

喹啉降解反应器菌群内整合子检测和菌株耐药性分析

陈睿佳 张晓君* 毛跃建 岳思青 赵立平

(上海交通大学 生命科学技术学院 教育部微生物代谢重点实验室 上海 200240)

摘要: 运用 PCR 技术及克隆文库方法, 对一个实验室规模的喹啉降解反应器生物膜系统中的整合子进行了分析。结果表明, 在该反硝化喹啉降解反应器的生物膜群落中, 整合子携带着丰富多样的基因盒。主要为编码与抗生素耐药性相关的基因盒, 如氨基糖苷类耐药基因(*aadA* 基因等), 也带有与工业废水环境发现的整合子中可能与芳香族化合物降解有关的基因(如 *FldF* 基因)。还有一些功能未知的基因。鉴于耐药性相关基因的广泛存在, 对该反应器中分离的优势菌株进行了耐药性分析。结果表明, 44.1% 的菌株存在耐药性, 29.4% 的菌株有多重耐药性。它们对 4 种抗生素的耐药率分别为: 氨苄青霉素 29.4%、卡那霉素 23.5%、氯霉素 20.6%、链霉素 23.5%。不存在抗生素选择压力环境的微生物群落中分离的群落优势菌株普遍具有抗生素耐药性, 而且群落基因组的整合子中携带多种抗生素抗性基因的基因盒。这一现象还未曾见报道, 其成因值得进一步研究。

关键词: 反应器, 整合子, 基因盒, 耐药性, 喹啉降解

Detection of integron and antibiotic resistance analysis in a lab-scale quinoline degrading microbial community

CHEN Rui-Jia ZHANG Xiao-Jun* MAO Yue-Jian YUE Si-Qing ZHAO Li-Ping

(Key Laboratory of MOE for Microbial Metabolism and School of Life Science & Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: In this study, PCR and clone library methods were used to analyze the composition and potential functions of integrons in the ecosystem of a lab-scale quinoline-degrading bioreactor. The results showed that the integrons carried gene cassettes of sizes between 200 bp and 1 000 bp. Some gene cassettes could not find any analogue in database. But some of them are similar with the sequences of integrons previously found in industrial wastewater, such as *FldF* gene, which might be related to degradation of aromatic compounds. Many cassettes had aminoglycoside resistance genes, such as *aadA*

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 20677041); 国家 863 计划重点项目(No. 2007AA021301); 上海市重点学科建设项目(No. B203)

* 通讯作者: Tel: 86-21-34204878; 邮箱: xjzhangsjtu@gmail.com

收稿日期: 2010-11-22; 接受日期: 2011-02-10

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

gene, which might encode antibiotic-resistance protein. To verify this result, we measured the antibiotic resistance pattern of 34 isolated strains, which were dominant in the quinoline-degrading bioreactor. Results indicated 44.1% of the isolates were resistant to antibiotics, and the incidence of multiple antibiotic resistances was 29.4%. The ratio of resistance to ampicillin, kanamycin, chloromycetin, streptomycin of the isolates were 29.4%, 23.5%, 20.6%, 23.5%, respectively. There barely exists antibiotic stress in the quinoline wastewater bioreactor and the environment where seed sludge came from. However, the dominant bacterial strains were generally resistant to antibiotic and many integrons carried resistance gene in first gene cassette. This phenomenon so far has not been reported and its mechanism needs further study.

