

铜对蚯蚓转化牛粪过程抗生素抗性基因的影响

田雪力,李仲瀚,杨凤霞*,韩秉君,张克强** (农业农村部环境保护科研监测所,天津 300191)

摘要: 以赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)为试验蚓种,设定不同 Cu 浓度梯度,研究蚯蚓转化牛粪过程中 Cu 对 ARGs 消长的影响.结果表明,不同 Cu 浓度处理下,ARGs 累积总丰度呈现出 CF(未添加 Cu)<T3(高浓度,1000mg/kg)<T1(低浓度,100mg/kg)<T2(中浓度,500mg/kg)的趋势.与未添加蚯蚓的对照组相比,加入蚯蚓的 CF 处理组中 ARGs 的总丰度从 5.28×10^{-1} 降低至 4.33×10^{-1} copies/16S copies.低、中浓度 Cu 的添加显著提高了样品中 ARGs 的总丰度水平 ($P < 0.05$).通过研究不同类型 ARGs 在不同时间阶段的变化,发现低、高浓度 Cu 处理组(T1、T3)在蚯蚓转化过程中提高了 *tet*-ARGs、*erm*-ARGs 和 *str*-ARGs 的丰度,而中浓度 Cu 处理组(T2)中 *tet*-ARGs 和 *str*-ARGs 丰度降低.冗余分析(RDA)得出 pH 值显著影响蚯蚓转化过程中 ARGs 相对丰度的变化 ($P < 0.05$),且 TOC、TN 和 Cu 对 ARGs 的消长也发挥着重要作用.蚯蚓转化可加速牛粪中 ARGs 丰度的削减,一定程度上能够减少其环境风险,但牛粪中 Cu 的残留可导致蚯蚓转化过程中部分 ARGs 的富集,因此亟需进一步优化蚯蚓转化处理工艺.

关键词: 重金属铜; 蚯蚓; 牛粪; 转化过程; 抗生素抗性基因

中图分类号: X750 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2022)10-4688-08

Effects of copper on antibiotic resistance genes during earthworm conversion of cow dung. TIAN Xue-li, LI Zhong-han, YANG Feng-xia*, HAN Bing-jun, ZHANG Ke-qiang** (Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Tianjin 300191, China). *China Environmental Science*, 2022,42(10): 4688~4675

Abstract: In this study, *Eisenia fetida* was used as the experimental earthworm, different Cu concentration gradients were set to study the effect of Cu on ARGs growth during earthworm conversion of cow dung. Results revealed that, under different Cu concentrations, the total abundance of ARGs showed a trend of CF (without Cu addition) < T3 (high concentration, 1000mg/kg) < T1 (low concentration, 100mg/kg) < T2 (medium concentration, 500mg/kg). Compared with the control group without earthworm, the total abundance of ARGs in the CF treatment group with earthworms decreased from 5.28×10^{-1} to 4.33×10^{-1} copies/16S copies. The addition of low and medium concentrations of Cu significantly increased the total abundance of ARGs in the samples ($P < 0.05$). By studying the changes of different ARG subtypes in different time stages, we found that the low and high concentration of Cu treatment groups (T1, T3) increased the abundances of *tet*-ARGs, *erm*-ARGs and *str*-ARGs during earthworm conversion, while the abundances of *tet*-ARGs and *str*-ARGs decreased in the medium-concentration Cu treatment group (T2). Redundancy analysis (RDA) showed that pH significantly affected the relative abundance of ARGs during earthworm conversion ($P < 0.05$), and TOC, TN, and Cu also played an important role in ARGs variation. Earthworm conversion can accelerate the reduction of ARGs in cow dung and reduce its environmental risk to a certain extent, but the residual Cu in cow dung would lead to the enrichment of some ARGs during earthworm conversion of cow dung, thus it was urgent to further optimize the treatment process of earthworm conversion.

Key words: copper; earthworm; cow dung; conversion process; antibiotic resistance genes

近年来,养殖业的迅速发展产生大量的畜禽粪便,导致环境压力骤增.2018年全国牛粪年产量1.82亿 t^[1].我国每年畜禽粪污综合利用率不足 60%^[2],如何做好畜禽粪污的无害化处理与资源化利用,提高粪污综合利用率成为亟待解决的问题.另一方面,牛粪不仅含有丰富的有机质^[3],而且含水量大、保水性强、透气性好、发热量低,是蚯蚓养殖较理想的基料.

