

饮用水中铜绿假单胞菌全基因组分析与分子溯源

Whole genome analysis and molecular traceability of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking water

郭焜鹏 张海韵 何娟 高晗 杨滔 宋晟

GUO Kun-peng ZHANG Hai-yun HE Juan GAO Han YANG Tao SONG Sheng

(湖南省产商品质量检验研究院食品安全监测与预警湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410117)

(Hunan Institute of Commodity Quality Inspection, Hunan Provincial Key Laboratory of Food
Safety Monitoring and Early Warning, Changsha, Hunan 410117, China)

摘要:目的:为湖南省饮用水中铜绿假单胞菌的溯源研究和污染防治提供数据支持。方法:按 GB 8538—2016 检验湖南省部分市县随机采集的桶装水,对分离鉴定的 18 株铜绿假单胞菌进行全基因组测序、分子溯源以及毒力基因和耐药基因分析。结果:通过系统进化树分析可知,18 株铜绿假单胞菌有明显的聚类分布,清晰反映了样本菌株的亲缘远近情况;通过统计分析毒力基因和耐药基因,证实 4 株铜绿假单胞菌在地域分布、同源性、致病基因和耐药基因型上呈现一致性,推测为同一来源。结论:基于全基因组测序、16S rRNA 和单拷贝直系同源分析,可实现饮用水中铜绿假单胞菌的溯源、毒力基因及耐药基因分析。

关键词:饮用水;铜绿假单胞菌;全基因组测序;系统进化树;分子溯源

Abstract: Objective: Provide data support for the source tracing and pollution prevention of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking water in Hunan Province. **Methods:** According to the national food safety standards of GB 8538—2016, the bottled water was tested randomly collected from partial cities and counties in Hunan Province, and the whole genome sequencing and molecular traceability of the 18 strains of *Pseudomonas aeruginosa* were detected. The carrying of virulence genes and drug resistance genes was detected. **Results:** It was confirmed that four strains of *Pseudomonas aeruginosa* showed consistency in terms of geographical distance, genetic distance, pathogenic

and drug-resistant genotypes, and it was presumed that there was the same source. **Conclusion:** The traceability analysis of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking water and the analysis of virulence and drug resistance genes in drinking water can be realized by whole gene sequencing based on 16S rRNA and single-copy orthologous genes.

Keywords: drinking water; *Pseudomonas aeruginosa*; whole-genome sequencing; phylogenetic tree; molecular traceability

铜绿假单胞菌是桶装饮用水中常见的一种条件致病菌,其最适生长温度为 35 ℃,广泛存在于自然界中,耐干燥,主要产生胞外酶、内毒素、外毒素 A 等十余种致病因子^[1],抵抗力弱者如老幼等可引发急性肠道疾病、肺炎、菌血症和脑膜炎等^[2]。

目前对铜绿假单胞菌的研究主要集中在疾控和临床领域,一般以耐药分析为主,研究样本来源较为集中,尚未见跨地域饮用水中铜绿假单胞菌的溯源分析。研究拟通过采集湖南省内销售的桶装水,依据 GB 8538—2016 检验方法分离、鉴定样品中的铜绿假单胞菌,并对检测出来自 5 市 13 县的 18 株铜绿假单胞菌进行全基因组测序与溯源分析,结合菌株之间的毒力基因与耐药基因的差异,研究地域与铜绿假单胞菌亲缘远近分布的相关性,以期对饮用水中铜绿假单胞菌的溯源研究和污染防治提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料

桶装饮用水:5 桶/批次,湖南省各市州桶装水生产及销售企业;

假单胞菌琼脂基础培养基(CN)、绿脓菌素测定培养基、营养琼脂平板、HE 琼脂:北京陆桥技术股份有限公司;

基金项目:湖南省市场监督管理局科技计划项目(编号:2021KJJH41);湖南省科技创新平台与人才计划项(编号:2019TP1058)

作者简介:郭焜鹏,男,湖南省产商品质量检验研究院工程师,硕士。

通信作者:宋晟(1979—),男,湖南省产商品质量检验研究院高级工程师,硕士。E-mail:83071480@qq.com

收稿日期:2022-12-16 **改回日期:**2023-03-29

革兰氏阴性菌鉴定试剂卡(GN);法国 Bio Mérieux 公司。

1.2 仪器与设备

多联薄膜过滤器:EZ-Fit(六联)型,默克密理博公司;
低温培养箱:MIR-254L-PC 型,日本松下电器产业株式会社;

全自动微生物鉴定系统:VITEK 2 compact30 型,法国生物梅里埃股份有限公司。

1.3 水样过滤

在洁净室中,无菌采样,量取 250 mL 水样经 0.45 μm 孔径滤膜过滤,滤膜贴合于 CN 平板。

1.4 培养

将 CN 平板倒置于 36 ℃ 培养箱培养 24~48 h。

1.5 生化试验

从 CN 平板上选择蓝色或绿色的疑似阳性菌落,进行绿脓菌素确证性试验。

1.6 鉴定

选取在 CN 琼脂上生长并产生绿脓菌素的单菌落,划线接种营养琼脂平板,36 ℃ 培养 24 h,挑取纯化的单菌落制备菌悬液,采用 VITEK2 compact system 全自动微生物鉴定及药敏分析系统进行菌种鉴定。

