

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2014.12.003

四环素类药物酶修饰基因-*tet(X)* 的起源、分布 及在环境中的作用*

田 哲 张 昱** 杨 敏

(中国科学院生态环境研究中心, 环境水质学国家重点实验室, 北京, 100085)

摘 要 抗性基因作为一类严重威胁人类健康和生命安全的新型环境污染物, 近年来引起了广泛的关注. 四环素类抗性基因是环境和临床上研究得最多的一大类抗性基因, 目前已报道的相关基因共有 44 种, 包含泵出、核糖体保护和酶修饰 3 种主要机制. 相对于前两种机制, 酶修饰机制关注得不多. *tet(X)* 是唯一一种研究较为透彻的酶修饰基因, 它编码的蛋白可化学修饰和降解四环素, 广泛存在于各种环境介质中, 对临床耐药性的发展具有一定的贡献. 本文综述了 *tet(X)* 基因的研究进展, 指出有必要重新认识 *tet(X)* 对环境中四环素类生物降解的贡献及其对于细菌四环素耐药性发展的重要性, 并对 *tet(X)* 的未来研究方向进行了展望.

关键词 四环素类抗生素, 四环素抗性基因, *tet(X)*, 酶修饰, 降解.

The origin, environmental distribution and potential application of tetracycline resistance gene-*tet(X)*

TIAN Zhe ZHANG Yu** YANG Min

(State key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences,
Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100085, China)

Abstract: The mass production and use of tetracycline antibiotics accelerate the development of tetracycline resistance genes (TRGs), which shade health risks to humans and animals. Among the known 44 TRGs, *tet(X)*, one of the two enzymatic modification genes, was found to be widely present in various environmental media, and has certain contribution to the antibiotic resistance of clinical isolates in recent years. However, this gene received little attention. This article reviews the research advances of *tet(X)* gene, including its degradation mechanism for TCs, environmental distribution and potential utilization in biodegradation and risk control. The prospects on the research of *tet(X)* are also presented.

Keywords: tetracycline antibiotics, tetracycline resistance genes, *tet(X)*, enzymatic modification, biodegradation.

四环素类抗生素(TCs)是一类广谱抗生素(主要类型的分子结构见表1),对革兰氏阳性、阴性菌、衣原体、支原体和恶性疟原虫等均有较好的抑菌作用^[1],广泛应用于人和家畜的细菌感染预防及治疗,并且因低剂量四环素对动物的生长具有促进作用也大量用于农业及水产养殖业^[1-2].据统计,欧盟每年的抗生素消耗量达5000吨,其中四环素类抗生素用量达2500吨^[3];2005至2010年间,日本的兽用抗生素中,四环素类用量约占到总使用量的一半^[4];四环素类抗生素也是我国畜禽饲养业中使用量最大的一类抗生素^[5].

2014年2月20日收稿

* 国家自然科学基金项目(21277162)和科技部中日合作课题(2013DFG50150)资助.

** 通讯联系人, Tel: 86-10-62849372; E-mail: zhangyu@rcees.ac.cn

由于吸收率较低,服用后大量 TCs 以母体或活性代谢物的形式随尿液和粪便进入环境^[6],使得医疗和畜禽养殖废水、废物成为 TCs 进入环境的重要点源.同时,中国是四环素类抗生素生产大国,如2003 年我国土霉素的产量占到世界总产量的 65%,强力霉素产量排在世界第一位^[7-8].由于抗生素发酵生产过程工艺复杂、抗生素提取效率低,生产废水中含有高水平抗生素残留,使得抗生素生产废水成为其进入环境中的另一重要来源^[9].Li 等^[9]发现在土霉素生产废水生物处理系统出水中,土霉素浓度 ($19.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)甚至高于细菌对 TCs 敏感性测试的抗性折点值 ($16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)^[10].

表 1 主要的四环素类抗生素分子结构(A)及其编号方法(B)

Table 1 Structure (A) and nomenclature (B) of tetracyclines

基本结构	A			B	
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
	H	OH	CH ₃	H	H
四环素	H	OH	CH ₃	H	H
金霉素	Cl	OH	CH ₃	H	H
土霉素	H	OH	CH ₃	OH	H
强力霉素	H	H	CH ₃	OH	H
米诺环素	(CH ₃) ₂ N	H	H	H	H
替加环素	(CH ₃) ₂ N	H	H	H	(CH ₃) ₃ C-NH-CH ₂ -CO-NH

四环素类抗生素的大量使用和排放促进了四环素抗性菌和抗性基因(tetracycline resistance genes, TRGs)的发展.在四环素投入使用之前的 1917—1954 年间,Murray 收集到的 433 株肠杆菌科细菌中仅有 2%具有四环素抗性^[11],而 20 世纪 40 年代末四环素投入使用之后,土壤中四环素抗性基因的丰度显著增加^[12].目前四环素抗性菌已被作为德尔文察河自然保护区(波兰)水体细菌耐药性发展的指示因子^[13],而 TRGs 作为细菌表达四环素耐药性的主要机制,在土壤^[12]、动植物体^[14]、食物^[15]、空气^[16]、河流^[17]、海洋^[18-19]甚至地下水^[20]等各种环境介质中广泛检出,TRGs 可在环境微生物和病原微生物之间进行传播,最终对人类的健康产生威胁^[12,21].

目前已报道的 TRGs 有 44 种^[22-23].根据作用机理主要分为 3 类:外排泵基因(*tet* (A—E)、*tet* (G)、*tet* (H)、*tet* (J)、*otr* (B)等)、核糖体保护基因(*tet* (M)、*tet* (O)、*tet* (S)、*otr* (A)等)和酶修饰基因^[24].关于外排泵基因和核糖体保护基因的作用机理、环境分布和抗性贡献目前已有大量的报道,但两者均为微生物自我保护机制,没有真正降低环境中四环素含量,而酶修饰基因可编码合成氧化还原酶化学修饰四环素使其失活,是环境中四环素类药物降解的主要机制之一.目前已确认具有酶修饰作用的抗性基因仅有两种^[24-25],而 *tet* (X)是唯一一种研究较为透彻的可使四环素结构发生变化的四环素抗性基因.2007 年之前 *tet* (X)基因仅发现存在于专性厌氧的拟杆菌属(*Bacteroides* spp.)中,但其编码蛋白 TetX 只有在有 O₂存在的情况下才能发挥作用,因此许多学者认为它对环境中四环素类抗生素的降解及抗性发展贡献较小并缺乏临床意义^[1,26].但随后有人从土壤环境中分离出 *tet* (X)的好氧宿主菌^[26].同时,*tet* (X)也在城市污水厂活性污泥等各种环境介质中被频繁检出^[28].最近,欧洲和塞拉利昂的临床菌耐药性筛查工作发现,多种(好氧或厌氧)病原菌,如 *Klebsiella pneumoniae*、*Bacteroides fragilis* 和 *Escherichia coli* 等均含有 *tet* (X)或其同源基因^[29-30].同时,第三代四环素——替加环素已在美国和欧洲获得许可投入使用^[31],它可克服外排泵和核糖体保护机制介导的四环素抗性^[26,32-33],但含有 *tet* (X)基因的宿主菌仍具有抗性^[34],因此替加环素在全球的推广使用可能会加大 *tet* (X)的选择压力,进一步促进其扩散.

