

城市生活污水和生活垃圾渗滤液抗生素抗性基因污染的比较研究

黄福义¹, 李虎^{1,2}, 安新丽^{1,2}, 欧阳纬莹^{1,2}, 苏建强^{1*}

(1. 中国科学院城市环境研究所城市环境与健康重点实验室, 厦门 361021; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 为研究城市生活污水(接收生活垃圾渗滤液后合并进入污水厂处理)和垃圾渗滤液中抗生素抗性的分布格局,采用高通量荧光定量 PCR 技术对城市生活污水和生活垃圾渗滤液中的抗生素抗性基因的多样性和丰度进行了分析。结果表明,生活垃圾渗滤液中检测出 39 种抗性基因,城市生活污水中检测出 187 种抗性基因,两者检出的抗生素抗性种类有显著差异($P < 0.05$);相对于垃圾渗滤液,城市生活污水抗生素抗性基因有 119 种显著增加($P < 0.05$),其中增加倍数最大的是转座子 *tnpA*-04 基因, *bla_{VEB}* 基因,分别达到了 3 338 倍和 1 061 倍,表明可移动元件转座子基因和 β -内酰胺类抗生素抗性基因在城市生活污水中得到有效富集和传播;城市生活污水是环境抗生素抗性基因的重要存储库。

关键词: 城市生活污水; 生活垃圾渗滤液; 抗生素; 抗生素抗性基因; 高通量定量 PCR

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2016)10-3949-06 DOI: 10.13227/j.hjks.2016.10.037

Comparative Investigation of Antibiotic Resistance Genes Between Wastewater and Landfill Leachate

HUANG Fu-yi¹, LI Hu^{1,2}, AN Xin-li^{1,2}, OUYANG Wei-ying^{1,2}, SU Jian-qiang^{1*}

(1. Key Laboratory of Urban Environment and Health, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: The increasing output of wastewater and landfill leachate during the rapid urbanization exacerbated the human health risks induced by antibiotic resistance genes (ARGs). For further insight into antibiotic resistance genes (ARGs) of wastewater (adding leachate before treatment) and landfill leachate, high-throughput qPCR technique was used to investigate their abundance and diversities. A total of 187 unique ARGs were detected in wastewater, which was significantly higher than that in leachate (39 unique ARGs were detected) ($P < 0.05$). A total of 119 antibiotic resistance genes were significantly enriched in wastewater compared with the landfill leachate ($P < 0.05$), especially the *tnpA*-04 and *bla_{VEB}*, which belongs to mobile gene elements (MGEs) and β -Lactamase, increased by 3 338-fold and 1 061-fold, respectively. Our results showed that the profile of ARGs was significantly different between the wastewater and leachate, and the wastewater was the important reservoir of ARGs.

Key words: wastewater; landfill leachate; antibiotic; antibiotic resistance genes; high-throughput qPCR

随着我国新型城镇化的不断推进以及城市人口的持续增加,城市生活污水和生活垃圾的产生量也不断增加。城市生活污水和生活垃圾填埋场产生的垃圾渗滤液是城市环境保护工作的重点和难点。抗生素在养殖、医疗保健等行业被广泛使用,并存在着过度使用、长期滥用等现象,并且产生了严重的环境抗生素抗性的问题,抗生素抗性基因在环境中不断传播与富集,严重危害人类健康与环境安全。各种环境介质中,包括猪场土壤^[1,2]、污泥堆肥^[3,4]、城市河流水体^[5]、施用猪粪水稻土^[6],甚至自来水^[7,8]中也检测出环境抗生素抗性基因,环境抗生素抗性基因研究取得了一些进展^[9]。Pruden等^[10]2006年首次提出将抗生素抗性基因作为一种新型环境污染物的,逐渐引起全球科学家和公众的高度关注。

城市生活污水主要是指城市生活中的各种餐厨污水、垃圾、粪便、洗涤剂等各种污染水体形成的混合污水,氮、磷、硫等营养元素含量较高,微生物含量高,并且含有病原微生物^[11,12]。生活垃圾填埋场是城市生活垃圾、污水厂的处置污泥、电子废弃物、垃圾焚烧厂飞灰残渣等固体废弃物的主要最终堆放场所。垃圾渗滤液是伴随垃圾填埋场运营整个生命周期的“二次污染物”。生活垃圾渗滤液具有污染物成分复杂,污染物浓度高的特点,相较于城市生活污水,其高浓度的氨氮、有毒有害物质,重金属离

