

稻田土壤 CH_4 排放及其关联微生物功能基因丰度对磺胺二甲嘧啶和铜污染的反应

程粟裕, 朱长俊, 李昕钰, 董宁, 周金蓉, 蒋静艳

引用本文:

程粟裕, 朱长俊, 李昕钰, 等. 稻田土壤 CH_4 排放及其关联微生物功能基因丰度对磺胺二甲嘧啶和铜污染的反应[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(10): 2246–2256.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0212>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

磺胺二甲嘧啶对稻田土壤微生物的中长期效应

徐佳迎, 周金蓉, 吴杰, 王珏, 程粟裕, 赵鸽, 蒋静艳

农业环境科学学报. 2020, 39(8): 1757–1766 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0123>

不同遮阴处理下施肥对稻田 CH_4 和 N_2O 排放的影响

王坤, 姜运生, 邢钰媛, 刘健

农业环境科学学报. 2021, 40(2): 464–472 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0953>

有机无机肥配施对苹果园温室气体排放的影响

马艳婷, 赵志远, 冯天宇, SOMPOUVISETThongsouk, 孔旭, 翟丙年, 赵政阳

农业环境科学学报. 2021, 40(9): 2039–2048 <https://doi.org/10.11654/jaes.2020-1477>

巢湖圩区再生稻田甲烷及氧化亚氮的排放规律研究

王天宇, 樊迪, 宋开付, 张广斌, 徐华, 马静

农业环境科学学报. 2021, 40(8): 1829–1838 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0181>

不同水分对半干旱地区砂壤土温室气体排放的短期影响

李平, 魏玮, 郎漫

农业环境科学学报. 2021, 40(5): 1124–1132 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-1377>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

程粟裕, 朱长俊, 李昕钰, 等. 稻田土壤CH₄排放及其关联微生物功能基因丰度对磺胺二甲嘧啶和铜污染的响应[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(10): 2246–2256.

CHENG S Y, ZHU C J, LI X Y, et al. Response of methane emission and the related microbial abundance to sulfamethazine and copper in paddy soils[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2021, 40(10): 2246–2256.



开放科学 OSID

稻田土壤CH₄排放及其关联微生物功能基因丰度对磺胺二甲嘧啶和铜污染的响应

程粟裕, 朱长俊, 李昕钰, 董宁, 周金蓉, 蒋静艳*

(南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

摘要: 为了研究畜禽粪便中磺胺类兽用抗生素磺胺二甲嘧啶(Sulfamethazine, SMZ)和典型重金属铜(Copper, Cu)复合污染对稻田土壤CH₄排放及其微生物相关功能基因丰度的影响,以猪粪为肥源,设置无污染、低、中、高4种SMZ和Cu不同污染水平的浓度,SMZ分别为0、0.1、1、5 mg·kg⁻¹,Cu分别为0、100、500、1 500 mg·kg⁻¹,两两组合共计16个处理,通过长时间室内模拟淹水培养实验,定期测定CH₄排放速率和相关土壤功能基因丰度,以期探索SMZ和Cu单一及复合污染影响CH₄排放和相关功能基因丰度的浓度效应及影响时长。结果表明:培养前期(0~12 d),不同浓度的SMZ和Cu未显著影响CH₄排放速率($P>0.05$);培养中后期(13~71 d),单一低浓度SMZ(0.1 mg·kg⁻¹)处理对CH₄排放具有促进作用,高浓度SMZ(≥ 1 mg·kg⁻¹)则反之,单一Cu污染及与不同浓度的SMZ复合污染处理均显著降低了CH₄排放速率($P<0.05$)。与对照(SMZ和Cu零添加)相比,除单一低浓度SMZ(0.1 mg·kg⁻¹)处理的CH₄累积排放量增加了19.7%外,其他处理均显著降低了CH₄排放,尤其Cu和SMZ(≥ 1 mg·kg⁻¹)复合污染处理显著降低了约77%($P<0.05$)。SMZ单一污染对16S rRNA-CH₄、*mcrA*和*pmoA*的基因丰度均有明显的浓度效应和输入时间效应,Cu单一污染则未有明显的浓度和时间效应,两者复合污染的联合作用比较复杂,主要取决于两污染物的起始浓度及SMZ输入土壤的时间。无论SMZ和Cu单一还是复合污染,中高浓度在培养的中后期对三大基因丰度的影响均以降低为主,且*pmoA*基因丰度对Cu和SMZ单一及复合污染响应更敏感。研究表明,SMZ和Cu在一定程度上会降低稻田土壤CH₄排放及相关微生物基因丰度,有利于温室气体减排,但规模化养殖业畜禽粪便还田后导致抗生素和重金属高残留的环境风险仍不可忽视。

关键词: 铜(Cu);磺胺二甲嘧啶(SMZ);猪粪;稻田土壤;CH₄排放;功能基因

中图分类号:X53;X713 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2021)10-2246-11 doi:10.11654/jaes.2021-0212

Response of methane emission and the related microbial abundance to sulfamethazine and copper in paddy soils

CHENG Suyu, ZHU Changjun, LI Xinyu, DONG Ning, ZHOU Jinrong, JIANG Jingyan*

(College of Resource and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The production of greenhouse gases, such as methane is of increasing concern with respect to climate change. Methanogenesis has been tied to certain functional genes in the microorganisms that produce methane through anaerobic processes (methanogens). This study investigated the impacts of the singly or combined pollution of sulfamethazine (SMZ) and copper (Cu) upon the relative abundance of functional genes of methanogens in livestock manure and their resultant methane production. A long-term incubation experiment was simulated using manure as a source of fertilizer on flooded soils. Selected concentrations of SMZ (0, 0.1, 1 mg·kg⁻¹, and 5 mg·kg⁻¹) and Cu (0, 100, 500 mg·kg⁻¹, and 1 500 mg·kg⁻¹) were added to the soil-manure mixture in paired combinations. The study incorporated sixteen

收稿日期:2021-02-23 录用日期:2021-05-20

作者简介:程粟裕(1996—),男,辽宁丹东人,硕士研究生,主要研究方向为环境污染与全球变化。E-mail:2018103035@njau.edu.cn

*通信作者:蒋静艳 E-mail:lilacjy@njau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金项目(41675148)

Project supported: The National Natural Science Foundation of China (41675148)

treatments, including a control (Cu0+SMZ0), and fifteen different paired concentrations levels of Cu and SMZ treatments (Cu0+SMZ0.1, Cu0+SMZ1, Cu0+SMZ5, Cu100+SMZ0, Cu100+SMZ0.1, Cu100+SMZ1, Cu100+SMZ5, Cu500+SMZ0, Cu500+SMZ0.1, Cu500+SMZ1, Cu500+SMZ5, Cu1500+SMZ0, Cu1500+SMZ0.1, Cu1500+SMZ1 and Cu1500+SMZ5). CH₄ emission rates and related microorganism functional gene abundance were tested at regular intervals of incubation and analyzed for exploring the dose and tolerance effects of single and combined treatments of SMZ and Cu on CH₄ emissions and the related microorganism gene abundance. Study results showed that during the early stages of incubation (0~12 d), different concentration treatments of SMZ and Cu had no significant effect on CH₄ emission ($P>0.05$). In the middle and late stages of incubation (13~71 d), the addition of a low concentration of only SMZ (Cu0+SMZ0.1) in the soil promoted CH₄ emissions, while a high concentration of SMZ ($\geq 1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) had an inhibitory effect. Both single treatments of high-moderate concentrations of Cu and combined treatments of Cu and SMZ significantly reduced the CH₄ emission rate ($P<0.05$). In comparison with the control, the Cu0+SMZ0.1 treatment increased cumulative CH₄ emissions by 19.7%. All other treatments significantly reduced CH₄ emissions ($P<0.05$), specifically the combined treatments of Cu and SMZ, which decreased CH₄ emissions by approximately 77%. Single treatment by SMZ had dose- and time-dependent effects on the abundance of the 16S rRNA-CH₄, *mcrA*, and *pmoA* genes. However, single treatments of Cu had no dose- or time-dependent effects. Moreover, results of the interaction between SMZ and Cu were complex, and primarily dependent upon the initial dose and application duration of SMZ. In the middle and late stage, application of middle or high concentrations of Cu, either singly or combined with SMZ at concentrations $\geq 1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, significantly reduced the relative abundance of the above-mentioned genes ($P<0.05$). Abundance of the *pmoA* gene was more sensitive to the single and combined treatments by Cu and SMZ than the 16S rRNA-CH₄ and *mcrA* genes. The joint application of sulfamethazine and copper can reduce CH₄ emissions and the relative abundance of the microorganism genes in paddy soil. This is beneficial to greenhouse gas emission mitigation. However, the environmental risk of high concentrations of residual antibiotics and heavy metals in livestock and poultry manure should not be ignored.

