

净水技术前沿与热点综述

王羽洁, 胡意凡, 高欣然, 等. 纳米孔测序技术检测水环境中细菌抗生素耐药性的应用综述[J]. 净水技术, 2025, 44(1): 8-15, 134.

WANG Y J, HU Y F, GAO X R, et al. Review on application of nanopore sequencing technology in determination of bacteria antibiotic resistance in water environment [J]. Water Purification Technology, 2025, 44(1): 8-15, 134.

纳米孔测序技术检测水环境中细菌抗生素耐药性的应用综述

王羽洁, 胡意凡, 高欣然, 施 鹏*

(污染控制与资源化国家重点实验室, 南京大学环境学院, 江苏南京 210023)

摘 要 【目的】 抗生素抗性细菌(ARB)和抗生素抗性基因(ARGs)的传播和扩散已成为全球公共卫生领域的一大挑战,其中因水环境具有流动性和广泛性,成为抗生素耐药性(AMR)传播的重要媒介,因此对其中细菌 AMR 的检测显得尤为关键。文章旨在探讨水环境中细菌 AMR 的检测方法,以期为未来的研究方向提供指导。【方法】 文章介绍了包括基于传统培养的药敏试验法、基于聚合酶链式反应(PCR)的分子生物学、基于高通量测序的宏基因组学 3 种检测水环境细菌 AMR 的主流方法,并阐述了它们的优缺点。还主要介绍了单分子纳米孔测序技术的原理与特点,综述了纳米孔测序技术凭借长读长优势在检测水环境细菌 AMR 的应用进展及存在的问题。【结果】 药敏试验法、分子生物学检测复杂水环境中的 ARB 均存在一定的局限性,而宏基因组学可检测数百种 ARGs,并能直接定位 ARGs 宿主。这其中使用纳米孔测序技术无需组装、分装便能直接得到 ARGs 宿主、遗传位置等丰富的抗生素 ARGs 组信息,但现主要面向生物量大的水环境样本,对饮用水等生物量少的水环境原位分析能力不足。【结论】 可使用多种检测方法全面识别水环境中细菌 AMR 的表型和基因型,需要发展水环境细菌富集和 DNA 提取技术,这方便使用纳米孔测序对更多种类的环境进行抗生素抗性基因组深度识别。

关键词 纳米孔测序技术 水环境 细菌抗生素耐药性 药敏试验 分子生物学 宏基因组学

中图分类号: X52 **文献标志码:** A **文章编号:** 1009-0177(2025)01-0008-09

DOI: 10.15890/j.cnki.jsjs.2025.01.002

Review on Application of Nanopore Sequencing Technology in Determination of Bacteria Antibiotic Resistance in Water Environment

WANG Yujie, HU Yifan, GAO Xinran, SHI Peng*

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of Environment, Nanjing University, Nanjing 210023, China)

Abstract [Objective] The transmission and spread of antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistant genes (ARGs) have become a major challenge in global public health. The water environment is an important vector for the spread of antimicrobial resistance (AMR) due to its mobility and widespread characteristics. Therefore, the detection of bacteria antibiotic resistance in it is particularly critical. This paper aims to explore the detection methods for bacteria AMR in water environments, with the hope of providing guidance for future research directions. [Methods] This paper introduces and contrasts the strengths and weaknesses of three mainstream methods for detecting bacteria antibiotic resistance in water environment, including susceptibility test based on traditional culture, molecular biology based on polymerase chain reaction (PCR), and metagenomics based on high-throughput sequencing. The paper primarily discusses the principles and features of nanopore sequencing technology, and summarizes the advancements as well as problems in its application for detecting bacteria AMR in water environment, which benefits from its capability of generating long reads. [Results] The susceptibility test and molecular biology have limitations in complex water environments.

[收稿日期] 2024-06-07

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(52370013)

[作者简介] 王羽洁(1999—),女,硕士,研究方向为饮用水生物风险识别,E-mail:1062586970@qq.com。

[通信作者] 施鹏,男,副教授,E-mail:shipeng@nju.edu.cn。

However, metagenomics can detect hundreds of ARGs and locate the ARG hosts directly. Furthermore, nanopore sequencing technology can directly obtain rich antibiotic resistome information such as ARG hosts and ARGs locations without the need for assembly or binning. Despite the prowess of nanopore sequencing technology in handling water environment samples with high biomass, it exhibits certain limitations when it comes to in situ analysis of water environments with lower biomass, such as drinking water.

[**Conclusion**] A combination of detection methods can be used to comprehensively identify the phenotype and genotype of bacteria AMR in water environments. The development of efficient bacteria enrichment and DNA extraction techniques for aquatic environments is essential to facilitate in-depth identification of antibiotic resistome in a broader range of environments using nanopore sequencing technology.

Keywords nanopore sequencing technology water environment antimicrobial resistance (AMR) susceptibility test molecular biology metagenomics

细菌抗生素耐药性 (antimicrobial resistance, AMR) 是全球性“人类-动物-环境”健康问题,它依赖于抗生素抗性细菌 (antibiotic resistance bacteria, ARB) 和抗生素抗性基因 (antibiotic resistance genes, ARGs) 的传播扩散,对公众健康构成严重威胁。研究^[1]指出,从 2000 年—2015 年,人均抗生素消耗增加了约 39%,全球抗生素消耗量增加了约 65%。随着全球抗生素消耗量的快速增长,人们逐渐意识到 AMR 问题造成的危害。2015 年,世界卫生组织将 AMR 问题列为 21 世纪人类在健康领域面临的最大挑战之一^[2]。2019 年,AMR 问题直接导致了全球 127 万人死亡,间接导致 495 万人死亡^[3],我国每年因 AMR 问题导致的死亡人数约为 60 万,占全年死亡总人数的 5.58%,其中 14.5 万例死亡可直接归因于 AMR^[4]。研究^[5]预测,在 2050 年 ARB 感染将导致每年 1 000 万人死亡,如果对 AMR 问题不加以控制,每 3 s 就会有 1 人因此而死亡,是引起全球死亡的首要原因。

