



## 宏基因组学在微生物抗生素抗性基因检测中的应用

胡海燕<sup>1,2</sup> 刘慧敏<sup>1,3</sup> 孟璐<sup>1,3</sup> 董蕾<sup>1,3</sup> 兰图<sup>1,3</sup> 郑楠<sup>\*1,3</sup> 程建波<sup>2</sup> 王加启<sup>1,3</sup>

1 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 农业农村部奶产品质量安全风险评估实验室(北京) 北京 100193

2 安徽农业大学动物科技学院 安徽 合肥 230000

3 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所 动物营养学国家重点实验室 北京 100193

**摘要:** 抗生素广泛应用于人类和动物疾病的治疗等过程中。不合理利用和滥用抗生素导致耐药细菌、抗性基因的产生和传播。宏基因组学能够分析不同环境中抗生素抗性基因的多样性,并且完善目前已有的或构建新的宏基因组文库,从而为将来进行基因比对提供有力的参考。本文将综述宏基因组学在人类、动物和环境微生物抗生素抗性基因检测的应用,以期对未来评估抗性基因风险和解决抗生素耐药性问题提供技术支持。

**关键词:** 宏基因组学, 抗生素抗性基因, 人类, 动物, 环境

## Application of metagenomics in the detection of microbial antibiotic resistance genes

HU Hai-Yan<sup>1,2</sup> LIU Hui-Min<sup>1,3</sup> MENG Lu<sup>1,3</sup> DONG Lei<sup>1,3</sup> LAN Tu<sup>1,3</sup> ZHENG Nan<sup>\*1,3</sup>  
CHENG Jian-Bo<sup>2</sup> WANG Jia-Qi<sup>1,3</sup>

1 Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Dairy Products of China Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

2 College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230000, China

3 State Key Laboratory of Animal Nutrition, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

**Abstract:** Antibiotics are widely used in the treatment of human and animal diseases. Unreasonable use and abuse of antibiotics lead to the production and spread of resistant bacteria and resistance genes. Metagenomics can analyze the diversity of antibiotic resistance genes in different environments, and improve the existing or construct new metagenomic libraries, which will provide powerful references for future gene comparison. This article will review the application of metagenomics in the detection of

**Foundation items:** Fundamental Research Funds for the Central Non-profit Research Institution (2018-YWF-RW-18); The Agricultural Science and Technology Innovation Program (ASTIP-IAS12); Modern Agro-Industry Technology Research System of the PR China (CARS-36); Project of Risk Assessment on Raw Milk (GJFP2018008)

**\*Corresponding author:** E-mail: zhengnan\_1980@126.com

**Received:** 02-01-2019; **Accepted:** 14-05-2019; **Published online:** 11-06-2019

**基金项目:** 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2018-YWF-RW-18); 中国农业科学院科技创新工程(ASTIP-IAS12); 现代农业产业技术体系专项资金(CARS-36); 奶产品质量安全风险评估与营养品质评价重大专项(GJFP2018008)

**\*通信作者:** E-mail: zhengnan\_1980@126.com

**收稿日期:** 2019-01-02; **接受日期:** 2019-05-14; **网络首发日期:** 2019-06-11

microbial antibiotic resistance genes in human, animals and the environment, and provide technical support for future assessment of resistance gene risks and addressing antibiotic resistance.

**Keywords:** Metagenomics, Antibiotic resistance genes, Human, Animals, Environment

抗生素的使用已经成为全球广泛关注的热点, 抗生素的广泛使用以及滥用造成了抗生素耐药性在微生物中的发展和传播<sup>[1]</sup>, 并且加速了全球多重耐药细菌和抗生素抗性基因(Antibiotic resistance genes, ARGs)的出现和传播<sup>[2]</sup>。在医疗和农业中对抗生素的需求日益增加, 这使得环境中细菌耐药性水平日益加剧, 并且破坏了微生物和抗生素之间的自然平衡<sup>[3]</sup>。

ARGs 作为一种新型的环境污染物<sup>[4]</sup>, 广泛存在于人类、动物体内以及复杂的环境中。ARGs 起源早于人类使用抗生素, 抗生素耐药性是一种存在于环境中的古老的、自然发生的现象, 从晚更新世(Late pleistocene)永久冻土沉积物中回收的 DNA 序列, 确定存在四环素类(*tetM*)、万古霉素(*vanX*)以及  $\beta$ -内酰胺酶类(*bla*)抗性基因<sup>[5]</sup>。人和动物会将未代谢完的抗生素及 ARGs 通过粪便和肠道细菌排放到环境中, 环境中的耐药细菌会在抗生素选择压力下获得富集<sup>[6]</sup>, 或通过水平基因转移(Horizontal gene transfer, HGT)的方式将它们携带的 ARGs 传播到水原微生物中<sup>[7]</sup>, 造成 ARGs 在不同菌之间的传播, 这些原因共同促成了 ARGs 在畜禽养殖废水、医院废水和生活污水中的聚集。然而食物链富集代表了一种特殊情况, 在肉类生产和水产养殖过程中, 可能会造成抗生素在组织细胞的富集, 产生含有短暂而高浓度抗生素的细菌<sup>[8]</sup>。

自 1991 年 Pace 首次提出环境基因组学(也称微生物环境基因组学、宏基因组学、生态组学)的概念, 并在同年构建了第一个通过克隆环境样品中 DNA 的噬菌体文库以来<sup>[9-10]</sup>, 发现 ARGs 在土壤<sup>[11]</sup>、废水<sup>[12-13]</sup>、河水<sup>[14]</sup>、饮用水<sup>[15]</sup>、海水<sup>[16]</sup>、沉积物<sup>[17]</sup>等环境中广泛存在, 尤其是水生生态系统(例如城市和医院废水), 是获取和传播 ARGs 的理想环境, 甚至在动物源性食品<sup>[18-19]</sup>以及人体(例

如肠道<sup>[20-21]</sup>)中也检测到丰富的 ARGs。总而言之, 利用宏基因组学的方法, 在很大程度上帮助我们更全面地了解不同环境中 ARGs 的多样性与丰度变化, 对构建新的或完善目前已有的宏基因组文库, 研究其对人类的潜在威胁具有重大意义, 为未来获得基因的筛选比对提供了有力的参考。本文主要将宏基因组学在人类、动物和环境微生物中 ARGs 的检测应用以及重要意义进行了综述。

## 1 宏基因组学概述

宏基因组学(也称为环境和社区基因组学)是通过直接提取和克隆来自微生物组合的 DNA 来对微生物进行基因组分析。随着组学技术的发展, 宏基因组学越来越多地被用于研究人类微生物群落以及环境中存在的 ARGs, 从而评估 ARGs 对人类健康的风险。宏基因组学领域大致可以分为两种不同的方法: 基于序列的宏基因组学和功能宏基因组学(图 1)<sup>[22]</sup>。传统微生物学主要依赖于实验室对细菌的分离培养, 然而, 由于细菌分离培养较缓慢, 且对细菌的生长基质选择与最适生长温度了解较少, 所以目前环境中大多数的细菌不能通过培养的方式进行分离。董蕾等对金黄色葡萄球菌的检测方法研究进展进行综述, 发现传统的检测方法已经不能适应现代化大规模的检测需要, 而分子生物学方法研究更加快速、准确和灵敏<sup>[23]</sup>, 宏基因组学的发展, 使得研究更加简便、高效、且特异性强, 成本也在不断下降。

基于测序的宏基因组学的技术路线主要包括: (1) 直接从环境中提取 DNA(包括未培养细菌); (2) 对 DNA 片段进行宏基因组测序; (3) 将宏基因组序列与多年来在国家数据库(参考序列)中累积的已知序列进行比较, 以鉴定已知引起抗性的抗性基因和突变<sup>[22]</sup>。功能性宏基因组学通常涉及宏基因组文库的构建, 近几年功能性宏基因组学

