

堆肥化处理对畜禽粪便中四环素类抗生素及抗性基因控制的研究进展

田哲 张昱* 杨敏

(中国科学院生态环境研究中心 中国科学院饮用水科学与技术重点实验室 北京 100085)

摘要: 随着四环素类抗生素在畜禽养殖中的广泛应用, 畜禽粪便已成为四环素类抗生素和抗性基因的重要富集位点, 其未经处理直接施用具有潜在的生态环境和人类健康风险。堆肥化处理可有效消减畜禽粪便中的四环素类抗生素, 并且对抗性基因的扩散和传播具有一定的控制效果。本综述比较了不同的堆肥化工艺对粪肥中四环素类抗生素消减的效果, 并重点讨论了其微生物降解机理, 总结了堆肥化处理对粪肥中四环素抗性基因消减的研究进展, 进一步讨论了堆肥化处理过程中抗性基因变化的微生态机理与控制策略, 最后提出了采用热水解等预处理工艺去除抗生素压力和采用厌氧堆肥化工艺增强抗性基因控制的技术建议, 以及从动态的角度采用高通量的检测技术来解析抗性基因消减机制的研究策略建议。

关键词: 畜禽粪便, 四环素类抗生素, 四环素抗性基因, 堆肥化, 控制

Control of tetracyclines and resistance genes in animal manure by composting

TIAN Zhe ZHANG Yu* YANG Min

(Key Laboratory of Drinking Water Science and Technology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China)

Abstract: With the wide use of tetracyclines in the livestock and poultry industries, animal manure has become an important reservoir for tetracyclines and tetracycline resistance genes. The direct application of untreated manure will shade great potential risks for ecological environment and human health. Composting processes (including aerobic composting, anaerobic digestion and anaerobic lagoon, etc.) are important technologies for biotreatment of animal manure. Recent process on studies of the removal effects of tetracyclines and resistance genes in animal manure by different composting processes, the microbial degradation mechanism of tetracyclines during composting and the microbial ecological mechanism and strategies for controlling the proliferation of tetracycline resistance genes by composting were reviewed. Finally, suggestion of controlling tetracycline and resistance genes by using thermal hydrolysis pretreatment and anaerobic composting processes and strategy of dynamically exploring the removal mechanism of resistance genes during composting using high-throughput

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21277162); 科技部中日合作项目(No. 2013DFG50150)

*通讯作者: Tel: 86-10-62928390; 信箱: zhangyu@rcees.ac.cn

收稿日期: 2014-11-29; 接受日期: 2015-01-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-03-03

techniques were proposed.

Keywords: Animal manure, Tetracyclines, Tetracycline resistance genes, Composting process, Control

四环素类抗生素是一类天然[四环素(TC)、土霉素(OTC)、金霉素(CTC)等]或半合成(多西环素、米诺环素等)的具有四环分子骨架和抑菌活性的化合物,其作为细菌感染的预防和治疗药物及生长促进剂广泛应用于畜禽养殖业中^[1]。由于其吸收率较低,口服后大量四环素会以母体或活性代谢物的形式随着畜禽尿液和粪便进入环境^[2-3],有报道其在猪粪中的浓度可达到 764.4 mg/kg^[4]。含四环素的畜禽粪便施入土壤后会改变土壤微生物群落的结构(如降低细菌群落的多样性和提高真菌/细菌比例等)^[5]和降低土壤微生物活性^[6]。除了影响土壤微生物群落的功能多样性,四环素残留还会促进土壤环境中细菌耐药性的传播和发展^[5]。因此,畜禽粪便是一种重要的四环素类抗生素“污染环境”的污染源。

目前,抗生素抗性基因已经被看作是一种新兴的环境污染物^[7]。而经常服用四环素的畜禽,其肠道中含有大量可表达四环素抗性的共生微生物^[8-9],它们作为四环素抗性基因(Tetracycline resistance genes, TRGs)的宿主,会随着畜禽排便过程从肠道进入环境。因此,畜禽粪便中既有抗生素残留,又含有大量抗性菌,使其成为 TRGs 持久存在的理想环境。TRGs 通常存在于细菌细胞中的可移动遗传元件上(如质粒、转座子等)^[1,10-11],使得它们可以在不同的细菌菌株间传播,细菌广泛的生境为 TRGs 提供了广阔的“储存库”和转移途径,并可能通过水平转移使人类或动物病原微生物获得四环素抗性,对人类和牲畜健康造成威胁^[7,12]。

综上所述,作为抗生素和抗性基因的重要富集位点,含有四环素残留的畜禽粪便需经处理后方可排放进入农田土壤等受纳环境。堆肥化是依靠自然界中广泛分布的细菌、放线菌和真菌等微生物,有控制地促进可生物降解的有机物向稳定的腐殖质转化的生物化学过程^[13]。堆肥化处理是最常用的粪肥处理工艺,可有效减小废物体积,杀死病原菌^[14],并对一些难降解有机物具有增强的消减效果^[15]。已

