

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

引用本文:

黄薇, 刘洋, 饶秋华, 罗钦, 王为刚, 宋永康, 罗土炎. 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[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(1): 197–208.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2022-0693>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

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>

粪源环丙沙星对潮土中抗生素抗性基因的影响

常旭卉, 贾书刚, 王淑平, 周志强

农业环境科学学报. 2018, 37(12): 2727–2737 <https://doi.org/10.11654/jaes.2018-0401>

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>

洪泽湖沉积物中四环素土霉素及相关抗性基因的分布特征及潜在风险分析

罗方园, 潘根兴, 李恋卿, 张俊, 王娜, 焦少俊, 张旭辉

农业环境科学学报. 2017, 36(2): 369–375 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-1237>

重金属协同选择环境细菌抗生素抗性及其机制研究进展

张佳奇, 徐艳, 罗义, 毛大庆

农业环境科学学报. 2016, 35(3): 409–418 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016.03.001>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

黄薇, 刘洋, 饶秋华, 等. 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[J]. 农业环境科学学报, 2023, 42(1): 197–208.

HUANG W, LIU Y, RAO Q H, et al. Distribution characteristics and influencing factors of antibiotic resistance genes in sediments from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) culture areas[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2023, 42(1): 197–208.



开放科学 OSID

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^{1,2}, 刘洋¹, 饶秋华¹, 罗钦¹, 王为刚³, 宋永康^{1*}, 罗土炎^{1*}

(1. 福建省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所/福建省农产品质量安全重点实验室, 福州 350003; 2. 福建师范大学生命科学学院, 福州 350108; 3. 连江县水产技术推广站, 福州 350500)

摘要:为揭示大黄鱼养殖海域沉积物中抗生素抗性基因(Antibiotic resistance genes, ARGs)的赋存特征及其影响因素,本研究通过野外调查采集了6个站点的大黄鱼养殖海域沉积物样品,利用宏基因组测序分析技术解析沉积物中ARGs的分布特征,同时运用化学分析技术和高通量测序技术对沉积物中的环境因子以及微生物群落结构进行分析,以进一步对ARGs与环境因子以及微生物群落结构的相关性进行研究。结果显示:大黄鱼养殖海域沉积物中共检出781个ARGs亚型,分属于38种抗生素抗性类型;不同站点的优势ARGs抗生素抗性类型基本一致,主要为四环素类、大环内酯类和氟喹诺酮类,引起细菌耐药性的主要机制为外排泵。进一步相关性分析结果显示,除P_{NGM-1}与电导率和TN呈显著正相关($P < 0.05$)外,其余丰度前20的ARGs均与环境因子相关性不显著($P > 0.05$);而丰度前20的ARGs均与丰度前20的菌属呈显著或极显著相关关系($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。研究表明,大黄鱼养殖海域沉积物中含有丰富的ARGs,微生物群落是影响沉积物中ARGs分布的重要因素。

关键词:抗生素抗性基因;宏基因组测序分析技术;大黄鱼养殖海域;沉积物;微生物群落

中图分类号:X55 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2023)01-0197-12 doi:10.11654/jaes.2022-0693

Distribution characteristics and influencing factors of antibiotic resistance genes in sediments from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) culture areas

HUANG Wei^{1,2}, LIU Yang¹, RAO Qiuhua¹, LUO Qin¹, WANG Weigang³, SONG Yongkang^{1*}, LUO Tuiyan^{1*}

(1. Institute of Agricultural Quality Standards and Testing Technology Research, Fujian Academy of Agricultural Sciences/Fujian Key Laboratory of Agro-products Quality & Safety, Fuzhou 350003, China; 2. College of Life Science, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China; 3. Aquatic Technology Promotion Station of Lianjiang County, Fuzhou 350500, China)

Abstract: To reveal the distribution characteristics and influencing factors of antibiotic resistance genes (ARGs) in the sediments of large yellow croaker culture areas, sediment samples from six sites of large yellow croaker culture areas were collected via field survey, and the distribution characteristics of ARGs in the sediments were analyzed using macro-genome sequencing analysis technology. The environmental factors and microbial community structure in the sediment were analyzed using chemical analysis and high-throughput

收稿日期:2022-07-06 录用日期:2022-09-29

作者简介:黄薇(1986—),女,江西抚州人,硕士研究生,副研究员,主要从事水产微生物学研究。E-mail:lifehuangwei@aliyun.com
刘洋与黄薇同等贡献

*通信作者:罗土炎 E-mail:zx16588@qq.com; 宋永康 E-mail:songlibby@sina.com

基金项目:福建省属公益类科研院所基本科研专项(2020R1022009, 2022R1022002);福建省农业科学院科技项目(YC2019011, 2022KF20, CXTD2021015-3)

Project supported: The Special Scientific Research Funds for Public Scientific Research Institution of Fujian (2020R1022009, 2022R1022002); The Science and Technology Project of Fujian Academy of Agricultural Sciences (YC2019011, 2022KF20, CXTD2021015-3)

sequencing techniques, and the correlation between ARGs and environmental factors and microbial community structure was investigated. 781 ARGs subtypes belonging to 38 ARGs types were identified, indicating the wide-spectrum profiles of ARGs in the sediments from large yellow croaker culture areas. Statistical analyses revealed that the types of antibiotic resistance in the dominant ARGs in sediments from different large yellow croaker culture areas were basically the same, mainly tetracyclines, macrolides, and fluoroquinolones, and the main mechanism causing bacterial resistance was the efflux pump. Correlation analysis showed that the top 20 ARGs were not significantly correlated ($P>0.05$) with environmental factors, except for *PNGM-1*, which was significantly and positively correlated ($P<0.05$) with conductivity and TN; however, all the top 20 ARGs were significantly or highly significantly correlated ($P<0.05$, $P<0.01$) with the top 20 bacterial genera. Our results indicate that sediments from large yellow croaker culture areas are rich in ARGs, and the microbial community is an important factor that affects the distribution of ARGs in the sediments.

Keywords: antibiotic resistance gene; macro-genome sequencing analysis technology; large yellow croaker culture area; sediment; microbial community

抗生素在医疗、畜禽养殖和水产养殖中都发挥着十分重要的作用。在水产养殖过程中,抗生素被用于防治各种细菌性疾病,同时兼具促进水生动物生长等功效^[1]。为了提高养殖产量、降低养殖成本,抗生素在水产养殖过程中被长期过度使用,这导致了水产养殖环境和养殖动物体内耐药菌和抗生素抗性基因(Antibiotic resistance genes, ARGs)^[2]的产生。ARGs于2006年由Pruden等^[3]首次确认为新型的环境污染物,由于可以通过水平基因转移在环境和生物体内长久持续传播,ARGs的危害性相对于抗生素和耐药菌更强,因此其被世界卫生组织列为21世纪人类医疗健康面临的三大威胁之一^[4]。

水产养殖环境被证明是ARGs的潜在储藏库,ARGs在水产养殖环境(水体、沉积物)及水产养殖对象中普遍存在^[5-7]。Hedberg等^[8]证实沿海水域的ARGs主要来源于水产养殖。水产养殖环境中的ARGs可以通过食物链直接与人类肠道菌群进行水平基因转移传播^[9]。Yang等^[10]的研究显示,海水养殖沉积物中的ARGs序列与人体致病菌中的ARGs序列高度相似。因此,随着全球水产养殖业的快速发展,水产养殖环境中的ARGs引起了更多的关注,尤其是沉积物。与水不同,沉积物中的ARGs具有更稳定、更持久的特点,其ARGs赋存量显著大于水,被认为是ARGs的“汇”^[11]。Yuan等^[12]认为随着时间的推移,水中的ARGs会在沉积物中不断积累,沉积物很可能增强了抗生素抗性的传播。