上述研究进展表明,有必要重新认识 *tet* (X)在环境中四环素类生物降解中的贡献及其对于细菌四环素耐药性发展的重要性.目前已有大量关于 *tet* (X)作用机理和环境分布的研究,但相关综述还未见报道.本文从介绍 *tet* (X)的发现历程入手,着重介绍了其作用机理、环境分布及四环素生物降解作用的应用潜力及风险控制.

1 *tet(X)*的发现与命名

Guiney 等^[35]研究拟杆菌属细菌的氯洁霉素抗性时,在其结合性质粒 pBF4 上发现了一个新的四环素抗性基因,同时在拟杆菌属的另外一个质粒 pCP1(也被叫做 pBFTM10)^[35-36]上也发现了类似的抗性基因.该基因转入大肠杆菌后,可使好氧生长条件下的大肠杆菌表达四环素抗性,但厌氧生长条件下的细胞却无法表达抗性,同样该基因也无法使其宿主菌(专性厌氧菌)产生四环素抗性^[35].利用 Tn5 插入突变方法,Mathews 和 Guiney^[37]发现上述四环素抗性基因长度为 1 kb,存在于质粒 pCP1 上的转座子 Tn4400 及 pBF4 上的转座子 Tn4351 中^[38-41],两转座子有超过 90% 的碱基序列相同^[42].同时,Guiney 等^[35,43]发现 Tn4400 与 Tn4351 上的新抗性基因与当时已知的四环素抗性基因不具有同源性,而将其命名为 *Tc^r.Speer 等^[44]发现含有 *Tc^r 基因(取自转座子 Tn4351)的大肠杆菌可使添加四环素的培养基解毒.Park 等^[45-46]发现转座子 Tn4400 上的 *Tc^r 也可以使四环素解毒,并且含有该转座子的大肠杆菌可表现出能量依赖的四环素外排机制,虽然与 *tet(C)* 相比 Tn4400 上的 *Tc^r 表达的泵出活性较低,但 Park 认为该 *Tc^r 是一种新的四环素外排基因,并以此命名该基因为 *tet(F)*.此后,Speer 等^[47]证明 *Tc^r 表达的四环素抗性机理为其编码的蛋白化学修饰四环素分子使其失活,这也是关于通过化学修饰改变四环素分子结构使其失活的抗性机理的第一次报道.随后 Speer 等^[48]考察了外排机制对 Tn4351 和 Tn4400 四环素抗性的贡献大小,发现 Tn4351 中不含有外排泵基因,而 Tn4400 上的外排泵基因对其介导的四环素抗性没有任何贡献.因此 Speer 等^[47-48]将其更名为 X 组四环素抗性基因(class X, *tet(X)*).

2 作用机制

tet(X) 可编码合成一个含有 388 个氨基酸、分子量为 43.7 kDa 的蛋白(TetX),其氨基端氨基酸序列与许多依赖 NAD(P) 的氧化还原酶相似^[44,49].TetX 含有一种黄素辅酶,即黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD),FAD 与 TetX 的化学计量比随酶提取批次不同有所差异,最小约为 0.6,最大可超过 0.8,并且外源添加 FAD 可增加 TetX 的稳定性^[50].TetX 在厌氧条件下也可被合成,但只有在 NADPH 和 O₂ 同时存在时才表达四环素降解特性,并且在 pH 8.5 时该酶的活性最高^[44,50].TetX 主要作用于四环素的芳基-β-二酮羧基区域(C₁₁羰基, C₁₂烯醇式结构),化学修饰作用一步完成,并只形成一个主要降解产物^[47,50].Park 等^[45]计算得出 TetX 灭活四环素的初始反应速率为 0.7 μg 四环素·h⁻¹·10⁻⁸ 个细胞.Yang 等^[50]以土霉素作为模式反应物,使用高效液相色谱分析其降解过程,发现随着土霉素特征吸收峰的减小,立即出现产物 P1 对应的吸收峰,10 min 后又出现一个新的产物 P2 吸收峰,P1、P2 随着土霉素降解过程进行的先后出现,表明 P2 是由 P1 转化而来.后续实验进一步证明,P1 转化为 P2 并不是一个酶促反应,可在中性条件下快速进行,P2 又可自发分解为多种小分子量物质,最终使培养液呈褐色并出现黑色沉淀^[45,47-48].随后,Yang 等^[50]测得 P1 的分子量为 477.15 Da,比土霉素(461 Da)大 16 Da,说明 P1 是土霉素的单加氧产物,表明 TetX 是一种单加氧酶.综上所述,TetX 降解土霉素的作用机制可以描述如下:首先 TetX 的辅酶 FAD 被 NADPH 还原为 FADH₂,由此形成的异咯嗪结构(位于 FADH₂上)与 O₂ 反应生成活性 FAD-4α-氢过氧化物(FAD-4α-hydroperoxide),该过氧化物通过环氧化作用于 C_{11α} 和 C₁₂ 间的烯醇式双键,导致 C_{11α}、C₁₂ 间形成一种 α-羟基酮结构,使 C_{11α} 被羟基化,并且由于 C_{11α} 处无 H 可脱除,C_{11α}、C₁₂ 间无法再恢复到原来的烯醇式结构,使得 C₁₂ 处出现新的羰基,它和 C₆ 羟基迅速发生分子内环化反应,形成 6,12-半酮缩醛结构产物(P1),P1 又经过一系列非酶促反应而转化为多种物质,使四环素失活.降解过程见图 1.

基因调控方面,Speer 等^[49]发现 Tn4400 和 Tn4351 上的 *tet(X)* 基因在编码区碱基序列完全相同,唯一的差异在于 Tn4351 和 Tn4400 在 *tet(X)* 编码区上游 350 bp 处有 4 个碱基不同,删除 Tn4351 中上述 4 个碱基中的 2 个可导致其 TetX-LacZ 融合蛋白活性降低 3 倍.据此 Speer 认为 Tn4351 中上述 4 个碱基的变化在 *tet(X)* 基因上游产生了一个活性更强的启动子,从而促进了 *tet(X)* 基因的表达.

3 替加环素抗性

替加环素(Tigecycline)是惠氏公司研发的第三代四环素(分子结构见表 1),2005 年取得美国食品与药物管理局授权进入美国市场.它专门针对外排泵和核糖体保护抗性机制设计,可消除两种机制介导

的四环素抗性^[26,32-33],对多种多重耐药菌如耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(MRSA)和表达新德里金属 β -内酰胺酶1基因(NDM-1)的“超级细菌”肠杆菌均具有良好抑制效果^[33,51].但替加环素仍是TetX的作用底物,Moore等^[34]研究发现TetX在有O₂和NADPH存在的情况下可使替加环素11 α 位羟基化,虽因其C₆位无羟基不会发生分子内环化形成半酮缩醛结构而被进一步降解,但羟基化替加环素与核糖体结合能力减弱(解离常数增大2倍多),不会抑制细胞内蛋白质的合成.替加环素在临床上的广泛应用增大了四环素抗性菌的选择压力,使含tet(X)及其相似基因的菌株取得更大生存优势,如在近期欧洲的拟杆菌属细菌耐药性调查和厌氧菌替加环素抗性调查中即首次筛得多株含有tet(X)或tet(X1)基因的临床抗性菌(表2),它们均具有较高的替加环素抗性^[30,52].替加环素通过静脉注射进入人体后,超过90%会以母体(主要形态)和活性代谢产物的形式由尿液和粪便排出体外^[53],并最终通过污水处理设施进入各种环境介质.因此,随着替加环素在全球的推广使用,未来在临床及更广泛的环境介质中tet(X)的检出频率有可能会显著增加.

