

# 环境耐药组及其健康风险的宏基因组学研究策略和方法

苏志国<sup>1,2</sup>, 陈吕军<sup>1,3</sup>, 温东辉<sup>\*2</sup>

1 清华大学环境学院, 北京 100084

2 北京大学环境科学与工程学院, 北京 100871

3 浙江清华长三角研究院生态环境研究所 浙江省水质科学与技术重点实验室, 浙江 嘉兴 314006

苏志国, 陈吕军, 温东辉. 环境耐药组及其健康风险的宏基因组学研究策略和方法[J]. 微生物学通报, 2023, 50(4): 1538-1558.

SU Zhiguo, CHEN Lüjun, WEN Donghui. Metagenomic strategies and methods for studying environmental resistome and its health risk[J]. Microbiology China, 2023, 50(4): 1538-1558.

**摘要:** 抗生素耐药性在环境中的发展和传播对人体健康造成潜在风险。随着高通量测序技术和生物信息学方法的不断发展, 宏基因组学技术被广泛应用于不同环境样本的抗生素耐药组研究。本文介绍了两种针对环境耐药组筛查的宏基因组学分析方法, 总结了当前主流的生物信息学软件和数据库, 并阐述了环境耐药组的风险评估框架和基于宏基因组学技术的相关实践, 以期对环境耐药组的监测、风险评估和管控提供可行的路线图。

**关键词:** 抗生素抗性基因; 耐药组; 宏基因组; 生物信息; 风险评估

## Metagenomic strategies and methods for studying environmental resistome and its health risk

SU Zhiguo<sup>1,2</sup>, CHEN Lüjun<sup>1,3</sup>, WEN Donghui<sup>\*2</sup>

1 School of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China

2 College of Environmental Sciences and Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

3 Zhejiang Provincial Key Laboratory of Water Science and Technology, Department of Environment in Yangtze Delta Region Institute of Tsinghua University, Jiaxing 314006, Zhejiang, China

**Abstract:** The development and spread of antibiotic resistance in the environment pose

资助项目: 国家自然科学基金(52170185, 51938001, 52070111); 中国博士后科学基金(2022M721815); 清华大学“水木学者”计划

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (52170185, 51938001, 52070111), the China Postdoctoral Science Foundation (2022M721815), and the “Shuimu Tsinghua Scholar” Program of Tsinghua University.

\*Corresponding author. E-mail: dhwen@pku.edu.cn

Received: 2022-12-26; Accepted: 2023-02-06; Published online: 2023-02-14

potential risks to human health. With the advances in high-throughput sequencing and bioinformatics, metagenomics has been widely used in the study of antibiotic resistomes in different environmental samples. This paper introduces two metagenomic methods for environmental resistome screening, summarizes the current mainstream bioinformatic tools and databases, and describes the risk assessment framework of environmental resistome and the related practice based on metagenomic technology. We aim to provide a feasible roadmap for the monitoring, risk assessment, and control of environmental resistome.

**Keywords:** antibiotic resistance genes (ARGs); resistome; metagenomics; bioinformatics; risk assessment

抗生素作为 20 世纪最重要的科学发现之一, 为人类疾病防治和农业生产做出了重要贡献<sup>[1]</sup>。不同抗生素能够特异性地抑制细菌的细胞壁、蛋白质和核酸合成, 或者损害细胞膜功能, 干扰细胞特定的能量代谢系统<sup>[2]</sup>(图 1), 从而实现抑菌和杀菌效果。根据达尔文的进化选择理论, 针对自然环境中某些微生物(如真菌)可以合成抗生素的“有意识”行为, 细菌为了获得更高的生存机会, 成功进化出了抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)<sup>[3]</sup>, 通过使抗生素失活、细胞外排泵、改变膜通透性、药物靶位点修饰等机制抵御抗生素的攻击<sup>[4-5]</sup>(图 1)。细菌的耐药性是自然界固有和古老的现象, 是某些环境微生物的内在抗性<sup>[6-7]</sup>。例如, 有研究者在 3 万年前永冻土层沉积物中检测到了 ARGs 的存在<sup>[8]</sup>, 从一个过去 400 万年里无人类接触的洞穴样品中同样筛选到了可培养的抗生素抗性细菌(antibiotic resistant bacteria, ARB)<sup>[9]</sup>。

然而, 由于抗生素的大量生产、使用甚至滥用, 这一自然进程被极大地加快, 细菌耐药性频繁发生并不断增强, 甚至出现了可以抵抗几乎所有抗生素的“超级细菌”。美国疾病控制与预防中心 2019 年的报告显示, 每年有 280 万美国人感染抗生素耐药细菌, 超过 3.5 万人因此死亡<sup>[10]</sup>, 如果目前的耐药性问题得不到遏制,

到 2050 年全球每年因耐药菌感染而死亡的人数将达到 1 000 万<sup>[11]</sup>。2013 年, “八国集团首脑峰会”明确指出, 抗生素耐药性(antimicrobial resistance, AMR)问题是与气候变暖同样严峻的全球性危机; 2015 年, 世界卫生组织(World Health Organization, WHO)也将其列为 21 世纪人类在健康领域面临的重大挑战之一。

环境是 AMR 传播扩散的关键节点。近年来, ARGs 在地表水、地下水、沉积物、废水、污泥、土壤甚至饮用水和空气等不同生境中被频繁地检测到<sup>[12-14]</sup>。大量研究证实, 畜禽养殖、疾病治疗和工业生产等人类活动对 ARGs 的广泛存在和传播起到了主导作用<sup>[3,15-17]</sup>。通过多种途径输入到环境中的大部分抗生素及其代谢产物仍处于活性状态, 虽然浓度已经很低, 但是足以对环境微生物产生持续的选择压力<sup>[2]</sup>, 并促使微生物通过遗传突变和水平基因转移(horizontal gene transfer, HGT)等方式获得耐药性<sup>[18]</sup>。整合子、转座子、质粒、噬菌体等可移动遗传元件(mobile genetic elements, MGEs)介导的 HGT 过程被认为是 ARGs 快速传播的主要驱动力<sup>[19]</sup>。值得注意的是, 人类活动还会带来大量非抗生素类抑菌化合物(如重金属、消毒剂、生物杀灭剂等)<sup>[20]</sup>, 会通过交叉抗性(cross-resistance)、协同抗性(co-resistance)和共调控(co-regulation)等机制实现与 AMR 的共选

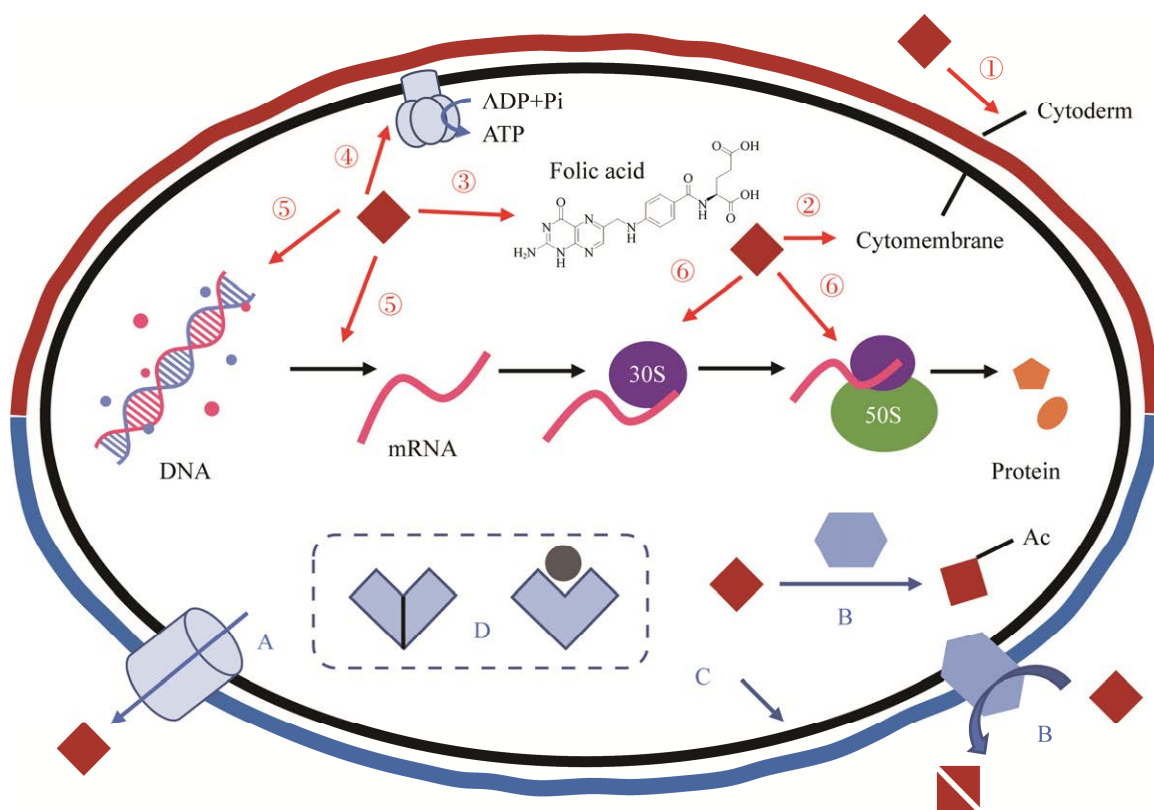


图1 抗生素作用机制和细菌耐药机制<sup>[2,4-5]</sup> ①抑制细胞壁合成与修复; ②改变细胞膜结构; ③竞争性拮抗; ④干扰细胞能量代谢及电子传递系统; ⑤抑制核酸合成; ⑥抑制蛋白质合成; A: 抗生素外排泵; B: 抗生素灭活; C: 细胞膜渗透性降低; D: 抗生素作用靶点突变或被修饰

Figure 1 Main action mechanism of antibiotics and resistance mechanism of bacteria<sup>[2,4-5]</sup>. ① Inhibition of cell wall synthesis and repair; ② Alteration of cell membranes; ③ Competitive antagonism activity; ④ Interference of cell energy metabolism and electron transmission system; ⑤ Inhibition of nucleic acid synthesis; ⑥ Inhibition of protein synthesis; A: Antibiotic efflux; B: Antibiotic inactivation; C: Reduced permeability to antibiotic; D: Antibiotic target alteration/protection/replacement.