有大量研究指出,堆肥化处理也可有效去除畜禽粪便中的四环素类抗生素^[16],并且近期的研究结果表明堆肥化过程同样是一种减少 TRGs 进入环境的有效途径^[17],因此综合分析堆肥化处理过程中四环素类抗生素和抗性基因的消减效果和生态机制对于畜禽粪便处理与资源化利用具有重要意义。本文综述了堆肥化处理畜禽粪便过程对四环素类抗生素及抗性基因的去除效果和机制,并在此基础上提出控制策略研究的建议。

1 堆肥化处理对四环素类抗生素的去除效果

本文将粪肥的直接堆储、好氧堆肥、厌氧发酵和厌氧氧化塘等工艺均纳入堆肥化处理的概念范畴,以全面地比较不同粪肥处理工艺对于四环素及其抗性基因的控制效果。针对不同的畜禽粪便,研究者使用不同的堆肥化工艺研究了四环素类抗生素在堆肥化处理过程中的降解情况。表 1 为一些研究结果的总结。

由表 1 可知,不同的研究者得出的堆肥化处理去除粪肥中四环素类抗生素的效果相差较大,其中半衰期最长为 105 d (TC, 猪粪)^[28],最短为 1 d (CTC, 火鸡厩肥)^[27]。造成上述差异的原因可能有以下两点:(1) 粪肥类型不同。表 1 所列各研究中使用到的粪肥包括牛粪、猪粪、鸡(肉鸡、火鸡、蛋鸡)粪等,不同的粪肥其物化性质(总有机碳、总氮、重金属等)以及含有的微生物种类和数量不同,这些成分对于堆肥过程及 TCs 的降解均有影响。(2) 粪肥处理工艺的差异。有的仅简单堆储而不再进行管理,有的在堆肥过程中严格控制各种环境条件,不同操作中堆肥的温度、供氧量、生物量等可能具有显著差异,同样可影响四环素在堆肥过程中的去除情况。

2 四环素类抗生素在堆肥化过程中的微生物降解

除了热解^[23]、光解^[25]和水解^[18]等非生物降解机

表 1 堆肥化处理对畜禽粪便中四环素类抗生素去除效果比较

Table 1 Removal effects of tetracyclines in animal manure by different composting processes

研究者 Researcher	畜禽粪便 Animal manure	堆肥化工艺 Composting process	四环素去除效果 Removal effects of tetracyclines
Kühne et al ^[18]	液态猪粪	好氧消化和厌氧发酵	四环素在好氧和厌氧处理的猪粪中半衰期分别为 4.5 d 和 9 d, 并且两处理中 4-差向四环素(4-Epi-oxytetracycline)占四环素总量的比例都逐渐增高
Storteboom et al ^[19]	(1) 马粪 (0.328 mg/kg, CTC); (2) 牛粪: 牛饲养场牛粪(FM)和牛奶厂牛粪(DM), 口服排泄后获得 3 种四环素: TC, OTC 和 CTC	采用高强度 [High-intensity management, HIM: 肥料中添加新鲜紫花苜蓿(氮源)和干树叶(膨胀剂), 并定期浇水和翻堆] 和低强度 [Low-intensity management, LIM: 肥料中不添加任何成分, 堆成长堆后不进行浇水和翻堆] 两种管理办法进行好氧堆肥	(1) CTC 在堆肥中快速降解, 在 HIM 和 LIM 堆肥中的半衰期分别为 5.11 d 和 8.43 d (2) 高强度管理处理效果更优, 其中 TC、OTC 和 CTC 在 HIM 堆肥中的半衰期分别为 6.5 d (FM)、9.8 d (DM) 和 6.3 d (DM), 在 LIM 堆肥中半衰期分别为 17.2 d (FM)、31.1 d (FM) 和 13.4 d (FM)。并且在所有堆肥样品中 3 种四环素含量均为: OTC>CTC>TC
Bao et al ^[20]	肉鸡粪、蛋鸡粪和猪粪。含有 CTC, 其中猪粪中含有高浓度的 Cu ²⁺ 和 Zn ²⁺	好氧堆肥	堆肥初期可提取的 CTC 含量迅速下降, 随后去除速率逐渐变慢, 堆肥结束时(42 d), 肉鸡粪肥和蛋鸡粪肥中可提取 CTC 去除率均超过 90%, 而猪粪中相应去除率仅为 27%。CTC 在肉鸡粪、猪粪和 3 种蛋鸡粪中半衰期分别为 11、86.6、12.2 d (150.3 mg CTC/kg)、12.0 d (100 mg CTC/kg) 和 4.39 d (53.10 mg CTC/kg)。可提取 CTC 在所有堆肥过程中的降解规律均服从一级降解动力学模型
Arikan et al ^[21]	牛粪(含 OTC)混合稻草和木屑(3:1:1, 体积比)	(控温、避光)好氧堆肥; 对照系统: 室温堆储和灭菌后室温堆储	OTC 含量在堆肥过程的前 6 天迅速下降, 在第 6 天时可提取 OTC 含量下降了 95%, 堆肥结束时(35 d)可提取 OTC 去除率超过 99.8%, OTC 半衰期大约为 3.2 d。而室温下培养的粪肥(37 d)和灭菌后培养的粪肥(35 d)中可提取 OTC 的去除率仅为 12% 和 25%
Liguoro et al ^[22]	牛粪(含 OTC)和草垫混合物	直接堆储	OTC 在堆肥中的半衰期为 30 d, 但腐熟 5 个月后可检测到 820 μg/kg 的 OTC, 并且 OTC 在其中的降解规律符合双指数动力学模型
Wang et al ^[23]	牛粪(外源添加 OTC)	(不同温度和湿度下)好氧堆肥	OTC 在所有湿度条件和低温条件(≤25 °C)下降解规律符合可用性调整的一级动力学模型(Availability-adjusted first-order model)。并且 OTC 随着粪肥湿度增加(60%–100%)降解速率加快, 但在水饱和的粪肥中变得难以降解。增加温度可促进 OTC 的降解, 但在过高的温度(≥35 °C)热解变为主要的降解方式, 此时降解速率明显加快。OTC 在湿度为 80%, 25 °C 下的粪肥中半衰期为 8.1 d
Arikan et al ^[24]	牛粪(含 OTC)和草垫混合	(中温)厌氧发酵	厌氧消化过程中, OTC 半衰期为 56 d。4-差向土霉素(4-Epi-oxytetracycline)的含量先逐渐增加, 27 d 后又逐渐降低, 在 64 d 时浓度(0.84±0.04 mg/L)大于初始浓度(0.55±0.03 mg/L)。α-原土霉素(α-Apo-oxytetracycline)浓度在 64 d 的消化时间内从 0.30±0.03 降为 0.14±0.02 mg/L。β-原土霉素(β-Apo-oxytetracycline)含量在整个消化反应期间没有显著变化

