

翻堆频次对奶牛粪污异位发酵床中抗生素抗性基因及细菌群落的影响

郜道玉, 崔华威, 周源, 龚萍, 陈洁, 万平民, 邵志勇, 华娟, 李鹏, 金尔光

引用本文:

郜道玉, 崔华威, 周源, 龚萍, 陈洁, 万平民, 邵志勇, 华娟, 李鹏, 金尔光. 翻堆频次对奶牛粪污异位发酵床中抗生素抗性基因及细菌群落的影响[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(8): 1841–1851.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2022-1070>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

猪场废水处理系统出水及周边河流中噬菌体携带抗性基因的污染特征

杨亦文, 陈颖熙, 蔡影峰, 邢斯程, 吴芮庭, 陈凝雪, 廖新伟

农业环境科学学报. 2020, 39(11): 2631–2639 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0659>

天津市畜禽粪污处理工艺对抗生素抗性基因的去除效果

闫雷, 丁工尧, 杨凤霞, 阮蓉, 韩秉君, 支苏丽, 张克强

农业环境科学学报. 2021, 40(9): 2021–2030 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1280>

华北地区不同规模畜禽养殖场粪便中抗生素抗性基因污染特征

邹威, 金彩霞, 魏闪, RamasamyRajeshKumar, 周启星

农业环境科学学报. 2020, 39(11): 2640–2652 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0403>

牛粪原料浓度对厌氧消化削减四环素类抗性基因的影响

朱文博, 张秋萍, 许继飞, 庞小可, 刘建国, 赵吉

农业环境科学学报. 2021, 40(8): 1808–1817 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0033>

粪源环丙沙星对潮土中抗生素抗性基因的影响

常旭卉, 贾书刚, 王淑平, 周志强

农业环境科学学报. 2018, 37(12): 2727–2737 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0401>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

郜道玉, 崔华威, 周源, 等. 翻堆频次对奶牛粪污异位发酵床中抗生素抗性基因及细菌群落的影响[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(8): 1841–1851.

GAO D Y, CUI H W, ZHOU Y, et al. Effects of turning frequency on antibiotic resistance genes and bacterial communities in dairy manure ectopic fermentation bed[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2023, 42(8): 1841–1851.

翻堆频次对奶牛粪污异位发酵床中抗生素抗性基因及细菌群落的影响

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

(1. 武汉市农业科学院畜牧兽医研究所, 武汉 430208; 2. 长江大学动物科学学院, 湖北 荆州 434025; 3. 华中农业大学动物医学院, 武汉 430070)

摘要: 为了探讨翻堆频次对异位发酵床动态堆肥过程中抗生素抗性基因(Antibiotic resistance genes, ARGs)、整合子基因(*intI1*)及细菌群落的影响, 设置1 d翻堆1次(T1)和2 d翻堆1次(T2)2种条件, 采取qPCR、16S rRNA技术研究了目标基因(*tetG*、*tetW*、*sul1*、*sul2*、*bla_{TEM-1}*、*ermQ*和*intI1*)及细菌群落的动态变化, 并分析ARGs与细菌群落及*intI1*的关系。结果表明: 堆肥后T1和T2组目标基因总相对丰度较0 d时分别降低82.33%和80.46%, 其中*tetG*、*tetW*、*sul1*、*bla_{TEM-1}*、*ermQ*、*intI1*相对丰度分别降低16.70%、87.88%、54.60%、>99.99%、97.80%、59.33%和61.33%、99.46%、50.91%、99.29%、82.23%、99.92%。网络分析发现, *Trichococcus*、*Aquabacterium*和*Clostridiaceae_Clostridium*等是ARGs和*intI1*的共同潜在宿主菌; 冗余分析显示, 细菌群落解释了ARGs变化的70.07%, *intI1*解释了25.10%。研究表明, 细菌群落的演替和*intI1*相对丰度的变化可能是影响异位发酵床堆肥过程中ARGs相对丰度变化的关键因素, 两处理组均能降低大部分ARGs的丰度, 但不能有效去除*tetG*、*sul1*、*sul2*, 其中2 d翻堆1次效果更好。

关键词: 奶牛粪污; 异位发酵床; 抗生素抗性基因; 细菌群落

中图分类号: S141.4 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2023)08-1841-11 doi:10.11654/jaes.2022-1070

Effects of turning frequency on antibiotic resistance genes and bacterial communities in dairy manure ectopic fermentation bed

GAO Daoyu^{1,2}, CUI Huawei^{1,3}, ZHOU Yuan¹, GONG Ping¹, CHEN Jie¹, WAN Pingmin¹, SHAO Zhiyong¹, HUA Juan¹, LI Peng^{2*}, JIN Er-guang^{1*}

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Wuhan Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430208, China; 2. College of Animal Science and Technology, Yangtze University, Jingzhou 434025, China; 3. Animal Science and Technology College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: To investigate the effect of turning frequency on antibiotic resistance genes (ARGs), integrator genes (*intI1*), and bacterial communities during dynamic composting in ectopic fermentation beds, two conditions were established: turning over once per day (T1 group) and turning over once every two days (T2 group). The dynamic changes of target genes (*tetG*, *tetW*, *sul1*, *sul2*, *bla_{TEM-1}*, *ermQ*, and *intI1*) and bacterial communities were studied using qPCR and 16S rRNA, and the relationship between ARGs, bacterial communities, and

收稿日期: 2022-10-26 录用日期: 2023-02-23

作者简介: 郜道玉(1997—), 女, 贵州毕节人, 硕士研究生, 研究方向为畜禽粪便无害化处理与资源化安全利用。E-mail: 1662971348@qq.com

*通信作者: 金尔光 E-mail: 523229599@qq.com; 李鹏 E-mail: lipeng@yangtzeu.edu.cn

基金项目: 西藏自治区重点科技计划项目(XZ201801NB34); 武汉市农业科学院协同创新专项(XTCX2020002, XTCX2021002)

Project supported: Tibet Autonomous Region Key Science and Technology Program (XZ201801NB34); Wuhan Academy of Agricultural Sciences Collaborative Innovation Special Project (XTCX2020002, XTCX2021002)

intI1 was analyzed. The results showed that the total relative abundance of target genes in T1 and T2 groups decreased by 82.33% and 80.46%, respectively, compared with 0 d after composting. The relative abundance of *tetG*, *tetW*, *sul1*, *bla_{TEM-1}*, *ermQ*, and *intI1* decreased by 16.70%, 87.88%, 54.60%, >99.99%, 97.80%, 59.33% in T1 and 61.33%, 99.46%, 50.91%, 99.29%, 82.23%, 99.92% in T2, respectively. Network analysis revealed that *Trichococcus*, *Aquabacterium*, and *Clostridiaceae_Clostridium* were common potential host bacteria for ARGs and *intI1*. Redundancy analysis showed that the bacterial communities accounted for 70.07% of the variation in ARGs, and *intI1* explained 25.10%. The result showed that the succession of bacterial communities and the change in relative abundance of *intI1* may be the key factors affecting the change in relative abundance of ARGs during the composting process of the ectopic fermentation bed, and the abundance of most ARGs could be reduced under both treatments. The removal efficiency of most ARGs was better in the condition of turning over once every two days; however, *tetG*, *sul1* and *sul2* could not be effectively removed.

