

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20200102001

綦峥, 杨红, 张铁林, 等. 畜牧场中磺胺类抗生素及其抗性基因的空间分布规律[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(1): 215-222

Qi Z, Yang H, Zhang T L, et al. Spatial distribution of sulfonamides and its antibiotic resistance genes in livestock farm [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(1): 215-222 (in Chinese)

畜牧场中磺胺类抗生素及其抗性基因的空间分布规律

綦峥*, 杨红, 张铁林, 齐越, 凌娜

哈尔滨商业大学药物工程技术研究中心, 哈尔滨 150076

收稿日期: 2020-01-02 录用日期: 2020-05-21

摘要: 为了解畜牧场内磺胺类抗生素及抗性基因的污染物空间分布情况、分布规律及相关性, 选取某畜牧场的 10 cm 和 50 cm 深度的土壤样品共 20 个及 5 个粪便样品, 分别对样品中 13 种磺胺类抗生素的浓度和 3 种磺胺类抗性基因(*sul1*、*sul2* 和 *sul3*) 的丰度进行定量分析, 并用地理信息系统优化采样并对污染物空间分布进行可视化分析。结果表明, 垂直浓度的空间分布规律为粪便>10 cm 深度土壤>50 cm 深度土壤, 水平浓度的空间分布主要集中在畜牧场的东南部。3 种抗性基因在 10 cm 和 50 cm 深度土层中均有检出, 其基因相对丰度分布情况为 10 cm 深度土壤>50 cm 深度土壤, 且抗生素对抗性基因的表达压力相似。本研究为抗生素和抗性基因污染的精准分析和深入研究畜牧场周边环境中的抗性基因的传播规律提供基础数据。

关键词: 磺胺类抗生素; 抗生素抗性基因; 畜牧场; 液相色谱-串联质谱法; 实时荧光定量 PCR 法

文章编号: 1673-5897(2021)1-215-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Spatial Distribution of Sulfonamides and Its Antibiotic Resistance Genes in Livestock Farm

Qi Zheng*, Yang Hong, Zhang Tielin, Qi Yue, Ling Na

Engineering Research Center for Medicine, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

Received 2 January 2020 accepted 21 May 2020

Abstract: In order to analyze the spatial distribution and correlation of sulfonamides (SAs) and their antibiotic resistance genes (ARGs), a livestock farm was taken as a case study, and 20 soil samples including 10-cm and 50-cm depth and 5 manure samples were collected. 13 kinds of SAs and 3 ARGs (*sul1*, *sul2* and *sul3*) were quantitatively detected respectively, and Geographic Information System (GIS) was used to optimize sampling and visualize the spatial distribution. The spatial distribution of vertical concentrations were as followed: manure> 10 cm-depth soil> 50 cm-depth soil. The spatial distribution of horizontal concentrations were mainly concentrated in the southeast. 3 ARGs were detected in 10-cm and 50-cm depth soil layers. The distribution of ARGs relative abundance was 10 cm-depth soil> 50 cm-depth soil, and the expression pressure of antibiotic antagonistic genes was similar. It provides basic data for accurate analysis of antibiotic and resistance gene pollution and in-depth study of the spread of resistance genes in the surrounding environment of the livestock farms.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41702368); 黑龙江省自然科学基金资助项目(LH2019D007); 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费资助项目(2020CX09, 2020CX10, 2020CX38); 中央支持地方高校改革发展基金优秀青年人才项目(2020YQ12)

第一作者: 綦峥(1981—), 女, 博士, 副研究员, 硕士研究生导师, 研究方向为环境毒理学, E-mail: 18645039597@163.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: 18645039597@163.com

Keywords: sulfonamides; antibiotic resistance genes; livestock farm; liquid chromatography-mass spectrometry; real-time quantitative PCR

我国每年生产抗生素 21 万 t, 其中 48% 用于农牧业^[1]。畜禽养殖业中抗生素高浓度残留现象已成为社会关注的热点问题^[2]。研究表明, 大多数进入动物体内的抗生素不能被其自身完全吸收, 30% ~ 90% 的抗生素通过畜禽排泄物或动物粪便排出, 从而导致了土壤中抗生素残留的持续污染^[3]。抗生素残留可诱导抗生素抗性基因 (antibiotic resistance genes, ARGs) 的产生, 通过注射抗生素会导致其动物粪便中抗生素耐药基因的产生^[4]。磺胺类抗生素 (sulfonamides, SAs) 在农牧业中的使用量很高, 尤其在畜禽粪便中 SAs 的检出率也非常高^[5]。在江苏省 13 个城市的 80 份猪场粪便样本中, 磺胺二甲嘧啶 (SMD) 的检出率最高, 达到 50% 以上, 磺胺氯哒嗪 (SPD) 和磺胺嘧啶 (SD) 检出率都高于 30%, 三者的平均残留量分别为 34.0、49.0 和 69.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[6]。残留的 SAs 药物对土壤中的微生物及微生物群落有重要的抑制作用^[7]。SAs 在牧区中的普遍使用, 将导致耐药菌和 ARGs 在土壤环境中与动物之间传播, 从而引起环境领域的广泛关注^[8], 同时 ARGs 也被公认为一种新的污染物^[9]。