(待续)

			(续表)
Kuang et al ^[25]	新鲜鸡粪, 外源添加 OTC 和 CTC	恒温 (25 °C) 避光堆储和室温 (21.5±0.5 °C) 自然光照下堆储	避光条件下, 鸡粪中 3 个初始浓度的 OTC 在 15 d 内降解幅度分别为 5.67%、6.05%和 7.61%; CTC 降解幅度分别为 5.93%、6.20%和 7.36%; 而在自然光照条件下, OTC 降解幅度分别达到 87.60%、95.66%和 97.81%, CTC 分别达到 89.53%、95.98%和 98.62%, 且鸡粪中 OTC、CTC 的浓度随时间变化趋势符合一级动力学方程($C_t=C_0e^{-kt}$), 鸡粪中 OTC、CTC 的降解半衰期分别为 4.11±1.17 d 和 3.24±1.02 d
Zhang et al ^[26]	新鲜的猪粪、鸡粪及麦秸(粪肥中各种四环素均为药物口服排泄后获得)	好氧堆肥, 并且实验组添加 BM 菌剂以增强四环素类抗生素降解作用	不同堆肥处理的 TC、OTC、CTC 均以猪粪+麦秆处理、鸡粪+麦秆处理去除效果最好; 添加专门选择的 BM 菌剂可以促进四环素类抗生素的降解, 添加 BM 菌剂处理对 TC、OTC、CTC 的降解去除效果优于粪肥+麦秆+四环素类抗生素处理。所有处理对 OTC 去除效果较差, 鸡粪+麦秆+OTC 处理去除率最低, 为 40.23%。所有堆肥处理中降解去除率由大到小的顺序均为: TC>CTC>OTC
Dolliver et al ^[27]	火鸡粪便与垫草的混合物, 外源添加 CTC	简单堆储(初始调节湿度后不再进行任何管理); 直接堆储(每周进行翻堆和调节湿度); 好氧堆肥(堆肥过程中控制温度、湿度等条件最优)	3 种堆肥方式对 CTC 的降解能力没有显著差别, 在堆肥过程结束时(22–35 d), 3 种堆肥方式中 CTC 去除率均超过 99%。CTC 去除规律符合一级降解动力学模型, 半衰期为 1 d
Winckler et al ^[28]	猪粪, 外源添加 TC	好氧消化	TC 在猪粪中表现出明显的稳定性, TC 初始浓度、环境温度和曝气状况均对其降解没有显著影响。TC 在猪粪中的半衰期为 55–105 d

