

DOI: 10.7524/j.issn.0254-6108.2015.01.2014111303

张昱, 杨敏, 王春艳, 等. 生产过程中抗生素与抗药基因的排放特征、环境行为及控制[J]. 环境化学, 2015, 34(1): 1-8
ZHANG Yu, YANG Min, WANG Chunyan, et al. Antibiotics, antibiotic resistance genes, pollutant discharge characteristics, horizontal transfer mechanism, pollution control technology[J]. Environmental Chemistry, 2015, 34(1): 1-8

生产过程中抗生素与抗药基因的 排放特征、环境行为及控制*

张 昱 杨 敏** 王春艳 田 哲

(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)

杨敏, 男, 博士, 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研究员, 国家杰出青年基金获得者. 长期从事针对饮用水、生活污水和行业废水的有害污染物识别、转化与控制研究.

张昱, 女, 博士, 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研究员. 主要从事水质生物转化与控制技术研究, 重点开展抗生素等有害污染物的微生物生态效应、生物转化机制和控制技术研究.

摘 要 世界卫生组织在 2000 年的报告中将抗生素抗性列为本世纪人类在健康领域面临的最大挑战之一, 有关抗药基因传播机制与控制技术的研究已经成为国际环境科学领域的一个前沿问题. 本文以生产量大、使用历史长的几种发酵类和化学合成类生素为对象, 以典型城市污水厂为对照系统, 全面评估抗生素生产及废水处理过程中抗生素与抗药基因的排放特征; 把传统的筛选培养方法与高通量测序技术及生物信息学手段有机结合, 深入研究抗生素胁迫下整合子对抗性基因的重组作用及质粒介导的结合转移作用, 以揭示抗药基因在抗生素压力驱动下主要的水平转移机制; 构建多通道生物膜流动暴露系统进行抗生素最小选择浓度评价; 研究针对抗生素生产全过程的抗生素及抗药基因控制多级屏障技术, 为抗药基因的污染控制与管理提供全面系统的科学基础.

关键词 抗生素, 抗药基因, 污染物排放特征, 水平转移机制, 污染控制技术.

Antibiotics, antibiotic resistance genes, pollutant discharge characteristics, horizontal transfer mechanism, pollution control technology

ZHANG Yu YANG Min** WANG Chunyan TIAN Zhe

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

Abstract: Antibiotic resistance has been listed as one of the major challenges for human health in WHO report issued in 2000, and antibiotic resistance genes (ARGs), which have been considered as a kind of emerging contaminant, have now become one of the most important issues in environmental studies. Focusing on several fermentative antibiotics and one synthetic antibiotic, this study will mainly focus on the following issues: (1) to evaluate the discharging characteristics of antibiotics and ARGs from the above six typical antibiotic manufacturing processes with typical municipal wastewater treatment plants as the control; (2) to better understand the horizontal transfer mechanisms of ARGs in environment, the

2014 年 11 月 13 日收稿.

* 国家自然科学基金重点项目资助(21437005)资助.

** 通讯联系人, E-mail: yangmin@cees.ac.cn

contributions of the recombination of ARG cassettes by integrons and the ARGs transfer by conjugation of plasmids under the existence of antibiotics will be revealed by combining the traditional culture-based approach with the high through-put sequencing technique and bioinformatics; (3) a biofilm exposure system will be established to determine the allowable antibiotic discharge concentrations; (4) to construct a multi-barrier process for the control of discharge of antibiotics and ARGs during the whole antibiotic manufacturing processes. The goal of this study is to provide a solid scientific base for the pollution control and management of ARGs.

Keywords: antibiotics, antibiotic resistance genes, pollutant discharge characteristics, horizontal transfer mechanism, pollution control technology.

1 抗生素的使用及抗药基因的产生

抗生素是一类可通过干扰细菌生长所必需的生理过程或细胞结构实现抑菌、杀菌效果的抗菌药物。自 20 世纪 40 年代青霉素被发明并广泛应用于临床医疗以来,抗生素在减少疾病痛苦、延长人类寿命方面发挥了无法替代的作用。抗生素主要包括天然产生的和人工合成的抗菌药物。天然抗生素主要是由自然界中存在的一些微生物代谢所产生,其中有些为了提高药效还被进行了化学改造,主要包括:(1) β -内酰胺类,如青霉素 G、氨苄青霉素、羟氨苄青霉素、头孢氨苄等;(2)氨基糖苷类和氨基环多醇类,如链霉素、双氢链霉素、卡那霉素等;(3)四环素类,如四环素、土霉素、强力霉素等;(4)大环内酯类,如红霉素、螺旋霉素等;以及氯霉素类如氯霉素、甲砒霉素等,糖肽类如万古霉素等,林可胺类如林可霉素等,多烯类如制霉菌素等。常见的化学合成的抗菌药物包括:(1)磺胺类,如氨苯磺胺、磺胺二甲基异噁唑、磺胺异恶唑、磺胺二甲基噁唑等;(2)喹诺酮类,如诺氟沙星、环丙沙星等;(3)硝基呋喃类,如呋喃西林和痢特灵等。欧洲调查数据显示,1997 年欧盟和瑞士用于人类治疗、动物治疗和动物生长促进的抗生素用量分别达到了 5460、3465 和 1575 t^[1]。2003 年美国抗生素的使用量为 5 万吨,其中 60% 人用,32% 用作生长促进剂,8% 为兽药^[2]。2002 年欧盟 26 国门诊用药统计显示, β -内酰胺类占近 50%,其他依次为四环素类、大环内酯类、喹诺酮类和磺胺类等^[3]。喹诺酮类和磺胺类抗生素进入了美国 1995 至 2002 年间前 200 种最常用处方药名单^[4],而环丙沙星进入了加拿大前 20 种最常用处方药名单^[5]。我国是抗生素生产和使用大国,年产抗生素原料大约 21 万吨,出口 3 万吨,其余 18 万吨自用(包括医疗与农业使用)。

