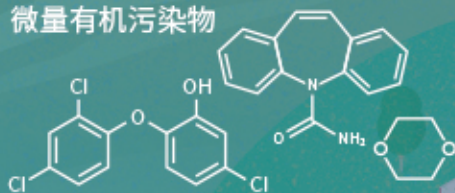


城市污水再生处理中微量有机污染物控制的关键难题与解决思路

王文龙, 吴乾元, 杜烨, 黄南, 陆韻, 魏东斌, 胡洪营

微量有机污染物



深度处理

- 污染物非靶向筛查
- 新型处理技术开发
- 处理效率替代性指标
- 工艺运行指南与排放标准

污水处理厂

深度处理

污水再生利用

湖泊湿地等

景观娱乐用水

下游城市河湖

污水达标排放

■ 主办 中国科学院生态环境研究中心

■ 出版 科学出版社



2021年6月

第42卷 第6期
Vol.42 No.6

目次

综述与专论

- 城市环境生物安全研究的进展与挑战 苏建强, 安新丽, 胡安谊, 朱永官 (2565)
城市污水再生处理中微量有机污染物控制的关键难题与解决思路 王文龙, 吴乾元, 杜焯, 黄南, 陆韻, 魏东斌, 胡洪莹 (2573)
污泥 EPS 作为阻燃剂的机制归纳与潜力分析 郝晓地, 赵梓丞, 李季, 时琛, 吴远远 (2583)

研究报告

- 北京大气 PM_{2.5} 载带金属浓度、来源及健康风险的城郊差异 周安琪, 刘建伟, 周旭, 毕思琪, 张博哈, 高越, 曹红斌 (2595)
京津冀及周边 MAIAC AOD 和 PM_{2.5} 质量浓度特征及相关性分析 金国因, 杨兴川, 晏星, 赵文吉 (2604)
天津市 PM_{2.5} 中二次硝酸盐形成及防控 肖致美, 武婷, 卫昱婷, 徐虹, 李立伟, 李鹏, 陈魁, 邓小文 (2616)
南京市大气细颗粒物(PM_{2.5})中硝基多环芳烃污染特征与风险评估 傅银银, 文浩哲, 王向华, 于南洋, 李冰, 韦斯 (2626)
汾渭平原吸收性气溶胶时空演化及潜在源区分析 刘旻霞, 李亮, 于瑞新, 宋佳颖, 张国娟, 穆若兰, 徐璐 (2634)
西南典型区域夏季大气含氧挥发性有机化合物来源解析
... 陈木兰, 王赛男, 陈天舒, 朱波, 彭超, 周佳维, 车汉雄, 黄汝辉, 杨复沐, 刘合凡, 谭钦文, 韩丽, 陈军辉, 陆克定, 陈阳 (2648)
气溶胶中溶解性有机质(DOM)液相氧化 陶冶, 陈彦彤, 李楠旺, 张敬宇, 叶招莲, 盖鑫磊 (2659)
基于 MERRA-2 再分析资料的上海市近 40 年大气黑碳浓度变化及潜在来源解析
... 曹闪闪, 段玉森, 高婵婵, 苏玲, 杨怡萱, 张洋, 蔡超琳, 刘敏 (2668)
石家庄市臭氧和二氧化氮的时空演替特征及来源解析 王帅, 聂赛赛, 冯亚平, 崔建升, 陈静, 刘大喜, 石文雅 (2679)
基于光化学指标法的邯郸市臭氧生成敏感性 牛元, 程水源, 欧盛菊, 姚诗音, 沈泽亚, 关攀博 (2691)
基于 Landsat 数据的关中盆地腹地 AOD 时空格局及城市化对其影响 郑玉蓉, 王旭红, 张秀, 胡贵贵, 梁秀娟, 牛林芝, 韩海青 (2699)
基于卫星遥感和地面观测的人为源 VOCs 区域清单多维校验 王玥, 魏巍, 任云婷, 王晓琦, 陈赛赛, 程水源 (2713)
中原城市群国家干线公路 SOA 生成潜势估算 王娜萍, 李海萍, 张帆 (2721)
北京市“大气十条”实施的空气质量改善效益 卢亚灵, 范朝阳, 蒋洪强, 牛传真, 李勃 (2730)
工业大气污染源排放绩效定量评价及应用 李廷昆, 冯银厂, 吴建会, 毕晓辉, 张裕芬 (2740)
基于生态风险的我国水环境高风险抗生素筛选排序 周力, 刘珊, 郭家骅, 李琦 (2748)
基于 RDA-REM 模型的我国再生水开发利用潜力 郑锦涛, 马涛, 刘九夫, 彭安帮, 邓晰元, 郑皓 (2758)
基于模型研究质量评价的 SWAT 模型参数取值特征分析 荣易, 秦成新, 杜鹏飞, 孙博 (2769)
大型浅水湖泊水质模型边界负荷敏感性分析 王亚宁, 李一平, 程月, 唐春燕, 陈刚 (2778)
不同流域水陆过渡带氮磷有效态的特征对比及环境意义 朱海, 袁旭音, 叶宏萌, 成瑾, 毛志强, 韩年, 周慧华 (2787)
基于不同赋权方法的北运河上游潜在非点源污染风险时空变化特征分析
... 李华林, 张建军, 张耀方, 常国梁, 时迪迪, 徐文静, 宋卓远, 于佩丹, 张守红 (2796)
长期施肥和耕作下紫色土坡耕地径流 TN 和 TP 流失特征 吴小雨, 李天阳, 何丙辉 (2810)
渭河和泾河流域浅层地下水水化学特征和控制因素 刘鑫, 向伟, 司炳成 (2817)
太湖流域上游南苕溪水系夏秋季水体溶存二氧化碳和甲烷浓度特征及影响因素
... 梁佳辉, 田琳琳, 周钟昱, 张海阔, 张方方, 何圣嘉, 蔡延江 (2826)
低温期浅水湖泊氮的分布及无机氮扩散通量:以白洋淀为例 文艳, 单保庆, 张文强 (2839)
覆盖条件下底泥微环境对内源磷释放的影响 陈姝彤, 李大鹏, 徐楚天, 张帅, 丁玉琴, 孙培荣, 黄勇 (2848)
圩区河道底泥腐殖酸对重金属和抗生素的共吸附 薛向东, 杨宸豪, 于荐麟, 庄海峰, 方程冉 (2856)
两种 PPCPs 对雅鲁藏布江沉积物硝化作用的影响 凌欣, 徐慧平, 陆光华 (2868)
铁碳微电解及沸石组合人工湿地的废水处理效果 赵仲婧, 郝庆菊, 张尧钰, 熊维霞, 曾唯, 陈俊江, 江长胜 (2875)
CDs-BOC 复合催化剂可见光下活化过硫酸盐降解典型 PPCPs 雷倩, 许路, 艾伟, 李志敏, 杨磊 (2885)
pg-C₃N₄/BiOBr/Ag 复合材料的制备及其光催化降解磺胺甲噁唑 杨利伟, 刘丽君, 夏训峰, 朱建超, 高生旺, 王洪良, 王书平 (2896)
海藻酸钠负载硫化零价铁对水体中 Cr(VI) 的还原去除 王旭, 杨欣楠, 黄币娟, 刘壮, 李诗萌, 程敏, 谢燕华 (2908)
超顺磁性纳米 Fe₃O₄@SiO₂ 功能化材料对镉的吸附机制 张立志, 易平, 方丹丹, 王强 (2917)
典型药物在医院废水和城市污水处理厂中的污染特征及去除情况 叶璞, 游文丹, 杨滨, 陈阳, 汪立高, 赵建亮, 应光国 (2928)
印染废水循环利用抗生素抗性基因丰度变化特性 徐瑶瑶, 王锐, 金鑫, 石炬, 王岩, 金鹏康 (2937)
短程硝化反硝化除磷颗粒污泥的同步驯化 王文琪, 李冬, 高鑫, 刘博, 张杰 (2946)
厌氧氨氧化颗粒污泥的长期保藏及快速活性恢复 李冬, 刘名扬, 张杰, 曾辉平 (2957)
市政污泥热解过程中重金属迁移特性及环境效应评估 姜媛媛, 王彦, 段文焱, 左宁, 陈芳媛 (2966)
不同作物农田土壤抗生素抗性基因多样性 黄福义, 周曙仡, 王佳妮, 苏建强, 李虎 (2975)
宁夏养牛场粪污和周边土壤中抗生素及抗生素抗性基因分布特征 张俊华, 陈睿华, 刘吉利, 尚天浩, 沈聪 (2981)
温度和搅拌对牛粪厌氧消化系统抗生素抗性基因变化和微生物群落的影响
... 许继飞, 张秋萍, 朱天骄, 秦帅, 朱文博, 庞小可, 赵吉 (2992)
小麦秸秆生物质炭施用对不同耕作措施土壤碳含量变化的影响 刘振杰, 李鹏飞, 黄世威, 金相乐, 张阿凤 (3000)
农牧交错带典型区土壤氮磷空间分布特征及其影响因素 张燕江, 王俊鹏, 王瑜, 张兴昌, 甄庆, 李鹏飞 (3010)
汞矿区周边土壤重金属空间分布特征、污染与生态风险评价 王锐, 邓海, 贾中民, 王佳彬, 余飞, 曾琴琴 (3018)
调理剂对磷富集土壤中两种元素交互作用的影响 黄洋, 胡学玉, 曹坤坤, 张敏, 胡晓晓, 王子劲 (3028)
S-烯丙基-L-半胱氨酸缓解水稻种子幼根和幼芽镉胁迫机制 程六龙, 黄永春, 王常荣, 刘仲齐, 黄益宗, 张长波, 王晓丽 (3037)
连续 4 个生长季大气 CO₂ 升高与土壤铅(Pb)污染耦合下刺槐幼苗根际土壤微生物特征
... 贾夏, Lkhagvajargal Khadkhurel, 赵永华, 张春燕, 张宁静, 高云峰, 王子威 (3046)
嗜热脂肪地芽孢杆菌对聚苯乙烯的降解性能 邢睿智, 赵子强, 赵文琪, 陈志, 陈金凤, 周顺桂 (3056)
冬青和女贞叶表面颗粒物微形态及叶际细菌群落结构 李慧娟, 徐爱玲, 乔凤禄, 蒋敏, 宋琪 (3063)
罗红霉素对大型溞生殖生长及抗氧化系统的影响 张凌玉, 刘建超, 冷阳, 陆光华 (3074)
中国粮食作物产量和木本植物生物量与地表臭氧污染的响应关系 冯兆忠, 彭金龙 (3084)
《环境科学》征订启事(2698) 《环境科学》征稿简则(2712) 信息(3027, 3055, 3073)