择<sup>[21]</sup>。人们逐渐认识到某些人类病原体可以获得环境中非致病性细菌的耐药性特征,这对公共健康是一个巨大威胁。因此 ARGs 被视为一种新型的环境污染物<sup>[22]</sup>,而基因组或微生物群落中的全部 ARGs 和可能表达耐药性的同系物构成了耐药组,对其来源、分布、传播规律和潜在风险的研究越来越受到人们的重视。

目前,研究抗生素耐药性的方法主要有3类<sup>[12]</sup>: (1) 基于细菌培养的药敏试验; (2) 基

于聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)的分子生物学分析方法; (3) 基于高通量测序的宏基因组学方法。其中药敏试验的方法主要服务于病原菌的耐药性研究,是临床微生物学最重要的方法之一,可以为感染性疾病的治疗提供关键的细菌耐药性表型信息<sup>[23]</sup>,但是由于环境中很大比例的微生物在实验室条件下无法进行培养,该方法并不能有效追踪复杂微生物群落中耐药性的出现和传播。PCR 技术可

以根据目的基因的引物序列检测不同类型环境样本中的 ARGs, 具有快速、灵敏、准确等特点, 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 技术还可以实现对 ARGs 的精确定量<sup>[12]</sup>。在此基础上, 近年来得到快速发展的高通量实时荧光定量 PCR (high-throughput quantitative real-time PCR, HT-qPCR) 技术, 可以同时定量检测上百种 ARGs 且自动化程度高, 因此在许多环境 ARGs 的研究中被广泛使用<sup>[24]</sup>。但是基于 PCR 的方法仍然存在一定的局限性<sup>[25]</sup>, 一是 PCR 结果的可靠性可能会受到扩增效率低和非特异性反应的影响; 二是受到引物的限制, 无法有效覆盖环境中丰富多样的 ARGs 序列。

随着测序技术的不断发展和成熟, 宏基因组学方法克服了细菌培养和 PCR 扩增的限制, 可以有效识别环境样品中数以千计的 ARGs 及其变体, 同时还能解析物种组成和其他功能基因的变化, 通过序列组装确定 ARGs、MGEs 和病原菌之间的关键联系, 从而提供 ARGs 传播扩散规律及其潜在健康风险等重要信息。另外, 宏基因组学技术具有灵活、可扩展、易于快速实施和标准化等优势, 并且测序成本的不断降低为大规模调研 ARGs 在污水处理厂、土壤、海洋等复杂生境内的全球分布提供了经济可行的监测平台。基于此, 有效地利用生物信息学手段解析测序数据, 将是环境耐药组研究的重要步骤。

## 1 环境耐药组的宏基因组学研究策略

### 1.1 基于短序列和序列组装的分析方法

测序技术和生物信息学方法的进步提高了不同环境样本中微生物序列数据的可用性, 为环境耐药组的监测提供了可行的工具。近年来,

以 Illumina 测序平台为代表的二代测序技术是宏基因组学研究的主要测序方法, 具有读长短 (100–300 bp)、速度快、通量高、准确性高和成本低等特点<sup>[26]</sup>。研究者们基于高通量测序平台和一系列生物信息学分析工具, 构建了较为成熟的针对环境耐药组的宏基因组学研究策略。如图 2 所示, 首先提取环境样品中的所有 DNA, 通过二代测序平台的标准流程获得大量的原始序列(raw reads)数据, 然后需要进行质量控制和去除宿主污染, 输出高质量的清洁序列(clean reads); 此后, 为了识别和表征宏基因组数据集中的 ARGs 等功能基因, 主要有两种数据分析方法<sup>[26–28]</sup>, 即基于短序列的分析与基于组装的分析。

基于短序列的研究方法是利用 Bowtie2、Diamond 等工具直接将 clean reads 映射到参考数据库, 或者先将 clean reads 拆分成 k-mers, 再把它们映射到参考数据库, 从而不需要通过序列组装即可检测样品中的 ARGs。基于序列组装的研究方法是首先利用 IDBA-UD、MEGAHIT、MetaSPAdes 等工具将 reads 组装成较长的重叠群序列(contigs), 或进一步利用 MetaBAT2、MaxBin2、MetaWRAP 等工具进行分箱(binning)获得细菌基因组草图(metagenome-assembled genomes, MAGs); 然后通过 prokka、prodigal 等工具预测 contigs 或 MAGs 上具有编码蛋白质潜能的开放阅读框(open reading frame, ORF), 最后使用 BLAST、Usearch、Diamond 等工具将它们与参考数据库进行比对, 从而对 contigs 或 MAGs 进行 ARGs 的注释。

### 1.2 序列同一性阈值的确定和数据标准化

在上述分析流程中, 从大量序列中识别 ARGs 等功能基因主要依赖于序列相似性比对, 即相似性高的基因通常表达相似功能, 这是生物信息学方法的核心原则<sup>[29]</sup>。因此, 选择合适的序

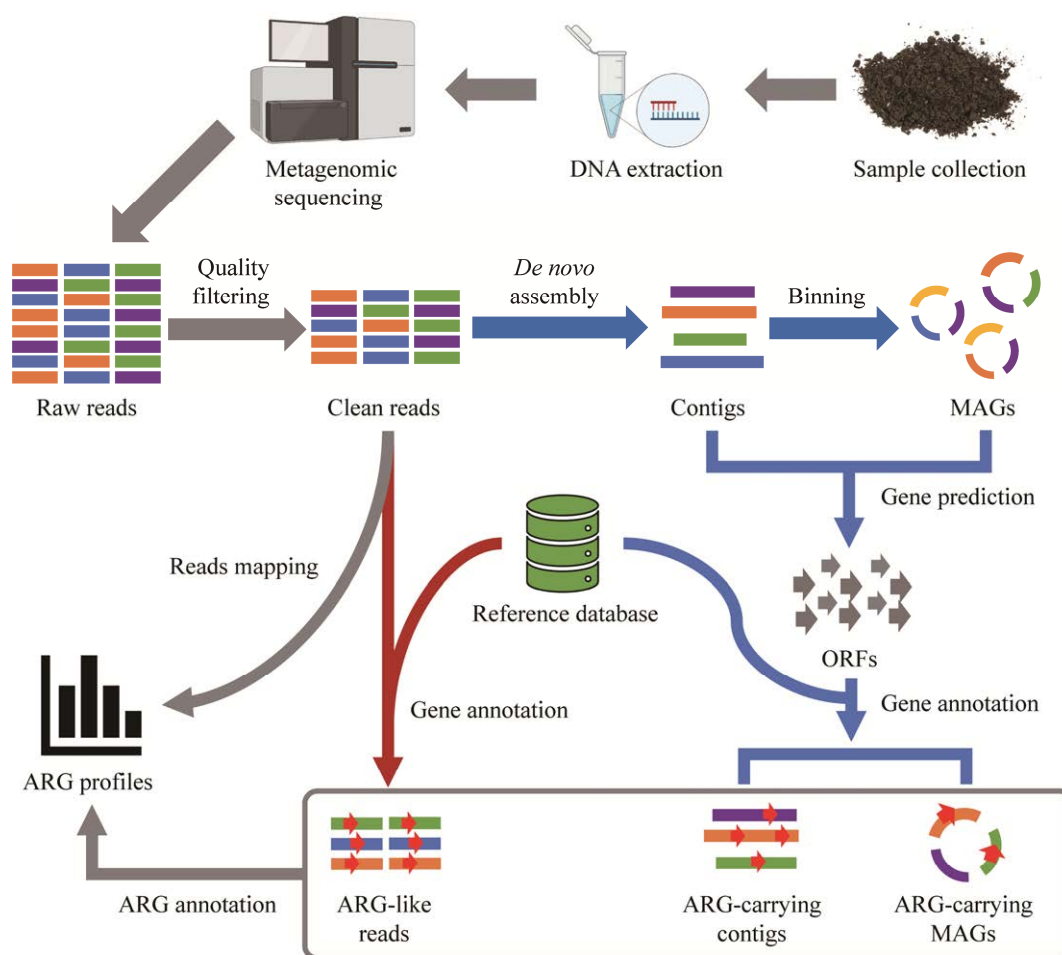


图2 针对环境抗生素耐药组的宏基因组学分析流程 红线代表基于短序列的分析步骤, 蓝线代表基于序列组装的分析步骤, 灰线代表共同的步骤

Figure 2 Metagenomics analysis process for environmental antibiotic resistance. The red line represents the analysis flow based on short reads, the blue line represents the analysis flow based on sequence assembly, and the gray line represents the common flow.

列同一性阈值(比如 identity、query coverage、e-values)对 ARGs 等功能基因的准确判定至关重要。然而阈值的确定受到多种因素的影响<sup>[26,29]</sup>:

(1) 测序过程会带来一定错误,使得即使表达相同功能的基因之间也存在细微差异;(2) 当前许多相关数据库高度偏向经过实验验证、以临床病原体 and 人类共生菌为特征的基因,忽略了环境中更加多样的基因变体;(3) 测序得到的短读长序列可能仅代表基因序列的一部分,该片段

可能无功能信息,即使与参考序列 100%匹配,也不一定表达相同的功能;(4) 错配容许度越高,需要比对的数据集也越大,那么处理它们所需的计算资源就越多。因此,选择序列同一性阈值需要权衡基因鉴别的灵敏性、严格性和计算速度。现在相关研究大多采用 80%–95% 的序列同一性阈值作为序列比对的参数<sup>[29-32]</sup>。当然,由于不同目标基因的序列长度、变异程度等特征都有一定差别,未来研究可关注不同阈

值对不同基因识别效力的影响,从而优化分析流程。

在获得 ARGs 的注释信息之后,可以对 ARGs 的丰度和多样性进行分析。然而,由于不同样本的宏基因组数据量大小可能差异很大,为了提高 ARGs 的组成数据在样本之间的可比性,进行数据标准化是不可或缺的。有研究直接采用各个样本宏基因组清洁序列的数据量对 ARGs 序列数进行标准化(copies/Gb)<sup>[31]</sup>,或者基于测序深度和基因长度对 ARGs 序列数进行标准化(RPKM、FPKM 和 TPM)<sup>[33-34]</sup>。还有研究采用通用的微生物标记基因的拷贝数进行数据标准化,比如 16S rRNA 基因的应用已经较为成熟<sup>[35]</sup>。但由于不同细菌基因组中 16S rRNA 基因的拷贝数是不一样的<sup>[36]</sup>,使得不同样本的 ARGs 丰度受到微生物群落组成的影响。因此,在这种情况下,有研究建议使用 *recA*、*rpoA*、*rpoB*、*gapA*、*gyrB* 和 *pyrH* 等单拷贝管家基因<sup>[37-39]</sup>,或者计算宏基因组数据集中的细胞数量<sup>[35]</sup>对 ARGs 丰度进行标准化,以减少微生物组成差异带来的不确定性,增加样本之间的可比性。

### 1.3 两种分析方法的比较和选择

针对环境耐药组的两种宏基因组学分析方法各有优劣<sup>[27,40]</sup>,基于短序列的方法通常快速且对计算的要求较低,能够鉴定低丰度物种中的 ARGs,但是将 clean reads 直接映射到数据库可能会增加基因比对的假阳性,而且该分析也缺乏 ARGs 的遗传位置信息;基于序列组装的方法可以更准确地检测到蛋白质编码基因,同时提供有关基因的系统发育和遗传位置的信息,这对于在环境中评估 ARGs 的风险非常重要,但是从头组装和注释的过程在计算上昂贵且费时,并且会丢失序列信息,导致遗漏掉一些 ARGs,尤其是在分析具有高微生物多样性

