
分类号_____

密级_____

UDC _____

编号_____

中国科学院地球化学研究所
博士后研究工作报告

煤矿酸性废水抗性组特征的宏基因组研究

黄强

工作完成日期: 2020年12月—2023年05月

报告提交日期: 2023年05月

中国科学院地球化学研究所

2023年05月

煤矿酸性废水抗性组特征的宏基因组研究

**resistome characteristics analysis of coal source AMD by
metagenomic techniques**

博士后姓名	黄强
流动站（一级学科）名称	环境科学与工程
专业（二级学科）名称	环境科学
合作导师	郝立凯

研究工作起始时间： 2020 年 12 月

研究工作期满时间： 2023 年 05 月

中国科学院地球化学研究所

2023 年 05 月

摘要

近期的一项针对全球范围的研究发现矿物开采产生的酸性废水(AMD, acid mine drainage)拥有以多药(multidrug)耐药基因占据主导地位的抗生素抗性组(antibiotic resistome)特征,且其丰度与城市污水厂相似但是高于淡水沉积物环境。这些发现引起人们的担心:矿物开采可能增加抗生素抗性基因(ARGs, antibiotic resistance genes)环境扩散风险。该研究以典型金属矿为研究对象,而忽略了煤矿这种富含各种金属的非典型金属矿。鉴于煤矿是世界上最主要的能源资源之一,开采量巨大,研究煤矿酸性废水的抗性组特征及其对土壤抗性组的影响,能帮助人们更全面认识采矿环境抗生素抗性组特征及其扩散风险。

针对以上问题,首先,我们使用高通量宏基因组测序分析了一个煤矿 AMD 处理系统的抗性组特征。结果显示 multidrug 基因占据抗生素抗性组的主体,同时重金属抗性组(heavy metal(loid) resistome)多样性更高,主要抗性种类包括汞(mercury-),铁(iron-),和砷(arsenic-)。相关性分析显示移动元件(MGEs, mobile gene elements)对重金属抗性基因(MRGs, heavy metal(loid) resistance genes)比对 ARGs 具有更高的驱动效应。从组装得到的基因组(MAGs, metagenomic assembled genomes)中回收到了 6 个潜在病原菌,它们携带多重抗性基因,对数种抗生素和重(类)金属具有抗性。其中 *Pseudomonas* spp. 携带最多数量的抗性基因(RGs, resistance genes),对多达 2 种抗生素和 12 种重(类)金属具有抗性。这些携带多种 RGs 的病原菌以及以 multidrug 为主体的抗生素抗性组特征提示煤矿 AMD 或许也是潜在的抗性基因的一个源,后续需要进一步调查其可能引起的 ARGs 环境扩散风险。

其次,为了研究煤矿 AMD 对土壤抗性组的影响,我们收集了受到煤矿 AMD 影响的土壤以及周围未受影响的背景土壤,利用宏基因组技术比较研究了 AMD 对土壤抗性组的影响。分析发现受 AMD 污染和未受污染的土壤均拥有 multidrug 占据主体的抗生素抗性组特征。AMD 污染土壤 ARGs 相对丰度低于背景土壤(分别为: 47.45 ± 23.34 x/Gb, 85.47 ± 19.71 x/Gb),但是 AMD 污染土壤 MRGs 和 MGEs 的相对丰度均高出背景组 56.26%和 412.12%。普氏分析显示微生物群落(Genus 水平)和 MGE 对重(类)金属抗性组的驱动效应明显强于抗生素抗性组。代谢相关分析发现微生物群落还增加了产能相关代谢,以满足酸和重(类)金属抗性所需的能量。另外,研究还发现水平基因转移(HGT, horizontal gene transfer)事件促进群落交换能量和信息相关基因来适应 AMD 环境。

相关发现对于矿物开采环境 ARGs 的环境扩散风险提供了新的视野。

关键词: 煤矿酸性废水、宏基因组、抗生素抗性组、重(类)金属抗性组、废水处理系统

Qiang Huang (Environmental science)

Directed by Prof. Likai Hao

ABSTRACT

A recent global scale study found that mining-impacted environments such as acid mine drainage (AMD) have multidrug antibiotic resistance gene (ARG)-dominated resistomes with an abundance that is similar to that in urban sewage but much higher than that in freshwater sediment. These findings raised concern that mining-impacted environments may increase the risk of ARG environmental proliferation. However, this study mainly focused on typical metal(lid) mines and ignored coal mine, which also is a kind of metal(loid)-enriched mine. Considering the fact that coal mine is one of the most important energy resources in the world and so leads to large-scale mining activities, investigating resistome characteristics of coal mine source AMD and the effects to soil will help improving knowledge of antibiotic resistome characteristics from mining-impacted environments and ARGs diffusing risk.

Focused on the above problem, we firstly analyzed characteristics of a coal source AMD passive treatment with metagenomic techniques. The results showed that the multidrug efflux type genes dominated the antibiotic resistome, and a highly diverse heavy metal(loid) resistome was dominated by mercury-, iron-, and arsenic--associated resistance. Correlation analysis indicated that mobile gene elements (MGEs) had a greater influence on the dynamic of MRGs (metal(loid) resistance genes) than ARGs. Among the metagenome-assembled genomes, six potential pathogens carrying multiple resistance genes resistant to several antibiotics and heavy metal(loid)s were recovered. *Pseudomonas* spp. contained the highest numbers of resistance genes, with resistance to two types of antibiotics and 12 types of heavy metal(loid)s. The occurrence of potential pathogens containing multiple resistance genes might increase the risk of ARG dissemination in the environment.

Secondly, we analyzed resistome characteristics difference between this coal source AMD affected soil samples and surrounding unaffected soil samples with metagenomic techniques, in order to evaluate the effects on soil resistomes of AMD. Both contaminated and background soils have multidrug-dominated antibiotic resistomes that are attributed to the acidic environment. AMD-contaminated soils had a lower relative abundance of ARGs ($47.45 \pm 23.34 \times/\text{Gb}$) than background soils ($85.47 \pm 19.71 \times/\text{Gb}$) but held a higher relative abundance of heavy metal(loid) resistance genes (MRGs) and transposase- and insertion sequence-dominated MGEs, which was $133.29 \pm 29.36 \times/\text{Gb}$ and $188.51 \pm 21.81 \times/\text{Gb}$, respectively, 56.26% and 412.12%

higher than that of background soils. Procrustes analysis showed that the microbial community and MGEs exerted more influencing on driving heavy metal(loid) antibiotic variation than antibiotic resistome. The microbial community increased energy production-related metabolism to fulfill the increasing energy needs required by acid and heavy metal(loid) resistance. Horizontal gene transfer (HGT) events primarily exchanged energy- and information-related genes to adapt to the harsh AMD environment.

These findings provide new insight into the risk of ARG proliferation in mining environments.

Keywords: coal source acid mine drainage, metagenomic, antibiotic resistome, heavy metal(loid) resistome, passive-type drainage treatment

论文原创性声明和使用授权说明

声 明

本人声明所呈交的博士后出站报告是我个人和合作导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国科学院地球化学研究所或其他教育机构和科研单位的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确说明并表示了谢意。

签名： 黄强 日期： 2023 年 05 月 15 日

关于博士后出站报告使用授权说明

本人完全了解中国科学院地球化学研究所有关保留、使用博士后出站报告的规定，即中国科学院地球化学研究所有权保留送交博士后出站报告的复印件，允许博士后研究报告被查阅和借阅；中国科学院地球化学研究所可以公布博士后研究报告的全部或部分內容，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存研究报告。

公开 保密(____年)(保密的论文在解密后应遵守此规定)

博士后签名： 黄强

合作导师签名： _____

日期： 2023 年 05 月 15 日

目录

1 绪论	1
2 煤矿酸性废水抗性组特征	3
2.1 前言	3
2.2 材料与方法	3
2.2.1 样品采集与处理.....	3
2.2.2 DNA 提取、扩增子测序、宏基因组测序和分析.....	4
2.2.3 数据分析与可视化.....	5
2.3 结果	5
2.3.1 环境参数特征.....	5
2.3.2 抗性组和移动元件在不同采样点的特征	6
2.3.3 ARGs、MRGs、MGEs 和微生物群落之间的相关性.....	8
2.3.4 基因组水平抗性基因的携带特征	11
2.4 讨论	12
2.4.1 AMD 包含以 multidrug 为主的抗生素抗性组和高度多样的重(类)金属抗性组.....	12
2.4.2 移动元件是 AMD 环境中多功能抗性基因的主要驱动力.....	13
2.4.3 从 AMD 中回收到数个潜在抗性病原菌.....	14
2.4.4 对于 AMD passive treatment 的建议.....	15
3 煤矿酸性废水对土壤抗性组的影响	16
3.1 前言	16
3.2 材料与方法	16
3.2.1 样品采集与处理.....	16
3.2.2 原始数据分析.....	17
3.2.3 数据分析与可视化.....	18
3.3 结果	19
3.3.1 ARG 变化.....	19
3.3.2 MRG 变化和 MGE 变化.....	19
3.3.3 群落和 MGEs 对 ARGs 和 MRGs 的驱动效应.....	21
3.3.4 产能代谢的变化.....	22
3.3.5 水平基因转移事件.....	23
3.4 讨论	24
3.4.1 AMD 污染对 ARGs 的影响.....	24
3.4.2 AMD 污染对 MRGs 的影响.....	24

3.4.3 驱动抗性组多样性的关键因素	25
3.4.4 AMD 污染对群落产能相关代谢的影响.....	25
3.4.5 MAGs 之间的 HGT 事件.....	25
3.4.6 MRG 环境扩散风险.....	26
4 结论.....	27
5 附录.....	28
参考文献.....	35
致谢.....	43
博士后期间发表的学术论文.....	44

1 绪论

抗生素抗性基因(ARGs, antibiotic resistance genes)的环境扩散会引起病原菌产生抗生素抗性和治疗失败,因此获得持续性关注。这些问题威胁到人类和其它生物的健康,造成巨大经济损失和高死亡率 (Hendriksen et al., 2019; Zhuang et al., 2021)。据估计,由抗生素抗性菌感染造成的死亡人数每年约为 700,000,问题如果没有得到控制,到 2050 年该数字可能上升至 10,000,000 (Crofts et al., 2017)。除了抗生素,相关研究显示非抗生素物质如重(类)金属也可以促进 ARGs 共现性的产生,即所谓的抗生素重(类)金属共选择 (Imran et al., 2019)。共选择理论认为通过共抗性、交叉抗性和共调节机制,重(类)金属能促进 ARGs 和 MRGs 的共表达 (Li et al., 2017; Pal et al., 2017; Wales and Davies, 2015)。由此,人们假设矿物开采环境可能是 ARGs 的一个源。事实上,已经有相关研究见诸报道。一个铜矿尾矿污染土壤拥有以 rifamycin-, glycopeptide aminocoumarin-, 和 macrolide-related resistance 占据主导的抗生素抗性组 (Jiang et al., 2021)。而在一个金矿尾矿污染的农田里,其抗生素抗性组由 MLS- (macrolides-lincosamides-streptogramins-), vancomycin-和 aminoglycoside 占据主导。特别是近期的一个全球尺度的矿区环境抗性组研究更是证实了该假设,该研究发现在全球范围内的典型金属矿物相关环境中, multidurg 占据抗生素抗性组的主体,且抗生素抗性基因丰度与城市污水厂相似,但是高于淡水沉积物 (Yi et al., 2022)。考虑到矿区环境是抗性基因潜在的源,人们不由得担心矿区环境的 ARGs 环境扩散风险。当认识到重(类)金属在自然界的转化比抗生素更困难时,该问题变得更尖锐 (Song et al., 2017; Stepanauskas et al., 2005)。

尽管 Yi et al. (2022)的研究提供了关于矿区环境抗性组特征的新的视野,该项研究并没有调查矿区周边未受到采矿活动明显影响的土壤环境抗性组特征。因此,矿物开采活动对土壤环境抗性组的影响仍未可知,这限制了对于 ARGs 环境扩散风险的评估。另外,由于该研究主要关注铜矿、铅锌矿、金矿、黄铁矿和多金属矿,我们还不知道煤矿这一非典型金属矿物对周围环境抗性组的影响。在中国,煤炭供应的能源超过了主要能源的 50% (Ma et al., 2020)。另外,作为全球的主要能源,一直到 2035 年,煤矿对能源的供应预计一直高于 24% (Liu and Liu, 2020)。对于煤矿能源的高度需求会刺激煤矿开采,这样会带来一系列污染物,其中最典型就是 AMD。在嗜酸微生物的介导下,当含有硫化物的尾矿暴露在空气和雨水中时,就会形成含有高浓度 SO_4^{2-} 以及多种金属离子的极端酸性(<4)废水 (Dopson and Holmes, 2014; Pan et al., 2021; Xin et al., 2021)。而由于金属在酸性环境中更容易溶解,生活在 AMD 中的微生物就会面对比在一般水生环境中的更大

的金属胁迫。根据共选择理论，这种富含各种重(类)金属的环境会刺激 ARGs 和 MRGs 的共同出现。所以，煤矿来源的 AMD 可能含有大量的 ARGs 和 MRGs，AMD 污染可能会刺激土壤环境抗性基因相对丰度增加，但是相关研究还未见诸报道。

针对上述问题，我们选择了位于中国西南地区贵州省某处废弃煤矿作为研究对象，分别从山脚下的酸性废水 passive-type 处理系统中采集污水样品，从山坡上采集受到 AMD 污染和未受污染的土壤样品。对于污水样品，使用宏基因组分析技术我们(1)调查了煤矿 AMD 的抗性组特征；(2)分析了 RGs 的宿主特征；(3)确定了 MGEs 对 RGs 的驱动效应。对于土壤样品，使用宏基因组技术我们比较分析了 AMD 对土壤抗性组的影响，主要(1)调查并比较了两组土壤中的抗性组和 MEGs 的特征与相对丰度差异；(2)分析了微生物群落和 MGEs 对土壤抗性组的驱动效应；(3)分析了 AMD 污染对土壤微生物群落代谢特征的影响并在 MAGs 层面分析了潜在的 HGT(horizontal gene transfer)事件。

相关研究有助于人们更全面了解不同类型矿山开采活动对于周围环境抗性组的影响，有助于评估矿山开采造成的 ARGs 环境扩散风险。

2 煤矿酸性废水抗性组特征

2.1 前言

不同处理系统被开发出来用于 AMD 的处理。其中, passive-type 类型的处理系统因其相对低的投资和维护简易性, 被视为最有前途的工艺技术 (Akciil and Koldas, 2006)。在中国西南部的贵州省, 一个中试规模的 passive-type 处理系统在 2013 年被建造, 并一直用于对 AMD 进行原位修复。Chen 和同事分析了系统在处理 AMD 过程中的微生物群落结构变化以及该系统对 Fe(II) 的去除效果, 但是并没有分析该处理系统的抗性组特征 (Chen et al., 2020)。本研究在此基础上调查处理系统内部 AMD 的抗性组特征。因为 MGEs 介导 RGs 在微生物之间的转移 (Wozniak and Waldor, 2010), 环境参数如 pH 等被报道能直接或者间接影响 RGs 的变化 (Zhou et al., 2022), 所以我们还分析了 MGEs 和环境参数与 ARGs 和 MRGs 之间的相关性。我们从处理系统的不同单元收集 AMD 样品, 测量其中的地球化学参数, 还利用宏基因组技术进行分析。借助这些技术, 我们希望能: (1) 调查煤矿酸性废水的抗性组特征; (2) 分析 RGs 的宿主特征; (3) 分析 MGEs 在驱动 ARGs 和 MRGs 过程中所起的作用。我们的研究在 passive-type 处理系统内部的抗性组特征和煤矿酸性废水抗性基因环境扩散方面提供了初步见解。

2.2 材料与方法

2.2.1 样品采集与处理

所有样品采集自中国西南部贵州省内的一个煤矿 AMD passive-type 处理系统 (26°31'28.68"N, 106°34'13.72"E)。AMD 自山顶流下, 依次流过处理系统的 5 个处理单元 (Fig. 1)。6 个采样点分布在第 1 个处理单元的进水口与所有 5 个处理单元的出水口, 分别命名为 Entrance, Pond1, Pond2, Pond3, Pond4 和 Effluence。在每个采样点的表层水中(0-30cm)采集 3 个平行样品。每个样品的阴阳离子都被测量, 另外样品还送交测序公司进行 16S rRNA 扩增子和宏基因组测序。

使用多通道水质分析仪(YSI, Ohio, USA)对每个样点在原位测量 pH 值和溶解氧(DO)。对于每个样品, 使用 0.45 μm 滤膜过滤 200 mL 水, 然后等分成 4 个 50 mL 分别用来测量阴阳离子。50 mL 使用浓硝酸(16 mol/L)酸化后, 使用 ICP-OES (Optima 5300 DV, PerkinElmer, USA)测量样品的 Mn 含量。50 mL 水样使用浓盐酸(12 mol/L)酸化后, 使用 ICP-MS (PerkinElmer, USA)测量样品的微量元素。50 mL 水样不经处理, 直接使用 ICS-90(Dionex, USA)测量 SO_4^{2-} 浓度。使用

ferrozine 方法测量样品的 Fe^{2+} 和 Fe (Stookey, 1970)。所有采样点的环境参数以平均值 \pm standard error 表示。

2.2.2 DNA 提取、扩增子测序、宏基因组测序和分析

从每个样品中，使用 0.22 μm 滤膜过滤 5 L 原水。滤膜被分开存放在无菌离心管中，离心管和干冰一起放置于泡沫盒中，送往 Sangon Biotech Company (Shanghai, China) 进行 DNA 提取。

使用 V3-V4 引物进行扩增子测序，平台选用 Illumina HiSeq2500 平台。下机数据使用 Qiime2 (v2021.4, qiime2.org) (Bolyen et al., 2019) 进行分析。简单来说，使用 dada2 算法进行 100% ASV 聚类(Callahan et al., 2016)，物种数据库选用 Silva database (v138, not weighted) (Bokulich et al., 2018; Robeson et al., 2021)。

同样使用 Illumina HiSeq2500 平台 PE150 模式对 18 个样品进行宏基因组测序，最低测序量定为 10 Gb。Kneaddata (v0.6.1) (github.com/biobakery/kneaddata) (Bolger et al., 2014) 用于进行质控与宿主污染过滤 (key parameters were set as --trimmomatic-options 'ILLUMINACLIP: adapters/TruSeq3-PE.fa:2:40:15 SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:50')。序列组装使用 MEGAHIT (v1.1.3) (Li et al., 2015)。开放阅读框 (ORF, open reading frame) 预测、去冗余和基因定量分别使用 Prodigal (v2.6.3, with default parameters) (Hyatt et al., 2010)，CD-HIT (v4.8.1, -aS 0.9 -c 0.95 -G 0 -g 0 -T 0 -M 0) (Fu et al., 2012)，和 Salmon (v0.13.1, with default parameters) (Patro et al., 2017) 进行。

调用 Diamond (v2.0.2) 的 blastp 模式比对 genes 至 SARG 数据库 (Yin et al., 2018) 和 BacMet2 (Pal et al., 2014) 数据库，用于检测 ARGs 和 MRGs，参数设置为 identity \geq 70%，e-value = 10^{-5} ，alignment length \geq 20。Blastn (v2.5.0+) 比对 genes 至 MobileGeneitcElement Database (Pärnänen et al., 2018)，用于检测 MGEs，参数设定为 identity \geq 70%，e-value = 10^{-5} ，alignment length \geq 28，blasting strand 设定为 both。CARD database 用于对 ARGs 进行抗性机制分类。RGs 或者 MGEs 的丰度根据下列表达式计算得到 (Patro et al., 2017):

$$\text{Relative abundance (coverage, } \times / \text{ Gb)} = \sum_1^n \frac{N_{\text{mapped reads}} \times L_{\text{reads}} / L_{\text{RG/MGE-like ORF}}}{S}$$

