

研究报告

海州湾近岸海域的微生物群落结构和抗生素抗性基因时空变化

范晨荣¹, 陈俐锟¹, 钟毅¹, 金星鹏¹, 詹炜君¹, 陈丽^{*2}, 陈海红^{*2}

1 江苏海洋大学海洋科学与水产学院, 江苏 连云港 222005

2 江苏省海洋资源开发研究院, 江苏 连云港 222005

范晨荣, 陈俐锟, 钟毅, 金星鹏, 詹炜君, 陈丽, 陈海红. 海州湾近岸海域的微生物群落结构和抗生素抗性基因时空变化[J]. 微生物学通报, 2023, 50(10): 4322-4342.

FAN Chenrong, CHEN Likun, ZHONG Yi, JIN Xingpeng, ZHAN Weijun, CHEN Li, CHEN Haihong. Spatial and temporal changes of microbial community structure and antibiotic resistance genes in the coastal waters of Haizhou Bay[J]. Microbiology China, 2023, 50(10): 4322-4342.

摘要:【背景】近岸海域抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)的污染和累积将直接影响海产品质量和安全, 海州湾作为江苏省的四大渔场之一, 是江苏渔业发展的主要载体, 有多条大小河流注入, 沿岸为重要农业区, 对公众健康产生重大影响。【目的】对海州湾夏秋季的水样及沉积物展开微生物及 ARGs 检测。【方法】基于宏基因组测序技术开展海州湾夏秋两季近岸 6 个站点中水体和沉积物中 ARGs 种类和相对丰度以及微生物群落的组成研究。【结果】变形菌门(*Proteobacteria*)和放线菌门(*Actinobacteria*)是夏秋两季两种介质中最优势的门类, 水样中优势的科级细菌为红细菌科(*Rhodobacteraceae*), 沉积物样品中为脱硫杆菌科(*Desulfobacteraceae*); 夏季水样中的 ARGs 相对丰度要明显高于秋季, 但沉积物中不同季节的 ARGs 相对丰度未表现出明显的变化趋势; 在水样中主要门类微生物群落的抗性机制主要是抗生素靶位替换和抗生素靶位保护, 沉积物样品则以抗生素灭活机制为主, 而主要科级微生物群落的抗性机制更加多样; 冗余分析(redundancy analysis, RDA)和典型对应分析(canonical correspondence analysis, CCA)发现硝酸盐及盐度等环境因子与 ARGs 的变化显著相关。【结论】海州湾近岸海域的微生物群落及 ARGs 组成在夏秋季不同介质中有明显差异, 且不同介质中主要微生物群落的抗性机制不尽相同, ARGs 的相对

资助项目: 江苏省海洋科技创新专项项目(HY2018-10); 江苏省“333 工程”高层次人才培养资金资助项目(BRA2014111); 连云港市“521 高层次人才培养工程”资助项目(LYG52105-2018028); 江苏省海洋生物产业技术协同创新中心专项资金资助项目

This work was supported by the Jiangsu Provincial Marine Science and Technology Innovation Special Project (HY2018-10), the Project of Jiangsu Province “333 Project” High-level Talent Training Funds (BRA2014111), the Lianyungang City “521 High-level Talent Training Project” Funding Project (LYG52105-2018028), and the Jiangsu Provincial Marine Biological Industry Technology Collaborative Innovation Center Special Funding Project.

*Corresponding authors. E-mail: CHEN Li, chenjouedu@163.com; CHEN Haihong, chenhhhailey@163.com

Received: 2023-03-07; Accepted: 2023-05-01; Published online: 2023-06-29

丰度和分布受盐度和硝酸盐等环境因子调控。研究结果为海州湾公共安全监测和生态环境的保护提供了理论依据。

关键词: 抗生素抗性基因; 微生物群落; 海州湾; 水样; 沉积物

Spatial and temporal changes of microbial community structure and antibiotic resistance genes in the coastal waters of Haizhou Bay

FAN Chenrong¹, CHEN Likun¹, ZHONG Yi¹, JIN Xingpeng¹, ZHAN Weijun¹, CHEN Li^{*2}, CHEN Haihong^{*2}

1 School of Marine Science and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, Jiangsu, China

2 Jiangsu Institute of Marine Resources Development, Lianyungang 222005, Jiangsu, China

Abstract: **[Background]** The pollution and accumulation of antibiotic resistance genes (ARGs) in coastal waters directly affect the quality and safety of seafood. As one of the four major fishing grounds, Haizhou Bay is the main carrier of fishery development in Jiangsu province, with multiple rivers injected. The coast is an important agricultural area with a significant impact on public health. **[Objective]** To study the microorganisms and ARGs in the water and sediment samples collected from six points of Haizhou Bay in summer and autumn. **[Methods]** Metagenomic sequencing was employed to determine the composition and relative abundance of microorganisms and ARGs. **[Results]** *Proteobacteria* and *Actinobacteria* were the most dominant phyla in the two media in summer and autumn. The dominant families in water and sediment samples were *Rhodobacteraceae* and *Desulfobacteraceae*, respectively. The relative abundance of ARGs in water samples in summer was significantly higher than that in autumn, while the relative abundance of ARGs in sediments did not show a significant trend in different seasons. The resistance mechanisms of the main phyla in water samples were mainly antibiotic target replacement and antibiotic target protection, while that in the sediment samples was mainly antibiotic inactivation. The main families had more diverse resistance mechanisms. Redundancy analysis (RDA) and canonical correspondence analysis (CCA) showed that environmental factors such as nitrate and salinity were significantly correlated with the changes of ARGs. **[Conclusion]** The microbial community and ARGs in the coastal area of Haizhou Bay varied in different media in summer and autumn, and the main microbial communities in different media adopt different resistance mechanisms. The relative abundance and distribution of ARGs were regulated by environmental factors such as salinity and nitrate. The findings provide a theoretical basis for public safety monitoring and environment protection in Haizhou Bay.

Keywords: antibiotic resistance gene; microbial community; Haizhou Bay; water sample; sediment

抗生素抗药性正在成为 21 世纪的全球性危机^[1]。据估计,如果不能有效控制,到 2050 年,全球死于抗生素耐药性细菌感染的人数可能达到每年 1 000 万^[2]。自 2006 年以来,抗生素抗性基因(antibiotic resistance gene, ARG)已被广泛认为是一种新兴污染物^[3]。目前,ARG 普遍存在于环境中,如土壤、水和空气^[4-5],对人类健康安全造成了潜在威胁。来自医院、养殖场和污水处理厂等含有抗生素、ARG 和抗生素抗性菌的多种类型废水最终被排入自然水体^[6-8],因此水环境是 ARG 的重要储存库。

ARG 在环境中的增加与人类活动密切相关^[9]。随着城市化进程的推进,人口、医疗水平和生活污水排放量等都迅速增加^[10]。从而加重了抗生素和其他类型污染物(如非抗生素药物、重金属和消毒副产品)向环境的释放,这将进一步促进不同微生物之间 ARGs 的突变和基因水平转移^[11-13]。

河流易受人类活动的影响,为 ARG 的积累和传播提供了理想的媒介^[14]。水和沉积物之间的交换可能进一步使河流生态系统更加复杂。尽管如此,大多数河流 ARGs 的研究集中在人类污染的水环境(如污水和畜禽废水)或单一的河流介质(如水体和沉积物)^[15]。近年来,中国沿海地区经济发展迅速,近岸海域受到严重的人为干扰,导致近岸海水 ARG 污染的报道频繁。例如,在珠江河口检出磺胺类 ARG (*sulI*)^[16];在泰国 2 个热带休闲海滩检出 6 种 ARG (*bla*_{NDM}、*bla*_{TEM}、*bla*_{VIM}、*mcr-1*、*sulI* 和 *tetQ*)等^[17]。海州湾为多条河流入海口,地理位置特殊,既受到地表径流的影响,又与海洋有交互,因此海州湾 ARG 的时空分布具有较高的研究价值。

本研究旨在对海州湾夏秋季节水样和沉积物样品中的微生物群落组成和 ARG 的组成及丰度进行分析,并对其潜在的公共卫生风险进行评估,同时探讨了环境因子对微生物群落及 ARG 的影响,以期为沿海地区和河流入海口的微生物

群落及 ARG 研究提供数据参考和科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

细菌 DNA 提取试剂盒 HiPure Bacterial DNA Kit, 上海迈跟生物科技有限公司;文库制备试剂盒 NEBNext[®] ULtra[™] DNA, 南京赛泓瑞生物科技有限公司。Qubit 荧光仪、NanoDrop3300 荧光分光光度计,赛默飞世尔科技(中国)有限公司;便携式水质分析仪,广州博勒泰科技有限公司;multi N/C 3100 分析仪,耶拿分析仪器有限公司;QuAAtro 39 分析仪,水尔分析仪器(上海)有限公司;2100 生物分析仪,安捷伦科技有限公司;Illumina NovaSeq 6000 测序仪,上海土森视觉科技有限公司。

1.2 样品采集

样品采集自中国连云港海州湾近岸海域,范围分别是 34.66–35.04°N 和 119.18–119.76°E。在 2022 年 7 月及 9 月进行了采样,海州湾的 6 个采样点分别位于高公岛附近以及烧香河、临洪河、龙王河、青口河、柘汪河入海口附近,这 6 个站位对应编号为 1、2、3、4、5 和 6,水样以 W 表示,沉积物样品以 S 表示,夏季以-1 表示,秋季以-2 表示。站位的经纬度信息见表 1。在每个采样点进行水样及沉积物的采集,并对一些理化因子进行原位测定。从海州湾近岸海域共采集了 24 份样品,水样和沉积物样品各 12 份。将水样及沉积物样品置于冰上运回实验室,将每份样品存储于-80 °C,用于提取 DNA。

表 1 站位信息表

Table 1 Station information table

站位 Station	经度 Longitude (°E)	纬度 Latitude (°N)
W1/S1	119.484 0	34.699 1
W2/S2	119.459 5	34.667 7
W3/S3	119.222 6	34.786 0
W4/S4	119.194 4	34.923 8
W5/S5	119.199 7	34.831 7
W6/S6	119.225 8	35.048 3

水样通过用 Schindler 采水器在采样点随机取样 3 次, 将 3 次水样在桶中进行充分混合, 取混合水样 2–3 L, 现场采样真空过滤装置进行抽滤。将水样先用 5 μm 的滤膜进行过滤, 然后将过滤后的水样再用 0.45 μm 滤膜进行过滤。将滤膜放置于做好标记的离心管中再放入液氮中进行保存, 每个点位重复提取 6 次, 再将滤膜(贮存于冻存管)用干冰存贮, 并立即送往广州进行测序。另外, 在每个点取混合水样 4 L 存贮于样品瓶中置于冰上运回实验室, 用于后续理化指标的测定。采样过程中严格记录采样点环境、时间、地点, 并在现场用便携式水质分析仪测定水样的 pH、溶解氧、盐度、电导率和温度。沉积物样在每个采样点用 Petersen 抓斗式采泥器随机 3 次抓取表层沉积物(0–10 cm), 将 3 次沉积物样品进行充分混合, 取出部分(≥ 2 g)放入离心管中, 剩余的用锡箔纸包好后放入自封袋, 放入冰上运回实验室, 离心管中的沉积物样品同水样一起干冰运输并测序, 自封袋中的沉积物样品冷冻保存, 待下一步处理。整个采样期间佩戴手套, 避免样品污染。