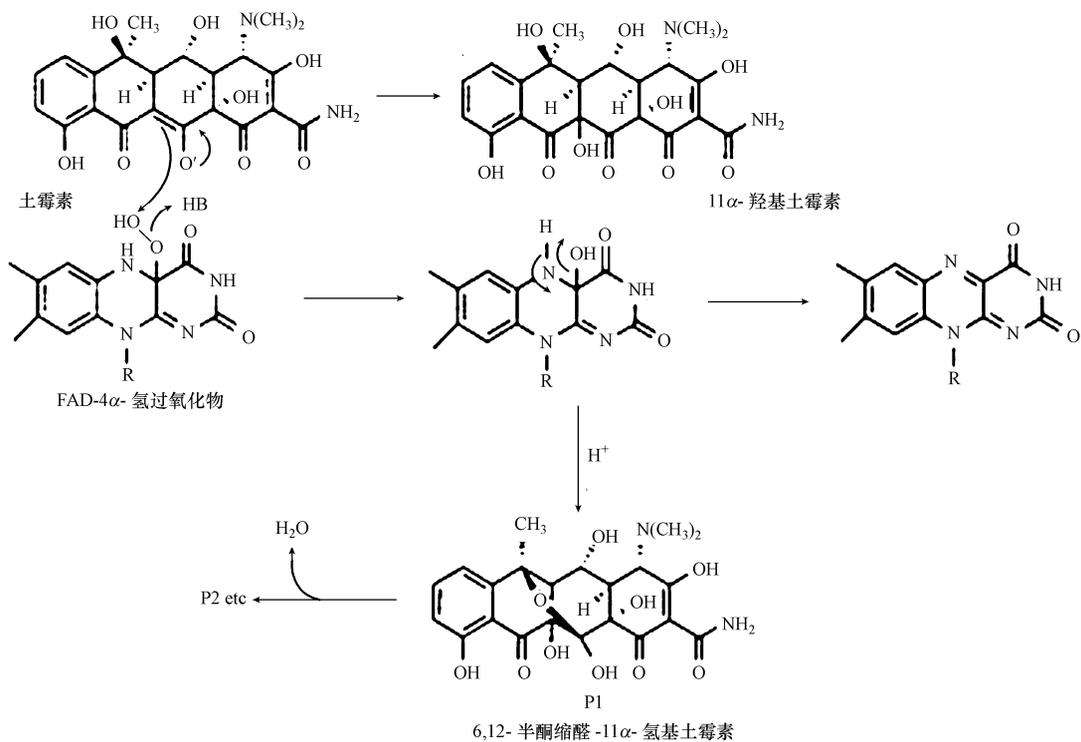


图1 TetX降解土霉素过程示意图^[50]

Fig.1 Schematic diagram of the degradation of oxytetracycline by TetX^[50]

4 tet(X)的环境分布

2007年之前tet(X)基因仅发现存在于专性厌氧的拟杆菌属(*Bacteroides* spp.)中.2007年Ghosh和LaPara^[27]在粪肥改良过的土壤中分离出一株含有tet(X)的鞘氨醇杆菌*Sphingobacterium* sp. strain PM2-P1-29,这是首次为好氧菌中发现tet(X)基因,对于重新认识四环素类的生物降解潜力和tet(X)基因的起源具有重要意义.除了上述两种菌属外,已知的tet(X)宿主菌还包括肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)中的阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*),丛毛单胞菌科(*Comamonadaceae*)中的睾丸酮丛毛单胞菌(*Comamonas testosteroni*)和食酸戴尔福特菌(*Delftia acidovorans*)及部分假单胞菌(*Pseudomonadaceae*)(表2).

在涉及tet(X)的环境分布研究中,多使用常规PCR进行定性,使用Real-Time PCR进行定量,两种分析使用的引物和反应条件已比较成熟^[28,54].目前,已在禽畜粪便、农田土壤、空气气溶胶、河水、池塘、港湾沉积物、污水厂进出水、活性污泥及剩余污泥等环境介质中检测到tet(X)基因(表2),检出环境多受到人类活动的强烈影响.定量结果表明tet(X)在受四环素污染环境(如纳污河流和污水厂活性污泥)

中的丰度明显高于天然环境^[54-55],说明四环素施加的选择压力可促进 *tet(X)* 基因的富集;TRGs 多与其他抗生素或重金属抗性基因共存^[56],*tet(X)* 也被发现与氨基糖苷类抗生素、链丝菌素和氯洁霉素等的抗性基因共存于质粒等遗传元件中^[35,57],因此其它类别抗生素存在时产生的协同选择作用(Co-Selection)也将影响 *tet(X)* 的丰度;而在污水、污泥处理系统中,系统操作条件如污水末端消毒工艺^[58-59]、厌氧消化池运行温度^[60]和好氧消化池进料方式^[61]等均会影响 *tet(X)* 的丰度.尽管已经对 *tet(X)* 在一些环境(主要是污水处理系统或畜禽废物处理系统)中的分布情况有所了解,但目前还没有专门针对 *tet(X)* 基因的环境分布调查,因此 *tet(X)* 基因在更广泛的环境介质中的分布与丰度情况还需进一步研究.