水环境是 AMR 传播的关键节点,它具有较高流动性和较大生物量。例如城市污水、医疗废水等水环境因接收高浓度的机会病原菌、抗生素及其他可能诱导 AMR 的化学物质,而加速 AMR 在污水中的传播^[6]。此外,研究^[7]表明,我国介水传染病病例虽然有所下降,但仍是传染病的主要组成部分,占比约为 22%。在美国,每年约发生 715 万例介水传染病,占比约为 21.3%,导致 60.1 万人急诊、6 630 人死亡、23.9 亿美元的损失^[8]。目前,已有大量研究^[9-11]对污水处理厂各工艺段、水厂各工艺段、饮用水等环境中 ARGs 的赋存特点进行了归纳总结。然而,需要指出的是,仅依据 ARGs 的种类和丰度来评估 AMR 传播和扩散的风险是不全面的,进一步追

溯 ARB 可以更准确地识别潜在风险,因为 ARGs 的宿主为病原菌,会极大提高感染人类的可能性。2019 年,仅耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌就直接导致了 12.1 万人死亡,如果致病菌对氟喹诺酮类和碳青霉烯类抗生素产生抗性,也更易致使人感染,因为这 2 种抗生素耐药问题直接导致了超过 70% 死亡案例^[3,12]。随着检测技术的不断发展,对 ARGs 识别定量、ARB 的判定方法也在不断升级,文章总结对比了 ARB 的 3 种主流检测方法,并主要介绍纳米孔测序技术的原理及其在水环境中检测细菌 AMR 的研究进展,以期为水环境中细菌 AMR 的检测提供方法支撑。

1 水环境中细菌 AMR 检测方法

1.1 药敏试验

药敏试验虽然是判断 ARB 的“金标准”,但在面对复杂的真实水体时,局限性较大。抗生素药敏试验是通过对比目标细菌在含有抗生素的肉汤或者平板上的最低抑菌浓度与标准限值来判断该细菌是否为 ARB,该方法主要面向临床上的病原菌^[13-14]。应用于水环境中时,该方法主要有 2 个缺点:其一,该方法只面向可培养细菌,而水环境中存在大量的活的但不可培养的细菌^[15],这些细菌是否携带 ARGs 就无法用该手段判断;其二,该方法需要有明确的标准进行参考。所以在获得水环境的可培养细菌后,必须有其他手段辅助来确定该菌株种类,才能衡量该菌株的抗生素抗性强弱,操作较为繁琐^[16]。最后,只有少数抗生素与细菌种属的组合有耐药性参考值,面对真实水体中多种细菌,可能出现没有参考标准的情况^[17-18]。研究^[19]指出,从水环境中分离出的 162 个细菌中,只有 13 个可以使用药敏试验判断细菌的抗生素抗性。

1.2 分子生物学

通过分子生物学来检测细菌 AMR 主要有 2 种途径:一是从水环境分离得到单菌后,基于聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 得到该单菌的物种及其上的 ARGs 种类;二是直接得到富集后水环境样品的 ARGs 种类丰度与物种信息,再使用相关性分析手段去判定 ARB。前者主要可以确定 ARB 的抗生素抗性来源,比如 *mecA* 可使金黄色葡萄球菌对甲氧西林产生耐药性,*bla_{SHV}* 可使肠杆菌科细菌对 β -内酰胺类抗生素产生耐药性,*vanA* 可使肠球菌对万古霉素产生耐药性^[20-22]。后者则是对环境样品脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 直接进行分析,一般对多种 ARGs 同时定量,再使用 16S rRNA 基因测序或者仍基于 PCR 得到病原菌丰度,最后用相关性分析判定 ARB,这种基于斯皮尔曼 (Spearman) 相关性分析确定的假定关系来检测细菌抗生素耐药性结果存在较高的假阳性,因为该关系可能是间接或由其他未知变量介导,所以表现出了较强的相关性^[9,23]。

除了 ARB 的判定,该方法在检测 ARGs 种类丰度上相较药敏试验有较大优势,可检测近 300 种已知的 ARGs,已在多种环境中得到广泛应用^[24-25]。但是该方法必须有目标基因的特异性引物,在检测未知或新型 ARGs 方面还存在局限性^[26]。除此之外,如果水环境中存在过量 DNA 或 PCR 抑制剂,就会降低扩增效率,从而导致定量不准确^[27]。

1.3 宏基因组学

相较于有引物限制的分子生物学方法,基于高通量测序的宏基因组学方法已成为一种被普遍接受的 ARGs 广谱定量检测方法。该方法打破了基于传统培养方法的局限性,补充了基于 PCR 方法的相关性分析不确定的空白,可以快速检测数百种 ARGs,同时还能直接定位 ARGs 的细菌宿主。

目前主要的测序技术主要有以桑格 (Sanger) 测序为代表的一代测序技术,因美纳 (Illumina) 测序为代表的二代测序技术,以及纳米孔测序为代表的三代测序技术。Sanger 测序准确度最高,但通量最低,一般适用于有限长度 DNA 的碱基识别,在对细菌的研究中,多用于确定突变位点^[28]。Illumina 测序通量有所增大,可针对大规模采样,是目前最常用的测序方法。该测序技术主要生成错误率仅在 0.1% 的高精度短读序列^[29]。报道^[30]显示,同时能检测 32