伴随着抗生素的广泛使用,细菌的抗药性在不断增强,甚至出现了能耐受所有抗生素的“超级细菌”。细菌抗性的快速发展大幅削弱了人类治疗感染性疾病、癌症的能力。世界卫生组织(WHO)在 2000 年的报告中将抗生素抗药性列为本世纪人类在健康领域面临的最大挑战之一,并呼吁制定全球性策略以遏制抗生素抗性。研究发现,环境中的抗药基因可通过直接接触或食物链传递等途径在不同环境介质间传播,并最终通过基因水平转移等方式进入人体病原菌,使其产生耐药性^[6],而抗生素的存在可能会强化抗药基因的产生和传播。人们已经将抗生素抗药基因列为一种新型环境污染物。目前,阐明抗药基因在环境中的传播机制是环境科学领域的一个研究热点。其中,了解环境中抗生素排放产生的选择压力对于抗药基因转移及细菌抗性发展的影响是一个亟待解决的问题,是建立用于阻断和控制抗药基因的产生和传播的环境管理措施的不可或缺的科学基础。

2 抗生素生产过程是抗生素及抗药基因的重要排放源

作为疾病治疗和农业生产中不可或缺的药物,抗生素在全球得到广泛应用,由此产生的抗药菌和抗药基因的污染已经引起了全球范围的高度关注。近年来,人们已经对城市污水^[7]、家畜养殖废水^[8-9]、水产养殖废水^[10]、医疗废水^[11]等与抗生素使用密切相关的废水,以及土壤、湖泊、河流、地下水等自然环境中抗生素与抗药基因的行为开展了大量的环境调查^[12-13],发现抗生素与抗药基因的污染非常普遍。然而,人们对于另外一类重要的污染源——抗生素生产过程,却没有能够给予足够的重视。因为世界经济的分工,大宗抗生素原料药的生产早已从美国、欧洲等发达国家转移到中国和印度等一些发展中国家,主要发达国家基本上不生产大宗原料药,所以也很难关注到生产过程中抗生素和抗药基因的排放问题。

早期抗生素主要是通过微生物发酵法制备,近年来,为了改善发酵类抗生素的性能,特别是解决一

些药物长期使用后产生的细菌耐药性问题,对一些传统的发酵类抗生素进行化学修饰获得新的半合成抗生素也越来越多.总体上,目前国内外大宗使用的药物仍然以发酵类抗生素及其修饰产物为主.发酵类抗生素生产过程大致分为发酵、过滤、提取和精制等几道工序,在过滤过程中产生抗生素生产菌菌渣,而在提取过程中产生大量废母液.菌渣含有高浓度单细胞蛋白,曾被广泛用作动物饲料添加剂,但因其含有高浓度抗生素,2002 年,国家把抗生素菌渣列入禁止在饲料和动物饮用水中使用的药物品种目录.但是,至今为止,针对废弃菌渣,我国还没有提出一个经济有效的处置方法.

废母液也通常含有高浓度抗生素,我国基本上采取稀释后生物处理的方法进行处理.一般来说,生物技术对于这类发酵废水的处理从 COD 和氨氮去除的角度是非常有效的.然而,项目组针对土霉素和青霉素生产废水处理系统开展的研究发现,废水中土霉素和青霉素的含量每升分别高达毫克和数百微克的水平,而且生物处理出水以及下游河流中仍然含有较高含量的残留抗生素^[14].Larsson 调查了印度某制药废水处理厂中的 11 种抗生素,该厂接收来自 90 个制药厂的生产废水,处理出水中广谱类抗生素(头孢类、弗洛喹酮类)的浓度很高($90\text{—}31000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$),其中环丙沙星浓度高达 $28000\text{—}31000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,超过细菌毒性阈值 1000 倍以上^[15].同时,对制药废水处理厂周边环境开展的调查发现,部分井水样品中的抗生素含量超过 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,湖水中部分弗洛喹酮类抗生素高达 $0.16\text{—}6.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[16].上述结果表明,抗生素生产废水处理系统的排放会导致生产地周边自然环境受到严重的抗生素污染.

