

DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2022111001

吴丹妮, 冯皓迪, 代世婷, 等. 畜禽粪便源有机肥中四环素类抗生素及转化产物的分布特征[J]. 环境化学, 2024, 43(5): 1445-1454.

WU Danni, FENG Haodi, DAI Shiting, et al. Occurrence of tetracyclines and their transformation products in manure-based organic fertilizers[J]. Environmental Chemistry, 2024, 43(5): 1445-1454.

畜禽粪便源有机肥中四环素类抗生素及转化产物的分布特征*

吴丹妮^{1,2} 冯皓迪^{2,3} 代世婷^{2,4} 马春萌^{2,4} 杨敏^{2,4} 张昱^{1,2,4}**

(1. 郑州大学 河南先进技术研究院, 郑州, 450003; 2. 中国科学院生态环境研究中心环境水质学国家重点实验室, 北京, 100085; 3. 北京交通大学 市政与环境工程系, 北京, 100044; 4. 中国科学院大学, 北京, 100049)

摘要 畜禽粪便源有机肥是农田土壤中抗生素母体及转化产物污染的重要来源之一. 为研究畜禽粪便源有机肥中四环素类抗生素及转化产物的残留情况, 在全国8个省(市)采集55个有机肥样品, 采用超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS), 分析畜禽粪便源有机肥中四环素、强力霉素、金霉素和土霉素4种四环素类抗生素及10种转化产物的分布特征. 结果表明, 四环素、强力霉素、金霉素和土霉素在55个有机肥样品中均有检出, 浓度分别为1.63—4348 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、ND—11451 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、ND—30300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、7.11—55008 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. 10种转化产物中, 差向异构体是主要的转化产物. 不同畜禽粪便来源的有机肥中四环素类抗生素及转化产物的浓度存在显著差异, 猪粪肥样品中四环素类抗生素及转化产物的浓度高于鸡粪肥、牛粪肥和羊粪肥. 畜禽粪便资源化利用模式可能也会影响有机肥中四环素类抗生素的浓度. 种养结合模式生产的有机肥中四环素类抗生素及转化产物的浓度显著高于集中处理模式生产的有机肥. 进一步研究了典型地区畜禽粪便源有机肥和施肥土壤中的四环素类抗生素及转化产物残留的污染特征, 发现四环素类抗生素及转化产物通过施用有机肥进入土壤环境中, 差向异构体在施肥土壤中仍是主要的转化产物. 畜禽粪便源有机肥和施肥土壤中四环素类抗生素及转化产物的残留不容忽视.

关键词 畜禽粪便源有机肥, 施肥土壤, 四环素类抗生素, 转化产物.

中图分类号 X-1; O6 文献标识码 A

Occurrence of tetracyclines and their transformation products in manure-based organic fertilizers

WU Danni^{1,2} FENG Haodi^{2,3} DAI Shiting^{2,4} MA Chunmeng^{2,4}
YANG Min^{2,4} ZHANG Yu^{1,2,4}**

(1. Henan Institutes of Advanced Technology, Zhengzhou University, Zhengzhou, 450003, China; 2. State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100085, China; 3. Department of Municipal and Environmental Engineering, Beijing Jiaotong University, Beijing, 100044, China; 4. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049, China)

Abstract Manure-based organic fertilizers are important sources of pollution of antibiotic and transformation products in farmland soil. To study the residues of tetracyclines and transformation products in manure-based organic fertilizers, 55 organic fertilizer samples were collected from eight provinces in China. Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was used to analyze the distribution characteristics of tetracycline, doxycycline,

2022年11月10日收稿(Received: November 10, 2022).

* 国家自然科学基金(22076203)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China (22076203).

** 通信联系人 Corresponding author, Tel: 86-10-62919883, E-mail: zhangyu@rcees.ac.cn

chlortetracycline, oxytetracycline and their transformation products in organic fertilizers. The results showed that tetracycline, doxycycline, chlortetracycline and oxytetracycline were detected in 55 organic fertilizer samples, and the concentrations were 1.63—4348 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, ND—11451 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, ND—30300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 7.11—55008 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively. Among the 10 transformation products, the 4-epimers were the main transformation products. There were significant differences in the contents of tetracyclines and their transformation products in organic fertilizers produced from manure of different animal species. The concentrations and detection rates of tetracyclines and their transformation products in swine manure fertilizers were higher than those in chicken manure fertilizers, cattle manure fertilizers and sheep manure fertilizers. The treatment model of resource utilization of livestock manure might also affect the contents of tetracyclines in organic fertilizers. The concentrations of tetracyclines and their transformation products in organic fertilizers produced by the model of combination of farming and animal husbandry were significantly higher than those produced by the mode of centralized treatment. The pollution characteristics of tetracyclines and their transformation products in manure-based organic fertilizers and fertilized soil in typical areas were further studied. The results showed that the 4-epimers were still the main transformation products in the fertilized soil. Therefore, the residues of tetracyclines and their transformation products in manure-based organic fertilizers and fertilized soil cannot be ignored.

Keywords manure-based organic fertilizer, fertilized soil, tetracyclines, transformation products.

四环素类抗生素(tetracyclines, TCs)具有治疗和预防动物疾病、促进动物生长、提高畜牧业生产力等作用^[1],是我国畜禽养殖业中使用量最大的一类兽用抗生素,约占总使用量的37%^[2-3].不同动物使用的抗生素类型和剂量不同.猪和鸡的高养殖密度和较短的繁殖期,抗生素使用频繁;通常牛的养殖密度较低,抗生素相对使用率低^[4].四环素类抗生素不能被动物机体完全吸收,以母体或代谢物的形式随畜禽粪便排出^[5].畜禽粪便通过集中处理和种养结合等模式生产有机肥^[6]的肥料化利用是其处理和资源化利用的主要方式^[7].有机肥中仍存在较高浓度的土霉素、四环素和金霉素等TCs残留^[8],施用有机肥的农田土壤中TCs母体的残留水平也可高达 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 水平^[9].残留的抗生素可能会对土壤微生物施加选择压力,导致细菌耐药性增加^[10];同时土壤中的抗生素也可被动、植物吸收,并可能通过食物链进入到人体,对健康构成潜在危害^[11-12].