Keywords: Bioreactor, Integron, Gene cassette, Antibiotic resistance, Quinoline degrading

整合子参与的水平基因转移在细菌获得外源基因的过程中起了重要作用。近 20 年来, 整合子已受到广泛的关注。对整合子的研究发现^[1-2], 许多医源性的整合子携带若干个编码抗生素耐药性的基因盒, 属于第一类整合子^[3]。国内研究集中于单一菌种的第一类整合子及其耐药性的相关性研究, 尤其是临床耐药致病菌。国外已针对环境中微生物群落的整合子进行了定性、定量检测。如 Wright 等^[4]对重工业污染水域和洁净水域的微生物群落进行的研究结果表明, 环境选择压力可以较显著地影响群落中整合子的丰度, 重工业污染水体环境中整合子丰度明显高于洁净水体环境。Koenig 等^[5]对悉尼一个焦油池出水口微生物群落的研究发现, 该生境中含有丰富多样的第一类整合子, 携带的基因盒编码多种与污染物降解有关的蛋白。张力焯等^[6]对焦化废水生物膜样品的整合子进行了分析, 发现了多样整合子的存在。但总体来说, 目前对工业废水处理系统中整合子的了解还非常有限, 它们是否参与污染物降解过程, 以及它们在群落中存在的意义都不清楚, 因此有必要针对工业废水处理系统进行整合子的研究。

医疗机构排放的污水, 以及城市生活污水和生活污水处理厂中抗生素的广泛存在, 抗生素选择压力导致环境中抗性菌的大量存在^[7]。而对没有抗生素污染的工业废水中细菌耐药性状况的研究还未见报道。本研究发现, 以喹啉为唯一碳源的反应器中, 从微生物群落 DNA 的整合子携带有较多的氨基糖

苷类抗生素的抗性基因。为进一步确认这个结果, 对从该反应器中分离的 34 株优势菌株进行了耐药性的测定。本文确证了在无抗生素的工业废水处理环境中抗生素抗性的普遍存在。

1 材料与方法

1.1 喹啉反应器的构建及喹啉去除率检测

本实验室建立了一个以喹啉为唯一碳源驯化的反硝化反应器, 运行两年多时间, 状态稳定。该反应器体积为 2 L, 以弹性材料作为填料, 通过恒流泵将合成废水从底部的进水孔泵入密闭的反应器, 流经附着有微生物的填料, 从顶端的出水孔流出, 构成连续流反应器。水力停留时间为 24 h。种子污泥采集于某焦化厂废水处理系统的 A2 (缺氧反硝化) 池。反应器人工合成废水的组成为: 100 mg/L Quinoline, 0.24 g/L NaNO₃, 0.14 g/L K₂HPO₄·3H₂O, 以自来水配置。根据喹啉在波长 313 nm 处有吸收峰的特性, 用分光光度法定期测定反应器出入水口的喹啉相对含量。部分样品以 HPLC 法测定了喹啉的含量^[9]。具体测定方法是: 岛津 LC10ADVP (SPD10AVP UV-Vis Detector); Diamonsil C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。流动相为甲醇与水(体积比为 4:1), 流速为 1 mL/min; 检测波长为 220 nm, 进样体积为 10 μL。利用 PXJ-1B 型数字式离子计(江苏江分电分析仪器有限公司), 配合 pNO₃-1 型硝酸根离子选择性电极(上海精密科学仪器有限公司)测定反应器出水 NO₃⁻-N 浓度。

1.2 反应器生物膜样品总 DNA 提取和整合子 PCR 分析

1.2.1 总 DNA 提取: 从反应器填料表面刮取生物膜, 运用 Bead beater 法提取生物膜样品的总 DNA^[10]。

1.2.2 整合子首位基因盒分析: 使用 ICC48 (5'-GCAACTGGTCCAGAACCTTGAC-3')和 ICC21 (5'-GTCGGCTTGRAYGAATTGTTAGRC-3')为引物^[11](图 1)。PCR 反应体系为 25 μ L, 其中含 *Taq* buffer, 1.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 引物各 20 pmol, *Taq* 酶 5 U, 模板 DNA 约 20 ng。PCR 循环为: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 45 s, 51 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。使用 1.2% (W/V) 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增得到的 PCR 产物。