Keywords: manure and sewage of dairy cattle; ectopic fermentation bed; antibiotic resistance genes; bacterial communities

中国是世界上最大的抗生素生产国和消费国,每年畜牧业抗生素使用量占全球用量的一半左右^[1]。然而进入畜禽体内的抗生素仅有少部分被吸收利用,绝大部分以原药或代谢产物形式随粪尿排出体外^[2-3]。抗生素的选择压力会诱导肠道微生物和环境微生物产生抗生素抗性基因(Antibiotic resistance genes, ARGs)和耐药菌(Antibiotic resistant bacteria, ARB),导致畜禽粪污中残存大量的 ARGs 和 ARB。粪污中的 ARGs 和 ARB 可随空气逸散、地表径流、土壤渗滤及还田利用等进入生态环境,进而进入食物链对人类和动物健康构成潜在危害。

异位发酵床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一种新型粪污处理技术,其以锯末、秸秆和砻糠等为垫料,通过接种复合微生物菌剂以及连续添加粪污,实现异地高效同步处理粪污^[4-5]。翻堆是异位发酵床动态堆肥的保障,通过翻堆补充粪污、增加通气量,为微生物增殖提供养分和氧气,调节温度的变化及微生物群落结构,促进物料的分解,提高 ARGs 等污染物的消减效果。研究表明,堆肥过程中产生的高温可杀灭不耐热的 ARGs 宿主菌、调整微生物群落结构,显著降低畜禽粪便中 ARGs 和可移动遗传因子(MGEs)的多样性和丰度^[6-7]。钱勋^[8]指出,不充分堆肥、普通高温堆肥、连续高温堆肥均可降低奶牛粪便中大部分 ARGs 的丰度,其中连续高温堆肥效果最佳。由此可见,堆肥是去除粪污中 ARGs 的有效途径之一。

近年来,异位发酵床堆肥技术的研究主要集中在不同垫料对微生物菌落多样性和纤维素降解的影响方面^[4,9],关于不同翻堆频次对异位发酵床中 ARGs 和整合子基因(*intI1*)的相对丰度的变化与微生物菌落丰度变化关系的报道较少,仅见张锦^[10]报道实验室堆肥 2 d 翻堆 1 次可显著降低猪粪中 *ermB*、*ermC*、*tetQ*、

tetW、*qnrS*、*qnrD* 的相对丰度。本研究以谷壳、锯末和砻糠等为垫料,辅以接种复合微生物菌剂,探讨翻堆频次对异位发酵床堆肥过程中 ARGs、*intI1* 和细菌群落变化的影响,分析 ARGs 相对丰度变化与微生物菌落和 *intI1* 之间的关系,为阐明粪污异位发酵床堆肥过程中 ARGs 变化的主要影响因素提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

堆肥材料包括奶牛粪污(粪便、尿液及生产污水,含水量约 90%)和异位发酵床垫料(谷壳、锯末、砻糠),其均来自湖北某奶牛场。复合微生物菌剂(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⁻¹)由武汉旭润环保科技有限公司提供。

土壤基因组 DNA 提取试剂盒(Fast DNA Spin kit for soil)购自 TIANGEN 公司;TaqDNA 聚合酶购自大连宝生物公司(TAKARA),Agarose 琼脂糖(每瓶 100 g)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奶牛场雨棚内开展试验。塑料盒总容积 0.7 m³(高 765 mm、上外径 1 060 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 m³,谷壳、锯末、砻糠按体积比 2:1:1 添加,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、150 g 菌剂和 1 500 g 尿素,调整物料 C/N 为 30:1,含水率为 60% 左右,充分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⁻¹)。

按翻堆频次分为两组,T1组:1 d翻堆1次;T2组:2 d翻堆1次。

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(kg)=(60%-发酵床含水量)×60÷90%。

用实时数显温度仪垂直插入物料中心20~30 cm处监测温度,每天9:00记录实时数显温度仪温度及空气温湿度测定器的温度和湿度。

用四分法取5 g样品,加45 mL无菌水,室温下振荡器振荡30 min,然后静置30 min,用pH计测定上清液pH,每份样品3个重复。

1.3 样品采集

分别于堆肥第0、5、12、33、47、61天(T1组记为T1-0、T1-5、T1-12、T1-33、T1-47、T1-61,T2组记为T2-0、T2-5、T2-12、T2-33、T2-47、T2-61)收集样品。采用五点采样法从每个处理的上、中、下层(距离表面10、20、30 cm)采样,样品充分混合均匀,用四分法收集约500 g,然后分成两等份,密封于自封袋,其中一份储存在4℃冰箱中用于理化性质分析,另一份冷冻干燥后,研磨成1 mm,储存在-80℃冰箱,用于后续生物分析。

1.4 DNA提取

根据TIANGEN土壤基因组DNA提取试剂盒操作手册,分别提取上述样品DNA,使用分光光度计(NANODROP ONE^c, Thermo Fisher Scientific, 美国)检测DNA纯度和浓度,所有提取的DNA样品在测序之前,均密封在-80℃的冰箱保存备用。

1.5 定量PCR检测

根据课题组的前期研究,选择包括四环素类抗性基因(*tetG*、*tetW*)、磺胺类抗性基因(*sul1*、*sul2*)、β-内酰胺类抗性基因(*bla_{TEM-1}*)、大环内酯类抗性基因(*ermQ*)和整合子基因(*int11*)7种目标基因在ABI ViiA 7 Real Time PCR System荧光定量PCR仪上进行荧光定量PCR检测。目标基因的引物设计参考文献[11],引物序列、片段大小及退火温度见表1。反应体系为基因组DNA 1 μL, iTaq Universal SYBR Green Supermix (2x) 10 μL, 10 μmol·L⁻¹的上下游引物各0.25 μL, 双蒸水8.5 μL, 总体积20 μL。反应条件:95℃ 3 min; 95℃ 5 s、60℃ 30 s、72℃ 30 s,共40个循环;65℃延伸5 s。每个样品3个重复。运行过程中,通过溶解曲线来检查非特异扩增,根据标准曲线的相关系数≥0.99计算ARGs拷贝数。

1.6 16S rRNA高通量测序

使用上海派森诺生物科技有限公司 Illumina

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 Primer	片段 长度 Size/bp	退火温度 Annealing temperature/ ℃
<i>tetG</i>	F:5'-GCAGAGCAGGTCGCTGG-3' R:5'-CCYGCAAGAGAAGCCAGAAG-3'	134	54
<i>tetW</i>	F:5'-GAGAGCCTGCTATATGCCAGC-3' R:5'-GGGCGTATCCACAATGTTAAC-3'	168	56
<i>sul1</i>	F:5'-CGGCGTGGGCTACCTGAACG-3' R:5'-GCCGATCGCGTGAAGTTCCG-3'	433	60
<i>sul2</i>	F:5'-GCGCTCAAGGCAGATGGCATT-3' R:5'-GCGTTTGATACCGGCACCCGT-3'	293	59
<i>bla_{TEM-1}</i>	F:5'-CATTTTCGTGTCGCCCTTAT-3' R:5'-GGGCGAAAACCTCTCAAGGAT-3'	189	57
<i>int11</i>	F:5'-CTGGATTTCGATCACGGCACG-3' R:5'-ACATGCGTGTAATCATCGTCG-3'	473	60
16S V3	F:5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' R:5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'	193	55

HiSeq平台进行16S rRNA基因测序,确定堆肥样品中的细菌群落。使用PCR通用引物806R(GGACTACH-VGGGTWCTAAT)和338F(ACTCCTACGGGAGGC-AGCAG)扩增V3~V4区域。按照DADA2方法进行去引物、质量过滤、拼接和去嵌合体等步骤。使用Vsearch(v2.13.4_linux_x8_64)对97%相似度水平高质量序列进行聚类,输出代表序列和OTU表。采用RDP分类器对OTU的代表性序列进行分类。