表 2 *tet(X)* 的环境分布Table 2 Environmental distribution of *tet(X)*

环境来源(国家或地区)	微生物来源	基因丰度	参考文献
水环境	纳污河流(河水及沉积物);抗生素生产废水处理系统出水;市政污水处理系统出水(中国)	微生物群落 抗生素生产废水处理系统排污口上游河流(<i>tet(X)</i> /16S rRNA): $5.38 \times 10^{-2} \pm 1.92 \times 10^{-2}$ (河水,冬季); $5.01 \times 10^{-4} \pm 1.71 \times 10^{-5}$ (河水,夏季); $1.48 \times 10^{-3} \pm 3.26 \times 10^{-5}$ (沉积物,夏季); 市政污水处理厂排污口下游(1 km)河流(<i>tet(X)</i> /16S rRNA): $6.97 \times 10^{-2} \pm 1.89 \times 10^{-3}$ (河水,冬季); $3.82 \times 10^{-3} \pm 5.31 \times 10^{-5}$ (河水,夏季); $1.25 \times 10^{-3} \pm 9.48 \times 10^{-5}$ (沉积物,夏季); 市政污水处理厂排污口下游(3 km)河流(<i>tet(X)</i> /16S rRNA): $3.05 \times 10^{-2} \pm 1.63 \times 10^{-3}$ (河水,冬季); $1.27 \times 10^{-2} \pm 0.00$ (河水,夏季); $3.28 \times 10^{-3} \pm 1.57 \times 10^{-3}$ (沉积物,夏季); 抗生素生产废水处理系统排污点河流(<i>tet(X)</i> /16S rRNA): $2.38 \times 10^{-1} \pm 1.36 \times 10^{-2}$ (出水,冬季); $3.12 \times 10^{-3} \pm 3.20 \times 10^{-6}$ (出水,夏季); $1.80 \times 10^{-4} \pm 1.12 \times 10^{-5}$ (沉积物,夏季); 市政污水处理厂排污点河流(<i>tet(X)</i> /16S rRNA): $1.87 \times 10^{-1} \pm 3.35 \times 10^{-2}$ (出水,冬季); $5.92 \times 10^{-3} \pm 4.58 \times 10^{-5}$ (出水,夏季); $2.88 \times 10^{-2} \pm 2.29 \times 10^{-4}$ (沉积物,夏季)	[17]
	不同地理区域的15个市政污水厂收集的活性污泥(中国、美国、加拿大、新加坡)	微生物群落 中国11个污水厂活性污泥样品中 <i>tet(X)</i> 的平均相对丰度(<i>tet(X)</i> /16S rRNA): $1.62 \times 10^{-3} \pm 1.93 \times 10^{-3}$; 其他4个污水厂活性污泥样品中 <i>tet(X)</i> 的平均相对丰度(<i>tet(X)</i> /16S rRNA): $5.96 \times 10^{-4} \pm 5.81 \times 10^{-4}$	[28]
	St. Louis 河, Duluth-Superior 港和 Superior 湖的表层水和沉积物样品;三级处理的市政污水(美国)	微生物群落 三级处理的市政污水: 1.2×10^3 copies·mL ⁻¹ ; Duluth-Superior 港表层水:略高于 2.6×10^2 copies·mL ⁻¹ ; St. Louis 河和 Superior 湖的表层水: $< 2.6 \times 10^2$ copies·mL ⁻¹ . 三级处理的市政污水排污口附近沉积物: $2.9 \times 10^4 \pm 5.4 \times 10^3$ copies·g ⁻¹ 湿重; Duluth-Superior 港沉积物: $1.2 \times 10^4 \pm 2.3 \times 10^3$ copies·g ⁻¹ 湿重; St. Louis 河和 Superior 湖的沉积物: $< 1.3 \times 10^4$ copies·g ⁻¹ 湿重	[65]
	市政污水厂剩余污泥(美国)	微生物群落 剩余污泥: $1.50 \pm 0.33 \times 10^8$ copies·g ⁻¹ 干污泥; 中温厌氧消化可显著降低 <i>tet(X)</i> 丰度,并且高的污泥停留时间可增加 <i>tet(X)</i> 的去除效果;热水解可显著降低剩余污泥中 <i>tet(X)</i> 丰度	[62]
	市政污水厂剩余污泥;好氧和厌氧消化污泥(美国)	微生物群落 厌氧消化池进泥: $3.3 \pm 1.4 \times 10^4$ copies·μL ⁻¹ ; 好氧消化池进泥: $4.9 \pm 1.7 \times 10^4$ copies·μL ⁻¹ ; 提高温度可增加厌氧消化液中 <i>tet(X)</i> 的去除效果;只有 55 °C 的好氧消化消减 <i>tet(X)</i> 丰度,在此条件下 <i>tet(X)</i> 一级消减速率为 5.3 d ⁻¹	[60]
	市政污水厂活性污泥及出水(德国)	微生物群落	[66]
	活性污泥(中国:香港、上海;美国:加州)	微生物群落	[67]

续表2

环境来源(国家或地区)	微生物来源	基因丰度	参考文献
水环境	中、高温厌氧消化池污泥(美国)	微生物群落 消化池进泥(剩余污泥)(<i>tet(X)/16S rRNA</i>): 1.5×10^{-3} — 1.0×10^{-2} ; 高温厌氧消化池污泥(<i>tet(X)/16S rRNA</i>): 0.5×10^{-4} — 1.0×10^{-3} ; 中温厌氧消化池污泥(<i>tet(X)/16S rRNA</i>): 1.0×10^{-4} — 0.5×10^{-3}	[68]
	处理养猪场废水、废物的氧化塘泥浆和沉积物;池塘水(美国)	微生物群落 氧化塘泥浆: 10^5 — 10^8 copies of <i>tet(X)</i> ·mL ^{-1a} ; 氧化塘沉积物: 10^4 — 10^6 copies of <i>tet(X)</i> ·g ^{-1a} ; 池塘水: 10 — 100 copies of <i>tet(X)</i> ·mL ^{-1a} ; 池塘沉积物: <10 copies of <i>tet(X)</i> ·g ^{-1a}	[69]
	土霉素发酵母液;土霉素菌渣;土霉素生产废水处理系统进、出水和活性污泥(中国)	微生物群落 母液(<i>tet(X)/16S rRNA</i>): 6.6×10^{-3} 菌渣(<i>tet(X)/16S rRNA</i>): 2.8×10^{-3} ; 土霉素生产废水处理系统进水(<i>tet(X)/16S rRNA</i>): 3.7×10^{-3} ; 土霉素生产废水处理系统出水(<i>tet(X)/16S rRNA</i>): 2.9×10^{-2} ; 活性污泥(序批式反应器)(<i>tet(X)/16S rRNA</i>): 9.2×10^{-2} ; 活性污泥(生物接触氧化反应器)(<i>tet(X)/16S rRNA</i>): 1.0×10^{-1}	[54]
	养猪场氧化塘污泥和养牛场储粪池污泥(美国)	微生物群落 <i>tet(X)</i> 在污泥的胞外和胞内DNA中的平均相对丰度(<i>tet(X)/16S rRNA</i>)为:胞外 2.8×10^{-5} ;胞内 1.8×10^{-3}	[70]
土壤和畜禽粪肥	临近养猪场的农田土壤(中国)	微生物群落	[71]
	施用过动物粪肥的农田土壤(美国)	<i>Sphingobacterium</i> sp. strain PM2-P1-29, Tn6031	[27,57]
	猪粪(美国)	微生物群落	[62]
	马粪(美国)	微生物群落	[72]
	牛粪(美国)	微生物群落	[73]
	养猪场粪肥和堆肥产品(中国)	微生物群落	[74]
	人类(母亲及其婴儿)粪便样品(美国)	微生物群落	[75]
食物链	牡蛎(美国)	微生物群落	[76]
空气	养猪场、养牛场和诊所等室内环境中的空气气溶胶(美国)	微生物群落 养猪场室内空气溶胶: $\lg(tet(X) \text{ number} \cdot \text{m}^{-3} \text{ air}) = 1.19$ — 2.52^a ; 养牛场室内空气溶胶: $\lg(tet(X) \text{ number} \cdot \text{m}^{-3} \text{ air}) = 1.10$ — 1.76^a ; 诊所室内空气溶胶: $\lg(tet(X) \text{ number} \cdot \text{m}^{-3} \text{ air}) = 0.48$ — 1.14^a	[16]
其它	临床菌株(美国)	<i>Bacteroides</i> , pBF4	[35]
	临床菌株(美国)	<i>Bacteroides</i> , Tn4400, Tn4351, pCP1	[38,41]
	临床菌株(分离自临床尿液标本)(塞拉利昂)	<i>tet(X)</i> : <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Comamonas testosteroni</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Enterobacter</i> sp., <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonadaceae tet(X2)</i> ; <i>Escherichia coli</i> , <i>Delftia acidovorans</i>	[29]
	临床拟杆菌菌株(欧洲)	<i>tet(X)</i> : <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Parabacteroides (Bacteroides) distasonis</i> ; <i>tet(X1)</i> : <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Bacteroides vulgatus</i> , <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> , <i>Parabacteroides (Bacteroides) distasonis</i>	[30,52]

注:a:部分数据为原文图表中估算值.

