

草鱼肠道微生物抗生素抗性基因研究

赵 帝^{1,2}, 徐在言³, 吴山功^{1,2}, 熊 凡^{1,2}, 郝耀彤^{1,2}

(1. 中国科学院水生生物研究所, 水生生物多样性与保护重点实验室, 湖北 武汉 430072;

2. 中国科学院大学, 北京 100039;

3. 华中农业大学, 湖北 武汉 430070)

摘要: 水产养殖过程中抗生素的过度使用导致耐药菌株不断出现, 细菌耐药性成了威胁公共安全的一个全球性问题。抗性基因是细菌产生耐药性的根本原因, 动物肠道微生物是抗性基因的储存库, 目前我国对水产养殖动物消化道微生物抗生素抗性基因的研究匮乏。为探究草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)肠道微生物中抗性基因的类型和丰度, 通过提取草鱼肠道内容物的基因组 DNA, 采用 shotgun 宏基因组技术进行测序和序列注释, 分析草鱼肠道内容物微生物数据, 对比抗性基因数据库 ARDB 筛选出微生物序列中的抗性基因。结果表明, 草鱼肠道内容物共有 61 554 个可注释微生物的基因序列, 包括 409 个真核生物序列、88 个古细菌序列和 61 057 个真细菌序列; 共得到 1011 个抗性基因, 归为 123 种基因型, 包括 78 种单抗性基因型(679 个单抗性基因), 45 种多抗性基因型(304 个多抗性基因), 多抗性基因数量占抗性基因总数的 30.1%, 说明草鱼肠道中可能存在大量的多重耐药性微生物; 检出草鱼肠道中数量最多的抗性基因是抗大环内酯类抗生素基因 *MacB*, 产生抗性基因数量最多的是大环内酯类抗生素。研究结果可为水产养殖中抗生素的使用监管提供基础数据, 验证了宏基因组测序技术检测抗性基因的可行性。

关键词: 草鱼; 抗性基因; 宏基因组测序; 微生物

中图分类号: Q935 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-3075(2019)06-0111-06

抗生素是一类抗病原微生物活性的天然、半合成或人工合成化合物(徐冰洁等, 2010)。自从青霉素被发现并应用于临床后, 抗生素开始被广泛使用(高立红等, 2013)。抗生素的广泛使用导致了微生物的耐药性, 抗生素抗性基因是细菌产生耐药性的根本原因, 抗性基因的出现增加了疾病的防治难度(高盼盼等, 2009); 即使携带抗性基因的细胞被杀死, 细胞中抗性基因的 DNA 片段仍可水平传播至同属或不同属的细菌(文汉卿等, 2015); 在环境中持续残留, 污染养殖环境; 另一方面, 抗性基因一旦通过食物链进入人体, 含有新抗性基因的病原菌将严重威胁到人类的健康(鲁曦, 2012)。因此, 抗性基因的污染受到了越来越多的关注(Pruden et al, 2006; 苏建强等, 2013; 文汉卿等, 2015)。

我国是全球水产养殖大国, 2008 年中国大陆水

产养殖产量占世界水产养殖总产量的 62.4% (FAO, 2010)。然而, 集约化与高密度下养殖鱼类感染疾病的机率大大提高、病害频繁发生, 导致抗生素被大量过度使用(吕爱军等, 2006); 但目前对水产养殖中抗生素抗性基因污染的研究还不够全面(高盼盼等, 2009)。水产养殖中抗生素抗性基因的研究大多基于微生物培养实验, 并且只针对某种或某几种抗性基因开展工作(王丽梅等, 2010)。近年来发展的 PCR、荧光定量 PCR 技术或 DNA 微阵列技术虽然可以通过测定样品 DNA 研究抗性基因, 但也仅能研究几种特定的抗性基因(罗义和周启星, 2008)。宏基因组测序技术(Metagenomic sequencing)直接测定环境样品中全部生物的 DNA, 不仅可以省去细菌培养, 避免设计不同抗性基因引物扩增的繁琐过程, 还可全面检测出样品中抗性基因的种类及丰度, 是一条研究抗性基因的新途径(李丽娟等, 2007)。Hu 等(2013)利用宏基因组技术研究了 162 个来自不同国家和地区的人肠道抗性基因, 发现与欧美国家相比, 中国人样本中抗性基因的丰度和多样性较高。但宏基因组测序技术尚未应用于水产养殖中抗生素抗性基因的研究, 该技术的运用将极大地丰富水产养殖中抗生素抗性基因的内容。

