes was investigated. During the research, the soil with long-term application of pig manure containing residual tetracycline was collected in autumn and summer respectively in the farmland around a certain pig farm in Shuyang City, Huang Huai area, north of Jiangsu province. At the same time, soils without application of pig manure in the farmland of this area were collected as the reference sample. Composition of drug-resistant bacteria in all soil samples was analyzed and three common tetracycline-resistance genes (*tetA*, *tetC*, *tetE*) were studied by PCR as well. During the research, 59 drug-resistant bacteria belonging to 13 bacterial genus respectively were separated from the soil sample collected in autumn while 35 drug- resistant bacteria belonging to 10 bacterial genus respectively were separated from the soil sample collected in summer and as for the reference sample, 3 drug-resistant bacteria belonging to 1 bacterial genus (*Streptomyces*) were separated with pathogenic bacteria up to 38.14% of total drug- resistant bacteria. PCR result showed that resistance genes were detected in all drug-resistant bacteria and *tetC* accounted for the most. At the same time, the residual tetracycline in the soil which was in a range of 41.1-61.9 μg·kg^{-1} correlated with the amount of resistance genes (4.63×10^5-37.42×10^5 copies·g^{-1}). Besides, the climate was found accelerating the formation of drug-resistant bacteria and resistance genes.

Key words: soil; tetracycline; drug-resistant bacteria; resistance gene; PCR; R-T PCR

随着畜牧养殖业的集约化发展,抗生素已广泛用于养殖业达 50 a 之久[1]. 其中四环素由于具有较强的抗炎、免疫作用且价格低廉[2],常被作为饲料添加剂及防病药物在畜牧业尤其养猪行业中广泛使用[3]. 畜禽养殖中大量使用的四环素多会以原药的形式随粪便及尿液排出动物体外[4]. 由于畜禽粪便中残留的四环素类药物在非特定条件下降解较为缓慢[5],当被持续施加到农田后就直接导致了土壤污染. 近年来,国外有报道指出环境中抗生素的残留可诱导环境中抗性基因产生,并可维持其含量水平[6]. Pruden 等[7]指出,抗生素污染所诱导的抗性

收稿日期: 2013-09-24; **修订日期**: 2013-11-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(21102053); 江苏省自然科学基金项目(BK2011082)

作者简介: 张俊(1988 ~),男,硕士研究生,主要研究方向为环境微生物与抗性基因的检测,E-mail:ykd518@126.com

* 通讯联系人,E-mail:yebp@cpu.edu.cn; jsj@nies.org

基因与抗生素一样，也可能成为一种新型环境污染物，而且其风险要比抗生素药物本身的污染风险更高. 此外，土壤抗生素污染还可通过地表径流和淋滤作用进一步造成水体的抗生素污染[8]，并引发细菌耐药性，威胁动物与人类健康. 鉴于四环素残留可能造成的环境和健康危害，很多国家已经在养殖业中制定了四环素使用规范并强制进行禽畜粪便的无害化处置[9]. 然而我国在此方面的研究才刚刚开始，所暴露出来的某些环境问题却日趋严重[10]，因此，了解四环素残留对耐药菌及抗性基因形成的影响，对于降低四环素耐药菌及抗性基因的环境污染，制定养殖行业四环素的使用规范，控制我国有机肥料使用中的环境风险，保护人类的身体健康显得尤为重要.

1　材料与方法

1.1　土壤的采集

实验所用土壤采集于江苏省沭阳市某年出栏量为3 000头左右的养猪场周边种植耕地，已持续施用该养猪场的未经任何处理的猪粪 8 a，每年施加猪粪肥 2 ~ 3 次. 土壤性质为黄棕壤. 本研究中采样分为两次，2011 年 11 月（秋季）不同点采集土壤样品 7 个，分别标记为 A1 ~ A7，2012 年 7 月（夏季）采集 4 个土壤样品，分别标记为 S1 ~ S4. 其中 S1、S2、S3 为 A1、A2、A3 的同点重复采样. 同时于 2011 年 11 月采集当地远离养猪场，从未施加过猪粪的耕地土壤作为空白对照，标记为 CK. 土壤采集于地表以下 10 ~ 15 cm 处，采集后于 4℃冰箱中冷藏保存[11].

1.2　猪粪的采集

采集该养猪场内新鲜猪粪若干，置于干净的塑料袋中，于 4℃冰箱中保存.

1.3　土壤和猪粪中四环素残留量的分析

采用 LC-MS/MS 法[12]测定土壤和猪粪中四环素残留量，HPLC 测定条件：色谱柱：ACQUITY UPLC BEH C18 柱（1.7 μm，2.1 mm × 100 mm；Waters）；柱温：35℃；流动相：乙腈（A）和 0.1% 甲酸/水（体积比）（B），流速 0.2 mL·min^{-1}. MS 检测条件：电喷雾离子源（ESI），离子源温度为 120℃，脱溶剂温度为 350℃，脱溶剂气和锥孔气为氮气，脱溶剂气流速为 600 L·h^{-1}，锥孔气流速为 50 L·h^{-1}，碰撞气为高纯氩气，采用多反应监测模式（MRM）检测. 测定使用 ESI 正离子模式，进样 5 μL. 土壤中四环素的检出率为 100%，回收率为 70.4% ±5.7%，检测限为 0.2 ng·g^{-1}. 粪便中四环素的检出率为 100%，回收率为 68.3% ±6.6%，检测限为 0.3 ng·g^{-1}.

1.4　土壤的处理

1.4.1　土壤总 DNA 的提取

分别取各采样点土壤 0.25 g，按照 PowerSoil® DNA Isolation Kit（MoBio，美国）试剂盒说明书提取土壤总 DNA.

