Eco-Environmental Knowledge Web

环境科学

ENVIRONMENTAL SCIENCE

ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV
HUANJING KEXUE

■ 主办 中国科学院生态环境研究中心
■ 出版 科学出版社

2020
Vol.41 No.6
第41卷 第6期

环境科学
(HUANJING KEXUE)
ENVIRONMENTAL SCIENCE
第41卷 第6期
2020年6月15日

目 次

基于SPAMS的天津市夏季环境受体中颗粒物的混合状态及来源 …… 林秋菊, 徐娇, 李梅, 王玮, 史国良, 冯银厂 (2505)
南京北郊降水无机离子和有机酸的化学特征及来源分析 …… 杨笑影, 曹芳, 林煜棋, 章炎麟 (2519)
西安市 $PM_{2.5}$ 中水溶性离子的季节变化特征 …… 黄含含, 王羽琴, 李升苹, 陈庆彩 (2528)
新疆石化工业区颗粒物含水量和酸度对二次无机组分形成的影响 …… 刘会斌, 迪丽努尔·塔力甫, 王新明, 张潇潇, 王威, 阿布力克木·阿不力孜, 买里克扎提·买合木提, 刘伟 (2536)
长春秋季生物质燃烧对 $PM_{2.5}$ 中 WSOC 吸光性的影响 …… 孟德友, 曹芳, 翟晓瑶, 张世春, 章炎麟 (2547)
2019年5月上海复合污染过程中挥发性有机物的污染特征及来源 …… 王倩 (2555)
南京工业区秋季大气挥发性有机物污染特征及来源解析 …… 曹梦瑶, 林煜棋, 章炎麟 (2565)
郑州市春季大气污染过程 VOCs 特征、臭氧生成潜势及源解析 …… 任义君, 马双良, 王思维, 于世杰, 李一丹, 张瑞芹, 尹沙沙 (2577)
上甸子区域背景站 VOCs 污染特征及其对臭氧生成贡献 …… 韩婷婷, 李颖若, 邱雨露, 何迪, 王垚, 马志强 (2586)
北京市餐饮业大气污染物排放特征 …… 孙成一, 白画画, 陈雪, 翟翼飞, 高启天, 何万清, 聂磊, 石爱军, 李国傲 (2596)
北京市农业机械排放因子与排放清单 …… 王凯, 樊守彬, 亓浩雲 (2602)
北京市土壤风蚀扬尘排放因子本地化 …… 李贝贝, 黄玉虎, 毕晓辉, 刘李阳, 秦建平 (2609)
基于 MODIS_C061 的长三角地区 AOD 与 Angström 指数时空变化分析 …… 张颖蕾, 崔希民 (2617)
环渤海地区 2,4,4′-三氯联苯的多介质归趋模拟 …… 张毅, 马艳飞, 宋帅, 吕永龙, 张盛, 吴强 (2625)
岗南水库沉积物间隙水有色溶解有机物的时空分布特征及差异分析 …… 周石磊, 孙悦, 苑世超, 彭瑞哲, 刘世崇, 岳哲丞, 张航, 王周强, 李再兴, 罗晓 (2635)
"河-湖"沉积物重金属环境特征及来源解析 …… 李悦昭, 陈海洋, 孙文超 (2646)
伊通河(城区段)沉积物重金属形态分布特征及风险评价 …… 姜时欣, 翟付杰, 张超, 王蒙蒙, 单保庆 (2653)
典型岩溶地下河流域水体中硝酸盐源解析 …… 赵然, 韩志伟, 申春华, 张水, 涂汉, 郭永丽 (2664)
沉积物参与下氮磷脉冲式输入对太湖水体营养盐浓度和藻类生长的影响 …… 陈洁, 许海, 詹旭, 许笛, 朱广伟, 朱梦圆, 季鹏飞, 康丽娟 (2671)
丰水期东洞庭湖超微型浮游藻类时空分布特征及其影响因子 …… 李胜男, 陈豪宇, 彭华, 李尝君, 朱坚, 简燕, 纪雄辉 (2679)
胶网藻对水体中恩诺沙星的毒性响应及去除作用 …… 王振方, 韩子玉, 王梦雪, 马逸驰, 王婷, 王丽卿, 张玮 (2688)
不同光照和磷水平下两种沉水植物磷富集和钙磷含量的比较 …… 桑雨璇, 杨珈乐, 熊怡, 尹文博, 汪华, 王和云 (2698)
过氧化钙复合片剂对水体修复和底泥磷控制的作用 …… 张帅, 李大鹏, 丁玉琴, 徐楚天, 许鑫澎, 孙培荣, 赵哲豪, 黄勇 (2706)
基于区域 DNDC 的稻田轮作氮素空间分异与驱动分析:以晋江流域为例 …… 王亚楠, 税伟, 祁新华, 范水生 (2714)
不同铁锰浓度的低温铁锰氨地下水净化中氨氮去除途径 …… 张杰, 梅宁, 刘孟浩, 叶雪松, 李冬 (2727)
高晶度 Mn-Fe LDH 催化剂活化过一硫酸盐降解偶氮染料 RBK5 …… 李立, 吴丽颖, 董正玉, 王霁, 张倩, 洪俊明 (2736)
Fe-cyclam/H_2O_2 体系催化降解罗丹明 B 机制 …… 余雨清, 陈翔宇, 蔡权华, 黄歆珏, 陈曼 (2746)
微生物光电化学池去除硝酸盐氮:以 PANI/TiO_2-NTs 为光阳极 …… 卢忆, 周海珊, 彭瑞建, 叶杰旭, 陈建孟, 宋爽, 张士汉 (2754)
缺氧 MBR-MMR 处理海水养殖废水性能及膜污染特性 …… 陈凡雨, 徐仲, 尤宏, 柳锋, 李之鹏, 陈其伟, 韩红卫 (2762)
HRT 对改良式 A^2/O-BAF 反硝化除磷脱氮的影响 …… 赵凯亮, 刘安迪, 南彦斌, 梁利民, 王云霞, 陈永志 (2771)
重金属Ni(Ⅱ)对厌氧氨氧化脱氮性能的影响及其动力学特征变化 …… 孙琪, 赵白航, 范飒, 周邦磊, 李玉琪 (2779)
异养硝化-好氧反硝化混合菌对尿素的去除及重金属和盐度的影响 …… 王萌萌, 曹刚, 张迪, 冯乃宪, 潘涌璋 (2787)
火山岩填料曝气生物滤池的 SNAD 工艺启动特性及功能菌丰度演替 …… 薛嘉俊, 张绍青, 张立秋, 李淑更, 姚海楠, 耿忠轩, 李鸿, 刘晓玲 (2796)
游离羟胺对两种典型亚硝态氮氧化菌活性的影响 …… 沈琛, 张树军, 彭永臻 (2805)
死菌 DNA 对厌氧消化污泥中抗生素抗性基因及微生物群落分析的干扰 …… 苏宇傲, 刘宏波, 毛秋燕, 张慧旻, 张衍, 刘和 (2812)
中国农田土壤重金属空间分布特征及污染评价 …… 陈文轩, 李茜, 王珍, 孙兆军 (2822)
土壤环境质量预警体系构建与应用 …… 李笑诺, 丁寿康, 陈卫平, 王夏晖, 吕斯丹, 刘睿 (2834)
不同母质发育土壤团聚体分布对外源输入秸秆的响应及其与有机碳矿化的关系 …… 毛霞丽, 邱志腾, 张爽, 沈倩, 章明奎 (2842)
长期施肥稻田土壤胞外酶活性对底物可利用性的响应特征 …… 宁玉菲, 魏亮, 魏晓梦, 祝贞科, 袁红朝, 葛体达, 吴金水 (2852)
生物质炭对磷镉富集土壤中两种元素生物有效性及作物镉积累的影响 …… 黄洋, 郭晓, 胡学玉 (2861)
基于田块尺度的农田土壤和小麦籽粒镉砷铅污染特征及健康风险评价 …… 肖冰, 薛培英, 韦亮, 刘成程, 高培培, 樊利敏, 杜佳燕, 刘文菊 (2869)
重构土壤垂直剖面重金属 Cd 赋存形态及影响因素 …… 胡青青, 沈强, 陈飞, 尹炳, 邹宏光, 庄红娟, 张世文 (2878)
新乡市镉污染土壤细菌群落组成及其对镉固定效果 …… 陈兆进, 李英军, 邵洋, 林立安, 徐鸽, 陈彦, 田伟, 姚伦广, 韩辉 (2889)
三峡消落带适生植物根系活动调控土壤养分与细菌群落多样性特征 …… 李丽娟, 李昌晓, 陈春桦, 杨治华, 陈雪梅 (2898)
滇池水中细菌和古菌氮代谢功能基因的空间分布 …… 张宇, 左剑恶, 王丝可, Alisa Salimova, 李爱军, 李玲玲 (2908)
模拟升温对冰川前缘地微生物种群的影响 …… 王愉琬, 马安周, 种国双, 谢飞, 周汉昌, 刘国华, 庄国强 (2918)
水肥气耦合对温室番茄地土壤 N_2O 排放及番茄产量的影响 …… 商子惠, 蔡焕杰, 陈慧, 孙亚楠, 李亮, 朱艳, 王晓云 (2924)
矸石山及其周边村庄土壤浸出液对大麦的毒性作用 …… 尚誉, 杨丰隆, 宁夏, 董轶茹, 桑楠 (2936)
海南省昌化江河口海域生物体中多环芳烃污染特征、来源解析及健康风险评价 …… 汪慧娟, 旷泽行, 周贤, 覃晓青, 黄洪辉 (2942)
春季北京市河流大型底栖动物群落结构特征及影响因子分析 …… 贺玉晓, 李珂, 任玉芬, 王思琪, 方文颖 (2951)
热解温度和时间对香蒲生物炭性质的影响及生态风险评估 …… 蔡朝卉, 楚沉静, 郑浩, 罗先香, 李锋民 (2963)
长江经济带交通碳排放测度及其效率格局(1985~2016年) …… 蒋自然, 金环环, 王成金, 叶士琳, 黄艳豪 (2972)
《环境科学》征订启事(2595) 《环境科学》征稿简则(2687) 信息(2697, 2713, 2811)