1.2.3 整合子基因盒分析: 使用 HS286 (5'-GGGATCCTCSGCTKGARCGAMTTGTTAGVC-3')和 HS287 (5'-GGGATCCGCSGCTKANCTCVRRCGTTAGSC-3')为引物^[12](图 1)。PCR 反应体系同 1.2.2。PCR 循环为: 95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 150 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。使用 1.2% (W/V) 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增得到的 PCR 产物。

1.2.4 基因盒克隆文库构建和测序: 将 PCR 扩增产物以纯化试剂盒 (Geneaid) 进行纯化, 再通过 T4 DNA 连接酶连接至 pCR[®]2.1-TOPO[®] 克隆载体

(Invitrogen)。连接产物用化学转化法转入大肠杆菌 DH5 α 中构建克隆文库。随机挑取阳性克隆由生工[®] 生物工程(上海)有限公司进行测序。

1.3 分离菌株的耐药性测定

1.3.1 菌株: 样品菌株均分离自喹啉驯化的反硝化反应器生物膜样品。经前期研究已确认它们为反应器的优势细菌, 其中的 26 株已进行了 16S rRNA 基因的鉴定(表 1a)。

1.3.2 培养基和培养条件: LB 液体培养基和 LB 固体培养基进行细菌的培养。菌株耐药性试验时, LB 培养基中加入不同抗生素, 抗生素及其终浓度分别为: 氨苄青霉素(Ampicillin, 简称 Amp, 50 mg/L)、卡那霉素(Kanamycin, 简称 Kan, 50 mg/L)、氯霉素(Chloromycetin, 简称 Cm, 30 mg/L)、链霉素(Streptomycin, 简称 Str, 25 mg/L)、利福平(Rifampicin, 简称 Rif, 100 mg/L)。

1.3.3 菌株耐药性测定: 采用滤纸片扩散法鉴定菌株的天然耐药性。各菌株于 1 mL LB 液体培养基中, 150 r/min 摇床培养后, 取 200 μ L 培养菌液涂布到 LB 固体平板上。将 5 种不同抗生素溶液浸泡的圆形滤纸片放置在已涂布菌液的培养平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 16 h。根据抑菌圈大小来确定抗生素抗性。

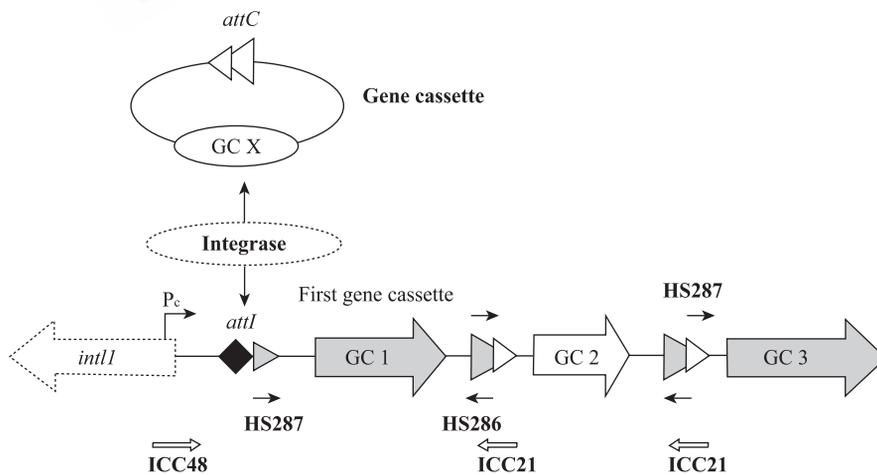


图 1 整合子结构及引物对扩增位点示意图

Fig. 1 Structure of integrons and positions of the primer pairs used

表 1 反硝化反应器生物膜样品中菌株的天然耐药性

Table 1 Antibiotic resistances of bacteria isolated from biofilm in a denitrification reactor