总有机碳和总氮利用 multi N/C 3100 分析仪进行自动测定, 硝酸盐、亚硝酸盐、总磷和氨氮用 QuAAtro 39 分析仪进行测定。

1.3 DNA 提取和 Illumina 测序

根据制造商的说明, 使用 HiPure Bacterial DNA Kit 提取基因组 DNA。使用 Qubit 荧光仪和 NanoDrop3300 荧光分光光度计对 DNA 质量进行相应的检测。合格的基因组 DNA 首先被超声处理成 350 bp 大小的片段, 然后根据制备方案使用 NEBNext[®] MLtra[™] DNA 文库制备试剂盒进行末端修复、A-tailed 和适配体连接。通过 PCR 富集长度为 300–400 bp 的 DNA 片段。PCR 反应体系: adaptor ligated DNA fragments 23 μL ,

NEBNext High Fidelity 2 \times PCR Master Mix 25 μL , index primer 1 μL , universal PCR primer 1 μL 。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 75 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 12 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。PCR 产物使用 AMPure XP 系统纯化, 用 2100 生物分析仪分析文库的大小分布, 并使用实时 PCR 进行定量。基因组测序在 Illumina NovaSeq 6000 测序仪上使用对端技术(PE 150)进行。

1.4 质量控制和组装

来自 Illumina 平台的原始数据使用 FASTP (v0.18.0)按照以下标准进行过滤: (1) 去除 N 的比例大于 10%的 reads; (2) 去除低质量 reads (质量值 $Q \leq 20$ 的碱基数占整个 read 的 50%以上); (3) 去除含 adapter 的 reads。过滤后的 clean reads 被用于基因组组装。使用 MEGAHIT (v1.1.2)^[18] 对每个样本的 clean reads 进行单独组装, 在 21–99 的 k-mer 范围内产生样本衍生的组装。使用 MetaGeneMark (v3.38)^[19] 根据最终组装的等位基因(>500 bp)预测基因。使用 CD-HIT (v4.6)^[20] 将所有样本中长度 ≥ 300 bp 的预测基因集中起来, 并根据 $\geq 95\%$ 的一致性和 90%的 reads 覆盖率进行合并, 以减少下游组装步骤中的冗余基因数量。使用 Bowtie (v2.2.5)^[21] 将 reads 与预测的基因重新配对, 以计算 reads 数。最终的基因目录由比对到 reads 数大于 2 的非冗余基因组成。

1.5 数据分析处理

Comprehensive antibiotic resistance database (CARD)以 antibiotic resistance ontology (ARO)为分类单位(term)构建, 用于关联抗生素模块及其目标、抗性机制、基因变异等信息。使用 Diamond 将预测的基因序列比对至数据库进行注释, 通过该数据库的注释可以找到耐药性相关基因的名称、所耐受的抗生素种类和抗性机制等信息。基

于抗性基因丰度的 Bray-curtis 距离矩阵由 R Vegan 软件包^[22]生成。使用 R vegan 软件包^[22]计算 bray-curtis 距离的多变量统计技术,包括主成分分析(principal component analysis, PCA)、主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA)和非计量多维缩放(nonmetric multidimensional scaling, NMDS),并使用 R ggplot2 软件包^[23]绘图。使用 R Vegan 包进行 Welch's *t*-检验、方差分析(analysis of variance, ANOVA)、Adonis (也称 Permanova)和 Anosim 检验等统计分析。使用 R Pheatmap 软件包^[24]绘制热图。微生物与抗性机制的关系利用使用 circos (v0.69-3)^[25]进行绘制。每组的生物标志物特征由 Metastats (v20090414)^[26]和 LEfSe 软件(v1.0)^[27]进行筛选。测序所得原始数据已提交到 NCBI 的 SRA (sequence read archive) 数据库, 登录号为 PRJNA949388。

2 结果与分析

2.1 夏秋两季不同介质中微生物群落的组成

在这项研究中,夏季的水样中鉴定出 171 门的微生物,在秋季的水样中鉴定出 169 门,总计 176 门;夏季的沉积物样品中鉴定出了 168 门的微生物,秋季的沉积物样品中鉴定出 173 门,总计 175 门。

在水样中,总相对丰度排名前 10 的细菌门类中,相对丰度从高到低分别为变形菌门(*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、广古菌门(*Euryarchaeota*)、蓝藻门(*Cyanobacteria*)、芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)和酸杆菌门(*Acidobacteria*)。变形菌门和放线菌门是夏秋季水样中最优势的门类,两者都在夏季水样中表现

出相对较高丰度,变形菌门是最优势的门,在各站位中的占比为 28.78%–64.58%,平均占比为 46.48%,且夏季变形菌门的平均占比要高于秋季,放线菌门则在 W3-1、W4-1 和 W5-2 站位中占比较高,分别占 19.14%、19.22%和 16.93%;拟杆菌门在夏季站位 W2-2 中表现出较高水平,占比为 13.38% (图 1A)。

相对丰度排名前 10 的科水平细菌为红细菌科(*Rhodobacteraceae*)、远洋杆菌科(*Pelagibacteraceae*)、肌尾噬菌体科(*Myoviridae*)、伯克氏菌科(*Burkholderiaceae*)、莫拉菌科(*Moraxellaceae*)、黄杆菌科(*Flavobacteriaceae*)、红螺菌科(*Rhodospirillaceae*)、脱硫杆菌科(*Desulfobacteraceae*)、微杆菌科(*Microbacteriaceae*)和丛毛单胞菌科(*Comamonadaceae*)。秋季站位中放线菌门的红细菌科和远洋杆菌科的水平明显高于夏季,红细菌科在秋季 6 个站位的占比为 8.29%–25.02%,平均占比为 12.40%,远洋杆菌科在秋季站位 W1-1、W1-2、W5-2 和 W6-2 中水平较高,在站位的占比分别为 6.08%、4.00%、5.36%和 4.23%;变形菌门的伯克氏菌科和莫拉菌科则在夏季个别站位中表现出较高丰度,伯克氏菌科在夏季 W4-1 和 W6-1 站位中丰度较高,占比分别为 5.26%和 5.37%,莫拉菌科在夏季 W6-1 站位中丰度较高,占比为 10.43% (图 1B)。

在水样中,夏秋季的样品均检测到了属于变形菌门的多种致病菌,如铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)和土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*)等,其中铜绿假单胞菌的丰度较高。

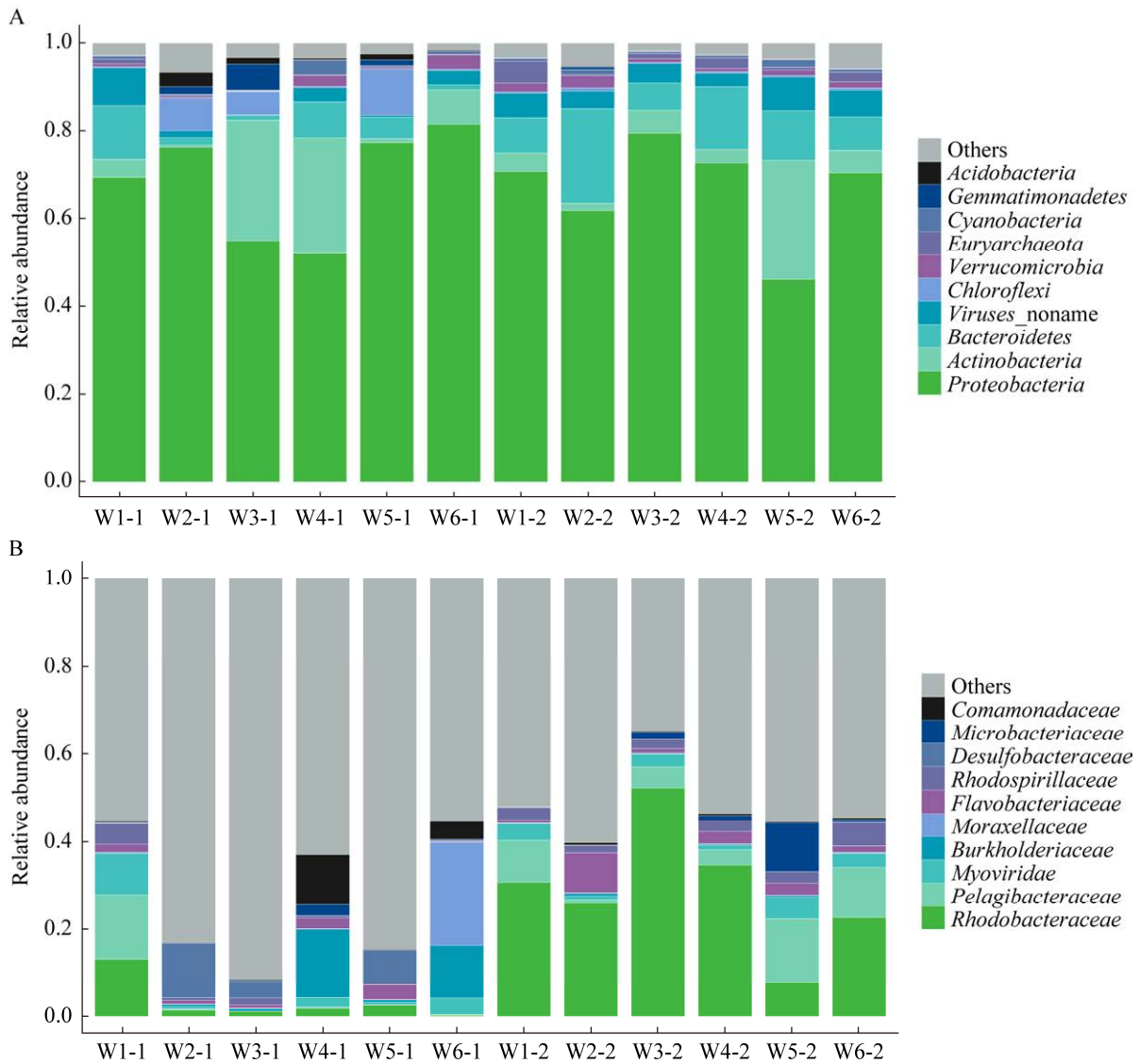


图 1 夏秋季水样中微生物群落组成 A: 门水平. B: 科水平

Figure 1 Microbial community composition in water samples in summer and autumn. A: Phylum level. B: Family level.

