

研究报告

一株污水源多重耐药大肠杆菌的耐药性检测及全基因组测序分析

崔红, 王继华*, 车琦, 黄涵, 朱剑琴

哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150025

崔红, 王继华, 车琦, 黄涵, 朱剑琴. 一株污水源多重耐药大肠杆菌的耐药性检测及全基因组测序分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 3800-3817.

CUI Hong, WANG Jihua, CHE Qi, HUANG Han, ZHU Jianqin. Drug resistance detection and whole genome sequencing of a multi-drug resistant *Escherichia coli* strain from sewage[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 3800-3817.

摘要: 【背景】水体环境分布广、流动性强, 是耐药菌和耐药基因传播的主要媒介。【目的】了解北方污水厂大肠杆菌携带的耐药基因及可移动遗传元件情况。【方法】从北方污水厂筛选出一株多重耐药大肠杆菌, 通过药敏试验进行耐药性检验, 采用 96 孔板法测定菌株的最小抑菌浓度, 利用酶标仪探究亚抑菌浓度抗生素对菌株生长的影响, 并对菌株进行全基因组测序, 对其携带的耐药基因及可移动遗传元件进行预测。【结果】大肠杆菌 WEC 对四环素、环丙沙星、诺氟沙星和红霉素具有耐药性, 亚抑菌浓度的四环素、环丙沙星和诺氟沙星能够延缓或抑制菌株的生长。WEC 菌株的基因组中包含一条大小为 4 782 114 bp 的环状染色体和 2 个大小分别为 60 306 bp (pWEC-1) 和 92 065 bp (pWEC-2) 的环状质粒。菌株共携带 129 个耐药基因, 其中 128 个位于染色体上, 在染色体上预测到原噬菌体、基因岛及插入序列的存在, 部分可移动遗传元件携带有耐药基因。质粒 pWEC-1 中无耐药基因, pWEC-2 含有 1 个耐药基因, 在质粒基因组中预测到原噬菌体和插入序列。【结论】污水源大肠杆菌 WEC 是一株多重耐药菌株, 其基因组中携带耐药基因和多种可移动遗传元件, 具有发生耐药性转移的潜力。

关键词: 污水处理厂; 大肠杆菌; 多重耐药; 全基因组测序

资助项目: 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(2021-KYYWF-0172); 2022 年哈尔滨师范大学研究生创新项目(2021301178)

This work was supported by the Basic Scientific Research Funds for Colleges and Universities in Heilongjiang Province (2021-KYYWF-0172) and the Graduate Innovation Project of Harbin Normal University in 2022 (2021301178).

*Corresponding author. E-mail: wangjihua333@hotmail.com

Received: 2023-01-05; Accepted: 2023-03-11; Published online: 2023-05-16

Drug resistance detection and whole genome sequencing of a multi-drug resistant *Escherichia coli* strain from sewage

CUI Hong, WANG Jihua*, CHE Qi, HUANG Han, ZHU Jianqin

Life Science and Technology College, Harbin Normal University, Harbin 150025, Heilongjiang, China

Abstract: [Background] The water environment with wide distribution and high mobility is the main medium for the spread of drug resistant bacteria and genes. [Objective] To understand the drug resistance genes and mobile genetic elements carried by *Escherichia coli* from a sewage plant in northern China. [Methods] A multi-drug resistant strain of *E. coli* was isolated from the sewage plant. The antimicrobial susceptibility test was carried out. The 96-well plate method was employed to determine the minimum inhibitory concentrations of antibiotics against this strain. The effects of antibiotics at sub-inhibitory concentrations on the growth of the strain were explored by a microplate reader. The whole genome sequencing was carried out to predict the resistance genes and mobile genetic elements carried by the strain. [Results] *E. coli* WEC was resistant to tetracycline, ciprofloxacin, norfloxacin, and erythromycin. Sub-inhibitory concentrations of tetracycline, ciprofloxacin, and norfloxacin stagnated or inhibited the growth of strains. The genome of WEC was composed of a circular chromosome of 4 782 114 bp and two circular plasmids of 60 306 bp (pWEC-1) and 92 065 bp (pWEC-2), respectively. The strain carried 129 drug resistance genes, of which 128 were located on the chromosome. Prophages, gene islands, and insertion sequences was predicted to be present on the chromosome, and some mobile genetic elements carried drug resistance genes. There was no drug resistance gene in plasmid pWEC-1, and pWEC-2 carried one drug resistance gene. Prophages and insertion sequences were predicted to be present in the plasmid genome. [Conclusion] *E. coli* WEC from sewage is a multi-drug resistant strain. Carrying drug resistance genes and a variety of mobile genetic elements, the strain has the potential of drug resistance transfer.

Keywords: sewage treatment plant; *Escherichia coli*; multidrug resistance; whole genome sequencing

耐药菌(antibiotic resistant bacteria, ARB)是能够抵制抗生素对其自身影响的细菌,对3类及以上抗生素产生抵抗的细菌称为多重耐药菌(multi-drug resistant organism, MDRO)。耐药基因(antibiotic resistant genes, ARGs)是基于多种机制使宿主对抗生素产生耐受性的基因。耐药菌和耐药基因能够在不同的环境介质中传播,给人类、动物和环境安全都带来极大的挑战^[1]。大肠杆菌是结构相对简单的单细胞生物,同时也是研究微生物间遗传

物质水平转移现象的模式生物^[2]。Kawahara 等^[3]通过调查发现大肠杆菌携带的耐药基因可通过转座子在同一家庭的人和牲畜之间传播。作为人畜共患的肠道病原体之一,在猪、羊、鸟禽中均发现多重耐药的大肠杆菌,经多位点序列分型分析,它们属于不同的序列类型^[4-6]。水环境因具有较强的流动性,为耐药菌和耐药基因的传播提供了动力,在医院废水、溪流和城市污水处理厂中均检测到耐药大肠杆菌的存在^[7-9]。微生物耐药性问题

已成为国际各界广泛关注且持续研究的话题。

国内外研究者采用全基因组测序技术和比较基因组学分析的方法,基于基因组图谱对耐药菌的遗传信息及耐药基因转移的问题进行解析^[10-12]。林本夫等^[13]在沙门氏菌流行病学调查研究中发现,全基因组测序分析结果与传统试验的结果一致,且在试验操作和周期上更有优势。目前对医院和畜牧源耐药微生物全基因组解析的研究成果较丰富,关于土壤、污水等环境中耐药菌的全基因组解析仍有待深入。在本研究中,为了解污水中耐药菌携带耐药基因和可移动遗传元件的情况,对从北方污水厂中分离出一株多重耐药大肠杆菌进行全基因组测序分析,获得菌株完整的基因组信息,以确定其携带的耐药基因和可移动遗传元件在基因组的分布情况,为污水源大肠杆菌耐药性评估及耐药基因流行情况的研究提供研究基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

大肠杆菌 WEC 分离自哈尔滨市呼兰老城区污水处理厂,其污水主要来源是呼兰区的生活污水。质控菌大肠杆菌 ATCC 25922 购自上海保藏生物技术有限公司。

抗生素(磺胺甲恶唑、磺胺二甲基嘧啶、四环素、强力霉素、环丙沙星、诺氟沙星、阿奇霉素和红霉素),上海源叶生物科技有限公司;抗生素药敏纸片,常德比克曼生物科技有限公司;台式高速冷冻离心机,盐城市凯特实验仪器有限公司;酶标分析仪,深圳雷杜生命科学股份有限公司。

MHA 培养基和 MHB 培养基,青岛海博生物技术有限公司。

1.2 菌株耐药性检测

采用传统培养方法与 K-B 纸片法相结合的方式测定大肠杆菌 WEC 对磺胺甲恶唑(sulfamethoxazole, SMX)、磺胺二甲基嘧啶

(sulfamethazine, SMZ)、四环素(tetracycline, TET)、强力霉素(doxycyclin, DOX)、环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)、诺氟沙星(norfloxacin, NOR)、阿奇霉素(azithromycin, AZI)、红霉素(erythromycin, ERM)等 4 类(共 8 种)常见抗生素的耐受性,用游标卡尺测量各抗菌药物抑菌圈直径大小,以大肠杆菌 ATCC 25922 为质控菌,根据 CLSI M100 标准做出判断。采用 96 孔板法测定菌株对不同抗生素的最小抑菌浓度(MIC)^[14]。

1.3 抗生素对菌株生长的影响

基于大肠杆菌 WEC 对不同抗生素的最小抑菌浓度(MIC),配制 1 MIC、1/2 MIC、1/4 MIC、1/8 MIC 及 1/16 MIC 等浓度梯度的抗生素溶液,以不含抗生素的菌悬液为对照,通过酶标仪测定在亚抑菌浓度抗生素作用下大肠杆菌 WEC 的生长曲线。

1.4 菌株全基因组测序、组装和分析

将在 LB 液体培养基中 35 °C、150 r/min 培养 6 h 得到的大肠杆菌 WEC 菌悬液经 4 °C、4 000×g 离心 10 min 获得菌体,缓存于-80 °C 冰箱,随后将样品置于干冰中送至深圳微科盟科技集团有限公司进行全基因组测序。利用 Pacbio 平台和 Illumina 平台进行建库和库检,库检合格后进行 PacBio Sequel 和 Illumina NovaSeq PE150 测序。用 SMRT Link v5.0.1 软件进行基因组组装,利用 arrow 软件对组装结果进行优化,最终得到高质量的细菌基因组完整序列。

