

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20200205002

卢文强, 孙昊宇, 王雅娟, 等. 抗生素的胁迫与抗生素抗性基因产生与传播关系的研究[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(4): 129-138

Lu W Q, Sun H Y, Wang Y J, et al. The relationship of antibiotic stress with emergence and dissemination of antibiotic resistance genes [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(4): 129-138 (in Chinese)

## 抗生素的胁迫与抗生素抗性基因产生与传播关系的研究

卢文强<sup>1</sup>, 孙昊宇<sup>2</sup>, 王雅娟<sup>2</sup>, 林志芬<sup>2</sup>, 张饮江<sup>1,\*</sup>

1. 上海海洋大学海洋生态与环境学院, 上海 201306

2. 同济大学环境科学与工程学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092

收稿日期: 2020-02-05 录用日期: 2020-03-11

**摘要:** 抗生素的环境残留和抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)污染日益增加, 对全球公共卫生构成重大威胁。目前, 关于环境中抗生素与 ARGs 产生与传播的关系的研究较多, 但结果却不尽相同。为了确定抗生素的胁迫与 ARGs 产生与传播的关系, 用磺胺类抗生素(SAs)对大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)毒性作用表征 SAs 的胁迫作用, 用突变和接合转移表征 ARGs 的产生与传播, 测定了 SAs 对大肠杆菌的毒性、突变频率和结合转移频率的影响, 根据剂量-效应曲线, 计算了毒性参数(无观察效应浓度(NOEC)、抑制率为 50% 的化合物浓度(EC<sub>50</sub>)、抑制率为 80% 的化合物浓度(EC<sub>80</sub>)), 突变效应参数(促进率为 1% 时最低可观测突变促进效应浓度(MC<sub>0.1</sub>)、促进率为 50% 时突变促进效应浓度(MC<sub>50</sub>)、促进率最大时突变促进效应浓度(MC<sub>max</sub>))和接合转移效应参数(促进率为 1% 时最低可观测接合转移促进效应浓度(RC<sub>0.1</sub>)、促进率最大时接合转移促进效应浓度(RC<sub>max</sub>)和促进率为 1% 时最高可观测接合转移促进效应浓度(RC<sub>0.2</sub>)), 利用线性回归分析的方法探究 SAs 的胁迫与大肠杆菌突变频率和结合转移频率之间的关系, 并分析其可能的机制。结果表明, 磺胺的高胁迫作用导致核苷酸碱基的大量减少, 在 DNA 复制与转录时, 碱基对错配的概率大大增加, 从而开始促进突变频率。SAs 的低胁迫作用可能引起大肠杆菌的 SOS 反应, SOS 反应可以上调质粒编码的基因以及控制细胞膜的通透性基因, 从而提高其接合转移频率。此外, 真实环境中存在许多其他的因素也会影响 ARGs 的产生和传播, 据此, 本文建议在探索真实环境中 ARGs 的产生和传播时, 应考虑真实环境中其他影响因素和抗生素胁迫的综合作用。上述研究为探索抗生素胁迫对 ARGs 产生与传播的影响提供了新的思路。

**关键词:** 抗生素; 磺胺; 抗生素抗性基因; 突变; 接合转移

文章编号: 1673-5897(2020)4-129-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## The Relationship of Antibiotic Stress with Emergence and Dissemination of Antibiotic Resistance Genes

Lu Wenqiang<sup>1</sup>, Sun Haoyu<sup>2</sup>, Wang Yajuan<sup>2</sup>, Lin Zhifen<sup>2</sup>, Zhang Yinjiang<sup>1,\*</sup>

1. College of Marine Ecology and Environment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

2. College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Re-use, Shanghai 200092, China

Received 5 February 2020 accepted 11 March 2020

**基金项目:** 同济大学污染控制与资源化研究国家重点实验室自主研究(重点)项目(PCRRK16007); 上海市科学技术委员会科研计划课题(17DZ1200103, 14DZ2261100); 环境化学与生态毒理学国家重点实验室开放基金课题(KF2016-11); 111 工程资助项目; 博士后创新人才支持计划资助项目(BX20190247); 中国博士后科学基金资助项目(2019M661624)

