

光照对畜禽粪便中抗生素降解和微生物的影响

林 辉¹,马军伟¹,孙万春¹,俞巧钢¹,叶 静¹,虞铁俊^{2*} (1.浙江省农业科学院环境资源与土壤肥料研究所,浙江 杭州 310021; 2.浙江省耕地质量与肥料管理总站,农业农村部肥料质量监督检验测试中心(杭州),浙江 杭州 310020)

摘要:为研究光照对粪便发酵降解抗生素的影响,采用固态发酵试验,对比避光和光照培养后不同猪鸡粪中主要残留抗生素浓度和细菌群落组成差异。结果表明,光照促进发酵后粪便的抗生素残留总量下降,在猪粪样品中尤为显著,最高下降 23.8%。猪粪中四环素类、氟喹诺酮类和磺胺类抗生素在光培养下的降解总体高于避光培养,且光照降低猪粪中磺胺耐药细菌数量,增加细菌群落多样性和有机质降解相关细菌丰度。光照对鸡粪发酵中抗生素降解的影响在不同样品和光照时间之间差异显著,可抑制部分样品中磺胺类抗生素降解,并伴随磺胺耐药细菌数量的增加以及细菌群落丰度和多样性的下降。有针对性地在养殖粪便尤其是猪粪的堆肥场所提供适度光照将有助于抗生素的削减。

关键词:光照; 抗生素; 降解; 耐药菌; 细菌群落结构

中图分类号: X705,X172 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2021)01-0263-10

Effect of light illumination on antibiotic degradation and microbial community in manure. LIN Hui¹, MA Jun-wei, SUN Wan-chun¹, YU Qiao-gang¹, YE Jing¹, YU Yi-jun^{2*} (1.Institute of Environment, Resource, Soil & Fertilizer, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; 2.Hangzhou Center for Inspection and Testing for Quality and Safety of Fertilizer, Zhejiang Cultivated Land Quality and Fertilizer Management Station, Hangzhou 310020, China). *China Environmental Science*, 2021,41(1): 263~272

Abstract: This work investigated the effect of light illumination on antibiotic degradation during manure fermentation. The concentrations of antibiotic residues and bacterial communities in pig and chicken manure samples after solid-state incubation under dark and light conditions were analyzed. Results indicated that light illumination improved the removal of antibiotic residues in manure samples, particularly in pig manure, showing a maximum decline of 23.8% in the total antibiotic concentration. All the pig manure samples after a light incubation showed lower residual concentrations of tetracyclines, fluoroquinolones, and sulfonamides than those incubated in the dark. The proliferation of sulfonamides-resistant bacteria in pig manure samples could also be inhibited by light illumination, accompanied by increases in the diversity of the bacterial community and the abundances of some bacterial genera relating to organic matter degradation. In chicken manure, the effect of light illumination on the degradation of antibiotics varied greatly among chicken manure samples and light duration treatments. It was found that light illumination inhibited the degradation of sulfonamides in some chicken manure samples, accompanied by an increase in the sulfonamide resistance bacterial population and a decline in the diversity and abundance of manure bacterial community. This work suggested that supplying appropriate light illumination during the storage or processing processes of animal manure, especially pig manure, could be an option to improve the elimination of antibiotics and antibiotic resistance.

Key words: illumination; antibiotic; degradation; antibiotic-resistant bacteria; bacterial community

养殖畜禽粪便已成为环境抗生素污染的重要来源^[1],具有抗生素残留种类多,残留浓度高等特点^[2-5]。抗生素原药及其代谢物伴随畜禽粪便肥料化使用进入农业系统,一方面在土壤和作物可食部分中积累^[6],干扰土壤生态系统功能的主要调节者—土壤微生物^[7],另一方面加速环境中耐药菌和抗性基因的传播扩散^[8]。基于目前环境压力的不断增大,探索不同的粪肥处理策略,开发经济高效的抗生素去除方法迫在眉睫。传统粪便无害化处理,例如堆肥、厌氧消化等方式均证明可以通过生物降解、水解等方式减少抗生素残留^[9-12],但抗生素去除效果有限,

亟待加强^[5,11]。例如,Qian 等^[13]研究证实经过堆肥等常规无害化处理的商品有机肥中抗生素检出依然频繁,单种抗生素残留浓度可高达 72.8mg/kg。

传统粪便无害化处理,除晾晒外,均没有考虑光照的影响,大部分粪便在避光场所储存、加工。然而,光照是影响自然环境中抗生素残留量的重要因素,四环素、土霉素、红霉素在模拟日光下均能发生光

收稿日期: 2020-05-18

基金项目: 浙江省三农六方项目(2018SNLF028);浙江省自然科学基金资助项目(LY19D010011)

* 责任作者, 推广研究员, yuyijun0806@163.com

降解^[14],但光照对土壤、粪便等固体介质中抗生素降解的影响研究较少。尽管如此,有研究发现,在光照条件下培养鸡粪可加速氧氟沙星和恩诺沙星去除^[15-16]。但是,畜禽粪便中残留的抗生素类型多样,尚不清楚光照对畜禽粪便中抗生素降解的作用在不同抗生素类型和培养条件之间的差异。

综上,本文从不同来源采集了猪鸡粪,在固态发酵条件下,研究在粪便发酵过程设置辅助光照措施对主要残留抗生素降解的影响以及粪便细菌群落差异。研究以期为畜禽粪便中抗生素的去除处理提供理论和技术支撑,为传统堆肥工艺的提升改造提供参考。

1 材料与方法

1.1 畜禽粪便原料

表 1 猪鸡粪原料基本理化性质和抗生素残留量

Table 1 The basic physicochemical properties and antibiotic concentrations of chicken and pig manure samples

