

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第35卷 第11期

Vol.35 No.11

2014

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

南京北郊夏季近地层臭氧及其前体物体积分数变化特征	邵平, 安俊琳, 杨辉, 林旭, 吉东生 (4031)
亚青会期间南京污染气体与气溶胶中水溶性离子的分布特征	邹嘉南, 安俊琳, 王红磊, 邵平, 段卿, 薛国强, 庞博 (4044)
亚青会期间南京地区气溶胶浓度变化及其与能见度的关系	袁亮, 银燕, 李琦, 肖辉, 李力 (4052)
2013年10月长株潭城市群一次持续性空气污染过程特征分析	廖志恒, 范绍佳, 黄娟, 孙家仁 (4061)
在线单颗粒气溶胶质谱 SPAMS 对细颗粒物中主要组分提取方法的研究	付怀于, 闫才青, 郑玫, 蔡靖, 李小滢, 张延君, 周振, 傅忠, 李梅, 李磊, 张远航 (4070)
PM ₁₀ 可替代源成分谱的建立方法及其应用	陈强, 景毅, 吴焕波, 王芳 (4078)
夏季东海和南黄海一氧化氮的浓度分布、海-气通量和微生物消耗研究	王敬, 陆小兰, 杨桂朋, 徐冠球 (4085)
三峡库区典型农田小流域水体汞的时空分布特征	王娅, 赵铮, 木志坚, 王定勇 (4095)
浑太水系水体中不同粒径有机胶体荧光光谱特性	刘娜娜, 李斌, 刘瑞霞, 宋永会, 吴畏 (4103)
深圳湾流域 TN 和 TP 入海年通量变化规律研究	赵晨辰, 张世彦, 毛献忠 (4111)
滇池沉积物有机磷垂直分布特征及其生物有效性	熊强, 焦立新, 王圣瑞, 彭希琰 (4118)
金山湖闸坝型水体表层沉积物重金属分布特征及生态风险评价	周晓红, 刘龙梅, 陈曦, 陈志刚, 张金萍, 李义敏, 刘彪 (4127)
西藏普莫雍错湖芯沉积物中重金属的垂向分布特征及生态风险评估	谢婷, 罗东霞, 杨瑞强 (4135)
西安市雨水径流中重金属季节性污染特征及分析	袁宏林, 李星宇, 王晓昌 (4143)
城市不同下垫面降雨径流多环芳烃 (PAHs) 分布及源解析	武子澜, 杨毅, 刘敏, 陆敏, 于英鹏, 汪青, 郑鑫 (4148)
粗放型绿色屋面填料的介质组成对出水水质的影响	陈昱霖, 李田, 顾俊青 (4157)
饮用水处理中不同来源生物活性炭微生物群落多样性和结构研究	杜尔登, 郑璐, 冯欣欣, 高乃云 (4163)
压力强化混凝除藻工艺中藻毒素安全性研究	蒋新跃, 栾清, 丛海兵, 徐思涛, 刘玉娇, 朱学源 (4171)
基于膜特征参数变化的蛋白质超滤过程膜污染研究	王旭东, 张银辉, 王磊, 张慧慧, 夏四清 (4176)
臭氧氧化水溶液中对乙酰氨基酚的机制研究	曹飞, 袁守军, 张梦涛, 王伟, 胡真虎 (4185)
电辅助微生物反应器降解苯并噻唑效能的研究	刘春苗, 丁杰, 刘先树, 程旺斌 (4192)
铁铜复合氧化物纳米吸附剂的制备、表征及 As(Ⅲ) 吸附性能研究	张伟, 陈静, 张高生 (4198)
重金属铬胁迫下水蚯蚓的生理响应研究	楼菊青, 杨东叶, 曹永青, 孙培德, 郑平 (4205)
光质对蛋白核小球藻 (<i>Chlorella pyrenoidosa</i>) 生长特征及生化组成的影响研究	唐青青, 方治国, 嵇雯雯, 夏会龙 (4212)
常温低基质下碱度和溶解氧对厌氧氨氧化的影响	任玉辉, 王科, 李相昆, 马凯丽, 张杰 (4218)
Fe ²⁺ 和 Fe ³⁺ 对厌氧氨氧化污泥活性的影响	李祥, 黄勇, 巫川, 王孟可, 袁怡 (4224)
CSTR 中亚硝化颗粒污泥的变化过程研究	阴方芳, 刘文如, 王建芳, 吴鹏, 沈耀良 (4230)
盐度对好氧颗粒污泥硝化过程中 N ₂ O 产生量的影响	王珊珊, 梁红, 高大文 (4237)
硫酸盐还原反应器污泥驯化过程中微生物群落变化分析	曾国驱, 贾晓珊, 郑小红, 杨丽平, 孙国萍 (4244)
利用铅同位素方法量化不同端元源对南京土壤和长江下游悬浮物铅富集的影响	王成, 夏学齐, 张义, 廖启林, 杨忠芳, 季峻峰 (4251)
北京东南郊土壤剖面氟喹诺酮类抗生素分布特征	苏思慧, 何江涛, 杨蕾, 乔肖翠, 崔亚丰 (4257)
环境因素对土壤中几种典型四环素抗性基因形成的影响	张俊, 罗方园, 熊浩微, 焦少俊, 叶波平 (4267)
稻田土壤不同水分条件下硝化/反硝化作用及其功能微生物的变化特征	刘若萱, 贺纪正, 张丽梅 (4275)
典型岩溶土壤微生物丰度与多样性及其对碳循环的指示意义	靳振江, 汤华峰, 李敏, 黄炳富, 李强, 张家喻, 黎桂文 (4284)
变温环境对典型石灰土有机碳矿化的影响	王莲阁, 高岩红, 丁长欢, 慈恩, 谢德体 (4291)
铁氧化物与电子供体基质交互作用对红壤性水稻土中 DDT 还原脱氯影响	刘翠英, 徐向华, 王壮, 姚童言 (4298)
植物套种及化学强化对重金属污染土壤的持续修复效果研究	卫泽斌, 郭晓方, 吴启堂, 龙新宪 (4305)
不同取样尺度下亚高山草甸土壤呼吸的空间变异特征	李洪建, 高玉凤, 严俊霞, 李君剑 (4313)
不同开垦年限黑土温室气体排放规律研究	李平, 郎漫, 徐向华, 李煜珊, 朱淑娟 (4321)
转 Cry1Ac 基因抗虫棉与其亲本棉花根际真菌多样性的比较	潘建刚, 焦海华, 白志辉, 齐鸿雁, 马安周, 庄国强, 张洪勋 (4329)
天津污灌区内气态汞的污染特征及在叶菜类蔬菜中的富集	郑顺安, 韩允垒, 郑向群 (4338)
1-硝基芘和 1,2-萘醌的联合细胞毒性和致 DNA 损伤	尚羽, 蒋玉婷, 张玲, 李怡 (4345)
鸡粪堆肥有机物演化对重金属生物有效性影响研究	卜贵军, 于静, 邱慧慧, 罗世家, 周大寨, 肖强 (4352)
污泥预植重金属 Cu 炭化及炭中重金属的稳定性研究	窦晓敏, 陈德珍, 戴晓虎 (4359)
上层曝气式生物反应器填埋工艺特性的研究	田颖, 王坤, 徐期勇 (4365)
硝酸盐连续回灌对生物反应器填埋场 N ₂ O 产生的影响	卞荣星, 孙英杰, 李晶晶, 张欢欢 (4371)
中国碳强度下降和碳排放增长的行业贡献分解研究	蒋晶晶, 叶斌, 计军平, 马晓明 (4378)
泛长三角地区工业污染重心演变路径及其驱动机制研究	赵海霞, 蒋晓威, 崔建鑫 (4387)
基于污染防治技术模拟的造纸行业环境管理方法研究	张雪莹, 温宗国 (4395)
大气棕色碳的研究进展与方向	闫才青, 郑玫, 张远航 (4404)
《环境科学》征稿简则 (4094)	
《环境科学》征订启事 (4126)	
信息 (4243, 4266, 4274, 4328)	