宁夏养牛场粪污和周边土壤中抗生素及抗生素抗性基因分布特征

张俊华¹, 陈睿华², 刘吉利^{1*}, 尚天浩², 沈聪³

(1. 宁夏大学生态环境学院, 银川 750021; 2. 宁夏大学地理科学与规划学院, 银川 750021; 3. 宁夏大学生命科学学院, 银川 750021)

摘要: 畜禽粪便是抗生素和抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)重要的储存库。为揭示宁夏肉牛养殖场牛粪和养殖场周边土壤中抗生素及 ARGs 的分布特征,采用超高效液相色谱-串联质谱法和高通量荧光定量法对不同规模的养牛场进行调查研究。结果表明:①牛粪中优势抗生素为四环素类、喹诺酮类和磺胺类。不同养殖期牛粪中抗生素含量差异显著;育肥前期和哺乳期抗生素含量较高,犊牛期相反。②土壤中以喹诺酮类和四环素类抗生素为主,喹诺酮类抗生素检出率和含量都最高。养殖场对周边土壤中抗生素的分布无影响;施用牛粪的土壤中喹诺酮类和四环素类抗生素含量显著增加。③牛粪中共检测到 ARGs 亚型 79~142 种,其中氨基糖苷类 ARGs 数目最多。育成期 ARGs 数目最多且相对丰度最高,犊牛期相反。所有养殖期牛粪中共存 ARGs 是 *tetQ*、*ermF* 和 *tetO-01*。④土壤中 ARGs 亚型有 35~79 种,主要是多药类和氨基糖苷类 ARGs。养殖场对周边土壤中 ARGs 的数目和相对丰度无影响;施用牛粪的土壤中 ARGs 数目和相对丰度都显著高于其他土壤。⑤磺胺类和氯霉素类 ARGs 在牛粪和土壤中都有水平移动的风险。牛粪中氨基糖苷类和四环素类 ARGs 相对丰度与其对应抗生素含量呈极显著相关。⑥对牛粪和土壤中各类 ARGs 相对丰度而言,氨基糖苷类与磺胺类和氯霉素类、可移动遗传元件(mobile genetic elements, MGEs)与氨基糖苷类和磺胺类均呈显著或极显著正相关,而大环内酯类与万古霉素类则呈显著负相关。本研究结果可为肉牛不同养殖期抗生素的使用和牛粪施用等提供理论依据。

关键词: 抗生素; 抗生素抗性基因(ARGs); 可移动遗传元件(MGEs); 牛粪; 养殖期; 土壤

中图分类号: X53 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2021)06-2981-11 DOI: 10.13227/j.hjxx.202011075

Distribution Characteristics of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Manure and Surrounding Soil of Cattle Farms in Ningxia

ZHANG Jun-hua¹, CHEN Rui-hua², LIU Ji-li^{1*}, SHANG Tian-hao², SHEN Cong³

(1. School of Ecology and Environment, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 2. School of Geography and Planning, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 3. School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: Livestock breeding intensively uses veterinary antibiotics in concentrated feeding operations to improve growth and control disease. Consequently, livestock and poultry manure is an important repository of antibiotics and antibiotic resistance genes (ARGs). To understanding the distribution of antibiotics and ARGs in manure and surrounding soils of cattle farms in Ningxia, cattle manure from five breeding periods (lactation, calving, growing, pre-fattening, and post-fattening periods) and comparative soil samples were collected from the largest beef-breeding area in Ningxia. The compositions of ARGs in the samples were analyzed by UPLC-MS/MS and HT-qPCR. The results showed that: ① Tetracycline, quinolone, and sulfonamide were the dominant antibiotics in cattle manure. The content of antibiotics in the manure varied greatly between different breeding periods. High amounts of antibiotics were detected during the pre-fattening and lactation periods, and the lowest amounts were detected during the calving period. ② Quinolone and tetracycline were the dominant antibiotics in the soils, and the detection rate and content of quinolone were highest. The cattle farms did not affect the distribution of antibiotics in the surrounding soils. The content of quinolone and tetracycline in the soils with cattle manure application were significantly higher than control and surrounding soils. ③ We detected 79-142 ARGs in cattle manure, with aminoglycosides the most common form. The number and relative abundance of ARGs were highest during the growing period and lowest during the calving period. The dominant ARGs were *tetQ*, *ermF*, and *tetO-01* across all the breeding periods. ④ There were 35-79 ARGs in the tested soils, and multidrug and aminoglycoside ARGs were dominant. The cattle farms did not affect the number and relative abundance of ARGs in the surrounding soils; however, manure application significantly affected the number and relative abundance of ARGs. ⑤ Sulfonamide and chloramphenicol ARGs are at risk of mobilization and horizontal transport. A correlation analysis showed that the relative abundances of aminoglycoside and tetracycline in cattle manure were significantly positively correlated with their contents. ⑥ Aminoglycoside, sulfonamide, chloramphenicol, and mobile genetic elements (MGEs) in manure were significantly or extremely significantly positively correlated with aminoglycosides and sulfonamides in the soils, whereas macrolides were negatively correlated with vancomycin. These results provide baseline data to inform controls on the variety and dosages of feed and

收稿日期: 2020-11-09; 修订日期: 2020-12-02

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发项目(2019BFG02015)

作者简介: 张俊华(1977~),女,博士,研究员,博士生导师,主要研究方向为土壤质量提升及微生物资源开发与利用, E-mail: zhangjunhua728@163.com

* 通信作者, E-mail: 18295172155@163.com

veterinary drugs in cattle farms and the application of organic fertilizers in agriculture.

Key words: antibiotic; antibiotic resistance genes (ARGs); mobile genetic elements (MGEs); cattle manure; breeding periods; soils

作为 20 世纪最重要的发现之一, 抗生素曾挽救了无数生命. 如今却由于过量使用和滥用, 细菌耐药性不断进化、增强, 甚至出现了能耐受几乎所有抗生素的“超级细菌”, 从而使受感染人群面临死亡的风险^[1]. 世界卫生组织已将 ARGs 作为 21 世纪威胁人类健康的最重大挑战之一^[2]. 中国是抗生素生产和消费大国, 其中 52% 为兽用抗生素^[3], 这些兽用抗生素有 30%~90% 不能被动物完全吸收, 而是以母体化合物的形式随粪便排出体外^[4]. 据英国抗生素耐药评估委员会预测, 如果目前抗生素滥用的情况得不到改善, 到 2050 年中国将有 100 万人因耐药菌感染而死亡^[5].

Heuer 等^[6]的研究指出, 抗生素抗药性通过农业传播对人类健康的影响可能大于医院传播. 养殖粪便已成为抗生素和抗生素抗性基因 (antibiotic resistance genes, ARGs) 重要的储存库, 如不加以处理控制, ARGs 便会随着农用进一步污染土壤等环境介质, 并有可能通过直接或间接途径进入食物链和人体, 危害人类公共健康^[4]. 畜禽养殖涉及的抗生素种类主要有磺胺类、四环素类、氟喹诺酮类、大环内酯类、 β -内酰胺类、氨基糖苷类和林可酰胺类等^[7,8]. 猪、鸡和其他粪便内普遍检测到高水平的抗生素^[9,10]. 在动物粪便中, 由于代谢物再转化回母体化合物, 抗生素的浓度非常稳定, 甚至会增加^[11]. 猪口服¹⁴C 标记磺胺嘧啶 10 d 后, 连续 4 d 96% 以上的药物作为母体化合物或代谢物排出体外^[12], 二氟沙星和磺胺嘧啶都有类似的研究结果^[13]. 不同类型或相同类型不同地区的畜禽粪便中抗生素种类和浓度差异可能较大^[8~11].

ARGs 通常位于质粒、转座子和整合子等可移动遗传元件 (mobile genetic elements, MGEs) 上, 通过基因水平转移在菌群间迁移, 引起抗生素耐药菌的扩散, 甚至可能转移到人类共生微生物和病原体中^[14,15]. 澳大利亚某养殖场鸡粪、牛粪和猪粪中分别检出 127、109 和 136 种 ARGs, 3 种粪便中共存 86 种^[16]. 加拿大某奶牛场牛粪中发现 114 种 ARGs, 其中大环内酯-林可酰胺-链阳菌素 B 类、四环素类、氨基糖苷类、多药类和 β -内酰胺类 ARGs 分别有 28、21、19、18 和 16 种^[17]. 国内某大型猪场粪肥中检测到 149 种 ARGs, 与不使用抗生素的粪肥相比, 这些基因的含量增加了 192~28 000 倍^[18]. 由于这些粪便通常被农民用作肥料, 所以粪肥中的抗生素和 ARGs 及相关的环境风险是全球关注的焦

点^[19]. Karci 等^[20]的研究指出, 农业土壤中抗生素和 ARGs 含量因重复施用粪肥而增加. 农田中大量兽用抗生素和生物活性代谢物可持续存在数月至数年^[21]. 长期施用粪肥一般都会增加土壤中抗生素含量, 但随着土壤深度的增加, 抗生素和 ARGs 含量普遍降低^[22]. 在猪场周围的环礁湖和土壤中, 抗生素含量和 ARGs 相对丰度之间具有显著相关性^[19]. 也有研究表明, 抗生素含量并不直接影响 ARGs 的传播^[23]. 目前, 关于畜禽重要养殖期粪便中抗生素和 ARGs 的分布特征研究较少, 养殖场的存在对周边土壤抗生素和 ARGs 的影响也没有一致结论.

肉牛养殖是宁夏南部山区的支柱产业之一, 宁夏肉牛养殖场粪污中抗生素和 ARGs 处于何种水平? 哪个养殖期粪污中抗生素及 ARGs 水平最高? 养殖场的存在对周边土壤抗生素和 ARGs 有多大影响? 施用牛粪后土壤中抗生素和 ARGs 分布有无显著变化? 为了回答以上问题, 本文系统研究了不同养殖期牛粪中抗生素种类和含量及 ARGs 相对丰度状况, 明确了养殖场周边及施用牛粪的土壤中抗生素和 ARGs 分布特征, 以期为当地肉牛养殖场兽药抗生素种类的选择、用量及相关有机肥的科学施用提供依据.