1.7 统计分析

采用IBM SPSS Statistics(25.0版)对各处理样品之间的显著差异进行相关分析。使用Graphpadprism 8.0.2软件对目标基因进行分析和绘图。使用派森诺基因云中的热图,绘制Top35细菌群落的热图。采用CANOCO(5.1版)进行冗余分析,探究影响ARGs丰度变化的主要因素。基于ARGs、MGEs和细胞菌属之间的Pearson相关关系($P<0.05$, $R>0.6$),使用Gephi 0.9.2进行网络分析。

2 结果与讨论

2.1 粪污降解过程中温度和pH的变化

堆肥过程中的温度影响微生物的活动和有机质的降解速率,低分子物质(有机物、蛋白质和糖类等)被微生物利用产生大量的热量,进而可升高堆肥的温度。本研究根据温度的变化趋势将堆肥过程分为4

个阶段,即升温期、高温期、降温期及腐熟期,堆肥过程中两处理组的温度整体呈先上升后下降的变化趋势(图1A)。从图1A可看出,T1、T2组堆肥前期温度快速上升,分别在第5天和第12天达到最高温度(59.9℃、64.5℃),第2天至第40天均保持在50℃以上,第40天后逐步降低,堆肥结束时接近环境温度。《畜禽粪便无害化处理技术规范》(GB/T 36195—2018)要求堆肥温度 $\geq 50^\circ\text{C}$ 的时间不少于7 d,本研究中50℃以上温度超过7 d,满足粪污无害化处理要求。Chang等^[12]的研究表明,堆肥过程中添加功能性菌剂、调理剂、翻堆等有利于增强微生物活性,促进微生物繁殖,提高堆肥温度,延长高温持续时间。本研究T1和T2组50℃以上温度维持了39 d,可能与发酵床垫料、添加复合微生物菌剂、动态补充粪浆等有利于促进微生物活动有关;40 d后温度逐步降低,可能与可利用养分减少、微生物活动减弱等有关。高温期T2组温度高于T1组,可能与2 d翻堆1次有利于减少热量散失等因素有关。可见,2 d翻堆1次更有利于

提高堆肥温度和延长高温期。

T1、T2组pH值变化趋势见图1B。从图1B可以看出,第0天时pH值最大(9.16),随后逐步降低,试验结束时T1、T2组pH值分别降至6.69和6.48。堆肥过程中pH值的变化对微生物活动有较大的影响,当pH值为6.7~9.0时,微生物更加活跃,有利于其生长及最大限度地分解堆肥物料^[13]。本研究堆肥初始物料pH值为9.16,与上述报道中pH值范围接近,可为微生物的快速增殖和堆肥物料的分解提供良好生境。试验结束时堆肥产物中pH值较初始物料明显降低(6.69和6.48),这可能与堆肥过程中的氨挥发、微生物代谢产生有机酸及其硝化作用产生无机酸的积累等有关^[14-15]。

2.2 粪污降解过程中 ARGs 和 *intI1* 的相对丰度变化

2.2.1 目标基因总相对丰度变化

采用qPCR技术检测了6种ARGs(*sul1*、*sul2*、*tetG*、*tetW*、*bla_{TEM-1}*、*ermQ*)和*intI1*的相对丰度。T1和T2组目标基因总相对丰度整体上呈现先降低后升高