收稿日期: 2017-08-11

基金项目: 国家自然科学基金(31372571, 31272706); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-46-08)。

作者简介: 赵帝, 1992 年生, 女, 硕士研究生, 专业方向为微生物学。E-mail: 1534129258@qq.com

通信作者: 徐在言, 1976 年生, 女, 副教授, 研究方向为动物生理学。E-mail: xuzaiyan@mail.hzau.edu.cn

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是我国淡水养殖产量最高的品种,2015年草鱼养殖产量高达568万t,占淡水鱼类养殖总产量的20.9%(农业部渔业局,2016)。草鱼肠道中存在大量的微生物(吴康,2014),肠道微生物是抗生素抗性基因的储存库(Hu et al,2013);但迄今为止,对草鱼肠道抗生素抗性基因认知还是空白。本研究运用宏基因组技术,将草鱼微生物基因与抗性基因数据库进行比对,分析抗性基因的种类和丰度,以期揭示抗生素抗性基因在鱼类肠道中的扩散和传播规律,为国家对水产渔药抗生素的规范管理提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验选取未饲喂过抗生素的草鱼,饲养于湖北省武汉市江夏区多福农庄养殖池塘。饲养时间为2012年3月29日至7月6日,期间水温16.7~30.9℃。将草鱼随机平均分为2组,每天分别饲喂苏丹草(*Sorghum sudanense*)(9:00 am)或裕泰配合饲料(9:30 am,15:30 pm),直至实验结束,实验过程不添加抗生素。

1.2 样品采集

选取投喂不同饲料的草鱼各4尾,体重0.8~1.2 kg,体长35~43 cm。用高剂量MS-222处理草鱼,无菌条件下解剖,取出肠道。按照倪达书和洪雪峰(1963)的方法对草鱼肠道分段,并用发夹环固定。轻轻将后肠内容物挤压出去,充分混匀后置于无菌管中,液氮条件下暂存,用于抗生素抗性基因测序。

1.3 DNA提取和定量

取后肠内容物样品200 mg,加入0.4 g磁珠使细胞更好地裂解(Wu et al,2012)。用QIAamp DNA Stool Mini Kit(Qiagen, Germany)试剂盒提取基因组DNA,-20℃保存,具体提取方法参照试剂盒说明书。用超微量分光光度计(Nanodrop 8000,Thermo)测定DNA的浓度。为达到测序要求的DNA含量,将8个样品的DNA混合,-20℃保存。

1.4 序列处理

采用PE101测序策略,Hiseq 2000测序平台,将DNA样品构建成小片段文库,在上海美吉生物公司进行shotgun宏基因组测序。原始低质量reads主要依据序列长度和主要质量分数进行过滤,当主要质量分数大于20时,迭代停止;同样,含有“N”且长度低于20 nt的reads也会被舍弃。用

Crossmatch(<http://www.phrap.org>)程序搜索Illumina接头序列数据库,找出接头序列并去除。经剪切和去接头后,成对和单个的高通量reads被保留下来。运用SOAP-denovo组装reads(Luo et al,2012);其中,k-mers值选取31,SOAP-denovo程序集设置为默认程序。