环境因素对土壤中几种典型四环素抗性基因形成的影响

张俊^{1,4}, 罗方园^{1,2}, 熊浩徽^{1,2}, 焦少俊^{1,4*}, 叶波平³

(1. 环境保护部南京环境科学研究所, 南京 210042; 2. 南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095; 3. 中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210000; 4. 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: 兽用四环素在养殖业中的大量使用导致了日益严重的环境污染, 其诱导生成的抗性基因更可能产生比其自身污染更大的环境危害. 本研究探讨了环境因素对几种典型四环素抗性基因(*tetA*、*tetC*)形成的影响, 结果表明, 温度、光照及 pH 能够对土壤中四环素抗性基因的形成产生显著的影响, 在较为合适的温度条件(25℃)、光照条件(500 lx)和 pH(7.5)条件下, 土壤中四环素耐药菌菌落数和四环素抗性基因总含量均处于较高的水平, 并多显著高于其他环境条件下的诱导水平($P < 0.05$), 而高温、强光照及较高的 pH 条件能够有效抑制土壤中四环素抗性基因的形成, 抑制的主要途径可能包括影响土壤中四环素的残留水平或直接影响抗性基因的生成, 同时研究也发现这些不利的环境条件也抑制了土壤中四环素耐药菌的生长. 进一步分析在两种不同通气处理条件下土壤中所诱导产生的四环素抗性基因含量水平与土壤中四环素耐药菌数量之间的关系, 发现在两种条件下四环素抗性基因含量水平与土壤中四环素耐药菌数量之间存在着较为显著的正相关关系($R^2_{\text{好氧}} = 0.7872, n = 30$; $R^2_{\text{缺氧}} = 0.8841, n = 21$), 土壤中四环素耐药菌的生长对四环素抗性基因的形成也起到了关键性作用.

关键词: 四环素; 耐药菌; 抗性基因; 环境因素; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: X131.3; X53 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2014)11-4267-08 DOI: 10.13227/j.hjks.2014.11.032

Effect of Environmental Factors on the Formation of Several Typical Tetracycline Resistance Genes in Soil

ZHANG Jun^{1,4}, LUO Fang-yuan^{1,2}, XIONG Hao-hui^{1,2}, JIAO Shao-jun^{1,4}, YE Bo-ping³

(1. Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Environmental Protection, Nanjing 210042, China; 2. College of Resources and Environmental Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. School of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210000, China; 4. State Key Laboratory of Environmental Protection Pesticide Environmental Assessment and Pollution Control, Nanjing 210042, China)

Abstract: The extensive use of veterinary tetracycline in the stock husbandry has led to the increasingly serious environmental pollution, the tetracycline resistance genes induced by which could bring more hazardous environmental risk than veterinary tetracycline. This study investigated the effects of environmental factors on the formation of several typical tetracycline resistance genes (*tetA*, *tetC*). The results showed that temperature, light and pH could have impacts on the formation of tetracycline resistance genes in soil, the amounts of the tetracycline resistance bacteria and resistance genes induced in different treatments all reached the maximum in the proper environmental condition (25℃, 500 lx, pH7.5), which were all significantly higher than those in other environmental conditions ($P < 0.05$). In contrast, the adverse condition such as high temperature, strong light and high pH could effectively inhibit the formation of tetracycline resistance genes, probably due to the reduction of tetracycline residues or the direct influence on the formation of tetracycline resistance genes. And the results also showed that environmental factors could affect the growth of tetracycline resistance bacteria. Further analysis proved that the content of tetracycline resistance gene in soil had a positive correlation with the number of tetracycline resistance bacteria in the studied samples, therefore an inferred result was concluded that the growth of tetracycline resistance bacteria played a key role in the formation of the tetracycline resistance genes.

Key words: tetracycline; drug-resistance bacteria; resistance gene; environmental factors; RT-PCR

畜牧养殖业的集约化发展过程中, 兽用抗生素起到了重要的作用^[1], 其中兽用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养殖业中广泛使用^[3], 这些大量使用的四环素多会以原药或代谢物的形式随粪便及尿液排出动物体外^[4]. 在全球范围内许多地区的土壤、水体、底泥, 甚至饮用水中都能检出四环素的残留^[5~8]. 近年来, 有报道指出环境中残留的四

环素一般为 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 级别^[9]并能诱导及维持一定含量水平的抗性基因^[10], 无疑增加了抗生素残留对环境的威胁. 为消除抗性基因的环境污染, 国内外学者开展了多种方向的研究^[11~13], 其中就有研究证明

收稿日期: 2014-04-24; 修订日期: 2014-07-01

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学, E-mail: ykd518@126.com

* 通讯联系人, E-mail: jsj@nies.org

环境因素与抗生素抗性基因的去除之间存在着一定的关联,例如 Pei 等^[14]在研究生物处理对废水中抗生素抗性基因的作用时发现,厌氧和光照处理能够加速四环素类抗生素抗性基因 *tetO*、*tetW* 的去除。Diehl 等^[15]和 Munir 等^[16]也发现,温度与氧气条件能明显影响污泥等基质中抗性基因的含量。目前国内外许多研究多围绕不同环境条件中四环素抗性基因去除方法的探索,而针对四环素抗性基因形成过程中环境因素影响作用的研究则较为缺乏。本研究采取实验室条件下人工模拟自然条件的方式,通过人为改变环境因素诱导测试土壤,利用实时荧光定量 PCR 法检测被诱导土壤中的四环素抗性基因(*tetA*、*tetC*)的含量水平,探索温度、光照及 pH 条件对环境四环素抗性基因形成的影响规律。

1 材料与方法

1.1 土壤的采集

试验所需土壤采集于江苏省沭阳市某地,受人为活动较少,土壤性质为黄棕壤,标记为 S,采集后的土壤过 2 mm 筛,混合均匀,放于 4℃ 冰箱保存。

1.2 不同温度条件下的诱导

在无菌条件下称取土壤 S 100 g,按 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的比例向土壤中添加四环素标准溶液($1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),混合均匀,平铺于已在 121℃ 下灭菌 20 min 的 500 mL 空三角瓶底部。土壤含水量控制在田间持水量的 65%,用封口膜封住瓶口,将三角瓶置于避光恒温恒湿生化培养箱中。分别设置培养温度为 4、10、25、37 和 42℃,每组设置 3 个平行。每隔 2 d 称重补充损失的水分,培养周期为 21 d。