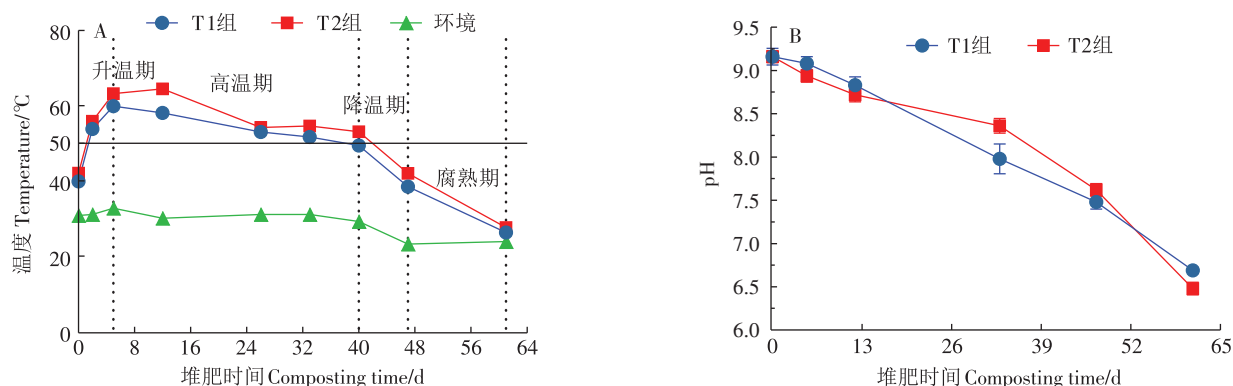


图1 粪污降解过程中温度和pH的变化

Figure 1 Variation of temperature and pH during degradation of manure and sewage

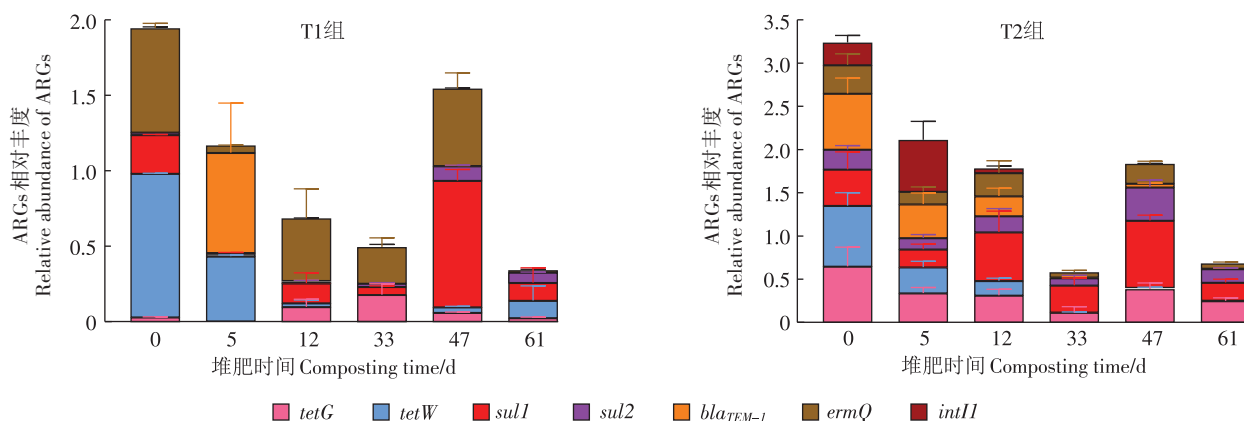
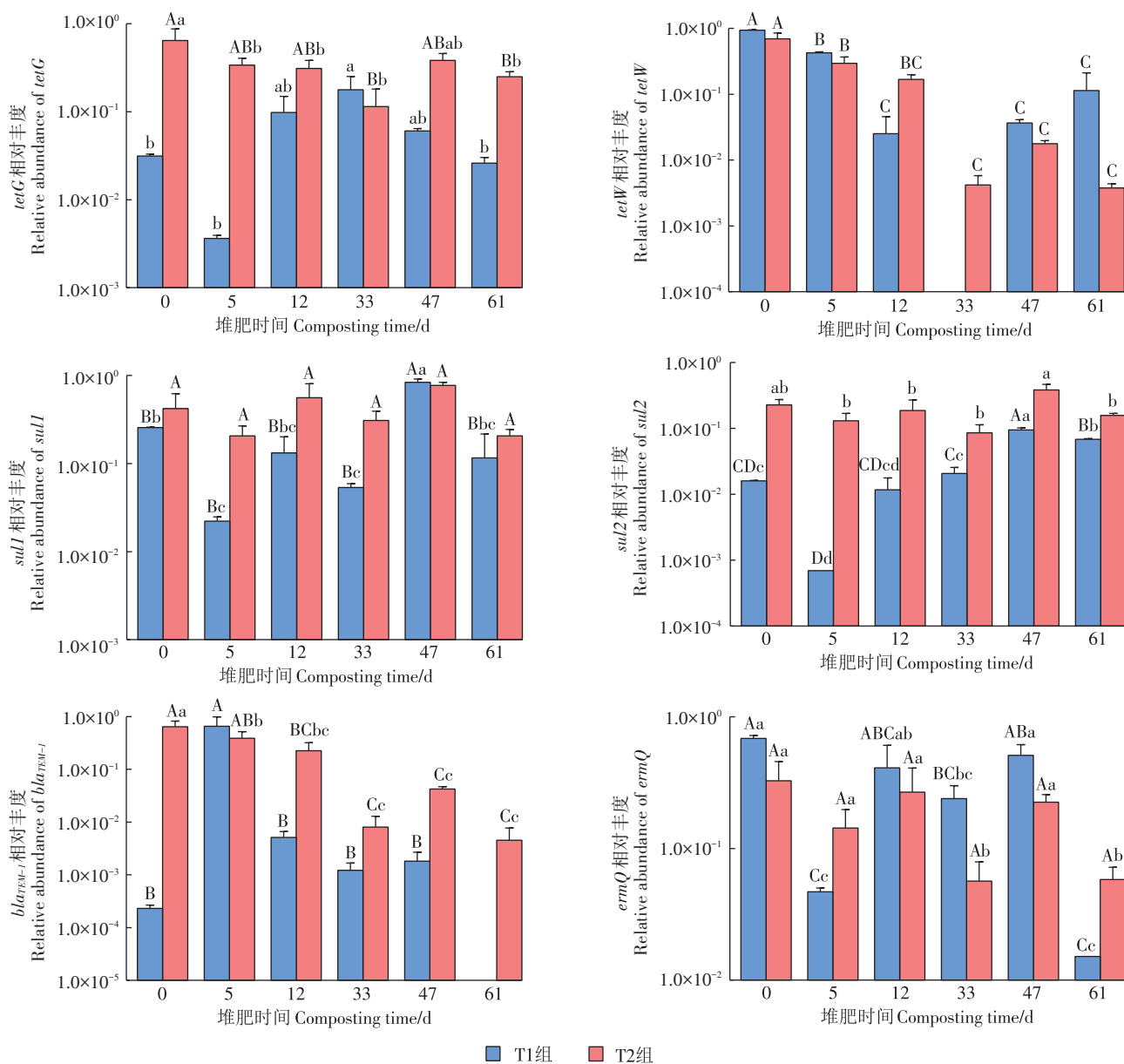


图2 粪污降解过程中T1和T2组目标基因总相对丰度变化

Figure 2 Changes of the total relative abundance of target genes in group T1 and T2 during degradation of manure and sewage

再降低的变化趋势(图2)。从图2可看出,T1和T2组总相对丰度在0~33 d逐步降低,33~47 d小幅度增加,47~61 d逐步降低,其中第33天较第0天分别降低了74.05%、78.35%,相对而言T2组高温期的效果较好。试验结束时T1、T2组目标基因总相对丰度较第0天分别降低82.33%、80.46%。研究表明,堆肥过程中保持相对较高的温度可杀灭/去除 ARGs 宿主菌、降解 ARGs,从而降低目标基因丰度^[8]。Wang等^[16]报道,堆肥高温期可明显降低 ARGs 的丰度;Lin等^[17]研究发

现,高温(50~60 ℃)堆肥可有效降低猪粪中 ARGs 的总相对丰度。本研究高温阶段目标基因的丰度变化与上述报道一致,说明堆肥过程中持续保持较高温度可能有利于降低 ARGs 的丰度。Qian等^[18]研究发现,牛粪好氧堆肥初期到高温期物料中部分目标 ARGs 丰度逐渐降低,而高温期到腐熟期升高。本研究第47天也出现类似情况,这可能与物料逐步腐熟,温度逐渐下降,高温环境下被抑制的微生物恢复活性及后续添加粪浆带入 ARGs 等有关^[19]。



同组中不同小写字母表示差异显著 $P < 0.05$, 不同大写字母表示差异极显著 $P < 0.01$ 。下同。

Different lowercase letters in the same group indicates significant differences $P < 0.05$, and different uppercase letters indicate extremely significant differences $P < 0.01$. The same below.

图3 粪污降解过程中T1和T2组ARGs相对丰度的变化

Figure 3 Changes of the relative abundance of ARGs in group T1 and T2 during degradation of manure and sewage

2.2.2 目标基因相对丰度变化

从图3可以看出, T1和T2组 *tetG*、*tetW*、*sul1*、*bla_{TEM-1}*、*ermQ* 的丰度整体上逐步降低, 堆肥结束时较第0天分别降低了16.70% ($P>0.05$)、87.88% ($P<0.01$)、54.60% ($P<0.05$)、>99.99% ($P<0.01$)、97.80% ($P<0.01$)和61.33% ($P<0.01$)、99.46% ($P<0.01$)、50.91% ($P>0.05$)、99.29% ($P<0.01$)、82.23% ($P<0.01$); 而T1组 *sul2* 丰度先降低后逐步升高, T2组呈降低-升高-降低的波动性变化, 堆肥结束时T1组增加了32.62% ($P>0.05$)、T2组降低了30.90% ($P>0.05$)。相对而言, T2组对6种目标基因有较好的消除效果。堆肥后两处理组 *tetW*、*bla_{TEM-1}* 和 *ermQ* 的相对丰度显著降低, 与Li等^[11]报道的猪粪锯末共堆肥可降低 *tetW*、*bla_{TEM-1}*、*ermQ* 的相对丰度的结果一致, 说明异位发酵床堆肥可有效去除 *tetW*、*bla_{TEM-1}*、*ermQ*。本研究中, T1组 *tetG*、*sul1* 和T2组 *tetG*、*sul1*、*sul2* 的相对丰度较第0天有不同程度降低, 与武晋萍等^[20]和Selvam等^[21]的报道类似, T1组 *sul2* 富集与Chang等^[12]的结果一致。Chen等^[22]报道猪粪锯末共堆肥产物中残留的主要是 *tetG*、*sul1*、*sul2*, 本研究结果与其一致, 可能与这些抗性基因对高温有较强耐受性, 或携带这些基因的宿主菌耐高温难以被除去^[23], 不同条件下相同抗性基因的变化也不一样^[24]等有关。尽管两处理均可较好地降低 *tetG*、*tetW*、*sul1*、*sul2*、*bla_{TEM-1}*、*ermQ* 的相对丰度, 但不能有效去除 *tetG*、*sul1*、*sul2*, 这些ARGs仍然可能有扩散传播的风险, 因此堆肥过程中高效去除 *tetG*、*sul1*、*sul2* 的技术还有待于进一步研究。