不同养殖区域、不同养殖对象以及不同养殖模式造成的ARGs赋存情况显著不同^[11]。大黄鱼是我国养殖规模最大的海水鱼,也是海区网箱养殖最主要的品种^[13],然而对大黄鱼养殖海域沉积物ARGs赋存特征的研究尚未见报道。目前,ARGs的检测方法主要以PCR技术为主,虽然很多研究人员已经利用PCR方

法对水产养殖环境中的ARGs进行了定量研究,且取得了一定成果,但对研究ARGs的种类有限制,很难得到环境中微生物抗生素抗性基因组的全面且详细的信息^[14]。近年来,随着高通量测序和功能基因组筛选技术的发展,宏基因组测序分析技术不再局限于PCR引物设计,可以为研究环境抗生素抗性基因组提供ARGs的广谱特征,从而全面客观地反映环境中ARGs的多样性。因此,本文以大黄鱼养殖海域沉积物为研究对象,利用宏基因组测序分析技术调查大黄鱼养殖海域内ARGs的污染状况,并探讨ARGs与环境因子以及微生物群落结构之间的相关性,揭示ARGs在水产养殖环境中的扩散和传播规律,以期为评价大黄鱼养殖区域ARGs的生态风险和污染控制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 采样点及样品采集

2022年1月选取6个大黄鱼养殖密集区采集养殖鱼排下的沉积物样品,具体采样点分布如图1所示,采样点信息见表1。每个采样点选取3个不同的网箱(分别用A、B、C表示),选取的网箱之间至少间隔一个网箱,在选取的网箱框架踏板上使用抓斗采泥器采集沉积物样品,样品采集后立即放入无菌的聚乙烯塑料袋中,放到低温(冰浴)冷藏箱中运至实验室,置于-80℃冰箱保存待测。

1.2 沉积物理化因子测定

样品pH和电导率(含盐量)通过出海采样实时检测得到,pH使用便携式pH计(METTLER TOLEDO,瑞士)获取,电导率通过便携式电导率仪(METTLER TOLEDO,瑞士)测定。有机碳(TOC)采用重铬酸钾氧化-还原容量法测定,总氮(TN)采用凯氏滴定法测定,总磷(TP)采用分光光度法测定。

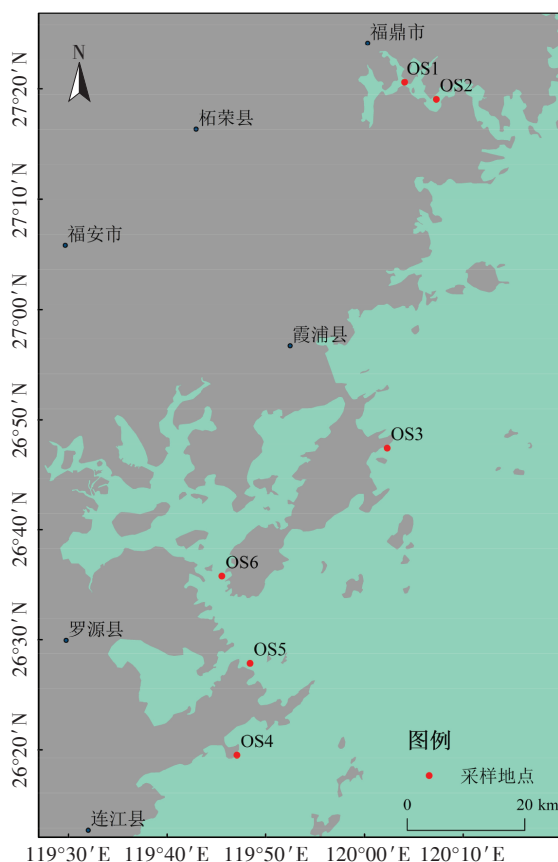


图1 采样点分布示意图

Figure 1 Location of sampling sites

表1 样本的基本信息

Table 1 Basic information of the samples

样品编号 Sample code	采样地点 Sampling site	水深 Water depth/m	所属行政区 Administrative region
OS1	27°15'35"N, 120°15'56"E	32.5	福建省宁德市福鼎市
OS2	27°13'36"N, 120°18'55"E	18.7	福建省宁德市福鼎市
OS3	26°42'40"N, 120°08'23"E	24.5	福建省宁德市霞浦县
OS4	26°16'51"N, 119°48'21"E	23.6	福建省福州市连江县
OS5	26°25'02"N, 119°51'05"E	38.6	福建省福州市连江县
OS6	26°33'19"N, 119°49'33"E	61.2	福建省宁德市霞浦县

1.3 沉积物微生物DNA提取

使用 PowerSoil DNA Isolation Kit 试剂盒 (MO-BIO, Carlsbad, CA, 美国), 参照试剂盒说明书进行沉积物总基因组DNA的提取, 使用 Qubit 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, 美国) 检测DNA样品的浓度, 然后将DNA样品放置于-80℃下保存备用。16S rRNA基因高通量测序样品为每个采样点的3个平行沉积物样品分别提取DNA, 宏基因组高通量测序样品为每个采样点的3个平行沉积物样品等质量混

合后提取DNA, 最后共获得18个用于16S rRNA基因高通量测序的基因组DNA样品和6个宏基因组高通量测序的基因组DNA样品。

1.4 16S rRNA基因高通量测序及生物信息学分析

16S rRNA基因高通量测序DNA样品送上海美吉生物医药科技有限公司, 于Illumina MiSeq平台进行测序, 16S rRNA基因高通量测序扩增16S rRNA基因V3~V4可变区, 通用引物为338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')。Miseq测序得到的原始序列首先根据overlap关系进行拼接, 之后裁切序列中的正反向引物, 同时对序列质量进行质控和过滤, 区分样本后按97%序列相似度进行OTU聚类分析划分分类操作单元(OTUs), 再运用Ribosomal Database Project(RDP) classifier进行物种注释, 得到每条序列从门到属各个水平的分类信息, 基于分类学信息, 统计每个生物样本的多样性指数。

1.5 宏基因组高通量测序及生物信息学分析

宏基因组高通量测序DNA样品送上海美吉生物医药科技有限公司, 于Illumina Hiseq 2500测序平台进行测序。Hiseq测序得到的原始序列首先进行质控, 剪切接头序列、低质量序列及含N碱基序列, 然后利用Megahit与Newbler拼接软件对质控数据进行拼接组装, 再使用MetaGene软件对拼接结果中的contigs进行ORF预测。预测出的基因序列按相似度95%进行聚类, 每类取最长的基因作为代表序列, 构建非冗余基因集; 将数据上传CARD数据库进行比对, 获得基因对应的ARGs功能注释信息, 包括基因名称、抗生素抗性类型、耐药机制以及基因如何与抗生素药物有关的描述等; ARGs的相对丰度使用百万分率(10^{-6})表示, 即在1 000 000个质控序列中有一个被标注为ARG的序列。

1.6 统计分析

采用Excel软件计算数据的平均值和标准偏差。采用SPSS软件进行方差分析和相关性分析, 方差分析采用LSD检验, 相关性分析选择spearman算法。应用R语言vegan、gplots、venn diagram和pheatmap等软件包绘制PCoA图、柱状图、韦恩图、热图和相关性热图。

2 结果与分析

2.1 大黄鱼养殖海域沉积物中抗生素抗性基因分布特征

本研究从6个沉积物底泥样本中共获得了

80 604 948~94 023 130条(平均89 055 467条)宏基因组高通量测序质量过滤序列,其中275 976~557 910条(0.32%~0.36%)序列被注释为CARD抗性基因序列(BLASTp, $e\text{-value} \leq 10^{-5}$)。图2为丰度前50的ARGs, OS1~OS6位点丰度最高的ARG均为 *macB* ($254.31 \times 10^{-6} \sim 436.85 \times 10^{-6}$), 其次均为 *tetA* (58) ($131.64 \times 10^{-6} \sim 241.69 \times 10^{-6}$)、*evgS* ($87.00 \times 10^{-6} \sim 193.42 \times 10^{-6}$)和 *bcrA* ($76.75 \times 10^{-6} \sim 128.89 \times 10^{-6}$), 上述优势ARGs分别占ARGs序列总数的15.44%~16.48%, 表明不同大黄鱼养殖海域沉积物中的优势抗生素抗性基因种类基本一致。