1.3 不同光照条件下的诱导

无菌条件下称取土壤 S 100 g,平铺于已在 121℃ 下灭菌 20 min 的带盖透明玻璃平皿中,在土壤表面均匀喷洒四环素标准溶液($1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)使土壤中四环素残留量为 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,混合均匀,土壤含水量为田间持水量的 65%。玻璃平皿置于光照培养箱中,光照度分别设置为 0、500、1000、5000、10000、20000 lx,每日光照时间为 12 h,培养箱温度设置为 37℃。每个试验组设置 3 个平行,每隔 2 d 称重补充损失水分,培养周期为 21 d。

1.4 不同 pH 条件下的诱导

在无菌条件下称取 50 g 土壤 S,平铺于已在 121℃ 下灭菌 20 min 的 500 mL 空三角瓶底部。向三角瓶中加入双蒸水,制成土壤悬液。配置磷酸盐缓冲液,利用磷酸盐缓冲液调节土壤悬液 pH 至 6、

6.5、7、7.5、8 和 8.5,按 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度向土壤悬液中添加四环素标准溶液,均匀混合,用封口膜封住瓶口,每个试验组设置 3 个平行,记录每个平行的质量。三角瓶置于避光、37℃、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床中,每隔两天称重补充损失水分。21 d 后阴干取土壤进行分析。

1.5 土壤总 DNA 的提取

称取培养后的土壤 0.25 g,按照 PowerSoil® DNA Isolation Kit(MoBio, 美国)试剂盒说明书提取土壤总 DNA。

1.6 土壤中可培养细菌和四环素耐药菌的丰度分析

称取培养后的土壤样品 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 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 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} 。分别取各稀释梯度的土壤悬液 200 μL 涂布于含 $16 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 四环素和不含抗生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($\text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$) = ($9 \times$ 平均菌落数 $\times$ 稀释倍数) / 0.2。

1.7 土壤总 DNA 上 *tetA*、*tetC* 基因的 RT-PCR 定量分析

1.7.1 DNA 提取

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(Tiagen, China)提取阳性样品中的基因组 DNA,提取的 DNA 用 1.0% 琼脂糖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)。

1.7.2 普通 PCR 反应

试验所有引物参照文献[17, 18]。建立 25 μL 扩增体系,其中含 100~200 ng 模板 DNA、 $10 \times \text{Taq plus buffer}$ (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,58℃、60℃、59℃(16S rRNA、*tetA*、*tetC*)退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,最后于 72℃ 延伸 7 min 结束反应。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,对比目标条带的大小。*E. coli* DH5 α 不含 *tet* 基因,被当作阴性对照。

1.7.3 构建 RT-PCR 阳性模板

采用 PCR 产物纯化试剂盒(Sangon, China)

纯化扩增后的目标条带,纯化后的产物连接到 *pEASY-T3 Cloning Vector* (TransGen, China), 连接产物转化于 *Trans1-T1* (TransGen, China) 感受态细胞中. 涂布平板,挑选阳性克隆子接种于 LB/Amp⁺ 的液体培养基中,过夜培养. 利用 AxyPrep Plasmid Miniprep Kit (Axygen, America) 提取质粒 DNA,送南京金斯瑞生物科技有限公司测序插入的基因片段. 从 Internet 进入 NCBI 站点后,用“Nucleotide Blast”程序对测序序列进行同源性检索比对.

1.7.4 RT-PCR 绝对定量标准曲线的制作

利用紫外分光光度计 (UV-8000PC) 检测提取的质粒 DNA 含量以及纯度, A_{260}/A_{280} 值在 1.8 ~ 2.0 之间,表明提取的质粒 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) $\times 6.02 \times 10^{23}$. 提取的质粒 DNA 按 10 倍浓度梯度稀释作为阳性反应模板,以拷贝数的 log 值为横坐标, *Ct* 值为纵坐标绘制标准曲线. 制成的标准曲线如图 1 ~ 图 3.

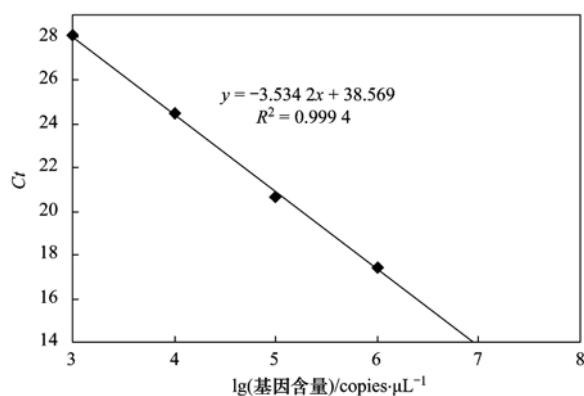


图 1 16S rRNA 标准曲线

Fig. 1 Standard curve of 16S rRNA

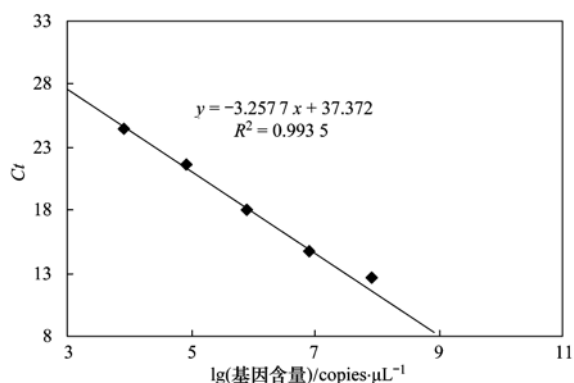


图 2 *tetA* 基因标准曲线

Fig. 2 Standard curve of *tetA* gene

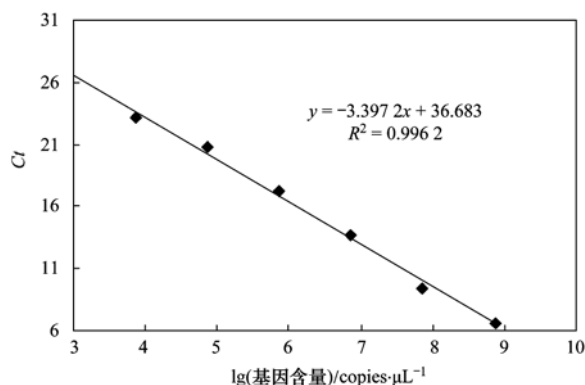


图 3 *tetC* 基因标准曲线

Fig. 3 Standard curve of *tetC* gene

1.7.5 RT-PCR 反应

参照 Ultra SYBR mixture (CWbio, China) 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, 其后进行 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.