为了解畜牧场内 SAs 及 ARGs 的污染物空间分布情况、分布规律及相关性, 为畜牧场土壤的修复提出参考依据, 本研究选取大庆市杜尔伯特蒙古自治区 (以下简称杜蒙) 作为研究对象, 该畜牧场位于中国东北黑土地地区, 东北的黑土地地区是目前世界上珍贵的三大黑土资源之一, 以其有机质含量高、土壤肥沃和最适宜耕作而闻名于世, 素有“谷物仓库”之称^[10]。杜蒙地区拥有众多大小畜牧场, 同时也是重要的奶源基地。本研究采用液相色谱-串联质谱法和实时荧光定量 PCR 法对该畜牧场土壤及粪便中的 SAs 含量及其 ARGs 丰度进行定量检测, 对其空间分布规律以及 SAs 对磺胺类 ARGs 选择压力的相似性进行分析。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 样品采集

杜蒙位于黑龙江省西部, 嫩江下游东岸。西邻泰来县, 南与肇源县毗邻, 北与齐齐哈尔市接壤^[11]。采样的畜牧场为典型的东北牧区 (图 1)。该地区气候属于温带大陆性气候, 冷暖适中, 四季分明。研究区土地类型上部为黑色腐殖土、黄土和松砂层, 下部

为灰褐和黑色粘土。底部为灰白、黄灰色砂层和砂砾层, 沉积厚度 118 cm 左右^[12]。牧区总面积约为 67 km^2 , 其中畜牧场 (存栏量约为 200 头), 在当地属于中型畜牧场。

在畜牧场采用网格布设预采样点, 运用荷兰钻 304 不锈钢土样采集器, 在网格内选取土壤采样点 10 个 (红色圆点), 采样深度分别为 10 cm 和 50 cm (图 2), 以及粪便样品 5 个 (黄色圆点)。用 GPS 定位并记录, 土壤样品各 500 g, 在每个采样点 1 m^2 内取 3 个土壤样品, 混匀后待检测。粪便样品每份 500 g, 装入牛皮纸密封袋中, 保存在冰袋中冷藏。

