

DOI:10.3876/j.issn.1000-1980.2022.06.010

环丙沙星和铜复合污染下河流底质微生物群落与 抗生素抗性基因的交互关系

李 轶^{1,2}, 胡 童^{1,2}, 王琳琼³, 范晨阳^{1,2}

(1. 河海大学环境学院, 江苏 南京 210098;
2. 河海大学浅水湖泊综合治理与资源开发教育部重点实验室, 江苏 南京 210098;
3. 河海大学海洋学院, 江苏 南京 210098)

摘要: 选择环丙沙星(CFC)和铜(Cu)作为目标污染物,设计室内驯化试验,通过 16S rRNA 高通量测序、定量 PCR 等技术探究 CFC 和 Cu 复合污染下河流底质微生物群落与抗生素抗性基因(ARGs)间的交互关系。结果表明,CFC 单一污染、Cu 单一污染和复合污染试验组中 ARGs 丰度、微生物群落组成及功能存在显著差异;所有试验组的总 ARGs 相对丰度呈现随时间先增后减的变化趋势。共现网络分析表明,*intI1* 与 3 类 ARGs 和 8 个菌群相关,是 ARGs 和微生物群落之间的桥梁;所属变形菌门、酸杆菌门、厚壁菌门、拟杆菌门和绿弯菌门的细菌最有可能成为水环境中 ARGs 的潜在宿主。基于偏冗余分析发现,在 MGEs、微生物群落和污染物等因素中微生物群落对 ARGs 丰度变化总解释率最高(49.77%);路径分析表明,CFC 和 Cu 主要通过微生物群落间接地影响 ARGs 的传播和扩散。

关键词: 抗生素抗性基因;微生物群落;环丙沙星;铜;复合污染

中图分类号: X173 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-1980(2022)06-0075-10

Interaction relationship between microbial communities and antibiotic resistance genes under ciprofloxacin and copper co-contamination in river sediments

LI Yi^{1,2}, HU Tong^{1,2}, WANG Linqiong³, FAN Chenyang^{1,2}

(1. College of Environment, Hohai University, Nanjing 210098, China;
2. Key Laboratory of Integrated Regulation and Resources Development of Shallow Lakes of Ministry of Education, Hohai University, Nanjing 210098, China;
3. College of Oceanography, Hohai University, Nanjing 210098, China)

Abstract: In this study, the ciprofloxacin (CFC) and copper (Cu) were selected as the target pollutants, indoor culture experiments were designed, and the interaction relationship between microbial communities and antibiotic resistance genes (ARGs) under ciprofloxacin and copper co-contamination in river sediments was explored using high throughput 16S rRNA sequencing and quantitative PCR. The results showed that the ARGs abundance, microbial community composition and functions were significantly different among different experimental groups (CFC contamination, Cu contamination and co-contamination). The total relative abundance of ARGs of each sample showed an increasing trend first, and then it decreased at the end of culture experiment. Co-occurrence network analysis suggested that *intI1* was associated with 3 types of ARGs and 8 bacterial communities, regarded as a bridge between ARGs and microbial community. Meanwhile, the bacteria that belonged to Proteobacteria, Acidobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes and Chloroflexi was considered as the potential ARGs hosts in the aquatic environment. Based on the partial redundancy analysis, the microbial community had the highest overall interpretation rate (49.77%) for the change of ARGs abundance among MGEs, microbial communities, pollutants and other factors. At last, the path analysis showed that CFC and Cu pollutants indirectly affect the spread and diffusion of ARGs mainly through microbial communities.

Key words: antibiotic resistance genes; microbial community; ciprofloxacin; copper; co-contamination

基金项目: 国家自然科学基金(5210100094);中央高校基本科研业务费专项(B210201006)

作者简介: 李轶(1975—),男,教授,博士,主要从事水污染控制与水环境修复研究。E-mail:envly@hhu.edu.com

通信作者: 王琳琼(1992—),女,讲师,博士,主要从事沿海环境微生物耐药性研究。E-mail:594532408@qq.com

引用本文: 李轶,胡童,王琳琼,等. 环丙沙星和铜复合污染下河流底质微生物群落与抗生素抗性基因的交互关系[J]. 河海大学学报(自然科学版),2022,50(6):75-84.

LI Yi, HU Tong, WANG Linqiong, et al. Interaction relationship between microbial communities and antibiotic resistance genes under ciprofloxacin and copper co-contamination in river sediments[J]. Journal of Hohai University(Natural Sciences), 2022, 50(6): 75-84.

抗生素具有高效、强力、广谱的杀菌特性,在医疗、畜牧、养殖等领域均有广泛的应用。根据中华人民共和国国家卫生健康委员会统计,2019 年我国抗生素使用量达到 16.1 万 t。人和畜禽对抗生素的利用率有限,摄入的抗生素约有 40% 会排出体外,这些含有抗生素的污水部分被直接排入水环境中^[1-2]。尽管环境中微生物可对抗生素等有机物进行转化和降解,但由于其降解率较低^[3],导致其在环境中累积。大量研究表明,抗生素的过量使用是抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes,ARGs)在环境中出现和广泛传播最主要和直接的原因^[4]。通过可移动遗传元件(mobile genetic elements,MGEs),ARGs 从基因组转移到噬菌体或质粒,从而促进了水环境中耐药细菌(antibiotic resistance bacteria,ARB)和 ARGs 的增殖和传播^[5]。

河流底质为微生物提供了优良的栖息场所,是水环境中微生物生命活动最活跃的区域,同时微生物也是河流中物质循环的主要参与者,决定着河流生态系统的稳定性^[6]。ARGs 作为一种基因层面的污染物,其传播和扩散与微生物的生命活动存在联系。微生物群落与 ARGs 之间有着复杂的相互作用机制,微生物群落组成的变化会影响 ARGs 宿主或敏感菌的丰度变化^[7-8]。反之,ARGs 的大量排入会对环境中土著微生物群落造成影响,获得 ARGs 的菌种可能被赋予更强的生存优势,再加上外源污染的干扰,最终导致微生物群落组成的变化^[9-10]。此外,在一定条件下,ARGs 会在不同种属的细菌间传播,一旦人类致病菌获得 ARGs,就可能对抗生素产生耐药性,导致抗生素治疗的失效,威胁人类健康^[11]。

河流底质作为众多污染物的“汇”,抗生素、重金属等污染物被频繁检出。胡冠九等^[12]对江苏省某市河流中抗生素浓度进行检测分析,结果表明磺胺类含量相对最高(51.9%),其次是四环素类(29.9%)和喹诺酮类(14.5%),其中磺胺类药物最高质量浓度可达 52.7 ng/L。封梦娟等^[13]对长江南京段水源水中 14 种抗生素进行测定,平均质量浓度为 0.14~49.91 ng/L,其中克林霉素作为首要污染抗生素,其质量浓度高达 739.44 ng/L。王龙飞等^[14]研究表明,在河流底泥和附着生物膜中磺胺类抗生素质量浓度分别为 NF(未检出)~47.3 ng/g 和 NF~3 759.1 ng/g。另外,重金属作为难降解污染物之一,在河流底质中浓度较高。肖艳春等^[15]对河流底泥中重金属含量检测分析发现,在污水处理厂排污口的点位,Ni(223.81 mg/kg)和 Cd(20.17 mg/kg)质量分数最高,而 Zn 和 Cu 呈现空间差异性,从河流上游至下游其质量分数逐渐增加,最高值分别可达 284.55 mg/kg 和 95.47 mg/kg。河流底质环境中污染物的赋存直接影响底质微生物群落的多样性、结构及功能,进而影响 ARGs 的分布及传播。