制, 微生物降解是环境中四环素类抗生素去除的一种重要途径^[29]。Storteboom 等^[19]在研究粪肥的管理强度对于其中 CTC 的去除影响时, 在粪肥中检测到了 *tet(X)* 基因。Barkovskii 等^[30]在研究 TRGs 的转移规律时, 在粪肥厌氧发酵池中同样发现了 *tet(X)* 基因。*tet(X)* 是第一个被发现的四环素类药物酶修饰基因, 其编码的蛋白(一种单加氧酶)可化学修饰四环素, 使其降解^[29,31]。因此, *tet(X)* 基因在不同堆肥工艺中的检出表明微生物降解作用存在的可能。张树清等^[26]在研究高温堆肥对畜禽粪肥中四环素类的降解效果时, 发现粪肥中四环素含量过高会抑制堆肥中微生物的增殖和活性, 降低对四环素类抗生素的降解能力; 但在相同条件下, 外源添加 BM 菌剂(一种芽孢杆菌生物复合制剂)可以促进四环素类抗生素的降解, 进一步表明堆肥过程中微生物降解作用的存在。Wang 等^[23]在研究堆肥湿度对其中 OTC 去除的影响时发现, 随着堆肥的湿度增加

(60%–100%), OTC 在其中的降解速率略有提高(半衰期从 9.3 d 降为 7.8 d), 但在灭菌或水饱和的粪肥中 OTC 的降解率显著下降, 据此作者认为好氧微生物降解是其研究中 OTC 去除的主要机理。De Liguoro 等^[22]和 Arikan 等^[21]同样认为微生物降解是其堆肥处理中一种可能的四环素去除机理。尽管目前已有大量研究表明堆肥过程中四环素类药物的降解与微生物降解作用有关, 但对于具体有哪些微生物参与了四环素的降解以及具体的降解途径还未见报道。因此, 下一步的研究需要关注微生物降解的直接证据, 例如: 降解微生物筛选、降解途径的解析、降解酶和降解基因的分离等。

3 堆肥化处理对 TRGs 的控制效果

目前已知的 TRGs 有 45 种^[32]。根据作用机理, 可将它们分为三类: 外排基因(Efflux genes), 编码外排泵蛋白将四环素泵出细胞(以减少细胞内抗生

素浓度), 如 *tet(A-E)*、*tet(G)*、*tet(H)*、*tet(J)*、*otr(B)* 等^[11]; 核糖体保护基因(Ribosomal protection genes), 编码核糖体保护蛋白改变核糖体构象从而解除四环素对蛋白合成的抑制^[33], 如 *tet(M)*、*tet(O)*、*tet(S)*、*otr(A)* 等; 酶修饰基因(Enzymatic modification genes), 编码氧化还原酶化学修饰四环素使其失活, 包括 *tet(X)*和 *tet(37)*^[31,34]。畜禽粪便是 TRGs 的天然“储存库”和一种地表及地下水体中抗性基因的重要来源, 在环境中 TRGs 的迁移扩散中起着重要作用^[7,35]。然而, 目前定量研究 TRGs 在粪肥处理中丰度变化的报道还很有限。

Yu 等^[36]使用实时定量 PCR 考察了 10 种 TRGs [*tet(A)*、*tet(C)*、*tet(G)*、*tet(M)*、*tet(O)*、*tetB(P)*、*tet(Q)*、*tet(S)*、*tet(T)*和 *tet(W)*]在环境中的分布, 在猪粪、牛粪、猪粪堆肥、猪粪的厌氧发酵池和处理猪粪废水的生物滤池中均发现了上述 10 种抗性基因, 并且所有猪粪样品中 10 种 TRGs 的拷贝数均高于牛粪。厌氧发酵和生物滤池处理均不能有效降低猪粪水中 TRGs 的含量, Chee-Sanford 等^[35]在考察厌氧发酵池中表达核糖体保护机制的 TRGs 变化时也发现了类似的现象。但 Yu 等^[36]发现在所有的猪粪堆肥样品中 10 种抗性基因数量大幅减少, 特别是 7 种表达核糖体保护机制的 TRGs [*tet(M)*、*tet(O)*、*tetB(P)*、*tet(Q)*、*tet(S)*、*tet(T)*和 *tet(W)*]在超过 60% 的堆肥样品中均低于检测限, 表明堆肥处理可有效消减粪肥中的 TRGs。而 Zhu 等^[17]在调查中国 3 个不同地区(北京、嘉兴和莆田)的猪粪中 TRGs 在堆肥处理前后的变化时, 发现堆肥处理对于不同来源的粪肥中含有的抗性基因消减效果有较大差异, 例如堆肥处理后北京的样品中 *tet(A)*、*tet(B)*和 *tet(C)* 基因丰度显著增加, 而堆肥处理可显著消减嘉兴和莆田的粪肥中 3 种基因的丰度。作者认为造成上述去除效果差异的原因主要源于不同来源的粪肥中含有的抗生素和重金属含量不同, 两者施加的直接或共选择作用会影响 TRGs 在堆肥处理过程中的变化。

