

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241204001

引用格式: 宋晟, 郭鲲鹏, 张露苗, 等. 宏基因组测序分析熟制禽肉制品污染微生物中整合子组成[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(10): 97–104.

SONG S, GUO KP, ZHANG LM, *et al.* Analysis of integrative and conjugative elements composition in contaminated microorganisms of cooked poultry products by metagenomic sequencing [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(10): 97–104. (in Chinese with English abstract).

宏基因组测序分析熟制禽肉制品污染微生物中整合子组成

宋 晟^{1,2}, 郭鲲鹏^{1,2}, 张露苗^{1,2}, 罗青雯^{1,2}, 王 芳^{1,2}, 高 晗^{1,2*}

(1. 食品安全监测与预警湖南省重点实验室, 长沙 410000; 2. 湖南省产商品质量检验研究院, 长沙 410000)

摘 要: 目的 研究熟制禽肉制品污染微生物中整合子的分布、来源及其携带的基因盒内容等相关情况。**方法** 采购熟制鸭肉, 对样品进行 DNA 提取, 测序、混合拼接、分箱, 获取宏基因组组装基因组, 整合子数据库比对。**结果** 熟制鸭肉污染微生物中检测到 65 种整合子, 共计 110 个, 主要来源于 31 种宿主微生物, 包括中生杆菌属、铜绿假单胞菌与肺炎克雷伯氏菌等; 整合子中共有 9 种转座酶, 1 种毒力因子基因, 19 个抗性相关基因, 其中四环素抗性基因 10 个, 防御基因 11 个, 均为防御噬菌体的基因。**结论** 多种整合子及毒力因子、抗性相关和防御基因的发现, 揭示了食品中微生物遗传多样性的复杂程度, 为研究基因的水平转移提供了重要线索, 对于评估食品安全性、预防和控制食源性病原体具有重要意义。

关键词: 熟制禽肉制品; 宏基因组; 整合子

Analysis of integrative and conjugative elements composition in contaminated microorganisms of cooked poultry products by metagenomic sequencing

SONG Sheng^{1,2}, GUO Kun-Peng^{1,2}, ZHANG Lu-Miao^{1,2}, LUO Qing-Wen^{1,2},
WANG Fang^{1,2}, GAO Han^{1,2*}

(1. Hunan Povincial Key Laboratory of Food Safety Monitoring and Early Warning, Changsha 410000, China;
2. Hunan Povincial Institute of Product and Goods Quality Inspection, Changsha 410000, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the distribution, sources, and gene cassette contents of integrative and conjugative elements in microorganisms contaminating cooked poultry meat products. **Methods** Cooked duck meat was purchased, and DNA extraction, sequencing, assembly, binning, and metagenome-assembled genome (MAG) acquisition were performed. These MAGs were then compared with an integron database. **Results** A total of 110 integrative and conjugative elements belonging to 65 distinct types were detected in the contaminating microbiota of

投稿日期: 2024-12-04

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(2022JJ90028)

第一作者: 宋晟(1979—), 男, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全与食品微生物。E-mail: 55074740@qq.com

*通信作者: 高晗(1982—), 男, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量安全研究与风险评估。E-mail: 125069250@qq.com

cooked duck meat, primarily originating from 31 host microorganisms, including *Mesorhizobium*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*. Among these integrative and conjugative elements, there were 9 kinds of transposases, 1 kinds of virulence factor gene, and 19 resistance-related genes, including 10 tetracycline resistance genes. Additionally, 11 defense genes, all of which were phage-defense genes, were identified. **Conclusion** The discovery of various integrative and conjugative elements, virulence factors, resistance-related genes, and defense genes reveals the complex genetic diversity of microorganisms in food. This provides important clues for studying horizontal gene transfer and has significant implications for assessing food safety and preventing and controlling foodborne pathogens. The effective application of metagenomic technology in integron research also demonstrates its potential in the fields of food safety and public health.

KEY WORDS: cooked poultry meat products; metagenomics; integrative and conjugative elements

0 引言

整合子(integrative and conjugative elements, ICEs)是在细菌进化过程中发挥重要作用的移动 DNA 原件,具有完整的接合机制,可整合到细菌染色体中,稳定遗传,并能在细菌之间自我传播^[1-2];其携带的不同基因盒,可赋予宿主不同的表型特征,如抗生素抗性、毒力机制、防御系统、金属抗性、化合物降解和共生等,对细菌的多样性和适应性有重要贡献^[3-4]。ICEs 通常由 5 端和 3 端两个保守区以及一个基因盒可变区组成,具有整合酶基因和初始整合位点,可通过整合酶捕获外源基因,并对外源基因进行启动和表达^[5-6]。研究 ICEs 有利于深入了解基因在细菌中的水平转移,并可对目标基因进行溯源。这对于了解细菌耐药性、致病性对于的产生、发展和传播机制以及指导临床用药具有重要意义。