和不均匀物种组成的复杂宏基因组数据集时。三代测序(PacBio 或纳米孔测序)和染色体构象捕获技术可显著提高基因组组装的保真度,在一定程度上弥补了上述方法的一些弊端,但是此类新兴的测序技术也存在数据噪音大、错误率较高等问题,还需要不断地发展和完善<sup>[27-28]</sup>。这意味着尚无哪种序列分析方法可以满足全部的研究需求,需要根据研究目的、测序类型及计算资源进行权衡,选择更恰当的方法或者综合使用多种方法来解析环境耐药组。

## 2 环境耐药组的生物信息学解析工具

无论是使用哪种宏基因组学分析方法,在测序数据中识别 ARGs 很大程度上依赖经过整理的 ARGs 数据库。同时,目前关于抗生素耐药性的研究,仅进行 ARGs 的注释往往不够,还需要解析样本中 MGEs、毒力因子等功能基因,从而可以更深入地研究 ARGs 的水平基因转移过程和潜在的致病性风险。涉及环境耐药组研究的生物信息学工具层出不穷,本文仅对当前主要的生物信息学分析管道、软件 and 数据库等资源进行了总结,如表 1-表 3 所示。

### 2.1 抗生素抗性基因的注释

自 Liu 等<sup>[41]</sup>于 2009 年手动整理第一个综合性的 ARGs 数据库(antibiotic resistance genes database, ARDB)以来,越来越多的研究者基于不同的目标建立起各类 ARGs 数据库以及相关的分析软件和流程(表 1),极大地推动了抗生素耐药性的组学研究。这些公开的数据库在涵盖的 ARGs 范围和提供的信息类型方面有很大的差异: ARDB<sup>[41]</sup>、CARD<sup>[42]</sup>、SARG<sup>[35]</sup>、ResFinder<sup>[43]</sup>、MEGARes<sup>[44]</sup>和 ARGminer<sup>[45]</sup>等数据库是通用的 ARGs 数据库,涵盖了较为广泛的 ARGs 序列

表 1 宏基因组学研究抗生素抗性基因的主要资源列表

Table 1 List of general resources for metagenomic analysis of antibiotic resistance genes

Bioinformatic tools	Tool types	Descriptions	Version status	Website
ARDB <sup>[41]</sup>	Database	Manually collected ARG database (4 500 sequences)	V1.1, 2009.07	<a href="http://arbd.cbcb.umd.edu/">http://arbd.cbcb.umd.edu/</a>
CARD (RGI) <sup>[42]</sup>	Database (software)	Organized by the Antibiotic Resistance Ontology (ARO) and AMR gene detection models.	V3.2.5 (V6.0.0)	<a href="https://card.mcmaster.ca/">https://card.mcmaster.ca/</a>
SARG (ARGs-OAP) <sup>[35]</sup>	Database (software)	Hierarchical database derived from ARDB, CARD, and NCBI-NR (>12 000 sequences)	V2.2 (V2.3), 2021.01	<a href="https://smile.hku.hk/SARGs">https://smile.hku.hk/SARGs</a>
ResFinder <sup>[43]</sup>	Database/ Software	Acquired ARGs associated with horizontal gene transfer events	V4.1, 2021.09/06	<a href="https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/">https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/</a>
MEGARes <sup>[44]</sup>	Database	Manually collected ARG database (~8 000 sequences)	V2.0.0, 2019.10	<a href="https://megares.meglab.org/">https://megares.meglab.org/</a>
ARGminer <sup>[45]</sup>	Database/ Online	ARGs detection platform integrating multiple databases	2020	<a href="https://bench.cs.vt.edu/argminer">https://bench.cs.vt.edu/argminer</a>
Resfams <sup>[46]</sup>	Database	ARG database based on Hidden Markov Model (HMM)	V1.2, 2015.01	<a href="http://www.dantaslab.org/resfams/">http://www.dantaslab.org/resfams/</a>
DeepARG <sup>[47]</sup>	Database/ Software	Prediction of ARGs based on deep learning method	V1.0.2, 2020.10	<a href="https://bench.cs.vt.edu/deeparg">https://bench.cs.vt.edu/deeparg</a>
Mustard <sup>[48]</sup>	Database	Predict ARGs integrated 3D Protein Structure (>6 000 sequences)	2017.09	<a href="http://mgps.eu/Mustard/">http://mgps.eu/Mustard/</a>
FARME DB <sup>[49]</sup>	Database	ARG sequences from functional metagenomic studies	2017	<a href="http://staff.washington.edu/jwallace/farme/">http://staff.washington.edu/jwallace/farme/</a>
BLDB <sup>[50]</sup>	Database	Sequence information on all the currently known $\beta$ -lactamases	2022.11.16	<a href="http://blbdb.eu/">http://blbdb.eu/</a>
LacED <sup>[51-52]</sup>	Database	Sequence information on TEM and SHV $\beta$ -lactamases	TEM, 2017; SHV, 2010	<a href="http://www.laced.uni-stuttgart.de/">http://www.laced.uni-stuttgart.de/</a>
MUBII-TB-DB <sup>[53]</sup>	Database	Database of ARG mutants of <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	V2.0, 2013.12	<a href="https://umr5558-bibiserv.univ-lyon1.fr/mubii/mubii-select.cgi">https://umr5558-bibiserv.univ-lyon1.fr/mubii/mubii-select.cgi</a>
U-CARE <sup>[54]</sup>	Database	Comprehensive ARG database of <i>Escherichia coli</i>	2016	<a href="http://www.e-bioinformatics.net/ucare">http://www.e-bioinformatics.net/ucare</a>
ARIBA <sup>[55]</sup>	Software	A combined mapping and targeted local assembly approach	V2.14.6, 2020.09	<a href="https://github.com/sanger-pathogens/ariba">https://github.com/sanger-pathogens/ariba</a>
GROOT <sup>[56]</sup>	Software	Variation graph for reference gene sets with an LSH indexing scheme	V1.1.2, 2020.05	<a href="https://github.com/will-rowe/groot">https://github.com/will-rowe/groot</a>
ShortBRED <sup>[57]</sup>	Software	A marker-based approach	V0.9.4, 2020.05	<a href="https://github.com/biobakery/shortbred">https://github.com/biobakery/shortbred</a>

及其抗性机制信息; Resfams<sup>[46]</sup>、DeepARG<sup>[47]</sup>、Mustard<sup>[48]</sup>、FARME DB<sup>[49]</sup>等数据库是结合深度学习算法、统计分析模型或功能宏基因组学研究建立起的数据库, 包含了数量更多的新型 ARGs 和已知 ARGs 的远距离同源物; 还有一些数据库仅提供了特定基因家族或物种的耐

药性信息, 如 BLDB<sup>[50]</sup>和 LacED<sup>[51-52]</sup>只关注了  $\beta$ -内酰胺酶的序列、突变和结构, 而 MUBII-TB-DB<sup>[53]</sup>和 U-CARE<sup>[54]</sup>则关注了特定模式细菌的耐药性。

为了提高 ARGs 预测的准确性和节约计算资源, 很多研究者也提出了不同的解决策略。比如,



Hunt 等<sup>[55]</sup>开发的 ARIBA 首先使用 CD-HIT 对参考序列进行聚类, 挑取每个 ARG 的代表性序列, 再通过靶向局部组装的方法将测序数据与代表序列进行比对, 从而减少分析所需的时间和计算资源; Rowe 等<sup>[56]</sup>开发的 GROOT 为参考基因集编译变异图, 并通过图遍历算法将测序数据与变异图进行比对, 提高了复杂样本中大量序列的比对效率和准确率; Kaminski 等<sup>[57]</sup>为了避免将目标序列虚假映射到不相关蛋白序列的同源区域而导致假阳性, 开发了一种基于标记的识别方法(ShortBRED), 主要是从参考数据库中识别每个抗生素抗性蛋白家族的代表性短肽序列作为“标记”, 然后将测序数据与这些标记进行比对, 该方法在保证灵敏度、特异性的基础上, 比全长蛋白序列比对的策略更快速。

## 2.2 可移动遗传元件的注释和水平基因转移事件的识别

可移动遗传元件(MGEs)本身也是遗传物质的片段, 能够在基因组内或不同生物体的基因组之间移动, 被认为是 ARGs 发生水平转移进而在环境中快速传播的关键驱动力。近年来, 许多研究者也围绕从宏基因组数据中识别 MGEs 开发了一系列分析工具和数据库, 如表 2 所示, 不仅有涵盖范围较广的综合性数据库, 还有专门整理的质粒、整合子、插入序列、噬菌体等特定数据库。但是需要说明的是, MGEs 特殊的基因结构对其生物信息学解析是一个挑战, 比如不同的质粒通常包含相似的复制和接合元件, 而转座子和噬菌体包含高频的重复序列和模块化结构, 这使针对 MGEs 的序列组装和基因注释的完整性和准确度受到了较大影响<sup>[80]</sup>。

此外, 基于宏基因组序列组装的策略, 一些生物信息学工具还可以从 contigs 和 MAGs 数据集中推断潜在的水平基因转移(HGT)事

件, 为表征 ARGs 的传播扩散提供了直接证据。比如, IslandViewer 根据不同种属细菌间基因组序列构成的差异, 预测携带了转座子、插入序列等移动元件的基因组岛, 还能同时对毒力因子和耐药基因进行注释<sup>[68]</sup>; HGTector 比较了不同系统发育距离的基因组中的蛋白质序列, 通过识别亲缘关系较远的物种之间具有更高序列相似性的基因来检测 HGT 的发生<sup>[69]</sup>; WAAFL 将重叠群序列的每个基因与泛基因组数据库进行相似性匹配, 确定重叠群的基因是否可以完全由单个物种解释, 或者是否需要多个物种来解释重叠群的基因组成, 后一种情况被视为 HGT 发生的推断证据; RANGER-DTL 通过系统发育不一致性测试来确定物种树上最有可能发生 HGT 的位置, 该测试方法是将基于跨类群同源序列的基因树与这些类群的系统发育树进行比较<sup>[70]</sup>; MetaCHIP 则结合了基因相似性比对和系统发育不一致性测试的方法, 专门用来识别群落水平供体和受体基因组之间的 HGT 事件<sup>[71]</sup>。

## 2.3 其他微生物抗性基因和毒力因子的注释

细菌耐药性的选择压力不仅来自抗生素, 其他化学污染物(如重金属和生物杀灭剂)也参与了抗生素抗性的选择<sup>[81]</sup>。有研究表明, 微生物对这些外源物质的胁迫具有相似的抗性机制, 还在某些基因的调控下产生多重抗性<sup>[82]</sup>。因此, 解析 ARGs 与其他微生物抗性基因的相互关系, 将有助于更深刻地理解微生物群落中抗生素抗性的发展和维持机制。BacMet 数据库<sup>[72]</sup>为鉴定 DNA 和蛋白质序列中的生物杀灭剂和金属抗性基因提供了有力工具, 该数据库包括两部分: 一是手动整理的高质量基因数据库, 充分参考了已发表的文献、经实验确定的功能基因; 二是预测抗性基因的数据库, 基于手动整理的基因序列在公共数据库进行相似性搜索生成, 但尚未经过实验研究。



