

研究报告

昆明越冬红嘴鸥粪便潜在病原细菌及耐药基因与毒力因子组成

陈秀¹, 何江波¹, 任禛², 曹艳茹², 曹丽琰¹, 魏云芳¹, 王纪爱¹, 孔璟¹, 柴雁菁^{*1}

1 昆明学院医学院, 云南 昆明 650214

2 昆明学院农学与生命科学学院, 云南 昆明 650214

陈秀, 何江波, 任禛, 曹艳茹, 曹丽琰, 魏云芳, 王纪爱, 孔璟, 柴雁菁. 昆明越冬红嘴鸥粪便潜在病原细菌及耐药基因与毒力因子组成[J]. 微生物学通报, 2024, 51(6): 1898-1916.

CHEN Xiu, HE Jiangbo, REN Zhen, CAO Yanru, CAO Liyan, WEI Yunfang, WANG Ji'ai, KONG Jing, CHAI Yanjing. Potential pathogenic bacteria, antibiotic resistance genes, and virulence factors from the feces of *Chroicocephalus ridibundus* overwintering in Kunming[J]. Microbiology China, 2024, 51(6): 1898-1916.

摘要:【背景】昆明越冬红嘴鸥数量庞大且常与人近距离接触, 其粪便细菌对人们有无感染威胁一直是关注焦点之一。【目的】探究红嘴鸥粪便中存在的潜在病原细菌及耐药表型、耐药基因与毒力因子。【方法】纯培养法分离鉴定粪便中的细菌, 并对其中的部分病原细菌进行耐药表型分析; 宏基因组测序检测红嘴鸥粪便样本中的潜在病原细菌以及耐药和毒力因子。【结果】纯培养分离发现红嘴鸥粪便中优势潜在病原细菌为粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、威隆气单胞菌(*Aeromonas veronii*)、福氏志贺菌(*Shigella flexneri*)等; 免培养方法检测到更多潜在病原细菌种, 优势种为大肠埃希菌(*Escherichia coli*)、阿尔伯特埃希菌(*Escherichia albertii*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)等, 但这些也是人和动物肠道常见菌种; 红嘴鸥粪便和滇池水中部分纯培养潜在病原细菌耐药表型不严重, 但免培养检测到丰富的耐药与毒力因子, 关联分析发现其来源菌种广, 并不局限于病原细菌种, 不过相似度覆盖度高的耐药基因中并未见临床关注耐药基因; 此外, 红嘴鸥粪便和滇池水中许多病原细菌所在属耐药基因含量相关性高。【结论】红嘴鸥粪便中未分离检测到二类病原细菌, 也未发现临床常见病原细菌种同时具有临床关注的耐药情况, 推测其粪便菌群对免疫力正常人群无感染威胁。

关键词: 红嘴鸥; 潜在病原细菌; 耐药基因; 毒力因子; 宏基因组测序

资助项目: 昆明市春城计划青年拔尖人才项目(C201914001); 云南省万人计划(YNWR-QNBJ-2020-096); 云南省地方本科高校基础研究联合专项(202301AT070051, 202101BA070001-035, 202001BA070001-238)

This work was supported by the Spring City Project for Young Top Talents (C201914001), the Ten-thousand Talents Program of Yunnan Province (YNWR-QNBJ-2020-096), and the Basic Research of Joint Special Projects of Universities in Yunnan Province (202301AT070051, 202101BA070001-035, 202001BA070001-238).

*Corresponding author. E-mail: chaiyanjing@126.com

Received: 2023-12-21; Accepted: 2024-02-05; Published online: 2024-03-25

Potential pathogenic bacteria, antibiotic resistance genes, and virulence factors from the feces of *Chroicocephalus ridibundus* overwintering in Kunming

CHEN Xiu¹, HE Jiangbo¹, REN Zhen², CAO Yanru², CAO Liyan¹, WEI Yunfang¹,
WANG Ji'ai¹, KONG Jing¹, CHAI Yanjing^{*1}

¹ School of Medicine, Kunming University, Kunming 650214, Yunnan, China

² School of Agriculture and Life Sciences, Kunming University, Kunming 650214, Yunnan, China

Abstract: [Background] A large number of black-headed gulls (*Chroicocephalus ridibundus*) overwinter in Kunming and have close contact with people. Whether their fecal bacteria can be a source of infections or not arouses public concern. **[Objective]** To explore the potential pathogenic bacteria, antibiotic resistance genes (ARGs), and virulence factors (VFs) in the feces of *C. ridibundus*. **[Methods]** Firstly, the bacteria in the feces were isolated and identified, and the antibiotic resistance of some potential pathogens was examined. Secondly, metagenomic sequencing was employed to detect the potential pathogens, ARGs, and VFs in the feces. **[Results]** *Enterococcus faecalis*, *Aeromonas veronii*, and *Shigella flexneri* were the main potential pathogenic bacteria detected by the isolation method, and *Escherichia coli*, *Escherichia albertii*, and *Enterococcus faecium* were the main potential pathogenic bacteria detected by metagenomic sequencing. These bacteria were frequently detected in the intestines of other animals and humans. Some isolated potential pathogenic bacteria were resistant to few antibiotics. The ARGs and VFs detected through metagenomic sequencing were abundant and had rich sources in addition to potential pathogenic bacteria. However, the ARGs receiving clinical concerns were not detected with high identity and coverage. In addition, some potential pathogenic bacterial genera and ARGs had high associations between the feces and the water in the Dianchi Lake. **[Conclusion]** No pathogenic bacteria belonging to the risk group II (China) or the ARGs arousing clinical concern were detected in the feces of *C. ridibundus*. Therefore, we conclude that the bacteria from the feces of *C. ridibundus* do not pose an infection threat to healthy people.

Keywords: *Chroicocephalus ridibundus*; potential pathogenic bacteria; antibiotic resistance gene; virulence factor; metagenomic sequencing

近年来, 候鸟对病原细菌和细菌耐药性的传播逐渐引起人们重视, 而其中分布广、数量庞大的鸥属鸟类常携带较其他候鸟更丰富的机会病原细菌或耐药菌, 可能给人类健康和生态环境带来威胁^[1-3]。Liao 等分离 500 份红嘴鸥粪便的常见肠道致病菌发现, 主要为肠致病性大肠埃

希菌(enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC)、沙门菌(*Salmonella* spp.)、气单胞菌(*Aeromonas* spp.)、肠杆菌(*Enterobacter* spp.)等^[4]。Leévesque 等也在环嘴鸥粪便中分离到较多沙门菌和气单胞菌^[5]。Jarma 等基于 16S rRNA 基因高通量检测发现黄腿鸥肠道含不动杆菌(*Acinetobacter*

spp.)、肠球菌(*Enterococcus* spp.)、肠杆菌科细菌(*Enterobacteriaceae*)、假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)、葡萄球菌(*Staphylococcus* spp.)等常见人类病原细菌,且通过 qPCR 检测到 *int11*、*sul1*、*bla_{TEM}*、*bla_{KPC}*、*bla_{NDM}*、*tetW*、*qnrS*、*mcr-1* 等耐药基因^[1]。李娟等针对昆明滇池红嘴鸥粪便分离去重复后得到 7 株菌,鉴定为大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*)、氧化克雷伯菌(*Klebsiella oxytosis*),不过该 7 株菌未表现出明显耐药^[6]。可见这些鸥属鸟类粪便可能携带人类潜在病原细菌,但这些研究主要基于有限纯培养分离或 16S rRNA 基因测序手段^[4,6],获得病原细菌及耐药基因信息有限。环境宏基因组测序不仅能对环境物种信息进行检测,还能对环境耐药基因、毒力因子、功能基因等进行检测,近年来已用于检测鸟类微生物组与耐药基因组^[7]。

红嘴鸥(*Chroicocephalus ridibundus*)隶属于鸥形目鸥科鸥属,是一种世界性分布鸟类,繁殖于古北界,南迁可至印度、东南亚及菲律宾,广泛分布于中国各省区,是内陆及沿海地区最常见的候鸟之一^[8]。自 1985 年 11 月以来,昆明成为很多红嘴鸥越冬的地方,在此越冬红嘴鸥数量庞大,近几年可达 4 万多只,其晚上主要栖息于滇池附近,白天进入昆明城区大观河、翠湖、盘龙江等地觅食,常与游客密切接触^[9]。跟踪发现昆明红嘴鸥主要往返于蒙古国的乌布苏湖、俄罗斯贝加尔湖、中国新疆维吾尔自治区博斯腾湖、中国宁夏回族自治区银川市等地^[9],可见红嘴鸥可在生态湖泊与城市内湖泊来回迁徙,如其肠道携带潜在病原菌或耐药细菌,也可能为生态环境带来潜在威胁。基于此,本研究主要采集昆明越冬红嘴鸥新鲜粪便,通过免培养和纯培养的方法分

析其中是否存在潜在病原菌种及其耐药性,分析红嘴鸥粪便与其生活环境滇池水中细菌及耐药基因相关性,为预防病原细菌及耐药基因转移、人与动物和谐相处提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 样品

样品采集地点为云南省昆明市内红嘴鸥和观鸥者几个主要聚集地(包括海埂大坝、大观河、翠湖)。采样时均使用无菌器械,主要采集样品为红嘴鸥新鲜粪便(湿润状),同时也采集 3–5 份干燥粪便样品(在环境中已风干)为 1 份混合样品、2 份红嘴鸥聚集区水样(海埂大坝旁滇池、近大观公园大观河;表面 1 m 内)。具体样品信息见表 1。除 1 号样品外,其他所有用于纯培养分离的样品均带回实验室当天处理并分离,所有用于宏基因组测序的样品带回实验室后放置于–80 °C 备用。

1.2 培养基

(1) 分离培养基

淀粉酪蛋白琼脂(M1)参考文献[10]配制;SS 琼脂(M3)和麦康凯琼脂(M4),杭州滨和微生物试剂有限公司;血琼脂(M6),郑州安图生物工程股份有限公司;M2 (g/L):胰酪大豆胨琼脂培养基 10.0, R2A 琼脂培养基 3.8, 琼脂 6.0, pH 7.0–7.4; M5 (g/L): 营养琼脂 5.0, 山梨酸钾 16.0, 磷酸二氢钾 1.5, 琼脂 10.0, pH 7.0–7.4。其中 M1、M2 两种培养基分别添加 50 mg/L 的制霉菌素。

