



## 活性污泥抗生素抗性基因研究进展

安新丽 苏建强\*

中国科学院城市环境研究所 城市环境与健康重点实验室 福建 厦门 361021

**摘要:** 抗生素抗性在全球范围内的传播扩散严重威胁人类健康。活性污泥是污水处理系统重要的处理工艺,同时也是抗生素抗性及其发生水平基因转移的一个重要储库和热区。目前,随着研究手段和技术的不断更新,活性污泥中抗生素抗性的研究不断增加,但是仍有许多科学问题亟待解决。本文主要针对活性污泥抗生素抗性的5个主要方面进行深入讨论:(1)活性污泥中抗性基因的丰度和分布的影响因素;(2)污泥抗性基因的研究方法;(3)活性污泥抗性基因的传播与扩散;(4)污泥中抗性基因环境风险评估;(5)研究展望。本综述在活性污泥抗生素抗性研究基础上,阐述了驱动抗生素抗性扩散的基本微生物生态过程研究进展,旨在为污水处理工艺的发展和优化及抗性基因控制政策的制定提供科学基础。

**关键词:** 活性污泥, 抗生素抗性基因, 污水处理厂, 环境污染, 人类健康, 水平基因转移

## Resistome in activated sludge: current knowledge and future directions

AN Xin-Li SU Jian-Qiang\*

Key Laboratory of Urban Environment and Health, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen, Fujian 361021, China

**Abstract:** The rapid dissemination of antibiotic resistance is threatening human health worldwide. Activated sludge system is a critical treatment technology for removing contaminants from wastewater. With the development of microbiological research technologies, increasing number of researches focus on antibiotic resistance in activated sludge. However, knowledge about antibiotic resistance and horizontal gene transfer in activated sludge remains largely unknown. Here, we review and discuss the research progress and main knowledge gaps of antibiotic resistance in activated sludge: (1) major determinants of antibiotic resistance in activated sludge; (2) methods used for analyzing antibiotic resistance; (3) dissemination and spread of antibiotic resistance genes in activated sludge; (4) environmental risks of antibiotic resistance in activated sludge; (5) concluding remarks and future perspectives. This review will contribute to illuminating the microbial ecology driving the dissemination of antibiotic resistance, intending to support the development and optimization of wastewater treatment technologies and provide

**Foundation items:** National Key Research and Development Program of China (2017YFE0107300); National Natural Science Foundation of China (31722004); K.C.Wong Education Foundation

\*Corresponding author: Tel: 86-592-6190792; E-mail: jqsu@iue.ac.cn

**Received:** 16-04-2019; **Accepted:** 13-06-2019; **Published online:** 11-07-2019

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFE0107300); 国家自然科学基金(31722004); 王宽诚教育基金

\*通信作者: Tel: 0592-6190792; E-mail: jqsu@iue.ac.cn

收稿日期: 2019-04-16; 接受日期: 2019-06-13; 网络首发日期: 2019-07-11

basis for developing management strategies to improve antibiotic resistance mitigation.

**Keywords:** Activated sludge, Antibiotic resistance genes, Wastewater treatment plant, Environmental pollution, Human health, Horizontal gene transfer

抗生素自发现以来为人类防治细菌感染做出了重大贡献,然而随着抗生素的长期大量使用和滥用,抗生素耐药性问题日趋加剧,不断威胁人类健康,已经成为全球最严峻的公共卫生问题之一。抗生素抗性基因(Antibiotic resistance genes, ARGs)已被广泛认为是一类新型环境污染物,与传统化学污染物不同,抗性基因污染属于生物污染,不仅会在不同环境介质中持久性残留、转移和扩散,而且具有暴发性的特征,一旦失控,将严重威胁公共安全,例如,2010年印度新德里报道的“超级细菌”事件,其携带的Beta-内酰胺类抗生素耐药基因NDM-1(New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1)编码一种碳青霉烯酶,可以水解青霉素等大多数抗生素,致使由该耐药菌引起的感染疾病难以医治<sup>[1-2]</sup>。当前,环境抗生素抗性污染问题已成为人类亟待解决的环境健康难题,是国际环境领域关注的热点。2011年,世界卫生组织(WHO)提出“遏制耐药——今天不采取行动,明天就无药可用”的呼吁,并于2014发布了《控制细菌耐药全球行动计划(草案)》<sup>[3]</sup>。我国也于2016年由国家卫生计生委等14部门联合制定并发布了《遏制细菌耐药国家行动计划(2016-2020年)》,旨在加强抗菌药物科学管理,遏制细菌耐药发展与蔓延,维护人民群众身体健康,促进经济社会协调发展<sup>[4]</sup>。

污水处理厂被认为是抗生素抗性基因的储库,活性污泥法是污水处理过程中应用较广泛、最为重要的处理阶段/工艺,活性污泥是环境抗性基因研究的热点。首先,污水处理厂每天接收和处理成千上万吨来自于人类生活污水、医疗废水、工业废水和养殖废水等污水,人类粪便、动物排泄物、制药厂出水以及医院出水中含有大量的抗生素抗性细菌(Antibiotic resistant bacteria,

ARB)和抗生素抗性基因,这些污水汇聚到污水处理厂,使污水处理厂尤其是活性污泥成为巨大的抗性基因库<sup>[5-6]</sup>。其次,活性污泥也是抗性基因水平转移的热区,不同来源的高度多样化的细菌在适宜的温度、丰富有机质、选择压力(如抗生素,重金属,药物,杀菌剂)等条件下,形成生物团聚体和生物膜,抗性菌与非抗性菌相互作用,使得非抗性菌可以通过水平基因转移获得抗性基因<sup>[6-7]</sup>。在实际污水环境中,对抗性基因产生选择压力的化合物的浓度远低于临床治疗浓度,但是即使在最小抑制浓度水平甚至最小抑制浓度的1/50或1/100倍,这些化合物仍然对微生物抗性表型具有选择压力<sup>[8]</sup>。多数研究关于化合物对抗性选择压力的研究主要集中在简单体系中,对于实际污水体系中的化合物对抗性选择压力研究还需深入研究。最后,由于目前污水处理工艺还不能完全去除污水环境中的抗性菌和抗性基因,出水中依然残留一定数量的抗性基因,这些抗性基因随出水排放从而扩散到下游自然环境中,例如河流、湖泊、海洋、土壤等,从而污染下游环境<sup>[9-12]</sup>。基于此,污水处理厂(活性污泥)是人类活动和环境之间一个独特界面,在抗性细菌和抗性基因在环境中的发生、扩散与持续存在方面发挥着重要作用<sup>[13-14]</sup>。本文将聚焦当前活性污泥中抗生素抗性基因的传播扩散研究进展进行综述,并提出尚未解决的科学问题,为进一步深入研究耐药基因的环境传播提供可能的研究方向。

