

细菌对四类土壤常见抗生素的降解机制

苏静静, 蒋亚梅, 温洪宇

(江苏师范大学 生命科学学院, 江苏 徐州 221116)

摘要:为了解决土壤中常见抗生素对环境的污染问题,就细菌对4种抗生素的降解机制进行了综述。研究发现某些细菌具有分解抗生素的能力,作用机制: β -内酰胺酶使 β -内酰胺类抗生素开环;酯酶、磷酸化酶和糖苷酶作用大环内酯类抗生素使其钝化;AAC、APH和ANT三类氨基糖苷类修饰酶对氨基糖苷类抗生素的修饰作用;氯霉素乙酰转移酶CAT基因catA和catB介导编码产生的酰基转移酶使氯霉素转化为无抗菌活性的代谢产物。通过阐明细菌对抗生素的降解机制,为解决土壤抗生素的污染问题提供了依据。

关键词:土壤;细菌;抗生素;降解机制;污染

中图分类号:X132 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)12-0052-03 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.12.0052

抗生素(antibiotics)是由微生物(包括细菌、真菌、放线菌属)在生活过程中产生的具有抗病原体或其它活性,能干扰其他活细胞发育功能的一类次级代谢产物。近年来,大量的抗生素被用于畜牧养殖、疾病治疗以及动植物病虫害防治等领域,但大部分的抗生素不能被机体完全吸收,并以原型或代谢产物的形式经由粪尿排出,含有抗生素的粪便长期施用于农田,通过环境的吸附和迁移作用最终进入土壤,造成严重的土壤抗生素污染。进入土壤中的抗生素可能会诱导土壤微生物环境中抗性基因的产生,这些抗性微生物还可能通过直接或间接(如食物链)的方式进入人体,使人体产生耐药性^[1],对人类的健康造成潜在的威胁,所以土壤抗生素的降解已逐渐引起人们的关注。抗生素在土壤环境中的降解途径之一是依赖其相应的耐药菌株所产生的降解酶实现的^[2],抗生素降解酶主要包括4类: β -内酰胺酶、大环内酯类钝化酶、氨基糖苷类修饰酶以及氯霉素酰基转移酶。

1 氨基糖苷类修饰酶

氨基糖苷类修饰酶种类众多,根据其作用机制的差异主要分为三类^[3-4]:

1.1 氨基糖苷类乙酰转移酶(AAC)

包括AAC(2),AAC(6'),AAC(9),AAC(3)

四种。AAC主要的作用是提供乙酰辅酶A作为乙酰基的供体,作用于AGs的2-脱氧链霉胺环的1位和3位以及6-氨基己糖环的2'位和6'位,使游离氨基乙酰化。肠杆菌科的大部分菌属、普罗威登斯菌属、沙雷菌属以及假单胞菌属等均可通过此类转移酶来修饰钝化庆大霉素、妥布霉素等抗生素。Björg C. Haldorsen^[5]等从耐AGs的大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌中发现氨基糖苷类修饰酶AAC(3)-II and AAC(6')-Ib的存在。随后的研究发现某些双功能酶如AAC(1')-APH(2'')也可催化O-乙酰转移^[6]。

1.2 氨基糖苷类磷酸转移酶(APH)

APH是能使所有氨基糖苷类抗生素磷酸化的羟基酶,作用于AGs的3-、2'-及6'-位,使游离羟基磷酸化。临床上分离得到7种APH:APH(3'),APH(2''),APH(3''),APH(6),APH(9),APH(4),APH(7'')^[3]。目前对氨基糖苷磷酸转移酶研究较多的是APH(3'),其编码基因为aphA,目前也已发现7种APH(3'):APH(3')-I~APH(3')-VII。APH(3')-I可作用于卡那霉素、新霉素,后期在大肠埃希氏菌、霍乱弧菌、肺炎克雷伯菌和空肠弯曲杆菌等耐药菌中均发现了编码APH(3')-I的基因aph(3')-I,空肠弯曲杆菌也存在APH(3')-VII编码基因,可对卡那霉素和新霉素进行修饰^[4]。

