

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第39卷 第1期

Vol.39 No.1

2018

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

2006~2015年北京市不同地区 O₃ 浓度变化 王占山, 李云婷, 安欣欣, 李倩, 孙乃迪, 王步英, 潘锦秀 (1)

南京北郊黑碳气溶胶的来源解析 肖思晗, 于兴娜, 朱彬, 何稼祺, 吕睿, 沙丹丹 (9)

电镀厂周边大气 PM₁₀ 中重金属季节性分布特征及生态风险评价 赵珍丽, 赵委托, 黄庭, 程胜高, 余葱葱, 尹伊梦 (18)

广西玉林市大气 PM₁₀ 和 PM_{2.5} 中有机碳和元素碳污染特征分析 黄炯丽, 陈志明, 莫招育, 李宏姣, 杨俊超, 刘慧琳, 毛敬英, 梁桂云, 张达标, 吴熊平, 郝爽 (27)

青岛近海及黄渤海大气气溶胶中不同形态氮磷质量浓度及组成特征 张瑞峰, 祁建华, 丁雪, 谢丹丹 (38)

大气环境分区管理: 以广东省为例 杨柳林, 李敏辉, 廖程浩, 曾武涛, 张晖, 张永波 (49)

基于高分影像的城市黑臭水体遥感识别: 以南京为例 温爽, 王桥, 李云梅, 朱利, 吕恒, 雷少华, 丁潇蕾, 苗松 (57)

基于 SWAT 模型的流域河道硝酸盐 δ¹⁵N 和 δ¹⁸O 模拟 王康, 冉宁, 林忠兵, 周祖昊 (68)

程河流域非点源污染负荷估算及其控制对策 陈学凯, 刘晓波, 彭文启, 董飞, 黄智华, 冯顺新, 王若男 (77)

陆浑水库饮用水源地水体中金属元素分布特征及健康风险评价 余葱葱, 赵委托, 高小峰, 程胜高, 谢地, 马鹏途 (89)

天津供水系统中抗生素分布变化特征与健康风险评价 张新波, 宋姿, 张丹, 刘楠楠, 李楠, 温海涛 (99)

西南丘陵区村镇典型供水水源有机物分布特征及对饮水水质的影响 王琼, 李乃稳, 李磊, 李龙国, 苟思, 杨凌, 肖 (109)

以 HKUST-1 为模板制备铜电极物活化过一硫酸氢钾降解罗丹明 B 陈卫平, 彭程伟, 杨阳, 吴玉梅 (117)

黄河岸边土壤中类二噁英类多氯联苯污染现状及风险 姚宏, 卢双, 张旭, 裴晋, 鲁垠涛 (123)

淹水落干下三峡水库消落带土壤无机磷形态转化特征 周健, 李春辉, 张志永, 胡红青, 万成炎, 胡莲, 潘晓洁 (130)

磷酸盐对铁锰复合氧化物膜去除地表水中氨氮的影响 卓瑞双, 黄廷林, 张瑞峰, 文刚 (137)

K₂S₂O₈ 强化 g-C₃N₄ 薄膜光电催化降解 Cu(CN)₂ 并同步回收 Cu 党聪哲, 李一兵, 王彦斌, 赵旭 (145)

以 HKUST-1 为模板制备铜电极物活化过一硫酸氢钾降解罗丹明 B 蒲嘉懿, 万金泉, 王艳, 马邕文, 武书彬 (152)

氨化松香基交联聚合树脂对水中诺氟沙星的吸附性能 马亚红, 黄婉婷, 刁开盛, 李鹏飞, 谭学才, 董慧岭, 覃方夸, 雷福厚, 刘绍刚 (161)

铁锰泥除砷颗粒吸附剂对 As(V) 的吸附去除 曾辉平, 吕赛赛, 杨航, 尹灿, 曹瑞华, 王艳菊, 李冬, 张杰 (170)

水铁矿及其胶体对砷的吸附与吸附形态 马玉玲, 马杰, 陈雅丽, 雷梅, 郭华明, 翁莉萍, 李永涛 (179)

阳(阴)离子复配修饰两性磁性膨润土的表面特征差异及对苯酚吸附的影响 任爽, 孟昭福, 王腾, 张洋, 田凯, 刘伟, 闫东旭 (187)

典型城市污水中对羟基苯甲酸酯的污染特征 赵雪, 张子峰, 祝富杰, 李一凡, 马万里 (195)

水力停留时间对活性炭生物转盘处理污水的影响 许雯佳, 戚小英 (202)

环丙沙星对膜生物反应器运行效能的影响及其去除特性 戴琦, 刘锐, 舒小铭, 张永明, 陈吕军 (212)

AAO 工艺低氧条件下的运行及其模拟 曹特特, 王林, 李咏梅 (219)

磷酸盐对亚硝化系统的抑制及恢复 顾澄伟, 陈方敏, 李祥, 张程锦 (227)

碳源对污水处理厂 SAD 工艺小试的影响 李冬, 赵世勋, 王俊安, 朱金凤, 关宏伟, 张杰 (232)

容积负荷对 ABR-MBR 工艺反硝化除磷性能的影响 吕亮, 尤雯, 韦佳敏, 吴鹏, 沈耀良 (239)

DNBF-O₃-GAC 组合工艺深度脱除氮磷及代谢产物 钟丽燕, 郝瑞霞, 王卫东, 万京京, 朱晓霞 (247)

交替好氧/缺氧运行模式对生物脱氮效能及活性污泥胞外聚合物的影响 孙洪伟, 陈翠忠, 吴长峰, 赵华南, 于雪, 方晓航 (256)

纳米零价铁对升流式颗粒污泥床反硝化性能的影响 周丰, 王翻翻, 钱飞跃, 黄慧敏, 沈耀良, 周建民 (263)

高含固污泥厌氧消化中 Fe/S 及 pH 对原位抑硫效率影响及其交互作用 韩芸, 曹玉芹, 卓杨, 王晓飞, 韩雅婷, 彭党聪 (269)

浑河流域贮存污泥成分特征及演变规律分析 刘甜甜, 崔崇威, 赫俊国, 唐建 (276)

去除城市生活污水中有机络合态金属强化其厌氧生物制气 卢怡清, 许颖, 董滨, 戴晓虎 (284)

污泥飞灰中重金属不同浸出方法比较及综合毒性评价 王丰, 李润东, 李彦龙, 赵云斌, 杨天华 (292)

初冬时期闽江河口区养殖塘排水后的 CH₄ 和 N₂O 通量日变化特征 杨平, 谭立山, 黄佳芳, 何清华, 全川 (300)

3 种土壤改良剂对河套灌区玉米田温室气体排放的影响 武岩, 红梅, 林立龙, 刘梅, 刘宇杰 (310)

有机替代比例对冬小麦/夏玉米轮作体系作物产量及 N₂O 排放的影响 侯苗苗, 吕凤莲, 张弘毅, 周应田, 路国艳, Ayaz Muhammad, 黎青慧, 杨学云, 张树兰 (321)

拔节期水稻光合碳输入的动态变化及其对施氮的响应: ¹³C-CO₂ 脉冲标记 陈珊, 祝贞科, 袁红朝, 王久荣, 彭佩钦, 葛体达, 吴金水 (331)

陕北黄土丘陵区不同土地利用方式下土壤碳剖面分布特征 兰志龙, 赵英, 张建国, 李会杰, 司炳成, 焦瑞, Muhammad Numan Khan, Tanveer Ali Sial (339)

不同地表条件下生物炭对土壤氮挥发的影响 邹娟, 胡学玉, 张阳阳, 陈窈君, 王向前, 刘扬 (348)