畜禽粪便作为四环素类抗生素的富集位点, 抗

生素存在产生的选择压力有可能导致抗性基因水平增高^[37]。Storteboom 等^[19]发现牛粪堆肥处理过程中, *tet(B)*和 *tet(M)*含量逐渐降低, 并且两基因的降解情况与其中四环素浓度变化均呈现出强的正相关。Smith 等^[38]调查了 *tet(O)*、*tet(W)*和 *tet(Q)*在多个饲养场氧化塘中的分布情况, 同样发现 3 种抗性基因总量与粪肥中四环素含量显著正相关。但是, Storteboom 等^[19]指出即使四环素浓度较低时 (<0.000 7 mg/kg), TRGs 仍可能长期存在, 这主要是因为四环素被降解后, 其降解产物仍具有活性, 可继续对 TRGs 产生选择压力。因此使用堆肥工艺来控制粪肥中 TRGs 时, 在其中四环素完全降解后仍需多放置一段时间以促进 TRGs 的去除。Peak 等^[39]比较了牛饲养场中不同的抗生素使用策略对 6 种 TRGs [*tet(O)*、*tet(Q)*、*tet(W)*、*tet(M)*、*tet(B)*和 *tet(L)*]在氧化塘中存在状况的影响, 发现在大量使用四环素的氧化塘中 6 种 TRGs 水平明显高于混合使用四环素和不使用四环素的氧化塘, 并且 TRGs 水平与养殖规模和样品中总细菌量显著正相关 ($r=0.67$ 和 0.51)。但 TRGs 却与氧化塘中水相四环素含量呈现弱的正相关($r=0.38$), 可能的原因是四环素与其抗性基因在环境中的转移转化途径不同, 以及四环素富集于沉积物中, 但作者未测定吸附态四环素含量。

同时, 有研究发现氧化塘中 TRGs 水平与日照时间呈现出强的负相关, 说明延长粪肥的日照时间可促进其中 TRGs 的去除^[39-40]。因此, 考虑到四环素类抗生素的光降解特性^[25], 延长粪肥的光照时间既可促进其中四环素的降解又可以增加 TRGs 的去除, 因此应尽量增加堆肥介质的曝光面积和时间。

4 堆肥化处理过程中 TRGs 变化的微生态机理与控制策略

细菌是 TRGs 的宿主, 粪肥处理过程中宿主的演替会导致其中抗性基因丰度的变化(抗性基因的垂直转移)。*tet(A)*、*tet(B)*和 *tet(G)*等四环素外排基因的宿主多为革兰氏阴性菌^[41], 而厌氧系统的细菌

群落以革兰氏阳性菌占主导^[42], 因此厌氧处理工艺具有内在的优势消减畜禽粪肥中的该类基因。例如, Barkovskii 等^[30]研究氧化塘中 TRGs 的变化时, 即发现新鲜粪肥中含有大量的 *tet(B)* 基因, 但经厌氧氧化塘处理后 *tet(B)* 快速消失。除氧含量外, 温度是微生物群落演替的另一种重要驱动力^[43]。温度同样可影响 TRGs 的消减, 例如 Diehl 和 LaPara^[44] 在研究温度对于好氧和厌氧消化工艺消减市政污泥中 TRGs 的影响时, 发现随着温度的增加 *tet(A)* 和 *tet(X)* 等基因在两种工艺中的去除速率增加, 上述抗性基因的消减可能与温度驱动下宿主菌的演替有关。好氧堆肥过程中堆温同样会显著变化: 初始的 2–3 d 堆肥温度从环境温度快速升至高温(一般在 50–65 °C, 甚至可升至 82 °C^[45]), 并在高温阶段维持 5–7 d^[13]。随着堆温的增加, 嗜热菌属和芽孢菌属等成为优势菌^[13,45], 而畜禽粪便中的细菌主要为嗜中温的肠道共生菌^[46], 它们在温度的选择压力下会逐渐被淘汰, 其含有的抗性基因同样可能会随着宿主的消亡而降低。但是, 随着堆肥中可降解有机质的消耗微生物代谢活性下降, 堆肥温度会逐渐降低, 同时嗜温菌属的数量会有所回升^[47], 随着嗜温菌的增多抗性基因丰度有可能会反弹。Ghosh 等^[48] 在研究两级厌氧消化对于 TRGs 的消减时, 即发现尽管第一级高温消化工艺可显著降低污泥中 *tet(A)*、*tet(O)* 和 *tet(X)* 的相对丰度, 但随后的中温消化段 3 种抗性基因的丰度会再次增加。目前对于堆肥工艺消减 TRGs 的研究多采取静态地采集堆肥前后样品进行抗性基因的分析, 缺乏整个堆肥过程的动态跟踪。因此, 结合堆肥过程中细菌类群的演替对抗性基因的变化进行深入研究对于了解堆肥过程中 TRGs 的行为具有重要的意义。