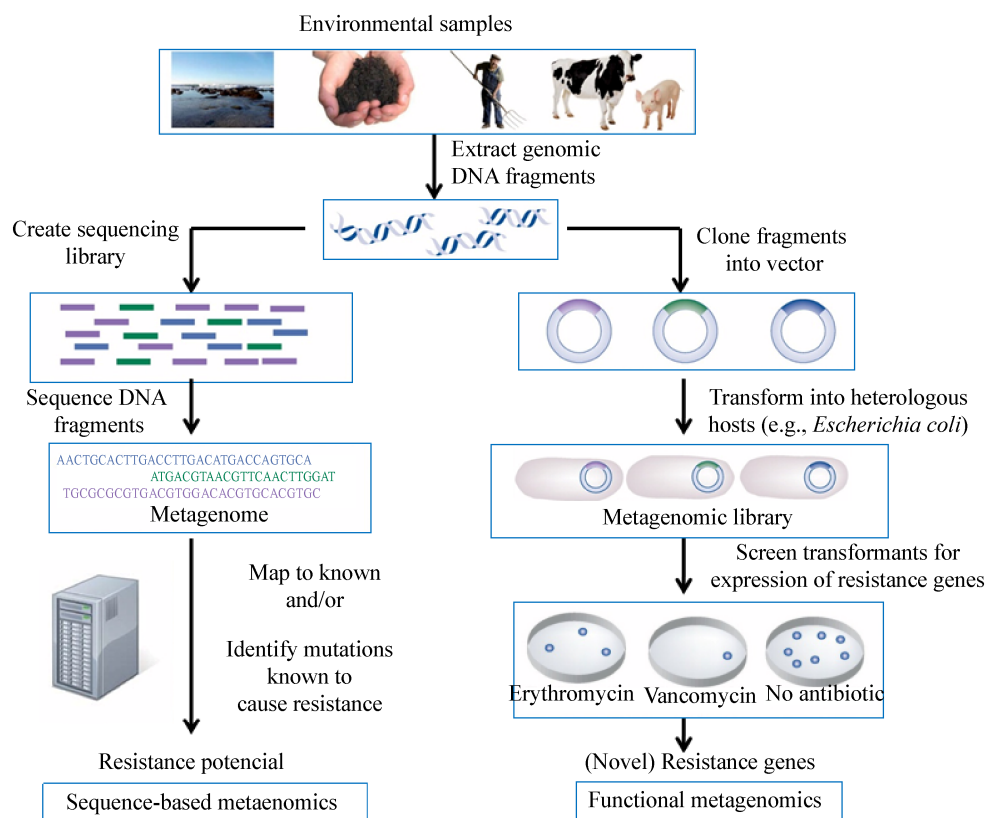


图1 微生物群落抗生素抗性的宏基因组学分析<sup>[22]</sup>

Figure 1 Metagenomic analysis of antibiotic resistance in microbial communities<sup>[22]</sup>

的应用与发展,证明了人类微生物群落中 ARGs 的储存库比以前依赖培养的方法所建立的更加多样化<sup>[24]</sup>。功能宏基因组学的技术路线主要包括:

(1) 直接从环境中提取 DNA(包括未培养细菌);(2) 将基因组 DNA 克隆到合适的载体中;(3) 将载体转化到宿主细菌,构建宏基因组文库;(4) 宏基因组文库的筛选和分析。利用功能性宏基因组学探索自然环境中的 ARGs 集合,可以揭示 ARGs 的真正多样性,确定新的耐药机制并揭示其生态作用。ARGs 研究的目标包括确定:(1) 抗生素耐药性是否是这些基因的主要功能;(2) 它们与临床重要的耐药机制的关联;(3) 它们的生物技术潜力<sup>[25]</sup>。利用宏基因组学在微生物方面的研究越来越多,随着高通量测序技术的不断进步,基于测序的宏基因组学的应用尤为广泛,而对于 ARGs 传播机制与功能研究也不容忽视,只有充分认识

到 ARGs 与抗生素耐药性之间的必然联系,才能够为未来 ARGs 可能对人类构成的健康威胁提供可靠地解决方法。

选择一个精确、完善、更新及时的数据库对 ARGs 筛查工作非常关键。功能性筛选有可能根据其序列识别出不可识别的基因,但基于序列的筛选可以识别出携带库的宿主物种中不表达的序列<sup>[26]</sup>。抗生素抗性基因数据库(Antibiotic resistance genes database, ARDB)整合了来自美国国立生物技术信息中心(National center for biotechnology information, NCBI)和 SwissProt 数据库的 13 254 个 ARGs 序列,经过数据过滤和去重后,得到 4 545 个 ARGs 序列,并且为研究细菌耐药性的分子基础的研究人员提供了可靠的注释服务(包括耐药性概况、作用机制、本体、COG 和 CDD 注释,以及到序列和蛋白质数据库的外部链接)<sup>[27]</sup>。综合抗生素研

究数据库(Comprehensive antibiotic research database, CARD)是一个用于从基因组数据预测抗生素耐药细菌(Antibiotic resistance bacteria, ARB)基因型的分子序列参考数据库,其核心是 ARO (Antibiotic resistance ontology),一种用于描述抗菌分子及其靶标,抗性机制、基因和突变及其关系的控制词汇表。除了高度发达的 ARO、CARD 还包括 RGI (Resistance gene identifier)软件,该软件可预测基因组序列数据中的 ARGs,包括未注释的基因组序列组装重叠群<sup>[28]</sup>。Resfams 是一个新的蛋白质家族策划数据库和相关的高精度和准确的 HMM (Hidden markov models)模型,通过本体确认抗生素抗性功能,在土壤和人体肠道微生物群中使用 Resfams 鉴定 ARGs,假阳性率极低,并且结果要优于 ARDB/CARD<sup>[29]</sup>。

2 宏基因组学检测抗生素抗性基因的方法

常用的 ARGs 检测方法主要分为传统微生物培养法和分子生物学方法。传统微生物培养法主要是评估微生物对抗生素的敏感性(或耐受程度),常见的药敏实验主要有纸片扩散法(K-B 琼脂法)、稀释法(肉汤稀释法和琼脂稀释法)、抗生素浓度梯度法(E-test)及利用自动化仪器(如 BD Phoenix、Vitek 2 等全自动微生物分析仪);分子生物学方法主要用来鉴定不同环境中微生物含有的不同 ARGs 的丰度与类型,包括 PCR、定量 PCR (q-PCR)、DNA 微阵列技术(或基因芯片技术)和宏基因组学方法<sup>[30]</sup>。基因测序技术在不同领域应用广泛,随着科学技术的不断进步,实现了更高的通量,更短的检测时间,测序结果更精确,成本有所降低。ARGs 的分子生物学检测方法优缺点比较见表 1。

表 1 抗生素抗性基因分子生物学检测方法优缺点比较<sup>[31-35]</sup>  
Table 1 Comparison of advantages and disadvantages of molecular biological detection methods for antibiotic resistance genes<sup>[31-35]</sup>

Items	优点 Advantages	缺点 Disadvantages
PCR	精确, 快速 Precise, fast	产物易交叉污染; 扩增与检测不能同步完成; PCR 结束后需要对产物进行凝胶电泳分析 The products were easy to be cross-contaminated; Amplification and detection can not be completed simultaneously; The products need to be analyzed by gel electrophoresis after PCR
q-PCR		
SYBR Green I	成本较低, 不需合成和标记探针 Lower costs, no need to synthesize and label probes	特异性较差, 检测通量低, 灵敏度低 Poor specificity, low detection throughput, low sensitivity
TaqMan q-PCR	灵敏度高, 具有良好的重复性 High sensitivity and good repeatability	淬灭难以彻底; 定量时容易受酶活性影响 Quenching is difficult to complete; It is easily affected by enzyme activity during quantification
HT-qPCR	定量, 高通量, 高效率 Quantitative, high-throughput, high efficiency	只能检测已知序列的抗性基因 Only detect resistance genes of known sequences
DNA 微阵列或芯片 DNA microarray or chips	高通量 High-throughput	灵敏度低, 精确度低, 不能定量, 有交叉杂合 Low sensitivity, low accuracy, not quantitative, crossing heterozygosity
宏基因组测序 Metagenome sequencing	特异性高, 灵敏度高, 高通量; 不依赖于微生物的培养和筛选过程 High specificity and sensitivity, high-throughput; Independent microbial culture and screening process	并行检测样品中的自由 DNA 及死亡微生物中 DNA; 成本较高(如酶制剂、高精密度仪器); 数据分析量大 Free DNA and DNA from dead microorganisms are detected in parallel; High costs (e.g. enzyme preparations, high-precision instruments); Large amount of data analysis