1 材料与方法

1.1 样品采集及处理

宁夏固原市西吉县是目前全区肉牛存栏量最大的县市. 本研究在该县选取规模不同的肉牛养殖场 10 家 (具体情况见表 1)^[24]. 同一家养殖场相同养殖时间视为同一个处理, 相同处理取多点 (同一圈舍采集 3 份样品) 充分混合为一个样, 所有养牛场共采集新鲜粪污样品 (牛粪) 27 个. 为便于分析, 根据肉牛生长期将牛粪样品分为 5 个时期: 哺乳期 (0~2 个月, C1)、犊牛期 (2~6 个月, C2)、育成期 (6~12 个月, C3)、育肥前期 (12~18 个月, C4) 和育肥后期 (18 个月以上, C5).

为研究养殖场对周边土壤抗生素和 ARGs 的影响, 选择其中两家规模较大的养牛场 (表 1 中序号为 3 和 4), 在距离养牛场西侧 20、50、100、200 和 300 m 处分别采集 0~20 cm 土壤作为养牛场周边土壤样品 (D1、D2、D3、D4 和 D5). 同时, 在各养殖场院内采集施用了牛粪的农用地土壤表层样品 14 个 (AC). 此外, 在远离所有养殖场 5 km 的荒地上采集对照土壤样品 3 个 (CK). 土样均采用五点取样

表 1 样本基本信息

Table 1 Basic information of samples					
序号	养殖时间/a	养殖规模/头	品种	牛粪样品	土壤样品来源
1	5	260	西门塔尔	C1、C4 和 C5	茄子地
2	13	290	秦川、西门塔尔和夏洛莱	C2、C3 和 C4	西红柿地和辣椒地
3	6	600	西门塔尔和安格斯	C2 和 C3	豆角地
4	4	400	西门塔尔和安格斯	C2、C3 和 C5	西红柿地
5	12	310	西门塔尔和夏洛莱	C2 和 C4	西红柿地
6	4	230	秦川、西门塔尔和安格斯	C2、C3 和 C5	青菜地和豆角地
7	6	180	西门塔尔	C3 和 C5	辣椒地
8	13	120	西门塔尔	C1、C3 和 C4	西红柿地和豆角地
9	7	200	西门塔尔和夏洛莱	C1、C3、C4 和 C5	玉米地
10	7	300	西门塔尔和安格斯	C1 和 C3	西红柿地和茄子地

法,每个样品约 1.0 kg.

采集的牛粪和土壤样品冷冻于 -80℃ 冰箱用于抗生素和 ARGs 的测定.

1.2 抗生素检测

采用超高效液相色谱-串联质谱法 (UPLC-MS/MS),对牛粪和土壤中的氨基糖苷类(林可霉素、庆大霉素、卡那霉素、新霉素)、四环素类(土霉素、金霉素、四环素、强力霉素)、喹诺酮类(诺氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、氧氟沙星、培氟沙星)、磺胺类(磺胺嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺甲噁唑、磺胺二甲氧嘧啶)、大环内酯类(红霉素、泰乐霉素、罗红霉素)和β-内酰胺类 6 大类共 21 种抗生素进行检测.

1.2.1 提取

称取 1.0 g 样品于 15 mL 离心管中,加入 EDTA-McIlvaine 缓冲溶液:乙腈 = 5:5 (pH ≈ 4.9) 10 mL 提取,然后置于超声波清洗器中超声 20 min, 4 000 r·min⁻¹ 条件下离心 10 min 后收集上清液,重复提取 2 次,第 3 次提取液为 5 mL,合并 3 次的提取液.准确量取 5 mL 混合提取液,氮吹至约 2.5 mL(移除乙腈),用蒸馏水补足至 5 mL,待净化.

1.2.2 净化

HLB 固相萃取柱依次用甲醇 3 mL、水 3 mL 和 EDTA-McIlvaine 缓冲溶液 3 mL 活化,准确移取备用液 5 mL 过柱,水 3 mL 淋洗,抽干.用甲醇 5 mL 洗脱,收集洗脱液,于 40℃ 下氮气吹干.准确加入 50% 甲醇溶液 1 mL 溶解残余物,混匀后过微孔滤膜过滤,供液相色谱-串联质谱仪测定.

液相色谱-串联质谱法检测抗生素的检测条件和检出限等详细信息见文献[25].

1.3 DNA 提取

使用 FastDNA[®] Spin Kit for soil (MP Biomedical, Santa Ana, California, USA) 试剂盒提取样品微生物基因组,按说明书操作步骤进行.分别用

琼脂糖凝胶和 NanoDrop ND-1000 (Nanodrop, USA) 检验 DNA 纯度和浓度.

1.4 抗生素抗性基因的高通量荧光检测

采用 Wafergen SmartChip 实时荧光定量 PCR 系统完成,该系统可用于大规模基因表达研究.共使用 296 对引物集,包括 295 个几乎针对所有大类的 ARGs、MGEs 和 1 个 16S rRNA 基因.在 95℃ 初始酶活化 10 min 后,95℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s,共 40 个循环;融化过程由 wafergen 软件自动生成.然后用 qPCR 软件对结果进行分析,剔除多峰或扩增效率超过 90%~110% 的样品.根据系统的灵敏度和精确度,确定循环次数 CT 值为 31 时作为仪器的检测限.阳性样品同时有 3 个复制的条件下进行筛选,计算相对拷贝数.所有浓度 ≥ 10 ng·μL⁻¹ 的样本 16S rRNA 内参基因全部检出,NTC 无扩增^[26].相对丰度计算如下:

抗性基因相对拷贝数 = 10^[(31-CT)/(10/3)]

抗性基因相对丰度 = $\frac{\text{抗性基因相对拷贝数}}{\text{16S rRNA 基因相对拷贝数}}$
式中,CT 表示高通量荧光定量所测定的循环阈值.

1.5 数据分析

采用 Excel 2010 分析不同处理中抗生素和 ARGs 的组成特征,利用 R 语言绘制热图和韦恩图.

2 结果与讨论

2.1 牛粪和土壤中抗生素种类和含量

2.1.1 不同养殖期牛粪中抗生素种类和含量

检测结果显示,整个养殖期牛粪中优势抗生素为四环素类、喹诺酮类和磺胺类(表 2),其中环丙沙星、强力霉素和土霉素的最高含量超过 1 000 μg·kg⁻¹.此外,还有氨基糖苷类和大环内酯类,而β-内酰胺类抗生素未检出.其中,磺胺甲噁唑检出率最高(52.94%),林可霉素、卡那霉素、新霉素、红霉素、罗红霉素、氧氟沙星和培氟沙星均未检出.四环素类和磺胺类抗生素使用广泛且在环境中具有

持久性^[19,27],是动物粪便中发现最频繁的种类^[28].根据本研究实地调查,氨基糖苷类和喹诺酮类也是当地养殖户常用的抗生素种类. Tang 等^[10]指出在中

国北方地区,畜禽粪便中检出率最高的抗生素是四环素类,其次是喹诺酮类、磺胺类和大环内酯类,与本研究结果略有不同.

表 2 牛粪中抗生素含量

Table 2 Contents of antibiotics in cattle manure

种类	名称	最大值 / $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	最小值 / $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	平均值 / $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	检出率 /%	种类	名称	最大值 / $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	最小值 / $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	平均值 / $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	检出率 /%
氨基糖苷类	林可霉素	0	0	0	0	磺胺类	磺胺嘧啶	65.2	0	1.63	5.88
	庆大霉素	181.43	0	12.9	11.76		磺胺甲噁啶	18.24	0	0.46	5.88
	卡那霉素	0	0	0	0		磺胺甲噁唑	26.31	0	10.76	52.94
	新霉素	0	0	0	0		磺胺二甲氧嘧啶	3.24	0	0.52	41.18
四环素类	土霉素	1 084	0	126.43	23.53	喹诺酮类	诺氟沙星	623.69	0	99.51	29.41
	金霉素	183.61	0	50.22	29.41		恩诺沙星	216.8	0	5.42	5.88
	四环素	122.61	0	25.04	17.65		环丙沙星	3 388	0	526.6	17.65
	强力霉素	2 396	0	240.72	17.65		氧氟沙星	0	0	0	0
大环内酯类	红霉素	0	0	0	0		培氟沙星	0	0	0	0
	泰乐菌素	0.073	0	0.005 6	17.65	β -内酰胺类	—	0	0	0	0
	罗红霉素	0	0	0	0						

不同养殖期牛粪中抗生素种类和含量差异都较大(表 3):哺乳期四环素类抗生素含量较高(平均 $402.19\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$),其中强力霉素含量高达 $1\ 198\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.犊牛期抗生素种类最少且平均含量最低.育成期抗生素种类较多,只有 β -内酰胺类未检出.育肥前期抗生素种类与育成期相同,但环丙沙星含量高达 $1\ 694\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,其他抗生素含量普遍低于育成期.育肥后期抗生素含量都较低.哺乳期牛粪中抗生素含量较高可能是出于防病和促生长等目的,在畜禽幼龄期

大剂量使用多种抗生素,而动物长成后抵抗力增加,需要的抗生素较少^[29].统计结果显示,不同养殖期各种抗生素含量差异较大,这是由于每个养殖场肉牛健康状况不同,养殖户给牛使用的抗生素的量也大不相同.值得注意的是,肉牛养殖中后期牛粪中环丙沙星含量较高.该抗生素具有抗菌谱广、半衰期长、药物快速发展的特点^[30],但在农业土壤中矿化率极低,生物难降解且易吸附^[31].所以建议养殖户尽量少用或不用环丙沙星,而用青霉素类药物来替代.

