ICS 65 020 01
CCS B 10

T/JAASS

团 体 标 准

T/JAASS XXXX—2024

蔬菜产地土壤和产品中抗性因子的健康风险评价技术规范

Qualitative standard for assess the human health risk of antimicrobial resistance determinants from soils and the vegetables

（征求意见稿）

2024－XX－XX 发布 2024－XX－XX 实施

江苏省农学会 发 布

目　　次

前言 II
1　范围 1
2　规范性引用文件 1
3　术语和定义 1
4　设备和工具、材料 1
5　试验程序 2
6　样品采集和制备 2
7　测定分析 2
8　判定规则 4

前　　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则　第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所提出。

本文件由江苏省农学会归口。

本文件起草单位：江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所，生态环境部南京环境科学研究所。

本文件主要起草人：何涛、魏瑞成、吉星、李俊、张莉莉、王冉、王娜。

蔬菜产地土壤和产品中抗性因子的健康风险评价技术规范

1 范围

本文件规定了蔬菜产地土壤和产品中抗性因子的健康风险评价的术语和定义、设备和材料、试验程序、样品采集和制备、测定分析及判定规则。

本文件适用于蔬菜产地土壤和产品中抗性因子对人类健康危害风险的定性分级评价。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 4789.1-2016 食品微生物学检验 总则

GB 19489-2008 实验室 生物安全通用要求

HJ/T 166-2004 土壤环境监测技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

抗性因子

又称耐药性决定因子或抗生素耐药基因（ARG），指微生物编码的可以对抗菌药物产生耐药性或敏感性下降的基因。

3.2

健康风险

是指抗性基因通过土壤传递给蔬菜产品，进而可能对人类健康造成风险。

3.3

移动元件

是指携带抗性因子的可移动遗传元件，包括整合子、转座子、质粒、基因岛等。

3.4

ESKAPE 病原菌

包括屎肠球菌(E)、金黄色葡萄球菌(S)、肺炎克雷伯菌(K)、鲍曼不动杆菌(A)、铜绿假单胞菌(P)和肠杆菌科细菌(E)。

4 设备和工具、材料

4.1 设备

——均质仪；

——Nanodrop 核酸浓度测定仪；

——微量移液器：0.1μL～2.5μL、1μL～10μL、10μL～100μL、100μL～1000μL；

——电子天平：感量 0.001g；

——水浴锅；

——生物信息学服务器。

4.2 工具和材料

——铁铲、圆形取土钻；
——无菌采集袋；
——剪刀；
——商品化土壤 DNA 提取试剂盒。

5 试验程序

蔬菜产地土壤和产品中抗性因子人类健康风险分级试验流程如图 1 所示。

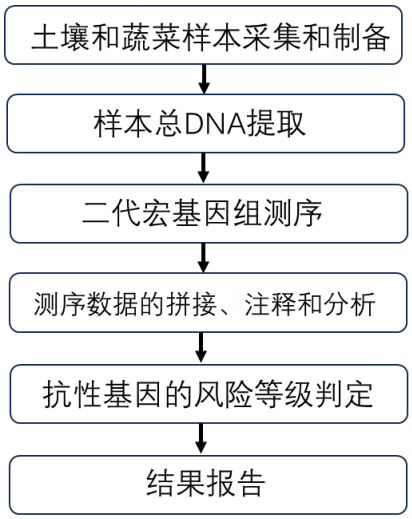

图1 蔬菜土壤抗性因子人类健康风险分级试验流程

6 样品采集和制备

6.1 样品采集

6.1.1 土壤

为了保证样品的代表性和随机性，每个土壤单元设3个～7个采样区，单个采样区是自然分割的一个田块，每个采样区的样品为蔬菜土壤的混合样，参照HJ/T 166 -2004，可采用对角线法、梅花点法、棋盘式法、蛇形法设计样品点，采集土壤的深度为10cm左右，每个点采集土壤1g，混合均匀后作为1个样本，放入无菌采样袋中，标记信息，密封后-20℃冷藏。

6.1.2 蔬菜

采集不同类型蔬菜的对应食用部分（果实或茎叶等），每种类型的蔬菜采集10g，将其放入无菌袋中，标记信息，密封后-20℃冷藏。

6.2 样品运输

采集的样品按GB 4789.1要求运达检验单位，运输时间不超过24h，运输工具应保持清洁，运输过程中应防止包装破损导致样品渗漏。

6.3 样品制备和保存

样品运回实验室时，应确认样品完好情况。

对于土壤样本，不用进行预处理可直接提取总DNA。对于蔬菜样本，需要进行样本预处理。用已灭菌的 Milli-Q 水清洗蔬菜，直至眼观达到家常做菜洗菜的清洁程度，加入500mL0.85%无菌生理盐水，置于摇床震荡15min。震荡产生的洗液过0.45μm滤膜收集菌体，用真空泵抽干后置于-80℃以备总DNA的提取。

