

陈默, 高敏, 宋渊, 等. 堆肥过程逸散抗生素耐药菌气溶胶的浓度及粒径分布特征[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(7): 1633–1640.

CHEN Mo, GAO Min, SONG Yuan, et al. Characteristics of antibiotic-resistant bioaerosols during composting[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2019, 38(7): 1633–1640.

堆肥过程逸散抗生素耐药菌气溶胶的浓度及粒径分布特征

陈默^{1,2}, 高敏^{2*}, 宋渊¹, 程首涛², 高浩泽², 王旭明²

(1. 中国农业大学生物学院, 北京 100193; 2. 北京市农林科学院北京农业生物技术研究中心, 北京 100097)

摘要: 利用FA-I撞击式采样器采集5家堆肥厂内外生物气溶胶样本, 对具有抗生素耐药性的细菌气溶胶浓度和粒径分布进行检测, 并对其随传播距离的变化规律加以分析。结果表明: 堆肥生产区细菌气溶胶浓度高达 2.65×10^4 CFU·m⁻³。具有四环素和红霉素耐药性的气溶胶分别达到 9.54×10^3 CFU·m⁻³和 7.39×10^3 CFU·m⁻³, 占总细菌的36.44%和40.20%。以上3种生物气溶胶在细颗粒物中的相对丰度为13.04%~37.23%, 且该丰度随逸散距离的增加而呈现下降趋势。红霉素和四环素耐药菌动力学粒径研究结果显示, 两种耐药菌可能主要沉降在人体的咽喉部。

关键词: 堆肥; 生物气溶胶; 四环素耐药菌; 红霉素耐药菌; 粒径分布

中图分类号: X513 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2019)07-1633-08 doi:10.11654/jaes.2019-0009

Characteristics of antibiotic-resistant bioaerosols during composting

CHEN Mo^{1,2}, GAO Min^{2*}, SONG Yuan¹, CHENG Shou-tao², GAO Hao-ze², WANG Xu-ming²

(1. College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 2. Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract: In this study, an FA-I impact sampler was used to collect bioaerosols emitted from composting facilities and the surrounding environment. We detected the concentration and size distribution of antibiotic-resistant bioaerosols, and analyzed their variation with transmission distance. The results indicated that the concentration of bioaerosols in the composting area reached 2.65×10^4 CFU·m⁻³. The concentrations of tetracycline-resistant and erythromycin-resistant bioaerosols were 9.54×10^3 CFU·m⁻³ and 7.39×10^3 CFU·m⁻³, respectively. The corresponding ratio of the two antibiotic-resistant bioaerosols accounted for 36.44% and 40.20% of the total bioaerosols, respectively. This ratio decreased with the emitting distance. Based on the results of aerodynamic size, the two antibiotic-resistant bioaerosols would be deposited in the anterior nasal region in the human body. The results of this study provide reference data for evaluating the health risks and environmental pollution of bioaerosols during composting.

Keywords: composting; bioaerosol; tetracycline-resistant bacteria; erythromycin-resistant bacteria; size distribution

收稿日期: 2019-01-04 录用日期: 2019-03-19

作者简介: 陈默(1989—), 男, 吉林人, 博士研究生, 从事生物气溶胶和抗性基因研究。E-mail: cm_1222@163.com

*通信作者: 高敏 E-mail: gm_baafs@126.com

基金项目: 国家自然科学基金项目(51878053); 北京市农林科学院青年基金项目(QNJJ201620, QNJJ201905); 家禽产业技术体系北京市创新团队专项(BAIC04-2019)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China(51878053); Youth Foundation of Beijing Agriculture and Forestry Academy(QNJJ201620, QNJJ201905); Beijing Innovation Consortium Project for Poultry Industry Technology System(BAIC04-2019)

作为世界最大的抗生素生产国和消费国,我国每年有近一半的抗生素被用于畜牧业、农业和水产^[1]。抗生素的不规范使用为微生物耐药性选择进化提供了直接驱动力,导致耐药菌的出现和传播,影响了抗生素的治疗效果^[2]。此外,耐药菌所携带的抗性基因还会通过水平基因转移机制^[3],在不同微生物之间传播,最终威胁到人类健康。

目前,抗生素抗性基因被定义为一种新型环境污染物质,而动物粪便是环境中抗性基因的主要来源^[3]。随着我国集约化畜禽养殖业迅猛发展,大量排放的畜禽粪便对大气、水体及土地环境造成了严重污染^[4]。堆肥是利用微生物在一定条件下分解有机固体废弃物为腐殖质的生化转化过程^[5]。该技术作为一种有机固体废弃物稳定化、减量化和资源化的方法,被广泛应用于畜禽粪便、城市生活垃圾及剩余污泥等处理^[6]。然而研究结果显示,堆肥过程对粪便中的某些抗性基因的去除效果并不显著^[3]。

堆肥生产过程中,畜禽粪便中的抗生素耐药菌可逸散进入空气,形成生物气溶胶。生物气溶胶是指悬浮在气体介质中的生物颗粒,如细菌、真菌、病毒和孢子等。耐药菌以及抗性基因经气溶胶化后,可对堆肥场工人和周边环境造成危害。呼吸被认为是人类暴露于抗性基因和条件致病菌的重要途径^[7]。已有研究表明,在堆肥区下风向200 m处霉菌气溶胶浓度高达 1.3×10^5 CFU·m⁻³^[8]。并且,在堆肥厂外600 m处仍检测到嗜热放线菌气溶胶^[9]。本课题组也在堆肥场的堆肥区、装料区、生活区以及下风向均检测出多种高浓度抗生素抗性基因^[10]。