a) 耐药情况一览表 Antibiotic resistance of isolates

菌株编号 No. strains	分类地位鉴定 Taxonomy	抗生素抗性 Antibiotic resistance					菌株编号 No. strains	分类地位鉴定 Taxonomy	抗生素抗性 Antibiotic resistance				
		Amp	Kan	Cm	Str	Rif			Amp	Kan	Cm	Str	Rif
IS-FXY12	<i>Rhodococcus</i> sp.	-	-	-	-	-	IS-FXY32	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	-	-	-	-	-
IS-FXY46	<i>Rhodococcus</i> sp.	-	-	-	-	-	IS-FXY47	<i>Brucella</i> sp.	++	++	+	+	-
IS-FXY51	<i>Rhodococcus</i> sp.	-	-	-	-	-	IS-FXY16	<i>Pseudomonas</i> sp.	++	-	++	-	-
IS-FXY52	<i>Rhodococcus</i> sp.	-	-	-	-	-	IS-FXY22	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	-	-	-	-
IS-FXY10	<i>Microbacterium</i> sp.	-	+	-	+	-	IS-FXY23	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	-	++	-	-
IS-FXY43	<i>Microbacterium</i> sp.	-	++	+	++	-	IS-FXY25	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	-	-	-	-
IS-FXY01	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	-	-	3-35	<i>Thauera</i> sp.	-	-	-	-	/
IS-FXY03	<i>Bacillus</i> sp.	++	-	-	-	-	Q20-C	<i>Thauera</i> sp.	-	-	-	-	/
IS-FXY05	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	-	-	Q4	<i>Thauera</i> sp.	-	-	-	-	/
IS-FXY08	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	-	-	I05-B07	Unidentified	++	++	-	++	-
IS-FXY34	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	++	-	-	I05-D05	Unidentified	++	++	-	++	-
IS-FXY04	<i>Staphylococcus</i> sp.	-	-	-	-	-	I05-F03	Unidentified	++	++	-	++	-
IS-FXY14	<i>Staphylococcus</i> sp.	-	-	-	-	-	IS-FXY11	Unidentified	-	-	-	-	-
IS-FXY53	<i>Staphylococcus</i> sp.	+	-	-	-	-	IS-FXY13	Unidentified	-	++	-	++	-
IS-FXY54	<i>Staphylococcus</i> sp.	-	-	-	-	-	IS-FXY42	Unidentified	++	+	+	++	-
IS-FXY02	<i>Staphylococcus</i> sp.	+	-	-	-	-	IS-FXY45	Unidentified	-	-	-	-	-
IS-FXY17	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	-	-	-	-	-	IS-FXY48	Unidentified	-	-	+	-	-

注: ++: 抗性强; +: 抗性较强; -: 无抗性; /: 未测定。

Note: ++: Strong resistance; +: Better resistance; -: No resistance; /: Not detect.

b) 耐药情况汇总 Statistic analysis of antibiotic resistance

菌株总数 Number of strains	耐药率 Resistance rate (%)	多重耐药率 Multiple resistance rate (%)	菌株对不同抗生素的耐药率 Resistance rate to different antibiotics (%)				
			Amp	Kan	Cm	Str	Rif
34	44.1	29.4	29.4	23.5	20.6	23.5	0

c) 耐药性分型 Types of antibiotic resistance

类型 Types	抗性型 Resistance types	菌株编号 Strains
A	Amp	IS-FXY02, IS-FXY03, IS-FXY53
B	Cm	IS-FXY34, IS-FXY48
C	Amp+Cm	IS-FXY16, IS-FXY23
D	Kan+Str	IS-FXY10, IS-FXY13
E	Amp+Kan+Str	I05-B07, I05-D05, I05-F03
F	Kan+Cm+Str	IS-FXY43
G	Amp+Kan+Cm+Str	IS-FXY42, IS-FXY47

