

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20221031002

王犇, 贾伟丽, 吴颖琳, 等. 低温热解对有机肥中抗生素及抗性基因的消减研究[J]. 生态毒理学报, 2023, 18(1): 88-100

Wang B, Wu W L, Wu Y L, et al. Reduction of antibiotics and resistance genes in organic fertilizers by low-temperature pyrolysis [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2023, 18(1): 88-100 (in Chinese)

低温热解对有机肥中抗生素及抗性基因的消减研究

王犇¹, 贾伟丽^{1,*}, 吴颖琳¹, 刘芳^{2,#}, 应光国¹

1. 华南师范大学环境学院, 广州 510006

2. 华南师范大学地理科学学院, 广州 510631

收稿日期: 2022-10-31 录用日期: 2022-12-22

摘要: 为研究低温热解作用下有机肥中抗生素和抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)的消减规律, 利用高分辨液相色谱-串联质谱技术和荧光定量 PCR(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, Real-time PCR)技术分别测定热解前后有机肥中抗生素和 ARGs 含量。结果发现, 80~250 °C 低温热解后抗生素总量降低, 去除率在 11.63%~47.32% 之间。热解温度与抗生素熔点对有机肥中抗生素去除影响显著: 热解温度越高, 对抗生素的去除效果越好; 抗生素熔点越低, 去除越彻底。80~250 °C 低温热解对 ARGs 丰度和水平转移有强烈抑制作用。温度升高, 对 ARGs 的去除效果不断增强, 去除率最高可达 99%; 可移动元件平均去除率高达 90%, 在 250 °C 下, 几乎被完全去除; 大肠杆菌指示基因 *uidA* 在各个温度下的平均去除率均达到 99% 以上。添加硅藻土和沸石与单一有机肥相比, 在 80~150 °C 对抗生素和 ARGs 的去除分别发挥促进和抑制作用; 在 250 °C 显著抑制了抗生素的去除。本研究揭示了不同热解温度对抗生素和 ARGs 的影响, 为有机肥中抗生素和 ARGs 的低温热解阻控技术提供理论依据。

关键词: 抗生素; 抗性基因; 有机肥; 低温热解; 消减

文章编号: 1673-5897(2023)1-088-13 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Reduction of Antibiotics and Resistance Genes in Organic Fertilizers by Low-temperature Pyrolysis

Wang Ben¹, Jia Weili^{1,*}, Wu Yinglin¹, Liu Fang^{2,#}, Ying Guangguo¹

1. School of Environment, South China Normal University, Guangzhou 510006, China

2. School of Geography, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

Received 31 October 2022 accepted 22 December 2022

Abstract: Low-temperature pyrolysis experiments were conducted to study the dynamics of antibiotics and antibiotic resistance genes (ARGs) in organic fertilizers. The concentrations of antibiotics and ARGs before and after pyrolysis were determined by ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry and quantitative PCR technology, respectively. The results showed that low-temperature pyrolysis under 80~250 °C decreased the levels of antibiotics from 11.63% to 47.32%. Pyrolysis temperature and antibiotic melting point played important roles in

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(42030703); 国家自然科学基金青年基金项目(42107022); 广东省自然科学基金资助项目(2019A1515110759)

第一作者: 王犇(1997—), 男, 硕士研究生, 研究方向为养殖粪污资源化与污染治理, E-mail: wangben@m.scnu.edu.cn

* 通信作者(Corresponding author), E-mail: weili.jia@m.scnu.edu.cn

共同通信作者(Co-corresponding author), E-mail: liufang77@m.scnu.edu.cn

the removal of antibiotics in organic fertilizers: the higher the pyrolysis temperature, the better the removal effect of antibiotics; the lower the melting point of the antibiotic, the more thoroughly it is removed. Meanwhile, low-temperature pyrolysis under 80 ~ 250 °C had strong inhibiting effects on abundance of ARGs and horizontal gene transfer. The removal efficiency of ARGs continuously increased up to 99% along with increasing temperature. The average removal rate of mobile genetic elements was 90%, and almost all of them were removed at 250°C. The average removal rates of *uidA* were all above 99% within the whole pyrolysis temperature range. In comparison with organic fertilizers, the addition of diatomite and zeolite promoted and inhibited the removal of antibiotics and ARGs, respectively, at 80 ~ 150°C, and significantly inhibited the removal of antibiotics at 250°C. The results from this study revealed the influence of pyrolysis temperature on the behavior and removal of antibiotics and ARGs, thus providing a theoretical basis for future application of low-temperature pyrolysis in reducing antibiotics and ARGs in organic fertilizers.

Keywords: antibiotics; antibiotic resistance genes; organic fertilizers; low-temperature pyrolysis; reduction

随着集约化养殖业的兴起与不断发展,抗生素被广泛用于预防、治疗动物疾病和促进动物生长^[1]。我国 2019 年抗生素使用量为 16.1 万 t,据估计养殖业的抗生素用量高达 7.4 万 t,约占总使用量的 46.0%^[2-3]。抗生素进入动物体内后不能被完全吸收代谢,大量未被代谢的抗生素随动物粪便排出体外,促进了抗生素在环境中的迁移扩散^[4]。Wang 等^[5]对我国不同地区猪粪中抗生素污染做了大量研究,结果发现猪粪中四环素含量最高可达 172.90 mg·kg⁻¹。抗生素的使用会对畜禽肠道微生物群落产生选择压力,提高粪便中细菌耐药性与抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)蓄积。与其他环境介质相比,畜禽粪便是 ARGs 的主要来源和储存库。Li 等^[6]考察了 10 种典型环境介质中的 ARGs 分布特征,结果显示畜禽粪便中 ARGs 含量高于其他环境介质(如土壤、河水、饮用水和沉积物等)1 ~ 3 个数量级。据统计,我国每年畜禽粪便排放量可达 20 亿 t,其中畜禽粪便中抗生素残留以及 ARGs 的产生、迁移和转化会对生态环境和人体健康构成潜在威胁^[7]。因此,寻求科学有效的畜禽粪便无害化处理和资源化利用技术对我国畜禽养殖业可持续发展具有重要意义。好氧堆肥作为目前国内外畜禽粪便资源化处理运用最广泛的处理方式之一,可以有效降低畜禽粪便中抗生素的浓度和 ARGs 的丰度,抗生素和 ARGs 的去除率分别能达到 47.3% ~ 98.8% 和 25.4% ~ 76.0%^[8-10]。但该技术仍存在抗生素与 ARGs 去除不完全,去除效果不稳定等缺点^[11]。例如,常规堆肥中最高温度在 70 °C 以下,部分 ARGs 和病原菌、极端嗜热菌等,在此温度下不能被有效去除,且会随着堆肥后期温度的下降而不断增

加^[12]。因此提高好氧堆肥产品的安全性,寻求有效的堆肥产品再加工技术,是当前一项重要的研究任务。

热解技术是粪便无害化的一种常用技术,是将生物物质在缺氧的条件下进行热处理^[13],可生成可燃气体、焦油和生物炭等^[14]。热解过程可以改变原料的某些特性,降低抗生素以及 ARGs 的环境风险^[15-16]。已有研究表明,高于 600 °C 的热解能够有效去除泰乐菌素、四环素、磺胺嘧啶、磺胺甲噁唑、金霉素、强力霉素和磺胺二嗪等多种典型抗生素^[15, 17]。迄今为止,热解去除有机肥中抗生素的温度主要在 300 ~ 700 °C 之间,达到炭化温度以上。有机肥炭化后不能保持原来的肥力甚至失去肥力,严重影响有机肥的品质。污泥中 3 种典型抗生素环丙沙星、土霉素和磺胺二甲嘧啶的初始分解温度均在 300 °C 以下^[18],故低温热解(300 °C 以下)不仅能在一定程度上去除抗生素、杀死病原微生物、破坏 ARGs 结构,且其对有机肥肥力破坏也相对较小。目前,关于低温热解对有机肥中抗生素及 ARGs 的去除研究鲜见报道。此外,硅藻土和沸石常被作为改良剂用于提高堆肥品质,其表面丰富的微孔结构可以为抗生素吸附、微生物附着提供位点,促进微生物和抗生素的接触进而加速抗生素降解^[19-20]。硅藻土和沸石还可以通过抑制可移动元件和降低 ARGs 潜在宿主丰度等途径有效抑制堆肥中 ARGs 传播^[21-22]。热解能进一步改善硅藻土和沸石的结构性能,提高对污染物的去除能力^[23-24],但在低温热解条件下这 2 种改良剂对有机肥中抗生素和 ARGs 的去除效果尚不明确。因此,本研究采用 80 ~ 250 °C 的热解温度,并添加硅藻土和沸石对堆肥产品进行改良,探究低温热解对