为了促进动物生长、提高产量,重金属常被用做添加剂被广泛添加在畜禽饲料中^[4],其中只有少部分被吸收利用,大部分重金属以粪便的形式排出^[5].与此同时,畜禽粪便中也检出丰富抗生素抗性基因

(ARGs).研究发现,磺胺类、四环素类抗性基因在牛场中被普遍检出^[6-7].谷艳茹等^[8]除了有上述发现外,在粪便中检出了 *bla*_{OXA-1}、*bla*_{TEM-1} 和 *bla*_{ampC} 等与人类健康密切相关的 β -内酰胺类 ARGs.研究还发现粪便中 ARGs 的丰度与其含有的抗生素以及砷、铜等重金属浓度显著相关,且砷、铜等重金属和抗生素的复合污染可以增加环境中 ARGs 的丰度^[9].另外,

收稿日期: 2022-03-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(42077355,41807399);所级基础前沿任务资助项目(2022-jcqyrw-dyz);中央级公益性科研院所基本科研业务费资助专项(Y2021PT01)

* 责任作者, 副研究员, yangfengxiacomeon@163.com; ** 研究员, keqiangzhang68@163.com

在重金属污染地区发现微生物不仅对重金属产生抗性,并且还能对多种抗生素产生抗药性,且 ARGs 水平随重金属污染水平增加而增加^[10]. Stepanauskas 等^[11]在微宇宙实验中发现水中 ARGs 及耐药菌的检出频率随重金属暴露浓度的升高而升高.目前国内外缺少重金属对蚯蚓转化牛粪过程中 ARGs 影响的研究.在重金属存在的情况下蚯蚓转化引起 ARGs 的变化尚不完全明确.

本研究选取牛粪中残留量最高的重金属 Cu 为研究对象,利用实时荧光定量 PCR 技术,追踪考察不同浓度 Cu 胁迫下蚯蚓转化牛粪过程中 ARGs 的消长变化.通过测定不同 Cu 浓度处理组及其不同转化时段样品中 ARGs 的丰度,并分析蚯蚓转化牛粪过程中不同环境因子(TN、TP、含水率、TOC、pH 值等)的变化规律及其对 ARGs 的贡献,旨在揭示蚯蚓转化牛粪过程中重金属影响 ARGs 的潜在机制,为采取适合措施以减轻蚯蚓养殖场环境中 ARGs 的传播提供参考.

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试蚯蚓为赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*),为本实验室饲养,单体重 0.50g 左右.试验前将蚯蚓在牛粪环境下驯化 30d,实验时挑选健康、带有明显生殖环带的蚯蚓,用无菌水清洗表面后放置于装有湿润滤纸的干净烧杯中,暗环境下保持 24h,使其排出体内粪便.

供试牛粪采自本实验站自养泌乳奶牛,经混匀

后自然堆肥 15d.其基本理化性质为:pH 值为 7.8、含水率为 81.3%、总氮为 2.24%、总磷为 1.42%.

1.2 试验设计

试验体系以牛粪为主料,添加少量养殖基质供蚯蚓生存,共设 5 个处理,每个处理 3 个重复.其中,CK 为无蚯蚓对照组;CF(未添加 Cu+蚯蚓)、T1(低浓度 100mg/kg Cu 胁迫+蚯蚓)、T2(中浓度 500mg/kg Cu 胁迫+蚯蚓)、T3(高浓度 1000mg/kg Cu 胁迫+蚯蚓)为处理组.重金属选取奶牛养殖过程中饲料常用添加剂且生物毒性较强的 Cu 进行试验,根据牛粪中重金属 Cu 的实际残留量范围(5~1257mg/kg)设置 3 个浓度梯度.

按照分组要求将牛粪用重金属 Cu 处理,具体方法:用无菌蒸馏水将牛粪调整至含水量 70%左右,向不同试验处理组加入不同量的重金属 CuSO₄,使得两者在牛粪基质中添加浓度梯度分别为 100,500,1000mg/kg,混匀后分别装入塑料养殖盒(盒底直径 11cm,盒口直径 15cm,盒高 7.5cm)中,并做好标记,每盒装 200g;而空白组即为未添加重金属 Cu 作为对照;然后取 30 条蚯蚓均匀地放置在每盒的牛粪基料上,盒子四周用铝箔纸做避光处理,并用 3 层纱布封盖,保证透气并防止蚯蚓逃跑,同时为保持水分和湿度,通过计重方式每隔 2d 喷洒一次无菌水.培养过程中,于第 1,7,14,28,35,42,49d 进行破坏性取样,收集蚯蚓与培养基质.