此外,从青霉素生产废水处理系统出水筛选的细菌中,有 41.6%—92.2% 对 β -内酰胺类、氨基糖苷类、大环内酯类、四环素类、喹诺酮类、利福霉素类等抗生素同时具有抗药性,且 β -内酰胺类的 50% 抑菌浓度(MIC_{50})高达 $1024\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上^[17].从土霉素生产废水处理系统出水中筛选的细菌,有 97% 对多种抗生素具有抗性,94.2% 携带四环素类抗药基因^[18].同时,处理装置出水和活性污泥中四环素抗药基因的总丰度比城市污水厂高出 1—4 个数量级^[19].由此可见,抗生素生产废水处理系统在有效去除 COD 和氨氮等常规污染物的同时,成为抗生素及抗药基因的一个重要排放源^[20].

最近,国际上要求对人和兽用药物生产开展强制性环境风险评估的呼声越来越高.在这种背景下,德国环境保护当局率先举办了专题研讨会.2013 年 8 月,世界卫生组织(WHO)在波恩举办了一个有关健康相关产品绿色采购研讨会(UN interagency technical consultation green procurement for health products: pharmaceuticals and biomedical devices).包括作者在内的与会者一致认为,WHO 应修改其采购标准,强化对药品生产过程中的污染排放控制要求,而首当其冲的药物即为抗生素类药物.但是,在如何对细菌抗性发展风险进行评估方面显然存在巨大的知识盲点^[21].从环境管理的角度,确定复杂微生物群落中抗菌生长的最小选择浓度,从而制定抗生素的允许排放水平是环境管理的当务之急.

抗生素生产在我国国民经济发展中扮演有极其重要的角色.目前,我国生产抗生素的企业多达 300 余家,生产的抗生素品种超过 70 个,抗生素产量占到世界总产量的 20%—30%,是临床上需求量最大的 β -内酰胺类、四环类和氨基糖苷类等 9 种发酵类抗生素药物的主要生产基地,部分产品如红霉素、盐酸强力霉素和头孢菌素类产品的产量位居全球第一,在国际上具有举足轻重的地位.因此,加强对生产过程中环境风险的控制对于产业自身的可持续发展来说也非常重要.

3 细菌的抗药机制及抗药基因

细菌的抗生素抗性机制主要包括:泵出、靶点修饰和酶修饰.细菌能够通过一些特殊的膜蛋白将抗生素泵出细胞,使得抗生素难以到达作用靶点并积累到一定浓度水平,从而抑制抗生素对细菌的损害作用.在四环素类抗性中这一机制比较重要.抗生素作用靶点的重构也是一种重要的抗药机制.例如,肠球菌在由操纵子编码的酶的作用下可以合成亲和力低的细胞壁肽聚糖前体,通过消除与万古霉素结合的靶位而产生耐药性^[22].耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)通过 *mec(A)* 基因调节,产生对 β -内酰胺类抗生素亲和力很低的特殊青霉素结合蛋白 PBP2a,从而导致细菌产生对 β -内酰胺类药物的抗性^[23].氨基糖苷类抗生素的修饰酶能够通过磷酸化(磷酸转移酶)或者乙酰基化(乙酰转移酶)等化学作用修饰氨基糖苷类抗生素,被修饰后的产物与 RNA 的结合能力大大下降,从而无法影响蛋白质合成^[24].

β -内酰胺类抗生素最早应用于临床,有关这类抗生素抗药机制研究也最多. β -内酰胺类抗生素的 β -内酰胺环能被 β -内酰胺酶打开,从而失去药效^[25].在 1980 年代早期仅发现有 19 种质粒编码的酶,此

后每年都有新 β -内酰胺酶的报道,至今已有两百多种(ARDB), β -内酰胺酶分成4类,活性位点是丝氨酸残基的A类(青霉素酶)、C类(头孢霉素酶)、D类(苯唑青霉素酶)和活性位点是锌原子的B类,其中A类主要是青霉素酶,包含许多染色体编码以及质粒编码的基因,广谱 β -内酰胺酶和抗抑制 β -内酰胺酶的出现使这一类的功能更加复杂;C类主要是由很多革兰氏阴性菌染色体上携带的头孢霉素酶基因组成的,大多数由底物诱导表达;D类主要由质粒编码的苯唑青霉素酶组成;B类主要是活性位点由4个锌原子组成的金属 β -内酰胺酶,可以降解几乎所有的 β -内酰胺类抗生素^[26-28]。由于 β -内酰胺酶基因的广泛传播,早期 β -内酰胺类抗生素在临床上几乎完全失效。通过对青霉素和头孢霉素的修饰改造,半合成类青霉素、头孢霉素、广谱类头孢霉素、单环 β -内酰胺以及碳青霉烯等相继被开发出来,目前临床应用的 β -内酰胺类抗生素达40余种^[29]。