Keywords: copper (Cu); sulfamethazine (SMZ); pig manure; paddy field; CH₄ emissions; functional gene

甲烷(CH₄)是重要的温室气体之一,其增温潜能是二氧化碳(CO₂)的28倍,对温室效应的贡献率仅次于CO₂,为20%,且在大气中滞留时间较长^[1]。稻田是CH₄的重要排放源之一,稻田年CH₄排放量可占其总排放量的9%~19%^[2]。近几十年来我国畜牧养殖模式高度集约化,畜禽养殖规模增大导致畜禽粪便增多,大量畜禽粪便就近施用于农田,促进了CH₄排放^[3]。

微量元素Cu、Zn、As等作为动物饲料添加剂,可以促进畜禽生长,但其不能被动物完全吸收,不被吸收的部分随着畜禽粪便排出体外,再经施肥进入农田造成污染^[4]。有报道统计分析了我841个农田土壤样本,发现Cu是仅次于Zn的第二大输入农田的重金属($84\ 069 \text{ t} \cdot \text{a}^{-1}$)^[5],含量范围在0.12~1 247.82 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[6],且南方土壤76%的Cu来自于畜禽粪便的施用^[5]。LIU等^[7]对2 300多份猪粪样品进行统计分析,发现猪粪中Cu浓度介于72.66~1 288.00 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,平均为531.37 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,且因畜禽粪便中猪粪产量最高,因此猪粪还田是农田土壤中Cu来源的主要贡献者。

规模化养殖业大量使用兽用抗生素,同重金属一样,30%~90%的抗生素并不能被畜禽代谢,而是随着畜禽粪便排出体外,经农用地后进入土壤环境^[8]。猪粪中磺胺二甲嘧啶(SMZ)浓度甚至可高达28.7 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[9]。畜禽粪便还田导致抗生素持续输入农田土

壤,目前我国农田土壤中兽药抗生素的浓度介于每千克微克级到毫克级之间^[10]。土壤中抗生素的存在会影响土壤微生物结构与功能,导致抗性基因大量传播,具有较大的生态毒性^[11]。

土壤CH₄是在极端厌氧的条件下,由土壤中产甲烷菌利用其他微生物发酵形成的低碳有机酸、H₂和CO₂等物质为底物转化产生^[12]。土壤CH₄排放是产甲烷菌和甲烷氧化菌共同作用的结果。重金属能够阻碍微生物本身的蛋白质合成以及相关酶类的生成与分泌,或者通过土壤中重金属的氧化还原过程直接抑制微生物的新陈代谢,改变微生物数量和活性^[13]。抗生素对靶标微生物主要起杀死或抑制效应^[14]。因此畜禽粪便施用导致的土壤中重金属和抗生素含量增多,势必会对土壤微生物活性产生影响,进而会影响到土壤CH₄的排放。已有报道证实猪粪厌氧消化过程中,添加25、50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 四环素和磺胺甲氧二嗪可降低CH₄的产生^[15];而Cu离子浓度为100~300 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 时可提高CH₄产量,浓度为400~600 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 时,则明显抑制CH₄产量^[16]。培养基培养中,随着重金属Pb²⁺、Cd²⁺和Hg²⁺浓度的增大,其对甲烷氧化菌生长的抑制作用增强^[17];红霉素浓度越高对产甲烷菌的抑制作用越明显,产CH₄速率越低^[18]。近年来,国内外抗生素和重金属复合污染对农田土壤CH₄排放的研究鲜见

报道,已有研究多集中于对堆肥发酵过程或土壤微生物群落结构与活性的影响。如KONG等^[19]的研究表明,土霉素和重金属Cu的复合污染对土壤微生物群落的功能多样性具有负面影响,且表现出明显的加和作用。YANG等^[20]的最新研究表明,一定浓度的Cu和SMZ复合污染相比于单一污染会抑制脲酶、磷酸酶和蔗糖酶的活性,但在一定的暴露时间内却会促进二磷酸核酮糖羧化酶的活性,促进或抑制酶活作用取决于二者的剂量以及暴露时间。这说明重金属和抗生素复合污染对土壤有关酶活以及微生物群落结构与功能的影响存在一定的联合作用,与单一污染影响不同,因而对土壤CH₄的排放影响也可能存在不同效果。

随着畜禽养殖业的规模化扩大,畜禽粪便大量还田,农田土壤中抗生素和重金属残留量增高,因此有必要研究两者复合污染对CH₄排放及相关微生物的影响。本文以重金属Cu和磺胺类抗生素中的典型代表SMZ作为研究对象,通过室内模拟培养试验,以未经重金属和抗生素污染的农家猪粪为肥源,分别添加不同浓度的Cu和SMZ,探究在不同浓度Cu和SMZ单一及复合污染条件下CH₄排放,以及与CH₄产生有关的功能基因(16S rRNA-CH₄和*mcrA*)和与CH₄氧化有关的功能基因(*pmoA*)丰度的变化^[21],首次分析了Cu和SMZ复合污染对CH₄排放及相关功能基因丰度的交互效应,以期为了解畜禽粪便还田导致的Cu和SMZ复合污染对CH₄排放的影响及机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试土壤采自安徽皖南常规农田0~20 cm耕作层(118°19'E, 29°59'N)。土壤pH为5.15,有机质含量为88.41 g·kg⁻¹,全氮含量为1.20 g·kg⁻¹,Cu含量为28.66 mg·kg⁻¹。供试猪粪来源于未饲喂过含有重金属和抗生素添加剂饲料的农户家猪排泄物,属于有机猪粪,全氮含量为8.81 g·kg⁻¹,全磷含量为1.84 g·kg⁻¹,有机质含量为720.33 g·kg⁻¹,Cu含量为27.72 mg·kg⁻¹。供试土壤和猪粪均未检测出磺胺类抗生素。

供试抗生素为上海麦克林公司生产的磺胺二甲嘧啶钠试剂(纯度≥98%),供试重金属试剂为上海阿拉丁公司生产的五水合硫酸铜试剂(纯度≥99.0%)。

1.2 试验设计

室内模拟淹水培养试验共设16个处理,以有机猪粪为肥源,Cu添加的浓度分别为0、100、500、1 500

mg·kg⁻¹,SMZ添加的浓度分别为0、0.1、1、5 mg·kg⁻¹,两两组合,代码分别为Cu0+SMZ0、Cu0+SMZ0.1、Cu0+SMZ1、Cu0+SMZ5、Cu100+SMZ0、Cu100+SMZ0.1、Cu100+SMZ1、Cu100+SMZ5、Cu500+SMZ0、Cu500+SMZ0.1、Cu500+SMZ1、Cu500+SMZ5、Cu1500+SMZ0、Cu1500+SMZ0.1、Cu1500+SMZ1、Cu1500+SMZ5,其中Cu0+SMZ0即为对照(CK)。每个处理9个重复,其中3个重复用于定期测定CH₄排放,6个重复用于培养中间阶段土样微生物测定。每个处理称取150 g干土(过10目筛)置于590 mL塑料瓶内,加超纯水预培养1周,按设定浓度同步添加猪粪(按N=100 mg·kg⁻¹干土计算,猪粪添加量为每处理干质量1.702 6 g)、Cu和SMZ后,在恒温恒湿(25℃、95%水分)培养箱中进行室内模拟淹水培养。考虑到土壤和猪粪中存在Cu背景值,代表无污染(Cu0)、低(Cu100)、中(Cu500)、高(Cu1500)浓度处理实际的Cu浓度分别为29 [(4.299 mg土壤+0.047 mg猪粪)/0.15 kg干土]、129、529 mg·kg⁻¹和1 529 mg·kg⁻¹。因土壤和猪粪中无背景SMZ存在,各SMZ处理实际浓度即为设定浓度。培养试验中每个培养瓶水深约2 cm,期间土壤水分通过补加超纯水(重量法)保持,每3 d补充1次。气体测定频率为前25 d每日测定,之后2~3 d测定1次。在前期(5 d)、中期(39 d)和培养终期(71 d)分别采集各处理的土壤,放入-80℃冰箱中储存,用于测定CH₄排放相关基因的基因丰度。