收稿日期: 2016-03-04; 修订日期: 2016-05-16

基金项目: 国家重点研发计划重点专项(2016YFD0800205); 国家自然科学基金项目(31270153); 国家自然科学基金国际(地区)合作交流项目(21210008)

作者简介: 黄福义(1987~),男,硕士,助理工程师,主要研究方向为环境抗生素抗性基因污染, E-mail: fyhuang@iue.ac.cn

* 通讯联系人, E-mail: jqsu@iue.ac.cn

子等特征形成了一个特殊环境,尤其是场龄大于 5 a 的垃圾渗滤液可生化性差^[13]。受人类生产生活的影 响,城市生活污水和垃圾渗滤液中含有抗生素残留以及抗生素抗性的微生物,被认为是环境抗生素抗性的一个重要存储库^[14~16]。

由于垃圾渗滤液深度处理后产生了难以处理的浓缩液,垃圾渗滤液(包括浓缩液)往往被运送到城市生活污水处理厂进行合并处理^[13,17]。目前,城市生活污水处理过程中的抗生素抗性基因污染分布及演变有较多相关研究^[18,19],并且主要是针对磺胺类、四环素类等少数几种抗生素抗性基因。针对城市生活污水(接收垃圾渗滤液进行合并处理)和生活垃圾渗滤液环境抗生素抗性的对比研究,从抗生素抗性谱的角度全面研究这两者间的抗性基因污染还没有或者比较少相关研究报道。因此,对城市生活污水和生活垃圾渗滤液中抗生素抗性种类、分布格局开展对比研究,比较两者之间的异同,综合分析研究城市生活污水和垃圾渗滤液抗生素抗性基因污染状况,对于加强城市生活污水和垃圾渗滤液管理与处置,评估两者的生态安全情势和环境风险显得十分必要。

1 材料与方法

1.1 样品采集及前处理

城市生活污水样品于 2015 年 7 月采集自厦门市某污水处理厂(接收厦门市东部固废处理中心生活垃圾填埋场部分的垃圾渗滤液和垃圾渗滤液处置后浓缩液)的进水样品 1 L(3 个采样平行样品),其中添加了终浓度为 50% 乙醇进行预处理,用于固定污水中微生物。生活垃圾渗滤液采样地点位于厦门市东部固废处理中心生活垃圾填埋场,于 2015 年 7 月采集了垃圾渗滤液调节池末端,也是渗滤液处理站污水进口端样品 1 L(3 个采样平行样品),同样在采集样品中添加了乙醇进行预处理。所采集的城市生活污水和生活垃圾渗滤液,存放在低温采样箱中并迅速转移至实验室的 -20℃ 冰箱中保存,用于环境样品的 DNA 提取。

1.2 城市生活污水和生活垃圾渗滤液 DNA 提取

量取城市生活污水(raw wastewater, RWW)和生活垃圾渗滤液(raw leachate, RLC)各 40 mL,分装到 50 mL 离心管中,使用 12 000 r·min⁻¹ 转速离心 10 min,倒掉上清液,每个离心管中再加入 1 mL 生理盐水,振荡并悬浮起离心管底部固体,从而达到清洗效果。再将离心管中的全部样品分别转移至新的 1.5

mL 离心管中,18 000 r·min⁻¹ 转速离心后,弃去上清液。然后加入 FastDNA® Spin Kit for Soil 试剂盒(MP Biomedicals,美国)中的 PBS 缓冲液(978 μL)。

随后将上述含有采集样品的 PBS 缓冲液转移至试剂盒中的 Lysing Matrix E tube,按照生产商提供的方法提取样品中的总 DNA,然后用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳验证。样品所提取的 DNA 样品用 QuantiFluor® dsDNA System (Promega Corporation, 美国)试剂盒测定双链 DNA 浓度。根据测定的样品 DNA 浓度,实验样品用灭菌的超纯水统一稀释至 50 ng·μL⁻¹。