$N_{\text{mapped reads}}$ 是比对到 RG/MGE-like ORFs 的序列数； L_{reads} 是 reads 长度，即 150； $L_{\text{RG/MGE-like ORF}}$ 是 RG/MGE-like ORFs 的长度； n 是属于同一个 RG/MGE 类型的 ORFs 数，该数值由 Salmon 计算得到； S 是每个样品宏基因组的大小，该值为双端序列进行质控后得到的干净序列的平均值。

使用 MetaWRAP pipeline (v1.3.2) (Uritskiy et al., 2018) 对长度大于 1000 bp 的 contigs 进行基因组分箱。该 pipeline 包含数个模块，可以分别进行基因组分箱、基因组提纯和基因组定量。软件 checkM (v1.0.12) (Parks et al., 2015) 用于进行完

整度和污染率评估。随后, 高质量 MAGs (contamination < 5%, completeness > 70%) 被用于检测 RGs 和 MGEs, MAGs 的物种注释使用 CTDBB-Tk (v2.0.0)完成, 配套数据库版本为 version release_207 (Parks et al., 2022)。

2.2.3 数据分析与可视化

R (v3.6.1)被用于进行数据分析和可视化。Barplots 使用在线平台 ImageGP (ehbio.com)进行绘制。ANOSIM 分析、RDA 分析、普氏分析和斯皮尔曼相关性热图分析在在线平台 Tutools (clouduutu.com)上完成。使用在线平台 iTOL (itol.embl.de)对 MAGs 构建物种进化树。使用 Gephi (v0.9.2, github.com/gephi)绘制网络图。每个采样点基因相对丰度由该点三个样品的平均值 \pm standard error 表示。

2.3 结果

2.3.1 环境参数特征

Table 1 展示各样品主要环境参数值。pH 值由进水口的 3.03 ± 0.00 轻微上升至出水口的 3.13 ± 0.00 。DO 由进水口的 $4.19 \pm 0.09 \text{ mg L}^{-1}$ 上升至 Pond 2 处的 $5.05 \pm 0.11 \text{ mg L}^{-1}$, 然后在出水口降低至 $3.86 \pm 0.01 \text{ mg L}^{-1}$ 。SO₄²⁻浓度由进水口的 $4,030.23 \pm 199.93 \text{ mg L}^{-1}$ 增加至出水口的 $6,060.09 \pm 209.79 \text{ mg L}^{-1}$ 。Fe²⁺浓度有微弱变化, 而总 Fe 浓度先由进水口的 $5.92 \pm 0.08 \text{ mg L}^{-1}$ 上升至 Pond 1 处的 $22.14 \pm 0.98 \text{ mg L}^{-1}$, 然后在出水口, 该值降低至 $14.55 \pm 0.03 \text{ mg L}^{-1}$ 。金属如 Mn、Zn、As、Hg、Cu、Sb 和 Pb 的浓度呈现先下降后上升的趋势。

总的来说, pH、DO 和 Fe²⁺的浓度有轻微改变, 而其它参数从进水口到出水口均呈现不同程度的上升趋势。对于微生物群落结构, 请参考 Fig. S1。

表 1. 各采样点 AMD pH, 溶解氧(DO), SO₄²⁻浓度以及主要金属离子浓度。值以 mean \pm standard error 表示。

Table 1. Water pH, dissolved oxygen (DO), and concentrations of SO₄²⁻ and main metal(loid) elements at different sample sites in the passive treatment of coal source acid mine drainage. Values are the mean \pm standard error.

Phases	Entrance	Pond1	Pond2	Pond3	Pond4	Effluence
pH	3.03 \pm 0	3.00 \pm 0.00	2.97 \pm 0.00	3.04 \pm 0.00	3.08 \pm 0.00	3.13 \pm 0.00
SO ₄ ²⁻ (mg L ⁻¹)	4030.23 \pm 199.93	5337.03 \pm 418.19	6167.26 \pm 355.75	6122.6 \pm 32.22	6217.91 \pm 16.76	6060.09 \pm 209.79
DO (mg L ⁻¹)	4.19 \pm 0.09	4.3 \pm 0.07	5.05 \pm 0.11	4.73 \pm 0.05	3.05 \pm 0.05	3.86 \pm 0.01
Fe ²⁺ (mg L ⁻¹)	0.71 \pm 0.07	0.77 \pm 0.07	0.85 \pm 0.05	0.65 \pm 0.02	0.73 \pm 0.04	0.72 \pm 0.02
Fe (mg L ⁻¹)	5.92 \pm 0.08	22.14 \pm 0.98	21.20 \pm 3.93	16.48 \pm 0.13	14.37 \pm 0.09	14.55 \pm 0.03
Mn (mg L ⁻¹)	13.22 \pm 0.17	14.08 \pm 0.22	12.27 \pm 0.11	20.30 \pm 2.22	20.51 \pm 4.49	20.82 \pm 4.42

Zn ($\mu\text{g L}^{-1}$)	298.51±6.46	291.27±3.82	282.06±10.97	301.88±1.01	354.50±13.45	347.03±6.50
As ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1.60±0.49	0.70±0.22	1.70±0.142	2.38±0.25	3.14±0.71	4.41±0.12
Hg ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.37±0.24	0.06±0.02	0.01±0.01	0.05±0.02	1.03±0.74	2.04±0.46
Cu ($\mu\text{g L}^{-1}$)	8.16±0.28	7.78±0.11	9.63±0.24	15.98±0.19	26.58±3.88	26.38±0.46
Sb ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1.91±2.09	0.13±0.08	0.08±0.03	0.36±0.02	3.91±1.62	5.20±0.38
Pb ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1.84±0.74	0.99±0.10	1.59±0.31	1.45±0.23	14.94±8.71	24.22±1.70

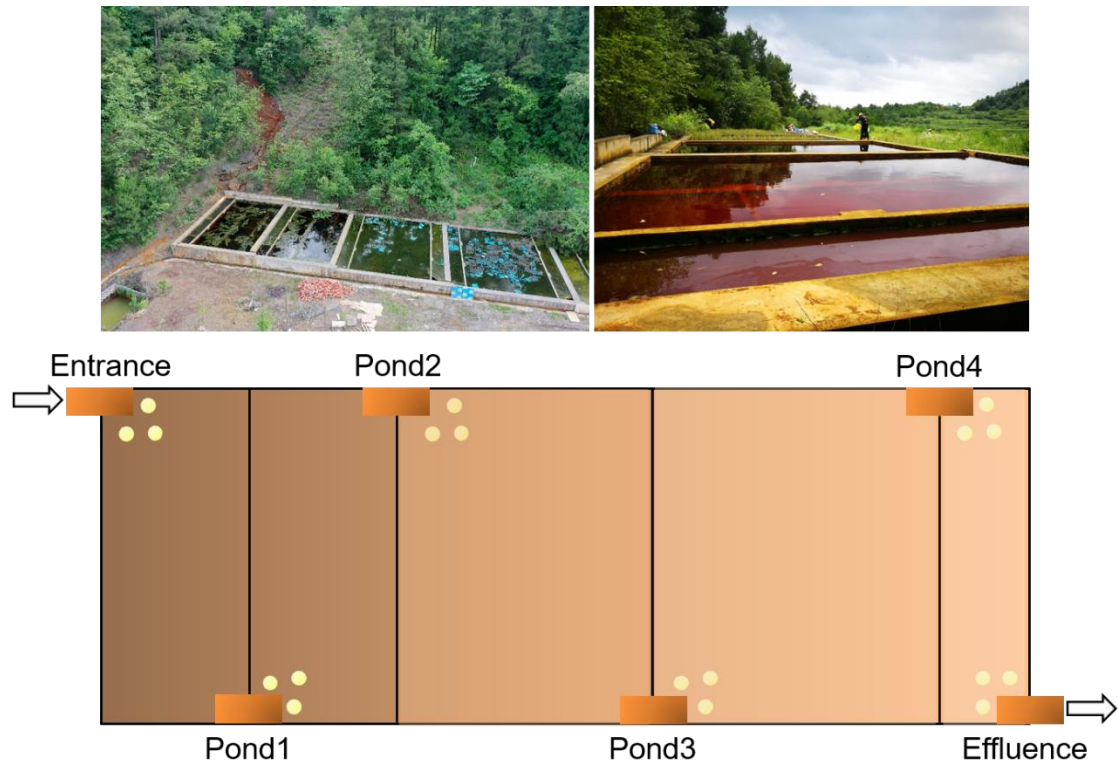


图 1. 煤矿酸性废水处理系统结构图。6 个采样点分别位于 5 个子单元的进出水口，分别命名为 Entrance, Pond1, Pond2, Pond3, Pond4 和 Effluence。

Fig. 1. Photographs of five ponds and schematic of the passive treatment of coal source acid mine drainage. Six sampling sites were at the entrance of the first pond and the effluences of five ponds, named as Entrance, Pond1, Pond2, Pond3, Pond4, and Effluence, respectively.

2.3.2 抗性组和移动元件在不同采样点的特征

ANOSIM 分析(Fig. S2a, 2b 和 2c)中 R 值为正且均具有显著性，表明组间差异大于组内差异。结果说明 AMD 在流过不同处理单元时，抗性基因和 MGEs 浓度发生了明显的变化。

Fig. 2a, 2b 显示抗生素抗性基因的种类特征和相对丰度变化。共有针对 18 种抗生素的 69 种抗性基因被检测到，其中包括一些临床上的重要抗生素，如 multidrug (30 种)，beta-lactams (8 种)和 vancomycin (4 种)。Multidrug-type ARGs 的相对丰度在所有样品中占比超过 65%，占据着抗生素抗性组的绝对优势。三个相对丰度最高的基因均为 multidrug-type，为分别为 *mdtB*，*mexF* 和 *mdtC*，总占

比超过 25%。总 ARGs 的相对丰度由进水处的 $30.609 \times/\text{Gb}$ 降低至出水口的 $17.368 \times/\text{Gb}$ ，减少 43.26%。

Fig. 2c 显示重类金属抗性基因的种类特征和相对丰度变化。针对 36 种金属类型(包括 21 种多金属类型)的 101 种 MRGs(包括 37 种多抗性基因)被检测到。其中, *fpvA* 对多达 8 种重金属具有抗性, 包括 Cd, Co, Cu, Fe, gallium (Ga), Mn, Ni 和 Zn, 但是只是在进水处被检测到。丰度最高的抗性类型包括 Hg-, multiresistance-, As-和 Fe-related 抗性, 它们在进出水口的丰度变化百分比分别为 21.23%到 49.15%, 12.74%到 26.86%, 15.82%到 25.46%以及 9.40%到 14.03%。对于单金属抗性基因多样性, Cu-related 抗性拥有最多 14 种抗性基因, As-, Hg-和 Fe-related 抗性基因种类分别为 9, 8 和 7。Hg-related *merA* 拥有最高相对丰度, 其次为 *arsH* (As-related resistance), *ruvB* (Cr-selenium (Se)-tellurium (Te)-related resistance), *dpsA* (Fe-related resistance)和 *arsA* (As-Sb-related resistance)。MRGs 的丰度由进水口的 $135.55 \times/\text{Gb}$ 降低至出水口的 $50.859 \times/\text{Gb}$, 降幅达 62.48%。

Fig. 2d 显示了 MGEs 的种类特征和相对丰度变化。包括 integrase, insertion sequences, qacEdelta, plasmid, transposition module 和 transposase 在内的 6 种 type 被检测到。另外, 针对这 6 种 type, 一共有 29 种 subtype 被检测到。这其中, *IS91* 和 *tnpA* 占据最高相对丰度, 在所有样品两者丰度之和占比均超过 75%。与 ARGs 和 MRGs 的变化趋势相似, MGEs 的相对丰度由进水处的 $501.005 \times/\text{Gb}$ 降低至出水处的 $198.438 \times/\text{Gb}$, 降幅达 60.39%。

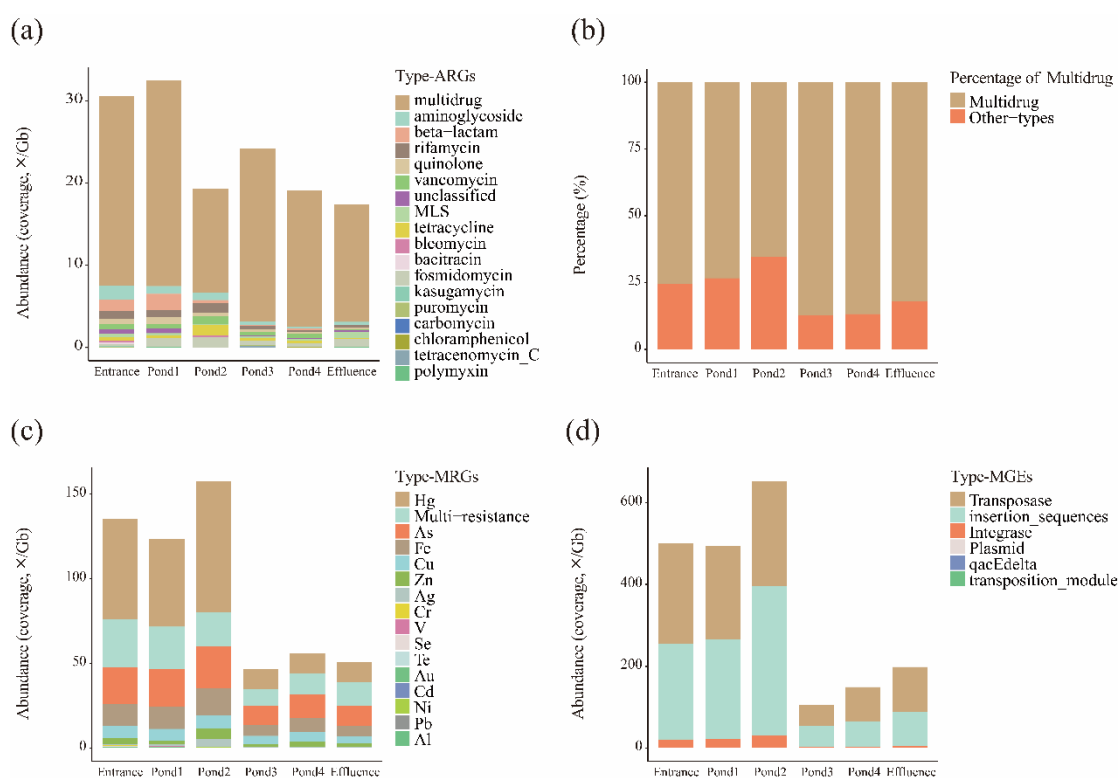


图 2. (a) 抗生素抗性组在各采样点的特征以及变化; (b) 多药耐药基因在各采样点的平均百分比占比; (c) (类)金属抗性组在各采样点的特征以及变化; (d) 移动元件在各采样点的特征以及变化。相应的值为各采样点 3 个平行样的平均值。

Fig. 2. Characteristics and dynamics of (a) antibiotic resistome (ARGs, antibiotic resistant genes) and (b) average percentage of multidrug-resistant ARGs and other types in six sample sites of the passive treatment of acid mine drainage. Characteristics and dynamics of (c) heavy metal(loid)s resistome (MRGs, heavy metal(loid) resistance genes), and (d) mobile gene elements (MGEs) in six sample sites. The six sample sites were at the entrance of the first pond and the effluences of five ponds, named as Entrance, Pond1, Pond2, Pond3, Pond4, and Effluence, respectively. The values are the mean abundance of each antibiotic type. In (a), MLS is macrolide–lincosamide–streptogramin. In (c), multi-resistance included resistance to 21 types of multimetal(loid)s.

2.3.3 ARGs、MRGs、MGEs 和微生物群落之间的相关性

Fig. 3a 显示 MGEs–ARGs–MRGs (MAM)网络图, Fig. 3b 显示 Genera–ARGs–MRGs (GAM)网络图。Real-network 的结构参数(包括 clustering coefficient, average path length 和 network diameter)均大于 random Erdős–Rényi network (Tables S1 and S2), 表示真实网络并不是随机分布的, 而是有高度相关的拓扑结构。

MAM 网络一共有 78 个节点 (包括 29 个 ARGs, 32 个 MRGs 和 17 个 MGEs) 和 215 条边 (包括 81 个 ARG-MGE 和 134 个 MRG-MGE)。29 个 ARGs 节点包含 19 个 multidrug-related ARGs 和 4 个 beta-lactam-related ARGs。32 个 MRGs 节点包含 4 个 As-related MRGs, 5 个 Cu-related MRGs, 4 个 Fe-related MRGs 和 5 个 Hg-related MRGs。在 215 条边中, 81 条为 ARG-MGE type, 其中 51 条属于 multidrug-related type。与之相对应, 134 条属于 MGE-MGE type, 包括 22 条 Cu-related, 17 条 Fe-related, 21 条 Hg-related 和 19 条 As-related。此外, 还有 43 条属于 multimetal-related, 如 *arsA* 和 *ruvB*。拥有最多条 edges 的 MGEs 有 *IS26* (19 ARGs 和 9 MRGs), *istA5* (11 ARGs 和 17 MRGs), *tnpA2* (9 ARGs 和 13 MRGs) 和 *ISRj1* (10 ARGs 和 12 MRGs)。其中, 大多数 MGEs 更多地与 MRGs 呈现显著的正相关关系。*IS26* 与 19 个 ARGs 呈现显著的正相关关系, 而仅与 9 个 MRGs 呈现显著的正相关关系。

在 GAM network 中, multidrug-related ARG multidrug_ABC_transporter 与多达 28 个 genera 形成 edges, 其中包括数个典型的 AMD 物种, 如 *Ferroplasma*, *Leptospirillum*, *Acidithiobacillus*, *Acidobacterium*, *Acidibacillus*, *Metallibacterium* 和 *Desulfurispora*。As-related MRG *pstB* 也与多达 28 个 genera 显著正相关。Genera 中, *Acinetobacter* 与多达 30 种 RGs 形成显著正相关关系, 包括 9 种重(类)金属和 21 种抗生素。其它与多个 RGs 存在显著正相关关系的属包括 *Desulfitobacterium* (20 ARGs 和 8 MRGs), *Granulicella* (12 ARGs 和 9 MRGs),

Syntrophobacter (12 ARGs 和 7 MRGs)和 *Acidiphilium* (4 ARGs 和 11 MRGs)。这些属可能是 AMD 环境中的 RGs 潜在宿主。