抗生素在河流环境中作为主要的相关性因素可直接促进相关 ARGs 的增殖与传播,同时还可能与其他类抗性基因存在联系^[16]。尽管大多数环境中抗生素的残留处在一个较低的水平,但仍会对 ARGs 有选择作用^[17]。Yang 等^[18]对洞庭湖中的抗生素和 ARGs 含量进行了调查,8 种抗生素的总质量分数(磺胺类 4 种和四环素类 4 种)在 60.02~321.04 μg/kg 之间,同时在底质样品中 *sul1*、*sul2*、*tetA*、*tetC* 和 *tetM* 等抗性基因均被检出,且 ARGs、残留抗生素和底质特征之间存在显著的相关性。此外,河流底质中重金属的赋存同样会对 ARGs 施加选择压力,从而提高环境中 ARGs 的丰度^[19-20]。有研究发现,环境中的重金属浓度与 ARGs 丰度呈正相关关系,表明 ARGs 丰度的增加也可能与重金属污染有关^[21-22]。然而,目前关于抗生素和重金属复合污染条件下河流底质微生物群落特征及其与 ARGs 间的交互研究较少,两者间的相互作用关系仍有待进一步研究。

本文选择环丙沙星(ciprofloxacin,CFC)和铜(copper,Cu)为代表性抗生素和重金属,采集江苏省南京市秦淮河江宁段污水处理厂上游点位的底质和水体样品进行微宇宙试验。通过设计室内驯化试验,利用高通量测序和荧光定量 PCR 等生物信息学技术,检测分析微生物群落组成和 ARGs 丰度,通过部分冗余性分析、路径分析、网络分析等方法,分析微生物群落和 ARGs 对复合污染的响应,考察微生物群落特征对环境因子的响应及其与 ARGs 的交互关系,探究微生物群落及污染物对 ARGs 传播扩散的作用机制,从而为河流中 ARGs 的污染防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

河流底泥样品于 2021 年 9 月 8 日取自于江苏省南京市秦淮河江宁段污水处理厂上游河流,采用抓斗式采泥器采集水泥界面向下 0~20 cm 处的底泥。将采集到的沉积物装入聚乙烯塑料袋中,避光封口后带回实验室,去除石块、水生动物和植物残体后混合均匀,随后转移到 4℃ 冰箱内保存直至驯化试验待用。

1.2 试剂与器材

试剂:环丙沙星(生物级)、CuSO₄·5H₂O、Na₂HPO₄·2H₂O、MgSO₄·7H₂O、NaHCO₃、Na₂CO₃、NaNO₃、Na₂SO₄、(NH₄)₂·SO₄、KH₂PO₄、NaCl、KCl 和 NH₄Cl 均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司;FastDNA Spin Kit for Soil(MP bio 土壤基因组 DNA 提取试剂盒)、SYBR Green qPCR Mix(2×实时定量 PCR 预混液)、Platinum Taq DNA 聚合酶、50×TAE 缓冲液、6×DNA Loading Buffer、DL2000 DNA Marker 和 10×Ex Taq Buffer 购于生工生物工程(上海)股份有限公司。

器材:无菌超净台、高速离心机(德国 Eppendorf)、移液枪(1 μL、2 μL、10 μL、100 μL 和 1 000 μL)、电泳仪(BIO-RAD,美国)、凝胶成像仪(Tanon-3500,上海天能)、实时荧光定量 PCR 仪(ABI7500,美国 Applied Biosystems)、漩涡振荡仪、水浴锅(HH-4,常州普天仪器制造有限公司)和高压灭菌锅等。耗材有 2 mL 离心管、不同规格的枪头、96 孔 PCR 板、八连排 PCR 管等。所有耗材均经过高压灭菌锅灭菌处理后使用。

1.3 试验方法

1.3.1 试验设计

无机营养盐的配置:称取 K₂HPO₄(3.80 g)、KH₂PO₄(1.00 g)、NaCl(1.00 g)、MgSO₄(0.20 g)和 NH₄Cl(0.10 g)溶于 1 L 蒸馏水中,并用玻璃棒搅拌透明后,4℃保存待用。

驯化试验设置:准备 15 个 500 mL 的锥形瓶作为底质驯化培养的容器,共 5 个试验组,每组包括 3 个平行试验,且分别在第 0 d、5 d、15 d、30 d 采取底质样品。在每个锥形瓶中加入 175 g 已处理好的底质样品。以蒸馏水为溶剂分别配置 10 mg/kg 的 CFC 储备液和 1 000 mg/kg 的硫酸铜储备液,根据表 1 的最终质量分数设定值,量取 3.5 mL CFC 储备液至 CFC1 和 CC1 组的 6 个锥形瓶中,量取 8 mL CFC 储备液至 CFC2 和 CC2 组的 6 个锥形瓶中,量取 16 mL 硫酸铜储备液至 Cu、CC1 和 CC2 组的 9 个锥形瓶中,最后用无机营养盐将所有锥形瓶的净重补至 200 g,搅拌均匀并贴上标签,用封口膜封住瓶口,在 25℃ 黑暗环境中驯化培养。培养底质选择秦淮河上游点位作为驯化基质,质量分数设定参考秦淮河江宁区段 CFC、Cu 质量分数的最高值和最小抑菌浓度值(MIC),见表 1。

表 1 室内驯化试验 CFC 和 Cu 质量分数设定
Table 1 CFC and Cu concentration setting of indoor culture experiments

试验组	CFC 原始 质量分数/ (μg·kg ⁻¹)	Cu 原始 质量分数/ (mg·kg ⁻¹)	CFC 设定 质量分数/ (μg·kg ⁻¹)	Cu 设定 质量分数/ (mg·kg ⁻¹)
CFC1	10.24	29.97	26.63	29.97
CFC2	10.24	29.97	49.95	29.97
Cu	10.24	29.97	10.24	46.01
CC1	10.24	29.97	26.63	46.01
CC2	10.24	29.97	49.95	46.01

1.3.2 微生物测序及目标基因定量

底质样品 DNA 用 FAST DNA® SPIN Kit for Soil 试剂盒按操作说明提取。对样品进行 DNA 提取和质量检测后,预留荧光定量 PCR 所需的 DNA 样品(约 10 μL),将剩余的 DNA 样品送至上海凌恩生物科技有限公司(Biozeren,上海)进行 16S rRNA 基因测序。待测序原始数据返回后,首先对原始数据序列进行优化处理。为了保证序列及分析结果的质量,通过 QIIME(version1.17)提取原始数据中的有效序列,并对数据进行除杂和过滤处理。按相似性大于 97% 的标准,将得到的优化序列进行 OTU 划分^[23]。在区分样本后,进行 OTU 聚类分析和物种分类信息学分析。根据 OTU 聚类分析结果,计算 Chao 1、Shannon、Simpson 等微生物多样性指数;基于物种分类学信息,可以在各个分类水平上统计微生物群落组成和物种丰度。