在沉积物样品中, 总相对丰度排名前 10 的细菌门类中, 其相对丰度从高到低分别为变形菌门、放线菌门、拟杆菌门、绿弯菌门、酸杆菌门、浮霉菌门(*Planctomycetes*)、芽单胞菌门和蓝藻门。变形菌门是夏秋季沉积物样品中最优势的门类, 夏秋季的变化对于变形菌门的影响较小, 变形菌门在各站位的占比为 24.12%–62.32%, 平均

占比为 50.54%; 放线菌门则在部分站位表现出较高的丰度, 放线菌门在夏季站位 S2-1、S3-1 和 S5-1 站位中占比较高, 分别占 24.13%、27.80% 和 26.08% (图 2A)。

在沉积物样品中, 相对丰度排名前 10 的科水平细菌为脱硫杆菌科(*Desulfobacteraceae*)、红细菌科 (*Rhodobacteraceae*)、伯克氏菌科

(*Burkholderiaceae*)、黄杆菌科(*Flavobacteriaceae*)、慢生根瘤菌科(*Bradyrhizobiaceae*)、假单胞菌科(*Pseudomonadaceae*)、丛毛单胞菌科(*Comamonadaceae*)、甲基杆菌科(*Methylobacteriaceae*)、脱硫棒杆菌科(*Desulfobulbaceae*)和微杆菌科(*Microbacteriaceae*)。变形菌门的脱硫杆菌科具

有相对优势,在 S1-1、S6-1 和 S4-2 站位中丰度较高,在各站位的占比分别为 3.48%、3.07%和 3.20%;变形菌门的红细菌科、伯克氏菌科和慢生根瘤菌科等则在夏季个别站位有较高丰度(图 2B)。

铜绿假单胞菌、大肠杆菌、副溶血弧菌、肺炎克雷伯菌、空肠弯曲菌和土拉弗朗西斯菌等变形菌门的致病菌在沉积物样品中也均被检出。

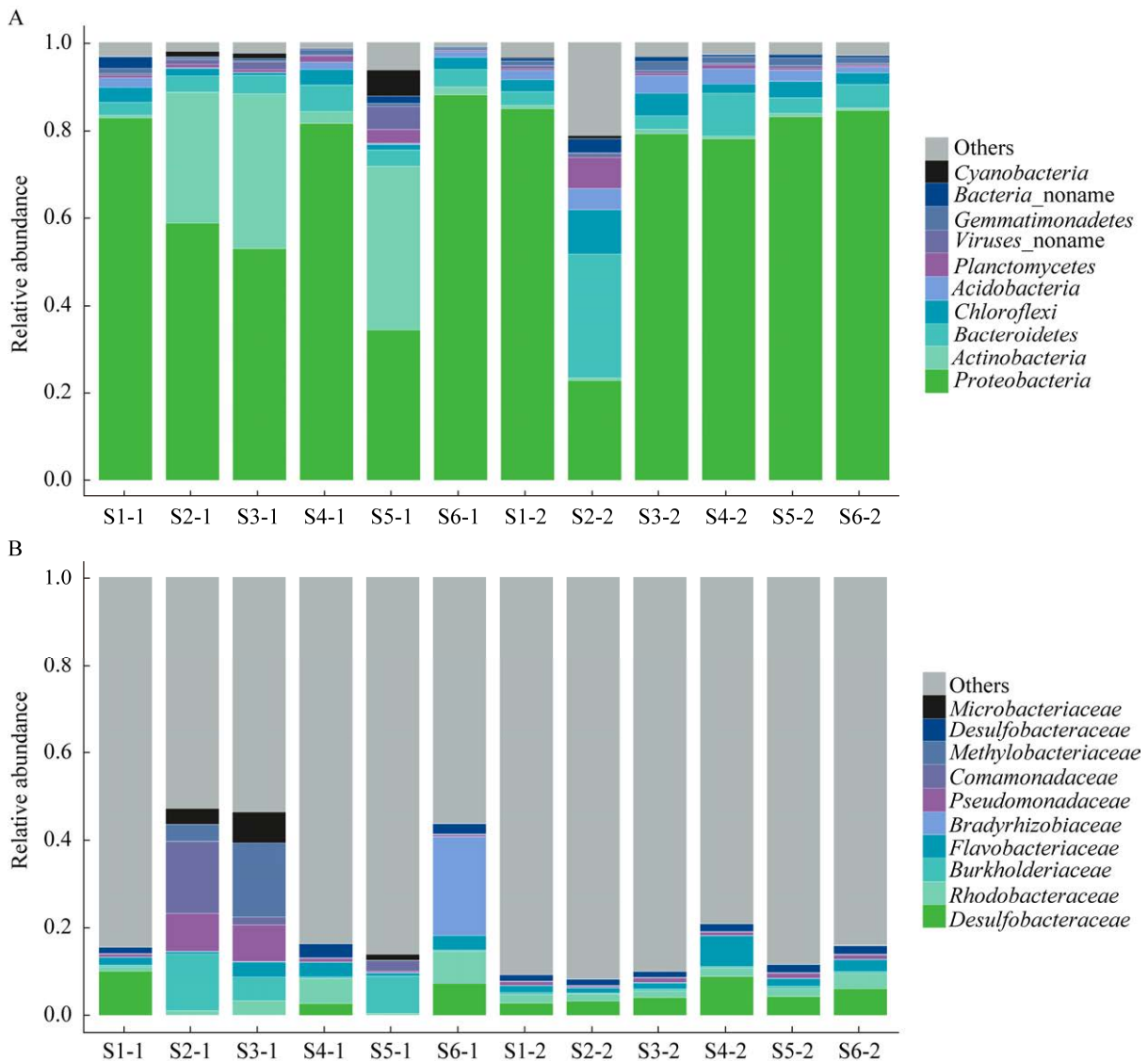


图 2 夏秋季沉积物样品中微生物群落组成 A: 门水平. B: 科水平

Figure 2 Microbial community composition in sediment samples in summer and autumn. A: Phylum-level. B: Family-level.

2.2 夏秋两季不同介质中 ARGs 相对丰度及类型

在夏秋两季的水样和沉积物样品中共检测出 1 179 种 ARG 亚型, 分属于 37 种 ARG 类型。检测出的 ARGs 可以根据其对应的药物种类进行分类, 在整体样品中相对丰度排名前 10 的 ARGs 种类分别为四环素类(tetracycline antibiotic)、大环内酯类(macrolide antibiotic)、氟喹诺酮类(fluoroquinolone antibiotic)、青霉素类(penam)、氨基糖苷类(aminoglycoside antibiotic)、酚类(phenicol antibiotic)、糖肽类(glycopeptide antibiotic)、肽类(peptide antibiotic)、杀菌剂(disinfecting agents and antiseptics)和氨基香豆素类(aminocoumarin antibiotic)。

在水样排名前 10 的 ARGs 种类中, 四环素类 ARGs 和大环内酯类 ARGs 的总相对丰度是这 10 种主要抗性类型中排名最高的。四环素类 ARGs 的相对丰度为 3.94×10^{-3} – 1.12×10^{-2} , 在所有站位的平均相对丰度为 7.57×10^{-3} ; 在排名前 10 的 ARGs 种类中, 四环素类 ARGs 在各站位的占比为 19.11%–22.20%, 在各个站点平均占比为 19.97%。大环内酯类 ARGs 的相对丰度为 4.10×10^{-3} – 1.02×10^{-2} , 在所有站位的平均相对丰度为 6.92×10^{-3} ; 在排名前 10 的 ARGs 种类中, 大环内酯类 ARGs 在各站位的占比为 15.82%–21.21%, 在各个站点平均占比为 18.94%; 青霉素类氟喹诺酮类 ARGs、氨基糖苷类氟喹诺酮类 ARGs、酚类氟喹诺酮类 ARGs 和糖肽类氟喹诺酮类 ARGs 等在各站位的平均占比都低于 10%。图 3A 展示了海州湾 6 个采样点夏秋季度 ARGs 的总相对丰度和 TOP10 的 ARGs 种类。W1 站位为高公岛近岸海域站位, 该站位的 ARGs 相对丰度在夏秋两季并未表现出比较明显的变化。剩余的 5 个站位均为河流入海口站

位, 它们的总 ARGs 相对丰度从夏季(W2-1–W6-1)到秋季(W2-2–W6-2)有明显的下降趋势。在夏季站位中, W6-1 站点的 ARGs 相对丰度最高, 是 W1-1 站位的近 3 倍, 且 W1-1 站位的总 ARGs 相对丰度明显低于其余 5 个河流入海口的站位。在秋季站位中, W3-2 站位的总 ARGs 相对丰度最高, 但 6 个站位的总 ARGs 相对丰度都表现出较低的水平(图 3A)。

沉积物样品中, 四环素类 ARGs 和大环内酯类 ARGs 的相对丰度同样在这 10 种主要抗性类型中排名最高。四环素类 ARGs 的相对丰度为 5.42×10^{-3} – 1.33×10^{-2} , 在所有站位的平均相对丰度为 1.06×10^{-2} ; 在排名前 10 的抗性基因种类中, 四环素类 ARGs 在各站位的占比为 18.51%–22.11%, 在各个站点平均占比为 20.55%; 大环内酯类 ARGs 的相对丰度为 6.07×10^{-3} – 1.17×10^{-2} , 在所有站位的平均相对丰度为 9.15×10^{-3} ; 在排名前 10 的抗性基因种类中, 大环内酯类 ARGs 各站位的占比为 16.61%–21.09%; 在各个站点平均占比为 17.96%; 剩余的青霉素类抗性基因等的占比则相对较低。除夏季 S5-1 站位外, 各站位无论是受夏秋季节变化的影响, 还是地理位置改变的影响, 其总 ARGs 的相对丰度都未表现出较明显的变化趋势, 整体趋于一个较为平稳的状态(图 3B)。

2.3 夏秋两季不同介质中主要抗性机制解析

本研究对海州湾夏秋两季不同介质中细菌群落的抗性机制进行了初步研究。选取了主要的门级细菌群落和科级细菌群落作为研究对象, 研究发现这些细菌群落主要与抗生素外排泵、抗生素灭活和抗生素靶位的保护、替换, 以及改变细胞膜渗透性等多种抗性机制相关。

夏秋季水样中主要门级微生物群落的抗性机制为抗生素灭活(17.99%)、抗生素靶位替换(32.79%)和抗生素靶位保护(38.09%),主要科级微生物群落的抗性机制为抗生素灭活(22.83%)、抗生素靶位改变(20.15%)、抗生素靶位替换(18.92%)和

抗生素外排泵(13.97%)。在鉴定出的主要细菌群落中,变形菌门主要以抗生素靶位保护抗性机制为主,放线菌门主要依靠抗生素靶位保护(61.81%)和抗生素灭活(38.19%)这两类抗性机制,绿弯菌门则以抗生素靶位改变的抗性机制为主,广古菌门

