

IV型分泌系统及其对细菌重金属抗性的影响

伍燕梅, 岳彦博, 罗茂春, 鲁小璐*

中国地质大学(武汉)环境学院, 湖北 武汉 430074

伍燕梅, 岳彦博, 罗茂春, 鲁小璐. IV型分泌系统及其对细菌重金属抗性的影响[J]. 微生物学通报, 2024, 51(5): 1460-1470.

WU Yanmei, YUE Yanbo, LUO Maochun, LU Xiaolu. Roles of the type IV secretion systems in bacterial resistance to heavy metals[J]. Microbiology China, 2024, 51(5): 1460-1470.

摘要: IV型分泌系统(type IV secretion system, T4SS)是广泛存在于细菌中的特殊蛋白分泌系统, 不同于其他分泌系统, 该系统不仅能够转运蛋白质, 还能转移 DNA、DNA-蛋白质复合物。因此, T4SS 具有多种生物学特性。T4SS 能介导细菌的接合作用, 而接合是水平基因转移(horizontal gene transfer, HGT)的重要机制之一, 细菌能够利用 T4SS 介导的接合作用转移大部分可移动基因元件(mobile genetic element, MGE), 如接合型质粒和整合性元件, 从而使细菌获得新的基因, 这些辅助基因在特定环境条件下有益于帮助细菌获得新功能, 有助于细菌在新环境中占据生态位, 极大地促进了细菌对环境条件变化的适应性。本文主要对细菌 T4SS 的生物学作用研究进展进行综述, 并探讨了 T4SS 在细菌适应重金属环境中的作用。

关键词: 细菌; IV型分泌系统; 水平基因转移; 重金属抗性

Roles of the type IV secretion systems in bacterial resistance to heavy metals

WU Yanmei, YUE Yanbo, LUO Maochun, LU Xiaolu*

School of Environmental Studies, China University of Geosciences (Wuhan), Wuhan 430074, Hubei, China

Abstract: The type IV secretion systems (T4SSs) are ubiquitous and versatile in bacteria, capable of transporting proteins, DNA, and protein-DNA complexes. Bacterial conjugation is a key mechanism of horizontal gene transfer. T4SSs can mediate the transfer of conjugative plasmids or integrative elements from one bacterium to another, which endow bacteria with new genes and functions. The acquisition of genes in this way not only enables bacteria to gain new functions but also helps them occupy niches, promoting the adaptation of bacteria to a new or

资助项目: 国家自然科学基金(42077220)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (42077220).

*Corresponding author. E-mail: luxiaolu@cug.edu.cn

Received: 2023-07-07; Accepted: 2023-12-18; Published online: 2024-02-19

changing environment. This article summarizes the roles of T4SSs, especially in bacterial adaptation to heavy metal-polluted environments.

Keywords: bacteria; type IV secretion system; horizontal gene transfer; heavy metal resistance

细菌利用I–VII型七大分泌系统介导与外界环境的互作。其中, IV型分泌系统(type IV secretion system, T4SS)是一种多功能、多种蛋白复合而成, 横跨细菌细胞内膜和外膜的通道结构^[1]。T4SS广泛存在于革兰氏阴性菌中, 在一些革兰氏阳性菌、无壁细菌和泉古菌门的某些古菌中也有报道^[2]。与细菌中已发现的其他分泌系统不同, T4SS形成的管道既能转移DNA, 又能转运蛋白质, 因此可以行使多种生物学功能^[3]。其中, T4SS介导的接合作用是水平基因转移(horizontal gene transfer, HGT)机制之一, 细菌的T4SS能够通过接合作用转移大部分可移动基因元件(mobile genetic element, MGE), 进而散播耐药性和致病性等重要的生物学性状^[4]。T4SS的存在能提高细菌基因组的可塑性, 有利于其对环境的适应。本课题组的前期研究发现T4SS的活性能显著影响锑耐受细菌 *Bosea* sp. AS-1 对锑污染的耐受能力, 且锑的存在会明显提高菌株AS-1中T4SS系统相关基因的表达。这些都说明T4SS可能帮助提高细菌对锑污染环境的适应性^[5]。同时, T4SS还可能通过促进水平基因转移的方式加剧抗生素抗性基因在锑污染地区的传播, 从而进一步影响锑污染地区的生态环境^[6]。下面我们就T4SS的结构与功能进行简要的综述。

1 IV型分泌系统的结构

IV型分泌系统结构的研究始于大约20年前, 最初仅有一些高度保守T4SS亚基的X射线结构被报道。在随后的10年里, 利用单粒子电子显微镜和晶体学观察到了来自R388和

pKM101质粒接合系统更大的组件结构^[7]。近年来, 冷冻电子显微镜技术的发展使得人们能够在细菌细胞膜天然环境中可视化更大的子组件和完整的T4SS系统结构^[8–10]。这些方法与最先进的荧光显微镜相结合, 为完整细胞中T4SS组装动力学和空间组织结构提供了新的发现^[10–12]。

T4SS的典型结构是存在于根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)中的VirB/D4系统, 是一个由VirB1–VirB11和VirD4这12种蛋白组成的多蛋白复合体的跨膜通道结构(图1)。

该通道由一个横跨内膜的蛋白复合体和一个位于细胞质和外膜的核心蛋白复合体组成^[13]。内膜蛋白复合体(intimal membrane complex, IMC)由VirB3、VirB6、VirB8和VirB10的N端区域组成, 与通道稳定相关的VirB4 ATPase也被作为是内膜蛋白复合体的一部分^[13–14]。其中, VirB6是一种内膜蛋白, 对底物分泌至关重要^[15]。VirB8为其他VirB蛋白质和DNA底物提供了潜在的结合位点, 促进了可移动基因元件的水平转移^[16]。外膜核心蛋白复合体(outer membrane core complex, OMCC)通过桶状结构与内膜蛋白复合体连接, 该复合体由脂蛋白VirB7、VirB9和VirB10的C端结构域组成^[13,17], 其中, VirB7和VirB9形成异二聚体, 并与VirB6相互作用形成通道结构。VirB10与CP蛋白的N末端相互作用而发挥功能, 有研究发现, VirB10仅存在于革兰氏阴性菌内, 在革兰氏阳性菌和古细菌中尚未发现^[1]。三个高度保守的内膜结合ATPase-VirB4、VirB11和VirD4构成细胞质能量中心, 为整个转运过程提供能量^[1,4]。在这些ATPase中, VirD4作为DNA或蛋白质进入易位通道之前的结合