7 测定分析

7.1 样本总 DNA 提取及测序

使用商品化土壤总DNA提取试剂盒提取土壤和预处理后蔬菜样本的总DNA，使用nanodrop仪测定所提取总DNA的浓度和纯度，经测定需要满足总DNA含量>2μg，同时OD260/OD280介于1.6～2.0之间。将检测合格的DNA样本送至测序公司进行二代宏基因组测序，每个样品测序的数据量为10G。

7.2 宏基因组数据拼接、注释和分析

使用本地生物信息学分析平台或委托生物技术公司开展宏基因组数据的拼接、注释和分析。

原始数据质控：根据Index序列区分各个样品的数据，提取出的数据以fastq 格式保存，获得原始数据raw data。数据过滤及质量控制：去除含N碱基的reads，对序列3’端和5’端进行质量控制并去除所含低质量碱基（fastqc, https://github.com/s-andrews/FastQC; Trimmomatic, http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic ）。

序列拼接与基因预测 ：（1）序列拼接组装：基于De-Brujin graph原理，对过滤后的序列进行拼接组装，根据k-mer间的重叠（overlap）关系，构建De-Brujin graphs，获得contigs；把reads mapping到contig上，根据成对reads之间的双端（pair-end）关系把contigs构建成scaffolds（megahit, https://github.com/voutcn/megahit ）。拼接主要参数为megahit默认参数。（2）基因预测：对拼接结果中的 contig 进行 ORF 预测（Prodigal https://github.com/hyattpd/Prodigal ），选择核酸长度大于等于100bp的基因，并将其翻译为氨基酸序列。

基因丰度计算：分别将每个样品的高质量reads与组装的contigs进行比对并计算丰度，统计注释的不同基因在对应样品中的丰度信息（Bowtie2, https://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml ）。

物种分类学注释：将不同样本的宏基因组测序数据集中的每个序列进行k-mer切割，然后将这些k-mer序列与物种参考数据库中的k-mer序列进行比对。通过比对这些k-mer序列，快速地确定宏基因组数据中包括那些微生物物种（Kraken2，https://github.com/DerrickWood/kraken2 ）。

耐药基因注释： 使用 CARD （ https://card.mcmaster.ca/ ） 与 ResFinder (http://genepi.food.dtu.dk/resfinder) 数据库组建本地耐药基因数据库。使用diamond (https://github.com/bbuchfink/diamond) 进行蛋白和DNA 的快速比对，比对参数可用默认参数，或自定义为期望值e-value为1e-9，identity为80%，coverage为80%。获得对应的抗生素耐药功能注释信息，使用Bowtie2（https://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml ）计算该耐药基因的丰度。耐药基因在样品中的相对丰度使用“TPM”表示，其定义为：每百万reads中对应某耐药基因的reads数。

可移动元件注释：使用promge 数据库（https://promge.embl.de/ ）建立本地可移动元件数据库（包括质粒，转座子，插入序列等），使用diamond (https://github.com/bbuchfink/diamond) 进行蛋白和DNA 的快速比对，比对参数可用默认参数，或自定义为期望值e-value为1e-9，identity为80%，coverage 为 80%。获得对应的可移动元件的注释信息。使用 Bowtie2 （ https://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml ）计算该可移动元件的丰度。可移动元件在样品中的相对丰度使用“TPM”表示，其定义为：每百万reads中对应某耐药基因的reads数。

耐药基因，可移动元件和宿主的共存情况分析，使用两种方法进行分析：（1）根据耐药基因，可移动元件和微生物物种注释信息，获得相对应的contigs位置和序列信息。单独对contigs进行功能注释（RAST, https://rast.nmpdr.org/ ）和NCBI BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) 分析，分析耐药基因，可移动元件和微生物物种的在共存情况。（2）根据耐药基因，可移动元件和微生物物种的丰度信息，使用SPSS软件进行person 相关性分析，计算耐药基因、可移动元件和微生物物种之间的相关性值 r，一般相关系数计算结果 p 值小于0.05，且 r 的绝对值在0.8以上，认为有强相关性；0.4 到 0.8 之间，认为有中等相关性；0.4 以下认为有弱相关性（参考 https://rpubs.com/stong/stats ）。本标准只统计具有强相关性的信息来评估耐药基因，可移动元件和微生物物种之间的共存情况。两种方法互为补充，取并集进行最终的共存情况判定。