1.7 菌株保存

单菌纯化后用甘油冻存管-70 ℃ 保存。

1.8 全基因组测序

对 18 株铜绿假单胞菌 DNA 的提取、测序、基因预测,功能注释等工作由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 菌株形态、生化鉴定结果

在 CN 琼脂培养基上,菌株形态为蓝色或绿色;单菌落分离纯化后接种绿脓菌素测定培养基和乙酰胺肉汤后,上层盐酸液内出现粉红色。

2.2 18 株铜绿假单胞菌基因组基本信息

由表 1 可知,18 株铜绿假单胞菌的基因组碱基数为 6 309 683~6 685 466,GC 平均含量为 66.26%,编码蛋白的基因数为 5 902~6 282,转运 RNA 数为 67.17,核糖体 RNA 数为 4.78。

2.3 18 株铜绿假单胞菌同源基因分析

由表 2 可知,18 株铜绿假单胞菌单拷贝直系同源基因数为 5 179~5 607;多拷贝直系同源基因数为 36~191;未聚类基因数为 0~147,其中 HNTL07 的单拷贝直系同源基因最少,多拷贝直系同源基因和未聚类基因最多。HNTL01 和 HNTL10 分别采自怀化和邵阳,HNTL06 和 HNTL13 分别采自怀化、永州,但单拷贝直系同源基因、多拷贝直系同源基因、未聚类基因和其他基

表 1 18 株铜绿假单胞菌基因组信息

Table 1 18 Strains of *Pseudomonas aeruginosa* genome information

菌株	碱基数量	GC 含量/%	编码蛋白的基因数量	转运 RNA 数量	核糖体 RNA 数量
HNTL01	6 564 153	66.10	6 104	68	4
HNTL02	6 455 457	66.40	6 062	65	6
HNTL03	6 309 683	66.44	5 902	66	3
HNTL04	6 501 425	66.38	6 123	69	3
HNTL05	6 526 141	66.31	6 155	68	7
HNTL06	6 572 045	66.10	6 122	67	4
HNTL07	6 533 116	66.05	6 160	69	5
HNTL08	6 685 466	66.02	6 259	69	3
HNTL09	6 645 379	66.22	6 282	65	5
HNTL10	6 569 111	66.10	6 113	68	4
HNTL11	6 401 848	66.50	5 994	66	6
HNTL12	6 435 568	66.31	5 987	67	6
HNTL13	6 570 829	66.10	6 117	68	4
HNTL14	6 611 568	66.22	6 171	69	5
HNTL15	6 499 961	66.33	6 131	66	6
HNTL16	6 577 789	66.31	6 204	65	6
HNTL17	6 388 713	66.39	5 939	67	5
HNTL18	6 363 047	66.44	6 013	67	4
平均值	6 511 738.83	66.26	6 102.11	67.17	4.78

表 2 18 株铜绿假单胞菌直系基因与旁系基因分析

Table 2 Analysis of orthologous gene and paralogous gene of 18 strains of *Pseudomonas aeruginosa*

菌株	单拷贝直系同源基因	多拷贝直系同源基因	未聚类基因	其他直系同源基因未聚类基因	市县区
HNTL01	5 529	39	0	5 568	邵阳新邵
HNTL02	5 435	45	4	5 480	邵阳新邵
HNTL03	5 287	49	54	5 336	邵阳洞口
HNTL04	5 394	79	66	5 473	怀化辰溪
HNTL05	5 436	71	95	5 507	怀化芷江
HNTL06	5 539	41	2	5 580	怀化麻阳
HNTL07	5 179	191	147	5 370	怀化洪江
HNTL08	5 607	52	30	5 659	怀化麻阳
HNTL09	5 420	111	75	5 531	怀化中方
HNTL10	5 535	38	0	5 573	怀化中方
HNTL11	5 378	43	45	5 421	湘西保靖
HNTL12	5 303	59	57	5 362	湘西保靖
HNTL13	5 536	41	1	5 577	永州东安
HNTL14	5 373	132	90	5 505	永州东安
HNTL15	5 448	41	51	5 489	永州道县
HNTL16	5 520	54	38	5 574	株洲攸县
HNTL17	5 324	47	32	5 371	株洲醴陵
HNTL18	5 347	36	38	5 383	株洲荷塘

因的数量都非常接近,说明菌株源性基因数与地域并非一致性。

2.4 基于 16S rRNA、单拷贝直系同源基因分别构建 18 株铜绿假单胞菌系统发育树

由图 1 可知,基于 16S rRNA 构建系统发育树,18 株铜绿假单胞菌明显聚集为 2 簇,其中 HNTL10、HNTL06、HNTL05、HNTL18、HNTL09、HNTL08、HNTL01、HNTL17、HNTL15、HNTL14、HNTL13、