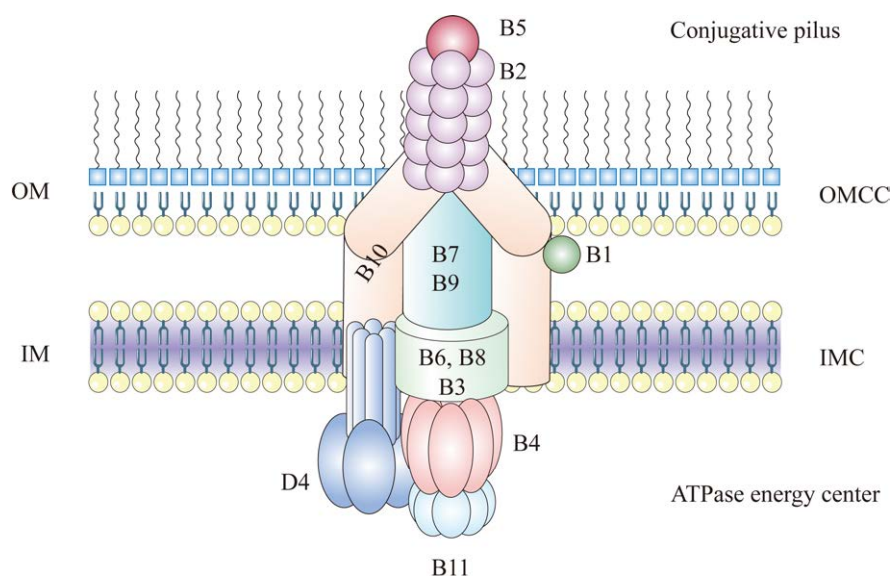


图1 根癌农杆菌的IV型分泌系统结构模式图^[7] OM: 外膜; IM: 内膜; OMCC: 外膜核心复合物; IMC: 内膜复合物

Figure 1 Structural pattern diagram of the type IV secretion system of *Agrobacterium tumefaciens*^[7]. OM: Outer membrane; IM: Inner membrane; OMCC: Outer membrane core complex; IMC: Inner membrane complex.

受体,在接合作用中发挥着关键作用^[18-19]。VirB4可以促进菌毛产生^[20]。VirB1和VirB11共同产生结合配对形成(mating pair formation, Mpf)蛋白,形成接合通道^[21]。此外, VirB2和VirB5共同构成胞外菌毛, VirB2在物质交换中起主要作用,是菌毛的主要成分; VirB5主要“收集”需要交换的底物,是菌毛的次要成分^[22-23]。多数T4SS菌毛是管状结构,可能作为底物在供体与受体之间进行转运的通道,其黏附特性可能有助于革兰氏阴性病原菌定殖宿主细胞^[24]。

2 IV型分泌系统的生物学功能

IV型分泌系统是一种多功能的蛋白分泌系统,既能转移DNA,又能转运蛋白质,主要介导细菌的接合作用,转运效应蛋白,摄取或释放DNA,在细菌的毒力、耐药性、环境适应性等方面发挥重要作用^[3]。其中,接合作用是水平基因转移的重要机制之一,细菌能够利用自

身编码的T4SS接合转移大多数MGE,如接合型质粒和整合性接合元件,进而散播耐药性和致病性等重要的生物学性状^[4]; T4SS也参与转运效应蛋白质分子,致病菌可以通过T4SS转运毒素蛋白;非致病菌也能利用T4SS向外界分泌蛋白质,与周围环境进行物质能量交换或是与其他细菌进行信息传递,帮助其适应环境。此外,近年也有研究表明T4SS的活性与生物膜的形成有关,并可能帮助细菌抵抗环境压力。

2.1 介导细菌间的接合作用

介导接合作用的T4SS可以由接合性质粒或整合性接合元件(如接合性转座子或细菌基因组上的致病岛)编码^[1]。最近在具有多种耐药性的粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)中的染色体上也发现了编码T4SS的基因,并能够介导该菌全基因组的转移^[25]。这些系统存在于大多数革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌中,一些古菌中也存在着接合性质粒^[26]。细菌中这些MGE的

存在能帮助细菌获得更好的适应性,而从临床角度来看,则可能会造成严重的细菌耐药性^[27]。自1982年发现了具有编码四环素抗性基因的25.2 MD接合质粒后,目前国际上发现的具有四环素耐药性的淋病奈瑟球菌(*Neisseria gonorrhoeae*)普遍含有25.2 MD质粒,这暗示着25.2 MD接合质粒在细菌间的转移是造成四环素耐药性快速传播的重要原因之一^[28]。1972年首次分离出了具有氨苄西林耐药性的菌株,这些菌株很快便获得了对四环素、红霉素、氯霉素以及其他多种抗生素的耐药性并在世界范围内迅速传播^[29]。过去30年中,有多株多重耐药性的霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)被报道,其耐药性的出现很大程度上归因于MGE的传播^[30]。细菌耐药性的快速传播与T4SS介导的接合作用密切相关,抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARG)通过T4SS在细菌之间的转移促进了多耐药和泛耐药细菌的加速出现^[4]。最近,一株分离自病人体内的巴西短殖单胞菌(*Brevundimonas brasiliensis*)的基因组上包含T4SS型的整合接合性元件、可移动整合元件和一些插入序列,暗示着这些MGE在细菌的耐药性的发展和传播中发挥着重要作用^[31]。流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)的基因岛组ICEHin1056也编码T4SS,被报道与基因岛组的传播有关^[29]。因此,细菌间的接合作用是抗生素耐药性在整个微生物种群中传播背后的驱动力。