表 3 不同养殖期牛粪中抗生素含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$

Table 3 Contents of antibiotics in cattle manure during different breeding periods/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$

种类	名称	C1	C2	C3	C4	C5
氨基糖苷类	林可霉素	0	0	0	0	0
	庆大霉素	0	0	60.48 ± 44.72	4.03 ± 2.69	0
	卡那霉素	0	0	0	0	0
	新霉素	0	0	0	0	0
四环素类	土霉素	225.6 ± 53.23	21.6 ± 18.71	361.33 ± 127.90	23.60 ± 14.25	0
	金霉素	98.22 ± 24.37	21.05 ± 18.23	61.20 ± 44.76	53.49 ± 30.65	17.13 ± 3.25
	四环素	86.93 ± 31.73	0	22.94 ± 17.20	0	15.33 ± 1.84
	强力霉素	$1\ 198 \pm 599.00$	0	0	3.92 ± 3.29	1.69 ± 0.49
喹诺酮类	诺氟沙星	101.66 ± 25.41	0	60.04 ± 40.64	234.38 ± 60.18	101.49 ± 35.22
	恩诺沙星	0	0	0	0	27.10 ± 18.48
	环丙沙星	0	0	909.33 ± 692.98	$1\ 694.00 \pm 757.58$	29.65 ± 23.03
	氧氟沙星	0	0	0	0	0
	培氟沙星	0	0	0	0	0
磺胺类	磺胺嘧啶	0	0	0	0	8.15 ± 4.58
	磺胺甲噁啶	0	0	0	0	2.28 ± 0.21
	磺胺甲噁唑	26.31 ± 5.37	8.30 ± 3.59	9.79 ± 5.46	5.78 ± 4.55	3.61 ± 1.19
	磺胺二甲氧嘧啶	0	0.24 ± 0.14	1.11 ± 0.80	1.04 ± 0.52	0.20 ± 0.025
大环内酯类	红霉素	0	0	0	0	0
	泰乐菌素	0	0	$0.019 \pm 0.008\ 2$	0	$0.009\ 1 \pm 0.005\ 2$
	罗红霉素	0	0	0	0	0
β -内酰胺类	—	0	0	0	0	0

2.1.2 养殖场周边及施用牛粪的土壤中抗生素种类和含量

所有供试土壤中共检测到 4 大类抗生素(表 4),以喹诺酮类和四环素类抗生素为主,其中喹诺酮类检出率(22.7%)和含量(平均为 $4.14\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)都最高,氨基糖苷类和磺胺类检出率和含量都很低,大环内酯类和 β -内酰胺类均未检出.距养殖场 50 m 处土壤中检出 4 种抗生素,其中四环素和诺氟沙星的含量都超过 $1.0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,其他距离处土壤中抗生素种类和含量都很低.土壤中抗生素种类和含量并没有随距离养殖场的远近而呈现出规律性分布.孔晨晨等^[32]选取了我国北部典型农副产品生产基地,发现抗生素含量与距养殖场距离呈显著

负相关,与本研究结论不同.这可能是由于本研究区养牛场牛粪收集都采用干清粪方式,不用水冲洗,且该地区降雨量低,所以抗生素随水流失转移到养殖场周边的可能性大大减小,此外养牛场多建在相对偏僻、荒凉的地方,土壤本底污染少,所以短期内养殖场并未影响周边土壤抗生素分布.

施用牛粪的土壤中检测到喹诺酮类、四环素类和磺胺类抗生素,其中喹诺酮类抗生素含量最高,平均为 $27.63\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,四环素、强力霉素和磺胺嘧啶含量在 $1\sim 10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 之间.所以施用牛粪会显著提高土壤中喹诺酮类和四环素类抗生素的含量.由于土壤中检测到的抗生素含量整体较低,所以各处理检测值的差异相对也较小.

表 4 养殖场周边和施用牛粪的土壤中抗生素含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$
Table 4 Contents of antibiotics in soils around farms and with cattle manure application/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$

种类	名称	CK	D1	D2	D3	D4	D5	AC
氨基糖苷类	林可霉素	0	0	0	0	0	0	0
	庆大霉素	0	0	0	0	0.058 ± 0.032	0	0
	卡那霉素	0	0	0	0	0	0	0
	新霉素	0	0	0	0	0	0	0
四环素类	土霉素	0	0	0	0	2.32 ± 0.18	0	0
	金霉素	0	0	0	0	0	0	0
	四环素	0.029 ± 0.011	0	1.50 ± 0.052	0	0	0	8.63 ± 2.61
	强力霉素	0	0	0	0	0	0	5.26 ± 1.57
喹诺酮类	诺氟沙星	0	0	3.14 ± 2.16	0	0	0	32.94 ± 10.95
	恩诺沙星	0	0	0	0.57 ± 0.28	0	0	57.40 ± 23.58
	环丙沙星	0	0	0.89 ± 0.074	0	0	0	11.07 ± 1.76
	氧氟沙星	0	0	0	0	0	0	27.83 ± 12.62
	培氟沙星	0	2.25 ± 1.03	0	0	0	0	8.93 ± 3.84
磺胺类	磺胺嘧啶	0	0	0	0	0	0	1.02 ± 0.07
	磺胺甲噁唑	0	0	0.037 ± 0.0029	0	0	0	0
	磺胺甲噁唑	0	0	0	0	0	0.054 ± 0.014	0
	磺胺二甲氧嘧啶	0	0	0	0	0	0	0
大环内酯类	红霉素	0	0	0	0	0	0	0
	泰乐菌素	0	0	0	0	0	0	0
	罗红霉素	0	0	0	0	0	0	0
β -内酰胺类	-	0	0	0	0	0	0	0

2.2 牛粪和土壤中抗生素抗性基因多样性

2.2.1 不同养殖期牛粪中抗生素抗性基因多样性

肉牛不同养殖期粪便中共检测到抗生素 ARGs 亚型 79~142 种,其中相对丰度大于 0.000 5 的有 11~64 种,主要隶属于氨基糖苷类(22.6%)[图 1(a)]、四环素类(20.3%)、多药类(18.4%)和大环内酯类(12.3%),MGEs 占比为 10.4%.所有牛粪中检测到的喹诺酮类 ARGs 亚型只有 *qnrA*,但相对丰度均小于 5×10^{-4} ,故下文中均未出现.由 MGEs 导致的 ARGs 的水平转移是造成 ARGs 污染广泛、严重且日益恶化的主要原因,所以 MGEs 是导致耐药基因在细菌间水平转移重要的指示基因^[2].本研究牛粪中 MGEs 种类多于 β -内酰胺类、磺胺类、氯

霉素类和万古霉素类 ARGs,因此也有造成 ARGs 污染的风险.

整体来看,牛粪中氨基糖苷类 ARGs 数目最多,其次为四环素类和多药类,万古霉素类最少[图 2(a)].除犊牛期外,其他 4 个养殖期牛粪中都有 9 类 ARGs.育成期 ARGs 数目最多(64 个),哺乳期次之(60 个),犊牛期最少(11 个).牛粪中 ARGs 平均相对丰度由高到低分别为:四环素类、氨基糖苷类、多药类、大环内酯类、 β -内酰胺类、磺胺类、氯霉素类、其他和万古霉素类[图 2(b)].育成期各类 ARGs 丰度最高;哺乳期虽然 ARGs 数目较多,但相对丰度居 5 个养殖期中间;犊牛期 ARGs 相对丰度最低,只有四环素类、 β -内酰胺类和多药类 3 类

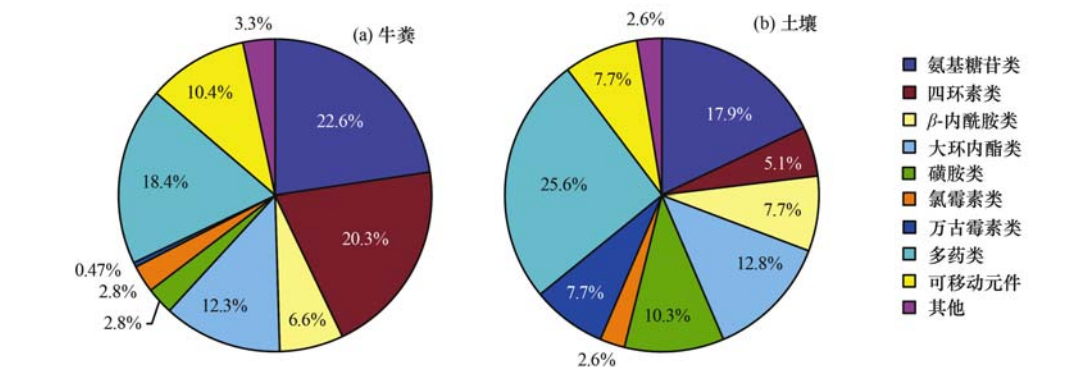


图 1 牛粪及养殖场周边土壤中抗生素抗性基因种类
Fig. 1 Variety of antibiotic resistance genes in cattle manure and soil

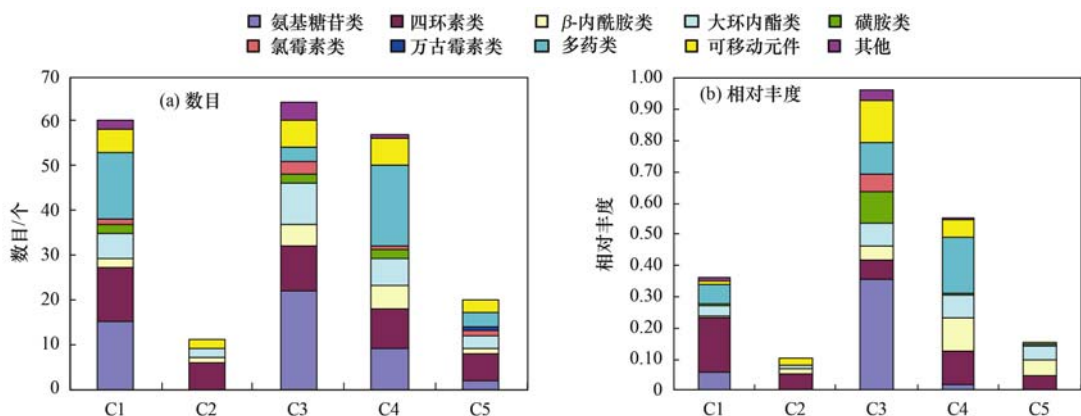


图 2 不同养殖期牛粪中抗生素抗性基因与可移动元件的数目及相对丰度
Fig. 2 Number and relative abundance of ARGs and MGEs in cattle manure during different breeding periods

ARGs 及 MGEs.

2.2.2 养牛场周边及施用牛粪的土壤中抗生素抗性基因多样性

供试土壤中共检测到 ARGs 亚型 35 ~ 79 种,其中丰度大于0.000 5的亚型有 2 ~ 13 种,主要由多药类(25.6%)、氨基糖苷类(17.9%)、大环内酯类(12.8%)和磺胺类(10.3%) ARGs 组成[图 1(b)].距离养殖场 50 m 处的土壤中 ARGs 数目相对较多[图 3(a)], 300 m 处土壤最少.施用了牛粪的土壤

中 ARGs 种类和数目都显著高于其他土壤.从相对丰度的角度看[图 3(b)],施用了牛粪的土壤中 ARGs 相对丰度分别比对照土壤和养殖场周边土壤平均增加了 5.40 倍和 1.56 倍.结果表明施用粪肥后土壤中 ARGs 种类和数量都显著增加,与前人的研究结果基本一致^[33,34].