PCR 方法是最为经典的用于环境样品及纯菌株中 ARGs 的检测方法。通过 SYBR Green 荧光染料定量 PCR 方法和 *TaqMan* 荧光探针定量 PCR 方法联用发现,农业土壤中某些抗生素的亚临床浓度可以增强噬菌体介导的 ARGs 向潜在人类病原体的水平转移<sup>[36]</sup>。利用高通量荧光定量 PCR 技术(High-throughput quantitative PCR, HT-qPCR),研究城市饮用水处理厂不同水处理方式(例如臭氧预处理、砂滤、生物活性炭)对饮用水中的 ARGs 多样性与丰度的影响,探索 ARGs 在饮用水系统中的潜在转移机制<sup>[37]</sup>等。另外, DNA 微阵列(DNA microarray)或芯片(Chip)技术证实,屎肠球菌分离株中存在万古霉素和替考拉宁抗性基因 *van(A)*和 *van(Z)*,并鉴定了其他抗性基因,例如四环素类 *tet(M)*、大环内酯类 *erm(B)*和氨基糖苷类 *aac(6)-Ii* 抗性基因<sup>[38]</sup>。

对宏基因组的测序分析,目前主要有 Sanger/鸟枪法和高通量测序技术(High-throughput sequencing)。高通量测序技术又称第二代测序技术,目前主要代表平台有 Roche 454 焦磷酸测序(Pyrosequencing)、Illumina Solexa 合成测序、ABI SOLiD 连接法测序

等<sup>[30]</sup>。利用这些平台对动物体内(例如淡水鱼类)及养殖水环境<sup>[39]</sup>、废水以及废水接收河水<sup>[40]</sup>,甚至是人体(例如人类肠道)<sup>[1]</sup>中存在的 ARGs 进行测序,探索 ARGs 在环境中的传播机制以及对人类健康的潜在影响。随着人们对高通量测序的进一步研究,被称为第三代测序技术的 Helicos 单分子测序、Pacific Bioscience 的 SMRT (Single molecule real-time)技术和 Oxford Nanopore Technologies 公司的纳米孔单分子测序技术正向着高通量、低成本、更长的读取长度发展<sup>[31]</sup>。测序技术的快速进步推动了宏基因组学的发展,本文对第二代以及第三代测序技术的特点进行比较(表 2)<sup>[32,42-43]</sup>。

利用宏基因组测序得到很大的数据量,将较短读数组装成重叠群的过程可以采用两种不同的途径:基于参考的组装和从头组装。选择哪条路线取决于需要分析的数据集以及每个研究项目的具体需求,用于宏基因组数据分析的工具和数据库目前正朝着越来越高效和精细化的方向发展, Oulas 等对目前最常用的有关宏基因组数据分析的工具进行了综述<sup>[44]</sup>。有参分析流程适合人类肠道、海洋、土壤等有较好参考数据库的领域,而无参分

表 2 第二代、第三代宏基因组测序技术特点

Table 2 Characteristics of second-generation and third-generation metagenomic sequencing technologies

Items	通量 Throughput	读长 Length (bp)	准确性 Accuracy (%)	化学原理 Chemical principle
第二代 Second-generation				
Roche 454	400 Mb	400–500	99	焦磷酸测序 Pyrosequencing
Illumina HiSeq 2500	600 Gb	180	98	边合成边测序 Sequencing-by-synthesis process
SOLiD 5500 xl	30 Gb	50–100	99	边连接边测序 Sequencing-by-ligation process
第三代 Third-generation				
Helicos	35 Gb	30–35	96	边合成边测序/DNA 聚合酶 Sequencing-by-synthesis process/DNA polymerase
SMRT	No data	100 000	85	边合成边测序/DNA 聚合酶 Sequencing-by-synthesis process/DNA polymerase
Nanopore	10–20 Gb	不限 Unlimited	99	电信号测序/核酸外切酶 Electrical signal sequencing/exonuclease

析流程能够获得未被注释的物种和基因注释表达并通过分箱(Binning)挖掘新物种的基因组。通过宏基因组测序,构建和完善不同领域宏基因组文库,可以捕获样本中系统发育和遗传多样性<sup>[27]</sup>,能够在充分了解 ARGs 存在种类、传播途径以及抗生素耐药机制的基础上,预测未来可能出现的抗生素抗性以及对人类构成的其他潜在威胁。

### 3 宏基因组学在抗生素抗性基因领域的研究现状与重要意义

近年来,人们意识到 ARGs 在人类健康、环境污染方面问题的严重性,随着宏基因组学的发展,越来越多的 ARGs 在人类体内、动物体内、水环境、土壤和空气中被检测到,利用宏基因组学技术发现和了解不同领域存在的 ARGs,建立健全宏基因组文库,ARGs 的传播途径以及与抗生素耐药机制之间的联系,对各领域发展以及了解 ARGs 对人类健康的潜在威胁具有重要意义。

#### 3.1 宏基因组学对人类抗生素抗性基因的研究现状与意义

ARGs 大量存在于人体,人类既是 ARGs 的来源也是传播载体。首先,人类肠道微生物群是 ARGs 的重要宿主。利用 PCR 技术和宏基因组方法从不同国家志愿者的粪便中检测出的四环素、大环内酯、林可酰胺、链阳性菌素、杆菌肽、万古霉素、 $\beta$ -内酰胺和氨基糖苷类抗性基因是前七种最丰富的 ARGs 类型<sup>[45-46]</sup>。更有研究表明,人类肠道菌群中的噬菌体携带的 ARGs 能够使人对抗菌肽、林可霉素、链球菌产生耐药性以及多药耐药性<sup>[22]</sup>。检测来自欧洲、中国和美国的 1 267 个人类粪便样品,其中有 3 个中国人肠道微生物组中存在完整的可移动的黏菌素耐药(Mobile colistin resistance)基因 *mcr-1* (100%核苷酸同一性),说明 *mcr-1* 在中国广泛存在并且已经扩散到健康人类的肠道中<sup>[23]</sup>。

其次,人体其他器官和系统也含有复杂的微生物群落结构,人类口腔也是 ARGs 的储存库。人类口腔中的 ARGs 有许多是在质粒和转座子上发现

的,整合子是天然基因捕获和表达单位,利用基于 PCR 的宏基因组方法研究健康人类口腔中携带 ARGs 整合子的存在,获得了临床重要抗生素抗性的功能基因<sup>[47]</sup>。对人类唾液中的微生物群落进行宏基因组学分析与鉴定,发现唾液中存在新型四环素、替加环素抗性基因,这表明口腔环境可能会危及这些抗生素的有效性<sup>[48]</sup>,我们需要进一步研究和了解口腔环境中 ARGs 的存在对抗生素有效性的影响以及监测口腔环境中存在的 ARGs 的变化与出现。充分利用宏基因组学数据分析,参考 ARGs 的出现频率、在人体细菌中携带的 ARGs 的丰度与多样性的变化以及一些其他的重要信息,对于医生临床中抗生素的使用及用量具有一定的指导意义。

抗生素被用来治疗不同年龄阶段出现的各种疾病,例如成人、青少年、儿童甚至是新生婴儿,利用宏基因组学方法检测不同年龄段人体微生物含有的 ARGs,例如肠道或粪便。新生婴儿体内的 ARGs 可能来源于母体,利用宏基因组学方法,研究新生婴儿肠道内微生物群落以及存在的 ARGs,发现一周龄婴儿粪便中含有  $\beta$ -内酰胺类(*mecA*)和四环素类[*tet(A)*、*tet(B)*、*tet(D)*、*tet(O)*、*tet(Q)*、*tet(X)*]抗性基因<sup>[49]</sup>。研究不同年龄阶段(学龄前儿童、学龄儿童、高中生和成人)肠道内 ARGs 的多样性,从 124 个个体的肠道微生物群中发现 80 种不同的 ARGs 类型,包括氨基糖苷类、青霉素  $\beta$ -内酰胺类、酰胺醇类、甲氧苄啶、大环内酯类-林可酰胺-链阳性菌素(Macrolide-lincosamide-streptogramins, MLS)、磺胺类、四环素类等抗性基因,并且在学龄前儿童、学龄儿童、高中生和成人组中分别鉴定出 25、37、58 和 72 种 ARGs,说明人类肠道中 ARGs 的多样性随着年龄的增长而增加<sup>[50]</sup>。

如今我们面临更大的世界性难题,抗生素的发现和广泛用于人类疾病的治疗意义深远,但复杂、滥用以及不合理地使用抗生素引发的细菌抗生素耐药性增加以及 ARGs 的传播等问题,导致了临床药师在抗菌药物选用时面临着困难,医院抗感染的

治疗面临着巨大压力<sup>[51]</sup>。加强抗生素管理措施,合理使用抗生素,可有效地降低抗生素的使用强度和常见致病菌的耐药性<sup>[52]</sup>;利用宏基因组学了解内在细菌耐药性的遗传基础,从而了解抗生素的活性谱,可以指导具有针对靶标改善或增加活性的组合新药剂的开发<sup>[53]</sup>。人体是 ARGs 的储存库,通过宏基因组学的应用,能够更好地确定并了解人体内细菌群落中基础 ARGs 以及内在抗性机制,抗生素对复杂的微生物群落的影响,最大限度地减少抗生素耐药性的负面影响和确定 ARGs 从健康人类肠道菌群转移到致病菌的风险和潜在途径<sup>[54]</sup>。