2 结果与讨论

2.1 温度对土壤中四环素抗性基因含量的影响

2.1.1 不同温度下四环素抗性基因含量

从图 4 中可以看出, 土壤中 *tetA* 基因的含量范围为 $6.53 \times 10^4 \sim 2.62 \times 10^5$ copies·g⁻¹, *tetC* 基因的含量范围为 $1.33 \times 10^6 \sim 4.37 \times 10^6$ copies·g⁻¹. 不同温度条件下的四环素抗性基因的含量却存在着不同, *tetC* 基因含量在 25℃ 时达到峰值 4.37×10^6 copies·g⁻¹, 与其他条件下含量存在明显差异 ($P < 0.05$), 37℃ 时 *tetA* 基因的含量最高 2.62×10^5 copies·g⁻¹, 与其他条件下含量存在明显差异 ($P <$

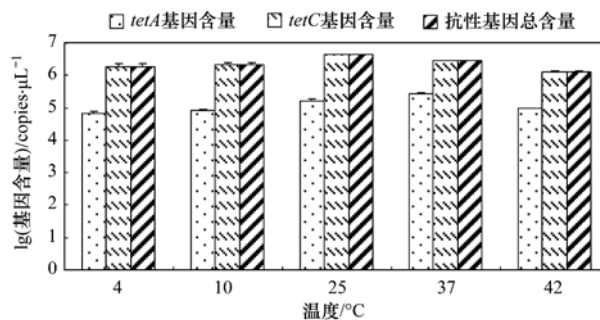


图 4 不同温度条件下四环素抗性基因的含量

Fig. 4 Amount of tetracycline resistance genes in soil at different temperature

0.05). 将 *tetA* 和 *tetC* 基因含量之和记为四环素抗性基因的总含量,25℃时抗性基因的总含量出现峰值,42℃时最低. 值得注意的是,0℃、10℃、37℃、42℃条件下四环素抗性基因的总含量仅占 25℃时含量的 41.82%、49.55%、69.44% 和 31.15%,各条件下四环素抗性基因总含量差异明显. 可以看出温度条件能够影响土壤中四环素抗性基因的含量,其中低温或高温条件可以有效降低土壤中四环素抗性基因的含量,这与 Diehl 等^[15]发现的温度可以影响四环素抗性基因含量的结论较为一致. 如图 5 所示,*tetA*、*tetC* 基因与16S rRNA表达量的比值分别介于 $10^{-2.005} \sim 10^{-1.5296}$ 与 $10^{-0.671} \sim 10^{-0.312}$ 之间,在 37℃时 *tetA* 与16S rRNA表达量比值最大,在 25℃时 *tetC* 基因与16S rRNA表达量的比值最大. 不同温度间 *tetA*、*tetC* 基因与16S rRNA表达量的比值的趋势与 *tetA*、*tetC* 基因含量在各温度条件间的变化趋势相近,说明不同温度条件下,土壤中 *tetA*、*tetC* 基因的含量与土壤中整体微生物丰度有关.

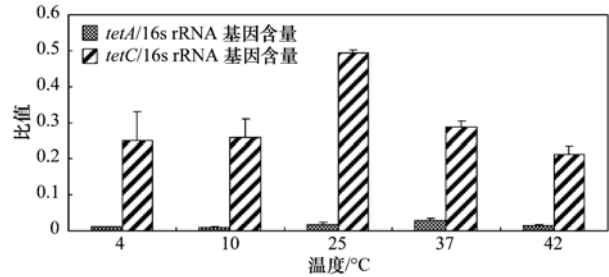


图5 不同温度条件下四环素抗性基因相对表达量
Fig. 5 Copies of *tet* genes/copies of 16S rRNA at different temperature

2.1.2 不同温度下土壤中四环素抗性水平变化

通过测定土壤中可培养细菌及四环素耐药菌的丰度,可以看出不同的温度条件下可培养菌菌落数和四环素耐药菌菌落数之间存在着明显差异(如表1). 25℃和37℃条件下可培养细菌菌落数和四环素耐药菌菌落数均显著高于其他条件($P < 0.05$),可以判断温度条件能促进或抑制细菌的生长. 其中在25℃时,四环素耐药菌菌落数达到最大, $(2.13 \pm 0.07) \times 10^6$ CFU·g⁻¹,为42℃时最低值的2.5倍. 值得注意的是土壤中四环素耐药菌菌落数在各个温度条件下的变化趋势与四环素抗性基因总含量在各个温度下的变化趋势接近,可以看出四环素耐药菌菌落数对四环素抗性基因的总含量产生影响. 从而可以推断出温度条件有效影响了四环素耐药菌的生长,又间接影响到了耐药菌中四环素抗性基因的生

成. 同时土壤中 *tetA*、*tetC* 基因的含量与土壤中四环素的残留水平有正相关性^[19],而且温度条件能够影响土壤中四环素的残留量^[20, 21],这可能也影响到了土壤中四环素抗性水平及四环素抗性基因含量的变化.

表1 不同温度条件下土壤中可培养菌及四环素耐药菌菌落数
Table 1 Amount of cultivable and drug resistant bacteria in soil under different temperature conditions

温度/℃	可培养菌菌落数 ×10 ⁶ /CFU·g ⁻¹	四环素耐药菌菌落数 ×10 ⁶ /CFU·g ⁻¹
4	2.07 ± 0.12	1.20 ± 0.07
10	2.44 ± 0.11	1.39 ± 0.04
25	3.27 ± 0.11	2.13 ± 0.07
37	3.79 ± 0.16	1.98 ± 0.08
42	1.62 ± 0.13	0.85 ± 0.04

2.2 光照条件对四环素抗性基因含量的影响

2.2.1 不同光照下土壤中四环素抗性基因含量

从图6中可以看出不同的光照条件下,土壤中四环素抗性基因的含量存在着不同, *tetA* 基因的含量范围为 $6.99 \times 10^4 \sim 2.19 \times 10^5$ copies·g⁻¹,远低于 *tetC* 基因的含量范围 $0.86 \times 10^6 \sim 2.36 \times 10^6$ copies·g⁻¹. 当光照度达到500 lx时, *tetA* 和 *tetC* 基因的含量为最大,但数值大小基本与0 lx时持平 (*tetA* $P = 0.661$, *tetC* $P = 0.631$). 500 ~ 20 000 lx范围内, *tetA* 和 *tetC* 基因的含量都会随着光照度的增加而减小,其中20 000 lx时四环素抗性基因总含量 (0.93×10^6 copies·g⁻¹) 仅占500 lx时的35.98%. 500 ~ 1 000 lx之间是抗性基因总含量下降最为明显的一段,抗性基因的总含量同比降低了28.87%. 由此可以看出光照度能够对四环素抗性基因的生成产生一定的影响,当光照度超过500 lx时,抗性基因的总含量与光照度会呈现负相关关系,即光照度值越大,抗性基因的含量越低. 这与 Engemann 等^[22]研究的光照能加速四环素抗性基因降解的结论存在相关性. 如图7所示, *tetA*、*tetC* 基因与16S rRNA表达

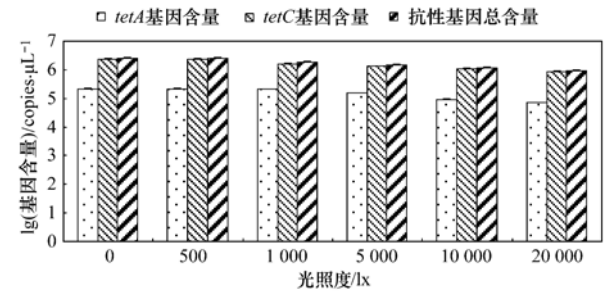


图6 不同光照条件下四环素抗性基因的含量
Fig. 6 Amount of tetracycline resistant genes in soil under different illumination

量的比值分别介于 $10^{-2.075} \sim 10^{-1.447}$ 与 $10^{-0.986} \sim 10^{-0.417}$ 之间,在 500 lx 时 *tetA*、*tetC* 基因与 16S rRNA 表达量比值最大,当光照度大于 500 lx 时,随着光照度增加比值在逐渐减小,这与土壤中 *tetA*、*tetC* 基因含量在各光照条件间的变化趋势相近,说明在不同光照条件下,土壤中 *tetA*、*tetC* 基因的含量与土壤中整体微生物丰度有关。

