

DOI: 10.12264/JFSC2024-0141

秦皇岛昌黎海域微生物群落与抗生素耐药基因季节性分布特征

王秋水¹, 邓婕¹, 王胜楠¹, 程波³, 刘悦¹, 袁寒玉⁴, 王伟², 高丽娟¹

- 北京市科学技术研究院分析测试研究所(北京市理化分析测试中心), 北京 100089;
- 国家卫生健康委员会食品安全风险评估重点实验室, 北京 100022;
- 中国水产科学研究院, 农业农村部水产品质量安全控制重点实验室, 北京 100141;
- 北京市计算中心, 北京 100094

摘要: 为深入了解秦皇岛昌黎海域微生物群落结构与抗性基因季节性赋存特征, 采用宏基因组测序技术对昌黎海域的海水、底泥和矛尾复虾虎鱼(*Synchogobius hasta*)肠道内容物进行分析。结果显示, 昌黎海域样本微生物组成主要是细菌类, 最优势的细菌门是变形菌门(Proteobacteria), 最优势的细菌属是发光杆菌属(*Photobacterium*)。海水中的主要抗生素耐药基因(antibiotic resistance genes, ARGs)类型是 *APH2_IIa*、*vanXYG*、*OXA_325* 和 *TriC*, 底泥中的最主要抗生素耐药基因类型是 *bcrB*、*vanHO*、*adeS* 和 *EreA* 等, 矛尾复虾虎鱼肠道内容物中抗生素耐药基因主要是 *msrE*、*emrK* 和 *QnrB4* 等。网络分析揭示了该海域的属水平的微生物类群与抗生素耐药基因高度相关, 并且主要类群的属都是多重耐药菌株, 抗生素的外排泵是该微生物群落主要的抗生素耐药机制。本研究发现昌黎扇贝养殖区具有丰富的抗生素耐药菌和抗生素耐药基因, 且与水产养殖生产中常用抗生素类别较为吻合, 提示后续应加强对该养殖海域中抗生素耐药菌和抗生素耐药基因的持续监控。

关键词: 昌黎县; 海域; 微生物群落; 抗生素耐药基因; 季节性分布特征

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2024)11-1399-12

海洋约占地球表面的 70%, 是世界上最大且最复杂的生态系统。海洋中的微生物不仅在食物链能量流动中发挥着重要作用, 在海洋生态系统的生物地球化学循环、污染环境的生物修复、全球气候变化中也扮演着重要的角色^[1-2]。然而, 近海海域作为人类活动的主要区域之一, 因水产养殖业、畜牧业、临床医疗和工业生产活动等大量抗生素的使用, 导致海洋环境恶化、抗生素等诸多药物残留、微生物耐药以及微生态平衡失调, 影响海洋生态系统的作用与功能^[3]。

近年来, 随着海水养殖业的快速发展, 养殖密度不断增加, 水产病害已成为制约我国海水

养殖业可持续发展的主要问题。当前, 使用化学药物是我国水产养殖病害防控的主要方式, 而抗菌药物的不合理使用, 不仅容易导致养殖动物药物残留超标影响水产品消费安全, 且容易引起一系列生态环境问题^[4]。研究表明, 环境中大量的抗生素残留会诱导和加速抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)的产生、传播以及耐药细菌(antibiotic resistant bacteria, ARB)的形成^[5-7]。2006 年, Pruden 等^[8]提出将 ARGs 作为一种新型环境污染物, 自此环境中 ARGs 的潜在风险便越来越引起人们的关注。相关研究表明, ARGs 已广泛存在于畜禽养殖、湖泊河流等不同

收稿日期: 2024-06-04; 修订日期: 2024-08-23.

基金项目: 国家卫生健康委食品安全风险评估重点实验室开放课题资助课题项目(2024-15); 世界自然基金会蔚蓝星球基金三期项目(PORO001427).

作者简介: 王秋水(1991-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向为微生物多样性分析及抗生素抗性基因赋存表征.

E-mail: wangqius9182901@hotmail.com

通信作者: 程波, 研究员, 研究方向为水产品质量安全与渔用化学品风险评估. E-mail: chengb@cafs.ac.cn

的生态环境中^[9-11]。对于海水养殖环境,已有研究表明,海水养殖区的各类 ARGs 的丰度要显著高于非养殖水体^[12-13]。

河北省秦皇岛市昌黎县是河北省沿海渔业经济大县,在地方农业经济中发挥着重要作用。本课题组前期对该海域的部分观测位点进行了一系列春季样本的采集分析工作,发现该海域的近海区由于受人类活动的影响,微生物多样性与远海区域相比较已经发生了很大变化,并且即使是在远海区域,也发现了大量 ARGs 的存在^[14]。鉴于此,本研究在已有工作的基础上,针对该海域扇贝筏式养殖核心站位,借助宏基因组分析技术,连续开展 4 个不同季节海水、底泥和矛尾复虾虎鱼肠道内容物中的微生物群落结构进行表征,同时阐释 ARGs 的赋存特征及潜在传播规律,以期解析昌黎县扇贝筏式养殖海域中 ARGs 的季节性污染特征及防控海水养殖中 ARGs 的产生提供科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本研究样品采自国家渔业资源环境秦皇岛观测实验站长期性、基础性监测站 S3 号站位(39°31'37.20"N, 119°32'16.44"E)^[14]。于 2022 年 3、6、9 和 11 月分别进行 4 批次海水、底泥和矛尾复虾虎鱼(*Synechogobius hasta*)样品的采集,每批次采集海水和底泥样本各 3 份,捕捞并随机采集矛尾复虾虎鱼 12 尾。参照前期研究方法,海水样本利用 Niskin 采水器采集水下 1 m 表层水体,每份 10 L,置于无菌聚乙烯塑料桶中,底泥样本采用不锈钢抓斗式采泥器(德国 HYDRO-BIOS 公司: Van Veen 采泥器)采集表层沉积物,并选择中心淤泥作为实验样本,置于无菌采样袋中,海水和底泥样品 4 °C 冷藏保存。对于矛尾复虾虎鱼,每次取其肠道内容物于 15 mL 无菌离心管中混合均匀,平均分成 3 等分,置于干冰上保存。所有样本采集后当天运回实验室立即进行前处理,其中,海水各样本取 500 mL,经 0.22 μm 孔径无菌滤膜(Whatman)过滤后,收集滤膜于 50 mL 无菌离心