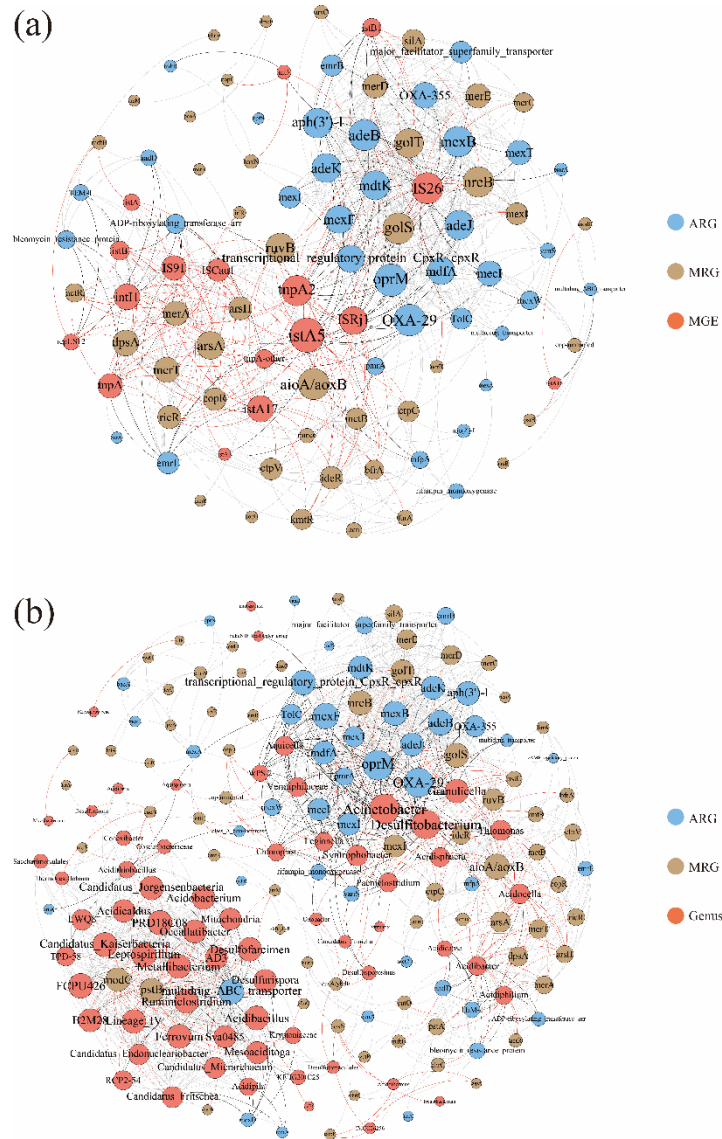


图 3. (a) 抗生素抗性基因, (类)金属抗性基因以及移动元件的 co-occurrence 网络图 (Spearman correlations: $r > 0.7, p < 0.05$); (b) 抗生素抗性基因, (类)金属抗性基因以及属水平群落结构的 co-occurrence 网络图 (Spearman correlations: $r > 0.7, p < 0.05$)。蓝色节点代表抗生素抗性基因, 棕色节点代表(类)金属抗性基因, 浅橙色节点代表移动元件(a)或者属(b)。节点大小代表每个节点所拥有的边。红色的边代表节点之间呈现显著正相关, 黑色的边代表节点之间呈现显著负相关。

Fig. 3. (a) Co-occurrence relations among antibiotic resistance genes (ARGs), heavy metal(loid) resistance genes (MRGs), and mobile gene elements (MGEs) (Spearman correlations: $r > 0.7, p < 0.05$); **(b)** Co-occurrence relations among ARGs, MRGs, and genera (Spearman correlations: $r > 0.7, p < 0.05$). Blue nodes represent ARGs, brown nodes represent MRGs, and salmon nodes

represent MGEs in **(a)** or genera in **(b)**. The size of each node corresponds to the number of edges with other nodes. The red edges represent significantly positive correlations between MRGs and MGEs in **(a)** or between MRGs and genera in **(b)**; the black edges represent significantly positive correlations between ARGs and MGEs in **(a)** or between ARGs and genera in **(b)**; and the gray edges represent other significantly positive correlations between other types.

普氏分析发现群落结构(属水平)与 ARGs 和 MRGs 存在相近的一致性 (对于 ARGs, $M^2=0.3365$, $p=0.001$, Fig. 4a; 而对于 MRGs, $M^2=0.4692$, $p=0.001$, Fig. 4b)。尽管 MGEs 与 ARGs 和 MRGs 均存在显著的一致性, 但是 MGEs 和 MRGs 存在更小的 M^2 值 (对于 ARGs, $M^2=0.5631$, $p=0.001$, Fig. 4c; 对于 MRGs, $M^2=0.2228$, $p=0.001$, Fig. 4d), 这表示 MGEs 相对于 ARGs, 对 MRGs 具有更强烈的驱动效应。

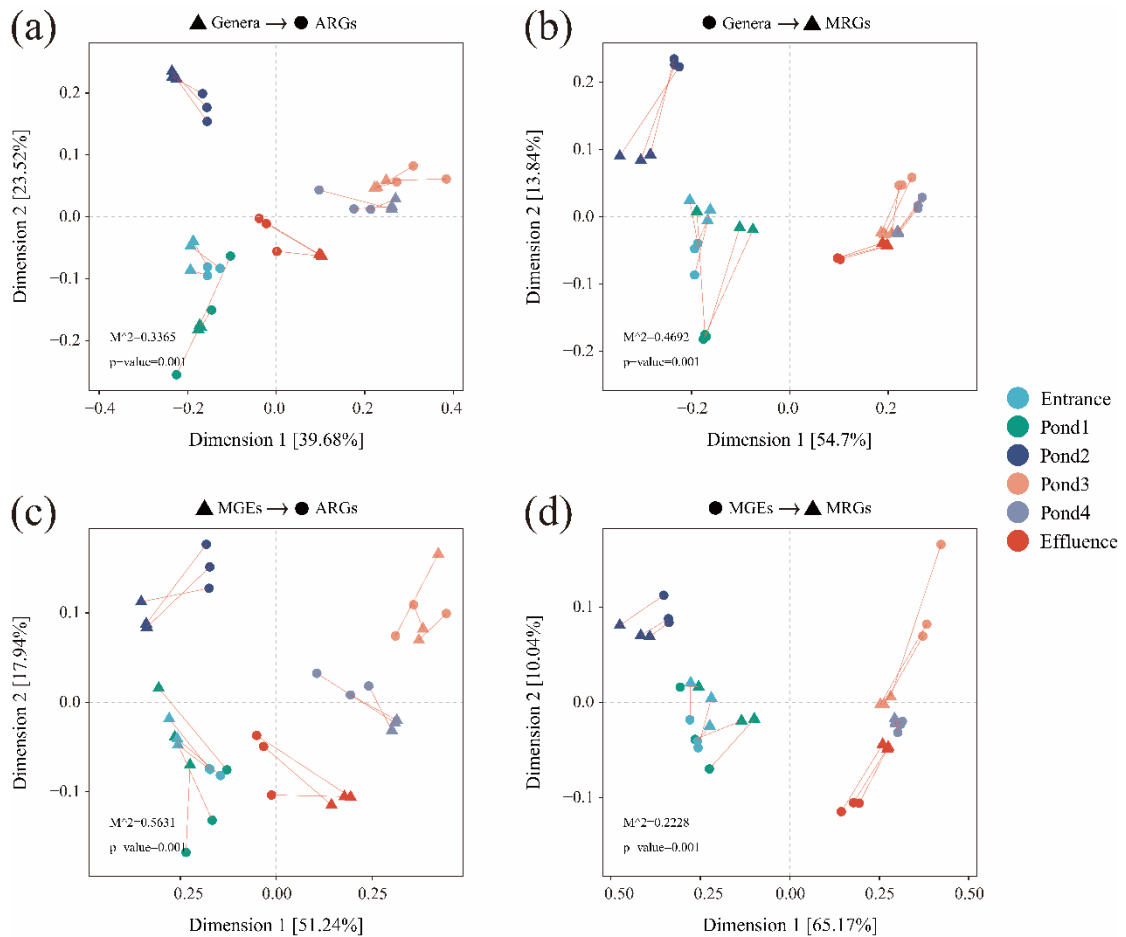


图 4. (a) 属水平群落结构与抗生素抗性基因的普氏分析; (b) 属水平群落结构与(类)金属抗性基因的普氏分析; (c) 移动元件与抗生素抗性基因的普氏分析; (d) 移动元件与(类)金属抗性基因的普氏分析;

Fig. 4. Procrustes analysis with Spearman correlations displaying significant correlations between **(a)** genera and antibiotic resistance genes (ARGs), **(b)** genera and heavy metal(loid) resistance genes (MRGs), **(c)** mobile gene elements (MGEs) and ARGs, and **(d)** MGEs and MRGs. In the passive treatment of coal source acid mine drainage, the six sample sites were at the entrance of the first pond and the effluences of five ponds, named as Entrance, Pond1, Pond2, Pond3, Pond4, and Effluence, respectively.

Spearman 相关性分析 (Fig. S3)显示,大多数 ARGs 与重(类)金属之间存在微弱的正相关或者显著的负相关关系。相反,多个 MRGs 与对应金属以及其它金属存在显著的正相关关系,如 *pstB* (As resistance), *merP* (Hg resistance), *merR* (Hg resistance), 此外还包括多个多金属抗性基因,如 *cueA*, *modC*, *wtpC* 和 *nia*。RDA 分析(Fig. S4)也显示出相似结果,即大多数 ARGs 和 MRGs 与重(类)金属显示出负的相关性。

2.3.4 基因组水平抗性基因的携带特征

宏基因组分箱用于分析 AMD 物种 RG 携带情况。一共有 215 个高质量 (contamination < 5%, completeness > 70%) MAGs 被回收得到,其中包括 209 个细菌 MAGs 和 6 个古菌 MAGs (Fig. 5)。在 6 个古菌 MAGs 中,只有一个包含一个 Cu-related MRG。在细菌 MAGs 中,有 101 个包含至少 1 个 RG 或者 MGE。Multidrug-related ARGs 在基因组水平也占据数量优势,在 13 个携带 ARG 的 MAGs 中,有 8 个携带至少一个 multidrug-type ARGs。

6 个携带最多数量 RGs 的 MAGs 同时被鉴定为潜在病原菌,包括 *Pseudomonas* (entrance_MAG01), *Mycobacterium* (entrance_MAG11 和 pond1_MAG02 被鉴定为 *M. numidiamassiliense*, 以及 pond2_MAG16) 和 *Acinetobacter* (entrance_MAG06 被鉴定为 *A. junii*, entrance_MAG29 被鉴定为 *A. guillouiae*)。Entrance_MAG01 携带 1 个 MGE 和 25 个 RGs,对 2 种抗生素 (multidrug 和 bacitracin) 和 12 种重(类)金属具有抗性; Entrance_MAG11 和 pond1_MAG02 携带 6 个 MGEs 和 13 个 RGs,对 4 种抗生素 (multidrug, quinolone, rifamycin 和 aminoglycoside) 和 4 种重(类)金属具有抗性; Pond2_MAG16 携带 10 个 RGs,对 2 种抗生素 (aminoglycoside 和 quinolone) 和 4 种重(类)金属具有抗性; Entrance_MAG06 携带 2 个 MGEs 和 8 个 RGs,对 multidrug 和 2 种重(类)金属具有抗性; Entrance_MAG29 携带 1 个 MGE 和 14 个 RGs,对 3 种抗生素 (multidrug, beta-lactam 和 aminoglycodise) 和 4 种重(类)金属具有抗性。

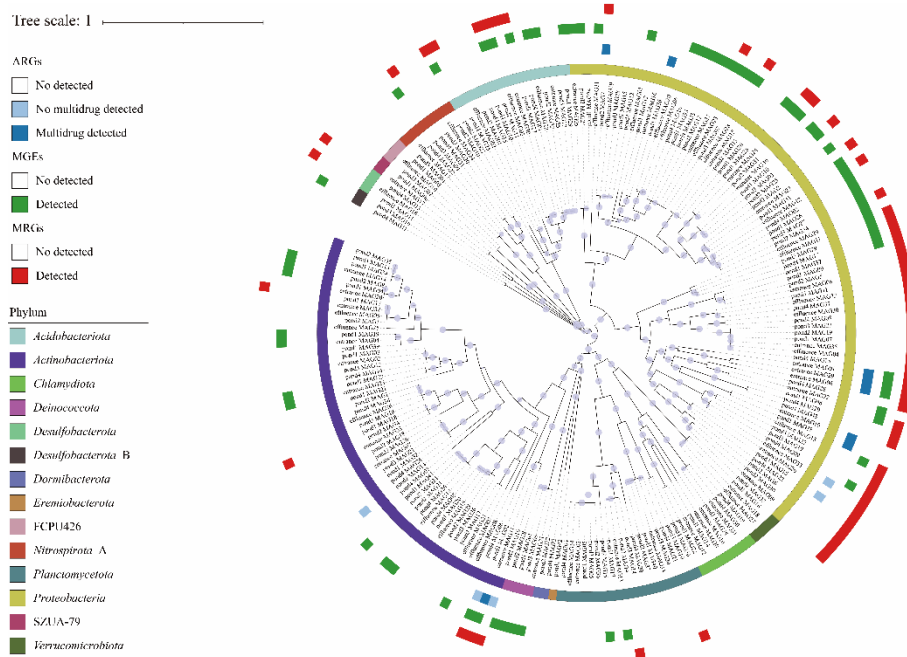


图 5. 回收到的基因组(completeness > 70% and contamination < 5%)物种进化树图。圈层由内向外, 彩色条带、蓝色条带、绿色条带和红色条带分别代表代表代表每个基因组注释到的门分类、基因组注释到的抗生素抗性基因信息、基因组注释到的移动元件注释信息以及基因组注释到的金属抗性基因信息。

Fig. 5. Phylogenetic tree of bacterial metagenome-assembled genomes (MAGs) and loading of resistance genes, with MAG completeness > 70% and contamination < 5%. From inner to outer circles, colored bars of first circle represent the phyla of every MAG, blue bars of the second circle represent MAGs carrying antibiotic resistance genes (ARGs), green bars of the third circle represent MAGs carrying mobile gene elements (MGEs), and red bars of the fourth circle represent MAGs carrying heavy metal(loid) resistance genes (MRGs).

2.4 讨论

2.4.1 AMD 包含以 multidrug 为主的抗生素抗性组和高度多样的重(类)金属抗性组

本研究中的煤矿 AMD 抗生素抗性组以 multidrug-type 抗性基因占据主要丰度优势 (Fig. 2a 和 Fig. 2b), 该结果与 Yi et al. (2022)的研究结果一致。Zhao et al. (2020)和 Malik et al. (2017)也发现了相似的现象, 他们分别发现在一个轻微酸性的 As-、Cu-污染农田和没有明显金属污染的酸性环境中发现了以 multidrug 为主的抗生素抗性组。在本研究中 multidrug-related RGs 总相对丰度占据每个样品的

65%以上, 这说明微生物群落形成 multidrug 主导的抗生素抗性组有助于群落在酸性环境中的生存。这可能跟 multidrug-related RGs 具有多重功能有关, 尤其是这些基因在对酸性和重(类)金属的抗性方面。有一些 multidrug-resistant ARGs 能形成 tripartite-like organization, 帮助 gram-negative 菌抵抗酸性胁迫, 维持包内外 pH 平衡 (Teelucksingh et al., 2020), 比如 *emrB-mdtB-tolC* 能通过调节 *gadAB* 这种关键酸抗性基因的表达而帮助 *Escherichia coli* 抵抗酸性胁迫 (Deininger et al., 2011; Schaffner et al., 2021)。*mdtB* 和 *mdtC* 能帮助宿主抵抗 Zn (Lee et al., 2005), 而携带 *mexI* 的宿主能抵抗 V (Aendekerck et al., 2002)。另外, multidrug-related organization 还有其它诸如生物膜形成、群体感应和解毒功能 (Alav et al., 2021; Okusu et al., 1996; Yu et al., 2003)。

但是在一些其它矿区的研究中发现了不一样的现象。如在一个受到铜矿尾矿污染的土壤中, 则是 rifamycin-, glycopeptide aminocoumarin-和 macrolide-抗性占据抗生素抗性组的主体 (Jiang et al., 2021); 此外, MLS- (macrolides-lincosamidsstreptogramins-), vancomycin-和 aminoglycoside-抗性占据了一个受到金矿尾矿污染的农田中的抗生素抗性组的主体 (Qiao et al., 2021)。因此, 需要更加深入的研究来确认矿区环境抗性组特征的主要决定因素。

与抗生素抗性组相比, 煤矿 AMD 包含一个以 Hg-, multimetal(loid)s-, As-和 Fe-占据主要丰度优势的更加多样化的重(类)金属抗性组。MRGs 中相对丰度最高的如 *merA* (Hg resistance), *arsA* (As-Sb resistance), *arsH* (As resistance), *ruvB* (Cr-Se-Te resistance)和 *dpsA* (Fe resistance)对多种重(类)金属具有抗性。*MerA* 是汞还原酶, 能转化 Hg^{2+} 为毒性较弱的单质 Hg^0 (Rugh et al., 1996)。另外, *merA* 对 Au 有微弱的还原能力, 能将 Au^{3+} 还原为 Au^+ (Summers and Sugarman, 1974)。*ArsA* 编码一个外排泵蛋白的催化亚基, 能运输 As 和 Sb 通过 *arsB* 膜结合蛋白, 而基因 *arsH* 能催化依赖于 NADPH 的 Fe, Cu 和 As 的还原 (Yang and Rosen, 2016)。此外, *ruvB* 对 Cr, Se 和 Te 具有抗性。Fe 抗性基因 *dpsA* 编码的蛋白能保护染色体 DNA 免受氧化性伤害, 在营养缺乏环境, 如 N 和 P 的摄取受到限制时, 其表达会上升 (Michel et al., 2003)。AMD 属于典型的寡营养环境 (Chen et al., 2016), 因此 *dpsA* 在群落中的富集能帮助微生物群落在该环境中的存活。和 multidrug-related ARGs 一样, 这些多重(类)金属抗性 MRGs 起着帮助微生物群落适应煤矿 AMD 环境的重要功能。

2.4.2 移动元件是 AMD 环境中多功能抗性基因的主要驱动力

与 MGEs 相比, 群落结构被普遍认为对抗性组的变化起到更大的作用。然而, 对于本研究中的 AMD 环境, MGEs 和 MRGs 之间的 M^2 值(0.2228, $p=0.001$)要小于群落与 MRGs 之间的 M^2 值(0.4692, $p=0.001$), 这说明在 MRGs 的变化过程中, MGEs 起到比群落结构更大的驱动作用。微生物一般通过 MGEs 介导的

HGT 事件获得新的抗性，以此来适应环境胁迫 (Blair et al., 2015)。在 MAM network (Fig. 3a)中，与 ARGs 相比，MRGs 被发现更频繁地与 MGEs 如 *tnpA*, *tnpA2*, *IS91*, *ICSau1*, *istA* 和 *intI1* 形成显著正相关关系。因此，该发现与普氏分析中的发现 MGEs 和 MRGs 的 M^2 值小于 MGEs 和 ARGs 的 M^2 值现象一致，即在面对多重金属胁迫时，微生物群落更倾向于通过 MGE 介导的 HGT 事件交换 MGEs。这可能是相比于 ARGs，MRGs 在帮助微生物群落抵抗金属胁迫中更具有特异性，这也可以解释环境中 MRGs 的相对丰度要高于 ARGs。另外，群落中 MGEs 的相对丰度要高于 MRGs 和 ARGs，可能原因是除了介导 ARGs 和 MRGs 的水平传播，群落也需要通过 HGT 获得其他能力，如酸抗性、金属转移和相关代谢能力来适应 AMD 环境 (Chen et al., 2021; Guo et al., 2015)。