### 3.2 宏基因组学对动物抗生素抗性基因的研究现状与意义

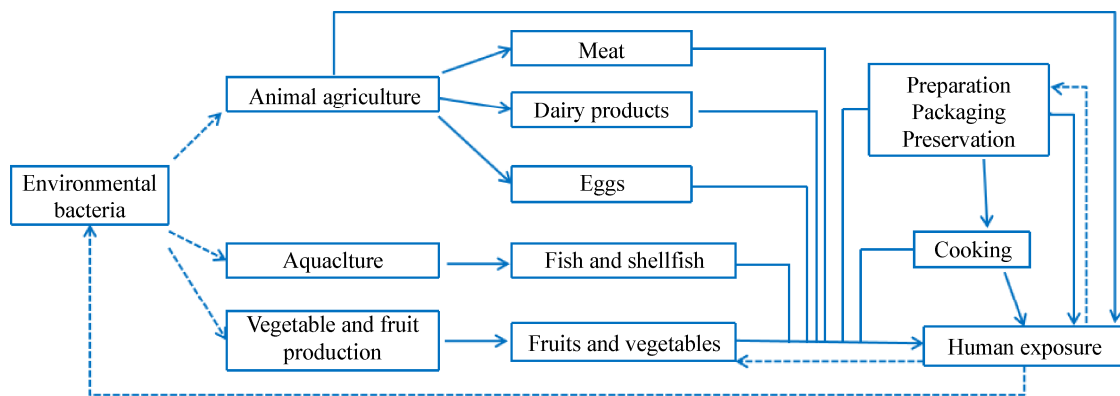
兽用抗生素在提高畜禽生产性能、防治疾病方面发挥着重要作用,目前全球超过一半以上的抗生素用于畜禽养殖,从而产生的耐药病原菌、ARGs 及其传播风险越来越得到人们的重视<sup>[55]</sup>。动物体内含有多种具有抗生素耐药性的细菌种类,使用宏基因组测序发现绵羊瘤胃中 30 种(包括达托霉素、氟喹诺酮类、新生霉素、环丙沙星等)已知抗生素的耐药性,曾经被认为是“最后的希望抗生素”的达托霉素和粘菌素(因为对它们的耐药性在临床环境中尚未广泛传播)也在绵阳瘤胃中检测出高丰度的 ARGs<sup>[56]</sup>。动物的粪便中也含有大量的 ARGs,对成年奶牛、小牛犊和断奶前犊牛的 28 种粪便进行宏基因组测序,发现四环素抗性基因是最常识别的 ARGs (占有抗性基因的 61%),其次是氨基糖苷类、大环内酯类、 $\beta$ -内酰胺类、磺胺类抗性基因<sup>[57]</sup>。利用宏基因组学研究猪、鸡和人类粪便样本中的共同 ARGs,在粪便样本中发现了高水平的四环素、红霉素、氨基糖苷类和多药抗性基因,鸡、猪和人类粪便共有许多 ARGs (如 *macA-macB* 和 *tetA-tetR*)<sup>[58]</sup>。宏基因组测序技术在动物、人类粪便中发现不同种类、丰度的 ARGs,说明在动物、人类的肠道细菌含有 ARGs,许多 ARGs 在动物、人类粪便共有,说明 ARGs 已经通过某些途径从动物相关细菌传播给人类肠道细菌,或者一些人兽共用类型抗生素

导致动物与人类对该类抗生素都产生了相同的 ARGs。目前已有几种人用抗生素被禁止用于动物养殖与疾病的治疗。利用宏基因组研究表明, SYN-007 (Ribaxamase)——一种口服  $\beta$ -内酰胺酶类抗生素与阿莫西林共同作用于动物,能够使肠道微生物群落的变化减少, ARGs 产生频率降低<sup>[39]</sup>,含有 2 g/L 金霉素的水饲喂肉鸡,使得粪便中大肠杆菌减少并抑制多药耐药基因(*mdtA*、*mdtC*、*mdtK*、*ompR* 和 *TolC*)的产生,促进四环素抗性基因(*tetA* 和 *tetW*)的丰度并导致双歧杆菌的富集<sup>[59]</sup>,说明抗生素的使用对动物肠道及粪便微生物群落结构具有一定的影响,且伴随着微生物群落中携带特定 ARG 宿主细菌丰度的变化。

水产养殖过程中抗生素的使用也使得鱼类体内以及水环境中出现大量的 ARGs 并进行传播。从水库收集野生淡水鱼类肠道黏液,使用宏基因组测序检测到水库中鱼类肠道黏液中含有  $\beta$ -内酰胺类(*bla<sub>TEM</sub>*)、大环内酯类(*ermB*)、喹诺酮类(*qnrS*)和磺胺类(*sulI*)抗性基因,说明 ARGs 不仅存在于常规使用抗生素的水产动物中,而且还存在于水生环境中生存的其他生物体内<sup>[60]</sup>。

目前食源性动物产品所携带的 ARGs 对人类的潜在危害并不是很了解,只有充分了解动物体携带以及所处环境 ARGs 的丰度和多样性,才能预估潜在影响或者更好地应对将来发生的问题。邢萌茹等对奶牛乳房炎的危害、主要致病菌的耐药现状及耐药机制、耐药性检测方法以及抗生素耐药性的防治措施等进行了综述,旨在为奶牛乳房炎的治疗和新型抗生素的开发提供参考,通过对乳房炎源细菌耐药机制及宏基因组测序分析所携带 ARGs,可以形成相关的风险评估报告,建立切实可行的预警防控体系等<sup>[61]</sup>。人类处于食物链的最顶端,而食物链可能会产生具有短暂且高浓度抗生素的细菌,特别是在肉类生产和水产养殖中(图 2)<sup>[8]</sup>。从大型生猪屠宰场采集的猪肉样品中发现  $\beta$ -内酰胺类(*bla<sub>TEM</sub>*、*bla<sub>CMY-2</sub>*、*bla<sub>CTX-M</sub>*)、四环素[*tet(L)*、*tet(M)*]和磺胺类(*sul1*、*sul2*)抗性基因的流行和分布<sup>[12]</sup>,



图2 抗生素抗性基因在食物链中的富集与传播<sup>[8]</sup>Figure 2 Enrichment and spread of antibiotic resistance genes in the food chain<sup>[8]</sup>

并且在珠江三角洲河口水产养殖区虾肠道样本中也检测到磺胺类(*sul1*, *sul2*)、四环素类(*tetO*, *tetX*)、喹诺酮类(*qnrA*)抗性基因<sup>[62]</sup>。从 195 份原料乳样品中分离出 53 株金黄色葡萄球菌具有多重耐药性,对青霉素 G、氨苄青霉素、红霉素等抗生素具有耐药性,可能对公众健康造成威胁,并且 63% 的青霉素抗性菌株具有  $\beta$ -内酰胺类(*blaZ*)抗性基因,60% 的红霉素抗性菌株具有大环内酯类[*erm(A)*、*erm(B)*、*erm(C)*、*msr(A)*或 *msr(B)*]抗性基因,对庆大霉素、卡那霉素和苯唑西林具有抗性的分离株分别携带氨基糖苷类(*aac6'*-*aph*", *ant*(4')-Ia)和  $\beta$ -内酰胺类(*mecA*)抗性基因<sup>[21]</sup>。反刍动物瘤胃可能成为临床重要抗生素的 ARGs 来源,而人类可以通过与反刍动物的密切接触(例如在农场、屠宰场或通过食用受污染的肉类产品),从而使这些 ARGs 传递到与人类相关的细菌<sup>[39]</sup>。目前就有研究发现,鱼类和人类两种主要的病原体发光杆菌和弧菌对多种抗生素具有耐药性,并在鱼类宏基因组中发现  $\beta$ -内酰胺类(*bla*<sub>TEM</sub>)、四环素类(*tetA*)、大环内酯类(*ermB*)、氨基糖苷类(*aadA*)和磺胺类(*sul1*)等 ARGs,所以鱼是抗生素抗性病原体的潜在载体,ARGs 可通过食物链进入人体肠道,这是抗生素抗性病原体从特定海洋鱼类向人类传播的直接证据<sup>[63]</sup>。