2 结果与分析

2.1 反应器运行情况

本研究所采用的喹啉降解反应器是一个缺氧反硝化反应器,反应器置于空调恒温的房间,室温 $23\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。2009年12月从反应器出水口取样,以HPLC测定喹啉含量,该时间点喹啉去除率为85.4%。该反应器一年内多次取样进行微生物群落结构的测定,每次取样时,同时进行喹啉浓度的HPLC分析,结果表明反应器总体维持较高的喹啉降解率。为便于操作,反应器平时每周一至二次采用分光光度法测定喹啉浓度的变化。反应器在采样时间点前后2个月内,紫外吸光值(313 nm)检测表明反应器的喹啉降解能力基本保持稳定。

2.2 生物膜整合子中首位基因盒的扩增

用 ICC48/ICC21 引物扩增生物膜样品群落总DNA,用纯化试剂盒(Geneaid)进行纯化后,琼脂糖凝胶电泳结果如图2所示,主要扩增条带约有6条,大小分别为200、300、500、800、1 000和3 500 bp左右,此外还有一些较浅的弥散条带,分布在200-4 000 bp之间。表明实验室规模的反硝化喹啉降解反应器中,存在丰富多样的基因盒。

2.3 整合子基因盒的扩增

用 HS287/HS286 引物对扩增生物膜样品群落总DNA,用纯化试剂盒(Geneaid)进行纯化后,琼脂糖凝胶电泳结果如图3所示。主要扩增条带约有4条,

大小分别为400、500、700和800 bp左右。但与首位基因盒的扩增相比,其扩增的效率相对较低。

2.4 基因盒序列分析

基因盒扩增产物建立了克隆文库并测序,分析基因盒携带的ORF编码蛋白的功能。ICC48/ICC21扩增片段克隆文库测定了12条有效序列。以NCBI数据库进行了BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)分析,寻找该DNA序列的同源序列。结果表明,其中I10/I45/I92 3个克隆的序列一致,长度为978 bp,与Tn21转座子、克雷伯氏菌、杀鲑气单胞菌和泛宿主性质粒等的部分序列相似度为99%。I12/I20-2克隆的序列长度为527 bp,与*Thauera* sp.、肠道沙门氏菌等的部分序列相似度为97%以上。I20-1克隆的序列长度为575 bp,与荧光假单胞菌等的部分序列相似度为80%。I107、I32、I35/I43/I49/I52克隆的序列长度分别为598 bp、190 bp和218 bp,在数据库找不到相似序列。

同时,使用NCBI的ORF Finder程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)从各个DNA片段序列中搜寻可能的开放读码框(Open Reading Frame, ORF)。然后使用BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)寻找所有ORF编码蛋白的同源蛋白,结果如表2所示。可以看出,12个克隆中有5个携带有与抗生素抗性直接相关的基因。

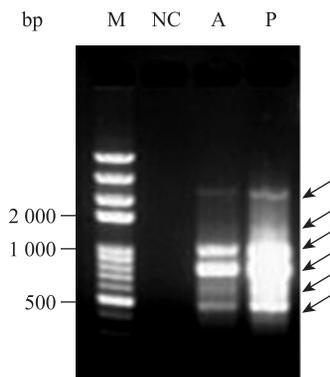


图2 ICC48/21引物对扩增生物膜群落DNA的基因盒
Fig. 2 PCR amplification and purification of gene cassettes in biofilm DNA using primer pair ICC48/21
Note: M: 100 bp ladder marker; NC: Negative control; A: PCR amplicon before purification; P: After purification.

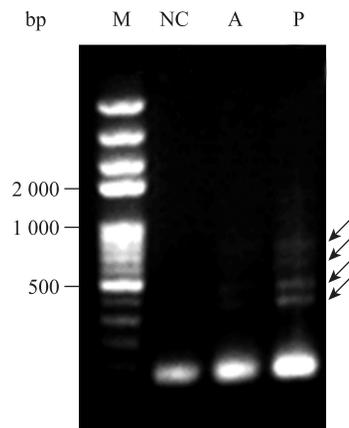


图3 HS287/286引物对扩增生物膜群落DNA的基因盒
Fig. 3 PCR amplification and purification of gene cassettes in biofilm DNA using primer pair HS287/286
Note: M: 100 bp ladder marker; NC: Negative control; A: PCR amplicon before purification; P: Purification result.