抗性基因主要有两种转移方式:垂直转移(Vertical gene transfer)和水平转移(Horizontal gene transfer)。*tet(X)*基因因为宿主菌较为单一(表2),垂直转移被认为是其丰度变化的重要原因^[62],例如本课题在研究厌氧消化对 TRGs 的控制时发现,*tet(X)*的相对丰度(*tet(X)*/16S rRNA)与拟杆菌属在总细菌中所占比例显著相关,说明在本实验的厌氧系统中 *tet(X)* 主要通过垂直迁移机制随着拟杆菌属的增殖或消亡而变化。基因水平转移是环境中抗性基因传播的重要途径^[63],*tet(X)*被发现存在于多种可移动遗传元件上^[35,40-41,57,64],因此 *tet(X)* 也可能通过基因水平转移机制在环境中传播。Whittle 等^[64]在拟杆菌属的结合转座子 CTnDOT 上发现了 *tet(X1)* 基因,该基因与 *tet(X)* 相比缺少 TetX 的氨基端编码序列,由此推测 *tet(X1)* 是 *tet(X)* 在 CTnDOT 上不完整复制的产物。Ghosh 等^[57]认为在土壤细菌中检测到 *tet(X)* 基因暗示着土壤细菌与动物肠道共生菌间存在 *tet(X)* 的基因交换,但目前尚无法在实验室条件下证明该基因(存在于转座子 Tn6031 上)可通过结合作用转移到其他菌株中。

5 类似基因

5.1 *tet(X1)* 和 *tet(X2)*

Whittle 等^[64]在拟杆菌属(*Bacteroides thetaiotaomicron*)的结合转座子 CTnDOT 上发现了 *tet(X)* 的两个同源基因:*tet(X1)* 和 *tet(X2)*。其中 *tet(X2)* 编码的蛋白 TetX2 与 TetX 有 99% 的氨基酸序列相同,而 *tet(X1)* 编码的蛋白 TetX1 与 TetX 的氨基酸序列同源性仅为 66%。Yang 等^[50]研究发现 TetX1 仅含有 359 个氨基酸(TetX 有 388 个),而缺失的氨基酸主要存在于氨基端(N-端),由于 FAD 结合点位即存在于 N-端,因此 TetX1 可能是一种无四环素降解活性的蛋白。

5.2 *tet(37)*

Torres 等^[77]使用宏基因组学方法从健康成年人的口腔宏基因组中成功克隆并在大肠杆菌中异源表达了一个新的四环素抗性基因 *tet(37)*。*tet(37)* 含有 390 个碱基对,其编码的蛋白 Tet37 与多种黄素蛋白、氧化还原酶和 NAD(P) 依赖酶均具有同源性。紫外可见光谱检测和脱毒实验(Detoxification assay)^[44]证明含 *tet(37)* 的大肠杆菌可使四环素灭活,并且其灭活作用的发挥同样依赖于 NADPH。虽然 *tet(37)* 的上述性质与 *tet(X)* 相似,但氨基酸序列比对显示 Tet37 与 TetX 没有同源性,这表明 *tet(37)* 可能是一种新的四环素类抗生素的降解基因。宏基因组学方法为从特殊生境中寻找抗性基因提供了一个新的思路,但该方法无法直接给出新基因的宿主信息。

5.3 *tet(34)*

tet(34) 是另一种“被认为”具有四环素灭活作用的四环素抗性基因,最早被发现于 *Vibrio* sp. (分离自黄尾金枪鱼的肠道)的染色体中^[78],目前其已知的宿主菌属包括 4 种:*Aeromonas*、*Pseudomonas*、*Serratia* 和 *Vibrio*^[24]。含有 *tet(34)* 的 *Vibrio* sp. 可表达高水平四环素抗性,其中土霉素对其的最小抑制浓度达到 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[78]。*tet(34)* 编码的蛋白 Tet34 含有 154 个氨基酸,与 *Vibrio cholerae*、*E. coli* 和 *Salmonella enterica* 中的黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(xanthine-guanine phosphoribosyltransferases)具有较高的同源性^[78]。Nonaka 和 Suzuki^[78]推测其抗性机理为 Tet34 可催化鸟嘌呤、黄嘌呤和次黄嘌呤等合成对应的核苷一磷酸,增加了蛋白合成的翻译步中嘌呤核苷酸的含量,过量供给的鸟苷三磷酸(GTP)可促进氨酰转运 RNA(aminoacyl-TRNA)和延伸因子 Tu(EF-Tu)的结合,从而促进了 EF-Tu·GTP·tRNA 复合物与核糖体的结合,保证了肽链的正常合成,同时上述过程通过竞争性结合作用减弱了四环素对蛋白合成的阻碍,使 *tet(34)* 的宿主菌具有了四环素抗性。Tet34 确实是通过酶催化作用表达四环素抗性,但其并不能化学修饰四环素使其失活^[25],因此有必要重新审视 *tet(34)* 在四环素抗性基因中的分类地位。

6 *tet(X)* 的四环素类抗生素降解作用应用潜力及风险控制

Dantas 等^[79]研究表明微生物降解是去除环境中多种抗生素的有效途径。Speer 等^[47]将 *tet(X)* 引入大肠杆菌中构建了可降解四环素的工程菌 *E. coli* EM24,发现其可以在 8 h 内使含四环素($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)的培养液完全解毒,说明 *tet(X)* 具有高效的四环素降解能力。Zhang 等^[28]在不同地区的污水厂不同时间取的活性污泥样品中均检测到 *tet(X)* 基因,作者推测该基因在活性污泥体系中具有重要作用。但 Li

等^[80]和 Gartiser 等^[81]研究发现四环素类抗生素不易被生物降解,在生物处理系统中主要通过吸附作用从水相富集到污泥中.吸附态 TCs 有可能在后续的污泥土地利用中解吸而释放进入土壤环境,具有潜在的生态风险^[82].本课题组考察了某土霉素制药厂废水处理系统中 *tet(X)* 基因的分布情况,在各处理单元中均可检测到高水平的 *tet(X)* 基因, SBR 反应器污泥中 *tet(X)* 的丰度甚至高达 3.90×10^8 copies \cdot mL⁻¹,并且沿污水处理流程 *tet(X)* 基因的相对丰度(*tet(X)*/16S rRNA)逐渐增高^[54].同时在上述系统中还分离出两株含有 *tet(X)* 基因的鞘氨醇杆菌,表明处理含高浓度抗生素的生物系统具有高的四环素生物降解潜力,但 *tet(X)* 在上述系统中的表达情况还有待进一步研究.