四环素类抗药基因(*tet*)也是受到广泛关注,到目前为止已发现有40多种^[30]。泵蛋白是研究得最多的四环素抗性机制。这些蛋白的编码基因属于易化扩散载体超家族(Major facilitator superfamily)^[31]。泵蛋白位于细胞膜上,能够将四环素类分子转运出细胞,泵蛋白分子量约为46 kDa,根据氨基酸序列主要分为六类^[32]。第一类最多,包含了12个跨膜的 α -螺旋结构,编码基因包括*tet*(A)、*tet*(B)、*tet*(C)、*tet*(D)、*tet*(E)、*tet*(G)、*tet*(H)、*tet*(Z)等,革兰氏阴性菌的泵基因通常位于大的质粒上,而且这些质粒上往往携带了其他抗药基因和抗重金属基因等^[33],这也是近年来多药抗性细菌数量剧增的原因之一;第二类泵蛋白有14个跨膜的 α -螺旋结构,编码基因包括*tet*(K)和*tet*(L)等,主要存在于革兰氏阳性菌小的质粒上,有时也会整合到染色体或大的质粒上^[32]。其他几类包含的编码基因比较少,且研究也较少。

四环素抗性机制中,核糖体保护蛋白数量排第二。它们位于细胞质,能保护核糖体免于四环素的攻击,同时还能对多西环素和米诺环素具有抗性。*tet*(M)和*tet*(O)是研究得较多的编码核糖体保护蛋白基因,它们都显示了核糖体依赖型的三磷酸鸟苷(GTP)酶活,通过GTP水解提供能量,导致四环素分子从核糖体上脱附^[34-35]。通常*tet*(Q)和*erm*(F)基因同时位于一个大的转座子上。到目前为止,通过破坏或修饰四环素分子来获得抗性的机制比较少见。*tet*(X)是唯一一个受到较多关注的四环素修饰基因,编码一个位于细胞质的44 kDa蛋白质,能够在氧气分子和还原型辅酶II存在下化学修饰、降解四环素分子^[36]。

大环内酯类抗生素主要作用于革兰氏阳性菌。革兰氏阳性菌对大环内酯类的抗性机制主要有3种。最常见的抗性机制是细菌23S核糖体亚基的转录后修饰,使得大环内酯类抗生素的结合位点发生改变,这类修饰酶的编码基因通常命名为*erm*基因;外排泵机制包括*mef*、*msr*和*vga*基因等;*ere*(A)和*ere*(B)等编码的各种修饰酶能够水解大环内酯核的内酯环^[37]。此外,氨基糖苷类抗药基因也存在比较广泛。目前已发现超过50种的氨基糖苷类修饰酶,大多数存在于革兰氏阴性菌。根据修饰的位点,这些酶被分为氨基糖苷乙酰基转移酶、氨基糖苷腺苷酰基转移酶、氨基糖苷磷酸转移酶等^[38]。除了氨基糖苷修饰酶,泵出机制和rRNA的突变也有报道^[22]。

目前,抗生素抗药基因库(ARDB)(<http://ardb.cbcb.umd.edu/>)中登录的基因序列达到23000多个,其中常见的抗药基因也有近1000种,每年各种新的抗药基因仍然在不断被发现。而且,近年来得到迅猛发展的高通量技术将会有力推进这对抗药机制及基因的研究。

4 抗药基因环境传播机制

阐明环境中抗药基因的产生、特别是其传播机制,是提出有效的抗药基因污染控制措施的前提,也是该领域研究的前沿。抗药基因的产生和传播主要有两种途径:垂直进化和水平转移。垂直进化是指细菌通过突变而使自身更加适应周围环境的改变,进而传递到子代中。水平转移的机制比较复杂^[39],一般可分为三类:发生于两个实际接触的细胞间或通过结合质粒进行的遗传物质的传递(结合作用);通过噬菌体将细菌遗传信息由供体菌向受体菌转移(转导作用);受体菌捕获供体菌释放的胞外DNA片段,通过交换与重组,获得抗药遗传信息(转化作用)。在多变的环境中敏感细菌常发生突变以适应其生存的环境。突变具有不确定性,不是抗药性得以迅速传播的主要原因。一般认为,水平转移是细菌抗药基因广泛传播的主要机制,能够发生在致病菌和非致病菌、甚至发育关系较远的革兰氏阳性和阴性菌之间^[40]。

整合子、转座子、质粒等水平转移因子在基因水平转移中发挥重要作用。其中,质粒是一种染色体外的稳定遗传因子,具有自主复制和转录能力并能在细菌间转移,是携带和转移抗药基因的一类最重要的

载体^[41-42].Szczepanowski 等从活性污泥体系中筛选出抗性菌,从其含有的质粒中共检出 140 种抗性基因,其中包括在临床分离的细菌中新发现的抗药基因^[7].大量研究发现,抗生素作为一种选择压力对抗药基因的水平转移有促进作用^[17,43].有人发现,0.5 mg·L⁻¹的庆大霉素可使质粒 pWG613 的转移几率提高十倍^[44],而 0.1 mg·L⁻¹的庆大霉素也可显著提高 *Staphylococcus aureus* 中含庆大霉素抗药基因质粒的转移几率^[45].Larsson 等将绿色荧光蛋白(GFP)标记的大肠杆菌投入活性污泥体系以捕获可转移的抗性质粒,发现在高抗生素选择条件下抗性质粒转移能力得到加强^[46].在城市污水厂活性污泥中,微生物(供体菌和受体菌)种类多、密度大,同时细菌群落含有的质粒(转移载体)多样性高、丰度大,还存在着抗生素等的选择压力,质粒介导的结合作用被认为可能是抗药基因水平转移的主要机制^[47].在抗生素生产废水处理系统中,抗生素选择压力还要高几个数量级,因此,质粒的结合作用可能会表现得更为突出.