室内驯化试验选取 9 种目标基因,分别为:16S rRNA、整合子 *intI1*、转座子 *IS26*、四环素类抗性基因 *tetA* 和 *tetT*、氟喹诺酮类抗性基因 *QnrA* 和 *QnrC*、磺胺类抗性基因 *sul1*、大环内酯类抗性基因 *ermB*,目标基因对应的正向引物、负向引物、定性和定量的退火温度如表 2 所示。目标基因 PCR 预试验选用 30 μL 混合的扩增体系,包括:15 μL qPCR Mix,2 μL Mg²⁺(25 mmol),两端引物各 0.5 μL,灭菌超纯水 10 μL 和 DNA 模板 2 μL。反应程序为 95℃ 3 min 加 30 个循环(94℃ 30 s;DNA 退火温度 30 s;72℃ 30 s)。反应后的 PCR 产物立即进行凝胶电泳检测。

目标基因的定量检测使用实时荧光 PCR 仪(Bio-Rad CFX96 Cyclers Q5 thermocycler,USA),扩增采用 20 μL 体系,具体包括:10 μL 2×SYBR green Premix II(TaKaRa),两端引物各 0.4 μL,灭菌超纯水 8.7 μL 和 DNA 模板 0.5 μL。试验中的阴性对照组为反应体系中加入 2 μL 的 ddH₂O。荧光定量 PCR 采用标准曲线法,首先将已知浓度的标准品稀释 10 倍、10²倍、10³倍、10⁴倍和 10⁵倍,将稀释后的基因标准品溶液作为模板

进行 PCR 检测,得到目标基因的标准曲线。横坐标为基因标准品拷贝数,纵坐标为 PCR 仪检测得到的 C_i 值。在检测环境样品时,在同一个点位取 3 次 DNA 样品作为模板与标准样品梯度溶液一起检测。在相同试验检测条件下,得到环境样品目标基因的 C_i 值,代入已知浓度的标准品标准曲线即可计算得到样品中目标基因的拷贝数。目标基因的标准曲线方程、扩增效率和相关系数 r^2 如表 3 所示。

1.4 数据处理

使用 Office excel 2016 软件进行数据处理和绘制图表,运用 SPSS 17.0 软件对样品进行 Kruskal-Wallis H 检验和 Pearson 相关性分析。当 $p<0.05$ 时,认为结果具有显著性。组间菌种差异 (LEfSe) 分析在线上分析网站 <https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/> 进行。共现网络分析首先通过 R 语言 psych 包生成目标相关性矩阵,再通过 Gephi0.9.2 软件生成点、边文件,进而对点、边文件进行注释,最后在该软件导入点、边文件,调整相关参数,完成可视化。部分冗余性分析通过 R 语言计算。

2 结果与讨论

2.1 ARGs 和微生物群落对复合污染的响应

2.1.1 CFC 和 Cu 复合污染对 ARGs 丰度的影响

5 个试验组目标 ARGs 在各取样时间点的相对丰度如图 1 所示。在所有样品中,总 ARGs 相对丰度为 $8.19\times10^{-3} \sim 1.22\times10^{-1}$ copies/16S rRNA copy,最高相对丰度出现在 CFC2 试验组。从各试验组来看,CFC 单一污染试验组 (CFC1 组和 CFC2 组) 的总 ARGs 相对丰度随时间变化呈先上升 (前 15 d) 后下降的趋势。在复合污染试验组 (CC1 组和 CC2 组) 中,总 ARGs 相对丰度在第 5 天左右达到峰值,随后下降 ($p<0.05$)。特别地,CFC 单一污染试验组 (CFC1 组和 CFC2 组) 和 Cu 单一污染试验组 (Cu 组) 在总 ARGs 峰值上有显著的差异性 ($p<0.05$)。ARGs 丰度在 CFC1 组和 CFC2 组中的峰值最高,是 Cu 组的 3 倍。这可能是因为 Cu 的生物毒性造成底质微生物群落多样性和结构发生变化或致使特定种群消失,导致抗性基因的潜在宿主减少,从而对参与 ARGs 传播的细菌产生抑制作用^[24-25]。

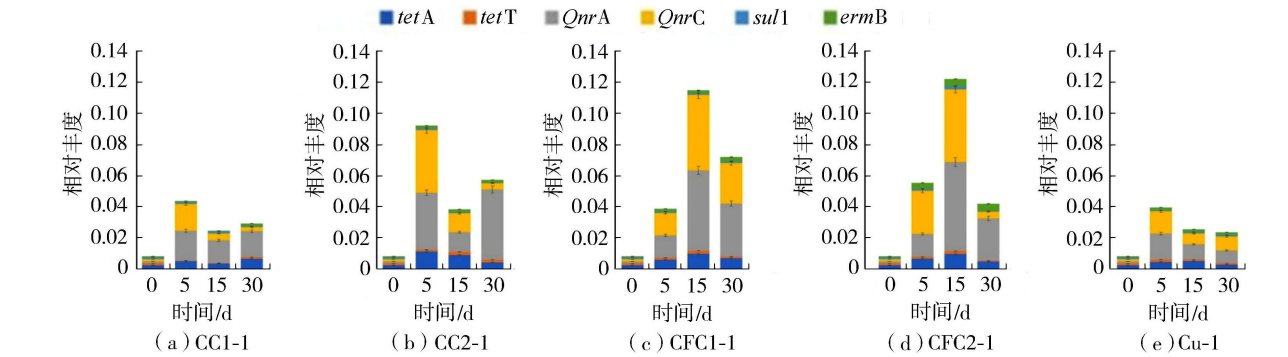


图1 各试验组 ARGs 相对丰度随时间的变化

表2 定量 PCR 方法进行分子检测的引物信息
Table 2 Primer information for molecular detection by quantitative PCR

目标基因	引物	引物序列	退火温度/℃
16S rRNA	FW	CGGTGAATACGTTTCYCGG	60
	RV	GGWTACCTTGTTACGACTT	
IntI1	FW	CCTCCCGCACGATGATC	60
	RV	TCCACGCATCGTCAGGC	
IS26	FW	ATGAAGCCATTCAAAGGCCGGCAT	65
	RV	TATGCAGCTTTGCTGTTACGACGG	
tetA	FW	GCTACATCCTGCTTGCCCTTC	65
	RV	CATAGATCGCCGTGAAGAGG	
tetT	FW	AAGGTTTATTATATAAAAAGTG	45
	RV	AGGTGTATCTATGATATTTAC	
QnrA	FW	GATAAAGTTTTTCAGCAAGAGG	70
	RV	ATCCAGATCGGCAAAAGGTTA	
QnrC	FW	TTGCGATCGGACTGCTTGTGG	60
	RV	AACACATGGTGCAGGGGATT	
sul1	FW	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC	65
	RV	TGAAGTTCGCCCGCAAGGCTCG	
ermB	FW	GCAGCGCATTCCTTGAGCATT	60
	RV	GCCGATACCTCCCAACTGTA	

表3 目标基因 PCR 定量标准曲线
Table 3 PCR quantitative standard curves of target gene

目标基因	标准曲线	r^2	扩增效率/%
16S rRNA	$y = -3.604\ 3x + 32.820\ 4$	0.998\ 4	89
intI1	$y = -3.629\ 9x + 32.190\ 4$	0.996\ 9	88
IS26	$y = -3.618\ 0x + 36.636\ 3$	0.998\ 6	89
tetA	$y = -3.377\ 2x + 35.798\ 2$	0.985\ 7	97
tetT	$y = -3.519\ 0x + 36.724\ 2$	0.999\ 6	92
QnrA	$y = -3.432\ 0x + 31.156\ 9$	0.997\ 7	95
QnrC	$y = -4.032\ 1x + 31.849\ 4$	0.999\ 8	87
sul1	$y = -3.278\ 1x + 34.253\ 5$	0.999\ 5	101
ermB	$y = -3.317\ 2x + 49.726\ 0$	0.989\ 1	100