基因水平转移(Horizontal gene transfer, HGT) 是环境中抗性基因传播的另一种重要途径^[49]。TRGs 被发现存在于多种可移动遗传元件上^[1], 同时在堆肥处理过程中细菌密度高^[47], 并且有多种抗生素或重金属共存^[17], 这些因素都会促进 TRGs 通过

水平转移机制在堆肥化过程中增殖和传播。Zhu 等^[17] 发现当粪肥中有高浓度抗生素存在时, TRGs 与转座基因(Transposase genes) 具有强的正相关性 ($r^2=0.97$), 说明存在高抗生素压力的环境中 HGT 在 TRGs 的富集中发挥着重要作用。而在无抗生素存在的环境, 如草地或未施用过粪肥的农田土壤中, 抗性基因的分布主要与细菌的群落结构有关, 并且功能宏基因组的分析表明其中的抗性基因大多未与转移元件相连, 这表明无抗生素压力的环境中 HGT 对于抗性基因扩散的贡献较小^[50]。因此, 从 TRGs 控制的角度考虑, 粪肥处理工艺应尽可能地去除粪肥中的残留抗生素以降低 TRGs 的 HGT 潜能。同时, 研究发现厌氧发酵技术, 特别是高温厌氧消化工艺可有效地消减整合子等水平转移元件^[48,51]; 另一方面, Pei 等^[52] 和 Rysz 等^[53] 认为厌氧情况下微生物活性较低不利于抗性基因的水平转移。因此, 厌氧堆肥化工艺, 如厌氧发酵或厌氧氧化塘, 更有利于控制 TRGs 的水平转移。

实际堆肥化处理过程中, 垂直转移和水平转移机制共同影响着粪肥中抗性基因的迁移和扩散。Storteboom 等^[19] 使用马粪作为堆肥原料(外源添加 CTC), 同时考察了堆肥过程中 TRGs [*tet(W)* 和 *tet(O)*] 和抗生素的降解情况, 发现 *tet(W)* 水平先升高后降低, 其变化与 CTC 无相关性; 而 *tet(O)* 含量在整个堆肥过程中逐渐降低, 且其变化趋势与堆肥中 CTC 的降解趋势一致。虽然初始粪肥中 *tet(W)* 的含量小于 *tet(O)*, 但堆肥结束时却超过 *tet(O)*。作者认为上述现象主要是因为 *tet(W)* 基因具有较广宿主范围(19 个属)^[10], 并存在于结合转座子(TnB1230) 中^[54], 转移能力强, 并且转移进入新宿主菌后也不易丢失(稳定性好)^[10]; 而 *tet(O)* 基因宿主范围较小(11 个属)^[10], 并主要存在质粒上(其在宿主中的稳定性小于转座子)^[10], 使得 *tet(O)* 在堆肥过程中所占比例逐渐低于 *tet(W)*。

5 结论与展望

四环素类抗生素在畜牧业养殖方面的广泛应

用,使畜禽粪便中含有大量四环素残留,并成为四环素抗性基因的“储存库”。上述畜禽粪便若未经处理或简单处理便施用于土壤,会对人类健康造成较大风险,因此有必要对其进行有效处理。综上所述,堆肥化处理是一种可降低粪肥中四环素类抗生素含量、控制四环素抗性基因扩散的有效工艺手段,但是目前在粪肥中抗生素及抗性基因消减效率和机理等方面仍有待深入研究。因此,本文提出如下两点建议:

(1) 在抗生素消减和抗性基因控制方面:由于抗生素残留会造成堆肥过程中抗性基因的产生和传播,对于含高浓度抗生素的粪肥,建议首先采用一定的预处理工艺(热水解等),降低其中的抗生素含量再进行后续的堆肥化处理,以降低残留抗生素对于 TRGs 的 HGT 的促进作用;另一方面,推广厌氧堆肥化工艺,如厌氧发酵或厌氧氧化塘工艺,在消减抗生素的同时尽可能控制 TRGs 的增殖与扩散。

(2) 在检测方法和机制研究方面:应动态地研究堆肥化处理过程中抗性基因、转移元件和细菌类群的变化,以进一步明确水平转移机制和垂直转移机制在堆肥化过程中对抗性基因消减的贡献;定量 PCR 方法可以定量确定部分抗性基因的丰度变化,但是畜禽粪便中由于有多种抗生素和重金属共存,可能导致其中存在的抗性基因种类繁多,因此采用更加高通量的检测方法,如基因芯片和宏基因组技术将有助于全面解析堆肥化处理对于抗性基因的控制情况。

参 考 文 献

[1] Roberts MC. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1996, 19(1): 1-24

[2] Hoffmann M, DeMaio W, Jordan RA, et al. Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of C-14 tigeicycline, a first-in-class glycylycine antibiotic, after intravenous infusion to healthy male subjects[J]. *Drug Metabolism and Disposition*, 2007, 35(9): 1543-1553

[3] Alcock RE, Sweetman A, Jones KC. Assessment of organic contaminant fate in waste water treatment plants I: selected compounds and physicochemical properties[J]. *Chemosphere*, 1999, 38(10): 2247-2262