1.3 分析指标与测定方法

1.3.1 理化指标 样品测定理化指标和方法详见表 1^[12].

表 1 样品测定指标与方法
Table 1 Indicators and methods of sample determination

测定指标	测定方法	方法标准号
全氮(TN)	有机肥料(蒸馏滴定法)	NY 525-2012
全磷(TP)	有机肥料(分光光度法)	NY 525-2012
有机质	有机肥料(重铬酸钾容量法)	NY 525-2012
含水率	复混肥料中游离水含量测定 (真空烘箱法)	GB 8576
pH 值	土壤 pH 值的测定(电位法)	NYT 1377-2007
铜(Cu)	土壤质量铜、锌的测定 (火焰原子吸收分光光度法)	GB/T 17138

1.3.2 DNA 提取 采用 Fast DNA SPIN Kit for soil 试剂盒(MP Biomedicals, LLC, Santa Ana, CA, 美国)按操作手册对 0.5g 粪便进行 DNA 提取,采用超微量紫外可见光分光光度计 Nano Drop 2000 (Thermo

Fisher, USA) 和琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA 质量.提取与检测完成后,将 DNA 样品放置于-20℃冰箱中暂存.

1.3.3 实时荧光定量 PCR 本研究对 8 类 24 个

ARGs 进行 qPCR 检测,即磺胺类抗生素抗性基因 *sul*-ARGs (*sul1*、*sul2*)、四环素类抗生素抗性基因 *tet*-ARGs (*tetO*、*tetQ*、*tetW*、*tetL*、*tetX*)、喹诺酮类抗生素抗性基因 *qnr*-ARGs (*qnrS*、*qnrB*、*oqxB*)、大环内酯类抗生素抗性基因 *erm*-ARGs (*ermB*、*ermC*)、链霉素类抗生素抗性基因 *str*-ARGs (*strA*、*strB*、*aadA*)、 β -内酰胺类抗生素抗性基因 *bla*-ARGs (*bla*_{GES-1}、*bla*_{OXA-1}、*bla*_{TEM-1}、*bla*_{ampC})、多粘菌素抗性基因(*mcr*-1)、氯霉素抗性基因(*cfr*、*fexA*)。使用仪器 7500 实时荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems, 美国)进行实时 qPCR 分析.根据提取 DNA 样品的浓度与标准曲线的定量范围,研究中将 DNA 样品用 ddH₂O 进行 10 倍稀释.qPCR 反应体系为 20.0 μ L,包括 10.0 μ L TB Green Premix Ex Taq(Tli RNase H Plus, Takara)、上下游引物各 0.4 μ L、0.4 μ L ROX Reference Dye II、6.8 μ L ddH₂O 和 2.0 μ L DNA 模板.每个 DNA 模板设置 3 个平行,无菌水为阴性对照,qPCR 反应程序和标准曲线的制作参照文献[13].

1.4 数据分析

采用 SPSS V22.0 对数据进行 ANOVA 方差分析,以 $P < 0.05$ 作为差异显著水平.采用 R 软件的 pheatmap 包制作热图,Origin 95 绘制了柱状图和折线图,RDA 分析采用 CANOCO 5 软件.数据的相对丰度(ARGs copies/16S rRNA gene copies)、平均值和标准差的计算均使用 Microsoft Excel 2007.

2 结果与讨论

2.1 蚯蚓转化牛粪过程中 ARGs 的赋存多样性特征

在考察的 24 种 ARGs 亚型中,仅 *qnrS* 未检出,其余 23 种亚型在蚯蚓转化牛粪的不同时间阶段均有检出,其检出频率范围为 2.90%~100%.总体来看,磺胺类(*sul*-ARGs)、四环素类(*tet*-ARGs)与链霉素类抗性基因(*str*-ARGs)存在较为普遍且污染水平较高,这可能与畜禽养殖过程中因该类抗生素价格低廉且对多种细菌具有较好抑制效果而使用较为普遍有关,从而导致了转化底物牛粪中相应的 ARGs 赋存较为丰富^[14].值得注意的是,在蚯蚓转化过程中,与人类健康密切相关的高风险 β -内酰胺类 ARGs (*bla*_{NDM-1}、*bla*_{GES-1}、*bla*_{OXA-1}、*bla*_{TEM-1}、*bla*_{ampC})在基质中的检出率也较高(40.00%~100%);而喹诺酮类

抗性基因(*qnrS*、*qnrB*、*oqxB*)的检出率最低,平均为 39.00%.上述结果表明,蚯蚓转化牛粪过程中, ARGs 存在普遍,具有种类多样、多种耐药机制并存的污染特点;且大部分基因可跨越这个阶段,依然以一定浓度而残留在转化产物蚓粪中,增加了蚓粪的后续利用风险^[15-16].

