

崔华威, 龚萍, 郜道玉, 等. 翻堆频次对奶牛粪污异位发酵床中抗生素抗性基因的影响[J]. 华中农业大学学报, 2022, 41(4): 64-72.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.04.009

翻堆频次对奶牛粪污异位发酵床中 抗生素抗性基因的影响

崔华威^{1,2}, 龚萍¹, 郜道玉³, 周源¹, 华娟¹,
邵志勇¹, 陈洁¹, 万平民¹, 金尔光¹, 李自力²

1. 武汉市农业科学院畜牧兽医研究所, 武汉 430208; 2. 华中农业大学动物医学院, 武汉 430070;
3. 长江大学动物科学学院, 荆州 434023

摘要 为了探讨翻堆次数对异位发酵床连续堆肥过程中抗生素抗性基因(ARGs)和可移动基因元件(MGEs)的影响, 设置1 d翻堆1次(F1组)和2 d翻堆1次(F2组)2种条件, 采用PCR技术检测堆肥过程中15种基因, 包括2种四环素类(*tetG*、*tetW*)、3种磺胺类(*sul1*、*sul2*、*dfrA1*)、2种β-内酰胺类(*bla_{TEM-1}*、*fexA*)、2种MLSB类(*ermX*、*ermQ*)、2种FCA类(*optrA*、*IsaE*)、1种氨基糖苷类(*aac(6')*-*Ib-cr*)、1种整合子(*intI1*)及2种转座子(*Tn916/1545*、*ISCR1*)基因。PCR结果显示, 2组样品中均检出11种ARGs(*tetG*、*tetW*、*sul1*、*sul2*、*bla_{TEM-1}*、*fexA*、*ermX*、*ermQ*、*optrA*、*IsaE*、*aac(6')*-*Ib-cr*)和3种MGEs(*intI1*、*Tn916/1545*、*ISCR1*), 其中7种基因(*tetG*、*tetW*、*sul1*、*sul2*、*bla_{TEM-1}*、*ermQ*、*intI1*)的检出率较高; F1和F2组0~5 d均检出12种, 33 d和40 d分别检出1种, 40 d后明显增加, 表明ARGs和MGEs种类随温度的变化而改变。采用qPCR技术对检出率较高的7种基因进行检测, 结果显示, F1和F2组7种目标基因的总相对丰度呈先降低后升高再降低的趋势, 试验结束时较0 d分别降低82.33%和78.89%, 其中*tetG*、*tetW*、*sul1*、*bla_{TEM-1}*、*ermQ*、*intI1*的相对丰度分别降低16.51%、87.89%、54.58%、99.99%、97.80%、59.29%和64.32%、99.46%、50.91%、99.29%、82.22%、99.92%。结果表明, 异位发酵床降解粪污高温期可减少ARGs种类和丰度, 且2 d翻堆1次对大部分ARGs的去除效果更好。

关键词 奶牛粪污; 降解; 异位发酵床; 抗生素抗性基因

中图分类号 X713 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)04-0064-09

抗生素类药物在畜禽疾病防治及促生长方面发挥了积极作用, 但进入体内的抗生素类药物仅少量被吸收利用, 绝大部分抗生素类药物及产生的抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)随粪尿排出体外, 粪尿中残留抗生素类药物的选择压力可能诱导微生物再次产生ARGs^[1]。畜禽粪污(粪尿和污水等)中的ARGs可通过基因垂直传播或水平转移在微生物间传播扩散, 并通过雨水径流、渗滤、还田利用等方式进入生态环境, 污染土壤、水体、农作物等, 进而进入食物链对公共健康构成潜在威胁^[2]。

异位发酵床技术是以微生物好氧发酵为基础, 结合原位发酵床和好氧堆肥形成的新型粪污处理技术, 以锯末、谷壳、砻糠等为垫料, 通过接种复合微生

物菌剂和连续添加粪污方式, 实现粪便和污水异地的动态堆肥。翻堆是异位发酵床动态堆肥的保障, 通过翻堆可补充粪污, 增加通气量, 为微生物增殖提供养分和氧气, 调节温度变化, 调整微生物群落结构, 促进物料的分解, 提高ARGs等污染物的消减或去除效果。近年来, 对粪污异位发酵床中ARGs的变化也进行了一些研究, 如李可心等^[3]研究了谷壳+锯末和酒糟垫料异位发酵床对猪粪中四环素类抗性基因和整合子基因*intI1*绝对丰度的影响, 李艳琴^[4]研究了异位发酵床对猪场粪污中土霉素抗性基因的去除作用, 但翻堆次数对粪污异位发酵床中ARGs影响的报道较少, 仅见到张锦^[5]报道实验室堆肥2 d翻堆1次可显著降低猪粪中*ermB*、*ermC*等基因的相对丰

收稿日期: 2022-03-08

基金项目: 武汉市农业科学院协同创新专项(XTCX2020002; XTCX2021002)

崔华威, E-mail: 29908956@qq.com

通信作者: 金尔光, E-mail: 523229599@qq.com; 李自力, E-mail: lizili@mail.hzau.edu.cn

度。本研究以奶牛粪污异位发酵床为研究对象,探讨翻堆次数对粪污堆肥降解过程中 ARGs 的影响,期为应用异位发酵床堆肥过程中降低 ARGs 的扩散传播风险及粪污降解产物的安全利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料及主要试剂

粪污(包括粪便、尿液及生产污水,含水量约90%)和异位发酵床垫料(锯末、谷壳、麸糠)来自湖北省某奶牛场。微生物菌剂(含芽孢杆菌、粪球菌、乳酸菌和酵母菌等,总菌量 $\geq 1 \times 10^{10}$ CFU/g)由武汉旭润环保科技有限公司提供。

土壤 DNA 提取试剂盒购自 TIANGEN 公司, TaqDNA 聚合酶购自大连宝生物公司(TaKaRa), Agarose 琼脂糖(100 g/瓶)购自北京索莱宝科技有限公司, iTaq Universal SYBR Green Supermix 购自上海根生生物科技有限公司, 抗生素抗性基因引物由北京擎科生物科技有限公司合成。