管中;底泥样本称取 20 g 左右置于 15 mL 无菌离心管中。运回实验室后,所有样本置于-80 °C 冰箱保存待测。4 个月份的海水样本分别命名为: BDHW3、BDHSW3、BDHTW3 和 BDHFW3;底泥样本分别命名为: BDHS3、BDHSS3、BDHTS3 和 BDHFS3;矛尾复虾虎鱼肠道内容物样本分别命名为: BDHXHY、BDHSXHY、BDHTXHY 和 BDHFXHY。

1.2 样品 DNA 提取

根据 FastDNA[®] Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, CA, USA)试剂盒产品操作手册要求,提取样品基因组 DNA。核酸提取后,使用 1%琼脂糖凝胶评估提取 DNA 的质量,使用 NanoPhotometer[®]分光光度计(IMPLEN, CA, USA)检测 DNA 纯度(OD₂₆₀/OD₂₈₀ 和 OD₂₆₀/OD₂₃₀)。DNA 浓度的测定使用 Qubit[®] 2.0 荧光计(Life Technologies, CA, USA)中的 QubitA[®] dsDNA 检测试剂盒进行。最终,全部基因组 DNA 样品用干冰保藏送往北京诺禾致源科技股份有限公司进行测序分析。

1.3 宏基因组数据分析

本研究利用 Illumina NovaSeq 平台对所有样本进行了测序。首先,原始测序数据通过 Readfq 软件(V8)进行质量控制,从而得到高质量的有效数据集(clean data)。随后, clean data 用 MEGAHIT^[15] 软件(V1.0.4-beta)进行组装,并从组装得到的 Scaffolds 中移除了含有 N 的区域,生成了不包含 N 的 Scaffigs。为了预测开放阅读框(ORFs),使用 MetaGeneMark 软件(V2.10)对长度在 500 bp 及以上的 Scaffigs 进行分析,并在预测结果中排除了长度在 100 nt 以下的序列。随后,预测 ORFs 通过 CD-HIT^[16] 软件(V4.5.8)去冗余,建立初始基因目录。为了量化基因表达水平,利用 Bowtie2 软件(V2.2.4)将每个样本的 Clean Data 与初始基因目录进行比对,计算出每个样本中每个基因比对得到的 reads 数量。本研究在随后的分析中,对每个样本中的 reads 个数小于 2 的基因进行了过滤去除,从而得出用于最终分析的基因 Unigenes。

随后,本研究利用 DIAMOND 软件将 Unigenes 与 NCBI 的 NR 数据库中的细菌、真菌等序列进

行了对比分析^[17], 设置了 Blastp 参数, 并将 e-value 阈值设置为 1×10^{-5} 。根据比较正确的结果, 本研究使用 LCA 算法来确定物种注释信息。结合 LCA 注释结果和基因丰度数据, 本研究提取了不同分类级别上的物种丰度信息及基因数量表。使用 R 语言(V4.2.2)对基因丰度数据进行统计分析, 利用 vegan 程序包计算 Shannon 指数、Simpson 指数和 chao1 等多样性指标, 以评估微生物群落的 alpha 多样性。同时, 使用 amplicon 程序包绘制这些多样性指标的箱线图, 并使用 ggplot2 程序包为总丰富度排名前 10 位的物种绘制门水平微生物群落组成柱状图。在抗性基因分析方面, 本研究使用了 CARD 数据库提供的 RGI 软件将 Unigenes 与 CARD 数据库进行了比对, 并结合 Unigenes 的丰度信息进行了抗性基因注释。通过 LefSe 分析, 本研究选出了显著性差异(LDA>3.5)的抗性基因, 并使用 R 语言 pheatmap 程序包绘制了 ARGs 在各样本中的分布热图。此外, 还采用了 Cytoscape 软件进行了网络共存分析, 以探讨抗性基因(ARGs)与微生物群落之间的内在联系。原始数据已经上传到国家生物信息中心-国家基因组科学数据中心(China National Center for Bioinformation, CNCB-NGDC)的组学原始数据归档库(GSA), GSA 编号分别为 CRA012975, CRA012980, CRA012982。

2 结果与分析

2.1 不同季节微生物群落结构分析

在秦皇岛昌黎海域 4 个季节的海水、底泥和矛尾复虾虎鱼肠道内容物样本中共检测出 157 个门, 2708 个属。分类结果显示, 细菌(bacteria)是该片海域样本中主要的微生物类群, 占比约 92.8%; 其次是古菌(archaea), 约占 5.7%; 真菌(fungi)占比仅有约 1.5%。由图 1 可知, 不同季节的各类样本之间在微生物多样性和物种组成上也存在一定的差异, 季节的变化一方面使得微生物的 alpha 多样性产生了显著差异, 另外也使得微生物组成上发生了变化。丰度在前 10 的优势菌门是变形菌门(Proteobacteria)、螺旋体门(Spirochaetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、蓝藻门(Cyanobacteria)、奇古菌门(Thaumarchaeota)、子

囊菌门(Ascomycota)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、广古菌门(Euryarchaeota)和放线菌门(Actinobacteria)。

海水样本中的优势菌门主要是变形菌门、拟杆菌门、蓝藻门、广古菌门和放线菌门, 这 5 个门类的总丰度在所有海水样本中高达 37%~66%, 且 4 个不同季节的海水样本组之间的微生物多样性存在差异。其中, 夏季海水样本(BDHSW3)与秋季海水样本(BDHTW3)的香农指数(Shannon index)存在显著差异(图 1a), 表明夏季和秋季海水中微生物的物种数目和均匀度均存在较大差异, 这种差异有可能与海水的温度、盐度等理化指标密切相关。此外, 在 11 月(冬季)的海水样本(BDHF3)中还发现了丰度明显增高的奇古菌门(图 1b)。底泥样本中的主要优势菌门是变形菌门、拟杆菌门、蓝藻门、奇古菌门、硝化螺旋菌门和放线菌门 6 个门类, 其总丰度在所有底泥样本中达 62%~74%。其中, 春、夏和秋季底泥样本中微生物多样性均存在显著差异, 冬季样本与秋季样本的多样性差异不大(图 1c)。该海域的土著鱼矛尾复虾虎鱼肠道内容物样本中的主要优势菌门是变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门、蓝藻门和放线菌门 5 个门类, 总丰度占有肠道内容物样本中的 16%~63%。