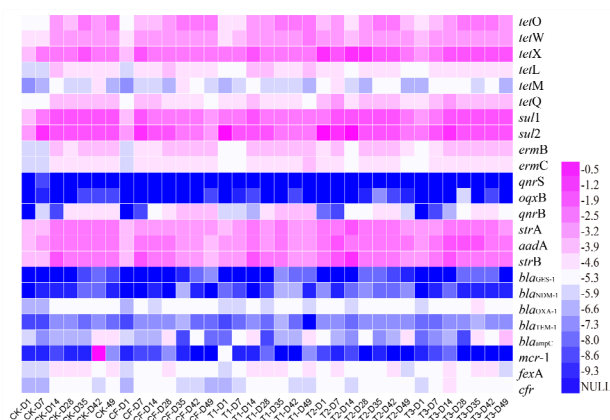


图1 蚯蚓转化过程中不同时间阶段 ARGs 丰度的变化

Fig.1 Changes in the abundance of ARGs at different time stages during earthworm conversion

图例单位为 1g(抗生素抗性基因拷贝数/16S rRNA 拷贝数),NULL 为未检出

如图1所示,在CK中,除了*qnr*-ARGs及*mcr*-1,其他类ARGs均普遍存在.其中,*tetW*、*tetX*、*sul1*、*sul2*、*strA*、*strB*和*aadA*赋存水平相对较高,数量级高达 10^{-4} ~ 10^{-1} copies/16S copies;而喹诺酮类ARGs中*qnrS*和*oqxB*的相对丰度仅为 10^{-8} ~ 10^{-7} copies/16S copies.在不同浓度Cu处理组的处理全过程,相对丰度较高的亚型为*sul1*、*sul2*,这可能是因为重金属Cu驱动了含有*sul1*和*sul2*的细菌宿主的选择^[17].在本研究中检测的关于*tet*-ARGs中,丰度最高的基因亚型为酶修饰基因*tetX*,且随着Cu浓度升高*tetX*丰度也升高,原因可能是添加的重金属浓度不同导致蚯蚓肠道菌群存在差异^[18].值得注意的是,与未添加蚯蚓的CK处理组相比,添加蚯蚓的处理组CF、T1、T2和T3中ARGs的赋存多样性有所降低,此结果表明蚯蚓对部分ARGs具有较好去除效果.此外,从相对丰度来看,添加蚯蚓CF与未添加蚯蚓组CK相比,添加蚯蚓有助于链霉素类抗性基因*strB*的去除.然而,蚯蚓转化后,转化产物蚓粪中依然存在多种ARGs.Ding等^[19]对长期施用鸡粪及污泥的土壤蚯蚓肠道中的ARGs进行研究中也发现,饲喂鸡粪和

中的消长趋势存在差异,如 *sul*-ARGs,在对照组 CK 的相对丰度在第 7d 达到最大值,然后降低并趋于稳定;在 CF 和 T3 处理组 *sul*-ARGs 的相对丰度在蚯蚓转化过程中的变化趋势与 CK 对照组基本一致;但 T1 和 T2 处理组中 *sul*-ARGs 的相对丰度在第 14d 达到最大值,峰值出现时间后移,且 T2 在第 7d 和 14d *sul*-ARGs 的相对丰度显著($P<0.05$)高于 CK 和 CF 的峰值.对于 *tet*-ARGs,在 CK、T1 和 T3 处理组均在第 14d 达到峰值,随后趋于平稳.而 T2 组峰值则出现在第 7d,第 14d 出现丰度下降,随后趋于平稳.与 *sul*-ARGs 和 *tet*-ARGs 不同,*str*-ARGs 在 CK、T1、T2 和 T3 的最大值均出现在第 14d,且在所选定的 8 类抗性基因中,蚯蚓转化对 *str*-ARGs 的去除效果最好,且中浓度 Cu 处理组 T2 对 *str*-ARGs 去除效果最佳.