## 1 活性污泥中抗性基因分布和丰度的影响因素

活性污泥法是一种低耗能和环境友好型的有效去除污水中化学需氧量的处理工艺。好氧污泥处理需要在有氧条件下进行,微生物利用氧气将

有机污染物转化为二氧化碳、水和好氧菌生物量; 厌氧污泥处理需要在无氧条件下进行, 微生物不需要氧气即可将有机污染物转变为甲烷、二氧化碳和厌氧菌生物量<sup>[15]</sup>。我们前期的研究表明经过活性污泥处理阶段(好氧-缺氧-厌氧处理), 污水环境中的抗性基因和细菌群落显著减少, 氨基糖苷类、多种抗药性、四环素类和  $\beta$ -内酰胺类抗性基因是活性污泥中主要的抗性类别, 并且活性污泥中的抗性基因具有明显的地域分布, 内地活性污泥的抗性基因分布明显不同于我国香港地区污泥样品<sup>[14]</sup>。与其他环境相比, 活性污泥中的抗性基因丰度、多样性以及结构分布明显不同于河水、饮用水、污水厂进水和出水、人类粪便、土壤和鸡粪等环境的抗性基因<sup>[16]</sup>。这一独特的抗性基因分布可能与活性污泥中生物与非生物等多个因素的共同作用密切相关。

许多非生物因素, 例如温度、pH、电导率等, 影响微生物群落动态分布, 因此也会影响活性污泥中抗性菌的适应性代价(Fitness cost)、存活(Survival)和增殖(Proliferation)。活性污泥中许多来源于临床和环境相关的抗性细菌是严格的化能异养、嗜常温、嗜中性 pH 的兼性或好氧细菌, 它们的生长和增殖需要这些环境变量的平衡状态<sup>[17-19]</sup>。此外, 污水处理过程中的化学需氧量、生物需氧量或污泥停留时间等对污水中抗性菌的生长、持续性和去除等具有显著相关性<sup>[20-21]</sup>。但是目前还没有确切的生物-物理-化学因子或某一外界条件可以明确表征活性污泥处理过程中抗性基因去除效果<sup>[19]</sup>。多数研究表明抗生素、消毒剂 and 重金属对抗性细菌和抗性基因具有选择压力, 这些选择剂的种类、浓度、化学形态、多种选择剂的共同暴露、暴露时间等变化都会对抗性细菌的生长产生不同影响<sup>[22]</sup>。但是研究这些选择剂的变化对活性污泥中抗生素抗性的确切影响相对较难, 因为活性污泥中的多数抗生素是可以生物降解的、发生形态变化或被活性污泥吸收, 具有一定的衰变

期, 有些抗生素衰变期较短极易降解, 很难与抗性菌生长增殖变化相关联<sup>[23-24]</sup>, 而且活性污泥环境测定的抗生素或重金属浓度几乎不能反映细菌微环境的真实作用浓度。目前对污泥环境中抗生素暴露和微生物群落抗性选择之间关系的研究相对不足<sup>[25-26]</sup>。同时对于活性污泥中非抗生素共选择压力的化合物如重金属、杀虫剂等对抗生素抗性的选择能力以及其潜在选择机制(如群体感应或者内在抗性 or 获得性抗性菌株的选择)仍需深入研究<sup>[27-30]</sup>。

污泥环境是一个相对复杂的环境, 其中的生物因素也会影响生物反应器或沉淀池中的 ARB/ARGs 的生态分布。例如, 选择或非选择性的捕食作用或病毒裂解都可能会对 ARB/ARGs 的命运具有重要影响, 抗性细菌与捕食细菌[如蛭弧菌(*Bdellovibrio bacteriovorus*)]、原生动物的相互作用等值得深入研究<sup>[19,31]</sup>。在土壤、海洋和淡水环境中, 异养鞭毛虫和纤毛虫是细菌捕食/死亡的主要源头, 这些细菌捕食者可能通过分泌刺激细菌生长的化合物或者选择性摄食某类细菌, 影响细菌的存活及增殖, 从而改变污泥中的微生物群落, 进而使抗性菌群也发生变化<sup>[31-32]</sup>。细菌的噬菌体也会通过选择性裂解细菌而影响细菌群落, 同时也对抗性基因的水平基因转移发挥重要作用<sup>[33-34]</sup>。

## 2 抗生素抗性基因的研究方法

### 2.1 传统细菌培养方法

传统细菌培养和抗生素敏感性测试方法是鉴定抗生素抗性的经典方法。采用合适的选择培养基可以对抗性细菌进行分离和计数, 进而分析抗性细菌的丰度和分布特征, 并可追溯抗性基因的水平基因转移。抗生素抗性的测定常常基于标准最小抑制浓度(Minimum inhibition concentration, MIC)通过琼脂平板扩散法或者系列稀释法从而鉴定抗生素抗性细菌或者抗生素敏感菌<sup>[35-36]</sup>。基于培养的抗性细菌法可以将抗性基因的表型与基因

型建立联系,为抗性基因的分布提供宿主信息<sup>[37-38]</sup>。目前标准培养筛选方法已应用于全球水质监测,未来可发展应用于水环境中抗性菌监测的参考标准,例如基于流行病学的 Cut-off 值 (ECOFFs)<sup>[38-39]</sup>。但是,基于细菌培养的方法通常是费时、耗人力的,且其最大局限在于复杂环境中仅有少量细菌是可培养的<sup>[30,39-40]</sup>。此外,由于抗性细菌对暴露人群和暴露环境潜在的污染危害,抗性菌的培养需要必要的安全设备和安全操作。

