

中文核公期刊/CSCD

请通过网上投稿系统投稿 网址:http://www.aes.org.cn

生态循环水养殖池塘抗生素抗性基因污染特征研究

曲疆奇,张清靖,吴彦飞,俞文钰,赵萌,朱华

引用本文:

曲疆奇,张清靖,吴彦飞,俞文钰,赵萌,朱华. 生态循环水养殖池塘抗生素抗性基因污染特征研究[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(3): 641-651.

在线阅读 View online: https://doi.org/10.11654/jaes.2022-0492

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

大黄鱼养殖海域沉积物中抗生素抗性基因分布特征及其影响因素

黄薇, 刘洋, 饶秋华, 罗钦, 王为刚, 宋永康, 罗土炎 农业环境科学学报. 2023, 42(1): 197-208 https://doi.org/10.11654/jaes.2022-0693

生物菌剂对土壤微生物群落结构和功能的影响

沙月霞,黄泽阳,李云翔,赵沛 农业环境科学学报. 2022, 41(12): 2752-2762 https://doi.org/10.11654/jaes.2022-1042

南京地区斑点叉尾养殖池塘水体微生物群落结构研究

钟立强, 王明华, 张世勇, 姜虎成, 陈校辉, 朱广伟, 边文冀 农业环境科学学报. 2020, 39(7): 1594-1604 https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0157

生物炭原位添加对养殖池塘底泥中微生物群落结构的影响

赵汉胤,陈潘毅,唐欣哲,陈以芹,李娟英 农业环境科学学报.2021,40(12):2770-2778 https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0434

华北地区不同规模畜禽养殖场粪便中抗生素抗性基因污染特征

邹威,金彩霞,魏闪, RamasamyRajeshKumar,周启星 农业环境科学学报. 2020, 39(11): 2640-2652 https://doi.org/10.11654/jaes.2020-0403



关注微信公众号,获得更多资讯信息

曲疆奇,张清靖,吴彦飞,等.生态循环水养殖池塘抗生素抗性基因污染特征研究[J].农业环境科学学报,2023,42(3):641-651. QUJQ,ZHANGQJ,WUYF, et al. Pollution characteristics of antibiotic resistance genes in ecological recirculating aquaculture ponds[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2023, 42(3): 641-651.

生态循环水养殖池塘抗生素抗性基因污染特征研究

曲疆奇1,张清靖1*,吴彦飞1,俞文钰1,2,赵萌1,朱华1

(1.北京市农林科学院水产科学研究所,渔业生物技术北京重点实验室,北京 100068;2.天津农学院,天津 300392)

摘 要:为探究生态循环水池塘养殖模式中抗生素抗性基因(Antibiotic resistance genes, ARGs)污染特征,本研究利用宏基因组技术检测分析了生态循环水养殖池塘ARGs的赋存特征及其与微生物群落和环境变量的相互关系。结果显示:试验共检测出21类1092种亚型ARGs,池塘底泥是ARGs的主要储存库。池塘中抗性基因macB、tetA(58)和nov相对丰度最高,多药类和主动外排泵是最主要的ARGs类型和耐药机制。养殖池塘水体和底泥微生物群落组成差异显著(P<0.05)。优势菌变形菌门(Proteobacteria)、蓝细菌门(Cyanobacteria)和放线菌门(Actinobacteria)中的多种菌属与不同类型ARGs存在显著正相关性,表明ARGs在这些菌属间具有水平转移的趋势,微生物为ARGs在系统中的持久存在和向水体扩散传播提供了有利条件。此外,氨态氮、亚硝态氮和硝态氮是影响养殖池塘ARGs分布特征和微生物群落组成的主要环境因子。本研究确定了生态循环水养殖系统中养殖池塘ARGs可能的背景值,并提供了生态化循环水养殖尾水具有较高ARGs传播风险的定量信息,为进一步优化升级生态循环水养殖系统、降低ARGs污染和保护养殖环境提供了数据支持。

关键词:生态循环水系统;池塘养殖;抗生素抗性基因(ARGs);微生物群落;污染特征

中图分类号:X52;X172 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2023)03-0641-11 doi:10.11654/jaes.2022-0492

Pollution characteristics of antibiotic resistance genes in ecological recirculating aquaculture ponds

QU Jiangqi¹, ZHANG Qingjing^{1*}, WU Yanfei¹, YU Wenyu^{1, 2}, ZHAO Meng¹, ZHU Hua¹

(1. Beijing Key Laboratory of Fishery Biotechnology, Fisheries Science Institute, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100068, China; 2. Tianjin Agricultural College, Tianjin 300392, China)

Abstract: To explore the characteristics of Antibiotic resistance genes (ARGs) pollution in the ecological recirculating aquaculture ponds, this study used metagenomic technology to detect and analyze the ARG profiles and their relationship with microbial communities and environmental variables. The results showed that a total of 21 types and 1 092 subtypes of ARGs were detected in aquaculture ponds, and the pond sediment was the main reservoir of ARGs. The resistance genes macB, tetA(58), and nov showed higher relative abundances in the pond. Multidrug and antibiotic efflux pumps were the most important types of ARGs and resistance mechanisms, respectively. There were significant differences in microbial community composition between the water column and bottom mud of the aquaculture pond (P < 0.05). There was a significant positive correlation between ARGs and Proteobacteria, Cyanobacteria, and Actinobacteria, indicating that ARGs were transferred horizontally among these different bacterial groups. At the same time, microorganisms also provided favorable conditions for the persistence and diffusion of ARGs in the aquaculture system. In addition, ammonia nitrogen, nitrite nitrogen, and nitrate