低浓度和高浓度的 Cu(T1、T3)处理提高了蚯蚓转化不同阶段中大部分的 ARGs 的丰度,如 *tet*-ARGs、*erm*-ARGs 和 *str*-ARGs.这表明粪污中重金属 Cu 的残留会导致蚯蚓转化过程中多类 ARGs 的富集.钱勋^[22]研究了畜禽粪便中残留的重金属 Cu 和 Zn 对好氧堆肥过程中 ARGs 的影响,发现模拟的 2 个 Cu 浓度(200 和 500mg/L)均增加了包括四环素类、大环内酯类和喹诺酮类中 5 种 ARGs 亚型的丰度.Li 等^[23]发现 2000mg/LCu 显著提高了堆肥过程中微生物对泰来菌素和万古霉素的抗性.而在中浓度 Cu 处理组 T2 中,*sul*-ARGs、*tet*-ARGs 和 *str*-ARGs 的丰度在蚯蚓转化后均较初始值降低,此结果

可能是因为该浓度的 Cu 通过促进蚯蚓的生长,提高了蚯蚓的处理效率,进而降低了牛粪中的 ARGs,此种猜测有待进一步证实.

2.3 不同 Cu 浓度胁迫下蚯蚓转化牛粪前后 ARGs 的差异分析

由图 4 可见,经过 49d 的蚯蚓转化后,产物中大多数 ARGs 有降低现象,而部分亚型如 *sul2*、*strA* 和 *bla*_{GES-1} 的含量水平经蚯蚓转化后却在所有处理中丰度均出现升高.但亚型 *bla*_{ampC} 和 *qnrB* 在不同处理中变化不同: *bla*_{ampC} 中 CF 处理升高,其余处理降低.说明加入蚯蚓导致其升高,但是加入重金属 Cu 后对其有去除作用,且差异显著($P<0.05$).基因 *qnrB* 在 T1 和 T2 处理中升高,其余处理中降低.*tetX* 的丰度在对照组 CF 中未显著降低,可能是因为该基因主要存在于革兰氏阴性菌中^[22],较难去除,但由于试验组中高浓度 Cu 对革兰氏阴性菌具有抑制作用^[24],从而导致 *tetX* 的丰度在添加 Cu 浓度最高的处理组 T3 中的增长得到了一定程度的控制.

tetL 为外排泵基因,存在于细菌细胞膜上,可外排抗生素等毒性物质,添加重金属 Cu 对 *tetL* 的去除在 CK、CF、T1 和 T3 组中有抑制作用.这是因为细菌暴露于 Cu 存在的环境中时,生物膜将会被诱导生长,同时导致存在于细菌细胞膜上的外排泵基因增多^[25].蚯蚓转化前牛粪中未检出 *oqx*B 基因,但蚯蚓转化后出现 *oqx*B 基因,这可能是由于蚯蚓肠道中存在 *oqx*B 基因,后经过腹转化进入蚓粪样品.后续研究可以针对蚯蚓肠道进行研究.