Eco-Environmental Knowledge Web

环 境 科 学
Environmental Science

第41卷第6期 2020年6月
Vol.41, No.6 Jun., 2020

死菌 DNA 对厌氧消化污泥中抗生素抗性基因及微生物群落分析的干扰

苏宇傲[1], 刘宏波[1,2,3], 毛秋燕[1], 张慧旻[1], 张衍[1,2,3*], 刘和[1,2,3]

(1. 江南大学环境与土木工程学院, 无锡 214122; 2. 江苏省厌氧生物技术重点实验室, 无锡 214122; 3. 江苏省水处理技术与材料协同创新中心, 苏州 215011)

摘要: 为评估死菌 DNA 对厌氧消化污泥抗生素抗性基因(ARGs)和微生物群落分析的潜在干扰,本研究对 3 种不同类型厌氧消化污泥进行叠氮溴化丙锭(PMA)处理,比较在 PMA 屏蔽死菌 DNA PCR 扩增情况下污泥 ARGs 和微生物群落分析结果与未经 PMA 处理情况下的差异. 结果表明,经 PMA 处理后,剩余污泥自厌氧消化样品和高含固厌氧消化污泥样品中的 ARGs 丰度分别下降了 41%~86% 和 74%~98%;污泥水解液厌氧消化 15 d 后的污泥样品中 ARGs 下降幅度相对较小,但降幅最高也达到 34%. PMA 处理对 3 个来源不同的厌氧消化污泥微生物群落组成分析结果呈现不同程度的影响,对高含固厌氧消化污泥的微生物群落结构分析影响最为显著. 在经 PMA 处理与未经 PMA 处理两种情况下,厌氧消化污泥 ARGs 与微生物群落组成相关性分析的结果也截然不同. 研究证明了死菌 DNA 对厌氧消化污泥 ARGs 和微生物群落分析的潜在干扰,采用 PMA 预处理能够更准确地反映厌氧消化污泥中的微生物群落及菌体携带 ARGs 的特征.

关键词:叠氮溴化丙锭(PMA); 厌氧消化污泥; 抗生素抗性基因(ARGs); 微生物群落; 相关性分析

中图分类号: X172; X705 **文献标识码**: A **文章编号**: 0250-3301(2020)06-2812-10 **DOI**: 10.13227/j.hjkx.201911092

Interference of Dead Cell DNA on the Analysis of Antibiotic Resistance Genes and Microbial Community in Anaerobic Digestion Sludge

SU Yu-ao[1], LIU Hong-bo[1,2,3], MAO Qiu-yan[1], ZHANG Hui-min[1], ZHANG Yan[1,2,3*], LIU He[1,2,3]

(1. School of Environment and Civil Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Anaerobic Biotechnology, Wuxi 214122, China; 3. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Water Treatment Technology and Material, Suzhou 215011, China)

Abstract: To investigate the potential interference of dead bacteria DNA on the analysis of antibiotic resistance genes (ARGs) and microbial communities in anaerobic digestion sludge, three different types of anaerobic digestion sludge were treated with propidium monoazide (PMA) in this study, and the results of subsequent ARGs and microbial community analysis with the interference of dead cell DNA blocked by PMA was compared to that without PMA treatment. It was found that after PMA treatment, the absolute abundance of the ARGs in the anaerobic digestion sludge from self-anaerobic digestion system of excess sludge and from high solid sludge anaerobic digestion system decreased by 41%-86%, and 74%-98%, respectively. ARGs abundance in the sludge from the anaerobic digestion system with sludge hydrolyzate as a substrate and anaerobic granular sludge as inoculum after 15 days of digestion considerably decreased with PMA treatment. However, its ARGs abundance still declined by up to 34%. PMA treatment influenced the analysis of microbial community of the three types of anaerobic digestion sludge to different degrees, in which the influence was the highest on the community structure analysis of the sludge from high solid anaerobic digestion system. The results of the correlation analysis between the ARGs abundance and the microbial community composition were completely different in the case with PMA treatment and without PMA treatment. This study proved the potential interference of dead cell DNA on the analysis of ARGs and microbial community in anaerobic digestion sludge. PMA pretreatment could achieve a more accurate analysis of the microbial community and ARGs characteristics in anaerobic digestion sludge.

Key words: propidium monoazide (PMA); anaerobic digestion sludge; antibiotic resistance genes (ARGs); microbial community; correlation analysis

环境中抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)快速发展,抗生素耐药性问题日趋严重. 污水处理厂是 ARGs 重要的"汇"与"源"[1]:一方面,它汇集了污水中大量的 ARGs;另一方面,一旦其对污水中 ARGs 去除效率不足,其排水将是受纳环境 ARGs 的重要来源. 此外,污水生化处理将大量 ARGs 汇集到剩余污泥,使其 ARGs 丰度(以干污泥计)高达 10^9 copies·g^{-1}[2],加强剩余污泥处理处置过程中 ARGs 的控制至关重要.

污泥厌氧消化具有污泥无害化、减量化和资源化的作用,是国际上广泛应用的一项污泥处理技术[3]. 研究表明厌氧消化能一定程度上削减污泥中

收稿日期: 2019-11-14; **修订日期**: 2020-01-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(51708253, 51938001);江南大学自主科研计划青年基金项目(JUSRP11820)

作者简介: 苏宇傲(1995~),男,硕士研究生,主要研究方向为有机固废资源化处理,E-mail:suyuaojn@126.com

* 通信作者,E-mail:yanzhang@jiangnan.edu.cn

的 ARGs[4, 5]，但也存在部分 ARGs 丰度上升的现象[6]. 学者们通过微生物群落分析，并将之与 ARGs 变化进行相关性研究[7]，以此来解析厌氧消化过程中 ARGs 变化的内在规律. 目前，研究主要采用提取污泥总 DNA，随后进行定量 PCR（qPCR）和高通量测序的方法展开[8, 9]. 但厌氧消化过程伴随着污泥微生物细胞裂解和细胞物质溶出等过程，厌氧消化污泥中通常存在大量死亡菌体及其 DNA，将死菌 DNA 纳入后续分析可能会对 ARGs 和微生物群落分析产生影响. 一方面，死菌 DNA 所携带的 ARGs 与活菌携带 ARGs 的传播途径不同[7, 10~12]，将其纳入总 DNA 分析可能造成 ARGs 传播风险评估的偏差；另一方面，死菌 DNA 的存在可能会对 ARGs 与微生物群落相关性分析产生影响，不利于污泥厌氧消化过程中 ARGs 变化规律的解析. 但死菌 DNA 对厌氧消化污泥中 ARGs 和微生物群落分析的具体影响尚未得到研究.

叠氮溴化丙锭（PMA）是一种叠氮类染料，能够穿过死菌受损的细胞膜，在强光诱导下与 DNA 形成共价结合，抑制其在 PCR 反应中的扩增. 采用 PMA 处理可以消除样品中死菌 DNA 对 PCR 和后续检测分析的影响[13~15]. 因此，本研究对 3 种不同类型厌氧消化污泥进行 PMA 处理并开展后续 ARGs 和微生物群落分析，将之与未处理样品进行对照，以解析 PMA 处理对厌氧消化污泥 ARGs 和微生物群落的影响，评估死菌 DNA 对厌氧消化污泥 ARGs 和微生物群落分析的潜在干扰.

1　材料与方法

1.1　样品来源

选取 3 个不同类型厌氧消化系统采集污泥样品，系统 1 为剩余污泥自厌氧消化体系，由 3.9 g 污水处理厂脱水污泥和 6.1 mL 去离子水组成，于厌氧管中自消化 72 d 后采集样品（S1）；系统 2 为污泥水解液厌氧消化体系，体系由 400 mL 经离心去除固体物质的剩余污泥水解液和 100 mL 厌氧颗粒污泥种泥组成，厌氧消化 15 d 后采集样品（S2）；系统 3 为处理规模 1 $t \cdot d^{-1}$ 高含固污泥厌氧消化示范工程，污泥停留时间 35 d，污泥含固率 15.7%，采集厌氧消化罐出泥口污泥（S3）.

1.2　PMA 处理方法及对死菌 DNA 屏蔽效率验证

所用 PMA 购自 Biotium 公司. 参考文献[16, 17]，本研究取适量样品置于离心管，10 000 $r \cdot min^{-1}$ 下离心 10 min 收集固形物，使用 0.9% NaCl 溶液振荡离心清洗 3 遍后，重悬至 D_{600} 处于 0.700 ~ 0.900 之间. 取两等份，一份进行 PMA 处理，一份作为不进行 PMA 处理的对照样品. 3 个污泥经 PMA 处理的样品分别编号为：S1P、S2P 和 S3P，对照样品分别编号为 S1N、S2N 和 S3N. PMA 反应于 1.5 mL 离心管中进行，管内置入 995 μL 重悬后的污泥样品以及 5 μL 20 $mmol \cdot L^{-1}$ 的 PMA 溶液，于黑暗处反应 30 min 后，在冰浴中用 500 W 卤素灯光照反应 10 min，随后再于黑暗处静置 15 min. 对照样品不添加 PMA 而用 5 μL 0.9% NaCl 溶液补足体系完成相同操作.