| 项目 | 参数 | 猪粪 | | 鸡粪 | |
|--------------|---------------|-----------|---------|---------|--------|
| | | PM1 | PM2 | CM1 | CM2 |
| 基本理化性质 | 含水率(%) | 73.3 | 68.2 | 54.0 | 52.65 |
| | pH 值 | 7.4 | 7.8 | 8.9 | 7.9 |
| | 电导率(ms/cm) | 4.5 | 3.2 | 4.1 | 5.6 |
| | TC(%) | 33.8 | 35.8 | 38.1 | 24.98 |
| | TN(%) | 2.6 | 2.1 | 2.9 | 2.1 |
| (μg/kg) | 磺胺嘧啶(SDZ) | 6530.7 | 3936.2 | 1438.1 | 2224.3 |
| | 磺胺噻唑(STZ) | n.d. | 639.4 | n.d. | 5.3 |
| | 磺胺二甲嘧啶(SMZ) | 1887.5 | 230.7 | 124.9 | 472.7 |
| | 磺胺氯哒嗪(SCP) | n.d. | 11.9 | n.d. | n.d. |
| | 磺胺间甲氧嘧啶(SMM) | 2104.3 | 556.9 | n.d. | 12.4 |
| | 磺胺间二甲氧嘧啶(SMD) | 6269.3 | 2000.0 | 1339.5 | 2419.9 |
| | 磺胺甲噁唑(SMZ) | n.d. | n.d. | n.d. | 31.9 |
| | 磺胺喹恶啉(SQ) | n.d. | n.d. | 2072.9 | n.d. |
| 氟喹诺酮类(μg/kg) | 氧氟沙星(OFL) | 11314.2 | 2547.73 | 67.9 | 2314.7 |
| | 环丙沙星(CIP) | 5214.3 | 2124.8 | 9280.8 | 1115.0 |
| | 恩诺沙星(ENR) | 19405.8 | 1180.0 | 53508.4 | 838.0 |
| | 替米考星(TIL) | n.d. | 287.1 | n.d. | 359.5 |
| | 培氟沙星(PEF) | n.d. | n.d. | n.d. | 112.3 |
| | 土霉素(OTC) | n.d. | 282.6 | 85255.2 | n.d. |
| (μg/kg) | 四环素(TET) | 3914.2 | 886.8 | n.d. | 173.7 |
| | 金霉素(CTC) | 63446.9 | 9409.9 | n.d. | n.d. |
| | 多西环素(DOX) | 10015.6 | 317.7 | 40196.0 | 227.3 |
| | 大环内酯类(μg/kg) | 克林霉素(CLI) | 117.2 | n.d. | 15.1 |
| | 替米考星(TIL) | 12153.5 | n.d. | n.d. | n.d. |

注:n.d.为无检出。

猪粪 PM1 取自浙江义乌,来源于农户散养肉猪;猪粪 PM2 取自浙江常山,来源于小型养猪场的储粪池。鸡粪 CM1 取自浙江义乌,来源于圈养肉鸡,是鸡

粪与农糠垫料的混合物,采用粉碎机将块状的鸡粪垫料混合物粉碎均匀待用;鸡粪 CM2 取浙江建德莲花镇,来源于蛋鸡,纯鸡粪,无垫料。原料的基本理化性质和抗生素残留量如表 1。

1.2 试验处理

试验 1 设两个处理:避光处理(D)和全天光照处理(L),原料为猪粪 PM1 和鸡粪 CM1。试验 2 在试验 1 的基础上,设置光照时间处理:避光处理(D),全天光照处理(L),12h 光照-12h 避光交替处理(L-12h),原料为猪粪 PM2 和鸡粪 CM2。每个处理 3 个重复。将 50g 原料分装到 9cm 无菌浅层培养皿中,将培养皿置于 30°C 光照培养箱中静置培养。光照强度为 10000lx。光照处理组直接暴露于光照下,避光处理样品用锡箔纸和报纸遮光。培养 5d 后,取一部分样品保存于 -20°C 用于抗生素残留浓度测定和基因组 DNA 提取测定,另外一部分样品直接进行耐药细菌培养计数。

1.3 测定方法

1.3.1 抗生素残留浓度测定 取 -20°C 保存的粪便样品,参照 Qian 等^[13]报道的步骤,采用固相萃取法联合高效液相色谱-串联质谱技术(HPLC/MS-MS)测定磺胺类、四环素类、氟喹诺酮类和大环内酯类抗生素浓度。采用乙腈 + Na₂EDTA-磷酸盐缓冲溶液(pH=3;V:V,1:1)从粪便样品中提取四环素类和大环内酯类抗生素,乙腈 + Na₂EDTA-McIlvain 缓冲溶液(pH=4.0;V:V,3:7)提取磺胺类抗生素,乙腈 + Na₂EDTA-McIlvaine 缓冲溶液(pH=7.0;V:V,1:1)提取氟喹诺酮类抗生素。精确称取 1.00g 样品到 50mL 离心管中,加入内标溶液和 15mL 提取液,涡旋 1min,超声 20min,12000r/min,离心 5min,然后转移上清液至圆底烧瓶中;重复提取残渣 3 次,并将上清液合于圆底烧瓶中;将圆底烧瓶放于水浴温度为 40°C 的旋转蒸发仪上除去有机相,然后将剩余溶液转移至 50mL 离心管中,并用去离子水定容至 40mL;过 HLB 固相萃取小柱(6cc/200mg,Waters),甲醇洗脱,收集洗脱液于玻璃刻度管中;40°C 氮吹后,用体积比为 1:1 的甲醇-水溶液定容至 1mL;过 0.22μm 有机滤膜;内标法定量。色谱条件:Luna C₁₈ 柱(5μm,2.0mm×150mm; Phenomenex); Thermo Finnigan Surveyor HPLC 系统(Thermo Scientific,USA);流速 0.25mL/min,柱温 30°C,进样量 5μL。流动相和洗脱条件如表 2 所示。磺胺类、四环素类、氟喹诺酮类和大环内酯类抗生素定量限分别为

1.6~3.6、1.2~3.3、1.0~2.6 和 0.5~2.5 μg/kg.

表 2 HPLC-MS/MS 洗脱条件
Table 2 HPLC-MS/MS operating conditions

| 抗生素 | 时间 (min) | A(%) | | B(%) 2mmol/L 醋酸铵溶液+0.1%甲酸 | 离子源 |
|-------|-------------|------|--|------------------------------|------------------|
| | | 甲醇 | | | |
| 磺胺类 | 0 | 20 | | 80 | |
| | 5 | 90 | | 10 | |
| | 16 | 90 | | 10 | ESI ⁺ |
| | 16.5 | 20 | | 80 | |
| | 24 | 20 | | 80 | |
| 氟喹诺酮类 | 12 | 50 | | 50 | ESI ⁺ |
| 四环素类 | 6 | 40 | | 60 | ESI ⁺ |
| 大环内酯类 | 4 | 80 | | 20 | ESI ⁻ |

1.3.2 可培养磺胺耐药细菌测定 以磺胺类抗生素为代表,开展光照对耐药细菌的影响。参考已往的报道^[17],选择 LB 琼脂平板用于磺胺抗性菌的分离。在培养基中添加总浓度为 100mg/L 的磺胺抗生素溶液(磺胺嘧啶:磺胺二甲嘧啶=1:1)用于抗性筛选。采用生理盐水(0.85%)浸提堆肥样品 2h 后,取梯度稀释上清涂布到抗性平板和无抗性平板上。25℃培养 24h。对菌落数为 20~200 之间的平板进行计数,计算抗性菌落数(CFU/g)。