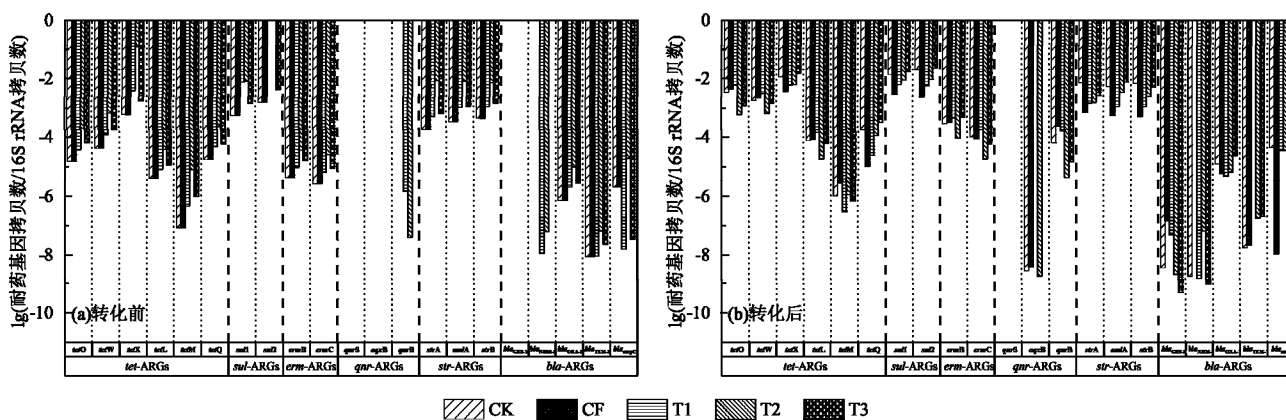


图 4 蚯蚓转化前后 ARGs 的变化

Fig.4 ARGs of earthworms before and after conversion

2.4 蚯蚓转化过程中 ARGs 的变化与环境因子的关系

为了探讨造成蚯蚓转化牛粪过程中 ARGs 变化的潜在因素,本研究通过冗余分析确定 ARGs 与重

金属及环境因子之间的关系.研究发现,对样品中 ARGs 差异影响最大的因素是 pH 值含量,占贡献率的 55.10%.如图 5 所示,含水率与基因 *tetM*、*tetW*、*tetL*、*tetQ*、*strA*、*aadA*、*strB*、*bla_{NDM-1}*、*cfr*、*fexA*、*bla_{TEM-1}*、*sul2*、*mcr-1* 和 *bla_{GES-1}* 成正相关,含水率升高,上述基因丰度增加,故在实际养殖过程中可以在保证蚯蚓存活的条件下降低养殖基质中的含水率以抑制 ARGs 丰度增加.Cu 与抗生素抗性基因 *bla_{OXA-1}*、*bla_{ampC}*、*bla_{NDM-1}*、*bla_{OXA-1}*、*oqxB*、*qnrB*、*tetO*、*tetW*、*tetX*、*tetL*、*tetM*、*ermB*、*ermC* 和 *fexA* 呈正相关($P<0.05$).此外,大部分 ARGs 指向 Cu 处理所在的第三象限,说明 Cu 的加入使得 ARGs 的相对丰度增加.Cu 是影响 ARGs 丰度的重要因素,前人研究也得到了类似的结果^[26].已有研究也表明重金属可以通过协同选择和交叉选择增加 ARGs 的丰度^[10].重金属在环境中很难降解,可以对环境中的 ARGs 产生持续性的选择压力.亦有研究报道土壤中携带 ARGs 的细菌可以通过植物组织气孔或机械损伤转移并存在于植物根内,随着植物的生长 ARGs 可以到达植物叶片^[27-28],进而进入生物链^[29].蚓粪含有多种重金属和 ARGs^[1],如果直接施用于农田,可能存在 ARGs 沿食物链扩散的风险.

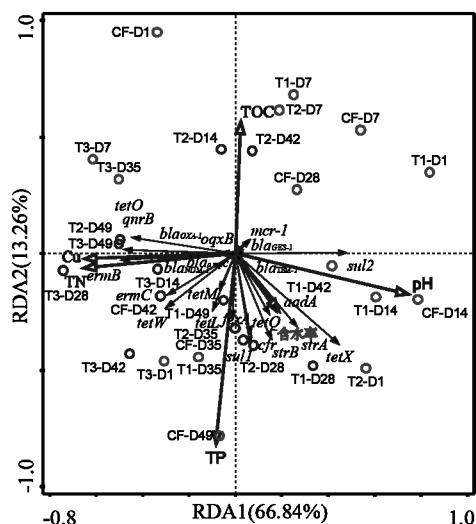


图 5 蚯蚓转化过程中 ARGs 的消长与环境因子之间的关系
Fig.5 Relationship between changes in ARGs and physicochemical properties during earthworm conversion

牛粪样品中的 TN 和 TP 水平也是造成样品间差异的部分原因,这表明动物的饲料结构可能会影

响牛粪样品的 ARGs^[30].pH 值变化可能会抑制微生物的自我复制过程,从而对 ARGs 的传播产生影响,这与前人研究相一致^[31].综上,蚯蚓转化牛粪虽然在一定程度上降低了牛粪中 ARGs 的多样性和丰度,但在处理后的蚓粪中仍有 ARGs,其中包括高风险的 *bla*-ARGs,它们在蚯蚓养殖环境、农田环境甚至食物链的残留和流动不容忽视.

3 结论

3.1 ARGs 遍布蚯蚓转化全过程,且污染最为严重的是 *sul*-ARGs(*sul1* 和 *sul2*, 10^{-3} ~ 10^0),其次是 *tet*-ARGs(*tetX*、*tetW* 和 *tetO*, 10^{-4} ~ 10^0)和 *str*-ARGs(*strA*、*strB* 和 *aadA*, 10^{-1} ~ 10^{-3}),令人担心的是,一些与人类健康密切相关的高风险 ARGs (如 *bla_{ampC}*、*bla_{OXA-1}* 和 *bla_{TEM-1}*)在蚯蚓转化过程中亦普遍存在.

3.2 蚯蚓转化可加速牛粪中 ARGs 的削减,与未加入蚯蚓的 CK 处理相比,加入蚯蚓的 CF 处理中 ARGs 的平均总丰度由 5.28×10^{-1} copies/16S copies 削减至 4.33×10^{-1} copies/16S copies,且发现蚯蚓转化对 *str*-ARGs 的去除效果较佳,中浓度 Cu 处理组的效果最优.