HS287/HS286 扩增片段克隆测序得到 5 条有效序列。比对分析结果显示, H16 克隆的序列长度为 393 bp, 与一未知细菌中可能的基因盒蛋白片段序列相似度为 87%。H35、H45、H47/H786 克隆的序列长度分别为 510、334 和 321 bp, 在数据库中找不到相似序列。这些序列的 ORF 分析结果如表 3 所示。

2.5 分离菌株的耐药性

对 5 种抗生素的药物敏感性试验表明, 从喹啉驯化的反硝化反应器中分离到的 34 株细菌中, 有

44.1% 的菌株存在耐药性, 29.4% 的菌株有多重耐药性。如表 1a、b 所示, 它们对 5 种抗生素的耐药率分别为: 氨苄青霉素 29.4%、卡那霉素 23.5%、氯霉素 20.6%、链霉素 23.5%, 对利福平则全部敏感。

菌株按耐药特性划分为 7 个不同的耐药谱, 如表 1c 所示。除了 6 株未鉴定分类地位的菌株外, 对氨苄青霉素一种抗生素有抗性的 3 株菌都属于厚壁菌门, 对氨苄青霉素和氯霉素同时有抗性的 2 株菌均属于假单胞菌属, 对卡那霉素有抗性的菌均对链霉素有抗性。

表 2 首位基因盒 PCR 产物的 ORF 分析(引物对 ICC48/ICC21)
Table 2 ORF derived from first gene cassettes amplified by primer pair ICC48/ICC21

克隆编号 Clone	ORF 大小 ORF size (bp)	左边距 Left boundary (bp)	右边距 Right boundary (bp)	最相似蛋白 Top hit protein	相似度 Identities
I10/I45/I92	931	2	931	AadA(streptomycin/spectinomycin resistance; adenyltransferase)	303/307 (98%)
I12/I20-2	297	194	470	Aminoglycoside adenyltransferase (<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> MGH 78578)(YP_001338814.1)	46/48 (95%)
I20-1	318	1	318	ABC superfamily (Glutamate/aspartate transporter), ATP-binding protein (<i>Azoarcus</i> sp. BH72)(YP_931943.1) ^[13]	82/102 (80%)
				ABC transporter ATP-binding protein (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7)(YP_001349400.1) ^[14]	79/102 (77%)
	238	315	575	ABC-type amino acid transport system, permease component (<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> MS-1)(ZP_00208411.1)	61/78 (78%)
I107	576	23	597	Site-specific recombinase, phage integrase family protein (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7)(YP_001345493.1) ^[14]	100/196 (51%)
I35/I43/I49/I52	201	1	201	Signal transduction histidine kinase (<i>Haemophilus influenzae</i> R2866)	18/43 (41%)
I32	189	2	190	No significant similarity found	

表 3 基因盒 PCR 产物的 ORF 分析(引物对 HS287/S86)
Table 3 ORF derived from first gene cassettes amplified by primer pair HS287/HS286

克隆编号 Clone	ORF 大小 ORF size (bp)	左边距 Left boundary (bp)	右边距 Right boundary (bp)	最相似蛋白 Top hit protein	相似度 Identities
H16	228	162	389	Putative integron gene cassette protein (uncultured bacterium)	68/73 (93%)
H35	507	4	509	FldF protein (<i>Sphingomonas</i> sp. LB126) (CAB87572.1) ^[15]	23/56 (41%)
H45	300	16	35	Hypothetical protein XCV4367 (<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> str. 85-10)(YP_366098.1) ^[16]	67/99 (67%)
H47/H78	285	32	316	No significant similarity found.	

