

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250308002

引用格式: 李娟, 黄梨煜, 孟璐璐, 等. 2024年北京市部分市售生食果蔬中潜在致病菌及耐药基因的特征研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(14): 1-9.

LI J, HUANG LY, MENG LL, *et al.* Study on the characterization of potential pathogen and antibiotic resistance genes from some commercially raw fruit and vegetables in Beijing in 2024 [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(14): 1-9. (in Chinese with English abstract).

2024年北京市部分市售生食果蔬中潜在致病菌及耐药基因的特征研究

李娟*, 黄梨煜, 孟璐璐, 陈忠辉

(北京市疾病预防控制中心营养与食品卫生所, 北京 100013)

摘要: **目的** 调研 2024 年北京市部分市售生食果蔬中潜在致病菌及抗生素耐药基因(antibiotic resistance genes, ARGs)的分布特征, 探究其在食品安全领域的潜在风险。**方法** 将高通量定量聚合酶链式反应(high-throughput quantitative polymerase chain reaction, HT-qPCR)技术、16S rRNA 扩增子测序与生物信息学、多元统计学分析技术相结合, 探究果蔬中 ARGs、可移动遗传元件(mobile genetic elements, MGEs)以及潜在致病菌的存在特征及潜在风险。**结果** 共检出 9 大类 182 个 ARGs 和 9 个 MGEs, 丰度范围分别为 $6.08 \times 10^3 \sim 1.57 \times 10^8$ copies/g、 $3.77 \times 10^4 \sim 3.50 \times 10^8$ copies/g; 水果中 ARGs、MGEs 以及菌群多样性和丰度均显著低于蔬菜($P < 0.05$); 不动杆菌属(*Acinetobacter*)、明串球菌属(*Leuconostoc*)、克雷伯杆菌属(*Klebsiella*)、黄单胞菌属(*Stenotrophomonas*)和黏质沙雷氏菌属(*Serratia*)为主要的潜在致病菌; 肠杆菌目(Enterobacterales)和约氏不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*)分别为茄果类蔬菜和叶菜类蔬菜中标志性潜在致病菌; 多元统计分析显示, 果蔬中的多数潜在致病菌同时携带 MGEs 和多种类 ARGs, 很可能具有多重耐药性状, 且耐药性状传播的主要驱动因素为 MGEs 携带 ARGs 发生的水平基因转移(57.56%)。**结论** 本研究揭示了 2024 年北京市部分市售生食果蔬中 ARGs 赋存情况严重, 其中多数潜在致病菌很可能具有多重耐药性状, MGEs 携带多种 ARGs 发生的水平基因转移事件促进了耐药现象的在细菌群落间的广泛传播, 并通过食物链危害人类健康, 应引起高度重视。

关键词: 生食果蔬; 致病菌; 耐药基因; 可移动遗传元件; 细菌群落

Study on the characterization of potential pathogen and antibiotic resistance genes from some commercially raw fruit and vegetables in Beijing in 2024

LI Juan*, HUANG Li-Yu, MENG Lu-Lu, CHEN Zhong-Hui

(Department of Nutrition and Food Hygiene, Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China)

收稿日期: 2025-03-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(21976020, 21607007); 北京市委组织部优秀人才资助项目(2016000021469G182); 北京市疾病预防控制中心科研培育专项(2020-BJYJ-01)

第一作者/*通信作者: 李娟(1982—), 女, 博士, 副研究员, 主要研究方向为微生物耐药、环境污染与食品安全。E-mail: muzijuan82@163.com

ABSTRACT: Objective To investigate the characterization of potential pathogen and antibiotic resistance genes (ARGs) from some commercially raw fruit and vegetables in Beijing, 2024, and explore their potential food safety risks. **Methods** In this study, the characterization and potential risks of ARGs, mobile genetic elements (MGEs) and potential pathogens were described by the combining high-throughput quantitative polymerase chain reaction (HT-qPCR), 16S rRNA amplicon sequencing with bio-informatics and multivariate analysis. **Results** A total of 182 ARGs subtypes belonging to 9 antibiotic types and 9 MGEs subtypes were detected with the abundance of 6.08×10^3 – 1.57×10^8 copies/g and 3.77×10^4 – 3.50×10^8 copies/g, respectively. It was seen that the diversity and abundance of ARGs, MGEs and bacterial community in fruits were significantly lower than those in vegetables ($P < 0.05$). *Acinetobacter*, *Leuconostoc*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas* and *Serratia* were the main potential pathogens, with Enterobacterales and *Acinetobacter johnsonii* as signature potential pathogens in solanaceous and leafy vegetables, respectively. MGEs and multiple ARGs were carried by the most of potential pathogens with multiple antibiotic resistance, whose transmission among them were mainly drove by the horizontal gene transfer of MGEs carrying ARGs (57.56%). **Conclusion** There are various and abundant ARGs and potential pathogens in raw vegetables and fruits in Beijing, 2024, with multiple antibiotic resistance, whose transmission among bacterium are mainly drove by the horizontal gene transfer of MGEs carrying ARGs, which can threaten human health. High attention shall be attached.

KEY WORDS: raw fruit and vegetables; pathogens; antibiotic resistance genes; mobile genetic elements; bacterial community

0 引言

食源性疾病是全球重要的公共卫生与食品安全问题。据统计,全球每年有约 40~60 亿例食源性事件暴发,其中有 70%是由致病菌所引发^[1]。在我国,2011—2020 年累计暴发食源性事件 34558 起^[2],仅 2023 年社区居民常见食源性致病菌发病率就达 18.0%^[3]。有研究证实,这些引发疾病的食源性致病菌很可能与以蔬菜为主的新鲜农产品及其农场环境有关^[4-5]。随着人们对健康、方便饮食的日益追求,生食果蔬越来越受到消费者的青睐,它们通常以未加工的形式售卖,只需简单清洗或去皮,无需经过烹饪、杀菌等加工即可直接食用,极容易引发食源性疾病^[6-7]。国内外已有大量关于食用生食果蔬而引发食源性疾病的报道,如 2014 年美国暴发的毒黄瓜事件,最终证实是由沙门氏菌导致^[8]。在我国,也有从生菜、香菜、折耳根等生食蔬菜中检出沙门氏菌、单核细胞增生李斯特菌、肠聚集黏附性大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌等致病菌的文献报道^[7,9]。

抗生素在治疗细菌感染性疾病方面发挥了不可替代的作用,但近几十年在养殖业等领域的滥用直接导致了动物性食品中致病菌耐药现象的日益增加^[10-11]。同时,养殖动物粪便的外排,能够驱动抗生素耐药基因(antibiotic resistance genes, ARGs)扩散到土壤-植物系统中^[12],并借助质粒、整合子、转座子等可移动遗传元件(mobile genetic elements, MGEs),ARGs 在微生物之间进行水平基因转移(horizontal gene transfer, HGT),进而通过食物链进入人体,逐渐实现从“环境到餐桌”的传递,危害人类健康^[13]。然而,