在属分类水平上, 发光杆菌属(*Photobacterium*)、偏在远洋杆菌属(*Candidatus Pelagibacter*)、伍斯氏菌属(*Woesseia*)和聚球藻属(*Synechococcus*)是所有样品中总丰度排名最高的 4 个菌属(图 2)。其中, 在秋季矛尾复虾虎鱼肠道内容物样本(BDHTXHY)中, 发光杆菌属的丰度占据了绝对优势。其属于弧菌科, 该菌属中的很多种类都被证明对海洋生物有致病性^[18]。除此以外, 在夏季(BDHSXHY)和冬季(BDHF3)的矛尾复虾虎鱼肠道内容物样本中还发现有一定丰度的阿菲波菌属(*Afipia*)、嗜冷菌属(*Psychrobacter*)和肠球菌属(*Enterococcus*), 在冬季样本中这 3 个菌属的丰度相对更高一些。

2.2 不同季节 ARGs 及耐药机制

在本研究采集到的样本中, 通过宏基因组测序分析得到了大量的抗性基因, 进一步将各个样本间通过 LefSe 分析得到的所有差异 ARGs 构建

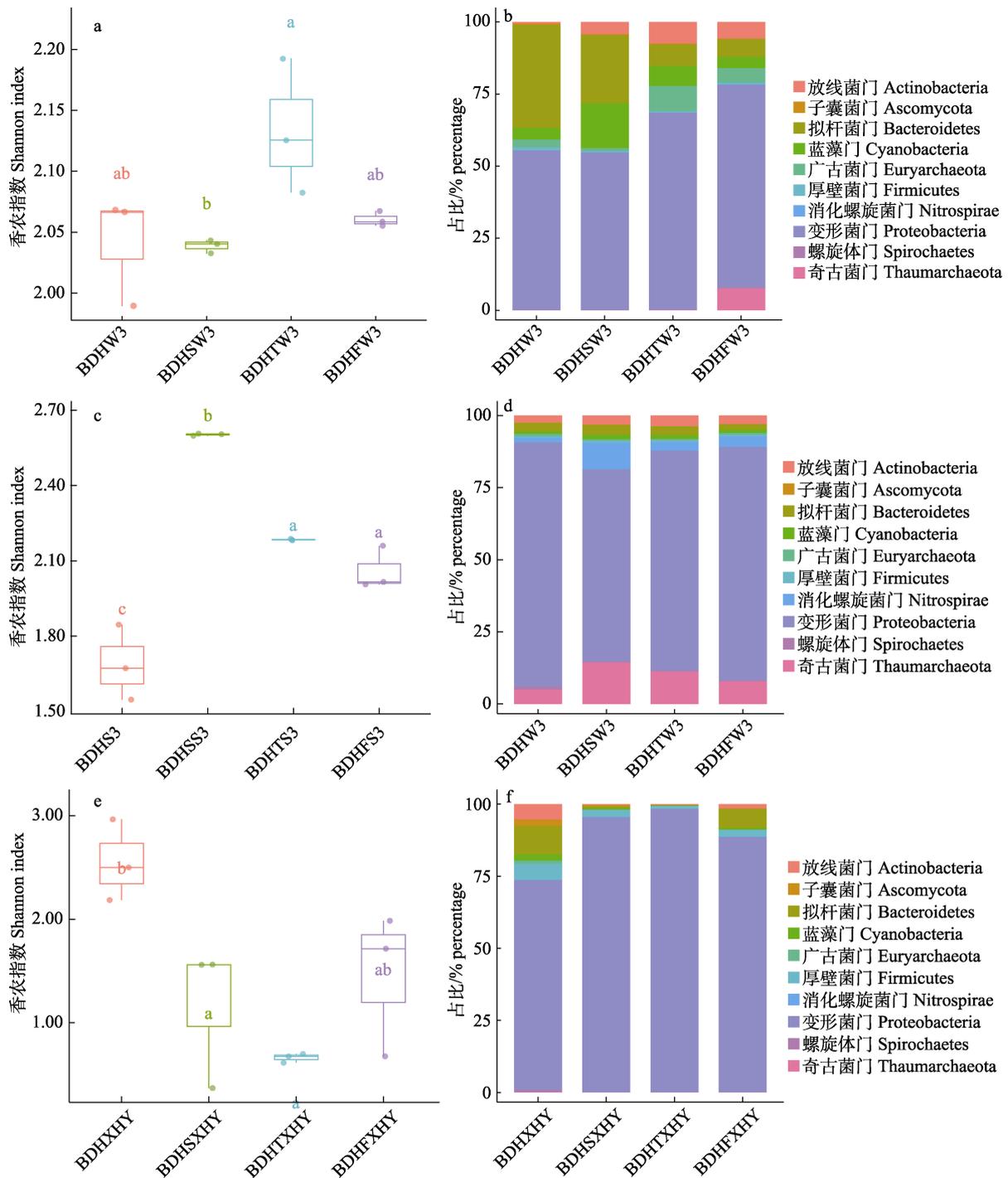


图 1 秦皇岛昌黎海域微生物 alpha 多样性及门水平微生物群落结构

箱线图上方不同小写字母表示组间差异显著($P < 0.05$)。其中, a, b 为海水样品分析结果; c, d 为底泥样品分析结果; e, f 为肠道内容物分析结果。4 个月份的海水样本分别命名为: BDHW3, BDHSW3, BDHTW3 和 BDHFW3; 底泥样本分别命名为: BDHS3, BDHSS3, BDHTS3 和 BDHFS3; 矛尾复虾虎鱼肠道内容物样本分别命名为: BDHXHY, BDHSXHY, BDHTXHY 和 BDHFXY。

Fig. 1 Alpha diversity and microbial composition in phylum level in the coastal waters of Changli County Qinhuangdao City. Different letters on the column indicate significant difference between groups ($P < 0.05$). a and b are the results of seawater; c and d are the results of sediment; e and f are the results of gut contents. Seawater samples collected in March, June, September and November in 2022 are named as BDHW3, BDHSW3, BDHTW3 and BDHFW3, respectively. Sediment samples in the four months are named as BDHS3, BDHSS3, BDHTS3 and BDHFS3, respectively; Gut content samples in the four months are named as BDHXHY, BDHSXHY, BDHTXHY and BDHFXY, respectively.