另外,整合子(integron)是一种在整合酶作用下识别重组位点,通过位点特异性重组剪切、捕获并整合细胞外游离的基因盒,并借助其强启动子使功能性基因得以表达的遗传系统,被捕获的基因盒多为耐药基因.作为携带多种耐药基因的重组表达系统,整合子在广泛的环境介质中被检出,已成为当前抗性基因水平转移研究领域的另一热点.整合子主要分为四大类(I型—IV型),其中I型整合子在各类环境中最为常见,携带的抗药基因盒目前发现 100 种以上(主要是 β -内酰胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类、甲氧苄氨嘧啶类抗药基因)^[48-49],环境分布调查发现其与抗性基因丰度有显著的相关性,或可作为抗性发展的备选指示因子^[19].Guerin 等研究整合子的基因盒重组机制时发现,在整合酶基因(上游)启动子区域存在 LexA 结合位点,LexA 是调控细菌 SOS 响应(细胞发生 DNA 损伤时应急响应系统)的转录抑制因子,当外界压力诱导 SOS 响应启动时,LexA 会自动催化裂解,解除对整合酶基因的转录抑制作用,从而促进整合子中基因盒的重组^[50].磺胺类、喹诺酮类和 β -内酰胺类等多种抗生素均可以诱导细菌的 SOS 响应^[51-52].我们的前期研究发现,在高浓度土霉素存在下,I型整合子丰度与一些重要四环素抗药基因的丰度成正比例关系^[18-19].但是,目前还不清楚是否所有的抗生素都有可能增强整合子的抗性基因捕捉和重组能力.另一方面,在抗生素持续选择的过程中,整合子结构会发生一些新变化.一些结构复杂的 I 型整合子可以与异常插入元件(ISCR)通过位点特异性重组将不同的耐药性基因进行重排,并通过接合型质粒进行传播,例如在 ISCR3 与 I 型整合子的连接处还发现有四环素抗药基因 *tet*(G) 和氯霉素抗药基因 *floR*^[53].虽然整合子可以通过基因盒的重组和与 ISCR 结合形成复杂结构而使抗性基因获得更大的转移潜力,但其本身无法移动.目前已有研究证据表明质粒是整合子及其与 ISCR 耦合结构进行水平转移的载体^[54],但是目前其对抗性选择压力下对抗性基因转移的作用还不清楚.

抗药基因水平转移机制研究是目前的一个研究热点,但总体上相关研究进展仍然比较缓慢,主要是由于方法学上的困难.虽然 Larsson 等^[46]建立了将绿色荧光蛋白(GFP)标记的大肠杆菌作为受体菌研究水平转移机制的方法,但环境中大部分细菌是不可培养的,使用特定受体菌进行质粒捕获时会受到质粒不相容性的影响^[55].因此上述基于分离培养的抗性质粒研究方法无法全面解析质粒介导的抗性基因转移情况.

近年来,宏基因组(Metagenome)概念的提出,以及以 454 pyrosequencing、Illumina 等为代表的高通量测序技术的快速发展,为全面解析抗性基因传播机制的研究提供了新的方法学支持.高通量测序技术已被广泛用于土壤^[56]、海洋^[57]、人体肠道^[58]、污水^[59]及活性污泥^[60]等环境中的微生物群落结构和功能的研究.最近,有人使用“鸟枪法”测定了受制药园区废水污染的河流沉积物中抗性基因和水平转移因子的分布情况,发现氨基糖苷类及喹诺酮类抗性基因丰度较高,并检测到两个新的质粒^[43];Zhang 等利用 Illumina Hiseq 2000 对城市污水厂活性污泥的质粒宏基因组进行测序,发现大量抗性基因和水平转移因子的存在^[61].因此,将基于培养的抗性菌、质粒筛选分离方法与高通量测序技术有机结合应该是全面解析抗生素胁迫下抗药基因水平转移机制的重要途径.

5 抗生素及抗药基因高效控制技术

抗生素和抗药基因的环境排放具有潜在的重大环境风险,必须对生产过程中抗生素及抗药基因的排放进行有效控制,设定废水中抗生素的安全排放标准.为了确定抗生素排放标准,必须了解在复杂的

微生物群落中选择抗性菌生长的抗生素最小选择浓度.有人使用两种竞争性抗性基因型设计了一个简化的实验室实验,发现 $100 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 的抗生素浓度仍然可以选择抗性菌^[62].但是,这种方法不能解决实际环境问题.从环境管理的角度,需要建立一种可以有效表达微生物生态系统对不同水平抗生素的响应的方法.