有机肥中抗生素和 ARGs 的影响,并结合有机肥热解能耗进行综合分析,以期为提高堆肥产品的环境安全性和实用性提供科学依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 供试材料和试剂

选取的有机肥采自广东省清远市某堆肥公司。该公司主要对畜禽养殖废物进行资源化综合利用。有机肥主要以农作物秸秆、畜禽粪便、污泥、沼液渣、食品业加工后的废料以及餐厨垃圾等为原料,其处理工艺流程主要包括有机废弃物的前处理(调节水分及碳氮比)、添加复合酶进行一次发酵、接种复合微生物进行二次发酵、后处理以及回流堆肥等。采集处理后的有机肥后进行冷冻干燥,研磨并过 100 目筛网备用,放于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。沸石粉末(粒径为 $22.5\text{ }\mu\text{m}$)和硅藻土粉末(粒径 $\leq 10\text{ }\mu\text{m}$)均购自上海阿拉丁试剂有限公司。

45 种抗生素混标溶液,包括:磺胺类 17 种、氟喹诺酮类 12 种、大环内酯类 6 种、四环素类 5 种和其他类 5 种,具体信息如表 1 所示^[25]。其中,泰乐菌素、红霉素和罗红霉素均购自 Sigma-Aldrich(美国),脱水红霉素为本实验室自制,其他抗生素标准品均购自 Dr. Ehrenstorfer GmbH(德国)。8 种抗生素内标:甲氯环素购自 Sigma-Aldrich(美国);磺胺二甲嘧啶- $^{13}\text{C}_6$ 购自 Cambridge Isotope Laboratories(美国);甲氧苄啶- D_3 、林可霉素- D_3 、红霉素- $^{13}\text{C}-\text{D}_3$ 、磺胺甲噁唑- D_4 、噻苯咪唑- D_4 和环丙沙星- D_8 均购自 Toronto Research Chemicals(加拿大)。

DNA 提取试剂盒(DNeasy PowerSoil Pro Kit, 美国)购自誉维生物科技有限公司,SYBR Green(TaKaRa, 日本)染料购自上海百赛生物技术有限公司,基因引物购自华大基因。

色谱纯乙腈和甲醇均购自德国 Merck 公司,分析纯乙腈和甲醇购自天津富宇精细化工有限公司,分析纯甲酸购于美国 Tedia 公司,分析纯乙酸铵购于美国 Sigma-Aldrich 公司。分析纯的乙二胺四乙酸四钠(EDTA-4Na)、柠檬酸和柠檬酸钠均购自上海阿拉丁试剂有限公司。超纯水自制,氮气(纯度 $\geq 99\%$)购自广州科气达公司。

1.2 低温热解实验

向 30 g 有机肥中分别添加质量比 1% 的沸石或硅藻土,混合均匀,同时设置无任何添加剂的有机肥对照组。参考葛丽炜等^[27]的方法,将不同处理组的

有机肥样品在坩埚中压实,包裹锡箔纸以隔绝氧气,放入马弗炉中加热。低温热解实验设计是基于单一控制变量的原则,兼顾去除有机肥中污染物和保持肥力的要求,结合堆肥过程的最高温度与热解过程的最低温度,低温热解温度设为 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$,设定温度下持续加热 0.5 h,待马弗炉冷却后取出样品。将热解后样品混合均匀,其中一部分放入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待抗生素分析,剩余部分放入 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待 ARGs 分析。各处理组均设置 4 个平行(表 2)。

1.3 样品前处理

1.3.1 抗生素提取

参考 Zhou 等^[25]的抗生素提取方法,称取 0.5 g 有机肥于 30 mL 洁净玻璃离心管中,加入 $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 内标 $100\text{ }\mu\text{L}$,置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱黑暗条件下过夜。分别向离心管中加入 10 mL 乙腈和 10 mL 柠檬酸盐缓冲液(34.74 g 柠檬酸和 10.2 g 的柠檬酸钠溶于 0.5 L 的超纯水中),涡旋混匀,超声处理 15 min,然后在 $3000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速下离心 10 min,将上清液转移至洁净的 200 mL 圆底烧瓶,重复此步骤 2 次。将收集有上清液的圆底烧瓶置于旋转蒸发仪,在 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下旋转蒸发至烧瓶中有有机溶剂挥发完全;然后向圆底烧瓶中加入超纯水至溶液体积约 200 mL,加入 0.2 g EDTA-4Na 用以螯合金属离子,均匀摇动瓶身使 EDTA-4Na 完全溶解。然后采用 SAX-HLB 串联柱(HLB 柱,500 mg,6 mL,上海安谱实验科技股份有限公司;SAX 柱,500 mg,6 mL,美国 Varian 公司)进行富集和净化,以 $5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度加载于已活化的串联柱上,加载完成后移去 SAX 柱,再用 10 mL 的超纯水洗去吸附在 HLB 柱上的杂质和 EDTA-4Na。将 HLB 小柱抽干,约 1 h 为宜。用 10 mL 甲醇洗脱目标抗生素,氮吹干后,用 1 mL 的色谱级甲醇溶解后过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 有机相滤膜,存于棕色小瓶并保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。抗生素提取同时设置空白与质控样品,提取过程同上。上机前,取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 样品,吹干后用混合溶液(V (含 0.2% 甲酸的甲醇): V (2 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵)=30:70)重新定容。

1.3.2 DNA 提取

称取 0.15 g 有机肥样品,按照 DNA 提取试剂盒的说明操作,提取并纯化有机肥总 DNA。样品总 DNA 用超微量紫外分光光度计(NanoDrop One[®], Thermo Scientific, 美国)检测, DNA 的浓度和纯度满足要求后,储存于 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱用于后续基因定量。

表 1 目标抗生素的基本信息^[26]
Table 1 Information of target antibiotics^[26]