1.4.2　土壤中可培养细菌和耐药菌丰度分析

每个土壤样品称取 5 g，分别加入到装有 45 mL 无菌生理盐水和若干小玻璃珠的三角瓶中，37℃下 200 r·min^{-1}振荡 30 min 制成土壤悬液，记为稀释度 1，然后按照 10 倍倍比稀释的方法将样品梯度稀释至 10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}. 分别取上述稀释梯度的土壤悬液 200 μL 涂布于牛肉膏蛋白胨平板培养基和含 16 μg·mL^{-1}四环素的牛肉膏蛋白胨平板培养基上，各稀释度制备 3 个平行板. 平板倒置于生化培养箱中，37℃恒温培养 2 ~ 5 d，根据菌落生长情况确定培养时间（H）. 计数每个平板上的菌落数，从而计算每克土壤样品中的菌落形成单位（CFU）. 计算公式为：菌落数/g 土 =（9 × 平均菌落数 × 稀释倍数）/0.2.

1.4.3　耐药菌的分离

利用平板划线法纯化抗性平板上长出的耐药菌. 挑取纯化后的单菌落接种至肉汤培养基（含四环素 16 μg·mL^{-1}）中培养，培养好的耐药菌置于甘油管中，于 -70℃冰箱中保存，以作后续研究. 从秋季土壤样品中分离出 59 株耐药菌，A1 ~ A7 分别为 14、19、8、4、5、4、5 株，夏季样品中分离出 35 株耐药菌，其中 S1 8 株，S2 14 株，S3 6 株，S4 7 株，对照组 CK 中分离出 3 株耐药菌.

1.4.4　耐药菌基因组 DNA 和质粒 DNA 的提取

将纯化好的耐药菌接种于肉汤培养基（含四环素 16 μg·mL^{-1}）中，在 37℃，200 r·min^{-1}摇床中培养过夜，分别利用 TIANamp Bacteria DNA Kit（Tiangen，中国）和 AxyPrep Plasmid Miniprep Kit（Axygen，美国）提取耐药菌基因组 DNA 和质粒 DNA.

1.5　耐药菌的鉴定

以提取的耐药菌基因组 DNA 作为模板，选取 16S rDNA 通用引物 27F（5′-AGAGTTTGATCATGGCTCAG- 3′）和 1492R（5′-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3′）进行 PCR 扩增. 扩增体系：100 ~ 200 ng 基因组 DNA，10 × *Taq* plus buffer（1.5 mmol $MgCl_2$），2.5 mmol dNTP，1.2 U *Taq* plus DNA 聚合酶，10 μmol 上/下游引物，补足 ddH_2O 至 25 μL. 扩

增条件:94℃预变性 5 min,94℃变性 1 min,58℃退火 30 s,72℃延伸 90 s,30 个循环,最后 72℃延伸 10 min 完成扩增. 设置双蒸水为模版的阴性对照. 将扩增好的 PCR 产物送往南京金斯瑞生物科技有限公司测序. 从 Internet 进入 NCBI 站点后,用"Nucleotide Blast"程序将测序序列与 GenBank 中已知的各种微生物 16S rDNA 进行相似性搜索,寻找同源序列,确定其所在菌属.

1.6 *tetA*、*tetC*、*tetE* 抗性基因的检测

1.6.1 基因组 DNA 和质粒 DNA 为模版的 PCR 扩增

抗性基因 *tetA*、*tetC* 和 *tetE* 的引物设计来源于文献[13,14],引物序列如表 1. 建立 25 μL 扩增体系,其中含 100 ~ 200 ng 基因组 DNA 或质粒 DNA、10 × *Taq* plus buffer(1.5 mmol $MgCl_2$)、1.5 U *Taq* plus DNA 聚合酶、2.5 mmol dNTP、10 μmol 上/下游引物、ddH_2O 补充体积至 25 μL. 混匀上述反应液后,94℃预变性 5 min,然后按 94℃变性 1 min,60℃、59℃、56℃(*tetA*、*tetC*、*tetE*)退火 30 s,72℃延伸 45 s,最后于 72℃延伸 7 min 结束反应. 选取基因组 DNA A202 和质粒 DNA A206 的扩增产物送往南京金斯瑞生物科技有限公司测序,经比对,确定基因组 DNA A202 上含有 *tetA* 和 *tetC* 基因,质粒 DNA A206 上含有 *tetE* 基因,故将其作为检测的阳性对照; *E. coli* DH5α 不含 *tet* 基因,被当作阴性对照. PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.6.2 土壤总 DNA 上 *tetA* 和 *tetC* 基因的 RT-PCR 定量分析

从 GenBank 数据库中获取 *tetA* 和 *tetC* 基因的 cDNA 序列,通过 NCBI 的 Primer-Blast(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)软件设计 RT-PCR 引物,引物序列见表 1. 参照 Ultra SYBR mixture(CWbio,中国)试剂盒说明书在 CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad,美国)仪器上进行 RT-PCR 扩增,扩增条件为 95℃热变性 10 min,后进行 40 个循环,每个循环包括 95℃变性 15 s,60℃反应 1 min,最后 60℃升到 95℃,其间每隔 0.5℃采集一次荧光以生成溶解曲线,根据溶解曲线的变化检测扩增结果的特异性.

选取基因组 DNA A202(特异性扩增产物送往南京金斯瑞生物科技有限公司测序,经比对,确定基因组 DNA A202 上含有 *tetA* 和 *tetC* 基因)作为阳性模版,提取出的基因组 DNA 用琼脂糖凝胶电泳及紫外分光光度计(UV-8000PC)检测含量以及纯度,*A*260/*A*280 值在 1.8 ~ 2.0 之间,表明提取的基因组 DNA 纯度较高. 基因拷贝数按以下公式计算:拷贝数 = (质量/相对分子质量) × 6.02 × 10^{23}. 提取的基因组 DNA 进行 10 倍浓度梯度稀释作为反应模版,以拷贝数的 log 值为横坐标,Ct 值为纵坐标绘制标准曲线. 建立的标准曲线如图 1、图 2.