类共 2 842 种 ARG 亚型。研究^[31-32]对全球 25 个地点的自来水进行采样分析,共检出 16 类共 181 种 ARG 亚型,发现 21 个样品中的 ARGs 相对丰度高于沉积物和土壤中的丰度,其中杆菌肽类、多药类、磺胺类、 β -内酰胺和氨基糖苷类 ARGs 在自来水中检出频次更高。Illumina 测序对 ARGs 种类识别和丰度定量方法已十分成熟,也得到了广泛应用。但是 Illumina 测序不能直接判定 ARGs 宿主,要通过对生成的 100~300 bp 的短读序列进行组装、分箱,得到连续性更好、完整度更高的重叠群或者宏基因组组装基因组才能获得物种信息^[33-34]。研究^[35-36]发现,假单胞菌属可能是造成自来水中 ARGs 增殖和传播的最重要菌属之一,但通过组装或分箱来确定 ARB,其宿主的识别率较低,如研究^[37]在对饮用水水库采样后进行物种注释,发现 22.2% 的重叠群在门水平无法被识别。除此之外,由于该方法仍是以 PCR 为基础进行建库,因此会存在碱基错配的情况,从而引入系统偏差^[38]。另外,该方法在建库过程中会对中等 GC 含量的序列有偏好性,所以会出现以偏概全的问题^[39]。而单分子纳米孔测序技术可以直接生成长序列,能弥补二代测序技术的不足,是测序技术新的发展方向,也促进了环境微生物的组学相关研究的发展^[40]。

2 纳米孔测序技术简介

与 Illumina 测序技术不同,纳米孔测序技术建库时无需进行 PCR 扩增,理论上可以测定不限长度的序列。此外,得益于其便携性和实时性的特点,该技术在宏基因组学中得到了快速应用。

2.1 纳米孔测序的原理

虽然纳米孔测序原理的设想在 20 世纪 80 年代就已被提出,但直到 2014 年, Oxford Nanopore Technologies 公司才推出第一台以该原理为基础的 MinION 测序仪,从此纳米孔测序技术迈入商业化^[41]。该方法测序的主体部分为多聚物膜上的跨膜蛋白、锚定蛋白、马达蛋白,当 DNA 双链靠近该主体部位时,锚定蛋白固定住一个 DNA 双链分子,马达蛋白则使双链 DNA 解开螺旋,并提供通过跨膜蛋白的动力。在膜两侧施加不一样的电位,不同碱基流动过跨膜蛋白产生的不同电流信号,通过捕捉每 5 个碱基流过产生的电信号,最后将识别形成的频谱还原为读数完成测序^[42]。自 2014 年以来,该公

司不断升级跨膜蛋白和马达蛋白,已发布了 8 个版本的芯片,以及 5 款纳米孔测序仪^[43]。

2.2 纳米孔测序特点

纳米孔测序最大的优势便是可以直接生成序列,其余对比如表 1^[44]所示。虽然 Illumina 测序技术是目前的主流测序手段,但因其只产生短读长的局限性,即使使用组装手段形成重叠群,也会出现结果的高度碎片化^[38]。与之相反,有研究^[45]利用纳米孔测序技术得到了平均测序读长为 23.8 kbp 的基因组,另有研究^[46]得到了 2 273 kbp 的超长序列。这说明在不引进系统偏差时,纳米孔测序产出了与 Illumina 重叠群长度相当的序列,无需进一步组装或

者分箱,直接满足了环境微生物组学相关分析的要求。但值得注意的是,纳米孔测序技术的生成序列错误率相对 Illumina 测序较高,然而随着产品的更新迭代,两者之间的差距越来越小。Oxford Nanopore Technologies 公司不断更新跨膜蛋白、马达蛋白来升级测序芯片以达到提高准确度的目的。研究^[47-48]表明,使用最新版本的 R10.4 芯片进行测序时,序列的准确性可达 99%,无需其他测序手段的帮助,经组装后可获得接近完整的微生物基因组。此外,也有研究人员^[49-51]不断推出新的生物信息分析手段来对长序列或者由长序列生成的重叠群进行校正纠错,常见的手段有 Racon、Polypolish 以及 Pilon 等。

表 1 Illumina 与纳米孔测序技术优缺点

Tab. 1 Advantages and Disadvantages of Illumina and Nanopore Sequencing Technology

优/缺点	Illumina 测序技术	纳米孔测序技术
优点	商业测序便宜,群落覆盖度高	测序仪价格低廉,快速得到测序结果
	建库 DNA 浓度要求低	可定制测序模式,测序场景更多样
	高正确率的短序列	没有系统偏差
	组装得到的重叠群正确率高	长序列的分析优势,有更连续的组装结果
	各种成熟的生物信息学工具	更容易区分相近物种
缺点	测序仪价格高昂	相对昂贵的商业测序服务,群落覆盖度不足
	测序结果等待时间长	建库 DNA 浓度和质量有严格要求
	PCR 步骤引入的系统偏差	相对高错误率的长序列
	难以开展精确的菌株区分	缺少生物信息学分析工具

3 纳米孔测序检测水环境中抗生素抗性基因组应用进展

目前,纳米孔测序多应用于临床环境或者经传统培养后得到的单菌,这主要是纳米孔测序为单分子测序技术之一,不经历 DNA 扩增步骤,所以对样品 DNA 的要求更为严格。研究^[52]发现,纳米孔测序建库需要总量不低于 1 000 ng、质量浓度不低于 20 ng/ μ L 的 DNA,远远高于 Illumina 的质控要求,这无疑对真实环境微生物组研究提出了挑战,特别是对于那些原位采样生物量较少的水体环境,若以自来水中菌落总数的 DNA 当量估算,需富集 260~52 000 L 水样^[53],操作难度显著增加,迫切需要高效的水样富集装置。