1.3 样品采集与测定方法

1.3.1 土壤CH₄排放的测定

采用间歇密闭培养-气相色谱法测定土壤CH₄排放速率。采样时培养瓶处于完全密闭环境,唯一出口用三通阀连接用于采气。在每日密闭培养开始前,使用针筒通过三通阀从培养瓶中抽取10~15 mL气体(背景气样),密闭培养12 h后,用同样的操作从培养瓶中抽取10~15 mL气体(试验气样),每次采样完成,培养瓶敞口继续培养。测定仪器为配置了FID检测器的气相色谱仪(GC7890B,安捷伦,美国)。载气为99.999%高纯氮,检测温度为250℃,柱箱温度为50℃。测得背景气样与试验气样的CH₄浓度后,经过计算得出密闭培养12 h期间,培养瓶内土壤的CH₄排放速率。具体计算公式为:

$$F = \Delta m / (W \times \Delta t) = \rho \times V \times \Delta c / (W \times \Delta t) \quad (1)$$

$$\rho = A / 22.4 \times 273 / (273 + T) \quad (2)$$

式中: F 为气体排放速率,ng·g⁻¹·h⁻¹; ρ 为气体密度,g·L⁻¹; V 为培养瓶内气体的有效空间,L; Δt 为培养瓶密

闭培养时间, h; Δc 为 Δt 时间内培养瓶内气体浓度差, $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; W 为培养瓶内土壤干质量, g; A 为分子量; T 为培养温度, $^{\circ}\text{C}$ 。

通过 3 个重复观测的数据按时间加权平均后获得 CH₄ 的排放总量, 计算公式为:

$$M = \sum (F_{N+1} + F_N) \times 0.5 \times (t_{N+1} - t_N) \times 24 \quad (3)$$

式中: M 为气体累计排放量, $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$; N 为采样次数; t 为采样时间(距离第一次采样的天数), d; F 为气体排放速率, $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。

1.3.2 土壤样品的测定

采用 PowerSoil[®] DNA Isolation kit 强力土壤 DNA 提取试剂盒法提取土壤样品全基因组。使用 Nano-Drop2000 微量紫外分光光度计测定提取出的土壤总 DNA 浓度, 并将所有样品的 DNA 浓度调节为 $10\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 然后使用 Applied-Biosystems Real-Time PCR 仪采用实时荧光定量 PCR 技术测定各功能基因丰度。PCR 扩增采用 $20\mu\text{L}$ 反应体系, 包括: $10\mu\text{L}$ 扩增酶混合物 SYBR Premix Ex Taq[™] ($2\times$); $6.8\mu\text{L}$ ddH₂O; $2\mu\text{L}$ DNA 模板; $0.4\mu\text{L}$ ROX Reference Dye ($50\times$); $0.4\mu\text{L}$ Forward Primer ($10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), $0.4\mu\text{L}$ Reverse Primer ($10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 即正反向引物各 $0.4\mu\text{L}$ 。引物及相应扩增程序见表 1。

1.4 数据统计与联合效应判断

采用 Excel 2019 和 SPSS Statistics 21.0 软件进行数据统计分析, 采用 Origin Pro 2021 软件作图。当二因子方差分析 Cu 和 SMZ 交互影响显著时, 将 Cu 和 SMZ 的个体效应[即 CH₄ 减排率或基因丰度降低率 = $(1 - T_{\text{单}}/T_{\text{CK}}) \times 100$, $T_{\text{单}}$ 代表 Cu 或 SMZ 单一处理]加和 ($M_1 = R_{\text{Cu}} + R_{\text{SMZ}}$, R_{Cu} 和 R_{SMZ} 分别代表 Cu 和 SMZ 单一处理 CH₄ 减排率或基因丰度降低率) 或计算独立作用效应结果 [$M_2 = R_{\text{Cu}} + R_{\text{SMZ}} \times (1 - R_{\text{Cu}}/100)$] 来判断复合污染处理

的联合效应 [$M_x = (1 - T_{\text{复}}/T_{\text{CK}}) \times 100$, $T_{\text{复}}$ 代表 Cu 和 SMZ 复合处理]。经 t 检验, 若 M_x 与 M_1 或 M_2 有显著差异 ($P < 0.05$), 则 $M_x > M_1$ 为协同作用, 反之为拮抗作用; 当 M_x 与 M_1 或 M_2 无显著差异 ($P > 0.05$) 时, $M_x \approx M_1$ 为加和作用, $M_x \approx M_2$ 为独立作用^[22]。

2 结果与分析

2.1 Cu 和 SMZ 单一及复合污染对土壤 CH₄ 排放动态变化及累积排放的影响

模拟淹水状况下, 各处理土壤 CH₄ 排放速率动态变化如图 1 所示。从动态图可以看出, 各处理 CH₄ 排放速率在培养前期动态变化趋势基本一致, 培养后期出现分化, 单一添加 SMZ 的处理 CH₄ 排放速率有升高趋势(图 1a), 而添加 Cu 的处理则逐步降低, Cu100+SMZ0.1 处理除外(图 1b~图 1d)。经培养时间与处理二因子方差分析发现, 培养前期(0~12 d)处理间 CH₄ 排放速率无显著差异 ($P > 0.05$), 仅每次测定之间有显著差异 ($P < 0.05$)。培养后期(13~71 d), 每次测定之间以及处理之间 CH₄ 排放速率皆有显著差异 ($P < 0.05$)。

进一步计算各处理 CH₄ 累积排放量及 CH₄ 减排率, 并判断其联合效应, 结果如图 2 所示。培养前 12 d 的各处理 CH₄ 累积排放量之间总体上无显著差异, 总累积排放量的差异性主要取决于第 13~71 d 的差异性。无 Cu 添加条件下, 单一 SMZ 处理存在明显的低促高抑浓度效应: 相对于 CK, Cu0+SMZ0.1 的 CH₄ 总累积排放量增加了 19.7%, 而 SMZ1 和 SMZ5 的 CH₄ 总累积排放量分别显著减少了 16.8% 和 40.6% ($P < 0.05$)。无 SMZ 添加条件下, 单一 Cu 处理与 CK 相比, CH₄ 总累积排放量均显著减少了 77% 左右 ($P < 0.05$), 且没有表现出明显的浓度效应。不同浓度 SMZ 和 Cu

表 1 目的基因的引物序列

Table 1 Primer set for the target genes

功能基因 Functional gene	引物 Primer	引物序列(5'~3') Primer sequences(5'~3')	扩增片段长度 Amplified fragment length/bp	文献 Reference
16S rRNA-CH ₄	1106F	TTWAGTCAGGCAACGAGC	350	[21]
	1378R	TGTGCAAGGAGCAGGGAC		
<i>mcrA</i>	<i>mcrA</i> -f	CGCCCCGCGCGCCCCGCGCCCGT	509	[21]
	<i>mcrA</i> -R	CCCGCCGCCCCGCGCGGTGGT		
		GTMGGDTTCACMCARTA		
		CGTTCATBGGCTAGTTVGRTAGT		
<i>pmoA</i>	<i>pmoA</i> A189F	GGNGACTGGGACTTCTGG	473	[21]
	<i>pmoA</i> m661	CCGGMGCAACGCTCYTTACC		