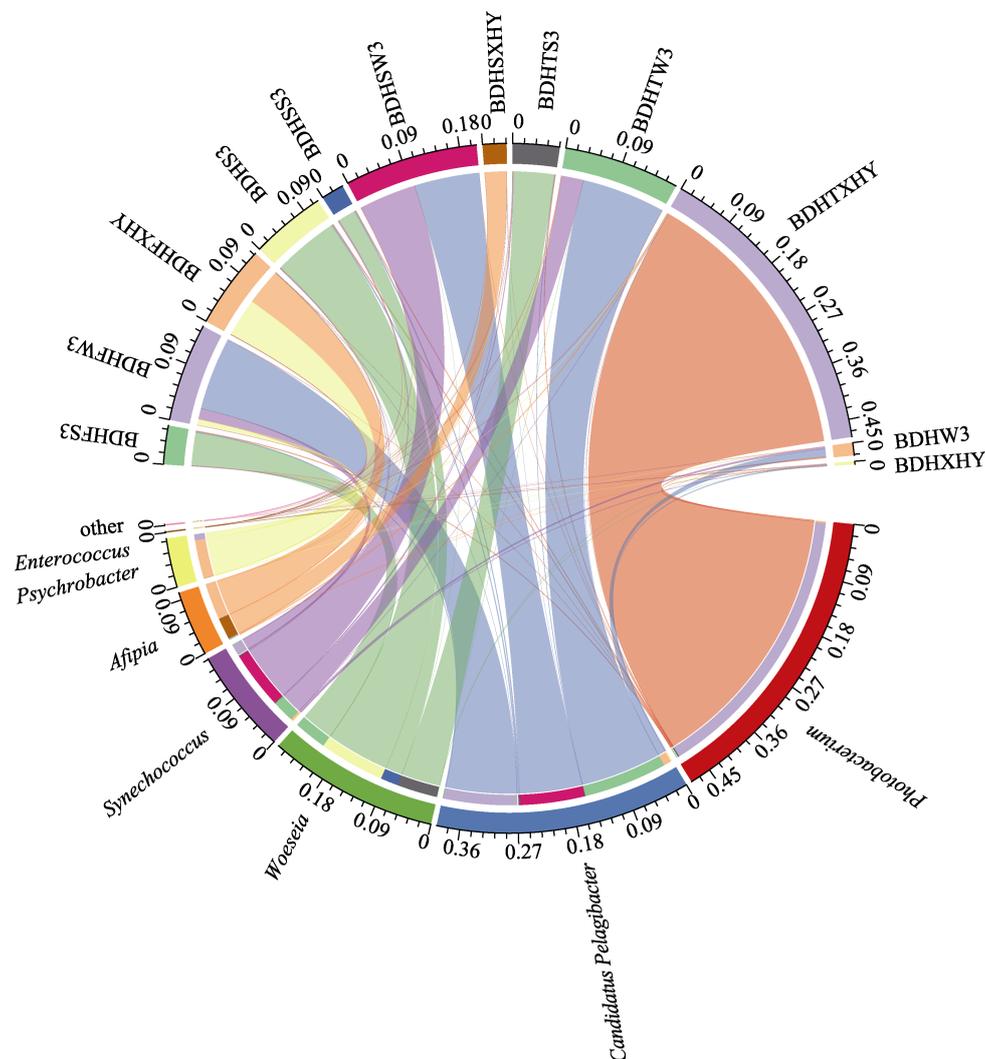


图 2 秦皇岛昌黎海域 4 个季节海水、底泥和矛尾复虾虎鱼肠道样品在属水平的微生物群落结构
4 个月份的海水样本分别命名为: BDHW3, BDHSW3, BDHTW3 和 BDHFW3; 底泥样本分别命名为: BDHS3, BDHSS3, BDHTS3 和 BDHFS3; 矛尾复虾虎鱼肠道内容物样本分别命名为: BDHXHY, BDHSXHY, BDHTXHY 和 BDHFXY。

Fig. 2 Taxonomic composition of microbial communities for seawater, sediment and *Synchogobius hasta* gut content samples at four different seasons at genus level in the coastal waters of Changli County, Qinhuangdao City
Seawater samples collected in March, June, September and November in 2022 are named as BDHW3, BDHSW3, BDHTW3 and BDHFW3, respectively. Sediment samples in the four months are named as BDHS3, BDHSS3, BDHTS3 and BDHFS3, respectively; Gut content samples in the four months are named as BDHXHY, BDHSXHY, BDHTXHY and BDHFXY, respectively.

如图 3 所示的热图。总体而言, 所有样本中丰度比较高的 ARGs 主要属于四环素类(*tet34*、*tetB48*、*adeF*、*tet44*、*tetX*、*tetV* 等)和酰胺类(*CARB_10*、*NmcR* 等)等几类常见类型的抗生素所对应的抗性基因, 其中所含 ARGs 种类最多的是四环素类的抗性基因, 推测与当地的海洋水产养殖业有一定的关系, 这也与之前报道的各类养殖海域中四环素类抗性基因比较高的结果相一致^[19]。

在春季的海水样本中, *APH2_Ila*、*vanXYG*、

OXA_325、*TriC* 等几种 ARGs 丰度比较高, 夏季海水样本中 ARGs 的聚类情况则与春季海水样本完全不同, 其中还有丰度非常高的 beta-内酰胺类抗生素的抗性基因 *NmcR*。与春季海水类似, 夏季海水样本中也含有万古霉素的一种 ARGs——*vanRN*, 万古霉素这种用来治疗所有抗生素均无效的严重感染的“最后一线药物”的抗性基因非常值得关注 and 重视。秋季海水样本中 ARGs 的种类相对于其他 3 个季节更多, 在热图中聚成了两类:

一类以丰度相对较高的 β -内酰胺类的抗性基因 *SHV_126*, 四环素类的抗性基因 *tet41* 和 *tet32* 等为主; 另一类则主要包含 *mdtQ*、*vanSC*、*adeN* 和 *CTX_M_75* 等抗性基因。冬季海水样本中则含有丰度比较高的 *msrA* 和 *aadA17* 等 ARGs, 与秋季海水样本中的 ARGs 种类有相似性。

底泥中丰度比较高的 ARGs 主要有 *bcrB*、*vanHO*、*adeS* 和 *EreA* 等。矛尾复虾虎鱼肠道内容物样本中有大量高丰度的 ARGs 在海水和底泥样本中没有检测到, 说明鱼类肠道微生物中本身也携带了一定丰度的 ARGs, 在遇到抗生素等外界选择压力的时候可以进一步进行扩散传播。同时, 海水中的一些 ARGs, 如 *mexQ*、*tcr3*、*tetB46* 等在矛尾复虾虎鱼肠道内容物样本中也被检测到, 而底泥中的 ARGs 种类很少与矛尾复虾虎鱼肠道内容物有重叠。