抗生素在畜牧养殖中的广泛使用,造成畜产品携带 ARB 或 ARGs,通过对奶产品质量与安全相关研究,发现奶牛、山羊、水牛、骆驼和牦牛奶中

中除了存在致病菌外,还大量存在假单胞菌属细菌<sup>[64-65]</sup>,假单胞菌属属于非致病菌,但会影响牛奶储存过程中品质的变化,可能携带 ARGs。即使在巴氏杀菌乳中,蜡状芽孢杆菌也能够以孢子的形式存活,在贮存温度升高大量生长并产生肠毒素与催吐毒素<sup>[66]</sup>,并且检测到蜡状芽孢杆菌具有  $\beta$ -内酰胺类、利福平抗生素耐药性,对喹诺酮类、氨基糖苷类、大环内酯类抗生素敏感<sup>[67]</sup>。在奶产品质量安全风险评估工作中,发现分离得到的乳房炎源致病菌对治疗疾病抗生素具有多重耐药性,因此,充分了解致病菌的抗生素耐药性以及携带的 ARGs,对奶牛乳房炎或其他疾病治疗过程中抗生素的使用具有指导意义。虽然通过培养的方式从原料乳中分离出两株携带四环素类 [*tet(M)*] 抗性基因和 Tn916-Tn1545 转座子基因的金黄色葡萄球菌<sup>[20]</sup>,但是通过宏基因组学等非培养的方式能够发现更多未知的 ARGs 以及传播机制,并建立丰富的 ARGs 数据库。结合笔者实验室研究,认为应该充分利用宏基因组学技术,探索牛奶中 ARGs 的存在以及传播机制,建立牛奶微生物 ARGs 宏基因组文库,并且利用宏基因组学进一步深入研究,以确定与 ARGs 相关的生态、分类和遗传风险因素。

### 3.3 宏基因组学对环境抗生素抗性基因的研究现状与意义

#### 3.3.1 水环境中的抗生素抗性基因

大量的 ARGs 存在于城市生活废水、医院废水



以及废水接收河水、沉积物中,应用宏基因组学研究新加坡城市废水和地表水环境中的 ARGs,发现废水、处理后的污水和地表水共有 21 个 ARGs 的耐药基因组,编码多药耐药外排泵或对氨基糖苷类、MLS、喹诺酮类、磺胺类和四环素类抗生素的耐药性。水环境是细菌生长和 ARGs 传播的良好介质,在医院废水中含有大量的肠道细菌、肠杆菌和机会致病菌,所以具有更高的 ARGs 多样性和丰度,以及临床上重要的超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(Extended-spectrum  $\beta$ -lactams, ESBL) (*bla*<sub>CTX</sub>、*bla*<sub>TEM</sub>、*bla*<sub>OXA</sub>、*bla*<sub>SHV</sub>)和碳青霉烯类(*bla*<sub>KPC</sub>、*bla*<sub>NDM</sub>)抗性基因<sup>[68]</sup>,所以医院废水在特定的废水处理厂(Wastewater treatment plant, WWTP)处理,提高废水中 ARGs 去除的处理工艺,废水处理后的排放与利用都应该重视起来,医院废水是 ARGs 最为复杂、丰度较高的载体,是控制 ARGs 传播的源头以及困难所在。

畜牧养殖中抗生素的大量使用,农场污水中也含有大量的 ARGs,平均而言,农场污水中 ARGs 的丰度是河源水的 3 倍,通过宏基因组测序发现,即使经过 WWTP 处理,废水接收河水中最丰富的 ARGs 是来自农场污水的四环素类(*tetC*、*tetW*)抗性基因<sup>[69]</sup>。而且废水排放明显增加了接收河水中的细菌多样性,并能够诱导接收河水中细菌群落的变化,一些在废水样品中占主导地位的 ARGs,在接收河水中几乎消失<sup>[40]</sup>,所以废水、废水接收河水以及环境中 ARGs 具有很大的相关性。

经过 WWTP 处理的废水仍然含有 ARGs,释放到环境中,研究周围河流沉积物的基因和有机物,废水对接收水体沉积物中 ARGs 的含量和微生物群落结构的影响很大,随着与 WWTP 的距离增加,湖泊沉积物的丰度降低<sup>[70]</sup>。而且在 WWTP 好氧活性污泥样品和厌氧消化污泥中发现了各种 ARGs (包括氟喹诺酮类、四环素、 $\beta$ -内酰胺类、MLS、磺胺类、氨基糖苷类、糖肽类、苯酚类和甲氧苄氨嘧啶类抗性基因),还检测到细菌中存在潜在的多药耐药性<sup>[71]</sup>。废水的处理至关重要,经

过 WWTP 处理过后的污水仍然能够携带和传播 ARGs,所以通过宏基因组学对 ARGs 的传播机制以及来源的不断探索,可以制定更加合理的废水处理策略,减少 ARGs 的传播与不良影响。例如在废水处理过程中,在加入氯化钠的污水处理池中,ARGs (特别是 *sul2*、*tetG* 和 *amrB*)的相对丰度下降了近 50%,表明高盐度可能会抑制携带 ARGs 细菌的生长<sup>[72]</sup>。综上所述,废水微生物群落汇集环境、人类和动物起源的细菌,其中很多都含有 ARGs<sup>[73]</sup>,但是在废水处理过程中,其含有的抗生素残留以及金属等,影响 ARB 和 ARGs 的含量和组成<sup>[74]</sup>。因此,减少抗生素和重金属向污水系统的释放(或增强其在预处理过程中的去除)可以减轻抗生素耐药性选择压力,并减轻 WWTP 中 ARGs 的扩散<sup>[75]</sup>。废水处理过程中细菌群落的改变,不可避免地影响 ARGs,进一步了解废水处理过程中细菌群落的动态及其与 ARGs 变化的关系,废水与沉积物中 ARGs 的差异<sup>[76]</sup>,对进一步优化废水处理过程中操作参数,控制 ARGs 在环境中的传播具有重要意义<sup>[77]</sup>。

随着水产养殖的快速发展以及抗生素的过度使用,在水产养殖系统中检测到 ARGs 并广泛在环境中传播。根据宏基因组学分析结果显示,在虾养殖池水中四环素类、磺胺类、大环内酯类、MLS、氨基糖苷类、氯霉素抗性基因丰度较高,且水样中移动遗传原件(Mobile genetic elements, MGEs)的相对丰度显著高于相应的虾肠和沉积物样品<sup>[78]</sup>。通过对水产养殖环境中 ARGs、MGEs 的丰度和多样性研究,能够更好地了解二者之间的相关性,减少传播并改善水生生态系统的生态管理。通过基于高通量测序的宏基因组分析,在工业海水养殖系统的样本中鉴定了 21 种 ARGs 类型(包括四环素类、磺胺类、氯霉素类、杆菌肽类、替加环素、链霉素、卡那霉素、碳青霉烯类、青霉素、林可酰胺、链霉素、大环内酯、氟喹诺酮类等),发现变形杆菌和拟杆菌是 ARGs 的潜在优势宿主,常规海水养殖系统与再循环系统相比较,后者能够控制 ARGs 的水

平, 是比较有发展前景的海水养殖系统<sup>[16]</sup>。

水资源的再利用已经在全世界范围内被提倡, 但有研究表明, 重复利用的水资源可以比饮用水传递更多的 ARGs, 所以评估水再利用的总体安全时, 需要考虑水中的 ARGs 以及携带 ARB<sup>[79-80]</sup>。海洋生态环境中其他物质与 ARGs 的相互作用也可能产生一定的影响, 萘或非是沿海微生物群落中两种典型的多环芳香烃, 一定量的萘或非存在显著提高了微生物群落中磺胺类(*sulI*)和氨基糖苷类(*aadA2*)抗性基因的丰度<sup>[81]</sup>。抗生素使用引发的问题日益严峻, 部分抗生素的禁用以及 ARB、ARGs 的产生与传播, 使得研究和寻找抗生素的替代品(例如益生菌)成为迫在眉睫的事情。从位于台湾奇古西南岸的海水鱼塘中分离出一种光合紫色硫细菌(*Photosynthetic purple sulfur bacteria*, *Marichromatium purpuratum* RuA2), 对温度具有更高的耐受性, 能够改善水质、减少磺胺类(*sulI*)抗性基因的出现以及增加微生物群落组成的多样性, 这种细菌可以作为抗生素的一种益生菌替代方法<sup>[82]</sup>。