注 Note: Y=C/T, V=A/C/G, W=A/T, R=A/G。

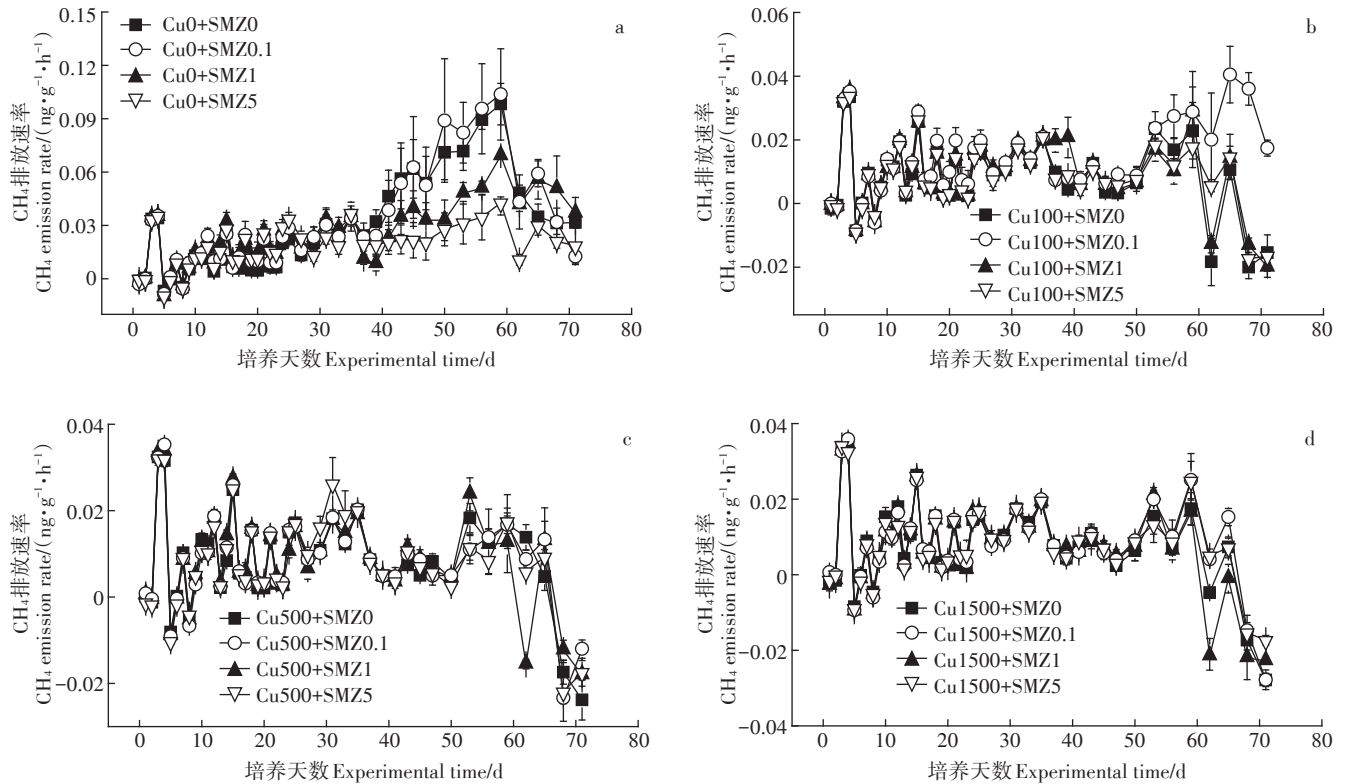
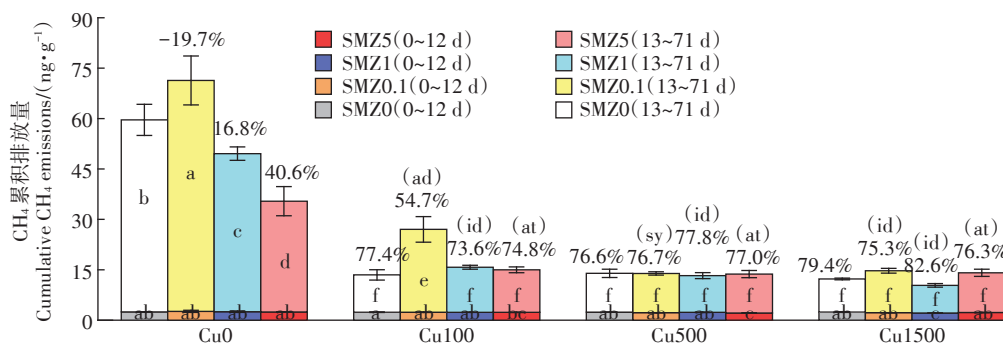


图1 模拟淹水培养条件下不同浓度Cu-SMZ处理的土壤CH₄排放速率(以C计)动态变化

Figure 1 Variation in CH₄ emissions rate (calculate by C) from the soils treated with different concentrations of Cu and SMZ under the simulated flooding incubation conditions



图中柱内不同字母表示差异性达到显著水平 ($P < 0.05$); 百分比数据为各Cu-SMZ处理相对于CK处理的CH₄减排率; 括号内文字(ad)代表相加效应, (at)代表拮抗效应, (sy)代表协同效应, (id)代表独立作用。下同

The different lowercase letters in the column indicate significant differences among treatments ($P < 0.05$). Percentage data for different Cu-SMZ treatments represent the mitigation rate on CH₄ emission relative to CK. The letter in brackets (ad) represents additive effect, (at) shows an antagonistic effect, (sy) indicates a synergistic effect while the letter (id) is an independent effect. The same below

图2 SMZ和Cu单一及联合处理CH₄累积排放量(以C计)、CH₄减排率及Cu-SMZ联合作用效应

Figure 2 Cumulative CH₄ emissions (calculate by C), mitigation rates and type of interactions under single and combined addition of Cu and SMZ

复合污染均显著降低CH₄累积排放($P < 0.05$),但交互效应比较复杂。

SMZ和Cu的二因子方差分析结果表明(表2),二者不同浓度组合下对CH₄排放有极显著的联合效应($P < 0.001$)。除了SMZ和Cu双低浓度复合污染时

(Cu100+SMZ0.1)为简单的加和作用以及低浓度SMZ与中浓度的Cu(Cu500+SMZ0.1)组合时为协同作用外,其他浓度SMZ和Cu组合交互效果不同。随着SMZ浓度的增加,这种交互作用变为独立作用。当SMZ浓度达到5 mg·kg⁻¹时,无论Cu浓度的高低,皆是

拮抗效应(图2)。

2.2 Cu和SMZ单一及复合污染对土壤CH₄排放的相关功能基因丰度的影响

不同处理在培养至第5、39 d和第71 d的16S rRNA-CH₄、*mcrA*和*pmoA*基因丰度变化分别如图3~图5所示。单因子方差分析表明,3个培养期16个处理间16S rRNA-CH₄、*mcrA*和*pmoA*基因丰度差异均极显著($P<0.01$)。Cu和SMZ单一及复合污染对与产甲烷菌有关的16S rRNA-CH₄和*mcrA*基因丰度的影响规律比较类似:在培养前期(第5 d),Cu0+SMZ5、Cu100+SMZ1、Cu500+SMZ1和Cu1500+SMZ1处理显著提高了此二者的丰度($P<0.05$),其他处理与CK相比均无显著差异($P>0.05$)。在培养中期(第39 d),不同浓度SMZ单一污染对16S rRNA-CH₄和*mcrA*基因丰度均无显著影响($P>0.05$)。不同浓度Cu单一污染均显著降低16S rRNA-CH₄基因丰度($P<0.05$),而对*mcrA*基因丰度无显著影响($P>0.05$)。Cu和SMZ复合污染中,0.1 mg·kg⁻¹ SMZ与各浓度Cu组合以及Cu100+SMZ1、Cu500+SMZ1的组合均显著降低16S rRNA-CH₄基因丰度($P<0.05$),减少幅度为50%~82%;除Cu500+SMZ1显著降低*mcrA*基因丰度11.7%外($P<0.05$),其他复合处理对基因丰度都无显著影响。在培养后期(第71 d),中高浓度SMZ(1、5 mg·kg⁻¹)单一污染均显著降低16S rRNA-CH₄和*mcrA*基因丰度($P<0.05$)。此外,中高浓度Cu单一污染显著降低16S rRNA-CH₄基因丰度($P<0.05$),无论单一Cu浓度高低,其对*mcrA*基因丰度均无显著影响($P>0.05$)。复合处理中,无论Cu浓度高低,中高浓度SMZ(1、5 mg·kg⁻¹)以及高Cu低SMZ处理(Cu1500+SMZ0.1)均显著降低16S rRNA-CH₄和*mcrA*基因丰度($P<0.05$)。

Cu和SMZ单一及复合污染对与甲烷氧化菌有关的*pmoA*基因丰度在不同培养阶段的影响规律比较一致,基本表现为SMZ单一污染,在培养前中期低浓度无影响、高浓度降低,培养后期3个SMZ浓度均有显