1.2 试验设计

根据奶牛场异位发酵床生产方式,于2020年7月29日至9月27日采用无盖塑料盒在雨棚内开展试验。塑料盒总容积 0.7 m^3 (高765 mm、上外径1060 mm、下外径950 mm),底部留有12个直径1 cm小孔。垫料总体积 0.5 m^3 ,谷壳、锯末、麸糠按体积比2:1:1添加,并根据各自质量和含水量计算出垫料总质量为60 kg,含水量12%。然后添加60 kg粪污(含水量90%)及150 g菌剂、1500 g尿素,调整物料C/N为30:1,混合均匀后装入塑料盒。试验期间,第1天添加粪污30 kg,第2~47天根据含水量变化调整粪污添加量(约4~8 kg/d)。

按翻堆频次分为2组,F1组:1 d翻堆1次;F2组:2 d翻堆1次。

用实时数显温度计垂直插入物料中心20~30 cm处监测温度,每天09:00记录实时数显温度计温度及空气温湿度测定器的温度和湿度。

试验期间含水量控制在60%左右。采用微波炉加热法监测含水量,并根据含水量变化调整粪污添加量,粪污添加量 $= \frac{(60\% - \text{发酵床含水量}) \times 60}{90\%}$ 。

1.3 样品采集

分别于堆肥0、5、12、26、33、40、47、61 d按上、中、下3层(分别距表面10、30、50 cm)采用五点采样法取样,混合均匀,再用四分法收集样品约500 g,密封于5号自封袋,置于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

1.4 DNA的提取

按 TIANGEN 土壤基因组 DNA 提取试剂盒(Fast DNA Spin kit for soil)操作手册分别提取上述样品 DNA,检测 DNA 的浓度与纯度, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.5 PCR及定量PCR检测

PCR 和 qPCR 引物设计参考文献[6],引物序列、片段大小及退火温度见表1。根据奶牛场前期兽药使用情况,选择常见的15种目标基因进行PCR检测,包括2种四环素类(*tetG*、*tetW*)、3种磺胺类(*sul1*、*sul2*、*dfrA1*)、2种 β -内酰胺类(*bla_{TEM-1}*、*fexA*)、2种 MLSB 类(*ermX*、*ermQ*)、2种 FCA 类(*optrA*、*IsaE*)、1种氨基糖苷类(*aac(6')*-*Ib-cr*)、1种整合子(*intI1*)和2种转座子(*Tn916/1545*、*ISCR1*)基因。PCR反应体系为基因组 DNA $1 \mu\text{L}$, $2 \times \text{mix}$ (*Taq*) $8.5 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{mol/L}$ 的上下游引物各 $0.25 \mu\text{L}$,双蒸水 $10 \mu\text{L}$,总体积 $20 \mu\text{L}$ 。反应条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s、退火 30 s、 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 60 s,共35个循环, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min。配制1%琼脂糖凝胶,对PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

对PCR检出率较高的7种基因(*tetG*、*tetW*、*sul1*、*sul2*、*bla_{TEM-1}*、*ermQ*、*intI1*)进一步在ABI ViiA 7 Real Time PCR System 荧光定量PCR仪上进行荧光定量PCR检测。反应体系为基因组 DNA $1 \mu\text{L}$, iTaq Universal SYBR Green Supermix ($2 \times$) $10 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{mol/L}$ 的上下游引物各 $0.25 \mu\text{L}$,双蒸水 $8.5 \mu\text{L}$,总体积 $20 \mu\text{L}$ 。反应条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 3 min, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 s、 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s、 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 s,共40个循环, $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸5 s。每个样品3个重复。

1.6 数据处理和分析

采用 SPSS (v19.0)、EXCEL (2016) 等进行统计分析, Origin 8.0 绘图。

2 结果与分析

2.1 粪污降解过程中的温度变化

粪污降解过程中温度变化见表2。从表2可看出,F1、F2组分别于第5、12天达到最高温度($60 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $64.5 \text{ }^\circ\text{C}$),第2~40天仍保持 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 以上,40 d后急剧下降,试验结束时接近环境温度。相对而言F2组的温度高于F1组,说明F2组更有利于保持较高的温度。畜禽粪污无害化处理技术规范(GB/T36195—2018)要求堆肥温度 $\geq 50 \text{ }^\circ\text{C}$ 不少于7 d,本研究中 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 以上温度超过7 d,达到粪污无害化处理的要求。

表1 PCR和qPCR引物序列、片段大小及退火温度
Table 1 PCR and qPCR primer sequence, fragment size and annealing temperature

基因 Gene	引物序列(5'-3') Primer sequence	片段长度/bp Size	退火温度/°C Temperature
<i>tetG</i>	F: GCAGAGCAGGTCGCTGG R: CCYGCAAGAGAAGCCAGAAG	134	54
<i>tetW</i>	F: GAGAGCCTGCTATATGCCAGC R: GGGCGTATCCACAATGTTAAC	168	56
<i>sul1</i>	F: CGGCGTGGGCTACCTGAACG R: GCCGATCGCGTGAAGTTCCG	433	60
<i>sul2</i>	F: GCGCTCAAGGCAGATGGCATT R: GCGTTTGATAACCGCACCCGT	293	59
<i>dfrA1</i>	F: AAATGGCGTAATCGGTAATG R: GTGAACAGTAGACAAATGAAT	304	51
<i>bla_{TEM-1}</i>	F: CATTTTCGTGTCGCCCTTAT R: GGGCGAAAACCTCTCAAGGAT	189	57
<i>fecA</i>	F: TTGGGAAGAATGGTTCAGGG R: ATCGGCTCAGTAGCATCACG	977	55
<i>optrA</i>	F: GCACCAGACCAATACGATACAA R: TCCTTCTTAACCTTCTCCTTCTCA	794	59
<i>IsaE</i>	F: TGTCAAATGGTGAGCAAACG R: TGTAAAACGGCTTCCTGATG	496	54
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	F: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	482	55
<i>ermQ</i>	F: CACCAACTGATATGTGGCTAG R: CTAGGCATGGGATGGAAGTC	154	55
<i>ermX</i>	F: GAGATCCGRCCAGGAAGC R: GTGTGCACCATCGCCTGA	488	58
<i>Tn916/1545</i>	F: TCCTACAGCGACAGCCAGTGA R: TGCGTTGCTTTGGTCTGCTGGT	174	54
<i>int11</i>	F: CTGGATTTTCGATCACGGCAGC R: ACATGCGTGTAATCATCGTCCG	473	60
<i>ISCR1</i>	F: CGCCCACTCAAACG R: GAGGCTTTGGTGTAACCG	452	54
<i>16S V3</i>	F: CCTACGGGAGGCAGCAG R: ATTACCGCGGCTGCTGG	193	55