此外, 通过对本研究中的 ARGs 所对应的耐药机制种类进行分析, 发现这些耐药机制主要包含了靶点保护(target protection)、外排泵(efflux)、靶点改变(target alteration)和失活(inactivation) 4 种类型, 其中属于外排泵的占比最高。在细菌中, 许多 ABC 家族的转运蛋白都与抗生素的耐受相关^[20], 这一点在本研究中的所有样本分析结果中也有体现(图 4)。如图 4 所示, 在所有样本的耐药机制中外排泵(efflux)是所占比例最大的, 约占 44%; 其次是失活(inactivation)类, 约占 30%; 之后依次是靶点改变(target alteration)、靶点保护(target protection)和靶点替换(target replacement)。

2.3 ARGs 与微生物群落的关联分析

对昌黎海域 4 个季节的 ARGs 与微生物类群的共存模式进行网络分析(图 5), 结果显示有 88 类 ARGs 与昌黎海域中属水平的微生物分类群高度相关, 并且主要类群的属都属于多重耐药菌株。比较值得关注的是使抗生素失活的 ARGs (*TEM-79*、*catII*、*AAC6-IIc*、*OXA-128*、*EreA*、*blaR1*、*ADC-8*、*IMP-32*、*CMY-69*、*IMP-31*、*CTX-M-81* 和 *TEM-60*)、抗生素外排泵类的 ARGs (*emeA*、*tet30*、*smeE*、*arlS* 和 *CRP*)和使抗生素靶点发生改变的 ARGs (*Haemophilus_influenzae_PBP3*、*clbC*、*MCR-3*、*PmrC* 和 *pgpB*)。这 3 类 ARGs 中很多相关性非常

密切, 且存在相互促进的正相关关系。在以上这 22 种 ARGs 中, 对 β -内酰胺类抗生素表现出耐药性的就有 11 种(*TEM-79*、*OXA-128*、*blaR1*、*ADC-8*、*IMP-32*、*CMY-69*、*IMP-31*、*CTX-M-81*、*TEM-60*、*CRP* 和 *Haemophilus_influenzae_PBP3*), 其中 9 种属于使抗生素失活的机制类型, 并且这些 ARGs 彼此之间也都存在正相关的关系。

3 讨论

3.1 秦皇岛昌黎海域微生物群落季节性分布特征

在秦皇岛昌黎县海域 4 个季节的海水、底泥和矛尾复虾虎鱼肠道内容物样品的菌群组成结构中, 细菌域是主要的微生物类群, 并且最优势的菌门是变形菌门(Proteobacteria), 其次是螺旋体门(Spirochaetes)、厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)。除此以外, 还发现了奇古菌门(Thaumarchaeota)和广古菌门(Euryarchaeota)等古菌和子囊菌门(Ascomycota)等真菌的类群。其中, 变形菌门、拟杆菌门、蓝藻门和广古菌门是不同季节的海水样本中相对丰度差异比较大的 4 个门类。拟杆菌门的细菌能够降解多种有机污染物, 对反硝化作用具有重要的影响。春季和夏季海水样品中较高丰度的拟杆菌也提示这两个季节的海水中可能含有比较多的有机污染物。与海水样本中微生物组成不同的是, 在各个季节的底泥样本中, 均可以发现丰度较高的奇古菌门的存在。奇古菌门是全球海洋中重要的微生物类群, 是一类化能无机自养型微生物, 可通过氧化氨获得能量, 实现不依赖光照的无机碳固定, 在碳、氮等元素的地球化学循环中起关键作用^[21]。所以, 奇古菌门在含氧量比较低的底泥样本以及冬季海水样本竞争力较强, 更有利于发展成为优势菌门。整体来看, 在矛尾复虾虎鱼肠道内容物样本中微生物群落的季节性变化相对稳定, 而且主要类群集中在变形菌门, 提示海洋鱼类的肠道内容物中微生物群落相对单一, 受污染程度比较小。

从属水平来看, 发光杆菌属(*Photobacterium*)、偏在远洋杆菌属(*Pelagibacterium*)、伍斯氏菌属(*Woeseia*)和聚球藻属(*Synechococcus*)是丰度最高的 4 个菌属, 这些海洋微生物在全球的碳、氮、