“ARGs 组”这一概念首次于 2006 年提出,先指包括病原菌在内的细菌以及抗生素生产者中循环的所有 ARGs 的集合^[54-55]。利用宏基因组学技术,以 ARGs 组为支撑,研究人员逐渐揭示了 AMR

的关键信息。目前经过大量研究^[56-58]发现,ARGs 组在人类、动物、环境微生物组中无处不在,且 ARGs 起源于环境抗性基因组并在此富集^[59]。可移动遗传元件(mobile genetic elements, MGEs)是导致 ARGs 在人类、动物和环境中流动的罪魁祸首^[60]。纳米孔测序在水环境 ARGs 组的应用如图 1 所示。一般通过对真实水体进行富集浓缩或者抗性培养得到 DNA 样品进行测序。数据分析时主要有 2 种策略:一是以纳米孔测序长序列为主;二是对长序列组装得到的重叠群进行分析。最后在评估 ARGs 组组成时,不仅要分析 ARGs 的种类丰度和环境宿主,还要确定 ARGs 的遗传位置以判断 ARGs 的移动能力,若其位于质粒上,则有更高的概率进行水平基因转移至其他不同的菌属上;还要确定与 MGEs、毒力因子(virulence factors, VFs)等风险基因的物理连接情况,以此全面识别环境 ARGs 组风险。

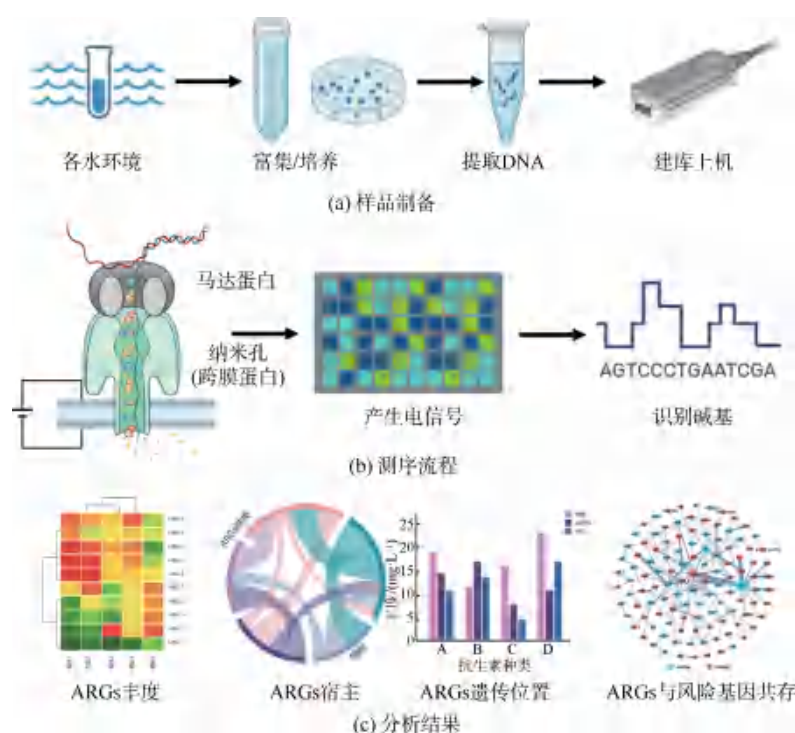


图1 纳米孔测序技术在水环境中的应用

Fig. 1 Application of Nanopore Sequencing Technology in Water Environment

3.1 基于重叠群的分析

重叠群是指经组装软件将质控后测序序列拼接为首尾相连的更长序列,对纳米孔测序生成的长序列来说,一般仅有输入长序列的长读组装以及结合 Illumina 数据的长短读混合组装 2 种手段^[61-64]。在对水环境的重叠群进行 ARGs 组分析时,主要针对已富集培养后得到的单菌体系或微生物群落,这种分析策略可以从基因组的高度上来评估其抗生素抗性风险。只有得到连续性更好的重叠群,才会得到从头组装的完整或近完整基因组,从而可以更好地回答“谁在哪里做什么”这个宏基因组学本质问题^[65-66]。研究者们^[67-68]首先在污水处理厂进出水中进行多重耐药菌的筛选,经单菌富集后通过长短读混合组装方法 Unicycler 重建完整基因组,发现了质粒是污水处理厂中多重耐药的主要来源,以及插入序列在 ARGs 的水平基因转移中发挥重要作用。研究者们^[63,69]通过将样品置于含有抗生素的肉汤中培养,经纳米孔测序后使用 metaFlye 组装,得到重叠群,发现位于质粒和整合性结合元件上的 ARGs 可以在系统发育距离较远的细菌种间进行水平基因转移。Peter 等^[70]通过对医院环境中分离鉴别得到的单菌进行长短读混合组装,得到的从头组装细菌

基因组后,发现了一个多重耐药质粒在铜绿假单胞菌、弗氏柠檬酸杆菌、克罗那柠檬酸杆菌间进行水平基因转移。由此可见,通过培养方法得到 ARB,进行纳米孔测序,经组装后获取几乎完整的序列,这种手段主要分析 ARGs 是否位于可以横跨不同菌属的质粒上,是否有在不同种类病原菌间进行水平基因转移的能力。