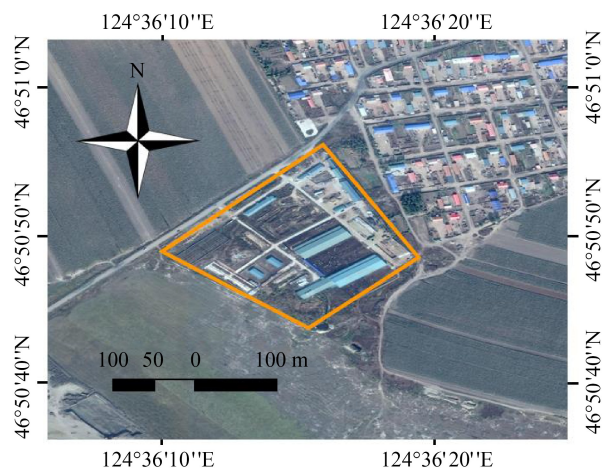


图1 杜蒙某畜牧场采样区

Fig. 1 Sampling area of livestock farm in Dumong

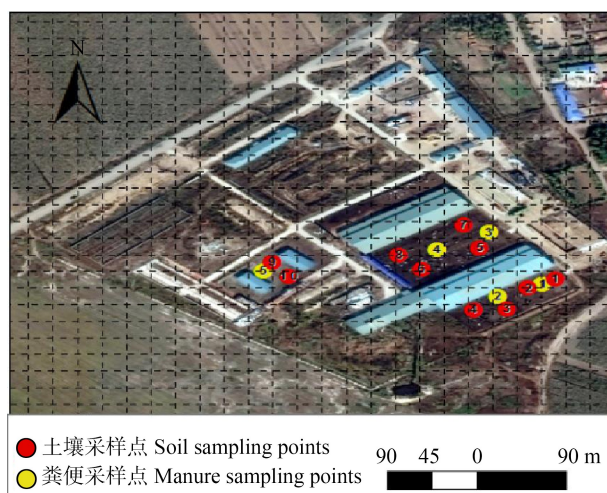


图2 现场土壤和粪便采样分布点

Fig. 2 Preset soil and manure on-site sampling points

1.2 样品检测

1.2.1 抗生素检测方法

采用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS),对土壤中的磺胺类包括磺胺醋酰(SA)、磺胺氯哒嗪(SPD)、磺胺嘧啶(SD)、磺胺二甲氧嘧啶(SEP)、磺胺脒(SG)、磺胺二甲嘧啶(SMD)、磺胺甲噻二唑(SDS)、磺胺甲恶唑(SMZ)、磺胺苯吡唑(SPP)、磺胺吡啶(SP)、磺胺噻唑(ST)、磺胺苯酰(SBA)和磺胺邻二甲氧嘧啶(SDM')共 13 种抗生素浓度进行检测。

称取 1.00 g 新鲜土壤样品(粪便样品)于 10 mL 试管中,以 EDTA-McIlvaine 缓冲提取液提取 3 次,

涡旋振荡超声离心,HLB 小柱净化富集,3 mL 甲醇洗脱后,氮吹至近干,1 mL 甲醇复溶震荡,过 0.22 μm 有机系滤膜,经 LC-MS/MS 检测,色谱和质谱条件如表 1 所示。同时,每组另加 2 个全程序空白平行样,以校正各待测化合物在土壤基质中存在的不可忽略的基质效应。

1.2.2 抗性基因检测方法

(1)DNA 提取

样品中的基因组提取使用的试剂盒为 TIAN-NAMP Soil DNA Kit(天根生化科技有限公司,中国),按照说明书要求进行提取。

表 1 液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)的色谱和质谱条件
Table 1 Chromatography and mass spectrometry conditions for liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

色谱条件 Chromatographic conditions				质谱条件 Mass spectrometry conditions	
色谱柱 Chromatographic column	Atiantis T3 2.1 mm×150 mm, 3 μm			电离方式 Ionization method	ESI ⁺
柱温 Column temperature	40 ℃			毛细管电压 Capillary voltage	5.5 kV
流速 Flow rate	0.3 mL·min ⁻¹			源温度 Source temperature	500 ℃
进样量 Injection volume	5 μL			气帘气压 Air curtain air pressure	206.84 kPa
梯度洗脱表 Gradient elution table	时间/min Time/min	A(0.1% 甲酸水溶液)/% A(0.1% formic acid aqueous solution)/%	B(甲醇)/% B (Methanol)/%	雾化气压 Atomization air pressure	413.7 kPa
	2.0	90	10	辅助加热气压 Auxiliary heating air pressure	413.7 kPa
	5.0	15	85	碰撞气 Collision gas	6
	10.0	15	85	检测模式 Detection mode	多反应监测(MRM) Multiple reaction monitoring (MRM)
	10.1	90	10		
	13.0	停止 Stop			

(2)实时荧光定量 PCR 检测

测定样品中 3 种磺胺类抗性基因 *sul1*、*sul2* 和 *sul3* 的多样性和丰富度,采用试剂盒 TB GreenTM Premix Ex TaqTM II 测定,qPCR 的反应体系如表 2 所示。qPCR 的反应条件:95 ℃ 30 s,一个循环。95 ℃ 5 s,40 个循环。60 ℃ 30 s,40 个循环。16S rRNA 基因作为内参基因。相对丰度的计算采用 2^{-ΔΔC_T} 的方法进行计算,其中 ΔC_T=C_T(目的基因)-C_T(内参基因)^[13]。

1.3 数据处理

数据通过 Excel2016 进行处理,采用 ArcGIS10.5 绘制 SAs 的空间分布规律图,Origin8.0 对 SAs 浓度

表 2 qPCR 反应体系
Table 2 qPCR reaction system

试剂 Chemicals	使用量/μL Volume/μL
TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (2×)	5
Primer F	0.4
Primer R	0.4
ROX Reference Dye (50×)	0.2
DNA Sample	1
ddH ₂ O	3
总体积 Total volume	10

和 ARGs 相对丰度进行分析,利用 Cluster3.0 和 Heatmap 绘制热图,对 SAs 和 ARGs 进行聚类分析。

2 结果 (Results)