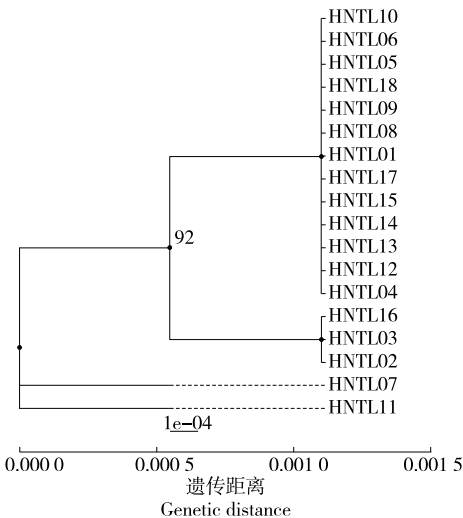


图 1 基于 16S rRNA 构建 18 株铜绿假单胞菌系统发育树
Figure 1 Phylogenetic tree of 18 *Pseudomonas aeruginosa* strain based on 16S rRNA

HNTL12、HNTL04 共 13 株聚集为 1 簇, HNTL16、HNTL03、HNTL02 共 3 株聚集为 1 簇,另有 HNTL07、HNTL11 无明显聚集。结合菌株地域来源,采自怀化麻阳的 HNTL06、HNTL08,采自永州东安的 HNTL13、HNTL14 聚集为 1 簇。

由图 2 可知,基于单拷贝直系同源基因构建系统进化树,18 株铜绿假单胞菌明显聚集为 4 簇,其中 HNTL06、

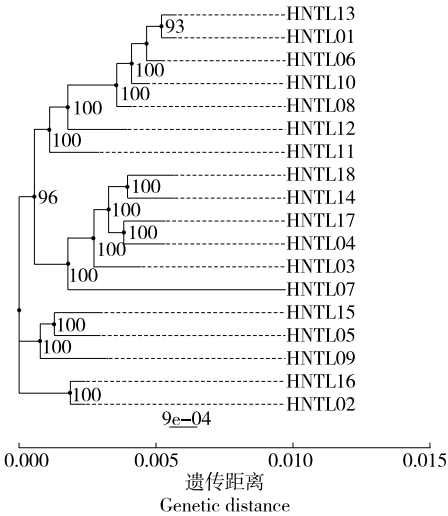


图 2 基于单拷贝直系同源基因构建 18 株铜绿假单胞菌系统进化树
Figure 2 Phylogenetic tree of 18 *Pseudomonas aeruginosa* strain based on single-copy orthologous genes

HNTL08、HNTL10、HNTL11、HNTL12、HNTL13、HNTL01 共 7 株聚集为 1 簇; HNTL17、HNTL18、HNTL14、HNTL03、HNTL04、HNTL07 共 6 株聚集为 1 簇; HNTL15、HNTL05、HNTL09 共 3 株聚集为 1 簇, HNTL16 和 HNTL02 共 2 株聚集为 1 簇。其中同在一簇遗传距离较近的 HNTL06、HNTL08 来自怀化麻阳, HNTL11、HNTL12 来自湘西保靖,而在另一簇遗传距离相互接近的 HNTL05、HNTL09 分别来自怀化芷江和中方。

对 18 株铜绿假单胞菌进行系统进化树分析可知,铜绿假单胞菌基因差异性大,仅有一小部分菌株的地域分布与亲缘远近有关联性。

2.5 18 株铜绿假单胞菌毒力基因分析

由图 3 可知,18 株铜绿假单胞菌共涉及 112 种毒力基因类型,有 97 种类型 168 个毒力基因为共有基因: *Capsule*、*TTSS*、*LPS*、*Aerobactin*、*Hemolysin*、*LOS*、*Type 1 fimbriae*、*AAFs*、*Alginate*、*Alkaline protease*、*BFP*、*BopD*、*Brk*、*Bsa* *T3SS*、*Capsule I*、*CcmC*、*Chu*、*ClpC*、*Cya*、*Cytolysin*、*Dot/Icm*、*Dr adhesin*、*EfaA*、*Enterobactin*、*EtpA*、*ExoS*、*ExoT*、*T2SS*、*T3SS1*、*T3SS2*、*T6SS*、*T6SS-1*、*TTSS (SPI-1 encode)*、*TTSS (SPI-2 encode)*等。