著影响($P<0.05$);3种Cu浓度单一处理,无论在哪个培养阶段均显著降低*pmoA*基因丰度;复合处理中,除前期含低浓度SMZ(0.1 mg·kg⁻¹)处理组合外,其余所有处理均显著降低*pmoA*基因丰度($P<0.05$)。

总之,SMZ单一污染对三大基因丰度有明显的浓度效应(低增或无影响、高降)和输入时间效应(前增、中无影响、后降),而Cu单一污染对16S rRNA-CH₄基因也有类似SMZ单一污染的浓度及输入时间效应,表现为低无影响高降、前无影响后降的规律,但对*mcrA*和*pmoA*基因丰度无明显浓度规律。Cu和SMZ复合污染对16S rRNA-CH₄和*mcrA*基因丰度影响程度更多取决于SMZ浓度的高低。相比16S rRNA-CH₄和*mcrA*基因丰度,*pmoA*基因丰度对Cu和SMZ单一及复合污染的反应更敏感,且主要表现为降低效应。

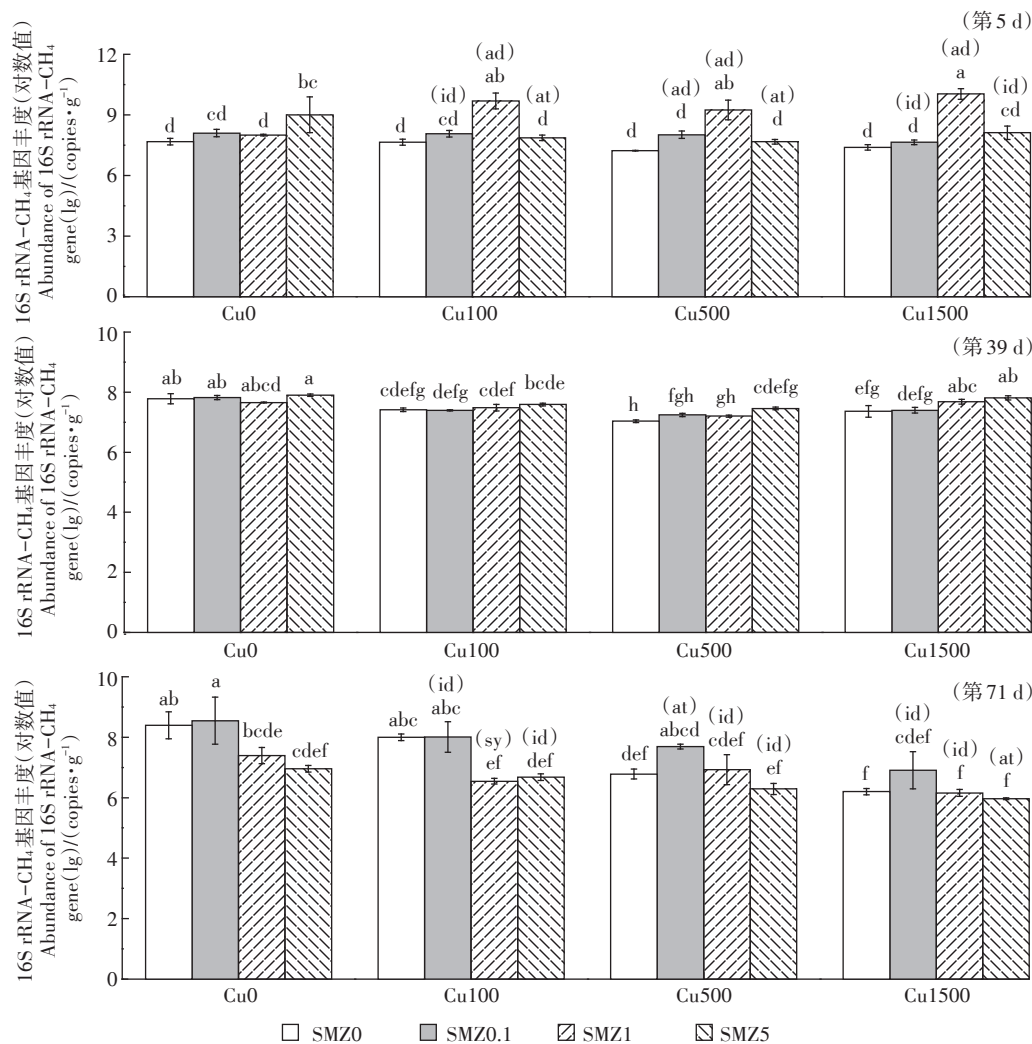
进一步进行Cu和SMZ二因子方差分析,结果见表2。SMZ和Cu交互效应有一个明显的规律,即都是在培养的前后期对三大基因丰度有显著影响($P<0.05$),培养中期均没有显著影响($P>0.05$)。对于16S rRNA-CH₄基因丰度(图3),培养前期不同浓度SMZ和Cu组合的交互效应以独立和相加作用为主,仅在SMZ浓度较高情况下(5 mg·kg⁻¹)出现拮抗效应,但Cu1500+SMZ5处理除外,为独立作用;培养末期中低浓度以独立作用为主,SMZ和Cu均为最高浓度的组合(Cu1500+SMZ5)为拮抗效应。对于*mcrA*基因丰度(图4),无论培养前期还是后期,低浓度以协同和相加作用为主,中高浓度以拮抗效应为主。对于*pmoA*基因丰度(图5),培养前期,除了最高浓度组合为独立作用外,其他SMZ和Cu组合的交互效应均是拮抗效应;在培养后期,除Cu100+SMZ5为拮抗效应外,其他各复合污染处理均为独立作用。总之,两者复合污染的联合作用比较复杂,主要取决于两污染物的起始浓度及SMZ输入土壤的时间。

经相关分析,未能发现CH₄排放速率与各相关微生物功能基因丰度之间在第5 d有显著相关关系($P>0.05$),但在培养的第39 d和第71 d,CH₄排放速率与

表2 CH₄累积排放总量及相关功能基因丰度的SMZ和Cu处理二因子方差分析结果(P 值)

Table 2 Results of two-way ANOVA on cumulative CH₄ emissions, and the abundance of 16S rRNA-CH₄, *mcrA* and *pmoA* genes in experiment with SMZ and Cu singly or in combination (P values)

因子 Factor	CH ₄ 累积排放量 Cumulative CH ₄ emissions	16S rRNA-CH ₄			<i>mcrA</i>			<i>pmoA</i>		
		5 d	39 d	71 d	5 d	39 d	71 d	5 d	39 d	71 d
Cu	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.264	<0.001	0.041	0.002	<0.001	<0.001
SMZ	<0.001	0.566	<0.001	0.001	<0.001	0.128	<0.001	<0.001	<0.001	0.049
Cu×SMZ	<0.001	0.001	0.161	0.021	<0.001	0.297	<0.001	0.030	0.055	<0.001



不同小写字母表示差异性达到显著水平 ($P < 0.05$)。下同
Different lowercase letters indicate significant differences among treatments ($P < 0.05$). The same below

图3 培养至第5、39、71 d不同处理的土壤 16S rRNA-CH₄基因丰度

Figure 3 The abundance of 16S rRNA-CH₄ gene in soil treated with Cu-SMZ after 5 d, 39 d and 71 d of incubation