TCs容易发生水解或光解,可通过差向异构化,脱水和质子转移途径形成差向异构体、脱水产物、差向脱水产物等转化产物^[13-14].一些四环素类转化产物不仅毒性更大,而且在环境中更稳定^[12].有研究发现污泥中的TCs母体及转化产物可能会对水生生物造成明显的水生毒性风险^[15].一些转化产物如脱水四环素对敏感和耐药的土壤细菌具有较大的毒性^[13].为全面评估抗生素的环境影响,欧盟委员会“REACH”法规建议应同时考虑抗生素母体及转化产物的残留和风险^[16].四环素类转化产物在畜禽粪便^[17]和施肥土壤^[18]中也有较高水平的检出.猪粪源有机肥及其施肥土壤四环素类抗生素和转化产物的总浓度分别为 $851\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $776\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[19].然而,目前关于不同动物类型和资源化处理模式的有机肥及施肥土壤中四环素类抗生素的分布特征并不清楚,特别是针对四环素类抗生素转化产物的研究仍非常有限.

本研究以4种兽用TCs(四环素、土霉素、金霉素及强力霉素)及10种转化产物为研究对象,对全国8个省(市)不同类型畜禽粪便源(猪粪、鸡粪、牛粪及羊粪)有机肥样品进行采样调查,主要研究了1)有机肥中4种四环素类抗生素及10种转化产物的分布特征;2)不同动物类型和畜禽粪便处理模式对有机肥中四环素类抗生素及转化产物的影响;3)典型地区有机肥和施肥土壤中的四环素类抗生素及转化产物的残留情况.本研究有助于了解畜禽粪便处理和利用过程中的四环素类转化产物的分布特征和归趋行为,为畜禽粪便的资源化利用和土壤安全施用提供数据基础.

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 化学品和材料

本研究选择了 4 种四环素类抗生素, 包括四环素(tetracycline hydrochloride, 98.0%)、土霉素(oxytetracycline hydrochloride, $\geq 95\%$)、金霉素(chlortetracycline hydrochloride, 96.9%)和强力霉素(doxycycline hyclate, 99.3%)和 10 种主要转化产物 4-差向四环素(4-epi-tetracycline hydrochloride, 90.0%)、脱水四环素(anhydrotetracycline hydrochloride, 93.0%)、4-差向脱水四环素(4-epianhydrotetracycline hydrochloride, 87.1%)、4-差向金霉素(4-epi-chlortetracycline hydrochloride, 84.9%)、异金霉素(isochlortetracycline, 96.0%)、脱水金霉素(anhydrochlortetracycline hydrochloride, 97.6%)、4-差向脱水金霉素(4-epi-anhydrochlortetracycline hydrochloride, 95%)、4-差向土霉素(4-epi-oxytetracycline, $\geq 95\%$)、 α -apo-土霉素(alpha-apo-oxytetracycline, $\geq 95\%$)、 β -apo-土霉素(beta-apo-oxytetracycline, $\geq 95\%$)进行了分析。差向四环素、脱水四环素、脱水四环素和金霉素购自欧洲药品质量管理局, 土霉素、差向土霉素、 α -apo-土霉素、 β -apo-土霉素购自美国 Sigma 公司, 四环素、异金霉素、差向脱水金霉素购自加拿大 Toronto Research Chemical 公司, 差向金霉素购自中国 Bepure 公司, 强力霉素购自德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司。内标四环素- d_6 (tetracycline- d_6)、去甲基金霉素(demeclocycline hydrochloride, 97.0%)、U- $[^{13}C_{22}^{15}N_2]$ -土霉素和强力霉素- d_3 (doxycycline- d_3)分别购自加拿大 Toronto Research Chemical 公司, 德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司以及奥地利 Romerlabs 公司。标准品充分溶于甲醇配制成浓度为 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储备溶液, 于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 密封保存。

甲醇, 乙腈和甲酸均为 HPLC 级, 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。柠檬酸、乙二胺四乙酸二钠(Na_2EDTA)和磷酸二钠(Na_2HPO_4)、盐酸(HCl)为分析纯级, 购自国药集团化学试剂有限公司。配制 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2EDTA -McIlvaine 缓冲液作为提取剂^[17]。固相萃取柱选用强阴离子交换柱(SAX, 500 mg, 6 mL, Agilent, USA)和 Oasis HLB 固相萃取柱(500 mg, 6 mL, Waters, USA)。

1.2 样品采集

从 2019 年到 2021 年, 在山东、上海、河南、河北、内蒙古、新疆、青海、吉林等 8 个省(自治区、市)采集畜禽粪便源有机肥样品 55 个(7 月、12 月采集青海有机肥样品; 3 月、9 月采集上海有机肥; 其余有机肥于 12 月采集)。根据畜禽粪便资源化处理模式的不同, 有机肥样品主要分为集中处理模式和种养结合模式生产的有机肥^[6]。其中 23 个有机肥样品为种养结合模式生产的有机肥, 大部分采用自然堆置处理工艺(青海 10 个, 上海 10 个, 新疆 3 个); 32 个有机肥样品为集中处理模式生产的有机肥, 采用高温堆肥处理工艺(其余 5 个省份采集)。在每个堆肥阶段结束时采集有机肥样品。在上海采集 9 个施用畜禽粪便源有机肥的种有农作物的土壤样品(施肥约 2 月后采集)和 5 个未施肥的对照土壤样品。有机肥和土壤样品采回后经冷冻干燥处理, 研磨, 过 0.5 mm 筛, 于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 密封保存用于测定。