(2) 纯化培养基

营养琼脂培养基(杭州滨和微生物试剂有限公司) (g/L): 牛肉膏 2.0, 酪蛋白酸水解物 17.5, 可溶性淀粉 1.5, 琼脂 17.0; 胰酪大豆胨琼脂培养基和 R2A 琼脂培养基, 青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

表 1 本研究采集样品及处理信息

Table 1 Sample and treatment information in this study

No.	Samples	Treatment	Sampling time
1	Mixture of 3–5 dry feces	Drying at 28 °C for a week; Isolation	Nov. 2019
2	Mixture of 3–5 fresh feces	Isolation	Nov. 2019
3	Mixture of 3–5 fresh feces and 3–5 dry feces	Isolation	Nov. 2019
4	Mixture of >5 fresh feces	Isolation and metagenomic sequencing (M1)	Nov. 2020
5	Mixture of >5 fresh feces	Isolation and metagenomic sequencing (M2)	Nov. 2020
6	Mixture of >5 fresh feces	Metagenomic sequencing (M3)	Dec. 2020
7	Mixture of >5 fresh feces	Metagenomic sequencing (M4)	Dec. 2020
8	12 single fresh feces	Isolation	Nov. 2020
9	Centrifuge sediment of 1.5 L water from Dianchi Lake (5 000 r/min)	Isolation and metagenomic sequencing (W2)	Nov. 2020
10	Centrifuge sediment of 1.5 L water from Daguan River (5 000 r/min)	Isolation (metagenomic sequencing failed)	Nov. 2020
11	Air	Isolation	Nov. 2020

M1–M4 和 W2: 宏基因组测序时对应混合粪便或水样样品的编号

M1–M4, and W2: The sample ID of the corresponding sample.

1.3 主要试剂和仪器

制霉菌素片, 浙江震元制药有限公司; 粪便 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; DNA 提取酚试剂, 北京索莱宝科技有限公司; 氯仿, 重庆川东化工(集团)有限公司; 1.1×T3 Super PCR Mix 和琼脂糖, 北京擎科生物科技股份有限公司; 药敏纸片, 杭州微生物试剂有限公司和湖南比克曼生物科技有限公司。

电子天平, 上海光正医疗仪器有限公司; 小型台式离心机, Thermo Fisher Scientific 公司; 台式离心机, 湖南赫西仪器装备有限公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司; 琼脂糖水平电泳仪, 北京六一生物科技有限公司。

1.4 菌株的分离

所有用于纯培养的混合样本均采用稀释涂布法与分区划线法相结合的方法进行菌株分离, 单独粪便样品均采用分区划线法。稀释涂布法为称取 1 g 粪便样品置于 19 mL 无菌生理盐水, 逐级稀释后取稀释液至分离培养皿涂布; 分区划线法则用无菌接种环或竹签蘸取新鲜粪便样品到分离培养基上进行分区划线分离; 空

气培养采用直径 90 mm M1 培养基放在距离地面约 1.6 m 高柱子上在空气中暴露 10 min 后合上培养皿盖。2019 年所采集样品分离时仅采用了 M3、M4、M6 这 3 种培养基, 2020 年分离时 M1–M6 均有采用。所有分离培养皿放入 28 °C 培养箱中培养 3 d 后观察, 通过菌落形态特征初步去重复后挑取单菌落进一步分离纯化。纯化后的菌株保藏到 25% 甘油管中–80 °C 保藏, 另一份保存于–20 °C 用于 DNA 提取。

1.5 菌株的鉴定

菌株 DNA 的提取采用 TE 煮沸法或酚氯仿抽提法, 16S rRNA 基因扩增采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系: PCR Mix 45 μL, 正、反向引物(10 μmol/L) 各 1.25 μL, DNA 模板 1–2 μL。PCR 反应条件: 94 °C 8 min; 94 °C 1 min, 54.5 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 8 min。PCR 扩增产物送测序公司进行测序, 最后得到的序列通过 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>) 或 NCBI-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Blast.cgi)进行序列比对。

1.6 粪便样品宏基因组测序

由于单独粪便样品不能满足宏基因组测序 DNA 要求,因此,本研究用于宏基因组测序的样品均为混合粪便样品。采用粪便 DNA 提取试剂盒(分别用于表 1 中 4、5、9 号样品)或酚氯仿抽提法(分别用于表 1 中 6、7 号样品)提取样品 DNA,抽提后的 DNA 采用干冰冷冻送样,测序公司检测合格后(DNA 主带 ≥ 3 kb, DNA 溶液不黏稠,无色素、悬浊物,无严重 RNA、蛋白、糖类等杂质污染, $1.7 \leq OD_{260}/OD_{280} \leq 2.1$,总量满足一次标准建库需求)进行片段化用于构建 PE 文库,然后基于 Illumina NovaSeq 平台通过桥式 PCR 原理进行高通量测序。下机原始序列进行拆分、质量剪切以及去除污染等优化处理,然后对优化后的序列拼接组装并进行基因预测。本研究物种分类学注释基于 non-redundant protein sequence database (NR)数据库,耐药基因注释基于 the comprehensive antibiotic resistance database (CARD)数据库(E -value $<10^5$)^[11],毒力因子注释基于 the virulence factor database (VFDB) (E -value $<10^5$)^[12],丰度统计基于 RPKM 算法。聚类分析首先使用统计算法 Bray-Curtis 计算两两样本间距离,获得 β 多样性距离矩阵,之后根据距离矩阵进行层级聚类(hierarchical clustering)分析,使用非加权组平均法(unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA)构建树状结构。细菌类群相关性分析采用 SPSS 25.0 计算两组数据间的 Pearson 相关系数。

1.7 菌株耐药性检测

基于鉴定结果和样品来源,选取鉴定得到的部分肠球菌属菌株、肠杆菌属菌株、志贺菌属菌株、葡萄球菌属菌株依据 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)^[13],采用纸

片扩散法(K-B 法)对其进行细菌药物敏感实验。

1.8 部分纯培养菌株四环素类耐药基因检测

基于前期纯培养菌株耐药表型和宏基因组测序耐药基因(antibiotic resistance gene, ARG)分析结果,对部分纯培养菌株(含四环素表型检测敏感和耐药菌株)进行四环素类耐药基因检测,检测基因包括 *tetA*、*tetB*、*tetC*、*tetL*、*tetW*^[14],同时检测整合酶基因 *intI1*^[15]。

2 结果与分析

2.1 纯培养结果

2.1.1 纯培养分离鉴定结果

通过观察菌落形态初步去重复后两次共分离到 386 株菌,基于 16S rRNA 基因测序共鉴定了 209 株菌。其中,滇池水样来源 47 株,分布在 23 个属;空气培养来源 12 株,分布在 8 个属;红嘴鸥粪便来源 150 株,分布在 26 个属(表 2,图 1)。分离的细菌中有一些人类或动物常见潜在病原细菌,如粪肠球菌、阿尔伯特埃希菌(*Escherichia albertii*)、弗格森埃希菌(*Escherichia fergusonii*)、威隆气单胞菌(*Aeromonas veronii*)、福氏志贺菌(*Shigella flexneri*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、屎肠球菌、腐生葡萄球菌(*Staphylococcus saprophyticus*)、痢疾志贺氏菌和金黄色葡萄球菌等,除气单胞菌外,其他也是人和动物肠道常见种,并且在肠道一般不引起人或动物发病^[1,7,16-17]。值得注意的是,同时采集的滇池水样也分离到大量的威隆气单胞菌及少量的福氏志贺菌。对于分离培养基,从 M1-M6 培养基分别分离到 40、50、35、24、33、27 株。总体而言,M3 培养基和 M4 培养基虽然利于挑取单菌落,但得到的菌株种属分布较单一;M5 培养基更适合于

表 2 纯培养分离获得的菌株分类信息及菌株数

Table 2 Taxonomic information and number of identified strains

Order	Family	Genus	Number of identified strains			
			Feces	Water	Air	
<i>Bacillota</i>	<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus</i>	3	0	0	
<i>Actinomycetota</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i>	0	1	0	
	<i>Beutenbergiaceae</i>	<i>Serinibacter</i>	0	1	0	
	<i>Dermatophilaceae</i>	<i>Mobilicoccus</i>	0	1	0	
	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium</i>	4	1	0	
	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcus</i>	1	0	0	
	<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycolicibacterium</i>	1	0	0	
	<i>Nocardiodaceae</i>	<i>Nocardioides</i>	1	0	0	
	<i>Ornithinimicrobiaceae</i>	<i>Serinicoccus</i>	0	1	0	
	<i>Brevibacteriaceae</i>	<i>Brevibacterium</i>	3	1	0	
	<i>Cellulomonadaceae</i>	<i>Cellulomonas</i>	1	0	0	
	<i>Corynebacteriaceae</i>	<i>Corynebacterium</i>	7	0	1	
	<i>Dermabacteraceae</i>	<i>Brachybacterium</i>	1	0	0	
		<i>Dermabacter</i>	2	0	0	
	<i>Dermacoccaceae</i>	<i>Yimella</i>	0	1	0	
	<i>Dietziaceae</i>	<i>Dietzia</i>	1	0	0	
	<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Arsenicicoccus</i>	1	0	0	
		<i>Janibacter</i>	0	1	0	
	<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Agromyces</i>	0	0	1	
	<i>Micrococcaceae</i>	<i>Arthrobacter</i>	2	0	0	
		<i>Kocuria</i>	2	5	2	
<i>Bacillota</i>	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i>	2	1	0	
		<i>Exiguobacterium</i>	5	4	0	
		<i>Lysinibacillus</i>	1	0	0	
	<i>Carnobacteriaceae</i>	<i>Trichococcus</i>	0	1	0	
	<i>Enterococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i>	13	0	0	
	<i>Paenibacillaceae</i>	<i>Paenibacillus</i>	0	0	1	
	<i>Planococcaceae</i>	<i>Jeotgalibacillus</i>	0	1	0	
	<i>Sporolactobacillaceae</i>	<i>Sinobaca</i>	1	0	0	
	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>	17	2	2	
<i>Bacteroidota</i>	<i>Hymenobacteraceae</i>	<i>Adhaeribacter</i>	1	0	0	
	<i>Weeksellaceae</i>	<i>Chryseobacterium</i>	0	0	1	
<i>Deinococcota</i>	<i>Deinococcaceae</i>	<i>Deinococcus</i>	0	1	0	
<i>Pseudomonadota</i>	<i>Aeromonadaceae</i>	<i>Aeromonas</i>	7	15	0	
	<i>Caulobacteraceae</i>	<i>Brevundimonas</i>	0	1	0	
	<i>Comamonadaceae</i>	<i>Acidovorax</i>	0	1	0	
		<i>Delftia</i>	0	0	2	
		<i>Citrobacter</i>	0	1	0	
	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter</i>	0	1	0	
		<i>Escherichia</i>	50	1	1	
		<i>Kosakonia</i>	1	0	0	
		<i>Shigella</i>	21	3	0	
		<i>Orbaceae</i>	<i>Orbus</i>	1	0	0
	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	0	1	0	
	<i>Xanthomonadaceae</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	0	0	1	
	Total			150	47	12