致病菌一旦捕获 ARGs,就会极大地增加感染性疾病的治疗难度,对人类健康危害巨大。ARGs 作为新型污染物^[14],具有“不易消亡”“可遗传”“可转移”等特性,能够在不同介质的微生物之间传播耐药性状。近几年,ARGs 在多种食品中检出,并导致食源性致病菌多重耐药现象的出现,严重威胁人类健康^[7,10,11,15]。因此,掌握食品安全领域中潜在致病菌及 ARGs 的分布特征,并根据实际情况采取相应的措施,对预防和控制细菌感染性疾病的暴发至关重要。

然而,食源性致病菌的检测多采用传统培养、分离及鉴定方法,操作复杂、费时,需预设检测目标,且绝大部分细菌因不能在实验室条件下进行纯培养而被忽视。随着分子生物学技术的不断发展,高通量测序技术在全面了解食品中潜在致病菌的多样性方面潜力巨大^[16]。本研究试图通过高通量 16S rRNA 基因 Illumina 测序技术,揭示北京市部分市售常见生食果蔬中细菌群落结构及潜在致病菌分布多样性,并结合 ARGs 的分布特征,通过对 ARGs 的水平迁移驱动因素的解析,以及 ARGs 的潜在宿主分析,初步探究生食果蔬中 ARGs 的存在风险,以期完善全国范围内 ARGs 的监测体系,为进一步加强 ARGs 对人类健康的风险评估与控制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品

受试样品为北京市居民餐桌上常见且具有代表性的生食果蔬:根茎类蔬菜(R1 樱桃萝卜、R2 胡萝卜、R3 白萝卜

卜、R4 洋葱)、叶菜类蔬菜(L1 香菜、L2 香葱、L3 紫甘蓝、L4 生菜、L5 白菜)、茄果类蔬菜(S1 西红柿、S2 黄瓜、S3 甜椒)以及水果类(F1 草莓、F2 桃子、F3 苹果、F4 梨)。所有样品分别于 2024 年 1 月、4 月、8 月、10 月,在北京市城中的西城区、城北的昌平区和城南的丰台区等地的多家超市、果蔬市场分散采集获得。以 R1 樱桃萝卜为例,在每次集中采集时间内,将不同售卖地点采集来的样品(每个采样点采集样品约 250 g)用无菌塑料袋密封后置冰上,4 h 内运至实验室 4 °C 冷藏,48 h 内在实验室无菌条件下混合后提取 DNA,依据此方法将 4 次集中采集来的样品的 DNA 进行混合后,命名为 R1 样品。

1.2 试剂与仪器

快速 DNA 提取试剂盒(FastDNA®SPIN kit, 美国 MP 生物医药公司)。

FastPrep-24™快速样品制备仪(美国 MP 生物医药公司); Eppendorf 5425 微量离心机(德国 Eppendorf 公司); NanoDrop™微量紫外-可见分光光度计(北京科尔德科贸有限公司); SmartChip 高通量荧光定量聚合酶链式反应系统(美国 Wafer Gen Biosystems 公司); ME 104E 电子天平(精度 0.1 mg, 瑞士梅特勒托利多公司)。

1.3 方法

1.3.1 DNA 的制备

本研究在实验室无菌条件下,将多地采集的样品同种混合,除去大颗粒污物及不新鲜枝叶等,收集可食部分,用无菌蒸馏水清洗至日常可食用状态,并将样品分割成小块放入料理机匀浆至充分混匀。同一编号的样品做 3 个平行($n=3$)各取 0.5 g,置 FastDNA SPIN kit 试剂盒中的研磨管内,通过 FastPrep-24™快速样品制备仪,以 6.0 m/s 的强度水平振荡研磨 30 s,并参考试剂盒生产商的推荐方法获得 DNA 溶液。

1.3.2 高通量定量聚合酶链式反应分析

本研究将各样品总 DNA 送至安徽微分基因科技有限公司,通过 SmartChip 高通量荧光定量聚合酶链式反应系统进行 296 个基因的高通量定量聚合酶链式反应(high-throughput quantitative polymerase chain reaction, HT-qPCR)分析,其中包括 16S rRNA 内参基因、285 个 ARGs 和 10 个 MGEs 等^[17]。扩增体系(100 nL)为: 1×LightCycler 480 SYBR Green I Master、500 nmol/L each primer、DNA 模板 2 ng/μL。Ct 值为检测基因的荧光信号达到设定的阈值时所需的循环数。参考李娟等^[17]研究中的具体操作,由公式(1)~(3)获得目的基因的相对丰度和绝对丰度。

$$\text{基因的相对拷贝数} = 10^{(31 - Ct) / (10/3)} \quad (1)$$

基因的相对丰度=基因的相对拷贝数/16S rRNA 的相对拷贝数

$$(2)$$

基因的绝对丰度=基因的相对丰度×16S rRNA 的绝对丰度

$$(3)$$

1.3.3 16S rRNA 扩增子测序及潜在致病菌分析

本研究将获得的各样品总 DNA 送往上海美吉生物医药科技有限公司利用 Illumina Nextseq 2000 PE300 平台进行 16S rRNA 扩增、建库和测序,扩增引物: 515FmodF: 5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3'; 806RmodR: 5'-GGACTA CNVGGGTWCTAAT-3', 段长度 291 bp; 体系(20 μL)包含: 5×FastPfu Buffer 4 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, FastPfu DNA polymerase 0.4 μL, 牛血清白蛋白 0.2 μL, 上下游引物各 0.8 μL, DNA 模板 1 μL, 纯水补齐 20 μL; 运行参数: (95 °C, 3 min)+{(95 °C, 30 s)+(55 °C, 30 s)+(72 °C, 1 min)}×30+(72 °C, 10 min)。所得到的双端原始测序序列进一步委托中科院生态环境研究中心用 FASTP、FLASH 和 USEARCH 等软件完成质控、过滤、拼接、降噪和聚类等操作,获得高分辨率扩增子序列变体(amplicon sequence variants, ASVs),并在每个样品的平均序列覆盖度大于 99%的前提下,将所有样本序列数抽平。基于 Ribosomal Database Project (RDP) 数据库对利用 Qiime2 的 classify-sklearn 分类器对 ASVs 进行物种注释,并进行 Alpha 和 Beta 多样性分析。序列原始数据已上传至美国国家生物技术信息中心 SRA 数据库,序列号为 PRJNA1171770。

本研究结合病毒因子数据库 (Virulence Factors Pathogenic Bacteria, VFDB, <http://www.mgc.ac.cn/VFs/>)、病原体宿主相互作用(PHI-base)和潜在人类细菌病原体列表^[18-19],构建了涵盖 1761 种细菌病原体的物种列表作为识别本研究样品中潜在致病菌的数据库,并将过滤后的高质量数据与该数据库进行 Blast 比对。该数据库随 VFDB 和 PHI-base 等的更新而及时补充。

1.4 数据处理

本研究中方差分析及显著差异检验等均由 SPSS 21.0 软件完成,并应用 Origin 2019b 软件绘制所有直方图; Past 4.03 软件进行 Mantel test 分析; 基迪奥平台 (<https://www.omicshare.com/tools/>) 绘制主坐标分析图 (principal component analysis, PCoA); 美吉生物云平台 (<https://cloud.majorbio.com/page/tools/>) 进行细菌群落 Alpha 多样性分析、普鲁克分析和方差分解分析 (variance partitioning analysis, VPA); 生科云平台 (<https://www.bioincloud.tech>) 进行 LEfSe (LDA Effect Size) 分析; 图云云平台 (<http://cloudtutu.com.cn/>) 结合 gephi0.9.2 软件绘制 network 相关性网络分析图。