1.3.3 基于荧光定量 PCR 的细菌丰度测定 取 0.25g 粪便样品,参照 Omega EZNA™ soil DNA kit(USA)提取基因组 DNA,基因组 DNA 于 -70℃ 以下保存备用。采用 16S rDNA 通用引物 27F/1492R 进行 PCR 扩增。PCR 扩增采用 2×EasyTaq PCR SuperMix (全式金公司)。对 PCR 产物进行凝胶电泳分析。将获得的 PCR 产物重组到 pMD19-T 质粒上,委托上海生工对质粒上的基因片段进行测序验证。测序验证正确的抗性基因重组质粒将作为实时定量 PCR (qPCR) 的标准品,用于建立质粒拷贝数与 CT 值对应关系的标准曲线。采用 Qubit 3.0 荧光计对质粒 DNA 浓度进行测定,随后通过计算可以获得质粒标准品的拷贝数。qPCR 扩增采用 ABI 公司的 StepOnePlus™ 实时荧光定量 PCR 系统。qPCR 引物为 :V3-FW(341F):CCTACGGGAGG-CAGCAG; V3-RV(518R): ATTACCGCGGCTGCTGGPCR。扩增试剂采用 MightyAmp™ for Realtime PCR Kit(Takara),反应在 20μL 的反应体系中进行。采用的 qPCR 方法必须保证待测样品的熔解曲线为单一峰,扩增特异性良好,并且和标准品具有相同的 TM 值。

1.3.4 基于 16SrRNA 测序的细菌群落结构分析 取粪便样品基因组 DNA,利用引物 515F (5'-GTG-CCAGCMGCCGCGTAA-3') 和 806R(5'-GGACT-ACHVGGGTWTCTAAT-3')扩增 16SrRNA 基因的 V4 区段。每个样品 3 个重复。PCR 产物回收纯化后,进行文库构建,文库经过进一步 Qubit 定量和检测后,由北京诺禾致源公司 Illumina NovaSeq PE250 平台进行测序分析。原始 DNA 序列经过初步质控得到原始数据,通过去除嵌合体序列获得有效数据。利用 Uparse 软件对所有样品的全部有效数据进行聚类,按照 97%相似性将序列聚类成为可操作分类单位(OTUs)。同时筛选 OTUs 中出现频数最高的序列作为 OTUs 的代表序列,用 Mothur 方法与 SILVA 的 SSUrRNA 数据库对 OTUs 代表序列进行物种注释分析(设定阈值为 0.8~1),获得分类学信息。最后以样品中数据量最少的为标准进行数据均一化处理。通过 Chao1 丰富度指数和 Shannon 多样性指数分析 α 多样性。使用 R 软件(Version 2.15.3)中 ade4 包和 ggplot2 软件包绘制主成分分析(PCA)图。利用 R 软件进行 Metastats 分析,采用获得的 P 值做差异性热图。

2 结果与分析

2.1 光照对猪粪中抗生素降解的影响

表 3 光照对猪粪中 15 种抗生素降解的影响

Table 3 Effects of illumination on the degradation of 15 antibiotics within pig manures

| 抗生素种类 | 化合物名称 | 抗生素浓度变化倍数 ^a (FC=光培养/暗培养) | | |
|-------|-------|-------------------------------------|---------------|---------------|
| | | PM1 24h 光照 | PM2 12h 光照 | PM2 24h 光照 |
| 磺胺类 | SDZ | 0.46 | 0.95 | 0.82 |
| | SMM | 0.49 | 0.86 | 0.93 |
| | SMD | 0.50 | 0.85 | 0.69 |
| | SM2 | 0.49 | 0.78 | 1.02 |
| | STZ | n.d. | 0.78 | 0.92 |
| | SCP | n.d. | 0.30 | 0.36 |
| 氟喹诺酮类 | OFL | 0.74 | 0.82 | 1.01 |
| | ENR | 0.78 | n.d. | n.d. |
| | CIP | 0.91 | n.d. | n.d. |
| 四环素类 | DOX | 0.64 | 0.84 | 0.84 |
| | CTC | 0.76 | 0.97 | 0.86 |
| | TET | 0.77 | 1.07 | 1.00 |
| | OTC | n.d. | 1.04 | 0.95 |
| 大环内酯类 | CLI | >1 ^b | n.d. | n.d. |
| | TIL | 2.18 | n.d. | n.d. |

注:^a FC>1 代表光照抑制降解,FC<1 表示光照促进降解;^b 暗处理组中浓度低于检测限;n.d.:原料样品无检出。

表3汇总了猪粪中15种不同抗生素在光照培养和避光培养后的浓度差异。可知,光照不会抑制猪粪中所有检出磺胺类、四环素类和氟喹诺酮类抗生素的降解。猪粪中66%的抗生素在光培养处理中的去除效果优于暗培养处理,且不因样品和光照时间改变而改变。发酵培养对猪粪中大环内酯类抗生素的去除率接近100%,因此可忽略光照对大环内酯类抗生素的抑制。综上,相比避光,在光照下培养更有利于猪粪中主要残留抗生素的去除。

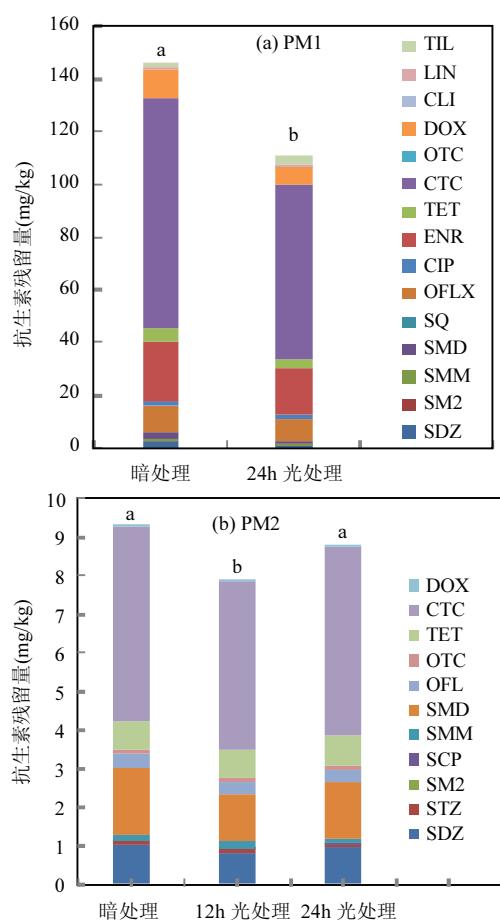


图1 不同光照条件下培养5d猪粪的抗生素残留浓度

Fig.1 Antibiotic concentrations in pig manures after incubation under different light conditions for 5d
不同字母代表处理之间存在显著差异($P<0.05$)

猪粪PM1中抗生素残留总量142.4mg/kg,以四环素类(54%)、氟喹诺酮类(25%)和磺胺类抗生素(11.8%)为主。图1(a)对比了猪粪PM1样品在光照和避光培养5d后的抗生素残留浓度。结果表明,光培养猪粪PM1中的抗生素残留总量显著($P<0.05$)低于避

光培养,其中四环素类、氟喹诺酮类和磺胺类抗生素残留浓度分别下降50.6%、22.3%和25.6%。进一步以猪粪PM2进行验证,并设置不同光照时长。相比PM1,猪粪PM2样品抗生素残留总量较低,为24.4mg/kg,四环素类、氟喹诺酮类和磺胺类分别占45%、25%和30%,但与以猪粪PM1为对象的降解试验结果相似,光培养处理猪粪PM2中的抗生素残留总量低于避光培养,下降比例在5.7%~15.9%[图1(b)]。同时以猪粪PM2为对象的降解试验证实光照时长影响抗生素去除,12h间歇光照处理优于全天光照。与避光培养相比,光培养下猪粪PM2中四环素类、氟喹诺酮类和磺胺类抗生素残留浓度最高下降24.8%、17.6%和12.4%。