生物气溶胶作为一种胶体,其动力学粒径决定了传输距离和肺部沉降位置等。同种微生物受到温度、湿度或负载颗粒性质的影响,可导致其形成生物气溶胶后动力学粒径的差异,使得对人体健康造成的危害不同^[11]。例如,粗颗粒($d > 2.5 \mu\text{m}$)主要沉积在人体上呼吸道,而细颗粒($d < 2.5 \mu\text{m}$)可渗入并沉积在气管、支气管和肺泡区域更深处^[12]。然而,目前对堆肥厂空气环境中的抗生素耐药菌,特别是耐药菌粒径特征的研究鲜有报道。针对以上情况,本研究对堆肥厂及其周围环境中生物气溶胶的浓度进行监测,对总细菌、四环素和红霉素耐药菌气溶胶的浓度和动力学粒径分布规律进行分析,为堆肥过程中抗生素耐药菌在空气环境中的污染现状以及对工人的健康危害评估提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 采样地点和时间

本研究以北京市周边地区堆肥厂为研究对象,在2014年10月—2015年6月期间分别对平谷区、怀柔区和门头沟区5家堆肥厂的生产车间、生活区和周围环境(距生产区分别50、100、500 m和1000 m)中的生物气溶胶样本进行采集。所调查堆肥厂的主要堆肥原料为鸡粪和蘑菇渣。

1.2 采样方法和培养方法

生物气溶胶的采集使用Anderson六级采样仪,采样仪共设6级,每级400个孔,从上至下孔径逐级缩小,空气中的生物气溶胶粒子按粒径大小被捕获于采样器各级中的培养皿上,采样器各级粒径范围如下: Stage I $> 7.0 \mu\text{m}$, Stage II $4.7 \sim 7.0 \mu\text{m}$, Stage III $3.3 \sim 4.7 \mu\text{m}$, Stage IV $2.1 \sim 3.3 \mu\text{m}$, Stage V $1.1 \sim 2.1 \mu\text{m}$ 和 Stage VI $0.65 \sim 1.1 \mu\text{m}$ 。采样时空气流量为 $28.3 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$,采样时间为1 min,采样高度为距离地面1.5 m。每个采样点进行3组平行采样,每次采样前用流量计(余姚,中国)对采样泵的流量进行校准。采样结束后将培养皿密封好,立即放入装有冰袋的保温箱运回实验室,放入 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中培养48 h后,进行菌落计数,并采用Positive hole method方法对菌落数进行相应校正^[13]。

1.3 培养基的配制

细菌培养采用9 cm培养皿,灭菌后在无菌条件下注入约20 mL培养基。总细菌采用LB营养琼脂培养基。红霉素、四环素耐药菌采用抗生素抗性培养基^[14]。

抗生素抗性培养基配制:首先将四环素和红霉素分别配成初始浓度为 $16 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $48 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的母液,其中,四环素母液的溶剂为超纯水,采用 $0.22 \mu\text{m}$ 水相滤头(聚醚砜)过滤,红霉素母液的溶剂为95%乙醇,采用 $0.22 \mu\text{m}$ 有机相滤头(尼龙)过滤。使用时分别取相应上述抗生素母液,加入到冷却至 $45 \sim 50 \text{ }^\circ\text{C}$ 已灭菌的LB营养琼脂培养基中,使四环素和红霉素培养基的最终浓度分别为 $16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $48 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.4 计算方法

1.4.1 总细菌气溶胶浓度

根据采样时间和气体流量,利用公式(1)计算各级空气带菌粒子的数量。

$$C = \frac{N \times 1000}{t \times F} \quad (1)$$

式中: C 为细菌气溶胶浓度, $\text{CFU}\cdot\text{m}^{-3}$; N 为各级菌落数; t 为采样时间, min ; F 为采样时的气体流量, $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

1.4.2 抗生素耐药菌气溶胶浓度所占比例

$$\eta = \frac{C_{\text{耐药菌}}}{C_{\text{总细菌}}} \times 100\% \quad (2)$$

式中: η 为耐药菌的丰度; $C_{\text{耐药菌}}$ 为耐药菌气溶胶浓度, $\text{CFU}\cdot\text{m}^{-3}$; $C_{\text{总细菌}}$ 为细菌气溶胶浓度, $\text{CFU}\cdot\text{m}^{-3}$ 。

1.4.3 细颗粒物负载细菌和抗生素耐药菌气溶胶比例

本研究将粒径 $D_{50} \leq 2.1 \mu\text{m}$ (Stage IV) 定义为细颗粒物。细颗粒物所负载细菌和耐药菌气溶胶比例 (FBT) 计算公式如下:

$$\text{FBT} = \frac{B_{\text{IV}} + B_{\text{V}} + B_{\text{VI}}}{B_{\text{I}} + B_{\text{II}} + B_{\text{III}} + B_{\text{IV}} + B_{\text{V}} + B_{\text{VI}}} \times 100\% \quad (3)$$

式中: B_{I} 、 B_{II} 、 B_{III} 、 B_{IV} 、 B_{V} 、 B_{VI} 分别为分布在 Stage I、Stage II、Stage III、Stage IV、Stage V 和 Stage VI 粒径范围内的耐药菌气溶胶浓度, $\text{CFU}\cdot\text{m}^{-3}$ 。

1.4.4 空气环境中细菌和抗性菌的动力学粒径计算^[11]

动力学粒径几何平均值 (d_g) 和几何标准偏差 (σ_g) 计算方法如下:

$$d_g = \exp\left(\frac{\sum c_i \ln d_i}{S}\right) \quad (4)$$

$$\ln \sigma_g = \exp\left(\frac{\sum c_i (\ln d_i - \ln d_g)^2}{S}\right) \quad (5)$$

式中: c_i 指在第 i 个粒径区间测量的细菌或耐药菌气溶胶的平均浓度, $\text{CFU}\cdot\text{m}^{-3}$; d_i 指在第 i 个粒径区间的中值径, μm ; S 指所有粒径平均浓度的总和, $\text{CFU}\cdot\text{m}^{-3}$ 。

1.5 数据统计分析

空气微生物与逸散距离之间的回归分析,以及耐药菌比率与逸散距离之间的一元回归在 Origin 8.5 中完成。利用 SPSS 21.0 进行数据的差异显著性比较,当 P 值小于 0.05 时,表明在 95% 的置信区间内具有统计学意义上的显著差异。