PMA 对死菌 DNA PCR 扩增抑制效率的验证实验设计如下：选用原污泥中未检出的 *Nitrospira amoA* 基因作为标记物，通过克隆构建携带 *Nitrospira amoA* 的大肠杆菌 JM 109 克隆子；随后将克隆子扩培至对数期，均匀取两等份，一份置于 95℃ 水浴 10 min 灭活；分别将 10 μL 活菌和死菌投加到 985 μL 稀释后的污泥样品，加入 5 μL PMA 进行处理，并设置不进行 PMA 处理对照组. 相应的实验组设置如表 1 所示，每个组别设置两个平行反应体系.

表 1　PMA 处理效率验证实验分组

Table 1　Groups of study of verification of PMA treatment efficiency

处理方式	PMA 处理		无 PMA 处理	
投加菌类型	活菌	死菌	活菌	死菌
样品名	PMA + 活菌	PMA + 死菌	无 PMA + 活菌	无 PMA + 死菌

1.3　DNA 提取及定量 PCR 方法

样品于 10 000 $r \cdot min^{-1}$ 下离心 10 min，收集底部污泥使用 PowerSoil® DNA Isolation Kit 提取 DNA，操作步骤按照试剂盒说明书进行.

本研究选择了 *tetA*、*tetO*、*sulI*、*sulII* 和 *ermB* 共 5 种 ARGs 进行定量检测. ARGs 及 *Nitrospira amoA* 基因 qPCR 检测所使用的引物和温度程序见表 2. qPCR 反应在 QuantStudio® 3（美国，Thermo Fisher）仪器上完成，反应体系为 20 μL，包含 SYBR Green I（SYBR® Green qPCR Mastermixes，QIAGEN）10 μL，前后引物各 1 μL，DNA 模板 1 μL，ddH_2O 7 μL. 将已知拷贝数标准质粒以 10 倍梯度稀释进行 qPCR 反应构建标准曲线，标曲 R^2 均大于 0.994，扩增效率为 97% ~ 104%. qPCR 反应均采用 3 个平行测试.

1.4　Illumina 高通量测序

测序采用细菌古菌通用引物 515FmodF（5′-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3′）和 806RmodR（5′-

表 2 引物序列和 PCR 温度程序

Table 2 Primers and PCR thermal procedures

目的基因	引物名称	引物序列(5′-3′)	温度程序	文献
Nitrospira amoA	*Ntsp-amoA 162F* *Ntsp-amoA 359R*	GGATTTCTGGNTSGATTGGA WAGTTNGACCACCASTACCA	95℃ 5 min; 40 × (95℃ 30 s, 48℃ 30 s, 72℃ 45 s)	[18]
tetA	*tetA-F* *tetA-R*	GCTACATCCTGCTTGCCTTC CATAGATCGCCGTGAAGAGG	95℃ 1 min; 40 × (95℃ 10 s, 64℃ 34 s, 72℃ 30 s)	[19]
tetO	*tetO-F* *tetO-R*	GATGGCATACAGGCACAGACC GCCCAACCTTTTGCTTCACTA	95℃ 1 min; 40 × (95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s)	[19]
sulI	*sulI-F* *sulI-R*	CACCGGAAACATCGCTGCA AAGTTCCGCCGCAAGGCT	95℃ 15 min; 40 × (95℃ 15 s, 65℃ 30 s, 72℃ 30 s)	[20]
sulII	*sulII-F* *sulII-R*	TCCGGTGGAGGCCGGTATCTGG CGGGAATGCCATCTGCCTTGAG	95℃ 2 min; 40 × (95℃ 10 s, 63℃ 30 s, 72℃ 45 s)	[21]
ermB	*ermB-F* *ermB-R*	GATACCGTTTACGAAATTGG GAATCGAGACTTGAGTGTGC	95℃ 3 min; 40 × (95℃ 15 s, 58℃ 20 s, 72℃ 30 s)	[22]

GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3′)完成[23,24]. PCR 反应条件如下:95℃ 预变性 3 min, 95℃ 变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 45 s,共 30 个循环;72℃最终延伸 10 min. PCR 产物胶纯化回收建库,建库成功后使用 Illumina MiSeq 平台对扩增子文库进行测序. 对测序数据进行 Paired-end raw reads 数据过滤、拼接,Raw Tags 序列质量过滤. 数据处理后进行 OTU 划分,并使用 I-Sanger 云平台进行微生物群落 α 和 β 多样性等分析. 测序工作委托上海美吉生物医药科技有限公司完成.

1.5 显著性分析

采用 SPSS 22.0 软件进行卡方检验完成显著性分析.

2 结果与讨论

2.1 PMA 对死菌 DNA PCR 扩增的抑制效果

PMA 对死菌 DNA PCR 扩增的抑制效率验证实验结果如图 1 所示. “PMA 处理 + 活菌”和“无 PMA 处理 + 活菌”实验组的 *amoA* 基因拷贝值处于同一数量级且较为接近,PMA 处理在厌氧消化污泥样品中活菌的检测影响不大. “无 PMA 处理 + 死菌”实验组中 *amoA* 基因拷贝值与“无 PMA 处理 + 活菌”相比仍在同一数量级,丰度上略有下降,这可能是由于高温灭活过程中菌体死亡后有少量 DNA 发生降解造成的. “PMA 处理 + 死菌”实验组的 *amoA* 拷贝值与“无 PMA 处理 + 死菌”相比下降了两个数量级. 由此可知 PMA 处理能够有效抑制厌氧消化污泥中死菌 DNA 的 PCR 扩增,抑制效率为 98.1%. 以往 PMA-qPCR 技术大多运用在纯菌[25]或者污水厂出水[18]等悬浮物浓度较低、干扰物质较少的样品,死菌 DNA PCR 扩增的抑制效率在 97%~99%[17,25,26],本研究得到的 PMA 抑制效率与上述研究相仿,证明了 PMA 处理对抑制厌氧消化污泥样品中死菌 DNA 扩增的有效性,满足本研究后续实验的要求. 本研究的目的在于探究死菌 DNA 是否会对厌氧消化污泥中 ARGs 及微生物群落的分析产生干扰,在死菌 DNA 抑制效率未达到 100% 的情况下,若发现死菌 DNA 对 ARGs 和微生物群落分析的影响,更加能够说明死菌 DNA 会对厌氧消化污泥中 ARGs 及微生物群落的分析产生干扰.

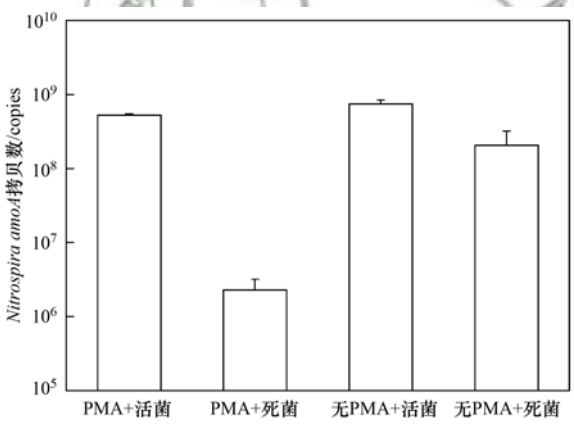


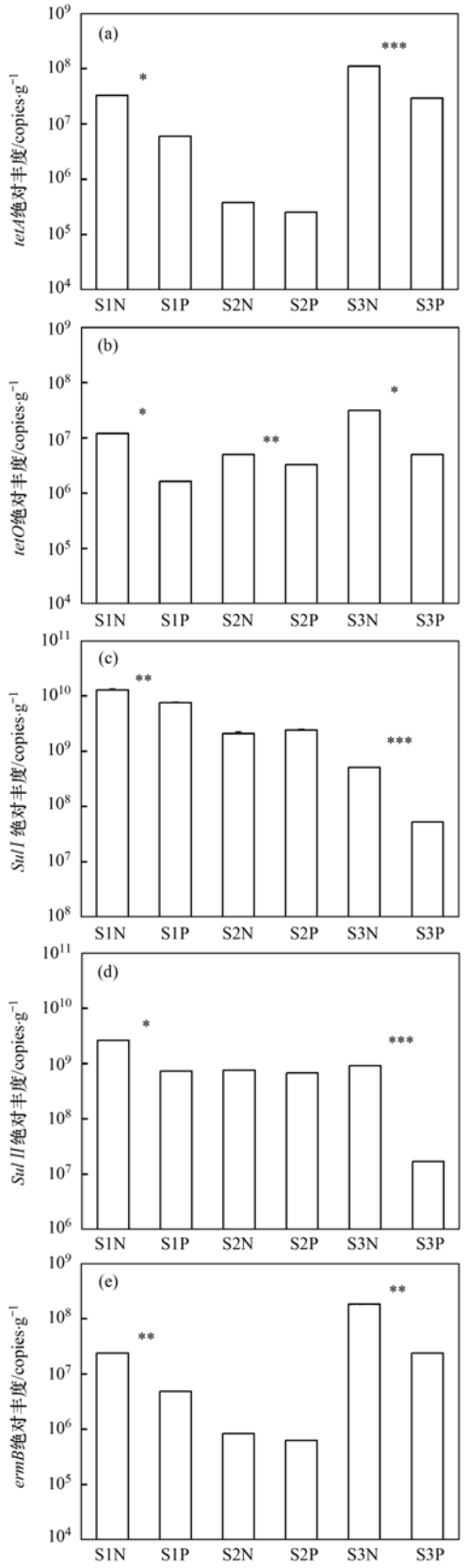
图 1 *Nitrospira amoA* 基因拷贝值变化

Fig. 1 Variation of the gene abundance of *Nitrospira amoA*

2.2 PMA 处理对不同厌氧消化污泥 ARGs 检测结果的影响

经 PMA 处理和未经 PMA 处理厌氧消化污泥中 ARGs 丰度的测定结果如图 2 所示. 可以看出,绝大多数 PMA 处理组的 ARGs 丰度都比未经 PMA 染料处理组有所降低. 其中,S1 样品经 PMA 处理后各个 ARGs 丰度较未经 PMA 处理组下降了 41%~86%; S3 样品经 PMA 处理后各个 ARGs 丰度下降幅度更大,达到 74%~98%. 而 S2 样品经 PMA 处理后 ARGs 丰度变化相对较小.