表2 粪污降解过程中的温度变化
Table 2 Change of temperature during degradation of manure and sewage

项目 Item		时间/d Time								
		0	2	5	12	26	33	40	47	61
堆肥温度 Compost temperature	F1	39.9	53.8	60.0	58.1	53.0	51.7	49.4	38.5	26.3
	F2	42.1	55.9	63.2	64.5	54.2	54.6	53.1	42.0	27.6
环境温度 Environment temperature		30.8	29.3	32.8	30.1	31.1	31.1	29.2	23.2	23.9

2.2 粪污降解过程中ARGs的种类变化

采用PCR方法检测了12种ARGs和3种MGEs。结果显示,2组样品中,除磺胺类*dfrA1*基因外,其余11种ARGs和3种MGEs均检出,其中*sul1*、*sul2*、*tetG*、*tetW*、*bla_{TEM-1}*、*ermQ*、*int11*的检出率较高。

粪污降解过程中,目标基因种类整体上随温度的升高而减少或降低而增加(表3)。F1、F2组0~5 d均检出12种目标基因,12~40 d可检出的种类逐步减少,分别于第33、40天减少至1种,40 d后明显增加,61 d时分别增加至9、10种。

表3 粪污降解过程中 ARGs 种类的变化

Table 3 Changes of ARGs species during degradation of manure and sewage

时间/d Time	F1	F2
0	<i>sul1, sul2, tetG, bla_{TEM-1}, fexA, aac(6')-Ib-cr, IsaE, oprA, ermQ, ermX, Tn916/1545, ISCR1</i>	<i>sul1, sul2, tetG, bla_{TEM-1}, fexA, aac(6')-Ib-cr, IsaE, oprA, ermQ, ermX, Tn916/1545, ISCR1</i>
5	<i>sul1, sul2, tetG, bla_{TEM-1}, fexA, aac(6')-Ib-cr, IsaE, oprA, ermQ, ermX, Tn916/1545, ISCR1</i>	<i>sul1, sul2, tetG, bla_{TEM-1}, fexA, aac(6')-Ib-cr, IsaE, oprA, ermQ, ermX, Tn916/1545, ISCR1</i>
12	<i>sul1, sul2, tetG, tetW, bla_{TEM-1}, aac(6')-Ib-cr, ermQ, intI1</i>	<i>sul2, sul1, tetG, tetW, bla_{TEM-1}, aac(6')-Ib-cr, IsaE, ermQ, intI1</i>
26	<i>sul1, sul2, tetG, tetW, bla_{TEM-1}</i>	<i>sul1, sul2, tetG, tetW, bla_{TEM-1}, intI1</i>
33	<i>sul2</i>	<i>sul2, tetG</i>
40	<i>sul1, tetw, bla_{TEM-1}, aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
47	<i>sul1, sul2, tetG, tetW, bla_{TEM-1}, aac(6')-Ib-cr, IsaE, Tn916/1545</i>	<i>sul2, sul1, tetG, tetW, bla_{TEM-1}, aac(6')-Ib-cr, IsaE, Tn916/1545</i>
61	<i>sul1, sul2, tetG, tetW, bla_{TEM-1}, aac(6')-Ib-cr, IsaE, Tn916/1545, ISCR1</i>	<i>sul2, sul1, tetG, tetW, bla_{TEM-1}, aac(6')-Ib-cr, IsaE, Tn916/1545, ISCR1, intI1</i>

2.3 粪污降解过程中 ARGs 和 MGEs 相对丰度变化

1) 目标基因总相对丰度变化。采用qPCR检测了6种 ARGs (*sul1, sul2, tetG, tetW, bla_{TEM-1}, ermQ*) 及1种 MGEs (*intI1*) 的相对丰度, F1 和 F2 组目标基因总相对丰度整体上呈先降低后升高再降低的变化趋势(图1)。F1 组(图1A) 0~26 d 逐步降低, 26~47 d 逐步升高, 47~61 d 快速降低, 其中, 26, 33 d 较 0 d

分别降低 81.63%、74.04%; F2 组(图1B) 0~40 d 逐渐降低, 40~47 d 大幅度增加, 47~61 d 降低, 其中 33, 40 d 较 0 d 分别降低 82.06%、86.91%。试验结束时, F1、F2 组 ARGs 总相对丰度较 0 d 分别降低 82.33%、78.89%。相对来看, 高温期 F2 组降低目标基因总相对丰度的效果较好, 说明持续保持相对较高的温度可能有利于低目标基因的丰度。

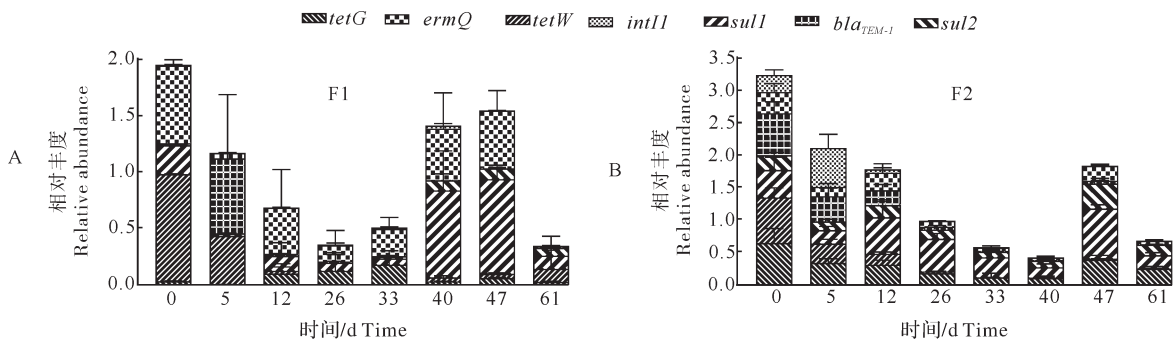


图1 粪污降解过程中 F1(A)、F2(B) 组 ARGs 和 MGEs 的变化

Fig.1 Changes of ARGs and MGEs in group F1 (A) and F2 (B) during degradation of manure and sewage