秸秆与生物炭还田对土壤团聚体及固碳特征的影响 徐国鑫, 王子芳, 高明, 田冬, 黄容, 刘江, 黎嘉成 (355)

县域尺度土壤铜的有效性及相关影响因素评估 李锦芬, 瞿明凯, 刘刚, 黄标 (363)

基于改进 LUR 模型的区域土壤重金属空间分布预测 曾菁菁, 沈春竹, 周生路, 陆春峰, 金志丰, 朱雁 (371)

沈北新区土壤中多环芳烃污染特征及源解析 李嘉康, 宋雪英, 魏建兵, 王颖怡, 李玉双, 郑学昊 (379)

磷酸盐、腐殖酸与粉煤灰联合钝化处理模拟铅镉污染土壤 赵庆圆, 李小明, 杨麒, 陈灿, 钟振宇, 钟宇, 陈飞, 陈寻峰, 王祥 (389)

控源及改良措施对稻田土壤和水稻镉累积的影响 封文利, 郭朝晖, 史磊, 肖细元, 韩晓晴, 冉洪珍, 薛清华 (399)

典型土壤双季稻对 Cd 吸收累积差异 李欣阳, 龙坚, 王树兵, 陈齐, 董霞, 蒋凯, 侯红波, 彭佩钦, 廖柏寒 (406)

松花江上游夹皮沟金矿开采区芦苇叶片汞分布特征 张曼胤, 李梦洁, 崔丽娟, 王贺年, 郭子良, 徐卫刚, 魏圆云, 杨思, 肖红叶 (415)

硝酸盐对土壤反硝化活性及厌氧降解的影响 代军帅, 左小虎, 王明霞, 姚炎红, 周志峰 (422)

长期施肥对稻田土壤微生物量、群落结构和活性的影响 王伟华, 刘毅, 唐海明, 孙志龙, 李宝珍, 葛体达, 吴金水 (430)

海洋沉积物中硫酸盐还原菌和硫酸化菌群落分析方法的比较 张玉, 米铁柱, 甄毓, 陈焯, 付璐璐, 王勋功 (438)

鄱阳湖微囊藻毒素时空分布格局及其与理化及生物因子的关系 袁丽娟, 廖且根, 张莉, 张大文, 罗林广, 刘聚涛 (450)

畜禽粪便中多重耐药细菌及耐药基因分布特征 张昊, 王盼亮, 杨清香, 俞宁 (460)

烟气净化工艺和焚烧炉类型对生活垃圾焚烧飞灰性质的影响 章骅, 于思源, 邵立明, 何晶晶 (467)

《环境科学》征稿简则(17) 《环境科学》征订启事(26) 信息(160, 255, 338)

畜禽粪便中多重耐药细菌及耐药基因的分布特征

张昊^{1,2,3}, 王盼亮^{2,3}, 杨清香^{1,2,3*}, 俞宁⁴

(1. 河南师范大学环境学院, 新乡 453007; 2. 河南师范大学生命科学院, 新乡 453007; 3. 资源微生物与功能分子河南省高校重点实验室培育基地(河南师范大学), 新乡 453007; 4. 新乡市环境保护监测站, 新乡 453007)

摘要: 为了解畜禽粪便中多重抗生素耐药细菌及耐药基因的污染特征, 采用微生物培养的方法调查了鸡粪、猪粪中多重耐药细菌的数量, 并挑取部分菌株进行 16S rDNA 鉴定和抗生素敏感性试验; 进一步通过高通量测序技术解析多重耐药细菌的群落结构, 利用高通量定量 PCR 对粪便中 176 种耐药基因的分布情况进行研究. 结果表明, 不同鸡粪、猪粪中对四环素、环丙沙星和庆大霉素同时耐药的三重耐药细菌比例在 7.96% ~ 12.40%; 单菌株鉴定和群落结构分析均显示, 可培养的多重耐药细菌主要集中在 *Escherichia* (埃希氏杆菌属)、*Acinetobacter* (不动杆菌属) 和 *Proteus* (变形杆菌属) 中. 与未饲用抗生素的猪粪相比, 猪粪样品中耐药基因的总富集倍数达到 $1.96 \times 10^4 \sim 1.54 \times 10^5$ 倍, 各类耐药基因的富集情况为: 四环素类 > β -内酰胺类 > MLSB (大环内酯、林可酰胺和链阳性菌素 B 类) > 氨基糖苷类 > FCA (氟喹诺酮、喹诺酮、氟苯尼考、氯霉素和酰胺醇类) > 磺胺类 > 万古霉素类.

关键词: 畜禽粪便; 多重耐药细菌; 耐药基因; 高通量定量 PCR; 可移动元件

中图分类号: X172 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2018)01-0460-07 DOI: 10.13227/j.hjcx.201705169

Distribution of Multidrug-Resistant Bacteria and Antibiotic-Resistant Genes in Livestock Manures

ZHANG Hao^{1,2,3}, WANG Pan-liang^{2,3}, YANG Qing-xiang^{1,2,3*}, YU Ning⁴

(1. School of Environment, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China; 2. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China; 3. Key Laboratory for Microorganisms and Functional Molecules (Henan Normal University), University of Henan Province, Xinxiang 453007, China; 4. Environmental Monitoring Station of Xinxiang City, Xinxiang 453007, China)

Abstract: In the present study, techniques for microbial culture enumeration, 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification, high-throughput sequencing for the multidrug-resistant bacteria (MRB) communities, and high-throughput quantitative PCR detection for the prevalence and abundance of antibiotic resistance genes (ARGs) were conducted to investigate the distribution characteristics of MRB and ARGs in chicken and swine manures. The results showed that the rates of MRB that were resistant to tetracycline, ciprofloxacin, and gentamycin simultaneously were from 7.96% to 12.40% for the different manure samples. The dominant genera of cultivable MRB were *Escherichia*, *Acinetobacter*, and *Proteus*, both in the chicken and swine manures. High-throughput quantitative PCR results indicated that, compared to the antibiotic free swine manure, the total enrichment of ARGs increased by $1.96 \times 10^4 \sim 1.54 \times 10^5$ times that in the swine manure samples, with different antibiotics following the sequence of tetracyclines > β -lactams > MLSB (macrolide, lincosamide, and streptogramin B) > aminoglycosides > FCA (fluoroquinolone, quinolone, florfenicol, chloramphenicol, and amphenicol) > sulfonamides > vancomycins.

Key words: livestock manure; multidrug-resistant bacteria; antibiotic-resistant genes; high-throughput quantitative PCR; mobile genetic element

改革开放以来, 畜禽养殖业在我国得到了迅速的发展. 现如今, 中国已经成为世界上畜禽养殖规模最大的国家之一, 但随之而来是每年超过 20 亿 t 畜禽粪便的产生和排放, 且这一数字仍在逐年递增^[1,2]. 在规模化的养殖行业中, 兽药抗生素通常被用作疾病治疗剂和生长促进剂而频繁使用^[3], 由此造成了动物肠道中抗生素的残留和耐药细菌的积累, 并伴随粪便排泄排出体外^[4]. 因此, 携带抗生素、耐药细菌的畜禽粪便如果未经处理直接作为有机肥料施用于农田, 会给生态环境带来风险^[5].