1.5 微生物序列与抗性基因筛选

组装后的contigs经过BLASTX(Altschul et al,1997)与NCBI nr蛋白质数据库(E-values<10⁻⁵)比对,通过MEGAN程序预测每一个基因的分类学水平(Huson et al,2007)。用软件MetaGene Annotator进行ORFs预测并选出长度大于500 bp的ORFs(Noguchi et al,2006),其中编码选用标准的Bacterial Genetic Code(NCBI 200 translation table 11)。选出的ORFs经过BLASTP与非冗长蛋白数据库比对,对蛋白进行注释。结果与NCBI中微生物数据库比对,得到微生物序列数据。Contigs进一步拼接成scaffolds,选择大于500 bp的scaffolds进行基因预测,用BLAST在抗生素抗性基因数据库ARDB(Antibiotic Resistance Genes Database)中搜索Scaffolds中的抗性基因,进行汇总得到抗性基因的种类、数量以及来源。

使用Excel进行数据统计与分析,将数据导入Excel,取其中E-value<0.0001且Similarity>40%的抗性基因数据进行分析。根据ARDB(Antibiotic Resistance Genes Database)分类,将抗性基因归为特定的抗性基因型;其中,仅对应一种抗生素的基因为单抗性基因型,对应两种及两种以上抗生素的基因为多抗性基因型。综上,一种抗性基因型所含的抗性基因数量一般不同,同时其可能属于多种抗生素;另外,一种抗生素也可能包含多种抗生素抗性基因型。根据以上关系,要计算某种抗生素包含的抗性基因数量,则将该抗生素所有的抗性基因型数量相加:

$$N_j = \sum_{i=1}^k Re_{ij} \quad (1)$$

式中: N_j 代表第j种抗生素抗性基因的数量; k 表示所求抗生素含有抗性基因型种类数; Re_{ij} 表示第j种抗生素中第i类抗性基因型包含的抗性基因数量;计算所有抗生素抗性基因总和,则将公式(1)得出的所有抗生素抗性基因数量相加,公式如下:

$$N = \sum_{j=1}^n N_j \quad (2)$$

式中: n 表示实验统计得出的抗生素种类数。

2 结果与分析

2.1 序列处理

测序得到原始序列(Raw read)2.03 亿条,上传至 NCBI 中的 SRA,序列号为 PRJNA 30546 (http://trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra_sub/sub.cgi?subid=555795&from=list&action=show;submission);其中有效序列 1.5 亿条,占原始序列的 74.08%。预测到 contigs 25.93 M,共 120174 条序列。拼接后,大于 500 bp 的 scaffolds 有 28 586 条,结果保存在 NCBI 中,序列号为 LTCX000000000(<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/wgs/SUB1287382/overview>)。

2.2 草鱼肠道微生物宏基因组

微生物基因序列共有 61 825 个,注释出的序列

有 61 554 个,包括 409 个真核生物序列,占微生物序列总数的 0.67%;61 057 个真细菌,占 99.2%;88 个古细菌,占 0.13%(图 1)。真细菌中,变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)以及拟杆菌(Bacteroidetes)为优势类群,分别占真细菌数的 51.1%、28.1%和 14.8%。古细菌中,广古菌门(Euryarchaeota)为优势类群,占总古菌数的 85%。

2.3 单抗性基因与多抗性基因

本研究共得到 1 011 个抗性基因,归为 123 种基因型;其中单抗性基因型 78 种(707 个单抗性基因),多抗性基因型 45 种(304 个多抗性基因)。多抗性基因数量占基因总数的 30.1%,且一些多抗性基因可对应不同类型的抗生素(表 1)。丰度最高的 4 种多抗性基因型 *AcrB*、*CarA*、*VanRA* 和 *SrmB* 均对应研究中不同分类的抗生素。