2 结果与分析

2.1 ARGs、MGEs 多样性及丰度分布

本研究从北京售卖的生食果蔬中共检出 9 大类抗生

素的 182 个 ARGs 和 9 个 MGEs 亚类, 涉及氯霉素类(7 个)、氨基糖苷类(27 个)、β-内酰胺类(39 个)、大环内酯-林可霉素-链阳霉素类(macrolide-lincosamide-streptogramin B, MLSB)(16 个)、磺胺类(6 个)、四环素类(31 个)、万古霉素类(11 个)、多重耐药类(38 个)及其他类(7 个), 以及 7 个转座酶和 2 个整合子, 丰度范围在 $6.08 \times 10^3 \sim 1.57 \times 10^8$ copies/g (ARGs) 和 $3.77 \times 10^4 \sim 3.50 \times 10^8$ copies/g (MGEs)。如图 1 所示, MGEs 的丰度最高; β-内酰胺类、多重耐药类和四环素类其次; 万古霉素类和霉素类最低, 这与本团队前期调研结果^[17]十分相似。说明, 新鲜果蔬中 β-内酰胺类、多重耐药类和四环素类 ARGs 污染较为严重, 与其相对应的耐药现象很可能普遍存在。其中以叶菜类蔬菜中 ARGs 的存在多样性和丰度最高, 其次为茄果类和根茎类蔬菜, 水果类最低(低近 10^2 倍)。茄果类蔬菜中 MGEs 丰度最高, 而部分水果中却并未检出 MGEs, 这可能由水果和蔬菜之间的多种差异所致, 如生长周期、对环境的敏感性以及对 ARGs 等物质的输送机制等, 本研究在前期研究中也发现了类似现象^[17]。

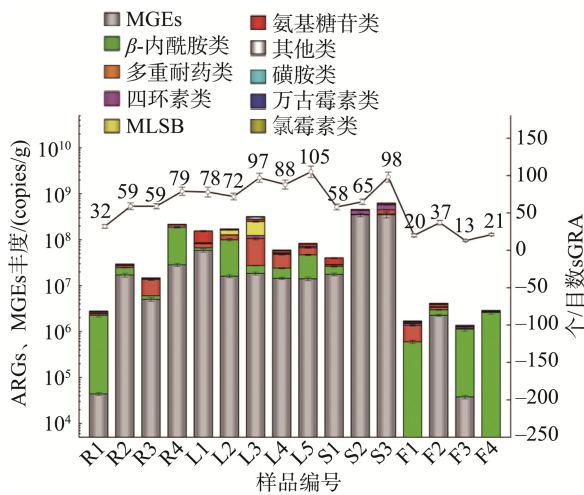


图 1 ARGs、MGEs 多样性及丰度分布
Fig.1 Diversity and abundance distributions of ARGs, MGEs

2.2 细菌群落结构分析

通过高通量测序、质控等处理, 本研究共获得 1005257 个优化序列, 抽平至每个样本 37417 个序列, 经聚类、物种分类学分析共获得细菌界下的 12 个门、28 个纲、54 个目、105 个科、207 个属、306 个菌种。门水平下(图 2), 假单胞菌门(Pseudomonadota)、芽孢杆菌门(Bacillota)和拟杆菌门(Bacteroidota)为本研究样品中的优势类群。这一结果虽不同于前人的调查^[20]。但其中的拟杆菌门为土壤生态系统中的常见菌, 与动植物和人类等多种真核生物宿主密切相关^[21]。属水平下(图 3), 样品中菌属的分布存在差异, 如假单胞菌属(*Pseudomonas*)在香菜(L1)和甜椒(S3)中为优势菌属; 泛菌属(*Pantoea*)在洋葱(R4)、桃子

(F2)、苹果(F3)和梨(F4)中为优势菌属; 而在草莓(F1)和香葱(L2)中葡糖杆菌属(*Gluconobacter*)和魏斯氏菌属(*Weissella*)分别占据优势。这与范梦豪等^[22]对上海市售新鲜蔬菜的调研结果一致。Alpha 多样性指数(Simpson)分析图(图 4)显示, 水果中的细菌多样性显著低于蔬菜 ($P < 0.01$), 而蔬菜中根茎类、茄果类以及叶菜类之间差异并不显著($P > 0.05$)。Beta 多样性分析结果(图 5)也证实了, 水果与蔬菜具有明显差异。为进一步探究构成这种差异的原因, 本研究对 4 类样品进行了 LEfSe 分析(图 6, $P < 0.01$, LDA > 2), 识别出存在丰度具有显著差异的代表性菌种, 如叶菜类蔬菜中的约氏不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*)和水果中的日本葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter japonicus*)。前者为机会性致病菌, 广泛分布于自然环境甚至高抗生素选择压力的临床环境中, 具有较强的生物膜形成能力, 能对多种抗生素耐受而引发感染性疾病^[23]; 后者则是含糖丰富的鲜花、水果中的常见菌^[24]。

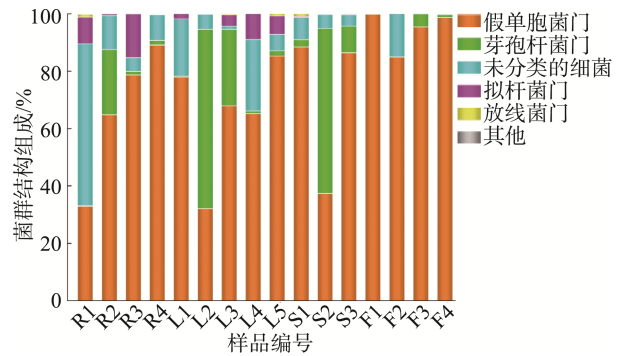


图 2 细菌菌门分布
Fig.2 Bacterial phylum distributions

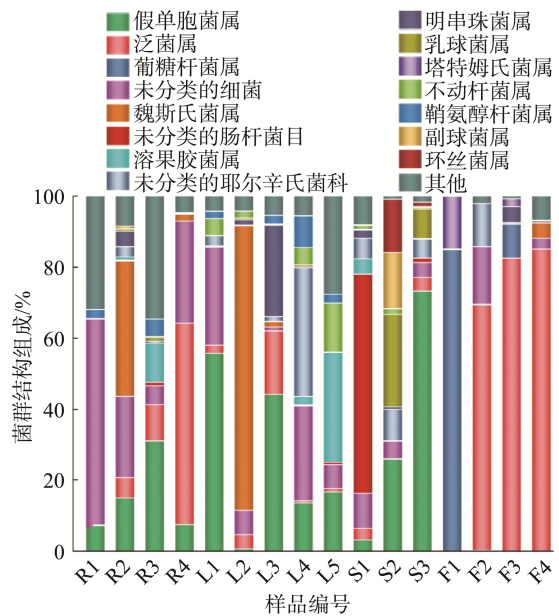
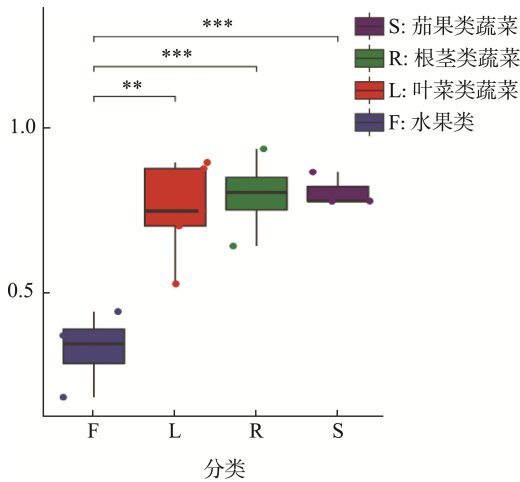