2.2.3 *int11* 相对丰度变化

堆肥过程中 *int11* 的相对丰度整体上呈下降趋势(图4)。从图4可知, 堆肥结束时T1、T2组 *int11* 相对

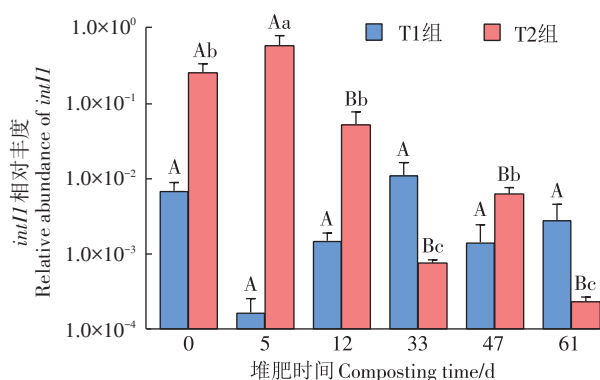


图4 粪污降解过程中T1和T2组 *int11* 相对丰度的变化

Figure 4 Changes of the relative abundance of *int11* in group T1 and T2 during degradation of manure and sewage

丰度较第0天分别降低了59.33% ($P<0.05$)、99.91% ($P<0.01$)。 *int11* 是ARGs水平转移的一个重要MGEs, ARGs可通过MGEs在不同的微生物之间传播, 降低 *int11* 的丰度可抑制ARGs的扩散和传播^[25]。Duan等^[26]报道指出, 添加复合微生物菌剂可降低牛粪堆肥产物中 *int11* 的相对丰度, 抑制ARGs的传播。Fan等^[27]发现堆肥可有效降低奶牛粪便中 *int11* 的丰度。本研究结果与上述报道类似, 说明两处理均可较好去除 *int11*, 其中T2组的效果优于T1组。堆肥后 *int11* 相对丰度降低可能是由于 *int11* 不耐高温、或高温条件下某些不耐热宿主菌被去除^[28], T1和T2组间的差别可能与连续添加粪污中的 *int11* 含量、翻堆次数、细菌群落结构等有关。

2.3 粪污降解过程中细菌群落的变化

取第0、5、12、33、47、61天样品, 每个样品3个重复, 计36个样品, 经组装、质量控制和过滤后, 共获得2 247 318条序列, 鉴定出3 441个相似度 $\geq 97\%$ 的OTUs。基于加权Weight-UniFace距离的主坐标分析(PCoA)显示, PCoA1和PCoA2解释了细菌群落变化的57.5%(图5)。同一时间点3份重复样品聚集在一起, 说明各重复样品间差异较小, 实验精确度高, 取样方法合理。第0天样品与堆肥其他时期样品明显分开, 按照堆肥不同时期聚集在一起, 表明堆肥过程对细菌群落结构变化有重要影响。

选取相对丰度Top10的物种构建柱状堆叠图(图6A)。本研究第0天的样品中门水平的优势菌群依次

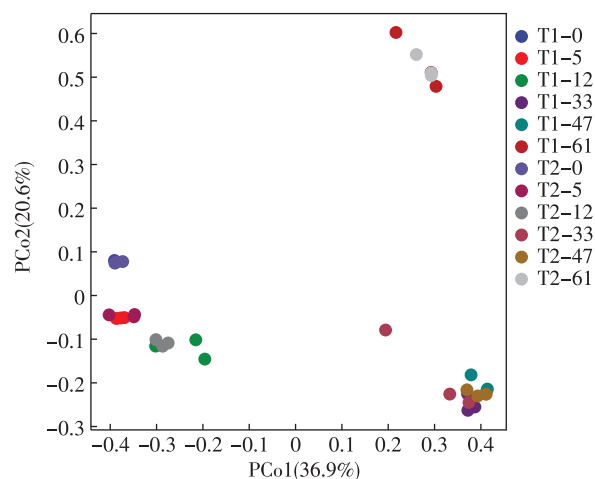


图5 基于发酵床堆肥过程中的加权快速UniFace的主坐标分析(PCoA)

Figure 5 Principal coordinate analysis(PCoA) based on weighted fast UniFace during composting in a fermented bed

是厚壁菌门(Firmicutes, 79.57%~84.36%)、变形菌门(Proteobacteria, 5.66%~7.94%)、放线菌门(Actinobacteria, 5.84%~6.98%)和拟杆菌门(Bacteroidetes, 0.94%~1.21%),这与Zhang等^[29]报道的奶牛粪便中微生物群落优势菌门的结果基本一致。堆肥不同时期,

细菌群落结构发生了明显变化,Firmicutes在0~12 d是最主要优势菌门,相对丰度占比为79.58%~87.57%,主要是由于属于Firmicutes的大部分菌属耐高温^[30]。第33天和第47天,Firmicutes的丰度占比下降到5.58%~15.16%,而Bacteroidetes(13.09%~

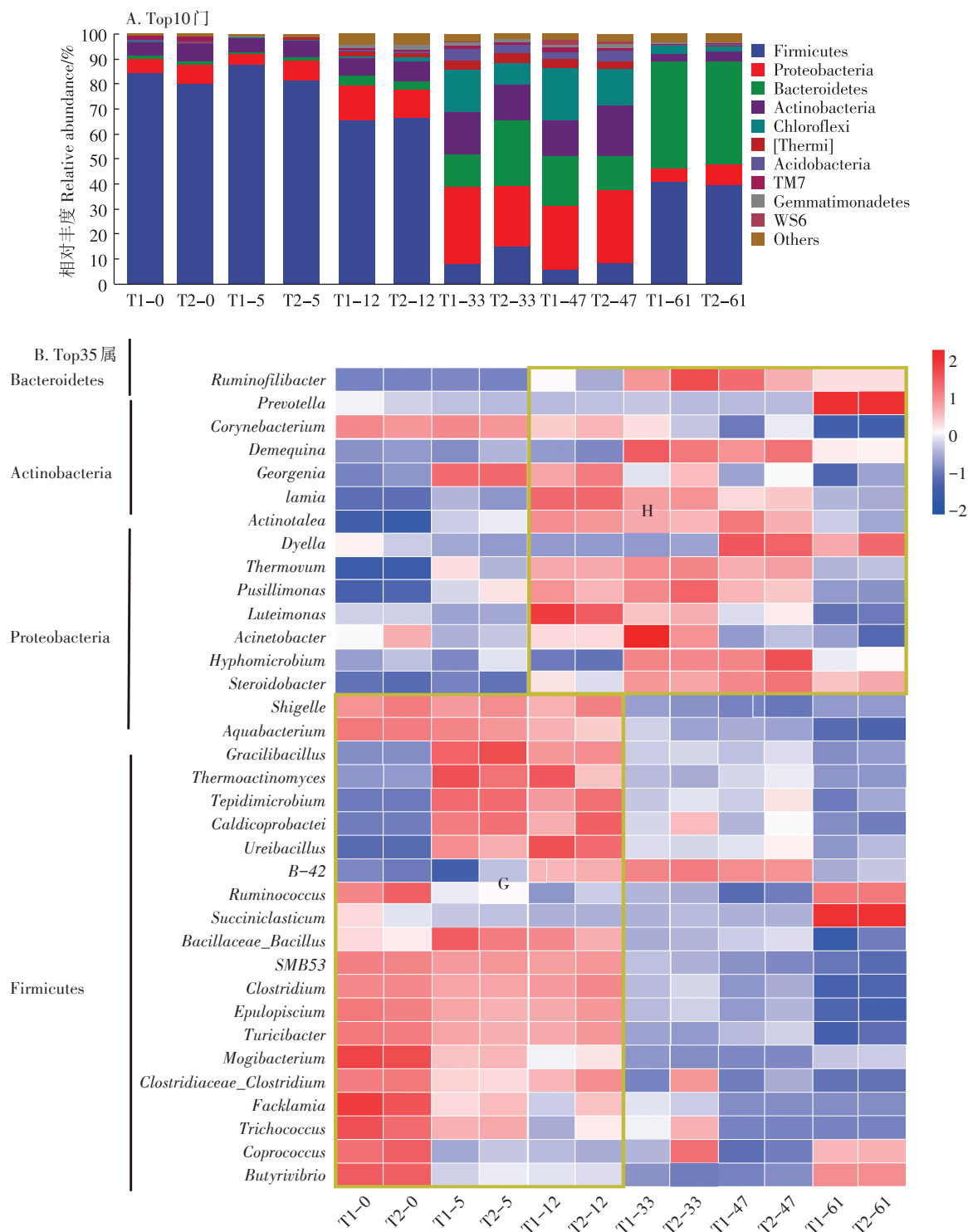


图6 粪污降解过程中细菌群落Top10门和Top35属水平相对丰度

Figure 6 Relative abundance of bacterial community top10 phylum and top35 genus levels during manure degradation