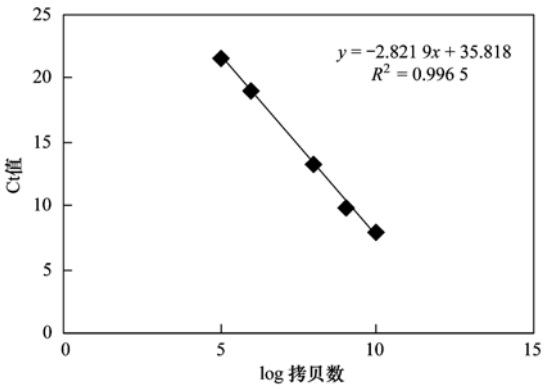

图 1 ***tetA*** **基因标准曲线**

Fig. 1 Standard curve of *tetA* gene

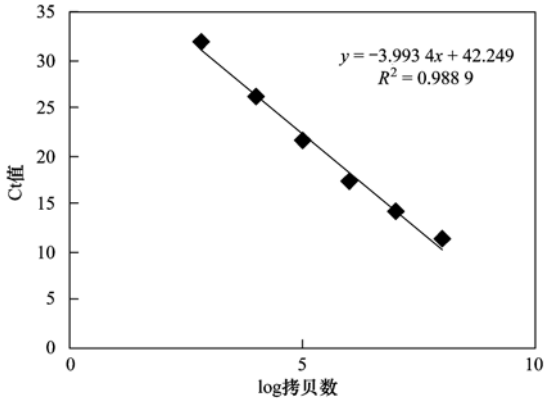

图 2 ***tetC*** **基因标准曲线**

Fig. 2 Standard curve of *tetC* gen

表 1 引物设计

Table 1 Primer for PCR

基因名称	引物名称	引物序列(5′→3′)	片段大小/bp
tetA	*tetA*-F	TTGGCATTCTGCATTCACTC	494
	tetA-R	GTATAGCTTGCCGGAAGTCG	
tetC	*tetC*-F	CTTGAGAGCCTTCAACCCAG	418
	tetC-R	ATGGTCGTCATCTACCTGCC	
tetE	*tetE*-F	TCCATACGCGAGATGATCTCC	442
	tetE-R	CGATTACAGCTGTCAGGTGGG	
tetA(RT)	*tetA*(RT)-F	GGCCATTCTGATAGCCCTGA	182
	tetA(RT)-R	TGCGAAATCTGTCGCTCAGT	
tetC(RT)	*tetC*(RT)-F	TGCAACTCGTAGGACAGGTG	140
	tetC(RT)-R	ACCAGTGACGAAGGCTTGAG	

2 结果与讨论

2.1 长期施用四环素残留猪粪后土壤中四环素的

残留情况

从表 2 中可以看出，采集的新鲜猪粪中四环素的残留量（干重）为 908.2 μg·kg^{-1}. 秋季土壤和夏季土壤中四环素的残留含量为 41.1 ~ 61.9 μg·kg^{-1}，这与 Zhu 等[15]检测的北京等地农场附近使用禽畜粪便后土壤中的四环素残留量较为接近，在同一个数量级别. 在对照组 CK 中未检出四环素残留.

2.2 长期施用四环素残留猪粪对土壤中耐药菌种类及丰度的影响

2.2.1 长期施用四环素残留猪粪后土壤微生物的四环素抗性水平

利用涂布平板法分别统计了各土壤样品中四环素耐药菌菌落数和可培养细菌菌落数，结果显示施用过猪粪肥和未施用过猪粪肥土壤中可培养细菌菌落数（以 CFU 表示）介于 $2.83 \times 10^7 \sim 10.24 \times 10^7$ 之间，耐药菌菌落数介于 $0.0032 \times 10^5 \sim 8.56 \times 10^5$（表 2），这表明采集的所有土壤中都有着丰富的细菌及耐药菌. 秋季和夏季各土壤样品中四环素耐药菌菌落数都达到了 10^5 CFU·g^{-1}，远高于对照组中四环素耐药菌菌落数（0.0032×10^5 CFU·g^{-1}）. 同时秋季和夏季土壤中四环素耐药菌菌落数占可培养细菌菌落数的比例分别为 0.14% ~ 1.08%、0.58% ~ 0.71%，都明显高于对照组中四环素耐药菌所占的比例（0.001%）. 这说明长期施用含四环素残留的猪粪能够提高土壤中微生物的四环素抗性水平. 另外土壤中可培养细菌及四环素耐药菌的数量巨大，可能会为耐药菌和抗性基因的传播与扩散提供良好的来源与介质[16]，具有较高的环境风险性.

表 2　四环素残留量与土壤中耐药菌、可培养细菌的丰度

Table 2　Tetracycline residues and the amount of drugresistant bacteria and cultivable bacteria in soil

项目	编号	四环素残留量 /μg·kg^{-1}	四环素耐药菌菌落数 ×10^5/CFU·g^{-1}	可培养细菌菌落数 ×10^7/CFU·g^{-1}
对照	CK	0.0	0.003 2 ± 0.000 2	3.13 ± 0.14
猪粪		908.2 ± 35.41	/	/
秋季土壤	A1	53.3 ± 1.68	6.75 ± 0.29	7.57 ± 0.33
	A2	61.9 ± 2.09	8.56 ± 0.94	10.24 ± 0.98
	A3	57.2 ± 1.86	6.21 ± 0.31	5.73 ± 0.28
	A4	60.1 ± 2.01	1.05 ± 0.06	3.02 ± 0.15
	A5	50.9 ± 1.54	1.15 ± 0.05	3.47 ± 0.16
	A6	60.5 ± 1.98	0.45 ± 0.04	3.23 ± 0.25
	A7	62.0 ± 2.1	3.27 ± 0.21	6.45 ± 0.33
夏季土壤	S1	45.6 ± 1.28	1.65 ± 0.07	2.83 ± 0.14
	S2	44.3 ± 2.21	6.16 ± 0.18	8.72 ± 0.37
	S3	41.1 ± 1.01	1.93 ± 0.09	2.96 ± 0.15
	S4	43.7 ± 2.18	1.99 ± 0.11	3.01 ± 0.18