ICEs 的研究方法包括聚合酶扩增法、多重聚合酶扩增法和宏基因组测序法^[7]。聚合酶扩增法,即通过设计特异引物对 ICEs 可变区进行扩增,检测 ICEs 及其携带的基因盒,张亚茹等^[8]采用聚合酶链反应法鉴定稻蛙共养系统样品,有 14 株菌检出 ICEs 且携带基因盒;多重聚合酶扩增法,即针对多种类型的 ICEs 设计多对特异引物,实现 1 类、2 类或 3 类 ICEs 的同时检测,黄靖宇等^[9]采用多重聚合酶链式法对临床领域 48 株亚胺培南耐药铜绿假单胞菌进行整合酶基因检测,其中 5 株为 1 类整合酶;24 株为 2 类整合酶;宏基因组测序法,即不采用任何参照序列,通过高通量测序获得基因组序列^[10-12],并与 ICEs 数据库比对,实现一次测序,测定样本中细菌所携带的所有 ICEs 的技术手段,较聚合酶链式反应更为全面真实^[13-14],郑鑫洱^[15]采用宏基因组法分析生猪屠宰环节样品,1 型 ICEs 检出率为 78.26%,基因盒所含的耐药基因类型包括甲氧苄胺嘧啶类、氯霉素类、磺胺类等。宏基因组测序法提供的信息量最大,能够覆盖整个微生物组;多重聚合酶扩增法次之,可以同时扩增多个目标序列;聚合酶扩增法提供的信息量最有限,只能扩增特定区域的 DNA,由此可知,宏基因组测

序法分析范围最广最全面,可实现 ICEs 的一次测序,全部鉴定。

课题组前期已采集包括生鲜鸡鸭肉、肉制品半成品、鸡鸭肉熟制品样品进行宏基因组分析,在各样品中鉴定出多种致病菌以及多种致病基因与耐药基因,为更深入研究致病基因、耐药基因的来源与传播方式,及与 ICEs 的关系。本研究从市场上再次购入熟制禽肉制品,通过宏基因组测序,序列拼接,分箱归类后,获取样本宏基因组组装基因组,与 ICEbeg 3.0 数据库比对,得到样本中所有 ICEs,并对其携带的基因盒信息进行识别与功能基因注释。该研究对于熟制禽肉制品中 ICEs 的统计分析,有助于提高禽肉制品微生物中基因水平转移的认识,以及致病基因与耐药基因的可能来源分析。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

五香卤鸭掌由国内知名大厂生产,生产日期为 2024 年 8 月 15 日,为山东产 90 d 龄麻鸭,经添加八角、茴香、桂皮、食盐、酱油等卤制,二次加热杀菌后包装,采购自京东商城。

磁珠法 DNA 提取试剂盒(货号 M1257-01,美国欧米加生命技术有限公司);Qubit3.0 DNA 检测试剂盒(货号 Q33226,美国英杰生命技术有限公司)。

1.2 仪器与设备

PL602E 电子天平(精度 0.01 g,瑞士梅特勒托利多公司);Qubit®3.0 荧光仪(美国英杰生命技术有限公司);ETC 811 PC 扩增仪(北京东胜创新生物科技有限公司);F980A 生物电泳图像分析系统(上海复日科技有限公司)。

1.3 样品中细菌 DNA 的提取与浓度测定

在 100 g 样品中加入液氮,研磨至粉末状,混合均匀后,在 2 mL 灭菌离心管中称入 0.25 g 样品,加入缓冲液振荡混匀后,加入蛋白酶 K,65 °C 裂解 10 min 后,4 °C 10000 r/min

离心 5 min, 转移上清液, 加入磁珠吸附 5 min 后, 加入 500 μ L 磁珠清洗液, 混匀磁珠, 放置 5 min, 弃上清, 重复清洗一次, 分离磁珠, 加入 50 μ L DNA 洗脱液到离心管中, 充分振荡混匀, 65 $^{\circ}$ C 水浴 10 min。小心吸取上清 DNA 液体到新的 1.5 mL 离心管中, 用 Qubit3.0 DNA 检测 DNA 样本浓度。

1.4 样品的宏基因组分析

样本 DNA 经 Illumina Miseq™/Hiseq™测序后, 将原始数据进行质量评估与过滤, 去除宿主基因组污染数据, 混合拼接, 分箱重新归类后, 获取宏基因组组装基因组。选择大于长度大于 100 bp 的基因, 翻译成氨基酸序列, 采用非比对和比对两种方式分析基因集丰度; 将基因集比对 ICEbeg3.0 数据库得到 ICEs 基因注释信息。

1.5 数据处理

将重复测试 3 次的的结果, 采用 WPS Office (12.1.0.19302)统计模块对数据进行分类统计分析。

2 结果与分析

2.1 样本中整合子的统计分析

样本中共检测到 65 种共计 110 个 ICEs, 其中 ICE1872 最多, 共有 9 个, 占比为 8.18%, 来源于副猪链球菌

SUT-286; ICE200 共 6 个, 占比为 5.45%, 来源于铜绿假单胞菌 2192; ICE1157 共 5 个, 占比为 4.55%, 来源于肺炎克雷伯氏菌 A_0125; ICE1253 共 5 个, 占比为 4.55%, 来源于肺炎克雷伯氏菌 INF249; ICE1871 共 5 个, 占比为 4.55%, 来源于副猪链球菌 SUT-286; ICE133 共 4 个, 占比为 3.64%, 来源于百脉根中生根瘤菌 MAFF303099; ICE1646 共 3 个, 占比为 2.7%, 来源于按蚊伊丽莎白金菌 CSID3000516074; ICE1045、ICE1081、ICE1097、ICE1743、ICE1819、ICE2049、ICE2052、ICE2070、ICE2076、ICE2084、ICE2089、ICE2103、ICE2104 均为 2 个, 占比均为 1.8%, 其他 ICEs 数量均为 1(表 1)。