表 2 宏基因组学研究可移动遗传元件和水平基因转移事件的主要资源列表

Table 2 List of general resources for metagenomic analysis of mobile genetic elements and horizontal gene transfer events

Bioinformatic tools	Tool types	Descriptions	Version status	Website
ACLAME <sup>[58]</sup>	Database/ Online	Comprehensive database that collects and categorizes MGE from different sources (>120 000 sequences)	V0.4, 2009.08	<a href="http://aclame.ulb.ac.be/">http://aclame.ulb.ac.be/</a>
MGEdatabase <sup>[59]</sup>	Database	More than 270 gene types, including plasmids, integrase, transposase, and insertion sequences	2018	<a href="https://github.com/KatariinaParnanen/MobileGeneticElementDatabase">https://github.com/KatariinaParnanen/MobileGeneticElementDatabase</a>
mobileOG-db <sup>[60]</sup>	Database	Covering 6 140 MGE protein families	2021.08	<a href="https://mobileogdb.flsi.cloud.vt.edu/">https://mobileogdb.flsi.cloud.vt.edu/</a>
PLSDB <sup>[61]</sup>	Database	Integrated plasmid sequences from NCBI database	V.2021_06_23	<a href="https://ccb-microbe.cs.uni-saarland.de/plsdb/">https://ccb-microbe.cs.uni-saarland.de/plsdb/</a>
PlasFlow <sup>[62]</sup>	Software	Predicted plasmid sequences from metagenomic data	V1.1, 2018.05	<a href="https://github.com/smaegol/PlasFlow">https://github.com/smaegol/PlasFlow</a>
ICEberg (ICEfinder) <sup>[63]</sup>	Database (online)	Integrated and conjugated elements of bacteria	V2.0, 2018.09	<a href="http://db-mml.sjtu.edu.cn/ICEberg/">http://db-mml.sjtu.edu.cn/ICEberg/</a>
ISfinder <sup>[64]</sup>	Database/ Online	Insertion sequences for bacteria and archaea	2021.09	<a href="https://www-is.biotoul.fr/">https://www-is.biotoul.fr/</a>
INTEGRALL <sup>[65]</sup>	Database/ Online	Comprehensive integron information	2021.09	<a href="http://integrall.bio.ua.pt/">http://integrall.bio.ua.pt/</a>
PHASTER <sup>[66]</sup>	Database/ Online	Identification and annotation of phage sequences	2020.12	<a href="http://phaster.ca">http://phaster.ca</a>
Phigaro <sup>[67]</sup>	Software	Detect the prophage genome	V2.3, 2021.03	<a href="https://github.com/bobeobibo/phigaro">https://github.com/bobeobibo/phigaro</a>
IslandViewer <sup>[68]</sup>	Database/ Online	Predict genomic islands from bacteria and archaea	V4, 2017.05	<a href="http://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/">http://www.pathogenomics.sfu.ca/islandviewer/</a>
HGTector <sup>[69]</sup>	Software	Identify genes in genomes displaying taxonomically Discordant similarity to genes within reference database	V2.0, 2020.12	<a href="https://github.com/DittmarLab/HGTector">https://github.com/DittmarLab/HGTector</a>
WAAFLE	Software	Identify genes in contigs displaying taxonomically Discordant similarity to genes within reference database	2018	<a href="http://huttenhower.sph.harvard.edu/waafle">http://huttenhower.sph.harvard.edu/waafle</a>
RANGER-DTL <sup>[70]</sup>	Software	Reconcile phylogenetic incongruencies between gene and species trees	V2.0, 2018	<a href="https://compbio.engr.uconn.edu/software/RANGER-DTL/">https://compbio.engr.uconn.edu/software/RANGER-DTL/</a>
MetaCHIP <sup>[71]</sup>	Software	Combined similarity and phylogenetic incongruency approach	V1.10.6, 2021.09	<a href="https://github.com/songweizhi/MetaCHIP">https://github.com/songweizhi/MetaCHIP</a>

环境中的 ARGs 向人类病原菌的传播扩散会造成巨大的健康风险，一直是环境耐药组研究的重点。毒力因子(virulence factor, VF)是指由细菌、病毒、真菌等微生物代谢产生、带有侵袭力和毒素等毒力性质的分子，表征了病原菌致病能力的强弱<sup>[83]</sup>。调控毒力因子的基因可

编码在 MGEs 上进行水平转移，使无害细菌变成危险的病原菌<sup>[84]</sup>。因此，毒力因子基因成为研究耐药细菌的致病性风险的靶标基因。如表 3 所示，目前已有多种生物信息学工具用来识别宏基因组数据集中的病原菌和毒力因子基因，其中 VFDB 和 PATRIC 的应用更广泛。由

表 3 宏基因组学研究其他微生物抗性基因和毒力因子的资源列表

Table 3 List of general resources for metagenomic analysis of other microbial resistance genes and virulence factor

Bioinformatic tools	Tool types	Descriptions	Version status	Website
BacMet <sup>[72]</sup>	Database/ Online	Antibacterial biocide- and metal-resistance gene database, including 753 experimentally confirmed resistance genes	V2.0, 2018.03	<a href="http://bacmet.biomedicine.gu.se/">http://bacmet.biomedicine.gu.se/</a>
VFDB <sup>[73]</sup>	Database/ Online	Database of virulence factors of pathogenic bacteria, including 4 271 experimentally confirmed resistance genes	2021.12	<a href="http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm">http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm</a>
Victors <sup>[74]</sup>	Online	5 304 virulence factors of human and animal pathogens	2018.08	<a href="http://www.phidias.us/victors">http://www.phidias.us/victors</a>
PHI-base <sup>[75]</sup>	Database/ Online	Molecular information that affects the pathogen-host interaction	V4.12, 2021.02	<a href="http://www.phi-base.org/">http://www.phi-base.org/</a>
PAIDB <sup>[76]</sup>	Database/ Online	223 types of pathogenic islands and 88 types of drug-resistant islands	V2.0, 2014.10	<a href="http://lilab2.sysu.edu.cn/microphenodb">http://lilab2.sysu.edu.cn/microphenodb</a>
PATRIC <sup>[77]</sup>	Database/ Online	A comprehensive database of pathogenic bacteria	V3.6.12, 2020	<a href="https://www.patricbrc.org/">https://www.patricbrc.org/</a>
PathoFact <sup>[78]</sup>	Software	Easy-to-use modular pipeline to analyze toxins, virulence factors, and drug resistance genes in metagenomic data	V1.0, 2014.10	<a href="https://pathofact.lcsb.uni.lu">https://pathofact.lcsb.uni.lu</a>
VirulenceFinder <sup>[79]</sup>	Database/ Online	Identify virulence factors in the genomes of <i>E. coli</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Listeria</i>	V2.0, 2020.02	<a href="https://bitbucket.org/genomicepidemiology/virulencefinder">https://bitbucket.org/genomicepidemiology/virulencefinder</a>

中国医学科学院研发的病原菌毒力因子数据库 (virulence factor database, VFDB)<sup>[73]</sup>收集整理了 32 个病原菌属的所有已知毒力因子信息, 涵盖了 14 个大类 100 多个子类的功能基因, 与 BacMet 数据库类似, 也分为经实验验证的毒力因子基因核心数据库(setA)和增加了预测基因的全库(setB)。而由美国弗吉尼亚理工大学等科研团队开发的病理系统资源整合中心(pathosystems resource integration center, PATRIC)<sup>[77]</sup>集成和储存了病原体的基因组、转录组、蛋白质组等多种数据类型, 并提供了各类在线分析和可视化的工具。

上述的各类数据库和工具, 同样有着各自的优劣和应用场景, 也受到不同因素的限制, 需要根据研究目标进行合理选择。特别是从更复杂的环境微生物群落中鉴定 ARGs 时, 数据

库的选择尤为重要, 使用不匹配的数据库可能会漏掉部分重要的 ARGs, 从而低估 ARGs 的多样性。而数据库本身也存在问题, 一方面, 大多数据库缺乏可持续的管理和更新, 无法及时收录新兴 ARGs 的序列; 另一方面, 数据库很难正确识别某些基因表达过程中的突变或修饰, 造成错误的预测, 而对一部分 ARGs 不同的命名策略又会带来数据库的冗余和混淆<sup>[26-27]</sup>。

已有研究比较了主要的 ARGs 数据库对宏基因组数据集中 ARG 序列的识别效力<sup>[26,28]</sup>, 结果表明 ARG-miner、CARD、MEGARes 和 SARG 等通用数据库在环境样本的 ARGs 检测方面最有效, 并且在某些情况下可以识别使用特定数据库(比如 BLDB)无法识别的  $\beta$ -内酰胺酶, 而使用 2 个或更多的数据库可以获得更多的 ARGs。因此, 对大规模环境样本的宏基因组数据集进

行解析时,可优先选择多个通用数据库,这种联合使用可获取更全面的环境调查结果。同时,由于下游的数理统计分析高度依赖参考数据库的正确性,应该持续加强相关数据库的建设、管理和维护,确保数据库的质量,为抗生素耐药性的环境监测提供可靠平台。

### 3 环境耐药组的风险评价框架

环境中不断累积和传播的 ARGs 和 ARB 可能会增大病原体获得耐药性的几率,并通过某种途径使耐药性病原体直接暴露于人体,进而对人类健康产生不利影响。近年来,许多科学家认识到一些严重威胁公共健康安全的流行性传染病可能与环境起源的细菌、病毒及原生动物密切相关,有研究表明多种临床病原体和常见土壤细菌所携带的 ARGs 有着 100% 的序列同一性<sup>[85]</sup>,这都说明环境 AMR 带来的健康风险不容忽视。然而针对环境 AMR 发展和传播的人类健康风险评估(human health risk assessment, HHRA)极具挑战性<sup>[86]</sup>,这严重制约了后续风险管理政策的制定。WHO 提出了基于微生物预测模型(predictive model, PM)和剂量-效应模型(dose response model, DRM)的微生物定量风险评估方法(quantitative microbial risk assessment, QMRA),对环境中特定致病微生物产生危害的可能性和严重性进行了数学描述,包括了危害鉴定、危害表征、暴露评估和风险特征描述 4 个步骤<sup>[87-88]</sup>。这似乎为定量评估 AMR 的风险提供了借鉴,因为一个重要的原则是必须根据 ARB 而不是其携带的 ARGs 来评估 AMR 从环境传播到人类的风险<sup>[89]</sup>。

本文根据已有研究<sup>[86,89-90]</sup>,将 AMR 的风险评价框架绘制为图 3 所示的流程:(1)危害鉴定:全面分析 ARGs 和 ARB 的环境分布和丰度水平,识别不同抗菌物质对 ARB 的选择作用。