2.2 光照对鸡粪中抗生素降解的影响

鸡粪CM1中抗生素残留总量193.3mg/kg,以四环素类(64.9%)和氟喹诺酮(32.5%)为主。鸡粪CM2样品抗生素残留总量6.3mg/kg,以氟喹诺酮类(69.3%)和磺胺类(18.5%)为主。光照培养后鸡粪CM1中平均抗生素残留总量低于避光培养鸡粪,但尚未达到显著水平[图2(a)]。其中光照促进鸡粪CM1中四环素类抗生素降解,5d光照培养后残留浓度比避光培养降低19.1%。光照对氟喹诺酮类抗生素降解的影响较小,但明显抑制磺胺类抗生素的降解。鸡粪CM2与CM1的试验结果相似。相比避光培养,光照培养后鸡粪CM2中的抗生素残留总量更低,其中磺胺类、氟喹诺酮类和四环素类抗生素残留量最高下降35.1%、11.3%和37.6%。鸡粪CM2培养试验进一步证实光照时间影响抗生素去除,在鸡粪CM2中,全天光照处理优于12h间歇光照。

表4汇总了鸡粪中14种抗生素在光照和避光培养后的浓度差异。相比猪粪,光照对鸡粪中抗生素降解的作用在不同样品和光照时间之间差异显著;仅有36%的抗生素在光照培养下的降解一直高于避光培养。全天光照促进了鸡粪CM2样品中包括6种磺胺类、4种氟喹诺酮类和2种四环素类在内的所有检出抗生素的降解,但相同光照条件仅能促进CM1样品中多西环素、土霉素和氧氟沙星的降解,同时强烈抑制磺胺类抗生素降解。从鸡粪CM2的试验结果中可知,相比氟喹诺酮类抗生素,光照时间对磺胺类和四环素类抗生

素降解的影响更加显著。综上,虽然光照有促进鸡粪中抗生素去除的潜力,但受具体样品和光照措

施的影响较大,特别是光照可能抑制磺胺抗生素在鸡粪发酵中的降解,值得关注。

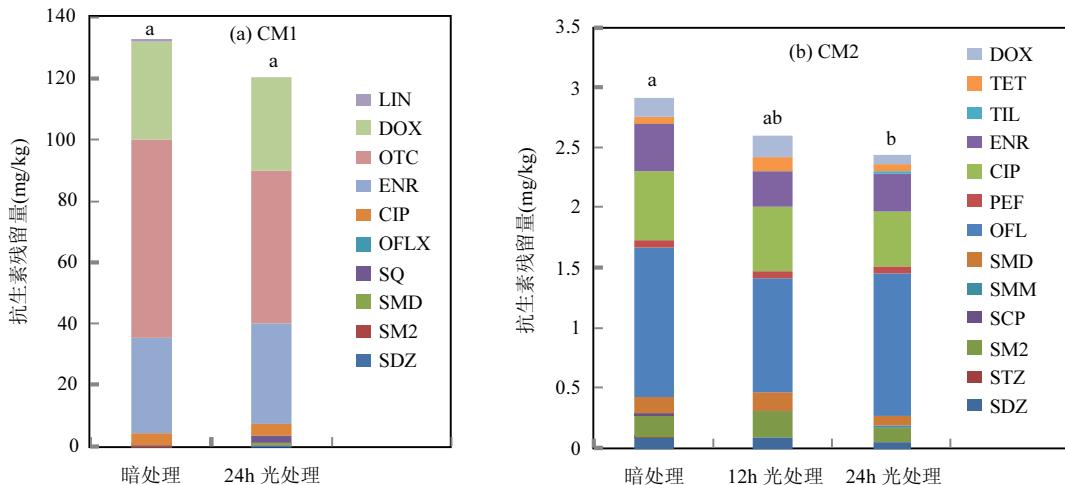


图 2 不同光照培养下 5d 鸡粪的抗生素残留浓度

Fig.2 Antibiotic concentrations in chicken manure samples after incubation under different light conditions for 5days
不同字母代表处理之间存在显著差异($P<0.05$)

表 4 光处理对不同来源鸡粪中 14 种抗生素降解的影响
Table 4 Effects of light illumination on the degradation of 14 antibiotics within chicken manures

| 抗生素 种类 名称 | 抗生素浓度变化倍数 ^a (FC=光培养/暗培养) | | |
|-----------------|-------------------------------------|---------------|---------------|
| | CM1 24h 光照 | CM2 12h 光照 | CM2 24h 光照 |
| SDZ | 30.11 | 1.07 | 0.55 |
| SM2 | 3.77 | 1.18 | 0.74 |
| SMM | n.d. | 1.14 | 0.79 |
| 磺胺类 | | | |
| SMD | 6.53 | 1.15 | 0.65 |
| STZ | n.d. | 0.00 | 0.00 |
| SMZ | n.d. | 0.00 | 0.00 |
| SQ | 3.51 | n.d. | n.d. |
| OFL | 0.71 | 0.76 | 0.94 |
| 氟喹诺 ENR | 1.02 | 0.74 | 0.87 |
| 酮类 | | | |
| CIP | 1.19 | 0.92 | 0.76 |
| PEF | n.d. | 1.01 | 0.97 |
| 四环素 类 | | | |
| DOX | 0.95 | 1.21 | 0.62 |
| OTC | 0.78 | n.d. | n.d. |
| TET | n.d. | 1.63 | 0.93 |

注:^a FC>1 代表光照抑制降解,FC<1 表示光照促进降解;n.d.:原料样品无检出。

2.3 光照对猪鸡粪中耐药细菌数量的影响

以磺胺类抗生素为代表,分析光照对猪鸡粪中与抗生素耐受相关细菌增殖的影响。由图 3 可

知,相比避光处理,全天光照显著($P<0.05$)降低猪粪中可培养磺胺耐药细菌数量,在不同猪粪样品中结果相似。与光照对鸡粪中磺胺类抗生素降解的作用非常相似,光照对鸡粪中磺胺耐药菌数量的作用更易受样品和光照时间的影响。相比避光培养,全天光照培养增加鸡粪 CM1 中磺胺耐药菌数量,但减少 CM2 中磺胺耐药菌数量(图 3)。光照对猪鸡粪中磺胺耐药细菌的抑制有随时间的增加而加强的趋势。光照对两种猪粪细菌丰度均无显著($P<0.05$)影响,但光照可轻微抑制鸡粪细菌丰度(图 4)。