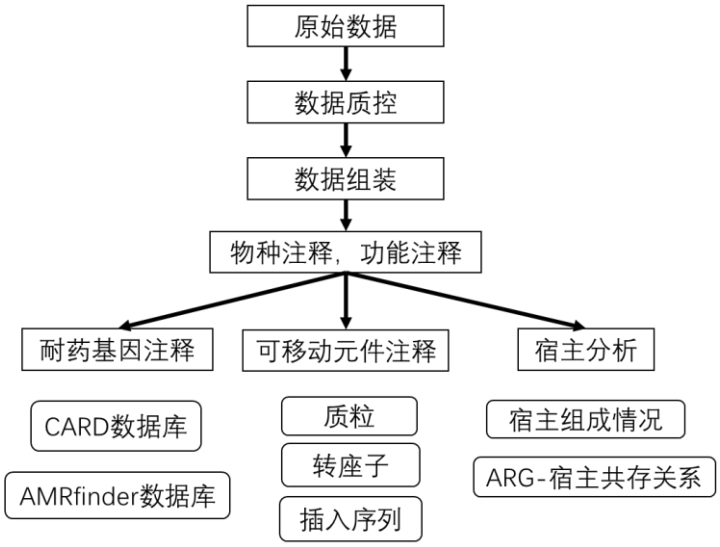

图2　宏基因组数据分析流程

8　判定规则

根据抗性因子是否在土壤和蔬菜中同时检出、抗性因子的可转移性、抗性因子是否位于ESKAPE病原菌中，将其分为四个人类健康风险等级（图3）：

IV级：仅在土壤中检出、而在蔬菜中没有检出的抗性因子；

III级：同时在土壤和蔬菜中检出的抗性因子；

II级： 同时在土壤和蔬菜中检出或仅在蔬菜中检出的抗性因子，且抗性因子定位于可移动的元件上；

I级：同时在土壤和蔬菜中检出或仅在蔬菜中检出的抗性因子，且抗性因子定位于可移动的元件上，同时抗性因子的携带菌为ESKAPE病原菌。

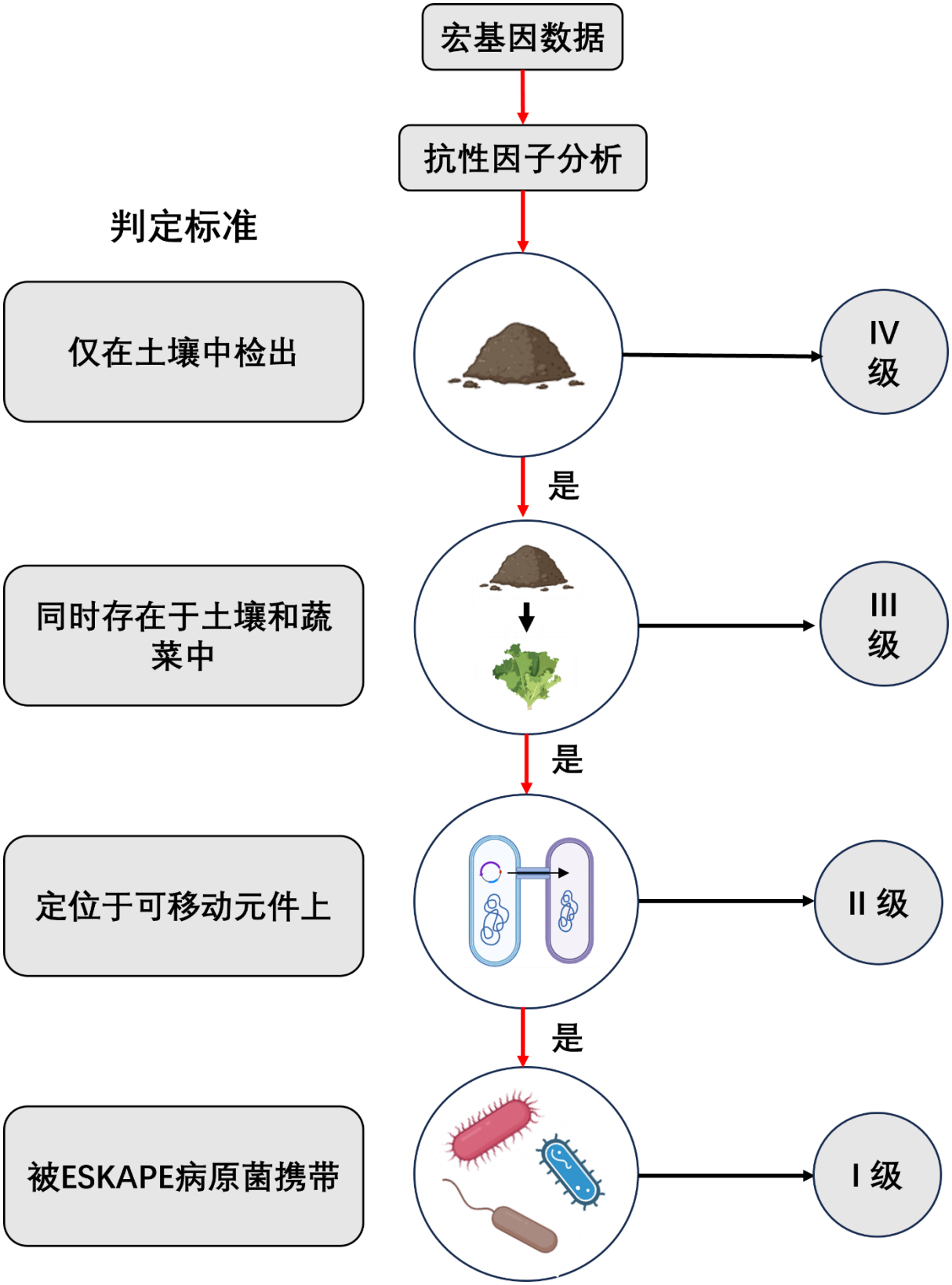

图3　抗性因子人类健康风险分级判定规则