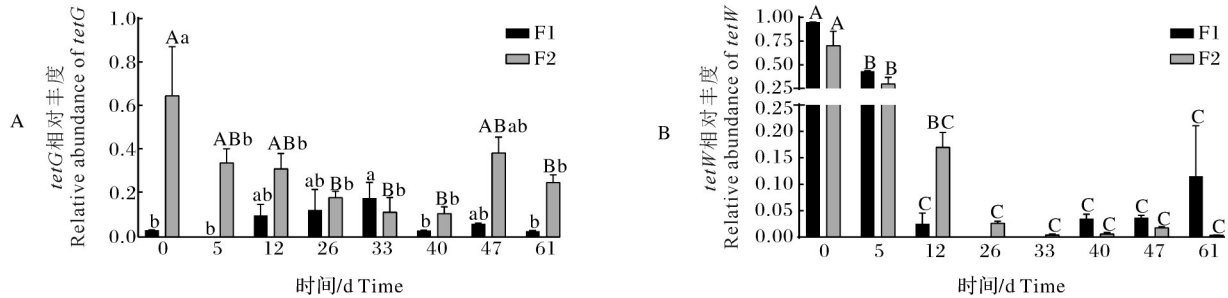
2) *tetG* 和 *tetW* 的相对丰度变化。粪污降解过程中 *tetG* 和 *tetW* 的相对丰度变化见图2。F1 组中 *tetG* 的相对丰度呈现降低-升高-降低-升高-降低的变化, F2 组则为降低-升高-降低的变化趋势(图2A), 试验结束时, F1、F2 组较 0 d 分别降低 16.51% ($P>0.05$)、64.32% ($P<0.01$)。F1 组, 5 d 时大幅降低 (88.57%), 而 12~33 d 和 47 d 均不同程度高于 0 d, 其中 33 d 比 0 d 高 5.68 倍 ($P<0.05$); F2 组, 0~40 d 逐步降低, 40~47 d 逐步增加后再降低, 其中 33, 40 d

较 0 d 分别降低 82.27%、83.39% ($P<0.01$)。

F1、F2 组中 *tetW* 整体呈降低变化趋势(图2B), 试验结束时, 与 0 d 比较分别降低 87.89%、99.46% ($P<0.01$)。F1 组, 0 d 相对丰度为 0.950 3, 12 d 极显著降低 (97.33%, $P<0.01$), 26~33 d 低于检测限, 40~61 d 小幅缓慢上升; F2 组, 0 d 相对丰度为 0.702 6, 0~40 d 逐步降低, 其中 33, 40 d 极显著降低 (99.40%、99.13%, $P<0.01$), 40~47 d 逐步升高, 61 d 再次降低至极低水平。

整体上, F1和F2组均可不同程度降低 *tetG* (16.51%和64.32%)、*tetW* (87.89%和99.46%)的相

对丰度,且F2组可较好地去除 *tetG*、*tetW*,尤其是高温期。



同组中不含相同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 不含相同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$), 下同。Note: Not containing the same lowercase letters in same group indicate significant differences ($P < 0.05$), and not containing the same uppercase letters indicate extremely significant differences ($P < 0.01$), the same as below.

图2 粪污降解过程中 *tetG*(A)和 *tetW*(B)的变化

Fig.2 Changes of *tetG* (A) and *tetW* (B) during degradation of manure and sewage

3) *sul1*和 *sul2*的相对丰度变化。磺胺类抗性基因 *sul1*、*sul2*相对丰度变化如图3所示。试验结束时, F1、F2组 *sul1*相对丰度较0 d分别降低54.58%、50.91% ($P > 0.05$)。F1组0~33 d及61 d不同程度降低, 40~47 d快速升高且极显著高于0 d (199.50%、225.62%, $P < 0.01$); F2组0~5 d、12~40 d和61 d不同程度降低, 其中12~26 d、47 d升高至高于0 d (图3A)。

F1组初始样品中 *sul2*的相对丰度较低, F2组较高 (图3B), 试验结束时与0 d比较, F1组中增加

327.33% ($P < 0.05$), F2组降低30.87% ($P > 0.05$)。F1组除0~12 d降低外, 其余时间点均升高至高于0 d, 其中47 d最高 (增加495.69%, $P < 0.01$); F2组0~40 d和47~61 d不同程度降低, 47 d突然增加至高于0 d (增加67.61%, $P < 0.05$), 然后再降低。

试验结束时, F1和F2组中 *sul1*的相对丰度均降低 (54.58%和50.91%), 但 *sul2*的丰度变化有较大差别 (-327.33%和30.87%), 说明F1和F2组均可较好地去除 *sul1*, 但去除 *sul2*的效果不理想。相比较来看, F2组可较好地降低 *sul1*、*sul2*的丰度。

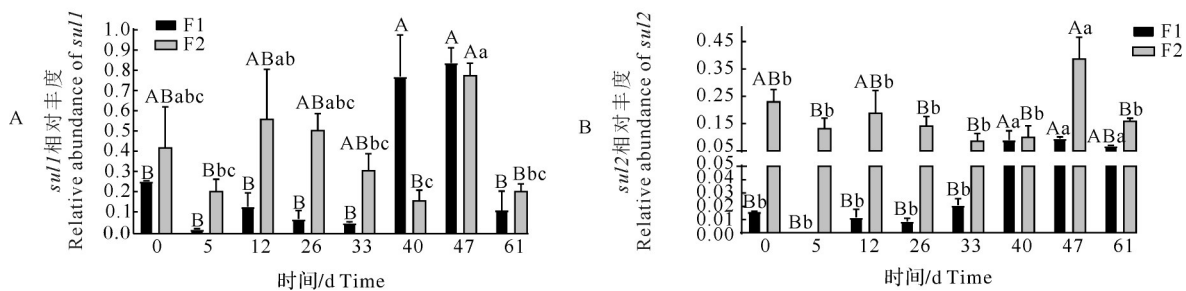


图3 粪污降解过程中 *sul1*(A)和 *sul2*(B)的变化

Fig.3 Changes of *sul1* (A) and *sul2* (B) during degradation of manure and sewage