通过 EnteroBase 在线分析平台对菌株进行核心基因组多位点序列分型(cgMLST)分析,利用 Grapetree 绘制进化树^[15]。将细菌基因组与 CARD 数据库比对,得到菌株的耐药基因注释信息。使用 VFDB 在线数据库的 VFAnalyzer 功能识别菌株基因组中的毒力因子^[16]。使用 oriTfinder 数据库预测菌株质粒基因组中的水平转移元件^[17]。采用 IslandPath-DIOMB 软件预测基因岛。通过软件 phiSpy 对菌株的原噬菌体进行预测。采用 ISfinder 比对菌株基因组上的插入

序列^[18]。使用 CGView 的 Alien Hunter 功能预测菌株中潜在的可发生水平转移的区域^[19]。使用 CGView 在线工具 Proksee 绘制结果图。

2 结果与分析

2.1 菌株耐药性检测结果

测定大肠杆菌 WEC 对不同抗生素的耐受程度, 结果表明菌株对 SMX、SMZ、DOX 和 AZI

表现敏感, 对 TET、CIP、NOR 和 ERM 表现出耐药性。如表 1 所示, 菌株对 TET 的耐药性最强, 达到 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。对于喹诺酮类抗生素, 菌株对 NOR 的耐药性显著高于 CIP。对 ERM 的最小抑菌浓度为 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2 抗生素对菌株生长的影响结果

不同浓度抗生素作用下大肠杆菌 WEC 的生长曲线结果显示(图 1), 在 TET、CIP 和 NOR 作

表 1 大肠杆菌 WEC 对不同抗生素的最小抑菌浓度结果

Table 1 The minimum inhibitory concentration results of *Escherichia coli* WEC to different antibiotics

Item	四环素 Tetracycline	环丙沙星 Ciprofloxacin	诺氟沙星 Norfloxacin	红霉素 Erythromycin
MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	256	32	128	32
抑菌率 Inhibition rate (%)	92.65	94.91	95.63	99.79

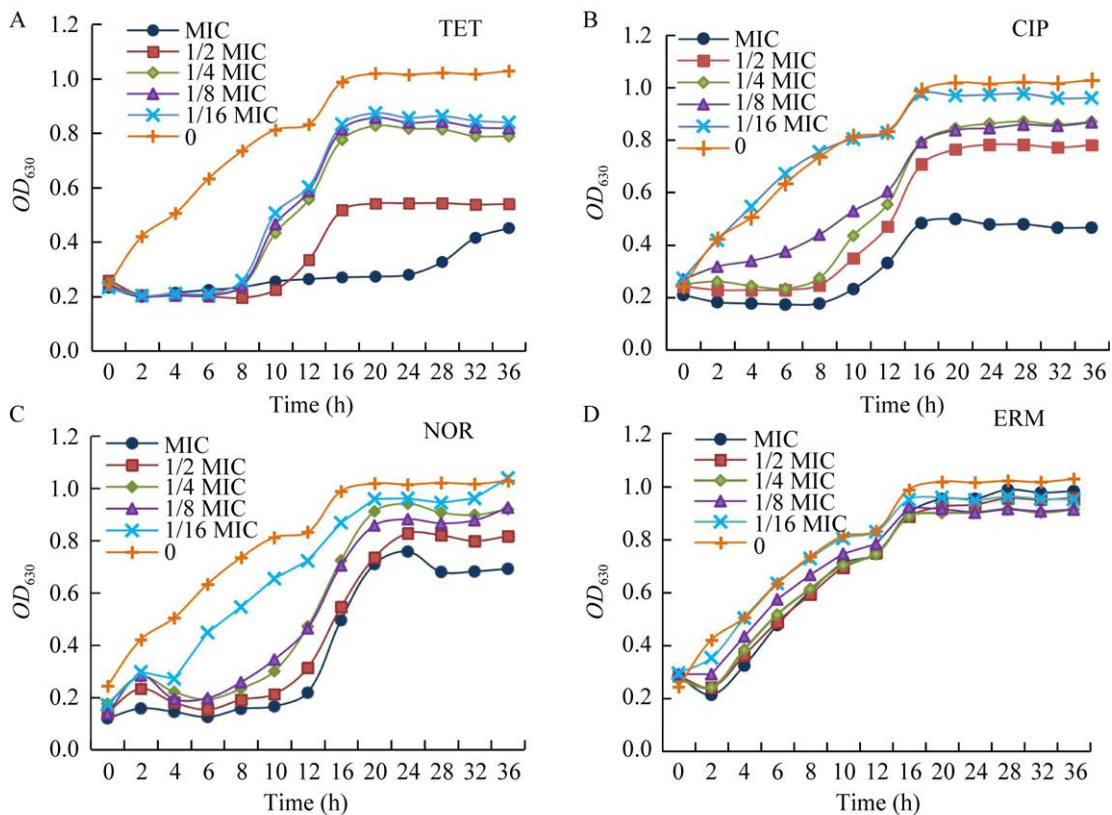


图 1 亚抑菌浓度抗生素下大肠杆菌 WEC 的生长曲线图 A: 不同浓度四环素中 WEC 菌株生长曲线. B: 不同浓度环丙沙星中 WEC 菌株生长曲线. C: 不同浓度诺氟沙星中 WEC 菌株生长曲线. D: 不同浓度红霉素中 WEC 菌株生长曲线

Figure 1 The growth curve of *Escherichia coli* WEC under sub-inhibitory concentration antibiotics. A: The growth curve of WEC strain in different concentrations of tetracycline. B: The growth curve of WEC strain in different concentrations of ciprofloxacin. C: The growth curve of WEC strain in different concentrations of norfloxacin. D: The growth curve of WEC strain in different concentrations of erythromycin.

用下,菌株的生长出现明显的延滞期,且高浓度抗生素作用下菌株的生长趋势不及低浓度和不加抗生素环境下的生长。不同浓度红霉素作用下菌株的生长趋势与对照组相似,说明红霉素对菌株生长的影响较小。

2.3 菌株全基因组测序结果

2.3.1 基因组基本特征分析结果

经过序列拼接及组装,WEC 菌株的基因组包括 1 条环状染色体,大小为 4 782 114 bp,GC 含量为 50.74%,同时含有 2 个大小分别为 60 306 bp 和 92 065 bp 的环状质粒,GC 含量分别为 42.24%

和 54.06%,分别命名为 pWEC-1 和 pWEC-2。将菌株基因组序列提交至 NCBI 的基因组数据库,获取 GenBank 登录号,其中染色体基因组登录号为 CP114592,质粒 pWEC-1 基因组登录号为 CP114593,质粒 pWEC-2 基因组登录号为 CP114594。经 EnteroBase 在线分析平台分析可知,菌株 WEC 的 MLST 分型为 ST 1589, cgMLST 分型为 cgST 230665。菌株进化最小生成树如图 2 所示,WEC 菌株与 *Escherichia coli* AUSMDU00019926 (SRA: PRJNA565795) 的进化关系最近。

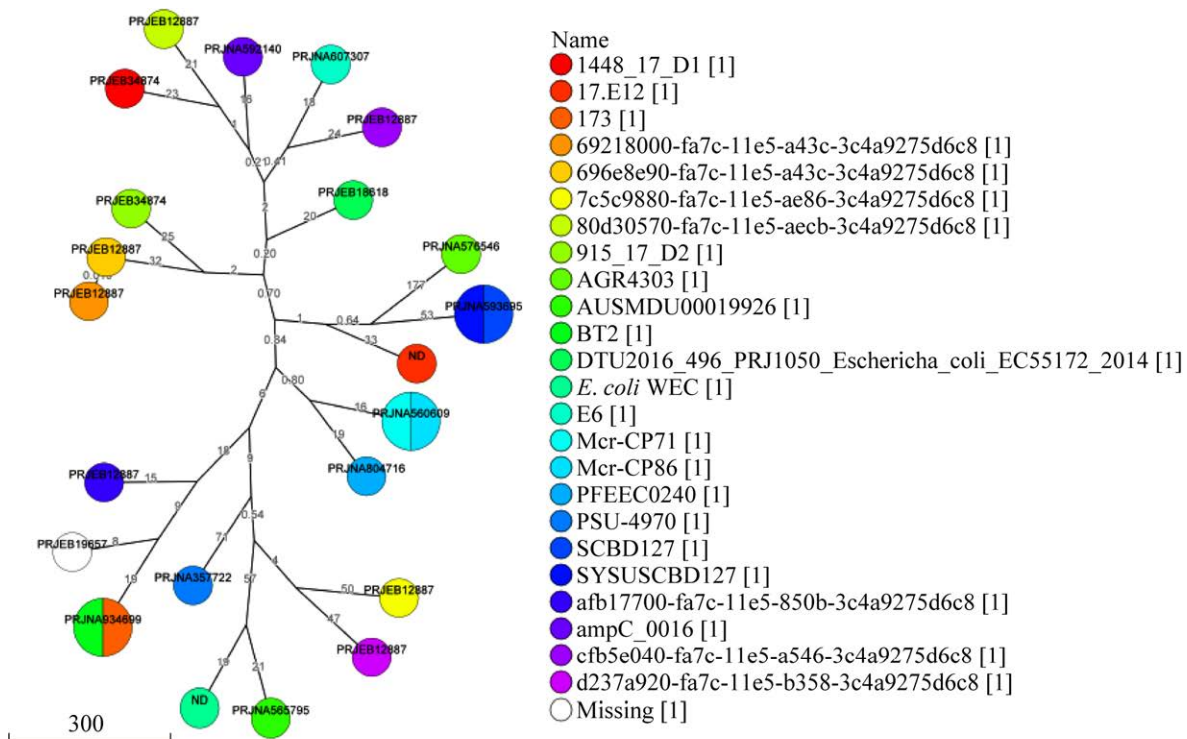


图 2 大肠杆菌 WEC 的最小生成树 右侧图标为菌株名称和数目;标尺表示分支缩放程度;圆形中的信息为 BioProject 登录号,ND 表示无;圆形直径大小表示菌株数量多少;圆形之间的实线及数字表示菌株之间遗传距离的远近

Figure 2 Minimum spanning tree of *Escherichia coli* WEC. The icon on the right shows the name and number of strains; The ruler indicates the degree of branch scaling; The information in the circle is BioProject login number, ND indicates none; The diameter of the circle indicates the number of strains; The solid lines and numbers between the circles indicate the genetic distance between strains.