1.3 样品的前处理

有机肥样品^[20-21]: 称取 1 g 干燥研磨的有机肥样品, 加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 内标混合液($200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 静置过夜。加入 5 mL Na_2EDTA -McIlvaine 缓冲液($\text{pH}=4.0$), 涡旋混匀后再加入 5 mL 有机提取液(甲醇/乙腈, 3:2, V/V), 涡旋 1 min 后超声提取 15 min , $3750\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 10 min , 收集上清液。再重复提取 2 次, 合并上清液过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔有机滤膜。加超纯水稀释至 300 mL 后用稀盐酸调节 pH 至 3.0 。依次用 5 mL 甲醇, 5 mL 超纯水和 5 mL Na_2EDTA -McIlvaine 缓冲液活化固相萃取柱。提取液以 $3\text{--}5\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 的流速通过 SAX-HLB 串联固相萃取柱进行富集净化。HLB 柱用 5 mL 超纯水和 5 mL 的 5% 甲醇水溶液淋洗并氮气吹干, 然后用 10 mL 含 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 草酸的甲醇溶液洗脱目标物。洗脱液在 $35\text{ }^\circ\text{C}$ 下氮吹至近干, 用 1 mL 1:9 甲醇水溶液复溶, 过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 有机滤膜, 待测。

土壤样品^[18]: 称取 1 g 干燥研磨后的土壤样品, 加入 $100\text{ }\mu\text{L}$ 内标混合液。提取过程与有机肥样品相同。土壤提取液用 HLB 固相萃取柱净化与富集, 其余处理过程与有机肥样品相同。

1.4 UPLC-ESI-MS/MS 分析

采用 Waters Acquity 超高效液相色谱和 Acquity UPLC BEH RP18 色谱柱($1.7\text{ }\mu\text{m}$; $2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}$,

Waters)实现 14 种目标物的分离. 柱温为 35 °C, 进样量为 5 μL ^[13]. 流动相使用 0.1% 的甲酸水(A)和甲醇(B), 流速为 0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 采用梯度洗脱程序如下: 0—1 min, 15% B; 1—4.5 min, 15%—25% B; 4.5—7.5 min, 25%—90% B; 7.5—8.5 min, 90%—100% B; 8.5—10.5 min, 100%—15% B, 并保持 1 min, 总运行时间为 11.5 min.

质谱分析使用 Waters Micromass XEVO TQ 质谱, 正离子模式, 操作参数为: 离子源温度为 150 °C; 脱溶剂温度为 350 °C; 脱溶剂气流速为 600 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$; 锥孔气流速为 50 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$; 毛细管电压为 3.20 kV. 采用多反应监测(MRM)模式检测.

1.5 质量保证和质量控制

本研究采用多内标法定量分析. TC-d₆^[4]、DC-d₃^[22]、DMC^[21]和 U-[¹³C₂₂¹⁵N₂]-OTC^[22] 分别作为 TC、DC、CTC 和 OTC 及其相应转化产物的内标物. 各目标物标准曲线的 R^2 均大于 0.99. 有机肥中所选目标物的方法定量限为 0.6—5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. 20、100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 两个加标浓度下回收率及相应的相对标准差(RSD)见表 1. 有机肥四种母体的加标回收率为 122%—136%, RSD 小于 3.0%. 除差向脱水金霉素(12%—16%), 其余转化产物加标回收率为 38%—130%, RSD 小于 11.0%. 有机肥中脱水产物的低回收率情况也有不少报道^[17-18, 23]. 脱水产物及其差向异构体的回收率较低可能是由于脱水产物的构象不同于母体, 与有机肥基质中的腐殖质和矿物的吸附能力也不同^[18]. 本研究通过采用多内标法和适当提高氮吹温度缩短氮吹时间等方法, 在一定程度上提高了有机肥中脱水产物的回收率. 土壤样品中母体、差向异构体和异金霉素的方法定量限为 0.7—5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 加标回收率为 83%—135%.

表 1 畜禽粪便源有机肥和土壤样品中四环素类及转化产物的加标回收率

Table 1 The recoveries of tetracyclines and their transformation products in manure-based organic fertilizer and soil samples

目标分析物 Compounds	畜禽粪便源有机肥 Manure-based organic fertilizer		土壤 Soil	
	20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
四环素(TC)	133% (2.1%)	127% (1.9%)	135% (3.1%)	119% (0.8%)
差向四环素(ETC)	113% (3.1%)	101% (2.3%)	103% (1.2%)	96% (1.2%)
脱水四环素(ATC)	88% (13%)	71% (3.4%)	—	—
差向脱水四环素(EATC)	64% (3.3%)	46% (8.5%)	—	—
强力霉素(DC)	124% (3.0%)	123% (0.4%)	85% (1.6%)	83% (1.7%)
金霉素(CTC)	136% (2.5%)	123% (1.8%)	118% (1.3%)	103% (0.7%)
差向金霉素(ECTC)	130% (5.2%)	113% (3.5%)	114% (2.0%)	107% (0.8%)
异金霉素(ICTC)	113% (0.7%)	116% (2.7%)	90% (1.7%)	83% (1.5%)
脱水金霉素(ACTC)	43% (11.0%)	38% (1.5%)	—	—
差向脱水金霉素(EACTC)	16% (10.8%)	12% (11.0%)	—	—
土霉素(OTC)	122% (1.3%)	129% (0.6%)	109% (2.3%)	88% (1.0%)
差向土霉素(EOTC)	129% (1.8%)	122% (4.0%)	113% (4.2%)	86% (7.2%)
α -apo-土霉素(α -apo-OTC)	96% (3.5%)	83% (4.4%)	—	—
β -apo-土霉素(β -apo-OTC)	54% (8.6%)	49% (1.6%)	—	—

注: 测定了 20、100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 两个加标浓度下四环素类抗生素及转化产物的回收率. 表中数据表示回收率(RSD). “—”表示未分析.