这一结果说明,S3 中死菌 ARGs 在污泥 ARGs



经 PMA 处理与未经 PMA 处理样品间的差异显著性用 * 表示：* 表示 $0.01 < P \leq 0.05$，** 表示 $0.001 < P \leq 0.01$，*** 表示 $P \leq 0.001$

图 2　ARGs 绝对丰度

Fig. 2　Absolute abundance of the ARGs

总量中所占的比例最大，S1 中死菌 ARGs 的比例也较高，而 S2 中死菌 ARGs 的量较小. 分析污泥来源可知，S2 取自污泥水解液厌氧消化体系，体系由液态的污泥水解液和厌氧颗粒污泥组成，所采的 S2 样品实际为高活性的厌氧颗粒污泥，因此 S2 中所携带的死菌较少. S1 取自剩余污泥自厌氧消化体系，剩余污泥在进入厌氧环境后，部分不适应厌氧条件的微生物大量死亡，所以 S1 样品中死菌的比例也较高，这与 PMA 处理大幅降低了 ARGs 检测丰度的结果一致. S3 是高含固污泥厌氧消化罐出泥口采集的污泥样品，高含固污泥厌氧消化进泥浓度高、厌氧消化处理时间长，经消化后污泥中微生物死亡裂解残余物多，所以 S3 经 PMA 处理后 ARGs 检测丰度下降量也最大.

比较 5 种 ARGs 的丰度发现，整体上厌氧消化污泥中 *sulI* 的丰度（以干污泥计，下同）最高，在未经 PMA 处理的污泥样品中达到 $5.08 \times 10^8 \sim 1.27 \times 10^{10}$ copies·g^{-1}；*sulII* 的丰度次之，为 $7.59 \times 10^8 \sim 2.59 \times 10^9$ copies·g^{-1}；其余 3 个 ARGs 丰度相对较低. 除 S2P 中的 *sulI* 基因丰度略有上升之外，*tetA*、*tetO*、*sulI*、*sulII* 和 *ermB* 在污泥 PMA 处理后丰度各下降了 33%～82%、34%～86%、41%～90%、11%～98% 和 26～87%，说明这 5 种 ARGs 在死菌和活菌中均各有分布. 此外，经 PMA 处理后，S3 中 ARGs 高低顺序由未经 PMA 处理时的 *sulII* > *sulI* > *ermB* > *tetA* > *tetO* 变为 *sulI* > *tetA* > *ermB* > *sulII* > *tetO*. 可见，厌氧消化污泥中活菌携带的各 ARGs 丰度高低顺序可能与死菌携带 ARGs 的高低顺序不同，PMA 处理可以更加准确分析厌氧消化污泥中活菌 ARGs 高低.

2.3　PMA 处理对不同厌氧消化污泥中微生物群落分析的影响

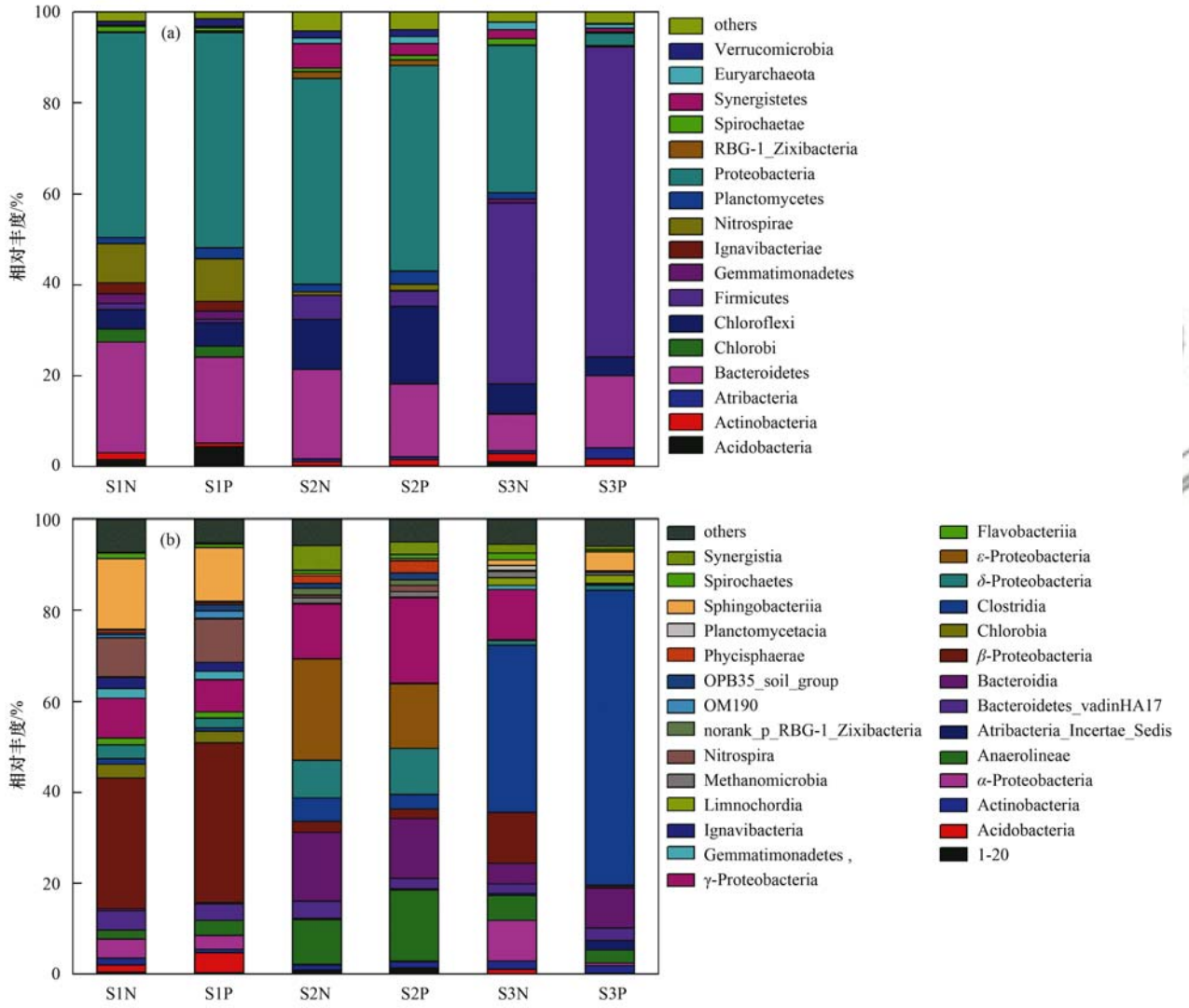
3 类厌氧消化污泥经 PMA 处理与未经 PMA 处理的 6 个微生物群落文库信息如表 3 所示. 可以看出，文库的覆盖度（coverage）达到0.995 3～0.999 3，能够很好反映污泥中微生物群落的信息. 比较发现，无论是否经过 PMA 处理，S1 样品中测定的 OTUs 数量均最大，S2 样品中测定的 OTUs 数量最小. 而 Chao 1 指数的高低顺序也为 S1 > S3 > S2，表明 S1 的微生物群落丰富度最高，而 S2 最低. 从 Shannon 指数看，S1 污泥中微生物群落多样性最高，S2 和 S3 比较接近，均低于 S1. 比较 PMA 处理对群落多样性指数的影响，发现 S3 样品经 PMA 处理后 Shannon 指数有较大幅度的下降；而 S1 和 S2 样品 Shannon 指数变化相对较小.

6 个样品在门和纲水平上的微生物群落组成如图 3 所示. 变形菌门（Proteobacteria）、厚壁菌门（Firmicutes）、拟杆菌门（Bacteroidetes）和绿弯菌门

表 3 样品高通量测序文库信息

Table 3 Information of the high throughput sequencing libraries

样品	序列数	OTUs	Shannon 指数	Chao 1 指数	覆盖度
S1N	63 209	1 117	5. 248 6	1 166. 51	0. 998 3
S1P	71 351	1 113	5. 054 0	1181. 22	0. 998 4
S2N	73 338	481	3. 983 3	520. 20	0. 999 3
S2P	70 633	474	4. 024 5	511. 89	0. 999 2
S3N	34 374	823	4. 813 6	988. 09	0. 995 3
S3P	42 385	603	3. 693 6	701. 09	0. 997 1



(a)门水平;(b)纲水平

图 3 样品中的微生物群落组成

Fig. 3 Microbial community composition in all samples

(Chloroflexi)为主要的门:其中,Proteobacteria 是 S1 和 S2 中丰度最高的门(45. 2%~47. 5%);Firmicutes 在 S3 中占绝对优势(39. 8%~68. 3%);Bacteroidetes 在各样品中的相对丰度较为接近(8. 0%~24. 3%);Chloroflexi 在 S1 与 S3 中稍低(4. 0%~6. 6%),而在 S2 中相对较高(16. 1%~19. 6%). 从纲水平看,S1 中主要为 β-变形菌纲(β-Proteobacteria)和鞘脂杆菌纲(Sphingobacteriia)等;S2 中主要为 ε-变形菌纲(ε-Proteobacteria)、γ-变形菌纲(γ-Proteobacteria)和拟杆菌纲(Bacteroidia)等;而 S3 中梭菌纲(Clostridia)是最主要的优势纲. 可见,3 个污泥微生物群落差异明显,其中 S3 与其他两个污泥的差异最大. S1 为剩余污泥自消化后的样品,其 β-Proteobacteria、Sphingobacteriia 和 γ-Proteobacteria 等主要菌群与活性污泥中常见的菌群[27]较为相似. 厌氧颗粒污泥中常含有

Proteobacteria、放线菌门（Actinobacteria）、Bacteroidetes 和 Firmicutes 等[28]，也在 S2 中能够找到. 而 S3 来源于高含固污泥厌氧消化系统，其占主要地位的 Clostridia 具有有机质高效降解、强化有机物发酵产酸等功能[29,30]，能够促进高含固污泥厌氧消化过程的进行.