ICEs 来源于 31 种宿主微生物, 有 17 种 ICEs 来源于中生根瘤菌属, 占比为 26.15%; 有 7 种 ICEs 来源于铜绿假单胞菌, 占比为 10.77%; 有 4 种 ICEs 来源于肺炎克雷伯氏菌, 占比为 6.15%; 有 4 种 ICEs 来源于副猪链球菌, 占比为 6.15%; 有 3 种 ICEs 来源于按蚊伊丽莎白金菌, 占比为 4.62%; 有 3 种 ICEs 来源于丁香假单胞菌, 占比为 4.62%; 有 2 种 ICEs 来源于鹰嘴豆中生根瘤菌, 占比为 3.08%; 有 2 种 ICEs 来源于猪链球菌, 占比为 3.08%(表 2)。宿主微生物, 如: 中生根瘤菌和丁香假单胞菌, 主要来自于土壤或水等, 肺炎克雷伯氏菌、副猪链球菌等均为畜禽养殖中常见致病菌, 因此 ICEs 的传播极有可能是通过养殖环境。

表 1 样品中 ICEs 统计表
Table 1 Statistical table of ICEs in samples

序号	ICE 编号	ICE 名称	大小/kb	宿主微生物	数量	占比/%
1	36	ICEVflInd1	114.20	河流弧菌 Ind1	1	0.91
2	52	ICEPaeLESB58-1	111.10	铜绿假单胞菌 LESB58	1	0.91
3	76	ICESde3396	63.70	乳酸乳球菌乳亚种 NS3396	1	0.91
4	133	ICEMloMAF-1	61.00	百脉根中生根瘤菌 MAFF303099	4	3.64
5	174	PAGI-2	105.00	铜绿假单胞菌 C	1	0.91
6	195	ICE(Tn4371)6036	59.80	西瓜食酸菌 AAC00-1	1	0.91
7	198	ICE(Tn4371)6039	53.50	食酸菌属 JS42	1	0.91
8	200	ICE(Tn4371)6041	48.50	铜绿假单胞菌 2192	6	5.45
9	219	ICE-GII	255.50	彼得里氏鲍特氏菌 DSM 12804	1	0.91
10	338	CMGI-3	97.00	耐重金属贪铜菌 CH34	1	0.91
11	438	phn Island	240.80	代尔夫特菌属 Cs1-4	1	0.91
12	827	ICESpy009	55.30	酿脓链球菌 MB56Spyo009	1	0.91
13	941	CTnPi4	58.60	中间普雷沃氏菌 17	1	0.91
14	1010	ICEPac690	86.20	铜绿假单胞菌 FFUP_PS_690	1	0.91
15	1045	ICEValHN437	94.30	解藻酸弧菌 HN437	2	1.82
16	1081	Pac_ICE1_cn	102.60	丁香假单胞菌猕猴桃科 M7 或 CH2010-6	2	1.82
17	1097	ICEMcSym(1284)- α	477.10	鹰嘴豆中生根瘤菌 WSM1284	2	1.82
18	1121	ICEKpn2_G_12-1	56.14	肺炎克雷伯氏菌 2_G_12	1	0.91
19	1157	ICEKpnA_0125-1	58.05	肺炎克雷伯氏菌 A_0125	5	4.55
20	1179	ICEKpnB12-AN-2	238.17	肺炎克雷伯氏菌 B12(AN)	1	0.91
21	1253	ICEKpnINF249-2	210.25	肺炎克雷伯氏菌 INF249	5	4.55
22	1378	ICEKpnJF999-1	80.22	肺炎克雷伯氏菌亚种.肺炎 JF999	1	0.91

表 1(续)