Fig.1 Changes of relative ARGs abundance in each experimental group with time

对比两个复合污染组(CC1 组和 CC2 组),在浓度 CFC 为 MIC 值的 CC2 组中 ARGs 丰度更高,且每个采样时间点的 ARGs 丰度均高于 CC1 组。由此推断,CFC 的 MIC 对 ARGs 增殖和传播具有一定的促进作用,且促进程度更大,表明环境中的 MIC 值对抗生素诱导 ARGs 具有重要的作用^[26]。以上结果可解释为抗生素在一定条件下可被微生物转化或降解,当抗生素作为外界环境选择压力使得少数耐药菌获得更多生存资源而快速繁殖,从而加速了 ARGs 的增殖^[3-17]。有研究表明,抗性基因丰度与抗生素及砷、铜等重金属污染浓度呈正相关关系,说明抗生素与重金属复合污染促进了环境中抗性基因的分布水平^[27-28]。综上,通过非参数检验,表明 5 个试验组总 ARGs 相对丰度的时间分布呈显著差异,也说明不同的污染组在一定的时间段内影响 ARGs 的增殖和传播。

2.1.2 CFC 和 Cu 复合污染对微生物群落结构及功能的影响

基于物种分类学分析,在门水平上对高通量测序结果进行归类,获得 15 个底质样品的微生物群落组成及相对丰度,结果如图 2 所示。共有 15 个丰度占比超过 0.5% 的菌门,其中超过 5% 的菌门有变形菌门 (Proteobacteria)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和绿弯菌门 (Chloroflexi),均为本试验样品中的优势菌门。变形菌门是所有样品中占据绝对优势的菌门,结合各试验组微生物群落的组成变化来看,变形菌门的丰度占比在添加 Cu 的试验组中随时间降低,在未添加 Cu 的试验组中没有发现相似的规律,说明较高的 Cu 浓度对变形菌门的丰度具有抑制作用。相反,厚壁菌门则在添加 Cu 的试验组中丰度占比随时间显著上升,这可能与厚壁菌门细菌的耐污能力有关,也使其成为抗生素和重金属复合污染环境下 ARGs 的潜在宿主^[29]。酸杆菌门、拟杆菌门和绿弯菌门在各试验组中没有显著的时间

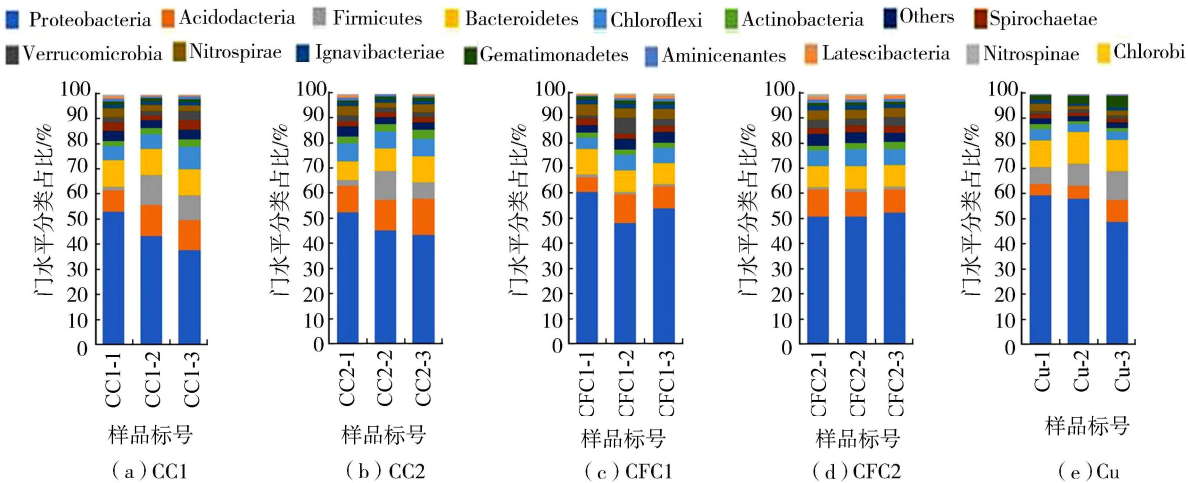


图 2 各试验组样品在门水平上的微生物群落组成

Fig.2 Microbial community composition of each sediment sample at the phylum level

变化规律。Tuo 等^[30]研究表明,环丙沙星对土壤优势微生物的影响较小,不同浓度环丙沙星污染组中门水平微生物丰度有显著差异,各处理优势门水平微生物及其丰度是放线菌门 (Actinobacteria)、变形菌门、厚壁菌门和奇古菌门 (Thaumarchaeota),该结果与本研究结果类似。

通过对各样品的 OTU 组成进行 PCoA 分析(图 3),进一步辨别各试验组样品微生物群落组成之间的差异性。图 3 表明各样品的整体分布与污染类型显著相关,CFC 和 Cu 复合污染的两个试验组 CC1 和 CC2 的 6 个点聚集在图上方,CFC 单一污染试验组的点都在图右侧,Cu 单一污染组除 1 个点外均聚集在右下角,表明不同的污染类型是造成微生物群落组成差异性的重要原因。已有研究发现,复合污染和单一污染对微生物群落组成的影响不同,多数抗生素和重金属复合污染对微生物群落多样性和结构产生显著的影响,呈现微

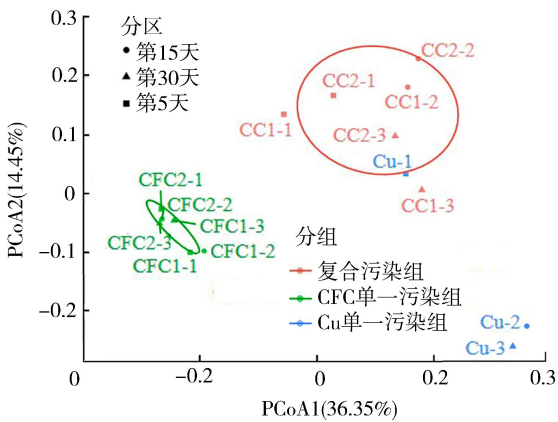


图 3 各试验组微生物群落 PCoA 分析

Fig.3 PCoA analysis of microbial community in each experimental sample sediment

生物群落组成的差异性^[31]。侯俊等^[32]探究了人工湿地系统中有机污染物对微生物群落的影响,结果表明污染物可直接改变微生物群落的丰度和多样性,相反微生物通过降解有机污染物,从而提高了微生物群落的耐受性。孙依欣^[25]认为,镉与环丙沙星的单一污染和复合污染试验组中微生物群落结构呈现明显的差异,单一环丙沙星处理组使得微生物群落多样性增加,而复合污染处理组中微生物群落多样性呈现下降趋势。