1.3 高通量荧光定量 PCR

采用 SmartChip Real-Time PCR Systems (WaferGen Inc., 美国)高通量荧光定量反应平台。研究中所采用的 293 对引物在先前的相关的研究中被有效验证过^[1]。此外另外添加了 1 对用于检定超级细菌抗生素抗性基因 *bla*_{NDM-1} 的引物^[20], 1 对 *intI1* 整合子基因(class 1 integron)引物^[21]和 1 对 *CintII* 临床医学意义上的整合子基因(clinical class 1 integron)引物^[22]。

PCR 扩增反应的体积为 100 nL。反应体系中各试剂的终浓度为: 1 × 的 LightCycler 480 SYBR® Green I Master Mix (Roche, 美国), nuclease-free PCR-grade water, 1 ng·μL⁻¹ 的 BSA, 5 ng·μL⁻¹ 的 DNA 模板, 1 μmol·L⁻¹ 的上下游引物。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 10 min; 95℃ 变性 30 s, 60℃ 退火延伸 30 s, 总共 40 个循环; 仪器程序自动升温进行熔解曲线分析。高通量定量 PCR 每个芯片都有不添加 DNA 模板的阴性对照。qPCR 反应得到的数据通过 Cyclor 预设定的筛选条件(扩增效率介于 1.8 ~ 2.2)进行导出。根据 SmartChip Real-Time PCR Systems 的灵敏度和精确度,确定循环次数 C_T 值为 31 时作为仪器的检测限。每个样品都进行 3 次技术重复实验,当 3 次技术重复都被扩增出来时认为是阳性扩增,3 个采样平行样品都是阳性扩增时,认为样品的目的基因被有效检出。

1.4 数据分析

基因的相对拷贝数(gene relative copy number)参照 Loof 等^[23]的研究,用公式(1)进行估算。根据 Schmittgen 等^[24]关于相对定量分析方法,用 FC(fold change)值,采用公式(2)来计算表征相对于城市生活污水对照样品,生活垃圾渗滤液的抗生素抗性的富集或者衰减状况。

$$\text{基因的相对拷贝数} = 10^{\left[\frac{31 - C_T}{10/3} \right]} \quad (1)$$

$$\begin{aligned}\Delta C_T &= C_{T(\text{ARG})} - C_{T(16S)} \\ \Delta\Delta C_T &= \Delta C_{T(\text{Target})} - \Delta C_{T(\text{Ref})} \\ FC &= 2^{-(\Delta\Delta C_T)}\end{aligned}\quad (2)$$

式中, C_T 是 PCR 反应收集到特定荧光时的循环次数, ARG 代表抗生素抗性基因, 16S 是代表 16S rDNA 基因, Target 是环境实验样品, Ref 是对照样品, FC 是 ARGs 拷贝数的富集或衰减程度. 当 $FC = 2^{-(\Delta\Delta C_T + 2)}$ > 1 时, 且 student t 检验具有显著性时, 认为环境实验样品相对于对照样品显著富集.