*通信作者:张清靖 E-mail:zhangqjhbs@126.com

收稿日期:2022-05-16 录用日期:2022-10-19

作者简介:曲疆奇(1985—),男,辽宁沈阳人,硕士,副研究员,从事水产养殖环境微生物研究。E-mail:quqi20122012@163.com

基金项目:国家重点研发计划项目(2020YFD0900103);北京市农林科学院青年科研基金项目(QNJJ202020);北京市渔业创新团队-尾水处理与综合利用(BAIC07-2022-06);河北省重点研发计划项目(22326701D)

Project supported: The National Key Research and Development Program of China (2020YFD0900103); Young Scientists Fund of the Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences (QNJJ202020); Beijing Agriculture Innovation Consortium (BAIC07-2022-06); The Key Research and Development Program of Hebei Province(22326701D)

nitrogen were major environmental factors that affected the distribution characteristics of ARGs and the composition of microbial communities in aquaculture ponds. The results of this study determined the possible background value of ARGs in the ecological recirculating aquaculture ponds. They also provided quantitative information that the tailwater had a high risk of ARGs transmission. The results provided data support for the further optimization and upgrading of ecological recirculating aquaculture systems, reducing ARGs pollution, and protecting the aquaculture environment.

Keywords: ecological recirculating aquaculture system; pond aquaculture; antibiotic resistance genes (ARGs); microbal community; pollution characteristics

我国是全世界唯一一个养殖产量超过捕捞量的 国家。据《2020中国渔业统计年鉴》显示,全国淡水 养殖面积710.85万hm²,养殖产量达5079.07万t。水 产品不但为人们提供丰富优质的蛋白质,而且也为我 国的粮食安全提供了重要保障。为减少细菌感染的 发生和传播,水产养殖过程中常使用抗生素这一类抗 菌剂来预防或治疗水产养殖动物的细菌性疾病吗。 然而,过量使用抗生素不但增加了水环境对耐药细菌 的选择压力,而且在水生环境中形成了耐药菌库和可 转移的抗生素抗性基因(Antibiotic resistance genes, ARGs)^[2]。Lulijwa等^[3]对全世界排名前15的主要水产 养殖国家进行了抗生素生态风险评估,结果发现有 73%的国家使用过土霉素、磺胺嘧啶和氟苯尼考等抗 生素药物,其中孟加拉国、中国和越南是水产养殖过 程中使用抗生素最多的3个国家。最近研究数据表 明,在我国淡水养殖池塘中共监测到44种抗生素,其 中甲氧苄啶、依诺沙星、莫能菌素、克拉霉素、罗红霉 素、红霉素检出率最高,经比较发现,在省级区域尺度 上天津和江苏地区养殖池塘抗生素残留量明显高于 其他省份, ARGs 以磺胺类 sull 和 sul2 以及四环素抗 性基因亚型为主^[4]。由于ARGs可从水生环境转移到 陆地环境,并极有可能对人类和养殖动物健康造成不 利影响,因此近年来其作为一类新型环境污染物被广 泛关注和研究^[5]。

池塘养殖是我国北方地区内陆渔业最重要的水 产养殖方式。现今我国水产养殖已经进入转型升级 的关键阶段,其中生态循环水养殖作为一种经济、高 效的渔业生产模式,成为了农业农村部主推的养殖尾 水生态化综合治理技术之一。该养殖模式主要是将 集约化养殖池塘、沉淀池和生态塘相连接,在养殖区 和净水区形成水循环,实现养殖尾水"零排放"和水资 源循环再利用¹⁶。池塘中的环境微生物作为食物网 的重要组成部分,在适应污染物、胁迫和环境变化等 生态功能中起着重要的作用¹⁷。在实际养殖过程中, 抗生素不断对养殖池塘微生物群落造成胁迫压力,从 而加速了超级耐药菌和多重耐药性抗性基因的形 成^[8]。赋存在池塘中的ARGs很可能最终富集在养殖 鱼类肠道中从而产生耐药性^[9]。此外,微生物也可以 通过基因突变、水平基因转移(HGT)和垂直基因转移 (VGT)的方式获得抗生素耐药性,从而影响营养物质 的生物地球化学循环和抗生素耐药分布^[10]。因此,养 殖池塘已成为ARGs积累和扩散的重要场所,这将对 养殖环境及其周边区域造成潜在ARGs污染。

养殖池塘水体和底泥是 ARGs 重要的汇。由于 生态循环水系统沉淀池和生态池中的 ARGs 均来源 于养殖池塘,因此确定养殖池塘中 ARGs 赋存特征对 控制生态循环水养殖模式抗生素耐药性的传播至关 重要。为此,本研究主要以生态循环水养殖池塘为研 究对象,利用宏基因组学方法对生态循环水养殖池塘 水体和底泥的 ARGs 多样性进行分析,同时量化和评 价系统对养殖尾水 ARGs 的去除特征,探究 ARGs 与 微生物群落结构、环境变量的相互关系,以期明确 ARGs 在生态循环水池塘养殖模式中的赋存分布及其 污染特征。