另外,将5个试验组的高通量测序数据与KEGG数据库进行对比,得到各样品组的一级功能预测结果,如表4所示(不包括未分类序列)。由表4可见,新陈代谢、遗传信息加工和环境信息处理是5个试验组中微生物群落的主要功能,相对丰度占比分别为48.52%~49.46%、16.56%~17.21%和12.02%~13.24%。各试验组一级功能预测结果无显著差异。如图4所示,二级功能预测结果表明,氨基酸代谢和其他次生代谢产物的合成在CFC单一污染组中的丰度明显高于复合污染组;复合污染组和Cu单一污染组功能的丰度组成相似,无显著差异,表明当CFC浓度不超过MIC值时,污染物CFC对底质微生物群落的氨基酸代谢和其他次生代谢的代谢产物合成均具有促进作用。

表4 各试验组样品一级功能预测基因的分布 单位:%

Table 4 Distribution of first-level function predicted

样品标号	新陈代谢	genes in each sample				unit: %
		遗传信息加工	环境信息处理	细胞过程	组织系统	人类疾病
CFC1-1	48.92	16.83	12.76	5.10	0.20	0.99
CFC1-2	49.42	16.71	12.62	4.91	0.20	1.02
CFC1-3	49.44	16.59	13.24	4.75	0.19	0.97
CFC2-1	48.99	17.01	12.43	5.00	0.20	0.99
CFC2-2	49.46	16.56	12.76	4.81	0.20	1.04
CFC2-3	49.37	16.74	12.89	4.93	0.19	0.99
CC1-1	49.05	16.58	12.98	5.11	0.20	0.96
CC1-2	49.30	16.71	12.99	4.89	0.19	0.92
CC1-3	49.00	16.75	13.01	5.09	0.20	0.94
CC2-1	49.18	16.78	12.94	4.98	0.19	0.93
CC2-2	49.37	16.63	13.06	4.89	0.19	0.93
CC2-3	49.35	16.56	13.13	4.88	0.19	0.94
Cu-1	49.15	16.74	12.36	5.07	0.21	1.08
Cu-2	48.52	17.21	12.02	5.35	0.21	1.16
Cu-3	49.12	17.05	12.16	5.09	0.20	1.09

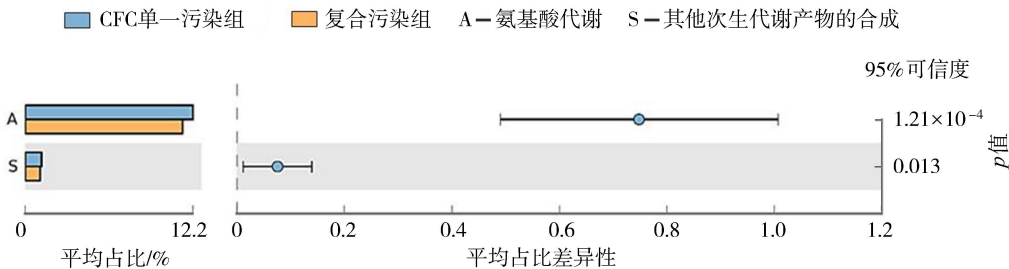


图4 每个样品中二级功能预测基因的显著性差异分析

Fig.4 Significance difference analysis of secondary function predicted genes in each sample

2.2 CFC 和 Cu 复合污染下微生物群落与 ARGs 的交互关系

基于 ARGs、MGEs 和微生物群落的结构组成,采用网络分析建立了 ARGs、MGEs 和门水平微生物群落的非随机共发生模式,结果如图5所示,共有23个节点,65条边。整合子 *intI1* 是 ARGs 水平转移的重要遗传元件,网络分析结果显示, *intI1* 是“度”最大的点,与 *tetA*、*tetT* 和 *sul1* 3种 ARGs 相连,呈现正相关关系,表明 *intI1* 在四环素类抗性基因和磺胺类抗性基因的水平转移中可能起到重要作用。该结果与已有研究结果类似:Chen 等^[33]在对长江口抗生素抗性基因分布特征的研究中发现, *intI1* 与磺胺类抗性基因存在较强的相关关系;王永强^[34]研究表明,艾比湖表层水和沉积物中 *intI1* 与 *sul1* 具有显著的正相关性($p<0.01$),说明 *intI1* 可能携带 *sul1* 基因在环境介质中进行水平迁移,从而增加了环境微生物的耐药性。除此之外, *intI1* 与降氨酸菌门(Aminicenantes)、绿菌门(Chlorobi)、匿杆菌门(Latescibacteria)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、硝杆菌门(Nitrospinae)、硝化螺杆菌门(Nitrospirae)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和 Ignavibacteriae 8个菌群相连,除拟杆菌门和芽单胞菌门外,均呈现正相关关系。同时, *intI1* 和 *tetT* 与硝化螺杆菌门、拟杆菌门等均存在正相关性,这可能是 *intI1* 和 *tetT* 具有相同的宿主菌, *intI1* 携带 *tetT* 可能在宿主菌中具有更强的转移性。Lu 等^[35]同样发现 *tetX* 和 *sul1* 与短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、苯基杆菌属(*Phenylobacterium*)和鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)呈正相关性,表明这些细菌可能是四环素耐药基因和磺胺耐药基因的潜在宿主。同样作为 MGEs 的插入序列, *IS26* 与 *QnrA*、*QnrC*、*tetA* 和 *tetT* 等多种 ARGs 相连,没有和微生物相关的节点相连,

说明 *IS26* 可能更多地在质粒上承担连接 ARGs 的工作。

从图 5 还可以看出,氟喹诺酮类抗性基因 *QnrC* 与变形菌门、硝化螺杆菌门和 Ignavibacteriae 相连且均呈正相关关系;四环素类抗性基因 *tetA* 与厚壁菌门呈正相关关系,和 Ignavibacteriae 呈负相关关系;*QnrA* 与变形菌门和硝化螺杆菌门相连,均呈正相关关系;大环内酯类抗性基因 *ermB* 与放线菌门存在正相关关系。该结论与 Dang 等^[36]研究结果类似,变形菌门和放线菌门是水环境中门水平的主要 ARGs 潜在宿主。Tuo 等^[30]通过网络分析表明,潜在宿主细菌大部分属于放线菌门和厚壁菌门,且 *intI2* 在抗性基因传播过程中扮演重要的角色。唐伟欣等^[37]对规模化畜禽场粪便中多重耐药菌进行了研究,结果显示,多重耐药菌的菌门集中分布在变形菌门、后壁菌门和放线菌门。Dumas 等^[38]研究发现,硝化螺旋菌门(*Pseudomonas*)可能携带多种 ARGs,具有多重耐药性,表明这些基因间存在共抗性,或者它们与其潜在宿主之间呈显著正相关关系,从而增强了环境微生物的耐药性。

基于 Lefse 分析(图 6),结果表明在 3 种污染类型中,CFC 单一污染和 Cu 单一污染试验组在优势菌种上有明显的差异。CFC 单一污染试验组的优势菌种多为变形菌门、硝化螺杆菌门和绿菌门的细菌,而 Cu 单一污染试验组的优势菌种主要为厚壁菌门的细菌。这几个菌门的细菌又恰好是网络分析得出的 ARGs 潜在宿主,表明各试验组微生物群落中的优势菌种与 ARGs 有着紧密的联系,潜在宿主的差异可能是造成各试验组中 ARGs 丰度差异的主要原因。何良英^[39]研究发现芽孢杆菌纲(*Bacilli*)是厚壁菌门下一类重要的细菌菌群,且致病菌 *Listeriaceae*、*Streptococcaceae* 和 *Staphylococcaceae* 均属于芽孢杆菌纲。值得注意的是,所属变形菌门和厚壁门的细菌在临床细菌抗性的全球性卫生问题中极其重要,发现了大量抗性基因及其相关 MGEs^[40]。多种潜在病原微生物通过 MGEs 进一步传播,将更多的抗性基因带入环境中,从而对生态环境和人类健康带来潜在威胁。