[4] Pan X, Qiang ZM, Ben WW, et al. Residual veterinary

antibiotics in swine manure from concentrated animal feeding operations in Shandong Province, China[J]. *Chemosphere*, 2011, 84(5): 695-700

[5] 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

[6] Kong WD, Zhu YG, Fu BJ, et al. The veterinary antibiotic oxytetracycline and Cu influence functional diversity of the soil microbial community[J]. *Environmental Pollution*, 2006, 143(1): 129-137

[7] Pruden A, Pei R, Storteboom H, et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(23): 7445-7450

[8] Wichmann F, Udikovic-Kolic N, Andrew S, et al. Diverse antibiotic resistance genes in dairy cow manure[J]. *mBio*, 2014, 5(2): e01017

[9] Looft T, Johnson TA, Allen HK, et al. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(5): 1691-1696

[10] Roberts MC. Update on acquired tetracycline resistance genes[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 245(2): 195-203

[11] Chopra I, Roberts MC. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, 65(2): 232-260

[12] Li ZJ, Yao ZP, Zhang J, et al. A review on fate and ecological toxicity of veterinary antibiotics in soil environments[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2008, 3(1): 15-20 (in Chinese)
李兆君, 姚志鹏, 张杰, 等. 兽用抗生素在土壤环境中的行为及其生态毒理效应研究进展[J]. *生态毒理学报*, 2008, 3(1): 15-20

[13] Huang DY, Lu WJ, Wang HT. Microbiological mechanism of organic solid wastes composting[J]. *Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control*, 2004, 5(1): 12-18 (in Chinese)
黄得扬, 陆文静, 王洪涛. 有机固体废物堆肥化处理的微生物学机理研究[J]. *环境污染治理技术与设备*, 2004, 5(1): 12-18

[14] Zhou QY, Wang SF. *Environmental Engineering Microbiology*[M]. Beijing: Higher Education Press, 2008: 348-352
周群英, 王士芬. *环境工程微生物学*[M]. 北京: 高等教育出版社, 2008: 348-352

[15] Hakk H, Millner P, Larsen G. Decrease in water-soluble 17 beta-estradiol and testosterone in composted poultry manure with time[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2005, 34(3): 943-950

[16] Wang R, Wei YS. Pollution and control of tetracyclines and heavy metals residues in animal manure[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(9): 1705-1719 (in Chinese)
王瑞, 魏源送. 畜禽粪便中残留四环素类抗生素和重金属的污染特征及其控制[J]. *农业环境科学学报*, 2013, 32(9): 1705-1719

[17] Zhu YG, Johnson TA, Su JQ, 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

[18] Kühne M, Ihnen D, Möller G, et al. Stability of tetracycline in water and liquid manure[J]. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 2000, 47(6): 379-384

[19] Storteboom HN, Kim SC, Doesken KC, et al. Response of antibiotics and resistance genes to high-intensity and low-intensity manure management[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2007, 36(6): 1695-1703

[20] Bao Y, Zhou Q, Guan L, et al. Depletion of chlortetracycline during composting of aged and spiked manures[J]. *Waste Management*, 2009, 29(4): 1416-1423