2 结果与讨论

2.1 堆肥厂及周边环境中抗生素耐药菌气溶胶浓度分布规律

首先对所选定堆肥厂及周边空气环境中的可培养细菌、四环素耐药菌和红霉素耐药菌气溶胶浓度进行检测,结果如图 1 所示。堆肥生产区总细菌气溶胶平均浓度为 $(2.65 \pm 2.15) \times 10^4 \text{CFU}\cdot\text{m}^{-3}$, 该结果高于北京城市空气中细菌气溶胶的检测结果 ($10^2 \sim 10^3 \text{CFU}\cdot\text{m}^{-3}$)^[15-16]。

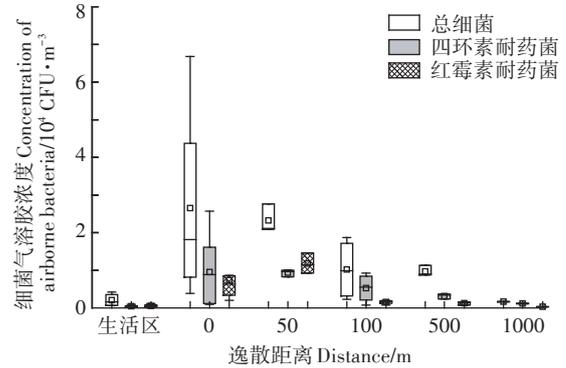


图 1 堆肥厂及周边环境细菌及耐药菌生物气溶胶浓度分布

Figure 1 Concentrations of airborne bacteria and antibiotic resistant bacteria in composting facility and surrounding environment

与前人对伦敦^[17]和伊朗^[18]的堆肥厂空气中细菌气溶胶的检测结果相似(浓度分别为 $1.23 \times 10^4 \text{CFU}\cdot\text{m}^{-3}$ 和 $9.3 \times 10^3 \text{CFU}\cdot\text{m}^{-3}$),说明堆肥厂空气可能受到了生物气溶胶的污染。同时,本研究在堆肥厂生产区检测到了四环素和红霉素耐药的细菌气溶胶,浓度分别为 $(9.54 \pm 8.68) \times 10^3 \text{CFU}\cdot\text{m}^{-3}$ 和 $(7.39 \pm 5.05) \times 10^3 \text{CFU}\cdot\text{m}^{-3}$ 。畜禽粪便被认为是养殖场空气中生物气溶胶的主要来源^[19],猪舍和鸡舍内空气中四环素和红霉素耐药菌的平均浓度分别高达 $10^3 \text{CFU}\cdot\text{m}^{-3}$ 和 $10^4 \text{CFU}\cdot\text{m}^{-3}$ 。由此推断,堆肥原料粪便中逸散的抗生素耐药菌可能是生产区空气中耐药菌的主要来源。

本研究在堆肥厂的生活区也检测到了四环素耐药菌和红霉素耐药菌,浓度分别为 $(4.45 \pm 2.78) \times 10^2 \text{CFU}\cdot\text{m}^{-3}$ 和 $(5.51 \pm 3.92) \times 10^2 \text{CFU}\cdot\text{m}^{-3}$ (图 1),红霉素耐药菌的平均浓度高于四环素耐药菌,但两者间差异不显著 ($P > 0.05$)。生活区是堆肥厂员工日常活动和休息的区域,耐药菌的检出说明该区域空气可能已经受到了污染。虽然生活区总细菌气溶胶浓度为 $(2.06 \pm 1.50) \times 10^3 \text{CFU}\cdot\text{m}^{-3}$,较生产区低 1 个数量级 ($P < 0.05$),但是耐药菌的检出仍需引起注意。

为了评估堆肥厂对周边空气环境造成的污染,对其周边不同距离空气环境中抗生素耐药菌的浓度进行了检测。结果显示,生产区总细菌气溶胶的浓度为 $(2.65 \pm 2.15) \times 10^4 \text{CFU}\cdot\text{m}^{-3}$,生产区外 50、100、500 m 和 1000 m 处,细菌气溶胶的浓度分别为 $(2.32 \pm 0.38) \times 10^4$ 、 $(1.02 \pm 0.82) \times 10^4$ 、 $(9.7 \pm 1.4) \times 10^3 \text{CFU}\cdot\text{m}^{-3}$ 和 $(1.66 \pm 0.05) \times 10^3 \text{CFU}\cdot\text{m}^{-3}$,分别降低至堆肥区的 87.61%、38.42%、36.57% 和 6.26%。四环素和红霉素耐药菌随传播距离的消减趋势与总细菌气溶胶相似:

在 100 m 处,两种耐药菌的检出浓度分别降低至 $(5.27 \pm 3.88) \times 10^3 \text{ CFU} \cdot \text{m}^{-3}$ 和 $(1.55 \pm 0.54) \times 10^3 \text{ CFU} \cdot \text{m}^{-3}$,分别是生产区浓度的 55.21% 和 21.04%;在 1000 m 处,浓度分别为 $(1.17 \pm 0.11) \times 10^3 \text{ CFU} \cdot \text{m}^{-3}$ 和 $(3.3 \pm 0.1) \times 10^2 \text{ CFU} \cdot \text{m}^{-3}$,分别为生产区浓度的 12.31% 和 4.42%。本阶段研究结果表明,堆肥厂下风向空气被抗生素耐药菌污染,下风向中多种抗生素抗性基因的检出也证实了本研究结果^[10]。