### 3.3.2 土壤中的抗生素抗性基因

土壤作为 ARGs 的储存库, 和临床耐药基因组之间存在明显的重叠, 但影响土壤中 ARGs 组成及其在基因组和栖息地之间运动的因素在很大程度上是未知的。农业土壤中 ARGs 丰富, 对来自 18 个草地和农业土壤样品中的 ARGs 进行了功能性宏基因组筛选, 确定了 2 895 个 ARGs, 其序列与公共数据库中的序列不同<sup>[83]</sup>。采集长江三角洲农业土壤样品, 所有样品中均检测到抗生素, 其中 15 个土壤样品中检测到 ARGs, 例如四环素类(*tetA*)、磺胺类(*sulI*)和喹诺酮类(*qnrS*), 并且磺胺类(*sulI*)抗性基因与喹诺酮类、四环素类抗生素以及铜和锌都显示出显著的相关性<sup>[84]</sup>。一些源自土壤的 ARGs, 例如  $\beta$ -内酰胺类(*blaP1*)、四环素类 [*tetA*(G)、*tetA*]、氨基糖苷类(*aadB*、*aacA4*)和磺胺类(*sulI*)抗性基因, 被发现分布于人类病原体中<sup>[85]</sup>, 这不仅提供 ARGs 在人类与环境中水平传播的证

据, 而且有利于了解 ARGs 传播的机制。

农业土壤中 ARB、ARGs 出现和传播的诱导因素有很多, 因为药物可以通过人为活动夹带到农田上, 这可能是土壤细菌耐药性出现和传播的潜在驱动因素。研究加拿大农业土壤中新发现几种基因产物(包括假设的酶类), 它们赋予对氨基糖苷类、磺胺类和 ESBL 高水平耐药性; 将功能宏基因组学和高分辨率蛋白质组学分析相结合, 发现一种富含脯氨酸的肽( $PPP^{AZI4}$ ), 其表达可以促进对不同大环内酯类抗生素的耐药性, 而不是其他核糖体靶向抗生素, 所以大胆推测  $PPP^{AZI4}$  可能涉及一种新的大环内酯特异性耐药机制<sup>[86]</sup>。农田中施用粪肥或用污水进行灌溉, 是土壤中细菌耐药性和 ARGs 出现和传播的另一个潜在因素。来自猪饲养场的抗生素残留和 ARGs 主要通过粪肥和养殖废水扩散到河水(福氏志贺氏菌、百日咳杆菌)、河流沉积物(四环素、艰难梭菌和结核分枝杆菌抗性基因)和温室土壤(多重抗性基因、炭疽杆菌)中<sup>[87]</sup>。对蔬菜基地的鸡粪和温室土壤中 ARGs 的多样性和丰度进行研究发现, 人工温室土壤中抗生素、ARGs、人类致病菌和携带 ARGs 的人类致病菌水平更高, 并且它们的相对丰度随着温室种植年限的延长而增加<sup>[88]</sup>。更有研究表明, 施用粪肥土壤中不仅 ARGs 的丰度和多样性显著增加, 而且导致 ARGs 和移动遗传元件显著富集, 说明粪肥的施用可通过 HGT 加速 ARGs 在土壤中的传播<sup>[11]</sup>。

随着生活水平的不断提高, 生活垃圾造成的环境污染一直是人类面临的巨大难题。然而通过宏基因组分析城市垃圾填埋场中 ARGs 的丰度和变异, 发现在垃圾分解期间, 编码外排泵的 ARGs 的百分比增加, 增加了抗生素耐药性, 所以我们应该对垃圾填埋场的 ARGs 的丰度和多样性进行全面的评估, 从而能够更全面地掌握 ARGs 的动态以及预估其对环境 and 人类健康的潜在影响<sup>[89]</sup>。

### 3.3.3 空气中的抗生素抗性基因

随着人们对环境中抗生素残留、ARB 的产生以及 ARGs 的传播越来越重视, 空气中 ARGs 的存

在对空气质量与安全也显得尤为重要。在动物养殖中,抗生素的使用对空气中 ARGs 的存在具有间接影响。测定来自肉牛养殖场的流动空气中 PM (Particulate matters) 抗生素、ARB 和 ARGs 的含量,发现 PM 可促进几种兽用抗生素以及含有 ARGs 的微生物群落的传播,因此自然环境因素促进 PM 的扩散,从而将养殖场存在的微生物(包括含有 ARGs 的微生物)传播到其他环境中,例如人类生活区<sup>[90]</sup>。工业化的迅速发展造成了空气污染程度的加重,宏基因组分析显示,雾霾天气时空气中 ARGs 丰度和种类都高于非雾霾天气,在 14 个 PM 样本中共检测到 22 种 ARGs 类型的 205 种亚型,31 种 ARGs 亚型被确定为优势 ARGs,包括四环素类、 $\beta$ -内酰胺类、氨基糖苷类、MLS 耐药性、氯霉素、多肽、多药、林可霉素、大环内酯、链阳性菌素和磺胺类抗性基因。在不同的非空气环境样本中,土壤中 ARGs 与空气样本的相似性最高<sup>[91]</sup>。空气中 ARGs 的存在不容小觑,与土壤、水环境相比,更加容易传播给人类,其潜在影响与危害目前并不了解,通过对空气中 PM 携带的 ARGs 进行研究,掌握空气中 ARGs 的来源,降低空气受 ARGs 的污染程度,避免空气作为传播介质将 ARB 和 ARGs 在环境、动物和人类之间广泛传播。

#### 4 总结与展望

由于抗生素的广泛使用与滥用引发的问题日益严峻,ARGs 的传播对人类公共健康的威胁已经引起了科学家的注意。在过去几十年中,人类体内、土壤、水环境(包括城市生活、医院废水,畜牧养殖废水,水产养殖环境,WWTP 排出水,河流及污泥等)甚至是空气以及食品中,不断检测出不同种类型抗生素的 ARGs,尤其是在人类医学与动物养殖过程中广泛使用的  $\beta$ -内酰胺类、四环素类、氨基糖苷类和磺胺类等抗生素。ARGs 在不同环境样品中同时存在,说明人类的活动会导致环境中出现高丰度的 ARGs,并且 ARGs 已经在不同环境中广泛传播。目前已经开展了不同环境中 ARGs 的多

样性与丰度、传播途径(例如 HGT)、与耐药机制之间的关系以及特定微生物携带特定的 ARGs 等研究,未来将致力于探索抑制不同环境中 ARGs 发生与传播的方法,防止 ARGs 传播至与人类相关的病原体中,从而降低 ARGs 对人类健康的威胁。

在科学信息技术发展迅速的时代,宏基因组学技术的发展与应用,为人类在微生物方面的研究与发展作出了巨大贡献,未来宏基因组学的发展将向着更高通量,更准确,更低成本的方向发展,但是对于目前研究得到的海量数据,怎样选择和构建更完善的宏基因组数据库进行 ARGs 的筛选与分析,以及更加清晰、简单地诠释结果内容,仍然是大家关注和需要克服的技术难题。

人类目前研究的可培养的细菌种类仍然是“冰山一角”,不基于培养的宏基因组学对剖析不同环境中 ARGs 的多样性与丰度,以及目前很多研究关注的 ARGs 通过 MGEs 的传播、ARGs 与抗生素耐药机制之间的关系,鉴定抗生素耐药性的特殊分子特性,提供了更丰富的分析。利用宏基因组学对人类医学、动物养殖与疾病治疗过程中抗生素的使用、WWTP 中抗生素残留以及 ARGs 的处理方式具有指导意义。目前全球面临严峻的抗生素耐药问题,使得宏基因组学的发展与利用显得尤为重要。宏基因组学能够探索和发现自然界中更广泛的 ARGs,捕获更完整的 ARGs 图谱,为研究 ARGs 的功能、预测未来可能出现的抗生素耐药性、研究新的抗生素以及寻找抗生素的替代品奠定了基础;并且宏基因组学与其他组学技术(例如宏转录组学)联用,可以探索学习更多的 ARGs 相关知识,为未来评估 ARGs 风险和解决抗生素耐药性问题提供技术支持。

#### REFERENCES

- [1] Hu YF, Yang X, Qin JJ, et al. Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 2151
- [2] Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2010, 74(3): 417-433