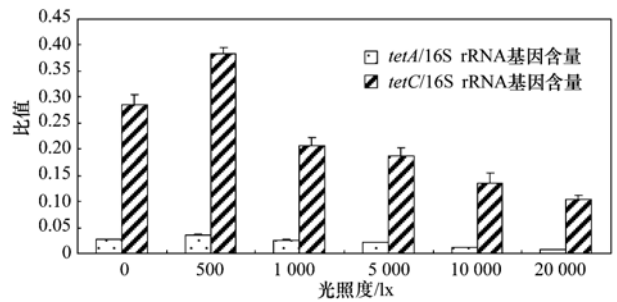


图 7 不同光照条件下四环素抗性基因相对表达量
Fig. 7 Copies of *tet* genes/copies of 16S rRNA under different illumination

2.2.2 不同光照条件下土壤中四环素抗性水平变化
不同光照条件下土壤中的可培养细菌菌落数之间不存在较大差异,都在 $3.52 \times 10^6 \sim 3.78 \times 10^6$ CFU·g⁻¹ 范围之内(如表 2),属于同一个数量级,但不同光照条件下土壤中的四环素耐药菌菌落数却差异明显($P < 0.05$),随着光照度的增加四环素耐药菌菌落数逐渐减少。在本研究中可以看出相同条件下,土壤中四环素耐药菌菌落数的减少对应着四环素抗性基因总含量的降低,两者的变化趋势相契合,由此可以推断在不同的光照条件下,四环素耐药菌菌落数与四环素抗性基因总含量之间具有对应关系,四环素耐药菌菌落数可以决定土壤中四环素抗性基因总含量。究其其他原因,*tetA*、*tetC* 基因的含量与土壤中四环素的残留量存在着正相关性^[19],四环素类抗生素具有光解特性^[23],强光照更易促进四环素类抗生素的降解^[24],同时本试验中采用的是日

表 2 不同光照条件下土壤中可培养菌菌落数与四环素耐药菌菌落数

Table 2 Amount of cultivable and drug resistant bacteria in soil under different illumination		
光照度 /lx	可培养菌菌落数 $\times 10^6$ /CFU·g ⁻¹	四环素耐药菌菌落数 $\times 10^6$ /CFU·g ⁻¹
0	3.69 ± 0.09	1.93 ± 0.04
500	3.52 ± 0.03	1.72 ± 0.03
1 000	3.54 ± 0.07	1.54 ± 0.05
5 000	3.67 ± 0.07	1.18 ± 0.05
10 000	3.78 ± 0.04	0.51 ± 0.07
20 000	3.64 ± 0.04	0.27 ± 0.04

光灯光源,日光灯光源相较其他光源更有利于四环素类抗生素的降解^[25],这可能也导致了土壤中四环素抗性基因生成量的减少。

2.3 pH 条件对四环素抗性基因含量的影响
2.3.1 不同 pH 条件下土壤中四环素抗性基因含量
利用 RT-PCR 绝对定量得到了不同 pH 条件下土壤中 *tetA* 和 *tetC* 基因的含量,根据表 3 可以看出 *tetA* 基因和 *tetC* 基因的含量范围分别为 527 ~ 6 954 copies·g⁻¹ 和 $1.21 \times 10^6 \sim 2.54 \times 10^6$ copies·g⁻¹。相较于在 pH = 7 时 *tetA* 基因的含量达到最大,*tetC* 基因的含量在 pH = 7.5 时达到峰值。在 pH = 7.5 时四环素抗性基因的总含量最高,为 2.55×10^6 copies·g⁻¹,与 pH = 7 时相当($P = 0.151$)。同时这两个 pH 条件下 *tetA* 和 *tetC* 基因的含量都明显区别于其他条件($P < 0.05$),说明 pH 条件能够影响四环素抗性基因的生成。比较酸性(pH < 7)、中性(7 ≤ pH ≤ 7.5)与碱性(pH > 7.5)条件下四环素抗性基因的含量可以发现,中性条件下四环素抗性基因的含量明显高于酸性和碱性条件($P < 0.05$),同时碱性条件下四环素抗性基因的含量又明显低于酸性条件($P < 0.05$),更为直观的是在 pH = 8.5 时,*tetA* 和 *tetC* 基因的含量仅为 527 copies·g⁻¹ 和 1.21×10^6 copies·g⁻¹,与 *tetA* 和 *tetC* 基因的含量峰值相比各减少了 92.42% 和 52.22%。由此可以推断中性条件比较适宜四环素抗性基因的生成,碱性条件下抗性基因的生成量会随着 pH 值的升高而减小。同时从图 8 中可以看出,*tetA*、*tetC* 基因与 16S rRNA 表达量的比值分别介于 $10^{-3.777} \sim 10^{-2.759}$ 与 $10^{-0.409} \sim 10^{-0.262}$ 之间,在 pH = 7 时 *tetA* 基因与 16S rRNA 表达量比值最大,pH = 6 时 *tetC* 基因与 16S rRNA 表达量比值最大,*tetA* 基因与 16S rRNA 表达量比值与土壤中 *tetA* 基因含量在各 pH 条件间的变化趋势相近,

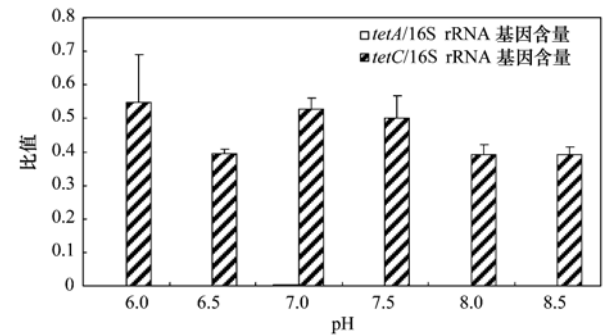


图 8 不同 pH 条件下四环素抗性基因相对表达量
Fig. 8 Copies of *tet* genes/copies of 16S rRNA under different pH conditions

表 3 不同 pH 值下土壤中四环素抗性基因的含量

Table 3 Amount of tetracycline resistant genes in soil under different pH conditions

pH	可培养菌菌落数 $\times 10^6/\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$	四环素耐药菌菌落数 $\times 10^6/\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$	<i>tetA</i> 基因含量 $/\text{copies}\cdot\text{g}^{-1}$	<i>tetC</i> 基因含量 $\times 10^6/\text{copies}\cdot\text{g}^{-1}$
6	1.97 ± 0.03	0.11 ± 0.01	860 ± 98	1.75 ± 0.06
6.5	2.01 ± 0.06	0.15 ± 0.02	$4\,290 \pm 321$	1.96 ± 0.04
7	2.13 ± 0.09	0.14 ± 0.01	$6\,954 \pm 391$	2.20 ± 0.07
7.5	2.09 ± 0.07	0.16 ± 0.01	$4\,470 \pm 255$	2.54 ± 0.08
8	1.27 ± 0.04	0.05 ± 0.01	$2\,010 \pm 139$	1.40 ± 0.06
8.5	1.04 ± 0.03	0.04 ± 0.01	527 ± 31	1.21 ± 0.04

说明不同 pH 条件下,土壤中 *tetA* 基因的含量与土壤中整体微生物丰度有关. 而 *tetC* 基因与16S rRNA 表达量比值与土壤中 *tetC* 基因含量在各 pH 条件下呈现不同的变化趋势,说明土壤中 *tetC* 基因的含量与土壤中整体微生物丰度无关.