种类 Types	化合物名称 Chemicals	缩写 Abbreviation	内标 Internal standard	CAS No. CAS number
磺胺类 Sulfonamides	磺胺醋酰 Sulfacetamide	SCT	磺胺二甲嘧啶- ¹³ C ₆ Sulfamethazine- ¹³ C ₆	144-80-9
	磺胺氯吡嗪 Sulfachlorpyridazine	SCP	磺胺甲噁唑-D ₄ Sulfamethoxazole-D ₄	80-32-0
	磺胺嘧啶 Sulfadiazine	SDZ	磺胺二甲嘧啶- ¹³ C ₆ Sulfamethazine- ¹³ C ₆	68-35-9
	磺胺多辛 Sulfadoxine	SDO	磺胺甲噁唑-D ₄ Sulfamethoxazole-D ₄	2447-57-6
	磺胺二甲氧吡嗪 Sulfadimethoxine	SDM	磺胺甲噁唑-D ₄ Sulfamethoxazole-D ₄	122-11-2
	磺胺胍 Sulfaguandine	SG	磺胺二甲嘧啶- ¹³ C ₆ Sulfamethazine- ¹³ C ₆	57-67-0
	磺胺二甲嘧啶 Sulfamethazine	SMZ	磺胺二甲嘧啶- ¹³ C ₆ Sulfamethazine- ¹³ C ₆	57-68-1
	磺胺甲噁唑 Sulfamethoxazole	SMX	磺胺甲噁唑-D ₄ Sulfamethoxazole-D ₄	723-46-6
	磺胺对甲氧嘧啶 Sulfamerter	SM	磺胺二甲嘧啶- ¹³ C ₆ Sulfamethazine- ¹³ C ₆	651-06-9
	磺胺间甲氧嘧啶 Sulfamonomethoxine	SMM	磺胺甲噁唑-D ₄ Sulfamethoxazole-D ₄	1220-83-3
	磺胺甲基嘧啶 Sulfamerazine	SMR	磺胺甲噁唑-D ₄ Sulfamethoxazole-D ₄	127-79-7
	磺胺吡啶 Sulfapyridine	SPD	磺胺二甲嘧啶- ¹³ C ₆ Sulfamethazine- ¹³ C ₆	144-83-2
	磺胺喹喔啉 Sulfaquinoxaline	SQX	磺胺甲噁唑-D ₄ Sulfamethoxazole-D ₄	59-40-5
磺胺二甲异噁唑 Sulfisoxazole	SX	磺胺甲噁唑-D ₄ Sulfamethoxazole-D ₄	127-69-5	
磺胺噻唑 Sulfathiazole	STZ	磺胺二甲嘧啶- ¹³ C ₆ Sulfamethazine- ¹³ C ₆	72-14-0	
磺胺类增效剂 Sulfonamide synergist	奥美普林 Ormetoprim	OMP	甲氧苄啶-D ₃ Trimethoprim-D ₃	6981-18-6
	甲氧苄啶 Trimethoprim	TMP	甲氧苄啶-D ₃ Trimethoprim-D ₃	738-70-5
氟喹诺酮类 Fluoroquinolones	环丙沙星 Ciprofloxacin	CFX	环丙沙星-D ₈ Ciprofloxacin-D ₈	85721-33-1
	达诺沙星 Danofloxacin	DAN	环丙沙星-D ₈ Ciprofloxacin-D ₈	112398-08-0
	二氟沙星 Difloxacin	DIF	环丙沙星-D ₈ Ciprofloxacin-D ₈	98106-17-3
	恩诺氟沙星 Enrofloxacin	EFX	环丙沙星-D ₈ Ciprofloxacin-D ₈	93106-60-6
	氟罗沙星 Fleroxacin	FL	环丙沙星-D ₈ Ciprofloxacin-D ₈	79660-72-3
	罗美沙星 Lomefloxacin	LFX	环丙沙星-D ₈ Ciprofloxacin-D ₈	98079-51-7
	马波沙星 Marbofloxacin	MAR	环丙沙星-D ₈ Ciprofloxacin-D ₈	115550-35-1
	诺氟沙星 Norfloxacin	NFX	环丙沙星-D ₈ Ciprofloxacin-D ₈	70458-96-7
	氧氟沙星 Ofloxacin	OFX	环丙沙星-D ₈ Ciprofloxacin-D ₈	82419-36-1
	培氟沙星 Pefloxacin	PEF	环丙沙星-D ₈ Ciprofloxacin-D ₈	70458-92-3
	沙拉沙星 Sarafloxacin	SAR	环丙沙星-D ₈ Ciprofloxacin-D ₈	98105-99-8
	卡巴多 Carbadox	CAR	噻苯咪唑-D ₄ Thiabendazole-D ₄	6804-07-5
大环内酯类 Macrolides	克拉霉素 Clarithromycin	CTM	红霉素- ¹³ C-D ₃ Erythromycin- ¹³ C-D ₃	81103-11-9
	脱水红霉素 Erythromycin-H ₂ O	ETM-H ₂ O	红霉素- ¹³ C-D ₃ Erythromycin- ¹³ C-D ₃	23893-13-2
	北里霉素 Leucomycin	LCM	红霉素- ¹³ C-D ₃ Erythromycin- ¹³ C-D ₃	1392-21-8
	竹桃霉素 Oleandomycin	ODM	红霉素- ¹³ C-D ₃ Erythromycin- ¹³ C-D ₃	3922-90-5
	罗红霉素 Roxithromycin	RTM	红霉素- ¹³ C-D ₃ Erythromycin- ¹³ C-D ₃	80214-83-1
	泰乐菌素 Tylosin	TYL	红霉素- ¹³ C-D ₃ Erythromycin- ¹³ C-D ₃	1401-69-0
四环素类 Tetracyclines	氯四环素 Chlortetracycline	CTC	美洛环素 Meclocycline	57-62-5
	强力霉素 Doxycycline	DC	美洛环素 Meclocycline	564-25-0
	甲烯土霉素 Methacycline	MT	美洛环素 Meclocycline	914-00-1
	氧四环素 Oxytetracycline	OTC	噻苯咪唑-D ₄ Thiabendazole-D ₄	79-57-2
	四环素 Tetracycline	TC	噻苯咪唑-D ₄ Thiabendazole-D ₄	60-54-8
其他类 Other classes	莫能菌素 Monensin	MON	噻苯咪唑-D ₄ Thiabendazole-D ₄	55134-13-9
	新生霉素 Novobiocin	NOV	噻苯咪唑-D ₄ Thiabendazole-D ₄	303-81-1
	甲基盐霉素 Narasin	NAR	噻苯咪唑-D ₄ Thiabendazole-D ₄	55134-13-9
	林可霉素 Lincomycin	LIN	林可霉素-D ₃ Lincomycin-D ₃	154-21-2
	沙利霉素 Salinomycin	SAL	噻苯咪唑-D ₄ Thiabendazole-D ₄	55721-31-8

表2 低温热解实验设置

Table 2 Experiment design of low-temperature pyrolysis

组别 Groups	编号 Number	添加剂 Additive	热解温度/°C Pyrolysis temperature/°C
对照组 Control group	Control	-	-
80 °C 处理组 80 °C treatment group	80-OF	-	80
	80-DIA	1% 硅藻土 1% diatomite	
	80-ZEO	1% 沸石 1% zeolite	
150 °C 处理组 150 °C treatment group	150-OF	-	150
	150-DIA	1% 硅藻土 1% diatomite	
	150-ZEO	1% 沸石 1% zeolite	
250 °C 处理组 250 °C treatment group	250-OF	-	250
	250-DIA	1% 硅藻土 1% diatomite	
	250-ZEO	1% 沸石 1% zeolite	

1.4 仪器分析

1.4.1 高分辨液相色谱-串联质谱分析抗生素

利用 Agilent 1200 series 高分辨液相色谱-串联质谱仪(HPLC-MS/MS)对有机肥中抗生素进行分析^[24]。色谱条件:色谱柱为 Agilent Eclipse Plus-C18 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm),在色谱柱的上游端安置在线过滤器,目的是去除样品及流动相中的细小颗粒;柱温设置为 40 °C,进样量设置为 5 μL;流动相为缓冲盐溶液(含 0.2% 甲酸和 2 mmol·L⁻¹ 乙酸铵)(A 相)和乙腈(B 相),流动相的流速设为 0.3 mL·min⁻¹;梯度洗脱参数设置:0 min 90% A,5 min 85% A,7 min 80% A,11 min 60% A,15 min 40% A,16 min 5% A,25 min 5% A。质谱条件:质谱参数由软件 Optimizer(安捷伦公司)进行优化。所有抗生素均用正离子模式(ESI+)采集数据,多重反应模式(MRM)检测。

1.4.2 质量保证和质量控制

实验中所使用的玻璃器皿均洗净。清洗流程如下:使用碱液浸泡 24 h 后,用自来水清洗干净,然后用去离子水润洗 3 次,放置于 70 °C 烘箱烘干,最后在马弗炉中以 450 °C 煅烧 4 h。为防止抗生素光解,实验过程均在相对黑暗环境下进行,避免强光照。

样品处理的同时还需设置空白和质量控制样品。实验空白样品只添加内标,与有机肥样品按照相同的步骤提取分析,用来矫正试剂及人为因素造成的误差。质量控制样品中添加干净基质(本实验基质为采取的山地土)和标准品(2 mg·L⁻¹ 的混标),与有机肥样品按照相同的步骤提取分析,用来分析

目标化合物提取过程的重现性和稳定性。本实验目标化合物回收率范围均在 60% ~ 120%;精密度(RSD)的范围为 0.15% ~ 12.14%, <20%;线性拟合的 R^2 的范围为 0.990 ~ 0.999,均在 0.990 以上,说明样品处理与上机符合数据分析要求。

1.4.3 荧光定量 PCR 分析

对 DNA 样品中的基因进行绝对定量。采用笔者课题组建立的 ARGs 荧光定量方法^[28]。使用 SYBR Green 染料,在实时荧光定量 PCR 仪(ABI QuantStudio™ 7 Flex System)上定量分析目标基因。本文选择的目标基因包括细菌总量的 16S rRNA 基因;移动元件(*int1*、*int2*、*Tn916*);19 种常见的抗生素 ARGs,分别为磺胺类 ARGs(*sul1*、*sul2*)、喹诺酮类 ARGs(*qnrD*、*qnrS*)、大环内酯类 ARGs(*ermA*、*ereA*)、四环素类 ARGs(*tetC*、*tetD*、*tetG*、*tetH*、*tetO*、*tetW*、*tetB/P*)、氯霉素类 ARGs(*cmlA*、*cfr*、*floR*、*fexA*)、氨基糖苷类 ARGs(*aadA*)、β-内酰胺酶类 ARGs(*blaTEM*)、大肠杆菌指示基因(*uidA*)。本实验定量 PCR 的反应体系为 20 μL,其组成成分如下^[9]:10 μL SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) (2×)、0.4 μL ROX Reference Dye II (50×)、0.4 μL 上游引物(10 μmol·L⁻¹)、0.4 μL 下游引物(10 μmol·L⁻¹)、2 μL DNA 和 6.8 μL 无菌超纯水。每个基因都同时设置了阳性对照(含有相应目的基因的 DNA 溶液)和阴性对照(无菌超纯水)。等待仪器程序运行完成后,检查扩增曲线的反应效率,熔解曲线理论上应与标准曲线一致。然后根据荧光强度反映出的 CT 值,利用标准曲线计算出样品里面目标基因的含量