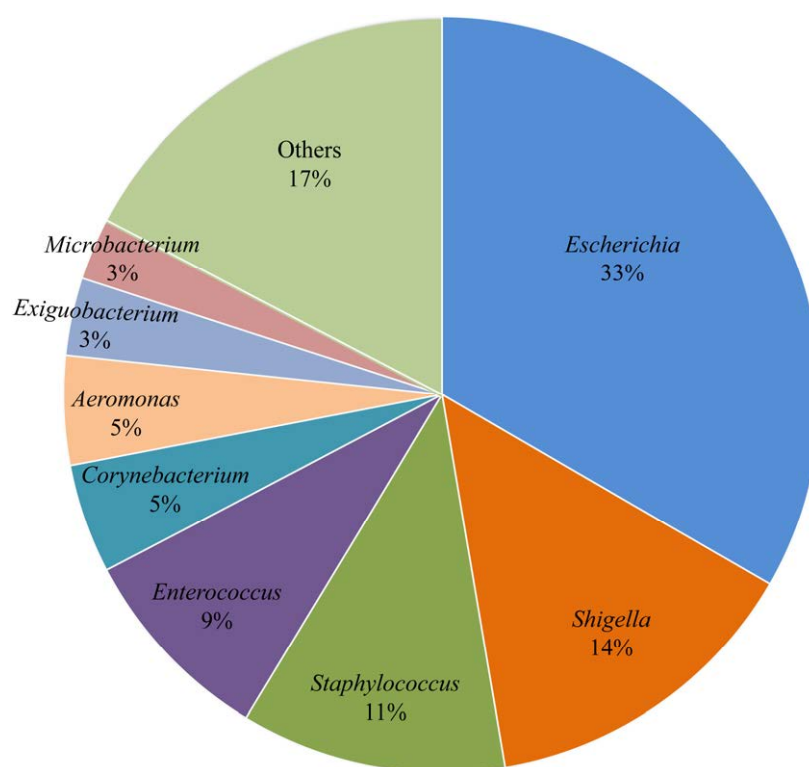


图 1 红嘴鸥粪便纯培养鉴定菌株组成

Figure 1 Bacteria from the feces of *Chroicocephalus ridibundus*.

革兰氏阳性细菌分离；其他几种培养基总体差别不大。

2.1.2 部分纯培养菌株耐药性检测结果

肠杆菌科药敏测试药物包括哌拉西林、哌拉西林-他唑巴坦、氨苄西林-舒巴坦、头孢唑林、头孢呋辛、头孢曲松、头孢噻肟、头孢他啶、头孢吡肟、氨曲南、头孢西丁、亚胺培南、美罗培南、庆大霉素、阿米卡星、链霉素、四环素、米诺环素、环丙沙星、左氧氟沙星、复方新诺明、氯霉素。结果显示，测试的 40 株肠杆菌科细菌(1 株 *Enterobacter asburiae*、1 株弗格森埃希菌、1 株福氏志贺菌来自滇池水样，1 株 *Escherichia marmotae* 来自空气，其余来自红嘴鸥粪便)绝大多数对测试药物敏感，但也存在一些耐药现象，如弗格森埃希菌(3 株)、阿尔伯特埃希菌(5 株)、*Escherichia marmotae* (1 株)对头

孢唑林耐药；阿尔伯特埃希菌(1 株)、*Escherichia marmotae* (3 株)、志贺菌(9 株)对头孢西丁耐药；埃希菌(2 株)、志贺菌(1 株)对四环素中介，志贺菌(1 株)对四环素耐药。需要注意，这些肠杆菌科细菌许多对氨苄西林为天然耐药。肠球菌属测试药物包括青霉素、氨苄西林、庆大霉素、链霉素、红霉素、四环素、米诺环素、环丙沙星、左氧氟沙星、氯霉素、万古霉素、利奈唑胺。结果显示，参与测试的 10 株肠球菌中(全部来自红嘴鸥粪便)，多数肠球菌对氨苄西林(9 株)、庆大霉素(8 株)、链霉素(7 株)、四环素(6 株)耐药，4 株对红霉素中介，1 株对四环素中介，2 株对米诺环素耐药。葡萄球菌属测试药物为青霉素、头孢西丁、庆大霉素、红霉素、四环素、米诺环素、环丙沙星、左氧氟沙星、复方新诺明、氯霉素、利奈唑胺。结果显示，

参与药敏试验的 20 株葡萄球菌中(2 株来自滇池水样, 2 株来自空气, 其余来自红嘴鸥粪便), 4 株对青霉素耐药, 2 株对红霉素耐药, 3 株对四环素耐药, 4 株对四环素中介。对于 *tet* 类耐药基因检测, 共有 10 株肠球菌、16 株肠杆菌科细菌、10 株葡萄球菌纳入。结果发现, 所有菌株均含有 *tetB* 耐药基因, 其他 *tet* 类耐药基因仅偶尔检测到, 未检测到整合酶基因 *int11*。

2.2 免培养测序结果

2.2.1 测序序列统计与质控

宏基因组测序总体质量较好, 但单份红嘴鸥粪便样品提取 DNA 并不能满足测序建库要求, 因此在后续重新补充采集了 2 份红嘴鸥粪便混合样品。在 DNA 提取过程中, 红嘴鸥粪便可能比较特殊, 采用常用粪便 DNA 提取试剂盒提取效果不佳, 最后部分改用传统酚氯仿提取法进行粪便 DNA 提取。本研究样品测序原始数据已上传至 NCBI (BioProject 号为 PRJNA1050657), 序列相关信息统计如表 3 所示。

2.2.2 免培养细菌组成

宏基因组测序发现, 红嘴鸥肠道细菌类群非常丰富, 4 份随机混合红嘴鸥粪便样品虽然

细菌含量不同, 但都以埃希菌属(*Escherichia*)、小链球菌属(*Catellibacillus*)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)等为优势菌群。丰度排前 20 的细菌中, 检测到以下潜在病原细菌: 大肠埃希菌、阿尔伯特埃希菌、屎肠球菌、肠沙门氏菌(*Salmonella enterica*)、产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、宋内志贺氏菌(*Shigella sonnei*)、福氏志贺菌、粪肠球菌和痢疾志贺氏菌。在同时采集的一份滇池水样中, 气单胞菌属(*Aeromonas*)为绝对优势菌, 柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)和埃希氏菌属也比较多(图 2), 在丰度排前 20 的细菌种中检测到以下潜在病原细菌种: 威隆气单胞菌、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)、大肠埃希菌、豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)、弗劳地柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)。此外, 在红嘴鸥粪便和滇池水样中还检测到了许多临床重视的病原细菌种, 如肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*; 红嘴鸥粪便丰度排第 38, 滇池水丰度排第 58)、金黄色葡萄球菌(红嘴鸥粪便丰度排第 247, 滇池水丰度排第 289)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*; 红嘴鸥

表 3 宏基因组测序序列信息统计

Table 3 Sequence information of metagenomic sequencing

Samples	Raw bases (bp)	Optimized bases (bp)	Optimized reads	Contigs	Contig bases (bp)	N50 (bp)
M1	8 359 721 796	7 933 145 136	52 752 060	34 156	35 504 046	1 610
M2	6 813 301 200	6 511 473 062	43 272 326	24 825	26 584 095	1 861
M3	6 379 013 120	6 183 736 123	41 069 874	22 089	22 723 481	1 457
M4	7 818 195 026	7 538 156 924	50 078 378	51 582	52 466 352	1 710
W2	7 733 643 482	7 523 396 894	49 959 668	163 053	102 787 963	659

Raw bases: 原始序列碱基数; Optimized bases/reads: 质控及去宿主或干扰物种(红嘴鸥和铜绿微囊藻)后的优化序列碱基数/序列数. M1–M4: 4 份红嘴鸥混合粪便; W2: 1.5 L 滇池水离心沉淀物; 具体样品信息见表 1, 宏基因组测序中代表意义均相同

Raw bases: Raw base number of sequences; Optimized bases/reads: number of bases/reads filtered through quality control, and the sequences originated from *C. ridibundus* and *Microcystis aeruginosa* were also removed. M1–M4: The four mixture feces of *C. ridibundus*; W2: The centrifuge sediment of 1.5 L Dianchi Lake water; samples informations are listed in Table 1 and the meanings in the metagenomic sequencing are the same.