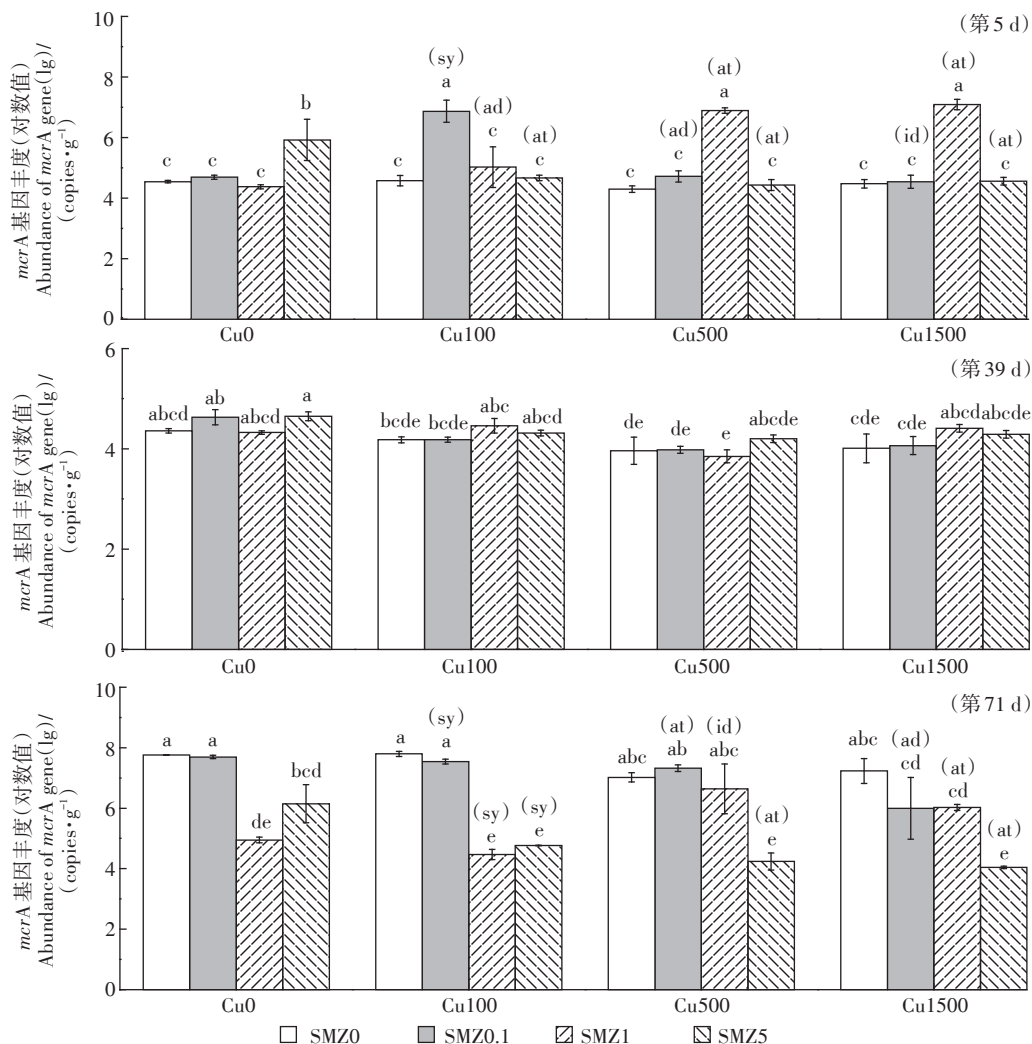
16S rRNA-CH₄和 $pmoA$ 基因丰度的对数值皆呈显著正相关 ($P < 0.05$), 仅在第39 d, CH₄排放速率与 $mcrA$ 基因丰度呈显著正相关 ($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 CH₄排放对SMZ单一污染的响应及其机制

本研究供试土壤为酸性土, 在SMZ单一污染条件下, 不同浓度SMZ对土壤CH₄排放的影响有明显的浓度效应, 存有低促高抑现象 (图2), 尤其反映在培养的中后期 (图1), 这与徐佳迎^[23]在碱性土上的研究结果一致。SHI等^[15]的研究也表明高浓度磺胺类抗生素 (250、500 mg·kg⁻¹) 在猪粪厌氧消化中显著降低CH₄累积排放。即便是含5 mg·kg⁻¹ SMZ的猪粪, 在厌氧堆肥过程中也表现出对CH₄排放的明显抑制效

应^[24]。田间原位研究结果也证实SMZ影响CH₄排放在不同的环境条件下表现不一, 10、30 mg·kg⁻¹ SMZ对水稻生长季CH₄排放有明显的前抑后促特征, 尤其与猪粪协同作用下水稻生长中后期促进作用比较明显^[25]。这种前抑后促或低促高抑现象的产生, 与SMZ在土壤中的降解转化有关。田间原位试验及室内机理研究表明低浓度的SMZ更易被土壤微生物降解转化成小分子物质, 从而可作为新的碳源利用; 高浓度的SMZ通过影响土壤微生物群落结构直接或间接降低产甲烷菌活性, 表现为在培养后期明显降低了16S rRNA-CH₄、 $mcrA$ 和 $pmoA$ 基因丰度 (图3~图5), 进而减少了CH₄的排放^[23]。中、高浓度SMZ进入土壤后母体去除较快, 中间降解产物却种类较多, 即便输入稻田土壤47 d和61 d后, 依旧存有一环或二环类中间产

图4 培养至第5、39、71 d不同处理的土壤*mcrA*基因丰度Figure 4 The abundance of *mcrA* gene in soil treated with Cu-SMZ after 5 d, 39 d and 71 d of incubation

物,其中以2-氨基-4,6-二甲基嘧啶和4-(2-亚氨基-4,6-二甲基嘧啶-1(2H)-基)苯胺为主^[26]。而SMZ的降解产物本身如2-氨基-4,6-二甲基嘧啶也能促进CH₄排放,这是SMZ影响CH₄排放前抑后促的原因^[23]。

3.2 CH₄排放对Cu单一污染的响应及其机制

在本研究Cu单一污染浓度条件下,各Cu处理均显著降低了CH₄的排放(图2),主要反映在培养的中后期,减排尤其明显,甚至出现负值(图1),这可能是由于本研究中Cu的浓度较高,导致土壤中微生物活性降低的缘故,反映在本研究结果中就是培养中后期中高浓度明显降低了16S rRNA-CH₄和*pmoA*基因丰度($P < 0.05$)(图3和图5),浓度越高,降低程度越大;但对*mcrA*基因丰度的影响不明显(图4),也不存在浓度效应。MISHRA等^[27]在室内培养研究中也发现,即便是低浓度的Cu²⁺(20 μg·g⁻¹)添加(以CuCl₂形式)也会对3种不同水稻土CH₄的产生有抑制作用,然而也

有报道证实低浓度的Cu²⁺(<10 mg·L⁻¹)可以促进畜禽废水厌氧消化过程中产CH₄速率^[28]。最近的报道发现,添加26 μmol·L⁻¹ Cu²⁺(以CuSO₄形式)在较短的培养周期(96 h)内促进了湿地土壤(背景值Cu²⁺为37.8 mg·kg⁻¹)CH₄的排放,对*mcrA*基因丰度的影响不显著($P > 0.05$)^[29],与本研究条件下,无论Cu浓度高低均未显著影响*mcrA*基因丰度的结果一致。XU等^[30]将Cu²⁺以CuSO₄形式添加至农田土壤(Cu²⁺背景值为20.15 mg·kg⁻¹),在40%最大田间持水量条件下培养28 d的研究发现,低浓度Cu²⁺(20 mg·kg⁻¹)仅在培养前期(0~14 d)降低了土壤微生物的活性,而在培养后期显著增加了土壤微生物的活性($P < 0.05$),高浓度(200 mg·kg⁻¹)的Cu²⁺在整个培养周期均显著降低了土壤微生物的活性($P < 0.05$)。MOHANTY等^[31]同样在室内培养中发现,添加较低浓度的Cu(25 mg·kg⁻¹)仅在土壤60%田间持水量条件下显著促进了水稻土的甲烷氧