序号	ICE 编号	ICE 名称	大小/kb	宿主微生物	数量	占比/%
23	1459	ICE_FpA2-165_tNAleu	34.40	普氏栖粪杆菌 A2-165 菌株 JCM 31915	1	0.91
24	1471	ICE_LspYL32_lysS	99.30	乳杆菌 YL32	1	0.91
25	1563	ICE_SsuNSUI002_pIL_1	71.60	猪链球菌 NSUI002 株	1	0.91
26	1576	ICE-2	73.20	多噬伯克霍尔德氏菌 ATCC BAA-247	1	0.91
27	1585	ICEAac2	27.70	伴放线菌团聚杆菌 VT1169	1	0.91
28	1587	ICE-AB AQ	71.80	丁香假单胞菌 ES4326-D	1	0.91
29	1588	ICEAcap1	66.70	荚膜酸杆菌 ATCC 51196	1	0.91
30	1629	ICE-DQ	83.60	丁香假单胞菌 ES4326-D	1	0.91
31	1646	ICEEal(4)_CSID3000516074	97.20	按蚊伊丽莎白金菌 CSID3000516074	3	2.73
32	1651	ICEEal(1)_0422	63.80	按蚊伊丽莎白金菌 0422	1	0.91
33	1661	ICEEal(7)_F3543	104.60	按蚊伊丽莎白金菌 F3543	1	0.91
34	1743	ICEP33	211.20	铜绿假单胞菌 P33	2	1.82
35	1763	ICEPgs6Chn1	116.00	鸽变形菌 T60	1	0.91
36	1819	ICEPsy15	51.20	丁香假单胞菌 CFBP6109	2	1.82
37	1844	ICEPvuChnBC22	148.80	普通变形菌 BC22	1	0.91
38	1869	ICESpsH35-1	69.80	副猪链球菌 H35	1	0.91
39	1870	ICESpsH35-2	62.30	副猪链球菌 H35	1	0.91
40	1871	ICESpsSUT-286-1	123.90	副猪链球菌 SUT-286	5	4.55
41	1872	ICESpsSUT-286-2	51.40	副猪链球菌 SUT-286	9	8.18
42	1881	ICESsu1112S	74.40	猪链球菌 1112S 株	1	0.91
43	1974	ICEXfa1_9a5c	88.20	苛养木杆菌 9a5c	1	0.91
44	2010	Tn6783_201330	72.00	铜绿假单胞菌 201330	1	0.91
45	2011	Tn6783_1305E	72.00	铜绿假单胞菌 1305E	1	0.91
46	2049	ICEMaB5P-1	129.80	澳大利亚中生根瘤菌 B5P	2	1.82
47	2052	ICEMcSymWSM1497- α	443.50	鹰嘴豆中生根瘤菌 WSM1497	2	1.82
48	2062	ICEMsp.SymAA22- α	766.80	中生根瘤菌属 AA22	1	0.91
49	2070	ICEMsp.M1D	199.40	中生根瘤菌属 M1D.F.Ca.ET.043.01.1.1	2	1.82
50	2071	ICEMsp.SymM1D-1	332.10	中生根瘤菌属 M1D.F.Ca.ET.043.01.1.1	1	0.91
51	2073	ICEMsp.SymM1E- α	563.10	中生根瘤菌属 M1E.F.Ca.ET.045.02.1.1	1	0.91
52	2076	ICEMsp.M2A.F.02	222.70	中生根瘤菌属 M2A.F.Ca.ET.043.02.1.1	2	1.82
53	2080	ICEMsp.M2A.F.046	155.50	中生根瘤菌属 M2A.F.Ca.ET.046.03.2.1	1	0.91
54	2083	ICEMsp.SymM3A	396.80	中生根瘤菌属 M3A.F.Ca.ET.080.04.2.1	1	0.91
55	2084	ICEMsp.SymM4B	529.70	中生根瘤菌属 M4B.F.Ca.ET.058.02.1.1	2	1.82
56	2086	ICEMsp.M7D	336.10	中生根瘤菌属 M7D.美国联邦法规 005.01.1.1	1	0.91
57	2088	ICEMsp.M8A-1	102.00	中生根瘤菌属 M8A.F.Ca.ET.057.01.1.1	1	0.91
58	2089	ICEMsp.M8A-2	197.00	中生根瘤菌属 M8A.F.Ca.ET.057.01.1.1	2	1.82
59	2094	ICEMINZP2042	65.90	中生根瘤菌属 NZP2042	1	0.91
60	2098	ICEMsp.NZP2077	508.30	中生根瘤菌属 NZP2077NS	3	2.73
61	2100	ICEMsp.SymNZP2298	467.10	中生根瘤菌属 NZP2298	1	0.91
62	2103	ICEMsp.SymSEMIA3007	480.90	中生根瘤菌属 SEMIA 3007	2	1.82
63	2104	ICEMISymTONO	508.60	中生根瘤菌属 TONO	2	1.82
64	2105	ICEMITONO	241.60	中生根瘤菌属 TONO	1	0.91
65	2111	ICEMsNIBBAC000500504-3	95.80	土中慢生根瘤菌 NIBBAC000500504	1	0.91

表 2 宿主微生物统计表
Table 2 Statistics table of host micobial

序号	宿主微生物	数量	占比/%
1	中生根瘤菌属	17	26.15
2	铜绿假单胞菌	7	10.77
3	肺炎克雷伯氏菌	4	6.15
4	副猪链球菌	4	6.15
5	按蚊伊丽莎白金菌	3	4.62
6	丁香假单胞菌	3	4.62
7	鹰嘴豆中生根瘤菌	2	3.08
8	猪链球菌	2	3.08
9	澳大利亚中生根瘤菌	1	1.54
10	百脉根中生根瘤菌	1	1.54
11	伴放线菌团聚杆菌	1	1.54
12	彼得里氏鲍特氏菌	1	1.54
13	代尔夫特菌属	1	1.54
14	丁香假单胞菌猕猴桃科	1	1.54
15	多噬伯克霍尔德氏菌	1	1.54
16	肺炎克雷伯氏菌亚种.肺炎	1	1.54
17	鸽变形菌	1	1.54
18	河流弧菌	1	1.54
19	荚膜酸杆菌	1	1.54
20	解藻酸弧菌	1	1.54
21	苛养木杆菌	1	1.54
22	耐重金属贪铜菌	1	1.54
23	酿脓链球菌	1	1.54
24	普氏栖粪杆菌	1	1.54
25	普通变形菌	1	1.54
26	乳杆菌	1	1.54
27	乳酸乳球菌乳亚种	1	1.54
28	食酸菌属	1	1.54
29	土中慢生根瘤菌	1	1.54
30	西瓜食酸菌	1	1.54
31	中间普雷沃氏菌	1	1.54

2.2 样本中整合相关蛋白酶的统计分析

样本中共检测到 9 种转座酶, 分别来源于 8 种宿主微

生物, 其中丁香假单胞菌有两个转座酶, 其他宿主微生物均只携带一种转座酶, 来源于酿脓链球菌 MB56Spyo009 的转座酶与大环内酯类、大环内酯、链菌素 B 抗性有关, 来源于副猪链球菌 H35 的转座酶与大环内酯、林可酰胺、链菌素 B、恶唑烷酮、苯尼考抗性有关; 样本中共检测到 2 种整合酶, 分别来源于猪链球菌与西瓜食酸菌, 其中来源于猪链球菌 NSUI002 株的整合酶与四环素抗性有关, 样本中共检测到 1 种解旋酶, 来源于丁香假单胞菌(表 3), 转座酶能携带抗性基因的基因盒从一个位置移动到另一个位置, 甚至在不同的细菌之间转移。整合酶则负责将基因盒整合到 ICEs 的特定位置。由此可知, 转座酶和整合酶通过促进抗性基因的水平转移和稳定整合, 共同在微生物耐药性的形成和传播中发挥了关键作用。这种作用不仅影响了个体微生物, 还对整个微生物群体和生态系统的抗生素耐药性产生了深远的影响。