2.2 传递效应蛋白至靶细胞

T4SS也参与转运效应蛋白质分子,将效应蛋白或其他大分子直接输送到靶细胞的细胞质中,这些蛋白通常是毒力蛋白、参与病原菌与宿主相互作用的蛋白^[32],以帮助细菌在宿主细胞或组织内生存和定殖。引起肺炎的嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)利用Dot/Icm T4SS系统将吞噬体转化为“包含嗜肺军团菌囊泡

(legionella-containing vacuole, LCV)”,以避免被宿主杀死^[33]。导致胃癌的幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)利用其Cag致病岛编码的T4SS向宿主细胞分泌一种称为CagA的效应因子,改变细胞信号并触发炎症反应^[34]。引起人畜Q热的贝纳柯克斯体(*Coxiella burnetii*)利用其T4SS将多种效应蛋白转运到宿主细胞中,这些蛋白通过操纵不同的细胞过程,使该菌能在宿主细胞中建立感染并完成发育周期^[35]。T4SS在布鲁氏菌(*Brucella*)的毒力中也发挥重要作用,对其在宿主细胞内的生存和繁殖至关重要。在沙门氏菌(*Salmonella*)、嗜肺军团菌和假单胞菌(*Pseudomonas*)中还发现了III型分泌系统(type III secretion system, T3SS)与T4SS的组合,它们是一些病原菌致病的关键毒力因子^[36-37]。由此可见,T4SS效应蛋白转运系统通常对细菌毒力的发挥有重要作用。

2.3 识别并转运 ssDNA

接合系统和效应蛋白转运系统通常需要细胞间的直接接触。然而,少数T4SS能独立于靶细胞相互作用,导入外源DNA或将DNA或蛋白质输出到环境中^[38-39]。目前的研究仅限于幽门螺旋杆菌的ComB T4SS和淋病奈瑟球菌的DNA释放系统^[1]。幽门螺旋杆菌因为其有效的毒力因子和菌株间的高度遗传变异成为普遍存在的人类病原体,幽门螺旋杆菌有4个T4SS,可用于分泌效应蛋白、接合作用和与环境交换DNA^[40]。ComB T4SS能帮助其获得外源DNA进行自然转化,并通过其基因组中存在的假定接合T4SS基因簇进行DNA交换。随着幽门螺旋杆菌中越来越多的可移动质粒和噬菌体被发现,科学家们认为接合作用和转导作用也可能导致幽门螺旋杆菌的遗传多样性^[41-42]。淋病奈瑟球菌基因岛(gonococcal genetic island, GGI)能够编码T4SS,并通过T4SS分泌ssDNA到胞

外,使遗传信息传递到其他属的菌株;并且分泌的 ssDNA 还参与了生物被膜形成的初始阶段,使得淋病奈瑟球菌在宿主细胞感染期间能够独立生存^[43]。

2.4 参与生物膜的形成

在一些致病菌的研究中,T4SS 的活性与生物膜的形成有关,并可能帮助细菌抵抗环境压力。如在黏附性大肠杆菌(adherent invasive *Escherichia coli*, AIEC)定殖肠道表皮细胞的过程中,T4SS 会促使 AIEC 形成生物膜,促进 AIEC 在肠道中生存^[44];幽门螺旋杆菌生物膜形成过程中的转录组分析也发现编码 T4SS 和鞭毛的相关基因会上调^[45]。引起水稻细菌性褐条病的水稻嗜酸菌(*Acidovorax oryzae*) RS-2 的 T4SS 某些基因的突变会引起细菌生长、运动、生物膜形成和过氧化氢耐受性的差异,影响该菌对水稻幼苗的致病性^[46]。

3 T4SS 系统与细菌的耐药性和重金属抗性

水平基因转移在细菌适应极端环境方面发挥着关键作用。水平基因转移主要通过接合、转化、转导,以及囊泡或病毒样颗粒介导的转移等途径^[47](图 2)。T4SS 介导的接合作用是水平基因转移的一个重要途径,它能提高基因组的可塑性,使细菌获得抗生素抗性基因、毒力基因或者其他提高环境适应性的代谢相关基因,有助于细菌进化。

T4SS 接合系统在传播 MGE 方面发挥着重要作用,MGE 通常编码对重金属或抗生素的抗性,并且在系统发育上相距较远的细菌之间很容易交换,利用不同的接合系统在微生物群落之间转移^[48-49]。环境中的各种 ARG 和重金属抗性基因(heavy metal resistance gene, HMRG)可

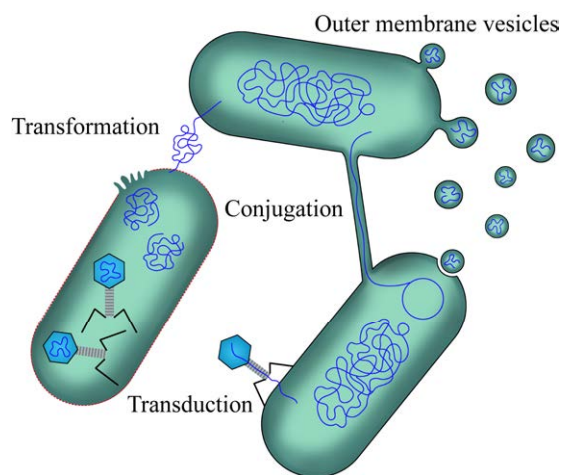


图 2 水平基因转移机制^[47]

Figure 2 Horizontal gene transfer mechanism^[47].