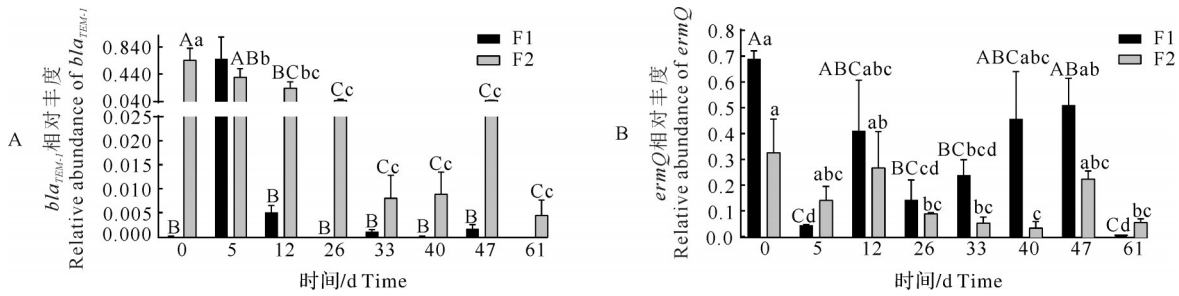
4) *bla*_{TEM-1}和 *ermQ*的相对丰度变化。粪污降解过程中 *bla*_{TEM-1}相对丰度整体上降低 (图4A)。F1组, 5 d极显著升高 ($P < 0.01$), 然后快速降低, 12~61 d极显著降低 ($P < 0.01$), 其中61 d低于检测限; F2组0~40 d逐步降低, 40~47 d升高后在降低。试验结束时, 与0 d比较, F1组低于检测限, F2组降低99.29% ($P < 0.01$)。

*ermQ*的相对丰度变化如图4B。初始样品中, F1组较高 (0.690 2), F2组较低 (0.328 4), 试验结束时与

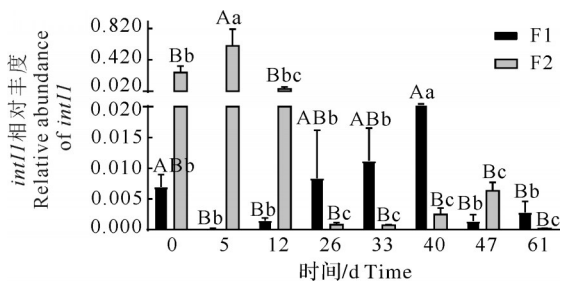
0 d比较, F1、F2组分别降低97.80% ($P < 0.01$)、82.22% ($P < 0.05$)。粪污降解过程中2组中 *ermQ*相对丰度均不同程度降低, F1组在5、26和61 d相对丰度较0 d极显著降低 ($P < 0.01$); F2组26~40 d以及61 d显著降低 ($P < 0.05$)。

F1和F2组均可显著降低 *bla*_{TEM-1}、*ermQ*的相对丰度, 且两组间无明显差别, 说明2种翻堆方式均可有效去除 *bla*_{TEM-1}、*ermQ*, 尤其是高温期。

5) 整合子基因 *intI1*的相对丰度变化。粪污降解

图4 粪污降解过程中 *bla*_{TEM-1}(A)和 *ermQ*(B)的变化Fig.4 Changes of *bla*_{TEM-1}(A) and *ermQ*(B) during degradation of manure and sewage

过程中 *intI1* 的相对丰度变化见图5。试验结束时, F1、F2组 *intI1* 的相对丰度分别降低 59.29% ($P > 0.05$)和 99.92% ($P < 0.05$)。F1组 0~12 d降低, 12~40 d逐渐升高, 40 d后大幅度降低, 其中 5 d 低于检测限, 40 d 升高至高于 0 d (293.18%); F2组 0~5 d 和 33~47 d 表现为升高趋势, 5~33 d 和 47~61 d 呈降低趋势, 其中 26~33 d 和 61 d 降低至极低水平。从 *intI1* 丰度的变化趋势来看, F1 和 F2 组均可降低 *intI1* 的相对丰度, F2 组去除 *intI1* 的效果更好 (99.92%), 尤其是高温期。

图5 粪污降解过程中 *intI1* 的变化Fig.5 Changes of *intI1* during degradation of manure and sewage

3 讨论

研究表明, 畜禽粪便堆肥过程中添加功能性菌剂^[7]、调理剂^[8](如锯末、蘑菇渣、秸秆等)及翻堆^[5]等有利于增强微生物活性, 促进微生物增殖, 改善微生物群落结构, 并能提高堆肥温度, 延长高温持续时间。本研究 F1、F2 组第 2~40 天均维持 50 °C 以上温度, 可能与异位发酵床垫料、添加复合菌剂、翻堆、微生物群落演替等有关; F2 组温度高于 F1 组, 可能与 2 d 翻堆 1 次有利于减少热量散失和保温、促进微生物的活动等有关。关于菌剂及添加量、垫料组成等对发酵床中微生物演替规律、温度和高温持续时间的影响有待于进一步研究。

武中庸^[9]在奶牛运动场粪土混合物中检出 18 种

耐药基因, 其中 *sul1*、*sul2*、*aac(6')*-*Ib-cr*、*ermB*、*tetM* 的检出率 100%; 许继飞等^[10]在奶牛粪便厌氧发酵原料中检出 3 种 MGEs (*intI1*、*intI2*、*Tn916/1545*) 基因; Zhang 等^[11]在奶牛粪浆中检出 8 种 ARGs (*tetA*、*tetC*、*tetG*、*tetO*、*tetQ*、*tetT*、*tetW*、*tetX*) 和 2 种 MGEs (*intI2*、*Tn916/1545*)。本研究除检出上述文献报道的四环素类、磺胺类、氨基糖苷类、MLSB 类抗性基因及 MGEs 的有关基因外, 还检出 FCA 类 (*optrA* 和 *IsaE*)、 β -内酰胺类 (*bla*_{TEM-1} 和 *fexA*) 及转座子基因 *ISCR1*, 这可能与生产过程中使用相关抗生素类药物或检测目标基因差异性等有关。