比较 PMA 处理对样品微生物群落组成分析结果的影响，发现 S1P、S2P 较 S1N、S2N 相比，Bacteroidetes 相对丰度明显下降；Chloroflexi 相对丰度在 S1P、S2P 样品中有不同程度的提高. 在纲水平上，S1P 和 S2P 群落组成较 S1N 和 S2N 差异更大，Sphingobacteriia 相对丰度在 S1P 中明显降低，而 β-Proteobacteria 和酸杆菌纲（Acidobacteria）相对丰度则大幅升高；S2P 中 ε-Proteobacteria、Bacteroidia、互营养菌纲（Synergistia）和 Clostridia 等丰度下降，而 γ-Proteobacteria、厌氧绳菌纲（Anaerolineae）和 δ-变形菌纲（δ-Proteobacteria）等丰度上升. S3 经 PMA 处理后微生物群落分析结果变化更为明显，在门水平中 Firmicutes 相对丰度上升了 28.5%，而 Proteobacteria 相应地下降了 29.7%. 在纲水平中 γ-Proteobacteria、β-Proteobacteria、α-变形菌纲（α-Proteobacteria）和 Anaerolineae 的相对丰度分别降低了 10.7%、10.6%、8.2% 和 2.7%，而 Clostridia、Bacteroidia 和 Sphingobacteriia 相对丰度分别上升 28.3%、4.2% 和 3.1%. 与门和纲水平结果类似，经 PMA 处理后，S1 和 S2 主要科相对丰度的变化相对较小，而 S3 的变化则较大（图 4）. S1 和 S2 中的主要优势科在经 PMA 处理和未经处理 PMA 处理样品中检测到的相对丰度变化超过 1% 的为 6 个，而在 S3 中主要优势科在经 PMA 处理后相对丰度变化超过 1% 达到 18 个.

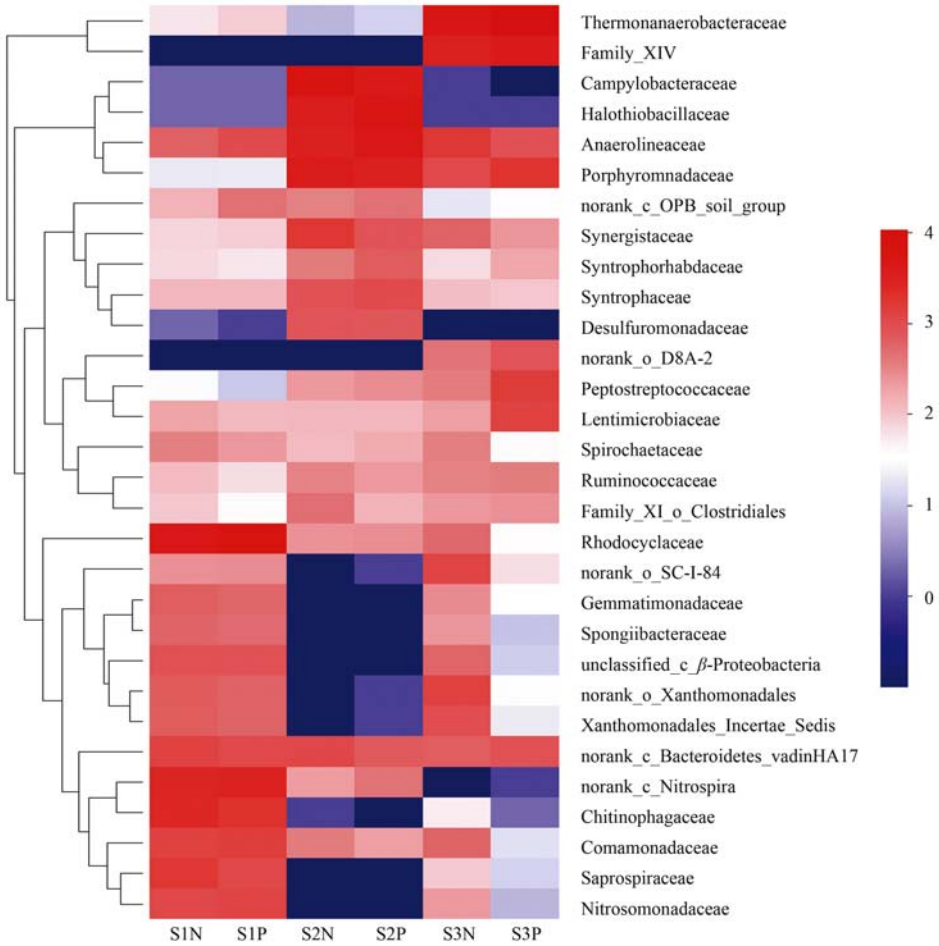
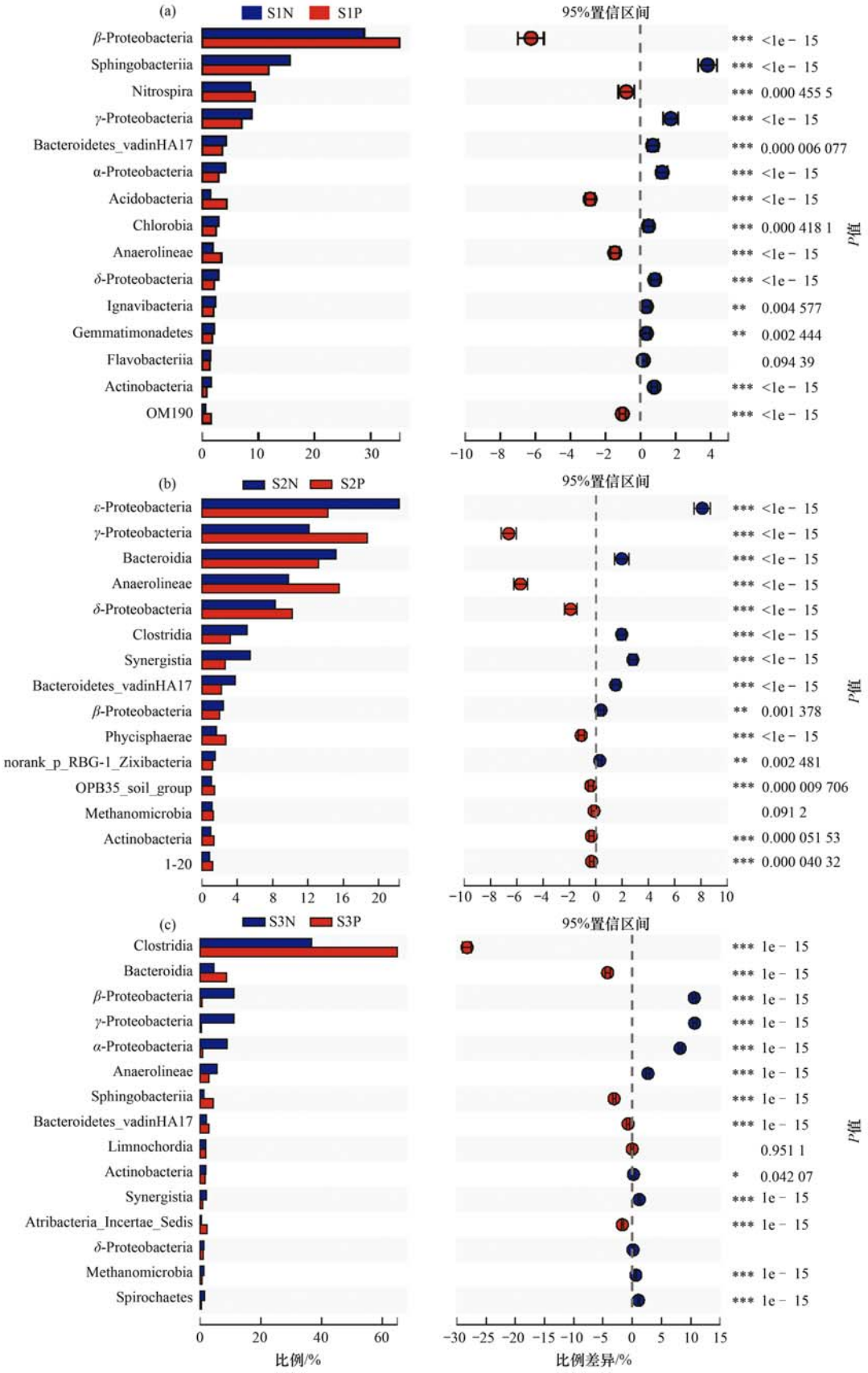


图 4　科水平下的 30 个主要物种相对丰度

Fig. 4　Relative abundance of the top 30 families in the samples

对经 PMA 处理和未经 PMA 处理样品采用 Fisher' exact test 方法进行样本物种丰度差异显著性检验（图 5），结果显示在 S1N 和 S1P、S2N 和 S2P、S3N 和 S3P 之间，丰度最高的 15 个纲中分别有 14、14 和 13 个纲的相对丰度存在显著差异，体现了 PMA 处理与否样品分析得到的微生物群落组成的显著差异. 微生物作为 ARGs 的宿主，微生物群落的差异必然会引起 ARGs 分析结果的差异，但由于不同 ARGs 存在于不同的微生物菌株中，这些 ARGs 宿主菌在死菌菌群中的存在情况又可能有所不同，所以 PMA 处理与未 PMA 处理的污泥中不同 ARGs 丰度差异也各不相同（图 2）. 正是由于死菌 DNA 对



* 表示 0.01 < P ≤ 0.05, ** 表示 0.001 < P ≤ 0.01, *** 表示 P ≤ 0.001

图 5 两样本差异显著性比较

Fig. 5 Significance comparison of the two samples

微生物群落分析的干扰,同时会对 ARGs 的分析产生影响,所以排除死菌 DNA 的干扰,能更加准确地反映出厌氧消化污泥中微生物群落及 ARGs 的特征.