Note: The recoveries of tetracyclines and transformation products at two spiked concentrations of 20 and 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ were determined. The values in the table represent recovery (RSD); “—” indicates that the data is not analyzed.

1.6 数据分析

利用 Microsoft Excel 2019、SPSS 26 及 Origin 2022 进行数据分析和作图.

2 结果与讨论(Results and discussion)

2.1 有机肥样品中四环素类抗生素及转化产物的浓度水平

在 8 个省(市)的畜禽粪便源有机肥样品中 4 种四环素类抗生素母体均有检出. TC、DC、CTC 和

OTC 的浓度分别为 1.63—4348 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、ND—11450 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、ND—30300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、7.11—55008 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，检出率为 76%—100% (表 2)，表明这些抗生素在畜禽养殖业广泛使用。本研究中的大部分四环素类抗生素母体浓度水平与已有报道相当^[8, 24-25]。据报道，动物体内的四环素类抗生素 30%—90% 以母体或代谢物的形式随畜禽粪尿排放^[5]。目前常用的兽用 TCs 包括在 C5、C9 上有不同取代基的金霉素、土霉素、四环素等第一代四环素类，及对其母核进行修饰的第二代半合成的强力霉素^[13]。不同取代基结构、不同代际 TCs 影响其药物代谢和动力学，第一代四环素类吸收率为 25%—90%，而强力霉素脂溶性相对较高，排泄缓慢，有较长的持续期^[26]。因此，畜禽养殖使用 TCs 后的粪便中不同 TCs 可能从形态到浓度赋存表现出差异，进而影响其在畜禽粪便源有机肥中的赋存情况。此外，有机肥中四环素类抗生素的残留量较大差异，可能与动物类型^[4]、处理方式等有关^[27]。10 种四环素类转化产物在有机肥中也存在较高浓度的残留。差向异构体的平均浓度为 129—1277 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。嘉兴等地猪粪肥中 ETC 的浓度也被报道与其母体 TC 的浓度相当^[19]。CTC 易不可逆生成 ICTC，浓度范围在 ND—8205 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 之间。TC、CTC、OTC 及其差向异构体中 C-5a 位的氢和 C-6 位的羟基易发生脱水反应形成脱水产物和差向脱水产物。脱水产物和差向脱水产物的检出率和浓度远低于母体，其中 ATC 和 EATC 的平均浓度分别为 59.9、47.5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，与 Qiao 等^[19] 和 Zhou 等^[20] 对猪粪肥和鸡粪肥中四环素类抗生素及转化产物污染的研究结果相当。脱水产物在强酸性条件下形成^[17]，而且有机肥中重金属对脱水产物的螯合能力较强，可能造成有机肥中脱水产物的浓度较低。

表 2 畜禽粪便源有机肥样品中四环素类抗生素及转化产物的浓度

Table 2 The concentrations of tetracyclines and their transformation products in manure-based organic fertilizer samples

目标物 Compounds	检出率 Frequency	平均浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$ Mean	最小值/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$ Minimum	中位值/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$ Median	最大值/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$ Maximum
TC	100%	267	1.63	27.8	4348
ETC	93%	129	ND	13.6	2270
ATC	49%	59.9	ND	12.6	543
EATC	49%	47.5	ND	ND	644
DC	76%	903	ND	70.7	11450
CTC	76%	1314	ND	27.7	30300
ECTC	87%	1277	ND	19.5	31310
ICTC	46%	302	ND	6.99	8205
ACTC	9%	16.8	ND	ND	189
EACTC	42%	5.78	ND	ND	85.0
OTC	100%	2265	7.11	53.5	55008
EOTC	95%	518	ND	64.6	12772
α -apo-OTC	27%	33.6	ND	ND	672
β -apo-OTC	22%	4.63	ND	ND	70.0
四环素类抗生素总和	100%	7143	54.6	584	104905

注：检出率=检出四环素类抗生素的样品数/采样数；四环素类抗生素总和为4种四环素类抗生素及10种转化产物浓度之和；ND，未检出，低于各自的方法检出限。

Note: Detection rate=Number of samples with tetracyclines /Sample numbers; Sum of tetracyclines represent the total concentrations of 4 tetracyclines and 10 transformation products; ND., Not detected, less than the respective method detection limits.

探究了有机肥中四环素类抗生素及转化产物的组成情况 (图 1)。四环素、金霉素、土霉素转化产物的浓度占相应类型抗生素母体及转化产物总浓度的 20%—55%。一方面，兽用四环素类抗生素不能被动物机体完全吸收，以母体或代谢物的形式随畜禽粪便排出^[5]。另一方面，畜禽粪便中的四环素类抗生素及转化产物经堆肥过程均可以被有效降解，同时堆肥过程中母体抗生素也会生成转化产物。其中差向异构体 ETC、ECTC 和 EOTC 是有机肥中主要的转化产物，这可能是由于四环素类抗生素容易在 C-4 位发生差向异构化^[13]。本研究结果发现畜禽粪便源有机肥样品中存在较高浓度的四环素类转化产物，为全面评估抗生素的环境影响，应同时考虑抗生素母体及转化产物的残留和风险。