3.3 不同 Cu 浓度胁迫下,不同类型 ARGs 在蚯蚓转化过程中的消长规律存在差异,且粪污中 Cu 的残留可导致蚯蚓转化过程中多类 ARGs 的富集,其累积总丰度整体呈现出 CF(未添加 Cu)<T3(高浓度, 1000mg/kg)<T1(低浓度, 100mg/kg)<T2(中浓度, 500mg/kg)的趋势.

3.4 蚯蚓转化牛粪过程中,牛粪基质理化因子的变化对 ARGs 的消长起到了直接或间接的作用,其中 pH 值是影响 ARGs 增殖扩散的主要因子,通过明确该过程中 ARGs 变化的影响因素对于进一步优化牛粪-蚯蚓养殖环境、削减 ARGs 丰度、抑制 ARGs 的传播有重要作用.

参考文献:

- [1] Tian X L, Han B J, Liang J F, et al. Tracking antibiotic resistance genes (ARGs) during earthworm conversion of cow dung in northern China [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021,222: 112538.
- [2] 吴浩玮,孙小淇,梁博文,等.我国畜禽粪便污染现状及处理与资源化利用分析 [J]. 农业环境科学学报, 2020,39(6):1168-1176.
- WU H W, Sun X Q, Liang B W, et al. Analysis of livestock and