本研究对空气中总细菌和抗生素耐药菌平均浓度随逸散距离的变化规律进行了回归分析,结果如图 2 所示。整体上,在距离堆肥厂 100 m 处生物气溶胶浓度下降最为显著 ($P < 0.05$)。在生产区外 1000 m 处,总细菌气溶胶平均浓度远低于场内,下降了 1 个数量级。已有研究表明,堆肥厂逸散的生物气溶胶浓度随着逸散距离迅速降低,在距逸散源约 250 m 处降至与环境背景浓度 ($10^3 \text{ CFU} \cdot \text{m}^{-3}$) 相似^[20-21]。通过回归公式计算,本研究所调查的堆肥厂空气中全部细菌和两种抗生素耐药菌浓度在 250 m 处分别为 1.61×10^4 、 $6.3 \times 10^3 \text{ CFU} \cdot \text{m}^{-3}$ 和 $5.1 \times 10^3 \text{ CFU} \cdot \text{m}^{-3}$ 。细菌浓度高于英国环境局关于堆肥厂生产操作标准的规定^[22-23]。目前,我国还未建立堆肥生产中逸散生物气溶胶浓度的相关行业标准,这一问题需引起相关部门的重视。建议制定相应的标准,以保护堆肥生产员工和周边居民的健康。浓度降低趋势在 500 m 处有所放缓,在 1000 m 处降低至 $10^3 \text{ CFU} \cdot \text{m}^{-3}$ 。尽管如此,相应抗生素耐药菌的浓度仍达到 $10^2 \text{ CFU} \cdot \text{m}^{-3}$ 。本研究在堆肥厂区以及周边空气中抗生素耐药菌的检出,表明抗生素耐药菌可作为一种空气污染的评价

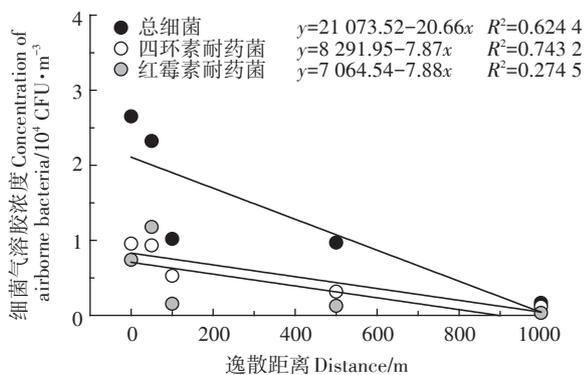


图2 堆肥厂及周边环境细菌及耐药菌生物气溶胶浓度随距离的回归分析

Figure 2 Regression analysis between the concentrations of airborne bacteria and antibiotic resistant bacteria and emitting distance

指标。

堆肥厂及周边空气中四环素和红霉素耐药菌的相对丰度分布结果如图 3 所示。堆肥生产区四环素和红霉素耐药性气溶胶占总细菌的相对丰度高达 36.44% 和 40.20%,这与养殖场空气的研究结果相近^[24]。四环素耐药菌所占总细菌的比例随逸散距离有所升高,我们将相对丰度 y 与逸散距离 x 之间的关系进行线性拟合分析,发现四环素耐药菌所占比例随逸散距离的增加而升高,得到关系公式 $y = 39.14 + 0.024x$ ($R^2 = 0.22$)。红霉素耐药菌所占比例与四环素耐药菌相反,其在总细菌中的相对丰度随距离的增加而降低,线性拟合公式为 $y = 40.92 - 0.028x$ ($R^2 = 0.42$)。在距离生产区 1000 m 处,四环素和红霉素耐药菌的相对丰度分别为 $(70.67 \pm 4.64)\%$ 和 $(19.68 \pm 0.16)\%$ 。分析其原因,堆肥厂逸散的空气细菌以及抗生素耐药菌逸散出场外,在传输过程中受到温度、湿度和紫外线等环境因素的影响^[25],加之周围空气的稀释作用,使得包括抗生素耐药菌在内的所有空气细菌整体上浓度呈现降低趋势(图 1)。其他来源的细菌对空气中细菌气溶胶的持续补充导致红霉素耐药菌相对丰度随距离呈现下降趋势。四环素耐药菌相对丰度的增加可能是因为某些抗生素耐药菌在获得抗生素耐药性后,其抗逆性增加,即对于环境因子(温度和湿度)的抵抗力增加^[26],导致其绝对浓度随距离下降缓慢,相对丰度有所增加。

2.2 堆肥厂及周边环境中细颗粒物负载抗生素耐药菌气溶胶浓度分布规律

鉴于细颗粒物对人类健康的危害较大,本阶段对细颗粒物负载的细菌、四环素以及红霉素耐药菌的浓度展开研究,结果如图 4 所示。堆肥生产区细颗粒物

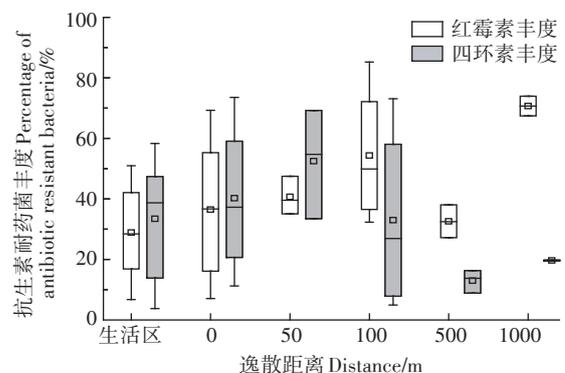


图3 堆肥厂及周边环境中耐药菌生物气溶胶丰度分布
Figure 3 Percentage of airborne antibiotic resistant bacteria in composting facility and surrounding environment

负载细菌气溶胶平均浓度为 $(8.12\pm 7.50)\times 10^3$ CFU·m⁻³,其中具有四环素和红霉素耐药性的细菌气溶胶浓度分别为 $(2.05\pm 2.07)\times 10^3$ CFU·m⁻³和 $(2.59\pm 3.46)\times 10^3$ CFU·m⁻³。根据公式3计算可得,细颗粒物负载的细菌、四环素和红霉素耐药菌在总颗粒物中所占相应比率分别为30.63%、21.46%和35.17%,说明堆肥厂逸散的以上3种生物气溶胶主要分布在粗颗粒物表面。在细颗粒物中,红霉素耐药菌的浓度高于四环素耐药菌,这与总颗粒物的结果相反(图1)。生活区细颗粒物负载的细菌浓度为 $(4.36\pm 3.12)\times 10^2$ CFU·m⁻³,该区域四环素耐药菌和红霉素耐药菌的浓度均远低于生产区,分别为 94 ± 73 CFU·m⁻³和 $(1.06\pm 1.10)\times 10^2$ CFU·m⁻³,分别占细颗粒物中总细菌的21.19%和19.25%。研究结果表明,虽然生活区受到污染,但是该区域可入肺部分的四环素和红霉素耐药菌所占比例相近,且均低于生产区($P<0.05$)。