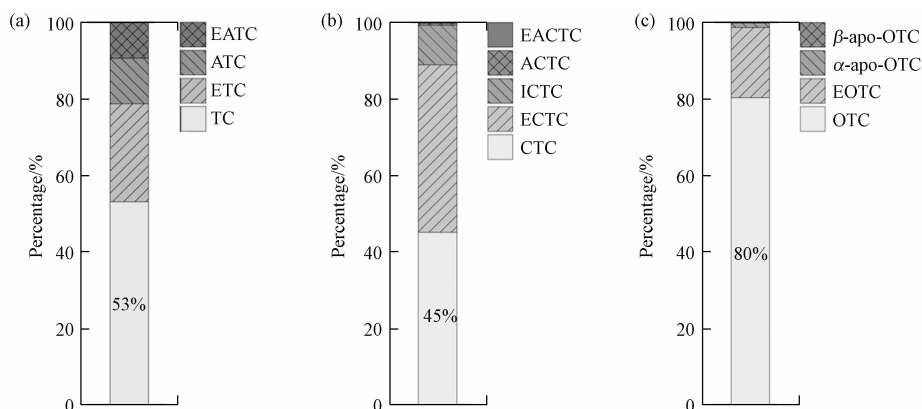


图1 畜禽粪便源有机肥样品($n=55$)中四环素(a)、金霉素(b)和土霉素(c)及转化产物的组成
注:采用平均浓度制作百分比堆积柱状图。

The mean concentrations are used to make the percent stacked column charts.

Fig.1 The composition of tetracycline (a), chlortetracycline (b) and oxytetracycline (c) and their transformation products in manure-based organic fertilizer samples ($n=55$)

2.2 不同动物类型对有机肥中四环素类抗生素及转化产物残留水平的影响

不同畜禽粪便源的有机肥中的抗生素残留水平具有明显差异(图2)。畜禽粪便源有机肥中总四环素类抗生素(4种母体和10种转化产物的加和)的平均浓度依次为:($15420 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)>鸡粪肥($3963 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)>羊粪肥($1481 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)>牛粪肥($569 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。猪粪肥样品中TC、DC、CTC和OTC的抗生素浓度和检出率均高于鸡粪肥、牛粪肥和羊粪肥,浓度范围分别为 $1.63\text{—}4348 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、ND— $11451 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、ND— $30300 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、ND— $30424 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,与北京、辽宁地区^[9]和浙北地区^[28]猪粪肥的结果相当。在21个鸡粪肥样本中,OTC、DC是浓度较高的四环素类母体,平均浓度分别为 2728 、 $319 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,与马来西亚^[29]和云南^[30]鸡粪肥样品浓度水平相当。羊粪肥样品中TC、CTC的残留水平相对较高,平均浓度分别为 333 、 $196 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。牛粪肥样品中TC、CTC和OTC的检出率和浓度低于其他动物类型的有机肥。

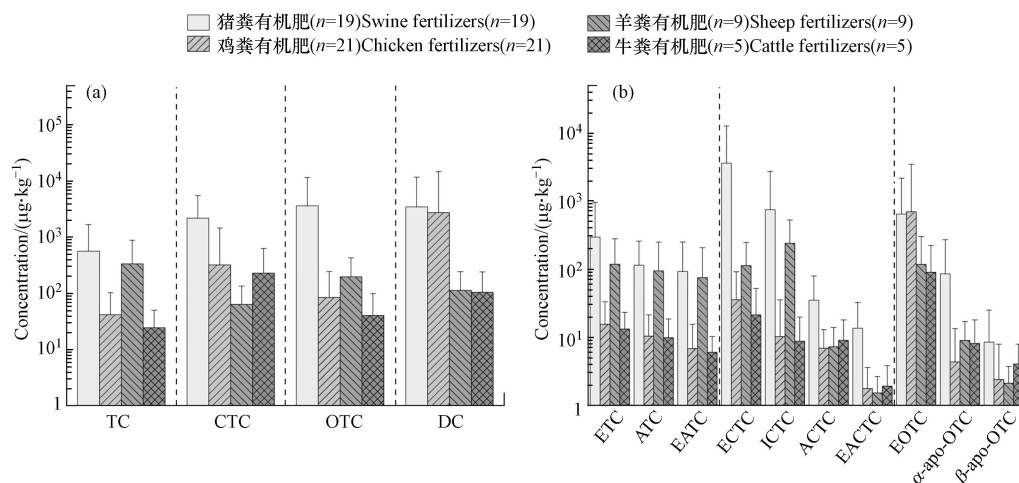


图2 不同畜禽粪便源的有机肥中四环素类抗生素(a)及转化产物(b)残留浓度

Fig.2 Residual concentrations of tetracyclines (a) and transformation products (b) in manure-based organic fertilizers of different animal types

四环素类母体的浓度和检出率较高的有机肥样品,其转化产物的浓度也较高。不同动物种类的有机肥样品中转化产物也存在显著差异。猪粪肥样品中四环素和金霉素相应转化产物总浓度显著高于鸡粪肥、牛粪肥和羊粪肥($P<0.05$)。在检出转化产物的有机肥样品中,不同畜禽粪便源有机肥中四环素产物的平均浓度大小依次是猪粪肥($503 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)>羊粪肥($287 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)>鸡粪肥($32.7 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)>牛粪肥($29.1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。猪粪肥平均浓度顺序为: ETC($296 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)>ATC($115 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)>EATC($92.3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。

金霉素产物在猪粪肥和羊粪肥中的浓度较高, 其中占比最高的金霉素产物 ECTC 的平均浓度分别为 3598、113 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。土霉素产物在 4 种有机肥中均有较高浓度的检出, 其中猪粪肥中 EOTC 的平均浓度可达到 642 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

与牛粪肥相比, 猪粪肥和鸡粪肥中四环素类抗生素浓度较高。由于猪和鸡的养殖密度高和繁殖期短, 抗生素频繁使用以促进动物生长和预防疾病, 但养牛场使用率相对较低^[4]。此外, 目前研究主要集中在猪、牛和鸡粪^[31], 对羊粪的关注较少, 本研究的羊粪肥主要来自规模化养殖场, 其四环素类抗生素及转化产物的污染不容忽视。