## 2.2 基于 PCR 扩增分析技术

PCR 扩增技术基于荧光染料或者荧光探针以及特异性引物可以对环境中的特定抗性基因进行实时快速并定量的检测,具有高度灵敏性和特异性的优势<sup>[41]</sup>。基于 PCR 定量分析可以挖掘抗性基因在环境中的分布及潜在变化规律,但是常规定量 PCR 具有低通量、高成本和费劳力等缺陷。目前,为了规避普通定量 PCR 低通量的限制,研究者们发展了高通量 qPCR (High-throughput quantitative PCR, HT-qPCR)技术,该技术可以一次反应同时检测上百个抗性基因<sup>[14,42-45]</sup>。基于高通量定量 PCR 的方法,我们从 39 个活性污泥样品中检测 95±46 个 ARGs,抗性基因丰度高达约  $10^{13}$  copies/L。但是定量 PCR 方法最大不足是引物的设计需要获得已知抗性基因序列,因此无法检测环境中未知 ARGs<sup>[46]</sup>。此外,定量 PCR 技术也受限于扩增反应条件,如 HT-qPCR 需要靶标基因的扩增反应循环数和退火温度是统一的<sup>[47]</sup>,同时环境 DNA 质量也会影响定量 PCR 技术的扩增效率<sup>[47]</sup>。

## 2.3 宏基因组学技术

宏基因组高通量测序技术可以获得环境中所有抗性基因的序列信息,尤其可以挖掘未知抗性基因的信息,克服了定量 PCR 检测技术引物或探针设计与选择的限制。目前,宏基因组学技术已广泛用于活性污泥 ARGs 的研究等<sup>[16,48-50]</sup>。通过对样品 DNA 进行高通量测序,获得的宏基因序列与已知的序列数据库(参考序列)进行比较,从而鉴定抗性基因或者引发抗性的突变体<sup>[51]</sup>。针对于抗性

基因的数据库主要有 National Center for Biotechnology Information (NCBI) NR 和 Antibiotic Resistance Gene Database (ARGD)<sup>[52]</sup>,实验验证抗性功能的数据库有基于 Hidden Markov Model (HMM) 模型的数据库 Resfams<sup>[53]</sup> 和 Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD)<sup>[54]</sup>。然而基于序列检索的同源比对的宏基因组测序技术具有一定的缺陷,一些新型 ARGs 可能由于同源序列相似性较低,从而使得新型 ARGs 丢失遗漏<sup>[51,54]</sup>。多数情况下无法验证同源比对注释的抗性基因的功能,这会造成假阳性抗性基因注释的出现。

目前多数宏基因组测序平台获得的 Reads (高通量测序每个反应获得的序列读长)较短,仅能获得抗性基因的有限信息。将短 Reads 组装成长片段的 Contigs (许多 Reads 通过片段重叠组装成一个更长片段的 Contig),重构细菌完整基因组,可以帮助获得 ARGs 的系统发育和遗传位置的相关信息,这将有助于注释基因的分类,促进抗性基因与可移动遗传元件(Mobile genetic elements, MGEs)上携带的抗性基因共发生特征的剖析,从而可评估多种抗药性抗性基因及水平基因转移发生的潜在可能性<sup>[45]</sup>,这对于评估环境中抗性风险极为重要<sup>[55-56]</sup>。与传统培养方法相比,宏基因组学技术面临一个极大挑战,即 ARGs 宿主细菌的鉴定。目前,科学家们常基于 ARGs 与细菌群落之间显著相关性(共发生)来间接推测抗性基因的宿主。ARGs 及其侧翼 DNA 的序列分析也可以为抗性基因宿主的确定提供直接信息。此外,宏基因组数据缺少标准分析方法和统一分析工具,限制了不同环境获得的数据的重现性和可比性<sup>[57]</sup>。

## 2.4 功能宏基因组学

功能宏基因组学技术通过构建基因表达文库、活性筛选(例如抗生素敏感性测试)并结合高通量测序技术,可以帮助挖掘未知的新的抗性基因<sup>[58-59]</sup>。由于功能宏基因组学是基于功能筛选和 DNA 片段的克隆和表达技术,因此该方法规避了

PCR 和宏基因组测序无法获得未知的新的抗性基因的缺陷。目前功能宏基因组文库构建已经应用于不同环境中微生物群落遗传潜力的研究, 例如土壤、沉积物、淡水环境、海洋环境和动物肠道, 关于活性污泥环境中抗性基因的研究尚未见相关报道。由于该方法基于功能宏基因组文库的构建以及基因片段的异源表达, 因此克隆子和插入片段的大小可能会限制由多个基因调控表达的 ARGs 的鉴定<sup>[60]</sup>。此外, 表达宿主的选择也会影响靶标抗性基因的成功检测, 因为不同的表达宿主可能具有不同的密码子使用和启动子识别能力, 合适的启动因子或者蛋白折叠能力等。不同的抗生素浓度、孵育方法以及培养基的种类可能也会影响功能基因片段的表达, 从而影响环境样品中抗性基因的正确评估。

## 2.5 新兴的分析技术手段

新技术的不断发展为活性污泥微生物群落 ARGs 的分析提供新的可能性, 目前亟待发展可以高通量鉴定并且不需要培养的技术手段以获得活性污泥环境中抗性基因的宿主信息。最近报道的 epicPCR 可以将来源于同一个细胞的两个基因连接到一个扩增子上, 随后对扩增子进行测序, 可获得该抗性基因的宿主信息<sup>[61]</sup>。此外, 单细胞基因组测序技术可以直接鉴定和组装环境或者临床上未可培养的细菌或病毒, 从而可以从污泥环境的微生物中鉴定各种参与特定功能或代谢途径的新型基因以及数据库中未包含的基因<sup>[62]</sup>。单细胞基因组测序技术结合高通量细胞分选技术(如流式细胞仪分选和微流控分选)可以一次分析>50 000 个细胞, 将成为研究活性污泥中抗性基因及其宿主信息极具前景的分析手段<sup>[63]</sup>。

抗性基因的遗传背景对抗性基因的表达调控和扩散传播密切相关。当抗性基因位于可移动遗传元件上, 则该基因可能具有更高的健康风险。随着高通量测序技术的发展, 三代测序技术(如 PacBio 和 NanoPore)可以获得更长 DNA 片段信息, 从而更加精确地鉴定抗性基因及其邻近序列的遗