2.4 光照对猪鸡粪中细菌群落结构的影响

以猪粪 PM1 和鸡粪 CM1 为代表样品进行细菌 16S rRNA 基因测序,分析光照对畜禽粪便细菌群落的影响。结果可知,猪鸡粪的细菌群落组成存在明显差异,其中猪粪细菌群落以 Proteobacteria 门(29%~40%)和 Firmicutes 门(47%~55%)为主,二者占总细菌的 85%以上;而鸡粪细菌群落组成更丰富,分布在 Proteobacteria 门(23%~25%)、Firmicutes 门(38%~39%)、Actinobacteria 门(19%~24%) 和 Bacteroidetes 门(12%~14%)(图 5A)。

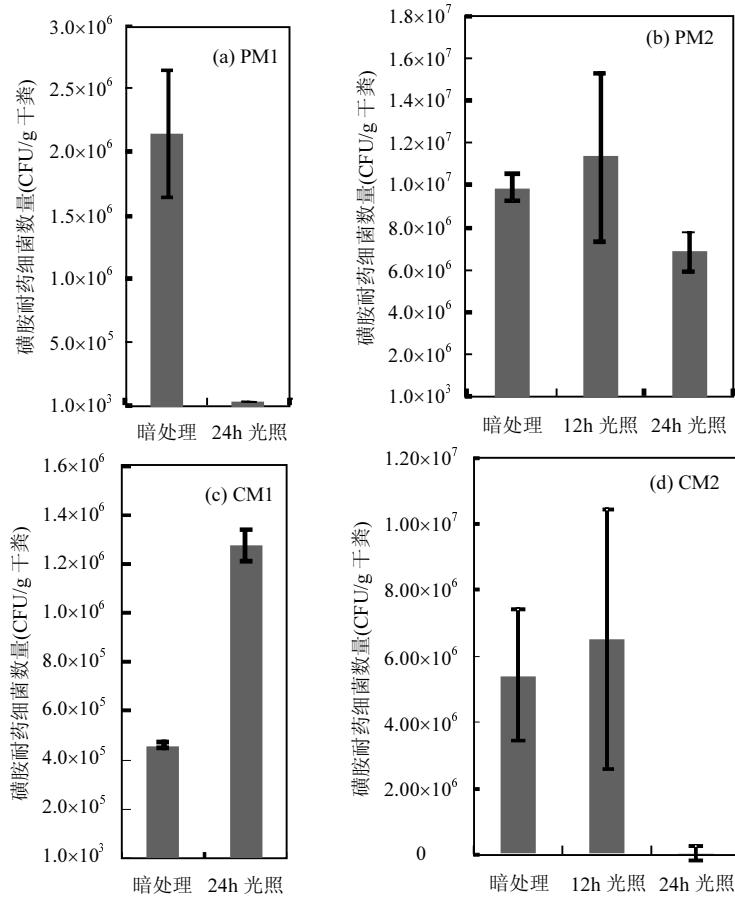


图 3 光照处理对猪粪和鸡粪中磺胺耐药菌数量的影响

Fig.3 Effects of illumination on the numbers of sulfonamide resistant bacteria in pig and chicken manures

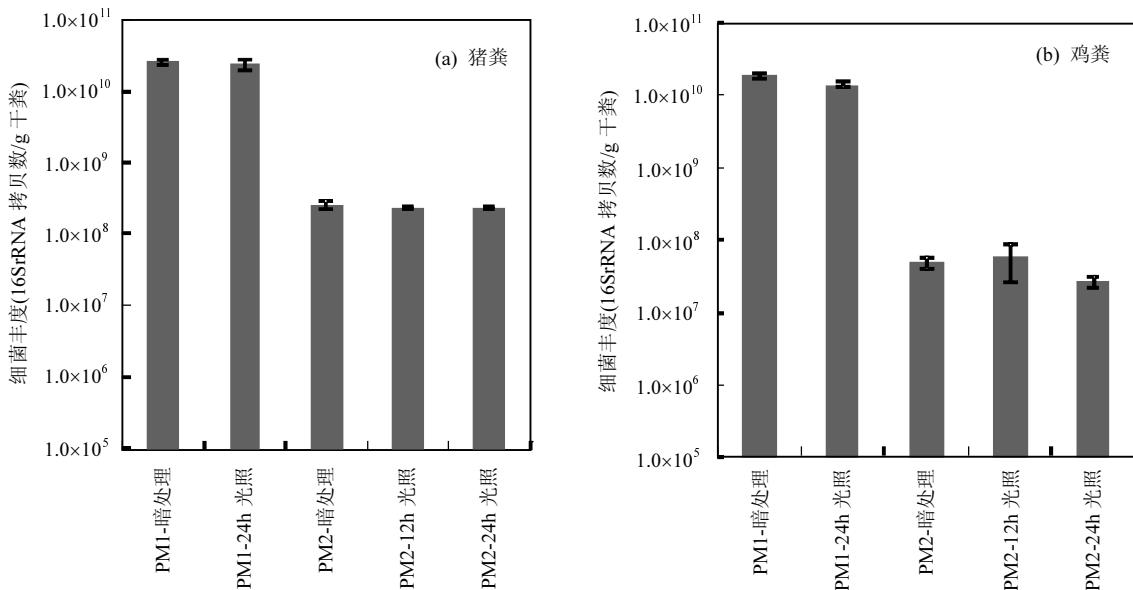


图 4 光照处理对猪粪和鸡粪总细菌丰度的影响

Fig.4 Effects of illumination on the bacterial abundances in pig and chicken manures

基于 OTU 的 PCA 分析结果表明,光照对猪粪 PM1 和鸡粪 CM1 的细菌群落结构均产生了明显影响(图 5B).从 Shannon 多样性指数上看,光照提高了

猪粪 PM1 细菌群落多样性,但降低了鸡粪 CM1 细菌群落的多样性,均达到显著水平(图 6A).从门水平上看,光照显著降低猪粪 PM1 中 Proteobacteria 门细菌

相对丰度以及鸡粪 CM1 中 Chloroflexi 门细菌相对丰度(图 6B).但是,Proteobacteria 门细菌是猪粪优势种群,而 Choroflexi 门细菌在鸡粪总细菌中仅占 0.05%~0.09%,因此可认为,光照仅对猪粪细菌在门水平上的组成产生较大影响.从科水平上看,光照显著增加了猪粪 PM1 中 Micrococcaceae、Corynebacteriaceae 和 Bacillaceae 细菌的相对丰度以及鸡粪 CM1 中 Corynebacteriaceae、Bacillaceae 和 Peptostreptococcaceae 细菌相对丰度;显著降低了猪粪中 Unidentified

Clostridiales 、 Unidentified Cardiobacteriales 、 Peptostreptococcaceae 细菌相对丰度以及鸡粪中 Unidentified Cardiobacteriales 、 Planococcaceae 和 Balneolaceae 细菌相对丰度(图 6C).总体上,光照促进畜禽粪便中 Corynebacteriaceae 和 Bacillaceae 细菌,抑制 Unidentified Cardiobacteriales,对 Peptostreptococcaceae 的影响在猪粪和鸡粪中相反.因此,光照对畜禽粪便细菌群落的影响存在直接和间接作用,而间接作用极可能具有很强的环境依赖性.