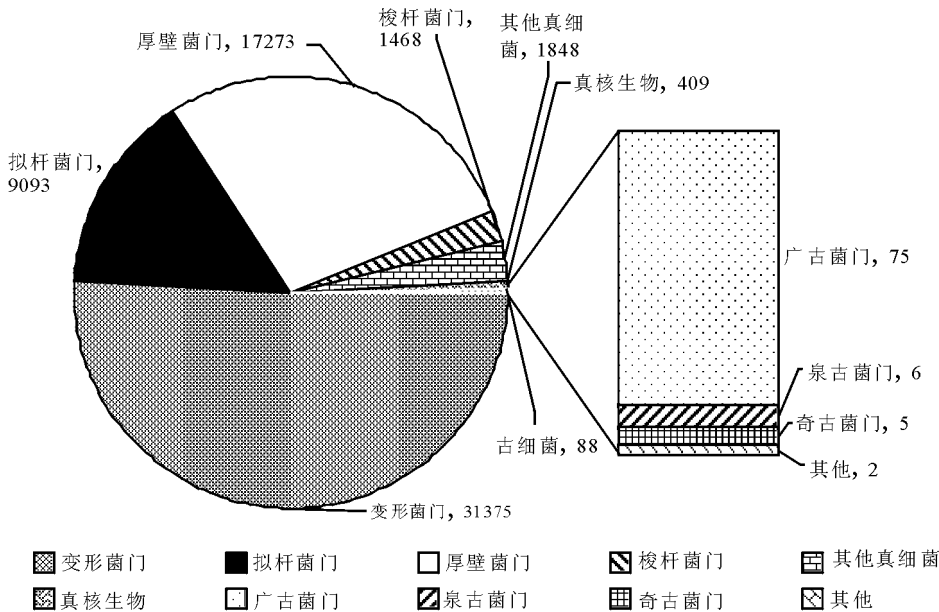


图 1 微生物序列门水平上的分类

Fig.1 Classification of microorganism sequences at the phylum level

表 1 优势抗性基因型相关参数

Tab.1 Parameters related to the dominant resistant genotypes

抗性基因型	数量	对应抗生素	同源微生物
MacB	176	macrolide	<i>Citrobacter koseri</i> ; <i>Enterobacter cancerogenus</i> ; <i>Escherichia</i> spp.
BcrA	76	bacitrac	<i>Bacillus cereus</i> ; <i>Staphylococcus</i> spp.
AcrB	42	aminoglycoside; acriflavin; glycylicline; macrolide; beta_lactam	<i>Salmonella enteric</i> ; <i>Enterob aerogenes</i> ; <i>Citrobacter koseri</i>
CarA	30	Lincosamide; streptogramin_b	<i>Streptomyces thermotolerans</i>
VanRA	25	vancomycin; teicoplanin	<i>Bacillus circulans</i> ; <i>Enterococcus faecium</i> ; <i>Paenibacillus apiarius</i>
SrmB	25	lincosamide; macrolide streptogramin_b	<i>Str ambofaciens</i>

2.4 抗性基因对应的抗生素

统计不同抗生素对应的抗性基因数量,丰度最高的前 5 种抗生素是万古霉素(vancomycin)、链霉

杀阳菌素(streptogramin)、杆菌肽(bacitracin)、盘尼西林(penicillin)和四环素(tetracycline),其对应的抗性基因数量分别为 149、108、99、81 和 79 个,其

中杆菌肽与万古霉素同属于多肽类抗生素。

参考李秀银等(2012)的分类方法进行改进,本研究将基因对应的抗性物质分为11类;其中,青霉素类与头孢菌素类抗生素归为 β -内酰胺类抗生素,糖肽类抗生素扩展为多肽类抗生素,磺胺类、喹诺酮类和硝咪唑类抗生素归为其他类抗生素,单独分出链霉素阳菌素和化学消毒类(如吡啶黄和氯根离子)抗性物质。根据1.6中的方法计算得到抗性基因1730个。从图2中可以看出,抗性基因丰度最高的6类抗性物质依次是大环内酯类、多肽类、化学消毒类、 β -内酰胺类、林可胺类和链霉素阳菌素,对应的抗性基因数量分别是353、319、223、187、108和108个;此外,链霉素阳菌素分为A型和B型,对应的抗性基因数量分别是26个和82个。