(copies· μL^{-1} DNA),将基因丰度单位换算成 copies· g^{-1} 。本文用于荧光定量 PCR 的引物、扩增片段大小和退火温度等信息参考前人的方法^[29-32]。

1.5 数据分析

用 Microsoft Excel 2016 对数据进行方差以及去除率等常规计算;采用 Origin 2018 进行数据统计与可视化;采用 SPSS Statistics 19.0 单因素方差分析(one way ANOVA)进行 LSD 检验,以 $P<0.05$ 作为有显著性差异,比较不同处理组之间的显著差异。

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 抗生素含量变化

在 45 种目标抗生素中,有机肥样品中共检测到

8 种抗生素,主要包括磺胺类抗生素 1 种:磺胺间甲氧嘧啶(sulfamonomethoxine, SMM);大环内酯类的抗生素 1 种:脱水红霉素(erythromycin- H_2O , ETM- H_2O);喹诺酮类抗生素 4 种,包括恩诺氟沙星(enrofloxacin, EFX)、氧氟沙星(ofloxacin, OFX)、环丙沙星(ciprofloxacin, CFX)和培氟沙星(pefloxacin, PEF);林可霉素类抗生素 1 种:林可霉素(lincomycin, LIN);其他类抗生素 1 种:莫能菌素(monensin, MON) (图 1)。有机肥中抗生素组成以脱水红霉素、磺胺间甲氧嘧啶和恩诺氟沙星为主,分别占抗生素总含量的 32.75%、9.05% 和 38.24%,总占比达 80.04%;经过有机肥进行的热解处理,抗生素残留量显著降低,去除率在 11.63% ~47.32% 之间。

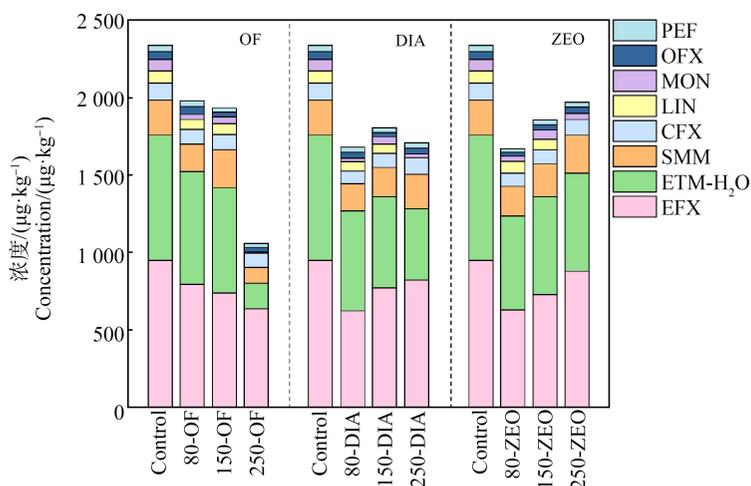


图 1 低温热解后抗生素浓度

Fig. 1 Antibiotics content in organic fertilizer under low-temperature pyrolysis treatment

对有机肥中主要抗生素脱水红霉素、磺胺间甲氧嘧啶和恩诺氟沙星的去除率进行分析发现(表 3),不同处理组中脱水红霉素,除 80-OF 组外,所有处理组均对脱水红霉素有显著的去除效果($P<0.01$),去除率在 15.80% ~79.40% 之间;对于不同处理组中恩诺氟沙星,大部分处理组对恩诺氟沙星去除效果显著,其中 80-DIA、80-ZEO、150-ZEO 和 250-OF 处理组对恩诺氟沙星有显著的去除效果($P<0.01$),去除率在 7.20% ~34.37% 之间。对于不同处理组中磺胺间甲氧嘧啶,仅有 250-OF 处理组对磺胺间甲氧嘧啶有显著的去除效果($P<0.05$),去除率 54.85%,其他热解处理均对磺胺间甲氧嘧啶含量没有显著影响。另外对有机肥中微量抗生素的去除率进行分析(表 3),发现不同的热解温度,80 °C 热解条件下莫能菌素的去除率最好,平均去除率为 58.52%,其次较

好的是环丙沙星,平均去除率为 22.75%;150 °C 热解条件下氧氟沙星的去除率最好,平均去除率为 38.37%,其次较好的是莫能菌素,平均去除率为 32.60%;250 °C 热解条件下林可霉素的去除率最好,平均去除率为 100%,其次是较好的是莫能菌素,平均去除率为 67.76%。对不同的添加剂,无添加剂组、添加沸石组以及添加硅藻土组均是莫能菌素的去除率最好,对应平均去除率分别是 60.53%、41.24% 和 57.11%;其次均是林可霉素,对应平均去除率分别是 42.39%、37.37% 和 48.19%。

总体上,温度越高对有机肥中抗生素的去除效果越好,250 °C 对抗生素的去除率最高,这主要是因为热解温度越高,对抗生素的分解越彻底^[18]。田仁强等^[15]通过热解技术发现鸡粪与农林废弃物中的 4 种典型抗生素在 400 °C 以上高温下的去除率能达到

表 3 抗生素去除率
Table 3 Removal rates of antibiotics

(%)

处理组编号 Group number	主要抗生素 Main antibiotics			微量抗生素 Trace antibiotics				
	EFX	SMM	ETM-H ₂ O	LIN	OFX	PEF	CFX	MON
80-OF	16.22	19.98	10.41	19.19	-0.09	4.41	15.96	52.08*
80-DIA	34.37**	22.52	20.04**	23.40	22.63	19.08	28.67*	66.67*
80-ZEO	33.72**	14.66	25.12**	1.36	46.13**	47.27**	23.61*	56.81*
150-OF	22.29*	-8.36	15.80**	7.00	42.78**	32.89*	13.53	38.66*
150-DIA	18.69*	15.96	27.34**	21.18	42.73**	31.34*	18.50*	37.08*
150-ZEO	23.25**	5.45	22.02**	10.74	29.61*	23.04	19.59*	22.05
250-OF	33.03**	54.85*	79.40**	100.00**	37.64**	42.37**	17.59*	90.84**
250-DIA	13.26	-0.49	43.33**	100.00**	19.52	17.83	7.92	67.58*
250-ZEO	7.20	-10.13	22.08**	100.00**	15.87	28.23	10.81	44.85

注:负数表示与对照组有机肥相比,抗生素含量增加;*表示与对照组有机肥相比,抗生素含量在 $P<0.05$ 水平上有显著差异;**表示与对照组有机肥相比,抗生素含量在 $P<0.01$ 水平上有显著差异。

Note: Negative data indicate an increase in antibiotic content compared to organic fertilizer in the control group; * indicates that there was a significant difference in antibiotic content at the $P<0.05$ level compared with the organic fertilizer in the control group; ** indicates that there was a significant difference in antibiotic content at the $P<0.01$ level compared with the control group organic fertilizer.