(2)危害表征:定性和定量地评估 ARGs 向病原体转移的发生,并表征其潜在的不良影响。(3)暴露评估:定性和定量地评估环境中的耐药性病原体通过不同途径影响人体的概率。(4)风险特征描述:最终目标是估计由环境 ARGs 和 ARB 引起的感染性疾病数量。然而必须指出的是,这一风险评价框架在实际操作上极为复杂,在多个环节受到限制<sup>[91-92]</sup>:一是环境中抗生素及共选择化合物(如重金属、生物杀灭剂)的暴露与细菌耐药性发展之间的关系还不清楚,它们可能的混合效应将更为复杂;二是 ARGs 发生水平转移的频率和影响 ARGs 从环境 ARB 向病原体转移的条件并不清楚,对新型 ARGs 和 ARB 的生物学特征研究还不足;三是环境 ARGs 和 ARB 向人体传播的途径、模式和频率仍然知之甚少,绝大多数 ARB 的剂量-效应数据严重缺乏。因此,若实现准确的环境 AMR 风险评估还需要大量的研究工作支持。目前研究者们主要在危害鉴定、危害表征这两个环节取得了一系列成果。

#### 3.1 危害鉴定:预测抗生素的选择作用

首先,依据通过实验发现的细菌与抗生素之间的浓度-响应关系来评估环境中抗生素暴露对细菌耐药性选择的作用,从而预测 AMR 发展的风险。一般情况下,环境中抗生素的暴露浓度远低于最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC),而亚抑菌浓度的抗生素能诱导细菌产生 ARGs。但是要在复杂的微生物群落中通过试验测定所有抗生素的最小选择浓度(minimum selective concentration, MSC),需要付出相当大的努力<sup>[93]</sup>。Bengtsson-Palme 等<sup>[94]</sup>的研究提出了一种估算诱发细菌耐药性的预测无影响浓度(predicted no effect concentration, PNEC)的方法,即 MIC 除以一个评价因子(研究中取 10),用于解释 MIC 和 MSC 之间的差异,若抗生素浓度维持在 PNEC 以下,则认为诱发

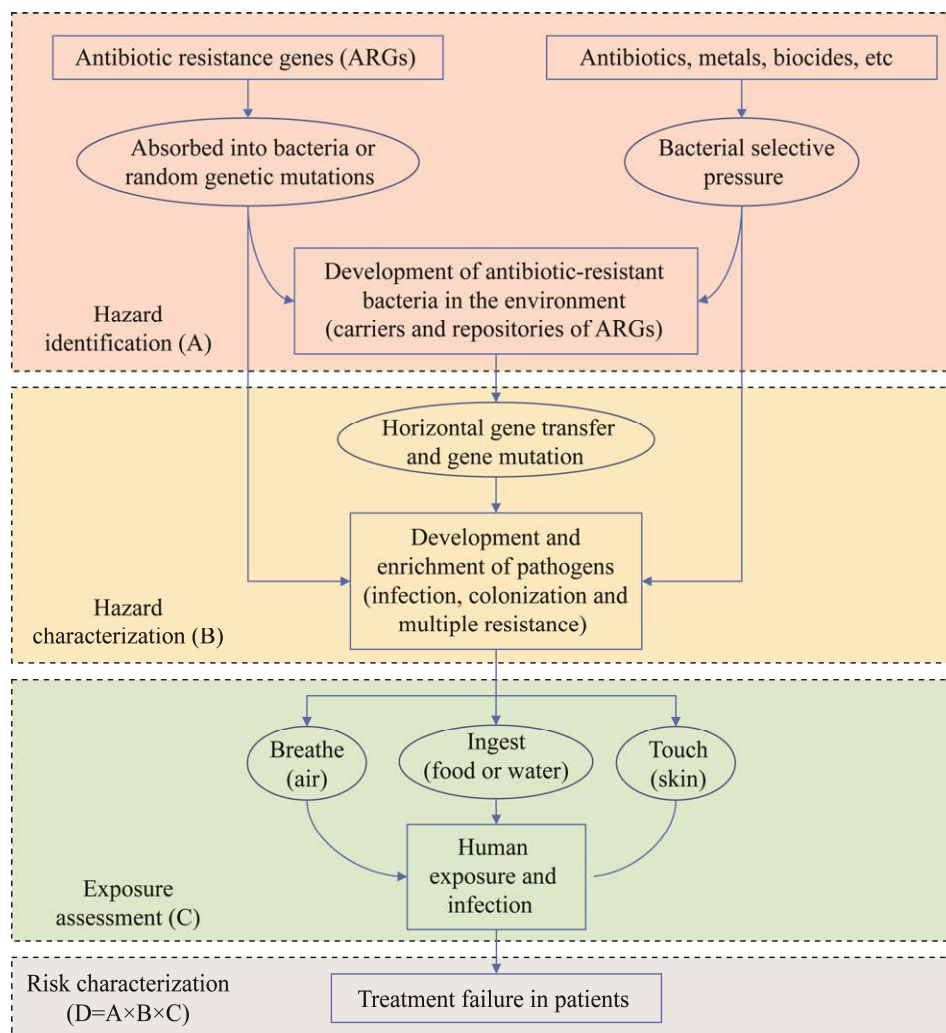


图3 环境抗生素耐药性的风险评价框架

Figure 3 Framework for risk assessment of antimicrobial resistance in the environment.

环境细菌产生耐药性的可能较低；研究中汇总了 EUCAST 数据库中 111 种抗生素及 11 种抗生素组合的 MIC，并在此基础上计算出了相应的 PNEC。Zhang 等<sup>[95]</sup>利用该方法研究了我国东江流域抗生素所带来的潜在的耐药性风险，结果表明 36 种被检测的抗生素中有 23 种抗生素的风险水平较高，风险高的河段属于污染源下游的 15 km 范围内。另外，Rico 等<sup>[96]</sup>提出了一种评估环境中 AMR 发展风险的概率方法，并在集约化水产养殖的场景进行了应用，该方法基

本的数据来源也是 EUCAST 数据库。应该注意的是，EUCAST 数据库中抗生素 MIC 的获得大多是基于病原菌，未覆盖大多数环境微生物，目前则假设试验菌种的响应特征可代表多数环境菌种。更进一步地，在多种化合物共存的环境中，充分根据混合物成分的信息来预测综合效应和风险显得尤为重要，已有研究通过开发新的统计模型对评估这种环境综合风险做了初步探索<sup>[97]</sup>。当然还需要更多的实验数据来进行方法优化，以及考察方法在不同场景的实际应

用效果。

### 3.2 危害表征: ARGs 的宿主识别

在整个环境 AMR 的风险评估框架中,耐药性病原体的识别和表征无疑是最基础和关键的组成部分<sup>[89]</sup>。在环境 AMR 的监测工作当中,全面解析复杂多样的 ARB 组成是必不可少的,一方面对于确定它们对人类健康的风险至关重要;另一方面可以利用先进的靶向调控方法,如噬菌体疗法和工程化溶菌酶等来控制 AMR 的传播,这就需要 ARGs 的宿主信息来帮助设计有针对性的策略<sup>[98]</sup>。最新的研究总结了现有的 ARGs 宿主表征方法<sup>[98-99]</sup>,并讨论了它们的优势和局限性(表 4)。

如前所述,基于细菌培养的方法是识别 ARB 及其相关 ARGs 的“黄金标准”,但忽略了环境中大部分不可培养的微生物。因此,目前主要使用分子生物学和统计学手段识别环境 ARB,包括相关性分析、宏基因组学技术、荧

光激活细胞分选技术(FACS)、细胞内融合基因技术(epicPCR)和高通量染色体构象捕获技术(Hi-C)等 5 种方法。目前相关性分析和宏基因组学方法被广泛应用于污水、污泥、粪便、河水、沉积物和土壤等环境样品的 ARB 筛查,而其他 3 种技术属于新兴的检测方法,仅有少量相关研究应用了这 3 种方法,还有待不断发展和更多研究的检验。相关性分析是使用统计方法(如 Pearson 和 Spearman 相关系数)来评估 ARGs 丰度与微生物丰度之间的关联,从而确定潜在的“ARGs-宿主”关系。宏基因组学技术可以获得更丰富的微生物结构和功能信息,基于 contigs 和 MAGs,通过识别与 ARGs 共定位的系统发育标志物,可以将 ARGs 与微生物分类信息联系起来。比较这两种常用方法,宏基因组学技术在表征环境 ARGs 及其宿主的多样性方面更强大,而且准确性更高,有较好的应用前景,但是仍需要针对其局限性不断优化。

表 4 主要的 ARGs 宿主识别方法及其优缺点

Table 4 Summary of ARG-host identification methods and their advantages and disadvantages

Host identification method	Advantages	Disadvantages
Traditional bacterial culture method	Reliable and stable, and can be characterized by phenotype	Only the resistance of culturable microorganisms, time-consuming, laborious and difficult to quantify
Correlation analysis	Low cost, simple operation, high throughput	Easily result in false positive or false negative results. Data standardization methods affect the quantity and intensity of correlation
Metagenomics	Non-targeting, high throughput, avoiding the bias of primer use, can obtain more abundant genetic localization information	Limited by sequencing depth and assembly strategy, impossible to capture strain variation effectively and locate host of broad-spectrum plasmid effectively
Fluorescence-activated cell sorting (FACS)	High sensitivity, fast speed, can track plasmid transfer	Affected by pH, temperature, and oxygen concentration, and cannot effectively screen for more complex environments
Single-cell fusion PCR (epicPCR)	Low cost, high throughput, highly parallel	Limited by primers, not accurate quantification, cannot obtain genetic background of target genes
High throughput chromosome conformation capture technologies (Hi-C)	High throughput, high resolution, can obtain the genetic background of the target gene	The experiment cost is high, the data noise is loud, the experiment process is tedious

### 3.3 危害表征: ARGs 的风险分级

基于上述环境 ARB 的识别, 有学者进一步提出了围绕耐药性病原体表征的风险评价思路, 即环境 AMR 风险主要取决于 3 个方面: ARGs 对应的抗生素耐药类型, ARGs 是否存在于实际病原体中, 以及 ARGs 是否有可能被转移到实际病原体中。宏基因组学方法在上述风险评价思路的实践中发挥了重要作用, 许多研究已经做了有益的探索。

比如, Martínez 等<sup>[100]</sup>将 ARGs 风险按照不同标准(RESCon)分成 7 类: RESCon7 风险最低, 包含比对 ARGs 数据库后相似度达到一定阈值的基因序列; 如果该序列被检测到在 MGEs 上, 则归为 RESCon6; 对 ARGs 进行功能评估, 如果编码了已知基因家族的抗性机制归为 RESCon5, 而编码了全新的抗性机制则归为 RESCon4; 对过去使用或现在很少使用的抗生素表达了抗性的 ARGs 属于 RESCon3; 风险最高的类别包括对目前使用的抗生素产生耐药性的基因并且位于 MGEs 上, 这些基因可存在于非病原体(RESCon2)或人类病原体中(RESCon1)。