一般来说,抗生素属于难降解污染物,利用含有 *tet(X)* 的高效降解菌或基因工程菌进行抗生素生产废水的生物强化处理具有一定的可行性.但是,针对这样的生物强化处理系统,必须充分考虑水排放可能导致的环境风险.膜生物反应器具有高效的固液分离功能,可有效拦截废水处理过程中产生的大量抗性基因和抗性菌^[83],其与生物强化技术的组合有望克服抗药基因排放问题.

降解菌中功能基因表达的直接降解作用底物专一性强,但降解存在着一定的(残留)阈值^[84]. Gullberg 等^[85]和 Knapp 等^[86]的研究表明,即使是低浓度 TCs 存在也可以促进抗性基因和抗性菌的增殖和传播.因此使用四环素降解菌处理含高浓度抗生素的废水或废物时,应考虑尽量降低四环素的残留.而具有共代谢作用的胞外氧化还原酶底物专一性低,但对外源物质的降解不受其浓度大小的影响^[77].目前已知对于 TCs 具有共代谢降解作用的微生物主要分为两类,一是白腐真菌(*Phanerochaete chrysosporium*),其在藜芦醇和 Mn²⁺作为共代谢基质的情况下可合成分泌锰过氧化物酶(MnP)和木质素过氧化物酶(LiP),两种酶对四环素均有较强的降解作用,其中 LiP(40 U \cdot L⁻¹)对 50 mg \cdot L⁻¹四环素的降解率在 5 min 内可达 95%以上^[87-89].另一类为硝化污泥,Shi 等^[90]研究了硝化颗粒污泥对四环素的去除特性,发现超过 30%的四环素去除源于微生物共代谢降解作用,增加 COD 或氨氮(<150 mg \cdot L⁻¹)浓度可促进四环素的生物降解,而硝化抑制实验表明氨单加氧酶(ammonium monooxygenase, AMO)在上述过程中发挥着重要作用.因此利用可表达 *tet(X)* 的降解菌与具有共代谢作用的菌群(如白腐真菌或硝化污泥)构建协同共生体系,将有助于提高四环素类抗生素的降解率和降低其残留阈值.

此处需要强调,目前抗性基因已经被认为是一类新型环境污染物^[91],若将可表达 *tet(X)* 的降解菌用于含四环素废水或废物的生物强化处理,需加强其抗性传播的风险控制.具体可从以下 3 方面考虑:生物处理系统采用膜生物反应器等工艺,阻断工程菌的转移和流失;生物处理系统的污泥或残渣采用堆肥^[92]、厌氧消化^[60,62]或焚烧等处理,消减抗性基因后方可进行后续处置;处理后的废水或废物采用紫外^[59]等消毒工艺,加强末端控制.

7 结论与展望

四环素类抗生素的大量生产和使用导致四环素抗性基因在环境中广泛分布,并具有一定的细菌耐药性发展指示作用.近年来,其中的酶修饰基因-*tet(X)* 在不同的环境介质中被频繁检出,并且已发现对临床耐药性具有一定的贡献.虽然已有多项研究对 *tet(X)* 的作用机理和环境分布进行了探索,但目前对该基因的关注仍较少.在上述研究基础上,今后对于 *tet(X)* 可加强以下几个方面的研究工作.(1)进一步探索 *tet(X)* 表达的四环素降解历程,明确中间产物及其抑菌活性;(2)开展更广泛的 *tet(X)* 环境分布调查研究,并进一步加强临床环境中 *tet(X)* 的监测工作;(3)继续筛选 *tet(X)* 同源基因;(4)将含有 *tet(X)* 基因的四环素降解菌应用于实际污染体系的生物修复,设计高效的生物降解工艺并加强对抗性基因的截留,防止其进入自然生境而产生可能的生态风险.

参 考 文 献

- [1] Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, 65(2): 232-260
- [2] Roberts M C. Tetracycline resistance determinants: Mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1996, 19(1): 1-24
- [3] Sarmah A K, Meyer M T, Boxall A B A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment [J]. *Chemosphere*, 2006, 65(5): 725-759
- [4] Hosoi Y, Asai T, Koike R, et al. Use of veterinary antimicrobial agents from 2005 to 2010 in Japan [J]. *International Journal of*