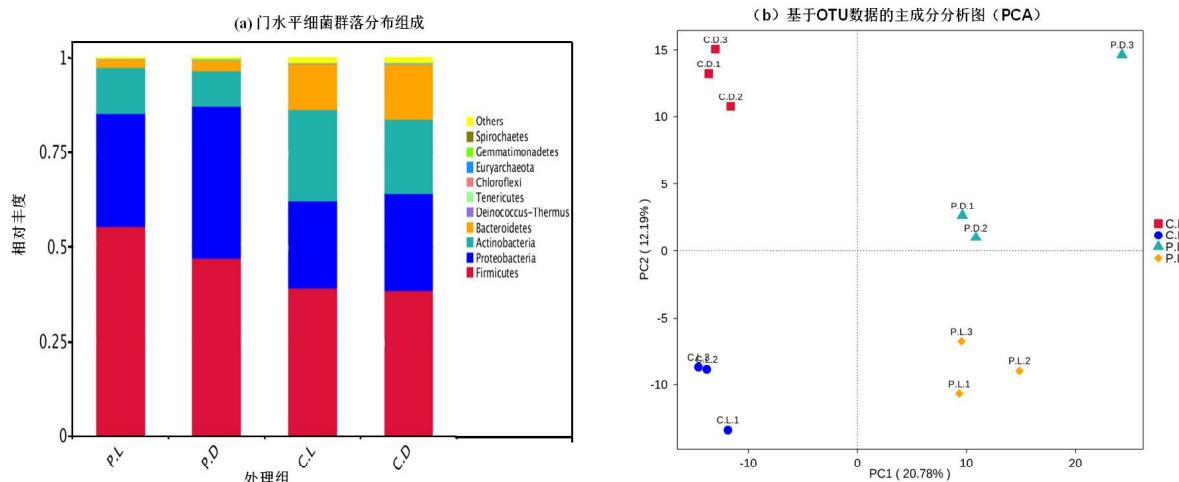


图 5 光照对猪粪和鸡粪细菌群落结构的影响

Fig.5 Effects of light illumination on the structures of bacterial communities in pig and chicken manure

P.L,猪粪光照处理; P.D,猪粪暗处理; C.L,鸡粪光照处理; C.D,鸡粪暗处理

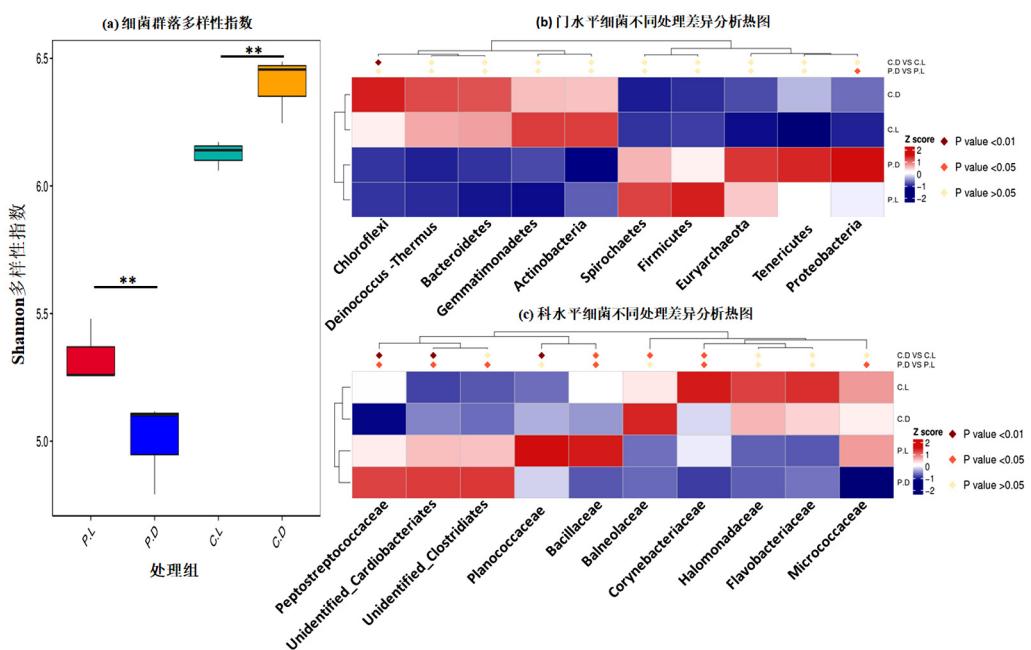


图 6 光照对猪粪和鸡粪细菌群落多样性及主导细菌类群丰度的影响

Fig.6 Effects of light illumination on the diversity of bacterial community and the dominant bacteria abundances in pig and chicken manures

P.L,猪粪光照处理; P.D,猪粪暗处理; C.L,鸡粪光照处理; C.D,鸡粪暗处理

3 讨论

堆肥等生物发酵是目前畜禽粪便无害化处理的主要方式,往往在避光条件下进行.在这一过程中,抗生素的去除主要依赖于微生物降解和水解的作用^[18],因此较少考虑光照的影响.本研究证明在粪便发酵过程中进行辅助光照可加速四环素类、氟喹诺酮类、磺胺类等多种类型抗生素的降解,在猪粪中尤为显著(表 5).其中,光照对粪便发酵过程中土霉素、金霉素、氧氟沙星以及恩诺沙星降解的促进作用在以往研究中已有报道^[15-16,19].

表 5 光照对猪鸡粪中主要残留抗生素降解的作用效应汇总
Table 5 A summary of the effect of light illumination on the degradation of the dominant antibiotic classes in manure samples

| 粪便类型 | 光照效应 | 抗生素残留总量 | 氟喹诺酮类 | 四环素类 | 磺胺类 |
|------|--------|---------|-------|------|-----|
| 鸡粪 | 24h 光照 | + | +/- | + | - |
| | 24h 光照 | + | + | + | + |
| | 12h 光照 | + | + | - | - |
| 猪粪 | 24h 光照 | + | + | + | + |
| | 24h 光照 | + | + | + | + |
| | 12h 光照 | + | +/- | + | + |

注:+表示促进效应;-表示抑制效应.

光照可能通过影响抗生素的光降解和化学降解改变粪便发酵对抗生素的去除效果.粪便发酵过程中有机质分解强烈,会释放大量小分子酸、硝酸盐等物质^[20],其中部分物质例如 NO_3^- 、 NO_2^- 等具有强光敏化作用^[21].在光敏物质的作用下,粪便中的抗生素可能在光照下发生强烈的光解.但是,光线进入粪便有限.与土壤、底泥等固体环境介质中的研究结论类似^[22-23],本文认为直接光解对粪便中抗生素降解和矿化的贡献有限.另外,光照可诱导粪便中有机质分解产生大量自由基、过氧化物、单重态氧等,这些强氧化物质的产生也可能加速抗生素的水解和光化学降解^[24-25].