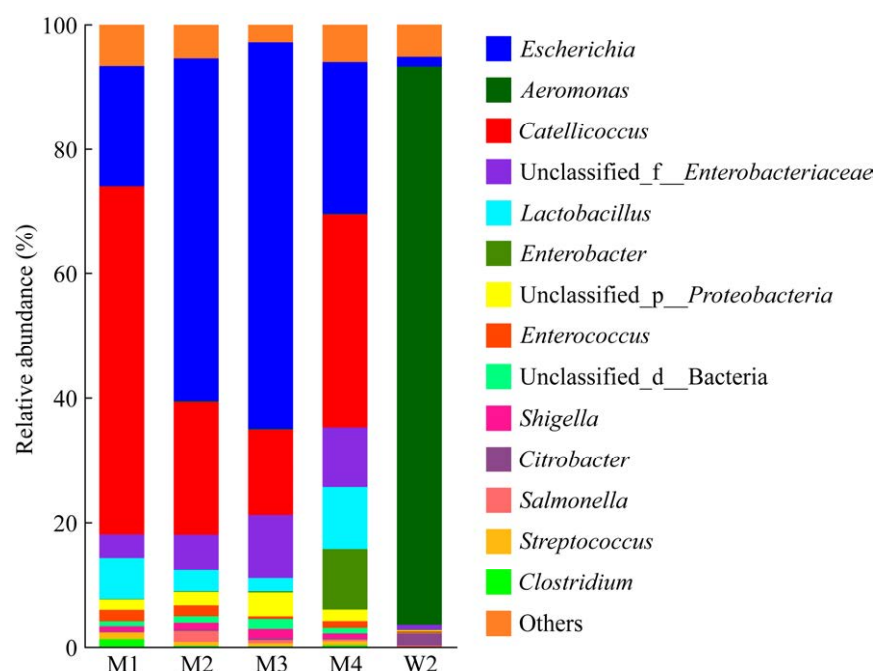


图2 基于属水平细菌注释相对丰度图

Figure 2 Relative abundance of the bacteria based on genus level.

粪便丰度排第 882, 滇池水丰度排第 168)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*; 红嘴鸥粪便丰度排 3 275, 滇池水丰度排第 149)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*; 仅在滇池水检测到, 丰度排第 319)、滑膜支原体(*Mycoplasma synoviae*; 仅在红嘴鸥粪便检测到, 丰度排第 252)等, 但在已注释到种的这些菌株中并未关联到临床重视的耐药基因, 如 *bla*_{CTX}、*bla*_{TEM}、*bla*_{KPC}、*bla*_{SHV}、*mecA*、*vanA* 等。对于《人间传染的病原微生物名录》(2023 版)^[18] 中危害程度为二类的病原细菌, 检测到以下种(基因比对一致度>97%): 炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*; 仅在滇池水检测到, 丰度排第 2 254)、类鼻疽伯克霍尔德菌(*Burkholderia pseudomallei*; 仅在滇池水检测到, 丰度排第 752)、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*; 红嘴鸥粪便丰度排第 994, 滇池水丰度排第 49)、鼠疫耶尔森

菌(*Yersinia pestis*; 仅在滇池水检测到, 丰度排第 92)。

2.2.3 免培养细菌耐药基因及毒力因子组成

宏基因组测序注释发现, 所注释耐药基因对应氨基酸序列比对相似性最低为 36.8%。丰度统计发现, 红嘴鸥肠道细菌耐药基因也非常丰富, 主要有(含量从高到低前 10) *macB*、*parY* mutant、*msbA*、*bcrA*、*rpoB2*、*tetA*(58)、*taeA*、*mupA*、*tetW*; 滇池水样中耐药基因主要有(含量从高到低前 10) *macB*、*evgS*、*tetA*(58)、*rpoB2*、*msbA*、*otr(A)*、*novA*、*parY*、*taeA*、*adeL*。二者含量丰富(>1.0%)的耐药基因中, 主要差异体现在红嘴鸥粪便含有丰富的 *tetW* (3.0%)、*tcr3* (1.7%)、*vanL* (1.5%)、*ermR* (1.3%), 而滇池水样中非常少或未检测到(<0.02%); 滇池水样中含有丰富的 *adeB* (1.9%)、*vatF* (1.5%)、*tet*(35) (1.4%)、*mexI* (1.3%)、*tlrC* (1.2%)、*mexW* (1.1%),

而粪便样品中未检测到或非常少(<0.02%)。对比一致度大于 85%且覆盖度大于 50%的耐药基因中,红嘴鸥粪便主要有(含量从高到低前 10) *msbA*、*tetW*、*evgS*、*lmrD*、*tetB(P)*、*cpxA*、*gadX*、*emrY*、*mdtP*、*YojI*,滇池水样中主要有(含量从高到低前 10) *evgS*、*msbA*、*yoiI*、*kdpE*、*cpxA*、*crp*、*acrB*、*lmrD*、*acrA*、*emrB*。二者含量丰富(>1.0%)的耐药基因中,主要差异体现在红嘴鸥粪便样品中含有丰富的 *tetW* (4.3%)、*lnuC* (1.3%),而滇池水样中未检测到;滇池水样中含有丰富的 *cmeB* (1.9%)、*cphA3* (1.2%),而红嘴鸥粪便检测到含量非常少(<0.01%)。测序检测到可信度覆盖度高的耐药基因如图 3 所示,可信度覆盖度高的主要几种耐药基因主要贡献菌如图 4 所示。

测序所注释毒力因子对应氨基酸序列比对相似性最低为 34.9%。丰度统计发现,红嘴鸥肠道细菌毒力因子也非常丰富,主要为(含量从高到低前 10): T6SS (VF0579)、LOS (CVF494)、flagella (VF0394)、T6SS (VF0569)、capsule (VF0361)、HitABC (VF0268)、pyoverdine (IA001)、lateral flagella (VF0474)、enterobactin (VF0228)、heme biosynthesis (CVF506); 滇池水样品中毒力因子主要为(含量从高到低前 10): polar flagella (CVF786)、LOS (CVF494)、type IV pili (CVF785)、tap type IV pili (CVF783)、polar flagella (VF0473)、lateral flagella (AI142)、lateral flagella (VF0474)、heme biosynthesis (CVF506)、bfmRS (VF0463)、T2SS (CVF780)。红嘴鸥粪便样品和滇池水样品毒力因子差别主要体现在丰度和一些含量较少的毒力因子。比对一致度大于 85%且覆盖度大于 50%的毒力因子中,红嘴鸥粪便主要有(含量从高到低前 10): capsule (CVF186)、capsule (VF0323)、SCI-I T6SS (CVF734)、Hek (AI384)、trigger factor (CVF149)、peritrichous flagella (AI140)、invasion of brain

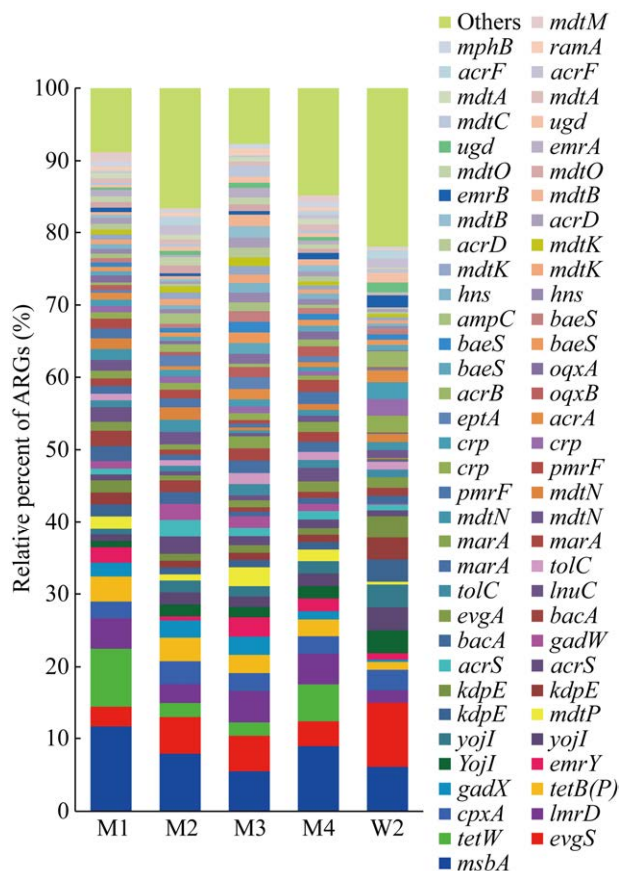


图 3 耐药基因相对丰度图 仅列出了一致度>85%且覆盖度>50%的耐药基因;其他耐药基因详见英文图注

Figure 3 Relative abundance of the ARGs. Only ARGs with identities >85% and coverage >50% are considered. The others including (content from high to low) *mdtG*, *acrE*, *baeR*, *emrK*, *acrA*, *mdtH*, *mdtF*, *ampC1*, *ermT*, *tet(L)*, *tetM*, *emrR*, *emrE*, *cmeB*, *ampH*, *tet(A)*, *KpnE*, *cphA3*, *mdfA*, *KpnF*, *tet(E)*, *bla_{ACT-18}*, *bla_{SRT-2}*, *fosA2*, *floR*, *tet(B)*, *cmeA*, *KpnG*, *msrC*, *bla_{CMY-72}*, *qnrS2*, *cmeC*, *bla_{TEM-171}*, *bla_{OXA-427}*, *sul1*, *tetA(P)*, *tet(K)*, *QnrD2*, *bla_{MOX-9}*, *APH(6)-Id*, *MCR-3.6*, *mphA*, *sul2*, *efmA*, *APH(3'')-Ib*, *bla_{OXA-465}*, *ANT(3'')-IIa*, *lnuA*, *bla_{ACT-12}*, *ermQ*, *cmeR*, *qnrB60*, *AAC(6')-Ii*, *dfrA17*, *catIII*, *bla_{CTX-M-37}*, *dfrA12*, *qnrB32*, *dfrA14* and *AAC(6')-Ic*.

endothelial cells (Ibes) (CVF429)、streptococcal enolase (CVF153)、iron/manganese transport (CVF459)、contact-dependent inhibition CDI system