2.3 畜禽粪便资源化利用模式对有机肥中四环素类抗生素及转化产物残留水平的影响

根据畜禽粪便资源化利用方式主要分为集中处理和种养结合两种模式, 对畜禽粪便进行处理和综合利用。不同处理模式可能会影响畜禽粪便源有机肥中四环素类抗生素的浓度和检出率(图 3)。种养结合模式生产的有机肥四环素类母体的检出率较高, 浓度显著高于集中处理模式生产的有机肥 ($P<0.05$), TC、DC、CTC 和 DC 在种养结合模式生产的有机肥中的最大浓度分别为 4348、11451、30300、55008 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 显著高于其在集中处理模式生产的有机肥的最大浓度(1632、5246、647、337 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。种养结合模式生产的有机肥中各种转化产物的浓度也显著高于集中处理模式生产的有机肥 ($P<0.05$)。两种模式生产的有机肥中差向异构体均是主要转化产物, 种养结合模式生产的有机肥中差向异构体的平均浓度范围为 251(ETC)—2995(ECTC) $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 高于集中处理模式生产的有机肥。

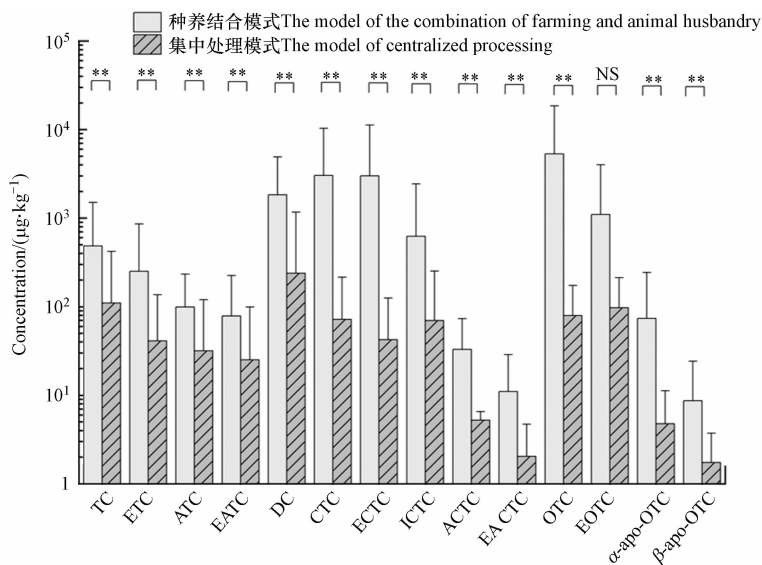


图 3 种养结合模式和集中处理模式的有机肥样品中四环素类抗生素及转化产物的浓度

注: **, 根据曼-惠特尼 U 检验 $P<0.01$, 差异性显著; NS., 根据曼-惠特尼 U 检验 $P>0.05$, 差异性不显著。

Note: **, based on the Mann-Whitney U test, $P<0.01$, significant difference; NS., based on Mann-Whitney U test $P>0.05$, no significant difference.

Fig.3 The concentrations of tetracyclines and their transformation products in organic fertilizer samples from the models of the combination of farming and animal husbandry and centralized processing

畜禽粪便经过收集进行好氧堆肥生产有机肥, 在堆肥过程中四环素类抗生素的降解行为是生物降解和热降解等的协同作用, 可以通过差向异构化、脱水或其他途径产生转化产物^[32]。同时, 畜禽粪便中残留母体四环素类抗生素和转化产物, 在堆肥过程中, 母体和转化产物的浓度都会由于发生生物降解和水解等而降低。相较于种养结合模式, 集中处理模式优势更为明显。集中处理模式是对周边养殖场的畜禽粪便实行专业化收集和运输, 并按资源化、无害化、标准化要求进行集中处理和综合利用^[6]。本研究中集中处理模式生产商品有机肥, 处理要求高, 大多采用高温堆肥工艺, 有机肥中残留抗生素浓度低, 畜禽粪便资源化利用的效率和水平提高^[33]。种养结合模式生产的有机肥是闭环应用, 将畜禽养殖产生的粪便生产加工有机肥应用于种植业, 同时种植业生产的作物为畜禽养殖提供食源, 其四环素类浓度残留相对较高, 可能是因为有机肥生产工艺可能未达到有机肥料的工业生产标准^[34]。本研究中种养结合模式大部分采用自然堆置处理工艺, 堆肥过程高温阶段的温度相对较低且维持时间较短, 抗生素

去除效果较差^[35]. 因此应选择合适的利用模式, 优化处理工艺, 合理利用畜禽粪便资源, 可以降低有机肥施用的潜在风险.

2.4 施肥土壤中四环素类抗生素及转化产物的残留

畜禽粪便源有机肥的施用是土壤抗生素污染的主要来源之一^[36-37]. 对上海 5 个农场生产的猪粪有机肥和施肥土壤及未施肥土壤对照样品中四环素类抗生素及转化产物的残留浓度进行了检测, 结果发现四环素类抗生素在施肥土壤中普遍检出. TC 和 OTC 在施肥土壤中的检出率达 100%, 浓度范围分别为 6.18—338 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 4.63—497 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. DC 和 CTC 的检出率较低, 平均浓度分别为 53.1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 195 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. 施肥土壤中差向异构体 EOTC、ETC 和 ECTC 检出率较高, 分别为 100%、89% 和 78%, 平均浓度分别为 77.2、13.1、65.9 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. ICTC 的检出率较低 (22%), 最高浓度为 16.1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. 土壤抗生素组成与有机肥表现出一定的相似性. 差向异构体在农田土壤中仍是持续存在的主要四环素类转化产物. 本研究对比检测了未施肥对照土壤, 发现四环素类及转化产物的浓度显著低于施肥土壤 (图 4). 此外, 检测了新疆地区鸡粪肥和施肥土壤, 部分施肥土壤检测到强力霉素和金霉素, 浓度分别为 7.42、29.8 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 而未施肥土壤中未检出强力霉素和金霉素, 也说明了施肥土壤中抗生素残留来源于畜禽粪便源有机肥的施用^[38].