传信息(如可移动遗传元件序列或宿主序列)<sup>[64-65]</sup>。此外, 反向 PCR 结合长片段测序手段也可以用于研究抗性基因的遗传背景。

综上, 抗生素耐药性及其在全球范围内的传播已成为国际关注的焦点。抗性基因在人类和环境之间快速传播与扩散将严重威胁人类健康。目前, 研究活性污泥中的抗性基因有以上各种研究方法, 这些方法都有各自的优点和缺陷, 因此应根据研究目的和科学假设选取适当的方法。各种研究方法可以相互结合, 互为补充, 以便更好研究污泥环境中的抗生素抗性, 旨在阐明活性污泥环境中抗生素抗性的来源、进化、发展、扩散以及潜在的风险。

## 3 活性污泥中抗性基因的传播与扩散

活性污泥中的抗性基因的传播与扩散主要有两种方式: (1) 通过污泥农用进入农田土壤生态系统, 我们的前期研究表明长期污泥用作有机肥施用可显著增加土壤中抗性基因的丰度和多样性, 同时也会显著增加地上植物叶表抗性基因的丰度, 并显著改变植物叶表微生物群落结构, 这些抗性基因进而可能通过食物链进入人体<sup>[66]</sup>; (2) 通过水平基因转移抗性基因可以在不同的菌属间传播扩散, 水平基因转移是抗生素抗性扩散的重要分子机制。可移动遗传元件(Mobile gene elements, MGEs)例如质粒、转座子和整合子等, 在细菌群落抗性基因水平转移中发挥着重要作用, 它们携带抗性基因在不同的细菌种属间进行水平转移。活性污泥中含有大量的可移动遗传元件, 这些可移动遗传元件作为抗性基因的载体, 促进抗性基因在污泥环境中的快速扩散。抗性基因的水平基因转移主要通过接合、转化和转导 3 种方式进行。

### 3.1 细菌接合作用

细菌的接合是最常见的抗性基因水平转移方式, 是供体菌和受体菌直接接触, 形成接合对, 将遗传物质(质粒 DNA)从受体菌转移到供体菌中<sup>[67]</sup>。研究表明, 质粒可以携带几乎所有与临床

相关的抗生素的抗性基因, 例如大环内酯类、四环素类、头孢菌素类、氟喹诺酮类、氨基糖苷类和  $\beta$ -内酰胺类<sup>[68]</sup>。根据质粒的不同类别以及宿主的不同种属, 不同抗性基因具有不同的转移频率。随着高通量测序技术的发展, 目前已有许多报道研究细菌接合作用在污泥环境中细菌进化和抗生素抗性基因水平转移中发挥着重要作用。Zhang 等采用 ATP 依赖的质粒安全的 DNA 酶消化污泥样品线性双链染色体 DNA, 获得总的环状质粒基因组 DNA, 测序结果表明污泥中有 307 个不同的质粒, 这些质粒携带红霉素抗性、四环素抗性和多种抗药性的基因<sup>[69]</sup>。Kav 等采用 PCR 扩增富集和 DNA 酶消化技术相结合, 发展了一种牛瘤胃质粒 DNA 的分离方法, 并进行了 Illumina 深度测序, 发现质粒的细菌宿主主要是 *Firmicutes*、*Bacteroidetes* 和 *Proteobacteria*, 质粒携带的功能基因有利于宿主适应牛瘤胃生态生境<sup>[70]</sup>。Sentchilo 等采用溴化乙锭-氯化铯密度梯度离心方法从两个污泥细菌群落总 DNA 中分离质粒基因组, 454 焦磷酸测序结果表明质粒主要携带编码与复制、转座相关的功能基因以及抗生素和重金属抗性的基因<sup>[71]</sup>。Norman 等结合电洗脱对 Kav 等的方法进行优化, 对污水中的大质粒(>10 kb)进行了富集, 通过质粒宏基因组学测序分析发现了 2 500 多个已知的质粒的基因组序列, 该方法可以更好地挖掘大质粒上携带的功能基因信息<sup>[72]</sup>。Li 等采用微流控技术对 *Pseudomonas putida* 的 RP4 在污泥中的宿主范围进行研究, 发现 46% 的细菌可以接纳 RP4 质粒, 同时利用该技术他们也发现 *Escherichia coli* 的 IncP-1 质粒 pKJK5 在污水处理厂进水和污泥中的宿主主要是 *Aeromonas*、*Acinetobacter*、*Enterobacter*、*Vagococcus* 和 *Kurthia*<sup>[73]</sup>。

细菌接合作用在抗性基因水平转移中的角色是极其复杂的, 因为除了质粒其他遗传元件(例如转座子、整合子或整合性接合元件)也可以携带抗性基因通过质粒接合作用进行水平转移。接合转座子可以通过切割、重新整合等过程从基因组的

一个位置接合转移到相同基因的质粒上, 进而通过接合转移到其他细菌基因组中。此外, 其他的可移动遗传元件例如整合子或者整合性接合元件(Integrative conjugative elements, ICEs), 也可以与接合质粒和接合性转座子串联排列。我们采用克隆文库和高通量测序发现活性污泥中一类整合子丰度最高, 三类整合子多样性最高, 其中一类整合子基因盒主要携带抗氨基糖苷类和  $\beta$ -内酰胺类的抗性基因, 三类整合子基因盒则主要携带  $\beta$ -内酰胺类的抗性基因<sup>[74]</sup>。ICEs 位于染色体上, 兼有质粒和噬菌体的特性, 也可以通过接合转移的方式将抗性基因转移到受体基因组上。许多 ICEs 包含抗性基因(例如 Tn916 携带四环素类抗性), 并具有广宿主特征, 目前报道的 ICE 多位于革兰氏阴性菌以及厚壁菌门中的部分革兰氏阴性菌中<sup>[75-76]</sup>。