2.3 牛粪和土壤中抗生素抗性基因组成

2.3.1 不同养殖期牛粪中抗生素抗性基因组成

哺乳期牛粪中相对丰度较高的有四环素类

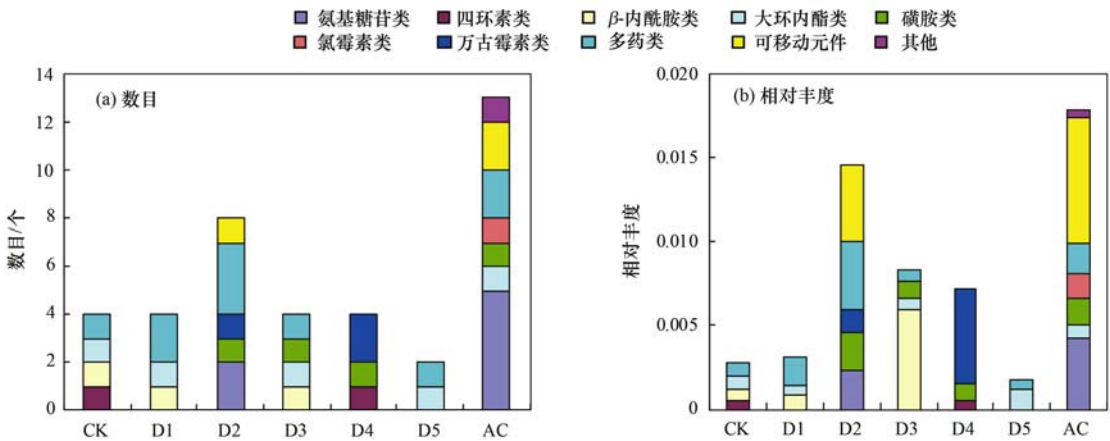


图 3 养殖场周边及施用牛粪的土壤中抗性基因与可移动元件的数目及相对丰度
Fig. 3 Number and relative abundance of ARGs and MGEs in soil around cattle farms and with cattle manure application

tetO-01、*tet*(32)和*tetQ*、氨基糖苷类*aadA-02*、*aadA-01*、大环内酯类*ermF*和*ermB*等ARGs(图4).犊牛期四环素类*tetQ*、*tetO-01*、 β -内酰胺类*cfxA*和MGEs*Tp614*相对丰度较高.育成期ARGs和MGEs种类最多且相对丰度也较高.育肥前期丰度较高的有 β -内酰胺类*cfxA*和*bacA-02*、四环素类*tetQ*、*tetO-01*和*tetX*、大环内酯类*ermF*和*mefA*,MGEs*Tp614*和*tnpA-05*相对丰度也较高.育肥后期主要有 β -内酰胺类*cfxA*、大环内酯类*mefA*和*ermF*、四环素类*tetQ*、*tetX*和*tetO-01*,MGEs主要是*Tp614*.

整个养殖期牛粪中共存ARGs有3个[图5(a)],分别是*tetQ*、*ermF*和*tetO-01*.此外,*aadA-02*、*aadA-01*、*strB*、*cfxA*、*mefA*及*Tp614*存在也较普遍.其中*tetQ*是家畜体内最丰富的四环素类抗性基因,通常与共轭转座子有关^[18].

2.3.2 养牛场周边及施用牛粪的土壤中抗生素抗性基因组成

在对照土壤、距养牛场20、100和300m处(图6),所有ARGs相对丰度都小于0.1,其他2个距离处丰度较高且常见的有*sul2*、*acrA-04*和*acrA-05*.有研究表明,禽畜养殖场周围土壤ARGs丰度较于正常土壤显著偏高,抗性基因污染严重^[34],与本研究的结论不一致.原因与养殖场周边土壤中抗生素种类少且含量低这一现象相同.施用牛粪的土壤中相对丰度较高的亚型有*sul2*、*cmx(A)*、*aadA2-03*、*oprD*和*tnpA-04*及整合子*intI-1(clinic)*.I类整合子(integron genes *I*,*intI-1*)是细胞内获得ARGs的活动基因元件,是最早被发现的整合子,与革兰氏阴性致病菌有密切联系,广泛存在于畜禽粪便等各种环境介质中^[18].施用了牛粪的土壤中*intI-1(clinic)*丰度较高,说明该类土壤中ARGs

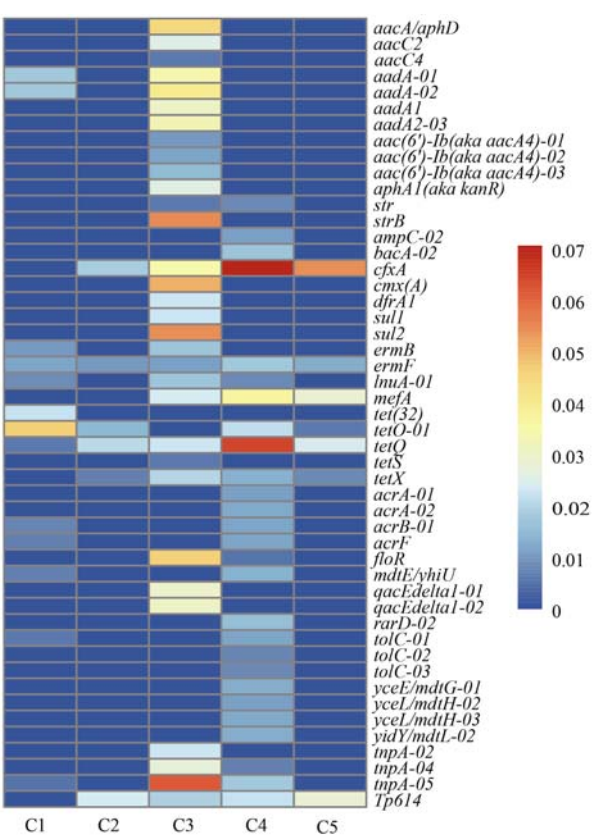


图4 不同养殖期牛粪中抗生素抗性基因与可移动元件的相对丰度

Fig. 4 Relative abundances of ARGs and MGEs in cattle manure during different breeding periods

横向转移的可能性更大^[2].有研究发现在施用了猪粪的水稻土中转座子基因丰度是未施猪粪土壤的15.5倍^[34],表明转座子类基因在施用猪粪土壤中富集,与本研究的结论相似.因此,本研究区土壤施用牛粪也需要注意土壤中ARGs富集问题.由于养殖场周边土壤中ARGs普遍较少,故所有供试土壤只有一个共存ARGs亚型[图5(b)],即磺胺类*sul2*.

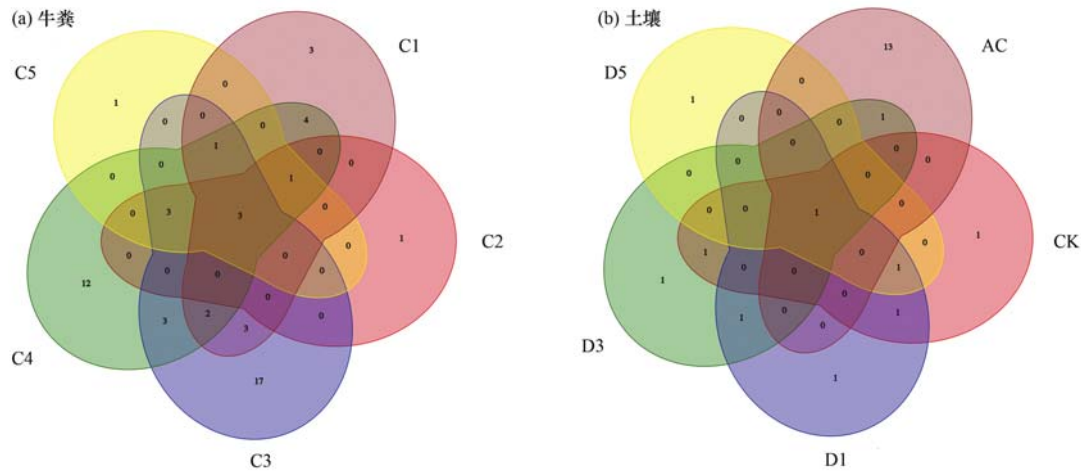


图5 牛粪及养殖场周边土壤中抗生素抗性基因韦恩图

Fig. 5 Venn diagram of antibiotic resistance genes in cattle manure and soils around cattle farms

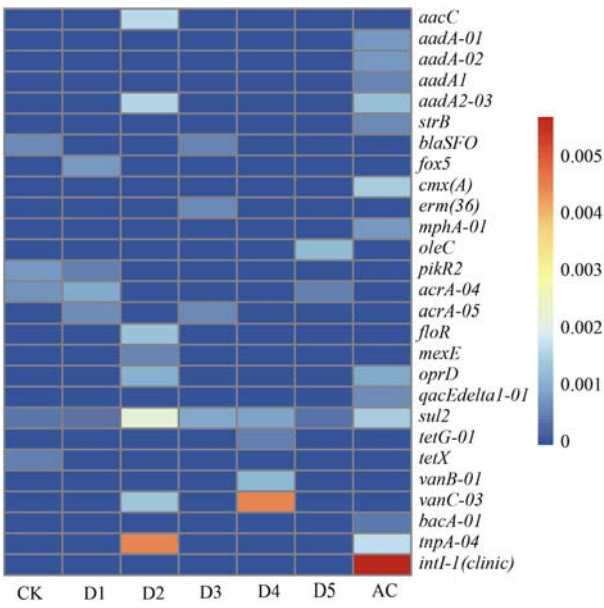


图 6 土壤中抗生素抗性基因与可移动元件的相对丰度
Fig. 6 Relative abundances of ARGs and MGEs in different soils