由表 3 可知,12 种类型毒力基因仅在部分菌株中检出。*ExoA*、*ExoU*、*ExoY*、*ExoS*、*ExoT* 基因注释分别为

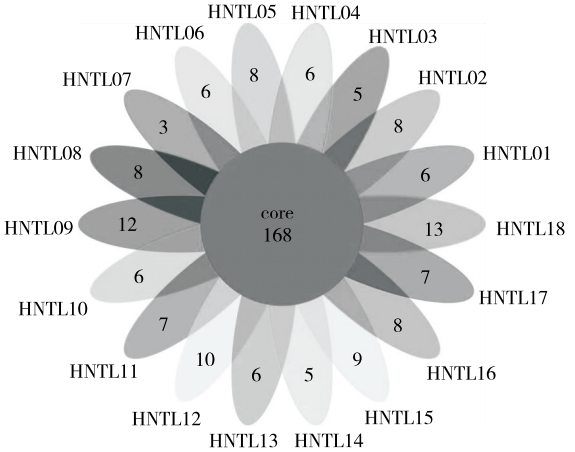


图 3 18 株铜绿假单胞菌毒力基因花瓣图
Figure 3 Flower plot of 18 strains of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor gene

外毒素 A、外毒素 U、外毒素 Y、外毒素 S 和外毒素 T,其中 18 株菌株均检测出 *ExoS*、*ExoT* 基因,外毒素 S 和外毒素 T 高度同源,兼具 ADP-核糖基转移酶和 GTP 酶激活蛋白活性,尤其是通过对膜结合型 GTP/GDP 结合蛋白(Ras)的 ADP 核糖基化,从而影响宿主细胞功能,降低其抗感染力^[3-4];除 HNTL07 外,均含有 *ExoA*、*ExoA* 作为细胞内活性毒素,通过 ADP-核糖基修饰转移酶活性来抑制宿主细胞蛋白质合成^[5-7]。

ExoU 为一种具有脂肪酶活性的磷脂酶,可诱导细胞

表 3 18 株铜绿假单胞菌特有毒力基因分析[†]

Table 3 Analysis of unique virulence factor of 18 strains of *Pseudomonas aeruginosa*

菌株	Flagella	ACF	ExoA	ExoU	FHA	HpuAB	MAM7	ExoY	Ptx	TCP	FadD33	Type IVpili	合计
HNTL01	5	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	4	15
HNTL02	5	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	5	18
HNTL03	5	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	4	14
HNTL04	5	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	5	17
HNTL05	6	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	4	16
HNTL06	5	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	4	15
HNTL07	5	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	5	13
HNTL08	5	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	5	17
HNTL09	6	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	5	18
HNTL10	5	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	4	15
HNTL11	5	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	5	18
HNTL12	5	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	4	15
HNTL13	5	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	4	15
HNTL14	6	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	4	14
HNTL15	6	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	5	18
HNTL16	5	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	5	18
HNTL17	5	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	5	18
HNTL18	6	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	5	19

褶皱变形和骨架裂解,从而导致细胞膜发生不可逆的破坏,最终引起细胞快速死亡,造成组织破坏^[8]。传统观点认为 *ExoS* 和 *ExoU* 基因位于细菌染色体同一染色体的不同部位,因遗传因素二者不能共存^[9],试验发现单拷贝直系同源基因进化树同一分支的 HNTL03、HNTL04、HNTL07、HNTL14、HNTL17、HNTL18 均为 (*ExoS*+/ *ExoU*-) 基因型;另有 12 株铜绿假单胞菌同时检出 (*ExoS*+/ *ExoU*+)。有文献^[10]报道,迫于环境选择压力,同一菌株可以同时检测到 *ExoS* 和 *ExoU* 基因,而双阳性基因 (*ExoS*+/ *ExoU*+) 的菌株传播传染能力更强。

ExoY 作为一种腺苷酸环化酶,可以增加宿主细胞内 cAMP 水平,破坏细胞骨架中的微管,促使细胞变圆,从而导致内皮细胞间隙形成,增加血管通透性,造成组织水肿^[11]。18 株铜绿假单胞菌中有 1/2 缺失该基因,其中来自湘西的 HNTL11、HNTL12、怀化的 HNTL06、HNTL07、HNTL08、HNTL09、HNTL10 均缺失 *ExoY* 基因,而来自株洲的 HNTL16、HNTL17、HNTL18 均有此毒力基因。

ACF 基因,该基因注释为辅助定植因子 (AcfB),介导协助菌体对宿主肠道系统定植^[12],单拷贝直系同源基因构建的进化树同源程度较为接近的 HNTL07、HNTL14 均未检出 ACF 相关基因,推测其对肠道的侵袭要弱于其他 15 株菌株。HNTL07 和 HNTL14 在缺失 ACF 基因的同时,均缺少 *ExoU* 基因,HNTL07 甚至还缺失 *ExoA*、*ExoY* 基因,推测 HNTL07 在 17 株菌中的致病能力最弱,HNTL14 次之。

毒素共调菌毛 (TCP) 基因能表达由多种 TCP 亚单位组成的 IV 型菌毛,是致病菌的主要黏附定居因子之一,起到组织细胞黏附性和血凝性,并通过激活或加强其他毒力基因表达的作用^[13]。HNTL02、HNTL15 和 HNTL16 具有 ACF、*ExoA*、*ExoU*、*ExoT*、*ExoS*、*ExoY* 等基因以及 TCP 基因,推测此 3 株铜绿假单胞菌的肠道侵袭致病能力最强,而缺少 TCP 基因的 HNTL01、HNTL03、HNTL05、HNTL06、HNTL10、HNTL12、HNTL13 可能对宿主肠道黏附能力较弱。