2.2.2 长期施用四环素残留猪粪对耐药菌形成的影响

利用涂布平板法从采集的 12 个土壤样品中共分离到 97 株耐药菌，其中 94 株来自于 11 个施用过猪粪肥的土壤样品，3 株来自于未施用过猪粪肥的土壤样品. 根据菌落主要形态特征和 16S rDNA 序列分析结果，对纯化后的这些耐药菌菌株进行了鉴定，发现它们分别属于 16 个属. 各样品中耐药菌的组成如图 3 所示，在所分析的 12 个土壤样品中，A2 样品中的耐药菌多样性最为明显，该土壤中共分离鉴定到 7 个菌属的耐药菌；其次为 A5 和 S1，都具有 5 个属的耐药菌（图 3）. 从秋季土壤样品中分离出的 59 株耐药菌属于 13 种菌属，夏季分离出的 35 株耐药菌属于 10 种菌属，而对照组中的耐药菌只属于一种菌属（*Streptomyces*），明显低于前两者，这些结果都表明长期施用四环素残留猪粪有助于增加土壤中耐药菌的多样性. 耐药菌中出现较多的为 *Bacillus* 属（27 株）和 *Streptomyces* 属（17 株），这两个菌属都是土壤中的土著微生物，这与 Jensen 等[17]的研究结果较为一致，其发现原本土壤中就已经大量存在的细菌产生了耐药性，且占据了很大比例，这也更好地说明了土壤中大量的四环素耐药菌由猪粪直接带入或者其他途径进入土壤的几率较小，而主要是通过四环素诱导作用生成的. 以上结果都表明长期施加含有四环素残留的猪粪能够明显诱导生成大量且种类复杂的四环素耐药菌.

2.2.3 长期施用四环素残留猪粪对致病菌形成的影响

在 97 株耐药菌中可以检测到 37 株致病菌，占总耐药菌数的 38.14%. 致病菌分别属于 7 种菌属，其中含量较多的为耐药型 *Rhodococcus*（15 株）、*Pseudomonas*（10 株）等. 致病菌对人类健康

具有一定的危害性,如 *Rhodococcus* 近年来作为人体病菌越来越引起人们的关注[18]; *Pseudomonas* 更是一种抗药性极强的细菌,能引起化脓性病变[19]. 数量如此多、种类如此繁杂的耐药性致病菌一方面可能来源于动物体内,由粪便带入[20],或者由于蚊蝇滋生,从外界带入病原菌[21],另一面更可能是来源于土壤中四环素的直接诱导作用. 这些具有抗药性的致病菌一旦进入环境后,将对有接触的居民的健康产生明显的不利影响,容易造成疾病的传播. 结果表明长期施加的含有四环素残留的猪粪是土壤中抗药性致病菌的重要来源和促进其生成的主要推力,如果粪便资源化再利用时,兽药抗生素的残留问题得不到重视的话,将会严重危害人畜健康.