众多研究证实, 畜禽粪便已经成为了自然环境中耐药细菌和耐药基因的储“库”^[6]. 例如, Yang 等^[7]在鸡粪样品中检测到包括大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)、粪产碱杆菌 (*Alcaligenes faecalis*) 和肠球菌 (*Enterococcus* spp.) 在内的多种抗生素耐

收稿日期: 2017-05-17; 修订日期: 2017-07-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(21277041, U1504219); 河南省科技攻关重点项目(142102210447)

作者简介: 张昊(1979~), 女, 博士, 副教授, 主要研究方向为环境微生物学, E-mail: kelei1564@126.com

* 通信作者, E-mail: yangqx@htu.edu.cn

药的人致病菌. Brooks 等^[8]从养猪场的储粪池中检测到高于 10^5 cfu·mL⁻¹ 的致病性沙门氏菌 (*Salmonella* spp.) 和弯曲杆菌 (*Campylobacter* spp.), 并且它们大多具有耐药性. Chee-Sanford 等^[9]在两个猪粪化粪池中均检测到 7 种四环素类抗生素的耐药基因 *tetO*、*tetQ*、*tetW*、*tetM*、*tetB* (P)、*tetS* 和 *tetT*. 其中, *tetO* 和 *tetW* 基因在牛粪、鸡粪和猪粪中均显示较高丰度^[10]. Mu 等^[11]也发现鸡粪中喹诺酮类耐药基因 *oqxB* 和磺胺类耐药基因 *sul1*、*sul2* 的丰度分别达到了 3.48×10^{10} 、 1.39×10^{10} 和 7.53×10^9 copies·g⁻¹.

耐药基因的存在是细菌表现耐药性的根本原因. 有研究表明, 耐药细菌随着畜禽粪便排出动物体外后, 其携带的耐药基因可以通过水平转移的方式, 在质粒、转座子、整合子等可移动元件的作用下传递给其它环境微生物, 从而导致耐药性的传播和扩散^[12-14]. Qu 等^[15]利用比较基因组学证实了可移动的 DNA 元件是鸡肠道微生物中主要的功能性成分. Stokes 等^[16]也发现猪源 *E. coli* 中检测到的 *int11* (I 类整合子) 携带的耐药基因岛上同时存在多种耐药基因. 而一个捕获多个基因盒的整合子, 已经被证实能够完成多个耐药基因的转移^[17]. 因此, 当这样的畜禽粪便排入自然环境后, 在高丰度的耐药基因、可移动元件及其它环境压力共存的情况下, 环境中的敏感细菌可能会因此产生甚至是多重的抗生素耐药性^[18], 而一旦人类致病菌通过这种方式获得多重耐药, 则会对人类健康造成巨大威胁.

目前, 关于畜禽粪便中耐药细菌和耐药基因的污染问题已经引起了国内外学者的广泛关注, 但是已报道的研究工作多集中于某一种或几种典型抗生素或耐药基因的污染现象, 涉及多重耐药细菌和耐药基因多样性的系统研究并不深入. 本文选择不同来源的鸡粪和猪粪为研究对象, 通过对其中可培养多重耐药菌的群落结构以及 176 种耐药基因和 2 种可移动元件的存在、富集情况进行解析, 以为畜禽粪肥的合理处置、安全利用提供参考依据.

1 材料与方法

1.1 样品采集

选择新乡市郊区饲用抗生素的 3 家养鸡场 (养殖规模 > 10 000 只) 和 3 家养猪场 (存栏量 > 300 头), 在各养殖场的储粪池中采用 5 点混合取样法^[19], 分别采集 3 份粪便样品, 各自混匀后置于冰

盒中带回实验室. 24 h 内进行细菌培养实验, 其余样品于 -20℃ 保存.

1.2 总可培养异养细菌和多重耐药细菌的培养与计数

将粪便样品制成悬液, 梯度稀释后分别涂布于灭菌的 Luria-Bertani (LB) 平板和同时含有四环素 ($16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、环丙沙星 ($4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、庆大霉素 ($16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 LB 平板上, 37℃ 培养 72 h, 计数 LB 平板上的总可培养细菌数和含抗生素平板上的多重耐药细菌数^[20], 并按照以下公式^[19]计算多重耐药细菌的比例. 含抗生素平板上抗生素浓度的设定参考 CLSI(2016) 标准^[21].

$$\text{多重耐药细菌比例} = \frac{\text{多重耐药细菌数}}{\text{总可培养异养细菌数}} \times 100\%$$

1.3 多重耐药细菌的鉴定及药敏试验

从长有多重耐药菌的平板上随机挑选单菌落, 分离纯化后分别接种到新鲜灭菌 LB 液体培养基中, 37℃、150 r·min⁻¹ 振荡培养 12 h, 采用菌液 PCR 的方法扩增细菌 16S rDNA^[22]. 引物选用 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) 和 1492R (GGTACC TTGTTACGACTT)^[23]. 25 μL 反应体系包括: 12.5 μL 2 × PCR Taq MasterMix, 0.8 μL 引物, 1 μL 菌液, 9.9 μL dd H₂O. 反应条件^[24]: 95℃ 预变性 10 min; 35 个循环包括: 94℃ 变性 30 s, 57℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 90 s; 最后 72℃ 延伸 10 min. PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测合格后送交生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行 16S rDNA 测序, 测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对, 最后利用 MEGA 6.0 软件构建多重耐药菌的系统进化树.

对已鉴定的多重耐药菌株, 使用含有四环素、环丙沙星和庆大霉素的 Kirby Bauer 药敏纸片 (Thermo Fisher Oxoid, 英国) 进行抗生素敏感性试验^[25]. 即将活化的单菌株用 0.9% 无菌生理盐水制成 0.5 麦氏标准悬液, 均匀涂布于 MHA 营养琼脂平板上, 再将药敏纸片置于其上, 37℃ 培养 18 h, 测量抑菌圈直径并判定耐药结果^[21]. 实验同时选用 *E. coli* ATCC 25922 菌株作为质控菌株.

1.4 多重耐药细菌的群落结构分析

用无菌生理盐水收集生长在含抗生素平板上的所有多重耐药菌落, 再用 Bacterial DNA 试剂盒 (Omega, 美国) 对收集到的菌液提取 DNA, 并利用超微量分光光度计 (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific) 和琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量. 合格的 DNA 样品送至 Novogene 公司 (北京) 利用 HiSeq

2500 测序平台进行 16S rDNA 高通量测序分析. PCR 引物采用 515F (GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) 和 806R (GGACTACHVGGGTWTCTAAT)^[26], 数据分析参考文献[27].

1.5 耐药基因的高通量定量分析

称取 1.0 g 粪便样品, 利用 Stool DNA 试剂盒 (Omega, 美国) 进行总 DNA 提取. 检测合格的 DNA 送至 Wcgene 公司 (上海), 利用高通量定量 PCR 检测包括磺胺类、四环素类、 β -内酰胺类、氨基糖苷类、万古霉素类、FCA (氟喹诺酮、喹诺酮、氟苯尼考、氯霉素和酰胺醇类) 和 MLSB (大环内酯、林可酰胺和链阳性菌素 B 类) 在内的七大类 176 种耐药基因、2 个可移动元件 (I 类整合子和转座子 Tn916/1545) 和 16S rDNA 的存在情况^[28,29], 每个样品 3 次重复. 进一步根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法, 以一个无抗生素饲喂的家养猪粪为对照, 选取 Ct 检测值 ≤ 30 的耐药基因, 按如下公式计算饲用抗生素的猪粪样品中各类耐药基因的平均富集倍数^[30]:

$$\begin{aligned}\Delta Ct &= Ct_{(\text{耐药基因})} - Ct_{(16S)} \\ \Delta\Delta Ct &= \Delta Ct_{(\text{样品})} - \Delta Ct_{(\text{对照})} \\ \text{富集倍数} &= 2^{-\Delta\Delta Ct}\end{aligned}$$

1.6 数据处理及分析

利用软件 Microsoft Excel 2016 进行实验数据的处理及图表制作, 采用 SPSS V22.0 软件进行 ANOVA 方差分析.