2.4.3 从 AMD 中回收到数个潜在抗性病原菌

大多数 multi-RG 携带者为典型酸性异养菌，如 *Acinetobacter*, *Desulfitobacterium*, *Granulicella*, *Syntrophobacter*, *Acidiphilium*, *Acidocella* 和 *Acidibacter* (Fig. 3b)，它们被频繁地在酸性环境中检测到 (Chen et al., 2016; Huang et al., 2016)。携带多重(类)金属抗性 MRGs 和多功能 RND-type RGs 帮助它们更好地适应极端酸性多种金属富集的 AMD 环境。

通过 binning 回收到的 MAGs，携带最多 RGs 的 6 个 MAGs 均被鉴定为潜在病原菌，归属于三个属 *Pseudomonas*, *Mycobacterium* 和 *Acinetobacter*。这些属下面的菌株广泛分布在各种环境中，其中有些属于人、动物或者植物的病原菌或者选择性病原菌 (Forbes, 2017; Peix et al., 2009; Towner, 2009)。除了多样的抗性，其中的很多物种同时具有酸抗性。好几个深海热泉来源的 *Pseudomonas* strains 能适应酸性和抗生素 (Bravakos et al., 2021)，如能引起医院感染的 *P. aeruginosa* 具有酸抗性 (Lewenza et al., 2020; Naveed et al., 2020)。 *Mycobacterium avium* 能通过下调跨膜蛋白的活性和上调脂肪酸代谢酶的活性，从而在 pH 为 4.5 的环境中存活下来 (O'Brien et al., 1996; Roxas and Li, 2009; Shahbaaz et al., 2020)。 *Acinetobacter* 在生活在酸性重金属污染环境中的青蛙的表皮上被发现 (Proença et al., 2021)。

抗性病原菌是世界范围内的一大公共卫生威胁 (Ayobami et al., 2022)。另外，很多重(类)金属如 As, Cd, Cu, Hg, silver (Ag), Te 和 Zn 由于能部分替代抗生素而被应用于临床治疗。因此，由于重(类)金属抗性病原菌的存在导致的重(类)金属疗法失效也引起担忧 (Zagui et al., 2021)。而且同时携带 ARGs 和 MRGs 的病原菌相比于携带单一种 RGs 的病原菌因为具有更强的环境适应性而更具有威胁性。一个 multidrug-resistant 和 mercury-tolerant 的 *E. coli* 近期就被从一个受采矿活动影响的河流中被发现，它对重金属的抗性被认为与采矿活动相关 (Gaeta et al., 2022)。

尽管只有 entrance_MAG06 明确被鉴定为与 *A. junii* 这种引起尿道感染的病原菌高度相似 (Abo-Zed et al., 2020), 但是其他五个 MAGs 仍属于潜在病原菌。另外, 考虑到 HGT 事件更倾向于发生在亲缘关系接近的物种之间, 所以这几个潜在病原菌仍有可能把 RGs 传递给亲缘关系接近的同一个属下的病原菌中 (Daubin and Szöllösi, 2016)。如果 AMD 没有经过适当处理就被排放到周围环境中, 携带 multi-RGs 的 MAGs 可能会增加 ARG 的扩散风险, 导致治疗失败并危害公共健康。

2.4.4 对于 AMD passive treatment 的建议

目前为止, 还没有 AMD passive treatment 对于 ARGs 处理效果的报道。在本研究中, ARGs、MRGs 和 MGEs 的丰度有不同程度的降低。一个可能的原因是重(类)金属的共选择效应对 RGs 的刺激作用被寡营养环境带来的负面作用所抵消 (Herren and Baym, 2022b), 因为很多抗性机制尤其是外排泵机制, 是需要消耗能量的。除此之外, HGT 的效率在酸性环境中被降低, 因为酸溶液和重(类)金属能阻止基因转移以及微生物对裸露 DNA 的摄取 (Guo et al., 2015; Wenhua et al., 2003)。在不同环境参数下, AMD passive treatment 运行效率不一样。因此, 在不同的处理系统中, 微生物群落和抗性组会表现出和本研究不一样的特征。所以, 更多针对 passive treatment 对 ARGs 处理效果的研究需要进行, 为改善 AMD 处理提供指导。

3 煤矿酸性废水对土壤抗性组的影响

3.1 前言

为了理解矿物开采活动如何影响土壤环境抗性组,我们还采集了前文提到的煤矿山坡上受到 AMD 影响的土壤以及周围未受 AMD 明显影响的土壤。使用宏基因组技术,我们主要进行了以下研究:(1)调查和比较了 AMD 污染土壤和周围背景土壤之间的抗性组特征以及移动元件特征;(2)分析了群落结构和移动元件对两种抗性基因的驱动贡献;(3)比较了产能相关代谢途径的丰度变化,并评估了 AMD 污染土壤环境中物种之间的潜在的水平基因转移(HGT, horizontal gene transfer)现象。相关结果有助于增加我们对 AMD 如何影响土壤环境抗性组特征、微生物如何适应酸性 AMD 环境的认识,帮助我们评估煤矿来源 AMD 的 ARGs 环境扩散风险。

3.2 材料与方法

3.2.1 样品采集与处理

如图 Fig. 6 所示, AMD 从矿顶洞口沿着山腰流到山脚。6 个受 AMD 影响的土壤样品采集自山坡上 AMD 浸润过的地方,5 个背景土壤样品采集自离山坡 500-2000 米远的林地。所有 11 个样品分别放在 50 ml 无菌离心管中。样品采集完后,离心管在 4°C 条件下在 1 个小时之内被运送至实验室进行后续处理。每个样品分为两份,一份用于测量土壤 pH 值,一份用于进行 DNA 提取与宏基因组测序。对于 pH 值测量,土壤样品首先风干 2 天以上,在与纯水以 1:3(1:3, w/v)的比例进行混合后用 pH 计进行测定。用于 DNA 提取与宏基因组测序的样品放于泡沫盒中,泡沫盒塞满干冰后送至广东美格基因生物科技公司进行后续相关处理。使用 MagaBio soil/feces 试剂盒提取 DNA,建库后,在 Illumina HiSeq2500 平台上进行 PE150 双端测序,测序深度至少为~10G,该深度满足 AMD 极端环境宏基因组分析。



图 6. 土壤样品采样点信息。6 个 AMD 污染土壤样品收集于 AMD 流过的坡道，5 个背景样品收集于周边未受 AMD 明显影响的林地土壤。

Fig. 6. Sampling sites. Six AMD affected soil samples (blue dots) were collected from slope where AMD flowed, while five AMD unaffected background soil samples (orange dots) were collected from surrounding woodlands 500~2000 meters far away from the slope.

3.2.2 原始数据分析

每个样品单独进行相关分析。Kneaddata pipeline (v0.6.1) (github.com/biobakery/kneaddata, 关键参数设置: `--trimmomatic-options 'ILLUMINACLIP: adapters/TruSeq3-PE.fa:2:40:15 SLIDINGWINDOW:4:20 MINLEN:50'`)。使用 PhyloFlash 软件进行物种注释(Gruber-Vodicka et al., 2020), 该软件从宏基因组序列中搜寻 RNAs (SSU rRNAs)序列, 然后进行物种注释。被注释为细菌或古菌的 OTUs 被保留下来用于后续分析, 被注释为真菌的 OTUs 则被过滤掉。质控后的 clean reads 使用 MEGAHIT (v1.1.3, kmer was set as `--k-min 27 --k-max 141 --k-step 12, minimum length of 200 bp`) 组装为 contigs (Li et al., 2015)。长度大于 200 bp 的 contigs 随后被用于 ORF 预测、ORF 去冗余和基因定量操作, 相应软件分别为 prodigal (v2.6.3, 默认参数) (Hyatt et al., 2010), CD-HIT (v4.8.1, `-aS 0.9 -c 0.95 -G 0 -g 0 -T 0 -M 0`) (Fu et al., 2012)以及 salmon (v0.13.1, 默认参数) (Patro et al., 2017)。抗性基因或者移动元件的相对丰度计算公式如(a)所示 (Zhao, R. et al., 2020):

$$\text{Abundance (coverage, } \times / \text{Gb)} = \sum_1^n \frac{N_{\text{mapped reads}} \times L_{\text{reads}} / L_{\text{RG/MGE-like ORF}}}{s} \quad (\text{a})$$

$N_{\text{mapped reads}}$ 为比对到 RG 或者 MGE 的 ORF 的 reads 数, L_{reads} 是 Illumina 序列的长度(此处为 150 bp), $L_{\text{RG/MGE-like ORF}}$ 是 RG 或者 MGE 的 ORF 长度, n 是属于同

一个 RG 或者 MGE 类型的 ORF 数量, 该值由 salmon 计算得来, S 是测序样品的大小, 在本研究中为同一个样品两对干净序列的平均值。

使用 diamond 比对 ORFs 蛋白序列至 SARG 数据库 (Yin et al., 2018) 和 BacMet2 数据库 (Pal et al., 2014), 得到 ARGs 和 MRGs, 使用 blast 比对 ORGs 核酸序列至 MobileGeneElementDatabase (Pärnänen et al., 2018) 得到 MGEs。CARD 数据库 (Jia et al., 2017) 用于对 ARGs 进行机制分类。

从 6 个受 AMD 影响的土壤样品组装结果中选择长度 > 1000 bp 的 contigs 进行 binning 分箱, 该过程调用 MetaWRAP pipeline (v1.3.2) (Uritskiy et al., 2018)。该 pipeline 包含数个模块, 能够分别进行 MAG 分箱, 提纯与 MAG 定量。使用 CheckM (v1.0.12) 确定 MAG 的完成度与污染度。使用 Drep 对 MAGs 进行去冗余, 相关参数设置为 -sa 0.99 -nc 0.30 -p 24 -comp 50 -con 5 (Olm et al., 2017)。随后对高质量的 MAGs (污染度 < 5%, 完整度 > 50%) 基因组进行物种注释与 RG 和 MGE 挖掘。基因组物种注释调用 gtdbtk (v2.0.0), 配套参考数据库为 (version release_207) (Parks et al., 2022)。使用 Metachip 调用默认参数检测基因组之间潜在的 HGT 事件 (Song et al., 2019)。

使用 DiTing 比较 AMD 污染组与背景组之间代谢途径丰度的变化 (Xue et al., 2021), 相关基因和代谢途径的相对丰度根据公式(b)和(c)计算得到:

$$TPM_i = \frac{b_i}{\sum_j b_j} \cdot 10^6 = \frac{\frac{X_i}{L_i}}{\sum_j \frac{X_j}{L_j}} \cdot 10^6 \quad (b)$$

$$A_i = \frac{a_{1,1} + a_{1,2} + a_{1,n}}{n} + \frac{a_{2,1} + a_{2,2} + \dots + a_{2,n}}{n} + \dots + \frac{a_{m,1} + a_{m,2} + \dots + a_{m,n}}{n} \quad (c)$$

对于公式(b), TPM_i 表示基因 i 的相对丰度, b_i 表示基因 i 的拷贝数, L_i 表示基因 i 的长度, X_i 表示基因 i 在样品中被检测到的次数, j 表示每个样品中基因的个数。对于公式(c), A_i 表示途径 i 的相对丰度, $a_{m,n}$ 表示每个样品中蛋白 m_n 的相对丰度, m 是 i 途径中的可替换途径, 而 n 是可替换途径中的蛋白数目。

3.2.3 数据分析与可视化

R(v3.6.1) 和 Excel(version 2019) 被用于进行数据分析与可视化。所有图片使用 Adobe Illustrator (version CC 2019) 进行调整。

Barplots 在在线平台 ImageGP 上进行绘制 (Chen, T. et al., 2022)。普氏分析和相关性热图在在线平台 Tutools (cloudtutu.com) 上进行绘制, 相关性分析方法设置为 Spearman。另一个在线平台 iTOL (itol.embl.de) 则用于构建和美化 MAG 系统进化树, 相关配置文件调用 R 生成。热图调用 R 包“pheatmap” package (v1.0.12) 进行绘制。HGT 网络图由 Gephi (v0.9) 生成。Student t-test 被用于进行 ANOVA 统计学分析, “*”, “**” and “***” 分别代表不同的显著性水平, 分别对应于 p-值 “≤0.1”, “≤0.05” 以及 “≤0.01”。

3.3 结果

3.3.1 ARG 变化

背景和 AMD 污染土壤的环境 pH 值范围分别为 3.34–5.03 和 2.9–3.1，说明 AMD 污染降低土壤 pH 值。

背景土壤和 AMD 污染土壤抗生素抗性组发生了明显的变化(Fig. 7 and Figure S5a)。相对丰度由背景平均值的 $85.47 \pm 19.71 \times/\text{Gb}$ 降低为 $47.45 \pm 23.34 \times/\text{Gb}$ ($p = 0.0266^{**}$)。在背景土壤里检测到更多种类的抗生素抗性类型 (16 相比于 AMD 污染土壤中的 14)，sulfonamide 和 carbomycin 抗性没有在 AMD 污染土壤中被检测到。具体到 ARGs，有 82 种在背景土壤中被检测到，而只有 45 种在 AMD 污染土壤中被检测到。在这两种土壤中，multidrug 抗性均占据主导地位，分别为 $68.85\% \pm 6.10\%$ 和 $84.13\% \pm 3.30\%$ ($p = 0.004^{***}$)，显著性 p 值 0.004 表示 AMD 污染与 multidrug 的相对丰度的增加之间具有显著相关性。Multidrug 抗性也包含了最多种类的 ARGs (在背景土和 AMD 污染土中分别为 29 和 21 种)。在这两组土壤中，*mdtB* 和 *mdtC* 相对丰度最高，它们的丰度之和分别占据了总丰度的 43.70% 和 56.16%。

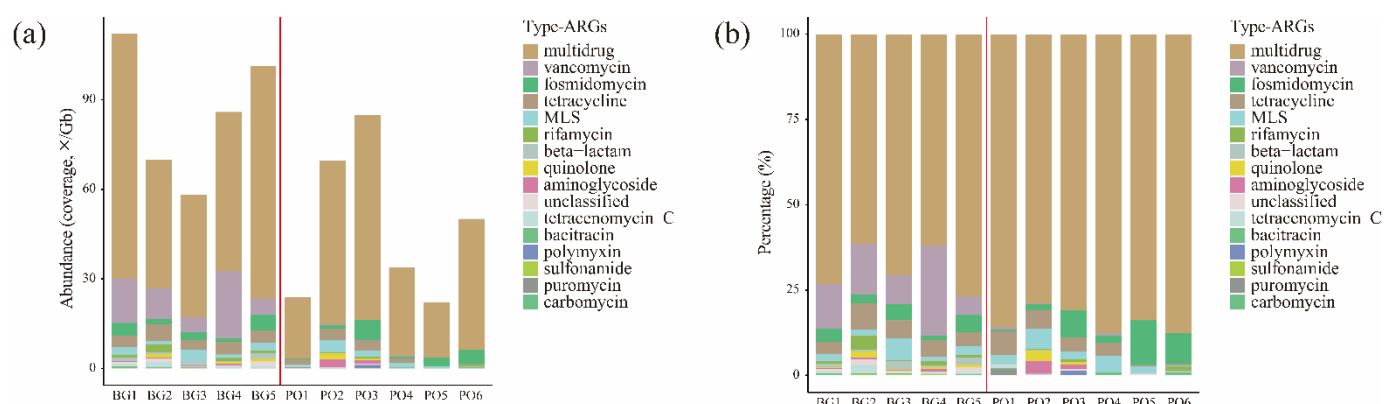


图 7. 抗生素抗性基因的相对丰度(a)以及百分比占比(b)。BG 代表对照组样品, PO 代表 AMD 污染组样品。

Fig. 7. Differences in the (a) relative abundance and (b) percentage of the antibiotic resistome between background and AMD contamination areas, by ARG type; BG represents background samples, and PO represents AMD contaminated samples.

3.3.2 MRG 变化和 MGE 变化

重(类)金属抗性组在两组土壤中的变化如 Fig. 8a 所示(参考 Figure S5b)。平均相对丰度由背景土壤中的 $85.30 \pm 4.36 \times/\text{Gb}$ 上升至 AMD 污染土壤中的 133.29

$\pm 29.36 \times/\text{Gb}$ ($p = 0.014082^{**}$), 增幅达 56.26%。分别在背景土壤和 AMD 污染土壤中检测到 17 种和 15 种重(类)金属抗性, Cd 和 Te 抗性没有在后者中检测到。另外, 102 种 MRGs 和 79 种 MRGs 分别在背景和 AMD 污染组中检测到。相对丰度最高的四种抗性包括 Hg-resistance, multimetal(loid)s-resistance, Cu-resistance 和 Fe-resistance。AMD 污染增加了它们的平均相对丰度, 分别由 $0.49 \times/\text{Gb}$, $13.56 \times/\text{Gb}$, $10.43 \times/\text{Gb}$ 和 $19.856 \times/\text{Gb}$ 上升至 $34.68 \times/\text{Gb}$, $29.50 \times/\text{Gb}$, $19.06 \times/\text{Gb}$ 和 $24.328 \times/\text{Gb}$ 。上升最显著的 MRGs 包括 Hg-resistance 基因 *merA*, 其平均相对丰度在背景土壤中仅为 $0.20 \times/\text{Gb}$, 而在污染土壤中, 该值达到了 $21.95 \times/\text{Gb}$ 。其次是 multimetal(loid)s-resistance *ruvB* (Cr-Se-Te resistance), 由背景土壤中的 $2.20 \times/\text{Gb}$ 上升至污染土壤中的 $14.75 \times/\text{Gb}$ 。此外, 还有 Fe-resistance *dpsA* 和 Hg-resistance *merT*, 分别由背景土壤中的 $0.056 \times/\text{Gb}$ 和 $0.244 \times/\text{Gb}$ 上升至污染土壤中的 $12.20 \times/\text{Gb}$ 和 $8.57 \times/\text{Gb}$ 。

移动元件在两组土壤中的变化如 Fig. 8b 所示(参考 Figure S5c)。在背景土壤中, MGEs 的平均相对丰度为 $36.81 \pm 6.25 \times/\text{Gb}$, 而在污染土壤中, 该值增加至 $188.51 \pm 21.81 \times/\text{Gb}$ ($p = 5.95\text{E-}06^{***}$), 增幅达 412.12%。在背景土壤中, 4 组类型被检测到, 包括 transposase, insertion_sequences, transposition_module 和 integrase, 此外在背景土壤中, 还另外检测到 plasmid 类型。另外, 21 种 MGE subtypes 在背景土壤中被检测到, 而 23 种 subtypes 在 AMD 污染土壤中被检测到。最丰富的的两种 MGE types 包括 transposase 和 insertion_sequences, 它们的平均相对丰度由背景土壤中的 $19.91 \times/\text{Gb}$ 和 $15.71 \times/\text{Gb}$ 增加至 AMD 污染土壤中的 $108.53 \times/\text{Gb}$ 和 $77.46 \times/\text{Gb}$ 。*TnpA*, *IS91* 和 *ISRj1* 这三种 subtypes 为 MGEs 平均丰度的增加贡献了最多。平均相对丰度分别由背景土壤中的 $18.91 \times/\text{Gb}$, $10.79 \times/\text{Gb}$ 和 $1.21 \times/\text{Gb}$ 增加至污染土壤中的 $89.89 \times/\text{Gb}$, $47.51 \times/\text{Gb}$ 和 $18.19 \times/\text{Gb}$ 。

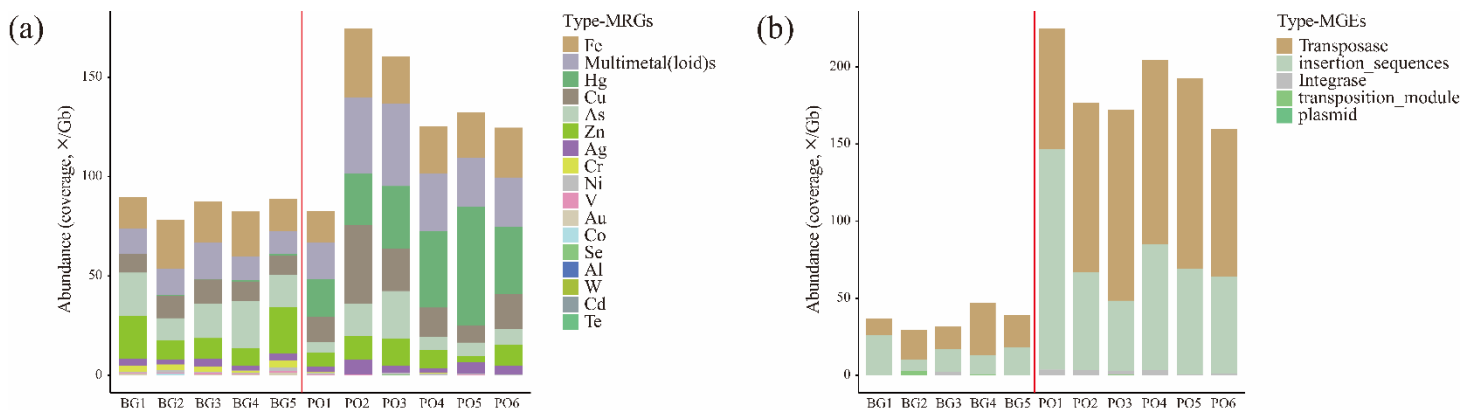


图 8. (类)金属抗性基因(a)以及移动元件(b)在各样品中的相对丰度。BG 代表对照组样品, PO 代表 AMD 污染组样品。

Fig. 8. Variations in **(a)** heavy metal(loid)s and **(b)** MGEs between the background and AMD contamination areas by type; BG represents background samples, and PO represents AMD contaminated samples.