2.3.2 耐药基因和毒力因子分析结果

经过与 CARD 数据库的比对发现, 大肠杆菌 WEC 共携带 129 个耐药基因, 只有 1 个与 β -内酰胺类抗生素耐药性相关的基因 *OmpK37* 位于质粒 pWEC-2 上, 通过降低抗生素渗透性引起耐药性。其余 128 个 ARGs 均位于染色体上, 如表 2 所示, 其中四环素类 ARGs 有 *TxR*、*emrK*、*emrY* 和 *tetC*, 喹诺酮类 ARGs 有 *emrB*、*emrA*、*emrR*、*MdtK* 和 *mdtH*, 大环内酯类 ARGs 有 *macB*, 这与前期药敏试验结果相一致, 说明 WEC 菌株的耐药基因与耐药表型相符。除携带四环素类、喹诺酮类和大环内酯类抗生素的 ARGs, 在菌株基因组中还比对到氨基糖苷类、碳青霉烯类和头孢菌素类等 ARGs, 这些耐药基因可通过降低抗生素渗透性、改变抗生素作用靶点、使抗生素失活以及抗生素外排使菌株产生耐药性。经统计发现与抗生素外排相关的 ARGs 最多, 相关外排泵有 ABC 型外排泵、RND 型外排泵、MFS 型外排泵等。*Pseudomonas aeruginosa soxR* 和 *tolC* 与 3 种外排泵均有关系, *marA*、*ramA* 和 *ParR* 不仅参与抗生素的外排, 还可以使抗生素渗透性降低。

对大肠杆菌 WEC 菌株基因组中携带的毒力因子进行分析(表 3), 结果表明, 菌株染色体上有 64 个毒力因子, 其中黏附类的毒力因子数目最多, 主要包括 EaeH 和 5 种菌毛类: CFA/I 菌毛(CFA/I fimbriae)、大肠杆菌共生菌毛(*E. coli* common pilus)、出血性大肠杆菌菌毛(hemorrhagic *E. coli* pilus)、I 型菌毛(type I fimbriae)和大肠杆菌层黏蛋白结合菌毛(*E. coli* laminin binding fimbriae)。其次是分泌系统, 18 个毒力因子均属于 VI 型分泌系统 ACE T6SS。非 LEE 编码的 TTSS 效应器检索到 8 个毒力因子, 自主转运蛋白毒力因子有 6 个, 与侵袭相关的毒力因子有 2 个, 定殖和免疫逃逸毒力因子及

毒素毒力因子各有 1 个。质粒 pWEC-1 无毒力因子, 质粒 pWEC-2 具有 2 个毒力因子, 均属于黏附类, 与 IV 型菌毛(type IV pili)有关。

基于 STRING 数据库和 Cytoscape 工具绘制大肠杆菌 WEC 中耐药基因和毒力因子的蛋白质互作网络图(图 3), 以 *Escherichia coli* K12 MG1655 为参考, 蛋白互作最低分数设置为高可信度 0.700, 结果共得到 73 个节点、209 条连线。其中 I 型菌毛和大肠杆菌层黏蛋白结合菌毛及大肠杆菌共生菌毛形成一个网络, 并通过外膜蛋白 OmpA 与耐药基因相关蛋白产生联系, 形成更大的互作网络。通过改变抗生素作用靶点产生耐药性的相关蛋白之间也形成互作关系。外排蛋白 TolC 与其他耐药相关蛋白质之间共形成 21 条连线, 说明其在介导细胞产生耐药性中发挥重要作用。

2.3.3 可移动遗传元件预测结果

通过 oriTfinder 数据库对质粒中的水平移动元件进行预测, 结果显示, 质粒 pWEC-1 含有 1 个 oriT (转移区起点)、17 个 T4SS (IV 型分泌系统基因)和 1 个 T4CP (IV 型偶联蛋白), 表明质粒 pWEC-1 具有转移的潜力(图 4A)。质粒 pWEC-2 未预测到相关元件, 说明质粒 pWEC-2 不具有自主转移潜力(图 4B)。

利用 CGView 的 Alien Hunter 功能对 2 个质粒上潜在的水平转移区域进行预测, 结果发现质粒 pWEC-1 上预测到 3 个 HGT 区域, 基于氨基酸序列注释比对得到的区域结构图如图 4C 所示, HGT (2 500–7 500 bp)上有 IV 型分泌系统蛋白、质粒相关蛋白 TrbJ 和 KikA 以及菌毛组装蛋白 PilL 等。HGT (42 500–47 500 bp)中有偶联转移蛋白 TraL、松弛酶、质粒转移松弛体蛋白 MobC 和 II 型毒素-抗毒素系统 HicB 家族抗毒素。HGT (52 500–60 306 bp)则含有染色体分配蛋白 ParA、插入序列 IS609、CaiF/GrlA 家族转

表 2 大肠杆菌 WEC 染色体上携带的耐药基因情况

Table 2 Drug resistance genes carried on *Escherichia coli* WEC chromosomes

耐药机制	耐药基因家族	耐药基因名称(数目)
Resistance mechanism	Antibiotic resistant gene family	Antibiotic resistant genes (numbers)
抗生素渗透性降低	对 β -内酰胺类渗透性降低的普通细菌孔蛋白	<i>ompA</i> , <i>Klebsiella pneumoniae OmpK37</i> (5)
Reduced permeability to antibiotic	General bacterial porin with reduced permeability to beta-lactams	
抗生素靶点替换	抗甲氧苄啶双氢叶酸还原酶 DFR	<i>Trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase DfrA42</i>
Antibiotic target replacement	Trimethoprim resistant dihydrofolate reductase DFR	
抗生素靶点改变或替换	耐利福霉素的 β -亚基 RNA 聚合酶	<i>Bifidobacterium adolescentis rpoB</i> mutants
Antibiotic target alteration; antibiotic target replacement	Rifamycin-resistant beta-subunit of RNA polymerase	
抗生素靶点改变	糖肽抗性基因簇、van 连接酶	<i>vanI</i>
Antibiotic target alteration	Glycopeptide resistance gene cluster; van ligase	
	糖肽抗性基因簇	<i>vanXA</i>
	Glycopeptide resistance gene cluster	
	磷酸乙醇胺转移酶	<i>PmrF</i> , <i>ugd</i> , <i>eptA</i> (2), <i>eptB</i> , <i>arnA</i> , <i>arnT</i>
	Phosphoethanolamine transferase	
	十一戊烯基焦磷酸相关蛋白	<i>bacA</i>
	Undecaprenyl pyrophosphate related proteins	
抗生素失活	ampC 型 β -内酰胺酶	<i>Escherichia coli ampC1</i> beta-lactamase (2), <i>Escherichia coli ampH</i> beta-lactamase, <i>Escherichia coli ampC</i> beta-lactamase
Antibiotic inactivation	ampC-type beta-lactamase	
	APH(3'')	<i>APH(3'')-Ib</i> (6)
	APH(6)	<i>APH(6)-Id</i>
	AAC(3)	<i>AAC(3)-Iib</i>
	CTX-M 型 β -内酰胺酶 CTX-M beta-lactamase	<i>CTX-M-5</i> , <i>CTX-M-66</i>
	TEM 型 β -内酰胺酶 TEM beta-lactamase	<i>TEM-108</i> , <i>TEM-116</i>
	SHV 型 β -内酰胺酶 SHV beta-lactamase	<i>SHV-64</i>
	链阳霉素乙酰转移酶	<i>vatD</i>
	Streptogramin vat acetyltransferase	
抗生素外排	对 β -内酰胺渗透性降低的普通细菌孔蛋白、RND 型外排泵	
Antibiotic efflux	型外排泵	
抗生素渗透性降低	General bacterial porin with reduced permeability to beta-lactams; resistance-nodulation-cell division	
Reduced permeability to antibiotic	(RND) antibiotic efflux pump	
	外膜孔蛋白(Opr)、RND 型外排泵	<i>ParR</i> (2)
	Outer Membrane Porin (Opr); resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump	
抗生素外排	ABC 型、MFS 型、RND 型外排泵	<i>Pseudomonas aeruginosa soxR</i> , <i>tolC</i>
Antibiotic efflux	ATP-binding cassette (ABC) antibiotic efflux pump;	
抗生素靶点改变	major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump;	
Antibiotic target alteration	resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump	
抗生素外排泵	ABC 型外排泵	<i>YojI</i> , <i>LptD</i> , <i>macB</i> , <i>msbA</i> (3), <i>TxR</i> (8)
Antibiotic efflux	ATP-binding cassette (ABC) antibiotic efflux pump	
	kdpE	<i>kdpE</i>
	MFS 型外排泵	<i>emrB</i> , <i>emrA</i> , <i>emrR</i> (2), <i>emrY</i> , <i>emrK</i> , <i>Klebsiella pneumoniae KpnE</i> (2), <i>mdtH</i> , <i>mdtM</i> , <i>mdtG</i> , <i>mdtN</i> (2), <i>mdtO</i> , <i>mdtP</i> , <i>arlR</i> (2), <i>tetC</i> , <i>Escherichia coli mdfA</i> , <i>Klebsiella pneumoniae KpnG</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>AbaF</i> , <i>qacEdelta1</i>
	Major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump	