2 结果与讨论

2.1 城市生活污水和垃圾渗滤液中抗生素抗性基因的多样性

根据实验中使用的 296 对引物, 按照基因对应抗生素类型分为氨基糖苷类抗生素 (Aminoglycoside)、 β -内酰胺类抗生素 (β -Lactamase)、氯霉素类抗生素 (Chloramphenicol)、大环内脂类-林肯酰胺类-链阳性菌素 B 类抗生素 (MLSB)、磺胺类抗生素 (Sulfonamide)、四环素类抗生素 (Tetracycline)、万古霉素类抗生素 (Vancomycin) 和其他类或者发挥外排泵作用 (other/efflux) 这 8 类抗生素抗性基因. 城市生活污水 (RWW) 检测出 187 抗生素抗性基因, 垃圾渗滤液检测出 39 中抗生素抗性基因 (图 1). 其中, 城市生活污水检测到的抗生素抗性基因涵盖了以上全部 8 类抗生素类型, 而垃圾渗滤液检测到的抗性基因类型只含有氨基糖苷类抗生素 (Aminoglycoside)、大环内脂类-林肯酰胺类-链阳性菌素 B 类抗生素 (MLSB)、四环素类抗生素 (Tetracycline) 和其它类或者发挥外排泵作用 (other/efflux) 这 4 类抗生素抗性类型. 有研究表明, 垃圾渗滤液中四环素类抗生素类型在中国 6 个不同地理位置的垃圾填埋场渗滤液中被有效检出^[25, 26], 与本研究结果一致. 此外, 垃圾渗滤液检测到的 4 类抗生素抗性类型中的抗性基因数目均小于生活污水中的对应类型抗性基因数目. 抗生素抗性基因按照抗性机制可以分成抗生素失活 (deactivation)、外排泵作用机制 (efflux)、核糖体保护机制 (protection) 和未知抗性机制 (unknown) 四大类. 将检测到的抗生素抗性基因从抗生素抗性机制归类分析, 抗生素失活 (deactivation) 是两种污水微生物抗生素抗性最主要机制, 比例分别为 48.13% 和 51.28% (图 2). 垃圾渗滤液检测到的 39 种抗生素抗性基因中只有 $erm_{(35)}$ 基因仅在垃圾渗滤液中检出, 其余 38 种抗性基因在城市生活污水同时

被有效检出. 总体结果表明, 城市生活污水和垃圾渗滤液检测到的抗生素抗性种类有显著差异 ($P < 0.05$).

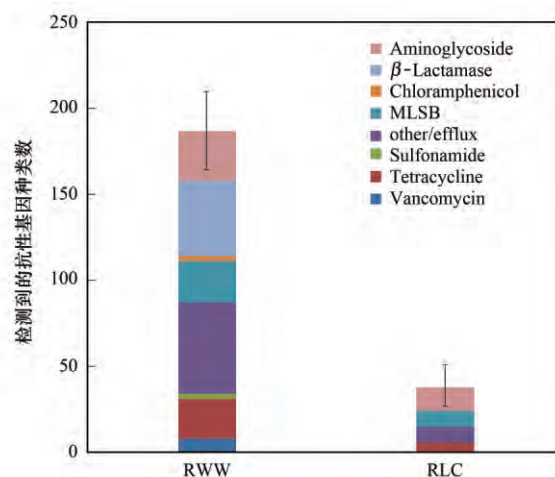


图1 检测到的抗生素抗性基因种类数

Fig. 1 Number of detected antibiotic resistance genes

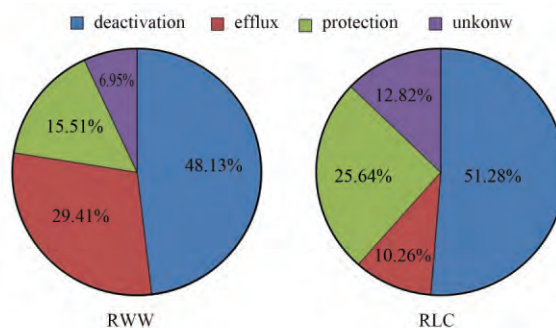


图2 抗生素抗性机制的相对比例

Fig. 2 Ratios of mechanism in detected antibiotic resistance genes

2.2 抗生素抗性基因在城市生活污水和垃圾渗滤液中的污染分布格局

主成分分析表明, 城市生活污水和垃圾渗滤液抗生素抗性基因结构不同, PCA1 解释了抗性基因结构变化的 98.8%. 城市生活污水和垃圾渗滤液抗性基因沿第一轴分为两个簇, 表明抗生素抗性基因在两种城市污水有着不同的分布格局 (图 3). 城市生活污水抗生素抗性基因分布相较于垃圾渗滤液更具有一致性.