3.3.3 群落和 MGEs 对 ARGs 和 MRGs 的驱动效应

Community (属水平)、MGEs、ARGs 和 MRGs 在水平方向上根据分组聚为明显的两类(Fig. 9),表明 AMD 污染显著改变了土壤群落结构、MGEs 和抗性组。

群落与 MRGs 之间的 M^2 为 0.3753 ($p=0.001^{***}$), 明显低于群落与 ARGs 之间的 M^2 (0.8289; $p = 0.045^{**}$)。与之类似, MGEs 和 MRGs 之间的 M^2 (0.2088, $p=0.001^{***}$)也明显低于 MGEs 和 ARGs 之间的 M^2 (0.6956; $p = 0.021^{**}$)。群落和 MGEs 对 MRGs 比对 ARGs 有更小且显著的 M^2 , 说明群落与 MGEs 对 MRGs 比对 ARGs 有更明显的驱动效应。

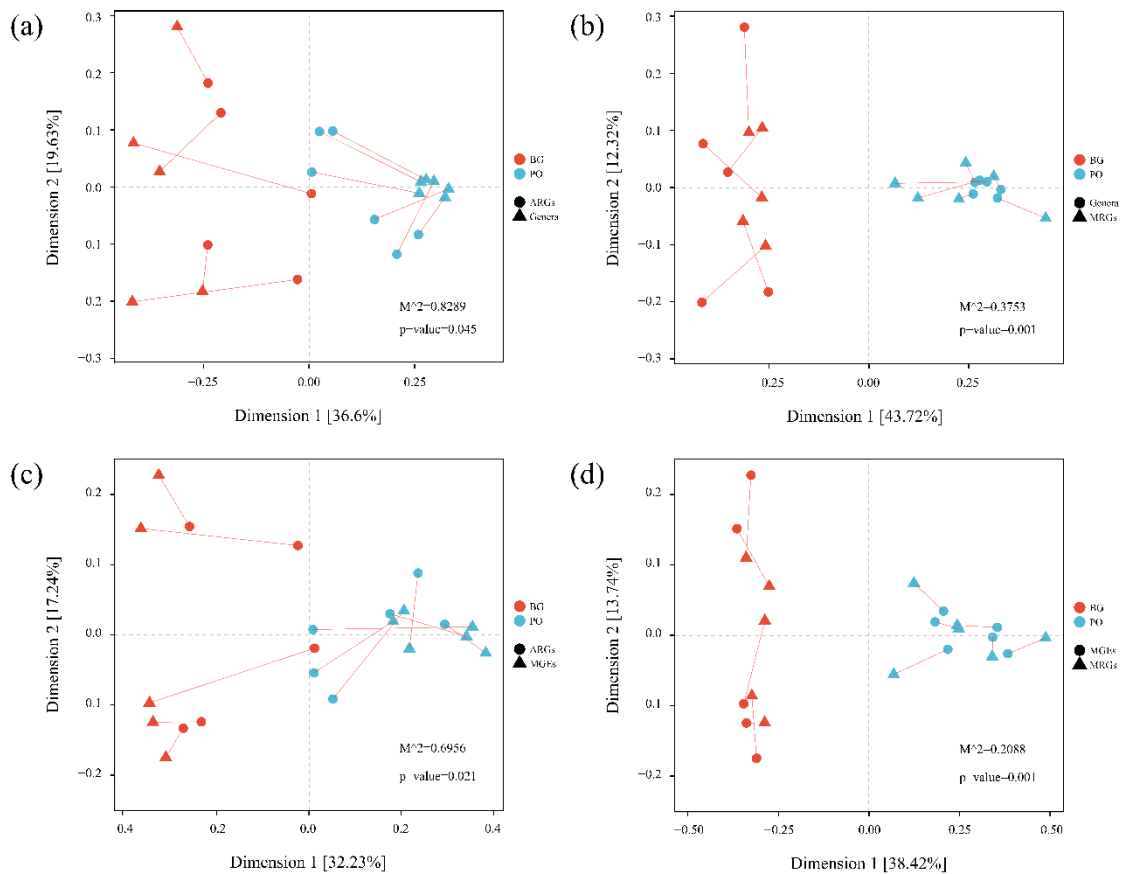


图 9. **(a)** 属水平群落结构与抗生素抗性基因的普氏分析; **(b)** 属水平群落结构与(类)金属抗性基因的普氏分析; **(c)** 移动元件与抗生素抗性基因的普氏分析; **(d)** 移动元件与(类)金属抗性基因的普氏分析。

Fig. 9. Procrustes analysis comparing **(a)** Genera and ARGs, **(b)** Genera and MRGs, **(c)** MGEs and ARGs, and **(d)** MGEs and MRGs; BG represents background samples, and PO represents AMD

contaminated samples. A smaller M^2 represents higher similarity, and the P-value represents M^2 significance. Genera annotation and abundance are found in Table S4.

3.3.4 产能代谢的变化

产能代谢途径的相对丰度变化如 Fig. 10 (详细代谢数据请参考 Figure S6)。大多数能量相关代谢途径的相关丰度在 AMD 污染刺激下得到了增加。对于 C 循环, Enter-Doudoroff (ED)途径由 63.79 ± 19.998 TPM 上升至 108.912 ± 12.662 TPM (corrected $p = 0.0227^{**}$), TCA 由 53.063 ± 17.492 TPM 增加至 191.273 ± 25.21 TPM ($p = 1e-04^{***}$), glycolysis 由 91.728 ± 10.461 TPM 增加至 230.88 ± 15.998 TPM ($p = 0^{***}$)。此外, 好几种发酵产能途径丰度也得到了提升。对于 N 循环, 参与反硝化途径的三个主要反应, 包括由 NO_3^- 还原为 NO_2^- , 由 NO_2^- 还原为 NO , 由 NO 还原为 N_2O , 它们的相对丰度分别由 9.768 ± 9.256 TPM, 12.021 ± 11.588 TPM 和 17.402 ± 13.665 TPM 增加至 12.724 ± 6.399 TPM, 33.593 ± 6.563 TPM 和 34.229 ± 8.877 TPM, 但是分组检验显示这种增加均不显著($p > 0.05$)。对于 S 循环, 参与异化性硫酸盐还原途径的两个主要反应, 包括由 SO_4^{2-} 还原至 SO_3^{2-} , 由 SO_3^{2-} 还原为 S^{2-} 分别由 43.277 ± 16.343 TPM 和 2.152 ± 2.673 TPM 增加至 153.75 ± 25.573 TPM ($p = 3e-04^{***}$)和 8.2 ± 2.792 TPM ($p = 0.0212^{**}$)。

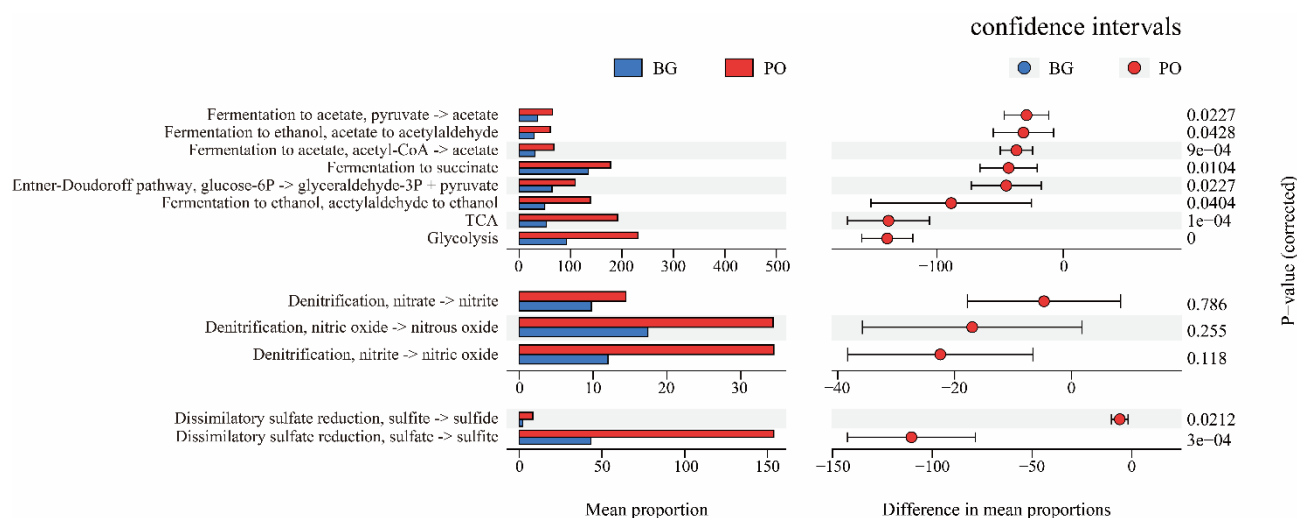


图 10. 产能相关代谢在对照组与污染组之间的变化。相对丰度单位为 TPM, P 值经过 BH 方法矫正。蓝色条带代表背景组平均丰度, 红色条带代表 AMD 污染组平均丰度。BG 代表背景组样品, PO 代表 AMD 污染组样品。

Fig. 10. Energy production-related metabolism. The unit of relative abundance was TPM and the P-value was adjusted using the BH method; the blue and red bars represent the average abundance of background and AMD contaminated samples. BG represents background samples, and PO represents AMD contaminated samples.

3.3.5 水平基因转移事件

通过 Binning，我们得到了 107 个中高完成度 MAGs，包括 59 个细菌和 48 个古菌 (Figure S7)。在同一个门内或不同门的物种之间共检测到存在 130 个 HGT 事件 (Fig. 11a)。结果显示，HGT 事件更频繁发生在亲缘关系较近的物种之间。在古菌与古菌之间检测到 10 次事件，细菌与细菌之间检测到 115 次事件，而细菌与古菌之间只检测到 5 次事件。72 次事件发生在同一个门内，包括 Proteobacteria (43 次)，Acidobacteriota (16 次)，Actinobacteriota (8 次)，Thermoproteota (3 次)和 Thermoplasmata (2 次)。

对 HGT 事件涉及的基因进行 RG 和 MGE 数据库比对，没有发现有基因被注释到。Fig. 11b 显示的是 130 次 HGT 事件涉及的基因的 COG 注释结果。供体和受体之间的注释结果没有明显区别。基因组主要被注释为能量产生与转移相关，包括在供体上有 24 次，在受体上有 22 次。其次是转移、核糖体结构和生源相关，在供体和受体中分别为 17 次和 18 次。

130 个 HGT 事件涉及到的基因 KEGG 注释结果见 Fig. 11c。基因主要被注释为基因信息处理相关，其在供体和受体中分别为 31 次和 32 次，其次是信号和细胞过程，其在供体和受体中分别为 14 次和 13 次。

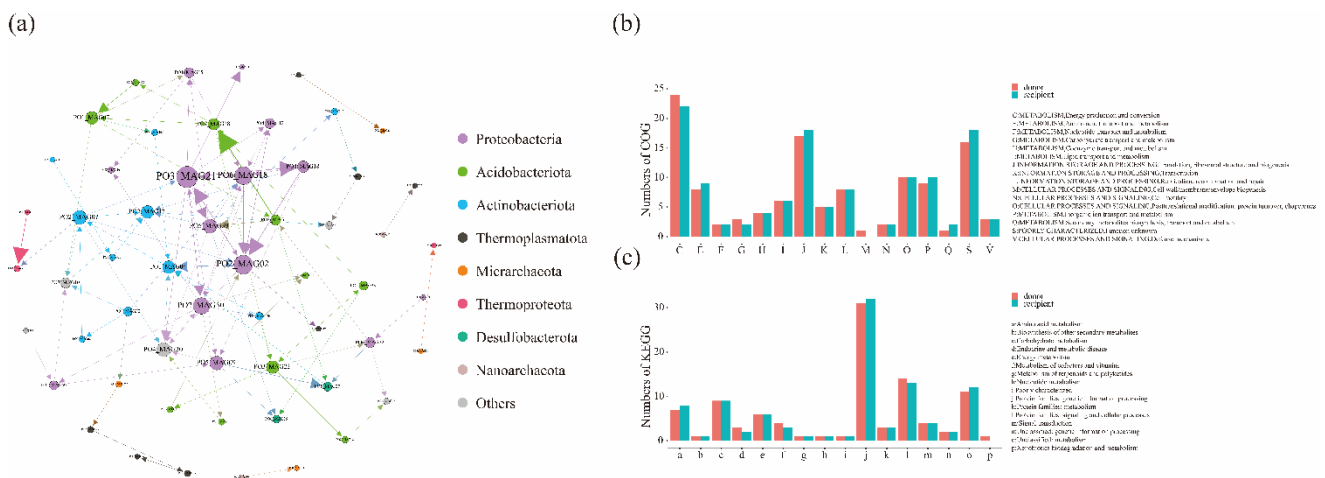


图 11. 水平基因转移事件与基因注释。(a) 网络图代表发生在 107 个基因组之间的水平基因转移事件。箭头代表转移方向，箭头的粗细代表基因组之间转移的基因个数，节点颜色代表不同的门。(b) 基因的 COG 注释，(c) 基因的 KEGG 注释。红色条带代表基因供应者，绿色条带代表基因接受者。

Fig. 11. HGT events and gene annotation. (a) The network representing HGT events included 107 MAGs; the arrow represents the transfer direction between the donor and recipient, the size of the arrow represents the number of genes transferred between the two MAGs, and the color represents

the different MAG phyla. The annotation of genes involved in HGT events in the (b) COG and (c) KEGG databases; the red bar represents donor genes and the green bar represents recipient genes.

3.4 讨论

3.4.1 AMD 污染对 ARGs 的影响

在巴西发生的一次尾矿倾倒事件增加了受影响河流 ARGs 的种类和相对丰度 (Furlan et al., 2020), 而另外一次铅矿污染也被发现增加了污染环境的 ARGs 的相对丰度 (Chen, X. et al., 2022)。因此, 我们猜测富含多金属的 AMD 污染也会增加污染地区 ARGs 的相对丰度。

但是意外的是, 本研究显示 ADM 污染降低了土壤抗生素抗性组的相对丰度。在前面两个案例中, pH 值分别是 6.4-7.1 和 8.5-9.5, 而本研究中的土壤 pH 呈现酸性。另外本研究中 ARGs 相对丰度的降低与 Lin et al. (2020) 相似, 该研究发现酸性条件有助于 sulfonamide 抗性和整个抗性组的相对丰度的降低。这些研究显示酸化有降低抗生素抗性基因相对丰度的功能。

本研究发现 multidrug resistance genes, 如 *mdtB* 和 *mdtC* 占据最高相对丰度, multidrug resistance genes 基因占据最高相对丰度这一现象与很多相关研究的发现类似。如 Zhao et al. (2020) 和 Malik et al. (2017) 的研究就分别揭示了 multidrug resistance 在酸性土壤环境中占据着抗生素抗性组的主导地位, 这很可能是由于这些 multidrug RGs 具备维持酸性环境微生物生存所需要的多种功能, 如 pH 维持和重(类)金属抗性 (Teelucksingh et al., 2020; Zgurskaya et al., 2021)。尽管在本研究中, 总的 ARGs 的平均丰度呈现降低趋势, 但是 multidrug RGs 的总的平均相对丰度占比由背景土壤中的 $68.851\% \pm 6.099\%$ 上升至污染土壤中的 $84.129\% \pm 3.302\%$ 。因此, 在酸性环境中, 微生物群落倾向于增加多功能的 multidrug resistance genes 来适应酸性多金属环境胁迫。

3.4.2 AMD 污染对 MRGs 的影响

AMD 污染导致的 MRGs 平均相对丰度的增加主要归功于 Hg-resistance-related *merA*, multimetal(loid)-resistance-related *ruvB*, Fe-resistance-related *dpsA* 和 Hg-resistance-related *merT*。 *MerA* 编码 mercuric reductase (SM et al., 2006), 还参与 Au^{3+} 和 Au^+ 的还原 (Summers and Sugarman, 1974)。 *MerT* 编码一种参与 Hg(II) 抗性的内膜蛋白 (Hamlett et al., 1992), 它还参与 Cd 的转运 (Ohshiro et al., 2020)。黄铁矿是煤矿中的主要金属硫化矿, 同时也是毒性金属 Hg 的主要宿主, 黄铁矿的氧化性溶解释放了很多 Hg 进入环境, 刺激了群落中 *merA* 和 *merT* 丰度的增加, 以此来抵抗 Hg 的毒性。 *RuvB* 是一种多金属抗性基因, 能抗 Cr、Se 和 Te。 Fe-related *dpsA* 编码一种蛋白, 能保护染色体 DNA 免受氧化性损伤, 在营养贫

乏如缺少氮和磷等元素的环境中，其表达量会得到提升 (Michel et al., 2003)，基因 *dpsA* 的丰度在群落中增加能帮助群落在 AMD 这种典型的贫营养环境中生存 (Chen et al., 2016)。总的来说，微生物群落增加了多功能 MRGs 的相对丰度来适应多金属富集的 AMD 环境。

3.4.3 驱动抗性组多样性的关键因素

本研究发现 AMD 污染增加了 MRGs 平均相对丰度的同时，降低了 ARGs 的平均相对丰度。类似的，Xu et al. (2022) 的研究发现生物物理干燥能降低 ARGs 的丰度的同时，MRGs 的丰度得到了增加，研究者把这种现象归因于环境对 MRG 携带者的选择效应。