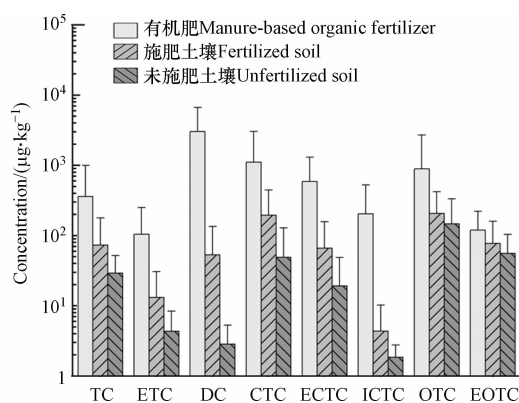


图 4 上海 5 个农场有机肥和施肥土壤中四环素类抗生素及转化产物的浓度

Fig.4 The concentrations of tetracyclines and transformation products in organic fertilizer and fertilized soil from five farms in Shanghai

有机肥中残留的四环素类抗生素扩散进入土壤环境中并在土壤中积累, 可能会造成较高的陆地生态毒性风险^[39] 和耐药性扩散风险, 将对动物源的食品安全和公共卫生构成威胁^[10, 40]. 同时由于结构相似性, 施肥进入土壤的四环素类转化产物可能也具有较强的持久性和一定环境风险^[14]. 已有研究发现污泥中残留的四环素类及转化产物对 3 种水生生物 (绿藻、水蚤和鱼类) 具有生态毒性风险^[14], 残留的转化产物也被报道可能增加抗生素耐药性风险^[41]. 因此需要进一步研究四环素类转化产物可能带来的潜在风险.

3 结论 (Conclusion)

(1) 本研究对 55 个畜禽粪便源有机肥样品中 4 种四环素类抗生素及 10 种转化产物进行同步检测分析. 发现畜禽粪便源有机肥中 4 种四环素类抗生素普遍检出, 残留浓度可高达 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 四环素、金霉素转化产物的总浓度几乎与母体浓度相当, 差向异构体是有机肥中主要转化产物. 施用含四环素类抗生素有机肥的农田土壤能检出四环素类抗生素和部分转化产物, 差向异构体仍是主要转化产物.

(2) 有机肥中抗生素的残留情况受到畜禽种类和资源化利用模式的影响. 四环素类抗生素及转化产物的浓度和检出率在猪粪肥样品中高于鸡粪肥、牛粪肥和羊粪肥; 在种养结合模式生产的有机肥中也显著高于集中处理模式生产的有机肥.

(3) 未来应进一步开展四环素类转化产物在畜禽粪便处理和资源化利用过程中的残留水平、环境行为和潜在风险的研究.

参考文献 (References)

- [1] GABALLAH M S, GUO J B, SUN H, et al. A review targeting veterinary antibiotics removal from livestock manure management systems and future outlook[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 333: 125069.
- [2] KRISHNASAMY V, OTTE J, SILBERGELD E. Antimicrobial use in Chinese swine and broiler poultry production[J]. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 2015, 4(1): 17.
- [3] 赵琪, 李霆, 姜子楠, 等. 2019 年我国兽用抗菌药物使用情况分析研究 [J]. *中国兽药杂志*, 2022, 56(1): 71-76.
ZHAO Q, LI T, JIANG Z N, et al. Investigation on antimicrobial consumption in animals in China in 2019[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2022, 56(1): 71-76 (in Chinese).
- [4] LI C, LI Y, LI X Y, et al. Veterinary antibiotics and estrogen hormones in manures from concentrated animal feedlots and their potential ecological risks[J]. *Environmental Research*, 2021, 198: 110463.
- [5] SUKUL P, LAMSHÖFT M, KUSARI S, et al. Metabolism and excretion kinetics of ¹⁴C-labeled and non-labeled difloxacin in pigs after oral administration, and antimicrobial activity of manure containing difloxacin and its metabolites[J]. *Environmental Research*, 2009, 109(3): 225-231.
- [6] 朱满兴, 杨军香. 畜禽粪便资源化利用技术-集中处理模式 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2016.
ZHU M X, YANG J X. Resource utilization technology of livestock manure-centralized treatment mode[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2016 (in Chinese).
- [7] 宣梦, 许振成, 吴根义, 等. 我国规模化畜禽养殖粪污资源化利用分析 [J]. *农业资源与环境学报*, 2018, 35(2): 126-132.
XUAN M, XU Z C, WU G Y, et al. Analysis of utilization of fecal resources in large-scale livestock and poultry breeding in China[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2018, 35(2): 126-132 (in Chinese).
- [8] 杨威, 狄彩霞, 李季, 等. 我国有机肥原料及商品有机肥中四环素类抗生素的检出率及含量 [J]. *植物营养与肥料学报*, 2021, 27(9): 1487-1495.
YANG W, DI C X, LI J, et al. Detection rate and concentration of tetracycline antibiotics in organic fertilizers raw materials and commercial products in China[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2021, 27(9): 1487-1495 (in Chinese).
- [9] HOU J, WAN W N, MAO D Q, et al. Occurrence and distribution of sulfonamides, tetracyclines, quinolones, macrolides, and nitrofurans in livestock manure and amended soils of Northern China[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(6): 4545-4554.
- [10] 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.
- [11] KUMAR M, JAISWAL S, SODHI K K, et al. Antibiotics bioremediation: Perspectives on its ecotoxicity and resistance[J]. *Environment International*, 2019, 124: 448-461.
- [12] HU X G, ZHOU Q X, LUO Y. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China[J]. *Environmental Pollution*, 2010, 158(9): 2992-2998.
- [13] HALLING-SØRENSEN B, SENDELØV G, TJØRNELUND J. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2002, 42(3): 263-271.
- [14] JIA A, XIAO Y, HU J Y, et al. Simultaneous determination of tetracyclines and their degradation products in environmental waters by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(22): 4655-4662.
- [15] ZHONG S F, YANG B, LEI H J, et al. Transformation products of tetracyclines in three typical municipal wastewater treatment plants[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 830: 154647.
- [16] EVGENIDOU E N, KONSTANTINO I K, LAMBROPOULOU D A. Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: A review[J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 505: 905-926.
- [17] WU X F, WEI Y S, ZHENG J X, et al. The behavior of tetracyclines and their degradation products during swine manure composting[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(10): 5924-5931.
- [18] SOLLIEC M, ROY-LACHAPPELLE A, GASSER M O, et al. Fractionation and analysis of veterinary antibiotics and their related degradation products in agricultural soils and drainage waters following swine manure amendment[J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 543: 524-535.
- [19] QIAO M, CHEN W D, SU J Q, et al. Fate of tetracyclines in swine manure of three selected swine farms in China[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2012, 24(6): 1047-1052.
- [20] ZHOU X, QIAO M, WANG F H, et al. Use of commercial organic fertilizer increases the abundance of antibiotic resistance genes and antibiotics in soil[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(1): 701-710.
- [21] WALLACE J S, AGA D S. Enhancing extraction and detection of veterinary antibiotics in solid and liquid fractions of manure[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2016, 45(2): 471-479.
- [22] 朱峰, 吴晓松, 李放, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时检测消毒产品中 13 种抗生素 [J]. *卫生研究*, 2021, 50(1): 121-128.