以借助整合子、转座子、质粒、病毒和囊泡等结构通过上述途径在环境中传播和扩散^[50-52]。

3.1 T4SS 系统与细菌耐药性的关系

世界卫生组织(World Health Organization, WHO)发布报告称,抗生素耐药性细菌正蔓延至全球各地。细菌的耐药性是细菌进化选择的结果,抗生素的滥用加剧了细菌耐药性的产生,严重危害生态系统和人体健康。环境中的抗生素主要来源于生活污水、医疗废水,以及动物饲料和水产养殖废水排放等。细菌耐药性的产生主要归因于 ARG 的传播。ARG 是一种新型且在环境中长期存在的污染物,细菌中携带 ARG 的 MGE (如质粒、整合子以及转座子等)可在菌株间发生水平基因转移,并且菌株死亡后携带 ARG 的 DNA 能在环境中长期存在。

水平基因转移是 ARG 的主要传播方式^[53]。其中,接合转移又是最主要的水平转移机制,ARG 通过 MGE 在微生物之间传播^[54]。然而,T4SS 与 DNA 的接合转移密切相关,大多数接合质粒和整合型接合元件通过 T4SS 进行传播。Tang 等^[20]在研究畜牧废水中残留的抗生素对厌氧消化过程中 ARG 去除的机制时,发现低浓度

的抗生素(0.5 mg/L)会加剧细菌的 ROS 和 SOS 反应,促进 ARG 的形成;他们利用宏基因组学还发现低浓度的抗生素还可能通过促进菌毛、通讯反应和 T4SS 相关基因来促进 ARG 的传播。Liu 等^[55]从动物病变器官中分离出 24 株具有多耐药或泛耐药性的大肠杆菌(*Escherichia coli*),其中菌株 J-8 T4SS 的 *virB6* 和 *traI* 基因分别被位于 IncX4 和 IncHI2/HI2A/N 型质粒上的插入序列 IS2 和 IS100 破坏,影响了质粒接合转移的效率。此外, Wang 等^[56]在研究用紫外线照射处理后的城市废水中的耐药菌和 ARG 的过程中,发现低浓度的氯(0.5 mg/L)可以增加耐药菌之间质粒接合转移的频率,而该过程中 T4SS 的 *vir4D*、*virB5* 和 *virB10* 的 mRNA 表达水平明显增强。

除了抗生素以外,环境中的某些重金属也可以通过共选择机制(包括交叉抗性、共抗性和共调控机制)来促进细菌 ARG 的传播^[57]。环境中低浓度的重金属通过促进 ARG 的水平转移促进了抗生素抗性现象。Lin 等^[58]的研究发现

0.5 mmol/L Pb、0.1 mmol/L As 和 0.005 mmol/L Hg 能明显促进 ARG 在污泥细菌中的迁移。环境中低浓度的 Cu(II)、Ag(I)、Cr(VI)和 Zn(II)会引起接合系统相关基因表达的改变,从而促进了 ARG 在 *E. coli* 之间的转移^[59]。He 等^[60]发现农田中的重金属可能通过共选择效应促进四环素抗性基因 *tet(X3)*和 *tet(X4)*在环境中传播。Zhao 等^[61]发现砷(As)与 ARG 含量之间存在显著的正相关关系,表明砷可能通过共选择机制促进 ARG 在土壤中的扩散。类似地,本课题组采集了湖南省冷水江市锡矿山锑(Sb)污染地区的土壤和水体样本,并对样品中的锑或砷浓度与 ARG 类型进行相关性分析发现,发现样品中的锑或砷浓度与大部分 ARG 类型存在显著的正相关关系^[6](图 3)。此外,本课题组分离自锡矿山的尾矿样品中的砷锑氧化细菌 *Bosea* sp. AS-1 的转录组结果显示,当锑存在时, T4SS 相关的大部分基因显著上调,这表明锑污染可能会通过激活耐锑细菌中的 T4SS 促进 ARG 在

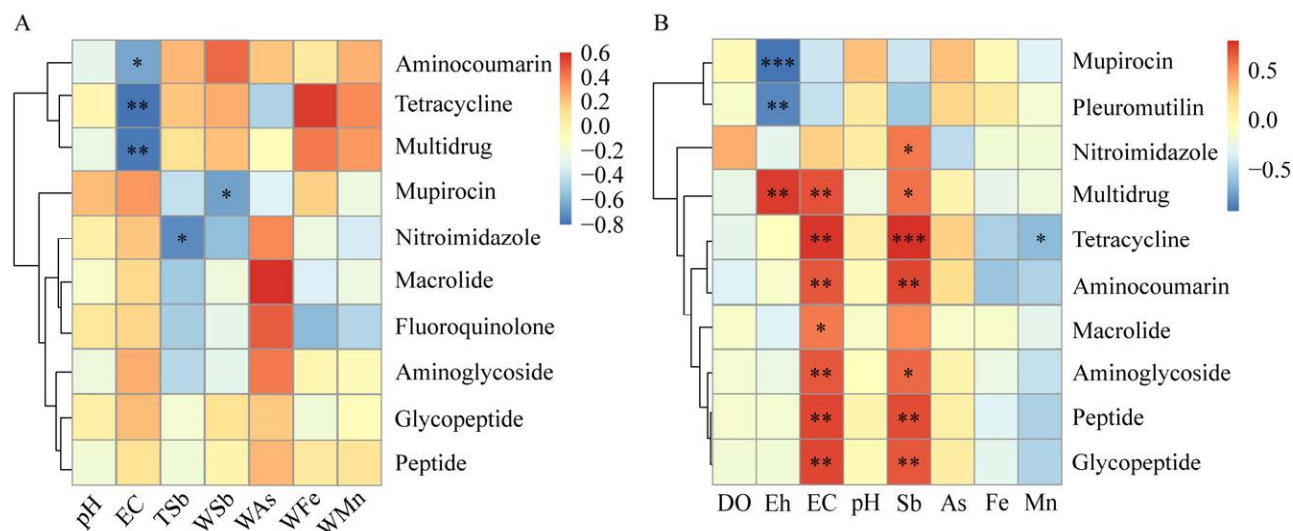


图 3 锡矿山样品中抗生素抗性基因类型与理化因子的相关性热图 A: 土壤样品. B: 水体样品

Figure 3 Heat map of the correlation between antibiotic resistance gene types and physicochemical factors in Xikuangshan samples. A: Soil samples. B: Water samples. EC: Electrical conductivity; TSb: Total Sb; WSb: Water-soluble Sb; WAS: Water-soluble As; WFe: Water-soluble Fe; WMn: Water-soluble Mn; Eh: Oxidation-reduction potential. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