在畜禽粪便的生物发酵过程中,微生物降解是大部分抗生素消减的主要机制^[18].因此,光照可能通过影响抗生素微生物降解改变粪便发酵下抗生素的去除效率.例如,光照实现抗生素光解和生物降解之间的协同,进而增强抗生素的去除^[26].在这个过程中,抗生素首先依靠光解转化成中间产物,而中间产

物被粪便中的微生物进一步降解.另外,Lin 等^[27]报道指出,光照诱导底泥产生强烈的环丙沙星生物降解能力,而这种生物降解能力在避光条件下没有出现,虽然未有进一步研究,但这一结果暗示光照改变了底泥微生物群落.

在本文中,光照被证实诱导畜禽粪便细菌群落组成发生变化,包括增加猪粪细菌群落多样性.光照对抗生素降解的促进作用与其对微生物群落的影响可能通过下述途径产生联系:(1)光照促进了抗生素降解,减轻了抗生素对猪粪中细菌群落丰度和多样性的抑制;(2)光照直接增加猪粪细菌群落多样性,诱导产生更多更全面的分解酶系,进而增强了包括抗生素在内的有机质的分解转化和微生物利用.事实上,在猪粪 PM1 样品中,光照诱导下丰度显著增加的细菌种群被发现与有机质尤其是难降解有机质的分解密切相关.例如,*Corynebacteriaceae* 科细菌可降解木质素、单宁、激素等有机物^[28-29].*Micrococcaceae* 科细菌可强烈分解果胶、木聚糖^[30],部分细菌被报道具有生物降解磺胺类抗生素的能力^[31].*Bacillaceae* 科细菌具有较强的污染物分解能力,该科部分细菌被报道用于分解活性染料^[32]、纤维素、甲壳素^[33]以及苯、甲苯、乙苯、二甲苯等芳香族污染物^[34].综上,光照可通过改变粪便发酵过程中的微生物群落组成促进抗生素的生物降解,以此加速抗生素去除.

光照对粪便中抗生素降解的作用效果在不同样品之间存在差异.相比鸡粪,光照对猪粪中抗生素降解的促进作用对原料和光照时间有更广的兼容范围(表 5).建议为猪粪及其堆肥的加工和储存场所中提供光照,例如将储粪区和堆肥车间的顶棚改为阳光棚,增设辅助照明设备等.猪粪和鸡粪中抗生素降解对环境变化的响应差异并不鲜见^[17,35].例如,Lin 等^[17]研究温度变化对猪鸡粪中抗生素降解的影响,发现抗生素在鸡粪中的最适温度为 30℃,而在猪粪中的最适温度为 50℃.由于肠道环境、饲料配方和用药的不同,猪粪与鸡粪在细菌群落组成、理化性质和抗生素分布上具有明显差异.猪粪和鸡粪中这些生物和非生物差异均可能影响光照对抗生素降解的作用.另外,光照对磺胺类抗生素降解的作用在鸡粪 CM1 和 CM2 样品中呈现完全相反的结果.鸡粪中抗生素的消减相比猪粪更加依赖于微生物的作

用^[17].而相比四环素类等其他抗生素,畜禽粪便、土壤等固体介质中的磺胺类抗生素的去除又更依赖于微生物降解作用^[18].因此,推测光照对CM1鸡粪中磺胺类抗生素降解的作用与其微生物群落变化具有重要关系,这里可能包括光照对CM1鸡粪中抗生素降解微生物的直接毒害.探讨光照对畜禽粪便发酵过程中抗生素降解的影响机制对于进一步优化和形成有助于畜禽粪便中抗生素去除的光催化-生物降解耦合技术具有参考价值.

本研究发现光照处理猪粪有助于抑制耐药污染物的扩散.在环境中,光照有可能通过促进猪粪中磺胺类抗生素降解,降低选择压力,从而减少磺胺耐药细菌的增殖.相似的结论在以往报道中有所涉及^[17,36].例如Wang等^[37]指出堆肥过程中抗生素残留浓度与抗生素抗性基因转录产物的丰度呈正相关.光照也可能通过产生的自由基、过氧化物等直接抑制耐药微生物的生长繁殖.例如,在本研究中,光照处理显著降低猪粪中Proteobacteria门细菌丰度,而Hu等^[38]研究发现肠道中的耐药基因更容易在Proteobacteria门细菌中出现.抗生素诱导产生的耐药细菌产生和扩散具有很大风险,因此光照对猪粪中抗生素耐药菌生长繁殖的抑制作用具有非常重要的意义.

4 结论

对比了光照对不同来源粪便中不同类型抗生素甚至同一类型的不同抗生素化合物降解的影响,表明光照促进猪粪发酵过程中大部分抗生素的降解,遏制磺胺耐药细菌增殖,增加细菌群落多样性以及有机质降解相关细菌丰度,且不影响粪便细菌总丰度.其中,光照对猪粪中抗生素降解的促进作用对原料和光照时间有更广的兼容范围.鸡粪对光照的响应易受样品和光照时间的干扰,光照总体有利鸡粪中抗生素残留总量下降,但抑制了部分鸡粪样品中磺胺类抗生素降解,同时伴随磺胺耐药细菌数量的增加以及细菌群落丰度和多样性的下降.

参考文献:

- [1] Berkner S, Konradi S, Schönfeld J. Antibiotic resistance and the environment—there and back again: Science & society series on science and drugs [J]. EMBO Reports, 2014,15(7):740–744.
- [2] Zhang H, Luo Y, Wu L et al. Residues and potential ecological risks of veterinary antibiotics in manures and composts associated with protected vegetable farming [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015,22(8):5908–5918.
- [3] 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.
- [4] 张树清,张夫道,刘秀梅,等.规模化养殖畜禽粪主要有害成分测定分析研究 [J].植物营养与肥料学报, 2005,11(6):822.
Zhang S Q, Zhang F D, Liu X M, et al. Determination and analysis on main harmful composition in excrement of scale livestock and poultry feedlots [J]. Plant Nutrition and Fertilizing Science, 2005,11(6):822.
- [5] Spielmeyer A. Occurrence and fate of antibiotics in manure during manure treatments: A short review [J]. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 2018,9:76–86.
- [6] Wang J, Lin H, Sun W, et al. Variations in the fate and biological effects of sulfamethoxazole, norfloxacin and doxycycline in different vegetable-soil systems following manure application [J]. J. Hazard. Mater., 2015,304:49–57.
- [7] Ma JW, Lin H, Sun WC, et al. Soil microbial systems respond differentially to tetracycline, sulfamonomethoxine, and ciprofloxacin entering soil under pot experimental conditions alone and in combination [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2014,21(12):7436–7448.
- [8] Udikovic-Kolic N, Wichmann F, Broderick NA, et al. Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014,111(42):15202–15207.
- [9] 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.
- [10] Pruden A, Larsson DGJ, Amézquita A, et al. Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment [J]. Environmental Health Perspectives, 2013,121(8):878–885.
- [11] Zhang M, He L-Y, Liu Y-S, et al. Fate of veterinary antibiotics during animal manure composting [J]. Science of the Total Environment, 2019,650:1363–1370.
- [12] Van Epps A, Blaney L. Antibiotic residues in animal waste: Occurrence and degradation in conventional agricultural waste management practices [J]. Current Pollution Reports, 2016,2(3):135–155.
- [13] Qian M, Wu H, Wang J, et al. Occurrence of trace elements and antibiotics in manure-based fertilizers from the Zhejiang Province of China [J]. Science of the Total Environment, 2016,559:174–181.
- [14] 李圆杏,黄 宏,刘 璞.模拟日光照射下三种抗生素的光降解行为 [J].环境化学, 2013,32(8):1513–1517.
Li Y X, Huang H, Liu Z. Photodegradation behavior of three antibiotics with solar simulator [J]. Environmental Chemistry, 2013, 32(8):1513–1517.
- [15] 潘孝成,张丹俊,程宝艳,等.鸡粪便中氧氟沙星的降解动态研究 [J].中国畜牧兽医, 2009,36(10):193–197.