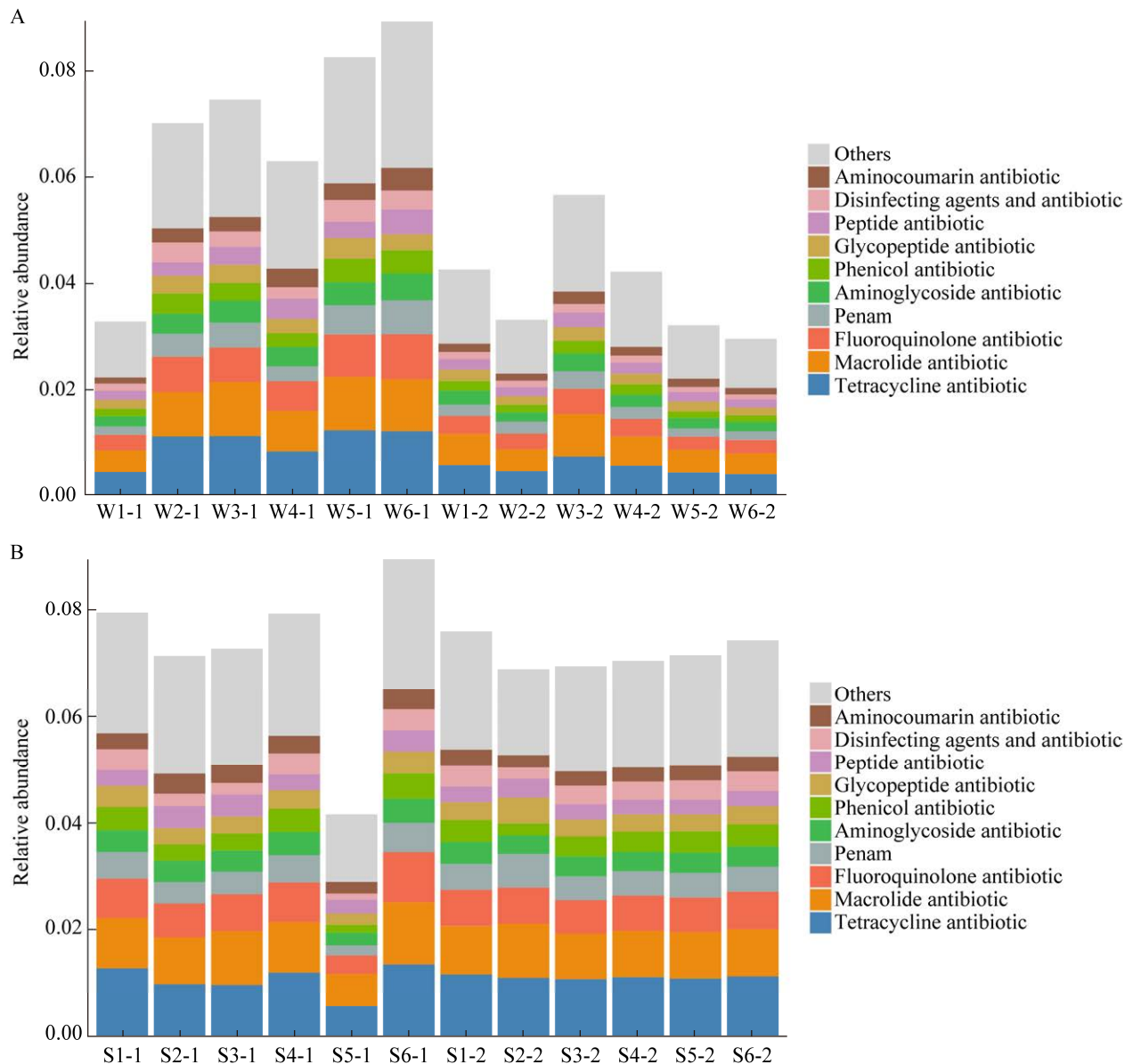


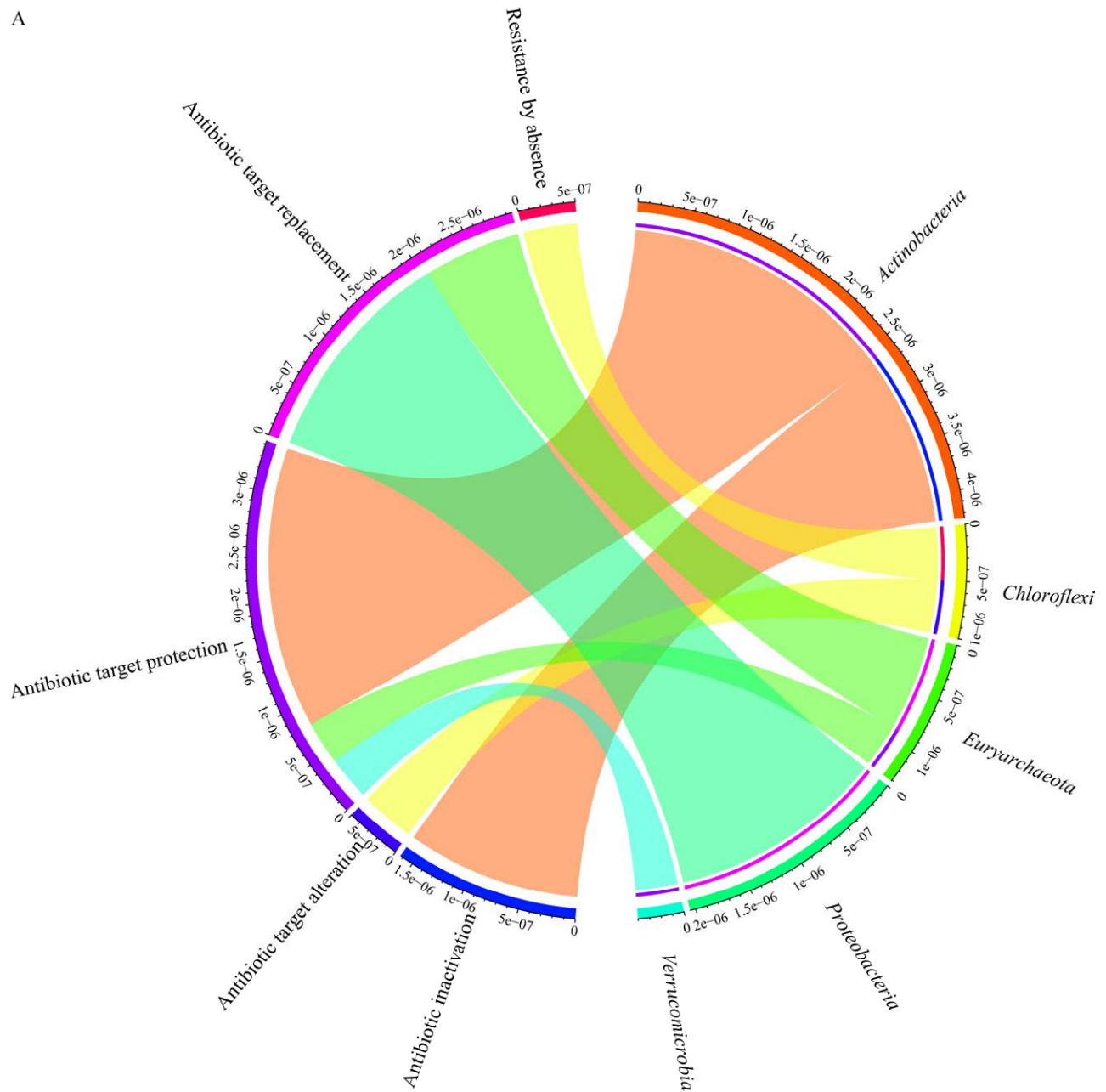
图3 夏秋季样品 ARGs 组成及类型 A: 水样. B: 沉积物样品

Figure 3 Composition and type of ARGs in summer and autumn samples. A: Water samples. B: Sediment samples.

则以抗生素靶位保护(31.06%)和抗生素靶位替换抗性机制(68.94%)为主, 疣微菌门以抗生素靶位保护抗性机制为主(图 4A)。在科水平主要的细菌群落中, 伯克氏菌科主要依赖抗生素外排泵和改变细胞膜渗透性机制, 丛毛单胞菌科主要依赖抗生素灭活和抗生素靶位保护机制,

脱硫杆菌科主要依赖抗生素靶位改变、保护和替换机制, 微杆菌科以抗生素靶位改变机制为主, 莫拉菌科主要依赖抗生素靶位改变、替换和抗生素外排泵机制, 远洋杆菌科以抗生素灭活机制为主, 红螺菌科和红细菌科都以抗生素靶位替换机制为主(图 4B)。

A



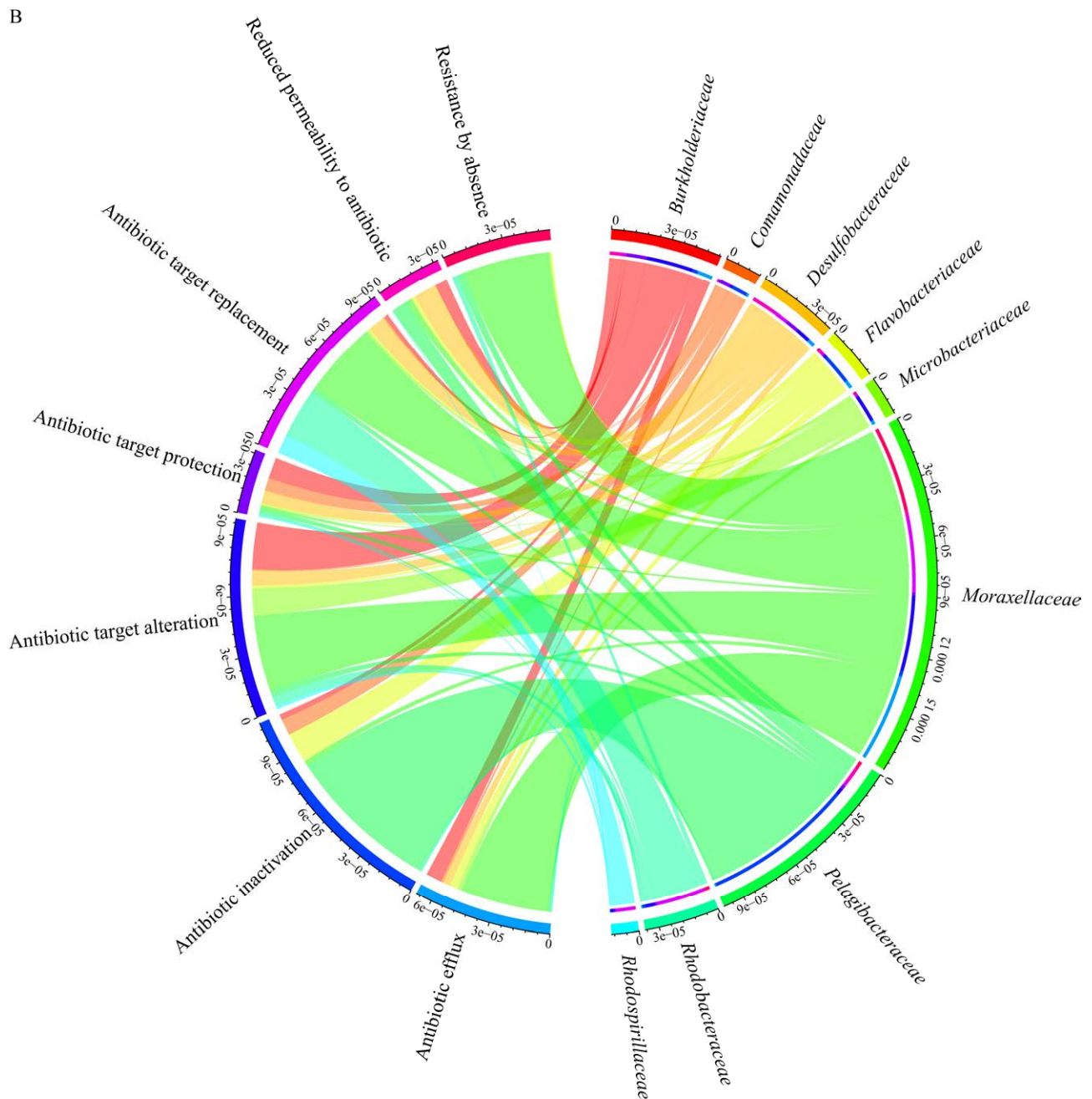


图 4 夏秋季水样中主要微生物的抗性机制 A: 门水平. B: 科水平. 图中左边为不同抗性机制, 右边为不同细菌群落, 中间连线的粗细代表细菌群落和抗性机制的占比程度

Figure 4 Resistance mechanism of main microorganisms in summer and autumn water samples. A: Phylum level. B: Family level. The left side of the figure is different resistance mechanisms, and the right side is different bacterial communities, the thickness of the middle line represents the proportion of bacterial communities and resistance mechanisms.