进一步通过 Bray-Curtis 距离算法、共有 OTUs 分析和样本差异显著性比较等方法，来评估各个样品经 PMA 处理和未经 PMA 处理微生物群落之间的差异性. 基于 Bray-Curtis 距离算法可知(图 6)，S1N 与 S1P、S2N 与 S2P 以及 S3N 与 S3P 的距离系数分别为0. 174 0、0. 215 3 和0. 461 6，PMA 处理与未经 PMA 处理样品之间均存在较大的组内距离，其中 S3N 与 S3P 组内距离最大.

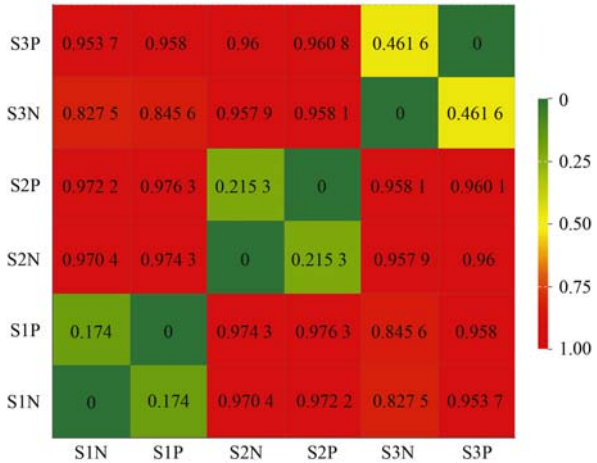
共有 OTUs 分析显示(表 4)，S1、S2 样本中 PMA 处理独有和未经 PMA 处理独有的 OTUs 占比在 6. 5%～10. 0%之间，共有 OTUs 占比分别为 81. 6% 和 83. 5%；而 S3 样本中共有 OTUs 占比只有 58. 7%，PMA 处理独有 OTUs 为 6. 6%，而未经 PMA 处理独有的 OTUs 占比达到 34. 7%. Bray-Curtis 距离算法和共有 OTUs 分析均显示了 PMA 处理对厌氧消化污泥微生物群落分析的影响，其中 S3 样品经 PMA 处理前后微生物群落分析结果差异最大. 值得关注的是，S3 中未经 PMA 处理独有的 OTUs 占比达到 34. 7%，说明污泥中存在大量不同种类的死亡菌体. 而这些 OTUs 仅在未经 PMA 处理的样品中被检出，说明 PMA 能够有效抑制厌氧消化污泥中死菌 DNA 的 PCR 扩增，更准确地分析污泥中存活的微生物群落组成.

表 4　PMA 处理样品与未 PMA 处理样品共有 OTUs 分析

Table 4　Shared OTUs analysis of PMA treated samples and non-PMA treated samples

样品类型 编号	PMA 处理独有	PMA 处理和 无 PMA 处理	无 PMA 处理独有
S1	99(8. 7%)	925(81. 6%)	109(9. 6%)
S2	31(6. 5%)	401(83. 5%)	48(10. 0%)
S3	58(6. 6%)	517(58. 7%)	306(34. 7%)

1)括号内百分比表示该组 OTU 数目在总 OTU 中的占比



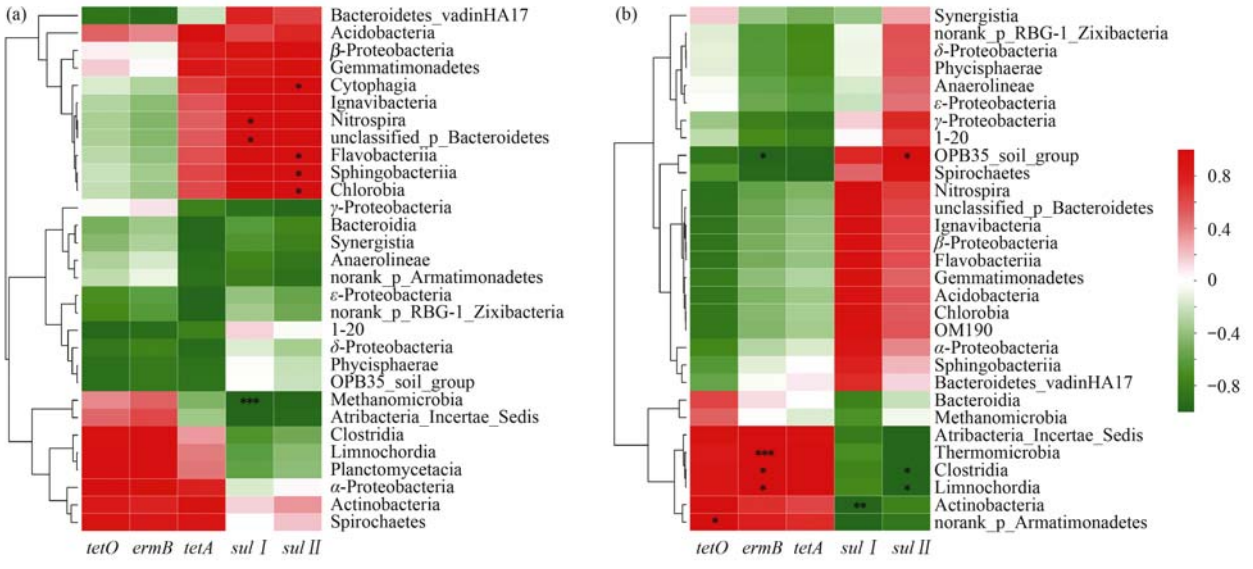
色块带为 Bray-Curtis 距离系数刻度，系数越大表示微生物群落之间的差异性越大

图 6　样本间相对丰度距离

Fig. 6　Distance heatmap based on the relative abundance of OTUs in all samples

2. 4　PMA 处理对 ARGs 与微生物群落组成相关性分析的影响

目前对与 ARGs 携带菌的分析，主要通过将 ARGs 与微生物群落进行各种相关性分析来推测[7,31,32]. 本研究进一步比较了经 PMA 处理和未经 PMA 处理的 3 类厌氧消化污泥中 ARGs 丰度与微生物群落主要纲的相关性，结果如图 7 所示. 在未经 PMA 处理情况下，*sulI* 与硝化螺旋菌纲(Nitrospira)和 unclassified_p_Bacteroidetes 呈显著正相关，与甲烷微菌纲(Methanomicrobia)呈显著负相关. *sulII* 与纤维黏网菌纲(Cytophagia)、黄杆菌纲(Flavobacteriia)、Sphingobacteriia 和绿菌纲(Chlorobia)呈显著正相关；而在经 PMA 处理情况



* 表示 0. 01 < P ≤ 0. 05，** 表示 0. 001 < P ≤ 0. 01，*** 表示 P ≤ 0. 001；(a)基于未经 PMA 处理的样品，(b)基于经 PMA 处理的样品

图 7　ARGs 与微生物群落的 Pearson 相关性分析

Fig. 7　Pearson correlation analysis between ARGs and microbial communities

下,*sulI* 则与 Actinobacteria 呈显著负相关;*sulII* 与 OPB35_soil_group 呈显著正相关,与 Clostridia 和 Limnochordia 呈显著负相关,此外 *tetA* 也与多个纲分别呈现相关性. 可以看出,经 PMA 处理情况下的 ARGs 与微生物群落相关性与未经 PMA 处理相比差异巨大,原因可能是在厌氧消化体系中死菌 DNA 上的 16S rRNA 与 ARGs 的降解速率可能存在差异,使得死菌中 ARGs 与微生物群落的相关性与活菌菌群中的分析结果不同,死菌 DNA 对 ARGs 与微生物群落相关性分析存在干扰.

综上所述,经 PMA 处理后 3 个厌氧消化污泥样品中 ARGs 检测丰度有所下降,微生物群落分析结果也发生了变化,ARGs 与微生物群落组成相关性分析结果更是截然不同. 可知,PMA 处理会对厌氧消化污泥中 ARGs 和微生物群落分析结果产生影响,而这正是由于 PMA 能够抑制厌氧消化污泥中死菌 DNA 的 PCR 扩增造成的. 可以看出,死菌 DNA 对厌氧消化污泥中 ARGs 与微生物群落分析存在较大干扰,PMA 处理后进行后续分析能够更准确地反映厌氧消化污泥中的微生物群落及 ARGs 特征.

3 结论

(1)PMA 处理能够有效抑制厌氧消化污泥中死菌 DNA 在 PCR 中的扩增,抑制效率达 98.1%.

(2)经 PMA 处理,厌氧消化污泥的 ARGs 定量检测丰度相比于未经 PMA 处理对照组明显降低,微生物群落分析结果与未经 PMA 处理样品呈现不同程度的差异.

(3)在经 PMA 处理和未经 PMA 处理情况下,厌氧消化污泥中 ARGs 与微生物群落组成的相关性分析呈现截然不同的结果.