根据统计结果,在大黄鱼养殖海域沉积物样品中共识别出38种抗生素抗性类型,781个ARGs亚型。图3a为不同抗生素抗性类型ARGs的相对丰度,在大黄鱼养殖海域沉积物中,ARGs的主要抗生素抗性类型为四环素类(Tetracyclines, $1\,049.03 \times 10^{-6} \sim 2\,061.39 \times 10^{-6}$)、大环内酯类(Macrolides, $999.59 \times 10^{-6} \sim 1\,946.88 \times$

10^{-6})和氟喹诺酮类(Fluoroquinolones, $660.02 \times 10^{-6} \sim 1\,292.33 \times 10^{-6}$)。图3b为不同耐药机制的ARGs占ARGs序列总数的相对百分比情况,从结果中可以看出,不同大黄鱼养殖海域沉积物样品中ARGs引起细菌耐药的机制基本一致,其中外排泵(Antibiotic efflux)是主要的耐药机制,占ARGs序列总数的62.63%~63.84%,其次为抗生素靶点改变(Antibiotic target alteration),占ARGs序列总数的18.76%~20.03%。

2.2 大黄鱼养殖海域沉积物 ARGs 与环境因子之间的关系

2.2.1 大黄鱼养殖海域沉积物中环境因子分布特征

大黄鱼养殖海域沉积物中5种环境因子的检测结果见表2。6个位点的大黄鱼养殖海域沉积物样品的pH和电导率相似,但TOC、TN和TP存在显著差异($P < 0.05$),TOC范围为0.48%(OS1)~0.59%(OS4),TN含量范围为398(OS1)~563 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (OS6),TP含量范围为546(OS5)~777 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (OS1)。根据我国《海洋

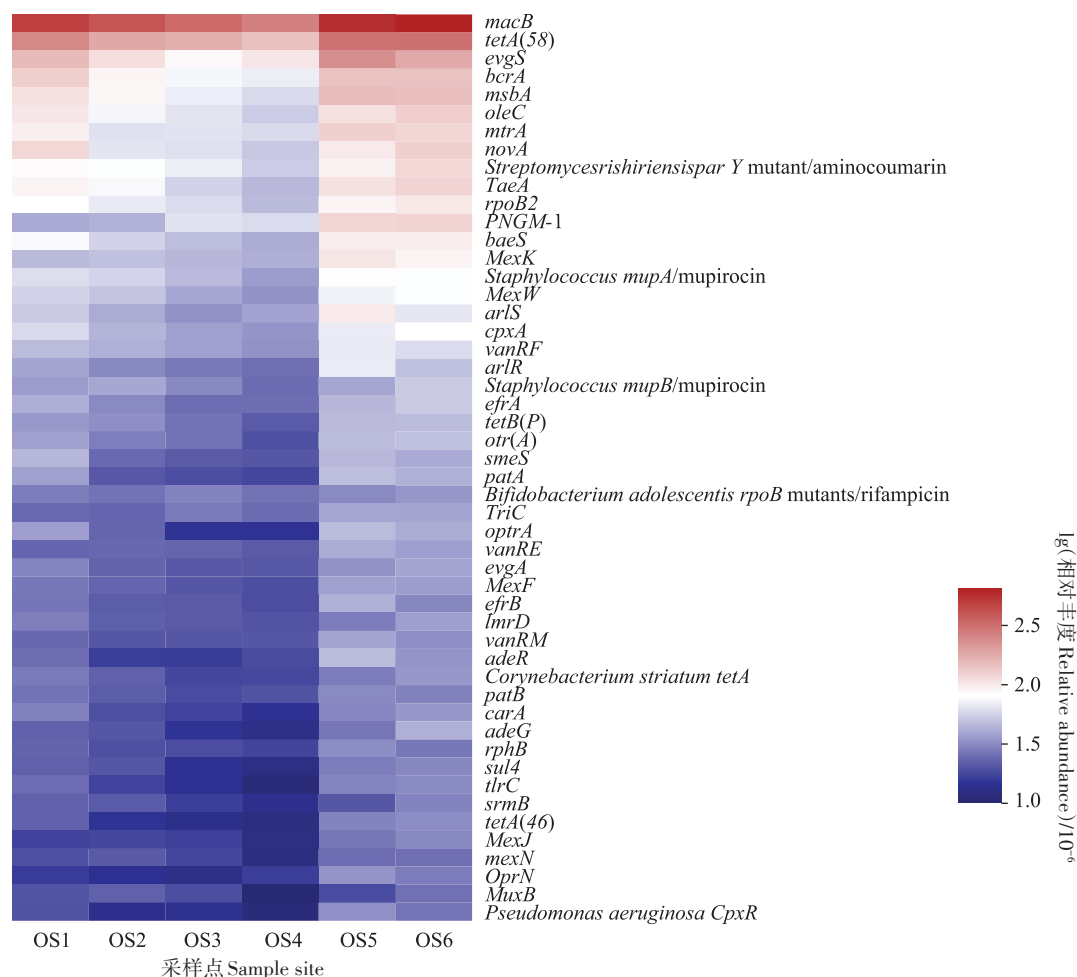


图2 大黄鱼养殖海域沉积物中ARGs赋存特征

Figure 2 Occurrence characteristics of ARGs in the different sediment samples from large yellow croaker culture area

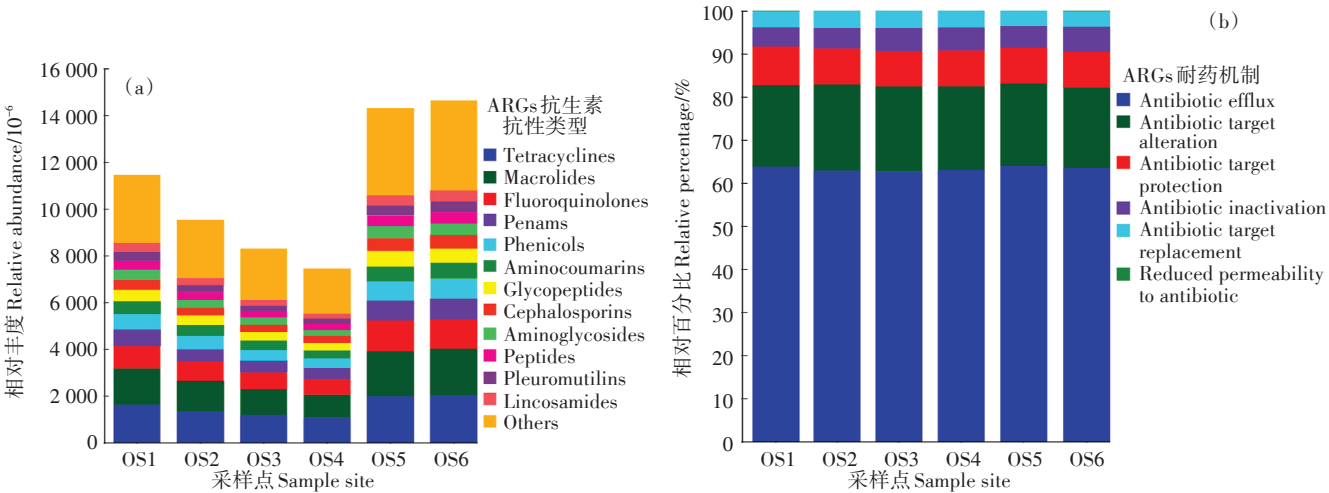


图3 大黄鱼养殖海域沉积物中 ARGs 的抗生素抗性类型和耐药机制

Figure 3 Antibiotic resistance types and resistance mechanisms of ARGs in different sediment samples from large yellow croaker culture area