90%以上,且在 600 °C 的去除率能达到 100%; Li 等^[33]通过共热解工艺发现猪粪中的四环素及磺胺类等 6 种抗生素在 600 °C 的高温下能够被完全去除。喹诺酮类物质主要含有苯环、喹啉环、哌嗪环、吡啶酸、环外羟基、乙基、环丙基、甲氧基和氮双环等结构^[34]。因此我们推测堆肥中的喹诺酮类抗生素在 80 ~ 150 °C 主要通过吸热脱去结晶水和 C—N 键断裂来降低抗生素含量;热解温度进一步升高,达到 250 °C 时,与许多喹诺酮类抗生素熔点接近^[34],主要通过 C—N 键与羧基断裂、侧链哌嗪环破裂进一步发生离解,进而有效降低抗生素含量^[18, 34]。磺胺类抗生素热解失重主要发生在 250 °C 以上^[18, 35],这在一定程度上解释了为什么仅在 250 °C 对磺胺间甲氧嘧啶有显著去除效果。堆肥中磺胺间甲氧嘧啶可能首先发生 S—N 断裂,接着磺胺结构与取代基中的甲氧基、—NH₂ 基团等进一步发生分解、取代与加成反应,实现小分子脱落与碳环缩聚的过程。大环内酯类抗生素物质主要含有内酯环、吡喃、环外羟基以及氨基等结构^[36],热解失重发生在 120 °C 以上^[37]。因此推测堆肥中的大环内酯类抗生素在 80 ~ 120 °C 主要通过吸热脱去结晶水和 C—N 键断裂来降低抗生素含量;当热解温度接近或超过大环内酯类抗生素熔点,主要通过 C—O 键断裂、吡喃环以及内酯环开环进一步分解,进而降低了抗生素的含量。总体

而言,热解温度与抗生素熔点对堆肥中抗生素分解发挥重要作用,脱水红霉素、林可霉素和莫能菌素这 3 种抗生素的熔点均在 100 ~ 150 °C 之间,更易分解,因此与其他抗生素相比,脱水红霉素、林可霉素和莫能菌素的去除效果最好。此外,堆肥中存在栖热菌属(*Thermus*)、扁平丝菌属(*Planifilum*)等嗜热菌,80 °C 加热条件会促进这些嗜热菌的生长增殖,有效分解堆肥中抗生素^[38]。同一热解温度下,与单一有机肥组相比,添加硅藻土和沸石粉末在 80 °C 和 150 °C 条件下对抗生素的去除有促进作用,可能原因是,沸石和硅藻土丰富的微孔结构能为部分嗜热菌提供更多的繁殖场所,从而有效转化抗生素。但在 250 °C 时,沸石和硅藻土对抗生素的去除有抑制作用,特别是抑制了脱水红霉素的去除。可能是因为在此温度下几乎全部微生物被杀死失活,微生物分解抗生素作用消失;同时硅藻土、沸石的表面性质发生改变,孔穴和通道中的水分和杂质大量挥发,孔径增大,吸附能力增强^[20-21]。因此通过表面作用或增加的微孔结构固定有机肥中抗生素,进而改变抗生素形态或熔点,削弱热解对抗生素的去除效果。

2.2 16S rRNA 基因、ARGs 及可移动元件丰度变化

根据荧光定量 PCR 结果,在有机肥中共检测出目标基因 22 种,包括表征细菌总量的基因(16S rRNA)、移动元件(*int1*、*int2*、*Tn916*)、磺胺类 ARGs

(*sul1*、*sul2*)、喹诺酮类 ARGs (*qnrD*)、大环内酯类 ARGs (*ereA*)、四环素类 ARGs (*tetC*、*tetD*、*tetG*、*tetH*、*tetO*、*tetW*、*tetB/P*)、氯霉素类 ARGs (*cmlA*、*cfr*、*floR*、*fexA*)、氨基糖苷类 ARGs (*aadA*)、 β -内酰胺酶类 ARGs (*blaTEM*)、大肠杆菌指示基因 (*uidA*)。

ARGs 和大肠杆菌指示基因丰度变化如图 2 所示,有机肥中 *sul1* 占比最高,范围为 $2.20 \times 10^6 \sim 9.31 \times 10^9$ copies \cdot g $^{-1}$,优势 ARGs 主要是 *sul1*、*sul2*、*cmlA*、

fexA 和 *aadA*。对单一有机肥进行热解处理,随加热温度的升高,对 ARGs 的去除效果不断增强。在 250 $^{\circ}$ C 处理下,有机肥中 ARGs 去除率最高达到 99%,平均去除率均高达 90%;*uidA* 的去除效果最为显著,在各个温度处理下的平均去除率均达 99% 以上,说明 80~250 $^{\circ}$ C 低温热解能有效降低堆肥中大肠杆菌丰度,而且随着热解温度的升高,*uidA* 的去除效果越显著。

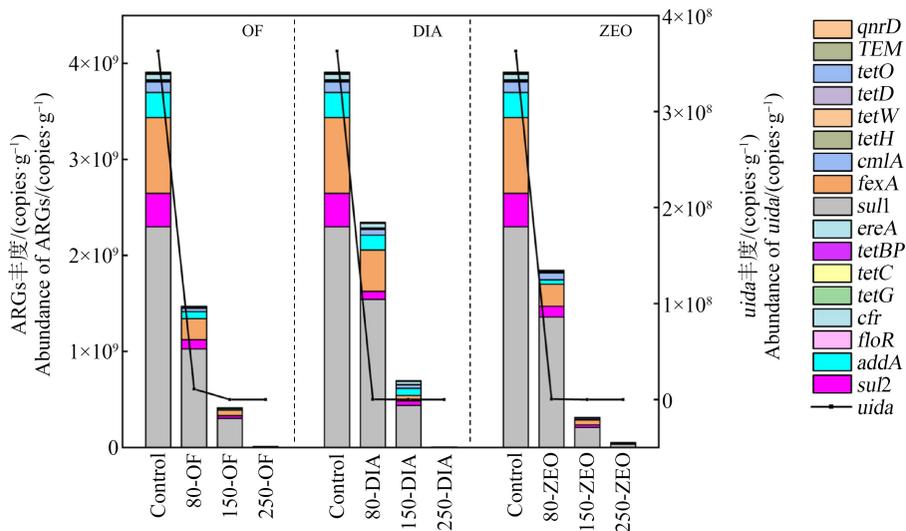


图 2 不同处理组有机肥中抗性基因 (ARGs) 和大肠杆菌指示基因的绝对丰度变化

Fig. 2 Absolute abundance of antibiotic resistance genes (ARGs) and *uidA* in organic fertilizer under different treatments

对 16S rRNA 的丰度变化进行分析(图 3(a)),与原始有机肥相比,随热解温度升高,16S rRNA 显著降低,说明细菌总量随热解温度升高不断降低,特别是 250 $^{\circ}$ C 处理下,16S rRNA 丰度仅为原始有机肥的 0.97%~2.14%。ARGs 与 16S rRNA 丰度比值代表 ARGs 的相对丰度,可以反映不同热解温度下单个细菌中 ARGs 的变化规律。由图 3(b)可知,与原始有机肥相比,随热解温度升高,有机肥中 ARGs 的相对丰度不断降低。其中,150~250 $^{\circ}$ C 处理下 ARGs 的相对丰度显著下降,对细菌抗性的消减效果最为显著。通过不同处理组中可移动元件的丰度变化可以看出(图 3(c)),随热解温度升高,可移动元件(*int1*、*int2* 和 *Tn916*)的含量均显著降低。在 250 $^{\circ}$ C 处理下,可移动元件几乎都被去除,平均去除率均高达 90%。由此可以看出低温热解对 ARGs 水平转移有强烈抑制作用。添加沸石和硅藻土后,在 80 $^{\circ}$ C 和 150 $^{\circ}$ C 条件下,与同一温度的单一有机肥相比,去除 ARGs 的效果有所下降:80 $^{\circ}$ C 时,硅藻土和沸石添加组中

ARGs 的绝对丰度有所提高;150 $^{\circ}$ C 时,添加硅藻土处理组中 ARGs 的相对丰度显著高于单一有机肥组。

以上表明,热解温度对 ARGs 的去除有显著影响,温度越高去除效果越好。李哲^[16]通过热碱解技术处理污泥发现四环素 ARGs 的去除率能达到 95% 以上;余震和周顺桂^[12]利用超高温堆肥技术(80~100 $^{\circ}$ C)对抗生素 ARGs 进行消减,相比普通堆肥去除率显著提升 89%;Kimbell 等^[39]通过热解技术处理城市固体污染物发现,四环素和磺胺类 ARGs 以及细菌 16S 和可移动元件 *int1* 在 300~700 $^{\circ}$ C 显著减少,去除率高达 99% 以上。高温会破坏有机肥中细菌细胞壁,造成细胞结构破坏,释放细胞内 DNA 物质,并破坏 DNA 的双螺旋结构^[15,40]。因此高温能够显著降低包括细菌(芽孢杆菌属(*Bacillus*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)、肠球菌属(*Enterococcus*)和古菌(甲烷短杆菌属(*Methanobrevibacter*))在内的各种 ARGs 潜在宿主以及抗性质粒丰度^[38]。同时可移动元件的减少在一定

程度上反映了 ARGs 的水平转移受到限制,也是低温热解过程中 ARGs 丰度降低的潜在原因。添加硅藻土和沸石后,其丰富的微孔结构为更多微生物提供了适宜的繁殖场所。加热过程中,有机肥中的嗜热菌更有可能存活下来。嗜热菌栖热菌属以及扁平