1 材料与方法

1.1 样本采集与前处理

试验于2020年7月在北京市农林科学院水产科 学研究所示范基地进行。如图1所示,本试验生态循 环水养殖模式中每个养殖池塘面积约0.67 hm²,水深



图1 生态循环水池塘养殖系统

Figure 1 Ecological recirculating aquaculture ponds system

2.5 m,池塘底部为与水平位置呈15°倾斜夹角的坡 面,以便于淤泥向池塘底部中心处汇集。养殖尾水经 污水管线可分批次输入到平流式沉淀池(长、宽、深分 别为25、15、1.5m),通过固液分离原理将养殖尾水中 的悬浮物和污泥截留在沉淀池中,沉淀后的养殖水排 入生态塘(长、宽、深分别为60、50、2m,主要功能为 去除养殖尾水中的含氮污染物)进行水质净化,净化 后的养殖水通过净水管线输回养殖池塘循环再利用, 整个过程实现了养殖水"零排放"。为保证数据的可 比性,所选池塘均以大口黑鲈(Micropterus salmoides) 为主要养殖鱼类,养殖密度约为4.5万尾·hm⁻²,养殖 期间全程投喂蛋白含量在45%左右的人工配合饲 料,每日分别在早、晚各投喂1次,投喂之后至少保持 1h的增氧,养殖过程中禁止投放抗生素类药品。养 殖池塘于2016年进行升级改造,将原来的土池塘进 行清淤处理,清淤出来的底泥置于池塘四周用于垫高 池塘,并使用水泥对塘口四周及底部进行硬化处理。 沉淀池和生态塘均为2018年新建的养殖尾水净化系 统单元。同时,参考曾碧健等凹的生态浮床原位修复 研究方法,将生态塘中生态浮床覆盖率设定在10% 左右,并在浮床上栽种水生植物黄花鸢尾(Iris wilsonii C. H. Wright),浮床下方悬挂有利于微生物附着的 载体生物填料,另外在水中种植了沉水植物菹草 (Potamogeton crispus L.),主要目的是消减春、秋两季 养殖水中的氮、磷等营养物质。试验期间,分别采集 池塘养殖水(PW)、底泥(S)、沉淀池养殖水(ST)和生 态塘养殖净化水(EP)样本,每组采集4个样本,总计 16个样本用于宏基因组测序。根据测序需求,将3L 水体样本经已灭菌的0.22 µm水系微孔滤膜过滤,然 后将滤膜折叠存放于冻存管中-80℃保存;使用彼得 逊抓斗采泥器采集池塘底部淤泥,底泥经剔除杂质冷 冻干燥后称取30g置于密封袋中冻存。现场使用英 国 Aquaread AP-700 多参数便携式水质分析仪测定 水体温度(T)、溶解氧(DO)、pH和总溶解固体(TDS)

等水质指标。取500 mL水样带回实验室,参照《水 和废水监测分析方法》^[12]测定总氮(TN)、氨态氮 (NH¹-N)、硝态氮(NO³₃-N)和亚硝态氮(NO²₂-N)等环境 指标。底泥样本测定指标包括T、pH、氧化还原电位 (ORP)、总有机碳(TOC)、全氮(TN)、全磷(TP)。具体 测定结果见表1和表2。

1.2 DNA提取与宏基因组测序

参照程森等^[13]的研究方法,使用 FastDNA[™] Spin Kit for Soil (MP Biomedicals 美国)提取水体和底泥样 本微生物 DNA,待所有样本 DNA 浓度和纯度检验合 格后于干冰保存寄送至上海美吉生物医药科技有限 公司进行宏基因组测序。利用 NEXTflex[™] Rapid DNA-Seq(Bioo Scientific,美国)构建PE文库,使用 Hiseg Xten(Illumina,美国)进行宏基因组测序。使用 软件 fastp(https://github.com/OpenGene/fastp,version 0.20.0) 去除剪切后长度小于50 bp、平均碱基质量低 于20以及含N碱基的reads,保留高质量的pair-end reads 和 single - end reads; 使用 MEGAHIT (https:// github.com/voutcn/megahit, version 1.1.2)对优化序列 进行拼接组装。在拼接结果中筛选≥300 bp 的 contigs 作为最终的组装结果;使用CD-HIT(http://www.bioinformatics.org/cd-hit/, version 4.6.1) 对所有样品预测 出来的基因序列进行聚类(参数为90% identity、90% coverage),每类取最长的基因作为代表序列,构建非 冗余基因集;使用 Diamond (http://www.diamondsearch.org/index.php, version 0.8.35)将非冗余基因集 的氨基酸序列与 NR 数据库进行比对(BLASTP 比对

表2 生态循环水养殖池塘泥样主要环境指标

Table 2 Sediment indictors of ecological recirculating

aquaculture ponds							
温度 <i>T/</i> ℃	рН	氧化还原电位 Eh/mV	全氮 TN/(g·kg ⁻¹)	全磷 TP/(mg·kg ⁻¹)			
19.5	7.80	-182	0.98	0.128			

表1 生态循环水养殖池塘水质

i abio i matoi guanti oi coological iconcatating agaacatato pond	Table 1	Water qualit	v of ecological	recirculating	aquaculture	ponds
--	---------	--------------	-----------------	---------------	-------------	-------

水样 Sample	水温 <i>T/</i> ℃	溶解氧 DO/(mg·L ⁻¹)	рН	总溶解固体 TDS/(mg·L ⁻¹)	总氮 TN/(mg·L ⁻¹)	氨氮 NH₄−N/(mg•L ⁻¹)	硝态氮 NO3-N/(mg·L ⁻¹)	亚硝态氮 NO ₂ -N/(mg·L ⁻¹)
PW	24.2a	5.57ab	7.72a	397.25a	4.11ac	0.02bc	2.28ac	0.24ac
ST	24.5a	4.07b	7.52a	324.25a	2.45bc	0.03ac	1.46bc	0.17bc
EP	24.7a	4.85b	7.70a	311.50a	0.75c	0.01c	0.10c	0.06c

注:不同字母表示不同单元存在显著性差异(P<0.05)。

Note: Different letters in the same column indicate significant difference between units (P<0.05).