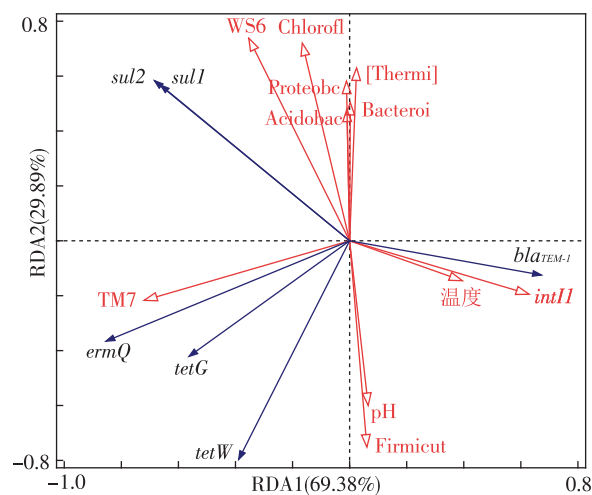
26.18%)、Proteobacteria (23.93%~30.81%)、绿湾菌门 (Chloroflexi, 8.70%~21.20%) 和 Actinobacteria (14.25%~20.00%) 的丰度逐渐增加, 取代 Firmicutes 成为优势菌门。试验结束时, 与第 0 天相比, Firmicutes 和 Actinobacteria 的丰度 T1 组分别降低了 40.13% 和 2.68%, T2 组分别降低了 43.71% 和 3.02%, Bacteroidetes 和 Chloroflexi 的丰度 T1 组分别增加了 40.15% 和 1.94%, T2 组分别增加了 41.69% 和 3.05%。Li 等^[11]报道指出, 猪粪锯末共堆肥腐熟期 Firmicutes 的相对丰度降低, 而 Bacteroidetes、Proteobacteria、Actinobacteria 相对丰度增加, 本研究堆肥后 Firmicutes 相对丰度降低, Bacteroidetes 相对丰度增加与上述报道一致, Actinobacteria 相对丰度降低及 Chloroflexi 相对丰度增加与上述报道不一致, 这可能与堆肥物料和工艺、添加微生物菌剂、连续添加粪污、降温腐熟期某些细菌增殖等有关^[12,31]。

本研究选取相对丰度 Top35 的菌属为细菌群落的代表作热图, 进行进一步分析。根据堆肥过程中菌属水平丰度变化, 将其分为两大类(H、G)。如图 6B 所示, Top35 菌属主要分布在 Firmicutes、Proteobacteria、Actinobacteria 和 Bacteroidetes 门中。G 类除 *Aquabacterium* 和 *Shigella* 外, 其余菌属均属于 Firmicutes, 这些菌属在堆肥初期和高温期丰度最大, 第 12 天后逐渐降低。*Clostridium*、*Mogibacterium*、*Turicibacter* 和 *Bacillaceae_Bacillus* 等菌属属于 Firmicutes, 堆肥初期和高温阶段丰度较高主要是由于这些菌属耐高温, 这与 Chang 等^[12]的研究结果一致。试验结束时除 *Succinoclasticum* 的丰度明显增加外, *Ruminococcus*、*Coprococcus*、*Butyrivibrio* 的丰度变化不明显, 其他菌属丰度均下降至最低。*Shigella* 和 *Turicibacter* 为人类致病菌^[32], 堆肥结束时 *Shigella* 丰度由 0.65%~1.05% 下降到 0.15%~0.16%, *Turicibacter* 丰度由 4.70%~4.90% 下降为 0.11%~0.17%, 可见两处理均能有效降低其丰度。H 类分别属于 Proteobacteria、Actinobacteria 和 Bacteroidetes, 这类菌属相对丰度随着堆肥进行逐渐升高, 高温期相对丰度最高, 然后逐渐降低, 试验结束时除属于 Proteobacteria 的 *Steroidobacter* 和 *Dyella*、Actinobacteria 的 *Demequina* 和 *Acinetobacter*、Bacteroidetes 的 *Ruminofilibacter* 和 *Prevotella* 菌属相对丰度较第 0 天有不同程度增加外, 其他菌属丰度均不同程度降低。Zhou 等^[33]指出 *Corynebacterium* 是人类致病菌, 初始物料中的丰度占比为 1.04%~1.39%, 堆肥结束时被完全去除。可见, 堆肥过程可明显影响细菌群落的结

构, 尤其是对人类致病菌具有较好的抑制作用。

2.4 ARGs 变化的影响因素分析

冗余分析(RDA)用于研究细菌群落、环境因子和 MGEs 与 ARGs 之间的关系, 本研究对堆肥温度、pH、细菌群落(基于门的分类)及 *intI1* 进行冗余分析。由图 7 可知, RDA 解释了 ARGs 丰度变化的 99.27%, 其中 RDA1 解释了 69.38%、RDA2 解释了 29.89%。选择变量中, 细菌群落可解释 ARGs 变化的 70.07%、*intI1* 解释 25.10%、温度和 pH 解释 4.10%, 表明堆肥过程中细菌群落、*intI1* 的丰度、温度及 pH 均可影响 ARGs 的丰度变化。Wang 等^[34]和胡婷^[35]研究发现 ARGs 与细菌群落之间存在较强的相关性。如表 2 所示, 本研究中 Firmicutes 与 *intI1* ($P<0.01$)、*tetW* ($P<0.01$)、*tetG*、*bla_{TEM-1}*、*ermQ* 呈正相关, 堆肥后 Firmicutes 相对丰度降低可解释 *intI1*、*tetW*、*tetG*、*bla_{TEM-1}*、*ermQ* 丰度的减少。Bacteroidetes、Chloroflexi 与 *sul1*、*sul2* 呈正相关, 堆肥结束时 Bacteroidetes、Chloroflexi 的丰度较第 0 天显著增加, 可解释 *sul1*、*sul2* 削减效果较差。可见, 细菌群落是影响堆肥过程中 ARGs 丰度变化的主要因素^[36]。Zhang 等^[37]的研究表明, 堆肥过程中可通过降低 *intI1* 的丰度抑制其介导的水平基因转移, 从而影响堆肥中 ARGs 丰度的变化。本研究中, *intI1* 与 *tetW* ($P<0.01$)、*bla_{TEM-1}* ($P<0.05$)、*ermQ* ($P<0.05$) 呈显著正相关, 堆肥后 T1 和 T2 组 *intI1* 相对丰度分别降低 59.33% 和 99.91%, 说明异位发酵床堆肥可能是通过降低 *intI1*



蓝色箭头代表 ARGs、红色箭头代表细菌群落、*intI1*、温度和 pH。Blue arrows represent ARGs, red arrows represent bacterial communities, *intI1*, temperature and pH.