丝菌属中通常携带包括磺胺类 ARGs 在内的大量 ARGs^[41-42]。因此推测在 80 °C 和 150 °C 条件下,硅藻土和沸石可能促进了某些携带有 ARGs 的嗜热菌的繁殖,因此与相同温度下单一有机肥相比增加了有机肥中 ARGs 丰度。

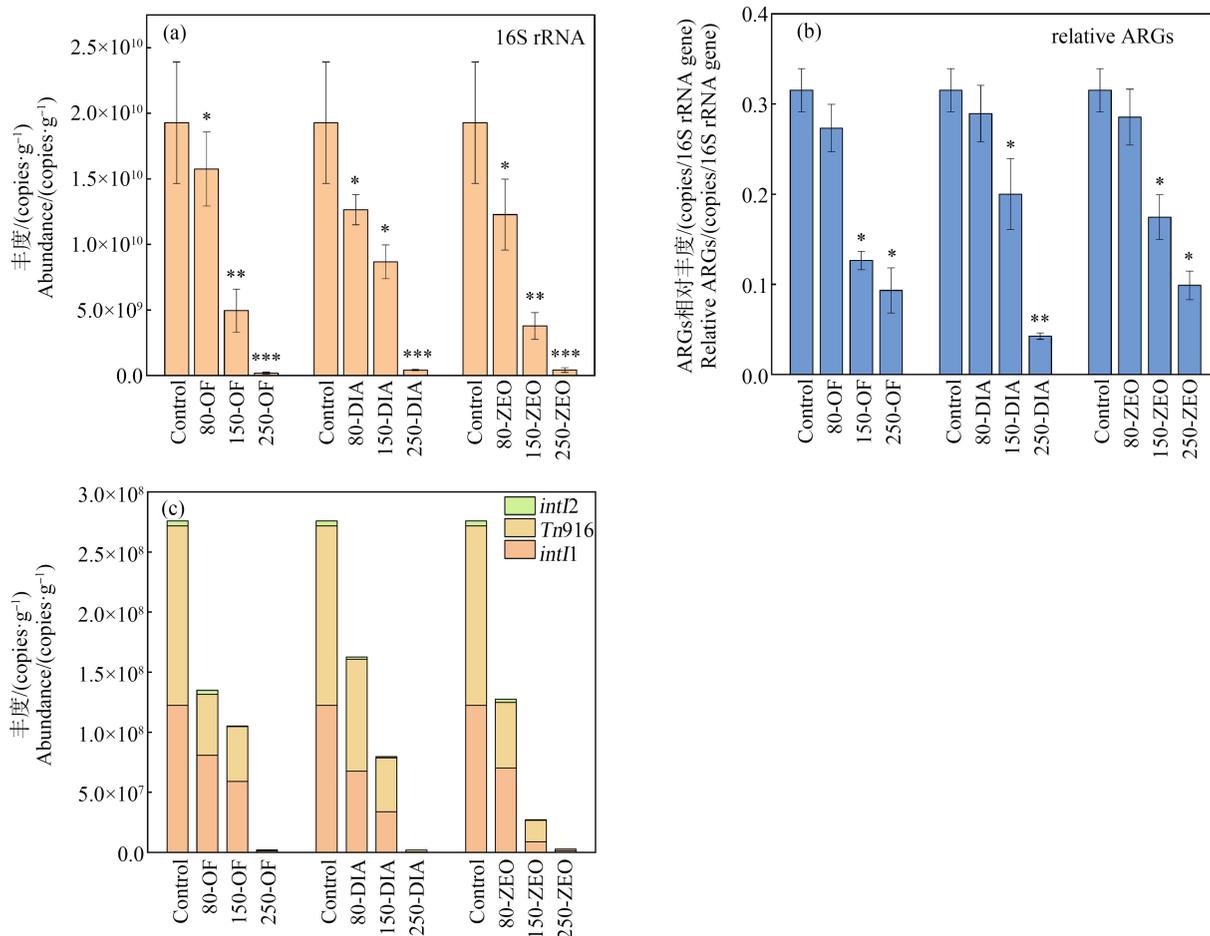


图3 不同处理组有机肥中 16S rRNA 绝对丰度 (a)、ARGs 相对丰度 (b) 以及可移动元件绝对丰度 (c)

注: * 表示与对照组有机肥相比,16S rRNA 绝对丰度、ARGs 相对丰度在 $P<0.05$ 水平上有显著差异;

** 表示与对照组有机肥相比,16S rRNA 绝对丰度、ARGs 相对丰度在 $P<0.01$ 水平上有显著差异;

*** 表示与对照组有机肥相比,16S rRNA 绝对丰度、ARGs 相对丰度在 $P<0.001$ 水平上有显著差异。

Fig. 3 Absolute abundance of 16S rRNA (a), relative abundance of ARGs (b) and absolute abundance of mobile gene elements (c) in organic fertilizer under different treatments

Note: * indicates that there was a significant difference in absolute abundance of 16S rRNA , relative abundance of ARGs at the $P<0.05$ level compared with the organic fertilizer of the control group; ** indicates that there was a significant difference in absolute abundance of 16S rRNA , relative abundance of ARGs at the $P<0.01$ level compared with the organic fertilizer of the control group; *** indicates that there was a significant difference in absolute abundance of 16S rRNA , relative abundance of ARGs at the $P<0.001$ level compared with the organic fertilizer of the control group.

2.3 低温热解能耗分析

使用马弗炉对有机肥进行低温热解,需要考虑热解过程中的能耗成本。温度越高,对有机肥中抗生素和 ARGs 的去除效果越好,但马弗炉用电量增加,经济成本也增加。因此,通过计算低温热解有机

肥的能耗,可以从经济角度对有机肥产品的实用性进行评估。参考武晓春^[43]的电阻炉功率计算方法,采用经验和估算方式计算马弗炉功率。计算升温时段和保温时段的功率,保温功率采用升温功率的 50% 计算^[44]。查阅相关文献^[43, 45],最终选用式(1)来

确定马弗炉的升温功率。

$$P = C \times \tau^{-0.5} \times F^{0.9} \times t^{1.55} \quad (1)$$

式中: P 为升温功率(kW); C 为散热系数, 散热量大的马弗炉取 30 ~ 35, 散热量小的马弗炉取 20 ~ 25, 本文 C 取 22^[43]; τ 为马弗炉升温到工作温度的时间(h)(实验为程序升温, $\tau=0.5$ h); F 为炉膛内壁的有效面积, 包括炉底、侧墙和炉顶所有面积之和(m^2) (内壁尺寸为 500 mm×300 mm×200 mm); t 为马弗炉的工作温度(k℃)。热解过程中马弗炉耗能是升温阶段和保温阶段的耗电量之和, 耗电量公式如式(2):

$$W = P_{\text{升}} t_{\text{升}} + P_{\text{保}} t_{\text{保}} \quad (2)$$

式中: $P_{\text{升}}$ 为升温功率(kW); $t_{\text{升}}$ 为升温时间(h); $P_{\text{保}}$ 为保温功率(kW); $t_{\text{保}}$ 为保温时间(h)。

结合式(1)和式(2)最终算出 80 ℃ 热解处理组的马弗炉耗电量为 0.30 kW·h, 150 ℃ 热解处理组的耗电量为 0.80 kW·h, 250 ℃ 热解处理组的耗电量为 1.77 kW·h。因此 250 ℃ 热解过程的耗能分别是 80 ℃ 和 150 ℃ 的 2.7 倍和 5.9 倍。从经济成本角度出发, 80 ℃ 和 150 ℃ 热解有机肥产品更具有竞争优势。

2.4 抗生素、ARGs 风险与能耗综合分析

低温热解能有效降低有机肥中抗生素和 ARGs 丰度, 提高有机肥产品的环境安全性, 但有机肥产品的大面积推广需要考虑其经济成本。因此, 从降低抗生素、ARGs 风险以及节约成本的角度出发, 对低温热解有机肥进行综合评价, 评价指标分别是抗生素残留、ARGs 残留以及能耗(energy)。对所有处理组有机肥按照热解温度进行分类(图 4), 比较 80 ℃、150 ℃ 和 250 ℃ 热解条件下的性能差异。各指标的坐标刻度按其大小分别赋予其级别强度 (I、II、III、IV 和 V), 根据指标封闭区域所围成的面积可以衡量样品的综合性能^[46]。评价级别 I、II、III、IV 和 V 代表指标性能从高到低。设定抗生素、ARGs 的残留量越低、能耗越少, 对应指标级别越高, 封闭区域面积越小, 表示其综合性能越好。如图 4 所示, 在 250 ℃ 时各个指标所围成的封闭区域面积最小, 综合性能最好, 是消减抗生素和 ARGs 的最佳条件, 特别是对 ARGs 的去除效果尤为显著, 不足之处是能耗成本最高。150 ℃ 低温热解的综合性能次之, 耗电成本大幅下降, 对 ARGs 的去除效果较好, 对抗生素的去除效果较差。80 ℃ 低温热解有机肥对 ARGs 的去除效果较差, 但对抗生素的去除效果较好, 同时能耗成本最低。因此, 250 ℃ 低温热解是提高有机肥环境安全性的最有效手段, 对抗生素和 ARGs 的平