(4)死菌 DNA 对厌氧消化污泥 ARGs 和微生物群落分析存在干扰,对于死菌含量较高的厌氧消化污泥,采用 PMA 预处理能够更准确地反映厌氧消化污泥中的微生物群落及 ARGs 的特征.

参考文献:

[1] Czekalski N, Díez E G, Bürgmann H. Wastewater as a point source of antibiotic-resistance genes in the sediment of a freshwater lake[J]. The ISME Journal, 2014, **8**(7): 1381-1390.

[2] Munir M, Wong K, Xagoraraki 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.

[3] Elalami D, Carrère H, Monlau F, *et al*. Pretreatment and co-digestion of wastewater sludge for biogas production: recent research advances and trends[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2019, **114**: 109287.

[4] Tian Z, Chi Y Z, Yu B, *et al*. Thermophilic anaerobic digestion reduces ARGs in excess sludge even under high oxytetracycline concentrations[J]. Chemosphere, 2019, **222**: 305-313.

[5] Huang H N, Chen Y G, Zheng X, *et al*. Distribution of tetracycline resistance genes in anaerobic treatment of waste sludge: the role of pH in regulating tetracycline resistant bacteria and horizontal gene transfer[J]. Bioresource Technology, 2016, **218**: 1284-1289.

[6] Xu R, Yang Z H, Zheng Y, *et al*. Metagenomic analysis reveals the effects of long-term antibiotic pressure on sludge anaerobic digestion and antimicrobial resistance risk[J]. Bioresource Technology, 2019, **282**: 179-188.

[7] Zhang Y, Li A L, Dai T J, *et al*. Cell-free DNA: a neglected source for antibiotic resistance genes spreading from WWTPs[J]. Environmental Science & Technology, 2018, **52**(1): 248-257.

[8] Tong J, Fang P, Zhang J Y, *et al*. Microbial community evolution and fate of antibiotic resistance genes during sludge treatment in two full-scale anaerobic digestion plants with thermal hydrolysis pretreatment[J]. Bioresource Technology, 2019, **288**: 121575.

[9] Zhang J Y, Lu T D, Shen P H, *et al*. The role of substrate types and substrate microbial community on the fate of antibiotic resistance genes during anaerobic digestion[J]. Chemosphere, 2019, **229**: 461-470.

[10] Karkman A, Do T T, Walsh F, *et al*. Antibiotic-resistance genes in waste water[J]. Trends in Microbiology, 2018, **26**(3): 220-228.

[11] Mao D Q, Luo Y, Mathieu J, *et al*. Persistence of extracellular DNA in river sediment facilitates antibiotic resistance gene propagation[J]. Environmental Science & Technology, 2014, **48**(1): 71-78.

[12] Miller J H, Novak J T, Knocke W R, *et al*. Survival of antibiotic resistant bacteria and horizontal gene transfer control antibiotic resistance gene content in anaerobic digesters[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, **7**: 263.

[13] Kim M, Wuertz S. Survival and persistence of host-associated *Bacteroidales* cells and DNA in comparison with *Escherichia coli* and *Enterococcus* in freshwater sediments as quantified by PMA-qPCR and qPCR[J]. Water Research, 2015, **87**: 182-192.

[14] Askar M, Sajid M, Nassif Y, *et al*. Propidium monoazide-polymerase chain reaction for detection of residual periprosthetic joint infection in two-stage revision[J]. Molecular Biology Reports, 2019, **46**(6): 6463-6470.

[15] Dorn-In S, Gareis M, Schwaiger K. Differentiation of live and dead *Mycobacterium tuberculosis* complex in meat samples using PMA qPCR[J]. Food Microbiology, 2019, **84**: 103275.

[16] 仝铁铮. PMA-qPCR 选择性检测水中活性菌方法的研究与应用[D]. 北京: 清华大学, 2010.
Tong T Z. Selective detection of viable pathogens in water using propidium monoazide combined with qPCR and its application[D]. Beijing: Tsinghua University, 2010.

[17] Guo F, Zhang T. Detecting the nonviable and heat-tolerant bacteria in activated sludge by minimizing DNA from dead cells[J]. Microbial Ecology, 2014, **67**(4): 829-836.

[18] Fowler S J, Palomo A, Dechesne A, *et al*. Comammox Nitrospira are abundant ammonia oxidizers in diverse groundwater-fed rapid sand filter communities[J]. Environmental Microbiology, 2018, **20**(3): 1002-1015.

[19] Chen B W, Liang X M, Huang X P, *et al*. Differentiating anthropogenic impacts on ARGs in the Pearl River Estuary by using suitable gene indicators[J]. Water Research, 2013, **47**(8): 2811-2820.

[20] Luo Y, Mao D Q, Rysz M, *et al*. Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China[J]. Environmental Science & Technology, 2010, **44**(19): 7220-7225.

[21] Jiang L, Hu X L, Xu T, *et al*. Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China[J]. Science of the Total Environment, 2013, **458-460**: 267-272.

[22] Huerta B, Marti E, Gros M, *et al*. Exploring the links between antibiotic occurrence, antibiotic resistance, and bacterial communities in water supply reservoirs[J]. Science of the Total Environment, 2013, **456-457**: 161-170.

[23] Walters W, Hyde E R, Berg-Lyons D, *et al*. Improved bacterial 16S rRNA gene (V4 and V4-5) and fungal internal transcribed spacer marker gene primers for microbial community surveys[J]. Msystems, 2016, **1**(1): e00009-15.

[24] Sampson T R, Debelius J W, Thron T, *et al*. Gut microbiota regulate motor deficits and neuroinflammation in a model of Parkinson's disease[J]. Cell, 2016, **167**(6): 1469-1480. e12.

[25] Li H Y, Xin H Y, Li S F Y. Multiplex PMA-qPCR Assay with internal amplification control for simultaneous detection of viable *Legionella pneumophila*, *Salmonella typhimurium*, and *Staphylococcus aureus* in environmental waters [J]. Environmental Science & Technology, 2015, **49**(24): 14249-14256.

[26] Li D, Tong T Z, Zeng S Y, *et al*. Quantification of viable bacteria in wastewater treatment plants by using propidium monoazide combined with quantitative PCR (PMA-qPCR)[J]. Journal of Environmental Sciences, 2014, **26**(2): 299-306.

[27] 赵婷婷, 乔凯, 王蕾, 等. 淀粉废水处理系统中活性污泥的微生物群落结构及多样性分析[J]. 环境科学, 2020, **41**(1): 321-329.
Zhao T T, Qiao K, Wang L, *et al*. Measurements of bacterial community and biodiversity from activated sludge for a wastewater treatment containing starch[J]. Environmental Science, 2020, **41**(1): 321-329.

[28] 宿程远, 郑鹏, 卢宇翔, 等. 磁性纳米铁对厌氧颗粒污泥特性及其微生物群落的影响[J]. 环境科学, 2018, **39**(3): 1316-1324.
Su C Y, Zheng P, Lu Y X, *et al*. Effects of magnetic Fe_3O_4 nanoparticles on the characteristics of anaerobic granular sludge and its interior microbial community[J]. Environmental Science, 2018, **39**(3): 1316-1324.

[29] Callejas C, Fernández A, Passeggi M, *et al*. Microbiota adaptation after an alkaline pH perturbation in a full-scale UASB anaerobic reactor treating dairy wastewater[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2019, **42**(12): 2035-2046.

[30] Su C Y, Lin X M, Zheng P, *et al*. Effect of cephalexin after heterogeneous fenton-like pretreatment on the performance of anaerobic granular sludge and activated sludge [J]. Chemosphere, 2019, **235**: 84-95

[31] Liu C, Li H, Zhang Y Y, *et al*. Evolution of microbial community along with increasing solid concentration during high-solids anaerobic digestion of sewage sludge[J]. Bioresource Technology, 2016, **216**: 87-94.

[32] Chen Q L, An X L, Li H, *et al*. Long-term field application of sewage sludge increases the abundance of antibiotic resistance genes in soil[J]. Environment International, 2016, **92-93**: 1-10.

HUANJING K0EXUE

Environmental Science (monthly)

Vol. 41 No. 6

Jun. 15, 2020

CONTENTS

Mixed State and Sources of Fine Particulate Matter in the Summer in Tianjin City Based on Single Particle Aerosol Mass Spectrometer (SPAMS) ····· LIN Qiu-ju, XU Jiao, LI Mei, *et al.* (2505)

Characteristics and Sources of Inorganic Ions and Organic Acids in Precipitation in the Northern Suburb of Nanjing, China ····· YANG Xiao-ying, CAO Fang, LIN Yu-qi, *et al.* (2519)

Seasonal Variation of Water-soluble Ions in $PM_{2.5}$ in Xi'an ····· HUANG Han-han, WANG Yu-qin, LI Sheng-ping, *et al.* (2528)

Effect of Liquid Water Content of Particles and Acidity of Particulate Matter on the Formation of Secondary Inorganic Components in Xinjiang Petrochemical Industrial Area ····· LIU Hui-bin, Dilinuer·Talifu, WANG Xin-ming, *et al.* (2536)

Effect of Biomass Burning on the Light Absorption Properties of Water Soluble Organic Carbon in Atmospheric Particulate Matter in Changchun ····· MENG De-you, CAO Fang, ZHAI Xiao-yao, *et al.* (2547)

Chemical Characteristics and Sources of Volatile Organic Compounds in Shanghai During an Ozone and Particulate Pollution Episode in May 2019 ····· WANG Qian (2555)

Characteristics and Source Apportionment of Atmospheric VOCs in the Nanjing Industrial Area in Autumn ····· CAO Meng-yao, LIN Yu-chi, ZHANG Yan-lin (2565)