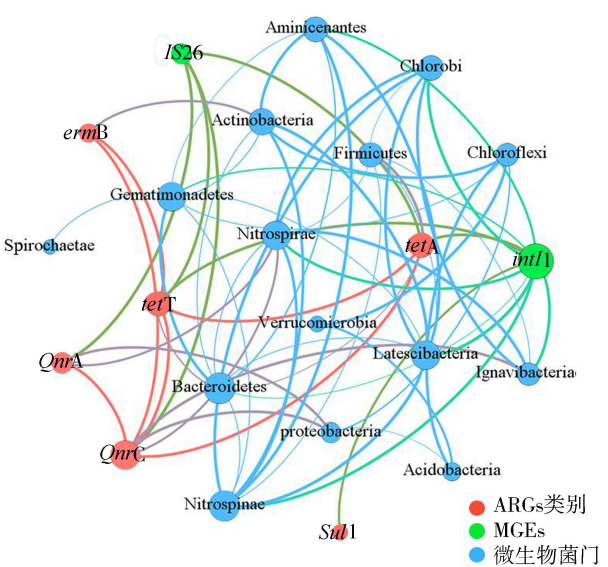


图 5 ARGs 及其潜在宿主菌分析

Fig. 5 Analysis of ARGs and their potential host bacteria

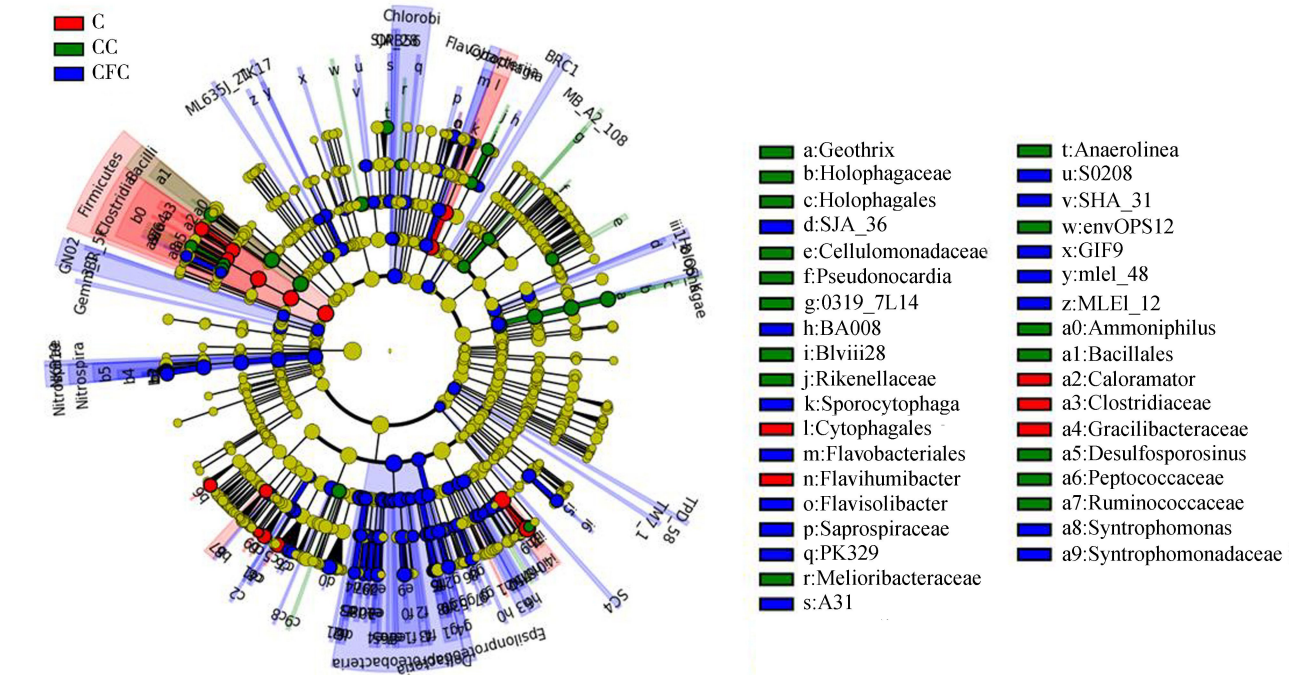


图 6 不同污染类型试验组的 LefSe 分析

Fig. 6 LefSe analysis of experimental groups of different pollution type

2.3 影响 ARGs 丰度变化的主导因子解析

为了较为全面地分析微生物群落、MGEs 以及污染物对 ARGs 增殖和传播的影响,采用偏冗余性分析对试验结果进行计算(图 7)。结果显示 94.4% 的 ARGs 丰度变化被所选因素所解释。MGEs 对总 ARG 丰度变化的解释率为 32.54%,略高于微生物群落(27.74%),远高于污染物(7.96%)。微生物群落与 MGEs 和环境因子的联合作用对 ARGs 丰度变化的总解释率为 49.77%,MGEs 与其他因子的联合作用对 ARGs 丰度变化的总解释率为 47.65%,本研究室内驯化试验结果与 Zhao 等^[41]的研究结果类似,区别在于本研究微生物群落的总解释率略高于 MGEs。造成这一差异的可能原因为:本研究为室内试验,在添加较高浓度污染物的外界压力条件下,微生物群落组成随时间的变化更为显著,进而导致 ARGs 潜在宿主微生物的丰度显著变化,最终影响 ARGs 的相对丰度。

采取路径分析对室内试验涉及的 CFC、Cu、微生物群落、MGEs 和 ARGs 按照既定路径进行分析,结果如图 8 所示。从整体来看,CFC 和 Cu 都通过多个路径影响了 ARGs 的丰度变化。CFC 对微生物群落具有显著的正向影响($p<0.01$),对 ARGs 具有正向影响;而 CFC 对 MGEs 具有显著的负面影响($p<0.01$);Cu 对微生物群落具有负面影响,对 MGEs、ARGs 具有显著的正向影响($p<0.05$);微生物群落对 MGEs 具有显著的正向影响($p<0.05$),对 ARGs 具有正向影响;MGEs 对 ARGs 具有显著的正向影响($p<0.05$)。

路径分析结果表明,受到污染物(CFC 和 Cu)等环境压力作用的微生物群落影响了 MGEs 和 ARGs,而受到污染物和微生物群落双重影响的 MGEs 也同样对 ARGs 的传播有重要的影响。在不同的污染条件下,每一条路径都可能做出相应的响应,如,当 CFC 成为环境中的主导污染物时,微生物群落可能受到较大的促进作用,一方面可能促进 ARGs 的垂向扩散过程,另一方面会显著促进 MGEs 介导的水平转移过程,最终导致 ARGs 丰度的上升。类似地,Zhou 等^[42]利用结构方程模型得出水质、微生物群落结构和人类活动的共同作用改变了 ARGs 分布的结论,其中,河流水体理化参数变化引起微生物群落变化是城市水系 ARGs 的主要因素。研究结果说明污染物或理化因子更多地通过微生物群落间接地影响 ARGs 的传播和扩散。