### 3.2 细菌转化

环境中一些细菌可以通过自然转化作用直接吸收胞外裸露 DNA, 并进行整合和功能表达, 菌株可以通过转化交换抗性基因, 进而“逃避”抗生素的毒害。细菌进行转化需要满足以下条件: 胞外 DNA 的出现; 受体菌需要处于“感受态”; 转化后 DNA 处于稳定状态(整合到受体基因组上或者重新环化为质粒 DNA)。研究表明, 抗生素的暴露可以诱导许多细菌进入“感受态”, 表明抗生素不仅可以诱导许多细菌进入“感受态”, 而且可以诱导这些菌株中抗性基因发生转化<sup>[77]</sup>。目前对活性污泥中抗性基因的自然转化的研究尚未见相关报道。随着分子技术发展, 已经可以鉴定发生转化的抗性基因。Balsalobre 等发现氟喹诺酮抗性基因(*parC*、*parE* 和 *gyrA*) 在 *Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus mitis* 和 *Streptococcus oralis* 之间发生转化<sup>[78]</sup>。

### 3.3 细菌转导

通过细菌转导作用, 噬菌体可以将一个细菌细胞的基因传递给另一个细菌细胞, 这些可转导的 DNA 序列可以是染色体 DNA 也可以是可移动遗传元件, 例如质粒、转座子和基因岛。据估计地球上的噬菌体约  $10^{31}$  个, 是最为丰富的生物。目前

对于噬菌体介导的抗性基因的水平基因的研究主要聚焦于土壤环境, 对于污泥环境中噬菌体的研究相对较少。Calero-Cáceres 等通过纯化噬菌体颗粒, 发现 26 个活性污泥样品的噬菌体 DNA 都携带至少 1 个抗性基因, 其中 *bla*<sub>TEM</sub> 和 *qnrA* 仅在噬菌体 DNA 中检测到, 在细菌 DNA 中并未检测到, 与污水样品相比, 污泥噬菌体颗粒携带更多的 *bla*<sub>TEM</sub> 和 *sulI*<sup>[79]</sup>。Yu 等发展了两个连续多宿主分离方法, 分离到两种多价噬菌体(短尾噬菌体科的 PX1 和长尾噬菌体科的 Pef1)<sup>[80]</sup>。宏基因组测序表明大部分病毒基因组中仅含有少量抗生素抗性基因(占总 Reads 的 0.01%)<sup>[81]</sup>。Colomer-Lluch 等从水环境样品中(包括城市污水和河水)分离出噬菌体 DNA, 发现了 *bla*<sub>TEM</sub> 和 *bla*<sub>CTX-M</sub> 的存在<sup>[82]</sup>。活性污泥环境中存在高度多样化的病毒, 并且目前仅有很少的病毒被测序, 宏基因组测序将会提供更多的关于污泥环境噬菌体介导的抗性基因转移的证据。

最近的研究表明, 亚剂量的抗生素可以促进抗性基因的水平基因转移, 减少环境中可能的受体细菌可能抑制水平基因转移的发生<sup>[83-84]</sup>。然而, 目前对污水处理厂中抗性基因水平基因转移的研究缺少合适的高通量的研究方法, 限制了活性污泥中抗性基因水平基因转移的分析, 因此对活性污泥中抗性基因如何转移的认识, 例如抗性基因在真实污泥环境中的转移频率、抗性基因转移的活跃程度、它们的宿主信息以及进入下游环境后的持续性存在等问题仍不明确。

#### 4 活性污泥中抗性基因环境风险评估

抗性基因环境健康风险评估是通过抗性基因对人体不良影响发生概率的估算, 评价暴露于抗性污染的个体健康受到影响的风险。目前关于抗性基因的环境健康风险评估还处于刚起步的阶段, 因为缺乏进行定量的人类健康风险评估所需的各种定量数据和模式方法, 比如大范围的抗生素抗性基因的种类和丰度的定量数据, 水平基因

转移频率的估算方法, 抗生素和重金属等因子的选择压力与抗性基因突变和转移的关系<sup>[85]</sup>, 流行病学数据的收集及其与抗性基因关联的数学模型等, 缺少这些将难以形成完整的抗性基因人类健康评价体系。环境健康风险评估的经典模式包括危害识别、剂量-反应评估、暴露评价和风险表征。危害识别是抗性基因人类健康风险评估的第一步, 即鉴定哪些抗性基因可能威胁人类健康, 有怎样的健康效应, 结合暴露数据确定哪些基因需要进行健康风险评估。剂量-反应关系评估是抗性基因在“一定的暴露剂量与暴露条件下, 其不良健康效应产生的可能性与严重程度, 剂量-反应关系评估为评估健康风险提供转换暴露信息的数学基础”<sup>[86]</sup>。暴露评估包括测量和评估人群暴露于抗性基因的量级、方式、频率和暴露时间<sup>[87]</sup>, 通过对环境介质中抗性基因的定量和不同暴露途径暴露参数的计算, 为最终抗性基因的风险评估提供暴露量这一重要参数。风险特征则是综合前述抗性基因危害识别、剂量-反应关系和暴露评估的结果, 定性、定量地描述抗性基因的健康风险, 并提出清晰完整的结论, 为政策的制定提供科学依据。

水平基因转移是活性污泥环境抗生素抗性来源和扩散路径风险评估的最大挑战。由于污泥环境抗性基因水平基因转移事件的发生, 抗性基因在不同的细菌种属间扩散传播, 环境风险评估必须在抗性基因以及它们命运的基础上考虑水平基因转移。目前还没有国际标准方法来定量描绘抗性基因水平基因转移过程和频率, 使得这方面的实验数据不足, 极大地增加了活性污泥环境中抗性基因的环境风险评估的不确定性, 因此有必要建立综合多因子的模型来量化其过程和频率。此外, 抗性基因的水平基因转移需要供体菌和受体菌的直接接触, 活性污泥环境中供体菌、受体菌和可移动遗传因子的丰度是决定水平基因转移的关键因子, 这些因子的存在增加了水平基因转移研究的复杂性, 同时也为其量化模型的建立提出