3 讨论

根据序列分析结果,在反应器样品整合子的部分克隆序列中找到了 *intI1* 的下游基因和 *attI* 基因,可确定为首位基因盒。其中 I10、I45、I92 携带 *aadA* 基因(序列相似度 98%以上),该基因编码氨基糖苷类乙酰基转移酶,携带该基因盒的细菌可对氨基糖苷类抗生素产生耐药性。*aadA* 基因是目前发现分布最广泛的耐药基因盒,在多种菌株、转座子、质粒中均有报道,如 Tn21、克雷伯氏菌、杀鲑气单胞菌等。本研究在喹啉降解反硝化反应器生物膜群落中得到的首位基因盒克隆文库中发现多个 *aadA* 基因,提示该群落的细菌可能具有氨基糖苷类耐药性。I12 和 I20-2 两个克隆携带的基因盒可能编码氨基糖苷类腺苷转移酶,该酶也可产生氨基糖苷类耐药性。类似序列在 *Thauera* sp. B4^[17]、肠道沙门氏菌、克雷伯氏菌等多种细菌中均被报道。这说明,除 *aadA* 基因外,实验室反应器生物膜群落中的某些细菌也可能通过这一基因编码的蛋白产生氨基糖苷类耐药性。Liu 等研究发现,在本实验室的反应器生物膜群落中,*Thauera* 属细菌为重要的功能优势菌^[18]。它们可能与氨基糖苷类耐药性有关。I20-1 克隆携带的基因盒 ORF 可能编码谷氨酸盐/天冬氨酸转运蛋白。该基因在 *Azoarcus* 属^[13]、铜绿假单胞菌属^[14]、荧光假单胞菌属、羧基假单胞菌等多种细菌中均被发现。I20-1 克隆携带的另一 ORF 可能编码一种跨膜蛋白,也参与氨基酸的转运过程。H16 克隆插入的基因序列与在悉尼一个焦油池中发现的基因盒相似性很高(序列相似性 93%),Koeinig 等人认为这一基因盒可能参与污染物的降解^[5]。该报道研究的水体环境与本研究的反应器水体环境相似,均含难降解芳香族化合物。H35 克隆携带的基因盒可能编码 FldF 蛋白,有报道指出该蛋白参与了芬(一种芳香族化合物)的降解过程中的转录调控过程^[16]。

部分序列在数据库中无相似序列。说明废水处理反应器环境中整合子携带的基因盒类型多样,有待进一步发掘。

尽管医源性水体污染环境中细菌所携带的抗生素抗性基因已有大量报道^[19-22]。但是,还未见对完

全无抗生素环境的废水处理系统中抗生素抗性基因普遍存在的报道。本研究通过整合子基因盒扩增片段分析和细菌菌株抗药性分析,发现了实验室规模的喹啉降解反硝化反应器中氨基糖苷类抗生素抗性基因的广泛存在,该反硝化反应器喹啉降解群落中的 34 株优势细菌中也有很高比例的菌株为耐药性菌株。然而,该反应器及其种子污泥的来源环境均无抗生素选择压力,却为何有如此高比例的抗性菌株?而且,首位基因盒中发现 *aadA* 等抗性基因普遍存在,说明在废水反应器或其种子的来源环境中发生着抗生素抗性基因的整合转移过程。其机制和生态意义值得深入探究。