(待续)

(续表 2)

耐药机制	耐药基因家族	耐药基因名称(数目)
Resistance mechanism	Antibiotic resistant gene family	Antibiotic resistant genes (numbers)
	MFS 型外排泵、RND 型外排泵	<i>evgA</i> , <i>evgS</i> (4), <i>H-NS</i> (2)
	Major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump; resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump	
	MATE 转运蛋白	<i>MdtK</i> , <i>hmrM</i>
	Multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter	
	RND 型外排泵	<i>acrB</i> , <i>acrA</i> , <i>acrD</i> (2), <i>acrE</i> , <i>acrF</i> (3), <i>acrS</i> (2),
	Resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump	<i>adeH</i> , <i>baeR</i> (2), <i>baeS</i> (2), <i>cpxA</i> (2), <i>CRP</i> , <i>gadW</i> , <i>gadX</i> (3), <i>golS</i> , <i>mdtA</i> , <i>mdtB</i> , <i>mdtC</i> , <i>mdtE</i> , <i>mdtF</i> (2), <i>MexD</i> , <i>OprZ</i> , <i>oqxB</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa CpxR</i> , <i>rsmA</i> , <i>sdiA</i> , <i>smeR</i> , <i>YajC</i>
	SMR 型外排泵	<i>Pseudomonas aeruginosa emrE</i> (2), <i>qacL</i>
	Small multidrug resistance (SMR) antibiotic efflux pump	

若耐药基因后面无数字标注, 表示该基因数目为 1

If there is no digital mark behind the resistant gene, it means the number of the gene is one.

表 3 大肠杆菌 WEC 基因组中携带的毒力因子情况

Table 3 Virulence factors carried in the *Escherichia coli* WEC genome

位置	分类	毒力因子	毒力基因(数目)	
Location	VF class	Virulence factors	VF genes (number)	
Chr	黏附 Adherence	CFA/I fimbriae	<i>cfaA</i> , <i>cfaB</i> , <i>cfaC</i>	
		<i>E. coli</i> common pilus	<i>ecpA</i> , <i>ecpB</i> , <i>ecpC</i> , <i>ecpD</i> , <i>ecpE</i> , <i>ecpR</i>	
		<i>E. coli</i> laminin-binding fimbriae	<i>elfA</i> , <i>elfC</i> , <i>elfD</i> , <i>elfG</i>	
		EaeH	<i>eaeH</i>	
		Hemorrhagic <i>E. coli</i> pilus	<i>hcpA</i> , <i>hcpB</i> , <i>hcpC</i>	
	自主转运蛋白 Autotransporter	Type I fimbriae	<i>fimA</i> , <i>fimC</i> , <i>fimD</i> (2), <i>fimE</i> , <i>fimF</i> (2), <i>fimG</i> (2), <i>fimH</i> , <i>fimI</i>	
		AatA	<i>aatA</i>	
		Antigen 43	<i>agn43</i>	
		Cah	<i>Cah</i>	
		EhaA	<i>ehaA</i>	
		EhaB	<i>ehaB</i>	
		UpaG adhesin	<i>upaG/ehaG</i>	
		入侵 Invasion	Invasion of brain endothelial cells	<i>ibeB</i> , <i>ibeC</i>
		非 LEE 编码的 TTSS 效应器 Non-LEE encoded TTSS effectors	EspL1	<i>espL1</i>
			EspL4	<i>espL4</i>
	EspR1		<i>espR1</i>	
	EspR4		<i>espR4</i>	
	EspX1		<i>espX1</i>	
	EspX4		<i>espX4</i>	
	分泌系统 Secretion system	EspX5	<i>espX5</i>	
EspX6		<i>espX6</i>		
ACE T6SS		Undetermined, <i>aec15</i> (3), <i>aec16</i> , <i>aec17</i> , <i>aec18</i> , <i>aec19</i> , <i>aec22</i> , <i>aec23</i> , <i>aec24</i> , <i>aec25</i> , <i>aec26</i> , <i>aec27/clpV</i> , <i>aec28</i> , <i>aec30</i> , <i>aec31</i> , <i>aec32</i>		
毒素 Toxin		Hemolysin/Cytolysin A	<i>hlyE/clay</i>	
定殖和免疫逃逸 Colonization and immune evasion		Capsule biosynthesis and transport (<i>Campylobacter</i>)	<i>Glf</i>	
pWEC-2	黏附 Adherence	Type IV pili biosynthesis (<i>Pseudomonas</i>) <i>pilU</i>		
		Type IV pili (<i>Yersinia</i>)	<i>pilW</i>	

若毒力基因后面无数字标注, 表示该基因数目为 1

If there is no digital mark behind the virulence gene, it means the number of the gene is one.

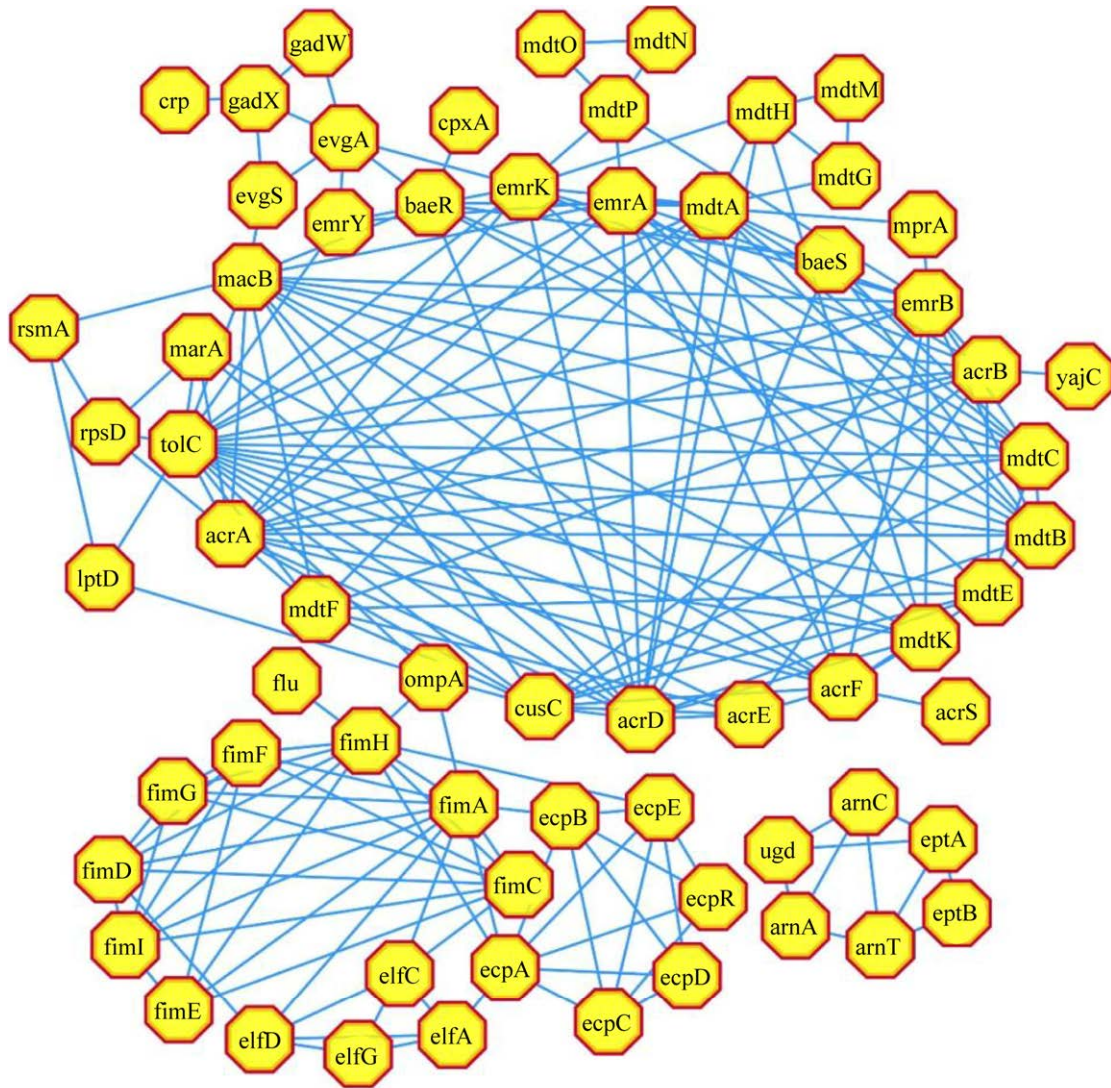


图3 大肠杆菌 WEC 中耐药基因与毒力因子的蛋白互作网络图

Figure 3 Protein interaction network diagram of drug resistance genes and virulence factors in *Escherichia coli* WEC.