HNTL09、HNTL12、HNTL18 都有百日咳毒素 *Ptx* (Pertussis toxin) 基因,其表达的百日咳毒素具有抑制单核细胞吞噬细菌的免疫调节特性,从而加强对呼吸道的黏附能力^[14]。采自怀化麻阳的 HNTL06 和 HNTL08,湘西保靖的 HNTL11 和 HNTL12,地域相近,在系统进化树上聚为一簇,且具有相同的毒力基因型 (ACF+/ *ExoA*+/ *ExoS*+/ *ExoT*+/ *ExoU*+/ *ExoY*-),推测为同一来源。而采自邵阳新邵的 HNTL01 和 HNTL02、怀化中方的 HNTL09 和 HNTL10、永州东安的 HNTL13 和 HNTL14 均不在进化树的同一簇上,且毒力基因数量和种类均有差异,说明同一地域的铜绿假单胞菌存在多

样性。

2.6 18 株铜绿假单胞菌耐药基因分析

为研究耐药基因分布,通过数据比对与分析(图 4),发现 76 类 462 个共有耐药基因,如 *PmrA*、*acrB*、*acrD*、*acrF*、*adeG*、*mdsB*、*mexD*、*mexF*、*amrB*、*ceoB*、*smeE*、*mexB*、*adeB*、*adeJ*、*mtrD*、*mexQ*、*acrA*、*acrE*、*macB*、*mdtB*、*mdtC* 等耐药基因。将 HNTL01~HNTL18 特有耐药基因归类统计,结果见表 4。

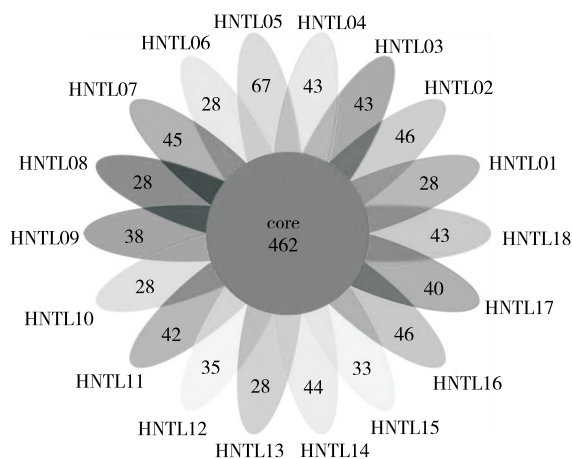


图 4 18 株铜绿假单胞菌耐药基因花瓣图

Figure 4 Flower plot of 18 strains of *Pseudomonas aeruginosa* resistance gene

18 株铜绿假单胞菌均含有 β -内酰胺酶前体和超广谱 β -内酰胺酶 OXA-10 前体相关基因,通过水解抗生素使之失活,从而具有对青霉素、头孢菌素和氨基糖苷类等抗生素的耐药性^[15-16],其中 HNTL15 的相关基因最少,只有 22 个,HNTL05 的最多有 53 个。

氯霉素乙酰基转移酶通过催化氯霉素乙酰化生成不能与细菌核糖体结合的氯霉素-3-乙酸酯,致使氯霉素失活,从而具有耐氯霉素的抗性,HNTL07 没有该基因,因此推测其没有氯霉素的耐药性。

热不稳定延伸因子 EF-Tu 可增强对宿主上皮细胞的黏附^[17],是细菌中最丰富的蛋白质之一,其主要功能是负责蛋白质合成翻译延伸过程中作为氨酰基-tRNA 与核糖体-mRNA 复合物结合的 GTP 酶^[18],在单拷贝直系同源基因进化树同一分支的 HNTL01、HNTL06、HNTL08、HNTL10、HNTL13 都缺失了相关基因,可能会影响相关蛋白质的合成和表达,或许会导致此 5 株菌株的侵袭能力稍逊于其他菌株。

锌、镉、钴或铜会激活转录激活蛋白 CzcR 基因,CzcR 蛋白会促进金属外排泵 CzcCBA 的表达,同时抑制具有孔道活性的外膜蛋白 OprD 的表达,从而抑制亚胺培南特异性进入菌体,即碳青霉烯类抗生素的菌体进入途径。同时,CzcR 作为转录抑制因子会对绿脓菌素的生物合成

表 4 18 株铜绿假单胞菌特有耐药基因分析[†]

Table 4 Analysis of unquedrug resistance gene of 18 strains of *Pseudomonas aeruginosa*