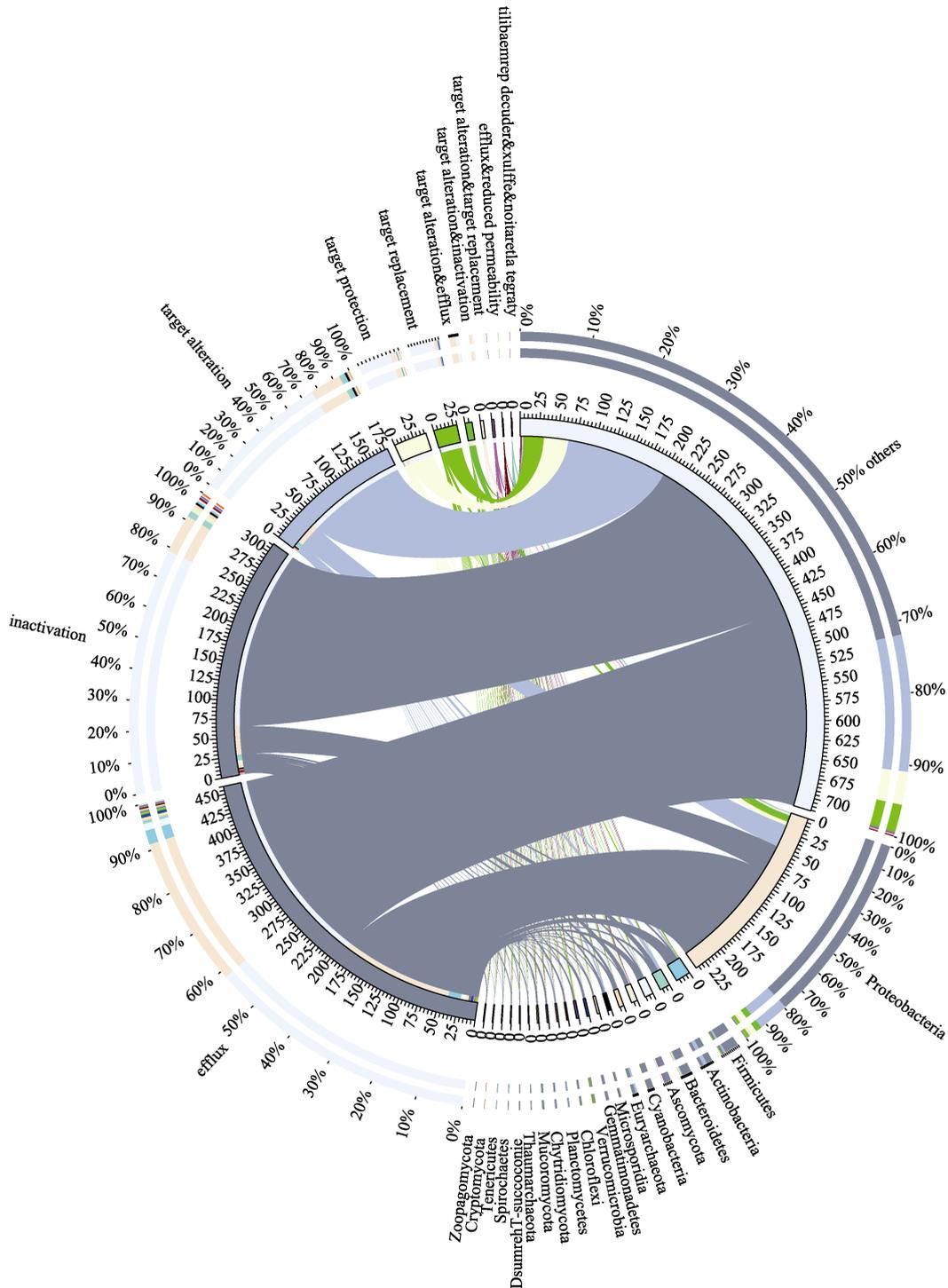


图 4 耐药机制与物种关系图

Fig. 4 Relations diagram of antibiotic resistance mechanism and taxonomy

硫元素循环中可能都发挥着重要作用。海水样本中的主要优势菌属是偏在远洋杆菌属和聚球藻属,其中聚球藻属是海洋中重要的光合自养生物,对海洋碳固定有重要的贡献^[22-23]。也正是由于这种光合自养特性,在阳光充足的夏季海水样本中聚

球菌属的丰度会明显升高,而在其余 3 个季节海水样本中的聚球藻属丰度则明显下降。在底泥样本中,伍斯氏菌属表现出了明显的优势,这是近些年被发现并培养的全球海洋微生物核心类群之一,已有研究结果表明该类群在全球分布极为广

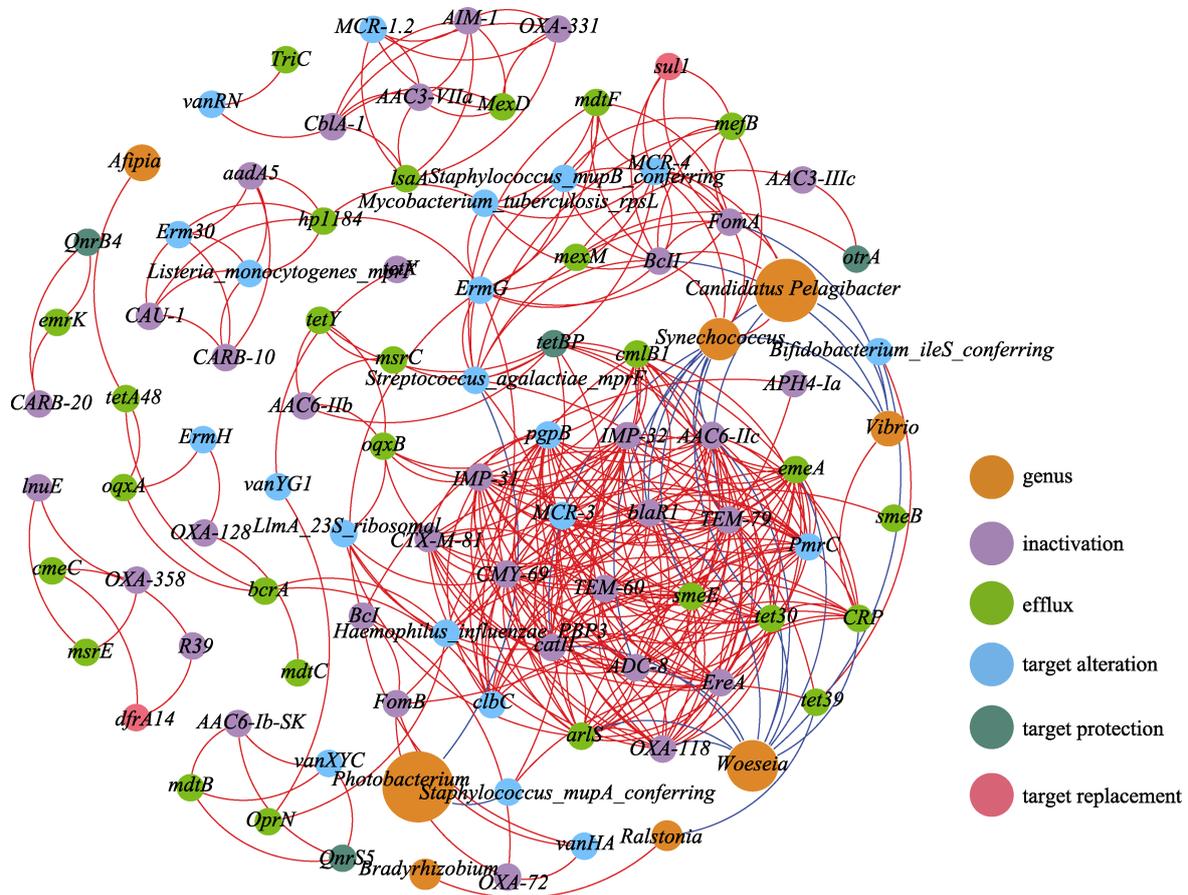


图 5 ARGs 与微生物类群的相关性网络分析

Fig. 5 Network analysis of the correlations between ARGs and microbial taxa

泛, 且相对丰度较高, 在全球的碳氮硫元素循环中可能发挥着重要作用^[24-25], 它们负责有机物的再矿化以及营养物质和能量向海洋中较高营养水平的转移^[26]。但到目前为止, 伍斯氏菌属中的可培养菌株依然是屈指可数, 是难培养海洋微生物代表之一。