3 结 论

- a. CFC 单一污染、Cu 单一污染和复合污染试验组中 ARGs 丰度、微生物群落组成和部分功能存在显著差异。所有试验组的总 ARGs 相对丰度呈现出随时间先增后减的变化趋势;变形菌门、酸杆菌门、厚壁菌门、拟杆菌门和绿弯菌门是样品中的优势菌门;与复合污染组相比,氨基酸代谢和其他次生代谢代谢产物的合成使这两个二级功能在 CFC 单一污染组中有更高的丰度。
- b. 微生物群落一方面受 CFC 和 Cu 等环境因子的影响,另一方面对 MGEs 和 ARGs 都具有正向促进作用。共现网络分析表明,*intI1* 与 3 类 ARGs 和 8 个菌群相关,是 ARGs 和微生物群落之间的桥梁,也是在环境中 ARGs 传播的重要途径。
- c. 通过偏冗余分析发现,在 MGEs、微生物群落和污染物中,微生物群落是对 ARGs 丰度变化总解释率最高的因素(49.77%);基于路径分析表明,CFC 和 Cu 等环境因子主要通过微生物群落间接地影响环境中 ARGs 的增殖与传播。

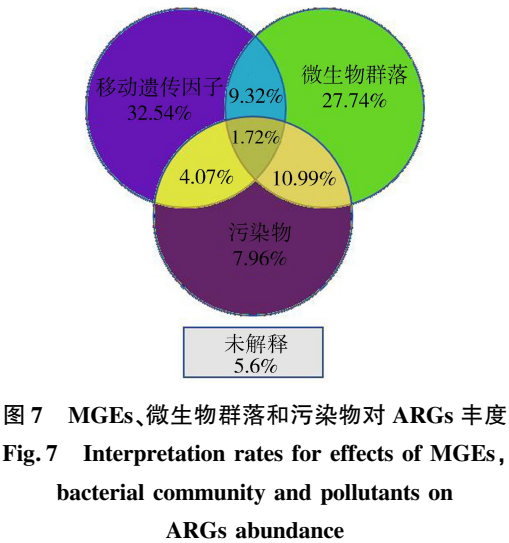


图 7 MGEs、微生物群落和污染物对 ARGs 丰度变化的解释率
Fig.7 Interpretation rates for effects of MGEs, bacterial community and pollutants on ARGs abundance

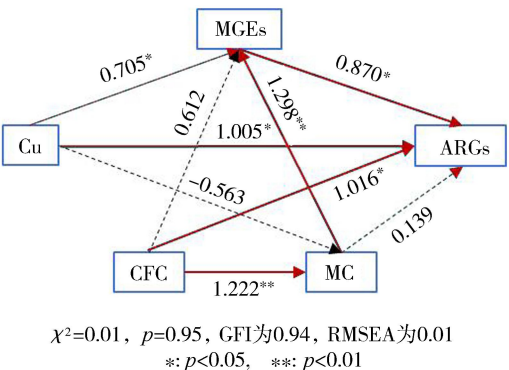


图 8 室内试验 ARGs 与各影响因素的路径分析
Fig.8 Path analysis of ARGs and each influencing factor in indoor experiments

参考文献:

[1] 隋倩雯,张俊亚,魏源送,等. 畜禽养殖过程抗生素使用与耐药病原菌及其抗性基因赋存的研究进展[J]. 生态毒理学报, 2015,10(5) :20-34. (SUI Qianwen,ZHANG Junya,WEI Yuansong,et al. Veterinary antibiotics use,occurrence of antibiotic resistance pathogen and its antibiotic resistance genes in animal production;an overview[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015,10(5) :20-34. (in Chinese))

[2] LEKUNBERRI I,BALCAZAR J L,BORREGO C M,et al. Metagenomic exploration reveals a marked change in the river resistome and mobilome after treated wastewater discharges[J]. Environmental Pollution,2018,234:538-542.

[3] 赵联芳,谭少文,张鹏英,等. 人工湿地处理四环素类抗生素废水时有机碳源的影响[J]. 水资源保护,2016,32(6) :70-74. (ZHAO Lianfang,TAN Shaowen,ZHANG Pengying,et al. Effects of different organic carbon sources on removal efficiency of tetracyclines from wastewater in constructed wetlands[J]. Water Resources Protection,2016,32(6) :70-74. (in Chinese))

[4] 刘鹏霄,王旭,冯玲. 自然水环境中抗生素的污染现状、来源及危害研究进展[J]. 环境工程,2020(38) :36-42. (LIU Pengxiao,WANG Xu,FENG Ling. Occurrences,resources and risk of antibiotics in aquatic environment;a review [J]. Environmental Engineering,2020(38) :36-42. (in Chinese))

[5] CURY J,TOUCHON M,ROCHA E P C. Integrative and conjugative elements and their hosts: composition, distribution and organization[J]. Nucleic Acids Reseach,2017,45(15) :8943-8956.

[6] 李轶,雷梦婷,杨楠,等. 河流微生物生态学的研究进展[J]. 水资源保护,2022,38(1) :190-197. (LI Yi,LEI Mengting,YANG Nan,et al. Research and prospect on river microbial ecology[J]. Water Resources Protection,2022,38(1) :190-197. (in Chinese))

[7] AYDIN S,INCE B,INCE O,et al. Development of antibiotic resistance genes in microbial communities during long-term operation of anaerobic reactors in the treatment of pharmaceutical wastewater[J]. Water Research,2015,83:337-344.

[8] 罗晓,张文丽,许曼,等. 冬季河流中抗生素抗性基因和微生物群落相关性研究[J]. 环境科学与技术,2019,42(5) :20-26. (LUO Xiao,ZHANG Wenli,XU Man,et al. Correlation between antibiotic resistance genes and microbial community in winter rivers[J]. Environmental Science & Technology,2019,42(5) :20-26. (in Chinese))

[9] CHEN Zhiqiang,WANG Yao,WEN,Qinxue,et al. Effects of chlortetracycline on the fate of multi-antibiotic resistance genes and the microbial community during swine manure composting[J]. Environmental Pollution,2018,237:977-987.

[10] PETERSON E,KAUR P. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria:relationships between resistance determinants of antibiotic producers,environmental bacteria,and clinical pathogens[J]. Front in Microbiology,2018,9:2928-2935.

[11] CZEKALSKI N,GASCON D E,BURGMANN H,et al. Wastewater as a point source of antibiotic-resistance genes in the sediment of a freshwater lake[J]. ISME Journal,2014,8(7) :1381-1390.

[12] 胡冠九,陈素兰,穆肃,等. 江苏省某市典型饮用水水源中抗生素质量浓度特征[J]. 水资源保护,2016,32(3) :84-88. (HU Guanjiu,CHEN Sulan,MU Su,et al. Characteristics of concentrations of antibiotics in typical drinking water sources in a city in Jiangsu Province[J]. Water Resources Protection,2016,32(3) :84-88. (in Chinese))

[13] 封梦娟,张芹,宋宁慧,等. 长江南京段水源水中抗生素的赋存特征与风险评估[J]. 环境科学,2019,40(12) :5286-5293. (FENG Mengjuan,ZHANG Qin,SONG Ninghui,et al. Occurrence characteristics and risk assessment of antibiotics in source water of the Nanjing reach of the Yangtze River[J]. Environmental Science,2019,40(12) :5286-5293. (in Chinese))

[14] 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 Longfei,CHENG Yiqun,HU Xiaodong,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. (in Chinese))

[15] 肖艳春,于会彬,宋永会. 河流底泥 DOM、营养盐与重金属空间分异特征及响应关系[J]. 环境科学,2022,43(5) :2490-2499. (XIAO Yanchun,YU Huibin,SONG Yonghui. Spatial differentiation characteristics and response relationship of DOM,nutrients,and heavy metals in river sediments[J]. Environmental Science,2022,43(5) :2490-2499. (in Chinese))

[16] LENG Yifei,XIAO Henglin,LI Zhu,et al. Tetracyclines,sulfonamides and quinolones and their corresponding resistance genes in coastal areas of Beibu Gulf,China[J]. Science of the Total Environment,2020,714:136899-136905.