2.1 磺胺类抗生素的空间分布规律

13 种 SAs 在粪便及 10 cm 和 50 cm 的土层中浓度分布情况(图 3)。整体上,土壤样品中的浓度分布不均匀,在粪便中,SEP、SMD、SPP、SBA 和 SDM 的检出率达到 100%,抗生素的平均浓度为 $0.060 \sim 8.167 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$;在 10 cm 土层中,SPP 的检出率达到 100%,抗生素的平均浓度为 $0.003 \sim 16.097 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$;在 50 cm 土层中,SEP、SBA 和 SDM 的检出率都达到 100%,抗生素的平均浓度为 $0.002 \sim 6.981 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。其中,SPP 是土壤中残留浓度最高的 SAs,SPP 在所有被检测的土壤样品中的检出率均高于 96.7%,SPP 在粪便中的浓度也最高。随土壤深度增加,SAs 残留浓度减小,SAs 在粪便样品和不同土层的浓度变化趋势与张昊^[14]的研究结果相

似,表明畜牧场土壤中 SAs 的来源很可能是畜禽粪便在畜牧场内的累积造成的。

土壤中 13 种 SAs 的空间分布特征如图 4 所示,从污染物空间分布特征来分析可知:从垂直方向上,随着土壤深度的加深,土壤中 SAs 的浓度逐渐减小,呈下降趋势。在水平方向上,10 cm 土层中 SPP、SA、SG 和 SBA 的空间分布结构相似,从西向东,污染特征呈逐渐减小的趋势,且主要污染集中在东部地区;SPD、SP 和 SMZ 在 10 cm 土层的分布结构相似,污染特征主要集中在东北部;50 cm 土层中 SA、SG、SMZ、SPP、SDM、SD 和 ST 的空间分布结构相似,从西向东污染程度逐渐增大,主要集中在东南部地区;整体水平上 SAs 在 10 cm 土层中由西到东空间分布污染情况逐步减小,主要聚集区域为畜牧场的西部,50 cm 土层中,从西向东,污染特征逐渐增大,主要污染聚集区域为东北部地区,其余区域均无明显聚集现象。

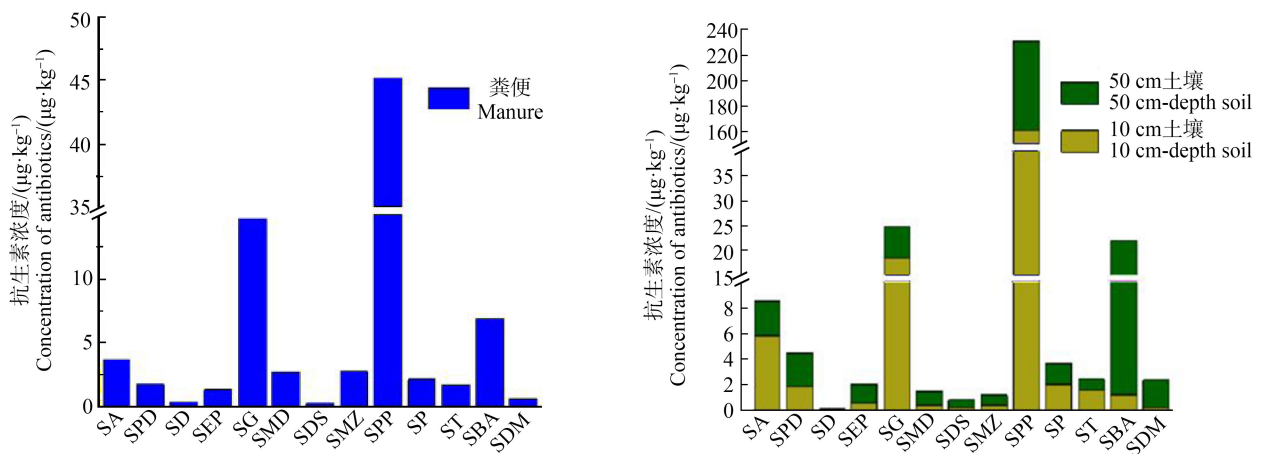


图 3 13 种磺胺类抗生素 (SAs) 在粪便和不同深度土壤中的浓度

注: SA 为磺胺醋酐;SPD 为磺胺氯吡啶;SD 为磺胺嘧啶;SEP 为磺胺二甲氧嘧啶;SG 为磺胺脒;SMD 为磺胺二甲噻唑;SDS 为磺胺甲噻二唑;SMZ 为磺胺甲恶唑;SPP 为磺胺苯吡唑;SP 为磺胺吡啶;ST 为磺胺噻唑;SBA 为磺胺苯酰胺;SDM 为磺胺邻二甲氧嘧啶。

Fig. 3 Concentrations of 13 sulfonamide antibiotics (SAs) in manure and soil at different depths

Note: SA stands for sulfacetamide; SPD stands for sulfachloropyridazine; SD stands for sulfadiazine; SEP stands for sulfadimethoxine;

SG stands for sulfaguanidine; SMD stands for sulfamethazine; SDS stands for sulfamethizole; SMZ stands for sulfamethoxazole;

SPP stands for sulfaphenazole; SP stands for sulfapyridine; ST stands for sulfathiazole; SBA stands for sulfabenzamide; SDM stands for sulfladoxine.