2 结果与分析

2.1 畜禽粪便中多重耐药细菌的分布

根据样品采集时的调研结果, 本研究选择当地养殖场普遍使用的四环素、环丙沙星和庆大霉素作为多重耐药细菌筛选的抗生素类型, 对不同来源的鸡粪、猪粪中总可培养异养细菌和同时对上述 3 种抗生素具有耐药性的多重耐药细菌的数量进行了统计. 结果显示, 被检测的 3 个鸡粪样品中, 总可培养细菌数量为 $6.59 \times 10^8 \sim 7.10 \times 10^9 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, 多重耐药细菌数量为 $8.17 \times 10^7 \sim 6.90 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$. 来自猪场的 3 个粪便样品中, 总菌数量和多重耐药菌数量分别为 $2.03 \times 10^9 \sim 1.37 \times 10^{10} \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $1.63 \times 10^8 \sim 1.09 \times 10^9 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, 其丰度均高于鸡粪样品. 进一步比较不同畜禽粪便中多重耐药菌占总细菌的比例, 结果显示在图 1 中.

由图 1 可知, 鸡粪中多重耐药菌比例为 9.73% ~ 12.40%, 而猪粪中该比例为 7.96% ~ 8.04%, 低于鸡粪样品. 同时单因素方差分析结果表明, 3 个

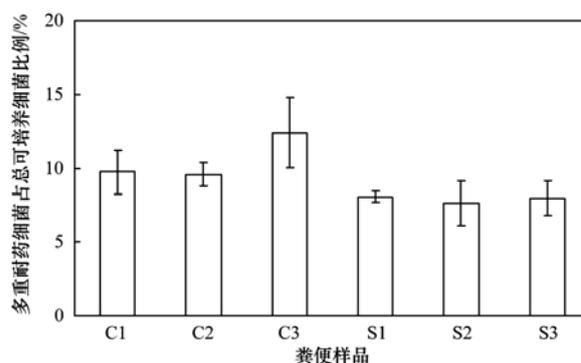


图 1 畜禽粪便中可培养多重耐药细菌占总可培养细菌的比例
Fig. 1 Rates of multidrug-resistant bacteria to total cultural heterotrophic bacteria in livestock manures

鸡粪样品中多重耐药细菌的平均比例显著高于猪粪样品 ($P < 0.05$).

2.2 多重耐药细菌的鉴定及其耐药性

随机挑取来自鸡粪和猪粪的多重耐药细菌菌落, 分离纯化后经 16S rDNA 测序和序列比对, 构建系统进化树的结果如图 2 所示. 从中可知, 有 19 株菌株测序成功, 分别属于大肠埃希氏菌 (*E. coli*)、奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*)、普通变形杆菌 (*Proteus vulgaris*)、粪产碱杆菌 (*Alcaligenes faecalis*) 和摩氏摩根菌 (*Morganella morganii*). 进一步利用药敏试验对这 19 株多重耐药菌的耐药性进行验证, 结果显示, 所有菌株对供试的四环素、环丙沙星和庆大霉素这 3 种抗生素均表现出耐药性.

2.3 畜禽粪便中多重耐药细菌的群落结构

采用高通量测序技术对畜禽粪便中所有可培养多重耐药细菌的群落组成进行了分析, 从中筛选出相对丰度 Top10 的优势属, 分属于埃希氏菌属 (*Escherichia*)、香味菌属 (*Myroides*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、变形杆菌属 (*Proteus*)、依格纳季氏菌属 (*Ignatzschinaria*)、嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter*)、普罗维登斯菌属 (*Providencia*)、肠球菌属 (*Enterococcus*)、产碱杆菌属 (*Alcaligenes*) 和费克蓝姆菌属 (*Facklamia*), 各属细菌在粪便样品中的分布情况显示于图 3. 从中可知, 鸡粪中 *Escherichia* (6.09% ~ 58.95%)、*Proteus* (3.64% ~ 19.44%)、*Ignatzschinaria* (1.36% ~ 21.24%) 和 *Acinetobacter* (3.12% ~ 4.98%) 比例较高, 猪粪中则是 *Escherichia* (3.54% ~ 18.34%)、*Acinetobacter* (7.12% ~ 51.75%)、*Facklamia* (9.94% ~ 48.72%) 和 *Proteus* (1.68% ~ 3.56%) 呈显著优势.

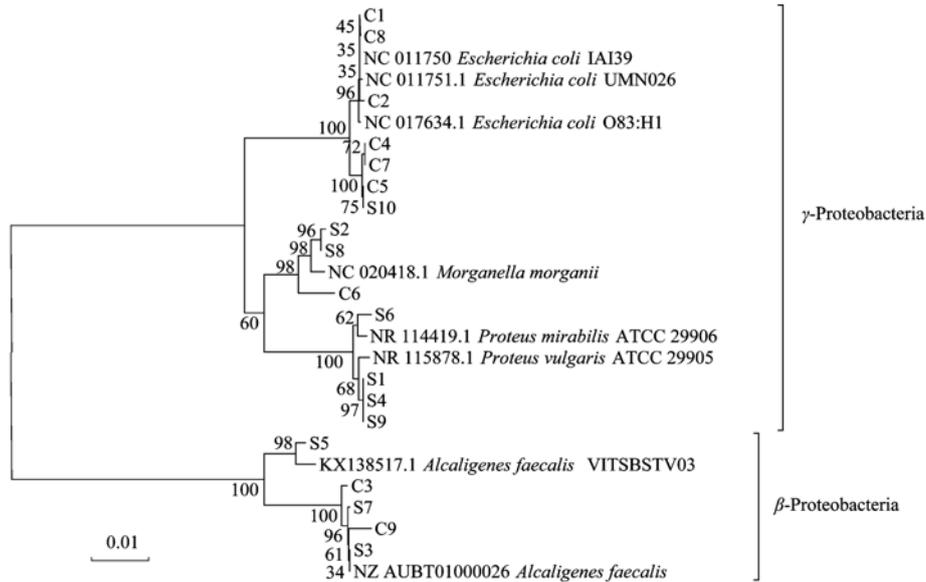


图 2 畜禽粪便中部分多重耐药细菌的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of the partial multidrug-resistant bacteria in livestock manures

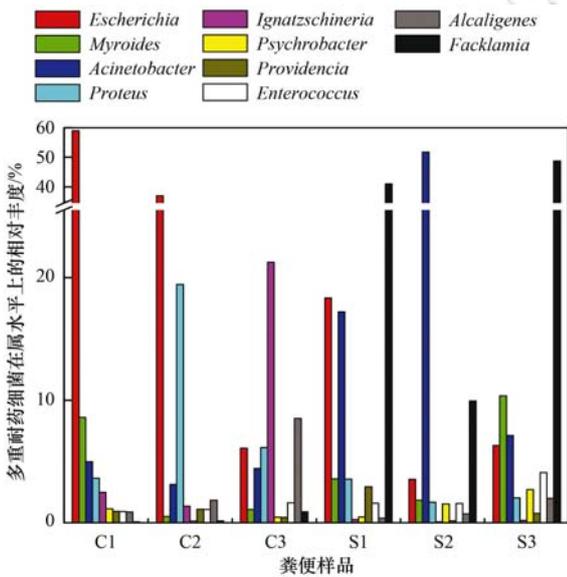


图 3 畜禽粪便中具代表性多重耐药细菌在属水平上的相对丰度

Fig. 3 Relative abundance of representative multidrug-resistant bacteria at the genus level in livestock manures

由此可见,虽然多重耐药菌在不同来源的畜禽粪便中的丰度有差异,但是 *Escherichia*、*Acinetobacter* 和 *Proteus* 细菌在所有样品中均普遍存在且保持较高丰度,该结果与 2.2 节中部分多重耐药菌的 16S rDNA 鉴定结果相符。