普氏分析 (Fig. 9) 显示群落与 MGEs 对 MRGs 比对 ARGs 有更强的相关性。群落与 MRGs 之间存在着与 ARGs 之间更高的相似性支持了 Xu et al. (2022) 的观点，即重(类)金属压力更加特异性地选择了 MRG 携带者。同时 MGEs 与 MRGs 之间更高的相似性显示 MGEs 介导了更多的 MRGs 在物种之间的水平转移。

这些发现显示微生物更加特异地通过 MRGs 的垂直和水平传播来增加群落对环境的适应。

3.4.4 AMD 污染对群落产能相关代谢的影响

KEGG 注释显示 AMD 污染刺激微生物群落产能代谢途径相对丰度的增加。有机碳或许来自于环境中无法适应环境的凋亡的细胞物质。同时硝酸盐和硫酸盐还原能力的增强也刺激了能量产生。类似的，Lopatkin et al. (2021) 也发现了由抗生素介导的代谢刺激现象。这些跟补偿代价理论一致。在补偿代价理论下，微生物要发挥抗生素抗性或者会扰乱重要的细胞过程，或者会引入大量的能量负担，因为很多抗生素作用于这些生理机制 (Melnyk et al., 2015)。同时，抗性机制如 multidrug 的多功能外排泵机制要发挥作用需要消耗能量 (Guazzaroni et al., 2013; Herren and Baym, 2022a; Nanda et al., 2019)。所以，在营养贫乏富含重(类)金属的 AMD 环境中，群落中的 RG 携带者必须通过刺激产能代谢来适应恶劣的环境 (Chen, L.X. et al., 2015)。

3.4.5 MAGs 之间的 HGT 事件

在 130 次 HGT 事件所涉及到的基因中没有注释到 RGs，这可能是由于我们仅回收了有限数量的 MAGs。大多数 COG 注释为产能和能量转运以及转移和核糖体结构和生源相关，而 KEGG 注释大多与基因信息处理、信号和细胞过程相关。这些注释结果显示除了 RGs，微生物还通过基因水平转移增强或获得其他能力，如酸抗性、金属转移和相关代谢能力以此来适应恶劣的 AMD 环境 (Chen et al., 2021; Guo et al., 2015)。

有好几个研究显示当对抗生素压力时，代谢相关基因(尤其是参与缓解能量压力有关)会通过由 plasmid 介导的 HGT 事件在群落之间被共享 (Chen, K. et al., 2015; Schlüter et al., 2003)。一项最近发表的研究也报道了当对抗生素压力时，临床上重要的大肠杆菌细胞内的接合质粒上广泛存在代谢基因。这些结果可能显示细胞代谢过程在抗生素或者金属抗性和提供选择优势方面发挥着未知的功能 (Palomino et al., 2023)。

本研究发现了类似的现象，即产能和信息处理相关的基因频繁参与到由 MGEs 介导的 HGT 事件中。这说明代谢相关基因可能确实存在着某些未知的抗性功能。

3.4.6 MRG 环境扩散风险

MRG 表达是微生物适应多金属环境的重要策略(Chandrangsu et al., 2017)。然而，很多重(类)金属如 As、Cd、Cu、Hg、Ag、Te 和 Zn 在临床上能发挥着类似于抗生素的功能 (Cheeseman et al., 2020)。这些已经导致重(类)金属抗性病原菌的出现，并引起对 MRG 环境扩散的担忧。本研究观察 AMD 污染显著增加了 MRGs 的平均相对丰度。所以类似地区的 MRGs 环境扩散风险也应该被慎重对待。

4 结论

当前的针对典型金属矿环境的抗性组特征研究忽略了煤矿环境, 该环境包含不同类型的重(类)金属, 因此也可能是潜在的 RG 源。本研究使用宏基因组学分析技术结合地球化学参数, 来调查一个煤矿酸性废水 passive treatment 中的 AMD 抗性组特征和变化。主要发现包括: (1) multidrug 外排机制占据抗生素抗性组的主体地位, 而重(类)金属抗性组拥有更多的多样性; (2) 微生物群落主要通过多功能 RGs 的水平转移来维持在 AMD 中的存活; (3) 在 AMD 中回收携带多重 RG 的病原菌, 说明煤矿酸性废水的排放必须受到监管, 来减小 ARG 环境扩散对人类健康带来的威胁。为了指导 AMD 处理, 更多针对 AMD passive treatment 对 ARGs 的处理研究必须得到开展。

针对矿区环境的抗性组研究主要集中在解析污染环境的抗性组特征, 少有研究对矿区环境和未明显受到采矿活动影响的环境进行比较分析, 这限制了对于采矿活动如何影响环境抗性组的理解。本研究通过比较分析受到 AMD 污染土壤样品和未明显受到 AMD 污染土壤样品的抗性组特征, 发现 AMD 污染降低了土壤抗生素抗性基因的平均相对丰度的同时, 增加了重(类)金属抗性基因和 MGEs 的平均相对丰度。和 AMD 的分析结果一致, 微生物群落和 MGEs 主要驱动着 MRGs 的变化, 而对 ARGs 的驱动效应相对较弱。此外, 代谢相关分析发现微生物群落通过增强产能代谢来适应 AMD 环境。进一步研究需要针对不同矿区环境开展更广泛的对照研究来获得采矿活动对抗性组影响的一般性结论。另外, 考虑到金属抗性病原菌已经出现, 对于矿区环境 MRGs 的环境扩散也需要得到应有的关注。

5 附录

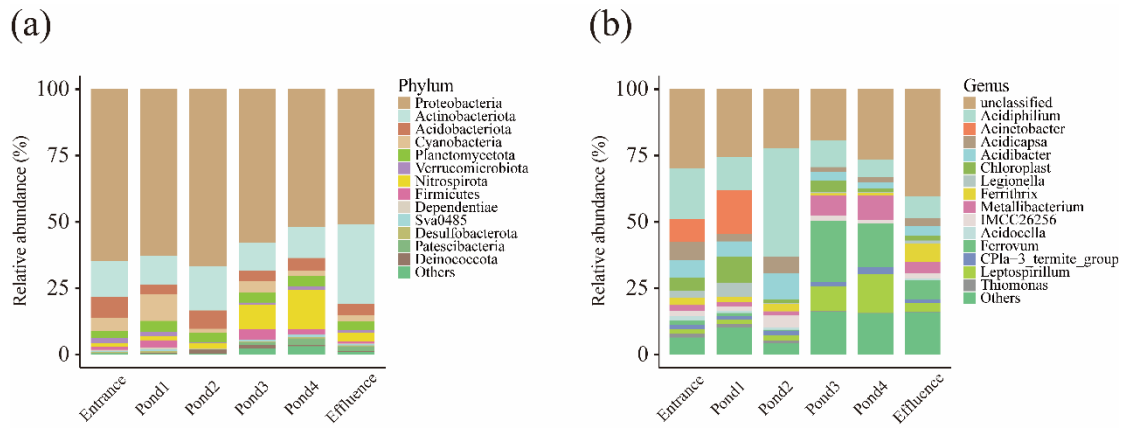


图 S1. 群落结构变化, (a) 门水平, (b) 属水平。

Figure S1. characteristics of microbial community at phylum level (a) and genus level (b).

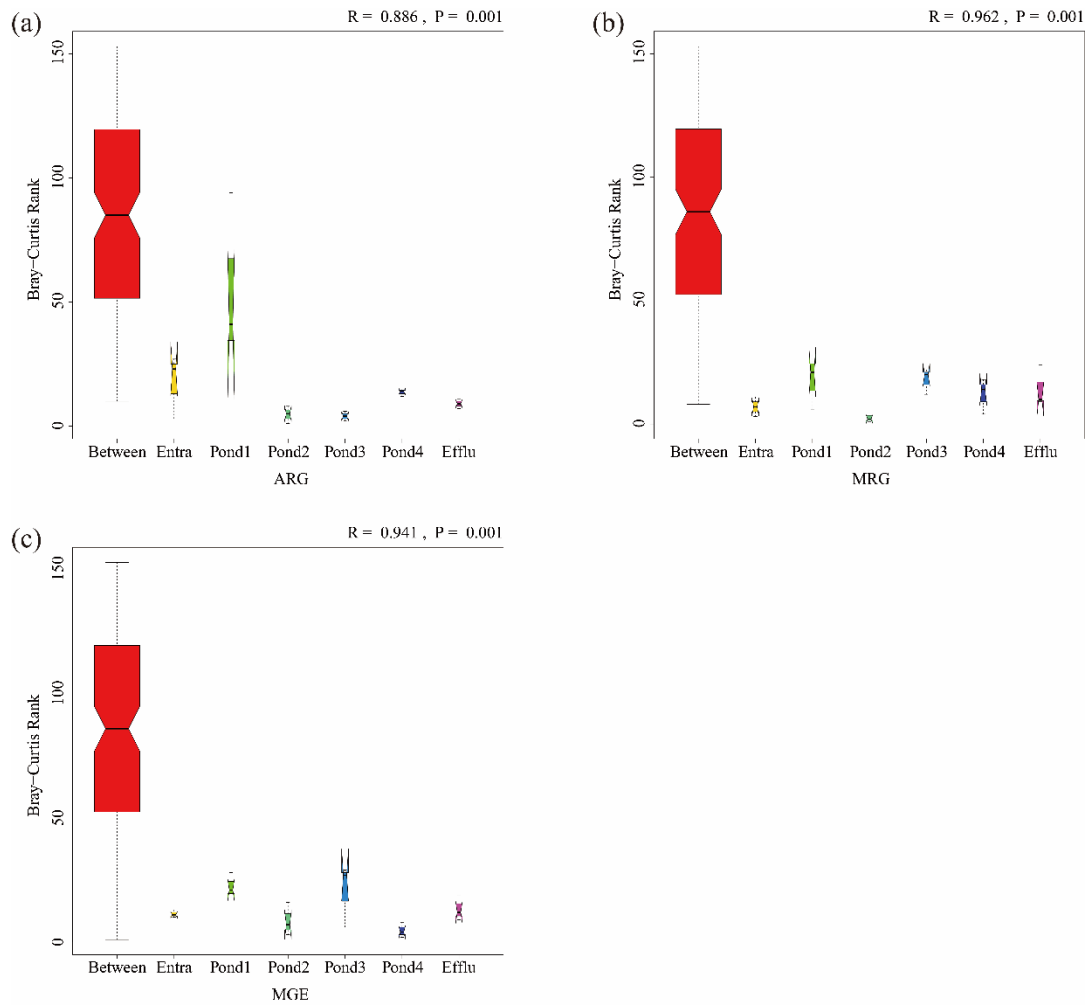


图 S2. ANOSIM 分析。(a)抗生素抗性基因, (b)(类)金属抗性基因, (c)移动元件。R > 0 代表组间差异大于组内差异, P 值代表显著性, Entra 代表 Entrance, Efflu 代表 Effluence。

Figure S2. ANOSIM analysis of (a) ARGs, (b) MRGs and (c) MGEs. R > 0 means that between group dissimilarities is bigger than within group dissimilarities, P value represents significance. Entra represents Entrance, and Efflu represents Effluence.

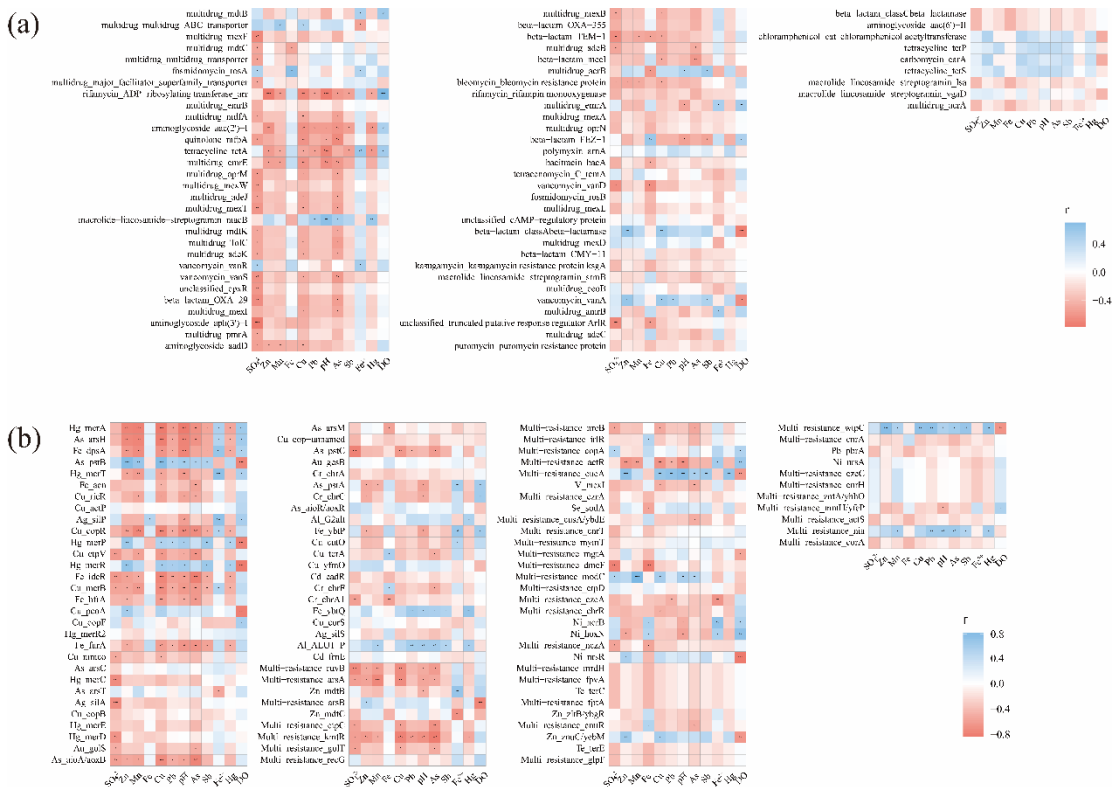


图 S3. 环境因子与抗生素抗性基因(a)和金属抗性基因(b)之间的相关性。灰色代表正相关, 蓝色代表负相关, 颜色的深浅代表相关系数的大小。*, **和***分别代表 P 值 <0.1, <0.05 以及<0.01。

Figure S3. Correlations between environmental parameters (including heavy metal(loid)s) and (a) ARGs or (b) MRGs by method of Spearman. Grey represented positive correlation and blue represented negative correlation, the depth of color represented correlation coefficient. *, ** and *** represented p -value of <0.1, <0.05 and <0.01 respectively. Three multidrug-related RGs *mdtB*, *mdtC* and *mexI* appeared at both (a) and (b), because they were annotated at both SARG database and BacMet database.

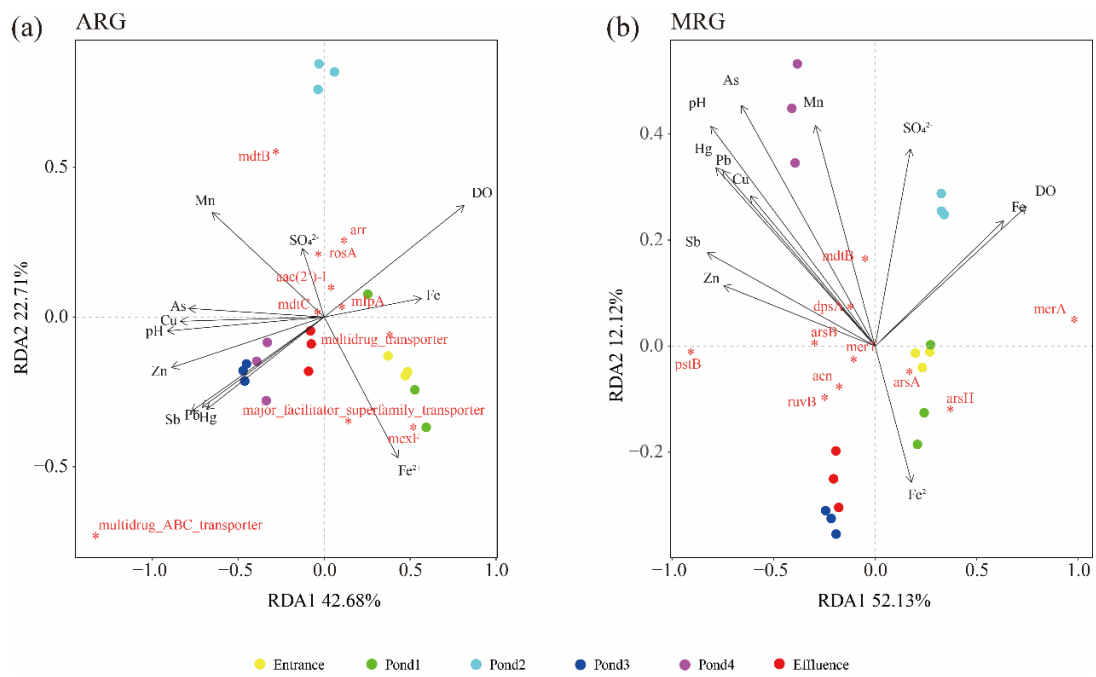


图 S4. RDA 分析。(a) 抗生素抗性基因与理化参数；(b) (类)金属抗性基因和理化参数。
Figure S4. RDA analysis (a) between ARGs and physicochemical parameters; (b) between MRGs and physicochemical parameters.

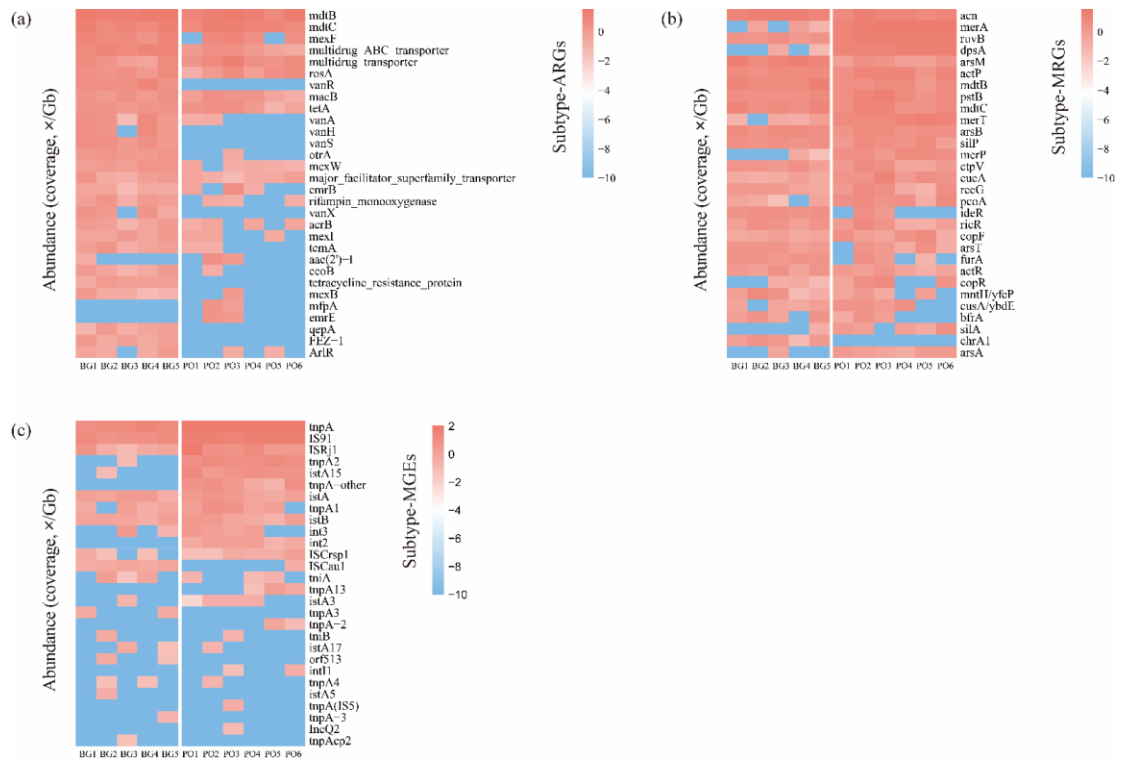


图 S5. (a) 抗生素抗性组的变化, (b) (类)金属抗性组的变化, (c) 移动元件的变化。(a)和(b)仅展示丰度最高的前 30 个抗性基因。

Figure S5. Variations of the (a) antibiotic resistome, (b) heavy metal(loid) resistome, and (c) MGEs between the background and AMD contaminated areas by subtype; (a) and (b) only show the top 30 RGs; BG represents the background samples, and PO represents the AMD contaminated samples.