参数设置期望值 e-value 为1E-5),并通过 NR 库对应 的分类学信息数据库获得物种注释,然后使用物种对 应的基因丰度总和计算该物种的丰度;将它们对应的 相对丰度整合到丰度矩阵中用于下一步的微生物组 成与抗生素抗性基因关联分析。同时,将宏基因组非 冗余基因集与综合抗生素耐药性数据库(The Comprehensive Antibiotic Research Database, CARD, https://CARD.mcmaster.ca/)进行比对,获得基因对应 的抗生素抗性基因序列注释信息。原始数据上传至 NCBI (National Center for Biotechnology Information) SRA (Sequence Read Archive)数据库(序列号: SRP383583)。

1.3 数据统计与分析

使用 Excel 2007 和上海美吉生物云平台对试验 数据进行数据处理和制图。采用 Student t 检验(Student's test)对养殖池塘水体和底泥中不同抗生素抗 性基因类型、微生物群落组成差异特征进行差异性分 析;使用 Spearman 相关性分析分析 ARGs 和微生物类 群与环境变量的关系。参考禹桃兵等^[14]的网络分析 方法,探究 ARGs 与微生物类群之间的互作关系。选 取 Spearman 相关系数 r>0.9 且显著性 P<0.05 作为网 络节点,构建共现网络并计算相关特征参数,包括节 点数、边数、平均路径长度、平均加权度、网络直径、图 密度和模块化等拓扑结构参数,然后利用 Gephi v.0.9.2软件对网络进行可视化分析^[15]。

2 结果与分析

2.1 养殖池塘ARGs赋存特征

为了解生态循环水养殖系统ARGs总体特征,首 先对系统中养殖池(PW)、沉淀池(ST)和生态塘(EP) 水体ARGs类型差异特征进行分析。宏基因组测序 结果显示,整个养殖系统共监测出21类1092种亚型 ARGs,其中多药类(34.7%)、四环素类(12.2%)和大 环内酯类(9.4%)是相对丰度最高的3类ARGs。如图 2a所示,沉淀池、生态塘与养殖池塘水中ARGs类型 无差异,说明生态循环水养殖系统中的ARGs均来源 于养殖池塘水体。从图2b可以看出,系统仅对大环 内酯类(MLS)的oleC亚型基因有显著去除作用(P< 0.05),说明生态循环水养殖系统对ARGs污染物去除 效果甚微。上述研究结果表明,赋存在养殖池塘中的 ARGs是生态循环水养殖系统的ARGs污染源,并对 整个养殖系统具有较高水平的ARGs传播风险。如 图2c所示,养殖池塘水体和底泥的ARGs相对丰度具 有明显差异。除磺胺类外,其他主要ARGs在池塘底 泥中的赋存量显著高于水体(P<0.05)。从图2d可 知,池塘中macB、tetA(58)和novA相对丰度最高;水体 中的msbA、otr(A)、tetA(58)、novA和TaeA抗性基因丰 度显著高于池塘底泥(P<0.05);而相比于水体,池塘底 泥中主要显著富集的ARGs亚型包括cpxA、evgS、carA、 MexW、smeS、optrA和bcrA。此外,主动外排泵、靶位保 护和靶点改变是ARGs的主要耐药机制(表3)。

= 2	<u>+</u> ≖	ADC	あせた	h4 + H	生山
ৰু ১	+	A KL-S	11111 257	1 + 11	THE

Table 3 Antibiotic resistan	ce mechanism for major ARGs		
抗生素耐药机制 Antibiotic resistance mechanism	主要抗生素抗性基因 Major ARGs		
主动外排泵 Antibiotic efflux pump	mtrA \baeS \cpxA \evgS \arlR \MexW \ smeS \efrA \msbA \macB \lmrD \oleC \ tetA(58) \bcrA \novA \TaeA		
靶位保护 Antibiotic target protection	$carA_optrA_tetB(P)$		
靶点改变 Antibiotic target alteration	rpoB2		

2.2 养殖池塘微生物群落组成及与环境变量的相关性

宏基因组高通量测序结果表明,在门水平下(图 3a),养殖池塘水体中主要门类(相对丰度>5%)包括 变形菌门(Proteobacteria, 17.4%), 蓝细菌门(Cyanobacteria, 7.9%)和浮霉菌门(Planctomycetes, 5.9%)等, 且蓝细菌门微生物相对丰度显著高于池塘底泥(P< 0.05);而池塘底泥中主要显著富集了变形菌门(Proteobacteria, 30.3%), 酸杆菌门(Acidobacteria, 9.6%)和 放线菌门(Actinobacteria, 8.7%)等门类微生物。在属 水平上(图3b),丰度前50的物种主要划分为6类,包 括 Acidobacteria(1 种)、Actinobacteria(13 种)、Actinobacteria d bacteria (8种)、拟杆菌门[Bacteroidetes(1 种)]、Cyanobacteria(6种)和Proteobacteria(21种)。从 热图(图3b)可以看出,池塘水体与底泥中的菌群差 异较大,池塘中蓝细菌(Cyanobium)、聚球蓝细菌 (Synechococcus)、微囊藻蓝细菌(Microcystis)和分枝杆 菌(Mycobacterium)等菌类相对丰度较高;而底泥中以 慢生根瘤菌(Bradyrhizobium)、冷杆菌(Cryobacterium) 和生丝微菌(Hyphomicrobium)为优势菌属。

微生物群落组成与环境因子相关性如图4所示。其中,Actinobacteria_d_bacteria与pH、NH4-N和NO2-N呈显著正相关关系,而与TN呈极显著负相关性(P<0.05);Cyanobacteria与TN呈极显著正相关关系(P<0.001),而与NH4-N和NO2-N呈极显著负相关



PW

0

0

20.