- ZHU F, WU X S, LI F, et al. Simultaneous determination of 13 antibiotics in disinfection products by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of hygiene research*, 2021, 50(1): 121-128 (in Chinese).
- [23] ARIKAN O A, SIKORA L J, MULBRY W, et al. The fate and effect of oxytetracycline during the anaerobic digestion of manure from therapeutically treated calves[J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(7): 1637-1643.
- [24] QIAN M R, WU H Z, WANG J M, et al. Occurrence of trace elements and antibiotics in manure-based fertilizers from the Zhejiang Province of China[J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 559: 174-181.
- [25] 赵文, 潘运舟, 兰天, 等. 海南商品有机肥中重金属和抗生素含量状况与分析 [J]. *环境化学*, 2017, 36(2): 408-419.
ZHAO W, PAN Y Z, LAN T, et al. Analysis of heavy metals and antibiotics content in Hainan commercial organic fertilizers[J]. *Environmental Chemistry*, 2017, 36(2): 408-419 (in Chinese).
- [26] AGWUH K N, MACGOWAN A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines[J]. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 2006, 58(2): 256-265.
- [27] 成登苗, 李兆君, 张雪莲, 等. 畜禽粪便中兽用抗生素削减方法的研究进展 [J]. *中国农业科学*, 2018, 51(17): 3335-3552.
CHENG D M, LI Z J, ZHANG X L, et al. Removal of Veterinary Antibiotics in Livestock and Poultry Manure: A Review[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2018, 51(17): 3335-3352 (in Chinese).
- [28] WANG H, CHU Y X, FANG C R. Occurrence of veterinary antibiotics in swine manure from large-scale feedlots in Zhejiang Province, China[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2017, 98(4): 472-477.
- [29] BIN HO Y, ZAKARIA M P, LATIF P A, et al. Occurrence of veterinary antibiotics and progesterone in broiler manure and agricultural soil in Malaysia[J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 488/489: 261-267.
- [30] ZHI S L, SHEN S Z, ZHOU J, et al. Systematic analysis of occurrence, density and ecological risks of 45 veterinary antibiotics: Focused on family livestock farms in Erhai Lake Basin, Yunnan, China[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 267: 115539.
- [31] WANG G Y, LI G X, CHANG J L, et al. Enrichment of antibiotic resistance genes after sheep manure aerobic heap composting[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 323: 124620.
- [32] BAO Y Y, ZHOU Q X, GUAN L Z, et al. Depletion of chlortetracycline during composting of aged and spiked manures[J]. *Waste Management*, 2009, 29(4): 1416-1423.
- [33] YU Y S, CHEN L J, FANG Y, et al. High temperatures can effectively degrade residual tetracyclines in chicken manure through composting[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 380: 120862.
- [34] 朱满兴, 杨军香. 畜禽粪便资源化利用技术-种养结合模式 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2016.
ZHU M X, YANG J X. Resource utilization technology of livestock and poultry manure-combination mode of planting and breeding[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2016 (in Chinese).
- [35] STALEY Z R, WOODBURY B L, STROMER B S, et al. Stockpiling versus composting: Effectiveness in reducing antibiotic-resistant bacteria and resistance genes in beef cattle manure[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(16): e0075021.
- [36] REHMAN M S U, RASHID N, ASHFAQ M, et al. Global risk of pharmaceutical contamination from highly populated developing countries[J]. *Chemosphere*, 2015, 138: 1045-1055.
- [37] WEI R C, GE F, ZHANG L L, et al. Occurrence of 13 veterinary drugs in animal manure-amended soils in Eastern China[J]. *Chemosphere*, 2016, 144: 2377-2383.
- [38] JECHALKE S, HEUER H, SIEMENS J, et al. Fate and effects of veterinary antibiotics in soil[J]. *Trends in Microbiology*, 2014, 22(9): 536-545.
- [39] LI C, CHEN J Y, WANG J H, et al. Occurrence of antibiotics in soils and manures from greenhouse vegetable production bases of Beijing, China and an associated risk assessment[J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 521/522: 101-107.
- [40] PRUDEN A, LARSSON D G, AMÉZQUITA A, et al. Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2013, 121(8): 878-885.
- [41] PALMER A C, ANGELINO E, KISHONY R. Chemical decay of an antibiotic inverts selection for resistance[J]. *Nature Chemical Biology*, 2010, 6(2): 105-107.