2.3 基因盒功能注释与统计分析

样本中主要的毒力因子基因为多药 ABC 转运蛋白 ATP 结合和渗透酶蛋白, 来源于副猪链球菌 SUT-286, 它是一种 ATP 结合和水解的跨膜转运蛋白, 通过水解 ATP 释放的能量来驱动底物的跨膜转运, 其转运的底物包括毒素或代谢产物; 且参与病原体对宿主细胞的黏附、入侵和定殖等过程, 从而增强病原体的致病能力。

样本中抗性相关基因共有 19 个, 其中四环素抗性基因最多, 共计 10 个, 主要来源于副猪链球菌, 功能蛋白主要为分子伴侣 DnaK; 氨基糖苷、 β -内酰胺、消毒剂、苯尼考、磺胺 G 降解 M 金属抗性 D 限制性修改基因共计 5 个, 主要来源于铜绿假单胞菌, 功能蛋白主要为脱氢酶; 氨基糖苷、 β -内酰胺、磺胺 M 金属抗性共计 5 个, 主要来源于肺炎克雷伯氏菌, 功能蛋白分别为铜转运 P 型 ATP 酶或糖原磷酸化酶; 氨基糖苷、叶酸途径拮抗剂、苯尼考与磺胺抗性基因, 主要来源于河流弧菌, 功能蛋白为 ATP 依赖性 RNA 解旋酶 SrmB(表 4)。这一发现有助于理解抗性基因如何在微生物之间传播,

表 3 基因盒中蛋白酶统计表
Table 3 Statistical table of proteases in gene cassettes

序号	ICE 编号	ICE 名称	大小/kb	宿主微生物	转座酶或整合酶注释
1	198	ICE(Tn4371)6039	53.50	食酸菌属 JS42	转座酶 IS66
2	827	ICESpy009	55.30	酿脓链球菌 MB56Spyo009	转座酶
3	1819	ICEPsy15	51.20	丁香假单胞菌 CFBP6109	插入序列元件 IS629 的转座酶; 转座酶, IS51
4	1763	ICEPgs6Chn1	116.00	鸽变形菌 T60	ISAbal4 转座酶; ve
5	1844	ICEPvuChnBC22	148.80	普通变形菌 BC22	IS30 样元件 ISAbal25 家族转座酶; 转座酶, ISAbal25
6	1869	ICESpsH35-1	69.80	副猪链球菌 H35	IS6 样元件 IS1216 家族转座酶; 转座酶, IS1216V
7	1121	ICEKpn2_G_12-1	56.14	肺炎克雷伯氏菌 2_G_12	IS5 样元件 ISKpn26 家族转座酶; 转座酶
8	1819	ICEPsy15	51.20	丁香假单胞菌 CFBP6109	插入序列元件 IS629 的转座酶; 转座酶, IS51
9	1881	ICESsu1112S	74.40	猪链球菌 1112S 株	IS6 样元件 ISS1S 家族转座酶; 转座酶
10	1563	ICE_SsuNSUI002_pIL_1	71.60	猪链球菌 NSUI002 株	整合酶; ve
11	195	ICE(Tn4371)6036	59.80	西瓜食酸菌 AAC00-1	整合酶, 催化区
12	1587	ICE-ABAQ	71.80	丁香假单胞菌 ES4326-D	复制 DNA 解旋酶

表 4 基因盒中抗性蛋白酶统计表
Table 4 Statistical table of resistance proteases in gene cassettes

序号	ICE 编号	ICE 名称	大小/kb	来源微生物	基因盒功能	功能蛋白说明
1	1872	ICESpsSUT-286-2	51.40	副猪链球菌 SUT-286	四环素	分子伴侣 DnaK
2	1872	ICESpsSUT-286-2	51.40	副猪链球菌 SUT-286	四环素	分子伴侣 DnaK
3	1872	ICESpsSUT-286-2	51.40	副猪链球菌 SUT-286	四环素	分子伴侣 DnaK
4	1872	ICESpsSUT-286-2	51.40	副猪链球菌 SUT-286	四环素	分子伴侣 DnaJ
5	1872	ICESpsSUT-286-2	51.40	副猪链球菌 SUT-286	四环素	分子伴侣 DnaK
6	1872	ICESpsSUT-286-2	51.40	副猪链球菌 SUT-286	四环素	分子伴侣 DnaK
7	1872	ICESpsSUT-286-2	51.40	副猪链球菌 SUT-286	四环素	分子伴侣 DnaK
8	1872	ICESpsSUT-286-2	51.40	副猪链球菌 SUT-286	四环素	分子伴侣 DnaK
9	1872	ICESpsSUT-286-2	51.40	副猪链球菌 SUT-286	四环素	分子伴侣 DnaK
10	1870	ICESpsH35-2	62.30	副猪链球菌 H35	四环素	3-磷酸丝氨酸/磷酸羟苏氨酸转氨酶
11	1010	ICEPac690	86.20	铜绿假单胞菌 FFUP_PS_690	氨基糖苷、 β -内酰胺、消毒剂、磺胺	S-(羟甲基)谷胱甘肽脱氢酶 /III 类醇脱氢酶
12	1743	ICEP33	211.20	铜绿假单胞菌 P33	氨基糖苷、 β -内酰胺、消毒剂、苯尼考、磺胺 G 降解 M 金属抗性 D 限制性修改	异丁酰辅酶 A 脱氢酶
13	1743	ICEP33	211.20	铜绿假单胞菌 P33	氨基糖苷、 β -内酰胺、消毒剂、苯尼考、磺胺 G 降解 M 金属抗性 D 限制性修改	辅酶 A 酰化甲基丙二酸半醛脱氢酶
14	1253	ICEKpnINF249-2	210.25	肺炎克雷伯氏菌 INF249	氨基糖苷、 β -内酰胺、磺胺 M 金属抗性	铜转运 P 型 ATP 酶
15	1253	ICEKpnINF249-2	210.25	肺炎克雷伯氏菌 INF249	氨基糖苷、 β -内酰胺、磺胺 M 金属抗性	糖原磷酸化酶
16	1253	ICEKpnINF249-2	210.25	肺炎克雷伯氏菌 INF249	氨基糖苷、 β -内酰胺、磺胺 M 金属抗性	糖原磷酸化酶
17	1253	ICEKpnINF249-2	210.25	肺炎克雷伯氏菌 INF249	氨基糖苷、 β -内酰胺、磺胺 M 金属抗性	ATP 依赖性 Clp 蛋白酶 ATP 结合亚基
18	1253	ICEKpnINF249-2	210.25	肺炎克雷伯氏菌 INF249	氨基糖苷、 β -内酰胺、磺胺 M 金属抗性	糖原磷酸化酶
19	36	ICEVflInd1	114.20	河流弧菌 Ind1	氨基糖苷、叶酸途径拮抗剂、苯尼考、磺胺	ATP 依赖性 RNA 解旋酶 SrmB