0

EP

(a)

(c)

曲疆奇,等:生态循环水养殖池塘抗生素抗性基因污染特征研究

大环内酯类 MLS (b) ST 组别 Group Fusidic acid 0 Fluoroquinolone Sulfonamide 0 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 1 Rifamycin 比例Proportion/% Fosfomycin 0 Phenicol Triclosan ST PW EP Aminoglycoside Diaminopyrimidine 抗性基因 oleC Bicyclomycin Elfamycin EP: PW Nucleoside Aminocoumarin Mupirocin PW : ST Glycopeptide Peptide EP:ST Tetracycline MLS L. 1 Т Multidrug 0.2 0.6 1.0 1.4 1.8 2.2 2.4 Beta-lactam 比例 Proportion/% Pleuromutilin (d) rpoB2 mtrA ■PW Multidrug 多药类 baeS *** cpxA MLS ** evgS 大环内脂类 Tetracycline 四环素类 arlR *** carA Glycopeptide 糖肽类 MexW * Peptide 肽类 *** smeS ** Mupirocin 莫匹罗星类 optrA efrA

msbA

macB lmrD

oleC

otr(A)

tetA(58)

tetB(P)

bcrA

novA

TaeA

0

1.0 0.5 0 -0.5 -1.0

PW1 PW2 PW3 PW4 S1

(a)ARGs维恩图;(b)沉淀池和生态塘对养殖尾水ARGs的去除效果;(c)养殖池塘水体和底泥ARGs类型差异特征;(d)养殖池塘水体和底泥主要 ARGs亚型(前20)的丰度差异特征。*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001。下同。

Fluoroquinolone 氟喹诺酮类

Beta-lactam *β*−内酰胺类

Rifamycin 利福霉素类

Triclosan 三氯生类

Sulfonamide 磺胺类

Aminoglycoside 氨基糖苷类

Pleuromutilin 截短侧耳素类

(a) Venn diagram of ARGs; (b) Removal effect of ARGs in tailwater by sedimentation tank and ecological pond; (c) Different types of ARGs in pond water and sediment; (d) Abundance differences of major ARGs subtypes(top 20) in pond water and sediment.

*
 $P\!<\!0.05\,,**P\!<\!0.01\,,***P\!<\!0.001.$ The same below.

图2 养殖池塘环境中ARGs组成和分布特征

Figure 2 Composition and distribution characteristics of ARGs in aquaculture ponds

关系(P<0.001); Proteobacteria 与TDS 呈极显著负相

S2 S3 S4

关性(P<0.001); Planctomycetes 与 DO 呈极显著正相

关性(P<0.001)。由此可见,环境因子对池塘微生物物种的分布和组成具有显著影响。

8

比例 Proportion/%

4

12

www.aer.org.cn

645

**

**

**

1.1

16



图3 养殖池塘水体和底泥中优势微生物组成与分布特征

Figure 3 Composition and distribution characteristics of dominant microbes in pond water and sediment

2.3 养殖池塘ARGs与环境变量、微生物群落的相关性 如图 5 所示,除 rpoB2 外,大部分多药类 ARGs 与 NH[‡]-N和NO⁵-N呈极显著负相关关系(P<0.001), 而与TN呈正相关关系; MLS类抗性基因 macB与



2023年3月

图4 池塘微生物组成与环境变量的Heatmap相关性分析 Figure 4 Heatmap correlation analysis between environmental factors and microbes at the phylum level

NH[‡]-N、NO⁵-N和NO⁵-N呈强负相关关系(*r*=-0.8); *tetA*(58)、*novA*均与NO⁵-N呈极显著负相关性(*P*< 0.001,图5)。上述结果说明NH₄-N、NO₃-N和NO₂-N 是影响养殖池塘ARGs分布的主要环境因子。此外, 利用共现模式网络分析相关性可追踪池塘环境中 ARGs的潜在宿主。结果表明(表4和图6),在养殖池 塘水体中有33个菌属与17个ARGs存在极显著相关 性(P<0.01),而在池塘底泥中,有12个菌属与21个 ARGs存在显著相关性(P<0.05)。蓝细菌门、变形菌 门和放线菌门等优势菌门中多个菌属种类与多种 ARGs表现出较强相关性,说明它们可能是池塘中 ARGs的潜在宿主,可对ARGs的传播起到重要作用, 且不同菌属间具有抗性基因水平转移过程的趋势。

3 讨论

近年来,宏基因组测序技术提供了比传统微生物 学方法更有洞察力的信息,已成功应用于识别各种环 境中ARGs分布特征和评估抗性基因诱发的生态风 险¹⁶⁶。本研究利用宏基因组测序技术监测到生态循





Figure 5 Heatmap correlation analysis between ARGs and microbes in the pond

网络指标 Property	节点数 Number of nodes	边数 Number of edges	平均路径长度 Average path length	平均加权度 Average degree	网络直径 Network diameter	图密度 Graph density	模块化 Modularity
PW	50	119	1.61	4.76	2	0.097	0.340
S	33	145	1.60	8.79	2	0.275	0.067

www.ger.org.cn



红线代表显著性正相关关系,绿线代表显著性负相关关系。 The red line and green line represent a significant positive or negative relationship, respectively.

图6 基于共现模式网络分析 ARGs 和优势菌属的相关性

Figure 6 Relationship between ARGs and dominate genera via co-occurrence network analysis

环水养殖池塘水体和底泥中富集了21类1092种亚型ARGs。相比于传统的抗性基因qPCR定量监测方法^[17],应用宏基因组技术能探索到更为丰富的ARGs 类型,从而揭示ARGs真正的多样性及其耐药机制生 态作用^[18]。本研究结果显示,养殖池塘底泥是ARGs 的主要储存库(图2a)。有研究表明,养殖鱼类排泄 物会增加池塘底泥ARGs的富集^[19]。ARGs可以长期 在养殖池塘水体和底泥中赋存,为耐药菌株的出现和 选择提供了理想的条件,并诱导了ARGs从水产养殖 业向陆地畜牧业和人类居住环境水平转移^[20],从而使 养殖池塘成为重要的抗性基因库并对周围生态系统 以及人类健康构成潜在威胁^[21]。