录调控因子以及 ProQ/FINO 家族蛋白和复制启动蛋白(Rep)。质粒 pWEC-2 共预测到 4 个 HGT 区域, 各区域结构图如图 4D 所示, HGT (2 500–10 000 bp)中基因编码的蛋白均与菌毛相关。HGT (15 000–32 500 bp)预测到 1 个耐药基因 *OmpK37*, 还包括接合转移蛋白 TraA、复制启动蛋白、质粒分离蛋白 ParM、整合酶、重组酶和 DNA 聚合酶, 以及 2 个 II 型毒素-抗毒素系统蛋白。HGT (62 500–67 500 bp)上有 IA 型

DNA 拓扑异构酶 TopoIA 及 DotA/TraY 家族蛋白。HGT (87 065–92 065 bp)含有接合转移蛋白 TraF 和酪氨酸重组酶 XerC。除 pWEC-2:HGT (2 500–10 000 bp)外, 其余 HGT 区域均含有一定数目的假定蛋白(HP)。通过 BLAST 分析发现, 质粒中的 HGT 区域除与来自大肠杆菌的质粒具有很高的相似性外, 部分 HGT 区域与 *Shigella flexneri* 和 *Salmonella enterica* 也具有较高的相似性(表 4)。

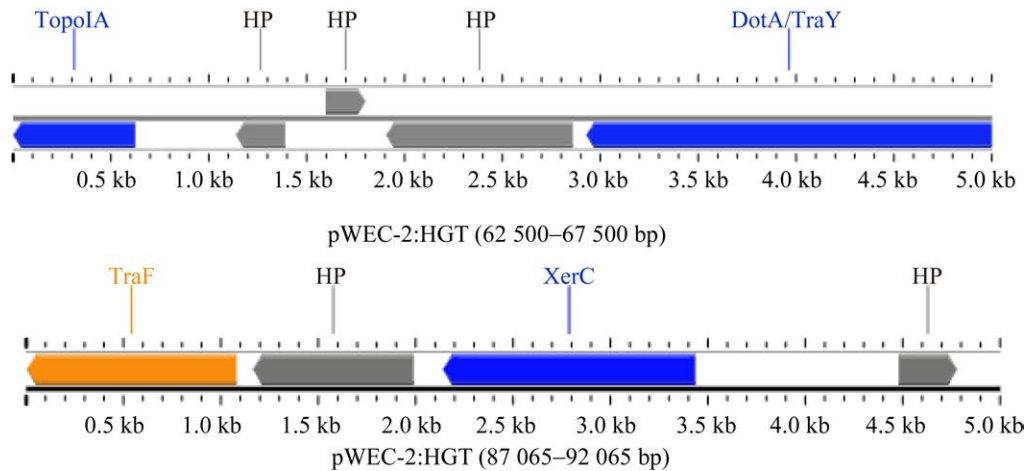


图 4 质粒 pWEC-1 和 pWEC-2 中基因水平转移区域注释结果 A: 质粒 pWEC-1 中基因水平转移区域预测结果. B: 质粒 pWEC-2 中基因水平转移区域预测结果. C: 质粒 pWEC-1 中基因水平转移区域注释结果. D: 质粒 pWEC-2 中基因水平转移区域注释结果

Figure 4 Annotation results of horizontal gene transfer regions in plasmids pWEC-1 and pWEC-2. A: Prediction results of horizontal gene transfer region of plasmid pWEC-1. B: Prediction results of horizontal gene transfer region of plasmid pWEC-2. C: Annotation results of horizontal gene transfer region of plasmid pWEC-1. D: Annotation results of horizontal gene transfer region of plasmid pWEC-2.

表 4 质粒 pWEC-1 和 pWEC-2 中 HGT 区域同源性分析结果

Table 4 Homology analysis results of HGT region in plasmids pWEC-1 and pWEC-2

质粒 Plasmid	HGT 区域 HGT region	描述 Description	相似度 Similarity (%)	登录号 Accession No.
pWEC-1	HGT (2 500–7 500 bp)	<i>Escherichia coli</i> strain 14EC033 plasmid p14EC033a	99.94	CP024148.1
	HGT (42 500–47 500 bp)	<i>Shigella flexneri</i> strain SWHIN_107 plasmid unnamed3	100.00	CP055102.1
	HGT (52 500–60 306 bp)	<i>Escherichia coli</i> strain O177:H21 plasmid unnamed1	99.83	CP016547.1
pWEC-2	HGT (2 500–10 000 bp)	<i>Escherichia coli</i> strain Z0117EC0062 plasmid pZ0117EC0062-3	99.93	CP098200.1
	HGT (15 000–32 500 bp)	<i>Salmonella enterica</i> strain PNUSAS039582 plasmid pPNUSAS039582_1	99.32	CP093089.1
	HGT (62 500–67 500 bp)	<i>Salmonella enterica</i> strain PNUSAS039582 plasmid pPNUSAS039582_1	99.94	CP093089.1
	HGT (87 065–92 065 bp)	<i>Escherichia coli</i> strain 90-1 plasmid pCD90-1-1	99.77	CP050048.1

对大肠杆菌 WEC 基因组中的原噬菌体进行预测, 有 11 个位于染色体基因组上, 2 个质粒上各有 1 个原噬菌体(表 5)。其中染色体上的 Prophage_2 中携带 8 个 ARGs, Prophage_3、Prophage_6、Prophage_8 和 Prophage_10 各含有 1 个 ARGs。质粒 pWEC-1 的原噬菌体中无 ARGs, 质粒 pWEC-2 的原噬菌体上携带 1 个

Klebsiella pneumoniae OmpK37。通过 BLAST 分析发现, 在菌株的染色体中, 有 6 个原噬菌体均与福氏志贺菌 STEFF_18 存在较高的相似性, 其他则与不同的大肠杆菌表现出较高相似性。质粒 pWEC-1 中的原噬菌体与福氏志贺菌 SWHIN_107 的质粒片段相似性最高, 为 99.81%, 质粒 pWEC-2 中的原噬菌体与肠道沙门氏菌质粒

pPNUSAS039582_1 的相似性为 98.24% (表 6)。

使用软件 IslandPath-DIOMB 预测基因岛, 结果表明, 2 个质粒上均不存在基因岛, 在 WEC 菌株的染色体上共预测到 18 个基因岛。根据基因注释结果, 有 13 个基因岛携带不同的插入序列, 其中 GIs001、GIs004 和 GIs007 上分别检测到 1 个氨基糖苷类耐药基因 *APH(3'')-Ib*, 在 GIs016 中检测到 *APH(3'')-Ib* 和头孢菌素耐药基

因 *Escherichia coli ampH* beta-lactamase (表 7), 说明携带耐药基因的基因岛具有发生水平转移的潜力。基因岛 GIs002 包含多个核糖体蛋白, GIs010 中有转座酶和重组酶, GIs011 包含翻译起始因子 IF-1 和位点特异性整合酶。GIs013 中有复制蛋白、重组酶以及与菌毛相关的蛋白, GIs015 则包含 DNA 结合蛋白 HU-beta 和转录调节因子 BolA。

表 5 大肠杆菌 WEC 基因组中原噬菌体预测结果

Table 5 Prophage prediction results of *Escherichia coli* WEC genome

原噬菌体	位置	基因位点	基因数目	耐药基因(数目)
Prophage	Location	Position	Gene numbers	Antibiotic resistant genes (number)
Prophage_1	Chr	411 344-449 421	60	\
Prophage_2	Chr	1 071 541-1 188 188	130	<i>rsmA, emrB, emrA, emrR(2), Klebsiella pneumoniae KpnG, H-NS, APH(3'')-Ib</i>
Prophage_3	Chr	1 414 812-1 471 320	59	<i>APH(3'')-Ib</i>
Prophage_4	Chr	1 502 471-1 520 609	20	\
Prophage_5	Chr	1 841 272-1 864 796	24	\
Prophage_6	Chr	1 908 342-1 937 519	36	<i>sdiA</i>
Prophage_7	Chr	2 278 288-2 326 058	56	\
Prophage_8	Chr	2 510 862-2 569 823	63	<i>Klebsiella pneumoniae OmpK37</i>
Prophage_9	Chr	2 765 475-2 785 562	28	\
Prophage_10	Chr	3 378 810-3 438 003	70	<i>gadX</i>
Prophage_11	Chr	4 221 566-4 244 380	29	\
Prophage_12	pWEC-1	9 410-51 385	56	\
Prophage_13	pWEC-2	12 603-40 355	46	<i>Klebsiella pneumoniae OmpK37</i>

\: 不含耐药基因。下同

\: No antibiotic resistant genes. The same below.