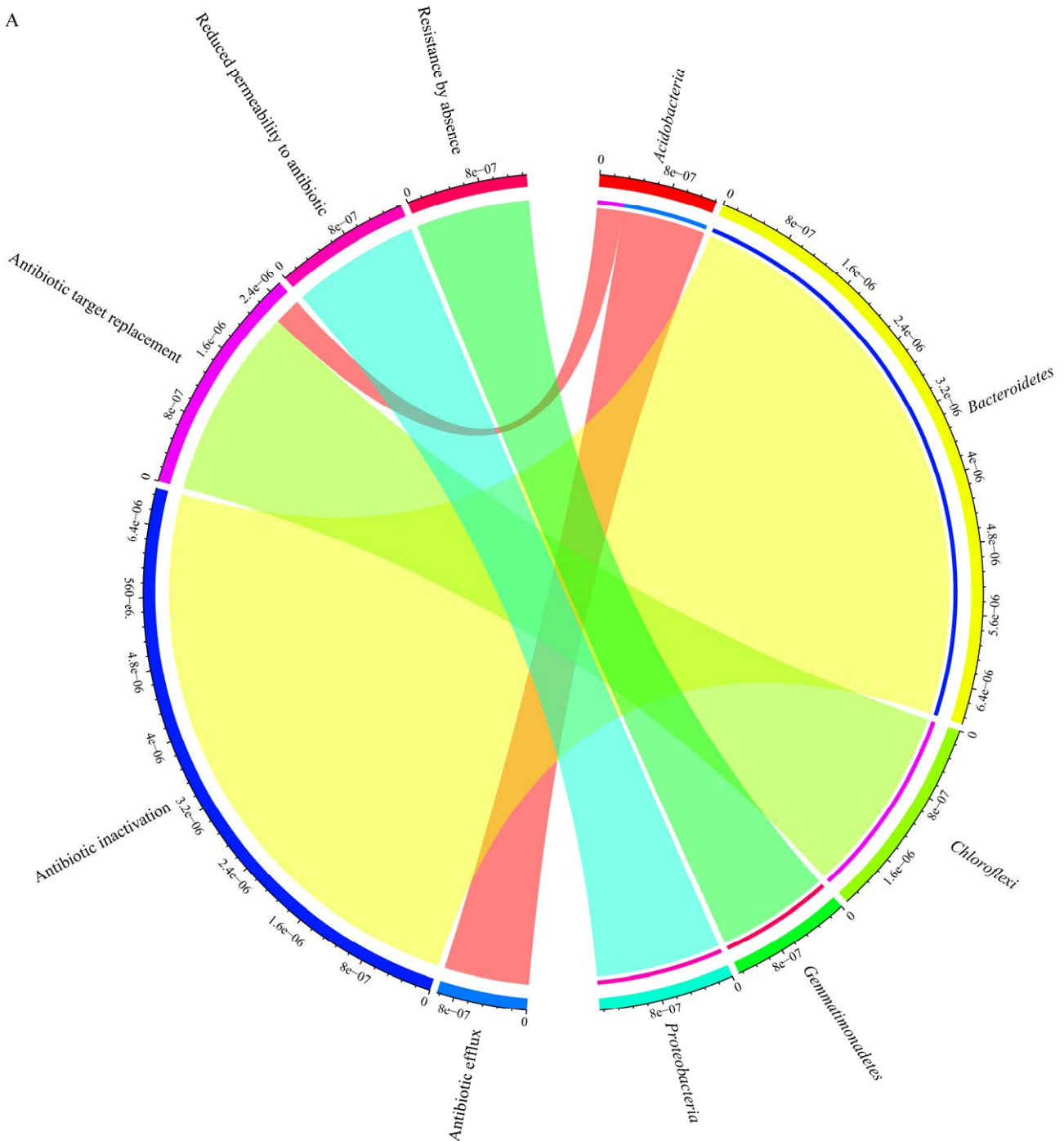
夏秋季沉积物样品中主要门级微生物群落的抗性机制为改变细胞膜渗透性(11.29%)、抗生素靶位替换(19.34%)和抗生素灭活(51.75%), 主

要科级微生物群落的抗性机制为抗生素靶位替换(19.26%)、抗生素灭活(17.13%)、抗生素靶位改变(13.83%)、抗生素外排泵(13.68%)和抗生素

靶位改保护(13.31%) (图 5)。在鉴定出的主要细菌群落中, 拟杆菌门则依靠抗生素灭活机制, 绿弯菌门依赖抗生素靶位替换机制, 变形菌门主要依靠改变细胞膜渗透性的机制(图 5A)。在科水平上, 慢生根瘤菌科涉及多种抗性机制, 最主要的是抗生素靶位改变机制, 伯克氏菌科主要依赖

抗生素靶位保护和改变机制, 丛毛单胞菌科和甲基杆菌科以抗生素靶位替换机制为主, 脱硫杆菌科主要依赖抗生素靶位替换和改变细胞膜渗透性机制, 红细菌科只涉及抗生素灭活和改变细胞膜渗透性两种机制, 黄杆菌科只涉及抗生素灭活机制(图 5B)。

A



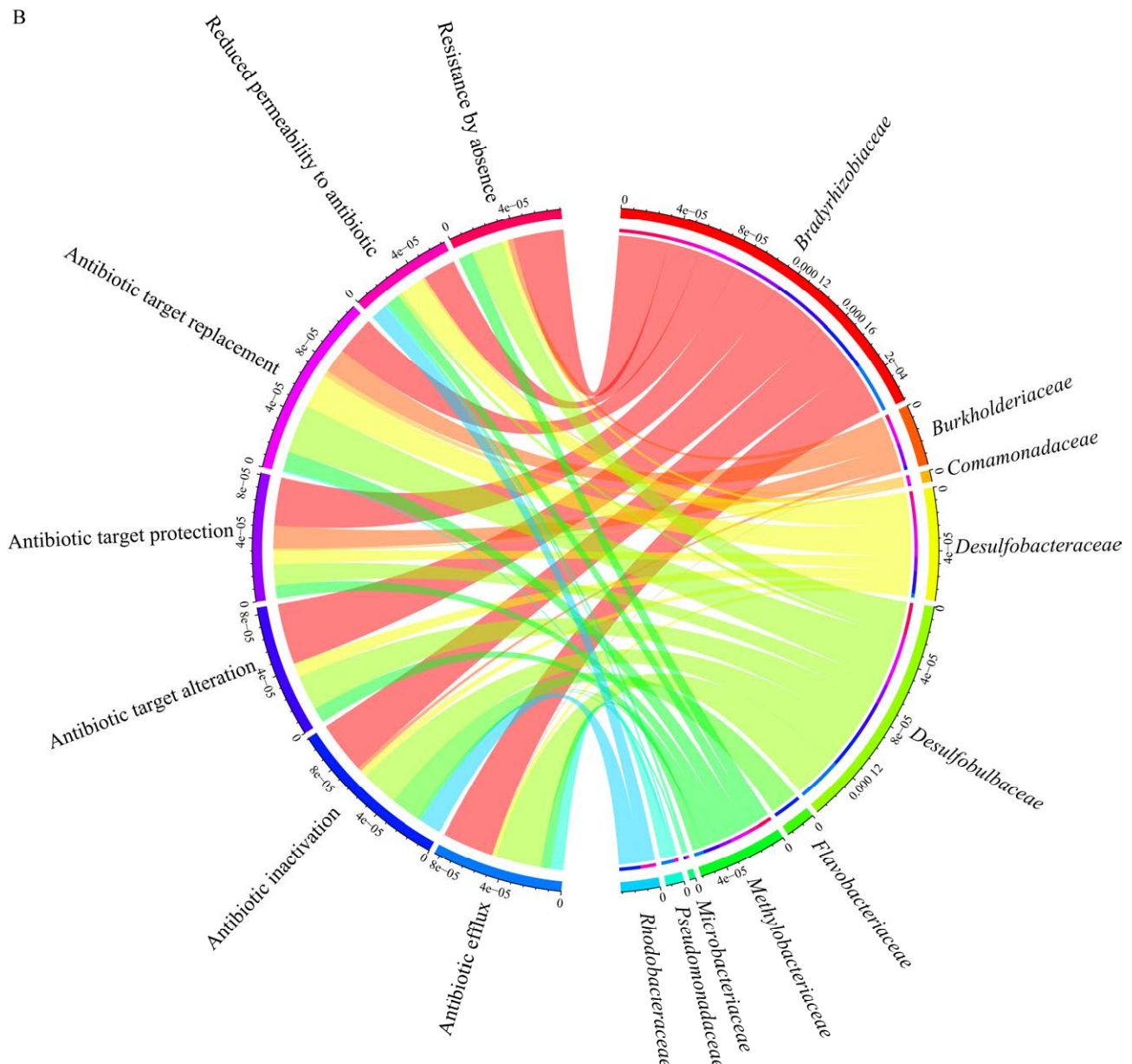


图 5 夏秋季沉积物样品中主要微生物的抗性机制 A: 门水平. B: 科水平. 图中左边为不同抗性机制, 右边为不同细菌群落, 中间连线的粗细代表细菌群落和抗性机制的占比程度

Figure 5 Resistance mechanism of main microorganisms in summer and autumn sediment samples. A: Phylum-level. B: Family-level. The left side of the figure is different resistance mechanisms, and the right side is different bacterial communities, the thickness of the middle line represents the proportion of bacterial communities and resistance mechanisms.

2.4 细菌群落与抗性基因的相关性

在夏秋两季度的水样中, 丰度前 25 的细菌门与丰度前 20 的 ARGs 之间的相关关系如图 6A 所示。丰度前 25 的细菌门中有 20 种与 ARGs

显著相关或极显著相关。从微生物群落结构与 ARGs 之间的关系来看, 共计存在 83 对显著或极显著相关关系(正、负相关), 其中 35 对显著或极显著负相关关系, 48 对显著或极显著正相关