- poultry manure pollution in China and its treatment and resource utilization [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020,39(6): 1168–1176.
- [3] Gong X, Li S, Carson M A, et al. Spent mushroom substrate and cattle manure amendments enhance the transformation of garden waste into vermicomposts using the earthworm *Eisenia fetida* [J]. *Journal of Environmental Management*, 2019,248:109263.
- [4] Shi Y P, Huang J F, Ni X W, et al. Sources and accumulation risk of heavy metal in major animal manure [J]. *Animal Husbandry & Feed Science*, 2016,8(6):318–322,326.
- [5] Cang L, Wang Y J, Zhou D M, et al. Heavy metals pollution in poultry and livestock feeds and manures under intensive farming in Jiangsu Province, China [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2004,16(3): 371–374.
- [6] Ji X, Shen Q, Liu F, et al. Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai, China [J]. *Journal of hazardous materials*, 2012,235:178–185.
- [7] 唐伟欣,孙兴滨,高浩泽,等.规模化畜禽养殖场粪便中多重耐药菌分离鉴定及其耐药特征 [J]. *农业环境科学学报*, 2020,39(1):207–216.
- Tang W X, Sun X B, Gao H Z, et al. Isolation and identification of multidrug-resistant bacteria in feces from large-scale livestock and poultry farms and their antibiotic-resistance characteristics [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020,39(1):207–216.
- [8] 谷艳茹,韩秉君,黄继元,等.天津市家庭农场养殖粪污耐药基因赋存特征及风险评估 [J]. *农业环境科学学报*, 2020,39(2):394–402.
- Gu Y R, Han B J, Huang J Y, et al. Occurrence characteristics and risk assessment of resistance genes in livestock waste from family farms in Tianjin City, China [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(2):394–402.
- [9] De la Iglesia R, Valenzuela-Heredia D, Pavissich J P, et al. Novel polymerase chain reaction primers for the specific detection of bacterial copper P-type ATPases gene sequences in environmental isolates and metagenomic DNA [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010,50(6):552–562.
- [10] Wang R, Chen M, Feng F, et al. Effects of chlortetracycline and copper on tetracyclines and copper resistance genes and microbial community during swine manure anaerobic digestion [J]. *Bioresource Technology*, 2017,238:57–69.
- [11] Stepanauskas R, Glenn T C, Jagoe C H, et al. Coselection for microbial resistance to metals and antibiotics in freshwater microcosms [J]. *Environmental Microbiology*, 2006,8(9):1510–1514.
- [12] 田雪力,翟中藏,丁飞飞,等.奶牛场粪污制备卧床垫料过程中物料性质及污染物含量的周年变化规律 [J]. *农业环境科学学报*, 2018, 37(3):552–558.
- Tian XL, Zhai Z W, Ding F F, et al. Annual variation of material properties and pollutant content in the process of dairy manure making bedding in dairy farm [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2018, 37(3):552–558.
- [13] Yang F X, Zhang K Q, Zhi S L, et al. High prevalence and dissemination of β -lactamase genes in swine farms in northern China [J]. *Science of The Total Environment*, 2019,651:2507–2513.
- [14] 张俊华,陈睿华,刘吉利,等.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 [J]. *环境科学*, 2021,42(6):2981–2991.
- Zhang J H, Chen R H, Liu J L, et al. Distribution characteristics of antibiotics and antibiotic resistance genes in manure and surrounding soil of cattle farms in Ningxia [J]. *Environmental Science*, 2021,42(6): 2981–2991.
- [15] Jia L, Lya C, Lan Z B, et al. Antibiotics in soil and water in China—a systematic review and source analysis [J]. *Environmental Pollution*, 2020,266:115–147.
- [16] Pu C J, Yu Y, Diao J X, et al. Exploring the persistence and spreading of antibiotic resistance from manure to bio compost, soils and vegetables [J]. *Science of the Total Environment*, 2019,688:262–269.
- [17] Ho Y B, Zakaria M P, Latif P A, et al. Degradation of veterinary antibiotics and hormone during broiler manure composting [J]. *Bioresource Technology*, 2013,131:476–484.
- [18] Warburton P J, Amodeo N, Roberts A P. Mosaic Tetracycline Resistance Genes Encoding Ribosomal Protection Proteins [J]. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2016,71:3333–3339.
- [19] Ding J, Zhu D, Hong B, et al. Long-term application of organic fertilization causes the accumulation of antibiotic resistome in earthworm gut microbiota [J]. *Environment International*, 2019,124: 145–152.
- [20] Thomas J C T, Oladeinde A, Kieran T J, et al. Co-occurrence of antibiotic, biocide, and heavy metal resistance genes in bacteria from metal and radionuclide contaminated soils at the Savannah River Site [J]. *Microbial Biotechnology*, 2020,13:1179–1200.
- [21] Song W, Wang X, Gu J, et al. Effects of different swine manure to wheat straw ratios on antibiotic resistance genes and the microbial community structure during anaerobic digestion [J]. *Bioresource Technology*, 2017,231:1–8.
- [22] 钱 勋.好氧堆肥对畜禽粪便中抗生素抗性基因的削减条件探索及影响机理研究 [D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2016.
- Qian X. Mechanism and conditions for reducing antibiotic resistance genes during aerobic composting of livestock manure [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2016.
- [23] Li Y, Liu B, Zhang X, et al. Effects of Cu exposure on enzyme activities and selection for microbial tolerances during swine-manure composting [J]. *Journal of Hazardous Material*, 2015,283:512–518.
- [24] Peng S, Li H, Song D, et al. Influence of zeolite and superphosphate as additives on antibiotic resistance genes and bacterial communities during factory-scale chicken manure composting [J]. *Bioresource Technology*, 2018,263:393–401.
- [25] 张佳奇,徐 艳,罗 义,等.重金属协同选择环境细菌抗生素抗性及其机制研究进展 [J]. *农业环境科学学报*, 2016,35(3):409–418.
- Zhang J Q, Xu Y, Luo Y, et al. Co-selection mechanisms of bacterial resistance to heavy metals and antibiotics [J]. *Journal of Agro-*

- Environment Science, 2016,35(3):409-418.
- [26] He L Y, Liu Y S, Su H C, et al. Dissemination of antibiotic resistance genes in representative broiler feedlots environments: identification of indicator ARGs and correlations with environmental variables [J]. Environmental Science and Technology, 2014,48:13120-13129.
- [27] Hardoim P R, Overbeek L S, Elsas J D V, et al. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth [J]. Trends in Microbiology, 2008,16(10):463-471.
- [28] Bulgarelli D, Rott M, Schlaeppli K, et al. Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota [J]. Nature, 2012,488:91-95.
- [29] 张 宁,李 淼,刘 翔.土壤中抗生素抗性基因的分布及迁移转化 [J]. 中国环境科学, 2018,38(7):2609-2617.
- Zhang N, Li M, Liu X. Distribution and transformation of antibiotic resistance genes in Soil [J]. China Environmental Science, 2018,38(7): 2609-2617.
- [30] Qian X, Gu J, Sun W, et al. Diversity, abundance, and persistence of antibiotic resistance genes in various types of animal manure following industrial composting [J]. Journal of Hazardous Material, 2018,344:716-722.
- [31] 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.

作者简介: 田雪力(1993-),女,黑龙江嫩江人,农村农业部环境保护科研监测所博士研究生,主要从事畜禽废弃物资源化利用过程中抗生素抗性基因污染研究.发表论文 6 篇.