参考文献

- [1] Labbate M, Case RJ, Stokes HW. The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation[J]. Horizontal Gene Transfer: Genomes in Flux, Methods in Molecular Biology, 2009, 532: 103-125.
- [2] Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, et al. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2009, 33(4): 757-784.
- [3] Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution[J]. Nature Review Microbiology, 2006, 4(8): 608-620.
- [4] Wright MS, Baker-Austin C, Lindell AH, et al. Influence of industrial contamination on mobile genetic elements: class 1 integron abundance and gene cassette structure in aquatic bacterial communities[J]. The ISME Journal, 2008, 2(4): 417-428.
- [5] Koenig JE, Sharp C, Dlutek M, et al. Integron gene cassettes and degradation of compounds associated with industrial waste: The case of the Sydney tar ponds[J]. PLoS ONE, 2009, 4(4): e5276.
- [6] 张力焯, 朱晨光, 张晓君, 等. 焦化废水生物膜样品和苯酚降解菌分离株基因盒的分析[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(5): 644-649.
- [7] Kummerer K. Resistance in the environment[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2004, 54(2): 311-320.
- [8] 毛跃建, 张晓君, 张宝让, 等. 专一性 PCR 和变性梯度胶电泳协助从焦化废水处理装置中分离优势功能菌 *Thauera* 属菌株[J]. 微生物学报, 2008, 48(12): 1-8.
- [9] 仲汇慧, 张晓君, 岳思青, 等. 喹啉废水反硝化反应器中优势菌的代谢功能分析[J]. 微生物学通报, 2010,

- 37(5):645–650.
- [10] Bond PL, Hugenholtz P, Keller J, et al. Bacterial community structures of phosphate removing and non-phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(5): 1910–1916.
- [11] Huang L, Cagnon C, Caumette P, et al. First gene cassettes of integrons as targets in finding adaptive genes in metagenomes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(11): 3823–3825.
- [12] Stokes HW, Holmes AJ, Nield BS, et al. Gene cassette PCR: sequence-independent recovery of entire genes from environmental DNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(11): 5240–5246.
- [13] Krause A, Ramakumar A, Bartels D, et al. Complete genome of the mutualistic, N₂-fixing grass endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72[J]. Nature Biotechnology, 2006, 24(11): 1384–1390.
- [14] Roy PH, Tetu SG, Larouche A, et al. Complete genome sequence of the multiresistant taxonomic outlier *Pseudomonas aeruginosa* PA7[J]. PLoS ONE, 2010, 5(1): e8842.
- [15] Wattiau P, Bastiaens L, van Herwijnen R, et al. Fluorene degradation by *Sphingomonas* sp. LB126 proceeds through protocatechuic acid: a genetic analysis[J]. Research in Microbiology, 2001, 152(10): 861–872.
- [16] Thieme F, Koebnik R, Bekel T, et al. Insights into genome plasticity and pathogenicity of the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* revealed by the complete genome sequence[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(21): 7254–7266.
- [17] Gillings MR, Duan XJ, Hardwick SA, et al. Gene cassettes encoding resistance to quaternary ammonium compounds: a role in the origin of clinical class 1 integrons[J]? The ISME Journal, 2009, 3(2): 209–215.
- [18] Liu BB, Zhang F, Feng XX, et al. *Thauera* and *Azoarcus* as functionally important genera in a denitrifying quinoline-removal bioreactor as revealed by microbial community structure comparison[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2006, 55(2): 274–286.
- [19] Hartmann A, Alder AC, Koller T, et al. Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of *umuC* genotoxicity in native hospital wastewater[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1998, 17(3): 377–382.
- [20] Kümmerer K, Henninger A. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2003, 9(12): 1203–1214.
- [21] Harwood VJ, Brownell M, Perusek W, et al. Vancomycin-Resistant *Enterococcus* spp. isolated from wastewater and chicken feces in the United States[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(10): 4930–4933.
- [22] Reinthaler FF, Posch J, Feierl G, et al. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge[J]. Water Research, 2003, 37(8): 1685–1690.

稿件书写规范

论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N(当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD (斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如: t (h) (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 跟数字之间加一空格(%除外), 例如: 20 cm×0.3 cm, 不能写成 20×0.3 cm; 3 °C–5 °C 不可写成 3–5 °C; 3%–6%不可写成 3–6%等。