2.2 磺胺类 ARGs 的相对丰度分布情况

3 种磺胺类 ARGs 在 10 cm 和 50 cm 的土层中相对丰度分布情况如图 5 所示。整体上,土壤样品中的相对丰度含量分布不均匀,在 10 cm 土层中,*sul1* 和 *sul2* 的检出率达到 100%,ARGs 的相对丰度范围为 $0.0043 \sim 0.2282$;在 50 cm 土层中,3 种 ARGs

的检出率都达到 100%,ARGs 的相对丰度范围为 $0.0013 \sim 0.1499$ 。其中,*sul2* 是土壤中残留含量最高的磺胺类 ARGs,在 10 cm 土层中的相对丰度含量最高,随土壤深度增加,磺胺类 ARGs 相对丰度逐渐减小。这与贵州省养猪场的情况有所不同,在寇宏等^[15]的研究中 *sul3* 是携带率较高的磺胺类 ARGs。

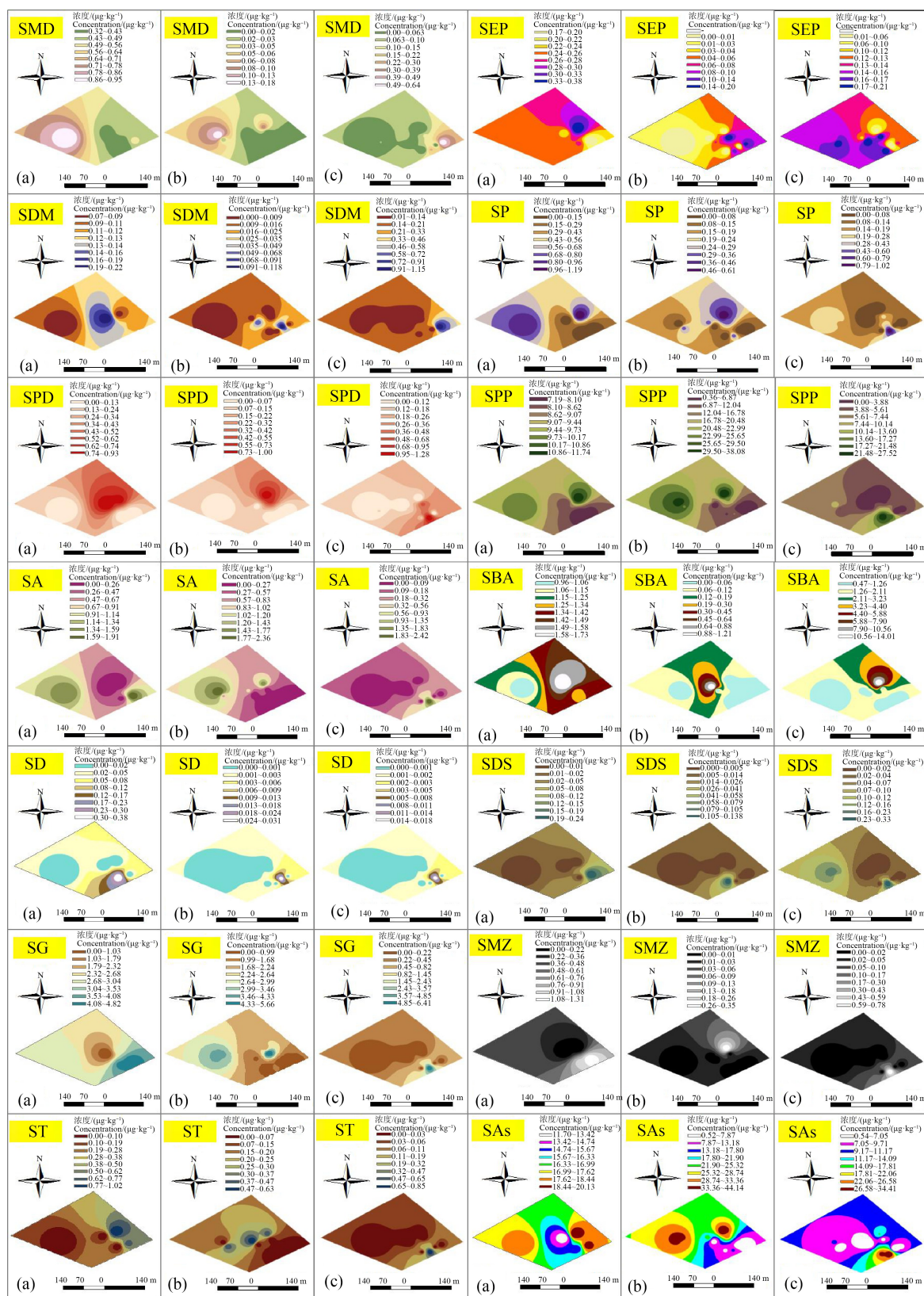


图 4 SAs 污染的空间分布 GIS 图

注: (a) 畜禽粪便中 SAs 浓度; (b) 10 cm 深土壤 SAs 浓度; (c) 50 cm 深土壤 SAs 浓度。

Fig. 4 GIS images of spatial distribution of SAs

Note: (a) SAs concentration in manure; (b) SAs concentration in 10 cm-depth soil; (c) SAs concentration in 50 cm-depth soil.