菌株	β -内酰胺酶 前体	延伸因子 Tu(EF-Tu)	β -内酰胺酶 OXA-10 前体	氯霉素乙酰 基转移酶	内膜转运 蛋白 ydhP	转录激活 蛋白 CzcR	转录调节 蛋白 OmpR	二氢蝶酸 合酶(DHPS)
HNTL01	18	0	5	3	1	1	0	0
HNTL02	25	7	11	1	1	1	0	0
HNTL03	25	7	6	2	1	1	1	0
HNTL04	25	7	7	1	1	1	1	0
HNTL05	25	7	28	1	1	1	0	3
HNTL06	18	0	5	3	1	1	0	0
HNTL07	7	7	28	0	1	1	1	0
HNTL08	18	0	5	3	1	1	0	0
HNTL09	18	7	6	4	1	1	1	0
HNTL10	18	0	5	3	1	1	0	0
HNTL11	25	7	4	2	1	1	1	0
HNTL12	18	7	5	3	1	1	0	0
HNTL13	18	0	5	3	1	1	0	0
HNTL14	25	7	6	2	1	0	1	0
HNTL15	18	7	4	1	1	1	1	0
HNTL16	25	7	11	1	1	1	0	0
HNTL17	25	7	4	2	0	1	1	0
HNTL18	25	7	4	2	1	0	1	0

菌株	异胞分化 ATP 结合蛋白 HepA	磷酸调节子转录 调节蛋白 PhoB	DNA 拓扑异构 酶 4 亚基 B	甲苯外排泵周质 连接蛋白 TtgD 前体	二氢叶酸 还原酶 3 型	转录激活蛋白 CzcR&QseB	合计
HNTL01	0	0	0	0	0	0	28
HNTL02	0	0	0	0	0	0	46
HNTL03	0	0	0	0	0	0	43
HNTL04	0	0	0	0	0	0	43
HNTL05	1	0	0	0	0	0	67
HNTL06	0	0	0	0	0	0	28
HNTL07	0	0	0	0	0	0	45
HNTL08	0	0	0	0	0	0	28
HNTL09	0	0	0	0	0	0	38
HNTL10	0	0	0	0	0	0	28
HNTL11	0	1	0	0	0	0	42
HNTL12	0	0	0	0	0	0	35
HNTL13	0	0	0	0	0	0	28
HNTL14	0	0	1	1	0	0	44
HNTL15	0	0	0	0	0	0	33
HNTL16	0	0	0	0	0	0	46
HNTL17	0	0	0	0	0	0	40
HNTL18	0	0	1	0	1	1	43

有负调控作用。HNTL14 和 HNTL18 缺少 *CzcR* 基因，在绿脓菌素测定斜面上有明显的蓝绿色^[19]，推测相比其他能够表达 *CzcR* 蛋白的 16 株铜绿假单胞菌，其对碳青霉烯类(尤其是亚胺培南)更敏感，抗性更弱^[20]。

除 HNTL05 外,17 株菌株均没有二氢蝶酸合酶基

因,其所表达的二氢蝶酸合酶是一种将对氨基苯甲酸合成叶酸的酶^[21],而叶酸是微生物生长所必需的物质,从而可以推测,只有 HNTL05 可以合成叶酸,其余菌株均需要从外界摄入具有生物活性的叶酸;同时因为缺失了此酶,导致磺胺类药物缺失了靶点^[22],17 株菌株对磺胺类

药物的耐药性要强于 HNTL05。

具有耐药基因型 β -内酰胺酶前体 +/OXA-10 precursor +/EF-Tu-/CzcR +/DHPS 的 HNTL06 和 HNTL08 采自怀化麻阳;具有耐药基因型 β -内酰胺酶前体 +/OXA-10 precursor +/EF-Tu +/CzcR +/DHPS 的 HNTL11 和 HNTL12 采自湘西保靖,进化树的遗传距离均相互接近,在地域上也是邻近的,推测可能具有相同的来源。采自邵阳新邵的 HNTL01 和 HNTL02、怀化中方的 HNTL09 和 HNTL10、永州东安的 HNTL13 和 HNTL14 均不在进化树的同一簇上,且在耐药基因数量和种类方面也各有差异,说明同一地域的铜绿假单胞菌存在多样性。

3 结论

研究采集自湖南省 5 市 13 县的桶装水,依据 GB 8538—2016 分离、鉴定出 18 株铜绿假单胞菌,通过全基因组测序、溯源分析,结合毒力基因与耐药基因的差异比较,分析地域与铜绿假单胞菌亲缘远近分布的相关性。结果发现,来自湖南西部的 4 株铜绿假单胞菌同源性较高,初步证实了地域与菌株基因组有相关性;而其他 14 株铜绿假单胞菌在系统进化树、毒力和耐药基因方面均存在明显差异,说明铜绿假单胞菌存在多样性,突变、获得外源基因的能力较强,从基因层面揭示了铜绿假单胞菌可能存在的致病风险和耐药特性。后续将进一步丰富样本量,采集其他地域样本;与湖南省内临床机构合作,研究食源性、医源性铜绿假单胞菌的同源性、致病基因与耐药基因,探索病从口入的完整传染链。