对堆肥厂逸散细颗粒物负载抗生素耐药菌浓度随逸散距离变化的研究,将有助于我们准确评估其对人体造成的危害。本研究结果显示,细颗粒物负载细菌和两种抗生素耐药菌的浓度随着逸散距离增加均呈现下降趋势(图4)。生产区细颗粒物负载总细菌气溶胶的浓度为 $(8.12\pm 7.50)\times 10^3$ CFU·m⁻³,生产区外50、100、500 m和1000 m处的相应浓度分别为 $(8.74\pm 2.90)\times 10^3$ 、 $(2.13\pm 1.98)\times 10^3$ 、 $(1.48\pm 0.23)\times 10^3$ CFU·m⁻³和 $(6.2\pm 0.24)\times 10^2$ CFU·m⁻³。厂外1000 m处浓度降低至生产区的7.62%。细颗粒物负载四环素和红霉素耐药菌也随传播距离增加而呈现消减趋势;在100 m处,浓度降低幅度最大,分别降至 $(1.08\pm 1.02)\times 10^3$ CFU·m⁻³和 $(3.6\pm 3.4)\times 10^2$ CFU·m⁻³,是生产区浓度的52.63%和13.93%;在1000 m处,两种耐药菌的检

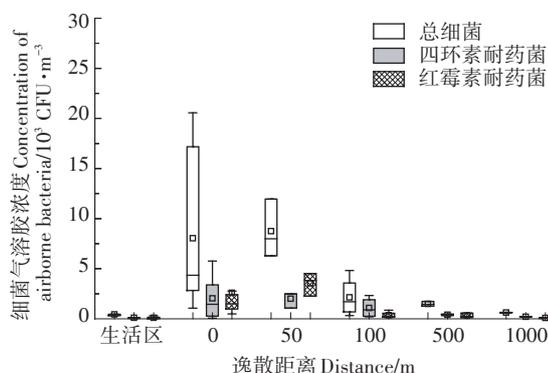


图4 堆肥厂及周边环境细颗粒物负载细菌气溶胶浓度分布
Figure 4 The concentration of airborne bacteria loading by fine particles in composting facility and surrounding environment

出浓度为 $(2.03\pm 0.12)\times 10^3$ CFU·m⁻²和 $(8.8\pm 4.9)\times 10^2$ CFU·m⁻³,分别是生产区浓度的9.92%和3.40%。结果表明,细颗粒物负载的细菌和耐药菌随逸散距离变化的规律与总细菌相一致。浓度和距离之间的回归分析结果如图5所示。通过回归公式计算,在250 m处,空气中总细菌和两种抗生素耐药菌的浓度分别为 4.77×10^3 、 1.29×10^3 CFU·m⁻³和 1.58×10^3 CFU·m⁻³。其中细颗粒物中总细菌气溶胶浓度在英国环境局关于堆肥厂生产操作标准规定^[23-24]范围之内,但是细颗粒物中高浓度抗生素耐药菌的检出表明,在距堆肥厂250 m范围内的空气仍存在生物风险。

同时,本研究考察了细颗粒物负载生物气溶胶(细菌和两种抗生素耐药菌)在总颗粒物中所占的比率。整体上,细颗粒物负载红霉素耐药菌在总颗粒物负载红霉素耐药菌的比率 $(28.03\pm 3.65\%)$ 高于四环素耐药菌的比率 $(18.74\pm 2.86\%)$ ($P<0.05$)。随着逸散距离的增加,细颗粒物负载细菌与总颗粒物负载细菌的比率没有显著变化 $(28.35\pm 8.18\%)$ 。细颗粒物负载生物气溶胶(细菌、两种抗生素耐药菌)在总颗粒物中所占的比率呈现下降趋势。经回归分析,四环素和红霉素耐药菌所占比率与距离之间的关系分别是 $y=20.57-0.0056x$ ($R^2=0.23$)和 $y=29.44-0.0043x$ ($R^2=0.14$)。

两种抗生素耐药菌在细菌中的相对丰度分析结果如图6所示。在生活区内,空气中细颗粒物负载四环素和红霉素耐药菌的相对丰度分别为 $31.22\pm 21.10\%$ 和 $30.55\pm 19.03\%$ 。在堆肥区,其相应丰度分别是 $23.56\pm 11.77\%$ 和 $34.66\pm 12.41\%$ 。随着逸

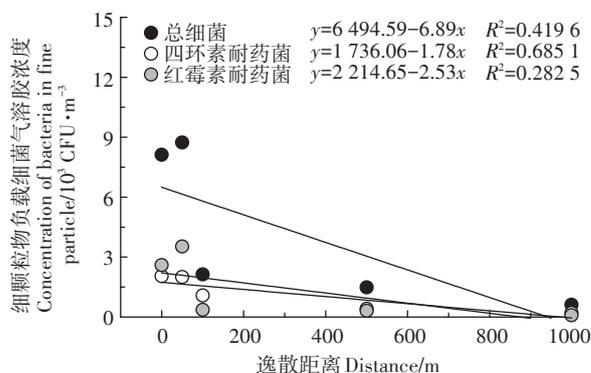


图5 堆肥厂及周边环境细菌及耐药菌生物气溶胶浓度随距离回归分析

Figure 5 Regression analysis between the concentrations of airborne bacteria and antibiotic resistant bacteria and emitting distance