此外,有关抗生素和抗药基因高效控制技术的研究也比较少见.对于抗生素的控制来说,由于抗生素作用目标本身就是细菌,所以,利用以细菌为主体的常规生物处理技术进行抗生素的降解难度很大,而且会导致在水处理过程中产生大量的抗药基因.以臭氧为代表的化学氧化技术可以有效削减土霉素等抗生素含量,但在处理过程中会产生具有较强毒性的未知中间产物^[63-64].有人研究了厌氧消化或堆肥等处置方式对于不同的畜禽养殖粪便中四环素类抗生素的去除效果,发现半衰期最长为 105 d(金霉素,猪粪),最短为 1 d(金霉素,火鸡厩肥)^[65-66].总体来看,现有的各种技术在抗生素的去除方面效果都不是很理想,而针对含有极高浓度抗生素的废弃菌渣如何处理还未见报道.因此,需要根据抗生素的结构和化学性质,开发出安全有效的抗生素控制技术,以满足抗生素行业可持续发展的需求.

在关于抗药基因控制技术方面的研究更少.Ghosh 等发现,常温厌氧消化很难削减城市污水厂剩余污泥中四环素抗药基因(*tet*(A), *tet*(O)和 *tet*(X))和 I 型整合子,而高温厌氧消化则比较有效^[67].对于处理水中抗药基因的去除,最佳的策略是与常规的消毒技术如紫外、氯气等的结合.常规的消毒技术其目标是使细菌等微生物灭活,但目前还不知道灭活后的抗药基因是否还有可能转移到细菌中.因此,最佳的策略是源头控制,即在废水进入生物处理系统之前定向去除抗生素,消除抗药基因产生和传播的条件.

本课题组是国际上最早关注抗生素生产过程中高浓度抗生素及抗药基因排放问题的研究小组之一,自 2005 起,以土霉素、青霉素这两类大宗原料药为对象开展系统研究,发现抗生素生产废水处理系统中存在远高于一般环境中浓度的抗生素,从该系统中筛选到的细菌不仅具有高比例的抗药菌,而且其耐药性也非常强^[14,17-19],抗生素生产废水处理系统出水和剩余污泥是抗生素、抗药菌和抗药基因排放的一个重要来源,应该从行业的角度进行科学的管理^[64,68-71],这些工作的开展为本课题组即将进行的研究提供了重要的科学依据和技术基础.

6 拟开展研究及展望

本课题组将以使用量大的几种发酵类和一种化学合成类抗生素的代表性生产过程为对象,系统评估含抗生素废水处理系统抗生素与抗药基因的排放特征,深入研究抗生素胁迫下抗药基因的水平转移机制,通过评估抗生素最小选择浓度来确定各种抗生素的允许排放浓度,并探索建立针对废水处理全过程的抗生素及抗药基因控制的多级屏障,为抗药基因的污染控制提供全面系统的科学基础.在国际上加强对药品生产过程中环境风险控制的呼声越来越高的当今,明确抗生素生产过程中抗生素和抗药基因的排放特征,建立科学地评估制药行业污染排放风险的方法,并提出控制抗生素抗性发展的可行的技术方案,不仅具有重要的环境与健康意义,对于支撑我国制药产业的可持续发展也意义重大.