了挑战。Martínez 等综合考虑抗性基因的抗性机制和生态功能、抗性基因是否对现有常用的抗生素产生抗性、其功能是否经过验证、抗性基因是否存在于可移动遗传因子上等因素,将抗性基因分为7个风险级别[Resistance readiness condition (RESCon)],从风险最高的 RESCon 1 到风险最低的 RESCon 7<sup>[88]</sup>。常用于感染治疗的抗生素其抗性越易进化、存在于可移动遗传因子上、其宿主是人类致病菌的,比如  $\beta$ -内酰胺酶类基因、万古霉素抗性基因 *vanA* 等,该类抗性基因的风险级别越高。

## 5 未来研究展望

活性污泥是抗性细菌和抗性基因扩散和抗性转移的热区,是抗性基因的重要储库,认清活性污泥中抗性基因的发生、进化、发展和扩散等特征将为最大化去除污水中抗性基因奠定基础。目前基于活性污泥环境抗性细菌和抗性基因的研究并可以延伸到其他环境研究的一些亟待解决的问题,我们从活性污泥抗性基因水平基因转移、出水和污泥中抗性基因的排放标准、污泥抗性基因在环境中的持久性存留及潜在健康风险和全球体系的数据共享等进行归纳总结:(1) 活性污泥中抗性基因水平转移的活跃程度如何? 环境中抗性基因移动和转移的过程、参与水平基因转移的宿主微生物、传播的下游环境热区、抗性基因的宿主以及它们的进化等问题仍需深入研究。(2) 基于目前活性污泥和出水环境中抗性基因和水平基因转移的定量数据,很难确定污泥和出水环境中的抗性基因在多大的抗性水平(抗性标准)下是具有环境风险的,即活性污泥或出水中抗性基因排放到环境中的抗性标准的确定较困难。(3) 活性污泥中抗性基因在环境中的持久性是怎样的? 这些持久存在的抗性基因具有什么样的环境风险? 缺乏构建活性污泥中抗性基因环境风险评估体系所需要的相关数据,例如污泥中抗性基因移动的速率、水平基因转移的频率、驱动抗性选择的抗生素的浓度等。(5) 抗生素抗性是全球性的环境问题,需要建立全球共享的数据库。全

球性的抗生素抗性监测可帮助我们深刻理解地方政策、措施方针及社会经济因素对抗生素抗性的影响,因此有必要进行国际合作与数据共享以确定环境中阻遏抗生素抗性水平的基线和节点,从而保持抗生素的长期有效性。

## REFERENCES

- [1] Pruden A, Pei R, Storteboom H, et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(23): 7445-7450
- [2] Poirer L, Hombrouck-Alet C, Freneau C, et al. Global spread of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1[J]. *Lancet Infectious Diseases*, 2010, 10(12): 832
- [3] WHO. Global antimicrobial resistance surveillance system [EB/OL]. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/188783/188781/9789241549400\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/188783/188781/9789241549400_eng.pdf), 2015
- [4] National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National action plan to curb bacterial resistance (2016-2020)[R]. Beijing: National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, 2016 (in Chinese)  
中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 遏制细菌耐药国家行动计划(2016-2020年)[R]. 北京: 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 2016
- [5] Baquero F, Martínez JL, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, 19(3): 260-265
- [6] 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
- [7] 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
- [8] King AM, Reid-Yu SA, Wang WL, et al. Aspergillomarasmine A overcomes metallo- $\beta$ -lactamase antibiotic resistance[J]. *Nature*, 2014, 510(7506): 503-506
- [9] Jiang L, Hu XL, Xu T, et al. Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China[J]. *Science of the Total Environment*, 2013, 458-460: 267-272
- [10] Rodriguez-Mozaz S, Chamorro S, Marti E, et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river[J]. *Water Research*, 2015, 69: 234-242
- [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] Pan M, Chu LM. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in soils from wastewater irrigation areas in the Pearl River Delta region, southern China[J]. *Science of the*