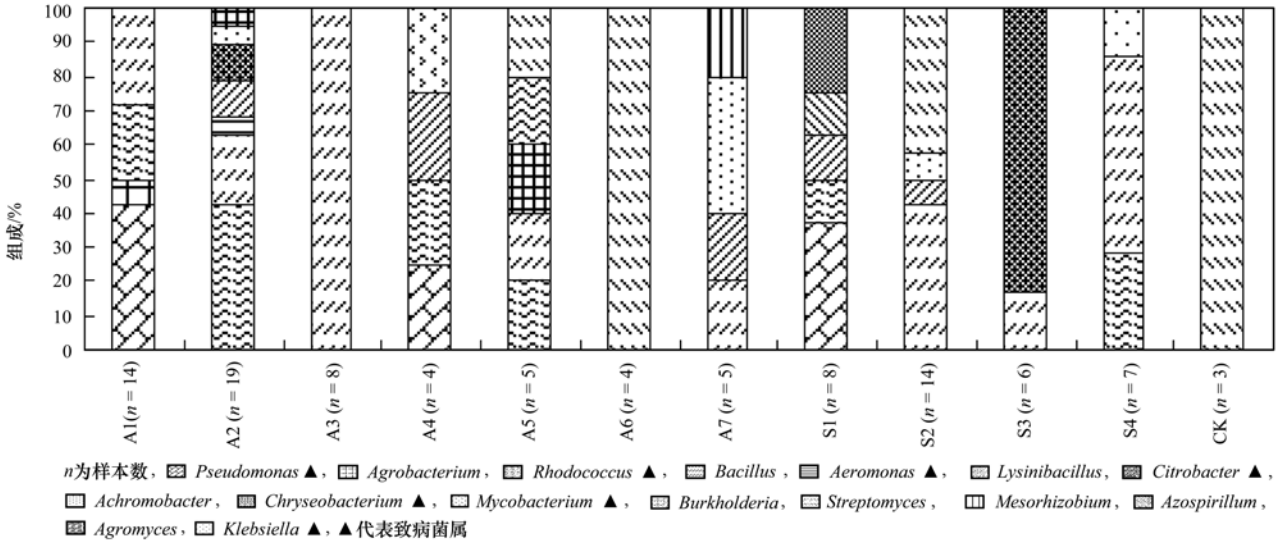

图 3 土壤中耐药菌的组成

Fig. 3 Composition of tetracycline-resistant bacteria in the soil microcosms

2.3 长期施用四环素残留猪粪对耐药菌中 *tetA*、*tetC*、*tetE* 抗性基因分布的影响

利用 *tetA*、*tetC* 和 *tetE* 特异性引物对分离到的 97 株(其中 94 株分离自施用过猪粪的土壤,3 株分离自未施用过猪粪的土壤)耐药菌基因组 DNA 和质粒 DNA 上的四环素抗性基因进行了分析. 统计结果显示,前 94 株四环素耐药菌的基因组 DNA 上均检测到四环素抗性基因,质粒 DNA 上抗性基因出现的几率为 95.7%,而对照组的 3 株耐药菌的基因组 DNA 和质粒 DNA 上均未检测到抗性基因. 进一步分析可知,有 92 株耐药菌的基因组 DNA 被检测出含有 *tetC* 基因,其次为 *tetA*,45 株,没能在基因组 DNA 上检测到 *tetE* 基因,这与文献中报道的 *tetE* 往往存在于大片段的质粒 DNA 上相符合[22]. 在质粒 DNA 上,3 种抗性基因都能被检出,*tetC*(91 株)和 *tetA*(41 株)基因保持着较高的检出率,检出率比较为 *tetC* > *tetA* > *tetE*,3 种抗性基因的检出率与 Zhang 等[23]报道的检出率相当. 有研究表明,耐药菌可以通过质粒交换等水平基因转移的方式将抗性基因传播给环境微生物[24],造成抗性基因的扩散,而在本研究中所检测的四环素抗性基因 *tetA*、*tetC* 和 *tetE* 均为用于编码外排泵蛋白的基因,这些外排泵基因又常与携带不同抗性基因甚至不同来源的质粒相连,这无疑加剧了抗性基因在细菌群体中的转移并使细菌易于产生多重耐药性,值得注意的是被鉴定出的 37 株致病菌的质粒 DNA 上都能检测出抗性基因,这些抗性基因如果通过质粒交换等方式在环境中进行传播,将可提高环境对四环素类抗生素的抗性水平. 研究结果说明,长期施用四环素残留猪粪能够诱导耐药菌的基因组 DNA 和质粒 DNA 上产生大量的抗性基因,同时存在于质粒 DNA 上的抗性基因又可能通过基因水平转移的方式扩散,将引发巨大的潜在危害,并威胁到环境及人类健康.

2.4 长期施用四环素残留猪粪对土壤中 *tetA*、*tetC* 抗性基因量的影响

利用荧光定量法测定了施用过猪粪肥与未施用过猪粪肥的土壤总 DNA 上 *tetA* 和 *tetC* 基因的含量,结果发现施用过猪粪肥的土壤总 DNA 上 *tetA* 的含量范围为 $2.81 \times 10^5 \sim 5.25 \times 10^5$ copies·g^{-1},明显低于 *tetC* 的含量范围 $1.82 \times 10^5 \sim 32.17 \times 10^5$

copies·g^{-1}，这与邹世春等[25]检测的养殖场土壤中 *tetA* 和 *tetC* 基因的含量及规律较为一致，而在未施用过猪粪肥的土壤总 DNA 上则未能检测出抗性基因的残留量. 这些结果表明养猪场周边的土壤由于受到四环素的持续性输入，导致了 *tetA* 和 *tetC* 基因在土壤中被诱导生成，从而造成抗性基因对土壤的污染. 将各样品中的四环素残留量与相对应的四环素抗性基因含量进行比对与拟合，发现各样品中四环素抗性基因（*tetA* 和 *tetC*）总含量和与四环素的残留量呈现良好的正相关线性关系（$R^2 = 0.981\,7$），拟合的线性方程如图 4. 这也表明在一定的四环素残留量范围内，可以通过四环素的残留量来粗略计算抗性基因的含量，从而判断土壤中抗性基因的污染水平，为抗性基因污染的鉴定提供了一条便捷途径.

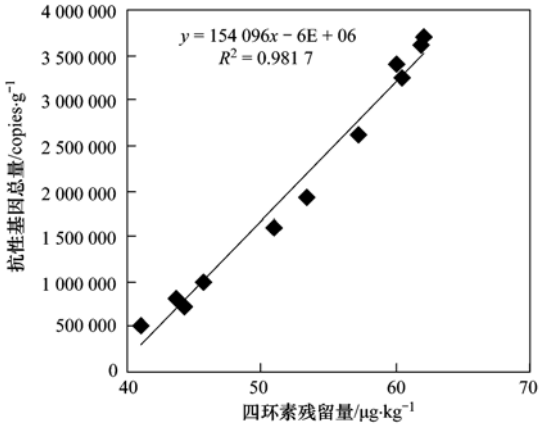

图 4　四环素残留量与抗性基因总量的线性方程

Fig. 4　Liner equation of tetracycline residues and the total amount of resistance genes

2.5　气候变化对耐药菌及抗性基因形成的影响

在本研究中 S1、S2、S3 为 A1、A2、A3 的同点重复采样，从 A1、A2 和 A3 中分离出 41 株耐药菌，分别属于 10 个菌属，各土壤样品中耐药菌菌落数占可培养细菌菌落数的比例为 0.84% ~ 1.08%；从 S1、S2 和 S3 中分离出 28 株耐药菌，分别属于 9 种菌属，土壤中耐药菌菌落数占可培养细菌菌落数比例为 0.35% ~0.71%，比较发现秋季耐药菌的种类和数量都明显高于夏季. A1、A2、A3 土壤中抗性基因（*tetA* 和 *tetC*）的总含量范围为 1.93×10^6 ~ 3.59×10^6 copies·g^{-1}，高于 S1、S2、S3 抗性基因的含量范围 5.13×10^5 ~ 9.94×10^5 copies·g^{-1}，这些结果都表明秋季较夏季更适合耐药菌和抗性基因的生成，究其原因可能是由于秋季凉爽的气候较夏季的闷热高温更适合耐药菌和抗性基因的生成[26]；另一方面可能由于夏季降雨量增加，加快了土壤中四环素的流失，在本研究中得到了验证，A1、A2、A3 的四环素残留量平均值为 57.5 μg·kg^{-1}，显著高于 S1、S2、S3 的平均值 43.7 μg·kg^{-1}. 当夏季土壤中四环素浓度降低，诱导产生的耐药菌和抗性基因的量也相应下降. 这表明气候条件的变化对四环素耐药菌及抗性基因的形成具有一定的影响，可以通过改变一定的气候条件来有效抑制四环素耐药菌及抗性基因的形成.