均去除率分别为 32.47% 和 99.42%, 但成本最高, 适用于深度去除有机肥中的抗生素和 ARGs 残留; 80 ℃ 和 150 ℃ 热解有机肥所需要的经济成本分别为 250 ℃ 的 16.9% 和 45.2%, 对抗生素的平均去除率分别为 23.98% 和 20.25%, 对 ARGs 的平均去除率分别为 51.73% 和 87.88%, 适用于处理 ARGs 残留较高的大批量有机肥。

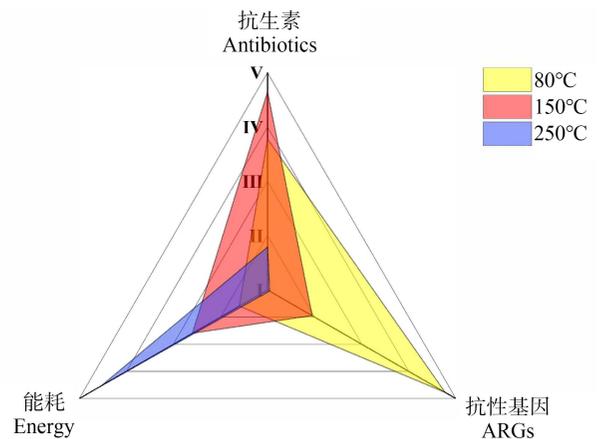


图 4 不同温度下有机肥的综合性能比较

Fig. 4 Comparison of the comprehensive properties of organic fertilizers at different temperatures

本研究结果表明, 对有机肥进行低温热解可以有效降低抗生素含量和 ARGs 丰度。热解温度和抗生素熔点对有机肥中抗生素的去除影响显著, 热解温度越高、抗生素熔点越低, 去除效果越好。脱水红霉素、林可霉素和莫能菌素的熔点较低, 在 100 ~ 150 ℃ 之间, 去除率最高。硅藻土与沸石在 80 ~ 150 ℃ 时对抗生素的去除有促进作用, 但在 250 ℃ 对抗生素去除有抑制作用, 可能与 80 ~ 150 ℃ 热解过程中硅藻土和沸石促进微生物降解、250 ℃ 加热引起材料结构改变进而固定抗生素有关。随热解温度升高, ARGs 的去除效果不断增强, 去除率最高可达 99%; 可移动元件平均去除率高达 90%, 在 250 ℃ 下, 几乎被完全去除。可移动元件减少, 也在一定程度上抑制了 ARGs 的水平转移, 降低了有机肥中 ARGs 的传播。在 80 ~ 250 ℃ 的热解范围内, 大肠杆菌指示基因 *uidA* 的去除率均达 99% 以上, 说明低温热解能有效降低堆肥中大肠杆菌丰度, 提高有机肥安全性。硅藻土与沸石在 80 ~ 150 ℃ 时对 ARGs 的去除有抑制作用, 可能因为在此温度下硅藻土和沸石为携带有 ARGs 的嗜热菌提供了适宜的繁殖场

所。结合不同热解温度下的能耗分析,250 °C 低温热解是提高有机肥环境安全性的最有效手段,但成本较高,更适用于对抗生素和 ARGs 含量较高的有机肥进行深度处理。80 °C 和 150 °C 热解有机肥产品成本较低,且对 ARGs 和大肠杆菌的去除效果显著,有望在农业生产中大面积推广。本研究揭示了不同热解温度下抗生素和 ARGs 的消减规律,为低温热解有机肥中抗生素和 ARGs 技术提供了理论指导。

通信作者简介:贾伟丽(1991—),女,博士,副研究员,主要研究方向为污染物环境行为与修复。

共同通信作者简介:刘芳(1981—),女,硕士,主要研究方向为环境生物学。

参考文献 (References):

- [1] 郭坤. 有机肥中抗生素及其抗性基因的检测和恩诺沙星对生菜内生细菌的喹诺酮抗性基因的影响[D]. 南京: 南京师范大学, 2013: 1-2
Guo K. Detection of antibiotics and their resistance genes in organic fertilizer and the effect of enrofloxacin on quinolone resistance genes of endophytic bacteria in lettuce [D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2013: 1-2 (in Chinese)
- [2] 李轶, 胡童, 王琳琼, 等. 环丙沙星和铜复合污染下河流底质微生物群落与抗生素抗性基因的交互关系[J]. 河海大学学报(自然科学版), 2022, 50(6): 75-84
Li Y, Hu T, Wang L Q, et al. The interactions between microbial communities and antibiotic resistance genes to ciprofloxacin and copper co-contamination in river sediments [J]. Journal of Hohai University (Natural Sciences), 2022, 50(6): 75-84 (in Chinese)
- [3] Li J J, Xin Z H, Zhang Y Z, et al. Long-term manure application increased the levels of antibiotics and antibiotic resistance genes in a greenhouse soil [J]. Applied Soil Ecology, 2017, 121: 193-200
- [4] Xie W Y, Shen Q, Zhao F. Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: A review [J]. European Journal of Soil Science, 2018, 69 (1): 181-195
- [5] Wang Y, Chen G X, Liang J, et al. Comparison of oxytetracycline degradation behavior in pig manure with different antibiotic addition methods [J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2015, 22 (23): 18469-18476
- [6] Li B, Yang Y, Ma L P, et al. Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes [J]. The ISME Journal, 2015, 9(11): 2490-2502
- [7] Wang Y Z, Zhang Y L, Li J X, et al. Biogas energy generated from livestock manure in China: Current situation and future trends [J]. Journal of Environmental Management, 2021, 297: 113324
- [8] Gaballah M S, Guo J B, Sun H, et al. A review targeting veterinary antibiotics removal from livestock manure management systems and future outlook [J]. Bioresource Technology, 2021, 333: 125069
- [9] Zhang M, He L Y, Liu Y S, et al. Variation of antibiotic resistome during commercial livestock manure composting [J]. Environment International, 2020, 136: 105458
- [10] Liu B T, Yu K F, Ahmed I, et al. Key factors driving the fate of antibiotic resistance genes and controlling strategies during aerobic composting of animal manure: A review [J]. The Science of the Total Environment, 2021, 791: 148372
- [11] Cheng X Q, Zhang C, Wang Z X, et al. Tailoring nanofiltration membrane performance for highly-efficient antibiotics removal by mussel-inspired modification [J]. Journal of Membrane Science, 2016, 499: 326-334
- [12] 余震, 周顺桂. 超高温好氧发酵技术: 堆肥快速腐熟与污染控制机制[J]. 南京农业大学学报, 2020, 43(5): 781-789
Yu Z, Zhou S G. Hyperthermophilic composting of organic solid wastes: Accelerated humification and pollution control mechanisms [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2020, 43(5): 781-789 (in Chinese)
- [13] 孟俊. 猪粪堆制、热解过程中重金属形态变化及其产物的应用[D]. 杭州: 浙江大学, 2014: 11-12
Meng J. Change of heavy metal fractions during the composting and pyrolysis processes of swine manure and the applications of its composts and biochars [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014: 11-12 (in Chinese)
- [14] 王艳. 城市生活垃圾中低温热解特性研究[D]. 天津: 天津大学, 2005: 15-16
Wang Y. Characteristic studies on middle and low-temperature pyrolysis of municipal household garbage [D]. Tianjin: Tianjin University, 2005: 15-16 (in Chinese)
- [15] 田仁强, 谢胜禹, 李春星, 等. 鸡粪与农林废弃物共热解对生物炭中残留重金属和抗生素的影响[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(11): 2619-2631
Tian R Q, Xie S Y, Li C X, et al. Effect of co-pyrolysis of chicken manure and agricultural or forestry wastes on residual heavy metals and antibiotics in biochar [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2019, 38(11): 2619-2631 (in Chinese)