- Total Environment, 2018, 624: 145-152
- [13] Negreanu Y, Pasternak Z, Jurkevitch E, et al. Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic resistance in agricultural soils[J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(9): 4800-4808
- [14] An XL, Su JQ, Li B, et al. Tracking antibiotic resistome during wastewater treatment using high throughput quantitative PCR[J]. Environment International, 2018, 117: 146-153
- [15] Barancheshme F, Munir M. Strategies to combat antibiotic resistance in the wastewater treatment plants[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 8: 2603
- [16] Li B, Yang Y, Ma LP, et al. Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes[J]. The ISME Journal, 2015, 9(11): 2490-2502
- [17] Munir M, Wong K, Xagorarakis I. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan[J]. Water Research, 2011, 45(2): 681-693
- [18] Zhang T, Yang Y, Pruden A. Effect of temperature on removal of antibiotic resistance genes by anaerobic digestion of activated sludge revealed by metagenomic approach[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(18): 7771-7779
- [19] 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
- [20] Kim S, Jensen JN, Aga DS, et al. Tetracycline as a selector for resistant bacteria in activated sludge[J]. Chemosphere, 2007, 66(9): 1643-1651
- [21] Di Cesare A, Fontaneto D, Doppelbauer J, et al. Fitness and recovery of bacterial communities and antibiotic resistance genes in urban wastewaters exposed to classical disinfection treatments[J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50(18): 10153-10161
- [22] Baquero F, Alvarez-Ortega C, Martinez JL. Ecology and evolution of antibiotic resistance[J]. Environmental Microbiology Reports, 2009, 1(6): 469-476
- [23] Bengtsson-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
- [24] Larsson DGJ, Andremont A, Bengtsson-Palme J, et al. Critical knowledge gaps and research needs related to the environmental dimensions of antibiotic resistance[J]. Environment International, 2018, 117: 132-138
- [25] Kraupner N, Ebmeyer S, Bengtsson-Palme J, et al. Selective concentration for ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* grown in complex aquatic bacterial biofilms[J]. Environment International, 2018, 116: 255-268
- [26] Le Page G, Gunnarsson L, Snape J, et al. Integrating human and environmental health in antibiotic risk assessment: a critical analysis of protection goals, species sensitivity and antimicrobial resistance[J]. Environment International, 2017, 109: 155-169
- [27] Koul S, Prakash J, Mishra A, et al. Potential emergence of multi-quorum sensing inhibitor resistant (MQSIR) bacteria[J]. Indian Journal of Microbiology, 2016, 56(1): 1-18
- [28] Widder S, Allen RJ, Pfeiffer T, et al. Challenges in microbial ecology: building predictive understanding of community function and dynamics[J]. The ISME Journal, 2016, 10(11): 2557-2568
- [29] Östman M, Lindberg RH, Fick J, et al. Screening of biocides, metals and antibiotics in Swedish sewage sludge and wastewater[J]. Water Research, 2017, 115: 318-328
- [30] Pal C, Asiani K, Arya S, et al. Metal resistance and its association with antibiotic resistance[J]. Advances in Microbial Physiology, 2017, 70: 261-313
- [31] Miki T, Jacquet S. Complex interactions in the microbial world: underexplored key links between viruses, bacteria and protozoan grazers in aquatic environments[J]. Aquatic Microbial Ecology, 2008, 51(2): 195-208
- [32] Faust K, Raes J. Microbial interactions: from networks to models[J]. Nature Reviews Microbiology, 2012, 10(8): 538-550
- [33] Yosef I, Manor M, Kiro R, et al. Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(23): 7267-7272
- [34] Enault F, Briet A, Bouteille L, et al. Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses[J]. The ISME Journal, 2017, 11(1): 237-247
- [35] de Oliveira AJFC, Pinhata JMW. Antimicrobial resistance and species composition of *Enterococcus* spp. isolated from waters and sands of marine recreational beaches in Southeastern Brazil[J]. Water Research, 2008, 42(8/9): 2242-2250
- [36] McClain JB, Taylor D, Neet J. Drug delivery medical device: USA, US20100239635[P]. 2010-09-23
- [37] Lester CH, Frimodt-Møller N, Sørensen TL, et al. *In vivo* transfer of the *vanA* resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, 50(2): 596-599
- [38] Wang XR, Kang Y, Luo CX, et al. Heteroresistance at the single-cell level: adapting to antibiotic stress through a population-based strategy and growth-controlled interphenotypic coordination[J]. mBio, 2014, 5(1): e00942-13
- [39] Kronvall G. Normalized resistance interpretation as a tool for establishing epidemiological MIC susceptibility breakpoints[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2010, 48(12): 4445-4452
- [40] Martínez JL, Coque TM, Baquero F. Prioritizing risks of antibiotic resistance genes in all metagenomes[J]. Nature Reviews Microbiology, 2015, 13(6): 396
- [41] Karkman A, Do TT, Walsh F, et al. Antibiotic-resistance genes in waste water[J]. Trends in Microbiology, 2018, 26(3): 220-228
- [42] Stedtfeld RD, Baushke SW, Tourlousse DM, et al. Development and experimental validation of a predictive threshold cycle equation for quantification of virulence and marker genes by high-throughput nanoliter-volume PCR on the OpenArray platform[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(12): 3831-3838
- [43] Dixon JM, Lubomirski M, Amaratunga D, et al. Nanoliter high-throughput RT-qPCR: a statistical analysis and assessment[J]. Biotechniques, 2009, 46(6S): ii-viii
- [44] Zhu YG, Johnson TA, Su JQ, et al. Diverse and abundant

- antibiotic resistance genes in Chinese swine farms[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(9): 3435-3440
- [45] Pärnänen KMM, Narciso-da-Rocha C, Kneis D, et al. Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence[J]. Science Advances, 2019, 5(3): eaau9124
- [46] Allen HK. Antibiotic resistance gene discovery in food-producing animals[J]. Current Opinion in Microbiology, 2014, 19: 25-29
- [47] Luby E, Ibekwe AM, Zilles J, et al. Molecular methods for assessment of antibiotic resistance in agricultural ecosystems: prospects and challenges[J]. Journal of Environmental Quality, 2016, 45(2): 441-453
- [48] Zhang T, Zhang XX, Ye L. Plasmid metagenome reveals high levels of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge[J]. PLoS One, 2011, 6(10): e26041
- [49] Yang Y, Li B, Ju F, et al. Exploring variation of antibiotic resistance genes in activated sludge over a four-year period through a metagenomic approach[J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(18): 10197-10205
- [50] Yang Y, Li B, Zou SC, et al. Fate of antibiotic resistance genes in sewage treatment plant revealed by metagenomic approach[J]. Water Research, 2014, 62: 97-106
- [51] Schmieder R, Edwards R. Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches[J]. Future Microbiology, 2012, 7(1): 73-89
- [52] Liu B, Pop M. ARDB—antibiotic resistance genes database[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 37(S1): D443-D447
- [53] 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
- [54] McArthur AG, Wagelchner N, Nizam F, et al. The comprehensive antibiotic resistance database[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2013, 57(7): 3348-3357
- [55] Albertsen M, Hugenholtz P, Skarshewski A, et al. Genome sequences of rare, uncultured bacteria obtained by differential coverage binning of multiple metagenomes[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(6): 533-538
- [56] Hultman J, Waldrop MP, Mackelprang R, et al. Multi-omics of permafrost, active layer and thermokarst bog soil microbiomes[J]. Nature, 2015, 521(7551): 208-212
- [57] Escobar-Zepeda A, de León AVP, Sanchez-Flores A. The road to metagenomics: from microbiology to DNA sequencing technologies and bioinformatics[J]. Frontiers in Genetics, 2015, 6: 348
- [58] Torres-Cortés G, Millán V, Ramírez-Saad HC, et al. Characterization of novel antibiotic resistance genes identified by functional metagenomics on soil samples[J]. Environmental Microbiology, 2011, 13(4): 1101-1114
- [59] Su JQ, Wei B, Xu CY, et al. Functional metagenomic characterization of antibiotic resistance genes in agricultural soils from China[J]. Environment International, 2014, 65: 9-15
- [60] de Castro AP, Fernandes GDR, Franco OL. Insights into novel antimicrobial compounds and antibiotic resistance genes from soil metagenomes[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 489
- [61] Spencer SJ, Tamminen MV, Preheim SP, et al. Massively parallel sequencing of single cells by epicPCR links functional genes with phylogenetic markers[J]. The ISME Journal, 2016, 10(2): 427-436
- [62] Lasken RS. Genomic sequencing of uncultured microorganisms from single cells[J]. Nature Reviews Microbiology, 2012, 10(9): 631-640
- [63] Lan F, Demaree B, Ahmed N, et al. Single-cell genome sequencing at ultra-high-throughput with microfluidic droplet barcoding[J]. Nature Biotechnology, 2017, 35(7): 640-646
- [64] Escalona M, Rocha S, Posada D. A comparison of tools for the simulation of genomic next-generation sequencing data[J]. Nature Reviews Genetics, 2016, 17(8): 459-469
- [65] Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies[J]. Nature Reviews Genetics, 2016, 17(6): 333-351
- [66] Chen QL, An XL, Zheng BX, et al. Long-term organic fertilization increased antibiotic resistome in phyllosphere of maize[J]. Science of the Total Environment, 2018, 645: 1230-1237
- [67] Huddleston JR. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes[J]. Infection and Drug Resistance, 2014, 7: 167-176
- [68] Smalla K, Jechalke S, Top EM. Plasmid detection, characterization, and ecology[J]. Microbiology Spectrum, 2015, 3(1): PLAS-0038-2014
- [69] Zhang T, Zhang XX, Ye L. Plasmid metagenome reveals high levels of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge[J]. PLoS One, 2011, 6(10): e26041
- [70] Kav AB, Sasson G, Jami E, et al. Insights into the bovine rumen plasmidome[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(14): 5452-5457
- [71] Sentchilo V, Mayer AP, Guy L, et al. Community-wide plasmid gene mobilization and selection[J]. The ISME Journal, 2013, 7(6): 1173-1186
- [72] Norman A, Riber L, Luo WT, et al. An improved method for including upper size range plasmids in metamobilomes[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e104405
- [73] Li LG, Dechesne A, He ZM, et al. Estimating the transfer range of plasmids encoding antimicrobial resistance in a wastewater treatment plant microbial community[J]. Environmental Science & Technology Letters, 2018, 5(5): 260-265
- [74] An XL, Chen QL, Zhu D, et al. Impact of wastewater treatment on the prevalence of integrons and the genetic diversity of integron gene cassettes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(9): e02766-17
- [75] Franke AE, Clewell DB. Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of “conjugal” transfer in the absence of a conjugative plasmid[J]. Journal of Bacteriology, 1981, 145(1): 494-502
- [76] D’Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, et al. Sampling the antibiotic resistome[J]. Science, 2006, 311(5759): 374-377
- [77] Seitz P, Blokesch M. Cues and regulatory pathways involved in natural competence and transformation in pathogenic and environmental Gram-negative bacteria[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37(3): 336-363
- [78] Balsalobre L, Ferrándiz MJ, Linares J, et al. Viridans group