3.2 基于长序列的分析

直接使用纳米孔长序列对 ARGs 组进行分析,可以得到更全面更丰富的信息。用长序列进行 ARGs 鉴定、物种识别等分析,可以避免部分数据的丢失,因为一些低覆盖率序列在组装时会直接被抛弃^[71]。在面对复杂的水环境样品时,由于群落覆盖度不足,很多长序列难以被组装,这些未被保留的长序列其实同 Illumina 短序列组装得到的重叠群长度差不多,本身就可以提供 ARGs 组学的组成信息,并且更加强调了群落的功能多样性^[44]。研究^[72]表明,比重叠群,纳米孔长序列的物种谱扩大了 40%。

自纳米孔测序技术商业化以来,已有多个研究直接利用长序列对如污水厂进水或活性污泥等水环境样品中的细菌 AMR 进行了检测。Bialasek 等^[73]

用纳米孔测序长序列在斯德哥尔摩的雨水中鉴定到了 11 类共 26 种 ARG 亚型,共计 37 个 ARB,其中包括产碱杆菌科鲍特氏菌、贪婪丙酸杆菌等机会病原菌。Wu 等^[74]对接收污水处理厂的水体进行 ARB 分析,发现 Illumina 组装后仅得到 18 个含 ARGs 的重叠群,但基于纳米孔测序长序列可以得到 380 个含 ARGs 的长序列,并且其宿主组成与培养基因组的高度一致,均显示大肠杆菌和克雷伯菌是该水体中主要的 ARB。Yang 等^[75]还通过在提取 DNA 前加内标的方法实现了对污水处理厂进出水中病原菌和 ARGs 绝对定量。Dai 等^[6]通过采集污水厂进水和活性污泥中样品进行纳米孔测序,通过对 ARGs 的遗传位置、ARGs 与 MGEs 的共定位分析,发现活性污泥中位于质粒上的 ARGs 丰度有所下降。另一方面,即使抗性组组成发生了显著变化,染色体上的 ARGs 宿主门类却保持相对一致,这说明在活性污泥法中垂直基因转移是 ARGs 传播的关键途径。可以看出,直接使用纳米孔长序列分析时,由于保留了更丰富的基因组数据,落脚点会更偏向 ARB 的组成分析,但仍可以分析 ARGs 的移动潜能以及与风险基因的共存情况,以充实水样中 ARGs 组的组成信息。

4 总结与展望

(1) 药敏试验法、分子生物学、宏基因组学等方法均可检测各类水环境的细菌 AMR 情况,可以根据研究目的与各方法的优缺点进行选择。总体来说,如要全面识别细菌 AMR 表型和基因型情况,则需结合多种检测方法。

(2) 近年来使用纳米孔测序技术检测水环境样品中的 ARGs 组研究逐渐增多,不仅能得到 ARGs 的丰度信息,还可以追溯其宿主与遗传位置,确定与其他风险因子的共存情况,丰富了细菌 AMR 的识别结果。

(3) 目前使用纳米孔测序技术主要集中在培养基因组或者如污水厂进水、活性污泥等生物量大的点位中,缺乏对如饮用水这种生物量少但与人类密切接触的环境水样品的原位分析。所以亟须高效的细菌富集浓缩装置,以及建立适用于纳米孔测序的水环境样品总 DNA 无损提取方法,以便在纳米孔测序技术的支持下,对更多类型的水环境进行深入的 AMR 识别。

参考文献

- [1] KLEIN E Y, VAN T P, MARTINEZ E M, et al. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015 [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115 (15): 3463–3470.
- [2] SALAM M A, ALAMIN M Y, SALAM M T, et al. Antimicrobial resistance: A growing serious threat for global public health [J]. *Healthcare*, 2023, 11 (13): 1946. DOI: 10.3390/healthcare11131946.
- [3] MURRAY C J L, IKUTA K S, SHARARA F, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis [J]. *Lancet*, 2022, 399 (10325): 629–655.
- [4] ZHANG C, FU X, LIU Y, et al. Burden of infectious diseases and bacterial antimicrobial resistance in China: A systematic analysis for the global burden of disease study 2019 [J]. *The Lancet Regional Health Western Pacific*, 2024, 43: 100972. DOI: 10.1016/j.lanwpc.2023.100972.
- [5] 张彤, 李炳. 水环境中抗生素耐药性的科学研究前沿、环境健康风险评估和控制阻断策略 [J]. *科学通报*, 2020, 65 (24): 2543–2554.
ZHANG T, LI B. Antibiotic resistance in water environment: Frontiers of fundamental research, risk assessment and control strategies [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2020, 65 (24): 2543–2554.
- [6] DAI D J, BROWN C, BÜRGEMANN H, et al. Long-read metagenomic sequencing reveals shifts in associations of antibiotic resistance genes with mobile genetic elements from sewage to activated sludge [J]. *Microbiome*, 2022, 10: 20. DOI: 10.1186/s40168-021-01216-5.
- [7] 白雪涛, 曹兆进. 健康中国所面临的主要环境卫生问题 [C]//河北省环境科学学会环境与健康论坛暨 2008 年学术年会, 石家庄: 河北科学技术出版社, 2008: 1–21.
BAI X T, CAO Z J. The main environmental health issues faced by healthy China [C]//Hebei Provincial Environmental Science Society Environmental and Health Forum and 2008 Annual Academic Conference, Shijiazhuang: Hebei Science and Technology Press, 2008: 1–21.
- [8] COLLIER S A, DENG L, ADAM E A, et al. Estimate of burden and direct healthcare cost of infectious waterborne disease in the United States [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2021, 27 (1): 140–149.
- [9] ZHANG K, XIN R, ZHAO Z, et al. Antibiotic resistance genes in drinking water of China: Occurrence, distribution and influencing factors [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 188: 109837. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109837.
- [10] 张冰, 赵琳, 陈坦. 城市污水处理厂抗生素抗性基因研究进展 [J]. *环境工程技术学报*, 2023, 13 (4): 1384–1394.