环境中的扩散, 从而进一步加剧镉污染地区的环境问题^[5]。

越来越多证据表明, 非致病性的环境微生物是 ARG 的宿主, 这些微生物可能最终将这些 ARG 通过水平基因转移给病原菌, 导致更严重的细菌耐药性^[62]。

3.2 T4SS 系统与细菌重金属抗性的关系

自然界中重金属主要存在于土壤和岩石之中, 通过风化侵蚀、地热运动、火山爆发和微生物活动释放到各种环境中。然而, 人类活动加速了重金属元素的释放过程, 导致重金属在全球范围内扩散加剧, 从而对人类和生态系统健康构成巨大威胁^[63]。重金属稳定存在于环境中, 并且能够直接作用于微生物细胞结构, 或通过改变环境条件间接影响细胞, 进而产生毒性效应。长期存在于环境中的重金属可作为选择压力刺激微生物的自我防御机制, 它们通过生物解毒对重金属毒性产生抗性, 能够在重金属污染的环境中生长繁殖^[64]。微生物的重金属抗性机制普遍与微生物细胞对重金属的生物吸附、胞外沉淀、生物转化、生物积累和外排作用相关^[64]。HMRGs 通过编码重金属转运蛋白、参与重金属解毒过程、参与重金属耐受信号转导等功能赋予微生物重金属抗性, 近年的研究显示某些 HMRGs 的传播可能与水平基因转移或与 T4SS 介导的接合作用有潜在联系^[5]。

砷和镉被归为类金属元素, 又因为砷和镉的毒性和重金属相近, 所以被列入重金属研究的对象。尽管砷和镉具有毒性, 但不少微生物却能够耐受高浓度的砷或镉, 然而对于微生物的耐砷或耐镉机制却不完全清楚。很多围绕着砷镉耐受细菌的基因组学分析都推测, 一些细菌对砷或镉的抗性可能来自于基因的水平转移过程。Yu 等^[65]在柠檬酸杆菌(*Citrobacter portucalensis*) Sb-2 中就发现了其砷镉抗性基因可由其基因组

上的原噬菌体序列编码。土壤细菌中砷甲基化基因的普遍存在表明细菌中砷抗性基因的传播可能与水平基因转移有关^[66]。Li 等^[67]在铜矿中分离出的一株黏液杆菌(*Mucilaginibacter*)可能通过 T4SS 系统接合转移具有 HMRGs 的质粒或基因岛, 使得菌群具有重金属抗性。本课题组对一株砷镉耐受细菌 *Bosea* sp. AS-1 的基因组分析显示, 其质粒上具有编码多种重金属耐受、砷镉耐受及与转化、细菌分泌途径相关的基因^[68], 而后对菌株 AS-1 在 As(III)或 Sb(III)存在时的转录组进行了测序, 通过对比差异表达基因, 发现砷或镉存在时, 菌株 AS-1 的转录谱存在明显差异, 其中 T4SS 相关基因(均定位于质粒)的表达差异非常显著。在 As(III)存在时, T4SS 相关的大部分基因的表达被显著下调, 而在 Sb(III)的存在时, T4SS 相关的大部分基因则显著上调^[5]。在加入 T4SS 的抑制剂粗糠柴苦素(rottlerin, 100 mg/L, 经检测不会影响细菌生长)后, 镉耐受能力从 200 mmol/L 下降至 50 mmol/L 以下, 这些结果表明 T4SS 对菌株 AS-1 的镉抗性具有重要意义^[5]。

T4SS 能介导 MGE 在细菌群落中转移, 而 HMRGs 和 ARG 常在同一个 MGE 上被发现, 暗示着 T4SS 在一定程度上能促进 HMRGs 和 ARG 在微生物群落中传播。

然而, 目前有关细菌的 T4SS 与其对重金属环境的适应尚有许多不明之处, 如不同重金属对细菌 T4SS 基因表达的影响如何, 镉究竟如何促进 T4SS 基因表达, 重金属污染环境中通过 T4SS 介导的 ARG 和 HMRGs 传播在所有水平基因转移中占比多少等。对这些问题的解答, 将有助于我们更深刻地理解重金属污染环境中水平基因转移过程对细菌的适应性的影响及其可能导致的环境问题, 并有助于我们对重金属污染环境进行科学管理与治理。

4 总结

T4SS 多样性的功能和结构已经在不同的细菌中有详细的研究。T4SS 具有多样的生物学功能, 可通过促进抗性基因水平转移、参与生物膜的形成等方面增加细菌对环境的适应能力。然而, 目前大量的研究仍局限于细菌耐药性、细菌效应蛋白的转运和病原菌定殖宿主细胞等医学领域。

细菌在环境中也通常以生物膜的形式存在, T4SS 基因的敲除会影响细菌生物膜的形成, 进而影响细菌对环境的适应性^[6]。然而目前几乎未看到有关 T4SS 系统对细菌的环境适应性影响的研究, T4SS 是否会通过影响生物膜形成来影响细菌对环境的适应性, 在哪一类环境中这种影响更为显著, 对这些问题的解答将有利于更好地理解 T4SS 的环境功能。此外, 靶向 T4SS 的新型拮抗类化合物, 除了可应用于超级细菌的医学治疗, 也可应用于环境治理领域, 如用于去除生物膜, 减少抗生素抗性基因传播等方面。有关 T4SS 基因在微生物适应不同环境中的具体作用及其环境效应值得进一步深入探索。