- streptococci are donors in horizontal transfer of topoisomerase IV genes to *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003, 47(7): 2072-2081
- [79] Calero-Cáceres W, Melgarejo A, Colomer-Lluch M, et al. Sludge as a potential important source of antibiotic resistance genes in both the bacterial and bacteriophage fractions[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(13): 7602-7611
- [80] Yu PF, Mathieu J, Li MY, et al. Isolation of polyvalent bacteriophages by sequential multiple-host approaches[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(3): 808-815
- [81] Allen HK, Looft T, Bayles DO, et al. Antibiotics in feed induce prophages in swine fecal microbiomes[J]. *mBio*, 2011, 2(6): e00260-11
- [82] Colomer-Lluch M, Imamovic L, Jofre J, et al. Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(10): 4908-4911
- [83] Jutkina J, Rutgersson C, Flach CF, et al. An assay for determining minimal concentrations of antibiotics that drive horizontal transfer of resistance[J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 548-549: 131-138
- [84] Hall JPJ, Williams D, Paterson S, et al. Positive selection inhibits gene mobilization and transfer in soil bacterial communities[J]. *Nature Ecology & Evolution*, 2017, 1(9): 1348-1353
- [85] Cui LL, Du YJ, Li TT. Risk assessment guidelines for environmental health Session 1 Hazard identification[J]. *Journal of Environment and Health*, 2015, 32(4): 362-365 (in Chinese) 崔亮亮, 杜艳君, 李湉湉. 环境健康风险评估方法 第二讲 危害识别(续一)[J]. *环境与健康杂志*, 2015, 32(4): 362-365
- [86] Zhang Y, Du YJ, Li TT. Risk assessment guidelines for environmental health Session 2 dose-response assessment[J]. *Journal of Environment and Health*, 2015, 32(5): 450-453 (in Chinese) 张翼, 杜艳君, 李湉湉. 环境健康风险评估方法 第三讲 剂量-反应关系评估(续二)[J]. *环境与健康杂志*, 2015, 32(5): 450-453
- [87] Du YJ, Mo Y, Li TT. Risk assessment guidelines for environmental health Session 3 exposure assessment[J]. *Journal of Environment and Health*, 2015, 32(6): 556-559 (in Chinese) 杜艳君, 莫杨, 李湉湉. 环境健康风险评估方法 第四讲 暴露评估(续三)[J]. *环境与健康杂志*, 2015, 32(6): 556-559
- [88] Martínez JL, Coque TM, Baquero F. Prioritizing risks of antibiotic resistance genes in all metagenomes[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(6): 396

(上接 p.2019)

## 征 稿 简 则

### 4 特别说明

4.1 关于测序类论文: 凡涉及测定 DNA 或氨基酸序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

4.2 关于版权: (1) 本刊只接受作者独立创作的原创性作品, 享有自主知识产权, 无抄袭问题; 文中相关内容不曾以各种语种在国内外公开发表过, 并且不存在学术伪造、一稿多投、同一学术成果多篇发表等问题; 论文不涉及泄密及其他与著作权有关的侵权问题; 全部数据真实可靠, 且数据、图表未曾正式发表。若来稿被发现存在上述问题, 编辑部调查核实后可随时终止流程, 已发表的将发布公告公开撤销发表, 并将作者列入黑名单, 本刊不再受理该作者任何稿件。作者文责自负。(2) 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式(即各种文字、各种介质)的版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。(3) 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.3 审稿程序及提前发表: (1) 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登录我刊系统或关注绑定微信也可查看。稿件经过内审、初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充后上传修改稿, 编辑部复审通过后将发出稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。(2) 本刊对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。

### 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

### 6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511; E-mail: tongbao@im.ac.cn; 网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>