堆肥过程中产生的高温可杀灭/去除不耐热的 ARGs 宿主菌及破坏耐药质粒^[12]、生物降解 ARGs^[13], 从而减少 ARGs 或 MGEs 数量^[14-15]。本研究高温期 (12~40 d) 目标基因种类减少, 其中 F1 组 26 d 减少至 1 种, F2 组 26~33 d 减少 1~2 种, 与 Wu 等^[15]报道的堆肥 (尤其是高温期) 可有效减少 ARGs 多样性的结果类似, 表明堆肥高温期可减少 ARGs 的种类。40 d 后 ARGs 种类增加, 可能与物料逐步腐熟, 微生物活性降低, 温度逐步下降, 高温环境下被抑制的微生物恢复活性^[16]及粪浆含有 ARGs、或 ARGs 的类型等有关。

研究表明, 堆肥过程中微生物群落结构变化是 ARGs 丰度变化的关键因素^[17], 持续相对较高的温度可杀灭/去除携带 ARGs 的微生物及降解 ARGs^[18], 进而降低目标基因相对丰度。本研究高温阶段基因总相对丰度整体上下降, 与 Wang 等^[19]报道的堆肥高温期可明显降低 ARGs 丰度的结果相似, 其中 F1 组第 26 天 (81.63%) 和 F2 组第 40 天 (86.91%) 明显降低, 且 F2 组有一定优势, 这可能与 ARGs 类型和丰度、持续较高的温度、微生物群落结构及丰度变化^[20]等有关。

Qian 等^[21]报道, 堆肥初期至高温期 *tetM*、*tetC*、*tetW*、*tetX*、*tetQ*、*sul1* 和 *sul2* 的相对含量逐渐降低, 但

高温期到腐熟期 *tetC*、*tetX*、*sul1*、*sul2* 的相对含量呈上升趋势。Cao 等^[22]发现,猪粪堆肥降温-腐熟阶段四环素类、磺胺类和氨基糖苷类抗性基因富集。本研究降温期基因总相对丰度变化与上述报道类似,这可能与有效养分减少,微生物群落活性降低,高温条件下某些 ARGs 和 MGEs 没有完全去除或持久存在,或携带 ARGs 的某些宿主菌恢复活性或积累^[23],或特定的 ARGs 富集或出现^[15],及持续补充粪污等有关。

研究表明,堆肥可降低大部分四环素类抗性基因如 *tetG*、*tetX* 的丰度^[24-25],但 Peng 等^[26]报道,堆肥降低了猪粪中 *tetW* 的相对丰度,增加了 *tetG* 的相对丰度。本研究 F1、F2 组 *tetW* 的相对丰度极显著降低,与上述报道基本一致,说明异位发酵可有效去除粪污中的 *tetW*。*tetG* 的相对丰度不同程度降低(16.51%、64.32%),与 Duan 等^[25]的报道相似,与 Peng 等^[26]的报道不一致,可能与复合菌剂、粪污源及降解工艺、菌群结构变化、粪污补充等有关。F2 组 *tetW*、*tetG* 的去除率(99.46%、64.32%)高于 F1(87.89%、16.51%),说明 2 d 翻堆 1 次可能有利于去除 *tetW*、*tetG*。

有研究^[21]报道,堆肥高温阶段磺胺类抗性基因(*sul1*、*sul2*)的丰度逐步降低,但在腐熟降温阶段不同程度增加。本研究高温阶段 *sul1* 和 *sul2* 相对丰度的整体变化趋势与上述报道相似,说明高温期可能有利于降低 *sul1* 和 *sul2* 的相对丰度。试验结束时,2 组中 *sul1* 的相对丰度降低(54.58%、50.91%),但 *sul2* 相对丰度变化(F1: -327.33%, F2: 30.87%)与 Duan 等^[25]的结果有一定差别,说明两处理可较好地去除 *sul1*,但去除 *sul2* 的效果不理想,这可能与磺胺类抗性基因的环境抗性强、携带磺胺类抗性基因的某些菌群耐高温或高温期未被完全去除^[27]及不同条件下相同 ARGs 也会出现不一样的变化^[28]等有关。F2 组去除 *sul1* 和 *sul2* 的效果相对较好(50.91%、30.87%),可能与物料中 *sul1* 和 *sul2* 含量、翻堆频次、微生物菌群更替及更高温度等有关。对于粪污降解过程中 2 组间 *sul2* 丰度变化的差异性有待进一步研究。

Jang 等^[14]发现,高温好氧堆肥后污泥中 β -内酰胺类抗性基因的去除率达 80.02%~100%。郑宁国等^[29]报道,高温堆肥可有效去除猪粪中 β -内酰胺类抗性基因,但去除 *ermQ* 的效果不佳。本研究 F1、F2 组均可显著降低 *bla*_{TEM-1} 和 *ermQ* 的相对丰度(低于检测限和 97.80%、99.29% 和 82.22%),去除 *bla*_{TEM-1} 的

效果与上述报道一致,而去除 *ermQ* 的效果与郑宁国等^[29]的结果不同,这可能与原料、处理工艺的差别及使用菌剂等有关,表明 2 种处理方式均可有效去除粪污中的 *bla*_{TEM-1} 和 *ermQ*。

intI1 是 ARGs 水平转移的一个重要 MGEs,降低 *intI1* 相对丰度可抑制 ARGs 的扩散和传播^[23]。Li 等^[30]发现,堆肥降低鸡粪中 *intI1* 的丰度。Duan 等^[25]报道,添加 0.5% 枯草芽孢杆菌可显著降低牛粪堆肥产物中 *intI1* 的相对丰度,抑制 ARGs 的传播。与上述报道类似,试验结束时 F1、F2 组中 *intI1* 相对丰度均有不同程度降低(59.29% 和 99.92%),说明两处理均可较好地去除粪污中的 *intI1*,其中 F2 的效果更好,可能与 *intI1* 不耐高温、相对更高的温度可促进 *intI1* 的去除^[31]等有关。F1 和 F2 组间的差异,可能与补充粪污及 *intI1* 含量、翻堆频次、细菌群落结构变化等有关。