3　结论

（1）长期施加四环素残留猪粪能促进包括致病菌在内的耐药菌及抗性基因的形成，对人体健康将会产生明显的不利影响，同时畜禽养殖场附近的土壤等环境也成为了抗性基因的一个重要储存库. 因此兽禽粪便利用前的抗生素风险评估与无害化处置，对于控制环境中抗生素耐药菌和抗性基因的形成显得尤为重要.

（2）在目前四环素残留量的水平下，土壤中四环素残留量与其诱导的抗性基因的含量存在着显著的相关关系，为快速判断抗性基因的污染水平提供了便捷途径.

（3）适宜的气候条件更适合耐药菌和抗性基因的生成，通过人为改变一定的气候条件可以有效抑制土壤中耐药菌及抗性基因的生成.

参考文献：

[1] Looft T, Johonson T A, Allen H K, *et al*. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, **109**(5): 1691-1696.

[2] 王秋霞, 赵刚, 吴洪涛, 等. 四环素的研究进展[J]. 现代畜牧兽医, 2012, (10): 67-68.

[3] 闾幸, 余卫娟, 兰亚琼, 等. 嘉兴市地表水中兽用抗生素的污染现状调查[J]. 环境科学, 2013, **34**(9): 3368-3373.

[4] Chee-Sanford J C, Mackie R I, Koie S, *et al*. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste[J]. Journal of Environmental Quality, 2009, **38**(3): 1086-1108.

[5] 童子林, 刘元璐, 胡真虎, 等. 四环素类抗生素污染畜禽粪便的厌氧消化特征[J]. 环境科学, 2012, **33**(3): 1028-1032.

[6] McGowan E. Comment on "antibiotic resistance genes as emerging contaminants studies in Northern Colorado"[J]. Environmental Science & Technology, 2007, **41**(7): 2651-2652.

[7] 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.

[8] Weiss K, Schüssler W, Porzelt M. Sulfamethazine and flubendazole in seepage water after the sprinkling of manured areas[J]. Chemosphere, 2008, **72**(9): 1292-1297.

[9] Kim K R, Owens G, Kown S I, *et al*. Occurrence and environmental fate of veterinary antibiotics in the terrestrial environemnt[J]. Water, Air, & Soil Pollution, 2011, **214**(1-4): 163-174.

[10] 尹春艳, 骆永明, 滕应, 等. 典型设施菜地土壤抗生素污染特征与积累规律研究[J]. 环境科学, 2012, **33**(8): 2810-2816.

[11] Wu N, Qiao M, Zhang B, *et al*. Abundance and diversity of tetracycline resistance genes in soils adjacent to representative swine feedlots in China [J]. Environmental Science & Technology, 2010, **44**(18): 6933-6939.

[12] 郜义萍, 莫测辉, 李彦文, 等. 长期施用粪肥菜地土壤中四环素类抗生素的含量与分布特征[J]. 环境科学, 2011, **32**(4): 1182-1187.

[13] Ng L K, Martin I, Alfa M, *et al*. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes [J]. Molecular and Cellular Probes, 2001, **15**(4): 209-215.

[14] Glenn L S M, Lindsey R L, Folster J P, *et al*. Antimicrobial resistance gens in multidrug-resistant salmonella enterica isolated from animals, retail meats, and humans in the United States and Canada[J]. Microbial Drug Resistance, 2013, **19**(3): 1175-184.

[15] 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.

[16] Luo Y, Xu L, Rysz M, *et al*. Occurrence and transport of tetracycline, sulfonamide, quinolone, and macrolide antibiotics in the Haihe River Basin, China[J]. Environmental Science & Technology, 2011, **45**(5): 1827-1833.

[17] Jensen L B, Baloda S, Boye M, *et al*. Antimicrobial resistance among Pseudomonas spp. and the Bacillus cereus group isolated from Danish agricultural soil [J]. Environment International, 2001, **26**(7-8): 581-587.

[18] 华苟根, 郭坚华. 红球菌属的分类及应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2003, **30**(4): 107-108.

[19] Tuon F F, Gortz L W, Rocha J L. Risk factors for pan-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia and the adequacy of antibiotic therapy [J]. The Brazilian Journal of Infectious Diseases, 2012, **16**(4): 351-356.

[20] Jiang H X, Tang D, Liu Y H, *et al*. Prevalence and characteristics of β-lactanmase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in Escherichia coil isolated from farmed fish in China[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012, **67**(10): 2350-2353.

[21] 叶小梅, 常志州, 陈欣, 等. 畜禽养殖场排放物病原微生物危险性调查[J]. 生态与农村环境学报, 2007, **23**(2): 66-70.

[22] Call D R, Bakko M K, Krug M J, *et al*. Identifying antimicrobial resistance genes with DNA microarrays[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, **47**(10): 3290-3295.

[23] Zhang T, Zhang M, Zhang X X, *et al*. Tetracycline resistance genes and tetracycline resistant Lactose-Fermenting Enterobacteriaceae in activated sludge of sewage treatment plants [J]. Environmental Science & Technology, 2009, **43**(10): 3455-3460.

[24] Ansari M I, Grohmann E, Malik A. Conjugative plasmids in multi-resistant bacterial isolates from Indian soil[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, **104**(6): 1774-1781.

[25] 邹世春, 李青, 贺竹梅. 禽畜养殖场土壤抗生素抗性基因污染的初步研究[J]. 中山大学学报, 2012, **51**(6): 87-91.

[26] 徐冰洁, 罗义, 周启星, 等. 抗生素抗性基因在环境中的来源、传播扩散及生态风险[J]. 环境化学, 2010, **29**(2): 169-178.