表2 大黄鱼养殖海域沉积物中环境因子分布特征(平均值±标准误,n=3)

Table 2 Distribution characteristics of environment factors in different sediment samples from large yellow croaker culture area(Mean±SEM,n=3)

环境因子 Environmental factor	OS1	OS2	OS3	OS4	OS5	OS6
pH	8.01	8.07	8.02	7.98	7.96	7.92
电导率/(mS·cm ⁻¹)	47.0	47.3	48.4	47.5	47.7	48.2
TOC/%	0.48±0.01c	0.52±0.01bc	0.49±0.02c	0.59±0.03a	0.54±0.01ab	0.58±0.04a
TN/(mg·kg ⁻¹)	398±26d	437±13cd	462±19c	518±15b	475±31c	563±28a
TP/(mg·kg ⁻¹)	777±50a	633±18b	607±22bc	559±20cd	546±22d	736±19a

注:同行数据后不同字母表示组间存在显著差异($P<0.05$)。下同。
Note: Values in each line with different letters are significantly different ($P<0.05$). The same below.

沉积物质量》(GB 18668—2002),6个位点的TOC均超过第三类海洋沉积物质量标准,根据加拿大安大略省环境和能源部1992年制定的沉积物标准,OS6中TN属轻度污染,OS1、OS2、OS3和OS6中TP为轻度污染。

2.2.2 沉积物中环境因子与 ARGs 之间的相关性

为探究大黄鱼养殖海域沉积物中环境因子对 ARGs 分布特征的影响,使用相关性分析解析6个位点大黄鱼养殖海域沉积物中的5种环境因子与丰度前20的 ARGs 之间的关系,结果见图4。如图4所示,大黄鱼养殖海域沉积物中,pH与丰度前20的 ARGs 均存在负相关关系,TN与丰度前20的 ARGs 均存在正相关关系,但除 *PNGM-1* 与电导率和TN呈显著正相关($P<0.05$)外,其余 ARGs 与所检环境因子之间的相关性均不显著($P>0.05$)。

2.3 大黄鱼养殖海域沉积物 ARGs 与微生物群落的关系

2.3.1 大黄鱼养殖海域沉积物中细菌群落结构

18个大黄鱼养殖海域沉积物样品Illumina MiSeq测序数据统计分析结果见表3。从表3可知,18个沉积物样品获得的16S rRNA序列数为56 007~66 002条,OTUs为2 066~3 451,每个样品的OUT覆盖率均大于96%,表明Illumina MiSeq测序获取的数据量能够很好地反映特定样品的细菌多样性情况。Alpha多样性分析结果表明,尽管OS2、OS3和OS4沉积物样品的覆盖率要显著低于OS1、OS5和OS6($P<0.05$),但是OS2、OS3和OS4的OTUs、ACE指数和Chao指数要显著高于OS1、OS5和OS6($P<0.05$),表明OS2、OS3和OS4样品中的物种数要高于OS1、OS5和OS6。此外,除OS1的Shannon指数外,各样本的Shannon指数和Simpson指数的差异不显著($P>0.05$),说明各样品间的物种丰度和多样性差异不显著。Beta多样性分析(PCoA分析,图5)结果表明,除OS3和OS4微生物组成结构相似外,不同采样点的微生物组成结构存在明显差异。

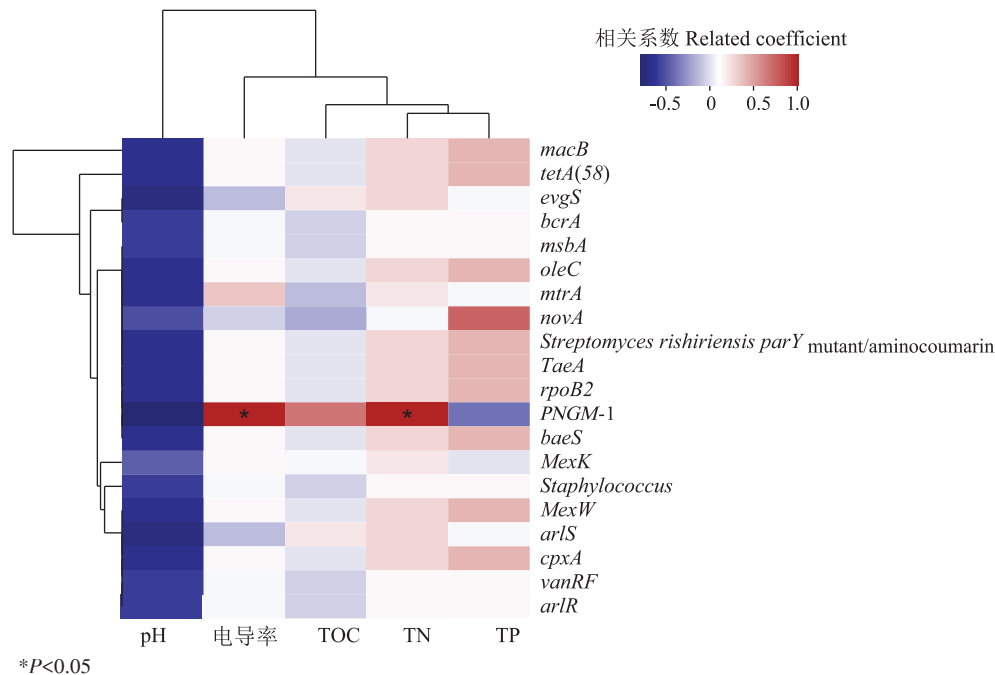


图4 大黄鱼养殖海域沉积物中 ARGs 和环境因子的关系

Figure 4 Correlation between ARGs and environmental factors in the sediment of large yellow croaker culture area

表3 Illumina MiSeq 测序数据统计分析(平均值±标准误, n=3)

Table 3 Statistical indexes calculated based on the Illumina MiSeq sequencing data(Mean±SEM, n=3)

项目 Item	OS1	OS2	OS3	OS4	OS5	OS6
序列数	60 523±3 925a	62 985±3 225a	62 523±3 387a	61 204±1 399a	60 992±4 958a	59 365±3 010a
OTUs	2 572±455b	3 041±19a	3 312±48a	3 301±160a	2 449±123b	2 645±64b
ACE 指数	3 638±405b	4 324±158a	4 505±55a	4 568±180a	3 527±103b	3 703±87b
Chao 指数	3 590±410b	4 186±148a	4 423±110a	4 458±220a	3 472±148b	3 650±83b
Shannon 指数	5.44±1.41b	6.33±0.09ab	6.58±0.08a	6.52±0.02a	5.83±0.03ab	6.11±0.02ab
Simpson 指数	0.07±0.10a	0.01±<0.01a	0.01±<0.01a	0.01±<0.01a	0.01±<0.01a	0.01±<0.01a
覆盖率/%	97.35±0.18a	96.84±0.35b	96.47±0.25b	96.52±0.10b	97.51±0.33a	97.02±0.50a

通过构建韦恩图分析了不同大黄鱼养殖海域沉积物样品中所共有的和特有的 OTU 数目(图 6)。如图 6 所示, 18 个 大黄鱼养殖海域沉积物样品共有 1 059 个 OTUs, 统计分析表明, 共有的 OTUs 序列分别占样品序列总数的 13.68%~22.85%, 特有 OTUs 序列分别占样品序列总数的 0.26%~1.39%。从物种注释结果来看, 本研究共得到细菌 59 个门(图 7a), 981 个属(图 7b)。对注释结果进行统计分析, 从门水平上看, 除 OS3 外, 其余大黄鱼养殖海域沉积物中丰度最高的细菌门均为 Proteobacteria, 其占样品序列总数的 21.36%±0.86%~44.19%±22.59%, OS3 丰度最高的细菌门为 Desulfobacterota; 其次, OS1、OS2 和 OS6 为 Bacteroidota (13.45% ± 6.97%、14.72% ± 1.57% 和