图 3 细菌菌属分布
Fig.3 Bacterial genus distributions



注: *, **, ***分别表示 $0.01 < P < 0.05$ 、 $0.001 < P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 。

图 4 细菌 α 多样性 Simpson 指数对比

Fig.4 Comparison of bacterial alpha-diversity Simpson indices

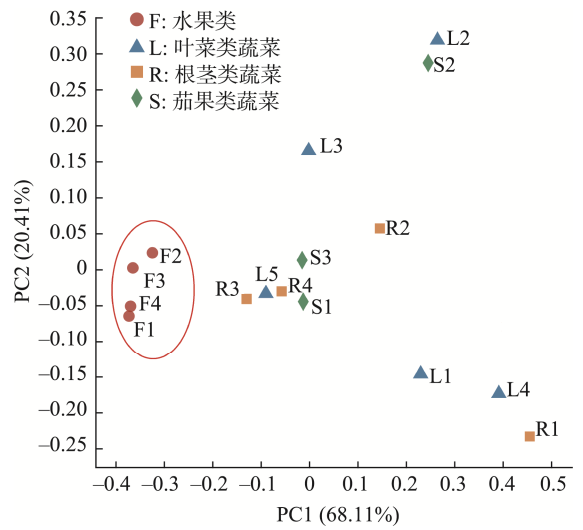


图 5 基于 Bray-Curtis 距离运算的细菌群落结构主坐标分析

Fig.5 Principal coordinate analysis based on the Bray-Curtis distance showing the bacterial communities

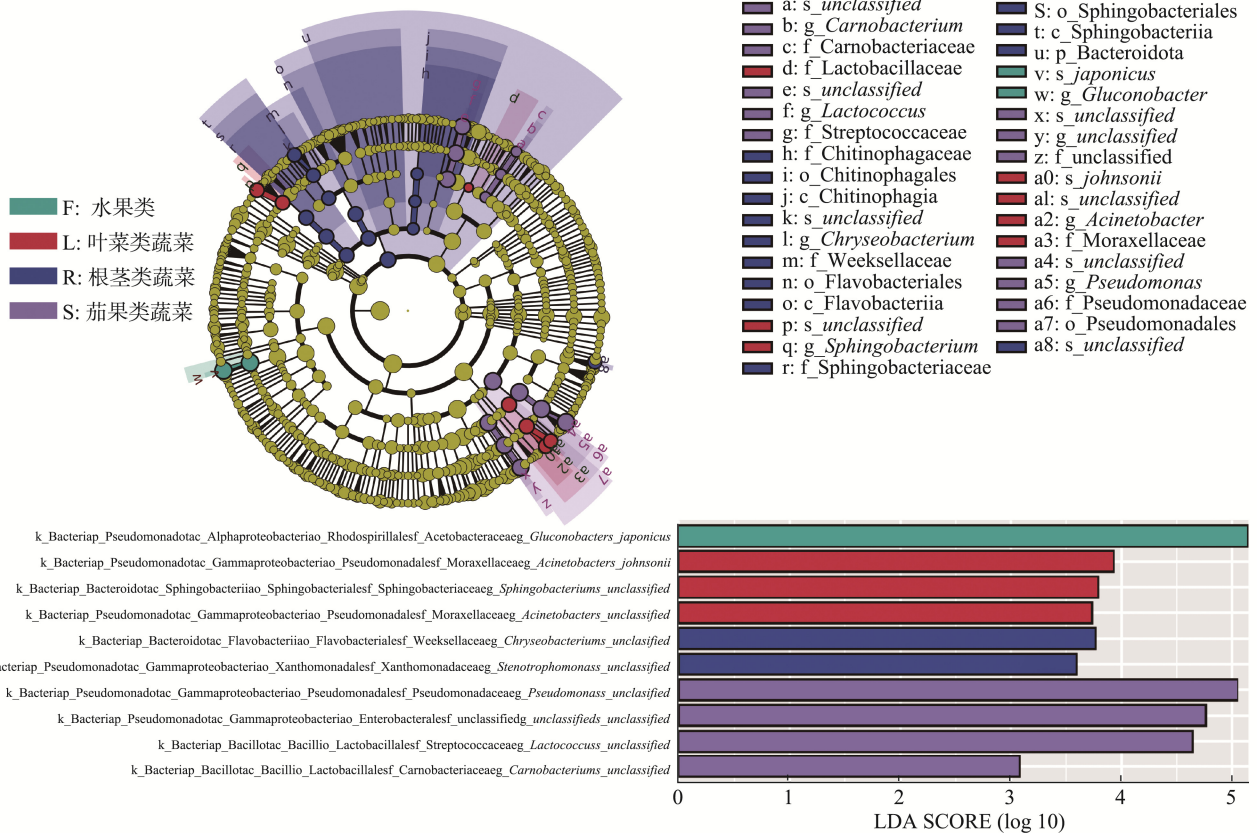


图 6 样品中细菌群落结构的 LefSe 分析 ($P < 0.01$, $LDA > 2$)

Fig.6 LefSe analysis of bacterial community structure in different types of samples ($P < 0.01$, $LDA > 2$)

2.3 潜在致病菌分析

近几年,因食用新鲜蔬菜而导致的食源性疾病越来越频繁,人们逐渐认识到,存在于新鲜蔬菜中的致病菌,已成为公共卫生面临的又一风险^[5]。本研究将抽平后的 598672 个优化序列与构建的细菌病原体物种列表进行比

对发现,共有 8595 个序列确定为潜在致病菌(检出率为 1.44%),涉及 16 个属的 24 个菌种,其中以不动杆菌属(如约氏不动杆菌)、明串球菌属(如肠膜明串球菌 *Leuconostoc mesenteroides*)、克雷伯杆菌属(如解鸟氨酸克雷伯菌 *Klebsiella ornithinolytica*)、黄单胞菌属(如嗜麦芽芽

食单胞菌 *Stenotrophomonas maltophilia*)和黏质沙雷氏菌属(如黏质沙雷氏菌 *Serratia marcescens*)为优势菌属,分别占细菌总数的 9.30%、3.73%、3.57%、2.35%和 1.82%。这些致病菌在临床中都比较常见,如解鸟氨酸克雷伯菌,能够引起患者尿路、呼吸道和血液感染,临床死亡率可达 5%^[25-26];嗜麦芽窄食单胞菌,虽在临床上致病性较弱,但耐药性强,耐药机制复杂,被世界卫生组织列为重要的多重耐药致病菌^[27-28],连续 6 年(2014—2019 年)在全国细菌耐药监测网报道的非发酵革兰氏阴性杆菌总数中的占比均高于 2.1%^[28];黏质沙雷氏菌,不仅可以引起人和动物多种感染性疾病,还会导致植物患病,多重耐药现象普遍,严重威胁免疫力低下人群的健康^[29-30]。