散距离的增加,细颗粒物中四环素和红霉素耐药菌相对丰度呈现出不同的趋势。相对丰度与距离的回归分析结果分别是 $y=27.87+0.0047x$ ($R^2=0.23$) 和 $y=34.99-0.023x$ ($R^2=0.47$)。

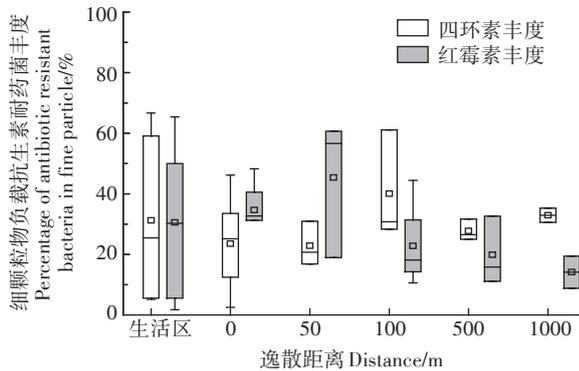


图6 堆肥厂及周边环境细颗粒物负载抗生素耐药菌气溶胶丰度分布

Figure 6 The percentage of airborne bacteria loading by fine particles in composting facility and surrounding environment

2.3 堆肥厂及周边环境中抗生素耐药菌气溶胶粒径分布规律

2.3.1 堆肥厂及周边环境细菌和耐药菌气溶胶粒径分布特点

各采样点细菌气溶胶的粒径分布情况如图7所示。由图可知,整体上,6个采样点的最高浓度均在4.7~7.0 μm (Stage II) 范围内检测到,但各采样点的具体粒径分布特点有所差异。其中,生产区(0 m)细菌气溶胶浓度在3.3~4.7 μm 和4.7~7.0 μm 两个粒径范围内整体较高,分别为 $1.7 \times 10^4 \text{ CFU} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d} \lg \text{Dp}^{-1}$ 和 $2.3 \times 10^4 \text{ CFU} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{d} \lg \text{Dp}^{-1}$ 。根据以往报道,这一粒径范围的气溶胶被人体吸入后主要沉降在鼻腔、口腔和咽部^[27]。在50 m处,粒径较小的细菌气溶胶浓度整体高于其他采样点。本研究结果显示,随着逸散距离的增加,各点的最高浓度所在粒径范围没有变化(4.7~7.0 μm)。目前,国内外还没有针对堆肥厂生物气溶胶粒径分布的相关研究。张兰河等^[24]对养殖场细菌气溶胶粒径分布情况的研究显示,肉鸡、牛和猪舍内细菌气溶胶的最大浓度分布在3.3~4.7 μm (Stage III) 范围内,与本研究结果有所差异。可能是因为不同环境中细菌气溶胶的粒径分布规律受到环境因素影响而呈现出不同的分布特征。

四环素耐药菌气溶胶在堆肥厂及周边的粒径分布情况如图8所示。与总细菌的粒径分布规律相似,各采样点空气中最高浓度的四环素耐药菌均在Stage II

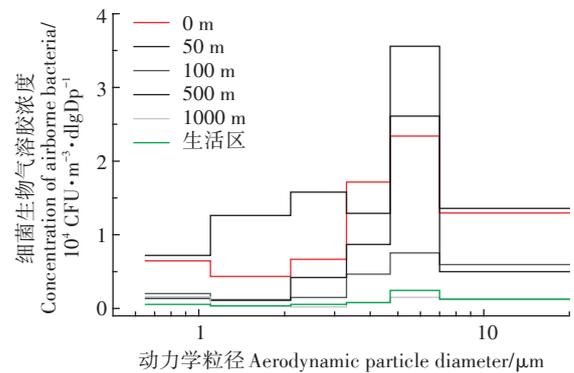


图7 堆肥厂及周边空气中细菌气溶胶浓度分布

Figure 7 The size distribution of airborne bacteria in composting facility and surrounding environment

(4.7~7.0 μm)内检测到,其次是在Stage III (3.3~4.7 μm)和Stage IV (2.1~3.3 μm)两个粒径范围中。目前,国内外未见关于抗生素耐药菌粒径分布的相关报道。Gao等^[12]对养鸡场空气中四环素抗性基因的粒径分布研究结果显示, *tetW* 和 *tetL* 的最高浓度也分布在较大粒径范围内(>5.8 μm)。随着逸散距离的增加,不同粒径内的四环素耐药菌浓度分布发生的变化有所差异。例如,在50 m和100 m处,Stage II和Stage III内的四环素耐药菌浓度均有所升高,而Stage IV (2.1~3.3 μm)内的浓度有所降低。某个粒径范围内四环素耐药菌浓度的变化,可以导致其动力学粒径的变化,从而影响其整体上在人体肺部的沉降位置。

红霉素耐药菌的粒径分布研究结果如图9所示。与四环素耐药菌类似,最高浓度同样在Stage II (4.7~7.0 μm)检出。这与前期对鸡场、猪场和牛场空气中红霉素耐药菌的粒径分布规律研究结果有所差异^[24],养殖场最高浓度的红霉素耐药菌主要分布在Stage III

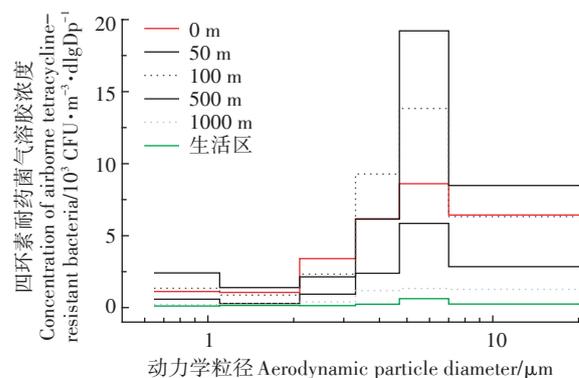


图8 堆肥厂及周边空气中四环素耐药菌气溶胶浓度分布
Figure 8 The size distribution of airborne tetracycline-resistant bacteria in composting facility and surrounding environment