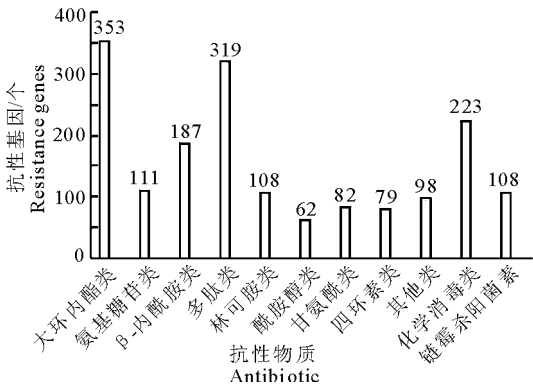


图2 不同抗性物质对应的抗性基因数量
Fig.2 Number of resistance genes corresponding to different antibiotics

3 讨论

3.1 草鱼肠道微生物优势菌群的组成

本研究中,古细菌占草鱼肠道总微生物数量的0.1%,与Wu等(2012)的研究结果一致。草鱼肠道中的优势菌群包括变形菌门、厚壁菌门以及拟杆菌门菌群,与其它淡水鱼类肠道微生物优势类群一致,且优势菌群的比例与其他学者的研究结果相似(Wu et al,2010;Wu et al,2012),说明宏基因组测序结果可靠性较高。

3.2 草鱼肠道内抗性基因丰度差异的影响因素

本研究检测出草鱼肠道中数量最多的抗性基因是抗大环内酯类抗生素基因*MacB*,该基因曾在河水中被检出(Stoll et al, 2012),但在国内水环境中研究甚少。虽然四环素类、大环内酯类、氨基糖苷类和磺胺类药物均是水产养殖中常用的抗生素(苏仲

毅,2008),但关于大环内酯类抗生素抗性基因*MacB*的报道远少于磺胺类抗性基因或四环素类抗性基因,这可能是因为*MacB*通过与*MacA*以及外膜通道蛋白Tolc结合形成药物排出泵导致细菌耐药性(Kobayashi et al,2003);而单独的抗性基因存在时,无法使微生物表现出抗性(王芝敏和郑铃,2005),因此之前的研究中往往被忽视;而宏基因组测序可以避免遗漏具有抗性但不在本物种中表达的抗性基因(李丽娟等,2007)。抗万古霉素的抗性基因*VanRA*属于草鱼肠道微生物中优势抗性基因之一,是具有万古霉素抗性菌株中大多数含有的基因型(宋刚等,2015),但万古霉素属于水产禁用药物(全国水产技术推广总站,2010)。草鱼中存在万古霉素的抗性基因可能是因为地表水中存在抗生素或者抗性基因DNA片段的水平传播(金煜,2014;文汉卿等,2015)。

草鱼肠道中不同抗性基因丰度的差异可能与不同地区的养殖环境中使用的抗生素种类差异相关,因为抗生素的选择压力是影响抗性基因丰度的主要因素(Hu et al,2013);此外,抗性基因存在于不同的微生物基因组中,而不同鱼类肠道细菌的种类和丰度有差异,这也会引起草鱼肠道微生物抗性基因丰度的差异(周玉法,2011);另外,本研究发现鱼类肠道中许多未曾报道过的抗性基因,如*MexW*,*EmrD*和*MdfA*,可能是因为传统的方法不易培养出含有这些抗性基因的细菌或难以设计出扩增这类抗性基因的引物,而本研究中宏基因组测序可全面检测出样品中的抗性基因。