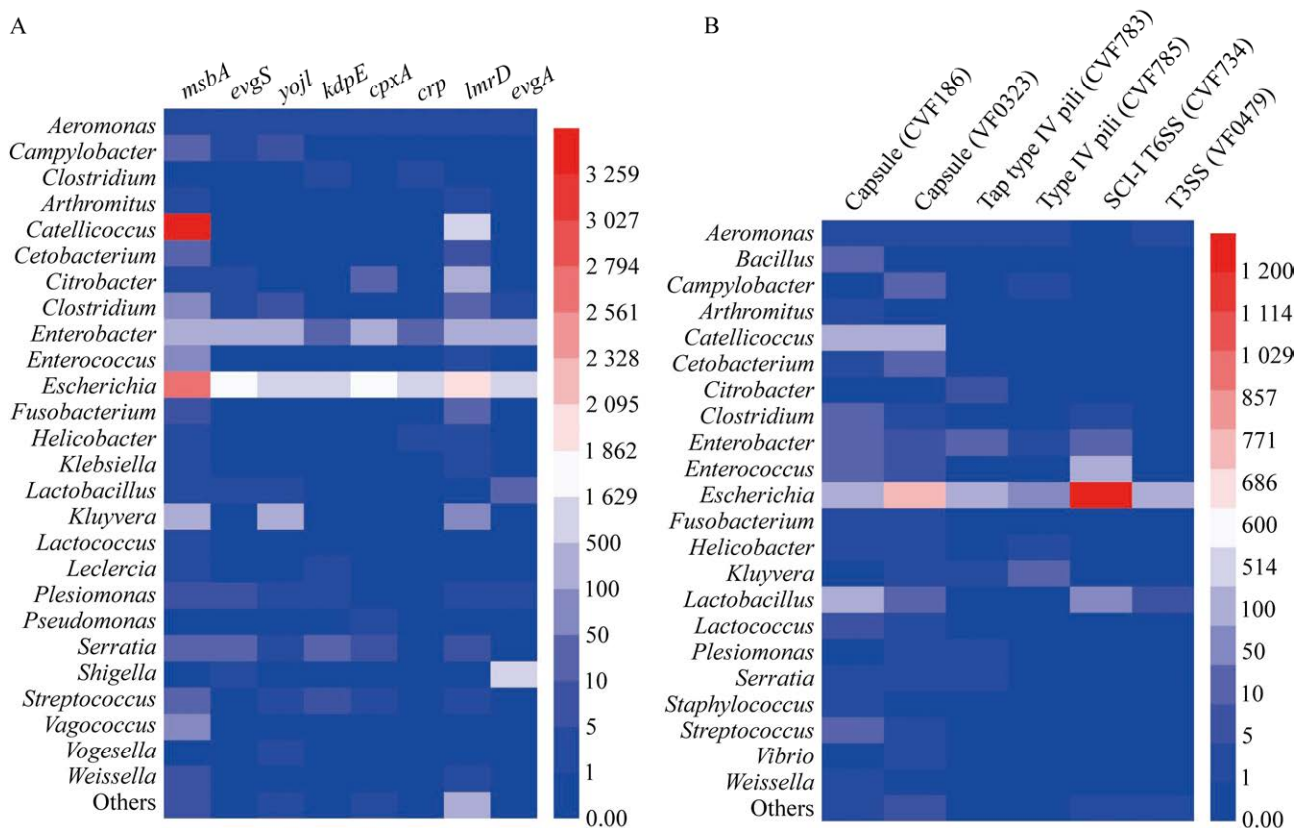


图 4 红嘴鸥粪便中主要耐药基因(A)与毒力因子(B)主要贡献细菌属 图中仅展示主要几种可信度>85%且覆盖度>50%的耐药基因与毒力因子的主要贡献细菌属, 且仅考虑了丰度含量在前 50 中细菌属

Figure 4 The main contributors to main ARGs (A) and VFIs (B) of the feces of *Chirocephalus ridibundus*. Only the ARGs and VFIs with identities >85% and coverage >50% are considered and only the top 50 most abundant genera are considered.

(CVF747); 滇池水样品主要有(含量从高到低前 10): type IV pili (CVF785)、tap type IV pili (CVF783)、T3SS (VF0479)、direct heme uptake system (IA062)、T6SS (SS194)、capsule (CVF854)、O-antigen (CVF043)、capsule (VF0323)、Hek (AI384)、capsule (CVF186)。二者含量丰富(>1.0%)的毒力因子中, 主要差异体现在红嘴鸥粪便样品中含有丰富的 enterotoxin (CVF414) (2.7%)、Tia/Hek (CVF430) (2.7%)、ACE T6SS (CVF736) (2.7%)、fibronectin-binding protein (AI158) (2.7%), 而滇池水含量较少(<0.07%); 滇池水环境含有较多的 tap type IV

pili (CVF783) (8.4%)、type IV pili (CVF785) (1.6%), 而红嘴鸥粪便含量很少(<0.02%)。本研究测序检测到的可信度覆盖度高的毒力因子如图 5 所示, 可信度覆盖度高的主要几种毒力因子主要贡献菌见图 4。

2.2.4 基于注释及丰度的聚类分析

聚类分析发现(图 6), 不论基于何种注释结果, 4 份红嘴鸥粪便样品可以聚集在一起, 而滇池水样则单独一枝, 说明物种大类群组成与细菌耐药基因、毒力因子、其他功能等相互之间息息相关, 即细菌大类群组成与丰度主导着环境耐药基因、毒力因子等。但是, 基于不同

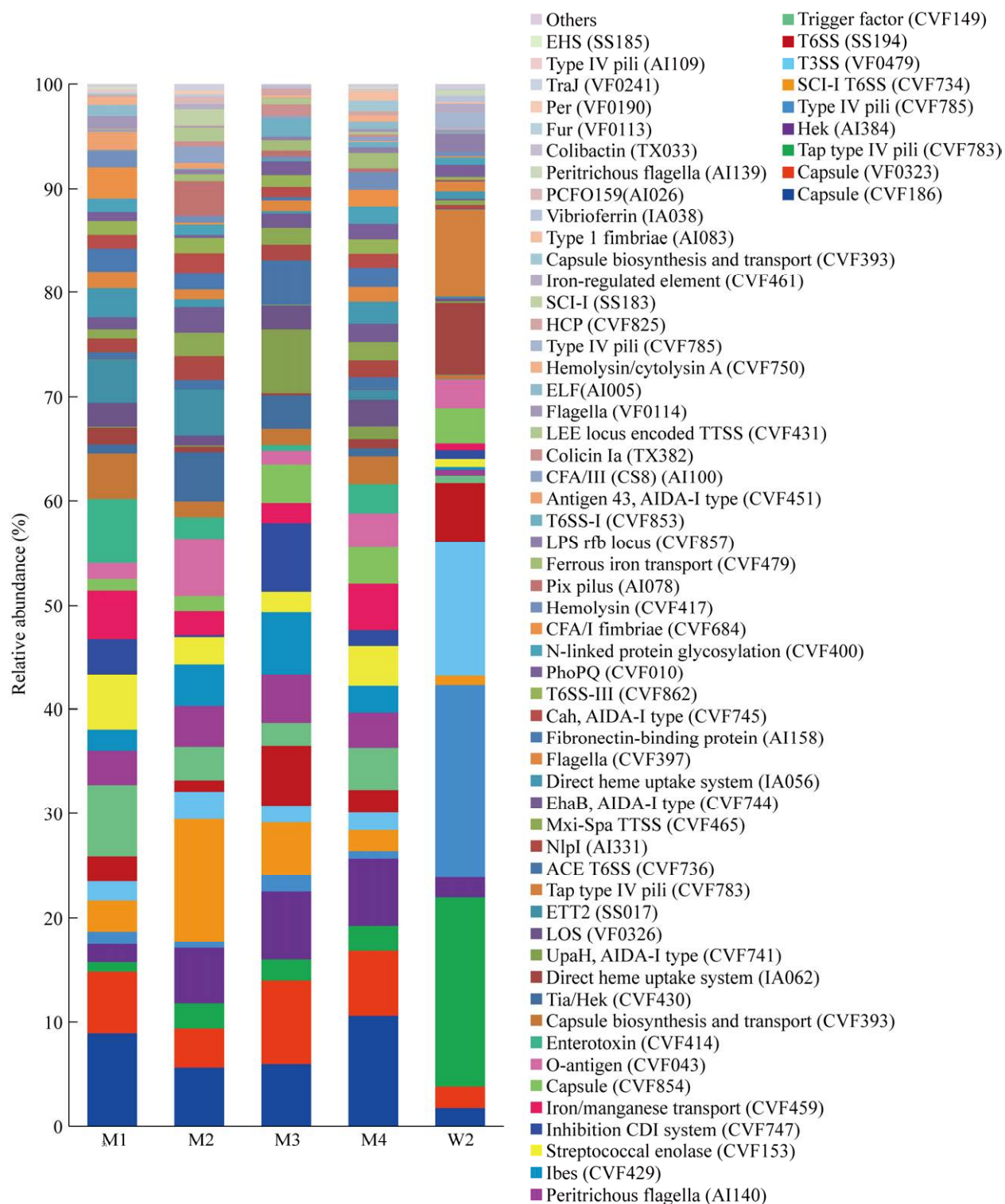


图5 毒力因子相对丰度 仅列出了一致度>85%，覆盖度>50%且相对丰度>0.05%的毒力因子

Figure 5 Relative abundance of the virulence factors. Only those with identity >85%, sequence coverage >50% and relative content >0.05% are listed.