- Pan X C, Zhang D J, Cheng B Y, et al. Study on degradation of ofloxacin in excrements of chicken [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2009,36(10):193–197.
- [16] 吴银宝,汪植三,廖新修,等.恩诺沙星在鸡体中的排泄及其在鸡粪中的降解 [J]. 畜牧兽医学报, 2005,10:1069–1074.
- Wu Y B, Wang Z S, Liao X S, et al. Study on the excretion of enrofloxacin in chicken and its degradation in chicken feces [J]. Acta Veterinaria at Zootechnica Sinica, 2005,10:1069–1074.
- [17] Lin H, Zhang J, Chen H, et al. Effect of temperature on sulfonamide antibiotics degradation, and on antibiotic resistance determinants and hosts in animal manures [J]. Science of the Total Environment, 2017, 607–608:725–732.
- [18] 刘元望,李兆君,冯瑶,等.微生物降解抗生素的研究进展 [J]. 农业环境科学学报, 2016,35(2):212–224.
- Liu Y W, Li Z J, Feng Y, et al. Research progress in microbial degradation of antibiotics [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2016,35(2):212–224.
- [19] 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.
- Ni G W, Sun Z L, Chen X J, et al. Degradation of tetracyclines in chicken feces [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2007,26(5): 1784–1788.
- [20] 张雪辰.禽畜粪便堆肥化过程碳氮转化规律及其受调控措施的影响 [D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2014.
- Zhang X C. The transformation of organic carbon and nitrogen with different regulation technology during the livestock manure composting process [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2014.
- [21] 刘伟,王慧,陈小军,等.抗生素在环境中降解的研究进展 [J]. 动物医学进展, 2009,30(3):89–94.
- Liu W, Wang H, Chen X J, et al. Progress on degradation of antibiotics in environment [J]. Progress In Veterinary Medicine, 2009,30(3):89–94.
- [22] Addamo M, Augugliaro V, Paola AD et al. Removal of drugs in aqueous systems by photoassisted degradation [J]. Journal of Applied Electrochemistry, 2005,35(7):765–774.
- [23] 段伦超,王风贺,纪营雪,等.不同环境因素下太湖中四环素的自然消减 [J]. 环境科学, 2014,35(4):1318–1325.
- Duan L C, Wang F H, Ji Y X, et al. Natural attenuation of tetracycline in the water of Taihu Lake under different environmental conditions [J]. Environmental Science, 2014,35(4):1318–1325.
- [24] 李晓亮,秦智伟,候利园,等.土壤环境因素对残留农药降解的影响 [J]. 东北农业大学学报, 2009,40(4):132–135.
- Li X L, Qian Z W, Hou L Y, et al. Influence of environmental factors on degradation of residual pesticide in soil [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2009,40(4):132–135.
- [25] 李伟明,鲍艳宇,周启星.四环素类抗生素降解途径及其主要降解产物研究进展 [J]. 应用生态学报, 2012,23(8):2300–2308.
- Li W M, Bao Y Y, Zhou Q X. Degradation pathways and main degradation products of tetracycline antibiotics: Research progress [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2012,23(8):2300–2308.
- [26] 熊厚锋.可见光催化氧化—生物降解直接耦合技术降解四环素废水的效能与作用机制 [D]. 长春:吉林大学, 2017.
- Xiong, H F. Efficiency and mechanism of visible light-induced intimately coupled photocatalysis and biodegradation technology for tetracycline wastewater treatment [D]. Changchun: Jilin University, 2017.
- [27] Lin J-S, Pan H-Y, Liu S-M, et al. Effects of light and microbial activity on the degradation of two fluoroquinolone antibiotics in pond water and sediment [J]. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 2010,45(5):456–465.
- [28] Charney W. Transformation of steroids by corynebacteriaceae [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1966,29(1):93–106.
- [29] Vashi H, Iorhemen OT, Tay J H. Degradation of industrial tannin and lignin from pulp mill effluent by aerobic granular sludge technology [J]. Journal of Water Process Engineering, 2018,26:38–45.
- [30] Yeager C M, Gallegos-Graves L V, Dunbar J, et al. Polysaccharide degradation capability of actinomycetales soil isolates from a semiarid grassland of the Colorado plateau [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017,83(6):e03020–03016.
- [31] Ricken B, Kolvenbach BA, Bergesch C, et al. FMNH₂-dependent monooxygenases initiate catabolism of sulfonamides in *Microbacterium* sp. strain BR1 subsisting on sulfonamide antibiotics [J]. Scientific Reports, 2017,7(1):15783.
- [32] Barathi S, Karthik C, Selvaraj N, et al. Biodegradation of textile dye reactive blue 160 by *bacillus firmus* (Bacillaceae: Bacillales) and non-target toxicity screening of their degraded products [J]. Toxicology Reports, 2020,7:16–22.
- [33] Citterio B, Malatesta M, Battistelli S, et al. Possible involvement of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillaceae* in structural modifications of *Tuber borchii* fruit bodies [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2001,47(3):264–268.
- [34] Singh A, Sar P, Bennett GN. Isolation and characterization of benzene degrading bacteria from gasoline contaminated water [J]. Technical Proceedings of the 2009 NSTI Nanotechnology Conference and Expo, NSTI-Nanotech 2009, 2009,2:424–427.
- [35] Zhang X, Yang Y, Sun W, et al. Compost-bulking agents reduce the reservoir of antibiotics and antibiotic resistance genes in manures by modifying bacterial microbiota [J]. Science of the Total Environment, 2019,649:396–404.
- [36] Nicholson FA, Groves SJ, Chambers BJ. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application [J]. Bioresource Technology, 2005,96(2):135–143.
- [37] Wang C, Dong D, Strong PJ, et al. Microbial phylogeny determines transcriptional response of resistome to dynamic composting processes [J]. Microbiome, 2017,5(1):103.
- [38] Hu Y, Yang X, Qin J, et al. Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota [J]. Nature Communications, 2013,4(1):2151.

作者简介: 林辉(1986-),女,浙江苍南人,副研究员,博士,主要从事微生物与农业环境污染研究,发表论文 40 余篇。