3.3 鱼类多抗性基因的产生及影响

随着抗生素的广泛使用,多种细菌出现了多重耐药性,草鱼肠道中存在多种多抗性基因,这些多抗性基因占抗性基因总数的30.1%,并且部分多抗性基因对应不同分类的抗性物质,说明草鱼肠道中的细菌具有多重耐药性。细菌的多重耐药性已经在许多研究中被证实,Jun等(2004)分离出20个菌株具有多重抗药性,同一菌株可以同时抗四环素、氯霉素、恶喹酸和卡那霉素。细菌产生多重抗药性,可能与目前养殖环境中使用的多种抗生素造成的微生物选择压力或者细菌之间抗性基因的交换有关(鲁曦,2012)。本文为建立水产养殖中抗生素的使用监管提供了基础数据,验证了宏基因组测序技术检测抗性基因的可行性。随着分子技术的成熟,宏基因组测序将广泛应用于水产养殖以及抗性基因检测。

参考文献

- 高立红,史亚利,厉文辉,等,2013. 抗生素环境行为及其环境效应研究进展[J]. 环境化学,9(9):1619-1633.
- 高盼盼,罗义,周启星,等,2009. 水产养殖环境中抗生素抗性基因(ARGs)的研究及进展[J]. 生态毒理学报,4(6):770-779.
- 金煜,2014. 我国地表水含 68 种抗生素[J]. 创新科技,(9):56.
- 李丽娟,张殿昌,龚世园,2007. 宏基因组技术在开发未培养微生物资源中的应用[J]. 水利渔业,27(3):7-9.
- 李秀银,王月兵,李明川,2012. 抗生素的分类及治疗原则[J]. 临床合理用药杂志,28(5):12.
- 鲁曦,2012. 低剂量抗生素刺激条件下耐药基因水平传播的机制研究[D]. 广州:华南理工大学.
- 罗义,周启星,2008. 抗生素抗性基因(ARGs)——一种新型环境污染物质[J]. 环境科学学报,28(8):1499-1505.
- 吕爱军,穆阿丽,许宏伟,等,2006. 抗生素在水产养殖中的应用[J]. 中国动物保健,(12):42-44.
- 倪达书,洪雪峰,1963. 草鱼消化道组织学的研究[J]. 水生生物学集刊,3(3):1-24.
- 农业部渔业局,2016. 2016 年中国渔业统计年鉴[J]. 北京:中国农业出版社.
- 全国水产技术推广总站,2010. 水产养殖禁用药物品种简表[J]. 中国水产,(10):57.
- 宋刚,吴月红,王国红,等,2015. 676 株肠球菌耐药性监测及万古霉素耐药基因研究[J]. 现代预防医学,42(5):939-941.
- 苏建强,黄福义,朱永官,2013. 环境抗生素抗性基因研究进展[J]. 生物多样,21(4):481-487.
- 苏仲毅,2008. 环境水样中 24 种抗生素残留的同时分析方法及其应用研究[D]. 厦门:厦门大学.
- 王丽梅,罗义,毛大庆,等,2010. 抗生素抗性基因在环境中的传播扩散及抗性研究方法[J]. 应用生态学报,21(4):1063-1069.
- 王瑞旋,耿玉静,王江勇,等,2012. 水产致病菌耐药基因的研究[J]. 海洋环境科学,31(3):323-328.
- 王芝敏,郑铃,2005. 大肠埃希菌多药外排泵 *AcrAB-ToIC* 系统的研究进展[J]. 福建医科大学学报,39(s):13-15.
- 文汉卿,史俊,寻昊,等,2015. 抗生素抗性基因在水环境中的分布、传播扩散与去除研究进展[J]. 应用生态学报,26(2):625-635.
- 吴康,2014. 饲喂蚕豆对草鱼肌肉结构、代谢、免疫及肠道菌群的影响[D]. 武汉:华中农业大学.
- 徐冰洁,罗义,周启星,等,2010. 抗生素抗性基因在环境中的来源、传播扩散及生态风险[J]. 环境化学,29(2):169-178.
- 周玉法,2011. 山东省东平湖四种常见淡水鱼肠道菌群分析[D]. 泰安:山东农业大学.
- Altschul S F, Madden T L, Schäffer A A, et al, 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. Nucleic acids research, 25(17):3389-3402.
- FAO, 2010. The State of World Fisheries and Aquaculture [R]. Rome: FAO.
- Hu Y, Yang X, Qin J, et al, 2013. Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota[J]. Nature communications, 4(2):2151.
- Huson D H, Auch A F, Qi J, et al, 2007. MEGAN analysis of metagenomic data[J]. Genome research, 17(3):377-386.
- Jun L J, Jeong J B, Huh M D, et al, 2004. Detection of tetracycline-resistance determinants by multiplex polymerase chain reaction in *Edwardsiella tarda* isolated from fish farms in Korea[J]. Aquaculture, 240(1):89-100.
- Kobayashi N, Nishino K, Hirata T, et al, 2003. Membrane topology of ABC-type macrolide antibiotic exporter *MacB* in *Escherichia coli* [J]. FEBS letters, 546(2/3):241-246.
- Luo R, Liu B, Xie Y, et al, 2012. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler[J]. GigaScience, 1(1):1-6.
- Noguchi H, Park J, Takagi T, 2006. MetaGene: prokaryotic gene finding from environmental genome shotgun sequences[J]. Nucleic acids research, 34(19):5623-5630.
- Pruden A, Pei R, Storteboom H, et al, 2006. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado[J]. Environmental Science & Technology, 40(23):7445-7450.
- Stoll C, Sidhu J P S, Tiehm A, et al, 2012. Prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in surface water samples collected from Germany and Australia [J]. Environmental science & technology, 46(17):9716-9726.
- Wu S G, Gao T, Zheng Y, et al, 2010. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. Aquaculture, 303(1):1-7.
- Wu S G, Wang G, Angert E R, et al, 2012. Composition, diversity, and origin of the bacterial community in grass carp intestine[J]. PloSone, 7(2):e30440.