- [3] von Wintersdorff CJH, Penders J, van Niekerk JM, et al. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 173
- [4] Pruden A, Pei RT, Storteboom H, et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(23): 7445-7450
- [5] D'Costa VM, King CE, Kalan L, et al. Antibiotic resistance is ancient[J]. *Nature*, 2011, 477(7365): 457-461
- [6] Murray AK, Zhang LH, Yin XL, et al. Novel insights into selection for antibiotic resistance in complex microbial communities[J]. *mBio*, 2018, 9(4): e00969-18
- [7] Baquero F, Martínez JL, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, 19(3): 260-265
- [8] Bengtsson-Palme J. Antibiotic resistance in the food supply chain: where can sequencing and metagenomics aid risk assessment?[J]. *Current Opinion in Food Science*, 2017, 14: 66-71
- [9] Schmidt TM, DeLong EF, Pace NR. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(14): 4371-4378
- [10] Hugenholtz P, Pace NR. Identifying microbial diversity in the natural environment: a molecular phylogenetic approach[J]. *Trends in Biotechnology*, 1996, 14(6): 190-197
- [11] Chen QL, An XL, Li H, et al. Long-term field application of sewage sludge increases the abundance of antibiotic resistance genes in soil[J]. *Environment International*, 2016, 92-93: 1-10
- [12] Karkman A, Johnson TA, Lyra C, et al. High-throughput quantification of antibiotic resistance genes from an urban wastewater treatment plant[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, 92(3): fiw014
- [13] Xu J, Xu Y, Wang HM, et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river[J]. *Chemosphere*, 2015, 119: 1379-1385
- [14] Amos GCA, Zhang L, Hawkey PM, et al. Functional metagenomic analysis reveals rivers are a reservoir for diverse antibiotic resistance genes[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 171(3/4): 441-447
- [15] Shi P, Jia SY, Zhang XX, et al. Metagenomic insights into chlorination effects on microbial antibiotic resistance in drinking water[J]. *Water Research*, 2013, 47(1): 111-120
- [16] Wang JH, Lu J, Zhang YX, et al. Metagenomic analysis of antibiotic resistance genes in coastal industrial mariculture systems[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 253: 235-243
- [17] Zhu YG, Zhao Y, Li B, et al. Continental-scale pollution of estuaries with antibiotic resistance genes[J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2: 16270
- [18] Li LL, Olsen RH, Ye L, et al. Antimicrobial resistance and resistance genes in aerobic bacteria isolated from pork at slaughter[J]. *Journal of Food Protection*, 2016, 79(4): 589-597
- [19] Liu HM, Li SL, Meng L, et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from dairy herds in northern China[J]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(11): 8796-8803
- [20] Starikova EV, Prianichnikov NA, Zdobnov E, et al. Bioinformatics analysis of antimicrobial resistance genes and prophages colocalized in human gut metagenomes[J]. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 2018, 12(2): 114-118
- [21] Hu YF, Liu F, Lin IYC, et al. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2016, 16(2): 146-147
- [22] Schmieder R, Edwards R. Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches[J]. *Future Microbiology*, 2012, 7(1): 73-89
- [23] Dong L, Liu HM, Meng L, et al. Research progress on rapid live *Staphylococcus aureus* detection methods[J]. *The Food Industry*, 2017, 38(10): 253-259 (in Chinese)  
董蕾, 刘慧敏, 孟璐, 等. 快速检测金黄色葡萄球菌活菌的研究进展[J]. *食品工业*, 2017, 38(10): 253-259
- [24] Sommer MOA, Church GM, Dantas G. The human microbiome harbors a diverse reservoir of antibiotic resistance genes[J]. *Virulence*, 2010, 1(4): 299-303
- [25] dos Santos DFK, Istvan P, Quirino BF, et al. Functional metagenomics as a tool for identification of new antibiotic resistance genes from natural environments[J]. *Microbial Ecology*, 2017, 73(2): 479-491
- [26] Riesenfeld CS, Schloss PD, Handelsman J. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities[J]. *Annual Review of Genetics*, 2004, 38: 525-552
- [27] Liu B, Pop M. ARDB—antibiotic resistance genes database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(S1): D443-D447
- [28] Jia BF, Raphenya AR, Alcock B, et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(D1): D566-D573
- [29] Gibson MK, Forsberg KJ, Dantas G. Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(1): 207-216
- [30] Wu N, Yang JH, Zhang WY, et al. Progress in detection methods of antibiotic resistance in different environmental matrices[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(12): 2720-2729 (in Chinese)  
吴楠, 杨静慧, 张伟玉, 等. 不同环境介质中抗生素耐药性的检测方法研究进展[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(12): 2720-2729
- [31] Rizzo L, Manaia C, Merlin C, et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review[J]. *Science of The Total Environment*, 2013, 447: 345-360
- [32] Rothberg JM, Leamon JH. The development and impact of 454 sequencing[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(10): 1117-1124
- [33] Yuan YN, Liu WZ. The types, characteristics and applications of real-time fluorescent quantitative PCR techniques[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2008, 35(3): 27-30 (in Chinese)  
袁亚男, 刘文忠. 实时荧光定量 PCR 技术的类型、特点与应用[J]. *中国畜牧兽医*, 2008, 35(3): 27-30
- [34] Luby E, Ibekwe AM, Zilles J, et al. Molecular methods for assessment of antibiotic resistance in agricultural ecosystems: prospects and challenges[J]. *Journal of Environment Quality*, 2016, 45(2): 441-453
- [35] Wang Y, Liu JJ. Recent advances in research on quantification of nucleic acids[J]. *Progress in Pharmaceutical Sciences*, 2006,

- 30(9): 385-390 (in Chinese)  
王宇, 刘景晶. 核酸的定量技术研究进展[J]. 药学进展, 2006, 30(9): 385-390
- [36] Ross J, Topp E. Abundance of antibiotic resistance genes in bacteriophage following soil fertilization with dairy manure or municipal biosolids, and evidence for potential transduction[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(22): 7905-7913
- [37] Xu LK, Ouyang WY, Qian YY, et al. High-throughput profiling of antibiotic resistance genes in drinking water treatment plants and distribution systems[J]. *Environmental Pollution*, 2016, 213: 119-126
- [38] Perreten V, Vorlet-Fawer L, Slickers P, et al. Microarray-based detection of 90 antibiotic resistance genes of gram-positive bacteria[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005, 43(5): 2291-2302
- [39] Kaleko M, Freguia CF, Fanelli B, et al. Sa1839-orally delivered beta-lactamase prevents gut microbiome dysbiosis caused by iv and oral antibiotics and mitigates propagation of antibiotic resistance in porcine and canine models[J]. *Gastroenterology*, 2018, 154(6 Suppl 1): S-415
- [40] Jia SY, Zhang XX, Miao Y, et al. Fate of antibiotic resistance genes and their associations with bacterial community in livestock breeding wastewater and its receiving river water[J]. *Water Research*, 2017, 124: 259-268
- [41] Bleidorn C. Third generation sequencing: technology and its potential impact on evolutionary biodiversity research[J]. *Systematics and Biodiversity*, 2016, 14(1): 1-8
- [42] Metzker ML. Sequencing technologies—the next generation[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(1): 31-46
- [43] Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, 26(10): 1135-1145
- [44] Oulas A, Pavlouidi C, Polymenakou P, et al. Metagenomics: tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies[J]. *Bioinformatics and Biology Insights*, 2015, 9: 75-88
- [45] Milanović V, Osimani A, Aquilanti L, et al. Occurrence of antibiotic resistance genes in the fecal DNA of healthy omnivores, ovo - lacto vegetarians and vegans[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2017, 61(9): 1601098
- [46] Feng J, Li B, Jiang XT, et al. Antibiotic resistome in a large - scale healthy human gut microbiota deciphered by metagenomic and network analyses[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(1): 355-368
- [47] Rahman MA. Detection and characterisation of integrons, gene cassettes and cassette-located antibiotic resistance genes in the human oral metagenome[D]. London: Doctoral Dissertation of University College London, 2017
- [48] Reynolds LJ. The identification and characterisation of novel antimicrobial resistance genes from human and animal metagenomes[D]. London: Doctoral Dissertation of University College London, 2017
- [49] Gosalbes MJ, Vallès Y, Jiménez-Hernández N, et al. High frequencies of antibiotic resistance genes in infants' meconium and early fecal samples[J]. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 2016, 7(1): 35-44
- [50] Lu N, Hu YF, Zhu LY, et al. DNA microarray analysis reveals that antibiotic resistance-gene diversity in human gut microbiota is age related[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 4302
- [51] Zhang HM, Jin CH, Fu P. Influence on use of antibiotics and bacterial drug resistance in the hospital before and after special rectification activities[J]. *China Pharmaceuticals*, 2016, 25(24): 77-80 (in Chinese)  
张红梅, 金彩辉, 傅萍. 专项整治前后医院抗菌药物使用情况及对细菌耐药性的影响[J]. *中国药业*, 2016, 25(24): 77-80
- [52] Geng FX. Effect of antibiotic management on antibiotic use intensity and bacterial resistance[J]. *World Latest Medicine Information*, 2017, 17(40): 110-111 (in Chinese)  
耿凤霞. 抗生素管理对抗生素使用强度及细菌耐药性的影响[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2017, 17(40): 110-111
- [53] Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(1): 42-51
- [54] Do TT, Tamames J, Stedtfeld RD, et al. Antibiotic resistance gene detection in the microbiome context[J]. *Microbial Drug Resistance*, 2018, 24(5): 542-546
- [55] Sui QW, Zhang JY, Wei YS, 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)  
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
- [56] Hitch TCA, Thomas BJ, Friedersdorff JCA, et al. Deep sequence analysis reveals the ovine rumen as a reservoir of antibiotic resistance genes[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 235: 571-575
- [57] Haley BJ, Kim SW, Cao H, et al. 265 Genomic and metagenomic analysis of antibiotic resistance in dairy animals[J]. *Journal of Animal Science*, 2017, 95(S4): 131
- [58] Ma LP, Xia Y, Li B, et al. Metagenomic assembly reveals hosts of antibiotic resistance genes and the shared resistome in pig, chicken, and human feces[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 5(1): 420-427
- [59] Xiong WG, Wang YL, Sun YX, et al. Antibiotic-mediated changes in the fecal microbiome of broiler chickens define the incidence of antibiotic resistance genes[J]. *Microbiome*, 2018, 6: 34
- [60] Marti E, Huerta B, Rodríguez-Mozaz S, et al. Abundance of antibiotic resistance genes and bacterial community composition in wild freshwater fish species[J]. *Chemosphere*, 2018, 196: 115-119
- [61] Xing MR, Liu HM, Meng L, et al. Progress on antimicrobial resistance of main pathogens in bovine mastitis[J]. *China Dairy Industry*, 2018, 46(9): 28-35 (in Chinese)  
邢萌茹, 刘慧敏, 孟璐, 等. 奶牛乳房炎主要致病菌耐药性研究进展[J]. *中国乳品工业*, 2018, 46(9): 28-35
- [62] Su HC, Liu S, Hu XJ, et al. Occurrence and temporal variation of antibiotic resistance genes (ARGs) in shrimp aquaculture: ARGs dissemination from farming source to reared organisms[J]. *Science of The Total Environment*, 2017, 607-608: 357-366
- [63] Naik OA, Shashidhar R, Rath D, et al. Characterization of multiple antibiotic resistance of culturable microorganisms and metagenomic analysis of total microbial diversity of marine fish sold in retail shops in Mumbai, India[J]. *Environmental Science*