HUANJING KEXUE

Environmental Science (monthly)

Vol. 35 No. 6

Jun. 15, 2014

CONTENTS

Comparative Analysis on Meteorological Condition for Persistent Haze Cases in Summer and Winter in Beijing ····· LIAO Xiao-nong, ZHANG Xiao-ling, WANG Ying-chun, *et al.* (2031)

Size Distributions of Water-Soluble Inorganic Ions in Atmospheric Aerosols in Fukang ····· MIAO Hong-yan, WEN Tian-xue, WANG Yue-si, *et al.* (2045)

Study on Transition Metals in Airborne Particulate Matter in Shanghai City's Subway ····· BAO Liang-man, LEI Qian-tao, TAN Ming-guang, *et al.* (2052)

Heavy Metal Concentrations in Mosses from Qiyi Glacier Region ····· MA Juan-juan, LI Zhen (2060)

Distributions of Dimethylsulfide and Dimethylsulfoniopropionate and Influencing Factors in the East China Sea and the Southern Yellow Sea During the Winter ····· SONG Yi-zhu, ZHANG Hong-hai, YANG Gui-peng (2067)

Pollution by Heavy Metals in the Petrochemical Sewage Waters of the Sea Area of Daya Bay and Assessment on Potential Ecological Risks ····· XU Shan-nan, LI Chun-hou, XU Jiao-jiao, *et al.* (2075)

Distribution of Perfluorinated Compounds in Surface Water of Shenzhen Reservoir Groups ····· WANG Xin-xuan, ZHANG Hong, HE Long, *et al.* (2085)

Contamination and Source of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Epikarst Spring Water ····· SUN Yu-chuan, SHEN Li-cheng, YUAN Dao-xian (2091)

Biogeochemical Processes of the Major Ions and Dissolved Inorganic Carbon in the Guijiang River ····· TANG Wen-kui, TAO Zhen, GAO Quan-zhou, *et al.* (2099)

Hydrologic Processes of the Different Landscape Zones in Fenhe River Headwater Catchment ····· YANG Yong-gang, LI Cai-mei, QIN Zuo-dong, *et al.* (2108)

Assessment of Groundwater Quality of Different Aquifers in Tongzhou Area in Beijing Plain and Its Chemical Characteristics Analysis ····· GUO Gao-xuan, JU Yi-wen, ZHAI Hang, *et al.* (2114)

Models for Quantification of Fluid Saturation in Two-Phase Flow System by Light Transmission Method and Its Application ····· ZHANG Yan-hong, YE Shu-jun, WU Ji-chun (2120)

Nitrogen Leaching and Associated Environmental Health Effect in Sloping Cropland of Purple Soil ····· CHEN Wei-liang, GAO Yang, LIN Yong-ming, *et al.* (2129)

Research on Land Use Structure Optimization Based on Nonpoint Source Dissolved Nitrogen Load Estimation in Shuaishui Watershed ····· LU Yu-chao, BI Meng-fei, LI Ze-li, *et al.* (2139)

Nitrogen and Organic Matter Vertical Distribution Characteristics and Evaluation in Ancient Canal Sediments of Zhenjiang Old Town ····· ZHOU Xiao-hong, LI Yi-min, ZHOU Yi, *et al.* (2148)

Effects of Two Submerged Macrophytes on Dissolved Inorganic Nitrogen in Overlying Water and Interstitial Water ····· YANG Wen-bin, LI Yang, SUN Gong-xian (2156)

Bioavailable Phosphorus on Suspended Solids of Lake Under Short-term and Repeated Sediment Disturbance ····· WU Xiao-fei, LI Da-peng (2164)

Influence of Different Disturbance Intensity on the Phosphorus Adsorption and Immobilization by the Sediments from an Inner City Heavily Polluted Canal ····· WANG Shang, LI Da-peng (2171)

Effect of Feed Residues on the Release of Nitrogen and Phosphorus of Pond Sediment ····· LÜ Yuan-jiao, LI Rui-jiao, ZHANG Nian, *et al.* (2178)

Delivery and Release of Sediment PAHs During Resuspension ····· WANG Xiao-hui, BI Chun-juan, HAN Jing-chao (2185)

Effects of Low Molecular Weight Organic Acids on Redox Reactions of Mercury ····· ZHAO Shi-bo, SUN Rong-guo, WANG Ding-yong, *et al.* (2193)

Removal of Fluorescent Whitening Agent by Hydrogen Peroxide Oxidation Catalyzed by Activated Carbon ····· LIU Hai-long, ZHANG Zhong-min, ZHAO Xia, *et al.* (2201)

Kinetics of Alkylphenols Degradation in Aqueous Phase with Excilamp Irradiation ····· LIU Yu-hai, YE Zhao-lian, WEN Ying-pin, *et al.* (2209)

AF + BAF for Treating Effluent in the Sewage Plant of the Resin and Chemical Industry Park ····· TU Yong, LIU Wei-jing, ZHANG Yao-hui, *et al.* (2216)

Synthesis and Adsorption Property of Cd(Ⅱ)-8-hydroxyquinoline Molecularly Imprinted Polymer Microspheres ····· YANG Chun-yan, CHEN Fu-bin, ZHAO Hui, *et al.* (2223)

Simultaneous Nitrification and Denitrification in a Microbubble-aerated Biofilm Reactor ····· LIU Chun, NIAN Yong-jia, ZHANG Jing, *et al.* (2230)

Effect of PLA/Starch Slow-Release Carbon Source on Biological Denitrification ····· TANG Dan-qi, WANG Juan, ZHENG Tian-long, *et al.* (2236)

Impacts of Filamentous Bulking on Treatment Effect and Fouling Characteristics of Nonwoven Bioreactor ····· SHI Kuan, XUE Gang, GAO Pin, *et al.* (2241)

Optimization for Phosphorous Removal in Thickening and Dewatering Sludge Water by Polyaluminum Chloride ····· ZHOU Zhen, HU Da-long, QIAO Wei-min, *et al.* (2249)

Simulation of Long-Range Transport Potential of POPs in Poyang Lake ····· GONG Xiao-feng, XIANG Hong-rui, CHEN Chun-li, *et al.* (2256)