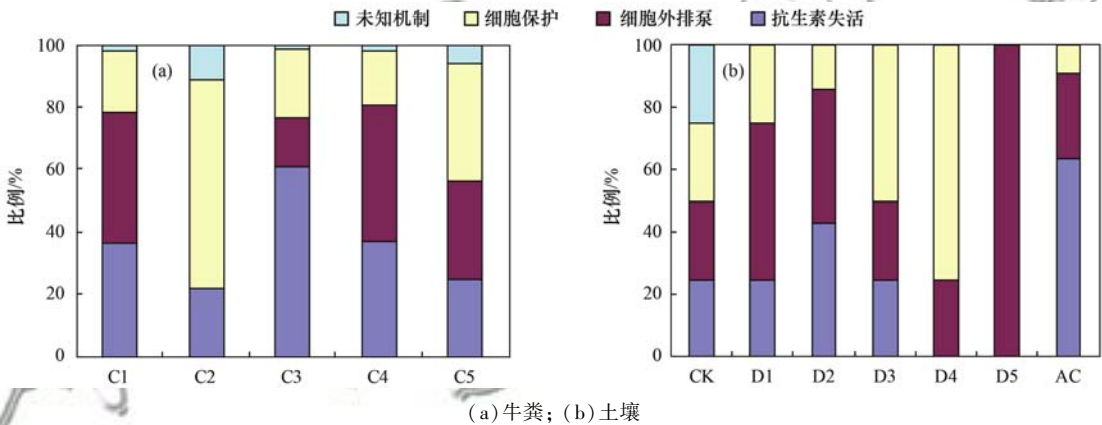


图 7 牛粪和土壤中抗生素抗性机制分析
Fig. 7 Mechanism analysis of antibiotic resistance in manure and soil

(b)]:对照土壤中有 4 种抗性机制,而养殖场周边不同距离的土壤和施用牛粪的土壤中均无未知机制,在距离 100 m 和 200 m 的土壤中只有细胞保护和细胞外排泵 2 种抗性机制,而距离养殖场 300 m 的土壤中只有细胞外排泵 1 种抗性机制.整体来看,施用牛粪的土壤中细胞失活和外排泵机制占比较大.能量驱动的药物外排系统越来越被认为是抗生素抗药性的机制^[38].目前,抗生素的耐药性发展很快,以单一机制或酶为靶点的抗生素导致细胞死亡,但对多个目标或机制起作用的抗生素,杀死微生物的耐药性发展相对较慢^[1].所以本研究土壤中抗生素的耐药性发展较慢.

2.5 牛粪和土壤中抗性基因与可移动元件的相关性

为研究牛粪中 ARGs 水平转移的风险,采用 Pearson 法分析了 ARGs 与 MGEs 的相关性(表 5):磺胺类 ARGs 与 MGEs 相关性最强,其次为氯霉素

2.4 牛粪及土壤中抗生素抗性机制

深入了解与抗生素耐药性相关基因的机制和调控,将有助于开发克服耐药性的抗生素衍生物^[35].从牛粪中抗生素抗性机制来看,抗生素失活、细胞保护和细胞外排泵是其主要的抗性机制,但不同养殖期各抗性机制的占比不同[图 7(a)].犊牛期没有细胞外排泵机制,细胞保护机制占 67%;其他 4 个养殖期则都具有 4 种抗性机制,但未知机制占比最小.由于抗生素失活酶可将胞内抗生素转换为低活性产物,因此是微生物适应抗生素选择压力的最有效方式之一,比如氨基糖苷类抗生素^[36].外排泵机制则可介导抗生素和重金属等多种污染物排出细胞外,因而也是微生物适应环境胁迫条件的主要途径^[37].所以新鲜牛粪中的 ARGs 有污染环境的可能.

供试土壤中抗生素抗性机制差异较大[图 7

类和氨基糖苷类 ARGs,都达到极显著正相关水平;ARGs 相对丰度总和与 MGEs 呈极显著正相关.说明牛粪中磺胺类、氯霉素类、氨基糖苷类 ARGs 都存在水平移动风险,进一步说明了 MGEs 可能会加快这些 ARGs 在土壤环境的迁移、传播和富集^[14].

表 5 牛粪和土壤中抗生素抗性基因与可移动元件的相关性¹⁾

Table 5 Correlation analysis between ARGs and MGEs in manure and soil		
抗生素抗性基因	牛粪	土壤
氨基糖苷类	0.916 **	0.999 **
四环素类	-0.210	-0.383
β -内酰胺类	0.277	-0.320
大环内酯类	0.669	-0.093
磺胺类	0.945 **	0.734
氯霉素类	0.934 **	0.836 *
万古霉素类	-0.358	-0.150
多药类	0.564	0.612
其他	0.865 *	0.836 *
抗性基因总和	0.938 **	0.728

1) *表示 $P < 0.05$, **表示 $P < 0.01$,下同

土壤中 MGEs 与各类 ARGs 的相关性与牛粪差异较大;与氨基糖苷类 ARGs 呈极显著正相关关系,与氯霉素类、其他类 ARGs 呈显著正相关. 表明氨基糖苷类和氯霉素类抗生素在土壤中有水平移动的风险. 梅花鹿养殖环境氨基糖苷类、大环内酯类、其它类和四环素类抗生素分别与 MGEs 都具有极显著的正相关关系^[39], 与本研究结论既有相同之处, 也有不同之处, 这主要和土壤类型、抗生素种类、来源、微生物和气候等因素有关^[4].

2.6 牛粪中抗生素浓度与抗生素抗性基因丰度间的相关性

整个养殖期牛粪中氨基糖苷类、四环素类、β-内酰胺类、大环内酯类和磺胺类抗生素含量与对应 ARGs 相对丰度的相关系数依次为:0.868、0.939、0.555、0.450 和 0.537, 说明氨基糖苷类和四环素类 ARGs 与其抗生素浓度分别呈显著和极显著正相关关系,其他种类抗生素与其 ARGs 间关系未达显著水平. 大量研究表明, 抗生素浓度和 ARGs 之间有显著的相关性^[4,15,19].

由于土壤中检测到的抗生素种类很少且浓度较低,故本文没有做土壤中抗生素含量与 ARGs 相对

丰度的相关分析.

2.7 牛粪和土壤中抗性基因相对丰度之间的相关性

牛粪中氨基糖苷类 ARGs 相对丰度与磺胺类(表6)、氯霉素类和 MGEs, 大环内酯类 ARGs 与多药类, 磺胺类 ARGs 与氯霉素类和 MGEs, 氯霉素类 ARGs 与 MGEs, 万古霉素类与多药类和 MGEs 均极显著正相关关系; 大环内酯类与万古霉素类则呈显著负相关. 四环素类、β-内酰胺 ARGs 相对丰度与其他种类 ARGs 均不相关.

供试土壤中氨基糖苷类 ARGs 相对丰度与磺胺类、氯霉素类、MGEs 之间, 磺胺类与 MGEs 之间, 氯霉素类与 MGEs 间均呈显著或极显著正相关关系(表6), 而大环内酯类和万古霉素类呈显著负相关, 其他 ARGs 相对丰度间均无相关性. 相对而言, 土壤中各类 ARGs 之间的相关性明显弱于牛粪中, 可能是因为土壤环境比牛粪更复杂.

整体来讲, 牛粪和土壤 2 种生境中氨基糖苷类 ARGs 与磺胺类和氯霉素类之间、MGEs 与氨基糖苷类和磺胺类之间均呈显著或极显著相关, 而大环内酯类与万古霉素类则呈显著负相关.

表6 牛粪和土壤中抗生素抗性基因间的相关性
Table 6 Correlation analysis between ARGs and ARGs in cattle manure and soil

项目	种类	氨基糖苷类	四环素类	β-内酰胺类	大环内酯类	磺胺类	氯霉素类	万古霉素类	多药类	可移动元件
牛粪	氨基糖苷类	1								
	四环素类	-0.128	1							
	β-内酰胺类	-0.038	-0.227	1						
	大环内酯类	0.532	0.062	0.700	1					
	磺胺类	0.992 **	-0.235	0.047	0.557	1				
	氯霉素类	0.993 **	-0.235	0.034	0.552	0.999 **	1			
	万古霉素类	-0.316	-0.376	-0.391	-0.774 *	-0.278	-0.522	1		
	多药类	0.319	0.352	0.696	0.843 **	0.331	0.312	0.865 **	1	
	可移动元件	0.916 **	-0.210	0.277	0.669	0.945 **	0.934 **	0.870 **	0.564	1
土壤	氨基糖苷类	1								
	四环素类	-0.377	1							
	β-内酰胺类	-0.315	-0.234	1						
	大环内酯类	-0.064	-0.278	0.089	1					
	磺胺类	0.710 *	-0.251	-0.016	-0.607	1				
	氯霉素类	0.861 **	-0.258	-0.215	0.246	0.357	1			
	万古霉素类	-0.158	0.629	-0.271	-0.726 *	0.244	-0.210	1		
	多药类	0.577	-0.500	-0.242	-0.389	0.667	0.128	-0.223	1	
	可移动元件	0.999 **	-0.383	-0.320	-0.093	0.734 *	0.836 **	-0.150	0.612	1

3 结论

(1) 整个养殖期牛粪中优势抗生素为四环素类、喹诺酮类和磺胺类, 其中环丙沙星、强力霉素和土霉素含量较高. 育肥前期和哺乳期牛粪中抗生素含量较高.

(2) 养殖场的存在对周边土壤中抗生素质量、

种类和浓度无影响. 施用牛粪会显著提高土壤中喹诺酮类和四环素类抗生素的含量.

(3) 牛粪中氨基糖苷类抗性基因数目最多. 育肥期抗性基因数目最多且相对丰度最高, 犊牛期数目最少且相对丰度最低.