本研究潜在致病菌的分布个体差异明显。其中,白菜(L5)和紫甘蓝(L3)中潜在致病菌最为丰富,分别检出 11 种和 10 种。白菜(L5)中约氏不动杆菌的相对丰度在所有检出的潜在致病菌中最高,占细菌总数的 7.37%;而紫甘蓝(L3)中缺陷短波单胞菌(*Brevundimonas diminuta*)的相对丰度在所有检出的潜在致病菌中最低,仅占细菌总数的 $5.35 \times 10^{-3}\%$ 。图 7 显示,根茎类蔬菜主要以嗜麦芽窄食单胞菌、解鸟氨酸克雷伯菌、约氏不动杆菌、乙酰微小杆菌(*Exiguobacterium acetylicum*)和黏质沙雷氏菌为主;叶菜类蔬菜主要以约氏不动杆菌和黏质沙雷氏菌为主;茄果类蔬菜主要以解鸟氨酸克雷伯菌和蜂房哈夫尼菌(*Hafnia alvei*)为主;水果中主要以抗辐射不动杆菌(*Acinetobacter radioresistens*)、栖稻黄色单胞菌(*Pseudomonas oryzihabitans*)、肠膜明串珠菌和褐色类香菌(*Myroides phaesus*)为主。

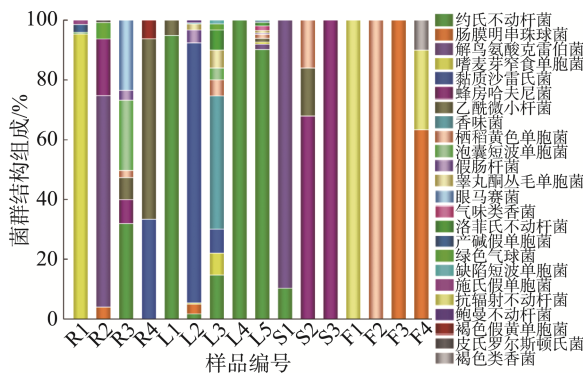


图 7 潜在致病菌分布
Fig.7 Potential pathogen distributions

LEfSe 分析(图 8, $P < 0.01$, $LDA > 2$)显示,肠杆菌目(Enterobacteriales)和约氏不动杆菌分别为茄果类蔬菜和叶菜类蔬菜中具有显著差异的标志性潜在致病菌。但样品中差异标志物分布于不同分类层级,推测其组间差异可能同时涉及广泛微生物类群的整体结构(如肠杆菌目下的群落分布)和特定物种的特异性响应(如约氏不动杆菌的丰度分布)。值得注意的是,本研究样品中肠杆菌目下主要检出了

3 种致病菌,如解鸟氨酸克雷伯菌、黏质沙雷氏菌和蜂房哈夫尼菌。其中,蜂房哈夫尼菌耐受低温,喜欢潮湿的厌氧环境,能够在冷藏食品中大量存在。冷藏状态下,低温抑制了果蔬中大多数细菌的生长,但类似蜂房哈夫尼菌这样的嗜冷菌能够大量繁殖,造成食品腐败变质^[31]。随着蜂房哈夫尼菌在人和动物临床疾病中的分离率越来越高,人们逐渐重视对其致病机制及有效防控方面的研究^[32]。可见,果蔬经过长时间的低温保存,虽然能减缓其腐败,但不能降低其中残留的致病菌对果蔬本身及人类健康的危害。

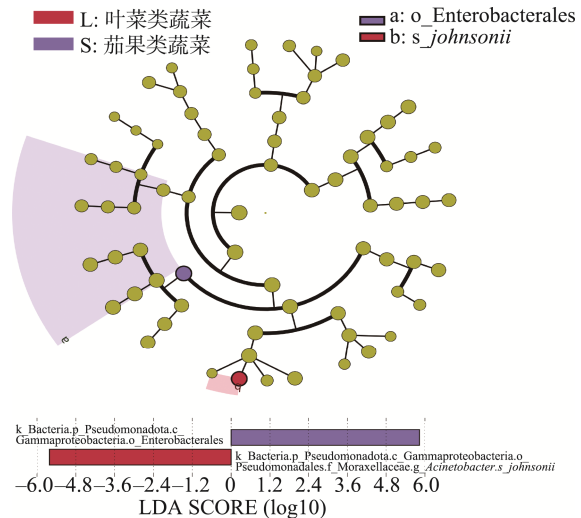
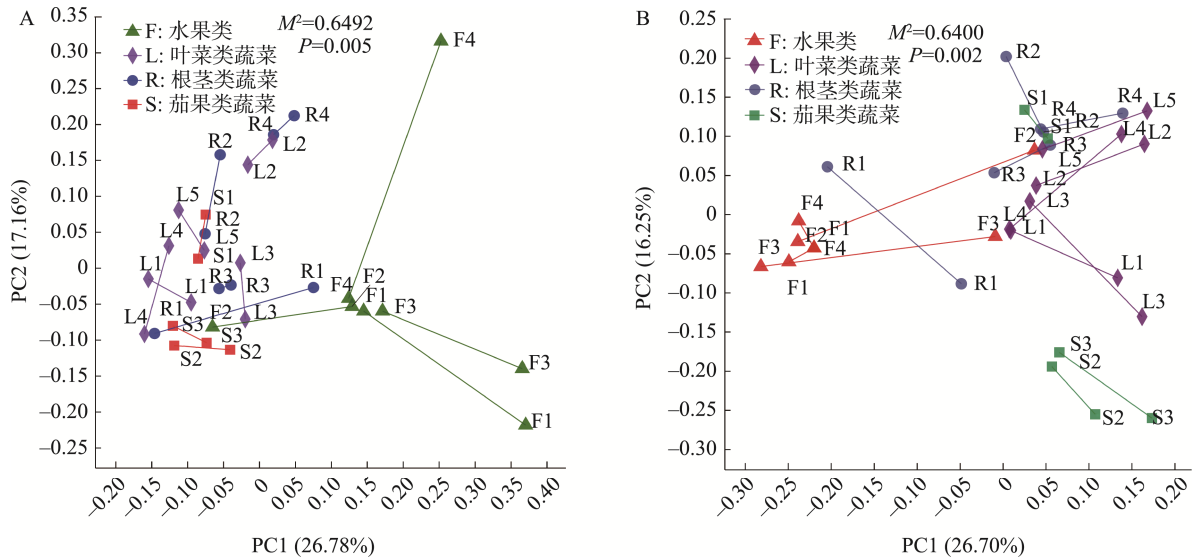


图 8 样品中潜在致病菌的 LEfSe 分析($P < 0.01$, $LDA > 2$)
Fig.8 LEfSe analysis of potential pathogens structure in different types of samples ($P < 0.01$, $LDA > 2$)