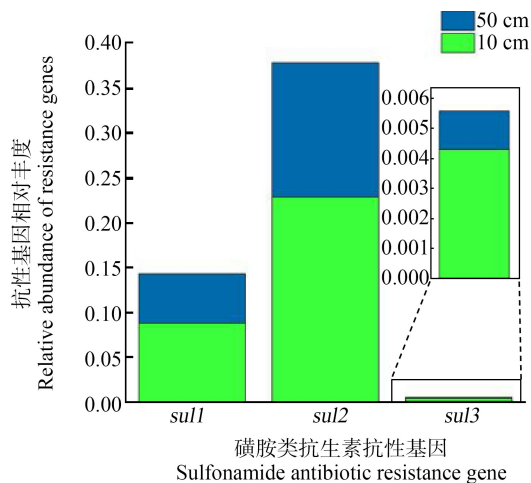


图5 磺胺类抗生素抗性基因 (ARGs) 在不同土层中的相对丰度

Fig. 5 Relative abundance of sulfonamides antibiotic resistance genes (ARGs) in different soil layers

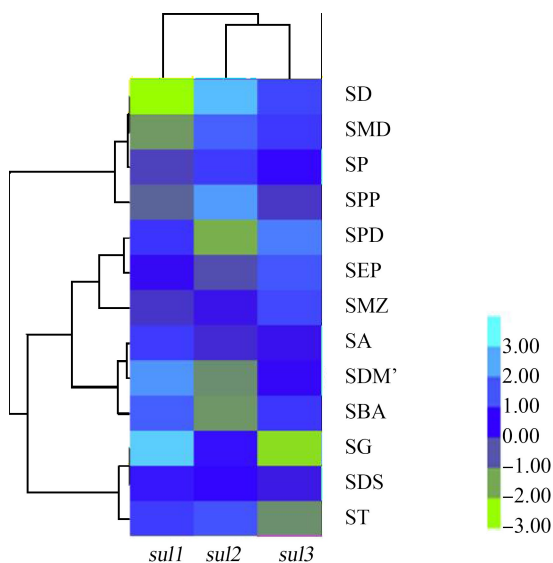


图6 土壤中 SAs 及 ARGs 的聚类分析

Fig. 6 Clustering of SAs and its ARGs in the soil

2.3 磺胺类抗生素及抗性基因的相关性分析

对 13 种 SAs 和 3 种磺胺类 ARGs (*sul1*、*sul2* 和 *sul3*) 进行聚类分析, 热图的纵向代表 ARGs 的相对丰度, 横向代表 13 种 SAs 的聚类情况, 反映了 SAs 对磺胺类 ARGs 是否有选择压力的相似性, 从图 6 可知, SD、SMD、SP 和 SPP 聚为一类, SPD、SEP、SMZ、SA、SDM 和 SBA 聚为一类; SG、SDS 和 ST 聚为一类。说明 SD、SMD、SP 和 SPP 对磺胺类 ARGs 的压力作用相似; SPD、SEP、SMZ、SA、SDM 和 SBA

对磺胺类 ARGs 的压力作用相似; SG、SDS 和 ST 对磺胺类 ARGs 的压力作用相似。

3 讨论 (Discussion)