参考文献

- [1] 梁小兵, 庄汉澜, 周洁, 等. 铜绿假单胞菌外毒素 A 的生产、分离纯化和鉴定[J]. 生物技术通讯, 2000, 11(2): 107-114.
LIANG X B, ZHUANG H L, ZHOU J, et al. Production purification and characterization of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Letters in Biotechnology, 2000, 11(2): 107-114.
- [2] 田国梁, 雷柳冰, 李发俊, 等. 包装饮用水中检出铜绿假单胞菌的同源性分析[J]. 标准科学, 2022(5): 128-134.
TIAN G L, LEI L B, LI F J, et al. Homology analysis of *Pseudomonas Aeruginosa* detected in packaged drinking water[J]. Standard Science, 2022(5): 128-134.
- [3] CRAIG L, FOREST K T, MAIER B. Type IVpili: Dynamics, biophysics and functional consequences [J]. Nat Rev Microbiol, 2019, 17: 429-440.
- [4] DE SOUSA T, HÉBRAUD M, DAPKEVICIUS M L N E, et al. Genomic and metabolic characteristics of the pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(23): 12892.
- [5] KARASH S, NORDELL R, OZER E A, et al. Genome sequences of two *Pseudomonas aeruginosa* isolates with defects in type III secretion system gene expression from a chronic ankle wound

- infection[J]. Microbiol Spectr, 2021, 9: e0034021.
- [6] ALATRAKTCHI F A, SVENDSEN W E, MOLIN S. Electrochemical detection of pyocyanin as a biomarker for *Pseudomonas aeruginosa*: A focused review[J]. Sensors, 2020, 20: 1-15.
- [7] ARMSTRONG S, MERRILL A R. Toward the elucidation of the catalytic mechanism of the mono-ADP-ribosyltransferase activity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A[J]. Biochemistry, 2004, 43(1): 183-194.
- [8] LUO Q, JIN S G. Molecular determinants in regulating *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system: A review[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(10): 1 413-1 417.
- [9] 类承斌, 晁艳, 孙相红, 等. 铜绿假单胞菌毒力基因检测及临床意义[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(4): 301-303.
LEI C B, CHAO Y, SUN X H, et al. Detection of virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* and its clinical significance[J]. Journal of Clinical Laboratory, 2011, 29(4): 301-303.
- [10] ANDERSSON D J. The biological cost of mutational antibiotic resistance: Any practical conclusion? [J]. Curr Opin Microbiol, 2006, 9(5): 461-465.
- [11] STEVENS T C, OCHOA C D, MORROW K A, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme Y impairs endothelial cell proliferation and vascular repair following lung injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014, 306(10): L915-L924.
- [12] HUGHES K J, EVERISS K D, KOVACH M E, et al. Isolation and characterization of the *Vibrio cholerae* *adA* gene, required for efficient intestinal colonization[J]. Gene, 1995, 156(1): 59-61.
- [13] 陆吉虎, 李瑾年, 张传亮. 病原弧菌毒素共调菌毛研究进展[J]. 动物医学进展, 2007(8): 55-58.
LU J H, LI J N, ZHANG C L. Advance in toxin coregulated pilus of pathogenic vibrio[J]. Advances in Veterinary Medicine, 2007 (8): 55-58.
- [14] 李鑫, 张新创, 谢贵林. 百日咳毒素的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2018, 31(2): 215-219, 224.
LI X, ZHANG X C, XIE G L. Advances in research of pertussis toxin[J]. Chinese Journal of Biologics, 2018, 31(2): 215-219, 224.
- [15] QIN S, XIAO W, ZHOU C, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 199.
- [16] 杨清丽. 泛耐药铜绿假单胞菌对 β 内酰胺类抗生素的耐药机制研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16(74): 31-32.
YANG Q L. Mechanism of resistance of pan-resistant *Pseudomonas aeruginosa* to β -lactam antibiotics[J]. World Latest Medical Information Digest, 2016, 16(74): 31-32.
- [17] KUIPER E G, DEY D, LAMORE P A, et al. Substrate recognition by the *Pseudomonas aeruginosa* EF-Tu-modifying methyltransferase EftM[J]. J Biol Chem, 2019 294(52): 20 109-20 121.

(下转第 61 页)