ARGs 是细菌体内产生耐药性的根源^[22]。本研究 中,多药类ARGs具有最高的相对丰度,其次是四环 素类和大环内酯类。研究发现,在所有被测序的细菌 基因组中都发现了编码多药转运蛋白的基因。多药 转运蛋白直接或局部受到转录因子的调控,通过氢键 的静电相互作用能够容纳不同类型药物化合物[23]。 本研究中,多药类、四环素类、大环内酯类大部分的 ARGs均可通过主动外排机制泵出细胞(表3),细菌 通过增强多药外排泵基因的表达从而产生耐药性[24]。 此外,本研究中另一个主要耐药机制是靶位保护机 制。靶位保护是由抗性蛋白与抗生素靶位相互作用 介导对抗生素产生耐药性,其作用方式主要有3种。 例如,本研究中四环素类 tetB 抗性机制属于 [型靶位 保护(表3),即直接在空间上覆盖抗生素的作用靶 点,将药物移除;而Ⅱ型和Ⅲ型靶位保护是将靶位构 象改变,间接移除抗生素或诱导靶位构象改变,靶位 保护蛋白可以通过阻断核糖体的易位来抑制细菌蛋 白质的合成[25]。

研究发现,抗性基因 carA、macB、bcrA、taeA、tetA 和oleC是海洋生态系统中沉积物中的高丰度抗性基 因[26],本研究结果与其类似。其中,大环内酯类抗性 基因 macB、四环素类 tetA(58)和氨基糖苷类 novA 在 养殖池塘水体和底泥中相对丰度最高(图2b)。在临 床及畜牧水产中大环内酯类抗生素被广泛使用[27]。 不同于其他结构特征的 ABC(ATP-binding cassette) 转运蛋白,大环内酯类macB转运蛋白主要通过机械 传输方式驱动抗生素外排,从TolC蛋白管道出口将 毒素从周质空间输出^[28]。四环素类是水产养殖生态 系统中污染最严重的抗性基因之一,对水生生物具有 毒性作用[29]。研究表明,抗性基因 tetA 也是我国珠江 三角洲地区鱼-鸭综合养殖模式养殖池塘水体和底 泥中ARGs的主要贡献者[30]。然而,尽管最近国家出 台了水产养殖业限用、禁用抗生素一类抗菌剂的相关 法令法规,但四环素类、大环内酯类、氨基糖苷类和磺 胺类等抗生素是过往水产养殖过程中常用的抗生素 类型^{18]},残留在水体环境中的抗生素诱导细菌产生的 ARGs有可能在细菌间水平转移(图6),且其在养殖 池塘水体和底泥中大量赋存会对生态循环水养殖系 统产生不利影响。

微生物群落作为ARGs的宿主载体和传播者,对 ARGs的分布及丰度变化具有重要影响^[31]。共现模式 网络分析(图6)结果表明,池塘中蓝细菌门、变形菌 门和放线菌门微生物与ARGs之间存在显著相关性, 说明细菌组成显著影响ARGs多样性和分布,且这些 菌属可能是 ARGs 的潜在宿主。蓝细菌门是养殖池 塘水体优势微生物,以聚球蓝细菌、微囊藻和浮丝藻 (Planktothrix)为优势属(图3)。池塘水体中的蓝细菌 (又称蓝藻)是池塘初级生产力的主要贡献者之一,在 光合作用、碳循环及食物链中扮演着举足轻重的角 色^[32]。本研究结果表明,养殖高峰季节集约化养殖池 塘水体TN浓度处于高位运行状态(表1),目TN浓度 与蓝细菌丰度呈显著正相关关系(图4),为蓝藻大量 增殖提供了充足的营养条件,因此养殖池塘水体中富 集了高丰度的藻华指示物种(微囊藻和浮丝藻),这些 物种可能会对池塘养殖鱼类产生藻毒素危害效应[33]。 此外,蓝细菌Cyanobium、Planktothrix和Synechococcus 均与多药类抗性基因 efrA、evgS、msbA、arlR 和 baeS 呈 显著正相关关系(图6a),且大部分多药类ARGs与 TN浓度亦呈显著强正相关关系(图5),说明在富营养 化水体中蓝细菌与多药耐药性关系十分密切。前人 研究证实,蓝细菌能够产生对脊椎动物、无脊椎动物、 植物、微藻、真菌、细菌、病毒和细胞系具有天然多药 逆转活性的次生代谢产物从而抑制抗生素毒性效 应^[34]。变形菌门是水产养殖池塘水体和底泥中重要 的微生物类群,也是最常见的ARGs宿主[35]。本研究 结果表明,养殖池塘水体和底泥中变形菌门微生物与 多药类ARGs具有显著正相关性(图6)。研究发现, 在许多变形菌门微生物中普遍存在一个保守的多药 外排泵基因 PACE (Proteobacterial antimicrobial compound efflux)家族,其在变形菌门细菌抗菌化合物外 排中发挥了重要作用¹³⁰,如在本研究中慢生根瘤菌是 池塘底泥变形菌门优势菌属。最近研究证实了慢生 根瘤菌可通过细菌外排泵作用减少细胞内抗生素水 平[37]。酸杆菌门和放线菌门微生物是本研究池塘底 泥中的主要类群(图3a)。李云莉等^[38]的研究同样发 现酸杆菌门和放线菌门也是我国沿海典型水产养殖 池塘底泥中的主要抗生素耐药菌,并指出不同抗生素 使用类型、养殖模式、养殖品种以及区域气候环境均 可显著改变池塘底泥细菌结构。此外,池塘底泥中放 线菌门与多药类和四环素类抗性基因呈显著正相关 (图 6b),说明放线菌门微生物也具有广泛的多药抗 菌素耐药性[39]。

www.aer.org.cn

农业环境科学学报 第42卷第3期

虽然生态化循环水养殖模式在水产养殖尾水处 理上具有节水、减排作用,但养殖池塘环境高风险 ARGs污染问题仍十分突出,养殖中存在的ARGs可 能对渔场工人、附近村民和消费者的健康以及周围生 态系统构成威胁。因此,需在该养殖模式基础上继续 改进,加入有效去除抗生素污染处理模块来控制养殖 池塘中ARGs污染问题。