Auerbach 等^[27]的研究表明, 城市生活污水 (污水处理厂进水) 四环素类抗生素抗性基因的丰度高达 $10^9 \text{ copies} \cdot \text{L}^{-1}$ 数量级. 相较于垃圾渗滤液, 热图分析表明 (图 4), 城市生活污水的抗生素抗性基因丰度和多样性均显著大于垃圾渗滤液 ($P < 0.05$). 图 4 中 A 簇代表抗生素抗性基因在城市生活污水和垃圾渗滤液中均有检出, 主要类型是氨基糖苷类和四环素类抗生素抗性基因, 并且 A1 簇的抗生素

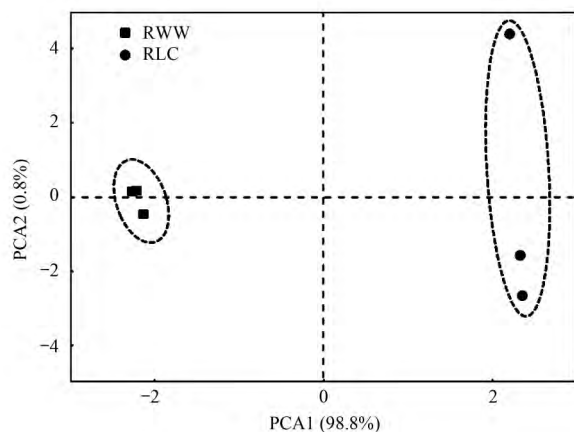


图3 城市生活污水和垃圾渗滤液抗生素抗性基因多样性主成分分析

Fig. 3 Principle component analysis of ARGs in wastewater and landfill leachate

抗性相对于 A2 簇显著富集. B 簇和 C 簇中的抗生素抗性基因仅在城市污水中检出,垃圾渗滤液中未检出(D 簇),并且抗生素抗性潜在表达强度 B 簇大于 C 簇.垃圾渗滤液是垃圾填埋体产生的“二次污染物”^[28],运营时间 5 a 以上的垃圾填埋场产生的垃圾渗滤液含有多有毒有害物质,并且氨氮浓度高,可生化性差^[13].高通量定量 PCR 结果表明垃圾渗滤液抗生素抗性类型和抗性基因丰度低于城市生活污水.热图分析总体结果显示,城市生活污水和生活垃圾渗滤液抗性基因污染分布格局显著不同.

2.3 抗生素抗性基因丰度与城市生活污水抗性基因的富集

广州、福州等地的污水厂接纳当地生活垃圾填埋场垃圾渗滤液进行合并处理,普通生活污水处理厂承担部分垃圾渗滤液的处理任务已经成为垃圾渗滤液处理的“新常态”,实践证明是一种经济有效的方式^[13, 17].本研究中采集的城市生活污水样品中含有一定量的垃圾渗滤液(浓缩液),因此可以将垃圾渗滤液作为对照样品,研究抗生素抗性基因的在这两种城市污水的异同.根据 Schmittgen 等^[24]关于基因拷贝数(gene copy number)的计算(估算)方法,得到了抗生素抗性基因的基因拷贝数(图 5).抗生素抗性基因在城市生活污水抗性基因拷贝数最高是 others 类(包含多重耐药基因、转座子基因、整合子基因等)抗性基因.除此之外,氨基糖苷类抗生素和四环素类的抗性基因的基因拷贝数分别达到了 $1.4 \times 10^8 \text{ copies} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $3.6 \times 10^7 \text{ copies} \cdot \text{L}^{-1}$.垃圾渗滤液中检测到的 39 种抗性基因,分为 4 大类,基因拷贝数最高的是氨基糖苷类抗生素抗性基因,达到