综上,奶牛粪污异位发酵床中添加复合菌剂、2 d 翻堆 1 次更有利于提高堆肥温度并延长高温持续时间,有利于去除粪污中大部分 ARGs,降低 ARGs 传播扩散风险。

参考文献 References

- [1] ZHU G B, WANG X M, YANG T, et al. Air pollution could drive global dissemination of antibiotic resistance genes[J]. The ISME journal, 2021, 15(1): 270-281.
- [2] CHEN Z Q, WANG Y, WEN Q X. Effects of chlortetracycline on the fate of multi-antibiotic resistance genes and the microbial community during swine manure composting[J]. Environmental pollution, 2018, 237: 977-987.
- [3] 李可心, 王远帆, 薛睿, 等. 垫料对异位发酵床中四环素抗性基因及 I 类整合子丰度的影响[J]. 四川农业大学学报, 2020, 38(5): 580-589. LI K X, WANG Y F, XUE R, et al. Effect of bio-bed litters on the abundance of tetracycline resistance genes and class I integron in ectopic fermentation bed[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2020, 38(5): 580-589 (in Chinese with English abstract).
- [4] 李艳蓉. 微生物发酵床中土霉素降解及其抗性基因丰度变化规律[D]. 北京: 中国农业科学院, 2019. LI Y L. Degradation of oxytetracycline and the abundance ARGs in microbial fermentation system[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019 (in Chinese with English abstract).
- [5] 张锦. 畜禽粪便中抗生素及抗性基因的消减研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2018. ZHANG J. Elimination of antibiotics and resistance genes in livestock manure[D]. Hangzhou: Zhejiang A & F University, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [6] 国辉. 异位发酵床技术在奶牛养殖废水污染控制中的研究及应用[D]. 北京: 中国农业大学, 2014. GUO H. Research and application of ectopic deep litter fermentation system in the control of

- dairy farming wastewater pollution[D]. Beijing: China Agricultural University, 2014 (in Chinese with English abstract).
- [7] HU T, WANG X J, ZHEN L S, et al. Effects of inoculation with lignocellulose-degrading microorganisms on antibiotic resistance genes and the bacterial community during co-composting of swine manure with spent mushroom substrate[J]. *Environmental pollution*, 2019, 252(Pt A): 110-118.
- [8] 邹威, 罗义, 周启星. 畜禽粪便中抗生素抗性基因(ARGs)污染问题及环境调控[J]. *农业环境科学学报*, 2014, 33(12): 2281-2287. ZOU W, LUO Y, ZHOU Q X. Pollution and environmental regulation of antibiotic resistance genes (ARGs) in livestock manure [J]. *Journal of agro-environment science*, 2014, 33(12): 2281-2287 (in Chinese with English abstract).
- [9] 武中庸. 奶牛养殖运动场及粪肥处理过程中耐药菌和耐药基因分布研究[D]. 兰州: 西北民族大学, 2018. WU Z Y. Study on drug resistant bacteria and drug resistance genes in dairy cows' sports field and fecal processing[D]. Lanzhou: Northwest University for Nationalities, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [10] 许继飞, 张秋萍, 朱天骄, 等. 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[J]. *环境科学*, 2021, 42(6): 2992-2999. XU J F, ZHANG Q P, ZHU T J, et al. Effects of temperature and stirring on the changes of antibiotic resistance genes and microbial communities in anaerobic digestion of dairy manure [J]. *Environmental science*, 2021, 42(6): 2992-2999 (in Chinese with English abstract).
- [11] ZHANG Q P, XU J F, WANG X J, et al. Changes and distributions of antibiotic resistance genes in liquid and solid fractions in mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of dairy manure [J/OL]. *Bioresource technology*, 2021, 320: 124372 [2022-03-08]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124372>.
- [12] ZHANG J, LIN H, MA J 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.
- [13] 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.
- [14] JANG H M, LEE J, KIM Y B, et al. Fate of antibiotic resistance genes and metal resistance genes during thermophilic aerobic digestion of sewage sludge [J]. *Bioresource technology*, 2018, 249: 635-643.
- [15] WU N, XIE S Y, ZENG M, et al. Impacts of pile temperature on antibiotic resistance, metal resistance and microbial community during swine manure composting [J/OL]. *Science of the total environment*, 2020, 744: 140920 [2022-03-08]. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140920>.
- [16] 田哲, 张昱, 杨敏. 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[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(5): 936-943. TIAN Z, ZHANG Y, YANG M. Control of tetracyclines and resistance genes in animal manure by composting [J]. *Microbiology China*, 2015, 42(5): 936-943 (in Chinese with English abstract).
- [17] RIAZ L, WANG Q Q, YANG Q X, et al. Potential of industrial composting and anaerobic digestion for the removal of antibiotics, antibiotic resistance genes and heavy metals from chicken manure [J/OL]. *Science of the total environment*, 2020, 718: 137414 [2022-03-08]. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137414>.
- [18] CHEN C Q, PANKOW C A, OH M, et al. Effect of antibiotic use and composting on antibiotic resistance gene abundance and resistome risks of soils receiving manure-derived amendments [J]. *Environment international*, 2019, 128: 233-243.
- [19] WANG R, ZHANG J Y, SUI Q W, et al. Effect of red mud addition on tetracycline and copper resistance genes and microbial community during the full scale swine manure composting [J]. *Bioresource technology*, 2016, 216: 1049-1057.
- [20] CUI G Y, LÜ F, ZHANG H, et al. Critical insight into the fate of antibiotic resistance genes during biological treatment of typical biowastes [J/OL]. *Bioresource technology*, 2020, 317: 123974 [2022-03-08]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123974>.
- [21] QIAN X, SUN W, GU J, et al. Variable effects of oxytetracycline on antibiotic resistance gene abundance and the bacterial community during aerobic composting of cow manure [J]. *Journal of hazardous materials*, 2016, 315: 61-69.
- [22] CAO R K, WANG J, BEN W W, et al. The profile of antibiotic resistance genes in pig manure composting shaped by composting stage: mesophilic-thermophilic and cooling-maturation stages [J/OL]. *Chemosphere*, 2020, 250: 126181 [2022-03-08]. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126181>.
- [23] LIAO H P, LU X M, RENSING C, et al. Hyperthermophilic composting accelerates the removal of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in sewage sludge [J]. *Environmental science & technology*, 2018, 52(1): 266-276.
- [24] 勾长龙, 王雨琼, 张喜庆, 等. 高温堆肥对猪粪中四环素类抗生素及抗性基因的影响[J]. *环境科学学报*, 2017, 37(4): 1454-1460. GOU C L, WANG Y Q, ZHANG X Q, et al. Effects of high-temperature composting on tetracyclines and tetracycline resistance genes in swine manure [J]. *Acta scientiae circumstantiae*, 2017, 37(4): 1454-1460 (in Chinese with English abstract).
- [25] DUAN M L, ZHANG Y H, ZHOU B B, et al. Changes in antibiotic resistance genes and mobile genetic elements during cattle manure composting after inoculation with *Bacillus subtilis* [J/OL]. *Bioresource technology*, 2019, 292: 122011 [2022-03-08]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122011>.
- [26] PENG S, WANG Y M, ZHOU B B, et al. Long-term application of fresh and composted manure increase tetracycline resistance in the arable soil of Eastern China [J]. *Science of the total environment*, 2015, 506/507: 279-286.
- [27] 闫书海. 畜禽养殖废水/粪便中典型抗药基因的调查研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013. YAN S H. Research on representative antibiotic resistance genes in livestock lagoons and manures [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013 (in Chinese with English abstract).
- [28] CAO R K, BEN W W, QIANG Z M, et al. Removal of antibiotic resistance genes in pig manure composting influenced by inoculation of compound microbial agents [J/OL]. *Bioresource technology*, 2020, 317: 123966 [2022-03-08]. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123966>.
- [29] 郑宁国, 黄南, 王卫卫, 等. 高温堆肥过程对猪粪来源抗生素抗性基因的影响[J]. *环境科学*, 2016, 37(5): 1986-1992. ZHENG N G, HUANG N, WANG W W, et al. Effects of thermophilic