表 6 大肠杆菌 WEC 基因组中原噬菌体同源性分析结果

Table 6 Results of homology analysis of prophages in *Escherichia coli* WEC genome

原噬菌体	位置	描述	相似度	登录号
Prophage	Location	Description	Similarity (%)	Accession No.
Prophage_1	Chr	<i>Shigella flexneri</i> strain STEFF_18 chromosome	99.99	CP055179.1
Prophage_2	Chr	<i>Escherichia coli</i> strain RHB39-C14 chromosome	99.32	CP057062.1
Prophage_3	Chr	<i>Escherichia coli</i> strain GN02545 chromosome	99.55	CP041544.1
Prophage_4	Chr	<i>Shigella flexneri</i> strain STEFF_18 chromosome	100.00	CP055179.1
Prophage_5	Chr	<i>Escherichia coli</i> TUM18530 DNA, complete genome	99.96	AP023190.1
Prophage_6	Chr	<i>Escherichia coli</i> strain RHB13-C06 chromosome	99.97	CP057841.1
Prophage_7	Chr	<i>Shigella flexneri</i> strain STEFF_18 chromosome	100.00	CP055179.1
Prophage_8	Chr	<i>Escherichia coli</i> strain 1943 chromosome	98.99	CP023359.1
Prophage_9	Chr	<i>Shigella flexneri</i> strain STEFF_18 chromosome	100.00	CP055179.1
Prophage_10	Chr	<i>Shigella flexneri</i> strain STEFF_18 chromosome	99.99	CP055179.1
Prophage_11	Chr	<i>Shigella flexneri</i> strain STEFF_18 chromosome	100.00	CP055179.1
Prophage_12	pWEC-1	<i>Shigella flexneri</i> strain SWHIN_107 plasmid unnamed3	99.81	CP055102.1
Prophage_13	pWEC-2	<i>Salmonella enterica</i> strain PNUSAS039582 plasmid pPNUSAS039582_1	98.24	CP093089.1

表 7 大肠杆菌 WEC 基因组中基因岛预测结果

Table 7 Prediction results of gene island in *Escherichia coli* WEC genome

基因岛 Gene island	基因位点 Position	基因数目 Gene numbers	耐药基因 Antibiotic resistant genes	插入序列(数目) Insertion sequence (number)
GIs001	118 068–123 480	7	<i>APH(3'')-Ib</i>	IS3 (2), ISEc17
GIs002	416 049–441 010	46	\	\
GIs003	613 467–616 991	8	\	IS621 (2)
GIs004	1 106 782–1 118 926	12	<i>APH(3'')-Ib</i>	ISEc17 (2)
GIs005	1 135 395–1 145 768	18	\	TnShfr1
GIs006	1 412 127–1 438 181	28	\	IS911 (2), IS30D, ISEhe3, IS1414, ISEc48 (2), ISEc31 (2), ISCro1
GIs007	1 440 232–1 467 324	28	<i>APH(3'')-Ib</i>	ISShdy2 (4), IS1414 (2), IS30D, ISSd1, IS640, IS100X, ISEc16 (4)
GIs008	1 841 702–1 867 730	28	\	ISEc47, ISKpn42 (2), ISEc38, IS30D, ISEhe3, IS2, ISEc27
GIs009	2 430 205–2 440 004	8	\	ISEc5 (2), ISEc1, IS1138B
GIs010	2 671 970–2 686 764	15	\	\
GIs011	3 052 233–3 063 981	13	\	\
GIs012	3 226 515–3 235 357	9	\	ISEc1 (2)
GIs013	3 427 041–3 440 448	19	\	\
GIs014	3 468 979–3 479 288	7	\	ISersp1
GIs015	3 538 494–3 545 679	7	\	\
GIs016	3 604 527–3 614 665	11	<i>APH(3'')-Ib, Escherichia coli ampH beta-lactamase</i>	IS3 (3)
GIs017	3 749 884–3 771 455	19	\	ISEc26
GIs018	4 134 008–4 156 284	23	\	ISRor6

使用 IS finder 查找 WEC 菌株基因组中的插入序列, 结果表明染色体上有 122 个插入序列, 其中插入序列 IS621 数目最多, 还有一些大肠杆菌插入序列, 包括 ISEc1、ISEc5、ISEc16、ISEc17、ISEc26、ISEc27、ISEc31、ISEc38、ISEc46、ISEc47

和 ISEc48 等共 11 种 28 个。根据基因的起止位置及方向, 可知在 6 个耐药基因 *APH(3'')-Ib* 的上游均有一个插入序列, 耐药基因 *H-NS* 的上游存在一个插入序列 ISCro3, 这为耐药基因的水平转移提供了可能性(表 8)。质粒 pWEC-1 上有

表 8 WEC 菌株染色体中插入序列与耐药基因的位置关系

Table 8 The positional relationship between the insertion sequence in the chromosome of WEC strain and the drug resistance gene

插入序列 Insertion sequence	基因位点和方向 Position and direction	耐药基因 Antibiotic resistant genes	基因位点和方向 Position and direction	转座酶 Transposase
IS3	121 926–122 225, +	<i>APH(3'')-Ib</i>	122 222–123 088, +	DDE
ISEc17	920 080–920 379, -	<i>APH(3'')-Ib</i>	919 217–920 083, -	DDE
ISEc17	1 107 955–1 108 254, +	<i>APH(3'')-Ib</i>	1 108 251–1 109 117, +	DDE
IS30D	1 444 657–1 445 808, +	<i>APH(3'')-Ib</i>	1 445 893–1 446 711, +	DDE
ISCro3	2 701 118–2 701 708, +	<i>H-NS</i>	2 703 212–2 703 625, +	DDE
IS3	2 884 956–2 885 255, +	<i>APH(3'')-Ib</i>	2 885 252–2 886 118, +	DDE
IS3	3 611 072–3 611 371, +	<i>APH(3'')-Ib</i>	3 611 368–3 612 237, +	DDE

+: 正义链; -: 反义链

+: Positive sense strand; -: Anti sense strand.

2个插入序列,均是IS609,质粒pWEC-2上只有1个插入序列ISCfr3(46 663–47 622,+),该插入序列与耐药基因间的距离较远,引起耐药基因转移的可能性不高。

3 讨论与结论

污水源大肠杆菌WEC对四环素、环丙沙星、诺氟沙星和红霉素表现出不同程度的耐药,是典型的多重耐药菌。大肠杆菌WEC的生长受到抗生素的影响,TET、CIP和NOR对菌株的影响大于ERM。有研究表明^[20],随着抗生素的浓度和作用时间的增加,且由于抗生素抑菌机制的不同,大肠杆菌在不同抗生素作用下的生长会受到不同程度的抑制。亚抑菌浓度的抗生素除了降低菌株生长速度外,对大肠杆菌生物膜的形成和毒力基因的表达也有一定的影响^[21-22]。

大肠杆菌WEC基因组中包含多种类型的ARGs和VFs,其中最主要的耐药机制和毒力类型分别是抗生素外排和黏附。细菌细胞中存在多种类型的外排泵,这是导致其产生耐药性的主要原因^[23]。四环素类、喹诺酮类和氨基糖苷类耐药基因在家禽源大肠杆菌中的检出率较高,与菌株耐药表型具有较高的一致性;但不同来源的大肠杆菌之间耐药性存在一定的差异,这可能与当地抗生素的使用情况有关^[24-25]。李贝贝等^[26]综述了与大肠杆菌耐药性相关的重要基因,强调了*ompC*基因和耐药外排泵的作用。陈红玲等^[27]对医药化工废水厂中微生物群落的耐药机制进行研究,发现耐药结节化细胞分化家族(RND)外排泵占主要部分。大肠杆菌WEC细胞中发现RND家族AcrAB-TolC外排泵,以及影响其表达的调控基因*marA*和*soxR*^[28]。正向全局调控蛋白MarA、SoxS能激活AcrAB-TolC外排泵相关基因的过表达,导致药物外排作用增强,这是引起大肠杆菌产生耐药性的关键因素^[29]。外排蛋白

TolC存在于多种外排泵中,*tolC*基因能够显著影响细胞外排活性^[30]。耐药基因与毒力因子的检出和表达之间存在一定的关联性^[31]。大肠杆菌WEC的染色体基因组上检测到多种类型的菌毛毒力因子,基因数目最多的是I型菌毛。I型菌毛广泛存在于肠杆菌科细菌表面,通过黏附作用与宿主连接,在介导细菌致病性过程中发挥重要作用^[32]。大肠杆菌WEC中存在构成Cpx双组分信号系统的*cpxA*和*cpxR*基因。有研究表明,Cpx系统对菌毛、III型分泌系统(T3SS)等毒力因子及药物外排系统的表达具有调节作用^[33-34]。

经全基因组测序分析发现,大肠杆菌WEC的基因组包含1条染色体和2个质粒。其中质粒pWEC-1环状结构中存在oriT、T4SS和T4CP等质粒发生转移所必需的元件,说明其具有自主转移的潜能。对质粒pWEC-1和pWEC-2中预测到的潜在水平转移区域进行注释,发现3个接合转移*tra*基因编码的蛋白(TraL、TraA和TraF)。*tra*基因在质粒接合转移过程中发挥重要作用,当*tra*相关基因的表达下调时,质粒的接合转移频率有所下降^[35]。基因岛、原噬菌体、插入序列是目前研究较多的可移动遗传元件,可通过多种方式介导耐药基因、毒力因子的转移。孙华润^[36]的研究表明,携带耐药基因的整合性接合元件ICE*HpaI*能通过接合转移到受体菌中,且接合子对抗生素的耐药性高于受体菌。于瑞^[37]的研究证实了位于染色体上的可移动遗传元件ICES*SsuSC128*和ICES*SsuSC117*能够携带耐药基因水平转移到受体菌中,赋予受体菌相应的抗生素耐药表型。Jiang等^[38]就对虾和猪肉源大肠杆菌中磺胺类耐药基因的分布及可移动遗传元件的多样性进行研究,大部分*sul*基因附近检测到来自不同家族的插入序列,其中IS91-*sul2*-IS10A可能介导了*sul2*基因在猪肉大肠杆菌中的传播。对WEC菌株基因组上携带的可移动遗传元件进