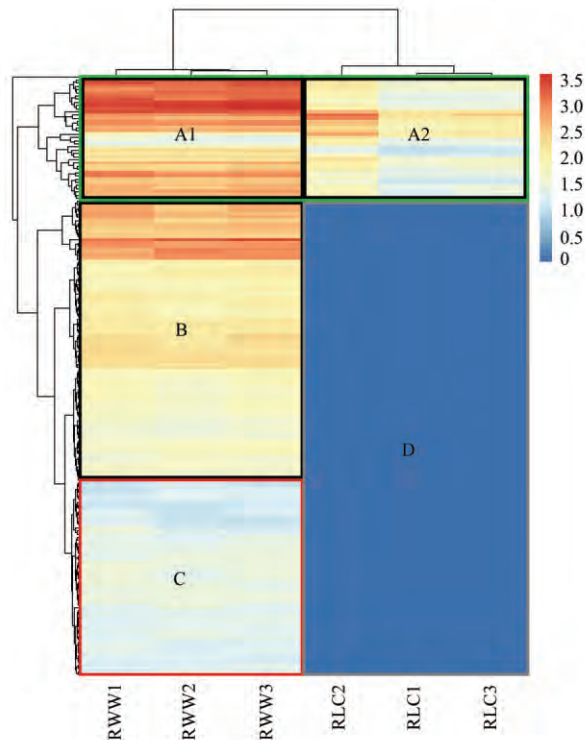


图4 城市生活污水和垃圾渗滤液抗生素抗性基因污染分布格局

Fig. 4 Pollution profile of ARGs in wastewater and landfill leachate

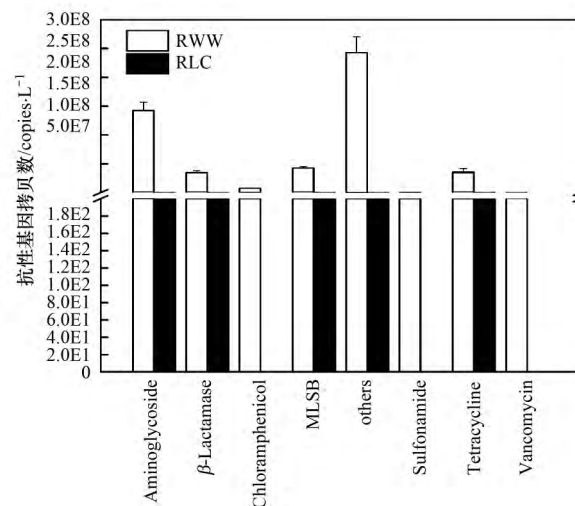


图5 城市生活污水和垃圾渗滤液抗生素抗性基因丰度

Fig. 5 Abundance of ARGs in wastewater and landfill leachate

$1.1 \times 10^5 \text{ copies} \cdot \text{L}^{-1}$,显著低于生活污水中的抗性基因丰度($P < 0.05$).

城市生活污水氮磷等营养元素丰富,相对于垃圾渗滤液其有毒有害物质浓度较低,微生物数量多,世代更新快,并且微生物种类繁多等特性,两者合并处理有一定优势^[13].城市生活污水检出富集的抗性基因总共有 7 大类,其中 119 种抗生素抗性基因

和可移动元件显著增加 ($P < 0.05$), 富集倍数前三的基因是转座子 *tnpA*-04 基因、*bla*_{VEB} 和 *bla*_{OXAI0}-01, 分别达到了 3 338、1 061 和 1 001 倍 (图 6), 表明转座子基因和 β -内酰胺类抗生素抗性基因在城市生活污水中显著富集。环境抗生素抗性基因在微生物中存在着水平基因转移机制 (horizontal gene transfer, HGT), 可移动元件 (MGEs) 与总抗生素抗性存在线性相关^[7], 可能是污水厂的进水普遍有较高的检出率和富集现象的原因之一。抗生素残留和重金属离子对抗生素抗性具有共选择或者诱导作用, 导致了特定类型的抗生素抗性基因的出现和富集^[10, 29]。城市生活污水和垃圾渗滤液都是人类生产生活末端的“副产物”, 含有一定量的抗生素残留和重金属离子, 在分子机制上进一步研究它们与抗生素抗性基因的关系, 分析抗性基因在环境物质胁迫下的演变传播显得十分必要。