参 考 文 献

- [1] Teuber M. Veterinary use and antibiotic resistance [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2001, 4(5): 493-499
- [2] Sarmah A K, Meyer M T, Boxall 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
- [3] Vanderstichele R H, Elseviers M M, Ferech M, et al. Hospital consumption of antibiotics in 15 European countries: results of the ESAC retrospective data collection (1997—2002) [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2006, 58(1): 159-167
- [4] Renew J E, Huang C H. Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1042(1/2): 113-121
- [5] Lee H B, Peart T E, Svoboda M L. Determination of ofloxacin, norfloxacin, and ciprofloxacin in sewage by selective solid-phase extraction, liquid chromatography with fluorescence detection, and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1139(1): 45-52
- [6] Gaze W H, Krone S M, Larsson D J, et al. Influence of humans on evolution and mobilization of environmental antibiotic resistance [J]. *Emerging Infect. Dis*, 2013, DOI: 10.3201/eid1907.120871. (Published Online)
- [7] Szczepanowski R, Linke B, Krahn Irene, 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]. *Microbiol-Sgm*, 2009, 155: 2306-2319
- [8] 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]. *Environ Sci Technol*, 2010, 44:6933-6939
- [9] Zhu Y G, Johnson T A, Su J Q, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2013, 110(9):3435-3440
- [10] Kim S R, Lisa N, Satoru S, et al. Occurrence of tetracycline resistance genes *tet*(M) and *tet*(S) in bacteria from marine aquaculture sites[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 237(1):147-156
- [11] Andrew B, Shapir N, Michael J S, et al. Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, *Nonselected*, and nonclinical *escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources [J]. *Appl. Environ. Microbiol*, 2004, 70(4): 2503-2507
- [12] D' Costa V M, King C E, et al. Antibiotic resistance is ancient[J]. *Nature*, 2011, 477:457 - 461
- [13] Segawa T, Takeuchi N, Rivera A, et al. Distribution of antibiotic resistance genes in glacier environments [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2012, 5(1):127 - 134
- [14] Li D, Yang M, Hu J, et al. Determination and fate of oxytetracycline and related compounds in oxytetracycline production wastewater and the receiving river[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2008, 27(1): 80-86
- [15] Larsson D, de Pedro C, Paxeus N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals [J]. *J Hazard Mater*, 2007, 148(3): 751-755
- [16] Fick J, Söderström H, Lindberg R H, et al. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2009, 28(12): 2522-2527
- [17] Li D, Yang M, Hu J Y, et al. Antibiotic-resistance profile in environmental bacteria isolated from penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river [J]. *Environ Microbiol*, 2009, 11(6): 1506-1517
- [18] Li D, Yu T, Zhang Y, et al. Antibiotic resistance characteristics of environmental bacteria from an oxytetracycline production wastewater treatment plant and the receiving river [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(11): 444-3451
- [19] 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]. *Environ Sci Technol*, 2012, 46(14): 7551-7557
- [20] Mariya M, Kelvin W, Irene X. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan [J]. *Water Research*, 2011, 45(2):681-93
- [21] Murray-Smith R J, Coombe V T, Gronlund M H, et al. Managing Emissions of Active Pharmaceutical Ingredients from Manufacturing Facilities: An Environmental Quality Standard Approach [J]. *Integr Environ Assess Manag*, 2011, 8(2):320-330
- [22] Fluit Ad C, Visser M R, Schmitz F J. Molecular detection of antimicrobial resistance [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2001, 14(4): 836-871
- [23] Recchia G D, Hall RM. Gene cassettes: a new class of mobile element [J]. *Microbiol*, 1995, 141: 3015-3027
- [24] Mingeot-Leclercq M P, Glupczynski Y, Tulkens P M. Aminoglycosides: Activity and resistance [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(4):727-737
- [25] Paterson D L, Bonomo R A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18(4):657-686
- [26] Livermore D M. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance [J]. *Clin Microbiol Rev*, 1995, 8(4): 557-584
- [27] Ambler R P. The structure of β -lactamases [J]. *Philos Trans R Soc London Ser B*, 1980, 289(1036): 321-331
- [28] Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structures [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39: 1211-1233
- [29] 顾觉奋. 国内外微生物药物生产状况及市场分析 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2011:63-122
- [30] Roberts M C. Update on acquired tetracycline resistance genes [J]. *Fems Microbiol let*, 2005, 245(2):195-203
- [31] Paulsen I T, Brown M H, Skurray R A. Proton-dependent multidrug efflux systems [J]. *Microbiol Rev*, 1996, 60(4):575-608
- [32] Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2001, 65(2): 232-260
- [33] Tauch A, Puhler A, Kalinowski J, et al. Tet Z, a new tetracycline resistance determinant discovered in gram-positive bacteria, shows high homology to gram-negative regulated efflux systems [J]. *Plasmid*, 2000, 44(3):285-291
- [34] Spahn C M, Blaha G, Agrawal R K, et al. Localization of the ribosomal protection protein Tet(O) on the ribosome and the mechanism of tetracycline resistance [J]. *Mol Cell*, 2001, 7(5): 1037-1045
- [35] Li W, Atkinson G C, Thakor N S, et al. Mechanism of tetracycline resistance by ribosomal protection protein Tet(O) [J]. *Nat Commun*, 2013, 4:1477
- [36] Yang W, Moore I F, Koteva K P, et al. Tet X is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(50): 52346-52352
- [37] Roberts M C. Resistance to macrolide, lincosamide, streptogramin, ketolide, and oxazolidinone antibiotics. *Mol Biotechnol* [J], 2004, 28(1): 47-62
- [38] Mingeot-Leclercq M P, Tulkens P M. Aminoglycosides: nephrotoxicity [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(5): 1003-1012
- [39] Frost L S, Lepiae R, Summers A O, et al. Mobile genetic elements: The agents of open source evolution [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3: 722-732
- [40] Courvalin P. Transfer of Antibiotic Resistance Genes between Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994, 38(7): 1447-1451