行预测,在染色体和质粒上均发现原噬菌体片段的存在,其中部分原噬菌体中存在氨基糖苷类、四环素类、大环内酯类或喹诺酮类耐药基因。祝希辉等^[39]借助 NCBI 数据库中大肠杆菌的全基因组数据信息,对大肠杆菌中的原噬菌体及其携带的耐药基因及毒力基因的数目和家族等信息进行整理分析,结果发现大部分大肠杆菌均携带原噬菌体,其中部分携带有耐药基因,以大环内酯类、头孢菌素类及四环素类等为主,主要通过抗生素外排产生耐药性,这与本研究结果基本一致。WEC 菌株的染色体基因组上预测到 18 个基因岛,有 4 个基因岛上携带了氨基糖苷类耐药基因。SGI1 基因岛是在沙门菌、奇异变形杆菌和大肠埃希菌等多种细菌中均被发现的基因岛,其携带多个耐药基因,能从染色体上切除并环化,在 Inc A/C 质粒的帮助下发生水平转移。SGI1 基因岛存在多种亚型,且其转移性与多个接合转移相关基因有关,因此研究基因岛的结构及功能机制可以推动细菌耐药基因转移性问题的研究^[40-41]。WEC 菌株基因组上存在多个插入序列,主要是 IS621、IS609 以及大肠杆菌插入序列。不同菌株之间,插入序列的种类有所不同,但不同时期的菌株中插入序列的数量无显著差异^[42]。插入序列在转座酶的作用下,自身能够发生水平转移,也可以通过噬菌体、质粒等其他可移动元件进行转移^[43]。大肠杆菌 WEC 菌中存在具有自主转移潜力的质粒,基因组中携带噬菌体、基因岛、插入序列等可移动遗传元件,这为耐药基因和毒力因子的水平转移创造了条件。此外,与多数动物源耐药大肠杆菌不同,多重耐药大肠杆菌 WEC 来自北方污水处理厂,这为研究水体环境中耐药菌及耐药基因的流行情况提供了研究基础。

REFERENCES

- [1] 迟小惠,冯友军,郑培文. 耐药菌在人-动物-环境中的传播和遗传机制[J]. 微生物学通报, 2019, 46(2): 311-318.
- CHI XH, FENG YJ, ZHENG BW. Transmission and genetic mechanism of drug-resistant bacteria in multi-sectors[J]. Microbiology China, 2019, 46(2): 311-318 (in Chinese).
- [2] 贺竹梅,王敏婷. 模式生物研究与遗传学发展[J]. 高校生物学教学研究(电子版), 2019, 9(4): 57-64.
- HE ZM, WANG MT. Genetics development and the application of model organisms[J]. Biology Teaching in University (Electronic Edition), 2019, 9(4): 57-64 (in Chinese).
- [3] KAWAHARA R, YAMAGUCHI T, YAMAMOTO Y. Comparative genome analysis of livestock and human colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from the same household[J]. Infection and Drug Resistance, 2021, 14: 841-847.
- [4] TRONGJIT S, CHUANCHUEN R. Whole genome sequencing and characteristics of *Escherichia coli* with co-existence of ESBL and *mcr* genes from pigs[J]. PLoS One, 2021, 16(11): e0260011.
- [5] EL ZOWALATY ME, HICKMAN RA, GAMBUSHE SM, ZISHIRI OT, EL ZOWALATY AE, JÄRHULT JD. Genome sequences of two multidrug-resistant *Escherichia coli* strains MEZEC8 and MEZEC10 isolated from livestock in South Africa[J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2020, 23: 445-449.
- [6] WYRSCH ER, CHOWDHURY PR, WALLIS L, CUMMINS ML, ZINGALI T, BRANDIS KJ, DJORDJEVIC SP. Whole-genome sequence analysis of environmental *Escherichia coli* from the faeces of straw-necked ibis (*Threskiornis spinicollis*) nesting on inland wetlands[J]. Microbial Genomics, 2020, 6(6): e000385.
- [7] WANG KY, LI PH, LI JH, HU XF, LIN YF, YANG L, QIU SF, MA H, LI P, SONG HB. An NDM-1-producing *Acinetobacter towneri* isolate from hospital sewage in China[J]. Infection and Drug Resistance, 2020, 13: 1105-1110.
- [8] FURLAN JPR, LOPES R, RAMOS MS, dos SANTOS LDR, da SILVA ROSA R, SAVAZZI EA, STEHLING EG. Colistin-resistant *mcr-1*-positive *Escherichia coli* ST1775-H137 co-harboring *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CMY-2} recovered from an urban stream[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2021, 96: 105156.
- [9] 卢汉清,张铮,郑琳,只帅,滕良方,张莺. 污水厂再生水中耐氯大肠杆菌筛查及细菌耐药性分析[J]. 中国给水排水, 2022, 38(3): 43-49.

- LU HQ, ZHANG Z, ZHENG L, ZHI S, TENG LF, ZHANG Y. Isolation of chlorine, resistant *Escherichia coli* and bacterial antibiotic resistance surveillance from reclaimed wastewater of municipal wastewater treatment plants[J]. *China Water & Wastewater*, 2022, 38(3): 43-49 (in Chinese).
- [10] GREVSKOTT DH, SALVÀ-SERRA F, MOORE ERB, MARATHE NP. Nanopore sequencing reveals genomic map of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases carried by *Escherichia coli* strains isolated from blue mussels (*Mytilus edulis*) in Norway[J]. *BMC Microbiology*, 2020, 20(1): 134.
- [11] PETER S, BOSIO M, GROSS C, BEZDAN D, GUTIERREZ J, OBERHETTINGER P, LIESE J, VOGEL W, DÖRFEL D, BERGER L, MARSCHAL M, WILLMANN M, GUT I, GUT M, AUTENRIETH I, OSSOWSKI S. Tracking of antibiotic resistance transfer and rapid plasmid evolution in a hospital setting by nanopore sequencing[J]. *mSphere*, 2020, 5(4): e00525-20.
- [12] GU J, LI YX, XU CW, XIE XJ, LI P, MA GX, LEI CW, LIU JX, ZHANG AY. Genome sequence of multidrug-resistant *Erysipelothrix rhusiopathiae* ZJ carrying several acquired antimicrobial resistance genes[J]. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2020, 21: 13-15.
- [13] 林本夫, 任欣悦, 袁晓琪, 梁梦诗, 丘穗萍, 潘婧淇, 原丽红. 细菌全基因组测序技术用于沙门氏菌流行病学调查的可行性分析[J]. *中国动物检疫*, 2022, 39(6): 125-131.
- LIN BF, REN XY, YUAN XQ, LIANG MS, QIU SP, PAN JQ, YUAN LH. Feasibility analysis on bacterial whole genome sequencing for epidemiological investigation on *Salmonella*[J]. *China Animal Health Inspection*, 2022, 39(6): 125-131 (in Chinese).
- [14] 苏梦茹, 马培培, 李鑫鑫, 刘沉, 李妍, 姚倩, 郭抗抗. 9种抗菌药物对大肠埃希菌最小抑菌浓度的测定[J]. *动物医学进展*, 2020, 41(3): 52-56.
- SU MR, MA PP, LI XX, LIU C, LI Y, YAO Q, GUO KK. Determination of minimum inhibitory concentration of nine antibacterial drugs to *Escherichia coli*[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2020, 41(3): 52-56 (in Chinese).
- [15] 朱丽萍, 张文成, 颜世敢, 陈蕾蕾, 崔生辉. 细菌核心基因组多位点序列分型(cgMLST)与溯源评价[J]. *畜牧与兽医*, 2021, 53(6): 140-146.
- ZHU LP, ZHANG WC, YAN SG, CHEN LL, CUI SH. Evaluation of core genome multilocus sequence typing and traceability of bacteria[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2021, 53(6): 140-146 (in Chinese).
- [16] LIU B, ZHENG DD, JIN Q, CHEN LH, YANG J. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D687-D692.
- [17] LI XB, XIE YZ, LIU M, TAI C, SUN JY, DENG ZX, OU HY. oriTfinder: a web-based tool for the identification of origin of transfers in DNA sequences of bacterial mobile genetic elements[J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(W1): W229-W234.
- [18] SIGUIER P, PEROCHON J, LESTRADE L, MAHILLON J, CHANDLER M. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(Database issue): D32-D36.
- [19] VERNIKOS GS, PARKHILL J. Interpolated variable order motifs for identification of horizontally acquired DNA: revisiting the *Salmonella* pathogenicity islands[J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(18): 2196-2203.
- [20] 朱福琳. 基于四面体 DNA 纳米结构的微流控平台用于致病性大肠杆菌的综合性研究[D]. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文, 2020.
- ZHU FL. A tetrahedral DNA nanostructure-based microfluidic platform for the integrated studying of pathogenic *Escherichia coli*[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Ocean University, 2020 (in Chinese).
- [21] de ANDRADE JPL, de MACÊDO FARIAS L, FERREIRA JFG, BRUNA-ROMERO O, Da GLÓRIA de SOUZA D, de CARVALHO MAR, dos SANTOS KV. Sub-inhibitory concentration of piperacillin-tazobactam may be related to virulence properties of filamentous *Escherichia coli*[J]. *Current Microbiology*, 2016, 72(1): 19-28.
- [22] DONG GF, LI JH, CHEN LJ, BI WZ, ZHANG XX, LIU HY, ZHI XY, ZHOU TL, CAO JM. Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin on biofilm formation and virulence factors of *Escherichia coli*[J]. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2019, 23(1): 15-21.
- [23] 高海娇, 程古月, 王玉莲, 宁佳囡, 陈婷, 李俊, 郝海红, 袁宗辉. 细菌主要外排泵及其调控蛋白研究进展[J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(11): 2023-2033.
- GAO HJ, CHENG GY, WANG YL, NING JN, CHEN T, LI J, HAO HH, YUAN ZH. Research progress of the mainly bacterial efflux pumps and related regulator[J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2017, 48(11): 2023-2033 (in Chinese).
- [24] 于静晨, 王虹, 李鑫, 李亚芯, 汤芳, 戴建君. 53株禽致病性大肠杆菌的耐药表型及耐药基因的检测[J]. *畜*