(3.3~4.7 μm)。随着逸散距离的增加,各粒径范围内红霉素耐药菌的浓度也发生变化。在50 m处,2个大粒径范围内的红霉素耐药菌浓度均有所升高。其中在Stage II内升高至 $1.7\times 10^4 \text{ CFU}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{d}\lg\text{Dp}^{-1}$ 。而小粒径颗粒物负载的红霉素耐药菌浓度均有所降低。在堆肥厂50 m处,各个粒径范围内的红霉素耐药菌浓度均低于生产区。

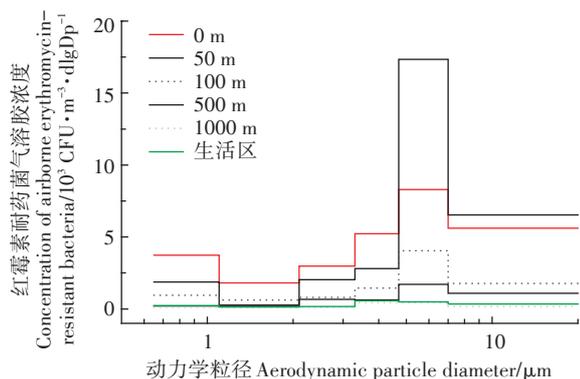


图9 堆肥厂及周边空气环境中红霉素耐药菌气溶胶浓度分布

Figure 9 The size distribution of airborne erythromycin-resistant bacteria in composting facility and surrounding environment

2.3.2 堆肥厂及周边环境生物气溶胶的空气动力学粒径特点

空气动力学粒径指的是单位密度($1 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$)的球体,在静止空气中做低雷诺数运动时,达到与实际粒子相同的最终沉降速度时的直径^[11],即将空气中的颗粒粒径换成具有相同空气动力学特性的等效直径。掌握堆肥厂空气中耐药菌的动力学粒径将有助于评估其整体在人体呼吸系统上的沉降位置。

本研究根据公式(4)和公式(5)计算了各采样点生物气溶胶空气动力学粒径的几何平均值(d_g)和标准偏差(σ_g)。如表1所示,堆肥生产过程中的总细菌、四环素和红霉素耐药菌的动力学粒径范围分别为4.33~6.12、6.11~6.70 μm 和4.00~6.12 μm 。在堆肥厂及周边空气环境中,四环素耐药菌的动力学粒径整体上高于总细菌($P<0.01$)和红霉素耐药菌($P<0.05$),说明后两种生物气溶胶进入肺部后的沉降位置更深。根据已报道文献^[27],在生产区和生活区,所考察的3种生物气溶胶均可能主要沉降在咽部(4.7~7.0 μm)。总细菌在50 m和1000 m、红霉素耐药菌在100 m和1000 m可能主要沉降在气管和一级支气管中,而不同采样点的四环素耐药菌可能主要沉降在上呼吸道的咽部^[27]。

生物气溶胶的粒径分布受许多生物与非生物因

素的影响,如微生物种类、环境中的营养组分以及周边空气的相对湿度^[21,25]等。另外,堆肥厂中相当一部分生物气溶胶会以聚合物的形式存在,细菌颗粒与空气中小液滴、灰尘微粒及其他微生物粒子结合,形成成分复杂的聚合物^[28],这也会对生物气溶胶的粒径造成影响。以上原因可能导致不同粒径内微生物的浓度随着逸散距离发生变化,从而影响其相应的动力学粒径。但本研究并没有检测到3种生物气溶胶的空气动力学粒径随距离变化的一致规律。

表1 堆肥厂及周边环境生物气溶胶的空气动力学粒径

Table 1 Aerodynamic diameter of bioaerosol in composting facilities and surrounding environment

采样点	总细菌		四环素耐药菌		红霉素耐药菌	
	$d_g/\mu\text{m}$	σ_g	$d_g/\mu\text{m}$	σ_g	$d_g/\mu\text{m}$	σ_g
0 m	5.01	2.44	6.35	2.18	4.80	2.63
50 m	4.45	2.40	6.39	2.17	5.85	2.31
100 m	6.12	2.43	6.40	2.02	4.00	2.72
500 m	5.68	1.90	6.70	2.06	6.12	2.26
1000 m	4.33	3.00	6.36	2.28	4.66	2.24
生活区	5.92	2.32	6.11	2.27	5.68	2.35

3 结论

本研究结果表明,堆肥生产区细菌气溶胶浓度可达 $10^4 \text{ CFU}\cdot\text{m}^{-3}$,具有四环素和红霉素耐药性的气溶胶浓度在 $10^3 \text{ CFU}\cdot\text{m}^{-3}$ 左右,占总细菌的30%~40%。在生活区检测出较高浓度的抗生素耐药菌,细颗粒物负载的细菌为 $8.1\times 10^3 \text{ CFU}\cdot\text{m}^{-3}$ 。堆肥厂周围生物气溶胶浓度随距离增加呈递减趋势,在距离堆肥生产区50~100 m处消减趋势最明显。细菌及各耐药菌最大浓度均在4.7~7.0 μm 粒径范围检出,整体上可能主要沉降在人体呼吸系统上的咽部。

参考文献:

- [1] 彭凤姣, 应光国, 周丽君, 等. 氧四环素在典型土壤中的吸附/解吸行为及其吸附态生物有效性研究[J]. 地球化学, 2015, 44(1): 71-78. PENG Feng-jiao, YING Guang-guo, ZHOU Li-jun, et al. Adsorption and desorption of oxytetracycline on typical soils and soil-adsorbed oxytetracycline's bioavailability[J]. *Geochimica*, 2015, 44(1): 71-78.
- [2] Arias C A, Murray B E, Murray B E. Antibiotic-resistant bugs in the 21st Century: A clinical super-challenge[J]. *New England Journal of Medicine*, 2009, 360(5): 439-443.
- [3] Zhu Y G, Johnson T A, Su J Q, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(9): 3435-3440.
- [4] 郑嘉熹, 魏源送, 吴晓凤, 等. 猪粪堆肥过程保氮固磷及温室气体