Ambient VOCs Characteristics, Ozone Formation Potential, and Source Apportionment of Air Pollution in Spring in Zhengzhou ····· REN Yi-jun, MA Shuang-liang, WANG Si-wei, *et al.* (2577)

Characteristics of VOCs and Their Roles in Ozone Formation at a Regional Background Site in Beijing, China ····· HAN Ting-ting, LI Ying-ruo, QIU Yu-lu, *et al.* (2586)

Emission Characteristics of the Catering Industry in Beijing ····· SUN Cheng-yi, BAI Hua-hua, CHEN Xue, *et al.* (2596)

Emission Factors and Emission Inventory of Agricultural Machinery in Beijing Under Real-world Operation ····· WANG Kai, FAN Shou-bin, QI Hao-yun (2602)

Localization of Soil Wind Erosion Dust Emission Factor in Beijing ····· LI Bei-bei, HUANG Yu-hu, BI Xiao-hui, *et al.* (2609)

Spatial and Temporal Characteristics of AOD and Angström Exponent in the Yangtze River Delta Based on MODIS_C061 ····· ZHANG Ying-lei, CUI Xi-min (2617)

Fate Simulation of 2,4,4′-Trichlorobiphenyl in the Bohai Rim Using the Multimedia Model ····· ZHANG Yi, MA Yan-fei, SONG Shuai, *et al.* (2625)

Temporal and Spatial Distribution Characteristics and Difference Analysis of Chromophoric Dissolved Organic Matter in Sediment Interstitial Water from Gangnan Reservoir ····· ZHOU Shi-lei, SUN Yue, YUAN Shi-chao, *et al.* (2635)

Environmental Characteristics and Source Apportionment of Heavy Metals in the Sediments of a River-Lake System ····· LI Yue-zhao, CHEN Hai-yang, SUN Wen-chao (2646)

Speciation Distribution and Risk Assessment of Heavy Metals in Sediments from the Yitong River City Area ····· JIANG Shi-xin, ZHAI Fu-jie, ZHANG Chao, *et al.* (2653)

Identifying Nitrate Sources in a Typical Karst Underground River Basin ····· ZHAO Ran, HAN Zhi-wei, SHEN Chun-hua, *et al.* (2664)

Influence of Nutrient Pulse Input on Nitrogen and Phosphorus Concentrations and Algal Growth in the Sediment-Water System of Lake Taihu ····· CHEN Jie, XU Hai, ZHAN Xu, *et al.* (2671)

Temporal and Spatial Variation Patterns of Picophytoplankton and Their Correlations with Environmental Factors During the Wet Season in East Lake Dongting ····· LI Sheng-nan, CHEN Hao-yu, PENG Hua, *et al.* (2679)

Toxicological Effects of Enrofloxacin and Its Removal by Freshwater Micro-Green Algae *Dictyosphaerium* sp. ····· WANG Zhen-fang, HAN Zi-yu, WANG Meng-xue, *et al.* (2688)

Comparative Phosphorus Accumulation and Ca-P Content of Two Submerged Plants in Response to Light Intensity and Phosphorus Levels ····· SANG Yu-xuan, YANG Jia-le, XIONG Yi, *et al.* (2698)

Effect of Calcium Peroxide Composite Tablets on Water Remediation and Phosphorus Control in Sediment ····· ZHANG Shuai, LI Da-peng, DING Yu-qin, *et al.* (2706)

Spatial Differentiation and Driving Analysis of Nitrogen in Rice Rotation Based on Regional DNDC: Case Study of Jinjiang River Watershed ····· WANG Ya-nan, SHUI Wei, QI Xin-hua, *et al.* (2714)

Low Temperature Ammonia Nitrogen Removal from an Iron, Manganese, and Ammonia Groundwater Purification Process with Different Concentrations of Iron and Manganese ····· ZHANG Jie, MEI Ning, LIU Meng-hao, *et al.* (2727)

Degradation of RBK5 by High Crystallinity Mn-Fe LDH Catalyst Activating Peroxymonosulfate ····· LI Li, WU Li-ying, DONG Zheng-yu, *et al.* (2736)

Mechanisms of Fe-cyclam/H_2O_2 System Catalyzing the Degradation of Rhodamine B ····· YU Yu-qing, CHEN Xiang-yu, CAI Quan-hua, *et al.* (2746)

Removal of Nitrate Nitrogen by Microbial Photoelectrochemical Cell: PANI/TiO_2-NTs as a Photoanode ····· LU Yi, ZHOU Hai-shan, PENG Rui-jian, *et al.* (2754)

Performance and Membrane Fouling Characteristics of Mariculture Wastewater Treated by Anoxic MBR-MMR ····· CHEN Fan-yu, XU Zhong, YOU Hong, *et al.* (2762)

Effect of HRT on Denitrifying Phosphorus and Nitrogen Removal in Modified A^2/O-BAF ····· ZHAO Kai-liang, LIU An-di, NAN Yan-bin, *et al.* (2771)

Effect of Ni(Ⅱ) on Anaerobic Ammonium Oxidation and Changes in Kinetics ····· SUN Qi, ZHAO Bai-hang, FAN Sa, *et al.* (2779)

Removal of Urea by Heterotrophic Nitrification-Aerobic Denitrification Mixed Strains and Effects of Heavy Metals and Salinity ····· WANG Meng-meng, CAO Gang, ZHANG Di, *et al.* (2787)

Start-up Characteristics of SNAD Process and Functional Abundance Succession of Volcanic Rock Biological Aerated Filter ····· XUE Jia-jun, ZHANG Shao-qing, ZHANG Li-qiu, *et al.* (2796)

Effect of Free Hydroxylamine on the Activity of Two Typical Nitrite-oxidizing Bacteria ····· SHEN Chen, ZHANG Shu-jun, PENG Yong-zhen (2805)

Interference of Dead Cell DNA on the Analysis of Antibiotic Resistance Genes and Microbial Community in Anaerobic Digestion Sludge ····· SU Yu-ao, LIU Hong-bo, MAO Qiu-yan, *et al.* (2812)

Spatial Distribution Characteristics and Pollution Evaluation of Heavy Metals in Arable Land Soil of China ····· CHEN Wen-xuan, LI Qian, WANG Zhen, *et al.* (2822)

Construction and Application of Early Warning System for Soil Environmental Quality ····· LI Xiao-nuo, DING Shou-kang, CHEN Wei-ping, *et al.* (2834)

Response of Aggregate Distribution to Input Straw and Their Linkages to Organic Carbon Mineralization in Soils Developed from Five Different Parent Materials ····· MAO Xia-li, QIU Zhi-teng, ZHANG Shuang, *et al.* (2842)

Response of Extracellular Enzyme Activities to Substrate Availability in Paddy Soil with Long-term Fertilizer Management ····· NING Yu-fei, WEI Liang, WEI Xiao-meng, *et al.* (2852)

Effects of Biochar on Bioavailability of Two Elements in Phosphorus and Cadmium-Enriched Soil and Accumulation of Cadmium in Crops ····· HUANG Yang, GUO Xiao, HU Xue-yu (2861)

Characteristics of Cd, As, and Pb in Soil and Wheat Grains and Health Risk Assessment of Grain-Cd/As/Pb on the Field Scale ····· XIAO Bing, XUE Pei-ying, WEI Liang, *et al.* (2869)

Reconstructed Soil Vertical Profile Heavy Metal Cd Occurrence and Its Influencing Factors ····· HU Qing-qing, SHEN Qiang, CHEN Fei, *et al.* (2878)

Bacterial Community Composition in Cadmium-Contaminated Soils in Xinxiang City and Its Ability to Reduce Cadmium Bioaccumulation in Pak Choi (*Brassica chinensis* L.) ····· CHEN Zhao-jin, LI Ying-jun, SHAO Yang, *et al.* (2889)

Root Activities of Re-Vegetated Plant Species Regulate Soil Nutrients and Bacterial Diversity in the Riparian Zone of the Three Gorges Reservoir ····· LI Li-juan, LI Chang-xiao, CHEN Chun-hua, *et al.* (2898)

Spatial Distribution of Nitrogen Metabolism Functional Genes of Eubacteria and Archaebacteria in Dianchi Lake ····· ZHANG Yu, ZUO Jian-e, WANG Si-ke, *et al.* (2908)

Effect of Simulated Warming on Microbial Community in Glacier Forefield ····· WANG Yu-wan, MA An-zhou, CHONG Guo-shuang, *et al.* (2918)

Effect of Water-Fertilizer-Gas Coupling on Soil N_2O Emission and Yield in Greenhouse Tomato ····· SHANG Zi-hui, CAI Huan-jie, CHEN Hui, *et al.* (2924)

Toxicity of Soil Leachate from Coal Gangue and Its Surrounding Village of Barley(*Hordeum vulgare*) ····· SHANG Yu, YANG Feng-long, NING Xia, *et al.* (2936)

Characteristics, Source Analysis, and Health Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Pollution in Marine Organisms from Estuaries of Changhua River in Hainan Province ····· WANG Hui-juan, KUANG Ze-xing, ZHOU Xian, *et al.* (2942)

Characteristics of Macrobenthos Community Structure and Their Relationships with Environmental Factors in Rivers of Beijing in Spring ····· HE Yu-xiao, LI Ke, REN Yu-fen, *et al.* (2951)

Effect of Pyrolytic Temperature and Time on Characteristics of *Typha angustifolia* Derived Biochar and Preliminary Assessment of the Ecological Risk ····· CAI Zhao-hui, CHU Chen-jing, ZHENG Hao, *et al.* (2963)

Measurement of Traffic Carbon Emissions and Pattern of Efficiency in the Yangtze River Economic Belt (1985-2016) ····· JIANG Zi-ran, JIN Huan-huan, WANG Cheng-jin, *et al.* (2972)