15.82% ± 0.38%), OS5 为 Acidobacteriota (11.22% ± 1.38%), OS4 为 Desulfobacterota (16.13%±0.87%), OS3 为 Proteobacteria (20.09%±0.67%); 对样品中前 20 的门 的丰度进行差异显著性分析, 结果显示这些门类的细菌在不同大黄鱼养殖海域沉积物中均存在显著差异 (P<0.05)。从属水平上看, OS1 丰度最高的属为 Pseudoalteromonas, OS2、OS4 和 OS5 丰度最高的属为 Woeseia, OS3 丰度最高的属 g_no rank_o_Sva1033, OS6 丰度最高的属为 g_no rank_f_unclassified。同时对样品中前 20 的属的丰度进行差异显著性分析, 结果显示除 g_no rank_o_Actinomarinales、Pseudoalteromonas 不显著 (P>0.05) 外, 其他属类细菌在不同大黄鱼养殖海域沉积物中均存在显著差异 (P<0.05)。以上说明

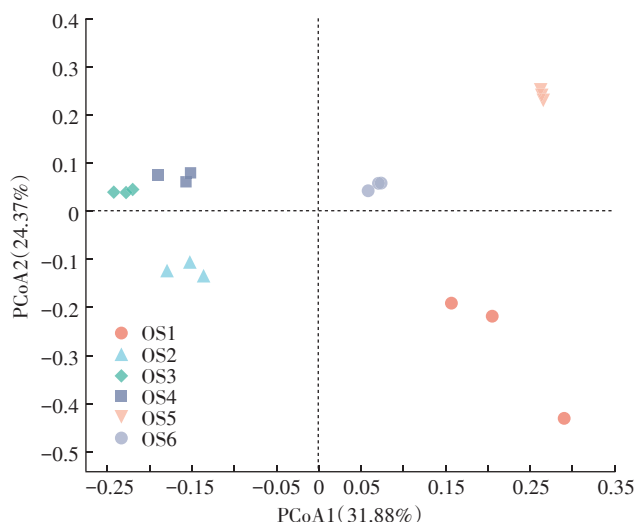


图5 大黄鱼养殖海域沉积物样品细菌群落结构PCoA分析

Figure 5 Principal coordinates analysis (PCoA) of bacterial community compositions in the different sediment samples from large yellow croaker culture area

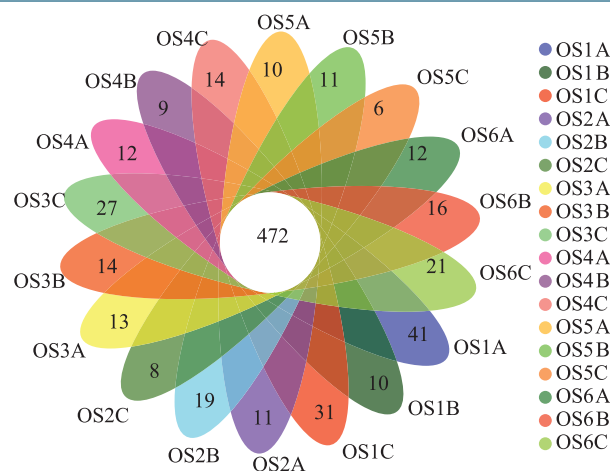


图6 不同大黄鱼养殖海域沉积物中共有和特有的OTUs

Figure 6 Venn diagram displaying the number of shared and unique OTUs in the different sediment samples from large yellow croaker culture area

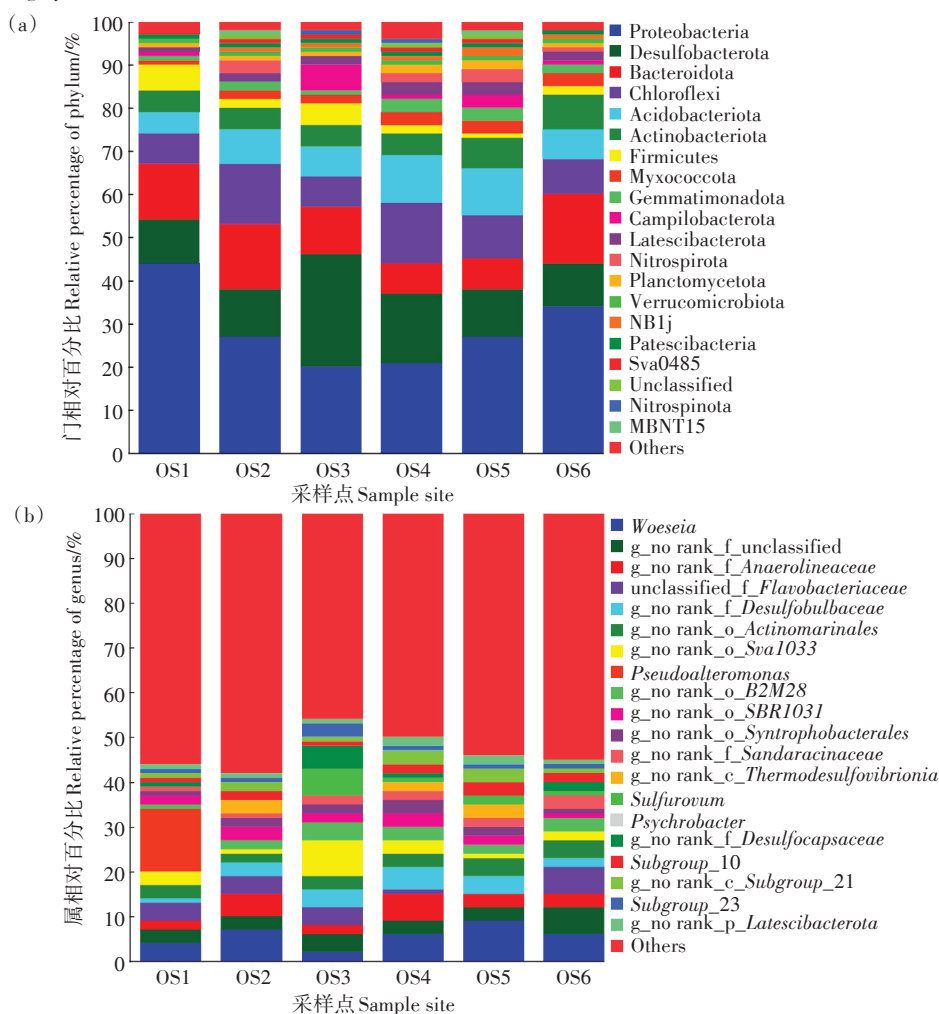


图7 门水平下和属水平下不同大黄鱼养殖海域沉积物中细菌群落结构组成

Figure 7 Bacterial community compositions in the different sediment samples from large yellow croaker culture area at the phylum level and at the genus level

不同点位的大黄鱼养殖海域沉积物的细菌丰度组成存在明显差异。

2.3.2 沉积物中细菌群落对 ARGs 分布特征的影响

在大黄鱼养殖海域沉积物中,丰度前20的细菌属与丰度前20的 ARGs 之间的相关关系如图8所示。由图8可知,除 PNGM-1 外,大部分 ARGs 之间呈显著或极显著正相关($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。从微生物群落结构与 ARGs 之间的关系来看,丰度前20的微生物菌属中有8种与 ARGs 呈显著或极显著相关。其中, *g_no_rank_c_Subgroup_21* 与丰度前20种的15种