类似的 ARGs 风险分级的思想也被应用于 Hu 等<sup>[101]</sup>的研究中, 该研究提出了针对饮用水系统的耐药性风险评价体系(R3DW), 与 RESCon 最显著的区别是重新定义了最高等级的风险水平, 如果饮用水系统中的 ARGs 定位于 MGEs 上且存在于能耐受氯消毒的人类病原体内, 则被认为是风险最高的(R3DW1)。Ma 等<sup>[102]</sup>同样针对饮用水系统开展了相关研究, 根据 ARGs、病原体和携带 ARGs 的病原体的检测结果, 将饮用水的公共健康风险分为三级: A 级, 样本中检测到携带 ARGs 的病原体; B 级, 样本中检测到 ARGs 和病原体, 但无携带 ARGs 的病原体; C 级, 样本中仅检测到 ARGs。根据病原体是专性还是机会性的, 又进一步把 A 级和 B 级

分别分成两个亚级, 表示专性病原体带来的潜在风险更高。Zhang 等<sup>[103]</sup>提出了一个基于“人为富集性”“可移动性”和“宿主致病性”这 3 个因素对 ARGs 风险进行排序的框架, 通过这个框架筛选到的高风险 ARGs (Rank 1)覆盖了绝大部分被 WHO 认定为高风险的 ARGs。

还有研究结合宏基因组序列组装方法和 ARGs 遗传位置识别, 对环境样本进行了耐药性风险的综合评价。比如, Oh 等<sup>[104]</sup>基于宏基因组学和生物信息学开发了一种计算方法(MetaCompare), 根据每个 ARG 的相对丰度、移动性和病原体内的存在情况进行评估, 然后对耐药性风险进行综合评分。Su 等<sup>[16]</sup>将 ARB 的杀菌剂和金属抗性也纳入考量, 提出了一种针对环境耐药组的综合风险评分方法, 能够有效识别高风险热点。

另外, 目前宏基因组分箱的方法使得获取较完整的细菌基因组成为可能, Liang 等<sup>[105]</sup>就利用该方法对携带 ARGs 和毒力因子基因的细菌进行了鉴定和定量, 以此来进行微生物水平的风险评估。Zhang 等<sup>[106]</sup>在获取全球不同生境的微生物基因组数据基础上, 通过综合考虑人类可及性、可移动性、致病性和临床可用性, 定量评估了 2 561 种 ARGs 对人类的健康风险。Su 等<sup>[107]</sup>则基于不同风险指示基因在基因组中的共现模式, 筛选出了全球微生物基因组目录中需要优先监控的高风险耐药菌清单。

以上方法为后续耐药性病原体的人体暴露评估和最终的风险特征描述提供了预测性质的危害特征数据, 但是如何更完整地表征耐药性病原体的危害特性, 以及如何分配不同特性的风险权重值, 仍是一个值得深入讨论的问题。

## 4 总结与展望

抗生素耐药性问题严重威胁全球公共健

康。在“同一个健康(one health)”框架下,人类、动物和环境健康紧密联系、互相影响<sup>[108]</sup>。监测和预判环境耐药组的流行、传播和潜在风险是应对挑战的重要基础工作。随着高通量测序技术和生物信息学方法的进步,宏基因组学技术已被广泛应用于不同环境样本中的 ARGs 检测。如本文所述,当前针对环境耐药组研究有不同的宏基因组学分析方法和多种生物信息学分析管道,极大地助力于抗生素耐药性研究,减少其对人类健康的不利影响,表现在:(1) 为快速全面地了解不同环境介质中 ARGs 的多样性和丰度变化提供了技术平台,特别是医院、污水处理厂、养殖场等重点场所中高风险 ARGs (如 CTX-M、NDM、*mcr* 和 *optrA*)的流行和变异,对研究其造成的潜在健康威胁具有重要意义;(2) 宏基因组学方法的应用能够更好地研究 ARGs 的传播机制,确定 ARGs 从环境细菌转移到人类致病菌的风险和传播途径,解析抗生素、消毒剂、重金属等污染物对复杂微生物群落的影响,为合理管控相关化学品的使用和排放提供科学依据;(3) 有助于发现环境中更多未知的 ARGs,预测出未来可能会发生的抗生素耐药性,同时可以深入研究细菌耐药性的内在遗传基础,指导新型抗生素或抗生素替代品的研发。

然而,宏基因组学方法在环境耐药组研究中的应用尚存在不足:(1) 针对研究中的海量数据,如何选择和组配生物信息软件和数据库进行耐药组的筛查和分析是一项非常复杂的工作,对研究者生物信息知识的储备和分子生物学实验的操作能力提出了更高的要求;(2) 目前仍缺乏标准和稳健的数据分析平台,如何确定基因比对时的同一性阈值还存在争议,有些功能基因数据库还不够完善、更新不够及时,基因检测的准确度和灵敏度受到测序深度和序列

质量的限制,这都影响了实际应用中数据解析的效果;(3) 宏基因组学方法只能从 DNA 序列中识别潜在的 ARGs,而对 ARGs 的遗传特性、表达活力、功能表型等信息还无法完全掌握。因此,建立合理化、规范化和标准化的数据分析流程应是一项持续和动态的工作,需要基于不同的样本类型和研究目标,不断优化生物信息软件和数据库的组合。

此外,为了增强对耐药基因传播扩散规律和抗性机制的认识,提高环境耐药组风险预测的准确度,未来研究中应将传统技术与先进技术进行有机结合,一方面宏基因组学技术可与传统的环境微生物富集培养方法结合,在筛选具有靶标耐药表型的 ARB 基础上,有效解析其分类学、致病性和耐药性等核心特征,与 PCR、RT-qPCR 等分子生物学技术结合,能够为特异性引物的设计提供更多的耐药基因参考序列;另一方面,三代测序、单细胞测序、功能基因组测序等技术正蓬勃发展,宏基因组结合宏转录组、宏蛋白组等多组学联用技术也广泛应用于环境微生物学研究,这些先进的技术手段可为精准深入地探索耐药基因的分子遗传特性提供有力支撑,也为将来解决抗生素耐药性问题奠定基础。

## REFERENCES

- [1] AMINOV RI. The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature[J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(12): 2970-2988.
- [2] GRENNI P, ANCONA V, CARACCILO AB. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: a review[J]. Microchemical Journal, 2018, 136: 25-39.
- [3] HOLMES AH, MOORE LSP, SUNDSFJORD A, STEINBAKK M, REGMI S, KARKEY A, GUERIN PJ, PIDDOCK LJV. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance[J]. The Lancet, 2016, 387(10014): 176-187.
- [4] BLAIR JMA, WEBBER MA, BAYLAY AJ, OGBOLU DO, PIDDOCK LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance[J]. Nature Reviews Microbiology,



- 2015, 13(1): 42-51.
- [5] ALLEN HK, DONATO J, WANG HH, CLOUD-HANSEN KA, DAVIES J, HANDELSMAN J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(4): 251-259.
- [6] 朱永官, 欧阳玮莹, 吴楠, 苏建强, 乔敏. 抗生素耐药性的来源与控制对策[J]. *中国科学院院刊*, 2015, 30(4): 509-516.
- ZHU YG, OUYANG WY, WU N, SU JQ, QIAO M. Antibiotic resistance: sources and mitigation[J]. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2015, 30(4): 509-516 (in Chinese).
- [7] MARTÍNEZ JL. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments[J]. *Science*, 2008, 321(5887): 365-367.
- [8] D'COSTA VM, KING CE, KALAN L, MORAR M, SUNG WWL, SCHWARZ C, FROESE D, ZAZULA G, CALMELS F, DEBRUYNE R, GOLDING GB, POINAR HN, WRIGHT GD. Antibiotic resistance is ancient[J]. *Nature*, 2011, 477(7365): 457-461.
- [9] BHULLAR K, WAGLECHNER N, PAWLOWSKI A, KOTEVA K, BANKS ED, JOHNSTON MD, BARTON HA, WRIGHT GD. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34953.
- [10] KWON JH, POWDERLY WG. The post-antibiotic era is here[J]. *Science*, 2021, 373(6554): 471.
- [11] O'NEILL J. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations[R]. *The Review on Antimicrobial Resistance*, 2014. <https://amr-review.org/home.html>.
- [12] 苏志国, 张衍, 代天娇, 陈嘉瑜, 张永明, 温东辉. 环境中抗生素抗性基因与I型整合子的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(10): 2217-2233.
- SU ZG, ZHANG Y, DAI TJ, CHEN JY, ZHANG YM, WEN DH. Antibiotic resistance genes and class 1 integron in the environment: research progress[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(10): 2217-2233 (in Chinese).
- [13] CHEN JY, SU ZG, DAI TJ, HUANG B, MU QL, ZHANG YM, WEN DH. Occurrence and distribution of antibiotic resistance genes in the sediments of the East China Sea Bays[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2019, 81: 156-167.
- [14] LARSSON DGJ, FLACH CF. Antibiotic resistance in the environment[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(5): 257-269.
- [15] SU ZG, LI AL, CHEN JY, HUANG B, MU QL, CHEN LJ, WEN DH. Wastewater discharge drives ARGs spread in the coastal area: a case study in Hangzhou Bay, China[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2020, 151: 110856.
- [16] SU ZG, WEN DH, GU AZ, ZHENG YH, TANG YS, CHEN LJ. Industrial effluents boosted antibiotic resistome risk in coastal environments[J]. *Environment International*, 2023, 171: 107714.
- [17] 陈嘉瑜, 苏志国, 姚鹏城, 黄备, 张永明, 温东辉. 废水排放对近海环境中抗生素抗性基因和微生物群落的影响[J]. *环境科学*, 2022, 43(9): 4616-4624.
- CHEN JY, SU ZG, YAO PC, HUANG B, ZHANG YM, WEN DH. Effects of wastewater discharge on antibiotic resistance genes and microbial community in a coastal area[J]. *Environmental Science*, 2022, 43(9): 4616-4624 (in Chinese).
- [18] 董杰. 细菌获得性抗生素耐药基因研究进展[J]. *中国预防医学杂志*, 2015, 16(1): 71-74.
- DONG J. Research progress of bacterial acquired antibiotic resistance genes[J]. *Chinese Preventive Medicine*, 2015, 16(1): 71-74 (in Chinese).
- [19] LAUREN BRITO I. Examining horizontal gene transfer in microbial communities[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(7): 442-453.
- [20] ENVIRONMENT UN. Frontiers 2017: emerging issues of environmental concern[R]. UN Environment, 2017, <https://www.unep.org/resources/frontiers-2017-emerging-issues-environmental-concern>.
- [21] ISABELLA S, ANNA NC, ROBERT L, DIMITAR M, TERESA L. State of the art on the contribution of water to antimicrobial resistance[R]. *Publications Office of European Union*, 2018.
- [22] 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.
- [23] KARKMAN A, DO TT, WALSH F, VIRTA MPJ. Antibiotic-resistance genes in waste water[J]. *Trends in Microbiology*, 2018, 26(3): 220-228.
- [24] 孙薇. 畜禽粪便厌氧发酵过程中抗生素抗性基因变化机理研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2017.
- SUN W. Variation mechanism of antibiotic resistance genes during anaerobic digestion with livestock manure[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2017 (in Chinese).