(4) 供试土壤中 ARGs 主要是多药类、氨基糖苷类、大环内酯类和磺胺类. 施用了牛粪的土壤中

ARGs 数目和相对丰度都显著高于其他土壤。

(5) 抗生素失活、细胞保护和细胞外排泵机制是牛粪中 ARGs 主要的抗性机制,但不同养殖期各抗性机制的占比不同。施用牛粪的土壤中细胞失活和外排泵机制占比较大。

(6) 牛粪中磺胺类、氯霉素类、氨基糖苷类 ARGs 都存在水平移动风险;土壤中氨基糖苷类和氯霉素类 ARGs 有水平移动的风险。牛粪中氨基糖苷类和四环素类 ARGs 与其抗生素含量分别呈显著和极显著正相关关系。

(7) 牛粪和土壤中氨基糖苷类 ARGs 相对丰度与磺胺类和氯霉素类相对丰度之间、MGEs 相对丰度与氨基糖苷类和磺胺类相对丰度之间均呈显著或极显著相关,而大环内酯类与万古霉素类相对丰度则呈显著负相关。

参考文献:

- [1] Hashmi M Z, Mahmood A, Kattel D B, *et al.* Antibiotics and antibiotic resistance genes (ARGs) in soil: occurrence, fate, and effects [A]. Hashmi M Z, Kumar V, Varma A (Eds.). *Xenobiotics in the Soil Environment* [M]. Cham: Springer, 2017.
- [2] 支苏丽, 周婧, 赵润, 等. 畜禽粪便厌氧发酵过程抗生素抗性基因归趋及驱动因子分析 [J]. 农业工程学报, 2019, **35** (1): 195-205.
Zhi S L, Zhou J, Zhao R, *et al.* Analysis of antibiotic resistance genes fate and its drivers during anaerobic digestion of animal manure [J]. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 2019, **35** (1): 195-205.
- [3] Zhang Q Q, Ying G G, Pan C G, *et al.* Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, **49** (11): 6772-6782.
- [4] 苑学霞, 梁芸芸, 范丽霞, 等. 粪肥施用土壤抗生素抗性基因来源、转移及影响因素 [J]. 土壤学报, 2020, **57** (1): 36-47.
Yuan X X, Liang J Y, Fan L X, *et al.* Effects of manure application on source and transport of antibiotic resistant genes in soil and their affecting factors [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2020, **57** (1): 36-47.
- [5] 张彤, 李炳. 水环境中抗生素耐药性的科学研究前沿、环境健康风险评估和控制阻断策略 [J]. 科学通报, 2020, **65** (24): 2543-2554.
Zhang T, Li B. Antibiotic resistance in water environment: frontiers of fundamental research, risk assessment and control strategies [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2020, **65** (24): 2543-2554.
- [6] Heuer H, Solehati Q, Zimmerling U, *et al.* Accumulation of sulfonamide resistance genes in arable soils due to repeated application of manure containing sulfadiazine [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, **77** (7): 2527-2530.
- [7] Zhang A N, Li L G, Ma L P, *et al.* Conserved phylogenetic distribution and limited antibiotic resistance of class 1 integrons revealed by assessing the bacterial genome and plasmid collection [J]. *Microbiome*, 2018, **6**, doi: 10.1186/s40168-018-0516-2.
- [8] 朱为静, 朱凤香, 王卫平, 等. 4 种粪便堆肥过程中抗生素的降解特性 [J]. 环境科学, 2020, **41** (2): 1005-1012.
Zhu W J, Zhu F X, Wang W P, *et al.* Degradation characteristics of antibiotics during composting of four types of feces [J]. *Environmental Science*, 2020, **41** (2): 1005-1012.
- [9] 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.
- [10] Tang X J, Lou C L, Wang S X, *et al.* Effects of long-term manure applications on the occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes (ARGs) in paddy soils: evidence from four field experiments in south of China [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, **90**: 179-187.
- [11] Jechalke S, Heuer H, Siemens J, *et al.* Fate and effects of veterinary antibiotics in soil [J]. *Trends in Microbiology*, 2014, **22** (9): 536-545.
- [12] Heuer H, Focks A, Lamshöft M, *et al.* Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, **40** (7): 1892-1900.
- [13] Sukul P, Lamshöft M, Kusari S, *et al.* Metabolism and excretion kinetics of ¹⁴C-labeled and non-labeled difloxacin in pigs after oral administration, and antimicrobial activity of manure containing difloxacin and its metabolites [J]. *Environmental Research*, 2009, **109** (3): 225-231.
- [14] Forsberg K J, Reyes A, Wang B, *et al.* The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens [J]. *Science*, 2012, **337** (6098): 1107-1111.
- [15] 张汝凤, 宋渊, 高浩泽, 等. 北京蔬菜地土壤中抗生素抗性基因与可移动元件的分布特征 [J]. 环境科学, 2020, **41** (1): 385-393.
Zhang R F, Song Y, Gao H Z, *et al.* Distribution characteristics of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in Beijing vegetable base soils [J]. *Environmental Science*, 2020, **41** (1): 385-393.
- [16] Zhang Y J, Hu H W, Gou M, *et al.* Temporal succession of soil antibiotic resistance genes following application of swine, cattle and poultry manures spiked with or without antibiotics [J]. *Environmental Pollution*, 2017, **231**: 1621-1632.
- [17] Gou M, Hu H W, Zhang Y J, *et al.* Aerobic composting reduces antibiotic resistance genes in cattle manure and the resistome dissemination in agricultural soils [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, **612**: 1300-1310.
- [18] 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.
- [19] Cheng W X, Chen H, Su C, *et al.* Abundance and persistence of antibiotic resistance genes in livestock farms: a comprehensive investigation in eastern China [J]. *Environment International*, 2013, **61**: 1-7.
- [20] Karci A, Balçetoğlu I A. Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluoroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey [J]. *Science of the Total Environment*, 2009, **407** (16): 4652-4664.
- [21] Du L F, Liu W K. Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agro-ecosystems. A review [J]. *Agronomy for Sustainable Development*, 2012, **32** (2): 309-327.
- [22] 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.
- [23] 周海东, 黄雨萍, 陈晓萌, 等. 人工生态系统对城市河流中抗生素和 ARGs 的去除[J]. 环境科学, 2021, **42**(2): 850-859.
- Zhou H D, Huang L P, Chen X M, *et al.* Removal of antibiotics and antibiotic resistance genes from urban rivers by artificial ecosystem[J]. Environmental Science, 2021, **42**(2): 850-859.
- [24] 张俊华, 尚天浩, 刘吉利, 等. 宁夏西吉县养牛场粪污和周边土壤重金属及细菌群落特征[J]. 应用生态学报, 2020, **31**(9): 3119-3130.
- Zhang J H, Shang T H, Liu J L, *et al.* Characteristics of heavy metals and bacterial community in manure and surrounding soil of cattle farm in Xiji, Ningxia, China[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2020, **31**(9): 3119-3130.
- [25] 陈莉, 贾春虹, 刘冰洁, 等. 超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法同时测定土壤中四环素类抗生素及其降解产物[J]. 地学前缘, 2019, **26**(6): 1-6.
- Chen L, Jia C H, Liu B J, *et al.* Determination of tetracyclines and their degradation products in soil using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Earth Science Frontiers, 2019, **26**(6): 1-6.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] 纪春晓. 多抗性猪源大肠杆菌的部分耐药性基因分析[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2007.
- Ji C X. Analysis on some resistant genes of *Escherichia coli* with multiple drug resistance [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2007.
- [30] Alonso J J S, El Kori N, Melián-Martel N, *et al.* Removal of ciprofloxacin from seawater by reverse osmosis [J]. Journal of Environmental Management, 2018, **217**: 337-345.
- [31] Andriamalala A, Vieublé-Gonod L, Dumeny V, *et al.* Fate of sulfamethoxazole, its main metabolite N-ac-sulfamethoxazole and ciprofloxacin in agricultural soils amended or not by organic waste products[J]. Chemosphere, 2018, **191**: 607-615.
- [32] 孔晨晨, 张世文, 聂超甲, 等. 农用地土壤抗生素组成特征与积累规律[J]. 环境科学, 2019, **40**(4): 1981-1989.
- Kong C C, Zhang S W, Nie C J, *et al.* Composition, characteristics, and accumulation of antibiotics in the soil in agricultural land [J]. Environmental Science, 2019, **40**(4): 1981-1989.
- [33] Engelhardt I, Sittig S, Šimůnek J, *et al.* Fate of the antibiotic sulfadiazine in natural soils: experimental and numerical investigations [J]. Journal of Contaminant Hydrology, 2015, **177-178**: 30-42.
- [34] 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.
- [35] Thaker M, Spanogiannopoulos P, Wright G D. The tetracycline resistome[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010, **67**(3): 419-431.
- [36] Zhang X X, Zhang T, Fang H H P. Antibiotic resistance genes in water environment [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, **82**(3): 397-414.
- [37] 程建华, 唐翔宇, 刘琛. 紫色土丘陵区畜禽养殖场土壤中抗生素抗性基因分布特征[J]. 环境科学, 2019, **40**(7): 3257-3262.
- Cheng J H, Tang X Y, Liu C. Characteristics of antibiotic resistance genes in various livestock feedlot soils of the hilly purple soil region [J]. Environmental Science, 2019, **40**(7): 3257-3262.
- [38] Levy S B. Mechanisms for resistance in soil[J]. Science, 2006, **312**(5773), doi: 10.1126/science.312.5773.529a.
- [39] 黄福义, 安新丽, 陈青林, 等. 梅花鹿养殖场抗生素抗性基因分布特征[J]. 环境科学, 2016, **37**(11): 4402-4409.
- Huang F Y, An X L, Chen Q L, *et al.* Distribution characteristics of antibiotic resistance genes in Sika deer farm [J]. Environmental Science, 2016, **37**(11): 4402-4409.