**第一作者:** 卢文强(1993—), 男, 硕士研究生, 研究方向为微生物毒理学, E-mail: 825089796@qq.com

\* **通讯作者** (Corresponding author), E-mail: yjzhang@shou.edu.cn

**Abstract:** The pollution induced by antibiotic residues and antibiotic resistance genes (ARGs) has been significantly threatening the global public health. Although the relationship between antibiotics and ARGs in the environment have been studied by many investigators, there is no unified conclusion for these results. To investigate the relationship of antibiotics stress with the emergence and dissemination of ARGs, the effects of sulfonamides (SAs) on growth, mutation frequency and conjugative transfer frequency were determined using *Escherichia coli* (*E. coli*) as a target organism in this study. The SAs stress on *E. coli* was expressed as the toxic effects of SAs on the growth of *E. coli*, and the emergence and dissemination of ARGs were characterized by the mutation and conjugative transfer, respectively. The typical mutation parameters, including minimum observable concentration of SAs ( $MC_{0.1}$ ), the concentration of SAs that induces the 50% promotion ( $MC_{50}$ ) and maximum promotion ( $MC_{max}$ ) were respectively selected to describe the onset of stimulation, the moderate stimulation, and the maximum stimulation effect of mutation frequency. The typical conjugative transfer parameters, including the minimum observable concentration of SAs ( $RC_{0.1}$ ), the concentration of SAs that induces the maximum promotion ( $RC_{max}$ ), and the maximum observable concentration of SAs ( $RC_{0.2}$ ) were respectively selected to describe the onset of stimulation, the maximum stimulation, and the terminal stimulation effect of conjugative transfer frequency. The linear regression was conducted to analyze the relationship of the stress of SAs with the mutation frequency and conjugative transfer frequency in *E. coli* and explore their possible mechanism. The results show that the high stress of SAs results in a substantial reduction in the number of nucleotide bases, which increases the probability of base pair mismatch during DNA replication and transcription, thus promoting the mutation frequency. The low stress of SAs may trigger the SOS response in *E. coli*, which promotes the conjugative transfer frequency by up-regulating the genes encoded by plasmid and controlling the membrane permeability. Previous studies suggested that many complicated influence factors in the real environment might impact the emergence and dissemination of ARGs, such as the type of compound, concentration of the compound, and transmitting medium. Therefore, it is necessary to comprehensively consider these possible factors when exploring the relationship of antibiotic stress with the emergence and dissemination of ARGs. The present research proposes a new insight into the emergence and dissemination of ARGs under the stress of antibiotics.

**Keywords:** antibiotics; sulfonamides; antibiotic resistance genes; mutation; conjugative transfer

抗生素作为一类可抑制微生物生长和繁殖,甚至杀死微生物的自然产生、部分合成或全合成的化合物,现已广泛应用在医疗卫生与畜牧养殖业中,用于治疗或预防细菌感染以及促进畜牧业的增长等<sup>[1]</sup>。然而,抗生素的过度使用,导致水体<sup>[2-3]</sup>、土壤<sup>[4]</sup>和空气<sup>[5]</sup>中残留的抗生素不断累积,不仅对生物体有潜在的毒性作用,更严重的是导致环境中抗生素抗性基因(antibiotics resistance genes, ARGs)的增加<sup>[6]</sup>。ARGs能够降低抗生素对细菌感染的治疗潜力,致使细菌感染的人和动物的死亡率上升<sup>[7-8]</sup>。目前,ARGs已被公认为新兴和持久的环境污染物质,如果ARGs持续累积得不到有效控制,到2050年每年可能导致1千万人死于ARGs污染<sup>[9]</sup>。因此,研究ARGs污染来源,深入探究ARGs污染机理,对采取更为有效的防治措施至关重要。