2.4 畜禽粪便中耐药基因的多样性

利用高通量定量 PCR 检测了畜禽粪便中 176 种耐药基因和 2 个可移动元件的存在情况,各样品的基因检出数量显示于图 4。从中可知,鸡粪中检出

耐药基因 131 ~ 147 种,猪粪中检出 136 ~ 146 种,供检测的 7 类耐药基因和 2 个可移动元件在所有粪便样品中均被 100% 检出。

进一步利用未饲用过抗生素的猪粪为对照,计算猪粪样品中耐药基因的富集情况,结果显示于表 1。从中可知,饲喂抗生素的 3 个猪粪样品中各类耐药基因的富集倍数均明显增加,总富集倍数达到 $1.96 \times 10^4 \sim 1.54 \times 10^5$ 倍。从基因类型来看,各类耐药基因的平均富集倍数依次为:四环素类 > β -内酰胺类 > MLSB > 氨基糖苷类 > FCA > 磺胺类 > 万古霉素类。

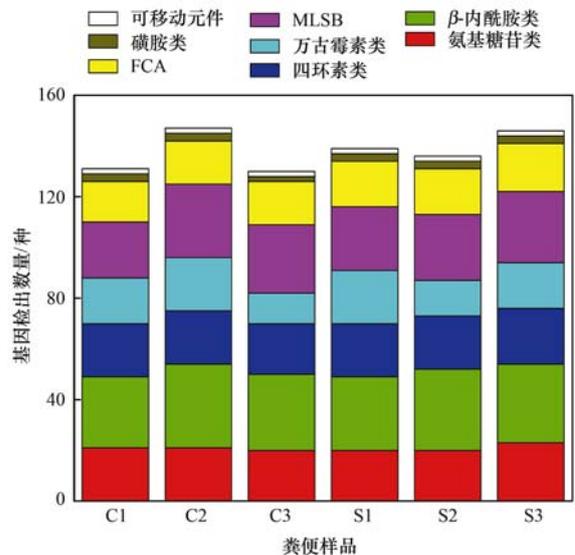


图 4 畜禽粪便中耐药基因的检出数量

Fig. 4 Number of antibiotic-resistant genes in livestock manures

表 1 猪粪样品中耐药基因的富集倍数

Table 1 Enrichment multiple of antibiotic-resistant genes in swine manure samples

耐药基因类型	S1	S2	S3	平均值
氨基糖苷类	6.59×10^2	4.74×10^2	5.94×10^2	5.75×10^2
FCA	3.36×10^2	2.45×10^2	9.11×10^2	4.97×10^2
MLSB	1.64×10^3	1.53×10^3	4.09×10^3	2.42×10^3
磺胺类	2.19×10^2	3.43×10^2	5.36×10^2	3.66×10^2
四环素类	1.35×10^4	2.63×10^4	9.23×10^4	4.40×10^4
万古霉素类	2.75×10^1	3.63×10^1	4.80×10^1	3.73×10^1
β -内酰胺类	3.19×10^3	2.17×10^4	5.56×10^4	2.68×10^4
总计	1.96×10^4	5.06×10^4	1.54×10^5	7.47×10^4

3 讨论

多项研究已证实, 畜禽粪便中普遍存在抗生素耐药细菌^[7]. 其原因一方面是因为粪便中残留的抗生素对微生物群落进行筛选, “淘汰”了一些抗生素敏感菌株; 另一方面, 动物在长期饲喂抗生素的过程中, 肠道微生物在抗生素的选择压力下通过突变产生了耐药性^[31]. 本研究中, 来自不同养殖场的鸡粪、猪粪中都存在高丰度的多重耐药细菌, 这与养殖过程中长期饲喂抗生素有关. 同时, 鸡粪中多重耐药细菌的比例显著高于猪粪样品 ($P < 0.05$), 该结果与本课题组前期报道的结果类似^[19]. 造成该现象的原因可能与动物对药物的代谢能力、抗生素饲喂剂量、饲喂方式等有关^[32]. 据调查, 养鸡业中的饲养密度、抗生素使用量、使用频次通常比生猪养殖业要大, 因而导致鸡粪中的抗生素残留水平、耐药细菌和耐药基因丰度相对较高^[33]. 另外, 与哺乳动物相比, 鸡的消化系统不够完善^[34], 造成了鸡粪中未消化营养物质的残留, 也为耐药细菌的生长和繁殖提供了良好的生存条件.

单菌株鉴定和群落结构分析的结果均表明, 畜禽粪便中检出的优势多重耐药细菌主要集中在 *Escherichia*、*Acinetobacter* 和 *Proteus* 中. 其中, 高丰度的 *Escherichia* spp. 虽然多为肠道共生菌, 但也可能成为引发尿路感染和胃肠道疾病的条件致病菌^[35]. 同时, 大量具有抗生素耐药性的 *E. coli* 在畜禽粪便中被频繁报道, 被视为普遍的粪源性耐药微生物^[7,36], 其在环境中的传播风险应当引起足够的重视. *Acinetobacter* spp. 细菌广泛分布在水体、土壤等自然环境中^[37], 其中的某些种在临床上被频繁分离. 例如典型的 *Acinetobacter baumannii* 被认为是一种医院获得性肺炎的“罪魁祸首”, 可以引起皮肤感染、心内膜炎、败血症和尿路感染等其他疾病^[38], 且往往表现出多种耐药性^[39]. 本研究中, 药敏试验

的结果进一步验证了随机挑取的多重耐药细菌, 确实表现出对四环素、环丙沙星和庆大霉素的耐药性, 并且这其中可能还包括未检测的更广泛的耐药性或其它种属的耐药菌株. 目前, 多重耐药细菌感染人类的病例数量在全球范围内日益增加, 甚至有的“超级细菌”感染已经造成了“无药可治”的局面. 据统计, 美国每年有两百万人遭受多重耐药菌的感染, 由此造成的死亡人数达23 000人; 欧洲每年也有25 000人死于多重耐药菌感染^[40,41]. 因此, 多重耐药细菌在环境中的存在和传播已经成为全球范围内的棘手问题, 通过畜禽粪便进入到自然环境的多重耐药菌, 尤其是耐药性的人类致病菌的存在应该引起足够的关注.

耐药基因的 qPCR 检测表明, 不论鸡粪还是猪粪, 氨基糖苷类、四环素类、磺胺类和 β -内酰胺类抗生素的耐药基因都在其中普遍存在, 同时它们也是在河流、湖泊、污水和农田等自然环境中检出频率较高的耐药基因类型^[42,43]. 近年来, 作为新型污染物的耐药基因在环境中的污染问题已经越来越多地引发人们的关注. 也有学者认为, 耐药基因在环境中的传播主要是由于畜禽粪肥在农业领域中的应用^[44]. 值得注意的是, 本研究检测的两种可移动元件在所有粪便样品中均被 100% 检出. 而已有研究证实, 可移动元件是造成细菌之间甚至不同种属之间基因转移的重要因素——耐药基因可以与可移动元件共存而实现自身的转移和传递, 也有证据表明携带耐药基因的可移动元件能够转移到人体共生菌和致病菌中^[45]. Zhu 等^[46] 在研究我国商业养猪场的猪粪、堆肥和施加粪肥的土壤时也发现, 耐药基因与转座子之间呈现很高的正相关性. 因此, 本研究中所有粪便样品中可移动元件的检出也提示了畜禽粪便传播耐药基因的风险. 进一步比较耐药基因的富集情况也发现, 饲喂抗生素的猪粪与未饲用抗生素的猪粪相比各类耐药基因的富集倍数明显上

升,说明了抗生素的使用对促进细菌耐药性发展的积极影响. 实际上,由于养殖过程中通常是多类型抗生素交替使用,因此造成了动物粪便中耐药基因类型的多样性,也为细菌多重耐药性的产生提供了可能. 同时,就抗生素种类而言,由于四环素类抗生素是传统养殖业中用量最大的类型^[47],因此在饲喂抗生素的猪粪中该类耐药基因的富集倍数也明显最高.