ARGs 呈显著或极显著负相关($P<0.05$ 或 $P<0.01$),涉及8种抗生素抗性类型和2种耐药机制; *unclassified_f_Flavobacteriaceae* 与13种 ARGs 呈显著或极显著正相关($P<0.05$ 或 $P<0.01$),涉及6种抗生素抗性类型和2种耐性机制; *g_no_rank_c_Thermodesulfovibrio* 与8种 ARGs 呈显著负相关($P<0.05$),涉及5种抗生素抗性类型和1种耐药机制; *g_no_rank_f_Desulfocapsaceae* 与6种 ARGs 呈显著或极显著正相关($P<0.05$ 或 $P<0.01$),涉及2种抗生素抗性类型和2种耐药机制; *g_no_rank_f_unclassified* 与4种 ARGs 呈显著正

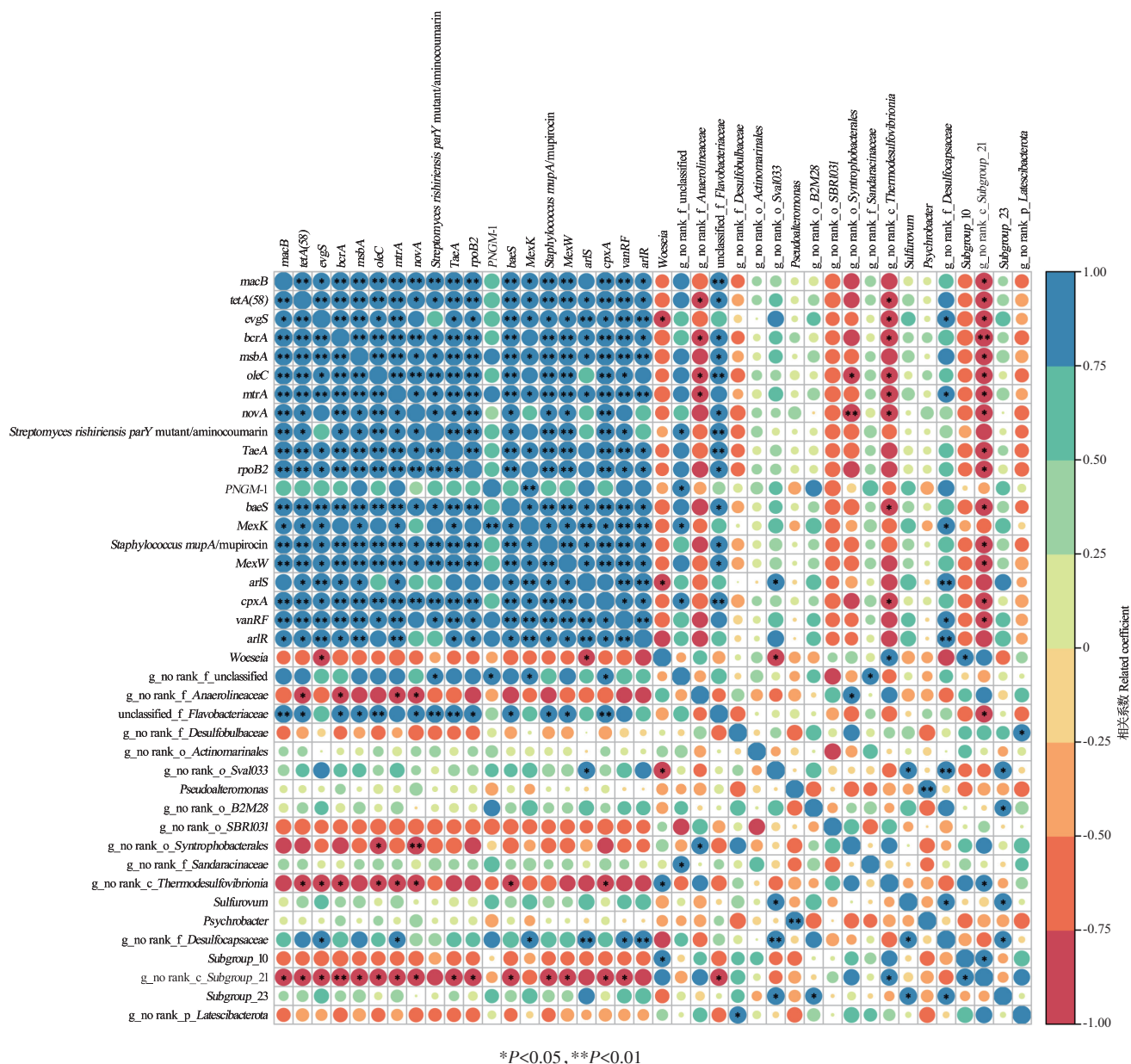


图8 ARGs与微生物菌属相关性分析

Figure 8 Correlation analysis between ARGs and microbial genus

相关($P<0.05$),涉及3种抗生素抗性类型和3种耐药机制;*g_no rank_f_Anaerolineaceae*与4种ARGs呈显著负相关($P<0.05$),涉及4种抗生素抗性类型和1种耐药机制;*g_no rank_o_Syntrophobacterales*与2种ARGs呈显著或极显著负相关($P<0.05$ 或 $P<0.01$),涉及2种抗生素抗性类型和1种耐药机制;*Woeseia*与2种ARGs呈显著负相关($P<0.05$),涉及1种抗生素抗性类型和1种耐药机制。从ARGs与微生物群落之间的关系来看,丰度前20的ARGs均与丰度前20的菌属有不同程度的显著相关性,其中,*macB*、*tetA* (58)、*evgS*、*bcrA*、*msbA*、*oleC*、*mtrA*、*novA*、*TaeA*、*rpoB2*、*PNGM-1*、*baeS*、*Staphylococcus mupA*/mupirocin、*MexW*、*vanRF*和*arlR*分别与1种菌属呈显著或极显著正相关($P<0.05$ 或 $P<0.01$),分别与1、3、3、3、1、3、3、4、1、1、0、2、1、1、1种和0种菌属呈显著或极显著负相关($P<0.05$ 或 $P<0.01$);*Streptimyoies rishiriensis parY* mutant/aminocoumarin、*MexK*、*arlS*和*cpxA*与2种菌属呈显著或极显著正相关($P<0.05$ 或 $P<0.01$),与0、0、1种和2种菌属呈显著或极显著负相关($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

3 讨论

本研究利用宏基因组高通量测序技术首次对大黄鱼养殖海域沉积物中ARGs赋存特征进行了分析。宏基因组高通量测序方法可以使检出的ARGs更加全面^[9,15]。从测序分析结果可知,本研究在6个大黄鱼养殖海域沉积物中共检测出781个ARGs亚型,其中有许多未曾在大黄鱼养殖环境中报道,如*fusH*、*QnrS7*等。从ARGs注释结果来看,大黄鱼养殖海域沉积物中ARGs最主要的抗生素抗性类型为四环素类、大环内酯类和氟喹诺酮类,而在多数以PCR检测方法研究抗性基因的报道中,磺胺类抗性基因被认为是我国海水养殖场中常见的抗性基因,其丰度占环境总ARGs的比例较高^[5,16-17],存在这种差异的原因可能与PCR检测目标ARGs种类的局限性造成ARGs统计结果产生差异有关。在本研究中,大黄鱼养殖海域沉积物中优势ARGs的种类与已报道的珠江三角洲^[18]、海南东寨港^[19]、东海近海(杭州湾、象山湾和台州湾)^[20]等沉积物中的ARGs赋存特征存在明显的差异。ARGs的产生和环境残留机制较为复杂,如抗生素是ARGs发生和传播的主要应激源,但抗生素与其相应的ARGs也并非总是同时出现,使用单一类型的抗生素也可能出现复杂的ARGs污染^[21-22]。近年来的研究表明,水产养殖环境ARGs与养殖动物肠道菌群特