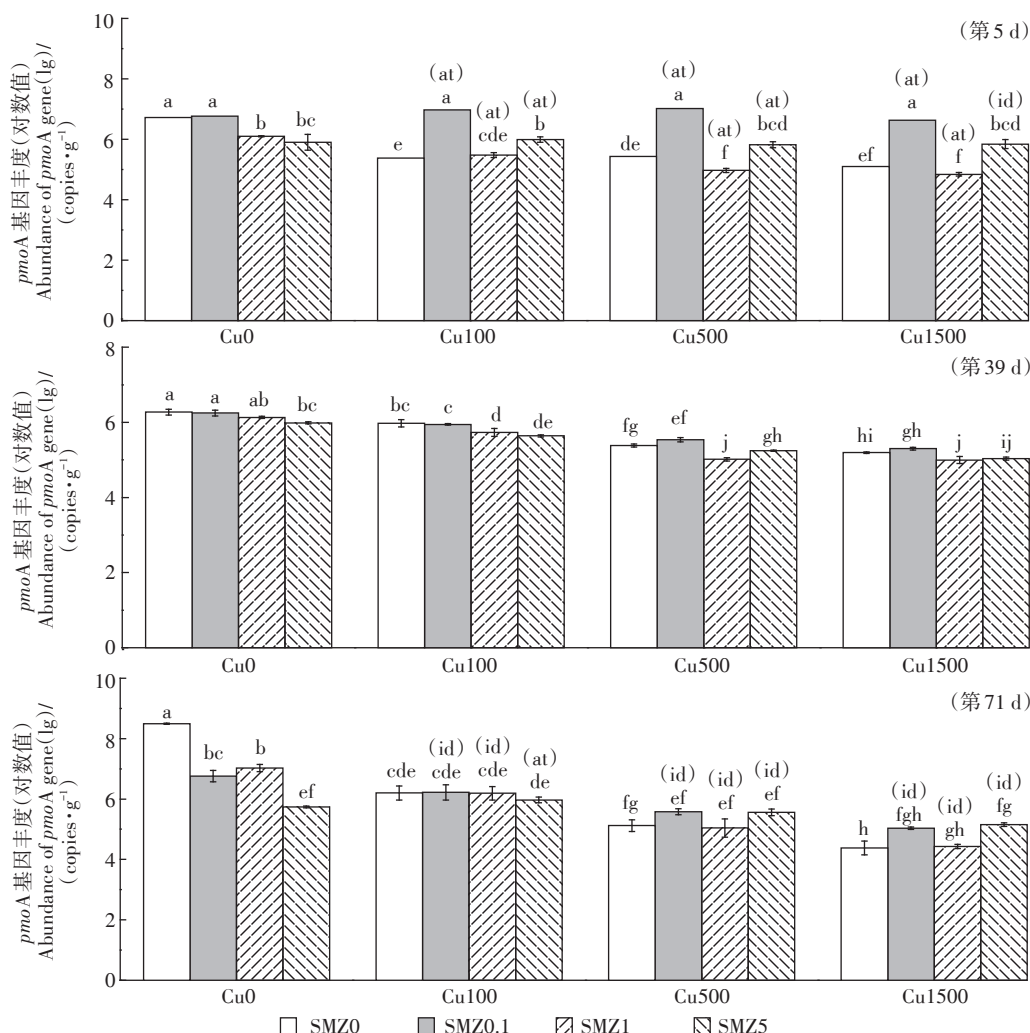


图5 培养至第5、39、71 d不同处理的土壤 $pmoA$ 基因丰度

Figure 5 The abundance of $pmoA$ gene in soil treated with Cu-SMZ after 5 d, 39 d and 71 d of incubation

化菌活性,而在淹水条件下却是轻微的抑制作用。重金属抑制 CH_4 氧化的浓度效应与土壤中的氧气含量有关^[32],进一步说明Cu的生物有效性或毒理效应取决于土壤环境状况,如水分、pH等,对土壤微生物活性以及 CH_4 产生也存在低促或无影响以及高抑现象。低浓度Cu对土壤 CH_4 产生的影响不显著可能是土壤有机质对Cu有吸附及固定作用,以及Cu本身可作为土壤酶活性位点之一的缘故^[33]。目前关于重金属影响土壤微生物及土壤碳转化的结果通常基于室内模拟研究以及重金属添加后的短期效应,尤其是已有研究通常是人为模拟添加 $CuSO_4$ 或 $CuCl_2$ 化学试剂进行污染条件的设定,高硫或高氯离子的存在对碳氮转化的影响尚没有定论,这也是目前室内毒理效应结果不能够外推到田间实际污染情况下的主要原因之一^[34]。如何确定田间重金属逐步积累污染条件下碳的转化变化以及不同重金属对 CH_4 排放的影响,进而判定畜

禽粪便中重金属的输入在土壤中的风险值是今后进一步研究的方向。

3.3 Cu和SMZ复合污染对 CH_4 排放的影响及其交互效应

Cu和SMZ分属于无机物和有机物,二者进入土壤后会有何反应,尚不清楚。MOREL等^[35]曾报道过当土壤pH=6时 Cu^{2+} 的存在会使土壤中磺胺甲恶唑(SMX)的吸附作用强烈增加(增加了6倍),这一发现有力地支持了酸性土壤中可能会形成三元SMX-Cu-土壤复合物的假设。SMZ与SMX同属于磺胺类药物,结构相似,只是基团不同,其是否也能够在酸性环境中与Cu形成新的螯合物,尚需进一步研究。但本研究证实,不同浓度SMZ和Cu复合污染对 CH_4 排放以及相关产甲烷菌的功能基因丰度在培养前后都有显著的交互效应(表2),尤其培养后期浓度较高时,拮抗效应越强(图2~图5),这可能与形成新的螯

合物有关。也可能是因为SMZ在土壤环境中更易被降解,而Cu在土壤中具有更高的持久性。有报道证实施用猪粪6个月后,土壤中Cu各形态含量较1个月时无明显变化^[36]。本研究仅分析了SMZ和Cu复合污染对整个培养周期CH₄累积排放的交互效应,因不同培养期SMZ在土壤中的降解情况不同,可能SMZ和Cu复合污染的交互效应也不相同。刘爱菊等^[37]的研究也表明不同浓度磺胺甲基嘧啶(0、5、25、50、100 mg·kg⁻¹)与Cu(0、100、500 mg·kg⁻¹)复合污染处理下,低剂量Cu(100 mg·kg⁻¹)的协同污染对土壤微生物呼吸,土壤微生物量碳、氮以及土壤脲酶等指标的活性均明显增加,而Cu为500 mg·kg⁻¹时与磺胺甲基嘧啶对土壤各微生物指标则基本表现为协同抑制作用。YANG等^[20]发现,同一浓度Cu(1.6 mmol·kg⁻¹ Cu²⁺)和不同浓度的SMZ(0、0.05、0.2、0.8 mmol·kg⁻¹)复合污染对土壤酶活性的交互影响并不是一种单一的相加效果,不同组合比以及不同培养周期对不同酶活性的影响都不相同。对于蔗糖酶活性,低浓度SMZ和Cu复合污染时为拮抗作用,随着SMZ浓度的增加,这种拮抗作用变为协同作用。在SMZ和Cu摩尔比为1:32时(0.05 mmol·kg⁻¹ SMZ+1.6 mmol·kg⁻¹ Cu),Cu和SMZ复合污染在培养7、14、21、28 d中对脲酶均有协同作用,随着SMZ浓度的增加,拮抗作用逐渐显现出来。对于磷酸酶则是在第7 d和第14 d观察到协同作用,在第21 d和第28 d时有拮抗作用。对于RubisCO酶的活性,不同浓度SMZ和Cu复合污染在不同培养周期均为协同作用。这说明磺胺类抗生素和Cu复合污染对土壤微生物结构与功能以及土壤酶活性的影响比单一污染结果复杂,对CH₄排放的影响机制尚需进一步研究。规模化养殖业产生的大量非有机畜禽粪便还田使得土壤中抗生素和重金属浓度均较高^[7,11],土壤抗生素和重金属的引入不容忽视,本研究结果虽然明确了在此浓度范围的SMZ和Cu复合污染降低了CH₄排放,但在实际情况下畜禽粪便还田后的环境效应或风险评价尚需通过田间长期定位试验来进一步判定。

4 结论

(1)单一SMZ污染对土壤CH₄排放及三大关联基因16S rRNA-CH₄、*mcrA*和*pmoA*基因丰度具有明显的低增或无影响、高降的浓度效应及前增或无影响、后降的输入时间效应。

(2)单一Cu污染除了对16S rRNA-CH₄基因丰度

有类似SMZ的浓度和输入时间效应外,对CH₄排放及其他两基因丰度均未表现出明显的浓度与时间效应。

(3)SMZ和Cu复合污染对土壤CH₄排放及相关基因丰度作用的联合效应取决于两污染物的起始浓度与输入时间。

(4)三大关联基因中,*pmoA*基因丰度对Cu和SMZ单一及复合污染响应更敏感,且主要表现为降低效应。

参考文献:

- [1] IPCC. Climate change 2013: The physical science basis. Contribution of working group I to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change[R]. Cambridge: Cambridge University Press, 2013.
- [2] ZHOU Y F, JING T. Research progress on methane emission from cropland[J]. *Agricultural Science and Technology*, 2017, 18(2): 357-360, 364.
- [3] LINQUIST B A, ADVIENTO-BORBE M A, PITTELKOW C M, et al. Fertilizer management practices and greenhouse gas emissions from rice systems: A quantitative review and analysis[J]. *Field Crops Research*, 2012, 135: 10-21.
- [4] HASHEMI M. Heavy metal concentrations in bovine tissues (muscle, liver and kidney) and their relationship with heavy metal contents in consumed feed[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 154(6): 263-267.
- [5] PENG H, CHEN Y L, WENG L P, et al. Comparisons of heavy metal input inventory in agricultural soils in north and south China: A review[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 660(4): 776-786.
- [6] ZENG S Y, MA J, YANG Y J, et al. Spatial assessment of farmland soil pollution and its potential human health risks in China[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 687: 642-653.
- [7] LIU W R, ZENG D, SU W X, et al. Comparisons of pollution characteristics, emission situations, and mass loads for heavy metals in the manures of different livestock and poultry in China[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 734: 139023.
- [8] 赵方凯, 杨磊, 乔敏, 等. 土壤中抗生素的环境行为及分布特征研究进展[J]. *土壤*, 2017, 49(3): 428-436. ZHAO F K, YANG L, QIAO M, et al. Environmental behavior and distribution of antibiotics in soils: A review[J]. *Soils*, 2017, 49(3): 428-436.
- [9] 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.
- [10] 方媛媛, 丁惠君. 抗生素的生态毒性效应研究进展[J]. *环境科学与技术*, 2018, 41(5): 102-110. FANG Y Y, DING H J. Advance in ecological toxicity of antibiotics[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 41(5): 102-110.
- [11] ZHI D, YANG D X, ZHENG Y X, et al. Current progress in the adsorption, transport and biodegradation of antibiotics in soil[J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 251: 109598.
- [12] 冯虎元, 程国栋, 安黎哲. 微生物介导的土壤甲烷循环及全球变化研究[J]. *冰川冻土*, 2004, 26(4): 411-419. FENG H Y, CHENG G

- D, AN L Z. Microbial-mediated methane cycle in soils and global change: A review[J]. *Journal of Glaciology and Geocryology*, 2004, 26(4):411-419.
- [13] WESTERGAARD K, MULLER A K, CHRISTENSEN S, et al. Effects of tylosin as a disturbance on the soil microbial community[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 2001, 33(15):2061-2071.
- [14] GARCÍA-GALÁN M J, DÍAZ-CRUZ S, BARCELÓI D. Identification and determination of metabolites and degradation products of sulfonamide antibiotics[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2008, 27(11):1008-1022.
- [15] SHI J C, LIAO X D, WU Y B, et al. Effect of antibiotics on methane arising from anaerobic digestion of pig manure[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2011, 166/167:457-463.
- [16] 可欣, 赵鑫, 李润东. 铜离子对猪粪厌氧消化性能的影响研究[J]. 可再生能源, 2013, 31(7):60-63, 69. KE X, ZHAO X, LI R D. Effect of copper ions on pig manure anaerobic digestion[J]. *Renewable Energy Resources*, 2013, 31(7):60-63, 69.
- [17] 李昀地, 陈亮, 赵良贵. 三种重金属离子对甲烷氧化菌生长的影响[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2011, 34(2):315-319. LI Y D, CHEN L, ZHAO G G. Effects of three heavy metal ions on the growth of methanotrophic bacteria[J]. *Journal of Shanxi University (Natural Science Edition)*, 2011, 34(2):315-319.
- [18] 刘子旭, 孙力平, 李玉友, 等. 红霉素对产甲烷菌的抑制及其驯化[J]. 环境科学, 2013, 34(4):1540-1544. LIU Z X, SUN L P, LI Y Y, et al. Inhibition of methanogenium by erythromycin and its domestication[J]. *Environmental Science*, 2013, 34(4):1540-1544.
- [19] KONG W D, ZHU Y G, FU B J, et al. The veterinary antibiotic oxytetracycline and Cu influence functional diversity of the soil microbial community[J]. *Environmental Pollution*, 2006, 143(1):129-137.
- [20] YANG R, XIA X M, WANG J H, et al. Dose and time-dependent response of single and combined artificial contamination of sulfamethazine and copper on soil enzymatic activities[J]. *Chemosphere*, 2020, 250(6):126161.
- [21] ZHANG Y, CUI M, DUAN J, et al. Abundance, rather than composition, of methane-cycling microbes mainly affects methane emissions from different vegetation soils in the Zoige alpine wetland[J]. *Microbiology*, 2019, doi:10.1002/mb.3699.
- [22] MEYNARD A, ESPINOZA-GONZÁLEZ C, NÚÑEZ A, et al. Synergistic, antagonistic, and additive effects of heavy metals (copper and cadmium) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) under binary and tertiary combinations in key habitat-forming kelp species of Chile[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021, 28:18300-18307.
- [23] 徐佳迎. 磺胺二甲嘧啶影响农田土壤温室气体的(CO₂、CH₄和N₂O)排放的微生物机制研究[D]. 南京:南京农业大学, 2020. XU J Y. Microbial mechanisms of sulfamethazine on greenhouse gas (CO₂, CH₄ and N₂O) emissions from farmland soils[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2020.
- [24] CHEN Z Q, WU Y Q, WEN Q X, et al. Effects of multiple antibiotics on greenhouse gas and ammonia emissions during swine manure composting[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, 27:7289-7298.
- [25] 张敬沙. 兽用抗生素磺胺二甲嘧啶对稻麦农田CH₄、N₂O和NH₃排放关联因子的影响[D]. 南京:南京农业大学, 2018. ZHANG J S. Effects of the veterinary antibiotic sulfamethazine on factors related to CH₄, N₂O and NH₃ emissions in rice-wheat croplands[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2018.
- [26] 徐佳迎, 周金蓉, 吴杰, 等. 磺胺二甲嘧啶对稻田土壤微生物的中长期效应[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(8):1757-1766. XU J Y, ZHOU J R, WU J, et al. Medium- and long-term effects of the veterinary antibiotic sulfadiazine on soil microorganisms in a rice field[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(8):1757-1766.
- [27] MISHRA S R, SETHUNATHAN N, ADHYA T K, et al. Effects of heavy metals on methane production in tropical rice soils[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1999, 44(1):129-136.
- [28] 刘晓佩. 磺胺甲恶唑和铜离子对畜禽废水厌氧消化的影响[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2018. LIU X P. Effects of sulfamethoxazole and copper on anaerobic digestion of livestock wastewater[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2018.
- [29] GIANOPOULOS G, HARTOP K R, BROWN B L, et al. Trace metal availability affects greenhouse gas emissions and microbial functional group abundance in freshwater wetland sediments[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11:560861.
- [30] XU Y G, YU W T, MA Q, et al. The combined effect of sulfadiazine and copper on soil microbial activity and community structure[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2016, 134:43-52.
- [31] MOHANTY S R, BHARATI K, DEEPA N, et al. Influence of heavy metals on methane oxidation in tropical rice soils[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2000, 47(3):277-284.
- [32] WALKIEWICZ A, BULAK P, BRZEZINSKA M, et al. Methane oxidation in heavy metal contaminated mollic gleysol under oxic and hypoxic conditions[J]. *Environmental Pollution*, 2016, 213:403-411.
- [33] CHAPERON S, SAUVÉ S. Toxicity interaction of metals (Ag, Cu, Hg, Zn) to urease and dehydrogenase activities in soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(9):2329-2338.
- [34] GILLER K E, WITTER E, MCGRATH S P. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: A review[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1998, 30(10/11):1389-1414.
- [35] MOREL M C, SPADINI L, BRIMO K, et al. Speciation study in the sulfamethoxazole-copper-pH-soil system: Implications for retention prediction[J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 481:266-273.
- [36] 商和平, 李洋, 张涛, 等. 畜禽粪便有机肥中Cu、Zn在不同农田土壤中的形态归趋和有效性动态变化[J]. 环境科学, 2015, 36(1):314-324. SHANG H P, LI Y, ZHANG T, et al. Form tendency and bio-availability dynamics of Cu and Zn in different farm soils after application of organic fertilizer of livestock and poultry manures[J]. *Environmental Science*, 2015, 36(1):314-324.
- [37] 刘爱菊, 刘敏, 李梦红, 等. Cu、抗生素协同污染对土壤微生物活性的影响[J]. 生态环境学报, 2013, 22(11):1825-1829. LIU A J, LIU M, LI M H, et al. Collaborative effects of Cu and antibiotic on soil microbial activities[J]. *Ecology and Environment Sciences*, 2013, 22(11):1825-1829.