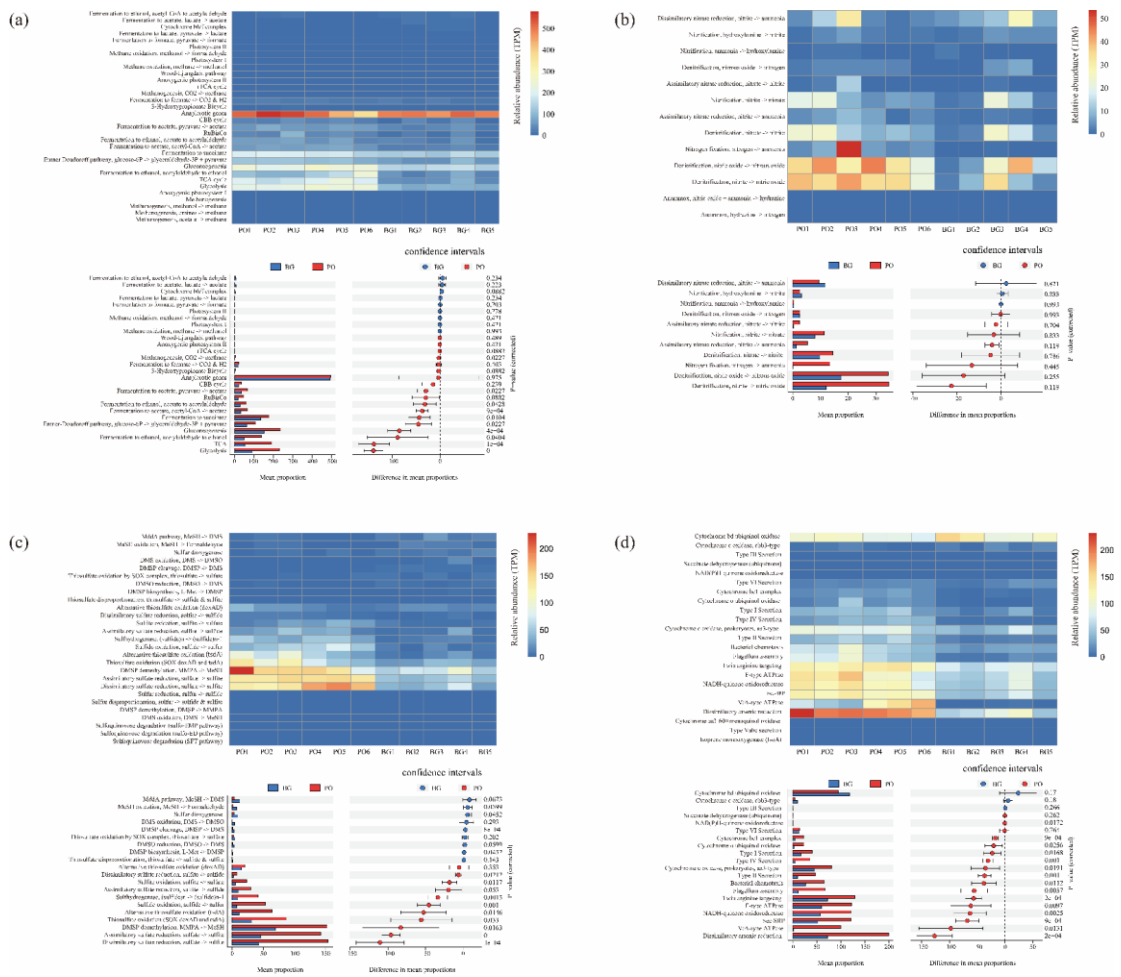


图 S6. (a) 碳循环代谢通路, (b) 氮循环代谢通路, (c) 硫循环代谢通路和 (d) 其它循环代谢通路。相对丰度单位为 TMP, P 值经过 BH 方法矫正。

Figure S6. Variations of the (a) carbon, (b) nitrogen, (c) sulfur, and (d) other metabolic pathways. The unit of relative abundance was TMP, and the P-value was adjusted using the BH method.

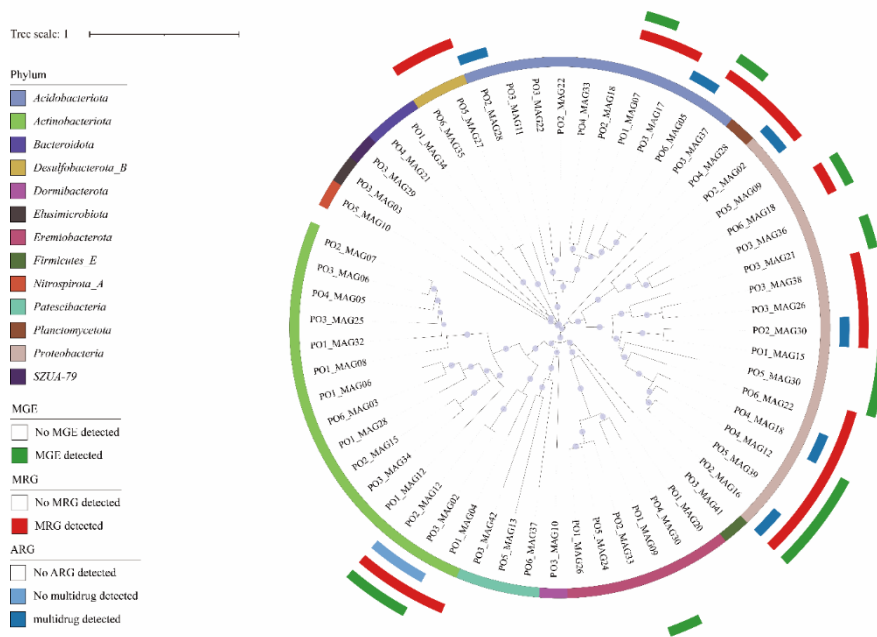


图 S7. 污染土壤样品中回收到的基因组(completeness >50% and contamination <5%)的物种与抗性基因注释。圈层由内向外，彩色条带、蓝色条带、红色条带和绿色条带分别代表代表每个基因组注释到的门分类、基因组注释到的抗生素抗性基因信息、基因组注释到的金属抗性基因信息以及移动元件信息。

Figure S7. The phylogenetic tree of dereplicated bacteria MAGs and resistance genes with a completeness >50% and contamination <5%. The colored bar of the first inner circle represents the phylum of every MAG, the blue bar of the second inner circle represents the ARG-carrying MAGs, the red bar of the third inner circle represents the MRG-carrying MAGs, and the green bar of the outer circle represents the MGE-carrying MAGs.

表 S1 抗生素抗性基因、(类)金属抗性基因和属水平群落结构网络图的拓扑结构参数信息。

Table S1 Topological properties of co-occurrence networks among ARGs, MRGs and Genus.

	Clustering coefficient	Average path length	Network diameter	Graph density
Whole network	0.594	4.218	13	0.084
Random network	0.0835±0.0033	2.1835±0.0034	3.4525±0.498	0.0835±0

The random network is an identically sized random network generated based on the Erdős-Rényi model; the topological properties are calculated as the average value of 10,000 random Erdős-Rényi networks. Table following S2 was the same.

表 S2 抗生素抗性基因、(类)金属抗性基因和移动元件网络图的拓扑结构参数信息。

Table S2 Topological properties of co-occurrence networks among ARGs, MRGs and MGEs.

	Clustering coefficient	Average path length	Network diameter	Graph density
Whole network	0.678	2.399	6	0.153
Random network	0.1524±0.0058	1.9363±0.0051	3.002±0.0447	0.1527±0

参考文献

Abo-Zed, A., Yassin, M., Phan, T., 2020. *Acinetobacter junii* as a rare pathogen of urinary tract infection. *Urol Case Rep* 32, 101209. <https://doi.org/10.1016/j.eucr.2020.101209>.

Aendekerk, S., Ghysels, B., Cornelis, P., Baysse, C., 2002. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology* 148(Pt 8), 2371-2381. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-8-2371>.

Akcil, A., Koldas, S., 2006. Acid Mine Drainage (AMD): causes, treatment and case studies. *Journal of Cleaner Production* 14(12), 1139-1145. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2004.09.006>.

Alav, I., Kobylka, J., Kuth, M.S., Pos, K.M., Picard, M., Blair, J.M.A., Bavro, V.N., 2021. Structure, Assembly, and Function of Tripartite Efflux and Type 1 Secretion Systems in Gram-Negative Bacteria. *Chemical Review* 121(9), 5479-5596. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00055>.

Ayobami, O., Brinkwirth, S., Eckmanns, T., Markwart, R., 2022. Antibiotic resistance in hospital-acquired ESKAPE-E infections in low- and lower-middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *Emerg. Microbes Infect.* 11(1), 443-451. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2030196>.

Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., Piddock, L.J.V., 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology* 13(1), 42-51. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3380>.

Bokulich, N.A., Kaehler, B.D., Rideout, J.R., Dillon, M., Bolyen, E., Knight, R., Huttley, G.A., Gregory Caporaso, J., 2018. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin. *Microbiome* 6(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0470-z>.

Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15), 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.

Bolyen, E., Rideout, J.R., Dillon, M.R., Bokulich, N.A., Abnet, C.C., Al-Ghalith, G.A., Alexander, H., Alm, E.J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J.E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C.J., Brown, C.T., Callahan, B.J., Caraballo-Rodríguez, A.M., Chase, J., Cope, E.K., Da Silva, R., Diener, C., Dorrestein, P.C., Douglas, G.M., Durall, D.M., Duvallet, C., Edwardson, C.F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J.M., Gibbons, S.M., Gibson, D.L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G.A., Janssen, S., Jarmusch, A.K., Jiang, L., Kaehler, B.D., Kang, K.B., Keefe, C.R., Keim, P., Kelley, S.T., Knights, D., Koester, I., Kosciolk, T., Kreps, J., Langille, M.G.I., Lee, J., Ley, R., Liu, Y.-X., Loftfield, E., Lozupone, C., Maher, M., Marotz, C., Martin, B.D., McDonald, D., McIver, L.J., Melnik, A.V., Metcalf, J.L., Morgan, S.C., Morton, J.T., Naimey, A.T., Navas-Molina, J.A., Nothias, L.F., Orchanian, S.B., Pearson, T., Peoples, S.L., Petras, D., Preuss, M.L., Pruesse, E., Rasmussen, L.B., Rivers, A., Robeson, M.S., Rosenthal, P., Segata, N., Shaffer, M., Shiffer, A., Sinha, R., Song, S.J., Spear, J.R., Swafford, A.D., Thompson, L.R., Torres, P.J., Trinh, P., Tripathi, A., Turnbaugh, P.J., Ul-Hasan, S., van der Hooft, J.J.J., Vargas, F., Vázquez-Baeza, Y., Vogtmann, E., von Hippel, M., Walters, W., Wan, Y., Wang, M., Warren, J., Weber, K.C., Williamson, C.H.D., Willis, A.D., Xu, Z.Z., Zaneveld, J.R., Zhang, Y., Zhu, Q., Knight, R., Caporaso, J.G., 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* 37(8), 852-857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>.

Bravakos, P., Mandalakis, M., Nomikou, P., Anastasiou, T.I., Kristoffersen, J.B., Stavroulaki, M., Kiliyas, S., Kotoulas, G., Magoulas, A., Polymenakou, P.N., 2021. Genomic adaptation of *Pseudomonas*

strains to acidity and antibiotics in hydrothermal vents at Kolumbo submarine volcano, Greece. *Scientific Reports* 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79359-y>.

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J., Holmes, S.P., 2016. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13(7), 581-583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.

Chandrangsu, P., Rensing, C., Helmann, J.D., 2017. Metal homeostasis and resistance in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 15(6), 338-350. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.15>.

Cheeseman, S., Christofferson, A.J., Kariuki, R., Cozzolino, D., Daeneke, T., Crawford, R.J., Truong, V.K., Chapman, J., Elbourne, A., 2020. Antimicrobial Metal Nanomaterials: From Passive to Stimuli-Activated Applications. *Advanced science* 7(10), 1902913. <https://doi.org/10.1002/advs.201902913>.

Chen, H.Y., Xiao, T.F., Ning, Z.P., Li, Q., Xiao, E.Z., Liu, Y.Z., Xiao, Q.X., Lan, X.L., Ma, L., Lu, F.H., 2020. In-situ remediation of acid mine drainage from abandoned coal mine by filed pilot-scale passive treatment system: Performance and response of microbial communities to low pH and elevated Fe. *Bioresour. Technol.* 317. <https://doi.org/ARTN12398510.1016/j.biortech.2020.123985>.

Chen, K., Xu, X., Zhang, L., Gou, Z., Li, S., Freilich, S., Jiang, J., 2015. Comparison of Four *Comamonas* Catabolic Plasmids Reveals the Evolution of pBHB To Catabolize Haloaromatics. *Appl. Environ. Microbiol.* 82(5), 1401-1411. <https://doi.org/10.1128/aem.02930-15>.

Chen, L.X., Hu, M., Huang, L.N., Hua, Z.S., Kuang, J.L., Li, S.J., Shu, W.S., 2015. Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses of microbial communities in acid mine drainage. *ISME J* 9(7), 1579-1592. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.245>.

Chen, L.X., Huang, L.N., Méndez-García, C., Kuang, J.L., Hua, Z.S., Liu, J., Shu, W.S., 2016. Microbial communities, processes and functions in acid mine drainage ecosystems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 38, 150-158. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.01.013>.

Chen, T., Liu, Y.-X., Huang, L., 2022. ImageGP: An easy-to-use data visualization web server for scientific researchers. *iMeta* 1(1), e5. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/imt2.5>.

Chen, X., Wang, J., Pan, C., Feng, L., Guo, Q., Chen, S., Xie, S., 2022. Metagenomic analysis reveals the response of microbial community in river sediment to accidental antimony contamination. *Sci. Total Environ.* 813, 152484. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152484>.

Chen, Z., Liu, W.S., Zhong, X., Zheng, M., Fei, Y.H., He, H., Ding, K., Chao, Y., Tang, Y.T., Wang, S., Qiu, R., 2021. Genome- and community-level interaction insights into the ecological role of archaea in rare earth element mine drainage in South China. *Water Res.* 201, 117331. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117331>.

Crofts, T.S., Gasparrini, A.J., Dantas, G., 2017. Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nature Reviews Microbiology* 15(7), 422-434. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.28>.

Daubin, V., Szöllösi, G.J., 2016. Horizontal Gene Transfer and the History of Life. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8(4), a018036. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018036>.

Deininger, K.N., Horikawa, A., Kitko, R.D., Tatsumi, R., Rosner, J.L., Wachi, M., Slonczewski, J.L., 2011. A requirement of TolC and MDR efflux pumps for acid adaptation and GadAB induction in *Escherichia coli*. *Plos One* 6(4), e18960. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018960>.

-
- Dopson, M., Holmes, D.S., 2014. Metal resistance in acidophilic microorganisms and its significance for biotechnologies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98(19), 8133-8144. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5982-2>.
- Forbes, B.A., 2017. Mycobacterial Taxonomy. *J. Clin. Microbiol.* 55(2), 380-383. <https://doi.org/10.1128/jcm.01287-16>.
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., Li, W., 2012. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics* 28(23), 3150-3152. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts565>.
- Furlan, J.P.R., Dos Santos, L.D.R., Moretto, J.A.S., Ramos, M.S., Gallo, I.F.L., Alves, G.A.D., Paulelli, A.C., Rocha, C.C.S., Cesila, C.A., Gallimberti, M., Devóz, P.P., Júnior, F.B., Stehling, E.G., 2020. Occurrence and abundance of clinically relevant antimicrobial resistance genes in environmental samples after the Brumadinho dam disaster, Brazil. *Sci. Total Environ.* 726, 138100. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138100>.
- Gaeta, N.C., de Carvalho, D.U., Fontana, H., Sano, E., Moura, Q., Fuga, B., Munoz, P.M., Gregory, L., Lincopan, N., 2022. Genomic features of a multidrug-resistant and mercury-tolerant environmental *Escherichia coli* recovered after a mining dam disaster in South America. *Sci. Total Environ.* 823, 153590. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153590>.
- Gruber-Vodicka, H.R., Seah, B.K.B., Pruesse, E., 2020. phyloFlash: Rapid Small-Subunit rRNA Profiling and Targeted Assembly from Metagenomes. *mSystems* 5(5). <https://doi.org/10.1128/mSystems.00920-20>.
- Guazzaroni, M.E., Morgante, V., Mirete, S., González-Pastor, J.E., 2013. Novel acid resistance genes from the metagenome of the Tinto River, an extremely acidic environment. *Environ. Microbiol.* 15(4), 1088-1102. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12021>.
- Guo, J., Wang, Q., Wang, X., Wang, F., Yao, J., Zhu, H., 2015. Horizontal gene transfer in an acid mine drainage microbial community. *BMC Genomics* 16(1), 496. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1720-0>.
- Hamlett, N.V., Landale, E.C., Davis, B.H., Summers, A.O., 1992. Roles of the Tn21 merT, merP, and merC gene products in mercury resistance and mercury binding. *J. Bacteriol.* 174(20), 6377-6385. <https://doi.org/10.1128/jb.174.20.6377-6385.1992>.
- Hendriksen, R.S., Munk, P., Njage, P., van Bunnik, B., McNally, L., Lukjancenko, O., Röder, T., Nieuwenhuijse, D., Pedersen, S.K., Kjeldgaard, J., Kaas, R.S., Clausen, P., Vogt, J.K., Leekitcharoenphon, P., van de Schans, M.G.M., Zuidema, T., de Roda Husman, A.M., Rasmussen, S., Petersen, B., Amid, C., Cochrane, G., Sicheritz-Ponten, T., Schmitt, H., Alvarez, J.R.M., Aidara-Kane, A., Pamp, S.J., Lund, O., Hald, T., Woolhouse, M., Koopmans, M.P., Vigre, H., Petersen, T.N., Aarestrup, F.M., 2019. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nat Commun* 10(1), 1124. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08853-3>.
- Herren, C.M., Baym, M., 2022a. Decreased thermal niche breadth as a trade-off of antibiotic resistance. *Isme J* 16(7), 1843-1852. <https://doi.org/10.1038/s41396-022-01235-6>.
- Herren, C.M., Baym, M., 2022b. Decreased thermal niche breadth as a trade-off of antibiotic resistance. *Isme J*. <https://doi.org/10.1038/s41396-022-01235-6>.
- Huang, L.N., Kuang, J.L., Shu, W.S., 2016. Microbial Ecology and Evolution in the Acid Mine Drainage Model System. *Trends Microbiol.* 24(7), 581-593. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.004>.
- Hyatt, D., Chen, G.L., Locascio, P.F., Land, M.L., Larimer, F.W., Hauser, L.J., 2010. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics* 11, 119. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119>.