畜牧业土壤中 SAs 的使用加速了其 ARGs 的累积, 目前 ARGs 的相对丰度与土壤中的菌群影响研究很多, 结果单一相关性很低, 因此, 土壤中 ARGs 的生成是土壤中微生物、畜牧业中动物肠道菌群和土壤性质等因素的共同协作结果^[16]。探究畜牧业土壤中 SAs 及 ARGs 的空间分布规律, 为土壤修复和污染防治提供借鉴。

SAs 在畜牧业土壤中广泛存在, 从空间分布的污染情况可知, 垂直方向上, SAs 的浓度由上至下逐步升高, 其中, SPP 的平均浓度最高为 $8.167 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 水平方向上, 10 cm 土层和 50 cm 土层的抗生素整体浓度水平不高, 主要聚集在畜牧场的东南部, 在畜牧场的西南方向有小部分聚集。西南区域是成牛的主要活动区, 东南方向是小牛的主要活动区, 因此出现了 2 个较为明显的抗生素残留聚集区。从 SAs 浓度的分布情况可知, 粪便中 SAs 的检测浓度高于土壤中的浓度。这与沈群辉^[17]的研究结果相同, 无论是养牛场、养鸡场或是养猪场, 粪便中 SAs 的检测浓度均高于周边土壤中的浓度。

结果表明, 抗生素的残留是导致土壤中磺胺类 ARGs 产生的主要原因之一, 也是潜在 ARGs 的携带者。越来越多的研究表明, 过量使用含有抗生素的残留物会显著增加土壤中的 ARGs 含量。抗生素残留量与 ARGs 相对丰度呈显著相关性^[18-19]。不同的耐药菌影响了土壤中 ARGs 的分布和基因相对丰度, 从而形成了不同的土壤中抗生素及其 ARGs 的空间分布特征^[20-21]。土壤的性质和有机质浓度等环境因素也会影响 ARGs 的分布^[22-26]。因此, 对 SAs 及其 ARGs 在土壤中的危害问题仍有待进一步的实验研究, 为今后土壤环境污染修复提供参考。

综上所述, 本研究结果表明:

(1) 土壤中 13 种 SAs 在土壤和粪便样品中均有检出, 其垂直浓度的空间分布规律为粪便 > 10 cm 深度土壤 > 50 cm 深度土壤, 空间分布污染特征主要集中在畜牧场的东南部。

(2) 土壤中 3 种 ARGs 在 10 cm 和 50 cm 深度土层中均有检出, 其基因相对丰度分布情况为 10 cm 深度土壤 > 50 cm 深度土壤, 且 SAs 对 ARGs 的压力作用呈现相似性。

(3) 土壤中 SAs 及其 ARGs 的空间分布规律和

SAs 对 ARGs 压力作用的相似性分析,为深入研究畜牧场周边环境 ARGs 的传播规律提供基础数据。

参考文献 (References):