4 结论

(1)在生态循环水养殖模式养殖池塘中共监测到 21类抗生素抗性基因(ARGs)。其中,多药类、四环素 类和大环内脂类ARGs的相对丰度较高。主动外排泵 是养殖池塘中最主要的耐药机制,并存在多种耐药机 制并存的污染特点。

(2)变形菌门是养殖池塘水体和底泥中的优势 菌,养殖池塘水体和底泥微生物群落组成差异明显。 微生物菌群作为ARGs的潜在宿主,促进了养殖系统 内ARGs的传播和扩散,且不同菌属间存在ARGs水 平转移趋势。

(3)生态循环水养殖池塘系统具有高水平ARGs 污染特征,因此需在现有生态循环水养殖模式设施模 块上增加抗生素去除或降解处理工艺,进而降低 ARGs污染和向周围环境的传播风险。

参考文献:

- [1] 梁惜梅, 施震, 黄小平. 珠江口典型水产养殖区抗生素的污染特征
 [J]. 生态环境学报, 2013, 22(2): 304-310. LIANG X M, SHI Z, HUANG X P. Occurrence of antibiotics in typical aquaculture of the Pearl River Estuary[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2013, 22 (2): 304-310.
- [2] TAMMINEN M, KARKMAN A, LÕHMUS A, et al. Tetracycline resistance genes persist at aquaculture farms in the absence of selection pressure[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(2): 386– 391.
- [3] LULIJWA R, RUPIA E J, ALFARO A C. Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: A review of the top 15 major producers[J]. *Reviews in Aquaculture*, 2020, 12(2): 640–663.
- [4] WANG C, LIU X, YANG Y, et al. Antibiotic and antibiotic resistance genes in freshwater aquaculture ponds in China: A meta-analysis and assessment[J]. Journal of Cleaner Production, 2021, 329:129719.
- [5] 文汉卿, 史俊, 寻昊, 等. 抗生素抗性基因在水环境中的分布、传播 扩散与去除研究进展[J]. 应用生态学报, 2015, 26(2):625-635. WEN H Q, SHI J, XUN H, et al. Distribution, dissemination and removal of antibiotic resistant genes (ARGs) in the aquatic environment[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2015, 26(2):625-635.

- [6] 张凯, 王广军, 龚望宝,等. 草鱼-鳙-鲫零换水养殖对池塘环境影响 [J]. 淡水渔业, 2022, 52(2):74-78. ZHANG K, WANG G J, GONG W B, et al. Study on environment of zero-water exchange culture pond of *Ctenopharyngodon idella*, *Hypothalmichthys nobilis* and *Carassius auratu*[J]. *Freshwater Fisheries*, 2022, 52(2):74-78.
- [7] 钟立强, 王明华, 张世勇, 等. 南京地区斑点叉尾鮰养殖池塘水体微 生物群落结构研究[J]. 农业环境科学学报, 2020, 39(7):1594-1604. ZHONG L Q, WANG M H, ZHANG S Y, et al. Microbial community structure in a channel catfish pond in Nanjing, China[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2020, 39(7):1594-1604.
- [8] 李十盛, 高会, 赵富强, 等. 水产养殖环境中抗生素抗性基因的研究 进展[J]. 中国环境科学, 2021, 41(11):5314-5325. LISS, GAOH, ZHAOFQ, et al. Research progress on the occurrence and influencing factors of antibiotic resistance genes in aquaculture environment[J]. *China Environmental Science*, 2021, 41(11):5314-5325.
- [9] SU H, HU X, WANG L, et al. Contamination of antibiotic resistance genes (ARGs) in a typical marine aquaculture farm: Source tracking of ARGs in reared aquatic organisms[J]. *Journal of Environmental Science* and Health, 2020, 55(3):220–229.
- [10] ZHENG J, GAO R, WEI Y, et al. High-throughput profiling and analysis of antibiotic resistance genes in East Tiaoxi River, China[J]. Environmental Pollution, 2017, 230:648–654.
- [11] 曾碧健, 岳晓彩, 黎祖福, 等. 生态浮床原位修复对海水养殖池塘 浮游动物群落结构的影响[J]. 海洋与湖沼, 2016, 47(2):354-359. ZENG B J, YUE X C, LI Z F, et al. Effect of ecological floating bed on zooplankton community structure in a mariculture pond[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2016, 47(2):354-359.
- [12] 国家环境保护总局.水和废水监测分析方法[M].四版.北京:中国 环境科学出版社, 2002. State Environmental Protection Administration. Methods for monitoring and analysis of water and wastewater [M]. 4th Edition. Beijing: China Environmental Science Press, 2002.
- [13] 程森, 路平, 冯启言. 渔业复垦塌陷地抗生素抗性基因与微生物群 落[J]. 环境科学, 2021, 42(5):2541-2549. CHENG S, LU P, FENG Q Y. Distribution of antibiotic resistance genes and microbial communities in a fishery reclamation mining subsidence area[J]. Environmental Science, 2021, 42(5):2541-2549.
- [14] 禹桃兵,石琪晗,年海,等. 涝害对不同大豆品种根际微生物群落 结构特征的影响[J]. 作物学报, 2021, 47(9):1690-1702. YUTB, SHIQH, NIANH, et al. Effects of waterlogging on rhizosphere microorganisms communities of different soybean varieties[J]. Acta Agronomica Ainica, 2021, 47(9):1690-1702.
- [15] BARBERÁN A, BATES S T, CASAMAYOR E O, et al. Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(2):343-351.
- [16] ZHAO R, FENG J, LIU J, et al. Deciphering of microbial community and antibiotic resistance genes in activated sludge reactors under high selective pressure of different antibiotics[J]. *Water Research*, 2019, 151:388–402.
- [17] 黄福义,周曙仡聃,王佳妮,等.不同作物农田土壤抗生素抗性基因多样性[J].环境科学,2021,42(6):2975-2980. HUANG FY,ZHOU SYD,WANGJN, et al. Profiling of antibiotic resistance

genes in different groplands[J]. *Environmental Science*, 2021, 42(6): 2975–2980.