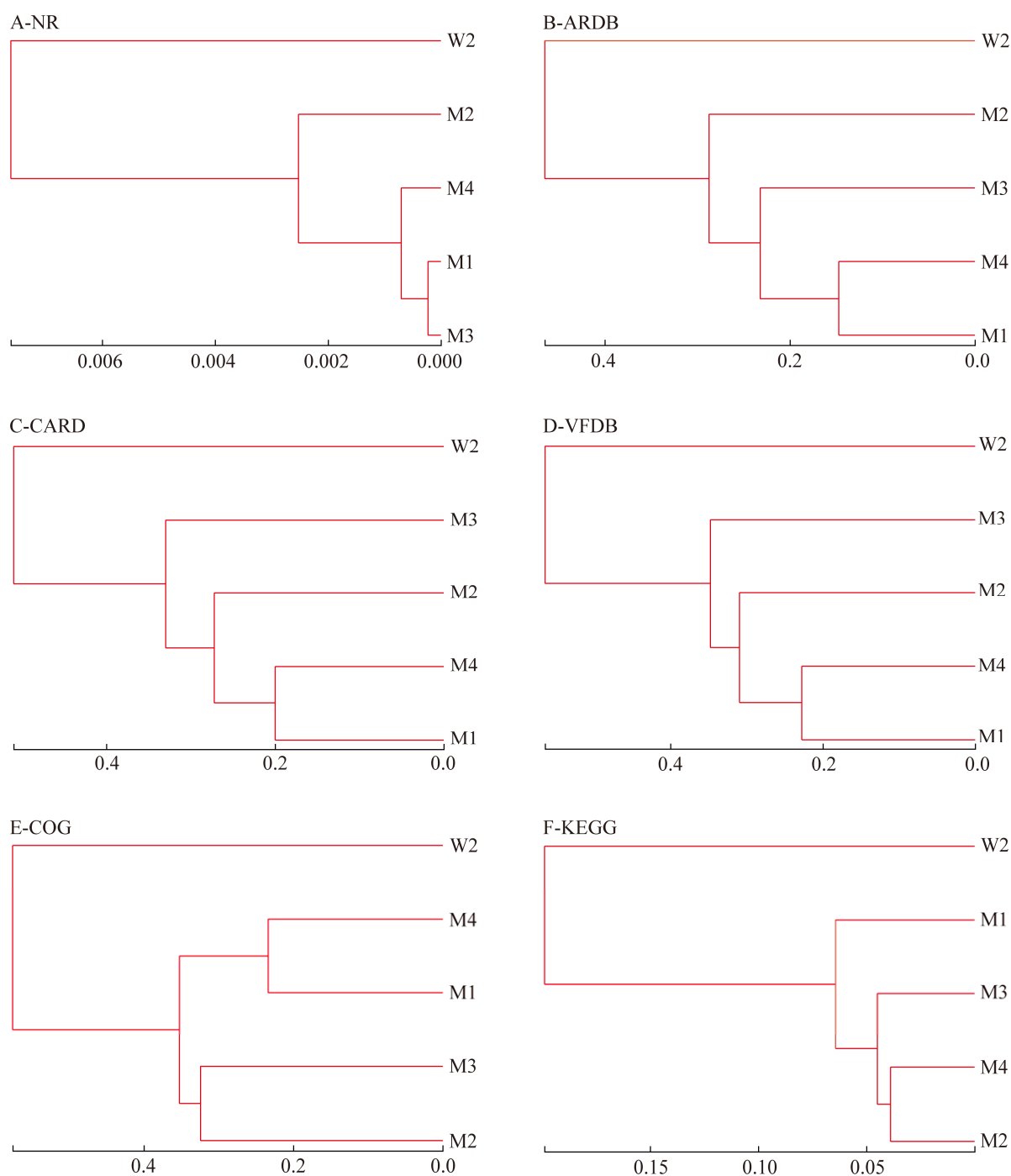


图 6 红嘴鸥粪便及滇池水样聚类分析 图中树枝长度代表使用 Bray-Curtis 算法计算得到的样品间的距离, 不同聚类分别基于不同的注释和丰度统计

Figure 6 Hierarchical clustering of the gull feces and Dianchi Lake water. The branch length represents the distance calculated using the Bray-Curtis algorithm. The above analyses are clustering based on the following annotation and abundance.

注释, 4 份红嘴鸥样品聚类则又体现不同, 基于耐药基因、毒力因子注释的聚类图更相似, 说明在小范围细菌类群组成前提下, 细菌的耐药基因和毒力因子更具有相关性。但由于这次纳入样品数量及环境类群数量有限, 而环境细菌类群与相关功能基因组成又非常复杂, 具体何种细菌类群之间存在何种相关功能基因相互交流还需要更多研究。

2.2.5 红嘴鸥粪便与水样优势细菌属及常见病原细菌属菌种组成相关性分析

由于宏基因组测序发现气单胞菌为滇池绝对优势菌, 且一些气单胞菌是水产动物常见致病菌, 因此对气单胞菌进行了进一步分析。分析发现, 气单胞菌在滇池水样中含量可达 86.22%; 在红嘴鸥粪便样品中也都存在, 含量为 0.02%–0.06%, 平均含量为 0.04%; 所有样

品优势菌群为威隆气单胞菌、豚鼠气单胞菌、嗜水气单胞菌、*Aeromonas allosaccharophila*、*Aeromonas media*、*Aeromonas jandaei*、*Aeromonas* sp._8C (未能注释)等, 其中威隆气单胞菌、豚鼠气单胞菌、嗜水气单胞菌为常见人或动物病原细菌种。红嘴鸥粪便样品与滇池水样不同气单胞菌组成及含量相关性系数为 0.74 ($P<0.01$), 且对于常见致病种相关性系数可达 0.84 ($P<0.01$) (这个值越接近 1, 那就说明相关性越大; 越接近 0, 说明相关性越小)。进一步对其他一些病原细菌属进行相关性分析, 发现其他很多病原细菌属菌种组成在红嘴鸥和滇池水样同样存在相关系数很高的情况, 如埃希菌为 0.99 ($P<0.01$), 克雷伯菌为 0.98 ($P<0.01$)、肠球菌为 0.96 ($P<0.01$) 等(表 4)。另外, 红嘴鸥粪便和水环境 ARGs 组

表 4 红嘴鸥粪便和滇池水样中优势菌属及一些常见病原属内菌种组成相关性系数及含量比值

Table 4 Community correlation and content ratios of some abundant or common pathogenic genera from the feces of *Chroicocephalus ridibundus* and Dianchi Lake water

Genus of pathogens	<i>r</i>	<i>P</i>	Absolute content ratio	Relative content ratio
<i>Acinetobacter</i>	0.49	<0.01	0.08	0.07
<i>Aeromonas</i>	0.74	<0.01	<0.01	<0.01
<i>Campylobacter</i>	0.26	>0.05	2 048.85	1 753.21
<i>Ciceribacter</i>	0.82	<0.01	0.05	0.05
<i>Clostridium</i>	0.80	<0.01	30.14	0.03
<i>Enterobacter</i>	0.85	<0.01	25.06	21.45
<i>Enterococcus</i>	0.96	<0.01	4.22	3.61
<i>Escherichia</i>	0.99	<0.01	19.99	17.11
<i>Fusobacterium</i>	0.25	>0.05	450.24	385.27
<i>Haemophilus</i>	0.99	<0.01	15.29	13.09
<i>Klebsiella</i>	0.98	<0.01	0.86	0.73
<i>Lactobacillus</i>	0.98	<0.01	5 420.87	4 638.64
<i>Listeria</i>	0.98	<0.01	28.46	24.35
<i>Pseudomonas</i>	0.01	>0.05	0.02	0.01
<i>Serratia</i>	0.99	<0.01	2.75	2.35
<i>Shewanella</i>	0.07	>0.05	0.05	0.04
<i>Staphylococcus</i>	0.09	>0.05	82.99	71.01
<i>Streptococcus</i>	0.75	<0.01	801.59	685.92
<i>Vibrio</i>	0.56	<0.01	<0.01	<0.01

Absolute content ratio=Average number of sequences from feces/Number of sequences from Dianchi Lake; Relative content ratio=Average relative abundance of feces/Relative abundance of Dianchi Lake.

成与含量相关系数为 0.74 ($P<0.01$)、VFs 组成与含量相关系数为 0.52 ($P<0.01$)。

3 讨论与结论

对于红嘴鸥肠道细菌类群组成, Liao 等通过 16S rRNA 基因测序发现, 红嘴鸥肠道含量最丰富的细菌门是厚壁菌门(*Firmicutes*, 86%)、变形菌门(*Proteobacteria*, 10%)、柔膜菌门(*Tenericutes*, 3%), 其中肠球菌科(*Enterococcaceae*)、肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)、支原体科(*Mycoplasmataceae*)为最丰富的科^[4]。本研究通过环境宏基因组测序检测发现埃希菌属、小链球菌属、乳酸杆菌等为优势菌群, 主要隶属于变形菌门与厚壁菌门, 与之前报道有差别, 可能是由于样品采集时间或者测序方法不同导致。虽然宏基因组测序从红嘴鸥粪便中检测到霍乱弧菌种, 但含量非常少, 且霍乱弧菌中主要是 O1 群和 O139 群可引起霍乱, 具有流行趋势, 推测红嘴鸥肠道所检测到的并非 O1 群和 O139 群。相比而言, 滇池水中的二类病原细菌种更多, 但含量也都比较少。对于红嘴鸥粪便纯培养细菌分离培养, 以往已有部分研究关注人类病原细菌。Liao 等针对常见病原细菌进行分离, 从 500 份红嘴鸥粪便共富集分离得到 124 株肠致病性大肠埃希菌(EPEC)、84 株沙门菌、62 株气单胞菌、41 株肠杆菌(*Enterobacter* spp.)、15 株小肠结肠炎耶尔森菌(*Yersinia enterocolitica*)、13 株泛菌属细菌(*Pantoea* spp.)和 38 株其他细菌(包括 19 个属)^[4]; 李娟等针对昆明滇池红嘴鸥粪便分离去重复后得到 7 株菌, 鉴定为大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、黏质沙雷氏菌、屎肠球菌、痢疾志贺氏菌、氧化克雷伯菌^[6]。本研究从红嘴鸥分离得到的细菌主要为埃希菌、志贺菌、葡萄球菌、肠球菌、气单胞菌、棒状杆菌(*Corynebacterium*)