总之,畜禽粪便已经被认为是耐药细菌和耐药基因的重要富集位点,这样的粪便施用于农田,会导致耐药细菌和耐药基因在土壤中的富集,也存在耐药基因传播扩散甚至促进细菌发展多重耐药性的风险. 因此,控制畜禽粪便中耐药基因的污染,采用新型有效的处理技术消减粪肥中的抗生素耐药性势在必行.

4 结论

(1) 畜禽粪便中普遍存在同时对多种抗生素耐药的多重耐药细菌,其中包括人类致病菌.

(2) 畜禽粪便中分布有多种耐药基因,且与非抗生素饲喂的粪便相比,各类耐药基因的富集倍数明显增加.

参考文献:

- [1] 朱建春, 张增强, 樊志民, 等. 中国畜禽粪便的能源潜力与氮磷耕地负荷及总量控制[J]. 农业环境科学学报, 2014, **33**(3): 435-445.
Zhu J C, Zhang Z Q, Fan Z M, *et al.* Biogas potential, cropland load and total amount control of animal manure in China[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2014, **33**(3): 435-445.
- [2] 朱宁, 马骥. 中国畜禽粪便产生量的变动特征及未来发展展望[J]. 农业展望, 2014, **10**(1): 46-48.
Zhu N, Ma J. Changes and outlook about production amount of livestock and poultry manure in China[J]. *Agricultural Outlook*, 2014, **10**(1): 46-48.
- [3] Sun W, Qian X, Gu J, *et al.* Mechanisms and effects of arsenic acid on antibiotic resistance genes and microbial communities during pig manure digestion[J]. *Bioresource Technology*, 2017, **234**: 217-223.
- [4] Sarmah A K, Meyer M T, Boxall A B A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment [J]. *Chemosphere*, 2006, **65**(5): 725-759.
- [5] Hamscher G, Sczesny S, Höper H, *et al.* Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2002, **74**(7): 1509-1518.
- [6] 孙刚, 袁守军, 计峰, 等. 畜禽粪便中抗生素残留危害及其研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2009, **26**(3): 277-279.
Sun G, Yuan S J, Ji F, *et al.* Environmental impact of antibiotics contamination from livestock and poultry dejecta: a review of recent researches [J]. *Journal of Environment and Health*, 2009, **26**(3): 277-279.
- [7] Yang Q X, Ren S W, Niu T Q, *et al.* Distribution of antibiotic-resistant bacteria in chicken manure and manure-fertilized vegetables[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014, **21**(2): 1231-1241.
- [8] Brooks J P, Adeli A, McLaughlin M R. Microbial ecology, bacterial pathogens, and antibiotic resistant genes in swine manure wastewater as influenced by three swine management systems[J]. *Water Research*, 2014, **57**: 96-103.
- [9] Chee-Sanford J C, Aminov R I, Krapac I J, *et al.* Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67**(4): 1494-1502.
- [10] McKinney C W, Loftin K A, Meyer M T, *et al.* Tet and sul antibiotic resistance genes in livestock lagoons of various operation type, configuration, and antibiotic occurrence [J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, **44**(16): 6102-6109.
- [11] Mu Q H, Li J, Sun Y X, *et al.* Occurrence of sulfonamide-, tetracycline-, plasmid-mediated quinolone- and macrolide-resistance genes in livestock feedlots in northern China [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, **22**(9): 6932-6940.
- [12] 杨凤霞, 毛大庆, 罗义, 等. 环境中抗生素抗性基因的水平传播扩散[J]. 应用生态学报, 2013, **24**(10): 2993-3002.
Yang F X, Mao D Q, Luo Y, *et al.* Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the environment [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, **24**(10): 2993-3002.
- [13] Blair J M A, Webber M A, Baylay A J, *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, **13**(1): 42-51.
- [14] Yang Q X, Zhang H, Guo Y H, *et al.* Influence of chicken manure fertilization on antibiotic-resistant bacteria in soil and the endophytic bacteria of pakchoi [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2016, **13**(7): 662.
- [15] Qu A N, Brule J M, Wilson M K, *et al.* Comparative metagenomics reveals host specific metavirulomes and horizontal gene transfer elements in the chicken cecum microbiome [J]. *PLoS One*, 2008, **3**(8): e2945.
- [16] Stokes H W, Gillings M R. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2011, **35**(5): 790-819.
- [17] Hall R M, Collis C M. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination [J]. *Molecular Microbiology*, 1995, **15**(4): 593-600.
- [18] Willetts N, Wilkins B. Processing of plasmid DNA during bacterial conjugation [J]. *Microbiological Reviews*, 1984, **48**(1): 24-41.
- [19] 祁诗月, 任四伟, 李雪玲, 等. 禽畜养殖粪便中多重抗生素抗性细菌研究[J]. 生态学报, 2013, **33**(13): 3970-3977.
Qi S Y, Ren S W, Li X L, *et al.* Multidrug-resistant bacteria in livestock feces [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, **33**(13): 3970-3977.