3.2 秦皇岛昌黎海域 ARGs 的季节性赋存规律

本研究的各类样本组中 ARGs 的组成有明显的不同, 同类样本在不同季节的 ARGs 分布情况也呈现不同。整体来看, 海水样本中 ARGs 检出的种类和丰度都是比较高的, 而且 4 个季节的海水样本中的 ARGs 之间聚类情况差异很显著。秦皇岛昌黎海域 4 个季节的所有样本中丰度比较高的 ARGs 主要属于四环素类、氨基糖苷类、万古霉素类以及 β-内酰胺类等常见类型的抗生素抗性基因, 其中所含 ARGs 种类最多的要数四环素类的抗性基因。整体来看, 海水样本中 ARGs 分布表

现出了非常明显的季节差异, 这可能与不同季节海水中的微生物群落组成的不同有关。底泥样本中 ARGs 的种类和丰度都不高, 不同季节的样本之间 ARGs 的分布表现出了非常高的相似性。在矛尾复虾虎鱼肠道内容物样本中, ARGs 种类和丰度在各个季节样本中同样表现出了不同的聚类关系。此外, 矛尾复虾虎鱼肠道内容物样本中有大量高丰度的 ARGs 在海水和底泥样本中是没有检测到的, 或者说是丰度很低的, 说明鱼类肠道微生物中本身也携带了一定丰度的 ARGs。同时, 海水中的一些 ARGs, 如 *mexQ*、*tcr3*、*tetB46* 等在矛尾复虾虎鱼肠道内容物样本研究也检测到了, 说明海水中的微生物携带的 ARGs 与鱼类肠道微生物之间也存在了比较频繁的基因交流。而对于底泥样本来说, 这种微生物之间接触的机会相对比较少, 所以底泥中的 ARGs 种类很少与矛尾复虾虎鱼肠道内容物有重叠。ARGs 所对应的耐药机制主要包含

了靶点保护(target protection)、外排泵(efflux)、靶点改变(target alteration)和失活(inactivation)4种类型,其中属于外排泵的占比最高。已有研究表明,细菌细胞膜上的主动外排泵可以将抗生素类药物排至细菌细胞外,从而阻碍各类药物与细菌细胞膜内的靶点结合,引起细菌耐药。此外,外排泵在介导细菌多重耐药中也起着重要的作用^[20]。本研究也发现除了以上几种耐药机制外,还存在一些在同一种细菌门类中同时存在2种或2种以上耐药机制的情况,不同耐药机制之间彼此重叠更加剧了耐药性的传播和扩散。

3.3 秦皇岛昌黎海域 ARGs 与微生物群落之间的关系

本研究发现偏在远洋杆菌属、聚球藻属和伍斯氏菌属均可能携带10个以上的ARGs,发光杆菌属和弧菌属中也各自携带近10个ARGs。相反地,阿菲波菌属、慢生根瘤菌属和雷尔氏菌属可能携带的ARGs数量较少。共存网络分析结果(图5)表明,阿菲波菌属(*Afipia*)可能仅携带*QnrB4*这一种喹诺酮类抗生素的ARGs,其耐药机制主要是编码一种*QnrB4*抗性蛋白,对抗生素的作用靶点进行保护,从而起到耐药的作用。此外,在本研究中慢生根瘤菌属本身可能不携带ARGs,但该类群微生物可能与雷尔氏菌属之间存在一定的促生关系,而雷尔氏菌属中可能携带像*tet39*这类的ARGs,所以慢生根瘤菌属对ARGs的传播和扩散也起到了间接的促进作用。

本研究对秦皇岛昌黎海域的微生物多样性和ARGs的赋存特征进行了季节性系统研究,发现该海域微生物属水平的微生物类群与ARGs高度相关,并且主要类群的属都是多重耐药菌株。此外,beta-内酰胺类的ARGs在我国的水产养殖环境中的报道很少,但是在本课题组前期昌黎县海域春季样品分析的结果中这类ARGs已经显现出了比较高的丰度^[14]。由于β-内酰胺类抗生素是一类在人类抗感染治疗中起重要作用,且使用频率比较高的抗生素,其污染和传播问题非常值得引起重视。这些研究结果提示,未来应对抗生素的使用进行更加科学的指导与监管,同时加强该片海域中抗生素抗性基因以及相关微生物的持续监测。

参考文献:

- [1] Jiao N Z. Marine Microbial Ecology[M]. Beijing: Science Press, 2006. [焦念志. 海洋微生物生态学[M]. 北京: 科学出版社, 2006.]
- [2] Anderson R, Wylezich C, Glaubitz S, et al. Impact of protist grazing on a key bacterial group for biogeochemical cycling in Baltic Sea pelagic oxic/anoxic interfaces[J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(5): 1580-1594.
- [3] Yan Q Q, Li B, Liao M J, et al. Distribution characteristics of antibiotic resistant bacteria and antimicrobial resistant genes in the intestine of cultured sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) seedlings in Shandong Province[J]. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(4): 134-143. [闫倩倩, 李彬, 廖梅杰, 等. 山东主要刺参养殖区幼参肠道抗生素耐药菌及耐药基因分布特征[J]. 渔业科学进展, 2020, 41(4): 134-143.]
- [4] Cheng B, Ai X H, Chang Z Q, et al. Direction of innovation and development for the study on drug metabolism residues of aquatic animals—The prediction technique based on PBPK model[J]. Chinese Fishery Quality and Standards, 2017, 7(6): 42-47. [程波, 艾晓辉, 常志强, 等. 水产动物药物代谢残留研究及创新发展方向——基于PBPK模型的残留预测技术[J]. 中国渔业质量与标准, 2017, 7(6): 42-47.]
- [5] Shen Y W, Huang Z T, Xie B. Advances in research of pollution, degradation and removal of antibiotics and antibiotic resistance genes in the environment[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2015, 21(2): 181-187. [沈怡雯, 黄智婷, 谢冰. 抗生素及其抗性基因在环境中的污染、降解和去除研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2015, 21(2): 181-187.]
- [6] Zhang H, Wang P L, Yang Q X, et al. Distribution of multidrug-resistant bacteria and antibiotic-resistant genes in livestock manures[J]. Environmental Science, 2018, 39(1): 460-466. [张昊, 王盼亮, 杨清香, 等. 畜禽粪便中多重耐药细菌及耐药基因的分布特征[J]. 环境科学, 2018, 39(1): 460-466.]
- [7] Zhang Y, Chen L J, Xie H, et al. Abundance of cell-associated and cell-free antibiotic resistance genes in two wastewater treatment systems[J]. Environmental Science, 2017, 38(9): 3823-3830. [张衍, 陈吕军, 谢辉, 等. 两座污水处理系统中细胞态和游离态抗生素抗性基因的丰度特征[J]. 环境科学, 2017, 38(9): 3823-3830.]
- [8] 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.
- [9] Liu Z B, Klümper U, Shi L, et al. From pig breeding environment to subsequently produced pork: Comparative