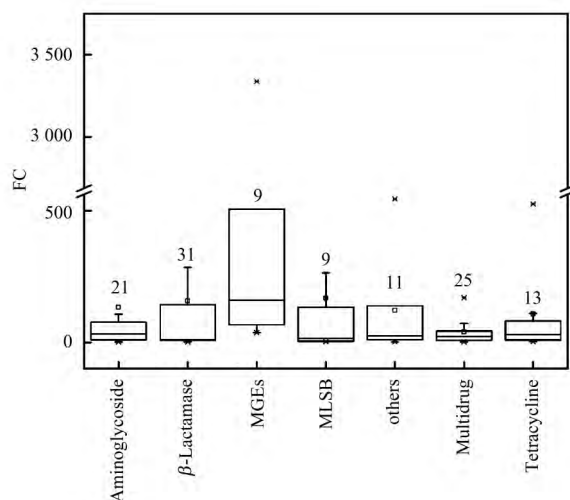


图 6 城市生活污水富集的抗生素抗性基因

Fig. 6 Enriched ARGs in wastewater

虽然 Wang 等^[25] 和 Wu 等^[26] 的研究表明垃圾渗滤液可以检测出四环素类和磺胺类等少量几种抗生素抗性基因, 但是本研究的结果表明垃圾渗滤液抗性基因丰度并不高, 垃圾渗滤液可以跟城市生活污水合并处理, 但是还需考虑高浓度抗生素残留和重金属等可能促进城市生活污水抗生素抗性的潜在影响。此外, 城市生活污水中高丰度和多类型的抗生素抗性基因对于人工湿地处理生活污水等处理方式可能潜在的生态环境安全风险也提供了新的考量和评价视角。

3 结论

(1) 垃圾渗滤液抗生素抗性基因丰度不高, 可

以接入城市生活污水厂合并处理, 城市生活污水是环境抗生素抗性的一个重要存储库。

(2) 抗生素抗性基因在城市生活污水和生活垃圾渗滤液中既有区别又有联系, 有着显著不同的分布格局。

参考文献:

- [1] 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 of the United States of America*, 2013, **110**(9): 3435-3440.
- [2] 吴柄, 乔敏, 朱永官. 猪场土壤中 5 种四环素抗性基因的检测和定量 [J]. *生态毒理学报*, 2009, **4**(5): 705-710.
Wu B, Qiao M, Zhu Y G. Quantification of five tetracycline resistance genes in soil from a swine feedlot [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2009, **4**(5): 705-710.
- [3] Su J Q, Wei B, Ouyang W Y, *et al.* Antibiotic resistome and its association with bacterial communities during sewage sludge composting [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, **49**(12): 7356-7363.
- [4] Rahube T O, Marti R, Scott A, *et al.* Impact of fertilizing with raw or anaerobically digested sewage sludge on the abundance of antibiotic-resistant coliforms, antibiotic resistance genes, and pathogenic bacteria in soil and on vegetables at harvest [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, **80**(22): 6898-6907.
- [5] Ouyang W Y, Huang F Y, Zhao Y, *et al.* Increased levels of antibiotic resistance in urban stream of Jiulongjiang River, China [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, **99**(13): 5697-5707.
- [6] 黄福义, 李虎, 韦蓓, 等. 长期施用猪粪水稻土抗生素抗性基因污染研究 [J]. *环境科学*, 2014, **35**(10): 3869-3873.
Huang F Y, Li H, Wei B, *et al.* Long-term manure application induced shift of diversity and abundance of antibiotic resistance genes in paddy soil [J]. *Environmental Science*, 2014, **35**(10): 3869-3873.
- [7] Xu L K, Ouyang W Y, Qian Y Y, *et al.* High-throughput profiling of antibiotic resistance genes in drinking water treatment plants and distribution systems [J]. *Environmental Pollution*, 2016, **213**: 119-126.
- [8] Xi C W, Zhang Y L, Marrs C F, *et al.* Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, **75**(17): 5714-5718.
- [9] 苏建强, 黄福义, 朱永官. 环境抗生素抗性基因研究进展 [J]. *生物多样性*, 2013, **21**(4): 481-487.
Su J Q, Huang F Y, Zhu Y G. Antibiotic resistance genes in the environment [J]. *Biodiversity Science*, 2013, **21**(4): 481-487.
- [10] Pruden A, Pei R T, Storteboom H, *et al.* Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado [J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, **40**(23): 7445-7450.
- [11] 魏东斌, 胡洪营. 污水再生回用的水质安全指标体系 [J]. *中国给水排水*, 2004, **20**(1): 36-39.
Wei D B, Hu H Y. Safety index system of reclaimed and reused