REFERENCES

- [1] GROHMANN E, CHRISTIE PJ, WAKSMAN G, BACKERT S. Type IV secretion in Gram-negative and Gram-positive bacteria[J]. *Molecular Microbiology*, 2018, 107(4): 455-471.
- [2] REDDY BL, SAIER MH Jr. Properties and phylogeny of 76 families of bacterial and eukaryotic organellar outer membrane pore-forming proteins[J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0152733.
- [3] 于雪莽, 沈瀚, 曹小利. 细菌IV型分泌系统的研究进展[J]. *临床输血与检验*, 2021, 23(2): 255-259.
YU XQ, SHEN H, CAO XL. Research progress of bacterial type IV secretion system[J]. *Journal of Clinical Transfusion and Laboratory Medicine*, 2021, 23(2): 255-259 (in Chinese).
- [4] BOUDAHER E, SHAFFER CL. Inhibiting bacterial secretion systems in the fight against antibiotic resistance[J]. *MedChemComm*, 2019, 10(5): 682-692.
- [5] WU YM, XIANG L, WANG HM, MA LY, QIU X, LIU D, FENG L, LU XL. Transcriptome analysis of an arsenite-/antimonite-oxidizer, *Bosea* sp. AS-1 reveals the importance of the type 4 secretion system in antimony resistance[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 826: 154168.
- [6] 伍燕梅. *Bosea* sp. AS-1 的IV型分泌系统对其锑抗性的影响及其环境意义[D]. 武汉: 中国地质大学(武汉) 硕士学位论文, 2023.
WU YM. Effect of type IV secretion system of *Bosea* sp. AS-1 in its antimony resistance and its environmental significance[D]. Wuhan: Master's Thesis of China University of Geoscience (Wuhan), 2023 (in Chinese).
- [7] COSTA TRD, HARB L, KHARA P, ZENG LY, HU B, CHRISTIE PJ. Type IV secretion systems: advances in structure, function, and activation[J]. *Molecular Microbiology*, 2021, 115(3): 436-452.
- [8] RIVERA-CALZADA A, FRONZES R, SAVVA CG, CHANDRAN V, LIAN PW, LAEREMANS T, PARDON E, STEYAERT J, REMAUT H, WAKSMAN G, ORLOVA EV. Structure of a bacterial type IV secretion core complex at subnanometre resolution[J]. *The EMBO Journal*, 2013, 32(8): 1195-1204.
- [9] CHETRIT D, HU B, CHRISTIE PJ, ROY CR, LIU J. A unique cytoplasmic ATPase complex defines the *Legionella pneumophila* type IV secretion channel[J]. *Nature Microbiology*, 2018, 3: 678-686.
- [10] GHOSAL D, JEONG KC, CHANG YW, GYORE J, TENG L, GARDNER A, VOGEL JP, JENSEN GJ. Molecular architecture, polar targeting and biogenesis of the *Legionella* Dot/Icm T4SS[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4: 1173-1182.
- [11] JEONG KC, GHOSAL D, CHANG YW, JENSEN GJ, VOGEL JP. Polar delivery of *Legionella* type IV secretion system substrates is essential for virulence[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(30): 8077-8082.
- [12] PARK D, CHETRIT D, HU B, ROY CR, LIU J. Analysis of Dot/Icm type IVB secretion system subassemblies by cryoelectron tomography reveals conformational changes induced by DotB binding[J]. *mBio*, 2020, 11(1): e03328-e03319.
- [13] LOW HH, GUBELLINI F, RIVERA-CALZADA A,