征、环境因子、养殖药物和饲料以及养殖模式等诸多因素均有密切联系^[23-25]。目前,有关大黄鱼养殖环境中ARGs污染情况的研究尚处在初期阶段,ARGs污染特征的时空分布特征以及影响因子还有待进一步深入研究。同时在本研究中,大黄鱼养殖海域沉积物中优势ARGs的丰度为 $76.75\times 10^{-6}\sim 436.85\times 10^{-6}$,这比相同算法的对虾养殖沉积物的丰度大得多^[26]。明确ARGs耐药机制对防止或延缓耐药性的产生具有重要意义^[27]。本研究结果显示大黄鱼养殖海域沉积物中ARGs主要的耐药机制为外排泵,这与杭州湾、我国沿海水域沉积物样品中ARGs的主要耐药机制一致^[28-29]。研究表明,抑制外排系统中外排泵蛋白的表达量可以降低细菌对药物的外排作用,减缓耐药性的产生^[30]。

环境因素可能会驱动和增强ARGs在环境中的传播^[31]。本研究测定了所取大黄鱼养殖海域沉积物样品中的5种环境因子,探究了其分布规律,并解析了这5种环境因子与ARGs之间的关系。结果发现,大黄鱼养殖海域沉积物中的TOC、TN和TP的含量较高,存在污染情况。TOC、TN和TP代表养殖环境中的污染状况^[11],侧面反映出渔业养殖是近海环境质量恶化的主要原因之一。对所检环境因子与ARGs进行相关性分析,发现除*PNGM-1*与电导率和TN呈显著正相关($P<0.05$)外,其余ARGs均与环境因子之间相关性不显著($P>0.05$),这一结果与陈嘉瑜^[20]的研究结果相似,但与Guo等^[31]的研究结果存在差异。水产养殖环境的理化因子复杂多变,除所检的5种环境因子外,还包括温度、化学耗氧量、溶解氧、营养物质和重金属等多种环境因子,且这些因子与气候条件、饲料组分、投饵量和吸收率等都有较密切的关系^[11]。考虑到环境因子的复杂性,在自然条件下确定哪种因素决定了ARGs的赋存特征很难,未来需要扩大环境因子的检测种类,增加样品数量,构建综合模型来更好地研究ARGs在环境介质中的行为。

ARGs与细菌群落之间存在着连锁效应、协同选择和进化的关系^[32-33]。本文利用16S rRNA基因高通量测序技术对不同位置的大黄鱼养殖海域沉积物的细菌群落结构进行分析,结果显示不同采样点的微生物组成结构存在明显差异,其中OS2、OS3和OS4样品中的微生物种类要显著高于OS1、OS5和OS6($P<0.05$)。进一步将6个位点的大黄鱼养殖海域的水深(表1)与沉积物细菌群落Alpha多样性指数(表3)进行相关性分析,结果显示物种总数指数(OTUs、ACE

指数和 Chao 指数)均与水深呈极显著或显著负相关($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),说明海水深度越深,微生物种类越少^[34]。尽管不同采样位置大黄鱼养殖海域沉积物中的菌群结构和优势菌群存在显著差异($P < 0.05$),但是不同海域沉积物中的 ARGs 基因类型基本一致。这个结果表明即使在不同地理位置上,同一养殖品种和同一养殖模式的海水养殖沉积物中 ARGs 的赋存状况也较相似,这也从侧面反映出海水养殖沉积物 ARGs 的主要来源为水产养殖。这个结果与 Hedberg 等^[8]的研究结果一致。

ARGs 在不同种类的细菌群落之间迁移、转化和传播,使其在环境中持续残留,这比抗生素自身的残留对生态环境的危害更大^[35]。因此,对大黄鱼养殖海域沉积物中 ARGs 和微生物群落之间进行相关性分析至关重要。本研究的结果显示,丰度前 20 的微生物菌属中有 3 种菌属与 ARGs 呈显著正相关($P < 0.05$),5 种菌属与 ARGs 呈显著负相关($P < 0.05$)。徐秋鸿等^[36]认为当微生物与目的 ARGs 呈显著正相关时,这些微生物可能是 ARGs 的潜在宿主;当微生物与目的 ARGs 呈显著负相关时,这些微生物可能会影响 ARGs 的水平转移。在本研究中,尽管有些菌属在沉积物样品中的相对丰度较低,但其却与多种 ARGs 存在显著相关性,说明在研究微生物与 ARGs 的关系时,应尽可能扩大研究范围。此外,部分菌属与多种抗生素抗性类型 ARGs 显著相关涉及多种耐药机制,而有些菌属仅与 1 种抗生素抗性类型 ARGs 显著相关,表明部分微生物可能是多种 ARGs 的共同潜在宿主,这种存在也可能对 ARGs 的分布特征和水平转移产生影响,导致细菌产生多重耐药性^[37]。而少数 ARGs 与 2 种菌属之间呈显著或极显著正相关($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),显示这些 ARGs 可能有多个潜在的微生物宿主^[38]。不同微生物携带 ARGs 的偏好不同^[36],后续研究也应积极探索 ARGs 对养殖环境微生物之间转移的机理,为通过控制相关菌属丰度来消减 ARGs 提供理论基础。

4 结论

(1)利用宏基因组高通量测序方法能够获得更加全面的 ARGs 信息。在大黄鱼养殖海域沉积物中,共检测出 38 种抗生素抗性类型,781 个 ARGs 亚型,丰度最高的 ARG 为 *macB* ($254.31 \times 10^{-6} \sim 436.85 \times 10^{-6}$),其次为 *tetA* (58) ($131.64 \times 10^{-6} \sim 241.69 \times 10^{-6}$)、*evgS* ($87.00 \times 10^{-6} \sim 193.42 \times 10^{-6}$) 和 *bcrA* ($76.75 \times 10^{-6} \sim 128.89 \times 10^{-6}$),

不同站点沉积物中的优势 ARGs 种类基本一致,主要的 ARGs 抗生素抗性类型为四环素类、大环内酯类和氟喹诺酮类,主要的 ARGs 耐药机制为外排泵。

(2)对大黄鱼养殖海域沉积物中的 pH、电导率、TOC、TN 和 TP 进行检测,结果显示大黄鱼养殖海域沉积物已受到污染;相关性分析结果显示,除 *PNGM-1* 与电导率和 TN 呈显著正相关($P < 0.05$)外,其余 ARGs 均与环境因子之间相关性不显著($P > 0.05$)。

(3)Proteobacteria 是各大黄鱼养殖海域沉积物样品中丰度最高的细菌门,但各站点沉积物中的微生物组成结构存在明显差异,且微生物群落结构对环境 ARGs 的产生和分布具有显著影响,丰度前 20 的微生物菌属中有 8 种与 ARGs 呈显著或极显著相关($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),丰度前 20 的 ARGs 均与丰度前 20 的菌属呈显著或极显著相关($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

参考文献:

- [1] MENG W. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river[J]. *Chemosphere*, 2015, 119(1):379-385.
- [2] ABRIQUEL H, OMAR N B, MOLONOS A C, et al. Comparative analysis of genetic diversity and incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococcal opulations from raw fruit and vegetable foods, water and soil, and clinical samples[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 123(1/2):38-49.
- [3] PRUDEN A, PEI R, STORTEBOOM H, et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in northern Colorado[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(23):7445-7450.
- [4] World Health Organization. Antibiotic resistance[EB/OL].[2020-07-31]. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>.
- [5] MUZIASARI W I, PARNANEN K, JOHNSON T A, et al. Aquaculture changes the profile of antibiotic resistance and mobile genetic element associated genes in Baltic Sea sediments[J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2016, 92(4):fiw052.
- [6] CHEN C Q, ZHENG L, ZHOU L, et al. Persistence and risk of antibiotic residues and antibiotic resistance genes in major mariculture sites in southeast China[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 580:1175-1184.
- [7] MIRANDA C D, TELLO A, KEEN P L. Mechanisms of antimicrobial resistance in finfish aquaculture environments[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013, 4:233.
- [8] HEDBERG N, STENSON I, PETTERSSON M N, et al. Antibiotic use in Vietnamese fish and lobster sea cage farms: Implications for coral reefs and human health[J]. *Aquaculture*, 2018, 495:366-375.
- [9] 赵帝, 徐在言, 吴山功, 等. 草鱼肠道微生物抗生素抗性基因研究[J]. *水生生态学杂志*, 2019, 40(6):111-116. ZHAO D, XU Z Y, WU S G, et al. Antibiotic resistance genes in the intestinal microorganisms