- [25] MIŁOBEDZKA A, FERREIRA C, VAZ-MOREIRA I, CALDERÓN-FRANCO D, GORECKI A, PURKRTOVA S, JAN BARTACEK, DZIEWIT L, SINGLETON CM, NIELSEN PH, WEISSBRODT DG, MANAIA CM. Monitoring antibiotic resistance genes in wastewater environments: the challenges of filling a gap in the One-Health cycle[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 424(Pt C): 127407.
- [26] GUPTA CL, TIWARI RK, CYTRYN E. Platforms for elucidating antibiotic resistance in single genomes and complex metagenomes[J]. *Environment International*, 2020, 138: 105667.
- [27] BOOLCHANDANI M, D'SOUZA AW, DANTAS G. Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2019, 20(6): 356-370.
- [28] PENG ZJ, MAO YJ, ZHANG N, ZHANG L, WANG Z, HAN MZ. Utilizing metagenomic data and bioinformatic tools for elucidating antibiotic resistance genes in environment[J]. *Frontiers in Environmental Science*, 2021, 9: 757365.
- [29] BENGTTSSON-PALME J, LARSSON DGJ, KRISTIANSSON E. Using metagenomics to investigate human and environmental resistomes[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2017, 72(10): 2690-2703.
- [30] WANG JH, LU J, ZHANG YX, WU J, LUO YM, LIU H. Metagenomic analysis of antibiotic resistance genes in coastal industrial mariculture systems[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 253: 235-243.
- [31] DANG CY, XIA Y, ZHENG MS, LIU T, LIU W, CHEN Q, NI JR. Metagenomic insights into the profile of antibiotic resistomes in a large drinking water reservoir[J]. *Environment International*, 2020, 136: 105449.
- [32] LIRA F, VAZ-MOREIRA I, TAMAMES J, MANAIA CM, MARTÍNEZ JL. Metagenomic analysis of an urban resistome before and after wastewater treatment[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 8174.
- [33] CHEN G, NING BT, SHI TL. Single-cell RNA-seq technologies and related computational data analysis[J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 317.
- [34] KIM H, KIM M, KIM S, LEE YM, SHIN SC. Characterization of antimicrobial resistance genes and virulence factor genes in an Arctic permafrost region revealed by metagenomics[J]. *Environmental Pollution*, 2022, 294: 118634.
- [35] YIN XL, JIANG XT, CHAI BL, LI LG, YANG Y, COLE JR, TIEDJE JM, ZHANG T. ARGs-OAP v2.0 with an expanded SARG database and Hidden Markov Models for enhancement characterization and quantification of antibiotic resistance genes in environmental metagenomes[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(13): 2263-2270.
- [36] VĚTROVSKÝ T, BALDRIAN P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57923.
- [37] PAL C, BENGTTSSON-PALME J, KRISTIANSSON E, JOAKIM LARSSON DG. The structure and diversity of human, animal and environmental resistomes[J]. *Microbiome*, 2016, 4(1): 54.
- [38] SUNAGAWA S, MENDE DR, ZELLER G, IZQUIERDO-CARRASCO F, BERGER SA, KULTIMA JR, COELHO LP, ARUMUGAM M, TAP J, NIELSEN HB, RASMUSSEN S, BRUNAK S, PEDERSEN O, GUARNER F, de VOS WM, WANG J, LI JH, DORÉ J, EHRLICH SD, STAMATAKIS A, et al. Metagenomic species profiling using universal phylogenetic marker genes[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(12): 1196-1199.
- [39] CHU BTT, PETROVICH ML, CHAUDHARY A, WRIGHT D, MURPHY B, WELLS G, PORETSKY R. 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-e02117.
- [40] LEE K, KIM DW, CHA CJ. Overview of bioinformatic methods for analysis of antibiotic resistome from genome and metagenome data[J]. *Journal of Microbiology*, 2021, 59(3): 270-280.
- [41] LIU B, POP M. ARDB-antibiotic resistance genes database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(suppl\_1): D443-D447.
- [42] ALCOCK BP, RAPHENYA AR, LAU TTY, TSANG KK, BOUCHARD M, EDALATMAND A, HUYNH W, NGUYEN AL V, CHENG AA, LIU SH, MIN SY, MIROSHNICHENKO A, TRAN HK, WERFALLI RE, NASIR JA, OLONI M, SPEICHER DJ, FLORESCU A, SINGH B, FALTYN M, et al. CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(D1): D517-D525.
- [43] BORTOLAIA V, KAAS RS, RUPPE E, ROBERTS MC, SCHWARZ S, CATTOIR V, PHILIPPON A, ALLESOE

- RL, REBELO AR, FLORENSA AF, FAGELHAUER L, CHAKRABORTY T, NEUMANN B, WERNER G, BENDER JK, STINGL K, NGUYEN M, COPPENS J, XAVIER BB, MALHOTRA-KUMAR S, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes[J]. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2020, 75(12): 3491-3500.
- [44] DOSTER E, LAKIN SM, DEAN CJ, WOLFE C, YOUNG JG, BOUCHER C, BELK KE, NOYES NR, MORLEY PS. MEGARes 2.0: a database for classification of antimicrobial drug, biocide and metal resistance determinants in metagenomic sequence data[J]. Nucleic Acids Research, 2020, 48(D1): D561-D569.
- [45] ARANGO-ARGOTY GA, GURON GKP, GARNER E, RIQUELME MV, HEATH LS, PRUDEN A, VIKESLAND PJ, ZHANG L. ARGminer: a web platform for the crowdsourcing-based curation of antibiotic resistance genes[J]. Bioinformatics, 2020, 36(9): 2966-2973.
- [46] 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.
- [47] ARANGO-ARGOTY G, GARNER E, PRUDEN A, HEATH LS, VIKESLAND P, ZHANG LQ. DeepARG: a deep learning approach for predicting antibiotic resistance genes from metagenomic data[J]. Microbiome, 2018, 6(1): 23.
- [48] RUPPÉ E, GHOZLANE A, TAP J, PONS N, ALVAREZ AS, MAZIERS N, CUESTA T, HERNANDO-AMADO S, CLARES I, MARTÍNEZ JL, COQUE TM, BAQUERO F, LANZA VF, MÁIZ L, GOULENOK T, de LASTOURS V, AMOR N, FANTIN B, WIEDER I, ANDREMONT A, et al. Prediction of the intestinal resistome by a three-dimensional structure-based method[J]. Nature Microbiology, 2019, 4(1): 112-123.
- [49] WALLACE JC, PORT JA, SMITH MN, FAUSTMAN EM. FARME DB: a functional antibiotic resistance element database[J]. Database, 2017, 2017: baw165.
- [50] NAAS T, OUESLATI S, BONNIN RA, LAURA DABOS M, ZAVALA A, DORTET L, RETAILLEAU P, IORGA BI. Beta-lactamase database (BLDB)-structure and function[J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2017, 32(1): 917-919.
- [51] FISCHER M, THAI QK, GRIEB M, PLEISS J. DWARF-a data warehouse system for analyzing protein families[J]. BMC Bioinformatics, 2006, 7(1): 495.
- [52] THAI QK, BÖS F, PLEISS J. The lactamase engineering database: a critical survey of TEM sequences in public databases[J]. BMC Genomics, 2009, 10: 390.
- [53] FLANDROIS JP, LINA G, DUMITRESCU O. MUBII-TB-DB: a database of mutations associated with antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. BMC Bioinformatics, 2014, 15: 107.
- [54] SAHA SB, UTTAM V, VERMA V. U-CARE: user-friendly comprehensive antibiotic resistance repository of *Escherichia coli*[J]. Journal of Clinical Pathology, 2015, 68(8): 648-651.
- [55] HUNT M, MATHER AE, SÁNCHEZ-BUSÓ L, PAGE AJ, PARKHILL J, KEANE JA, HARRIS SR. ARIBA: rapid antimicrobial resistance genotyping directly from sequencing reads[J]. Microbial Genomics, 2017, 3(10): e000131.
- [56] ROWE WPM, WINN MD. Indexed variation graphs for efficient and accurate resistome profiling[J]. Bioinformatics, 2018, 34(21): 3601-3608.
- [57] KAMINSKI J, GIBSON MK, FRANZOSA EA, SEGATA N, DANTAS G, HUTTENHOWER C. High-specificity targeted functional profiling in microbial communities with ShortBRED[J]. PLoS Computational Biology, 2015, 11(12): e1004557.
- [58] LEPLAE R, HEBRANT A, WODAK SJ, TOUSSAINT A. ACLAME: a CLAssification of mobile genetic elements[J]. Nucleic Acids Research, 2004, 32(suppl\_1): D45-D49.
- [59] PÄRNÄNEN K, KARKMAN A, HULTMAN J, LYRA C, BENGTSOON-PALME J, LARSSON DGJ, RAUTAVA S, ISOLAURI E, SALMINEN S, KUMAR H, SATOKARI R, VIRTÄ M. Maternal gut and breast milk microbiota affect infant gut antibiotic resistome and mobile genetic elements[J]. Nature Communications, 2018, 9: 3891.
- [60] BROWN CL, MULLET J, HINDI F, STOLL JE, GUPTA S, CHOI M, KEENUM I, VIKESLAND P, PRUDEN A, ZHANG LQ. MobileOG-db: a manually curated database of protein families mediating the life cycle of bacterial mobile genetic elements[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2022, 88(18): e0099122.
- [61] GALATA V, FEHLMANN T, BACKES C, KELLER A. PLSDb: a resource of complete bacterial plasmids[J]. Nucleic Acids Research, 2019, 47(D1): D195-D202.