- 牧与兽医, 2017, 49(5): 134-141.
- YU JC, WANG H, LI X, LI YX, TANG F, DAI JJ. Detection of resistance phenotypes and resistance determinants in 53 avian pathogenic *Escherichia coli* strains[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2017, 49(5): 134-141 (in Chinese).
- [25] 王永强, 李偲, 耿超, 马海滨, 阿嘎日, 窦亚平, 王婷婷, 王梓, 刘锴. 通辽地区犊牛腹泻大肠杆菌耐药性检测及一株多重耐药菌全基因组测序分析[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(12): 4964-4977.
- WANG YQ, LI C, GENG C, MA HB, AGARI, DOU YP, WANG TT, WANG Z, LIU K. Drug resistance of *Escherichia coli* strains causing calf diarrhea in Tongliao and whole-genome sequencing of a multi-drug resistant strain[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(12): 4964-4977 (in Chinese).
- [26] 李贝贝, 朱晗钊, 张琦, 杨鹏, 金一, 何晓青. 影响微生物互作的重要基因研究进展: 以大肠杆菌为例[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(9): 3071-3082.
- LI BB, ZHU HZ, ZHANG Q, YANG P, JIN Y, HE XQ. Research progress in important genes affecting microbial interactions: take *Escherichia coli* as an example[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(9): 3071-3082 (in Chinese).
- [27] 陈红玲, 张兴桃, 王晴, 姚沛琳. 宏基因组方法分析医药化工废水厂中抗生素耐药菌及抗性基因[J]. *环境科学*, 2020, 41(1): 313-320.
- CHEN HL, ZHANG XT, WANG Q, YAO PL. Metagenomic analysis of antibiotic resistant bacteria and resistance genes in a pharmaceutical and chemical wastewater treatment plant[J]. *Environmental Science*, 2020, 41(1): 313-320 (in Chinese).
- [28] FÀBREGA A, MARTIN RG, ROSNER JL, TAVIO MM, VILA J. Constitutive SoxS expression in a fluoroquinolone-resistant strain with a truncated SoxR protein and identification of a new member of the marA-soxS-rob regulon, mdtG[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 54(3): 1218-1225.
- [29] 张传珍, 常满霞, 杨磊, 刘艳艳, 陈品仙, 蒋红霞. MarA 和 SoxS 共同调节大肠杆菌 K12 外排泵 AcrAB-TolC 的表达[J]. *中国兽医学报*, 2017, 37(12): 2370-2377.
- ZHANG CZ, CHANG MX, YANG L, LIU YY, CHEN PX, JIANG HX. Co-regulation of MarA and SoxS on expression of AcrAB-TolC in development of ciprofloxacin resistance in *E. coli* K12[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(12): 2370-2377 (in Chinese).
- [30] PU YY, ZHAO ZL, LI YX, ZOU J, MA Q, ZHAO YN, KE YH, ZHU Y, CHEN HY, BAKER MAB, GE H, SUN YJ, XIE XS, BAI F. Enhanced efflux activity facilitates drug tolerance in dormant bacterial cells[J]. *Molecular Cell*, 2016, 62(2): 284-294.
- [31] 杜瑾鸿, 张泽宇, 刘祎佳, 范馨月, 刘怡蕾, 刘理慧, 程古月. 三种常见革兰阴性菌的毒力与耐药性关系的研究进展[J]. *国外医药(抗生素分册)*, 2022, 43(5): 297-305.
- DU JH, ZHANG ZY, LIU YJ, FAN XY, LIU YL, LIU LH, CHENG GY. Relationship between virulence and antimicrobial resistance in three common gram-negative bacteria species[J]. *World Notes on Antibiotics*, 2022, 43(5): 297-305 (in Chinese).
- [32] 刘玲红, 胡明, 刘玉庆. 山东省动物源多重高抗大肠杆菌的抗药基因和毒力基因分析[J]. *家禽科学*, 2022(6): 4-15.
- LIU LH, HU M, LIU YQ. Analysis of antibiotic resistance genes and virulence genes of multiple high resistant *Escherichia coli* from animals in Shandong Province[J]. *Poultry Science*, 2022(6): 4-15 (in Chinese).
- [33] 李国涛, 薛海玲, 姚远. 细菌 Cpx 双组分信号转导系统应对外界环境变化的响应调节机制研究进展[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(8): 2881-2894.
- LI GT, XUE HL, YAO Y. Research progress of Cpx two-component system in bacteria[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(8): 2881-2894 (in Chinese).
- [34] MIYAKE Y, YAMAMOTO K. Epistatic effect of regulators to the adaptive growth of *Escherichia coli*[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 3661.
- [35] 胡慧慧. 核蛋白 H-NS 和双组份信号转导系统 CpxAR 协调调控 IncFII质粒接合的分子机制[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2020.
- HU HH. The coordinate regulation mechanism of H-NS and CpxAR on IncFII plasmid conjugation[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [36] 孙华润. 副猪嗜血杆菌携带耐药基因的可移动遗传元件分析[D]. 郑州: 河南农业大学博士学位论文, 2022.
- SUN HR. Analysis of mobile genetic elements carrying antibiotic resistance genes in *Glaesserella parasuis*[D]. Zhengzhou: Doctoral Dissertation of Henan Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [37] 于瑞. 猪链球菌耐药相关可移动遗传元件的鉴定及其水平传播机制[D]. 郑州: 河南农业大学博士学位论文, 2022.
- YU R. Characterization of mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance in *Streptococcus*

- suis* and its mechanism of horizontal transmission[D]. Zhengzhou: Doctoral Dissertation of Henan Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [38] JIANG H, CHENG H, LIANG Y, YU ST, YU T, FANG JH, ZHU C. Diverse mobile genetic elements and conjugal transferability of sulfonamide resistance genes (Sul1, Sul2, and Sul3) in *Escherichia coli* isolates from *Perna vannamei* and pork from large markets in Zhejiang, China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1787.
- [39] 祝希辉, 庞喆羽, 王志伟, 裴兰英, 曹胜亮, 薛希娟, 李玉保. 致病性大肠杆菌携带原噬菌体的预测及耐药性与毒力研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49(3): 1126-1134.
- ZHU XH, PANG ZY, WANG ZW, PEI LY, CAO SL, XUE XJ, LI YB. Prediction of prophage carrying by pathogenic *Escherichia coli* and its drug resistance and virulence[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2022, 49(3): 1126-1134 (in Chinese).
- [40] 王芳. 沙门菌多重耐药基因岛 1(SGI1)研究进展[J]. *中国抗生素杂志*, 2010, 35(6): 414-420.
- WANG F. Progresses on *Salmonella* multi-drug resistance genomic island 1(SGI1)[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2010, 35(6): 414-420 (in Chinese).
- [41] 李博洋, 姚天歌, 栾仁栋, 王红宁, 雷昌伟. 奇异变形杆菌中基因岛介导的多重耐药传播研究进展[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(3): 916-923.
- LI BY, YAO TG, LUAN RD, WANG HN, LEI CW. Research progress in transmission of multidrug resistance mediated by genomic Islands in *Proteus mirabilis*[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(3): 916-923 (in Chinese).
- [42] 梁丽, 石继春, 陈驰, 龙新星, 叶强, 徐颖华. 不同时期分离的鼠伤寒沙门氏菌全基因组学分析研究[J]. *中国药事*, 2022, 36(12): 1403-1413.
- LIANG L, SHI JC, CHEN C, LONG XX, YE Q, XU YH. Whole-genomic sequence analysis of *Salmonella typhimurium* isolated in different periods[J]. *Chinese Pharmaceutical Affairs*, 2022, 36(12): 1403-1413 (in Chinese).
- [43] 张孟思, 朱德康, 汪铭书. 细菌插入序列中的转座酶和转座机制[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2018, 34(10): 1057-1064.
- ZHANG MS, ZHU DK, WANG MS. Transposases in bacterial insertion sequences and their transposition mechanisms[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 34(10): 1057-1064 (in Chinese).