2.3.2 不同 pH 条件下土壤四环素抗性水平变化

本研究中,随着 pH 条件的改变,土壤中四环素耐药菌菌落数也随着产生相应变化(如表 3),当 pH 值在 6.5 ~ 7.5 之间时土壤中四环素耐药菌菌落数相当,变化比较平缓,远大于 pH > 7.5 时土壤中四环素耐药菌菌落数. 将土壤中四环素耐药菌菌落数的变化趋势与 *tetA* 与 *tetC* 基因含量的变化趋势进行比对,发现两者随 pH 改变的变化趋势吻合,进一步证明了土壤中四环素耐药菌与四环素抗性基因的对应关系. 可以推断 pH 的变化带动了四环素耐药菌菌落数的改变,耐药菌菌落数的改变影响到了四环素抗性基因的生成. 同时 Jiao 等^[26] 的研究发现,四环素在碱性条件易分解,而酸性条件则能明显促进四环素的稳定性,四环素残留量的改变也可能影响到了四环素抗性基因的生成.

2.4 土壤中四环素耐药菌与四环素抗性基因含量的关系

分析比较本研究中所有的土壤培养条件可以发现,温度、光照条件的设置都以好氧培养作为前提, pH 条件是在缺氧条件下进行培养,因此可以把本研究中采用的环境条件分为两大类,即好氧条件诱导与缺氧条件诱导. 本研究中每个试验组都设置 3 个平行对照,因此将本研究对象分为好氧条件下的 30 个样本,缺氧条件下的 18 个样本. 将好氧条件与缺氧条件下土壤中可培养细菌菌落数与四环素抗性基因含量(*tetA* 与 *tetC* 含量之和)进行线性拟合发现,好氧条件下得线性方程为 $y = 0.163\,1x + 1.704\,5$ ($n = 30$),线性系数 $R^2 = 0.014\,1$,缺氧条件下线性方程为 $y = 0.796\,3x + 0.344\,5$ ($n = 18$),线性系数 $R^2 = 0.253\,6$,可以发现好氧与缺氧条件下可培养细菌

菌落数与四环素抗性基因含量水平之间不存在明显的线性关系.

进一步将好氧条件与缺氧条件下土壤中四环素耐药菌菌落数与四环素抗性基因含量进行线性拟合发现,好氧条件下线性方程为 $y = 1.200\,8x + 0.499\,2$ ($n = 30$),线性系数 $R^2 = 0.787\,2$ (图 9),缺氧条件下线性方程为 $y = 9.316\,6x + 0.832\,8$ ($n = 18$),线性系数 $R^2 = 0.884\,1$ (图 10),可以说明在好氧与缺氧条件下土壤中四环素耐药菌与四环素抗性基因含量之间存在较强的线性关系,即土壤中四环素耐药菌丰度可以决定土壤中四环素抗性基因的含量水平.

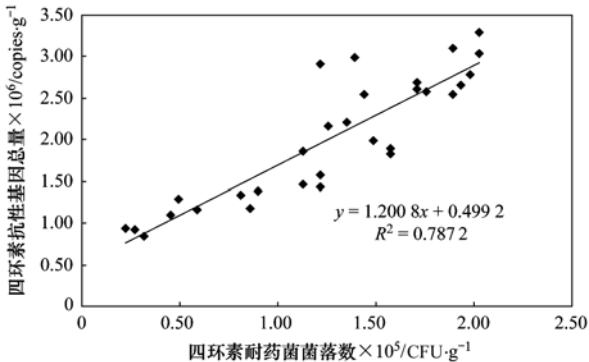


图 9 好氧条件下四环素抗性基因总量与四环素耐药菌菌落数线性方程 ($n = 30$)

Fig. 9 Liner equation of tetracycline resistance bacterial colonies and the total amount of resistance genes under aerobic conditions ($n = 30$)

3 结论

(1) 温度、光照及 pH 等环境因素都能对四环素抗性基因的形成产生明显的影响,较为合适的环境条件能够显著地促进四环素抗性基因的形成,影响的主要方式为通过影响土壤中四环素耐药菌的诱导与生长,进而影响到耐药菌中四环素抗性基因的生成. 通过调节环境因素可以控制环境中四环素抗性基因的生成量,高温、强光照及较高的 pH 条件都能够有效抑制土壤中四环素抗性基因的生成,从而

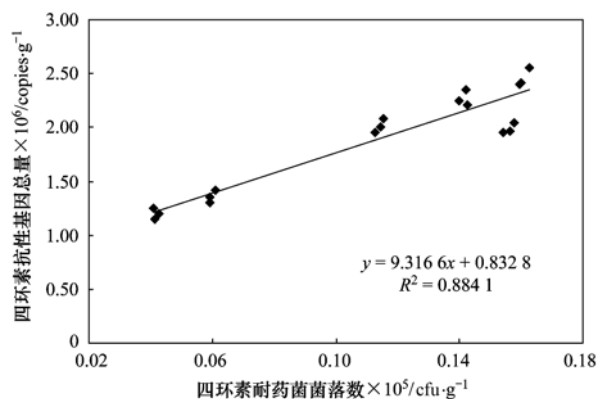


图 10 缺氧条件下四环素抗性基因总量与四环素耐药菌菌落数线性方程 ($n = 18$)

Fig. 10 Liner equation of tetracycline resistance bacterial colonies and the total amount of resistance genes under hypoxic conditions ($n = 18$)

能抑制四环素抗性基因的污染与扩散,促进四环素抗性基因污染水平的控制。

(2)不同的温度、光照条件下,*tetA*、*tetC* 基因的含量与土壤中整体微生物丰度有关,而在不同 pH 条件下,仅能得出 *tetA* 基因的含量与土壤中整体微生物丰度有关。

(3)四环素抗性基因含量水平与土壤中四环素耐药菌数量之间存在着较为显著的正相关关系,土壤中四环素耐药菌丰度对四环素抗性基因的形成也起到了关键性作用,并决定土壤中四环素抗性基因的含量水平。因此,在目前养殖业中四环素处于持续高水平投入的情况下,有必要调节畜禽粪便的处理条件,减少四环素耐药菌的生长,降低畜禽粪便再利用过程中四环素抗性基因的环境风险,从而保障环境中抗生素抗性基因污染风险处于可控程度。

参考文献:

- [1] Looft T, Johanson 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] 徐冰洁, 罗义, 毛大庆, 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.
- [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] Andreozzi R, Caprio V, Ciniglia C, *et al.* Antibiotics in the environment, occurrence in Italian STPs, fate, and preliminary assessment on algal toxicity of amoxicillin [J]. Environmental Science & Technology, 2004, **38**(24): 6832-6838.
- [6] Xu W, Zhang G, Zou S, *et al.* Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. Environmental Pollution, 2007, **145**(3): 672-679.
- [7] Gao P P, Mao D Q, Luo Y, *et al.* Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment [J]. Water Research, 2012, **46**(7): 2355-2364.
- [8] 徐冬梅, 王艳花, 饶桂维. 四环素类抗生素对淡水绿藻的毒性作用[J]. 环境科学, 2013, **34**(9): 3386-3390.
- [9] 李彦文, 莫测辉, 赵娜, 等. 菜地土壤中磺胺类和四环素类抗生素污染特征研究[J]. 环境科学, 2009, **30**(6): 1762-1766.
- [10] 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.
- [11] 窦春玲, 郭雪萍, 尹大强. 污水处理厂抗生素抗性基因分布和去除研究进展[J]. 环境化学, 2013, **32**(10): 1885-1893.
- [12] Fatta-Kassinos D, Kalavrouziotis I K, Koukoulakis P H, *et al.* The risks associated with wastewater reuse and xenobiotics in the agroecological environment [J]. Science of the Total Environment, 2011, **409**(19): 3555-3563.
- [13] Börjesson S, Mattsson A, Lindgren P E, *et al.* Genes encoding tetracycline resistance in a full-scale municipal wastewater treatment plant investigated during one year [J]. Journal of Water and Health, 2010, **8**(2): 247-256.
- [14] Pei R T, Cha J, Caloson K H, *et al.* Response of antibiotic resistance genes (ARG) to biological treatment in dairy lagoon water [J]. Environmental Science & Technology, 2007, **41**(14): 5108-5113.
- [15] Diehl D L, LaPara T M. Effect of temperature on the fate of genes encoding tetracycline resistance and the integrase of class 1 integrons within anaerobic and aerobic digesters treating municipal wastewater solids [J]. Environmental Science & Technology, 2010, **44**(23): 9128-9133.
- [16] Munir M, Wong K, Xagorarakis I. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan [J]. Water Research, 2011, **45**(2): 681-693.
- [17] 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.
- [18] Glenn L S M, Lindsey R L, Folster J P, *et al.* Antimicrobial resistance genes 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): 1175-1184.
- [19] 张俊, 杨晓洪, 葛峰, 等. 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[J]. 环境科学, 2014, **35**

- (6): 2374-2380.
- [20] Loftin K A, Adams C D, Meyer M T, *et al.* Effects of ionic strength, temperature, and pH on degradation of selected antibiotics[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2008, **37**(2): 378-386.
- [21] Wang Q Q, Yates S R. Laboratory study of oxytetracycline degradation kinetics in animal manure and soil[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, **56**(5): 1683-1688.
- [22] Engemann C A, Adams L, Knapp C W, *et al.* Disappearance of oxytetracycline resistance genes in aquatic systems[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, **263**(2): 176-182.
- [23] 匡光伟, 孙志良, 陈小军, 等. 四环素类抗菌药物在鸡粪中的降解研究[J]. *农业环境科学学报*, 2007, **26**(5): 1784-1788.
- [24] Zhang B, Li Y Q, Liu J X, *et al.* Progress on ovine theileriosis and genetically engineered vaccine in China[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2009, **30**(3): 86-89.
- [25] Ma Y J, Wilson C A, Novak J T, *et al.* Effect of various sludge digestion conditions on sulfonamide, macrolide, and tetracycline resistance genes and class I integrons[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, **45**(18): 7855-7861.
- [26] Jiao S J, Zheng S R, Yin D Q, *et al.* Aqueous photolysis of tetracycline and toxicity of photolytic products to luminescent bacteria[J]. *Chemosphere*, 2008, **73**(3): 377-382.

《环境科学》多项引证指标名列前茅

2014 年 9 月 26 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 2013 年度中国科技论文统计结果. 统计结果显示 2013 年度《环境科学》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.

《环境科学》综合评价总分 76.6,排名第一,总被引频次 6 941,影响因子 1.266.

综合评价总分是根据中国科技期刊综合评价指标体系,计算多项科学计量指标(总被引频次、影响因子、他引率、基金论文比、引文率等),采用层次分析法确定重要指标的权重,分学科对每种期刊进行综合评价,计算出每个期刊的综合评价总分. 这项指标屏蔽了各个学科之间总体指标背景值的差异,使科技期刊可以进行跨学科比较. 根据发布的统计结果,2013 年度《环境科学》综合评价总分 76.6,在被统计的 33 种环境科学技术及资源科学技术类期刊中名列第一.