图 7 ARGs、细菌群落、*intI1*、温度和 pH 的冗余分析

Figure 7 Redundancy analysis ARGs, bacterial communities, *intI1*, temperature and pH

表2 基于相对丰度的 ARGs、MGEs 和细菌菌门之间的 Pearson's 相关系数

Table 2 Pearson's correlation coefficients between ARGs, MGEs and bacteriophages based on their relative abundance

项目 Item	<i>intI1</i>	<i>tetG</i>	<i>tetW</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>bla_{TEM-1}</i>	<i>ermQ</i>
Firmicutes	0.737**	0.063	0.715**	-0.224	-0.392	0.238	0.224
Proteobacteria	-0.153	-0.105	-0.588**	0.336	0.161	-0.007	-0.077
Bacteroidetes	-0.807**	-0.004	-0.746**	0.018	0.361	-0.634*	-0.340
Actinobacteria	-0.123	-0.102	-0.151	0.501	0.179	0.123	0.060
Chloroflexi	-0.593*	-0.186	-0.683**	0.137	0.354	-0.221	-0.368
Thermi	-0.575	-0.263	-0.697*	0.284	0.095	-0.158	-0.228
Acidobacter	-0.439	0.112	-0.413	0.280	0.189	0.091	0.007
TM7	-0.161	0.368	0.200	0.676**	0.522	0.018	0.606*
Gemmatirr	-0.358	-0.172	-0.592*	0.242	0.207	-0.130	-0.151
WS6	-0.562	0.134	-0.402	0.317	0.663*	-0.367	-0.106
<i>intI1</i>	1	0.134	0.826**	-0.134	0.144*	0.373*	0.293*

注:** $P<0.01$ 极显著相关,* $P<0.05$ 显著相关。

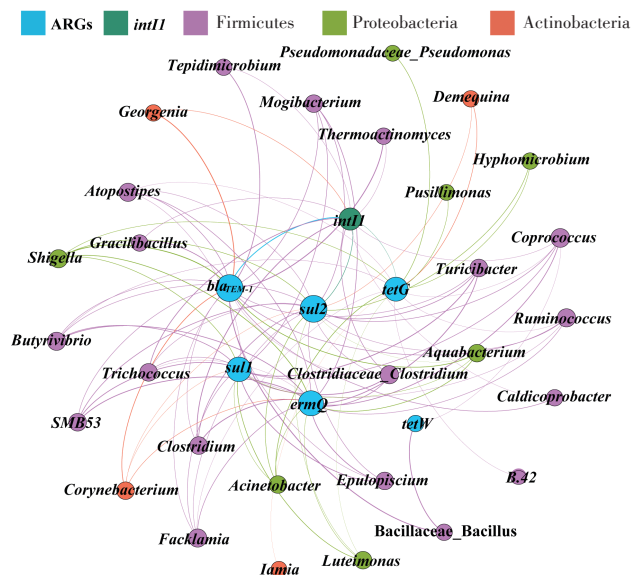
Note:** indicate extremely significant differences at $P<0.01$, * indicate significant differences at $P<0.05$.

的丰度抑制水平基因转移进而降低 ARGs 的丰度。

2.5 异位发酵床降解过程中 ARGs 和 *intI1* 的潜在宿主菌分析

为进一步探讨 ARGs 变化的影响因素,基于 Pearson 相关系数,进行网络分析。从图 8 可以看出,网络中 42 个节点(包括 6 种 ARG、*intI1* 和 35 个细菌属)间存在显著相关性($P<0.05$)。*Facklamia*、*Clostridiaceae_Clostridium* 和 *Turicibacter* 是 *tetW*、*ermQ*、*bla_{TEM-1}* 的共同潜在宿主菌,Li 等^[38]和 Zhou 等^[33]研究发现 *Facklamia*、*Clostridiaceae_Clostridium* 和 *Turicibacter* 是 *tetW*、*ermQ*、*bla_{TEM-1}* 的潜在宿主菌,与本研究结果一致,堆肥后这些菌属相对丰度显著降低可解释 *tetW*、*ermQ* 和 *bla_{TEM-1}* 相对丰度降低。*Epulopiscium*、*Aquabacterium* 和 *Clostridium* 等菌属分别为 *intI1* 和 *sul1*、*tetG*、*tetW*、*bla_{TEM-1}*、*ermQ* 共同潜在宿主菌,这与 Wang 等^[39]报道的 ARG 和 *intI1* 可同时共存于同一细菌中的结果一致,说明 *intI1* 和 ARGs 可能同时存在于同一细菌中,并可通过同一个细菌传播。*Prevotella* 是 *tetG* 和 *sul2* 的潜在宿主菌,*Dyella* 是 *tetG*、*sul1*、*sul2* 的潜在宿主菌,*Hyphomicrobium*、*Ruminofilibacter* 和 *Steroidobacter* 是 *sul1* 和 *sul2* 独有的潜在宿主菌,这与张鑫^[40]报道的 *Ruminofilibacter* 是 *sul1* 和 *sul2* 独有的潜在宿主菌的结果一致,堆肥后这些菌属的丰度增加,可解释 *tetG*、*sul1* 和 *sul2* 消除效果不理想。*Clostridium*、*Clostridiaceae_Clostridium*、*Shigella* 是 *tetG*、*tetW* 和 *intI1* 的潜在宿主菌,堆肥结束时 T1 和 T2 组中这 3 种菌属相对丰度较第 0 天分别降低了 11.05%、3.00%、0.64% 和 11.35%、3.23%、1.03%,可解释 T2 组 *tetG*、*tetW* 和 *intI1* 相对丰度降幅更大。本

研究中 *intI1* 的潜在宿主菌达 22 个,且与多个目标基因有共同潜在宿主菌,如 *Aquabacterium* 是 *sul1*、*tetG*、*tetW*、*bla_{TEM-1}*、*ermQ* 和 *intI1* 的共同潜在宿主菌,*Butyrivibrio* 是 *sul2*、*tetG*、*tetW*、*ermQ* 和 *intI1* 的共同潜在宿主菌,说明 ARGs 可能通过 *intI1* 介导的水平基因转移在



根据斯皮尔曼相关系数,连线代表显著正相关($P<0.05$),线的粗细代表相关性的程度,节点的大小表示 ARGs、*intI1* 和细菌属的相对丰度。

Connecting lines indicate significant positive correlations ($P<0.05$) according to the Spearman correlation coefficient, and the thickness of the line represents the magnitude of the correlation. The size of the nodes indicates the relative abundance of ARGs, *intI1* and bacterial genera.

图8 ARGs、*intI1* 和其潜在宿主菌的网络分析Figure 8 Network analysis of ARGs, *intI1* and their potential host bacteria

不同宿主菌间转移和传播^[41]。综上,粪污异位发酵床降解过程中可能主要是通过降低 ARGs 潜在宿主菌丰度及抑制 *int11* 介导的 ARGs 水平基因转移,从而降低多数 ARGs 的丰度。

3 结论

(1) 异位发酵床堆肥过程中翻堆有利于提高堆肥的温度,延长其高温期,改变细菌群落结构,显著降低 *int11* 和 ARGs 的相对丰度。

(2) 细菌群落和 *int11* 的变化是影响 ARGs 丰度变化的主要因素。此外,堆肥还能彻底清除或显著降低人类致病菌的丰度。

(3) 奶牛粪污异位发酵床降解过程中 2 d 翻堆 1 次可有效去除大部分 ARGs,降低环境中 ARGs 的传播风险。

参考文献:

- [1] TIAN M, HE X, FENG Y, et al. Pollution by antibiotics and antimicrobial resistance in live stock and poultry manure in China, and counter-measures[J]. *Antibiotics*, 2021, 10(5):539.
- [2] ZHANG Q Q, YING G G, PAN C G, et al. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China source analysis, multimedia modeling and linkage to bacterial resistance[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(11):6772-6782.
- [3] JIANG Y, LIANG X, YUAN L, et al. Effect of livestock manure on chlortetracycline sorption behaviour and mechanism in agricultural soil in northwest China[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 415: 129020.
- [4] SHEN Q, SUN H, YAO X, et al. A comparative study of pig manure with different waste straws in an ectopic fermentation system with thermophilic bacteria during the aerobic process: performance and microbial community dynamics[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 281: 202-208.
- [5] GUO H, ZHU C, GENG B, et al. Improved fermentation performance in an expanded ectopic fermentation system inoculated with thermophilic bacteria[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 198:867-875.
- [6] 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.
- [7] CHEN C, PANKOW C A, MIN O, 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.
- [8] 钱勋. 好氧堆肥对畜禽粪便中抗生素抗性基因的削减条件探索及影响机理研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2016. QIAN X. Exploration of the conditions for reduction of antibiotic resistance genes in livestock and poultry manure by aerobic composting and study of the influence mechanism[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2016.
- [9] SHEN Q, TANG J, SUN H, et al. Straw waste promotes microbial functional diversity and lignocellulose degradation during the aerobic process of pig manure in an ectopic fermentation system via metagenomic analysis[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 838:155637.
- [10] 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. Study on the abatement of antibiotics and resistance genes in livestock manure[D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2018.
- [11] LI K, CAO R, MO S, et al. Swine manure composting with compound microbial inoculants: removal of antibiotic resistance genes and their associations with microbial community[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11:592-599.
- [12] CHANG J L, JIANG T, ZHAO M X, et al. Variation pattern of antibiotic resistance genes and microbial community succession during swine manure composting under different aeration strategies[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2019, 95(2):466-473.
- [13] CHUNG W J, CHANG S W, CHAUDHARY D K, et al. Effect of bio-char amendment on compost quality, gaseous emissions and pathogen reduction during in-vessel composting of chicken manure[J]. *Chemosphere*, 2021, 283:131129.
- [14] MENG X Y, LIU B, ZHANG H, et al. Co-composting of the biogas residues and spent mushroom substrate: physicochemical properties and maturity assessment[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 276:281-287.
- [15] LV B Y, XING M Y, YANG J, et al. Speciation and transformation of heavy metals during vermicomposting of animal manure[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 209:397-401.
- [16] WANG J, BEN W, ZHANG Y, et al. Effects of thermophilic composting on oxytetracycline, sulfamethazine, and their corresponding resistance genes in swine manure[J]. *Environmental Science Processes & Impacts*, 2015;17(9):1654-1660.
- [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] 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.
- [19] WANG Q, GU J, WANG X, et al. Effects of nano-zerovalent iron on antibiotic resistance genes and mobile genetic elements during swine manure composting[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 258:113654.
- [20] 武晋萍, 陈建文, 刘勇, 等. 鸡粪与中药渣共堆肥对抗生素抗性基因的影响[J]. *环境科学*, 2019, 40(7):3276-3284. WU J P, CHEN J W, LIU Y, et al. Effect of chicken manure and Chinese medicine residue co-composting on antibiotic resistance genes[J]. *Environmental Science*, 2019, 40(7):3276-3284.
- [21] SELVAM A, XU D, ZHAO Z, et al. Fate of tetracycline, sulfonamide and fluoroquinolone resistance genes and the changes in bacterial diversity during composting of swine manure[J]. *Bioresource Technology*,

- 2012, 126:383–390.
- [22] CHEN Z, BAO H, WEN Q, et al. Effects of H_3PO_4 modified biochar on heavy metal mobility and resistance genes removal during swine manure composting[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 346: 126632.
- [23] LIU J, GU J, WANG X, et al. Evaluating the effects of coal gasification slag on the fate of antibiotic resistant genes and mobile genetic elements during anaerobic digestion of swine manure[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 271:24–29.
- [24] CAO R, BEN W, QIANG Z, et al. Removal of antibiotic resistance genes in pig manure composting influenced by inoculation of compound microbial agents[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 317: 123966.
- [25] 刘艳婷. 微生物菌剂对猪粪好氧堆肥过程中重金属钝化、抗生素与抗性基因削减的影响研究[D]. 广州: 广东工业大学, 2020. LIU Y T. Study on the effect of microbial agents on heavy metal passivation, antibiotics and resistance gene reduction in aerobic composting of pig manure[D]. Guangzhou: Guangdong University of Technology, 2020.
- [26] DUAN M, ZHANG Y, ZHOU B, et al. Changes in antibiotic resistance genes and mobile genetic elements during cattle manure composting after inoculation with *Bacillus subtilis*[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 292:122011.
- [27] FAN H F, WU S H, JOHN W, et al. Effective removal of antibiotic resistance genes and potential links with archaeal communities during vacuum-type composting and positive-pressure composting[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2020, 89:277–286.
- [28] WEN Q X, YANG S, CHEN Z Q. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of swine manure with sulfamethoxazole and norfloxacin: dynamics of microbial communities and evolution of resistance genes [J]. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2020, 15(5): 94–103.
- [29] ZHANG X, MA C, ZHANG W, et al. Shifts in microbial community, pathogenicity-related genes and antibiotic resistance genes during dairy manure piled up[J]. *Microbial Biotechnology*, 2020, 13(4): 1039–1053.
- [30] GUO H, GU J, WANG X, et al. Responses of antibiotic and heavy metal resistance genes to bamboo charcoal and bamboo vinegar during aerobic composting[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 252 (Pt B):1097–1105.
- [31] HUERTA B, MARTI E, GROS M, et al. Exploring the links between antibiotic occurrence, antibiotic resistance, and bacterial communities in water supply reservoirs[J]. *Science of the Total Environment*, 2013, 456/457:161–170.
- [32] SAM M Z, GUAN Q, YE C, et al. Network analysis suggests a potentially ‘evil’ alliance of opportunistic pathogens inhibited by a cooperative network in human milk bacterial communities[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1):8275.
- [33] ZHOU Z, SONG Z, GU J, et al. Dynamics and key drivers of antibiotic resistance genes during aerobic composting amended with plant-derived and animal manure-derived biochars[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 355:127236.
- [34] WANG L, ZHENG J, HUANG X. Co-composting materials can further affect the attenuation of antibiotic resistome in soil application[J]. *Waste Management*, 2021, 135:329–337.
- [35] 胡婷. 农业废弃物肥料化过程中功能基因和抗生素抗性基因变化机理研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2020. HU T. Study on the mechanism of functional genes and antibiotic resistance genes changes during fertilization of agricultural waste[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2020.
- [36] LI C, LI H, YAO T, et al. Microbial inoculation influences bacterial community succession and physicochemical characteristics during pig manure composting with corn straw[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 289:121653.
- [37] ZHANG L, GU J, WANG X, et al. Behavior of antibiotic resistance genes during co-composting of swine manure with Chinese medicinal herbal residues[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 244 (Pt 1): 252–260.
- [38] LI Y, GU J, WANG X, et al. The fate of antibiotic resistance genes and their influential factors in swine manure composting with sepiolite as additive[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 347:126727.
- [39] WANG J, GU J, WANG X, et al. Enhanced removal of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements during swine manure composting inoculated with mature compost[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 411:125135.
- [40] 张鑫. 抗生素对牛粪厌氧发酵功能微生物及抗性基因影响机理研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019. ZHANG X. Mechanistic study on the effect of antibiotics on functional microorganisms and resistance genes in anaerobic fermentation of cattle manure[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2019.
- [41] QIAN X, SUN W, GU J, et al. Reducing antibiotic resistance genes, integrons, and pathogens in dairy manure by continuous thermophilic composting[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 220:425–432.