- 较[J]. 中国油脂, 2008(3): 39-41.
- BAI Y A, SONG D H, ZHANG F Q, et al. Comparison of nutritional value between *Camellia oleifera* seed oil and olive oil[J]. China Oils Fats, 2008(3): 39-41.
- [3] TAI Y L, WEIC L, YANG H, et al. Transcriptomic and phytochemical analysis of the biosynthesis of characteristic constituents in tea (*Camellia sinensis*) compared with oil tea (*Camellia oleifera*) [J]. BMC Plant Biology, 2015, 15(1): 190-202.
- [4] FREEMAN B L, EGGET D L, PARKER T L. Synergistic and antagonistic interactions of phenolic compounds found in navel oranges[J]. Journal of Food Science, 2010, 75(6): C570-C576.
- [5] VERLEYEN T, FORCADES M, VERHE R. Analysis of free and esterified sterols in vegetable oils[J]. Journal of the American Oil Chemists Society, 2002, 79: 117-122.
- [6] 陈铁民, 刘永辉, 温健新, 等. β -谷甾醇对幽门螺杆菌感染性胃炎小鼠炎症影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(23): 2 811-2 815.
- CHEN T M, LIU Y H, WEN J X, et al. Effect of β -sitosterol on inflammation in mice with helicobacter pylori infection gastritis[J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2022, 38 (23): 2 811-2 815.
- [7] 陈元堃, 曾奥, 罗振辉, 等. β -谷甾醇药理作用研究进展[J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(1): 148-153.
- CHEN Y K, ZENG A, LUO Z H, et al. Advances on pharmacology of β -sitosterol[J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2021, 37(1): 148-153.
- [8] 赵海燕, 詹未, 李兵, 等. 超高效液相色谱法同时测定食用植物油中的4种植物甾醇[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(2): 223-226.
- ZHAN H Y, ZHAN W, LI B, et al. Simultaneous determination of four phytosterols in edible vegetable oil by ultra performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2016, 28(2): 223-226.
- [9] 李文. 基于超高效液相色谱的橄榄油中生物活性成分检测方法研究[D]. 杭州: 中国计量大学, 2020: 40-54.
- LI W. Determination of bioactive components in olive oil by ultra high performance liquid chromatography [D]. Hangzhou: China Jiliang University, 2020: 40-54.
- [10] 胡伯凯, 张时馨, 刘亚娜, 等. 贵州茶油气相色谱脂脂肪酸标准指纹图谱构建及其鉴别[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(21): 6 947-6 955.
- HU B K, ZHANG S X, LIU Y N, et al. Construction and identification of gas chromatographic fatty acids standard fingerprint of *Camellia oleifera* seed oil from Guizhou[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2022, 13(21): 6 947-6 955.
- [11] 杜杰, 刘春梅, 林春兰, 等. 气相色谱法测定食用油中的植物甾醇[J]. 中国油脂, 2021, 46(9): 145-148.
- DU J, LIU C M, LIN C L, et al. Determination of phytosterols in edible oil by GC[J]. China Oils Fats, 2021, 46(9): 145-148.
- [12] 黄银波, 花露, 陈君, 等. 气相色谱法测定植物甾醇中 β -谷甾醇、菜油甾醇、豆甾醇、菜籽甾醇的含量[J]. 现代食品, 2021(14): 179-182.
- HUANG Y B, HUA L, CHEN J, et al. Determination of glutosterol, vegetable oil sterol, soybean sterol and canola sterol in phytosterol by gas chromatography[J]. Modern Food, 2021(14): 179-182.
- [13] 王愉宁, 陈军辉, 何秀平, 等. 液相色谱—掺杂辅助大气压光电离子质谱测定海洋沉积物中的植物甾醇[J]. 分析化学, 2021, 49(2): 282-291.
- WAN Y N, CHEN J H, HE X P, et al. Determination of phytosterols in marine sediment by liquid chromatography-dopant-assisted atmospheric pressure photoionization mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2021, 49(2): 282-291.
- [14] 熊小平, 杨明, 樊淑宏, 等. GC-MS法对13种植物油中甾醇和脂肪酸的分布研究[J]. 中国测试, 2019, 45(2): 64-71.
- XIONG X P, YANG M, FAN S H, et al. Research on the distribution of phytosterols and fatty acids in 13 kinds of vegetable oils by GC-MS[J]. China Measurement & Testing Technology, 2019, 45(2): 64-71.
- [15] 陈通, 陈鑫郁, 谷航, 等. 气相离子迁移谱对山茶油掺假的检测[J]. 食品科学, 2019, 40(8): 275-279.
- CHEN T, CHEN X Y, GU H, et al. Detection of adulterated camellia oil using gas chromatography-ion mobility spectrometry [J]. Food Science, 2019, 40(8): 275-279.
- (上接第12页)
- [18] VOORHEES R M, RAMAKRISHNAN V. Structural basis of the translational elongation cycle[J]. Annu Rev Biochem, 2013, 82: 203-236.
- [19] DIEPPOIS G, DUCRET V, CAILLE O, et al. The transcriptional regulator CzcR modulates antibiotic resistance and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e38148.
- [20] 梁文, 李博, 董萌萌, 等. 铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素耐药机制研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(9): 641-646.
- LIANG W, LI B, DONG M M, et al. Research progress of carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2013, 38(9): 641-646.
- [21] JAYARAMAN P, SAKHARKAR K R, DANIEL L C, et al. Hybrid-drug design targeting *Pseudomonas aeruginosa* dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase[J]. Front Biosci (Elite Ed), 2013, 5(3): 864-882.
- [22] 褚海青, 李惠萍, 何国钧. 铜绿假单胞菌的耐药机制[J]. 中国抗感染化疗杂志, 2003(1): 54-57.
- CHU H Q, LI H P, HE G J. Drug resistance mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Chinese Journal of Anti-Infective Chemotherapy, 2003(1): 54-57.