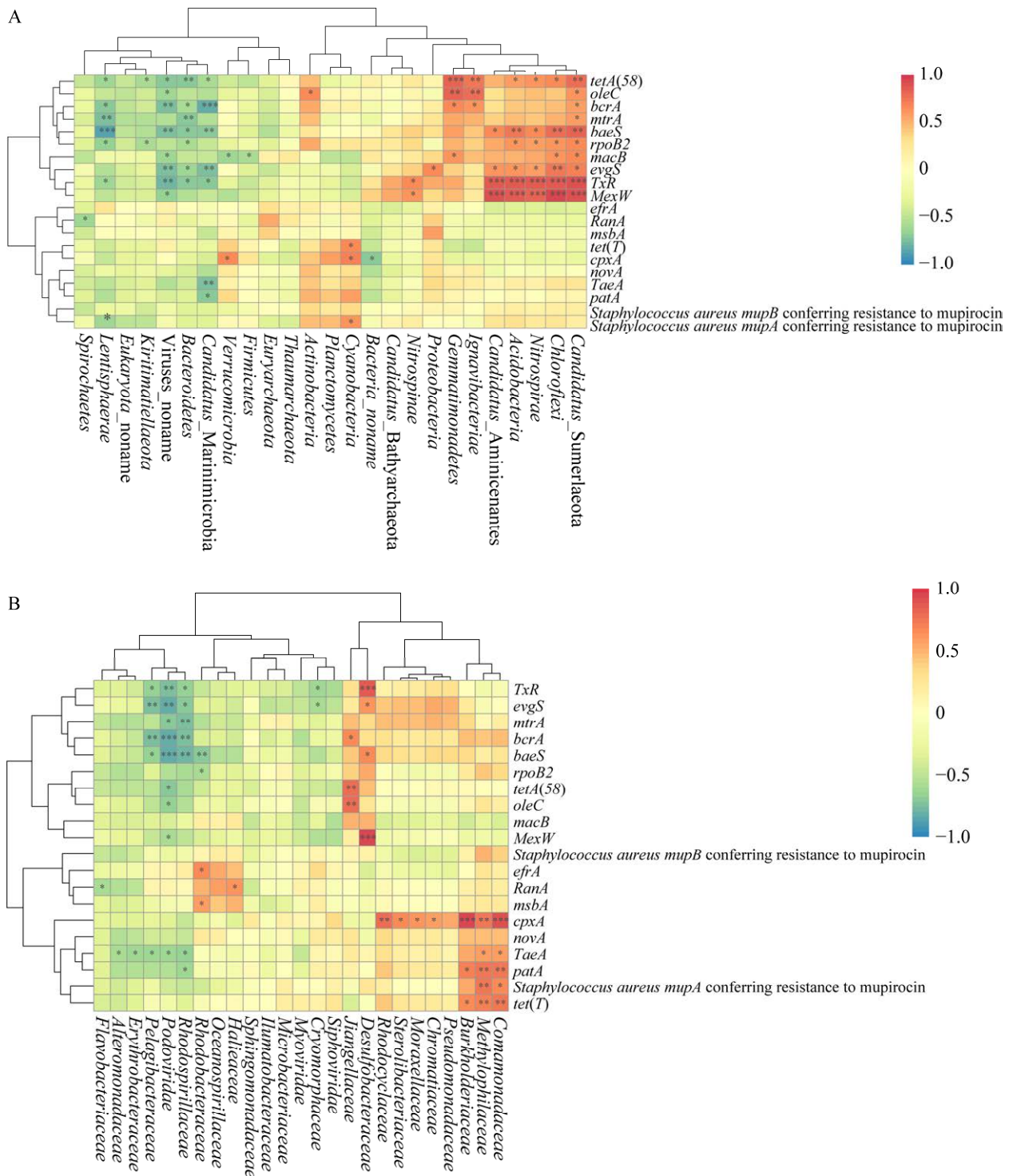


图 6 夏秋季水样中主要微生物群落与 ARGs 的相关性 A: 门水平. B: 科水平. *R* 值(相关系数)在图中以不同颜色表示, 红色表示正相关, 蓝色表示负相关, *: $0.01 \leq P < 0.05$, **: $0.001 \leq P < 0.01$, ***: $P < 0.001$
 Figure 6 The correlation between the main microbial communities in summer and autumn water samples and ARGs. A: Phylum-level. B: Family-level. The *R* value (correlation coefficient) is represented by different colors in the figure, red indicates positive correlation, blue indicates negative correlation, *: $0.01 \leq P < 0.05$, **: $0.001 \leq P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

关系。*TxR* 和 *MexW* 与绿弯菌门(*Chloroflexi*)、硝化螺旋菌门(*Nitrospirae*)和酸杆菌门(*Acidobacteria*)等呈显著或极显著正相关关系($P<0.05$ 或 $P<0.001$); *bcrA* 与海微菌门(*Candidatus_Marinimicrobia*)呈极显著负相关关系($R=-0.84$, $P<0.001$); 海微菌门(*Candidatus_Marinimicrobia*)与 7 种 ARGs 呈显著或极显著负相关关系($P<0.05$ 或 $P<0.001$); 拟杆菌门(*Bacteroidetes*)与 7 种 ARGs 呈显著负相关关系($P<0.05$)。在科水平上, 丰度前 25 的科级细菌与丰度前 20 的 ARGs 之间的相关关系如图 6B 所示。丰度前 25 的科级细菌中有 18 种与 ARGs 显著相关或极显著相关。从微生物群落结构与 ARGs 之间的关系来看, 共计存在 55 对显著或极显著相关关系(正、负相关), 28 对显著或极显著负相关关系, 27 对显著或极显著正相关关系。短尾噬菌体科与 *TxR* 和 *evgS* 等多种 ARGs 呈显著或极显著负相关关系($P<0.05$ 或 $P<0.001$); 丛毛单胞菌科和嗜甲基菌科与 *cpxA* 等多种相同的 ARGs 呈显著或极显著正相关关系($P<0.05$ 或 $P<0.001$); 红细菌科与 2 种 ARGs 呈显著负相关关系($P<0.05$), 与 2 种 ARGs 呈显著正相关关系($P<0.05$)。

在夏秋两季度的沉积物样品中, 丰度前 25 的细菌门与丰度前 20 的 ARGs 之间的相关关系如图 7A 所示。丰度前 25 的细菌门中有 19 种与 ARGs 显著相关或极显著相关。从微生物群落结构与 ARGs 之间的关系来看, 共计存在 118 对显著或极显著相关关系(正、负相关), 81 对显著或极显著负相关关系, 37 对显著或极显著正相关关系。放线菌门与 *novA* 和 *patA* 等多种 ARGs 呈显著或极显著正相关关系($P<0.05$ 或 $P<0.001$); 放线菌门与蓝藻门和 *macB* 及 *baeS* 等 4 种 ARGs 呈显著或极显著负相关关系($P<0.05$ 或 $P<0.001$); *evgS* 与圣诞岛盐菌门等多种门级细菌呈显著或极显著正相关关系($P<0.05$ 或 $P<0.001$); 酸杆菌门和硝化螺旋菌门与 *efrA* 及 *cpxA* 等多种 ARGs

呈显著或极显著正相关关系($P<0.05$ 或 $P<0.001$)。在科水平上, 丰度前 25 的科级细菌与丰度前 20 的 ARGs 之间的相关关系如图 7B 所示。丰度前 25 的科级细菌中有 24 种与 ARGs 显著相关或极显著相关。从微生物群落结构与 ARGs 之间的关系来看, 共计存在 151 对显著或极显著相关关系(正、负相关), 64 对显著或极显著负相关关系, 87 对显著或极显著正相关关系。柄杆菌科(*Caulobacteraceae*)与 2 种 ARGs 呈显著负相关关系($P<0.05$), 与 9 种 ARGs 呈显著或极显著正相关关系($P<0.05$ 或 $P<0.001$); 嗜甲基菌科与 4 种 ARGs 呈显著或极显著负相关关系($P<0.05$ 或 $P<0.001$), 与 7 种 ARGs 呈显著正相关关系($P<0.05$); 伯克氏菌科与 3 种 ARGs 呈显著或极显著负相关关系($P<0.05$ 或 $P<0.001$), 与 7 种 ARGs 呈显著正相关关系($P<0.05$); 微杆菌科与 2 种 ARGs 呈显著负相关关系($P<0.05$)。

2.5 ARGs 的主成分分析及与环境因子的关系

为了研究不同介质中 ARGs 在夏秋两个季度的抗性基因是否具有相似性, 利用主成分分析方法对样品进行了分析。结果表明, 秋季的水样和沉积物样品的 ARGs 样点分别能较好地聚在一起, 说明秋季样品中 ARGs 在不同介质中都表现出较高的相似性, 而夏季样品中的 ARGs 无论是在沉积物样品还是水样中的样点都比较分散, 相似性比较低, 特别是夏季水样中的样点特别分散(图 8A)。可能夏秋两季的水样中存在一些相应的环境因素影响海州湾近岸海域 ARGs 的变化, 而水环境中夏季的总 ARGs 的相对丰度明显高于秋季, 因此将继续对水环境的样本进行分析。

基于 Pearson 对 ARGs 与水环境因子进行了 CCA 分析, 研究水环境影响 ARGs 丰度变化的驱动机制。测定了水样的温度(TEMP)、盐度(SAL)、电导率(σ)、溶氧(DO)、磷酸盐(PHOS)、

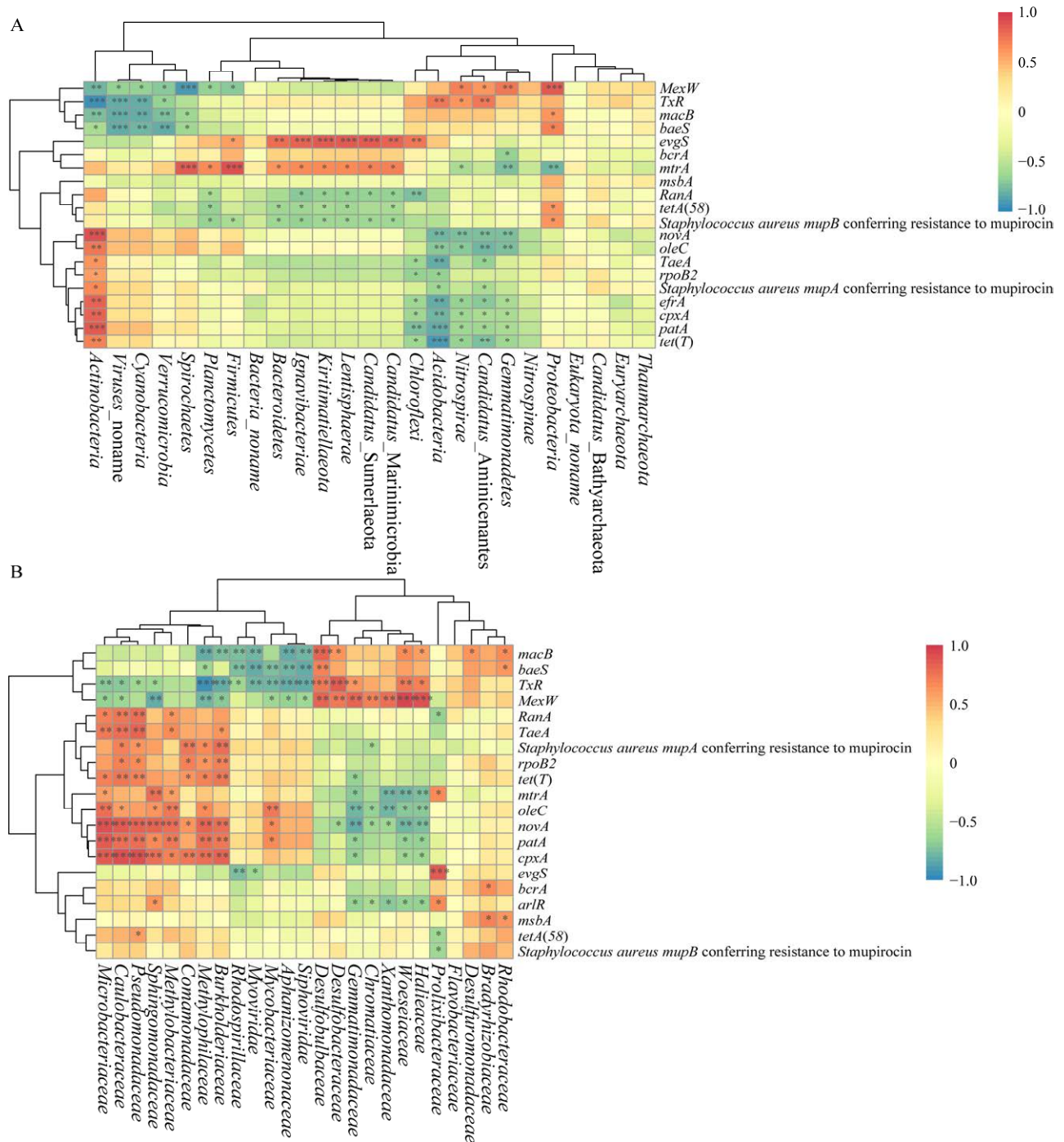


图 7 夏秋季沉积物样品中主要微生物群落与 ARGs 的相关性 A: 门水平. B: 科水平. *R* 值(相关系数)在图中以不同颜色表示, 红色表示正相关, 蓝色表示负相关, *: $0.01 \leq P < 0.05$, **: $0.001 \leq P < 0.01$, ***: $P < 0.001$