- [62] KRAWCZYK PS, LIPINSKI L, DZIEMBOWSKI A. PlasFlow: predicting plasmid sequences in metagenomic data using genome signatures[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(6): e35.
- [63] LIU M, LI XB, XIE YZ, BI DX, SUN JY, LI J, TAI C, DENG ZX, OU HY. ICEberg 2.0: an updated database of bacterial integrative and conjugative elements[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D660-D665.
- [64] SIGUIER P, PEROCHON J, LESTRADE L, MAHILLON J, CHANDLER M. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(suppl\_1): D32-D36.
- [65] MOURA A, SOARES M, PEREIRA C, LEITÃO N, HENRIQUES I, CORREIA A. INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(8): 1096-1098.
- [66] ARNDT D, GRANT JR, MARCU A, SAJED T, PON A, LIANG YJ, WISHART DS. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(W1): W16-W21.
- [67] STARIKOVA EV, TIKHONOVA PO, PRIANICHNIKOV NA, RANDS CM, ZDOBNOV EM, ILINA EN, GOVORUN VM. Phigaro: high-throughput prophage sequence annotation[J]. *Bioinformatics*, 2020, 36(12): 3882-3884.
- [68] BERTELLI C, LAIRD MR, WILLIAMS KP, Simon Fraser University Research Computing Group, LAU BY, HOAD G, WINSOR GL, BRINKMAN FS. IslandViewer 4: expanded prediction of genomic Islands for larger-scale datasets[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(W1): W30-W35.
- [69] ZHU QY, KOSOY M, DITTMAR K. HGTector: an automated method facilitating genome-wide discovery of putative horizontal gene transfers[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 717.
- [70] BANSAL MS, KELLIS M, KORDI M, KUNDU S. RANGER-DTL 2.0: rigorous reconstruction of gene-family evolution by duplication, transfer and loss[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(18): 3214-3216.
- [71] SONG WZ, WEMHEUER B, ZHANG S, STEENSEN K, THOMAS T. MetaCHIP: community-level horizontal gene transfer identification through the combination of best-match and phylogenetic approaches[J]. *Microbiome*, 2019, 7(1): 36.
- [72] PAL C, BENGTSOON-PALME J, RENSING C, KRISTIANSSON E, LARSSON DGJ. BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(D1): D737-D743.
- [73] CHEN LH, YANG J, YU J, YAO ZJ, SUN LL, SHEN Y, JIN Q. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors[J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(suppl\_1): D325-D328.
- [74] SAYERS S, LI L, ONG E, DENG SZ, FU GH, LIN Y, YANG B, ZHANG S, FA ZZ, ZHAO B, XIANG ZS, LI YQ, ZHAO XM, OLSZEWSKI MA, CHEN LN, HE YQ. Victors: a web-based knowledge base of virulence factors in human and animal pathogens[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D693-D700.
- [75] URBAN M, CUZICK A, SEAGER J, WOOD V, RUTHERFORD K, VENKATESH SY, de SILVA N, MARTINEZ MC, PEDRO H, YATES AD, HASSANI-PAK K, HAMMOND-KOSACK KE. PHI-base: the pathogen-host interactions database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(D1): D613-D620.
- [76] YOON SH, PARK YK, KIM JF. PAIDB v2.0: exploration and analysis of pathogenicity and resistance islands[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(D1): D624-D630.
- [77] WATTAM AR, ABRAHAM D, DALAY O, DISZ TL, DRISCOLL T, GABBARD JL, GILLESPIE JJ, GOUGH R, HIX D, KENYON R, MACHI D, MAO CH, NORDBERG EK, OLSON R, OVERBEEK R, PUSCH GD, SHUKLA M, SCHULMAN J, STEVENS RL, SULLIVAN DE, et al. PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(D1): D581-D591.
- [78] de NIES L, LOPES S, BUSI SB, GALATA V, HEINTZ-BUSCHART A, LACZNY CC, MAY P, WILMES P. PathoFact: a pipeline for the prediction of virulence factors and antimicrobial resistance genes in metagenomic data[J]. *Microbiome*, 2021, 9(1): 49.
- [79] JOENSEN KG, SCHEUTZ F, LUND O, HASMAN H, KAAS RS, NIELSEN EM, AARESTRUP FM. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014, 52(5): 1501-1510.
- [80] CARR VR, SHKOPOROV A, HILL C, MULLANY P, MOYES DL. Probing the mobilome: discoveries in the dynamic microbiome[J]. *Trends in Microbiology*, 2021, 29(2): 158-170.
- [81] 陈帅, 邹海燕, 高方舟, 吴黛灵, 张敏, 何良英, 应光国. 抗生素、重金属和杀生剂抗性共选择机制[J]. *生态毒理学报*, 2020, 15(2): 1-10.

- CHEN S, ZOU HY, GAO FZ, WU DL, ZHANG M, HE LY, YING GG. Co-selection mechanism of antibiotic, metal and biocide resistance[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2020, 15(2): 1-10 (in Chinese).
- [82] PAL C, BENGTTSSON-PALME J, KRISTIANSSON E, LARSSON DGJ. Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 964.
- [83] PAN Y, ZENG JX, LI LG, YANG JT, TANG ZY, XIONG WG, LI YF, CHEN S, ZENG ZL. Coexistence of antibiotic resistance genes and virulence factors deciphered by large-scale complete genome analysis[J]. *mSystems*, 2020, 5(3): e00821-e00819.
- [84] ESCUDEIRO P, POTHIER J, DIONISIO F, NOGUEIRA T. Antibiotic resistance gene diversity and virulence gene diversity are correlated in human gut and environmental microbiomes[J]. *mSphere*, 2019, 4(3): e00135-e00119.
- [85] FORSBERG KJ, REYES A, WANG B, SELLECK EM, SOMMER MOA, DANTAS G. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens[J]. *Science*, 2012, 337(6098): 1107-1111.
- [86] ASHBOLT NJ, AMÉZQUITA A, BACKHAUS T, BORRIELLO P, BRANDT KK, COLLIGNON P, COORS A, FINLEY R, GAZE WH, HEBERER T, LAWRENCE JR, LARSSON DGJ, McEWEN SA, RYAN JJ, SCHÖNFELD J, SILLEY P, SNAPE JR, van den EEDE C, TOPP E. Human health risk assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance[J]. *Environmental Health Perspectives*, 2013, 121(9): 993-1001.
- [87] 董庆利, 王海梅, Pradeep K MALAKAR, 刘箐, 宋筱瑜, 田明胜, 陆冉冉. 我国食品微生物定量风险评估的研究进展[J]. *食品科学*, 2015, 36(11): 221-229.
- DONG QL, WANG HM, PRADEEP KM, LIU J, SONG XY, TIAN MS, LU RR. Review of progress in quantitative microbiological risk assessment in China[J]. *Food Science*. 2015, 36(11): 221-229 (in Chinese).
- [88] 曲良娇, 黄正. 饮水微生物定量风险评估方法的研究进展[J]. *环境与健康杂志*, 2015, 32(10): 923-926.
- QU LJ, HUANG Z. Research progress of quantitative microbial risk assessment of drinking water[J]. *Journal of Environment and Health*, 2015, 32(10): 923-926 (in Chinese).
- [89] MANAIA CM. Assessing the risk of antibiotic resistance transmission from the environment to humans: non-direct proportionality between abundance and risk[J]. *Trends in Microbiology*, 2017, 25(3): 173-181.
- [90] BEN YJ, FU CX, HU M, LIU L, WONG MH, ZHENG CM. Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: a review[J]. *Environmental Research*, 2019, 169: 483-493.
- [91] CHEREAU F, OPATOWSKI L, TOURDJMAN M, VONG S. Risk assessment for antibiotic resistance in South East Asia[J]. *BMJ*, 2017, 358: j3393.
- [92] LARSSON DGJ, ANDREMONT A, BENGTTSSON-PALME J, BRANDT KK, de RODA HUSMAN AM, FAGERSTEDT P, FICK J, FLACH CF, GAZE WH, KURODA M, KVINT K, LAXMINARAYAN R, MANAIA CM, NIELSEN KM, PLANT L, PLOY MC, SEGOVIA C, SIMONET P, SMALLA K, SNAPE J, et al. Critical knowledge gaps and research needs related to the environmental dimensions of antibiotic resistance[J]. *Environment International*, 2018, 117: 132-138.
- [93] 杜翠红. 中国抗生素类化学品足迹的计算及表征研究[D]. 大连: 大连理工大学硕士学位论文, 2017.
- DU CH. Calculation and characterization on chemicals footprint of antibiotics in China[D]. Dalian: Master's Thesis of Dalian University of Technology, 2017 (in Chinese).
- [94] BENGTTSSON-PALME J, LARSSON DGJ. Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: proposed limits for environmental regulation[J]. *Environment International*, 2016, 86: 140-149.
- [95] ZHANG SX, ZHANG QQ, LIU YS, YAN XT, ZHANG B, XING C, ZHAO JL, YING GG. Emission and fate of antibiotics in the Dongjiang River Basin, China: implication for antibiotic resistance risk[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 712: 136518.
- [96] RICO A, JACOBS R, den BRINK PJV, TELLO A. A probabilistic approach to assess antibiotic resistance development risks in environmental compartments and its application to an intensive aquaculture production scenario[J]. *Environmental Pollution*, 2017, 231: 918-928.
- [97] KIENZLER A, BOPP S, HALDER M, EMBRY M, WORTH A. Application of new statistical distribution approaches for environmental mixture risk assessment: a case study[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 693: 133510.

- [98] RICE EW, WANG P, SMITH AL, STADLER LB. Determining hosts of antibiotic resistance genes: a review of methodological advances[J]. *Environmental Science & Technology Letters*, 2020, 7(5): 282-291.
- [99] NGUYEN AQ, VU HP, NGUYEN LN, WANG QL, DJORDJEVIC SP, DONNER E, YIN HB, NGHIEM LD. Monitoring antibiotic resistance genes in wastewater treatment: current strategies and future challenges[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 783: 146964.
- [100] MARTÍNEZ JL, COQUE TM, BAQUERO F. What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(2): 116-123.
- [101] HU YR, JIANG L, SUN XY, WU JQ, MA L, ZHOU YB, LIN KF, LUO Y, CUI CZ. Risk assessment of antibiotic resistance genes in the drinking water system[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 800: 149650.
- [102] MA LP, LI B, ZHANG T. New insights into antibiotic resistome in drinking water and management perspectives: a metagenomic based study of small-sized microbes[J]. *Water Research*, 2019, 152: 191-201.
- [103] ZHANG AN, GASTON JM, DAI CL, ZHAO SJ, POYET M, GROUSSIN M, YIN XL, LI LG, van LOOSDRECHT MCM, TOPP E, GILLINGS MR, HANAGE WP, TIEDJE JM, MONIZ K, ALM EJ, ZHANG T. An omics-based framework for assessing the health risk of antimicrobial resistance genes[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 4765.
- [104] OH M, PRUDEN A, CHEN CQ, HEATH LS, XIA K, ZHANG LQ. MetaCompare: a computational pipeline for prioritizing environmental resistome risk[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2018, 94(7): fty079.
- [105] LIANG JS, MAO GN, YIN XL, MA LP, LIU L, BAI YH, ZHANG T, QU JH. Identification and quantification of bacterial genomes carrying antibiotic resistance genes and virulence factor genes for aquatic microbiological risk assessment[J]. *Water Research*, 2020, 168: 115160.
- [106] ZHANG ZY, ZHANG Q, WANG TZ, XU NH, LU T, HONG WJ, PENUELAS J, GILLINGS M, WANG MX, GAO WW, QIAN HF. Assessment of global health risk of antibiotic resistance genes[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 1553.
- [107] SU ZG, WEN DH. Characterization of antibiotic resistance across Earth's microbial genomes[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 816: 151613.
- [108] SILVA V, CANIÇA M, CAPELO JL, IGREJAS G, POETA P. Diversity and genetic lineages of environmental staphylococci: a surface water overview[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2020, 96(12): fiae191.