- Antimicrobial Agents, 2013,41(5): 489-490
- [5] 陈育枝, 张元元, 袁希平, 等. 动物四环素类抗生素现状及前景[J]. 兽药与饲料添加剂, 2006,11(3): 16-17
- [6] 李兆君, 姚志鹏, 张杰, 等. 兽用抗生素在土壤环境中的行为及其生态毒理效应研究进展[J]. 生态毒理学报, 2008,3(1): 15-20
- [7] Richardson B J, Lam P K S, Martin M M. Emerging chemicals of concern: Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Asia, with particular reference to Southern China[J]. Marine Pollution Bulletin, 2005,50(9): 913-920
- [8] 肖斌, 黄满红, 陈亮. 活性污泥 SBR 系统对四环素耐药菌和总四环素的去除特性[J]. 环境化学, 2012,31(12): 1974-1978
- [9] Li D, Yang M, Hu J Y, et al. Determination and fate of oxytetracycline and related compounds in oxytetracycline production wastewater and the receiving river[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2008,27(1): 80-86
- [10] National Antimicrobial Resistance Monitoring system (NARMS) for Enteric Bacteria. 2005[EB/OL].[2013-12-5]. <http://www.cdc.gov/narms/annual/2005/NARMSAnnualReport2005.pdf>
- [11] Hughes V M, Datta N. Conjugative plasmids in bacteria of the "pre-antibiotic" era[J]. Nature, 1983,302(5910): 725-726
- [12] Knapp C W, Dolfing J, Ehler P A I, et al. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940[J]. Environmental Science & Technology, 2010,44(2): 580-587
- [13] Harnisz M, Golas I, Pietru M. Tetracycline-resistant bacteria as indicators of antimicrobial resistance in protected waters-The example of the Drweca River Nature Reserve (Poland)[J]. Ecological Indicators, 2011,11(2): 663-668
- [14] Schnabel E L, Jones A L. Distribution of tetracycline resistance genes and transposons among phyloplane bacteria in Michigan apple orchards[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999,65(11): 4898-4907
- [15] Rodríguez C, Lang L, Wang A, et al. Lettuce for human consumption collected in Costa Rica contains complex communities of culturable oxytetracycline- and gentamicin-resistant bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006,72(9): 5870-5876
- [16] Ling A L, Pace N R, Hernandez M T, et al. Tetracycline resistance and Class 1 integron genes associated with indoor and outdoor aerosols [J]. Environmental Science & Technology, 2013,47(9): 4046-4052
- [17] 刘苗苗, 张显, 李栋, 等. 制药废水受纳河流中四环素抗药基因及微生物群落结构变化研究[J]. 环境科学学报, 2010,30(8): 1551-1557
- [18] Rahman M H, Nonaka L, Tago R, et al. Occurrence of two genotypes of tetracycline (TC) resistance gene *tet(M)* in the TC-resistant bacteria in marine sediments of Japan[J]. Environmental Science & Technology, 2008,42(14): 5055-5061
- [19] Nonaka L, Ikeno K, Suzuki S. Distribution of tetracycline resistance gene, *tet(M)*, in Gram-positive and Gram-negative bacteria isolated from sediment and seawater at a coastal aquaculture site in Japan[J]. Microbes and Environments, 2007,22(4): 355-364
- [20] Chee-Sanford J C, Aminov R I, Krapac I J, et al. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001,67(4): 1494-1502
- [21] Hoa N T, Chieu T T B, Nghia H D T, et al. The antimicrobial resistance patterns and associated determinants in *Streptococcus suis* isolated from humans in southern Vietnam, 1997-2008[J]. Bmc Infectious Diseases, 2011,11: 6
- [22] Roberts M C. Mechanism of resistance for characterized *tet* and *otr* genes[EB/OL]. [2014-2-5]. <http://faculty.washington.edu/marilynr/tetweb1.pdf>
- [23] Caryl J A, Cox G, Trimble S, et al. "*tet(U)*" is not a tetracycline resistance determinant[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2012,56(6): 3378-3379
- [24] Roberts M C. Update on acquired tetracycline resistance genes[J]. Fems Microbiology Letters, 2005,245(2): 195-203
- [25] Thaker M, Spanogiannopoulos P, Wright G D. The tetracycline resistome[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010,67(3): 419-431
- [26] Chopra I. Glycylcyclines: Third-generation tetracycline antibiotics[J]. Current Opinion in Pharmacology, 2001,1(5): 464-469
- [27] Ghosh S, LaPara T M. The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria[J]. The ISME Journal, 2007,1(3): 191-203
- [28] Zhang X X, Zhang T. Occurrence, abundance, and diversity of tetracycline resistance genes in 15 sewage treatment plants across China and other global locations[J]. Environmental Science & Technology, 2011,45(7): 2598-2604
- [29] Leski T A, Bangura U, Jimmy D H, et al. Multidrug-resistant *tet(X)*-containing hospital isolates in Sierra Leone[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2013,42(1): 83-86
- [30] Bartha N A, S6ki J, Urbán E, et al. Investigation of the prevalence of *tetQ*, *tetX* and *tetX1* genes in *Bacteroides* strains with elevated tigecycline minimum inhibitory concentrations[J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2011,38(6): 522-525
- [31] Aminov R I. Evolution in action: Dissemination of *tet(X)* into pathogenic microbiota[J]. Frontiers in microbiology, 2013,4: 192
- [32] Livermore D M. Tigecycline: What is it, and where should it be used? [J] Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2005,56(4): 611-614
- [33] Bradford P A. Tigecycline: A first in class glycylcycline[J]. Clinical Microbiology Newsletter, 2004,26(21): 163-168
- [34] Moore I F, Hughes D W, Wright G D. Tigecycline is modified by the flavin-dependent monooxygenase TetX[J]. Biochemistry, 2005,44(35): 11829-11835
- [35] Guiney D G, Hasegawa P, Davis C E. Expression in *Escherichia coli* of cryptic tetracycline resistance genes from bacteroides R plasmids [J]. Plasmid, 1984,11(3): 248-252
- [36] Tally F P, Snyderman D R, Shimell M J, et al. Characterization of pBFTM10, a clindamycin-erythromycin resistance transfer factor from *Bacteroides fragilis*[J]. Journal of Bacteriology, 1982,151(2): 686-691
- [37] Matthews B G, Guiney D G. Characterization and mapping of regions encoding clindamycin resistance, tetracycline resistance, and a

- replication function on the *Bacteroides* R plasmid pCP1[J]. *Journal of Bacteriology*, 1986,167(2): 517-521
- [38] Welch R A, Macrina F L. Physical characterization of *Bacteroides fragilis* R plasmid pBF4[J]. *Journal of Bacteriology*, 1981,145(2): 867-872
- [39] Shoemaker N B, Guthrie E P, Salyers A A, et al. Evidence that the clindamycin-erythromycin resistance gene of *Bacteroides* plasmid pBF4 is on a transposable element[J]. *Journal of Bacteriology*, 1985,162(2): 626-632
- [40] Shoemaker N B, Getty C, Gardner J F, et al. Tn4351 transposes in *Bacteroides* spp. and mediates the integration of plasmid R751 into the *Bacteroides* chromosome[J]. *Journal of Bacteriology*, 1986,165(3): 929-936
- [41] Robillard N J, Tally F P, Malamy M H. Tn4400, a compound transposon isolated from *Bacteroides fragilis*, functions in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1985,164(3): 1248-1255
- [42] Smith C J, Gonda M A. Comparison of the transposon-like structures encoding clindamycin resistance in *Bacteroides* R-plasmids[J]. *Plasmid*, 1985,13(3): 182-192
- [43] Guiney D G, Hasegawa P, Davis C E. Homology between clindamycin resistance plasmids in *Bacteroides*[J]. *Plasmid*, 1984,11(3): 268-271
- [44] Speer B S, Salyers A A. Characterization of a novel tetracycline resistance that functions only in aerobically grown *Escherichia coli*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1988,170(4): 1423-1429
- [45] Park B H, Levy S B. The cryptic tetracycline resistance determinant on Tn4400 mediates tetracycline degradation as well as tetracycline efflux[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1988,32(12): 1797-1800
- [46] Park B H, Hendricks M, Malamy M H, et al. Cryptic tetracycline resistance determinant (class F) from *Bacteroides fragilis* mediates resistance in *Escherichia coli* by actively reducing tetracycline accumulation[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1987,31(11): 1739-1743
- [47] Speer B S, Salyers A A. Novel aerobic tetracycline resistance gene that chemically modifies tetracycline[J]. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171(1): 148-153
- [48] Speer B S, Salyer A A. A tetracycline efflux gene on *Bacteroides* transposon Tn4400 does not contribute to tetracycline resistance[J]. *Journal of Bacteriology*, 1990,172(1): 292-298
- [49] Speer B S, Bedzyk L, Salyers A A. Evidence that a novel tetracycline resistance gene found on two *Bacteroides* transposons encodes an NADP-requiring oxidoreductase[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991,173(1): 176-183
- [50] Yang W R, Moore I F, Koteva K P, et al. TetX is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004,279(50): 52346-52352
- [51] Kumarasamy K K, Toleman M A, Walsh T R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: A molecular, biological, and epidemiological study[J]. *Lancet Infectious Diseases*, 2010,10(9): 597-602
- [52] Nagy E, Urbán E, Nord C E. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe: 20 years of experience[J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2011,17(3): 371-379
- [53] Hoffmann M, DeMaio W, Jordan R A, et al. Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of C-14 tigecycline, a first-in-class glycylcycline antibiotic, after intravenous infusion to healthy male subjects[J]. *Drug Metabolism and Disposition*, 2007,35(9): 1543-1553
- [54] Liu M M, Zhang Y, Yang M, et al. Abundance and distribution of tetracycline resistance genes and mobile elements in an oxytetracycline production wastewater treatment system[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012,46(14): 7551-7557
- [55] Zhang W, Huang M H, Qi F F, et al. Effect of trace tetracycline concentrations on the structure of a microbial community and the development of tetracycline resistance genes in sequencing batch reactors[J]. *Bioresource Technology*, 2013,150(11): 9-14
- [56] Baker-Austin C, Wright M S, Stepanauskas R, et al. Co-Selection of antibiotic and metal resistance[J]. *Trends in Microbiology*, 2006,14(4): 176-182
- [57] Ghosh S, Sadowsky M J, Roberts M C, et al. *Sphingobacterium* sp strain PM2-P1-29 harbours a functional *tet(X)* gene encoding for the degradation of tetracycline[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009,106(4): 1336-1342
- [58] Auerbach E A, Seyfried E E, McMahon K D. Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants[J]. *Water Research*, 2007,41(5): 1143-1151
- [59] McKinney C W, Pruden A. Ultraviolet disinfection of antibiotic resistant bacteria and their antibiotic resistance genes in water and wastewater[J]. *Environmental Science & Technology*, 2012,46(24): 13393-13400
- [60] Diehl D L, LaPara T M. Effect of temperature on the fate of genes encoding tetracycline resistance and the integrase of class I integrons within anaerobic and aerobic digesters treating municipal wastewater solids[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010,44(23): 9128-9133
- [61] Burch T R, Sadowsky M J, Lapara T M. Aerobic digestion reduces the quantity of antibiotic resistance genes in residual municipal wastewater solids[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2013,4:17
- [62] Ma Y J, Wilson C A, Novak J T, et al. Effect of various sludge digestion conditions on sulfonamide, macrolide, and tetracycline resistance genes and class I integrons[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011,45(18): 7855-7861
- [63] Alekshun M N, Levy S B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance[J]. *Cell*, 2007,128(6): 1037-1050
- [64] Whittle G, Hund B D, Shoemaker N B, et al. Characterization of the 13-kilobase *ermF* region of the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001,67(8): 3488-3495
- [65] LaPara T M, Burch T R, McNamara P J, et al. Tertiary-treated municipal wastewater is a significant point source of antibiotic resistance