2.4 驱动因素分析

本研究通过建立在 Bray-Curtis 距离基础上的 Mantel test 分析和普鲁克分析阐述了菌群结构和 MGEs 存在对于 ARGs 赋存的驱动作用。Mantel test 分析结果显示,样本中 ARGs 的赋存与细菌群落结构(属水平)以及 MGEs 存在均呈显著正相关($R = 0.38$, $P < 0.01$, 蒙特卡洛随机置换次数阈值为 9999)。普鲁克分析(图 9)显示,样本虽未按分类进行聚合,但 ARGs 数据与细菌群落(属水平)和 MGEs 数据之间分别具有一定的拟合度(M^2 分别为 0.6492 和 0.6400, $R = 0.38$, $P < 0.01$, 蒙特卡洛随机置换次数阈值为 9999)。因此,本研究进一步利用方差分解分析(variance partitioning analysis, VPA)对样本中 ARGs 分布的主要驱动因素进行探究。如图 10 所示, MGEs 数据和细菌群落结构(属水平)对 ARGs 赋存的解释度分别为 57.56%和 17.32%,远高于于二者的共同解释度(0.01%),说明 MGEs 为本研究中 ARGs 分布的最主要驱动因素。从以往研究来看,细菌菌群结构、MGEs、环境因子以及金属抗性等因素,都能够在一定程度上影响 ARGs 的分布^[33]。本研究的总解释量为 74.89%,仍有 25.11%未做更深入解释,如食品直接接触的各项环境指标、食品类别等,这些还有待深入探究。



注: A. ARGs 与细菌菌属分布; B. ARGs 与 MGEs 分布。

图 9 普鲁克分析图

Fig.9 Procrustes analysis diagram

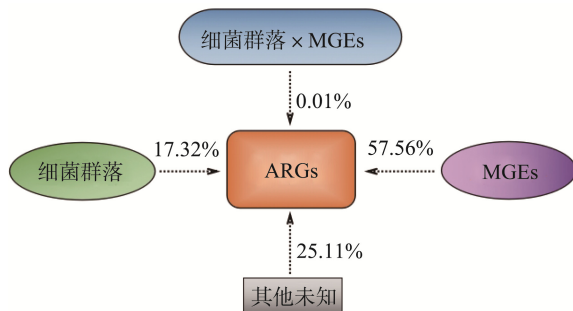
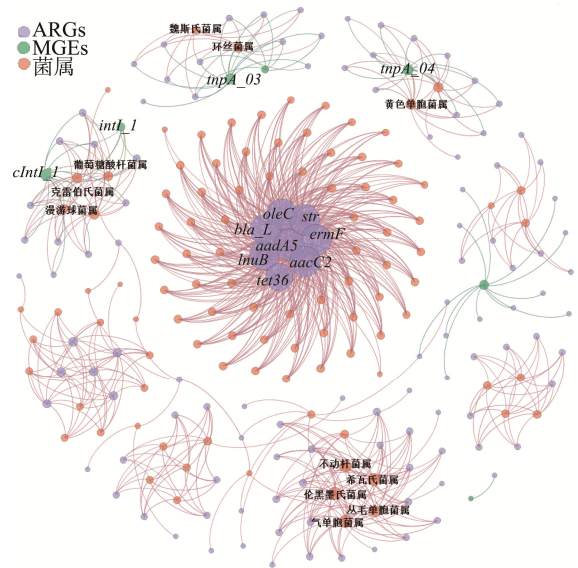


图 10 ARGs 水平转移的驱动因子解释率 VPA

Fig.10 VPA for the forcing of ARGs horizontal gene transfer

2.5 潜在宿主分析

网络分析(network analysis)是一种强大的分析展示工具,可用于识别复杂相互作用中的目标物(如 ARGs、MGEs),快速估算多个样本中目标物的数量,并进一步展示目标物的潜在宿主^[33]。为进一步挖掘本研究样本中 ARGs、MGEs 的潜在宿主,本研究通过基于斯皮尔曼相关性分析基础上的网络分析图对比了 ARGs、MGEs 与 ASVs(属水平)之间的相关性($r \geq 0.8$ 和 $P < 0.01$)。如图 11 所示,构建的关系网络共包含 230 个节点和 877 条边,涵盖 123 个 ARGs、7 个 MGEs 和 105 个菌属,平均度为 7.626,其中节点的半径与携带 ARGs、MGEs 的数量成正比,两个相邻节点之间的连线代表两节点显著正相关($r \geq 0.8$ 和 $P < 0.01$)。其中 *lnuB*、*oleC*、*str*、*aacC2*、*aadA5*、*bla_L*、*tet36*、*ermF* 等 ARGs 的潜在宿主菌数量最多,说明它们在样品的菌群中分布最广;不动杆菌属(*Acinetobacter*)、气单胞菌属(*Aeromonas*)、丛毛单胞菌属(*Comamonas*)、希瓦氏菌属(*Shewanella*)、伦黑墨氏菌属(*Rheinheimera*)、葡萄糖杆菌属(*Glutamicibacter*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、漫



注: 连接线代表 Spearman 相关系数 $r \geq 0.8, P < 0.01$, 节点半径与连接线数据成正比, 下同。

图 11 ARGs、MGEs 与潜在宿主菌的网络分析(属水平)

Fig.11 Network analysis showing the co-occurrence of ARGs, MGEs and their potential hosts bacteria (genus)

游球菌属(*Vagococcus*)、魏斯氏菌属(*Periweissella*)、环丝菌属(*Brochothrix*)、黄色单胞菌属(*Xanthomonas*)等菌属,携带 ARGs 的种类最丰富,涉及多重耐药类、MLSB、 β -内酰胺类、氨基糖苷类和氟喹诺酮类药物等,说明它们很可能具有多重耐药性状;而很多菌属同时携带 ARGs 和 MGEs,例如黄色单胞菌属(*tnpA_04*)、环丝菌属(*tnpA_03*)、克雷伯氏菌属(*cInt1_1* 和 *int1_1*)、葡萄糖酸杆菌属(*cInt1_1* 和 *int1_1*)、漫游球菌属(*cInt1_1*)等,说明以 *tnpA_04*、*tnpA_03*、*cInt1_1* 和 *int1_1* 等为代表的 MGEs 带着插入的 ARGs,在

菌属之间发生水平基因转移事件的机率非常大,在后期基因序列的深入解析过程中,应重点关注。

较非致病菌而言,耐药性致病菌对人类健康构成的危害更大。本研究进一步对 ARGs、MGEs 与潜在致病菌之间进行了共现性网络分析(Spearman, $r \geq 0.8$ 和 $P < 0.01$)。如图 12 所示,构建的关系网络共包含 155 个节点和 291 条边,涵盖 124 个 ARGs、7 个 MGEs 和 24 个潜在致病菌,平均度为 3.755,其中节点的半径与携带 ARGs、MGEs 的数量成正比,两个相邻节点之间的连线代表两节点显著正相关($r \geq 0.8$ 和 $P < 0.01$)。其中约氏不动杆菌、鞣酐丛毛单胞菌(*Comamonas testosteroni*)、气味类香菌(*Myroides odoratus*)、洛菲氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)、缺陷短波单胞菌等潜在致病菌携带丰富的 ARGs,涉及氯霉素类、氨基糖苷类、 β -内酰胺类、多重耐药类、磺胺类、四环素类、万古霉素类等 7 大类。而解鸟氨酸克雷伯菌、蜂房哈夫尼菌和栖稻黄色单胞菌分别作为整合子(*cInt1_1* 和 *int1_1*)、*IS613* 和 *tnpA_04* 的潜在致病菌宿主,并同时携带多种 ARGs。这些菌均属于临床上较常见的机会性致病菌。其中栖稻黄色单胞菌为水果类样品中的主要潜在致病菌之一,而蜂房哈夫尼菌为茄果类蔬菜样品中主要的、且与其他类果蔬之间具有显著性差异的标志性潜在致病菌。