- of grass carp[J]. *Journal of Hydroecology*, 2019, 40(6):111-116.
- [10] YANG J, WANG C, WU J Y, et al. Characterization of a multiresistant mosaic plasmid from a fish farm sediment *Exiguobacterium* sp. isolate reveals aggregation of functional clinic-associated antibiotic resistance genes[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2014, 80(4):1482-1488.
- [11] 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. LI S S, GAO H, ZHAO F Q, 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.
- [12] YUAN K, WANG X, CHEN X, et al. Occurrence of antibiotic resistance genes in extracellular and intracellular DNA from sediments collected from two types of aquaculture farms[J]. *Chemosphere*, 2019, 234:520-527.
- [13] 王凡, 廖碧钗, 孙敏秋, 等. 福建大黄鱼产业发展形势分析[J]. 中国水产, 2019(3):45-49. WANG F, LIAO B C, SUN M Q, et al. Analysis on the development situation of large yellow croaker industry in Fujian[J]. *China Fisheries*, 2019(3):45-49.
- [14] 张骞月, 赵婉婉, 吴伟. 水产养殖环境中抗生素抗性基因污染及其研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2015, 17(6):125-134. ZHANG Q Y, ZHAO W W, WU W. Antibiotics resistance gene pollution and its research progress achieved in aquaculture environment[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2015, 17(6):125-134.
- [15] 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.
- [16] SU H C, LIU S, HU X J, et al. Occurrence and temporal variation of antibiotic resistance genes (ARGs) in shrimp aquaculture: ARGs dissemination from farming source to reared organisms[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 607/608:357-366.
- [17] GAO P P, MAO D Q, LUO Y, et al. Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment[J]. *Water Research*, 2012, 46(7):2355-2364.
- [18] 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.
- [19] 姜春霞, 黎平, 李森楠, 等. 海南东寨港海水和沉积物中抗生素抗性基因污染特征研究[J]. 生态环境学报, 2019, 28(1):128-135. JIANG C X, LI P, LI S N, et al. Pollution characterization of antibiotic resistance gene in seawater and sediment of Dongzhai Harbor, Hainan Province[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2019, 28(1):128-135.
- [20] 陈嘉瑜. 中国东海近海沉积物中抗生素抗性基因的分布及其传播扩散研究[D]. 上海:上海师范大学, 2022:51-62. CHEN J Y. Distribution and propagation of antibiotic resistance genes in the coastal sediment of the East China Sea[D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2022:51-62.
- [21] ZHANG Q Q, TIAN G M, JIN R C. The occurrence, maintenance, and proliferation of antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment: Influencing factors, mechanisms, and elimination strategies[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(19):8261-8274.
- [22] WANG J H, LU J, WU J, et al. Proliferation of antibiotic resistance genes in coastal recirculating mariculture system[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 248:462-470.
- [23] 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 Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 2020, 55(3):220-229.
- [24] XU K, WANG J, GONG H, et al. Occurrence of antibiotics and their associations with antibiotic resistance genes and bacterial communities in Guangdong coastal areas[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 186:10979.
- [25] GU J, ZHANG L, WANG X, et al. High-throughput analysis of the effects of different fish culture methods on antibiotic resistance gene abundances in a lake[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26(6):5445-5453.
- [26] ZHAO Y, ZHANG X X, ZHAO Z, et al. Metagenomic analysis revealed the prevalence of antibiotic resistance genes in the gut and living environment of freshwater shrimp[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 350:10-18.
- [27] 张泽辉, 宋雪娇, 黄程程, 等. 细菌的获得性耐药机制研究进展[J]. 动物医学进展, 2017, 38(1):74-77. ZHANG Z H, SONG X J, HUANG C C, et al. Progress on antimicrobial resistance mediated by changes of target protein in bacteria[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2017, 38(1):74-77.
- [28] YUAN J L, NI M, LIU M, et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a typical estuary aquaculture region of Hangzhou Bay, China[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2019, 138:376-384.
- [29] LU J, ZHANG Y X, WU J. Continental-scale spatio-temporal distribution of antibiotic resistance genes in coastal waters along coastline of China[J]. *Chemosphere*, 2020, 247:125908.
- [30] YAMASAKI S, NIKAIIDO E, NAKASHIMA R, et al. The crystal structure of multidrug-resistance regulator RamR with multiple drugs[J]. *Nature Communications*, 2013, 4:2078.
- [31] GUO X P, YANG Y, LU D P, et al. Biofilms as a sink for antibiotic resistance genes (ARGs) in the Yangtze Estuary[J]. *Water Research*, 2018, 129:277-286.
- [32] 黄薇, 刘兰英, 刘洋, 等. 鳊鱼养殖废弃物抗性基因赋存特征及其与抗生素和微生物群落的相关性[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(5):1275-1281. HUANG W, LIU L Y, LIU Y, et al. The occurrence of antibiotic resistance genes in eel culture waste and its correlation with antibiotics and the microbial community[J]. *China Journal Applied Environmental Biology*, 2020, 26(5):1275-1281.
- [33] 罗晓, 张文丽, 袁立霞, 等. 纳污河流抗性基因和微生物群落相关性[J]. 中国环境科学, 2019, 39(6):2606-2613. LUO X, ZHANG W L, YUAN L X, et al. Correlation between resistance genes and microbial community in polluted rivers[J]. *China Environmental Science*, 2019, 39(6):2606-2613.
- [34] KHANDEPARKER R, MEENA R M, DEOBAGKAR D. Bacterial diversity in deep-sea sediments from Afanasy Nikitin seamount, equato-

- rial Indian Ocean[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2014, 31(10): 942–949.
- [35] 王秋水, 刘悦, 邓婕, 等. 动物性水产品及其养殖环境中抗生素抗性基因的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(5): 1453–1461. WANG Q S, LIU Y, DENG J, et al. Research progress of antibiotic resistance genes in animal aquatic products and aquaculture environment[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2022, 13(5): 1453–1461.
- [36] 徐秋鸿, 刘曙光, 娄厦, 等. 长江口近岸地区抗生素抗性基因与微生物群落分布特征[J/OL]. 环境科学: 1–16[2022–06–10]. DOI: 10.13227/j.hjks.202203160. XU Q H, LIU S G, LOU X, et al. Distributions of antibiotic resistance genes and microbial communities in the nearshore area of the Yangtze River Estuary[J/OL]. *Environmental Science*: 1–16[2022–06–10]. DOI: 10.13227/j.hjks.202203160.
- [37] 王龙飞, 程逸群, 胡晓东, 等. 江苏省代表性水源地抗生素及抗性基因赋存现状[J]. 环境科学, 2021, 42(2): 749–760. WANG L F, CHENG Y Q, HU X D, et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in representative drinking water resources in Jiangsu Province[J]. *Environmental Science*, 2021, 42(2): 749–760.
- [38] 秦荣, 喻庆国, 刘振亚, 等. 人类活动影响下的高原湿地四环素类抗生素抗性基因赋存与微生物群落共现性[J/OL]. 环境科学: 1–16[2022–06–10]. DOI: 10.13227/j.hjks.202203109. QIN R, YU Q G, LIU Z Y, et al. Co-occurrence of tetracycline antibiotic resistance genes and microbial communities in plateau wetlands under the influence of human activities[J/OL]. *Environmental Science*: 1–16[2022–06–10]. DOI: 10.13227/j.hjks.202203109.

(责任编辑: 李丹)