- composting on antibiotic resistance genes (ARGs) of swine manure source[J]. *Environmental science*, 2016, 37(5): 1986-1992 (in Chinese with English abstract).
- [30] LI H C, DUAN M L, GU J, et al. Effects of bamboo charcoal on antibiotic resistance genes during chicken manure composting[J]. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2017, 140: 1-6.
- [31] LIAO J Q, CHEN Y G. Removal of *int11* and associated antibiotics resistant genes in water, sewage sludge and livestock manure treatments[J]. *Reviews in environmental science and bio/technology*, 2018, 17(3): 471-500.

Effects of stacking frequency on antibiotic resistance genes in ectopic fermentation bed for manure and sewage of dairy cows

CUI Huawei^{1,2}, GONG Ping¹, GAO Daoyu³, ZHOU Yuan¹, HUA Juan¹, SHAO Zhiyong¹, CHEN Jie¹, WAN Pingmin¹, JIN Erguang¹, LI Zili²

1. *Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Wuhan Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430208, China;*

2. *College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*

3. *College of Animal Science and Technology, Yangtze University, Jingzhou 434023, China*

Abstract In order to investigate the effect of stacking frequency on antibiotic resistance genes (ARGs) and movable genetic elements (MGEs) in continuous composting of ectopic fermentation bed, two conditions were set: turning over once every day (F1 group) and turning over once every two days (F2 group). Fifteen target genes, including 2 tetracycline (*tetG*, *tetW*), 3 sulfonamide (*sul1*, *sul2*, *dfrA1*), 2 β -lactamase (*bla_{TEM-1}*, *fexA*), 2 MLSB (*ermX*, *ermQ*), 2 FCA (*optrA*, *IsaE*) and 1 aminoglycoside (*aac* (*6'*)-*Ib-cr*), 1 integrase (*int11*) and 2 transposon (*Tn916/1545*, *ISCR1*) genes, were identified by PCR in composting process, and 7 genes with high detection rate (*tetG*, *tetW*, *sul1*, *sul2*, *bla_{TEM-1}*, *ermQ*, *int11*) were quantitatively detected by qPCR. The PCR results showed that, 11 kinds of ARGs (*tetG*, *tetW*, *sul1*, *sul2*, *bla_{TEM-1}*, *fexA*, *ermX*, *ermQ*, *optrA*, *IsaE*, *aac* (*6'*)-*Ib-cr*) and 3 kinds of MGEs (*int11*, *Tn916/1545*, *ISCR1*) were detected in both groups. The detection rates of 7 genes (*tetG*, *tetW*, *sul1*, *sul2*, *bla_{TEM-1}*, *ermQ*, *int11*) were high. In F1 and F2 groups, 12 species were detected at 0 to 5 d, and 1 species was detected at 33 d in F1 and 40 d in F2, and the detection rates increased significantly after 40 d, indicating that the species of ARGs and MGEs changed with temperature. qPCR results showed that the total relative abundance of 7 target genes in F1 and F2 groups decreased firstly, then increased and then decreased, and decreased by 82.33% and 78.89% at the end of the experiment compared with 0 d, respectively. The relative abundance of *tetG*, *tetW*, *sul1*, *bla_{TEM-1}*, *ermQ* and *int11* decreased by 16.51%, 87.89%, 54.58%, 99.99%, 97.80%, 59.29%, and 64.32%, 99.46%, 50.91%, 99.29%, 82.22%, 99.92% in F1 and F2 groups, respectively. The results showed that the types and relative abundance of ARGs could be reduced by ectopic fermentation bed during degradation manure and sewage at high temperature, and the removal efficiency of most ARGs was better by turning over once every two days.

Keywords manure and sewage of dairy cows; degradation; ectopic fermentation bed; antibiotic resistance genes

(责任编辑:边书京)