1.3 氨基糖苷类核苷转移酶(ANT)

ANT的作用机制是以ATP为第二底物,通过将AMP分别转移到2''、3''、4'、6、9位的羟基上,使游离羟基核苷化而达到修饰AGs的目的。如:革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌中的金黄色葡萄球菌和棒状杆菌存在ANT(3'')-I,通过修饰

收稿日期:2016-10-27

基金项目:江苏师范大学在校大学生创新创业训练计划资助项目(XSJCX7093)

第一作者简介:苏静静(1996-),女,安徽省宿州市人,在读学士,从事微生物学研究。E-mail:1471612168@qq.com。

通讯作者:温洪宇(1973-),男,山西省定襄县人,博士,副教授,从事环境微生物学研究。E-mail:wenhuy2007@126.com。

链霉素的 3' 位羟基和壮观霉素的 9 位羟基而发挥其修饰特性; ANT(4')-I a 引起对妥布霉素、达佐霉素、卡那霉素耐药性, 广泛存在于金黄色葡萄球菌、嗜热杆菌和肠球菌; 约 80% 的葡萄球菌和肠杆菌中发现 ANT(6)-I 的编码基因, 从而对链霉素进行修饰使其钝化^[3]。

2 氯霉素乙酰转移酶

氯霉素乙酰转移酶由染色体或质粒上的氯霉素乙酰转移酶 CAT 基因 cat A 和 cat B 介导, 编码产生的酰基转移酶可使氯霉素转化为无抗菌活性的代谢产物。主要存在于葡萄球菌属、D 组链球菌、肺炎链球菌、肠杆菌属和奈瑟菌属^[7]。

含有 CAT 的细菌接触氯霉素时, 使氯霉素乙酰化而失活, 整个过程分为 3 步实现^[8-9]:

①第一步是在 CAT 作用下将乙酰辅酶 A 上的乙酰基转移到氯霉素的 C3 位, 形成 3-乙酰氯霉素; ②3-乙酰氯霉素在不需要酶的参与下进行分子内重排, 即乙酰基由 C3 位转移到 C1 位上, 形成 1-乙酰氯霉素; ③1-乙酰氯霉素作为酶的底物而再度在 C3 位上乙酰化生成 1,3-二乙酰氯霉素。其中, 3-乙酰氯霉素不能抑制细菌中蛋白的合成, 已经失去氯霉素原来的活性, 达到使抗生素失活的目的。吕治等^[10]对 137 株临床收集的肠球菌进行药敏试验后用 PCR 检测 CAT 基因。从中分离出 30 株耐氯霉素肠球菌, 其中粪肠球菌 27 株, 屎肠球菌 3 株。CAT 基因检测结果表明这 30 株耐氯霉素肠球菌均扩增出 CAT 基因片段, 证明肠球菌属对氯霉素的抗药性是因为细菌产生了氯霉素乙酰转移酶, 催化乙酰辅酶 A 上的乙酰基转移到氯霉素的 C3 位。

3 β -内酰胺酶

β -内酰胺酶是 β -内酰胺类抗生素耐药菌株分泌的一种胞外酶^[11], 能够水解渗入菌体的 β -内酰胺类抗生素^[12], 使 β -内酰胺类抗生素开环, 致其失活。在分子生物学基础上将 β -内酰胺酶分为四类: A 为青霉素酶, B 为金属 β -内酰胺酶, C 为头孢菌素酶, D 为苯唑西林酶^[12], β -内酰胺酶水解主要采用两种方式。

3.1 丝氨酸- β -内酰胺酶

A、C、D 属于丝氨酸- β -内酰胺酶, 其活性位点有一个丝氨酸残基以帮助水解。 β -内酰胺酶以非共价键的形式与 β -内酰胺酶类抗生素结合为 Michaelis 复合体, 然后在丝氨酸亲核试剂作用