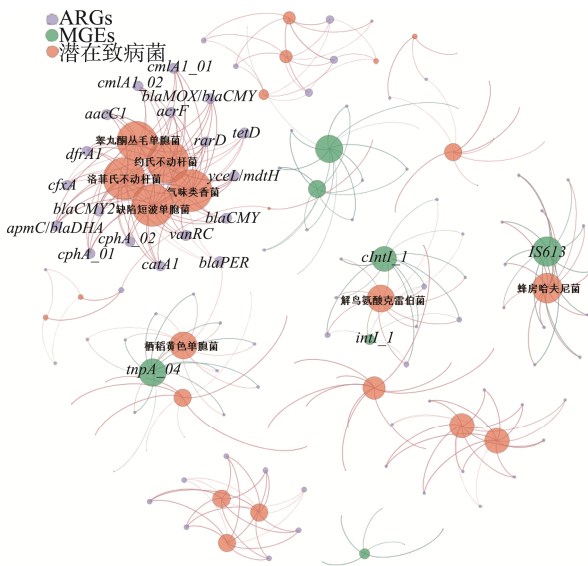


图 12 ARGs、MGEs 与潜在致病菌的网络分析图

Fig.12 Network analysis showing the co-occurrence of ARGs, MGEs and potential pathogens

3 讨论与结论

本研究在市售生食果蔬中检出大量 ARGs 和 MGEs,涉及 9 个抗生素类型,其中以 β -内酰胺类 ARGs 检出率和 MGEs 的存在丰度为最高。果蔬样品中菌群结构多样且存

在丰富的潜在致病菌,以假单胞菌门、芽孢杆菌门和拟杆菌门为优势群落,被检出的潜在致病菌主要属于不动杆菌属、明串球菌属(*Leuconostoc*)、克雷伯杆菌属。果蔬样中 ARGs、MGEs、菌群结构及潜在致病菌分布呈现个体差异,其中叶菜类蔬菜 ARGs 最丰富且丰度最高,茄果类蔬菜中 MGEs 丰度最高,水果中 ARGs 和 MGEs 的多样性和丰度均最低;水果的细菌多样性显著低于蔬菜($P < 0.05$),二者具有显著差异的代表性菌种分别为日本葡萄糖酸杆菌和约氏不动杆菌;茄果类蔬菜中的肠杆菌目和叶菜类蔬菜中的约氏不动杆菌分别为各自的标志性潜在致病菌。潜在致病菌的分布,对于果蔬种类具有一定的倾向性,这可能与果蔬的生长过程、可食部与环境的接触情况以及运输和储存环境等都有关系,具体的影响机制,还有待深入研究。果蔬样品中多数潜在致病菌,可能同时携带多种 ARGs 和 MGEs,具有多重耐药性状,而导致这一现象的主要驱动因素为 MGEs 携带 ARGs 而发生的水平转移,这对耐药性状的广泛传播,甚至“超级细菌”的最终产生起到了促进作用,严重威胁人类健康,应高度重视。

本研究通过数据的获得和深入分析,提示了新鲜果蔬作为 ARGs 及潜在致病菌储库,对食品安全以及人类健康所带来的潜在风险不容忽视。鉴于目前抗生素耐药性问题国际形势严峻,在全球“同一健康”理念的指导下,人们对新型环境污染物——ARGs 的关注,逐渐从“农场”转移到“餐桌”,因此,十分有必要在果蔬的种植、运输、加工、售卖等多环节中,加强对 ARGs 及潜在致病菌的监测,并通过制定合理的政策,精准防控细菌抗生素耐药性状的传播,有效降低由耐药致病菌引发的食源性疾病的发病率,保障人民食品安全、提高人民生活质量。

参考文献

- [1] ABEBE E, GUGSA G, AHMED M. Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens [J]. Journal of Tropical Medicine, 2020: 1–19. DOI: 10.1155/2020/4674235
- [2] 陈婷, 周庆琼, 戚平, 等. 2011—2020 年中国食源性疾病流行病学分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2023, 35(10): 1545–1550. CHEN T, ZHOU QQ, QI P, et al. Epidemiological analysis of foodborne diseases in China from 2011 to 2020 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2023, 35(10): 1545–1550.
- [3] FAN P, HAN H, LIU J, et al. Community incidence estimates of five pathogens based on foodborne diseases active surveillance — China, 2023 [J]. China CDC Weekly, 2024, 6(24): 574–579.
- [4] VAN-OVERBEEK L, DUHAMEL M, AANSTOOT S, et al. Transmission of *Escherichia coli* from manure to root zones of field-grown lettuce and leek plants [J]. Microorganisms, 2021, 9(11): 2289.
- [5] 艾思木巴提·叶尔肯别克, 宋亚琼, 元逢源, 等. 有机肥施用土壤-蔬菜系统中潜在人畜病原菌及其耐药性分析[J]. 生态毒理学报, 2024, 19(5): 50–63. YAISIMUBATI YERKKB, SONG YQ, QI FY, et al. Analysis of potential human and zoonotic pathogens and their resistance to antibiotics in organic fertilizer applied soil vegetable system [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2024, 19(5): 50–63.
- [6] ZHOU S, WEI M, GILES M, et al. Prevalence of antibiotic resistance in