- and Pollution Research, 2018, 25(7): 6228-6239
- [64] Meng L, Liu HM, Dong L, et al. Identification and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different raw milks at storage temperatures[J]. Journal of Dairy Science, 2018, 101(4): 2897-2905
- [65] Meng L, Zhang YD, Liu HM, et al. Characterization of *Pseudomonas* spp. and associated proteolytic properties in raw milk stored at low temperatures[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2158
- [66] Saleh-Lakha S, Leon-Velarde CG, Chen S, et al. A study to assess the numbers and prevalence of *Bacillus cereus* and its toxins in pasteurized fluid milk[J]. Journal of Food Protection, 2017, 80(7): 1085-1089
- [67] Gao TT, Ding Y, Wu QP, et al. Prevalence, virulence genes, antimicrobial susceptibility, and genetic diversity of *Bacillus cereus* isolated from pasteurized milk in China[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 533
- [68] Ng C, Tay M, Tan B, et al. Characterization of metagenomes in urban aquatic compartments reveals high prevalence of clinically relevant antibiotic resistance genes in wastewaters[J]. Frontiers in microbiology, 2017, 8: 2200
- [69] Rowe W, Verner-Jeffreys DW, Baker-Austin C, et al. Comparative metagenomics reveals a diverse range of antimicrobial resistance genes in effluents entering a river catchment[J]. Water Science and Technology, 2016, 73(7): 1541-1549
- [70] Chu BTT, Petrovich ML, Chaudhary A, et al. Metagenomics reveals the impact of wastewater treatment plants on the dispersal of microorganisms and genes in aquatic sediments[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(5): e02168-17
- [71] Guo JH, Li J, Chen H, et al. Metagenomic analysis reveals wastewater treatment plants as hotspots of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements[J]. Water Research, 2017, 123: 468-478
- [72] Liu MT, Li QL, Sun HH, et al. Impact of salinity on antibiotic resistance genes in wastewater treatment bioreactors[J]. Chemical Engineering Journal, 2018, 338: 557-563
- [73] Manaia CM, Rocha J, Scaccia N, et al. Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: tackling the black box[J]. Environment International, 2018, 115: 312-324
- [74] Karkman A, Do TT, Walsh F, et al. Antibiotic-resistance genes in waste water[J]. Trends in Microbiology, 2018, 26(3): 220-228
- [75] Mao DQ, Yu S, Rysz M, et al. Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants[J]. Water Research, 2015, 85: 458-466
- [76] Narciso-Da-Rocha C, Rocha J, Vaz-Moreira I, et al. Bacterial lineages putatively associated with the dissemination of antibiotic resistance genes in a full-scale urban wastewater treatment plant[J]. Environment International, 2018, 118: 179-188
- [77] Zhang JY, Yang M, Zhong H, et al. Deciphering the factors influencing the discrepant fate of antibiotic resistance genes in sludge and water phases during municipal wastewater treatment[J]. Bioresource Technology, 2018, 265: 310-319
- [78] Zhao YT, Zhang XX, Zhao ZH, et al. Metagenomic analysis revealed the prevalence of antibiotic resistance genes in the gut and living environment of freshwater shrimp[J]. Journal of Hazardous Materials, 2018, 350: 10-18
- [79] Garner E, Chen CQ, Xia K, et al. Metagenomic characterization of antibiotic resistance genes in full-scale reclaimed water distribution systems and corresponding potable systems[J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(1): 6113-6125
- [80] Hong PY, Julian TR, Pye ML, et al. Reusing treated wastewater: consideration of the safety aspects associated with antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes[J]. Water, 2018, 10(3): 244
- [81] Wang J, Wang J, Zhao ZL, et al. PAHs accelerate the propagation of antibiotic resistance genes in coastal water microbial community[J]. Environmental Pollution, 2017, 231: 1145-1152
- [82] Shiung II, Chang MJ, Chang YT, et al. Photosynthetic purple sulfur bacterium *Marichromatium purpuratum* RuA2 induces changes in water quality parameters, the occurrence of sulfonamide resistance gene and microbial community structure of marine aquaculture[J]. Aquaculture, 2018, 493: 68-78
- [83] Forsberg KJ. The diversity, ecology, and clinical implications of antibiotic resistance genes in uncultured soil microbial communities[D]. St. Louis: Doctoral Dissertation of Washington University, 2015
- [84] Sun JT, Zeng QT, Tsang DCW, et al. Antibiotics in the agricultural soils from the Yangtze River Delta, China[J]. Chemosphere, 2017, 189: 301-308
- [85] Forsberg KJ, Reyes A, Wang B, et al. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens[J]. Science, 2012, 337(6098): 1107-1111
- [86] Lau CHF, van Engelen K, Gordon S, et al. Novel antibiotic resistance determinants from agricultural soil exposed to antibiotics widely used in human medicine and animal farming[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2017, 83(16): e00989-17
- [87] Fang H, Han LX, Zhang HP, et al. Dissemination of antibiotic resistance genes and human pathogenic bacteria from a pig feedlot to the surrounding stream and agricultural soils[J]. Journal of Hazardous Materials, 2018, 357: 53-62
- [88] Fang H, Wang HF, Cai L, et al. Prevalence of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens in long-term manured greenhouse soils as revealed by metagenomic survey[J]. Environmental Science & Technology, 2015, 49(2): 1095-1104
- [89] Liu X, Yang S, Wang YQ, et al. Metagenomic analysis of antibiotic resistance genes (ARGs) during refuse decomposition[J]. Science of The Total Environment, 2018, 634: 1231-1237
- [90] McEachran AD, Blackwell BR, Hanson JD, et al. Antibiotics, bacteria, and antibiotic resistance genes: aerial transport from cattle feed yards via particulate matter[J]. Environmental Health Perspectives, 2015, 123(4): 337-343
- [91] Hu JL, Zhao FZ, Zhang XX, et al. Metagenomic profiling of ARGs in airborne particulate matters during a severe smog event[J]. Science of the Total Environment, 2018, 615: 1332-1340