- (N₂O)减排研究[J]. 环境科学, 2011, 32(7):2047-2055.
- ZHENG Jia-xi, WEI Yuan-song, WU Xiao-feng, et al. Nutrients conservation of N & P and greenhouse gas reduction of N₂O emission during swine manure composting[J]. *Environmental Science*, 2011, 32(7): 2047-2055.
- [5] 唐景春, 孙青, 王如刚, 等. 堆肥过程中腐植酸的生成演化及应用研究进展[J]. 环境污染与防治, 2010, 32(5):73-77.
- TANG Jing-chun, SUN Qing, WANG Ru-gang, et al. Formation and evolution of humic acid during composting process and its application [J]. *Environmental Pollution and Control*, 2010, 32(5):73-77.
- [6] 崔东宇, 何小松, 席北斗, 等. 牛粪堆肥过程中水溶性有机物演化的光谱学研究[J]. 中国环境科学, 2014, 34(11):2897-2904.
- CUI Dong-yu, HE Xiao-song, XI Bei-dou, et al. Spectrum analysis on the evolution of dissolved organic matter during cattle manure composting[J]. *China Environmental Science*, 2014, 34(11):2897-2904.
- [7] Valérie L, Benjamin N, Anne M, et al. Human pathogens and tetracycline-resistant bacteria in bioaerosols of swine confinement buildings and in nasal flora of hog producers[J]. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2010, 213(6):444-449.
- [8] Herr C E W, Nieden A Z, Jankofsky M, et al. Effects of bioaerosol polluted outdoor air on airways of residents: A cross sectional study[J]. *Occupational & Environmental Medicine*, 2003, 60(5):336-342.
- [9] Fischer G, Albrecht A, Jäckel U, et al. Analysis of airborne microorganisms, MVOC and odour in the surrounding of composting facilities and implications for future investigations[J]. *International Journal of Hygiene & Environmental Health*, 2008, 211(1):132-142.
- [10] Gao M, Qiu T, Sun Y, et al. The abundance and diversity of antibiotic resistance genes in the atmospheric environment of composting plants [J]. *Environment International*, 2018, 116:229-238.
- [11] Yamamoto N, Bibby K, Qian J, et al. Particle-size distributions and seasonal diversity of allergenic and pathogenic fungi in outdoor air[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(10):1801-1811.
- [12] Gao M, Jia R, Qiu T, et al. Size-related bacterial diversity and tetracycline resistance gene abundance in the air of concentrated poultry feeding operations[J]. *Environmental Pollution*, 2016, 220 (Part B): 1342-1348.
- [13] Andersen A A. New sampler for the collectin, sizing, and enumeration of viable airborne particles[J]. *Journal of bacteriology*, 1958, 76(5): 471-484.
- [14] Yang Q, Hao Z, Guo Y, et al. Influence of chicken manure fertilization on antibiotic-resistant bacteria in soil and the endophytic bacteria of pakchoi[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2016, 13(7):662.
- [15] Gao M, Jia R, Qiu T, et al. Seasonal size distribution of airborne culturable bacteria and fungi and preliminary estimation of their deposition in human lungs during non-haze and haze days[J]. *Atmospheric Environment*, 2015, 118:203-210.
- [16] Fang Z, Ouyang Z, Zheng H. Concentration and size distribution of culturable airborne microorganisms in outdoor environments in Beijing, China[J]. *Aerosol Science and Technology*, 2008, 42(5):325-334.
- [17] Pankhurst L J, Akeel U, Hewson C, et al. Understanding and mitigating the challenge of bioaerosol emissions from urban community composting[J]. *Atmospheric Environment*, 2011, 45(1):85-93.
- [18] Nikaee M H, Mirhendi M, Hatamzadeh E, et al. Bioaerosol emissions from composting facilities as a potential health risk for composting workers[J]. *Ecosystems and Development*, 2009, 55:27-29.
- [19] Kumari P, Choi H L. Seasonal variability in airborne biotic contaminants in swine confinement buildings[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112897.
- [20] Taha M P, Pollard S J, Sarkar U, et al. Estimating fugitive bioaerosol releases from static compost windrows: Feasibility of a portable wind tunnel approach[J]. *Waste Management*, 2005, 25(4):445-450.
- [21] Wéry N. Bioaerosols from composting facilities: A review[J]. *Frontiers in Cellular & Infection Microbiology*, 2014, 4(4):42.
- [22] Environment Agency. Health effects of composting. A study of three compost sites and review of past data[R]. UK: Environment Agency, 2001.
- [23] Environment Agency. Composting and potential health effects from bioaerosols: Our interim guidance for permit applicants[R]. UK: Environment Agency, 2010.
- [24] 张兰河, 贺雨伟, 陈默, 等. 畜禽养殖场空气中可培养抗生素耐药菌污染特点研究[J]. 环境科学, 2016, 37(12):4531-4537.
- ZHANG Lan-he, HE Yu-wei, CHEN Mo, et al. Pollution characteristics of antibiotic resistant bacteria from atmospheric environment of animal feeding operations[J]. *Environmental Science*, 2016, 37(12): 4531-4537.
- [25] Jones A M, Harrison R M. The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations: A review[J]. *Science of the Total Environment*, 2004, 326(1/2/3):151-180.
- [26] Yang Q, Wang R, Ren S, et al. Practical survey on antibiotic-resistant bacterial communities in livestock manure and manure-amended soil [J]. *Journal of Environmental Science and Health Part B Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 2015, 51(1):1-10.
- [27] Xu Z, Yao M. Monitoring of bioaerosol inhalation risks in different environments using a six-stage Andersen sampler and the PCR-DGGE method[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2013, 185(5): 3993-4003.
- [28] Brown G, Mohr A. Fate and transport of microorganisms in air[M]// Yates M, Nakatsu C, Miller R, et al. Manual of Environmental Microbiology, 4th Edition. Washington, DC: ASM Press, 2015.