- ZHANG B, ZHAO L, CHEN T. Research progress of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plants[J]. *Journal of Environmental Engineering Technology*, 2023, 13(4): 1384–1394.
- [11] AMARASIRI M, SANO D, SUZUKI S. Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: Current knowledge and questions to be answered[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2020, 50(19): 2016–2059.
- [12] KRAKER M E A, LIPSITCH M. Burden of antimicrobial resistance: Compared to what? [J]. *Epidemiologic Reviews*, 2021, 43(1): 53–64.
- [13] KARKMAN A, DO T T, WALSH F, et al. Antibiotic-resistance genes in waste water[J]. *Trends in Microbiology*, 2018, 26(3): 220–228.
- [14] WIEGAND I, HILPERT K, HANCOCK R E W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances[J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(2): 163–175.
- [15] LIU J Y, YANG L, KJELLERUP B V, et al. Viable but nonculturable (VBNC) state, an underestimated and controversial microbial survival strategy [J]. *Trends in Microbiology*, 2023, 31(10): 1013–1023.
- [16] WALSH F, DUFFY B. The culturable soil antibiotic resistome: A community of multi-drug resistant bacteria[J]. *Plos One*, 2013, 8(6): 65567. DOI: 10.1371/journal.pone.0065567.
- [17] RUDKJOBING V B, THOMSEN T R, XU Y J, et al. Comparing culture and molecular methods for the identification of microorganisms involved in necrotizing soft tissue infections[J]. *Bmc Infectious Diseases*, 2016, 16: 652. DOI: 10.1186/s12879-016-1976-2.
- [18] WOLFE A J, TOH E, SHIBATA N, et al. Evidence of uncultivated bacteria in the adult female bladder[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50(4): 1376–1383.
- [19] HAYWARD C, ROSS K E, BROWN M H, et al. The presence of opportunistic premise plumbing pathogens in residential buildings: A literature review[J]. *Water*, 2022, 14(7): 1129. DOI: 10.3390/w14071129.
- [20] GHIDÁN A, JENEY C, MARÓDI C L, et al. PCR detection of the *vanA* gene in a vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* clinical isolate from Hungary [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2000, 46(2): 325–327.
- [21] NAIR D, SHASHINDRAN N, KUMAR A, et al. Comparison of phenotypic MRSA detection methods with PCR for gene in the background of emergence of oxacillin-susceptible mrsa [J]. *Microbial Drug Resistance*, 2021, 27(9): 1190–1194.
- [22] ZORBOZAN H, KIMIRAN A. Detection of beta-lactam antibiotic resistance in aquatic Enterobacteriaceae isolates [J]. *Water Supply*, 2022, 22(12): 8557–8571.
- [23] ZHANG W H, SUYAMUD B, LOHWACHARIN J, et al. Large-scale pattern of resistance genes and bacterial community in the tap water along the middle and low reaches of the Yangtze River [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 208: 111517. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111517.
- [24] MILOBEDZKA A, FERREIRA C, VAZ-MOREIRA I, et al. 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: 127407. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.127407.
- [25] ZHU Y G, JOHNSON T A, SU J Q, 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.
- [26] ROHDE A, HAMMERL J A, BOONE I, et al. Overview of validated alternative methods for the detection of foodborne bacterial pathogens[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2017, 62: 113–118. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.02.006.
- [27] MANAIA C M, ROCHA J, SCACCIA N, et al. Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box [J]. *Environment International*, 2018, 115: 312–324. DOI: 10.1016/j.envint.2018.03.044.
- [28] 陈莉, 郑耿东, 周广彪, 等. 高通量测序技术在海关监管中的应用概述[J]. *质量安全与检验检测*, 2023, 33(6): 61–66.
- CHEN L, ZHENG G D, ZHOU G B, et al. Prospects of high-throughput sequencing technology in customs supervision [J]. *Quality Safety Inspection and Testing*, 2023, 33(6): 61–66.
- [29] YEE R, SIMNER P J. Next-generation sequencing approaches to predicting antimicrobial susceptibility testing results[J]. *Clinics in Laboratory Medicine*, 2022, 42(4): 557–572.
- [30] YIN X, ZHENG X, LI L, et al. ARGs-OAP v3.0: Antibiotic-resistance gene database curation and analysis pipeline optimization[J]. *Engineering*, 2022, 27: 234–241. DOI: 10.1016/j.eng.2022.10.011.
- [31] MA L P, LI B, JIANG X T, et al. Catalogue of antibiotic resistome and host-tracking in drinking water deciphered by a large scale survey[J]. *Microbiome*, 2017, 5: 154. DOI: 10.1186/s40168-017-0369-0.
- [32] JIA S Y, BIAN K Q, SHI P, et al. Metagenomic profiling of antibiotic resistance genes and their associations with bacterial community during multiple disinfection regimes in a full-scale drinking water treatment plant [J]. *Water Research*, 2020, 176: 115721. DOI: 10.1016/j.watres.2020.115721.
- [33] BOOLCHANDANI M, D'SOUZA A W, DANTAS G. Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2019, 20(6): 356–370.
- [34] HARRIS Z N, DHUNGEL E, MOSIOR M, et al. Massive