- [18] 胡海燕, 刘慧敏, 孟璐, 等. 宏基因组学在微生物抗生素抗性基因 检测中的应用[J]. 微生物学通报, 2019, 46(11):3110-3123. HU H Y, LIU H M, MENG L, et al. Application of metagenomics in the detection of microbial antibiotic resistance genes[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(11):3110-3123.
- [19] MUZIASARI W I, PITKÄNEN L K, SØRUM H, et al. The resistome of farmed fish feces contributes to the enrichment of antibiotic resistance genes in sediments below Baltic Sea fish farms[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 7:2137.
- [20] SANTOS L, RAMOS F. Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2018, 52(2):135–143.
- [21] ZHANG R Q, YING G G, SU H C, et al. Antibiotic resistance and genetic diversity of *Escherichia coli* isolates from traditional and integrated aquaculture in South China[J]. *Journal of Environmental Science* and Health, 2013, 48(11):999–1013.
- [22] 董祎,张万筠,鲍晨宁,等.抗生素抗性基因在环境中的来源与传播[J]. 辽宁化工, 2018, 47(3):253-255. DONG Y, ZHANG W J, BAO C N, et al. Study on the origin and transmission of antibiotic resistance genes in the environment[J]. *Liaoning Chemical Industry*, 2018, 47(3):253-255.
- [23] NIKAIDO H. Multidrug resistance in bacteria[J]. Annual Review of Biochemistry, 2009, 78:119-146.
- [24] GODSEY M H, HELDWEIN E E Z, BRENNAN R G. Structural biology of bacterial multidrug resistance gene regulators[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(43):40169-40172.
- [25] WILSON D N, HAURYLIUK V, ATKINSON G C, et al. Target protection as a key antibiotic resistance mechanism[J]. Nature Reviews Microbiology, 2020, 18(11):637–648.
- [26] CHEN B, YANG Y, LIANG X, et al. Metagenomic profiles of antibiotic resistance genes (ARGs) between human impacted estuary and deep ocean sediments[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(22):12753-12760.
- [27] 梁敏,章雪琴.水产品中大环内酯类药物残留检测技术的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(2):595-601. LIANG M, ZHANG X Q. Research progress on detection of macrolide residues in aquatic product[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2021, 12(2): 595-601.
- [28] GREENE N P, KAPLAN E, CROW A, et al. Antibiotic resistance mediated by the MacB ABC transporter family: A structural and functional perspective[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9:950.

- [29] 王慧珠, 罗义, 徐文青, 等. 四环素和金霉素对水生生物的生态毒 性效应[J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(4):1536-1539. WANG H Z, LUO Y, XU W Q, et al. Ecotoxic effects of tetracycline and chlortetracycline on aquatic organisms[J]. Journal of Agro – Environment Science, 2008, 27(4):1536-1539.
- [30] HUANG L, XU Y B, XU J X, et al. Antibiotic resistance genes (ARGs) in duck and fish production ponds with integrated or non-integrated mode[J]. *Chemosphere*, 2017, 168:1107-1114.
- [31] ELLABAAN M M H, MUNCK C, PORSE A, et al. Forecasting the dissemination of antibiotic resistance genes across bacterial genomes[J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1):2435.
- [32] 李佳霖, 秦松. 海洋微微型蓝细菌分子生态学研究进展[J]. 地球科 学进展, 2015, 30(4):477-486. LIJL, QINS. Advances in molecular ecology of marine picocyanobacteria[J]. Advances in Earth Science, 2015, 30(4):477-486.
- [33] 毕相东. 微囊藻毒素(MCs)对淡水池塘养殖业的危害及防控研究 进展[J]. 大连海洋大学学报, 2021, 36(4):535-545. BI X D. Research progress on the harm and control of microcystins (MCs) in freshwater pond aquaculture: A review[J]. Jounal of Dalian Ocean University, 2021, 36(4):535-545.
- [34] PATTERSON G M L, LARSEN L K, MOORE R E. Bioactive natural products from blue-green algae[J]. *Journal of Applied Phycology*, 1994, 6(2):151-157.
- [35] WANG J H, LU J, ZHANG Y X, et al. Metagenomic analysis of antibiotic resistance genes in coastal industrial mariculture systems[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 253:235–243.
- [36] HASSAN K, ELBOURNE L, LI L, et al. An ace up their sleeve: A transcriptomic approach exposes the Acel efflux protein of *Acinetobacter baumannii* and reveals the drug efflux potential hidden in many microbial pathogens[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6:333.
- [37] WANG L, LI Y, ZHAO Z, et al. Tidal flat aquaculture pollution governs sedimentary antibiotic resistance gene profiles but not bacterial community based on metagenomic data[J]. Science of the Total Environment, 2022, 833:155206.
- [38] 李云莉, 高权新, 齐占会, 等. 我国沿海典型水产养殖水域底泥中抗生素抗性细菌的多样性分析[J]. 海洋渔业, 2018, 40(5):604-613.
 LIYL, GAOQX, QIZH, et al. Diversity of abundant antibiotic-resistant bacteria in sediments from typical mariculture sites of China's coastline[J]. Marine Fisheries, 2018, 40(5):604-613.
- [39] ELDHOLM V, MONTESERIN J, RIEUX A, et al. Four decades of transmission of a multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis outbreak strain[J]. Nature Communications, 2015, 6(1):7119.

(责任编辑:朱晓昱)