从而增加微生物对抗生素的耐药性。这对于制定有效的抗生素使用策略和控制细菌耐药性的传播具有重要意义。

样本中防御基因共有 11 个，均为防御噬菌体的基因，其中噬菌体防御系统基因最多为 7 个，主要来源于肺炎克雷伯氏菌与中生根瘤菌，主要功能蛋白为伸长因子、顺乌头酸酶 1 与假想蛋白质；噬菌体排出系统基因 2 个，

来源于中生根瘤菌，功能蛋白为甲硫氨酸腺苷转移酶；噬菌体降解系统基因 2 个，来源于中生根瘤菌，功能蛋白为乙酰辅酶 A 乙酰转移酶和 4-氨基丁酸转氨酶(表 5)。

这些防御基因的存在和分布揭示了微生物在面对噬菌体侵袭时所采取的多种防御策略，如噬菌体防御系统、噬菌体排出系统和噬菌体降解系统等。

表 5 基因盒中防御相关蛋白酶统计表
Table 5 Statistical table of defense-related proteases in gene cassettes

序号	ICE 编号	ICE 名称	大小/kb	来源微生物	基因盒功能	功能蛋白说明
1	1179	ICEKpnB12-AN-2	238.17	肺炎克雷伯氏菌 B12(AN)	噬菌体防御系统	伸长因子
2	1157	ICEKpnAR_0125-1	58.05	肺炎克雷伯氏菌 AR_0125	噬菌体防御系统	顺乌头酸酶 1
3	1157	ICEKpnAR_0125-1	58.05	肺炎克雷伯氏菌 AR_0125	噬菌体防御系统	顺乌头酸酶 1
4	1157	ICEKpnAR_0125-1	58.05	肺炎克雷伯氏菌 AR_0125	噬菌体防御系统	顺乌头酸酶 1
5	1157	ICEKpnAR_0125-1	58.05	肺炎克雷伯氏菌 AR_0125	噬菌体防御系统	顺乌头酸酶 1
6	1157	ICEKpnAR_0125-1	58.05	肺炎克雷伯氏菌 AR_0125	噬菌体防御系统	顺乌头酸酶 1
7	2088	ICEMsp.M8A-1	102.00	中生根瘤菌属 M8A.F.Ca.ET.057.01.1.1	噬菌体防御系统	假想蛋白质
8	2100	ICEMsp.SymNZP2298	467.10	中生根瘤菌属 NZP2298	噬菌体排出系统	甲硫氨酸腺苷转移酶
9	2071	ICEMsp.SymM1D-1	332.10	中生根瘤菌属 M1D.F.Ca.ET.043.01.1.1	噬菌体排出系统	甲硫氨酸腺苷转移酶
10	2103	ICEMsp.SymSEMIA3007	480.90	中生根瘤菌属 SEMIA 3007	噬菌体降解系统	4-氨基丁酸转氨酶
11	2103	ICEMsp.SymSEMIA3007	480.90	中生根瘤菌属 SEMIA 3007	噬菌体降解系统	乙酰辅酶 A 乙酰转移酶

3 讨论与结论

随着聚合酶链式反应扩增技术、多重聚合酶链式反应扩增技术以及高通量测序技术的飞速发展, 科研人员得以更深入地探究畜禽肉中微生物的抗性基因与毒力因子基因^[16-18]。由于畜禽养殖业中抗生素的普遍且广泛使用, 鸡鸭肉中的抗性基因检出率不断攀升, 且这些基因呈现出多样化的趋势, 涵盖了 β -内酰胺类、氨基糖苷类、大环内酯类等多种类型耐药基因, 而这些耐药基因的多样性与高检出率, 极有可能与基因的水平转移有关^[19-21]。与此同时, 不良的饲养环境, 包括卫生条件不达标、通风不良、饮水质量低劣以及高密度饲养等因素, 也加剧了病原菌的传播风险, 并推动了其适应性进化。在这种环境下, 毒力因子基因更容易发生变异和重组, 从而赋予病原菌更强的致病能力和耐药性^[22-25]。