- [41] Seveno N A, Dimitris K, Smalla K, et al. Occurrence and reservoirs of antibiotic resistance genes in the environment [J]. Rev Med Microbiol, 2002, 13(1): 15-27
- [42] Davison J. Genetic exchange between bacteria in the environment [J]. Plasmid, 1999, 42(2):73-91
- [43] Kristiansson E, Fick J, Janzon A, et al. Pyrosequencing of antibiotic- contaminated river sediments reveals high levels of resistance and gene transfer elements [J]. PLoS ONE, 2011, 6(2): e17038
- [44] Al-Masaudi S B, Day M J, Russell A D. Effect of some antibiotics and biocides on plasmid transfer in *Staphylococcus aureus* [J]. J Appl Bacteriol, 1991, 71(3): 239-243
- [45] Ohlsen K, Ternes T, Werner G, et al. Impact of antibiotics on conjugational resistance gene transfer in *Staphylococcus aureus* in sewage [J]. Environ Microbiol, 2003, 5(8):711-716
- [46] Larsson D. Emissions from the pharmaceutical industry affects the environment. Antibiotic emissions also jeopardizes our own health [J]. Läkartidningen, 2012, 109(14/15): 750-753
- [47] Schlüter A, Szczepanowski R, Pühler A, et al. Genomics of *IncP-1* antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool [J]. FEMS Microbiol Rev, 2007, 31(4): 449-477
- [48] Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution [J]. Nat Rev Microbiol, 2006, 4: 608-620
- [49] Gillings M, Boucher Y, Labbate M, et al. The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance [J]. J Bacteriol, 2008, 190(14): 5095-5100
- [50] Guerin E, Cambray G, et al. The SOS response controls integron recombination [J]. Science, 2009, 324(5930):1034
- [51] Christine M, et al. SOS Response induction by β -lactams and bacterial defense against antibiotic lethality [J]. Science, 2004, 305(5690):1629-1631
- [52] Sandra D R, Garnier F, Guerin E, et al. The SOS response promotes *qnrB* quinolone-resistance determinant expression [J]. EMBO Rep, 2009, 10(8): 929-933
- [53] Toleman M A, Bennett P M, Walsh T R. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2006, 70(2):296-316
- [54] Trine M, L'Abée L, Sørum H. Class 1 integrons mediate antibiotic resistance in the fish pathogen *aeromonas salmonicida* worldwide [J]. Microbial Drug Resistance, 2001, 7(3): 263-272
- [55] Szczepanowski R, Bekel T, Thomas G, et al. Insight into the plasmid metagenome of wastewater treatment plant bacteria showing reduced susceptibility to antimicrobial drugs analysed by the 454-pyrosequencing technology [J]. J Biotechnol, 2008, 136(1/2):54-64
- [56] Nacke H, Thürmer A, Wollherr A, et al. Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils [J]. PloS one, 2011, 6(2): e17000
- [57] Qian P Y, Wang Y, Lee O O, et al. Vertical stratification of microbial communities in the Red Sea revealed by 16S rDNA pyrosequencing [J]. ISME Journal, 2011, 5: 507-518
- [58] Ley R E, Hamady M, Lozupone C, et al. Evolution of mammals and their gut microbes [J]. Science, 2008, 320: 1647-1651
- [59] McLellan S, Huse S, Mueller-Spitz S, et al. Diversity and population structure of sewage-derived microorganisms in wastewater treatment plant influent [J]. Environmental microbiology, 2010, 12(2): 378-392
- [60] Zhang T, Shao M F, Ye L. 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants [J]. The ISME Journal, 2011, 6(6): 1137-1147
- [61] Zhang T, Zhang X X, Ye L. Plasmid metagenome reveals high levels of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge [J]. PLoS ONE, 2011b, 6: e26041
- [62] Gullberg E, Cao S, Berg O G, et al. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations [J]. PLoS Pathog, 2011, 7(7): e1002158
- [63] Dodd M C, Buffle M O, Gunten U V. Oxidation of antibacterial molecules by aqueous ozone: moiety-specific reaction kinetics and application to ozone-based wastewater treatment [J]. Environ Sci Technol, 2006, 40(6):1969-1977
- [64] Li K, Yediler A, Yang M, et al. Ozonation of oxytetracycline and toxicological assessment of its oxidation by-products [J]. Chemosphere, 2008, 72: 473-478
- [65] Winckler C, Grafe A. Use of veterinary drugs in intensive animal production: Evidence for persistence of tetracycline in pig slurry [J]. J Soil Sediment, 2001, 1: 1614-7480
- [66] Dolliver H, Gupta S, Noll S. Antibiotic degradation during manure composting [J]. J Environ Qual, 2008, 37(3):1245-1253
- [67] 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]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 84(4): 791-796
- [68] Li D, Yang M, Hu J, et al. Determination of penicillin G and its degradation products in a penicillin production wastewater treatment plant and the receiving river, Water Research [J], 2008, 42(1/2): 307-317
- [69] Liu M M, Zhang Y, Ding R, et al. Response of activated sludge to the treatment of oxytetracycline production waste stream [J]. Appl Microbiol Biotechnology, 2013, 97(19): 8805-8812
- [70] Zhang Y, Xie J P, Liu M M, et al. Microbial community functional structure in response to antibiotics in pharmaceutical wastewater treatment systems [J]. Water Research, 2013, 47(16): 6298-6308
- [71] Liu M M, Ding R, Zhang Y, et al. Abundance and distribution of Macrolide-Lincosamide-Streptogramin resistance genes in an anaerobic-aerobic system treating spiramycin production wastewater [J]. Water Research, 2014, 63: 33-41