- ready-to-eat salad [J]. *Frontiers in Public Health*, 2020, 8: 92.
- [7] 汤晓召, 陈春燕, 杨菁. 云南省生食蔬菜中致病菌污染状况及其耐药性与分子特征研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2024, 36(5): 569–576.
TANG XZ, CHEN CY, YANG J. Pollution status, drug resistance and molecular characteristics of pathogenic bacteria in raw foodvegetables in Yunnan Province [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2024, 36(5): 569–576.
- [8] BOTTICCHIO L, MEDUS C, SORENSON A, *et al.* Outbreak of *Salmonella oslo* infections linked to persian cucumbers—United States, 2016 [J]. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2016, 65(50S1): 1430–1433.
- [9] 陈培超, 程芳洲, 黄强, 等. 2021—2023 年上海市嘉定区市售食品中金黄色葡萄球菌污染情况[J]. *上海预防医学*, 2024, 36(7): 644–649.
CHEN PC, CHENG FZ, HUANG Q, *et al.* Contamination of *Staphylococcus aureus* in food sold in Jiading District, Shanghai from 2021 to 2023 [J]. *Shanghai Journal of Preventive Medicine*, 2024, 36(7): 644–649.
- [10] 阙凤霞, 韩东方, 钟海明, 等. 2019—2022 年金山区肉类食源性致病菌污染监测分析[J]. *医学动物防制*, 2025, 41(3): 299–303.
QUE FX, HAN DF, ZHONG HM, *et al.* Monitoring and analysis of foodborne pathogens contamination in meat in Jinshan District from 2019 to 2022 [J]. *Journal of Medical Pest Control*, 2025, 41(3): 299–303.
- [11] 杨菁, 罗荣爱, 马妮, 等. 云南省熟肉制品中沙门氏菌、致泻大肠埃希氏菌污染状况调查[J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2024, 47(5): 463–467.
YANG J, LUO RAI, MA N, *et al.* Investigation on the pollution status of *Salmonella* and *Escherichia coli* in cooked meat products in Yunnan Province [J]. *Chinese Frontier Health Quarantine*, 2024, 47(5): 463–467.
- [12] WEN X, XU J, WANG Y, *et al.* Community coalescence and plant host filtering determine the spread of tetracycline resistance genes from pig manure into the microbiome continuum of the soil-plant system [J]. *Microbiological Research*, 2024, 284: 127734.
- [13] YUAN M, HUANG Z, MALAKAR PK, *et al.* Antimicrobial resistomes in food chain microbiomes [J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2024, 64(20): 6953–6974.
- [14] PRUDEN A, PEI R, STORTEBOOM H, *et al.* Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in northern colorado [J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(23): 7445–7450.
- [15] 全菲, 付诗琪, 康颖, 等. 北京市某区 2021 年 5—9 月生鲜蔬菜中蜡样芽孢杆菌检出情况和耐药特征分析[J]. *中国食品卫生杂志*, 2024, 36(1): 15–20.
QUAN F, FU SQ, KANG Y, *et al.* Contamination and drug resistance characteristics of *Bacillus cereus* isolated from raw vegetable from May to September 2021 in a district in Beijing [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2024, 36(1): 15–20.
- [16] 张星星, 高红霞, 石晓辉, 等. 高通量测序技术在食品微生物检测中的应用探讨[J]. *中外食品工业*, 2023(9): 70–72.
ZHANG XX, GAO HX, SHI XH, *et al.* Discussion on the application of high-throughput sequencing technology in food microbial detection [J]. *Chinese and Foreign Food Industry*, 2023(9): 70–72.
- [17] 李娟, 陈忠辉, 段佳丽. 北京市售生食果蔬中耐药基因赋存特征及迁移风险[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(18): 219–230.
LI J, CHEN ZH, DUAN JL. Characterization and transfer risk of antibiotic resistance genes from commercially raw vegetables and fruits in Beijing [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2024, 15(18): 219–230.
- [18] BARTLETT A, PADFIELD D, LEAR L, *et al.* A comprehensive list of bacterial pathogens infecting humans [J]. *Microbiology*, 2022, 168(12): 001269.
- [19] URBAN M, CUZICK A, SEAGER J, *et al.* PHI-base: The pathogen–host interactions database [J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(D1): D613–D620.
- [20] YIN Y, ZHU D, YANG G, *et al.* Diverse antibiotic resistance genes and potential pathogens inhabit in the phyllosphere of fresh vegetables [J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 815: 152851.
- [21] PAN X, RAAIJMAKERS J, CARRIÓN V. Importance of *Bacteroidetes* in host-microbe interactions and ecosystem functioning [J]. *Trends in Microbiology*, 2023, 31(9): 959–971.
- [22] 范梦豪, 朱盼盼, 苏炳棋, 等. 五种鲜切蔬菜冷藏过程中的微生物多样性[J]. *食品与发酵工业*, 2025, 51(2): 242–248.
FAN MH, ZHU PP, SU BQ, *et al.* Microbial diversity in five fresh-cut vegetables during low-temperature storage [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2025, 51(2): 242–248.
- [23] 贾佳. 约氏不动杆菌(*Acinetobacter johnsonii*)耐药性策略及环境适应性机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2022.
JIA J. Antibiotic resistance strategy and environmental adaptation mechanism of *Acinetobacter johnsonii* [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2022.
- [24] 刘宇鹏, 李华, 肖延铭, 等. 一种用日本葡萄糖酸杆菌菌株 HD1025 生产二羟基丙酮的方法: 中国, CN201811353424.0[P]. 2020-04-03.
LIU YP, LI H, XIAO YM, *et al.* A method for producing dihydroxyacetone using *Gluconobacter japonicum* strain HD1025: China, CN201811353424.0 [P]. 2020-04-03.
- [25] HAJJAR R, AMBARAGHASSI G, SEBAJANG H, *et al.* *Raoultella ornithinolytica*: Emergence and resistance [J]. *Infection and Drug Resistance*, 2020, 13: 1091–1104.
- [26] ASSADI RA, ALAWADHI HA, HASSON N, *et al.* Fatal case of sepsis caused by *Raoultella ornithinolytica*: A rare opportunistic pathogen [J]. *IDCases*, 2025, 39: e2156.
- [27] RIVERA J, VALERDI-NEGREROS JC, VAZQUEZ-ENCISO DM, *et al.* Phylogenomic, structural, and cell biological analyses reveal that *Stenotrophomonas maltophilia* replicates in acidified Rab7A-positive vacuoles of *Acanthamoeba castellanii* [J]. *Microbiology Spectrum*, 2024, 12(3): e298823.
- [28] 董星. 某三甲医院嗜麦芽芽孢单胞菌的临床分布与该菌依赖 *smeE* 基因耐药的初步研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2024.
DONG X. Clinical distribution of *Stenotrophomonas maltophilia* in a third class hospital and preliminary study on its antimicrobial resistance that is dependent on *smeE* gene [D]. Shijiazhuang: Hebei Medical University, 2024.
- [29] 莫晓欣. 粘质沙雷氏菌 *KdpD* 基因的敲除及对菌株生理生化表型的影响[D]. 重庆: 西南大学, 2024.
MO XX. Deletion of *Serratia marcescens KdpD* gene and its impact on phenotype [D]. Chongqing: Southwest University, 2024
- [30] 李瑾, 张秀月. 某大型综合性三级甲等医院 2017—2023 年黏质沙雷菌的流行病学特征及耐药性[J]. *中国感染控制杂志*, 2025, 24(1): 52–57.
LI J, ZHANG XY. Epidemiological characteristics and antimicrobial resistance of *Serratia marcescens* in a large general tertiary first-class hospital from 2017 to 2023 [J]. *Chinese Journal of Infection Control*, 2025, 24(1): 52–57.
- [31] 杨军. 抗蜂房哈夫尼菌卵黄抗体的制备及其特性研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2021.
YANG J. Production and features of egg yolk IgY against *Hafnia alvei* [D]. Chongqing: Chongqing University, 2021.
- [32] 宋健. 虹鳟源蜂房哈夫尼菌的鉴定及其致病性研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2023.
SONG J. Identification and pathogenicity study of *Hafnia alvei* from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2023.
- [33] ZHANG J, SUI Q, TONG J, *et al.* Soil types influence the fate of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes following the land application of sludge composts [J]. *Environment International*, 2018, 118: 34–43.

(责任编辑: 韩晓红 安香玉)