- analysis of antibiotic resistance genes and bacterial community composition[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 43.
- [10] Qiao M, Ying G G, Singer A C, et al. Review of antibiotic resistance in China and its environment[J]. *Environment International*, 2018, 110: 160-172.
- [11] Wang Y Z, Wang C, Song L. Distribution of antibiotic resistance genes and bacteria from six atmospheric environments: Exposure risk to human[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 694: 133750.
- [12] Suzuki S, Nakanishi S, Tamminen M, et al. Occurrence of *Sul* and *Tet* (M) genes in bacterial community in Japanese marine aquaculture environment throughout the year: Profile comparison with Taiwan residents and Finnish aquaculture waters [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 669: 649-656.
- [13] Wu J J, Su Y L, Deng Y Q, et al. Prevalence and distribution of antibiotic resistance in marine fish farming areas in Hainan, China[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 653: 605-611.
- [14] Wang Q S, Cheng B, Liu Y, et al. Analysis of bacterial communities and antibiotic resistance genes in the aquaculture area of Changli County[J]. *Environmental Science*, 2024, 45(1): 567-575. [王秋水, 程波, 刘悦, 等. 昌黎县海域细菌群落和抗生素抗性基因分析[J]. *环境科学*, 2024, 45(1): 567-575.]
- [15] Li D H, Liu C M, Luo R B, et al. MEGAHIT: An ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly *via* succinct de Bruijn graph[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(10): 1674-1676.
- [16] Fu L M, Niu B F, Zhu Z W, et al. CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(23): 3150-3152.
- [17] Langmead B, Salzberg S L. Fast gapped-read alignment with bowtie 2[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(4): 357-359.
- [18] Labella A M, Arahall D R, Lucena T, et al. *Photobacterium toruni* sp. nov., a bacterium isolated from diseased farmed fish[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(11): 4518-4525.
- [19] 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. [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.]
- [20] Chen H L, Zhang X T, Wang Q, et al. Metagenomic analysis of antibiotic resistant bacteria and resistance genes in a pharmaceutical and chemical wastewater treatment plant[J]. *Environmental Science*, 2020, 41(1): 313-320. [陈红玲, 张兴桃, 王晴, 等. 宏基因组方法分析医药化工废水厂中抗生素耐药菌及抗性基因[J]. *环境科学*, 2020, 41(1): 313-320.]
- [21] Liu J W, Liu J, Huang F Y, et al. The expanding knowledge of marine thaumarchaeota: From new groups to new functions [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(12): 4628-4645. [刘吉文, 刘姣, 黄付燕, 等. 海洋奇古菌门认知的拓展: 从新类群到新功能[J]. *微生物学报*, 2022, 62(12): 4628-4645.]
- [22] Assunção J, Amaro H M, Malcata F X, et al. Cyanobacterial pigments: Photosynthetic function and biotechnological purposes[M]//*The Pharmacological Potential of Cyanobacteria*. Amsterdam: Elsevier, 2022: 201-256.
- [23] Zhang Z H, Tang L L, Liang Y T, et al. The relationship between two *Synechococcus* strains and heterotrophic bacterial communities and its associated carbon flow[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2021, 33(2): 953-966.
- [24] Cai R N, Zhang J, Liu R, et al. Metagenomic insights into the metabolic and ecological functions of abundant deep-sea hydrothermal vent DPANN archaea[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(9): e03009-20.
- [25] Hutchins D A, Fu F X. Microorganisms and ocean global change[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 17058.
- [26] Li Y D, Jing H M, Xia X M, et al. Metagenomic insights into the microbial community and nutrient cycling in the western subarctic Pacific Ocean[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 623.

Seasonal distributions of microbial communities and antibiotic resistance genes in the coastal waters of Changli County, Qinhuangdao City

WANG Qiushui¹, DENG Jie¹, WANG Shengnan¹, CHENG Bo³, LIU Yue¹, YUAN Hanyu⁴, WANG Wei², GAO Lijuan¹

1. Institute of Analysis and Testing, Beijing Academy of Science and Technology (Beijing Center for Physical and Chemical Analysis), Beijing 100089, China;
2. NHC Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment, Beijing 100022, China;
3. Key Laboratory of Aquatic Product Quality and Safety Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chinese Academy of Fishery Sciences, Beijing 100141, China;
4. Beijing Computing Center, Beijing 100094, China

Abstract: The extensive use of antibiotics in industrial and agricultural activities has resulted in environmental deterioration, drug residues, bacterial resistance, and imbalanced microbial structure in the marine environment, affecting the function of the marine ecosystem. To understand the seasonal distributions of microbial communities and resistance genes in the sea area of Changli County, Qinhuangdao City, metagenomic sequencing technology was used to sample and analyze the seawater, sediments, and intestinal contents of the local fish, *Synechogobius hasta*. The microbial composition of the seawater samples in Changli County was mainly bacterial. Proteobacteria was the most dominant bacterial phyla, with *Photobacterium* being the most abundant genus. The main types of antibiotic resistance genes in seawater were *APH2_IIa*, *vanXYG*, *OXA_325*, and *TriC*, whereas in sediments were *bcrB*, *vanHO*, *adeS*, and *EreA*. Meanwhile, the main types of antibiotic resistance genes in the intestinal contents of the *Synechogobius hasta* were *msrE*, *emrK*, and *QnrB4*. Network analysis revealed that microbial genus level in the sea area was highly associated with antibiotic resistance genes, and the main genera were multi-resistant strains. The efflux pump of antibiotics is the main antibiotic resistance mechanism in this microbial community. The scallop farming area in Changli County is rich in antibiotic resistant bacteria and genes, which align with the commonly used antibiotic categories in aquaculture production. Enhancing the continuous monitoring of antibiotic-resistant bacteria and genes in the aquaculture area is urgently required.

Key words: Changli County; sea area; seasonal distribution; microbial composition; antibiotic resistance gene (ARGs)

Corresponding author: CHENG Bo. E-mail: chengb@cafs.ac.cn