Figure 7 The correlation between the main microbial communities in summer and autumn sediment samples and ARGs. A: Phylum-level. B: Family-level. The *R* value (correlation coefficient) is represented by different colors in the figure, red indicates positive correlation, blue indicates negative correlation, *: $0.01 \leq P < 0.05$, **: $0.001 \leq P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

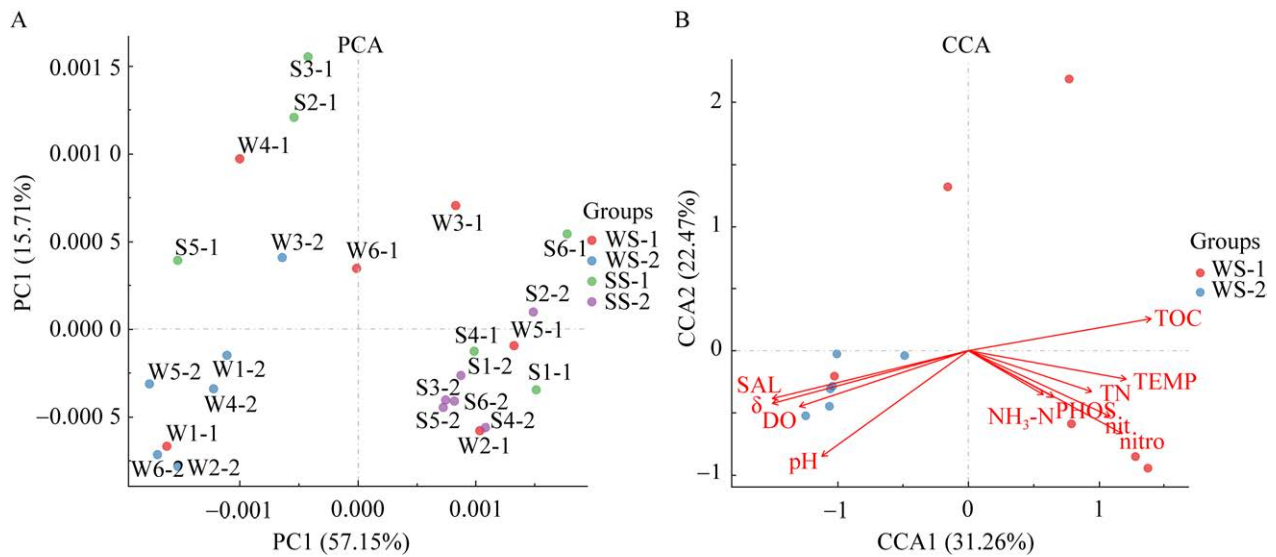


图 8 抗生素抗性基因(ARGs)主成分分析(A)及与环境因子的 CCA 分析(B) WS-1: 夏季水样; WS-2: 秋季水样; SS-1: 夏季沉积物样品; SS-2: 秋季沉积物样品

Figure 8 Principal component analysis of antibiotic resistance genes (A) and CCA analysis (B) with environmental factors. WS-1: Summer water sample; WS-2: Autumn water sample; SS-1: Summer sediment sample; SS-2: Autumn sediment sample.

硝酸盐(nitro)、亚硝酸盐(nit)、总有机碳(TOC)和总氮(TN)等水环境因子。如图 8B 所示, CCA1 轴解释了 31.26% 的 ARGs 的减少, CCA2 轴解释了 22.47%, 其中 pH、溶氧、盐度、硝酸盐和 TOC 与 ARGs 的变化显著相关($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究利用宏基因组测序技术,对海州湾近岸夏秋两季的海域微生物群落和 ARGs 组成及丰度进行了研究。在夏秋季度的水样和沉积物样品中,变形菌门和放线菌门都占据主导地位,检出的科级细菌群落大多属于变形菌门。大连海域沉积物研究表明变形菌门占绝对优势地位^[28],与本研究结果表现出一致性,说明同属黄海的连云港海州湾与大连海域的主要门类细菌具有相似性。微生物群落特征也受温度的调控,进而影响 ARGs 的丰度和迁移传播行为^[29],夏季较高的温度也可能为假单胞菌属等微生物提供了较

为适宜的生存条件^[30],本研究中,红细菌科在秋季水样中表现出较高丰度,假单胞菌属(*Pseudomonas*)和多核杆菌属(*Polynucleobacter*)的相对丰度在夏季的沉积物样品和水样中较高,不动杆菌属(*Acinetobacter*)的相对丰度在夏季的水样中有较高的占比,特别是假单胞菌属和不动杆菌属的适宜生长温度都是 30 °C,证实了温度对细菌群落的调控作用。其他环境也可能对微生物群落特征具有影响,如变形菌门与氮循环有着密切的联系^[31],总氮对该门的一些属级细菌的生长和繁殖具有重要作用^[32],同样有研究表明土壤中的硝态氮含量与拟杆菌门呈显著正相关关系^[33],在本研究中,海州湾夏季水样中氨氮水平较高可能导致变形菌门和拟杆菌门在夏季站位中表现出相对高的丰度。

值得注意的是,本研究在各站位检测出多种与人类相关的致病菌或病原体,比如铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠杆菌

(*Escherichia coli*)、沙眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*)、肉毒杆菌(*Clostridium botulinum*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*)、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、空肠弯曲菌 (*Campylobacter jejuni*) 和土拉弗朗西斯菌 (*Francisella tularensis*)等, 其中土拉弗朗西斯菌在夏季青口河的沉积物样品、秋季青口河水样及夏季龙王河和柘汪河水样中检出, 土拉弗朗西斯菌作为生物安全等级为III级的高风险人类致病菌, 具有可以通过空气高效传播的特质, 有很高的传染性, 需要人们提高警惕^[34]。在海州湾检出的致病菌也在其他海洋环境中检出, 如在浙江象山港的海洋沉积物中检出高丰度的肺炎链球菌、肺炎克雷伯菌和铜绿假单胞菌^[35], 相较而言, 海州湾检出的致病菌种类要更多一些。海州湾中大量致病菌在海州湾水样或沉积物中的检出暗示此海域对公众健康可能存在潜在威胁。

就抗性机制而言, 海州湾主要微生物群落的抗性机制在不同介质中无统一的分布趋势, 主要门级和科级微生物群落依赖的抗性机制也无良好的相似性, 但大部分的研究表明在水环境中抗性机制多以抗生素外排泵为主^[36], 而海州湾河口地区中的外排泵机制并不是主要的抗性机制, 说明河流入海口区域的主要抗性机制可能与其他水环境的主要抗性机制具有差异。

就 ARGs 与微生物群落的相关性而言, 徐秋鸿等认为当微生物与目的 ARGs 呈显著正相关关系时, 这些微生物可能是 ARGs 的潜在宿主; 当微生物与目的 ARGs 呈显著负相关关系时, 这些微生物可能会影响 ARGs 的水平转移^[37]。海州湾水样中绿弯菌门、硝化螺旋菌门和酸杆菌门可能是 *TxR* 和 *MexW* 等 ARGs 的潜在宿主, 海

微菌门可能影响 *bcrA* 的水平转移, 短尾噬菌体科可能影响 *TxR* 和 *evgS* 等多种 ARGs 的水平转移, 丛毛单胞菌科和嗜甲基菌科可能是 *cpxA* 等多种相同 ARGs 的潜在宿主, 在水样和沉积物样品中存在单一的微生物群落与多种 ARGs 或单一的 ARG 与微生物群落存在相关关系, 说明单一的微生物可以是多种 ARGs 的潜在宿主, 也可以影响不同 ARGs 的水平转移, 而单一的 ARG 也能有多种宿主。总体而言, 在门级和科级微生物群落与 ARGs 的相关性分析中, 沉积物中往往存在更多的显著或极显著负相关关系, 特别是在 ARGs 与门级微生物群落的相关性分析中, 沉积物中微生物群落与 ARGs 的显著或极显著负相关关系数量有很大的提升, 说明沉积物环境中的微生物群落更能影响 ARGs 的水平转移, 由于科级微生物并不占总体样本的主体, 因此科级微生物群落与 ARGs 的相关性分析并不能完全说明整个样本中 ARGs 与微生物群落关系的概况。

对于 ARGs 的研究, 夏季 ARGs 的总相对丰度是要高于秋季的, 特别是在 5 个河流入海口站位中表现得尤为明显, 这也与长江口及邻近海域中 ARGs 在夏季的高水平表现出一致性^[38]。ARGs 总相对丰度在沉积物中的季节性变化不明显, 与在中越边境北仑河的研究相类似^[39], 表明与水环境相比, 海州湾沉积物是一个相对稳定的 ARGs 储存库。环境因子对抗性基因有影响毋庸置疑^[40], 同为黄海海域的烟台四十里湾, 其 ARGs 丰度在很大程度上受到降雨的调控^[41]。本研究中, 夏秋季水样中的 ARGs 表现出很大的差异, 夏季水样相似性低, 秋季水样中的相似性较高, CCA 分析表明 TOC、盐度、溶氧、硝酸盐和 pH ($P < 0.05$) 是影响 ARGs 的重要环境变量, 而这些环境因子中大部分易受到降雨影响。由于海州湾受季风气候影响, 降水集中于夏季, 与秋季相比, 河流入海口站位海水的水环境在夏季出

现了明显的变化,从而导致夏季河流入海口站位的 ARGs 相对丰度比秋季高,表明地表径流是海州湾近岸海域 ARGs 的主要来源之一。沉积物样品的 S5-1 站位中 ARGs 相对丰度表现出较低水平则可能是由于一系列人为的河流治理措施导致,研究表明污水处理厂对 ARGs 有一定的去除效果^[42]。总体而言,海州湾近岸海域 ARGs 在夏秋季度的变化受多方面因素调控,需要更加全面的分析才能更准确地解释其变化规律。

4 结论

本研究利用宏基因组分析方法对海州湾近岸海域夏秋季不同介质中的微生物群落的组成和主要抗性机制, ARGs 的组成和分布,以及微生物群落与 ARGs 的相关性进行了分析。夏秋季不同介质中微生物群落在门水平上有较高的稳定性,都以变形菌门和放线菌门为优势门类,水样中优势的科级细菌为红细菌科,沉积物样品中为脱硫杆菌科,且红细菌科和脱硫杆菌科同属变形菌门。水样中总 ARGs 的相对丰度从夏季到秋季有明显下降的趋势,而沉积物中总 ARGs 的相对丰度受季节变化影响较小。在水样中主要微生物的抗性机制是主要抗生素靶位替换和抗生素靶位保护,沉积物样品中则以抗生素灭活机制为主。沉积物中的微生物群落更能影响 ARGs 的水平转移,同种 ARGs 有多种潜在的宿主。TOC、盐度、溶氧、硝酸盐和 pH 等环境因子能显著影响水环境中 ARGs 的组成和相对丰度。对海州湾夏秋季节不同介质样本进行的分析研究,有助于更清楚地了解此海域微生物群落和 ARGs 的组成和变化以及 ARGs 与微生物群落的相关关系。同时,大量 ARGs 及人类致病菌的检出也表明近岸海域的河流入海口地区的 ARGs 污染需要更多的关注。