- metagenomic data analysis using abundance-based machine learning[J]. *Biology Direct*, 2019, 14: 12. DOI: 10.1186/s13062-019-0242-0.
- [35] CHOWDHURY P R, SCOTT M J, DJORDJEVIC S P. Genomic islands 1 and 2 carry multiple antibiotic resistance genes in *Pseudomonas aeruginosa* ST235, ST253, ST111 and ST175 and are globally dispersed [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2017, 72(2): 620-622.
- [36] SU H C, LIU Y S, PAN C G, et al. Persistence of antibiotic resistance genes and bacterial community changes in drinking water treatment system: From drinking water source to tap water [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 616/617: 453-461. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.318.
- [37] DANG C Y, XIA Y, ZHENG M S, et al. Metagenomic insights into the profile of antibiotic resistomes in a large drinking water reservoir [J]. *Environment International*, 2020, 136: 105449. DOI: 10.1016/j.envint.2019.105449.
- [38] 雷文龙, 雷思茹, 陈帅. 纳米孔测序技术在基因组学中的应用研究进展 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2023, 42(3): 233-241.
- LEI W L, LEI S R, CHEN S. Advances in application of nanopore sequencing technology in genomics [J]. *Genomics and Applied Biology*, 2023, 42(3): 233-241.
- [39] TILAK M K, BOTERO-CASTRO F, GALTIER N, et al. Illumina library preparation for sequencing the GC-rich fraction of heterogeneous genomic DNA [J]. *Genome Biology and Evolution*, 2018, 10(2): 616-622.
- [40] 王东帅, 师丹阳, 金敏. 纳米孔测序技术在微生物基因组学研究中的应用 [J]. *解放军预防医学杂志*, 2021, 39(1): 106-109.
- WANG D S, SHI D Y, JIN M. Application of nanopore sequencing technology in microbial genomics research [J]. *Journal of Preventive Medicine of Chinese People's Liberation Army*, 2021, 39(1): 106-109.
- [41] DEAMER D, AKESON M, BRANTON D. Three decades of nanopore sequencing [J]. *Nature Biotechnology*, 2016, 34(5): 518-524.
- [42] ZHENG P J, ZHOU C T, DING Y M, et al. Nanopore sequencing technology and its applications [J]. *Medcomm*, 2023, 4(4): 316-316.
- [43] WANG Y H, ZHAO Y, BOLLAS A, et al. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications [J]. *Nature Biotechnology*, 2021, 39(11): 1348-1365.
- [44] XIA Y, LI X, WU Z Q, et al. Strategies and tools in illumina and nanopore-integrated metagenomic analysis of microbiome data [J]. *Imeta*, 2023, 2(1): e72. DOI: 10.1002/imt2.72.
- [45] DESCHAMPS S, ZHANG Y, LLACA V, et al. A chromosome-scale assembly of the sorghum genome using nanopore sequencing and optical mapping [J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 4844. DOI: 10.1038/s41467-018-07271-1.
- [46] PAYNE A, HOLMES N, RAKYAN V, et al. BulkVis: A graphical viewer for Oxford nanopore bulk FAST5 files [J]. *Bioinformatics*, 2019, 35(13): 2193-2198.
- [47] ZHANG T Y, LI H Z, MA S L, et al. The newest Oxford nanopore R10.4.1 full-length 16S rRNA sequencing enables the accurate resolution of species-level microbial community profiling [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2023, 89: 0060523-23. DOI: 10.1128/aem.00605-23.
- [48] SEREIKKA M, KIRKEGAARD R H, KARST S M, et al. Oxford nanopore R10.4 long-read sequencing enables the generation of near-finished bacterial genomes from pure cultures and metagenomes without short-read or reference polishing [J]. *Nature Methods*, 2022, 19(7): 823-826.
- [49] WICK R R, HOLT K E. Polypolish: Short-read polishing of long-read bacterial genome assemblies [J]. *PLOS Computational Biology*, 2022, 18(1): 1009802. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1009802.
- [50] VASER R, SOVIĆ I, NAGARAJAN N, et al. Fast and accurate de novo genome assembly from long uncorrected reads [J]. *Genome Research*, 2017, 27(5): 737-746.
- [51] WALKER B J, ABEEL T, SHEA T, et al. Pilon: An integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement [J]. *Plos One*, 2014, 9(11): e112963. DOI: 10.1371/journal.pone.0112963.
- [52] MAGHINI D G, MOSS E L, VANCE S E, et al. Improved high-molecular-weight DNA extraction, nanopore sequencing and metagenomic assembly from the human gut microbiome [J]. *Nature Protocols*, 2021, 16(1): 458-471.
- [53] BIAN K Q, WANG C, JIA S Y, et al. Spatial dynamics of bacterial community in chlorinated drinking water distribution systems supplied with two treatment plants: An integral study of free-living and particle-associated bacteria [J]. *Environment International*, 2021, 154: 106552. DOI: 10.1016/j.envint.2021.106552.
- [54] WRIGHT G D. The antibiotic resistome [J]. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2010, 5(8): 779-788.
- [55] D'COSTA V M, MCGRANN K M, HUGHES D W, et al. Sampling the antibiotic resistome [J]. *Science*, 2006, 311(5759): 374-377.
- [56] D'COSTA V M, KING C E, KALAN L, et al. Antibiotic resistance is ancient [J]. *Nature*, 2011, 477(7365): 457-461.
- [57] FORSBERG K J, REYES A, BIN W, et al. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens [J]. *Science*, 2012, 337(6098): 1107-1111.
- [58] HU Y F, GAO G F, ZHU B L. The antibiotic resistome: Gene flow in environments, animals and human beings [J]. *Frontiers of Medicine*, 2017, 11(2): 161-168.