- genes into Duluth-Superior Harbor[J]. *Environmental Science & Technology*, 2011,45(22): 9543-9549
- [66] Szczepanowski R, Linke B, Krahn I, et al. Detection of 140 clinically relevant antibiotic-resistance genes in the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to selected antibiotics[J]. *Microbiology-Sgm*, 2009,155(7): 2306-2319
- [67] Zhang T, Zhang M, Zhang X X, et al. Tetracycline resistance genes and tetracycline resistant lactose-fermenting enterobacteriaceae in activated sludge of sewage treatment plants[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009,43(10): 3455-3460
- [68] Ghosh S, Ramsden S J, LaPara T M. The role of anaerobic digestion in controlling the release of tetracycline resistance genes and class 1 integrons from municipal wastewater treatment plants[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009,84(4): 791-796
- [69] Barkovskii A L, Coleman C. Persistent and transient antibiotic resistance genes in swine feeding operations and their environmental fate as affected by farms' operational practices[R]. The Annual Meeting and International Symposium of Microbial Ecology Committee at the Ecological Society of China, 2009, Ningbo, China
- [70] Zhang Y P, Snow D D, Parker D, et al. Intracellular and extracellular antimicrobial resistance genes in the sludge of livestock waste management structures[J]. *Environmental Science & Technology*, 2013,47(18): 10206-10213
- [71] Wu N, Qiao M, Zhang B, et al. Abundance and diversity of tetracycline resistance genes in soils adjacent to representative swine feedlots in China[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010,44(18): 6933-6939
- [72] Storteboom H N, Kim S C, Doesken K C, et al. Response of antibiotics and resistance genes to high-intensity and low-intensity manure management[J]. *Journal of Environmental Quality*, 2007,36(6): 1695-1703
- [73] Thames C H, Pruden A, James R E, et al. Excretion of antibiotic resistance genes by dairy calves fed milk replacers with varying doses of antibiotics[J]. *Frontiers in microbiology*, 2012,3: 139
- [74] Zhu Y G, Johnson T A, Su J Q, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013,110(9): 3435-3440
- [75] de Vries L E, Vallès Y, Agersø Y, et al. The gut as reservoir of antibiotic resistance: microbial diversity of tetracycline resistance in mother and infant[J]. *PLoS One*, 2011,6(6): e21644
- [76] Barkovskii A L. Antibiotic resistance genes and environmental factors impacting their temporal and spatial distribution in oyster beds[R]. The International Symposium on Environmental Simulation and Pollution Control, 2009, Beijing, China
- [77] Diaz-Torres M L, McNab R, Spratt D A, et al. Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2003,47(4): 1430-1432
- [78] Nonaka L, Suzuki S. New Mg²⁺-dependent oxytetracycline resistance determinant tet 34 in *Vibrio* isolates from marine fish intestinal contents [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002,46(5): 1550-1552
- [79] Dantas G, Sommer M O A, Oluwasegun R D, et al. Bacteria subsisting on antibiotics[J]. *Science*, 2008,320(5872): 100-103
- [80] Li B, Zhang T. Biodegradation and adsorption of antibiotics in the activated sludge process[J]. *Environmental Science & Technology*, 2010,44(9): 3468-3473
- [81] Gartsis S, Urich E, Alexy R, et al. Ultimate biodegradation and elimination of antibiotics in inherent tests[J]. *Chemosphere*, 2007,67(3): 604-613
- [82] Kim S, Eichhorn P, Jensen J N, et al. Removal of antibiotics in wastewater: Effect of hydraulic and solid retention times on the fate of tetracycline in the activated sludge process[J]. *Environmental Science & Technology*, 2005,39(15): 5816-5823
- [83] Breazael M V, Novak J T, Vikesland P J, et al. Effect of wastewater colloids on membrane removal of antibiotic resistance genes[J]. *Water Research*, 2013,47(1): 130-140
- [84] 侯树宇,张清敏,多森,等. 白腐真菌和细菌对喹的协同生物降解研究[J]. *农业环境科学学报*, 2005,24(2): 318-321
- [85] Gullberg E, Cao S, Berg O G, et al. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations[J]. *Plos Pathogens*, 2011,7(7): e1002158
- [86] Knapp C W, Engemann C A, Hanson M L, et al. Indirect evidence of transposon-mediated selection of antibiotic resistance genes in aquatic systems at low-level oxytetracycline exposures[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008,42(14): 5348-5353
- [87] 贾燕南,文湘华,李佳喜. 木质素降解酶对四环素的降解可行性[J]. *环境科学学报*, 2008,28(1): 69-75
- [88] Wen X H, Jia Y N, Li J X. Degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude lignin peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium* — A white rot fungus[J]. *Chemosphere*, 2009,75(8): 1003-1007
- [89] Wen X H, Jia Y N, Li J X. Enzymatic degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude manganese peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010,177(1/3): 924-928
- [90] Shi Y J, Wang X H, Qi Z, et al. Sorption and biodegradation of tetracycline by nitrifying granules and the toxicity of tetracycline on granules[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2011,191(1/3): 103-109
- [91] 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
- [92] Yu Z, Michel F C, Hansen G, et al. Development and application of real-Time PCR assays for quantification of genes encoding tetracycline resistance[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005,(11): 6926-6933