- [1] Luo Y, Mao D Q, Rysz M, et al. Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China [J]. Environmental Science & Technology, 2010, 44 (19): 7220-7225
- [2] 傅海霞, 刘怡, 董志英, 等. 抗生素与重金属复合污染的生态毒理效应研究进展[J]. 环境工程, 2016, 34(4): 60-63, 104
Fu H X, Liu Y, Dong Z Y, et al. Progress in research on ecological toxicity of combined pollution of antibiotics and heavy metals [J]. Environmental Engineering, 2016, 34(4): 60-63, 104 (in Chinese)
- [3] Pan X, Qiang Z M, Ben W W, et al. Residual veterinary antibiotics in swine manure from concentrated animal feeding operations in Shandong Province, China [J]. Chemosphere, 2011, 84(5): 695-700
- [4] Blaser M J. Antibiotic use and its consequences for the normal microbiome [J]. Science, 2016, 352(6285): 544-545
- [5] Aust M O, Godlinski F, Travis G R, et al. Distribution of sulfamethazine, chlortetracycline and tylosin in manure and soil of Canadian feedlots after subtherapeutic use in cattle [J]. Environmental Pollution, 2008, 156(3): 1243-1251
- [6] 陈昇, 董元华, 王辉, 等. 江苏省畜禽粪便中磺胺类药物残留特征[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(1): 385-389
Chen H, Dong Y H, Wang H, et al. Residual characteristics of sulfanilamide in animal feces in Jiangsu Province [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2008, 27(1): 385-389 (in Chinese)
- [7] 杨玖, 谷洁, 张友旺, 等. 磺胺甲噁唑对堆肥过程中酶活性及微生物群落功能多样性的影响[J]. 环境科学学报, 2014, 34(4): 965-972
Yang J, Gu J, Zhang Y W, et al. Effects of sulfamethoxazole on enzyme activity and microbial community functional diversity during pig manure composting [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2014, 34(4): 965-972 (in Chinese)
- [8] Vittoria Pinna M, Castaldi P, Deiana P, et al. Sorption behavior of sulfamethazine on unamended and manure-amended soils and short-term impact on soil microbial community [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2012, 84: 234-242
- [9] Pruden A, Pei R T, Storteboom H, et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in northern Colorado [J]. Environmental Science & Technology, 2006, 40(23): 7445-7450
- [10] 韩长赋. 加强东北黑土地保护 推进农业绿色发展[N]. 人民日报, 2018-02-05(7)
- [11] 车占杉, 武志敏. 杜尔伯特蒙古族自治县发展草地畜牧业存在的问题及对策[J]. 现代畜牧科技, 2016(7): 1-2
- [12] 陈敬晶. 杜尔伯特蒙古族自治县湿地保护对策分析[J]. 科学技术创新, 2018(8): 155-156
- [13] Zhang T, Li X Y, Wang M F, et al. Time-resolved spread of antibiotic resistance genes in highly polluted air [J]. Environment International, 2019, 127: 333-339
- [14] 张昊. 抗生素及其耐药性在畜禽粪便-土壤-蔬菜中的传播和转移[D]. 新乡: 河南师范大学, 2018: 17-52
Zhang H. Spread and transfer of antibiotics and antibiotic resistance in the livestock manure-soil-vegetable endophytic system [D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2018: 17-52 (in Chinese)
- [15] 寇宏, 吕世明, 谭艾娟, 等. 贵州省猪源大肠杆菌对磺胺类抗菌药物耐药性及耐药基因检测[J]. 中国兽医杂志, 2018, 54(9): 75-78
Kou H, Lv S M, Tan A J, et al. Detecting antibiotic resistance and resistance genes of sulfonamides in *Escherichia coli* isolated from swine farms in Guizhou Province [J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2018, 54(9): 75-78 (in Chinese)
- [16] Song H L, Li H, Zhang S, et al. Fate of sulfadiazine and its corresponding resistance genes in up-flow microbial fuel cell coupled constructed wetlands: Effects of circuit operation mode and hydraulic retention time [J]. Chemical Engineering Journal, 2018, 350: 920-929
- [17] 沈群辉. 养殖场及周边农田土壤抗生素抗性基因和重金属污染初步研究[D]. 上海: 东华大学, 2013: 12-21
Shen Q H. Preliminary studies on the pollution levels of antibiotic resistance genes and heavy metals in feedlots and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai, China [D]. Shanghai: Donghua University, 2013: 12-21 (in Chinese)
- [18] Heuer H, Solehati Q, Zimmerling U, et al. Accumulation of sulfonamide resistance genes in arable soils due to repeated application of manure containing sulfadiazine [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(7): 2527-2530
- [19] Tang X J, Lou C L, Wang S X, et al. Effects of long-term manure applications on the occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes (ARGs) in paddy soils: Evidence from four field experiments in south of China [J].

- Soil Biology and Biochemistry, 2015, 90: 179-187
- [20] Cerqueira F, Matamoros V, Bayona J, et al. Distribution of antibiotic resistance genes in soils and crops. A field study in legume plants (*Vicia faba* L.) grown under different watering regimes [J]. Environmental Research, 2019, 170: 16-25
- [21] Forsberg K J, Patel S, Gibson M K, et al. Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats [J]. Nature, 2014, 509(7502): 612-616
- [22] Hu H W, Wang J T, Li J, et al. Long-term nickel contamination increases the occurrence of antibiotic resistance genes in agricultural soils [J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(2): 790-800
- [23] Luo G, Li B, Li L G, et al. Antibiotic resistance genes and correlations with microbial community and metal resistance genes in full-scale biogas reactors as revealed by metagenomic analysis [J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(7): 4069-4080
- [24] Ma L P, Li A D, Yin X L, et al. The prevalence of integrons as the carrier of antibiotic resistance genes in natural and man-made environments [J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(10): 5721-5728
- [25] Sun M M, Ye M, Wu J, et al. Positive relationship detected between soil bioaccessible organic pollutants and antibiotic resistance genes at dairy farms in Nanjing, Eastern China [J]. Environmental Pollution, 2015, 206: 421-428
- [26] Chen B W, He R, Yuan K, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) enriching antibiotic resistance genes (ARGs) in the soils [J]. Environmental Pollution, 2017, 220(Pt B): 1005-1013 ◆