- BRAUN N, CONNERY S, DUJEANCOURT A, LU F, REDZEJ A, FRONZES R, ORLOVA EV, WAKSMAN G. Structure of a type IV secretion system[J]. *Nature*, 2014, 508: 550-553.
- [14] BLEVES S, GALÁN JE, LLOSA M. Bacterial injection machines: evolutionary diverse but functionally convergent[J]. *Cellular Microbiology*, 2020, 22(5): e13157.
- [15] MARY C, FOUILLEN A, BESSETTE B, NANJI A, BARON C. Interaction via the N terminus of the type IV secretion system (T4SS) protein VirB6 with VirB10 is required for VirB2 and VirB5 incorporation into T-pili and for T4SS function[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(35): 13415-13426.
- [16] GOMIS-RÜTH FX, COLL M. Structure of TrwB, a gatekeeper in bacterial conjugation[J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2001, 33(9): 839-843.
- [17] CHRISTIE PJ, ATMAKURI K, KRISHNAMOORTHY V, JAKUBOWSKI S, CASCALES E. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2005, 59: 451-485.
- [18] LLOSA M, ALKORTA I. Coupling proteins in type IV secretion[M]//BACKERT S, GROHMANN E, eds. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Cham: Springer International Publishing, 2017: 143-168.
- [19] ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ I, ARANA L, UGARTE-URIBE B, GÓMEZ-RUBIO E, MARTÍN-SANTAMARÍA S, GARBISU C, ALKORTA I. Type IV coupling proteins as potential targets to control the dissemination of antibiotic resistance[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2020, 7: 201.
- [20] TANG TT, CHEN Y, DU Y, YAO B, LIU M. Effects of functional modules and bacterial clusters response on transmission performance of antibiotic resistance genes under antibiotic stress during anaerobic digestion of livestock wastewater[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 441: 129870.
- [21] GRAY TA, CLARK RR, BOUCHER N, LAPIERRE P, SMITH C, DERBYSHIRE KM. Intercellular communication and conjugation are mediated by ESX secretion systems in mycobacteria[J]. *Science*, 2016, 354(6310): 347-350.
- [22] YUAN Q, CARLE A, GAO C, SIVANESAN D, ALY KA, HÖPPNER C, KRALL L, DOMKE N, BARON C. Identification of the VirB4-VirB8-VirB5-VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(28): 26349-26359.
- [23] MACÉ K, VADAKKEPAT AK, REDZEJ A, LUKOYANOVA N, OOMEN C, BRAUN N, UKLEJA M, LU F, COSTA TRD, ORLOVA EV, BAKER D, CONG Q, WAKSMAN G. Cryo-EM structure of a type IV secretion system[J]. *Nature*, 2022, 607: 191-196.
- [24] CRAIG L, FOREST KT, MAIER B. Type IV pili: dynamics, biophysics and functional consequences[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17: 429-440.
- [25] HUA MX, DAI DF, DU PC, CHEN N, DUAN A, YUE JL, JIA HB, RONG CB, LI A, ZENG H, CHEN C. A chromosome-encoded T4SS independently contributes to horizontal gene transfer in *Enterococcus faecalis*[J]. *Cell Reports*, 2022, 41(6): 111609.
- [26] WAGNER A, WHITAKER RJ, KRAUSE DJ, HEILERS JH, van WOLFEREN M, van der DOES C, ALBERS SV. Mechanisms of gene flow in archaea[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15: 492-501.
- [27] RODRÍGUEZ-BELTRÁN J, SØRUM V, TOLL-RIERA M, deLa VEGA C, PEÑA-MILLER R, MILLÁN ÁS. Genetic dominance governs the evolution and spread of mobile genetic elements in bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(27): 15755-15762.
- [28] KNAPP JS, ZENILMAN JM, BIDDLE JW, PERKINS GH, DeWITT WE, THOMAS ML, JOHNSON SR, MORSE SA. Frequency and distribution in the United States of strains of *Neisseria gonorrhoeae* with plasmid-mediated, high-level resistance to tetracycline[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 1987, 155(4): 819-822.
- [29] JUHAS M, CROOK DW, DIMOPOULOU ID, LUNTER G, HARDING RM, FERGUSON DJP, HOOD DW. Novel type IV secretion system involved in propagation of genomic islands[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(3): 761-771.
- [30] RIVARD N, COLWELL RR, BURRUS V. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: mechanistic insights from IncC plasmid-mediated dissemination of a novel family of genomic islands inserted at *trmE*[J]. *mSphere*, 2020, 5(4): e00748-e00720.
- [31] SOARES GG, CAMPANINI EB, FERREIRA RL, DAMAS MSF, RODRIGUES SH, CAMPOS LC, GALVÃO JD, Da COSTA FUENTES AS, de MELO FREIRE CC, MALAVAZI I, PITONDO-SILVA A, Da

- CUNHA AF, Da SILVA PRANCHEVICIUS MC. *Brevundimonas brasiliensis* sp. nov.: a new multidrug-resistant species isolated from a patient in Brazil[J]. Microbiology Spectrum, 2023, 11(3): e0441522.
- [32] 赵红庆, 熊衍文, 徐建国. 细菌IV型分泌系统的研究进展[J]. 疾病监测, 2012, 27(11): 913-917.
ZHAO HQ, XIONG YW, XU JG. Progress in research of bacterial type IV secretion system[J]. Disease Surveillance, 2012, 27(11): 913-917 (in Chinese).
- [33] IYER S, DAS C. The unity of opposites: strategic interplay between bacterial effectors to regulate cellular homeostasis[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2021, 297(6): 101340.
- [34] TOHIDPOUR A. CagA-mediated pathogenesis of *Helicobacter pylori*[J]. Microbial Pathogenesis, 2016, 93: 44-55.
- [35] CORDSMEIER A, WAGNER N, LÜHRMANN A, BERENS C. Defying death: how *Coxiella burnetii* copes with intentional host cell suicide[J]. The Yale Journal of Biology and Medicine, 2019, 92(4): 619-628.
- [36] BÜTTNER D. Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 2012, 76(2): 262-310.
- [37] ABBY SS, CURY J, GUGLIELMINI J, NÉRON B, TOUCHON M, ROCHA EPC. Identification of protein secretion systems in bacterial genomes[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 23080.
- [38] STINGL K, MÜLLER S, SCHEIDGEN-KLEYBOLDT G, CLAUSEN M, MAIER B. Composite system mediates two-step DNA uptake into *Helicobacter pylori*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(3): 1184-1189.
- [39] KOCH B, CALLAGHAN MM, TELLECHEA-LUZARDO J, SEEGER AY, DILLARD JP, KRASNOGOR N. Protein interactions within and between two F-type type IV secretion systems[J]. Molecular Microbiology, 2020, 114(5): 823-838.
- [40] FISCHER W, TEGTMEYER N, STINGL K, BACKERT S. Four chromosomal type IV secretion systems in *Helicobacter pylori*: composition, structure and function[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1592.
- [41] VALE FF, LEHOURS P. Relating phage genomes to *Helicobacter pylori* population structure: general steps using whole-genome sequencing data[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(7): 1831.
- [42] WASKITO LA, YAMAOKA Y. The story of *Helicobacter pylori*: depicting human migrations from the phylogeography[M]//KAMIYA S, BACKERT S, eds. Advances in Experimental Medicine and Biology. Cham: Springer International Publishing, 2019: 1-16.
- [43] CALLAGHAN MM, HEILERS JH, van der DOES C, DILLARD JP. Secretion of chromosomal DNA by the *Neisseria gonorrhoeae* type IV secretion system[M]//BACKERT S, GROHMANN E. Type IV Secretion in Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. Cham: Springer, 2017: 323-345.
- [44] ELHENAWY W, HORDIENKO S, GOULD S, OBERC AM, TSAI CN, HUBBARD TP, WALDOR MK, COOMBES BK. High-throughput fitness screening and transcriptomics identify a role for a type IV secretion system in the pathogenesis of Crohn's disease-associated *Escherichia coli*[J]. Nature Communications, 2021, 12: 2032.
- [45] HATHROUBI S, HU S, OTTEMANN KM. Genetic requirements and transcriptomics of *Helicobacter pylori* biofilm formation on abiotic and biotic surfaces[J]. NPJ Biofilms and Microbiomes, 2020, 6: 56.
- [46] OGUNYEMI SO, FANG YS, QIU W, LI B, CHEN J, YANG M, HONG XX, LUO JY, WANG YL, SUN GC. Role of type IV secretion system genes in virulence of rice bacterial brown stripe pathogen *Acidovorax oryzae* strain RS-2[J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 126: 343-350.
- [47] BRITO IL. Examining horizontal gene transfer in microbial communities[J]. Nature Reviews Microbiology, 2021, 19: 442-453.
- [48] HUDDLESTON JR. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes[J]. Infection and Drug Resistance, 2014, 7: 167-176.
- [49] CABEZÓN E, RIPOLL-ROZADA J, PEÑA A, de La CRUZ F, ARECHAGA I. Towards an integrated model of bacterial conjugation[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2015, 39(1): 81-95.
- [50] HOOSTAL MJ, BIDART-BOUZAT MG, BOUZAT JL. Local adaptation of microbial communities to heavy metal stress in polluted sediments of Lake Erie[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2008, 65(1): 156-168.
- [51] DZIEWIT L, PYZIK A, SZUPLEWSKA M,