- [20] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995. 179-184.
- [21] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-sixth edition, M100S [S]. Wayne, PA: CLSI, 2016.
- [22] 唐晔盛, 李英, 朱静洁, 等. 菌落 PCR 在大规模基因组测序中的应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, **29**(2): 316-318.
Tang Y S, Li Y, Zhu J J, *et al.* Colony PCR apply to the rice genome sequencing [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2002, **29**(2): 316-318.
- [23] Patel J B. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory[J]. Molecular Diagnosis, 2001, **6**(4): 313-321.
- [24] Kim H C, Kim Y T, Kim H, *et al.* Development of broad-range and specific 16S rRNA PCR for use in routine diagnostic clinical microbiology[J]. Journal of Life Science, 2014, **24**(4): 361-369.
- [25] Bauer A W, Kirby W M M, Sherris J C, *et al.* Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method[J]. American Journal of Clinical Pathology, 1966, **45**(4): 493-496.
- [26] Caporaso J G, Lauber C L, Walters W A, *et al.* Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, **108** Suppl 1: 4516-4522.
- [27] 温崇庆, 何瑶瑶, 薛明, 等. 高通量测序分析 DNA 提取引起的对虾肠道菌群结构偏差[J]. 微生物学报, 2016, **56**(1): 130-142.
Wen C Q, He Y Y, Xue M, *et al.* Biases on community structure during DNA extraction of shrimp intestinal microbiota revealed by high-throughput sequencing[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, **56**(1): 130-142.
- [28] Goldstein C, Lee M D, Sanchez S, *et al.* Incidence of Class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, **45**(3): 723-726.
- [29] Liu M M, Ding R, Zhang Y, *et al.* Abundance and distribution of Macrolide-Lincosamide-Streptogramin resistance genes in an anaerobic-aerobic system treating spiramycin production wastewater[J]. Water Research, 2014, **63**: 33-41.
- [30] 黄福义, 李虎, 韦蓓, 等. 长期施用猪粪水稻土抗生素抗性基因污染研究[J]. 环境科学, 2014, **35**(10): 3869-3873.
Huang F Y, Li H, Wei B, *et al.* Long-term manure application induced shift of diversity and abundance of antibiotic resistance genes in paddy soil[J]. Environmental Science, 2014, **35**(10): 3869-3873.
- [31] Heuer H, Schmitt H, Smalla K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields [J]. Current Opinion in Microbiology, 2011, **14**(3): 236-243.
- [32] Zhao L, Dong Y H, Wang H. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China[J]. Science of the Total Environment, 2010, **408**(5): 1069-1075.
- [33] Van Houweling C D, Gainer J H. Public health concerns relative to the use of subtherapeutic levels of antibiotics in animal feeds [J]. Journal of Animal Science, 1978, **46**(5): 1413-1424.
- [34] Lanyasunya T P, Rong W H, Abdulrazak S A, *et al.* Factors limiting use of poultry manure as protein supplement for dairy cattle on smallholder farms in Kenya[J]. International Journal of Poultry Science, 2006, **5**(1): 75-80.
- [35] Ronald A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens[J]. Disease-a-Moutu, 2003, **49**(2): 71-82.
- [36] Jiang H X, Lü D H, Chen Z L, *et al.* High prevalence and widespread distribution of multi-resistant *Escherichia coli* isolates in pigs and poultry in China[J]. The Veterinary Journal, 2011, **187**(1): 99-103.
- [37] Doughari H J, Ndakidemi P A, Human I S, *et al.* The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview[J]. Microbes and Environments, 2011, **26**(2): 101-112.
- [38] Dent L L, Marshall D R, Pratap S, *et al.* Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: a descriptive study in a city hospital [J]. BMC Infectious Diseases, 2010, **10**: 196.
- [39] Fournier P E, Richet H, Weinstein R A. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities [J]. Clinical Infectious Diseases, 2006, **42**(5): 692-699.
- [40] Hampton T. Report reveals scope of US antibiotic resistance threat[J]. JAMA, 2013, **310**(16): 1661-1663.
- [41] Laxminarayan R, Duse A, Watal C, *et al.* Antibiotic resistance—the need for global solutions [J]. The Lancet Infectious Diseases, 2013, **13**(12): 1057-1098.
- [42] Lu Z H, Na G S, Gao H, *et al.* Fate of sulfonamide resistance genes in estuary environment and effect of anthropogenic activities [J]. Science of the Total Environment, 2015, **527-528**: 429-438.
- [43] Wang F H, Qiao M, Lv Z E, *et al.* Impact of reclaimed water irrigation on antibiotic resistance in public parks, Beijing, China [J]. Environmental Pollution, 2014, **184**: 247-253.
- [44] Byrnebailey K G, Gaze W H, Kay P, *et al.* Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2009, **53**(2): 696-702.
- [45] Allen H K, Donato J, Wang H H, *et al.* Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments [J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, **8**(4): 251-259.
- [46] 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.
- [47] Li Y W, Wu X L, Mo C H, *et al.* Investigation of sulfonamide, tetracycline, and quinolone antibiotics in vegetable farmland soil in the Pearl River Delta area, southern China [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, **59**(13): 7268-7276.