[17] GULLBERG E,CAO S,BERG O G,et al. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations[J]. PLoS Pathogens, 2011,7(7) :1002158-1002163.

[18] YANG Yuyi,CAO Xinhua,LIN Hui,et al. Antibiotics and antibiotic resistance genes in sediment of Honghu Lake and East Dongting Lake,China[J]. Microbial Ecology,2016,72(4) :791-801.

[19] JARDINE J,MAVUMENGWANA V,UBOMBA-JASWA E,et al. Antibiotic resistance and heavy metal tolerance in cultured bacteria from hot springs as indicators of environmental intrinsic resistance and tolerance levels[J]. Environmental Pollution, 2019,249:696-702.

[20] 张佳奇,徐艳,罗义,等. 重金属协同选择环境细菌抗生素抗性及其机制研究进展[J]. 农业环境科学学报,2016,35(3) :

- 409-418. (ZHANG Jiaqi, XU Yan, LUO Yi, et al. Co-selection mechanisms of bacterial resistance to heavy metals and antibiotics [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(3): 409-418. (in Chinese))
- [21] VIGNAROLI C, PASQUAROLI S, CITTERIO B, et al. Antibiotic and heavy metal resistance in enterococci from coastal marine sediment [J]. *Environmental Pollution*, 2018, 237: 406-413.
- [22] NGUYEN C C, HUGIE C N, KILE M L, et al. Association between heavy metals and antibiotic-resistant human pathogens in environmental reservoirs: a review [J]. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2019, 13(3): 873-882.
- [23] 张松贺, 周甜甜, 刘远思. 新开河4种水生植物表面附着微生物群落特征 [J]. *水资源保护*, 2020, 36(3): 83-88. (ZHANG Songhe, ZHOU Tiantian, LIU Yuansi. Characteristics of microbial communities in biofilm of four aquatic macrophytes in Xinkai River [J]. *Water Resources Protection*, 2020, 36(3): 83-88. (in Chinese))
- [24] LI Xiangyang, GU A Z, ZHANG Ye, et al. Sub-lethal concentrations of heavy metals induce antibiotic resistance via mutagenesis [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 369: 9-16.
- [25] 孙依欣. 含镉和环丙沙星有机肥对生菜中抗性基因及微生物群落的影响 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [26] ZHANG Ye, GU A Z, CEN Tianyu, et al. Sub-inhibitory concentrations of heavy metals facilitate the horizontal transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance genes in water environment [J]. *Environmental Pollution*, 2018, 237: 74-82.
- [27] DE LA IGLESIA R, VALENZUELA-HEREDIA D, PAVISSICH J P, et al. Novel polymerase chain reaction primers for the specific detection of bacterial copper P-type ATPases gene sequences in environmental isolates and metagenomic DNA [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 50(6): 552-562.
- [28] ZHANG Fengli, ZHAO Xiaoxue, LI Qingbo, et al. Bacterial community structure and abundances of antibiotic resistance genes in heavy metals contaminated agricultural soil [J]. *Environmental Science & Pollution Research International*, 2018(1): 1-9.
- [29] GUO Qingwei, LI Ningning, XIE Shuguang, et al. Heavy metal spill influences bacterial communities in freshwater sediments [J]. *Archives of Microbiology*, 2019, 201: 847-854.
- [30] TUO Xiaxia, GU Jie, WANG Xiaojuan, et al. Prevalence of quinolone resistance genes, copper resistance genes, and the bacterial communities in a soil-ryegrass system co-polluted with copper and ciprofloxacin [J]. *Chemosphere*, 2018, 197: 643-650.
- [31] 闫雷, 毕世欣, 赵启慧, 等. 土霉素及镉污染对土壤呼吸及酶活性的影响 [J]. *水土保持通报*, 2014, 34(6): 101-108. (YAN Lei, BI Shixin, ZHAO Qihui, et al. Effects of oxytetracycline and Cd pollution on soil respiration and enzyme activity [J]. *Bulletin of Soil and Water Conservation*, 2014, 34(6): 101-108. (in Chinese))
- [32] 侯俊, 王岩博, 张明, 等. 微生物-物化耦合法降解毒死蜱研究进展 [J]. *水资源保护*, 2021, 37(2): 15-20. (HOU Jun, WANG Yanbo, ZHANG Ming, et al. Research progress on degradation of chlorpyrifos by microbial-physicochemical coupling method [J]. *Water Resources Protection*, 2021, 37(2): 15-20. (in Chinese))
- [33] CHEN Baowei, LIANG Ximei, NIE Xianping, et al. 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.
- [34] 王永强. 艾比湖流域典型抗生素、抗性基因及微生物群落的分布特征 [D]. 济南: 山东师范大学, 2020.
- [35] LU Jian, ZHANG Yuxuan, WU Jun, et al. Occurrence and spatial distribution of antibiotic resistance genes in the Bohai Sea and Yellow Sea areas [J]. *China. Environmental Pollution*, 2019, 252: 450-460.
- [36] DANG Chenyuan, XIA Yu, ZHENG Maosheng, et al. Metagenomic insights into the profile of antibiotic resistomes in a large drinking water reservoir [J]. *Environment International*, 2020, 136: 105449.
- [37] 唐伟欣, 孙兴滨, 高浩泽, 等. 规模化畜禽养殖场粪便中多重耐药菌分离鉴定及其耐药特征 [J]. *农业环境科学学报*, 2020, 39(1): 207-216. (TANG Weixin, SUN Xingbin, GAO Haoze, et al. Isolation and identification of multidrug-resistant bacteria in feces from large-scale livestock and poultry farms and their antibiotic-resistance characteristics [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2020, 39(1): 207-216. (in Chinese))
- [38] DUMAS J L, VAN DELDEN C, PERRON K, et al. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR [J]. *FEMS Microbiol Letter*, 2006, 254: 217-225.
- [39] 何良英. 典型畜禽养殖环境中抗生素耐药基因的污染特征与扩散机理研究 [D]. 广州: 中国科学院广州地球化学研究所, 2016.
- [40] LANZA V F, TEDIM A P, MARTINEZ J L, et al. The plasmidome of Firmicutes: impact on the emergence and the spread of resistance to antimicrobials [J]. *Microbiology Spectrum*, 2015, 3(2): PLAS-0039-2014.
- [41] ZHAO Ze, ZHANG Kai, WU Nan, et al. Estuarine sediments are key hotspots of intracellular and extracellular antibiotic resistance genes: a high-throughput analysis in Haihe Estuary in China [J]. *Environment International*, 2020, 135: 105385-105397.
- [42] ZHOU Zhenchao, ZHENG Ji, WEI Yuanyuan, et al. Antibiotic resistance genes in an urban river as impacted by bacterial community and physicochemical parameters [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017, 24(30): 23753-23762.