- MATLAKOWSKA R, MIELNICKI S, WIBBERG D, SCHLÜTER A, PÜHLER A, BARTOSIK D. Diversity and role of plasmids in adaptation of bacteria inhabiting the Lubin copper mine in Poland, an environment rich in heavy metals[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 152.
- [52] BEN FEKIH I, ZHANG CK, LI YP, ZHAO Y, ALWATHNANI HA, SAQUIB Q, RENSING C, CERVANTES C. Distribution of arsenic resistance genes in prokaryotes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2473.
- [53] BENGTSOON-PALME J, KRISTIANSSON E, JOAKIM LARSSON DG. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2018, 42(1): fux053.
- [54] GUO MT, YUAN QB, YANG J. Distinguishing effects of ultraviolet exposure and chlorination on the horizontal transfer of antibiotic resistance genes in municipal wastewater[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(9): 5771-5778.
- [55] LIU ZY, LIU YQ, XI W, LIU SS, LIU J, MU HL, CHEN BB, HE H, FAN YP, MA WR, ZHANG WM, FU MZ, WANG J, SONG XP. Genetic features of plasmid- and chromosome-mediated *mcr-1* in *Escherichia coli* isolates from animal organs with lesions[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 707332.
- [56] WANG HC, WANG J, LI SM, DING GY, WANG K, ZHUANG T, HUANG X, WANG XY. Synergistic effect of UV/chlorine in bacterial inactivation, resistance gene removal, and gene conjugative transfer blocking[J]. *Water Research*, 2020, 185: 116290.
- [57] LI LG, XIA Y, ZHANG T. Co-occurrence of antibiotic and metal resistance genes revealed in complete genome collection[J]. *The ISME Journal*, 2017, 11(3): 651-662.
- [58] LIN H, JIANG LT, LI B, DONG YB, HE YH, QIU Y. Screening and evaluation of heavy metals facilitating antibiotic resistance gene transfer in a sludge bacterial community[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 695: 133862.
- [59] ZHANG Y, GU AZ, CEN TY, LI XY, HE M, LI D, CHEN JM. Sub-inhibitory concentrations of heavy metals facilitate the horizontal transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance genes in water environment[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 237: 74-82.
- [60] HE T, LI J, GONG L, WANG Y, LI R, JI X, LUAN F, TANG M, ZHU L, WEI R, WANG R. Comprehensive analysis of antimicrobial, heavy metal, and pesticide residues in commercial organic fertilizers and their correlation with tetracycline-resistant *tet(X)*-variant genes[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(2): e04251-04222.
- [61] ZHAO X, SHEN JP, ZHANG LM, DU S, HU HW, HE JZ. Arsenic and cadmium as predominant factors shaping the distribution patterns of antibiotic resistance genes in polluted paddy soils[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 389: 121838.
- [62] ZHANG ZY, ZHANG Q, WANG TZ, XU NH, LU T, HONG WJ, PENUELAS J, GILLINGS M, WANG MX, GAO WW, QIAN HF. Assessment of global health risk of antibiotic resistance genes[J]. *Nature Communications*, 2022, 13: 1553.
- [63] ZHU YG, YOSHINAGA M, ZHAO FJ, ROSEN BP. Earth abides arsenic biotransformations[J]. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 2014, 42: 443-467.
- [64] SUN FL, XU ZT, FAN LL. Response of heavy metal and antibiotic resistance genes and related microorganisms to different heavy metals in activated sludge[J]. *Journal of Environmental Management*, 2021, 300: 113754.
- [65] YU YS, XIE ZC, YANG JG, YANG RX, LI YP, ZHU YG, ZHAO YL, YANG QE, CHEN JC, ALWATHNANI HA, FENG RW, RENSING C, HERZBERG M. *Citrobacter portucalensis* Sb-2 contains a metalloid resistance determinant transmitted by *Citrobacter* phage Chris1[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 443: 130184.
- [66] DUNIVIN TK, YEH SY, SHADE A. A global survey of arsenic-related genes in soil microbiomes[J]. *BMC Biology*, 2019, 17(1): 45.
- [67] LI YP, CARRARO N, YANG N, LIU BX, XIA X, FENG RW, SAQUIB Q, AL-WATHNANI HA, van der MEER JR, RENSING C. Genomic islands confer heavy metal resistance in *Mucilaginibacter kameinonensis* and *Mucilaginibacter rubeus* isolated from a gold/copper mine[J]. *Genes*, 2018, 9(12): 573.
- [68] LU XL, ZHANG YN, LIU CY, WU M, WANG HM. Characterization of the antimonite- and arsenite-oxidizing bacterium *Bosea* sp. AS-1 and its potential application in arsenic removal[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2018, 359: 527-534.