REFERENCES

- [1] KNAPP CW, DOLFING J, EHLERT PAI, GRAHAM DW. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940[J]. *Environmental Science and Technology*, 2010, 44(2): 580-587.
- [2] BRADLEY P. Antimicrobial resistance-is wound care prepared?[J]. *Journal of Wound Care*, 2020, 29(12): 738-740.
- [3] ZHU GB, WANG XM, YANG T, SU JQ, QIN Y, WANG SY, GILLINGS M, WANG C, JU F, LAN BR, LIU CL, LI H, LONG XE, WANG XM, JETTEN MSM, WANG ZF, ZHU YG. Air pollution could drive global dissemination of antibiotic resistance genes[J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(1): 270-281.
- [4] PRUDEN A, PEI RT, STORTEBOOM H, CARLSON KH. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(23): 7445-7450.
- [5] ECHEVERRIA-PALENCIA CM, THULSIRAJ V, TRAN N, ERICKSEN CA, MELENDEZ I, SANCHEZ MG, WALPERT D, YUAN T, FICARA E, SENTHILKUMAR N, SUN FF, LI RJ, HERNANDEZ-CIRA M, GAMBOA D, HARO H, PAULSON SE, ZHU YF, JAY JA. Disparate antibiotic resistance gene quantities revealed across 4 major cities in California: a survey in drinking water, air, and soil at 24 public parks[J]. *ACS Omega*, 2017, 2(5): 2255-2263.
- [6] QUINTELA-BALUJA M, ABOUENLAGA M, ROMALDE J, SU JQ, YU YJ, GOMEZ-LOPEZ M, SMETS B, ZHU YG, GRAHAM DW. Spatial ecology of a wastewater network defines the antibiotic resistance genes in downstream receiving waters[J]. *Water Research*, 2019, 162: 347-357.
- [7] ZHU YG, JOHNSON TA, SU JQ, QIAO M, GUO GX, STEDTFELD RD, HASHSHAM SA, TIEDJE JM. 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.
- [8] BUELOW E, RICO A, GASCHET M, LOURENÇO J, KENNEDY SP, WIEST L, PLOY MC, DAGOT C. Hospital discharges in urban sanitation systems: long-term monitoring of wastewater resistome and microbiota in relationship to their eco-exposome[J]. *Water Research X*, 2020, 7: 100045.
- [9] PRUDEN A, ARABI M, STORTEBOOM HN.

- Correlation between upstream human activities and riverine antibiotic resistance genes[J]. *Environmental Science and Technology*, 2012, 46(21): 11541-11549.
- [10] BAI XM, SHI PJ, LIU YS. Society: realizing China's urban dream[J]. *Nature*, 2014, 509(7499): 158-160.
- [11] LI D, ZENG SY, HE M, GU AZ. Water disinfection byproducts induce antibiotic resistance-role of environmental pollutants in resistance phenomena[J]. *Environmental Science and Technology*, 2016, 50(6): 3193-3201.
- [12] WANG Y, LU J, ZHANG S, LI J, MAO LK, YUAN ZG, BOND PL, GUO JH. Non-antibiotic pharmaceuticals promote the transmission of multidrug resistance plasmids through intra- and intergenera conjugation[J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(9): 2493-2508.
- [13] LINUS S. Low sub-minimal inhibitory concentrations of antibiotics generate new types of resistance[J]. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 2019, 11: 46-48.
- [14] SINGH R, SINGH AP, KUMAR S, CIRI BS, KIM KH. Antibiotic resistance in major rivers in the world: a systematic review on occurrence, emergence, and management strategies[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2019, 234: 1484-1505.
- [15] SU JQ, AN XL, LI B, CHEN QL, GILLINGS MR, CHEN H, ZHANG T, ZHU YG. Metagenomics of urban sewage identifies an extensively shared antibiotic resistome in China[J]. *Microbiome*, 2017, 5(1): 1-15.
- [16] CHEN BW, LIANG XM, NIE XP, HUANG XP, ZOU SC, LI XD. The role of class I integrons in the dissemination of sulfonamide resistance genes in the Pearl River and Pearl River Estuary, South China[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 282: 61-67.
- [17] MAKKAEW P, KONGPRAJUG A, CHYERACHANA N, SRESUNG M, PRECHA N, MONGKOLSUK S, SIRIKANACHANA K. Persisting antibiotic resistance gene pollution and its association with human sewage sources in tropical marine beach waters[J]. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2021, 238: 113859.
- [18] LI DH, LIU CM, LUO RB, SADAKANE K, LAM TW. 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.
- [19] ZHU WH, LOMSADZE A, BORODOVSKY M. Ab initio gene identification in metagenomic sequences[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(12): e132.
- [20] FU LM, NIU BF, ZHU ZW, WU ST, LI WZ. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(23): 3150-3152.
- [21] LANGMEAD B, SALZBERG SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(4): 357-359.
- [22] OKSANEN J, BLANCHET FG, FRIENDLY M, KINDT R, LEGENDRE P, MCGLINN D, MINCHIN PR, OHARA RB, SIMPSON GL, SOLYMOS P. Vegan: community ecology package[J]. *R Package*, 2010, 23: 2010.
- [23] WICKHAM H, CHANG W. ggplot2: an implementation of the Grammar of Graphics[J]. *R Package version 0.7*, 2016. <http://CRAN.R-project.org/package=ggplot2>, 3.
- [24] DIAO C, XI Y, XIAO T. Identification and analysis of key genes in osteosarcoma using bioinformatics[J]. *Oncology Letters*, 2017, 15(3): 2789-2794.
- [25] KRZYWINSKI M, SCHEIN J, BIROL Í, CONNORS J, GASCOYNE R, HORSMAN D, JONES SJ, MARRA MA. Circos: an information aesthetic for comparative genomics[J]. *Genome Research*, 2009, 19(9): 1639-1645.
- [26] WHITE JR, NAGARAJAN N, POP M. Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples[J]. *PLoS Computational Biology*, 2009, 5(4): e1000352.
- [27] SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, GEVERS D, MIROPOLSKY L, GARRETT WS, HUTTENHOWER C. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. *Genome Biology*, 2011, 12(6): R60.
- [28] 李明月. 大连黄海沿岸潮间带沉积物细菌群落结构及其与环境因子相关性研究[D]. 大连: 辽宁师范大学硕士学位论文, 2021.
- LI MY. Study on bacterial community structure and its correlation with environmental factors in intertidal sediments along the Yellow Sea coast of Dalian[D]. Dalian: Master's Thesis of Liaoning Normal University, 2021 (in Chinese).
- [29] 李丹怡, 王许诺, 张广桔, 王增焕, 黄珂. 水产养殖环境中抗生素抗性基因(ARGs)研究进展[J]. *南方水产科学*, 2022, 18(5): 166-176.
- LI DY, WANG XN, ZHANG GJ, WANG ZH, HUANG K. Advances on antibiotic resistance genes (ARGs) in aquaculture environment[J]. *South China Fisheries Science*, 2022, 18(5): 166-176 (in Chinese).
- [30] 许瑛. 冷冻胁迫对荧光假单胞菌致病性和致腐性的影响及机理初探[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2021.
- XU Y. Preliminary study on the effect of freezing stress on pathogenicity and putrefaction of *Pseudomonas*

- fluorescens and the mechanism[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2021 (in Chinese).
- [31] 曲疆奇, 张清靖, 俞文钰, 刘盼, 杨慕, 贾成霞, 朱华. 生态浮床池塘水体核心微生物种类及氮循环功能研究[J]. 农业资源与环境学报, 2023(2): 302-313.
QU JQ, ZHANG QJ, YU WY, LIU P, YANG M, JIA CX, ZHU H. Core microbiome and nitrogen cycling in ecological floating-bed ponds[J]. Journal of Agricultural Resources and Environment, 2023(2): 302-313 (in Chinese).
- [32] 杨浩. 窖水中细菌群落结构和功能的季节性变化及其与水质因子的交互响应[D]. 兰州: 兰州交通大学博士学位论文, 2018.
YANG H. Seasonal changes of bacterial community structure and function in cellar water and their interaction with water quality factors[D]. Lanzhou: Doctoral Dissertation of Lanzhou Jiaotong University, 2018 (in Chinese).
- [33] 王礼霄, 刘晋仙, 柴宝峰. 华北亚高山土壤细菌群落及氮循环对退耕还草的响应[J]. 生态环境学报, 2022, 31(8): 1537-1546.
WANG LX, LIU JX, CHAI BF. Response of soil bacterial community and nitrogen cycle during the natural recovery of abandoned farmland in subalpine of the North China[J]. Ecology and Environment Sciences, 2022, 31(8): 1537-1546 (in Chinese).
- [34] 李昭宏, 谢秀琴, 原珂, 杨颖, 黄永顺, 陈保卫, 林岚. 中国边缘海沉积物中抗生素抗性基因和致病菌的组成特征[J]. 环境化学, 2023, 42(3): 805-812.
LI ZH, XIE XQ, YUAN K, YANG Y, HUANG YS, CHEN BW, LIN L. Compositional characteristics of antibiotic resistance genes and putative pathogenic bacteria in sediments of Chinese marginal seas[J]. Environmental Chemistry, 2023, 42(3): 805-812 (in Chinese).
- [35] YANG J, WANG C, SHU C, LIU L, GENG JN, HU SN, FENG J. Marine sediment bacteria harbor antibiotic resistance genes highly similar to those found in human pathogens[J]. Microbial Ecology, 2013, 65(4): 975-981.
- [36] 刘钰淳. 红树林、河口生境中抗生素抗性基因的分布规律及传播机制的研究[D]. 汕头: 汕头大学硕士学位论文, 2022.
LIU YC. Study on the distribution and transmission mechanism of antibiotic resistance genes in mangrove and estuary habitats[D]. Shantou: Master's Thesis of Shantou University, 2022 (in Chinese).
- [37] 徐秋鸿, 刘曙光, 娄厦, RADNAEVA LD, NIKITINA E, NIKOLAVICH MA, TAVARES AJ, 金宇辰, 李鑫. 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]. 环境科学, 2023, 44(1): 158-168.
XU QH, LIU SG, LOU S, RADNAEVA LD, NIKITINA E, NIKOLAVICH MA, TAVARES AJ, JIN YC, LI X. Distributions of antibiotic resistance genes and microbial communities in the nearshore area of the Yangtze River Estuary[J]. Environmental Science, 2023, 44(1): 158-168 (in Chinese).
- [38] 徐慕. 上海市沙田湖水产养殖区抗生素抗性基因污染特征研究[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2021.
XU M. Study on the characteristics of antibiotic resistance gene pollution in Shatian Lake aquaculture area of Shanghai[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2021 (in Chinese).
- [39] ZHU LJ, LI RL, YAN Y, CUI L. Urbanization drives the succession of antibiotic resistome and microbiome in a river watershed[J]. Chemosphere, 2022, 301: 134707.
- [40] 贾世杰, 王娇, 王钦, 刘晓环, 祁建华, 高会旺. 青岛冬春季大气气溶胶中抗生素抗性基因组成及影响因素[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2022, 52(8): 60-70.
JIA SJ, WANG J, WANG Q, LIU XH, QI JH, GAO HW. Airborne antibiotic resistance genes composition and the influencing factors in Qingdao during winter and spring[J]. Periodical of Ocean University of China, 2022, 52(8): 60-70 (in Chinese).
- [41] WANG JH, LU J, WU J, FENG YX. Seasonal distribution of antibiotic resistance genes under the influence of land-ocean interaction in a semi-enclosed bay[J]. Chemosphere, 2022, 301: 134718.
- [42] CALDERÓN-FRANCO D, SARELSE R, CHRISTOU S, PRONK M, van LOOSDERCHT MCM, ABEEL T, WEISSBRODT DG. Metagenomic profiling and transfer dynamics of antibiotic resistance determinants in a full-scale granular sludge wastewater treatment plant[J]. Water Research, 2022, 219: 118571.