CONTENTS

Advances and Challenges in Biosafety Research for Urban Environments	SU Jian-qiang, AN Xin-li, HU An-yi, <i>et al.</i> (2565)
Key Problems and Novel Strategy of Controlling Emerging Trace Organic Contaminants During Municipal Wastewater Reclamation	WANG Wen-long, WU Qian-yuan, DU Ye, <i>et al.</i> (2573)
Mechanisms Summary and Potential Analysis of EPS as a Flame Retardant	HAO Xiao-di, ZHAO Zi-cheng, LI Ji, <i>et al.</i> (2583)
Concentrations, Sources, and Health Risks of PM _{2.5} Carrier Metals in the Beijing Urban Area and Suburbs	ZHOU An-qi, LIU Jian-wei, ZHOU Xu, <i>et al.</i> (2595)
MAIAC AOD and PM _{2.5} Mass Concentrations Characteristics and Correlation Analysis in Beijing-Tianjin-Hebei and Surrounding Areas	JIN Jian-nan, YANG Xing-chuan, YAN Xing, <i>et al.</i> (2604)
Formation and Prevention of Secondary Nitrate in PM _{2.5} in Tianjin	XIAO Zhi-mei, WU Ting, WEI Yu-ting, <i>et al.</i> (2616)
Pollution Characteristics and Risk Assessment of Nitro Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in PM _{2.5} of Nanjing, China	FU Yin-yin, WEN Hao-zhe, WANG Xiang-hua, <i>et al.</i> (2626)
Spatio-temporal Patterns and Potential Sources of Absorbing Aerosols in the Fenwei Plain	LIU Min-xia, LI Liang, YU Rui-xin, <i>et al.</i> (2634)
Sources Apportionment of Oxygenated Volatile Organic Compounds (OVOCs) in a Typical Southwestern Region in China During Summer	CHEN Mu-lan, WANG Sai-nan, CHEN Tian-shu, <i>et al.</i> (2648)
Aqueous-phase Oxidation of Dissolved Organic Matter (DOM) from Extracts of Ambient Aerosols	TAO Ye, CHEN Yan-tong, LI Nan-wang, <i>et al.</i> (2659)
Changes and Potential Sources of Atmospheric Black Carbon Concentration in Shanghai over the Past 40 Years Based on MERRA-2 Reanalysis Data	CAO Shan-shan, DUAN Yu-sen, GAO Chan-chan, <i>et al.</i> (2668)
Spatio-Temporal Evolution Characteristics and Source Apportionment of O ₃ and NO ₂ in Shijiazhuang	WANG Shuai, NIE Sai-sai, FENG Ya-ping, <i>et al.</i> (2679)
Applying Photochemical Indicators to Analyze Ozone Sensitivity in Handan	NIU Yuan, CHENG Shui-yuan, OU Sheng-ju, <i>et al.</i> (2691)
Spatiotemporal Distribution of Aerosol Optical Depth Based on Landsat Data in the Hinterland of the Guanzhong Basin and Its Relationship with Urbanization	ZHENG Yu-rong, WANG Xu-hong, ZHANG Xiu, <i>et al.</i> (2699)
Multidimensional Verification of Anthropogenic VOCs Emissions Inventory Through Satellite Retrievals and Ground Observations	WANG Yue, WEI Wei, REN Yun-ting, <i>et al.</i> (2713)
Estimation of the SOA Formation Potential of the National Trunk Highway in Central Plains Urban Agglomeration	WANG Na-ping, LI Hai-ping, ZHANG Fan (2721)
Economic Benefit of Air Quality Improvement During Implementation of the Air Pollution Prevention and Control Action Plan in Beijing	LU Ya-ling, FAN Zhao-yang, JIANG Hong-qiang, <i>et al.</i> (2730)
Emission Performance Quantitative Evaluation and Application of Industrial Air Pollution Sources	LI Ting-kun, FENG Yin-chang, WU Jian-hui, <i>et al.</i> (2740)
Screening and Sequencing High-risk Antibiotics in China's Water Environment Based on Ecological Risks	ZHOU Li, LIU Shan, GUO Jia-hua, <i>et al.</i> (2748)
China's Reuse Water Development and Utilization Potential Based on the RDA-REM Model	ZHENG Jin-tao, MA Tao, LIU Jiu-fu, <i>et al.</i> (2758)
Characteristic Analysis of SWAT Model Parameter Values Based on Assessment of Model Research Quality	RONG Yi, QIN Cheng-xin, DU Peng-fei, <i>et al.</i> (2769)
Sensitivity Analysis of Boundary Load Reduction in a Large Shallow Lake Water Quality Model	WANG Ya-ning, LI Yi-ping, CHENG Yue, <i>et al.</i> (2778)
Comparison of Available Nitrogen and Phosphorus Characteristics in the Land-Water Transition Zone of Different Watersheds and Their Environmental Significance	ZHU Hai, YUAN Xu-yin, YE Hong-meng, <i>et al.</i> (2787)
Analysis of Spatial-Temporal Variation Characteristics of Potential Non-point Source Pollution Risks in the Upper Beiyun River Basin Using Different Weighting Methods	LI Hua-lin, ZHANG Jian-jun, ZHANG Yao-fang, <i>et al.</i> (2796)
Characteristics of Runoff-related Total Nitrogen and Phosphorus Losses Under Long-term Fertilization and Cultivation on Purple Soil Sloping Croplands	WU Xiao-yu, LI Tian-yang, HE Bing-hui (2810)
Hydrochemistry and Its Controlling Factors and Water Quality Assessment of Shallow Groundwater in the Weihe and Jinghe River Catchments	LIU Xin, XIANG Wei, SI Bing-cheng (2817)
Characteristics and Drivers of Dissolved Carbon Dioxide and Methane Concentrations in the Nantaoxi River System in the Upper Reaches of the Taihu Lake Basin During Summer-Autumn	LIANG Jia-hui, TIAN Lin-lin, ZHOU Zhong-yu, <i>et al.</i> (2826)
Nitrogen Distribution and Inorganic Nitrogen Diffusion Flux in a Shallow Lake During the Low Temperature Period: A Case Study of the Baiyangdian Lake	WEN Yan, SHAN Bao-qing, ZHANG Wen-qiang (2839)
Effects of Sediment Microenvironment on Sedimentary Phosphorus Release Under Capping	CHEN Shu-tong, LI Da-peng, XU Chu-tian, <i>et al.</i> (2848)
Coadsorption of Heavy Metal and Antibiotic onto Humic Acid from Polder River Sediment	XUE Xiang-dong, YANG Chen-hao, YU Jian-lin, <i>et al.</i> (2856)
Effects of Two PPCPs on Nitrification in Sediments in the Yarlung Zangbo River	LING Xin, XU Hui-ping, LU Guang-hua (2868)
Wastewater Treatment Effects of Ferric-carbon Micro-electrolysis and Zeolite in Constructed Wetlands	ZHAO Zhong-jing, HAO Qing-ju, ZHANG Yao-yu, <i>et al.</i> (2875)
CDS-BOC Nanophotocatalyst Activating Persulfate Under Visible Light for the Efficient Degradation of Typical PPCPs	LEI Qian, XU Lu, AI Wei, <i>et al.</i> (2885)
Preparation of pg-C ₃ N ₄ /BiOBr/Ag Composite and Photocatalytic Degradation of Sulfamethoxazole	YANG Li-wei, LIU Li-jun, XIA Xun-feng, <i>et al.</i> (2896)
Sodium Alginate Loading of Zero-Valent Iron Sulfide for the Reduction of Cr(VI) in Water	WANG Xu, YANG Xin-nan, HUANG Bi-juan, <i>et al.</i> (2908)
Adsorption Mechanism of Cadmium by Superparamagnetic Nano-Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ Functionalized Materials	ZHANG Li-zhi, YI Ping, FANG Dan-dan, <i>et al.</i> (2917)
Pollution Characteristics and Removal of Typical Pharmaceuticals in Hospital Wastewater and Municipal Wastewater Treatment Plants	YE Pu, YOU Wen-dan, YANG Bin, <i>et al.</i> (2928)
Abundance Change of Antibiotic Resistance Genes During PDWW Recycling and Correlations with Environmental Factors	XU Yao-yao, WANG Rui, JIN Xin, <i>et al.</i> (2937)
Simultaneous Domestication of Short-cut Nitrification Denitrifying Phosphorus Removal Granules	WANG Wen-qi, LI Dong, GAO Xin, <i>et al.</i> (2946)
Long-term Storage and Rapid Activity Recovery of ANAMMOX Granular Sludge	LI Dong, LIU Ming-yang, ZHANG Jie, <i>et al.</i> (2957)
Migration and Environmental Effects of Heavy Metals in the Pyrolysis of Municipal Sludge	JIANG Yuan-yuan, WANG Yan, DUAN Wen-yan, <i>et al.</i> (2966)
Profiling of Antibiotic Resistance Genes in Different Croplands	HUANG Fu-yi, ZHOU Shu-yi-dan, WANG Jia-ni, <i>et al.</i> (2975)
Distribution Characteristics of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Manure and Surrounding Soil of Cattle Farms in Ningxia	ZHANG Jun-hua, CHEN Rui-hua, LIU Ji-li, <i>et al.</i> (2981)
Effects of Temperature and Stirring on the Changes of Antibiotic Resistance Genes and Microbial Communities in Anaerobic Digestion of Dairy Manure	XU Ji-fei, ZHANG Qiu-ping, ZHU Tian-jiao, <i>et al.</i> (2992)
Effects of Wheat Straw-derived Biochar Application on Soil Carbon Content Under Different Tillage Practices	LIU Zhen-jie, LI Peng-fei, HUANG Shi-wei, <i>et al.</i> (3000)
Spatial Patterns of Nitrogen and Phosphorus in Soil and Their Influencing Factors in a Typical Agro-pastoral Ecotone	ZHANG Yan-jiang, WANG Jun-peng, WANG Yu, <i>et al.</i> (3010)
Spatial Distribution Characteristics, Pollution, and Ecological Risk Assessment of Soil Heavy Metals Around Mercury Mining Areas	WANG Rui, DENG Hai, JIA Zhong-min, <i>et al.</i> (3018)
Interaction and Mechanism Between Conditioning Agents and Two Elements in the Soil Enriched with Phosphorus and Cadmium	HUANG Yang, HU Xue-yu, CAO Kun-kun, <i>et al.</i> (3028)
Mechanism of S-allyl-L-cysteine Alleviating Cadmium Stress in Seedling Roots and Buds of Rice Seedlings	CHENG Liu-long, HUANG Yong-chun, WANG Chang-rong, <i>et al.</i> (3037)
Consecutive 4-year Elevated Atmospheric CO ₂ on Shaped Microbial Communities in the Rhizosphere Soil of <i>Robinia pseudoacacia</i> L. Seedlings Grown in Pb-contaminated Soils	JIA Xia, Lkhagvajargal Khadkhurel, ZHAO Yong-hua, <i>et al.</i> (3046)
Biodegradation of Polystyrene by <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	XING Rui-zhi, ZHAO Zi-qiang, ZHAO Wen-qi, <i>et al.</i> (3056)
Micro-morphological Characteristics of Particles on Holly and Ligustrum Leaf Surfaces and Seasonal Changes in Bacterial Communities	LI Hui-juan, XU Ai-ling, QIAO Feng-lu, <i>et al.</i> (3063)
Effects of Roxithromycin on Reproduction, Growth, and Anti-oxidation System of <i>Daphnia magna</i>	ZHANG Ling-yu, LIU Jian-chao, LENG Yang, <i>et al.</i> (3074)
Relationship Between Relative Crop Yield/Woody Plant Biomass and Ground-level Ozone Pollution in China	FENG Zhao-zhong, PENG Jin-long (3084)