[21] Arian OA, Sikora LJ, Mulbry W, et al. Composting rapidly

- reduces levels of extractable oxytetracycline in manure from therapeutically treated beef calves[J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(1): 169-176
- [22] De Liguoro M, Cibir V, Capolongo F, et al. Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil[J]. *Chemosphere*, 2003, 52(1): 203-212
- [23] Wang Q, Yates SR. Laboratory study of oxytetracycline degradation kinetics in animal manure and soil[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(5): 1683-1688
- [24] Arikian OA, Sikora LJ, Mulbry W, et al. The fate and effect of oxytetracycline during the anaerobic digestion of manure from therapeutically treated calves[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(7): 1637-1643
- [25] Kuang GW, Sun ZL, Chen XJ, et al. Degradation of tetracyclines in chicken feces[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(5): 1784-1788 (in Chinese)
- 匡光伟, 孙志良, 陈小军, 等. 四环素类抗菌药物在鸡粪中的降解研究[J]. *农业环境科学学报*, 2007, 26(5): 1784-1788
- [26] Zhang SQ, Zhang FD, Liu XM, et al. Degradation of antibiotics and passivation of heavy metals during thermophilic composting process[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(2): 337-343 (in Chinese)
- 张树清, 张夫道, 刘秀梅, 等. 高温堆肥对畜禽粪中抗生素降解和重金属钝化的作用[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(2): 337-343
- [27] Dolliver H, Gupta S, Noll S. Antibiotic degradation during manure composting[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2008, 37(3): 1245-1253
- [28] Winckler C, Grafe A. Use of veterinary drugs in intensive animal production: evidence for persistence of tetracycline in pig slurry[J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2001, 1(2): 66-70
- [29] Tian Z, Zhang Y, Yang M. The origin, environmental distribution and potential application of tetracycline resistance gene—*tet(X)*[J]. *Environmental Chemistry*, 2014, 33(12): 2027-2037 (in Chinese)
- 田哲, 张昱, 杨敏. 四环素类药物修饰基因——*tet(X)*的起源、分布及在环境中的作用[J]. *环境化学*, 2014, 33(12): 2027-2037
- [30] Barkovskii AL, Coleman C. Persistent and transient antibiotic resistance genes in swine feeding operations and their environmental fate as affected by farms' operational practices[C]. The Annual Meeting and International Symposium of Microbial Ecology Committee at the Ecological Society of China, 2009
- [31] Yang WR, Moore IF, Koteva KP, et al. TetX is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(50): 52346-52352
- [32] Roberts MC. Mechanism of resistance for characterized *tet* and *otr* genes[J/OL]. 2014-11-15. <http://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb1.pdf>
- [33] Spahn CMT, Blaha G, Agrawal RK, et al. Localization of the ribosomal protection protein Tet(O) on the ribosome and the mechanism of tetracycline resistance[J]. *Molecular Cell*, 2001, 7(5): 1037-1045
- [34] Diaz-Torres ML, McNab R, Spratt DA, et al. Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(4): 1430-1432
- [35] Chee-Sanford JC, Aminov RI, Krapac IJ, et al. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(4): 1494-1502
- [36] Yu ZT, Michel FC, Hansen G, et al. Development and application of real-time PCR assays for quantification of genes encoding tetracycline resistance[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(11): 6926-6933
- [37] Sandegren L. Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations[J]. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 2014, 119(2): 103-107
- [38] Smith MS, Yang RK, Knapp CW, et al. Quantification of tetracycline resistance genes in feedlot lagoons by real-time PCR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(12): 7372-7377
- [39] Peak N, Knapp CW, Yang RK, et al. Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies[J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(1): 143-151
- [40] Engemann CA, Keen PL, Knapp CW, et al. Fate of tetracycline resistance genes in aquatic systems: migration from the water column to peripheral biofilms[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(14): 5131-5136
- [41] Roberts MC. Distribution of *tet* resistance genes among Gram-negative bacteria[J/OL]. 2014-11-15. <http://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb2.pdf>
- [42] Liu MM, Ding R, Zhang Y, et al. Abundance and distribution of Macrolide-Lincosamide-Streptogramin resistance genes in an anaerobic-aerobic system treating spiramycin production wastewater [J]. *Water Research*, 2014, 63: 33-41
- [43] Tian Z, Zhang Y, Li YY, et al. Rapid establishment of thermophilic anaerobic microbial community during the one-step startup of thermophilic anaerobic digestion from a mesophilic digester[J]. *Water Research*, 2015, 69: 9-19
- [44] Diehl DL, LaPara TM. Effect of temperature on the fate of genes encoding tetracycline resistance and the integrase of class 1 integrons within anaerobic and aerobic digesters treating municipal wastewater solids[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, 44(23): 9128-9133
- [45] Beffa T, Blanc M, Lyon PF, et al. Isolation of *Thermus* strains from hot composts (60 to 80 degrees C)[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(5): 1723-1727
- [46] Dowd SE, Callaway TR, Wolcott RD, et al. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP)[J]. *BMC Microbiology*, 2008, 8: 125
- [47] Hassen A, Belguith K, Jedidi N, et al. Microbial characterization during composting of municipal solid waste[J]. *Bioresource Technology*, 2001, 80(3): 217-225
- [48] Ghosh S, Ramsden SJ, LaPara TM. The role of anaerobic digestion in controlling the release of tetracycline resistance genes and class 1 integrons from municipal wastewater treatment plants[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 84(4): 791-796
- [49] Aleksun MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance[J]. *Cell*, 2007, 128(6): 1037-1050
- [50] Forsberg KJ, Patel S, Gibson MK, et al. Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats[J]. *Nature*, 2014, 509(7502): 612-616
- [51] Ma Y, Wilson CA, Novak JT, et al. Effect of various sludge digestion conditions on sulfonamide, macrolide, and tetracycline resistance genes and class 1 integrons[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(18): 7855-7861
- [52] Pei R, Cha J, Carlson KH, et al. Response of antibiotic resistance genes (ARG) to biological treatment in dairy lagoon water[J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(14): 5108-5113
- [53] Rysz M, Mansfield WR, Fortner JD, et al. Tetracycline resistance gene maintenance under varying bacterial growth rate, substrate and oxygen availability, and tetracycline concentration[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(13): 6995-7001
- [54] Melville CM, Brunel R, Flint HJ, et al. The *Butyrivibrio fibrisolvens tet(W)* gene is carried on the novel conjugative transposon TnB1230, which contains duplicated nitroreductase coding sequences[J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(11): 3656-3659