Uncertainty Analysis of Ecological Risk Assessment Caused by Heavy-metals Deposition from MSWI Emission ····· LIAO Zhi-heng, SUN Jia-ren, WU Dui, *et al.* (2264)

Risk Assessment and Countermeasures of BTEX Contamination in Soils of Typical Pesticide Factory ····· TAN Bing, WANG Tie-yu, LI Qi-feng, *et al.* (2272)

Levels Distribution and Risk Assessment of the Indicator and Dioxin-Like Polychlorinated Biphenyls in Ten Different Species of Marine Fish of Bohai Bay, China ····· WANG Sha-sha, GAO Li-rong, TIAN Yi-ling, *et al.* (2281)

Detection of Biohazardous Materials in Water upon the Characteristics of Fluorescent Sensor Frex ····· ZHAO Wei, WANG Zhao, CAI Qiang, *et al.* (2287)

Generation and Release of Microcystin-LR by *Microcystis aeruginosa* Under Hydroquinone Inhibition ····· ZHANG Yuan-chun, LIANG Wen-yan, ZHAO Yuan, *et al.* (2294)

Culture Medium Based on Biogas Slurry and Breeding of Oil Chlorella ····· ZHAO Feng-min, MEI Shuai, CAO You-fu, *et al.* (2300)

Microbial Diversity and Ammonia-Oxidizing Microorganism of a Soil Sample Near an Acid Mine Drainage Lake ····· LIU Ying, WANG Li-hua, HAO Chun-bo, *et al.* (2305)

Effects of *Corbicula fluminea* Bioturbation on the Community Composition and Abundance of Ammonia-Oxidizing Archaea and Bacteria in Surface Sediments ····· WANG Xue, ZHAO Da-yong, ZENG Jin, *et al.* (2314)

Methanogenic Activity and Methanogen Diversity in Marine Gas Field Sediments ····· TIAN Qi, WANG Jia, FAN Xiao-lei, *et al.* (2322)

Effect of the Potential on Bacterial Community Under Illumination by DGGE and T-RFLP ····· WU Yi-cheng, DENG Huan, XIAO Yong, *et al.* (2328)

Isolation and Characterization of Two Bacteria with Heavy Metal Resistance and Phosphate Solubilizing Capability ····· TIAN Jiang, PENG Xia-wei, LI Xia, *et al.* (2334)

Identification and Denitrification Characteristics of a Psychrotolerant Facultative Basophilic Aerobic Denitrifier ····· WANG Zhao-yang, CHEN Guo-yao, JIANG Ke, *et al.* (2341)

Effects of Ryegrass and Arbuscular Mycorrhiza on Activities of Antioxidant Enzymes, Accumulation and Chemical Forms of Cadmium in Different Varieties of Tomato ····· JIANG Ling, YANG Yun, XU Wei-hong, *et al.* (2349)

Response of Active Nitrogen to Salinity in a Soil from the Yellow River Delta ····· LI Ling, QIU Shao-jun, CHEN Yin-ping, *et al.* (2358)

Variation of Soil Nitrogen During *in situ* Mineralization Process Under Different Grasslands in the Mountainous Area of Southern Ningxia, Northwest China ····· JIANG Yue-li, ZHAO Tong, YAN Hao, *et al.* (2365)

Effects of Long-Term Application of Pig Manure Containing Residual Tetracycline on the Formation of Drug-Resistant Bacteria and Resistance Genes ····· ZHANG Jun, YANG Xiao-hong, GE Feng, *et al.* (2374)

Long-Term Effects of Tillage Methods on Heavy Metal Accumulation and Availability in Purple Paddy Soil ····· CHANG Tong-ju, CUI Xiao-qiang, RUAN Zhen, *et al.* (2381)

Environmental Geochemical Baseline of Heavy Metals in Soils of the Ili River Basin and Pollution Evaluation ····· ZHAO Xin-ru, Telajin Nasier, CHENG Yong-yi, *et al.* (2392)

Distribution Patterns and Pollution Assessments of Heavy Metals in the *Spartina alterniflora* Salt-Marsh Wetland of Rudong, Jiangsu Province ····· ZHANG Long-hui, DU Yong-fen, WANG Dan-dan, *et al.* (2401)

Temporal-Spatial Distribution of Agricultural Diffuse Nitrogen Pollution and Relationship with Soil Respiration and Nitrification ····· OUYANG Wei, CAI Guan-qing, HUANG Hao-bo, *et al.* (2411)

Soil Respiration and Carbon Balance in Wheat Field Under Conservation Tillage ····· ZHANG Sai, WANG Long-chang, HUANG Zhao-cun, *et al.* (2419)

Comparison of Soil Respiration in Natural *Castanopsis carlesii* Forest and Plantation Forest ····· WU Jun-jun, YANG Zhi-jie, WENG Fa-jin, *et al.* (2426)

Influences of Hydraulic Retention Time on the Ethanol Type Fermentation Hydrogen Production System in a Hybrid Anaerobic Baffled Reactor ··· LIU Xiao-ye, ZHANG Hong, LI Yong-feng (2433)

《环境科学》第 6 届编辑委员会

主　编：欧阳自远

副主编：赵景柱　郝吉明　田　刚

编　委：（按姓氏笔画排序）

万国江　王华聪　王凯军　王绪绪　田　刚　田　静　史培军

朱永官　刘志培　汤鸿霄　陈吉宁　孟　伟　周宗灿　林金明

欧阳自远　赵景柱　姜　林　郝郑平　郝吉明　聂永丰　黄　霞

黄　耀　鲍　强　潘　纲　潘　涛　魏复盛

环 境 科 学

（HUANJING KEXUE）

（月刊　1976 年 8 月创刊）

2014 年 6 月 15 日　第 35 卷　第 6 期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

（Monthly　Started in 1976）

Vol. 35　No. 6　Jun. 15, 2014

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

中国标准刊号：ISSN 0250-3301 / CN 11-1895/X　　国内邮发代号：2-821

国 内 定 价：90.00 元　　国外发行代号：M 205

国 内 外 公 开 发 行