(责任编辑 万月华)

Antibiotic Resistance Genes in the Intestinal Microorganisms of Grass Carp

ZHAO Di^{1,2}, XU Zai-yan³, WU Shan-gong^{1,2}, XIONG Fan^{1,2}, HAO Yao-tong^{1,2}

- (1.The Key Laboratory of Aquatic Biodiversity and Conservation of Chinese Academy of Science,
Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072,P.R.China;
- 2.University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039,P.R.China;
- 3.Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070,P.R.China)

Abstract: Abuse of antibiotics in the aquaculture industry has resulted in antibiotic-resistant bacteria, which pose a global threat to human and animal health. The resistance gene is the underlying cause of resistance to antibiotics, and intestinal microbes are a repository of resistance genes. However, little research has been carried out on bacterial antibiotic resistance genes in the digestive tract of aquaculture animals in China. In this study, we explored the type and abundance of resistance genes in the intestinal microbiome of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). Genomic DNA from the intestinal contents of grass carp was extracted and sequenced, and the sequences were then annotated using shotgun metagenomic sequencing technology. The resistance gene database (ARDB) was then screened for antibiotic resistance genes. We obtained a total of 61,554 annotated microbial gene sequences, including 409 eukaryotic sequences, 88 archaeal sequences and 61,057 eubacterial sequences. A total of 1,011 antibiotic resistance genes from 123 genotypes were obtained, including 78 single-resistance genotypes (679 single resistance genes) and 45 multi-resistance genotypes (304 multi-resistance genes). The multi-resistance genes accounted for 30.1% of the total resistance genes, indicating the possibility of a large number of multi-drug resistant microorganisms in the intestinal tract of grass carp. Further, the anti-macrolide antibiotic gene, *MacB*, was the most abundant resistance gene in the grass carp gut. This gene is rarely reported in studies on the domestic water environment, probably because microorganisms are not resistant when *MacB* exists alone. This study documented the types and quantities of microbial antibiotic resistance genes in the gut of grass carp, providing basic data for the regulation of antibiotic use in aquaculture and verifying the feasibility of detecting resistance genes by metagenomic sequencing technology.

Key words: grass carp; resistance gene; metagenomic sequencing; microorganism