等属细菌, 其中一些是人或动物潜在病原细菌, 但除部分气单胞菌外, 这些菌在人和动物肠道也常见^[1,7,16-17], 且并未分离到沙门菌、耶尔森菌, 这可能是由于样品采集时间、样品采集数量、分离培养温度、培养基与方法等不同导致, 具体何种因素可能引起红嘴鸥肠道菌群何种变化需要进一步研究。另外, 结合宏基因组测序分析, 推测红嘴粪便所分离的许多潜在病原细菌并非优势菌且应不存在二类病原细菌。本研究发现, 滇池水样中存在许多气单胞菌, Zhang 等也通过 16S rRNA 基因高通量测序发现滇池中气单胞菌含量也较为丰富^[19], 而嗜水气单胞菌、威隆气单胞菌为常见水产动物病原细菌种, 应引起重视。本研究培养分离纯化菌株通过 16S rRNA 基因鉴定并无大肠埃希菌, 这可能是由于本研究分离或者鉴定方法的局限性, 相关研究表明 16S rRNA 基因并不能很好地区分一些非典型的大肠埃希菌和志贺菌^[20]。

宏基因组测序虽然检测到很多耐药基因, 但通过部分菌株耐药表型检测发现, 多数菌株对绝大多数抗生素表现为敏感, 可能是以下几方面原因所致:(1) 本研究中宏基因组测序所检测到的耐药基因主要不是来自检测耐药菌表型的菌株, 或者这些基因和药敏表型检测所用药物不能完全对应;(2) 由于目前耐药表型检测手段局限性, 部分耐药基因在检测条件下低表达或者不表达, 这种药敏表型与基因型不一致的现象很常见, 特别是对于临床不常见的耐药机制^[21-23];(3) 很多环境宏基因组注释的耐药基因一致度和覆盖度较低^[24]。本研究中, 去冗余基因集通过 CARD 耐药基因数据库比对一致度大于 85% 的仅占总耐药基因的 5.03%, 而其中仅有 50.87% 的序列覆盖度在 50% 以上。本研究中, 比对一致度大于 85% 且覆盖度大于 50% 的耐药基因中, 红嘴鸥粪便主有(含量从高到低前 10)

msbA、*tetW*、*evgS*、*lmrD*、*tetB(P)*、*cpxA*、*gadX*、*emrY*、*mdtP*、*yojI*，滇池水环境主要有(含量从高到低前 10) *evgS*、*msbA*、*yojI*、*kdpE*、*cpxA*、*crp*、*acrB*、*lmrD*、*acrA*、*emrB*。*msbA* 编码 ABC 转运白外排泵，主要使细菌对硝基咪唑类抗菌药物耐药^[11]，基因关联分析研究检测到的此基因主要来自肠杆菌科细菌。硝基咪唑类药物具有抗原虫和抗菌作用，此类耐药基因被检测到可能与近年来其经常作为饲料添加剂被广泛应用于养殖业有关^[25-26]。*tetW* 主要使细菌对四环素类药物耐药，目前主要在革兰阳性细菌中检测到，包括我们常见的益生菌动物双歧杆菌 (*Bifidobacterium animalis*)、短双歧杆菌 (*Bifidobacterium breve*)、长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*)等^[11,27]，该抗生素可在很多环境中检测到，如猪粪^[28]、屠宰场工作人员^[29]、废水^[30]等。本研究分析发现此基因很可能来自未鉴定的乳酸杆菌属细菌，提示我们可能需要注意益生菌对耐药基因的转移作用。*evgS* 耐药机制为外排泵型，主要使细菌对四环素类、喹诺酮类、培南类、大环内酯类、黏菌素抗生素耐药，其目前主要在埃希菌属和志贺菌属中检测到^[11,31]，该基因还与细菌毒力相关^[32]。本研究发现该基因应主要来自大肠埃希菌等肠杆菌科细菌，肠杆菌科细菌在临床和其他环境分布都非常广，且本研究在表型中也发现对四环素耐药现象，应引起重视。本研究在纯培养与免培养中都检测到 *tetB* 耐药基因，该基因也是编码外排泵，使细菌对四环素类药物耐药，该基因目前在很多临床及其他环境来源细菌中可检测到^[11,33]。本研究纯培养的很多细菌都有检测到，免培养分析发现其主要应来自产气荚膜梭菌，也是临床常见病原细菌种，也应注意其转移。来自红嘴鸥粪便的其他优势耐药基因中，*lmrD* 对应林可霉素类耐药(基因关联分析应

主要来源于肠杆菌科、梭杆菌 *Fusobacterium*、乳球菌 *Lactococcus* 等；后所附均表示基因关联分析主要来源菌)，*cpxA* 对应氨基糖苷类、氨基香豆素类抗生素耐药(埃希菌)，*gadX* 对应培南类、喹诺酮类、大环内酯类抗生素耐药(埃希菌)，*emrY* 也对应四环素类耐药(埃希菌、肠杆菌等)，*mdtP* 对应核苷类抗生素、消毒剂和防腐剂耐药(埃希菌、小链球菌等)，*yojI* 对应多肽类抗生素耐药(肠杆菌属、柠檬酸杆菌 *Citrobacter* 等)。来自滇池水环境中的 *kdpE* (*Kluyvera*、*Serratia*) 与 *cpxA* (柠檬酸杆菌、气单胞菌等)对应氨基糖苷类药物耐药，*crp* 对应培南类、喹诺酮类、大环内酯类抗生素耐药(气单胞菌、肠杆菌、希瓦氏菌 *Shewanella*)，*acrB* (气单胞菌、柠檬酸杆菌、哈夫尼亚菌 *Hafnia* 等)与 *acrA* (*Leclercia*、*Kluyvera*、肠杆菌属等)对应 8 类抗菌药物耐药，*lmrD* 对应林可霉素类耐药(乳球菌)、*emrB* 对应喹诺酮类药物耐药(*Plesiomonas*、*Vogesella*、克雷伯菌等)。对于临床比较重视的碳青霉烯类药物耐药基因 *bla_{KPC}*、*bla_{NDM}*、*bla_{VIM}*、*bla_{IMP}*、*bla_{OXA-48}*^[34]，本研究检测在去除相似度覆盖度较低的序列后并未发现以上 5 类基因。由此可见，不管是红嘴鸥肠道还是滇池水环境，细菌都有对应不同抗菌物质的抗性基因，且菌种来源很广，并不局限于病原细菌种。本研究检测最丰富的耐药基因主要是对应硝基咪唑类和四环素类抗菌药物，推测对应环境中存在较多的这类抗生素残留。本研究测序数据量仅为 6–8 Gb，对于含量较少的耐药基因很多可能漏检，在今后研究中需增加测序深度或者获得更多的纯培养菌株进行基因组测序，才能获得样品中更准确的数据。

免培养测序发现，滇池水环境和红嘴鸥粪便中一些潜在病原细菌属种类和丰度相关性非常高，比如威隆气单胞菌、豚鼠气单胞菌、嗜

水气单胞菌含量相关性可达 0.84 ($P < 0.01$), 而在纯培养中同样也从滇池水环境和红嘴鸥粪便都分离得到了气单胞菌, 说明红嘴鸥肠道和水环境中的部分细菌可以相互转移。聚类分析发现物种大类群组成与丰度主导着细菌耐药基因、毒力因子、其他功能等, 推测这些细菌携带的耐药基因和毒力因子等也可能随着细菌转移而转移。研究表明, 许多人体自身、医院环境、城市环境 ARG 可转移至其他环境, 而生态环境中的 ARG 也可能转移至人类病原细菌^[35-36], 红嘴鸥为候鸟, 其在生态环境和城市环境中来回迁徙, 其对病原细菌及其耐药基因的转移作用需要引起重视。

总而言之, 研究发现红嘴鸥粪便样品中细菌多样性很好, 存在一些人或动物潜在病原细菌, 但其中许多细菌种在人和动物肠道也常见, 且也未发现临床常见致病种同时具有临床关注耐药现象, 推测红嘴鸥粪便细菌对免疫力正常人群不会造成细菌感染威胁。但是, 随着农用和兽用抗菌药物的广泛使用, 环境各类抗菌药物积累, 检测发现不管是红嘴鸥粪便还是滇池水样, 细菌耐药基因多样性都很丰富, 来源菌种分布广, 均存在应对各类抗菌药物的抗性基因; 而且从相关性分析可发现红嘴鸥肠道和滇池水样存在很多细菌属菌种相关性很高的情况, 说明这些细菌属菌种很可能在两种环境中相互转移, 而这些细菌携带的耐药基因也可能随其转移而转移, 我们应重视红嘴鸥肠道和水环境对环境耐药基因的富集和转移作用。

REFERENCES

- [1] JARMA D, SÁNCHEZ MI, GREEN AJ, PERALTA-SÁNCHEZ JM, HORTAS F, SÁNCHEZ-MELSIÓ A, BORREGO CM. Faecal microbiota and antibiotic resistance genes in migratory waterbirds with contrasting habitat use[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 783: 146872.
- [2] LIN YF, DONG XH, SUN R, WU J, TIAN LJ, RAO DW, ZHANG LH, YANG K. Migratory birds-one major source of environmental antibiotic resistance around Qinghai Lake, China[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 739: 139758.
- [3] AHLSTROM CA, van TOOR ML, WOKSEPP H, CHANDLER JC, REED JA, REEVES AB, WALDENSTRÖM J, FRANKLIN AB, DOUGLAS DC, BONNEDAHN J, RAMEY AM. Evidence for continental-scale dispersal of antimicrobial resistant bacteria by landfill-foraging gulls[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 764: 144551.
- [4] LIAO F, GU WP, LI D, LIANG JR, FU XQ, XU W, DUAN R, WANG X, JING HQ, DAI JJ. Characteristics of microbial communities and intestinal pathogenic bacteria for migrated *Larus ridibundus* in southwest China[J]. *Microbiology Open*, 2019, 8(4): e00693.
- [5] LEÉVESQUE B, BROUSSEAU P, SIMARD P, DEWAILLY E, MEISELS M, RAMSAY D, JOLY J. Impact of the ring-billed gull (*Larus delawarensis*) on the microbiological quality of recreational water[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(4): 1228-1230.
- [6] 李娟, 杨勇, 李朝, 鲁红林, 肖望成, 黄翠琴, 段纲, 曾邦权, 段博芳, 代飞燕. 昆明滇池红嘴鸥粪便细菌分离鉴定与耐药性分析[J]. *野生动物学报*, 2019, 40(1): 121-126.
LI J, YANG Y, LI Z, LU HL, XIAO WC, HUANG CQ, DUAN G, ZENG BQ, DUAN BF, DAI FY. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of fecal bacteria from black-headed gull (*Chroicocephalus ridibundus*) in Kunming[J]. *Chinese Journal of Wildlife*, 2019, 40(1): 121-126 (in Chinese).
- [7] CAO J, HU YF, LIU F, WANG YN, BI YH, LV N, LI J, ZHU BL, GAO GF. Metagenomic analysis reveals the microbiome and resistome in migratory birds[J]. *Microbiome*, 2020, 8(1): 26.
- [8] 郑光美. 中国鸟类分类与分布名录[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2011.
ZHENG GM. A checklist on the classification and distribution of the birds of China[M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2011 (in Chinese).
- [9] 梁良, 姜志诚, 王方, 王紫江, 陈明勇. 中国红嘴鸥研究进展[J]. *野生动物学报*, 2019, 40(2): 484-490.
LIANG L, JIANG ZC, WANG F, WANG ZJ, CHEN MY. Research on black-headed gull in China[J]. *Chinese Journal of Wildlife*, 2019, 40(2): 484-490 (in Chinese).