下, β -内酰胺开环生成酰化的酶产物。一方面酶产物水解得到活性酶并留下失活的开环产物, 另一方面若酰化的酶产物未能被水解, 而是经过重排转为失活的酶产物, 这种 β -内酰胺类化合物就可作为 β -内酰胺酶抑制剂^[13]。

3.2 金属 β -内酰胺酶

金属 β -内酰胺酶分为 B1、B2、B3 三个亚类。该类酶可催化几乎所有的 β -内酰胺类抗生素(单环除外), 其催化过程需要在一两个金属离子(如 Mg^{2+})的帮助下进行。

(1)单锌酶: 以枯草芽孢杆菌分泌的单锌酶 BclI 为例介绍对 β -内酰胺类抗生素的降解机制^[14]: 首先, 锌离子与 His116, His118, His196 和水分子相互作用, 在此过程, 锌离子起到酸的作用以降低水的 PK 值, 使水能以羟基的形式在中性溶液体系中存在; 其次, 120 位的天门冬氨酸发挥其碱的作用是水分子的羟基基团发生去质子化, 生成双阴离子的第二中间产物, 该中间产物通过锌离子进一步稳定。最后, Asp120 将质子传递给内酰胺环上的氮原子以参与环的打开。

(2)双锌酶: 分离菌株 *S. Maltophilia* 产生的 L1 酶, 与 β -内酰胺类抗生素底物结合后^[14-15]: Zn1-羟基作为亲核试剂攻击 β -内酰胺的羰基, 产生一个阴离子中间体复合物, 随后 C-N 键断开, β -内酰胺环水解开环; Zn2 稳定并摆正底物的位置, 有利于亲核试剂的攻击。

4 大环内酯酶

细菌产生大环内酯类抗生素的钝化酶: 大环内酯酯酶、2'-磷酸转移酶、糖基转移酶等, 这些酶对大环内酯类抗生素的作用分别是水解、磷酸化、糖基化, 破坏其结构使其失去活性^[16]。肠杆菌科细菌如大肠杆菌产生红霉素酯酶或大环内酯 2'-磷酸转移酶, 可破坏 14 元环大环内酯类抗生素的内酯环^[17]。在耐大环内酯类抗生素金黄色葡萄球菌中也发现了大环内酯酯酶的编码基因 *ereA* 和 *ereB* 分别编码酯酶 I 和酯酶 II^[18]。

5 结论

新型抗生素不断的被发现与应用, 但由于不合理的使用造成了大量抗生素在水土方面的污染。目前, 关于抗生素降解机制的研究大都停留在实验室如何提高降解产物效率的层面, 而未综合考虑对环境产生的影响。Wondrack 等^[19]首次发现了 2 株能分解、灭活 14 和 16 元环大环内

酯类抗生素的金黄色葡萄球菌,此金黄色葡萄球菌能产生酯酶,这种酯酶可分解 14 和 16 元环大环内酯类抗生素。葡萄球菌属(金黄色葡萄球菌、溶血葡萄球菌)尚可产生达福普汀乙酰转移酶、奎奴普汀水解酶或林可酰胺核普酸转移酶,进而破坏链阳性菌素类或林可酰胺类抗生素的结构。

随着人们对环境问题重视程度的增加,通过探讨抗生素在环境中的降解作用来寻求降低环境中抗生素污染的方法,将会成为研究热点。水解、基团转移及酶降解,都是细菌代谢的主要或者中间过程,同样也是抗生素耐药机制的来源^[20]。除加强抗生素降解机制的研究外,还应减少抗生素的使用,从根源上减少污染。

参考文献:

- [1] 吴楠,乔敏.土壤环境中四环素类抗生素残留及抗性基因污染的研究进展[J].生态毒理学报,2010(5):618-627.
- [2] 刘元望,李兆君,冯瑶,等.微生物降解抗生素的研究进展[J].农业环境科学学报,2016(2):212-224.
- [3] 徐艳,郭丽双,付英梅,等.细菌对氨基糖苷类抗生素的耐药机制[J].中国微生态学杂志,2008(2):191-193.
- [4] 张晶.动物源性大肠杆菌对氨基糖苷类药物耐药及其相关机制的研究[D].长春:吉林农业大学,2006.
- [5] Haldorsen B C,Simonsen G S,Sundsford A,et al. Increased prevalence of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Norway is associated with the acquisition of AAC (3)-II and AAC(6')-Ib[J]. Diagnostic microbiology and infectious disease, 2014, 78(1): 66-69.
- [6] 沈依群,赵敏.氨基糖苷类抗生素的耐药机制及控制耐药性

的策略[J].国外医药(抗生素分册),2002(3):118-120,131.

- [7] 李科,张德纯.细菌耐药机制及耐药性消除的研究进展[J].中国微生态学杂志,2014(8):984-986,990.
- [8] 王艺颖.氯霉素乙酰转移酶突变体检测氯霉素[D].上海:华东师范大学,2005.
- [9] 杜向党,阎若潜,沈建忠.氯霉素类药物耐药机制的研究进展[J].动物医学进展,2004(2):27-29.
- [10] 吕治,许淑珍.耐氯霉素肠球菌乙酰转移酶基因检测及同源性分析[J].中华医院感染学杂志,2008(1):1-4.
- [11] 魏宝东,李强,齐欣. β -内酰胺酶降解青霉素钠条件的研究[J].食品科技,2012(7):12-16.
- [12] 曹孟淑.铜绿假单胞菌对 β -内酰胺类抗生素耐药机制的研究进展[J].国外医学(呼吸系统分册),2003(2):90-94.
- [13] 郑卫. β -内酰胺酶及其抑制剂研究进展[J].国外医药(抗生素分册),2001(2):49-56.
- [14] 陈照强,刘一方,朱宁,等.金属 β -内酰胺酶的研究进展[J].国外医药(抗生素分册),2011(3):111-115.
- [15] 陈姣,郑珩,沈秉正,等.IMP型金属 β -内酰胺酶及其抑制剂研究进展[J].今日药学,2010(9):1-5.
- [16] 潘丽萍.大环内酯类抗生素耐药的流行状况和机制[J].现代医学,2008(5):370-372.
- [17] 王明贵.细菌对大环内酯类抗生素耐药机制的研究进展[J].国外医药(抗生素分册),2000(1):13-15.
- [18] 李晓云.东北地区链球菌对大环内酯类抗生素耐药机制研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2009.
- [19] 王圣思,郑世民,卢斯亮.大环内酯类抗生素的作用机制、耐药机制与控制措施[J].黑龙江畜牧兽医,2009(23):28-30.
- [20] 崔浩.抗生素的细菌耐药性:酶降解和修饰[J].国外医学(药学分册),2006(1):34-36,41.

Degradation Mechanism of Bacteria for Four Kinds of Common Antibiotics in Soil

SU Jing-jing, JIANG Ya-mei, WEN Hong-yu

(College of Life Science, Jiangsu Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116)

Abstract: In order to solve the environmental pollution problem of common antibiotics in soil, the degradation mechanism of the bacteria on four kinds of antibiotics was reviewed to solve the environmental of common antibiotics in the soil. It was found that some bacteria had the ability to break down antibiotics, and the mechanism of action was as followed: β -lactamase open the loop of β -lactam antibiotic; esterase, phosphorylase and glycosidase make macrolide antibiotics passivation; modification of three types of amino glycosides modification enzymes that AACs, APHs and ANT; chloramphenicol acetyltransferase genes, cat A and cat B, encoding acyltransferase that making chloramphenicol into metabolites has no antibacterial activity. The results provided a basis for solving the problem of the pollution of soil antibiotics by elucidating the mechanism of the degradation of bacteria to antibiotics.

Keywords: soil; bacteria; antibiotics; degradation mechanism; pollution