-
- Imran, M., Das, K.R., Naik, M.M., 2019. Co-selection of multi-antibiotic resistance in bacterial pathogens in metal and microplastic contaminated environments: An emerging health threat. *Chemosphere* 215, 846-857. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.114>.
- Jia, B., Raphenya, A.R., Alcock, B., Waglechner, N., Guo, P., Tsang, K.K., Lago, B.A., Dave, B.M., Pereira, S., Sharma, A.N., Doshi, S., Courtot, M., Lo, R., Williams, L.E., Frye, J.G., Elsayegh, T., Sardar, D., Westman, E.L., Pawlowski, A.C., Johnson, T.A., Brinkman, F.S., Wright, G.D., McArthur, A.G., 2017. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res.* 45(D1), D566-d573. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1004>.
- Jiang, X., Liu, W., Xu, H., Cui, X., Li, J., Chen, J., Zheng, B., 2021. Characterizations of heavy metal contamination, microbial community, and resistance genes in a tailing of the largest copper mine in China. *Environ. Pollut.* 280, 116947. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116947>.
- Lee, L.J., Barrett, J.A., Poole, R.K., 2005. Genome-wide transcriptional response of chemostat-cultured *Escherichia coli* to zinc. *J. Bacteriol.* 187(3), 1124-1134. <https://doi.org/10.1128/jb.187.3.1124-1134.2005>.
- Lewenza, S., Johnson, L., Charron-Mazenod, L., Hong, M., O'Grady, H.M., 2020. Extracellular DNA controls expression of *Pseudomonas aeruginosa* genes involved in nutrient utilization, metal homeostasis, acid pH tolerance and virulence. *J. Med. Microbiol.* 69(6), 895-905. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001184>.
- Li, D., Liu, C.M., Luo, R., Sadakane, K., Lam, T.W., 2015. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics* 31(10), 1674-1676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033>.
- Li, L.G., Xia, Y., Zhang, T., 2017. Co-occurrence of antibiotic and metal resistance genes revealed in complete genome collection. *The ISME journal* 11(3), 651-662. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.155>.
- Lin, H., Sun, W., Yu, Q., Ma, J., 2020. Acidic conditions enhance the removal of sulfonamide antibiotics and antibiotic resistance determinants in swine manure. *Environ. Pollut.* 263(Pt A), 114439. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114439>.
- Liu, T., Liu, S., 2020. The impacts of coal dust on miners' health: A review. *Environ. Res.* 190, 109849. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109849>.
- Lopatkin, A.J., Bening, S.C., Manson, A.L., Stokes, J.M., Kohanski, M.A., Badran, A.H., Earl, A.M., Cheney, N.J., Yang, J.H., Collins, J.J., 2021. Clinically relevant mutations in core metabolic genes confer antibiotic resistance. *Science* 371(6531). <https://doi.org/10.1126/science.aba0862>.
- Ma, Q., Nie, W., Yang, S., Xu, C., Peng, H., Liu, Z., Guo, C., Cai, X., 2020. Effect of spraying on coal dust diffusion in a coal mine based on a numerical simulation. *Environ. Pollut.* 264, 114717. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114717>.
- Malik, A.A., Thomson, B.C., Whiteley, A.S., Bailey, M., Griffiths, R.I., 2017. Bacterial Physiological Adaptations to Contrasting Edaphic Conditions Identified Using Landscape Scale Metagenomics. *mBio* 8(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00799-17>.
- Melnyk, A.H., Wong, A., Kassen, R., 2015. The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evol Appl* 8(3), 273-283. <https://doi.org/10.1111/eva.12196>.
- Michel, K.P., Berry, S., Hifney, A., Kruij, J., Pistorius, E.K., 2003. Adaptation to iron deficiency: a comparison between the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942 wild-type and a DpsA-free mutant. *Photosynth Res* 75(1), 71-84. <https://doi.org/10.1023/a:1022459919040>.

Nanda, M., Kumar, V., Sharma, D.K., 2019. Multimetal tolerance mechanisms in bacteria: The resistance strategies acquired by bacteria that can be exploited to 'clean-up' heavy metal contaminants from water. *Aquat. Toxicol.* 212, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.04.011>.

Naveed, M., Chaudhry, Z., Bukhari, S.A., Meer, B., Ashraf, H., 2020. Chapter 19 - Antibiotics resistance mechanism, in: Hashmi, M.Z. (Ed.) *Antibiotics and Antimicrobial Resistance Genes in the Environment*. Elsevier, pp. 292-312. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818882-8.00019-X>.

O'Brien, L.M., Gordon, S.V., Roberts, I.S., Andrew, P.W., 1996. Response of *Mycobacterium smegmatis* to acid stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 139(1), 11-17. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1996.tb08173.x>.

Ohshiro, Y., Uruguchi, S., Nakamura, R., Takanezawa, Y., Kiyono, M., 2020. Cadmium transport activity of four mercury transporters (MerC, MerE, MerF and MerT) and effects of the periplasmic mercury-binding protein MerP on Mer-dependent cadmium uptake. *FEMS Microbiol. Lett.* 367(21). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa177>.

Okusu, H., Ma, D., Nikaido, H., 1996. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J. Bacteriol.* 178(1), 306-308. <https://doi.org/10.1128/jb.178.1.306-308.1996>.

Olm, M.R., Brown, C.T., Brooks, B., Banfield, J.F., 2017. dRep: a tool for fast and accurate genomic comparisons that enables improved genome recovery from metagenomes through de-replication. *Isme J* 11(12), 2864-2868. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.126>.

Pal, C., Asiani, K., Arya, S., Rensing, C., Stekel, D.J., Larsson, D.G.J., Hobman, J.L., 2017. Metal Resistance and Its Association With Antibiotic Resistance. *Adv. Microb. Physiol.* 70, 261-313. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2017.02.001>.

Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Rensing, C., Kristiansson, E., Larsson, D.G., 2014. BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database. *Nucleic Acids Res.* 42(Database issue), D737-743. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1252>.

Palomino, A., Gewurz, D., DeVine, L., Zajmi, U., Moralez, J., Abu-Rumman, F., Smith, R.P., Lopatkin, A.J., 2023. Metabolic genes on conjugative plasmids are highly prevalent in *Escherichia coli* and can protect against antibiotic treatment. *Isme J* 17(1), 151-162. <https://doi.org/10.1038/s41396-022-01329-1>.

Pan, Y., Ye, H., Li, X., Yi, X., Wen, Z., Wang, H., Lu, G., Dang, Z., 2021. Spatial distribution characteristics of the microbial community and multi-phase distribution of toxic metals in the geochemical gradients caused by acid mine drainage, South China. *Sci. Total Environ.* 774, 145660.

Parks, D.H., Chuvochina, M., Rinke, C., Mussig, A.J., Chaumeil, P.A., Hugenholtz, P., 2022. GTDB: an ongoing census of bacterial and archaeal diversity through a phylogenetically consistent, rank normalized and complete genome-based taxonomy. *Nucleic Acids Res.* 50(D1), D785-d794. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab776>.

Parks, D.H., Imelfort, M., Skennerton, C.T., Hugenholtz, P., Tyson, G.W., 2015. CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Res.* 25(7), 1043-1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>.

Pärnänen, K., Karkman, A., Hultman, J., Lyra, C., Bengtsson-Palme, J., Larsson, D.G.J., Rautava, S., Isolauri, E., Salminen, S., Kumar, H., Satokari, R., Virta, M., 2018. Maternal gut and breast milk microbiota affect infant gut antibiotic resistome and mobile genetic elements. *Nature Communications* 9(1), 3891. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06393-w>.

Patro, R., Duggal, G., Love, M.I., Irizarry, R.A., Kingsford, C., 2017. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat. Methods* 14(4), 417-419. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4197>.

Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H., Velázquez, E., 2009. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect Genet Evol* 9(6), 1132-1147. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.08.001>.

Proença, D.N., Fasola, E., Lopes, I., Morais, P.V., 2021. Characterization of the Skin Cultivable Microbiota Composition of the Frog *Pelophylax perezi* Inhabiting Different Environments. *Int J Environ Res Public Health* 18(5). <https://doi.org/10.3390/ijerph18052585>.

Qiao, L., Liu, X., Zhang, S., Zhang, L., Li, X., Hu, X., Zhao, Q., Wang, Q., Yu, C., 2021. Distribution of the microbial community and antibiotic resistance genes in farmland surrounding gold tailings: A metagenomics approach. *Sci. Total Environ.* 779, 146502. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146502>.

Robeson, M.S., 2nd, O'Rourke, D.R., Kaehler, B.D., Ziemski, M., Dillon, M.R., Foster, J.T., Bokulich, N.A., 2021. RESCRIPt: Reproducible sequence taxonomy reference database management. *PLoS Comput Biol* 17(11), e1009581. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009581>.

Roxas, B.A., Li, Q., 2009. Acid stress response of a mycobacterial proteome: insight from a gene ontology analysis. *Int J Clin Exp Med* 2(4), 309-328.

Rugh, C.L., Wilde, H.D., Stack, N.M., Thompson, D.M., Summers, A.O., Meagher, R.B., 1996. Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial *merA* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(8), 3182-3187. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.8.3182>.

Schaffner, S.H., Lee, A.V., Pham, M.T.N., Kassaye, B.B., Li, H., Tallada, S., Lis, C., Lang, M., Liu, Y., Ahmed, N., Galbraith, L.G., Moore, J.P., Bischof, K.M., Menke, C.C., Slonczewski, J.L., 2021. Extreme Acid Modulates Fitness Trade-Offs of Multidrug Efflux Pumps MdtEF-TolC and AcrAB-TolC in *Escherichia coli* K-12. *Appl. Environ. Microbiol.* 87(16), e0072421. <https://doi.org/10.1128/aem.00724-21>.

Schlüter, A., Heuer, H., Szczepanowski, R., Forney, L.J., Thomas, C.M., Pühler, A., Top, E.M., 2003. The 64 508 bp IncP-1beta antibiotic multiresistance plasmid pB10 isolated from a waste-water treatment plant provides evidence for recombination between members of different branches of the IncP-1beta group. *Microbiology (Reading)* 149(Pt 11), 3139-3153. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26570-0>.

Shahbaaz, M., Potemkin, V., Grishina, M., Bisetty, K., Hassan, I., 2020. The structural basis of acid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: insights from multiple pH regime molecular dynamics simulations. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 38(15), 4483-4492. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1682676>.

SM, N.C., Schaefer, J.K., Crane, S., Zylstra, G.J., Barkay, T., 2006. Analysis of mercuric reductase (*merA*) gene diversity in an anaerobic mercury-contaminated sediment enrichment. *Environ. Microbiol.* 8(10), 1746-1752. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01114.x>.

Song, J., Rensing, C., Holm, P.E., Virta, M., Brandt, K.K., 2017. Comparison of Metals and Tetracycline as Selective Agents for Development of Tetracycline Resistant Bacterial Communities in Agricultural Soil. *Environ. Sci. Technol.* 51(5), 3040-3047. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05342>.

Song, W., Wemheuer, B., Zhang, S., Steensen, K., Thomas, T., 2019. MetaCHIP: community-level horizontal gene transfer identification through the combination of best-match and phylogenetic approaches. *Microbiome* 7(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0649-y>.

-
- Stepanauskas, R., Glenn, T.C., Jagoe, C.H., Tuckfield, R.C., Lindell, A.H., McArthur, J.V., 2005. Elevated microbial tolerance to metals and antibiotics in metal-contaminated industrial environments. *Environ. Sci. Technol.* 39(10), 3671-3678. <https://doi.org/10.1021/es048468f>.
- Stookey, L.L., 1970. Ferrozine—A new spectrophotometric reagent for Iron. *Analytical Chemistry* 42(7).
- Summers, A.O., Sugarman, L.I., 1974. Cell-free mercury(II)-reducing activity in a plasmid-bearing strain of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 119(1), 242-249. <https://doi.org/10.1128/jb.119.1.242-249.1974>.
- Teelucksingh, T., Thompson, L.K., Cox, G., 2020. The Evolutionary Conservation of *Escherichia coli* Drug Efflux Pumps Supports Physiological Functions. *J. Bacteriol.* 202(22). <https://doi.org/10.1128/jb.00367-20>.
- Towner, K.J., 2009. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J. Hosp. Infect.* 73(4), 355-363. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.03.032>.
- Uritskiy, G.V., DiRuggiero, J., Taylor, J., 2018. MetaWRAP—a flexible pipeline for genome-resolved metagenomic data analysis. *Microbiome* 6(1), 158. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0541-1>.
- Wales, A.D., Davies, R.H., 2015. Co-Selection of Resistance to Antibiotics, Biocides and Heavy Metals, and Its Relevance to Foodborne Pathogens. *Antibiotics (Basel)* 4(4), 567-604. <https://doi.org/10.3390/antibiotics4040567>.
- Wenhua, L., Ruming, Z., Zhixiong, X., Xiangdong, C., Ping, S., 2003. Effects of La³⁺ on growth, transformation, and gene expression of *Escherichia coli*. *Biol. Trace Elem. Res.* 94(2), 167-177. <https://doi.org/10.1385/BTER:94:2:167>.
- Wozniak, R.A.F., Waldor, M.K., 2010. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nature Reviews Microbiology* 8(8), 552-563. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2382>.
- Xin, R., Banda, J.F., Hao, C., Dong, H., Pei, L., Guo, D., Wei, P., Du, Z., Zhang, Y., Dong, H., 2021. Contrasting seasonal variations of geochemistry and microbial community in two adjacent acid mine drainage lakes in Anhui Province, China. *Environ. Pollut.* 268(Pt A), 115826. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115826>.
- Xu, S., Liu, Y., Wang, R., Zhang, T., Lu, W., 2022. Behaviors of antibiotic resistance genes (ARGs) and metal resistance genes (MRGs) during the pilot-scale biophysical drying treatment of sewage sludge: Reduction of ARGs and enrichment of MRGs. *Sci. Total Environ.* 809, 152221. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152221>.
- Xue, C.X., Lin, H., Zhu, X.Y., Liu, J., Zhang, Y., Rowley, G., Todd, J.D., Li, M., Zhang, X.H., 2021. DiTing: A Pipeline to Infer and Compare Biogeochemical Pathways From Metagenomic and Metatranscriptomic Data. *Front Microbiol* 12, 698286. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.698286>.
- Yang, H.C., Rosen, B.P., 2016. New mechanisms of bacterial arsenic resistance. *Biomed J* 39(1), 5-13. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2015.08.003>.
- Yi, X., Liang, J.L., Su, J.Q., Jia, P., Lu, J.L., Zheng, J., Wang, Z., Feng, S.W., Luo, Z.H., Ai, H.X., Liao, B., Shu, W.S., Li, J.T., Zhu, Y.G., 2022. Globally distributed mining-impacted environments are underexplored hotspots of multidrug resistance genes. *Isme J* 16(9), 2099-2113. <https://doi.org/10.1038/s41396-022-01258-z>.
- Yin, X., Jiang, X.T., Chai, B., Li, L., Yang, Y., Cole, J.R., Tiedje, J.M., Zhang, T., 2018. 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. *Bioinformatics* 34(13), 2263-2270. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty053>.

Yu, E.W., McDermott, G., Zgurskaya, H.I., Nikaido, H., Koshland, D.E., Jr., 2003. Structural basis of multiple drug-binding capacity of the AcrB multidrug efflux pump. *Science* 300(5621), 976-980. <https://doi.org/10.1126/science.1083137>.

Zagui, G.S., Moreira, N.C., Santos, D.V., Darini, A.L.C., Domingo, J.L., Segura-Muñoz, S.I., Andrade, L.N., 2021. High occurrence of heavy metal tolerance genes in bacteria isolated from wastewater: A new concern? *Environ. Res.* 196, 110352. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110352>.

Zhao, R., Yu, K., Zhang, J., Zhang, G., Huang, J., Ma, L., Deng, C., Li, X., Li, B., 2020. Deciphering the mobility and bacterial hosts of antibiotic resistance genes under antibiotic selection pressure by metagenomic assembly and binning approaches. *Water Res.* 186, 116318. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116318>.

Zhao, X., Shen, J.P., Zhang, L.M., Du, S., Hu, H.W., He, J.Z., 2020. Arsenic and cadmium as predominant factors shaping the distribution patterns of antibiotic resistance genes in polluted paddy soils. *J. Hazard. Mater.* 389, 121838. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121838>.

Zhou, L., Xu, P., Gong, J., Huang, S., Chen, W., Fu, B., Zhao, Z., Huang, X., 2022. Metagenomic profiles of the resistome in subtropical estuaries: Co-occurrence patterns, indicative genes, and driving factors. *Sci. Total Environ.* 810, 152263. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152263>.

Zhuang, M., Achmon, Y., Cao, Y., Liang, X., Chen, L., Wang, H., Siame, B.A., Leung, K.Y., 2021. Distribution of antibiotic resistance genes in the environment. *Environ. Pollut.* 285, 117402. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117402>.

致谢

临近博后出站，回想两年半的博后经历，收获满满。

生活上，我认识了很多优秀的博士后同事们，在和他们的交流过程中，我体会到不一样的各具特色的人生经历。在和实验室的师弟师妹们一起工作与生活过程中也收获了很多乐趣。在技能方面，我掌握了宏基因组分析技术和基本的服务器使用技术，使得我有能力独立完成宏基因组分析工作。在科研成果方面，我开始接触此前从未了解过的矿区抗性组研究，并发表了两篇环境微生物文章。

在这里我首先需要感谢我的博士后合作导师郝立凯研究员。在北京与郝老师初次相识的时候，我正处于对未来职业发展的迷茫之中。郝老师给了我机会，让我先来贵阳地球化学研究所做博士后，让我缓冲一下，借机好好思考将来的打算。博后期间，郝老师全力支持我开展工作，并专门配备了服务器，供我学习相关服务器操作技能与宏基因组分析方法。在研究遇到困难的时候，郝老师支持我一如既往地干下去，在我对发表文章选择期刊信心不足的时候，也是郝老师支持我要对结果充满信心。最后总算得到了较好的结果，这些离开了郝老师的支持，是绝对达不到的。在此，衷心感谢郝立凯老师对我的信任与支持，使得我能比较圆满的结束博士后工作。

还需要感谢姜成英老师对我论文的修改过程中给予的帮助，姜成英老师在我研究生阶段就对我有所照顾。此外，还需要感谢地球化学研究所工作人员对我的帮助，比如帮我办理进站手续的胡晓燕老师、帮我办理薪酬的杨小力老师等。

两年半的博后经历无疑增加了我对环境微生物领域的研究宽度，也增强了利用生物信息学技能解决问题的能力。这些技能和成果将有利于我将来的职业发展。这两年半的经历是我人生中宝贵的一笔财富。在此，再次感谢这两年半的时间里，在我成长道路上给予我帮助的所有人。

博士后期间发表的学术论文

论文信息 1: Coal-source acid mine drainage reduced the soil multidrug-dominated antibiotic resistome but increased the heavy metal(loid) resistome and energy production-related metabolism. *Science of the Total Environment*.

论文链接 1: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162330>

论文信息 2: Metagenomic analysis characterizes resistomes of an acidic, multimetal (loid)-enriched coal source mine drainage treatment system. *Journal of Hazardous Materials*.

论文链接 2: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.130898>