为了深入探索熟制禽肉制品中抗性基因与毒力因子基因在微生物群落中的潜在传播途径, 本研究采用了一种先进的策略, 即结合宏基因组测序技术与生物信息学分析方法, 对这类产品中的 ICEs 进行了详尽的统计分析。在熟制鸭肉样本中, 成功鉴定出 65 种共计 110 个 ICEs, 其中 ICE1872 ICEs 数量最多, 达到了 9 个, 这些 ICEs 广泛分布于 31 种不同的宿主微生物中, 如中生根瘤菌属、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯氏菌、副猪链球菌等^[26-27], 有 17 种 ICEs 直接来源于中生根瘤菌属。这一发现不仅证实了 ICEs 在熟制禽肉制品中的普遍存在, 还揭示了其主要源自几种关键的病原菌, 进一步凸显了其在微生物抗性基因传播中的重要性。

通过对 ICEs 及其携带的基因盒进行深入剖析, 本研究发现了 9 种转座酶, 它们源自 8 种不同的宿主微生物, 同时鉴定出 2 种整合酶和 1 种解旋酶, 这些酶的存在为基因的水平转移提供了强有力的证据。在毒力因子方面, 本研究仅检测到 1 种, 即多药 ABC 转运蛋白 ATP 结合和渗透酶蛋白, 它来源于副猪链球菌 SUT-286, 这表明在熟制禽肉制品中毒力因子基因的水平传播相对有限^[28-29]。然而,

在抗性相关基因方面, 发现了多达 19 个基因, 其中四环素抗性基因最为丰富, 共计 10 个, 主要来源于副猪链球菌。此外, 还鉴定出 11 个防御噬菌体的防御基因, 它们主要源自肺炎克雷伯氏菌与中生根瘤菌。这些发现不仅展示了宏基因组测序技术在解析复杂微生物群落结构及其基因组成方面的强大能力, 还揭示了抗性基因与防御基因在微生物间的复杂交互作用。

本研究发现的大量抗性相关基因主要来源于病原菌, 且大多通过 ICEs 的方式进行传播, 这强烈暗示了 ICEs 在微生物群体抗性形成中的关键作用^[30]。这一发现不仅加深了对抗性基因传播机制的理解, 还为制定有效的策略以阻断抗性基因在食品链中的传播提供了科学依据。未来计划进一步采集饲养、屠宰以及生产环境样品, 运用高通量测序技术对 ICEs 进行纵向追踪研究, 以期更深入地揭示毒力因子基因与抗性基因的传播机制。

参考文献

[1] 郝佳慧, 杨泽华. 细菌整合子检测方法研究进展[J]. 检验医学, 2022, 37(9): 887-891.
HAO JH, YANG ZH. Research progress of bacterial integron determination methods [J]. Laboratory Medicine, 2022, 37(9): 887-891.

[2] 钱扬会, 齐永志, 李晓燕, 等. 2020—2022 年某儿童专科医院铜绿假单胞菌分离株耐药性及 I 类整合子变化趋势[J]. 中华医院感染学杂志, 2024, 34(15): 2372-2376.
QIAN YH, QI YZ, LI XY, et al. Changing trends of drug resistance and class I integron of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a children's hospital from 2020 to 2022 [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2024, 34(15): 2372-2376.

[3] 魏玉杰, 梁春彩, 王旭丹, 等. 抗菌药物减量对规模奶牛场抗生素抗性基因多样性的影响[J]. 中国兽医学报, 2024, 44(9): 2031-2039.
WEI YJ, LIANG CC, WANG XD, et al. Effect of antimicrobial reduction on the diversity of antibiotic resistance genes in large scale dairy farms [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2024, 44(9): 2031-2039.

[4] 刘宗保. 肉食品加工链多重耐药菌及耐药基因分布与传播研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2015.
LIU ZB. Prevalence and dissemination of multidrug-resistant bacteria and