- [16] 李哲. 热碱解-水解处理剩余污泥的效果及四环素类抗性基因的变化研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2018: 62-63
- Li Z. Study on the effect of disposing residual sludge and the change of tetracyclines resistance genes by thermal-alkaline combined with hydrolysis process [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018: 62-63 (in Chinese)
- [17] Tian R Q, Li C X, Xie S Y, et al. Preparation of biochar via pyrolysis at laboratory and pilot scales to remove antibiotics and immobilize heavy metals in livestock feces [J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2019, 19(7): 2891-2902
- [18] 李杰, 潘兰佳, 余广炜, 等. 污泥中抗生素热解特性及动力学分析[J]. *环境工程学报*, 2017, 11(9): 5213-5219
- Li J, Pan L J, Yu G W, et al. Pyrolysis characteristics and kinetics analysis of several antibiotics in sludge [J]. *Chinese Journal of Environmental Engineering*, 2017, 11(9): 5213-5219 (in Chinese)
- [19] 陈原, 张庚庚, 施宇震, 等. 高硅沸石吸附水中有机微污染物的研究进展[J]. *广州化工*, 2022, 50(7): 11-14
- Chen Y, Zhang G G, Shi Y Z, et al. Research progress on adsorption of organic micro pollutants in water by high silica zeolite [J]. *Guangzhou Chemical Industry*, 2022, 50(7): 11-14 (in Chinese)
- [20] 郭志伟, 赵宝龙, 郑志宏, 等. 碳化改性硅藻土对四环素的吸附[J]. *环境工程*, 2022, 40(5): 44-52
- Guo Z W, Zhao B L, Zheng Z H, et al. Preparation of modified diatomite via carbonization and its adsorption performance on tetracycline [J]. *Environmental Engineering*, 2022, 40(5): 44-52 (in Chinese)
- [21] Zhou G X, Qiu X W, Wu X Y, et al. Horizontal gene transfer is a key determinant of antibiotic resistance genes profiles during chicken manure composting with the addition of biochar and zeolite [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 408: 124883
- [22] Wei Y, Gu J, Wang X J, et al. Elucidating the beneficial effects of diatomite for reducing abundances of antibiotic resistance genes during swine manure composting [J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 821: 153199
- [23] 董颖博, 张圆, 林海, 等. 焙烧温度对天然沸石物化性能的影响[J]. *中国有色金属学报*, 2017, 27(7): 1520-1526
- Dong Y B, Zhang Y, Lin H, et al. Effects of calcination temperature on physicochemical properties of natural zeolite [J]. *The Chinese Journal of Nonferrous Metals*, 2017, 27(7): 1520-1526 (in Chinese)
- [24] 郭绍英. 焙烧改性硅藻土处理垃圾渗滤液[J]. *环境科学与管理*, 2012, 37(11): 101-103
- Guo S Y. Treatment of landfill leachate by roasting-modified diatomite [J]. *Environmental Science and Management*, 2012, 37(11): 101-103 (in Chinese)
- [25] Zhou L J, Ying G G, Liu S, et al. Simultaneous determination of human and veterinary antibiotics in various environmental matrices by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1244: 123-138
- [26] 刘叶新, 周志洪, 区晖, 等. 珠江广州河段沉积物中典型抗生素的污染特征[J]. *华南师范大学学报(自然科学版)*, 2018, 50(4): 48-54
- Liu Y X, Zhou Z H, Ou H, et al. Occurrence of typical antibiotics in sediments of Guangzhou section of the Pearl River [J]. *Journal of South China Normal University (Natural Science Edition)*, 2018, 50(4): 48-54 (in Chinese)
- [27] 葛丽炜, 夏颖, 刘书悦, 等. 热解温度和时间对马弗炉制备生物炭的影响[J]. *沈阳农业大学学报*, 2018, 49(1): 95-100
- Ge L W, Xia Y, Liu S Y, et al. Effect of pyrolysis temperature and time on biochar production in a muffle furnace [J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2018, 49(1): 95-100 (in Chinese)
- [28] He L Y, Liu Y S, Su H C, et al. Dissemination of antibiotic resistance genes in representative broiler feedlots environments: Identification of indicator ARGs and correlations with environmental variables [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(22): 13120-13129
- [29] 何轮凯, 张敏, 刘有胜, 等. 长期施用粪肥的土壤中抗生素耐药基因的消减规律[J]. *华南师范大学学报(自然科学版)*, 2018, 50(1): 1-10, 130
- He L K, Zhang M, Liu Y S, et al. Dynamics of antibiotic resistance genes in soil chronically fertilized by swine manure [J]. *Journal of South China Normal University (Natural Science Edition)*, 2018, 50(1): 1-10, 130 (in Chinese)
- [30] Madsen L, Aarestrup F M, Elmerdahl Olsen J. Characterisation of streptomycin resistance determinants in Danish isolates of *Salmonella typhimurium* [J]. *Veterinary Microbiology*, 2000, 75(1): 73-82
- [31] Ram J L, Ritchie R P, Fang J W, et al. Sequence-based source tracking of *Escherichia coli* based on genetic diversity of beta-glucuronidase [J]. *Journal of Environmental Quality*, 2004, 33(3): 1024-1032
- [32] Sidrach-Cardona R, Hijosa-Valsero M, Marti E, et al. Prevalence of antibiotic-resistant fecal bacteria in a river impacted by both an antibiotic production plant and urban treated discharges [J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 488-489: 220-227

- [33] Li C X, Xie S Y, Wang Y, et al. Simultaneous heavy metal immobilization and antibiotics removal during synergetic treatment of sewage sludge and pig manure [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, 27(24): 30323-30332
- [34] 韩森, 朱小梅. 喹诺酮类药物诺氟沙星的热稳定性研究[J]. *中国新药杂志*, 2007, 16(14): 1104-1107
Han S, Zhu X M. Thermal analysis of norfloxacin [J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2007, 16(14): 1104-1107 (in Chinese)
- [35] 胡慧敏. 生物质材料固定化微生物及其降解土壤中磺胺类抗生素的研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2017: 51-53
Hu H M. The research of biomass material immobilized microorganism and its degradation of sulfonamides in soil [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2017: 51-53 (in Chinese)
- [36] Böer T M, Procópio J V, Nascimento T G, et al. Correlation of thermal analysis and pyrolysis coupled to GC-MS in the characterization of tacrolimus [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013, 73: 18-23
- [37] 李玮. 大环内酯类抗生素热稳定性及分解动力学研究[J]. *药物分析杂志*, 2010, 30(8): 1544-1547
Li W. Studies on the thermal kinetics of thermal decomposition and stability of macrolide drugs [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2010, 30(8): 1544-1547 (in Chinese)
- [38] Yu Y S, Chen L J, Fang Y, et al. High temperatures can effectively degrade residual tetracyclines in chicken manure through composting [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 380: 120862
- [39] Kimbell L K, Kappell A D, McNamara P J. Effect of pyrolysis on the removal of antibiotic resistance genes and class I integrons from municipal wastewater biosolids [J]. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 2018, 4(11): 1807-1818
- [40] Mao Y J, Wilson C A, Novak J T, et al. Effect of various sludge digestion conditions on sulfonamide, macrolide, and tetracycline resistance genes and class I integrons [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(18): 7855-7861
- [41] 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
- [42] Xu F, Liu Y L, Du W C, et al. Response of soil bacterial communities, antibiotic residuals, and crop yields to organic fertilizer substitution in North China under wheat-maize rotation [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 785: 147248
- [43] 武晓春. 卧式电阻炉的设计与应用[J]. *现代制造技术与装备*, 2020(4): 94-95
Wu X C. Design and application of horizontal resistance furnace [J]. *Modern Manufacturing Technology and Equipment*, 2020(4): 94-95 (in Chinese)
- [44] 孙晓兵, 穆玉芹, 吕金根, 等. 箱式电阻炉热处理生产中的降本增效案例及创新思维[J]. *金属加工(热加工)*, 2019(3): 1-3, 11
Sun X B, Mu Y Q, Lv J G, et al. Reduction and efficiency cases and innovative thinking in heat treatment production of box-type resistance furnace [J]. *MW Metal Forming*, 2019(3): 1-3, 11 (in Chinese)
- [45] 江尧忠. 工业电炉[M]. 北京: 清华大学出版社, 1993: 520-530
- [46] 高采文. 基于因子分析的改进雷达图及其在综合评价中的应用[J]. *山西师范大学学报(自然科学版)*, 2013, 27(4): 19-22
Gao C W. Improved radar chart based on factor analysis and its application in comprehensive evaluating [J]. *Journal of Shanxi Normal University (Natural Science Edition)*, 2013, 27(4): 19-22 (in Chinese) ◆