(下转第134页)

效沉淀池分步投加除氟剂,并将除氟污泥回流到系统前端,可使出水氟离子保持稳定,并有效降低投药量。

(4)通过物化工艺调试,氟离子能够稳定达到地表Ⅳ类水质标准(1.5 mg/L),同时也使 COD_{Cr} 等其他指标稳定达标。

参考文献

- [1] 金月清, 曾旭. 两级沉淀法处理液晶面板生产中含氟废水的研究[J]. 中国给水排水, 2019, 35(21): 109-112.
JIN Y Q, ZENG X. Treatment of fluoride wastewater in liquid crystal panel production by two-stage precipitation method [J]. China Water & Wastewater, 2019, 35(21): 109-112.
- [2] 余琴芳, 镇祥华, 邹磊, 等. 含氟工业废水深度处理工艺方案[J]. 净水技术, 2020, 39(5): 140-146.
YU Q F, ZHEN X H, ZOU L, et al. Solutions of advanced treatment process for industrial fluoride wastewater [J]. Water

Purification Technology, 2020, 39(5): 140-146.

- [3] 王小兵, 曾佳玮, 汤钟. 高出水标准要求下高含氟工业废水处理实践[J]. 中国给水排水, 2022, 38(10): 83-89.
WANG X B, ZENG J W, TANG Z. Practice of high fluorine industrial wastewater treatment under the requirement of high effluent standard [J]. China Water & Wastewater, 2022, 38(10): 83-89.
- [4] 冯丽霞, 牟洁, 魏铮, 等. 集成技术处理光伏行业生产废水工程实例[J]. 工业水处理, 2020, 40(5): 118-121.
FENG L X, MOU J, WEI Z, et al. A project example on integrated technology for production wastewater treatment of photovoltaic industry [J]. Industrial Water Treatment, 2020, 40(5): 118-121.
- [5] 顾晨晨. 改性除氟剂对含氟废水深度处理方案优化[J]. 山东化工, 2021, 50(20): 274-278.
GU C C. Optimization of fluorine-containing wastewater treatment [J]. Shandong Chemical Industry, 2021, 50(20): 274-278.

(上接第15页)

- [59] FINLEY R L, COLLIGNON P, LARSSON D G J, et al. The scourge of antibiotic resistance: The important role of the environment [J]. Clinical Infectious Diseases, 2013, 57(5): 704-710.
- [60] PERRY J A, WRIGHT G D. The antibiotic resistance "mobilome": Searching for the link between environment and clinic [J]. Frontiers in Microbiology, 2013, 4: 138. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00138.
- [61] ANTIPOV D, KOROBEYNIKOV A, MCLEAN J S, et al. Hybridspades: An algorithm for hybrid assembly of short and long reads [J]. Bioinformatics, 2016, 32(7): 1009-1015.
- [62] BERTRAND D, SHAW J, KALATHIYAPPAN M, et al. Hybrid metagenomic assembly enables high-resolution analysis of resistance determinants and mobile elements in human microbiomes [J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(8): 937-944.
- [63] KOLMOGOROV M, BICKHART D M, BEHSAZ B, et al. MetaFlye: Scalable long-read metagenome assembly using repeat graphs [J]. Nature Methods, 2020, 17(11): 1103-1110.
- [64] VASER R, SIKIC M. Time- and memory-efficient genome assembly with Raven [J]. Nature Computational Science, 2021, 1(5): 332-336.
- [65] MOSS E L, MAGHINI D G, BHATT A S. Complete, closed bacterial genomes from microbiomes using nanopore sequencing [J]. Nature Biotechnology, 2020, 38(6): 701-709.
- [66] KAFETZOPOULOU L E, EFTHYMIADIS K, LEWANDOWSKI K, et al. Assessment of metagenomic nanopore and illumina sequencing for recovering whole genome sequences of chikungunya and dengue viruses directly from clinical samples [J]. Eurosurveillance, 2018, 23(50): 18-30.
- [67] CHE Y, XU X Q, YANG Y, et al. High-resolution genomic surveillance elucidates a multilayered hierarchical transfer of resistance between WWTP and human/animal-associated bacteria [J]. Microbiome, 2022, 10: 16. DOI: 10.1186/s40168-021-01192-w.
- [68] WICK R R, JUDD L M, GORRIE C L, et al. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads [J]. Plos Computational Biology, 2017, 13(6): e1005595. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005595.
- [69] QIAN X, GUNTURU S, SUN W, et al. Long-read sequencing revealed cooccurrence, host range, and potential mobility of antibiotic resistome in cow feces [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2021, 118(25): e2024464118. DOI: 10.1073/pnas.2024464118.
- [70] PETER S, BOSIO M, GROSS C, et al. Tracking of antibiotic resistance transfer and rapid plasmid evolution in a hospital setting by nanopore sequencing [J]. Msphere, 2020, 5(4): e00525-20. DOI: 10.1128/mSphere.00525-20.
- [71] LIU L, WANG Y L, CHE Y, et al. High-quality bacterial genomes of a partial-nitritation/anammox system by an iterative hybrid assembly method [J]. Microbiome, 2020, 8: 155. DOI: 10.1186/s40168-020-00937-3.
- [72] DANG C, WU Z, ZHANG M, et al. Microorganisms as bio-filters to mitigate greenhouse gas emissions from high-altitude permafrost revealed by nanopore-based metagenomics [J]. Imeta, 2022, 1(2): e24. DOI: 10.1002/imt2.24.
- [73] BIALASEK M, MILOBEDZKA A. Revealing antimicrobial resistance in stormwater with MinION [J]. Chemosphere, 2020, 258: 127392. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.127392.
- [74] WU Z, CHE Y, DANG C, et al. Nanopore-based long-read metagenomics uncover the resistome intrusion by antibiotic resistant bacteria from treated wastewater in receiving water body [J]. Water Research, 2022, 226: 119282. DOI: 10.1016/j.watres.2022.119282.
- [75] YANG Y, CHE Y, LIU L, et al. Rapid absolute quantification of pathogens and ARGs by nanopore sequencing [J]. Science of the Total Environment, 2022, 809: 152190. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.152190.