- esistant genes in meat products industry chain [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2015.
- [5] 李许南. 厨余垃圾多途径生物资源化高效利用及抗生素抗性基因控制的微生物机制研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2023.
LI XN. Microbial mechanisms of multichannel bioresource efficient utilization of food waste and the control of antibiotic resistance genes [D]. Shanghai: East China Normal University, 2023.
 - [6] 蒋梦雪. 鸭屠宰场中细菌的耐药性及 *qnb* 耐药基因的传播机制研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2021.
JIANG MX. Study on the antibiotic resistance of bacteria and the transmission mechanism of *qnb* resistance gene in duck slaughterhouse [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2021.
 - [7] 修瑜. 鲍曼不动杆菌临床分离株第1类整合子、碳青霉烯酶基因和生物膜相关基因的分析[D]. 合肥: 安徽理工大学, 2024.
XIU Y. Analysis of the class 1 integrons, carbapenemase genes and biofilm-related genes occurrence in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates [D]. Hefei: Anhui University of Science and Technology, 2024.
 - [8] 张亚茹, 董琪琪, 曲道峰, 等. 稻蛙共养系统中大肠杆菌耐药性及其传播风险[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3750–3764.
ZHANG Y, DONG QQ, QU DF, et al. Evaluation of antibiotic resistance and transmission risk of *Escherichia coli* in rice-frog coculture system [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3750–3764.
 - [9] 黄靖宇, 林佩贤, 李湖桂, 等. 亚胺培南耐药铜绿假单胞菌整合酶基因研究[J]. 热带医学杂志, 2017, 17(6): 730–732.
HUANG JY, LIN PX, LI HG, et al. The study of integron genes in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Tropical Medicine, 2017, 17(6): 730–732.
 - [10] HANDELSMAN J, OGDON M, BADDY SF, et al. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: A new frontier for natural products [J]. Chemical Biology, 1998, 5(10): 245–249.
 - [11] HUANG X, WU W, TIAN X, et al. A total infectome approach to understand the etiology of infectious disease in pigs [J]. Microbiome, 2022, 10(1): 73.
 - [12] LIU J, WANG X, ZHANG W, et al. Comparative analysis of gut microbiota in healthy and diarrheic yaks [J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 111–124.
 - [13] BEG G, YBAKOVA D, FISHE D, et al. Microbiome definition revisited: Old concepts and new challenges [J]. Microbiome, 2020, 8(1): 103–119.
 - [14] FEAVANTE C, MEMOLI D, PALUMBO D, et al. HOME-BIO (shotgun metagenomic analysis of biological entities): A specific and comprehensive pipeline for metagenomic shotgun sequencing data analysis [J]. BMC Bioinformatics, 2021, 22(7): 106–118.
 - [15] 郑鑫洱. 生猪屠宰环节耐药菌分布及抗性基因传播特征研究[D]. 杭州: 浙江工商大学, 2023.
ZHENG XER. Study on the distribution of drug-resistant bacteria and the characteristics of resistance gene transmission in a swine slaughterhouse [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2023.
 - [16] 管永晶. 环境压力下澜河抗生素耐药性赋存特征及扩散机理研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022.
GUAN YJ. Research on the occurrence characteristics and diffusion mechanism of antibiotic resistance in Bahe River under environmental pressure [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2022.
 - [17] GAO R, HUANG H, HAMEL J, et al. Application of a high-throughput targeted sequence amplification procedure to assess the presence and variants of virulence genes in *Salmonella* [J]. Microorganisms, 2022, 10(2): 856–871.
 - [18] 董庆利. 食源性致病微生物研究新动态[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(24): 9273–9274.
DONG QL. New trends of research on foodborne pathogenic microorganisms [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 11(24): 9273–9274.
 - [19] MURRAY CJL, IKUTA KS, SHARARA F, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis [J]. Lancet, 2022(10325): 399.
 - [20] HUSNA A, RAHMAN MM, BADRUZZAMAN ATM, et al. Extended-spectrum β -lactamases (ESBL): Challenges and opportunities [J]. Biomedicine, 2023, 11(11): 2937.
 - [21] 谢倩, 姚明, 刘媛, 等. 合肥市售鸡蛋壳表面与内容物沙门氏菌污染的检测及其分离株耐药性分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(5): 1505–1510.
XIE Q, YAO M, LIU Y, et al. Detection of *Salmonella* contamination on the surface and in the contents of retail eggs in Hefei, and antibiotic resistance analysis of isolated strains [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2013, 4(5): 1505–1510.
 - [22] 周晓红, 孙明华, 徐佩华. 酒店酱肉类熟肉制品中金黄色葡萄球菌检测结果及耐药性分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(6): 1440–1442.
ZHOU XH, SUN MH, XU PH. Detection results and drug resistance analysis of *Staphylococcus aureus* in cooked meat products of hotel sauces [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2011, 21(6): 1440–1442.
 - [23] 宋晟, 杨华, 郭焜鹏, 等. 结合平板计数与宏基因组学研究方法分析气调保鲜肉鸭掌中微生物污染[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(6): 211–217.
SONG S, YANG H, GUO KP, et al. Analysis of microbial contamination in modified atmosphere preservation bittern duck feet based on aerobically plate count and metagenomics [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(6): 211–217.
 - [24] 王玲玲. 铜离子胁迫下微生物 EPS 分泌及相关抗性基因表达和代谢水平变化的探究[D]. 南京: 南京林业大学, 2023.
WANG LL. Exploration of changes in microbial EPS secretion, expression of related resistance genes, and metabolic levels under copper ion stress [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2023.
 - [25] 李颖, 梁昊, 王苗, 等. 北京市顺义区零售鸡胴体中弯曲菌分布与分子特征研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2019, 4: 351–355.
LI Y, LIANG H, WANG M, et al. Distribution and molecular characteristics of *Campylobacter* in retail chicken carcasses in Shunyi district, Beijing [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2019, 4: 351–355.
 - [26] TAHERI N, FALLMAN M, WAI SN, et al. Accumulation of virulence-associated proteins in *Campylobacter jejuni* outer membrane vesicles at human body temperature [J]. Journal of Proteomics, 2019, 195: 33–40.
 - [27] DAVIES C, TAYLOR AJ, ELMI A, et al. Sodium taurocholate stimulates *Campylobacter jejuni* outer membrane vesicle production via downregulation of the maintenance of lipid asymmetry pathway [J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2019, 9: 177.
 - [28] MEHDIPOUR MMJ, MIRBAGHERI AA, SALEHI Z, et al. Prevalence of class 1 integrons and extended spectrum beta lactamases among multi-drug resistant *Escherichia coli* isolates from north of Iran [J]. Iranian Journal of Biomedicine, 2015, 19(4): 233–239.
 - [29] POIREL L, MADEC JY, LUPO A, et al. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* [J]. Microbiol Spectrum, 2018, 6(4): 1–5.
 - [30] 石奔, 赵薇, 孙景昱, 等. 全基因组测序分析45株沙门氏菌分子分型、耐药性与毒力携带情况[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(20): 79–88.
SHI B, ZHAO W, SUN JL, et al. Analysis of molecular subtyping, drug sensitivity and virulence factors of 45 strains of *Salmonella* by whole genome sequencing [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(20): 79–88.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)