CONTENTS

Variation of O ₃ Concentration in Different Regions of Beijing from 2006-2015	WANG Zhan-shan, LI Yun-ting, AN Xin-xin, <i>et al.</i>	(1)
Source Apportionment of Black Carbon Aerosol in the North Suburb of Nanjing	XIAO Si-han, YU Xing-na, ZHU Bin, <i>et al.</i>	(9)
Seasonal Characteristics and Ecological Risk Assessment of Heavy Metals in PM ₁₀ Around Electroplating Plants	ZHAO Zhen-li, ZHAO Wei-tuo, HUANG Ting, <i>et al.</i>	(18)
Characteristics of Organic and Elemental Carbon in PM ₁₀ and PM _{2.5} in Yulin City, Guangxi	HUANG Jiong-li, CHEN Zhi-ming, MO Zhao-yu, <i>et al.</i>	(27)
Concentrations and Compositions of Different Forms of Nitrogen and Phosphorus in Atmospheric Aerosols in the Qingdao Coastal Region and over the Yellow and Bohai Sea	ZHANG Rui-feng, QI Jian-hua, DING Xue, <i>et al.</i>	(38)
Air Quality Subarea Management: A case study of Guangdong Province	YANG Liu-lin, LI Min-hui, LIAO Cheng-hao, <i>et al.</i>	(49)
Remote Sensing Identification of Urban Black-Odor Water Bodies Based on High-Resolution Images; A Case Study in Nanjing	WEN Shuang, WANG Qiao, LI Yun-mei, <i>et al.</i>	(57)
Simulation of Nitrate Isotopic ($\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{18}\text{O}$) by Coupling the Hydrology and Transport Processes Described by the SWAT Model	WANG Kang, RAN Ning, LIN Zhong-bing, <i>et al.</i>	(68)
Estimation of and Control Strategies for Pollution Loads from Non-point Sources in the Chenghai Watershed	CHEN Xue-kai, LIU Xiao-bo, PENG Wen-qi, <i>et al.</i>	(77)
Distribution Characteristics and Health Risk Assessment of Metals in Drinking Water Sources from the Luhun Reservoir	YU Cong-cong, ZHAO Wei-tuo, GAO Xiao-feng, <i>et al.</i>	(89)
Distribution Characteristics and Health Risk Assessment of Antibiotics in the Water Supply System in Tianjin	ZHANG Xin-bo, SONG Zi, ZHANG Dan, <i>et al.</i>	(99)
Organic Distribution Characteristics and Influence on Drinking Water Quality in the Typical Water Sources for Towns in the Southwest Hilly Area of China	WANG Qiong, LI Nai-wen, LI Lei, <i>et al.</i>	(109)
Health Risk Evaluation of Organochlorine and Organophosphorus Pesticides in Groundwater in Beijing	CHEN Wei-ping, PENG Cheng-wei, YANG Yang, <i>et al.</i>	(117)
Pollution Status and Risks of Dioxin-like Polychlorinated Biphenyls in the Soil of the Yellow River	YAO Hong, LU Shuang, ZHANG Xu, <i>et al.</i>	(123)
Effects of Flooding and Drying on the Transformation of Soil Inorganic Phosphorus in the Water-Level-Fluctuating Zone of the Three Gorges Reservoir, China	ZHOU Jian, LI Chun-hui, ZHANG Zhi-yong, <i>et al.</i>	(130)
Effect of Phosphate on the Ammonium Removal Performance of Iron-Manganese Co-oxide Film in Surface Water Treatment	ZHUO Rui-shuang, HUANG Ting-lin, ZHANG Rui-feng, <i>et al.</i>	(137)
Enhanced Photoelectrocatalytic Oxidation of Cu(CN) ₃ ²⁻ and Synchronous Cathodic Deposition of Cu by Peroxydisulfate	DANG Cong-zhe, LI Yi-bing, WANG Yan-bin, <i>et al.</i>	(145)
Using HKUST-1 as a Template for Copper Oxides Preparation to Activate Peroxymonosulfate for RhB Degradation	PU Jia-yi, WAN Jin-quan, WANG Yan, <i>et al.</i>	(152)
Evaluation of Performance of an Aminated Rosin-based Resin for Adsorption of Norfloxacin from Aqueous Solutions	MA Ya-hong, HUANG Wan-ting, DIAO Kai-sheng, <i>et al.</i>	(161)
Arsenic(V) Removal by Granular Adsorbents Made from Backwashing Residuals from Biofilters for Iron and Manganese Removal	ZENG Hui-ping, LÜ Sai-sai, YANG Hang, <i>et al.</i>	(170)
Arsenic Adsorption and Its Species on Ferrihydrite and Ferrihydrite Colloid	MA Yu-ling, MA Jie, CHEN Ya-li, <i>et al.</i>	(179)
Comparison of Amphoteric-Cationic and Amphoteric-Anionic Modified Magnetic Bentonites: Characterization and Sorption Capacity of Phenol	REN Shuang, MENG Zhao-fu, WANG Teng, <i>et al.</i>	(187)
Pollution Characteristics of Parabens in Typical Sewage Wastewater	ZHAO Xue, ZHANG Zi-feng, ZHU Fu-jie, <i>et al.</i>	(195)
Influence of Hydraulic Retention Time on the Treatment of Polluted River Water by an Activated Carbon Rotating Biological Contactor	XU Wen-jia, CHENG Xiao-ying, <i>et al.</i>	(202)
Removal and Influence of Ciprofloxacin in a Membrane Bioreactor	DAI Qi, LIU Rui, SHU Xiao-ming, <i>et al.</i>	(212)
Operation of the AAO Process Under Low Dissolved Oxygen Conditions and Its Simulation	CAO Te-te, WANG Lin, LI Yong-mei, <i>et al.</i>	(219)
Inhibitory Effects of Phosphate and Recovery on a Nitrification System	GU Cheng-wei, CHEN Fang-min, LI Xiang, <i>et al.</i>	(227)
Effect of Carbon Source on Lab-scale SAD Process in a Wastewater Treatment Plant	LI Dong, ZHAO Shi-xun, WANG Jun-an, <i>et al.</i>	(232)
Effect of Volume Loading Rate (VLR) on Denitrifying Phosphorus Removal by the ABR-MBR Process	LÜ Liang, YOU Wen, WEI Jia-min, <i>et al.</i>	(239)
Combined Process of DNBf-O ₃ -GAC for Nitrogen and Phosphorus and Metabolite Advanced Removal	ZHONG Li-yan, HAO Rui-xia, WANG Wei-dong, <i>et al.</i>	(247)
Influence of Operating Modes for the Alternating Anoxic/Oxic Process on Biological Nitrogen Removal and Extracellular Polymeric Substances of Activated Sludge	SUN Hong-wei, CHEN Cui-zhong, WU Chang-feng, <i>et al.</i>	(256)
Effects of Nanoscale Zero-valent Iron (nZVI) on Denitrifying Performance of an Upflow Granular Sludge Bed Reactor	ZHOU Feng, WANG Fan-fan, QIAN Fei-yue, <i>et al.</i>	(263)
Influence on Desulfurization Efficiency and Interactions of Fe/S and pH During H ₂ S in situ Depression of High Solid Anaerobic Digestion	HAN Yun, CAO Yu-qin, ZHUO Yang, <i>et al.</i>	(269)
Analysis of Storage Sludge Composition Characteristics and Evolutionary Regularity in the Hunhe River Basin	LIU Tian-tian, CUI Chong-wei, HE Jun-guo, <i>et al.</i>	(276)
Enhancement of Anaerobic Methane Production by Removal of Organic-bonding Metals from Sewage Sludge	LU Yi-qing, XU Ying, DONG Bin, <i>et al.</i>	(284)
Comparison of Different Leaching Methods for Heavy Metals in Sludge Fly Ash and Comprehensive Toxicity Evaluation	WANG Feng, LI Run-dong, LI Yan-long, <i>et al.</i>	(292)
Diurnal Variations of CH ₄ and N ₂ O Fluxes from the Drained Aquaculture Pond in the Minjiang River Estuary During Early Winter	YANG Ping, TAN Li-shan, HUANG Jia-fang, <i>et al.</i>	(300)
Effects of Three Soil Amendments on Greenhouse Gas Emissions From Corn Fields in the Hetao Irrigation District	WU Yan, HONG Mei, LIN Li-long, <i>et al.</i>	(310)
Effect of Organic Manure Substitution of Synthetic Nitrogen on Crop Yield and N ₂ O Emission in the Winter Wheat-Summer Maize Rotation System	HOU Miao-miao, LÜ Feng-lian, ZHANG Hong-tao, <i>et al.</i>	(321)
Dynamics of Rice Photosynthesized Carbon Input and Its Response to Nitrogen Fertilization at the Jointing Stage: ¹³ C-CO ₂ Pulse-labeling	CHEN Shan, ZHU Zhen-ke, YUAN Hong-zhao, <i>et al.</i>	(331)
Profile Distribution of Soil Organic and Inorganic Carbon Under Different Land Use Types in the Loess Plateau of Northern Shaanxi	LAN Zhi-long, ZHAO Ying, ZHANG Jian-guo, <i>et al.</i>	(339)
Effect of Biochar on Ammonia Volatilization from Soils of Different Surface Conditions	ZOU Juan, HU Xue-yu, ZHANG Yang-yang, <i>et al.</i>	(348)
Effects of Straw and Biochar Return in Soil on Soil Aggregate and Carbon Sequestration	XU Guo-xin, WANG Zi-fang, GAO Ming, <i>et al.</i>	(355)
Assessment of the Availability of Soil Copper and Related Influencing Factors at a County Scale	LI Jin-fen, QU Ming-kai, LIU Gang, <i>et al.</i>	(363)
Application of the LUR Model in the Prediction of Spatial Distributions of Soil Heavy Metals	ZENG Jing-jing, SHEN Chun-zhu, ZHOU Sheng-lu, <i>et al.</i>	(371)
Pollution Characteristics and Source Apportionment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils of Shenyang North New Area	LI Jia-kang, SONG Xue-ying, WEI Jian-bing, <i>et al.</i>	(379)
Passivation of Simulated Pb- and Cd-Contaminated Soil by Applying Combined Treatment of Phosphate, Humic Acid, and Fly Ash	ZHAO Qing-yuan, LI Xiao-ming, YANG Qi, <i>et al.</i>	(389)
Distribution and Accumulation of Cadmium in Paddy Soil and Rice Affected by Pollutant Sources Control and Improvement Measures	FENG Wen-li, GUO Zhao-hui, SHI Lei, <i>et al.</i>	(399)
Differences in Cd Accumulation in Typical Soils Under the Double Rice System	LI Xin-yang, LONG Jian, WANG Shu-bing, <i>et al.</i>	(406)
Distribution Characteristics of Mercury in Reed Leaves from the Jiapigou Gold Mine in the Songhua River Upstream	ZHANG Man-yin, LI Meng-jie, CUI Li-juan, <i>et al.</i>	(415)
Effect of Nitrate Amendment on Soil Denitrification Activity and Anthracene Anaerobic Degradation	DAI Jun-shuai, ZUO Xiao-hu, WANG Ming-xia, <i>et al.</i>	(422)
Effects of Long-term Fertilization Regimes on Microbial Biomass, Community Structure and Activity in a Paddy Soil	WANG Wei-hua, LIU Yi, TANG Hai-ming, <i>et al.</i>	(430)
Analysis of Sulfate-Reducing and Sulfur-Oxidizing Prokaryote Community Structures in Marine Sediments with Different Sequencing Technologies	ZHANG Yu, MI Tie-zhu, ZHEN Yu, <i>et al.</i>	(438)
Seasonal and Spatial Variations of Microcystins and Their Relationships with Physicochemical and Biological Factors in Poyang Lake	YUAN Li-juan, LIAO Qie-gen, ZHANG Li, <i>et al.</i>	(450)
Distribution of Multidrug-Resistant Bacteria and Antibiotic-Resistant Genes in Livestock Manures	ZHANG Hao, WANG Pan-liang, YANG Qing-xiang, <i>et al.</i>	(460)
Influence of Air Pollution Control (APC) Systems and Furnace Type on the Characteristics of APC Residues from Municipal Solid Waste Incinerators	ZHANG Hua, YU Si-yuan, SHAO Li-ming, <i>et al.</i>	(467)