- water quality[J]. *China Water & Wastewater*, 2004, **20**(1): 36–39.
- [12] Molleda P, Blanco I, Ansola G, *et al.* Removal of wastewater pathogen indicators in a constructed wetland in Leon, Spain[J]. *Ecological Engineering*, 2008, **33**(3–4): 252–257.
- [13] 乔勇, 赵国志. 垃圾渗滤液接入城市污水处理厂存在的问题探讨[J]. *给水排水*, 2006, **32**(2): 13–16.
- Qiao Y, Zhao G Z. Discussion on refuse leachate diverting into urban wastewater treatment plant [J]. *Water & Wastewater Engineering*, 2006, **32**(2): 13–16.
- [14] 李蕾, 徐晶, 赵由才, 等. 垃圾填埋场抗生素抗性基因初探[J]. *环境科学*, 2015, **36**(5): 1769–1775.
- Li L, Xu J, Zhao Y C, *et al.* Investigation of antibiotic resistance genes (ARGs) in landfill [J]. *Environmental Science*, 2015, **36**(5): 1769–1775.
- [15] Schwartz T, Kohnen W, Jansen B, *et al.* Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003, **43**(3): 325–335.
- [16] Rizzo L, Manaia C, Merlin C, *et al.* Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review [J]. *Science of the Total Environment*, 2013, **447**: 345–360.
- [17] 余建恒, 赵淑贤, 夏耿东, 等. 接入垃圾渗滤液对城市污水处理厂运行的影响与对策[J]. *中国给水排水*, 2010, **26**(4): 95–97.
- Yu J H, Zhao S X, Xia G D, *et al.* Impact and countermeasures of treating landfill leachate in municipal sewage treatment plant [J]. *China Water & Wastewater*, 2010, **26**(4): 95–97.
- [18] Ghosh S, Ramsden S J, LaPara T M. The role of anaerobic digestion in controlling the release of tetracycline resistance genes and class 1 integrons from municipal wastewater treatment plants [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, **84**(4): 791–796.
- [19] Diehl D L, LaPara T M. Effect of temperature on the fate of genes encoding tetracycline resistance and the integrase of class 1 integrons within anaerobic and aerobic digesters treating municipal wastewater solids [J]. *Environmental Science & Technology*, 2010, **44**(23): 9128–9133.
- [20] Ahammad Z S, Sreekrishnan T R, Hands C L, *et al.* Increased waterborne *bla*_{NDM-1} resistance gene abundances associated with seasonal human pilgrimages to the Upper Ganges River [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, **48**(5): 3014–3020.
- [21] Stokes H W, Nesbø C L, Holley M, *et al.* Class 1 integrons potentially predating the association with Tn402-like transposition genes are present in a sediment microbial community [J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, **188**(16): 5722–5730.
- [22] Gillings M R, Gaze W H, Pruden A, *et al.* Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution [J]. *The ISME Journal*, 2015, **9**(6): 1269–1279.
- [23] Looft T, Johnson T A, Allen H K, *et al.* In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, **109**(5): 1691–1696.
- [24] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative *C_T* method [J]. *Nature Protocols*, 2008, **3**(6): 1101–1108.
- [25] Wang Y Q, Tang W, Qiao J, *et al.* Occurrence and prevalence of antibiotic resistance in landfill leachate [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, **22**(16): 12525–12533.
- [26] Wu D, Huang Z T, Yang K, *et al.* Relationships between antibiotics and antibiotic resistance gene levels in municipal solid waste leachates in Shanghai, China [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, **49**(7): 4122–4128.
- [27] Auerbach E A, Seyfried E E, McMahon K D. Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants [J]. *Water Research*, 2007, **41**(5): 1143–1151.
- [28] 陈家军, 张俊丽, 裴照滨. 垃圾填埋二次污染的危害与防治[J]. *安全与环境学报*, 2002, **2**(3): 27–30.
- Chen J J, Zhang J L, Pei Z B. Hazard and control of secondary pollution in sanitary refuse landfilling [J]. *Journal of Safety and Environment*, 2002, **2**(3): 27–30.
- [29] Chen S C, Li X M, Sun G X, *et al.* Heavy metal induced antibiotic resistance in bacterium LSJC7 [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, **16**(10): 23390–23404.