- [10] KÜSTER E, WILLIAMS ST. Selection of media for isolation of streptomycetes[J]. *Nature*, 1964, 202(4935): 928-929.
- [11] ALCOCK BP, HUYNH W, CHALIL R, SMITH KW, RAPHENYA AR, WLODARSKI MA, EDALATMAND A, PETKAU A, SYED SA, TSANG KK, BAKER SJC, DAVE M, MCCARTHY MC, MUKIRI KM, NASIR JA, GOLBON B, IMTIAZ H, JIANG XJ, KAUR K, KWONG M, et al. CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the comprehensive antibiotic resistance database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(D1): D690-D699.
- [12] LIU B, ZHENG DD, ZHOU SY, CHEN LH, YANG J. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors[J]. *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(D1): D912-D917.
- [13] Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: CLSI M100[S]. United States of America: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.
- [14] 邱实, 张含露, 朱丹怡, 吕熙, 万春云, 赵懿倅, 杨丰利, 李鹏飞. 某麋鹿保护区水源中细菌耐药基因携带情况调查[J]. *现代畜牧兽医*, 2021, 11: 67-70.
- QIU S, ZHANG HL, ZHU DY, LI X, WAN CY, ZHAO YM, YANG FL, LI PF. Investigation on drug resistance genes of bacteria in water source of a elk reserve[J]. *Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2021, 11: 67-70 (in Chinese).
- [15] CONTE D, PALMEIRO JK, BAVAROSKI AA, RODRIGUES LS, CARDOZO D, TOMAZ AP, CAMARGO JO, DALLA-COSTA LM. Antimicrobial resistance in *Aeromonas* species isolated from aquatic environments in Brazil[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 131(1): 169-181.
- [16] LLOYD-PRICE J, ABU-ALI G, HUTTENHOWER C. The healthy human microbiome[J]. *Genome Medicine*, 2016, 8(1): 51.
- [17] RYCHLIK I. Composition and function of chicken gut microbiota[J]. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 2020, 10(1): 103.
- [18] 国家卫生健康委关于印发人间传染的病原微生物目录的通知[N]. 中华人民共和国国家卫生健康委员会公报, 2023(8): 16-46.
- Notice of the national health commission on issuing the catalogue of pathogenic microorganisms transmitted among humans[N]. *Gazette of the National Health Commission of the People's Republic of China*, 2023(8): 16-46 (in Chinese).
- [19] ZHANG Y, ZUO JE, SALIMOVA A, LI AJ, LI L, LI D. Phytoplankton distribution characteristics and its relationship with bacterioplankton in Dianchi Lake[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, 27(32): 40592-40603.
- [20] DEVANGA RAGUPATHI NK, MUTHURULANDI SETHUVEL DP, INBANATHAN FY, VEERARAGHAVAN B. Accurate differentiation of *Escherichia coli* and *Shigella* serogroups: challenges and strategies[J]. *New Microbes and New Infections*, 2017, 21: 58-62.
- [21] RUPPÉ E, CHERKAoui A, CHARRETIER Y, GIRARD M, SCHICKLIN S, LAZAREVIC V, SCHRENZEL J. From genotype to antibiotic susceptibility phenotype in the order *Enterobacterales*: a clinical perspective[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2020, 26(5): 643.e1-643.e7.
- [22] 周秀娟, 何逸尘, 张利达, 崔妍, 史贤明. 基于基因组数据分析的细菌耐药基因识别与表型预测[J]. *微生物学报*, 2023: 1-15.
- ZHOU XJ, HE YC, ZHANG LD, CUI Y, SHI XM. Identification and prediction of bacterial antibiotic resistance via genomic data analysis[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023: 1-15 (in Chinese).
- [23] 唐梦君, 张小燕, 周倩, 陆俊贤, 唐修君, 张静, 杨星星, 陈薇, 高玉时. 一株同时携带 *optrA* 和 *cfrC* 基因的猪源多重耐药结肠弯曲菌的全基因组测序[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(8): 3538-3549.
- TANG MJ, ZHANG XY, ZHOU Q, LU JX, TANG XJ, ZHANG J, YANG XX, CHEN W, GAO YS. Whole genome sequencing of a porcine multiresistant *Campylobacter coli* strain carrying both *optrA* and *cfrC*[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(8): 3538-3549 (in Chinese).
- [24] DIAO ZL, HAN DS, ZHANG R, LI JM. Metagenomics next-generation sequencing tests take the stage in the diagnosis of lower respiratory tract infections[J]. *Journal of Advanced Research*, 2021, 38: 201-212.
- [25] 刘开, 郭建博, 薛晓文, 林芳, 王蕊, 宋莉, 李涛, 王晶. 超高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中硝基咪唑类药物及其代谢物的残留量的研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(19): 6751-6758.
- LIU K, GUO JB, XUE XW, LIN F, WANG R, SONG L, LI T, WANG J. Determination of nitroimidazoles and their metabolites residues in foodstuffs of animal origin by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2020, 11(19): 6751-6758 (in Chinese).
- [26] 上官苗苗. 动物源性食品中硝基咪唑类药物残留快

- 速检测方法研究[D]. 杭州: 浙江工业大学硕士学位论文, 2020.
- SHANGGUAN MM. Study on rapid determination of nitroimidazoles in animal derived food[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University of Technology, 2020 (in Chinese).
- [27] FATAHI-BAFGHI M, NASERI S, ALIZEHI A. Genome analysis of probiotic bacteria for antibiotic resistance genes[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2022, 115(3): 375-389.
- [28] JOYCE A, MCCARTHY CGP, MURPHY S, WALSH F. Antibiotic resistomes of healthy pig faecal metagenomes[J]. *Microbial Genomics*, 2019, 5(5): e000272.
- [29] van GOMPEL L, DOHMEN W, LUIKEN REC, BOUWKNEGT M, HERES L, van HEIJNSBERGEN E, JONGERIUS-GORTEMER BGM, SCHERPENISSE P, GREVE GD, TERSTEEG-ZIJDERVELD MHG, WADEPOHL K, RIBEIRO DUARTE AS, MUÑOZ-GÓMEZ V, FISCHER J, SKARŻYŃSKA M, WASYL D, WAGENAAR JA, URLINGS BAP, DORADO-GARCÍA A, WOUTERS IM, et al. Occupational exposure and carriage of antimicrobial resistance genes (*tetW*, *ermB*) in pig slaughterhouse workers[J]. *Annals of Work Exposures and Health*, 2020, 64(2): 125-137.
- [30] WANG Y, HAN YP, LI L, LIU JX, YAN X. Distribution, sources, and potential risks of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plant: a review[J]. *Environmental Pollution*, 2022, 310: 119870.
- [31] WAN F, XU LN, RUAN Z, LUO QX. Genomic and transcriptomic analysis of colistin-susceptible and colistin-resistant isolates identify two-component system EvgS/EvgA associated with colistin resistance in *Escherichia coli*[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2021, 14: 2437-2447.
- [32] PASQUA M, COLUCCIA M, EGUCHI Y, OKAJIMA T, GROSSI M, PROSEDA G, UTSUMI R, COLONNA B. Roles of two-component signal transduction systems in *Shigella* virulence[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(9): 1321.
- [33] LI YJ, ZHANG M, LUO J, CHEN JL, WANG QL, LU SL, JI H. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from retail foods in northern Xinjiang, China[J]. *Food Science & Nutrition*, 2020, 8(4): 2035-2051.
- [34] 余柏增, 孙宁, 王颖, 王卫萍, 黄红娟, 苗留飞, 陈勇, 曹进, 李晓军. 检测 5 种碳青霉烯酶基因的多重 PCR 方法的建立及临床应用[J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(15): 2281-2286.
- YU BZ, SUN N, WANG Y, WANG WP, HUANG HJ, MIAO LF, CHEN Y, CAO J, LI XJ. Establishment and clinical application of a multiplex PCR assay for the detection of five carbapenemase genes[J]. *Chinese Journal of Nosocomiology*, 2020, 30(15): 2281-2286 (in Chinese).
- [35] SALAZAR C, GIMÉNEZ M, RIERA N, PARADA A, PUIG J, GALIANA A, GRILL F, VIEYTES M, MASON CE, ANTELO V, D'ALESSANDRO B, RISSO J, IRAOLA G. Human microbiota drives hospital-associated antimicrobial resistance dissemination in the urban environment and mirrors patient case rates[J]. *Microbiome*, 2022, 10(1): 208.
- [36] LI HZ, ZHANG DD, YANG K, AN XL, PU Q, LIN SM, SU JQ, CUI L. Phenotypic tracking of antibiotic resistance spread via transformation from environment to clinic by reverse D₂O single-cell Raman probing[J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 92(23): 15472-15479.