CONTENTS

Variation Characteristics of Surface Ozone and Its Precursors During Summertime in Nanjing Northern Suburb	SHAO Ping, AN Jun-lin, YANG Hui, <i>et al.</i> (4031)
Distribution Characteristics of Pollution Gases and Water Soluble Ion in Aerosol During the Asian Youth Games of Nanjing, China	ZOU Jia-nan, AN Jun-lin, WANG Hong-lei, <i>et al.</i> (4044)
Aerosol Concentration Variation in Nanjing During Asian Youth Games and the Relationship Between Aerosol Concentration and Visibility	YUAN Liang, YIN Yan, LI Qi, <i>et al.</i> (4052)
Characteristic Analysis of a Multi-day Pollution Event in Chang-Zhu-Tan Metropolitan Area During October 2013	LIAO Zhi-heng, FAN Shao-jia, HUANG Juan, <i>et al.</i> (4061)
Application of On-line Single Particle Aerosol Mass Spectrometry (SPAMS) for Studying Major Components in Fine Particulate Matter	FU Huai-yu, YAN Cai-qing, ZHENG Mei, <i>et al.</i> (4070)
Establishment and Application of Replaceable Source Profiles of PM ₁₀	CHEN Qiang, JING Yi, WU Huan-bo, <i>et al.</i> (4078)
Distribution, Flux and Biological Consumption of Carbon Monoxide in the East China Sea and the South Yellow Sea in Summer	WANG Jing, LU Xiao-lan, YANG Gui-peng, <i>et al.</i> (4085)
Spatial and Temporal Distribution of Mercury in Water of a Small Typical Agricultural Watershed in the Three Gorges Reservoir Region	WANG Ya, ZHAO Zheng, MU Zhi-jian, <i>et al.</i> (4095)
Fluorescence Characteristics of Fractionated Colloidal Organic Matter in Freshwater from Hunhe and Taizihe Watersheds	LIU Na-na, LI Bin, LIU Rui-xia, <i>et al.</i> (4103)
Variations of Annual Load of TN and TP in the Deep Bay Watershed, Shenzhen	ZHAO Chen-chen, ZHANG Shi-yan, MAO Xian-zhong (4111)
Characteristics and Bioavailability of Organic Phosphorus from Different Sources of Sediments in Dianchi Lake	XIONG Qiang, JIAO Li-xing, WANG Sheng-rui, <i>et al.</i> (4118)
Heavy Metals Distribution Characteristics and Ecological Risk Evaluation in Surface Sediments of Dammed Jinshan Lake	ZHOU Xiao-hong, LIU Long-mei, CHEN Xi, <i>et al.</i> (4127)
Vertical Distribution Pattern and Ecological Risk Assessment of Heavy Metals in a Sediment Core from Pumoyum Co, Tibet	XIE Ting, LUO Dong-xia, YANG Rui-qiang (4135)
Heavy Metals Pollution and Analysis of Seasonal Variation Runoff in Xi'an	YUAN Hong-lin, LI Xing-yu, WANG Xiao-chang (4143)
Distribution and Source Apportionment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Urban Rainfall Runoff	WU Zi-lan, YANG Yi, LIU Min, <i>et al.</i> (4148)
Influence of the Substrate Composition in Extensive Green Roof on the Effluent Quality	CHEN Yu-lin, LI Tian, GU Jun-qing (4157)
Investigation of the Microbial Diversity and Structure of Biological Activated Carbon from Different Sources in Drinking Water Treatment Process	DU Er-deng, ZHENG Lu, FENG Xin-xin, <i>et al.</i> (4163)
Microcystin Safety Study During <i>Cyanobacteria</i> Removal by Pressure Enhanced Coagulation Process	JIANG Xin-yue, LUAN Qing, CONG Hai-bing, <i>et al.</i> (4171)
Membrane Fouling Based on Change of Membrane Characteristic Parameters During Ultrafiltration of Protein	WANG Xu-dong, ZHANG Yin-hui, WANG Lei, <i>et al.</i> (4176)
Impact Factors and Degradation Mechanism for the Ozonation of Acetaminophen in Aqueous Solution	CAO Fei, YUAN Shou-jun, ZHANG Meng-tao, <i>et al.</i> (4185)
Degradation of Benzothiazole in Electro-Assisted Microbial Reactor	LIU Chun-miao, DING Jie, LIU Xian-shu, <i>et al.</i> (4192)
Preparation and Evaluation of Fe-La Composite Oxide Nanoabsorbent for As(III) Removal from Aqueous Solutions	ZHANG Wei, CHEN Jing, ZHANG Gao-sheng (4198)
Physiological Responses of Tubificidae to Heavy Metal Chromium Stress	LOU Ju-qing, YANG Dong-ye, CAO Yong-qing, <i>et al.</i> (4205)
Effects of Light Quality on the Growth Characteristics and Biochemical Component of <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	TANG Qing-qing, FANG Zhi-guo, JI Wen-wen, <i>et al.</i> (4212)
Influence of Alkalinity and DO on ANAMMOX Bioreactor at Normal Temperature and Low Substrate Concentration	REN Yu-hui, WANG Ke, LI Xiang-kun, <i>et al.</i> (4218)
Effect of Fe ²⁺ and Fe ³⁺ on the Activity of ANAMMOX	LI Xiang, HUANG Yong, WU Chuan, <i>et al.</i> (4224)
Research on Change Process of Nitrosation Granular Sludge in Continuous Stirred-Tank Reactor	YIN Fang-fang, LIU Wen-ru, WANG Jian-fang, <i>et al.</i> (4230)
Effects of Salinity on N ₂ O Production During Nitrification Using Aerobic Granular Sludge	WANG Shan-shan, LIANG Hong, GAO Da-wen (4237)
Analysis of Microbial Community Variation in the Domestication Process of Sludge in a Sulfate-reducing Reactor	ZENG Guo-qu, JIA Xiao-shan, ZHENG Xiao-hong, <i>et al.</i> (4244)
Quantifying the Influence of Different Matrices on Pb Accumulation in the Soil from Nanjing and Suspended Matter from the Lower of the Yangtze River with Pb Isotopic Technique	WANG Cheng, XIA Xue-qi, ZHANG Yi, <i>et al.</i> (4251)
Contamination Characteristics of Fluoroquinolones in Different Kinds of Soil Profiles in Southeast Suburb of Beijing	SU Si-hui, HE Jiang-tao, YANG Lei, <i>et al.</i> (4257)
Effect of Environmental Factors on the Formation of Several Typical Tetracycline Resistance Genes in Soil	ZHANG Jun, LUO Fang-yuan, XIONG Hao-hui, <i>et al.</i> (4267)
Response of Nitrification/Denitrification and Their Associated Microbes to Soil Moisture Change in Paddy Soil	LIU Ruo-xuan, HE Ji-zheng, ZHANG Li-mei (4275)
Microbial Community Abundance and Diversity in Typical Karst Ecosystem to Indicate Soil Carbon Cycle	JIN Zhen-jiang, TANG Hua-feng, LI Min, <i>et al.</i> (4284)
Effects of Variable Temperature on Organic Carbon Mineralization in Typical Limestone Soils	WANG Lian-ge, GAO Yan-hong, DING Chang-huan, <i>et al.</i> (4291)
Influence of the Interaction Between Iron Oxide and Electron Donor Substances on 1,1,1-Trichloro-2,2-bis(<i>p</i> -chlorophenyl)ethane (DDT) Reductive Dechlorination in Hydragic Acrisols	LIU Cui-ying, XU Xiang-hua, WANG Zhuang, <i>et al.</i> (4298)
Continuous Remediation of Heavy Metal Contaminated Soil by Co-Cropping System Enhanced with Chelator	WEI Ze-bin, GUO Xiao-fang, WU Qi-tang, <i>et al.</i> (4305)
Spatial Heterogeneity of Soil Respiration in a Subalpine Meadow at Different Sampling Scales	LI Hong-jian, GAO Yu-feng, YAN Jun-xia, <i>et al.</i> (4313)
Study on Regularity of Greenhouse Gas Emissions from Black Soil with Different Reclamation Years	LI Ping, LANG Man, XU Xiang-hua, <i>et al.</i> (4321)
Comparison Between Transgenic Insect-Resistant Cotton Expressing CryIAc Protein and Its Parental Variety in Rhizospheric Fungal Diversity	PAN Jian-gang, JIAO Hai-hua, BAI Zhi-hui, <i>et al.</i> (4329)
Concentrations of Mercury in Ambient Air in Wastewater Irrigated Area of Tianjin City and Its Accumulation in Leafy Vegetables	ZHENG Shun-an, HAN Yun-lei, ZHENG Xiang-qun (4338)
Combined Effects of 1-Nitropyrene and 1,2-Naphthoquinone on Cytotoxicity and DNA Damage in A549 Cells	SHANG Yu, JIANG Yu-ting, ZHANG Ling, <i>et al.</i> (4345)
Influence of Organic Matter Evolution During Composting on the Bioavailability of Heavy Metals	BU Gui-jun, YU Jing, DI Hui-hui, <i>et al.</i> (4352)
Carbonization of Heavy Metal Cu Implanted Sewage Sludge and Stability of Heavy Metal in the Resulting Char	DOU Xiao-min, CHEN De-zhen, DAI Xiao-hu (4359)
Technological Characteristics of Bioreactor Landfill with Aeration in the Upper Layer	TIAN Ying, WANG Shen, XU Qi-yong (4365)
Impact of Nitrate Continuous Injection on N ₂ O Releases from Bioreactor Landfill	BIAN Rong-xing, SUN Ying-jie, LI Jing-jing, <i>et al.</i> (4371)
Research on Contribution Decomposition by Industry to China's Carbon Intensity Reduction and Carbon Emission Growth	JIANG Jing-jing, YE Bin, JI Jun-ping, <i>et al.</i> (4378)
Shifting Path of Industrial Pollution Gravity Centers and Its Driving Mechanism in Pan-Yangtze River Delta	ZHAO Hai-xia, JIANG Xiao-wei, CUI Jian-xin (4387)
Method for Environmental Management in Paper Industry Based on Pollution Control Technology Simulation	ZHANG Xue-ying, WEN Zong-guo (4395)
Research Progress and Direction of Atmospheric Brown Carbon	YAN Cai-qing, ZHENG Mei, ZHANG Yuan-hang (4404)

《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11月15日 第35卷 第11期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 35 No. 11 Nov. 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