目前,有研究表明,抗生素是ARGs污染的主要

驱动力<sup>[10]</sup>。例如,Zhao等<sup>[11]</sup>发现在活性污泥反应器中抗生素与相应的ARGs丰度相关。Zhang等<sup>[12]</sup>研究发现,我国温榆河及其支流耐药大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)的数量与残留抗生素水平呈正相关关系。Rodriguez-Mozaz等<sup>[13]</sup>调查了医院和城市废水中残留抗生素和ARGs的发生情况,发现检测到的残留抗生素与ARGs呈显著正相关。然而,与此相反,还有一些研究表明,环境中残留的抗生素与ARGs的污染无关。例如,在美国东北部一个未经处理的混合粪肥坑中,研究者发现,四环素抗性基因(*tetO*)的浓度与四环素浓度无关<sup>[14]</sup>。此外,Jia等<sup>[15]</sup>研究了巴河中残留抗生素与ARGs的相关性,研究表明,残留的抗生素与它们相应的ARGs无明显相关性。因此,ARGs污染与抗生素关系究竟如何,还需要进一步探究。

众所周知,ARGs污染源于ARGs的产生和传

播。ARGs的产生主要来源于抗生素诱导的细菌基因突变,在细菌增殖过程中,亲代细胞中的ARGs可遗传给子代细胞<sup>[16]</sup>。而ARGs在细菌之间的传播主要由水平基因转移引起。水平基因转移是遗传物质通过可移动的遗传因子(质粒、转座子和整合子等)在种内或种间的转移,包括接合,转化和转导<sup>[17]</sup>。然而,转化和转导这两种转移方式因发生的条件较为苛刻,发生转化的条件是细菌需建立感受态,在自然环境中不是所用的细菌都能建立感受态,并且,细菌建立感受态的条件较为苛刻,所以转化在自然环境中发生频率较少,例如,*E. coli*被认为在自然条件下无法建立感受态,然而,在低温下,用钙离子处理时可以建立感受态<sup>[18-19]</sup>;转导是病毒介导的细胞间进行遗传转移,噬菌体转导不需要裸露的DNA,而是噬菌体介导了两宿主之间的DNA重组,所以,转导发生频率低<sup>[18,20]</sup>;接合在环境中更容易发生,既可以在细菌之间发生,也可以在细菌与介质之间发生,其也就成为环境中细菌水平基因转移主要方式<sup>[21]</sup>。因此,研究抗生素对ARGs突变和接合转移的影响可能是探讨ARGs污染与抗生素关系的重要途径。

磺胺类药物(SAs)作为一种人工抗生素已被广泛应用于药物治疗和饲料添加<sup>[22]</sup>。近10年来,我国主要河流和海域的水和沉积物中检出的近百种抗生

素中,磺胺类抗生素是检出率最高的抗生素之一<sup>[9]</sup>。在本研究中,选择了SAs作为代表性的测试化合物,探讨了在实验室条件下ARG的产生与传播与抗生素胁迫之间的关系,并且用SAs对*E. coli*生长的毒性作用表征SAs对*E. coli*的胁迫,用ARGs的突变和接合转移表征ARGs的产生和传播。探讨ARGs的产生和传播与抗生素胁迫之间的关系,并分析影响抗生素胁迫与ARGs产生和传播关系的环境因素等,为研究ARGs污染与抗生素的关系提供新的思路,对ARGs污染防治措施提供一定的理论支撑和依据。

## 1 材料与方法 (Materials and methods)

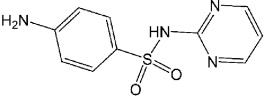
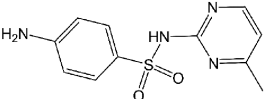
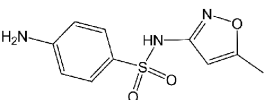
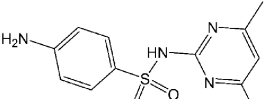
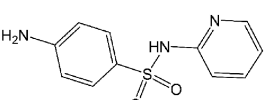
### 1.1 化学品与受试生物

实验用的*E. coli* MG1655购自北京谱如汀生物技术有限公司。在质粒接合转移实验中,含有RP4质粒(能够编码*bla*、*aphA*、*tetA*和*tetR*基因)的*E. coli*(RP4)被设定为供体菌(耐卡那霉素、氨基青霉素和四环素),而能够耐萘啶酮酸的*E. coli*(Nal)被设定为受体菌。

实验用的磺胺类化合物购于Sigma-Aldrich化学制品有限公司(上海),纯度均 $\geq 99\%$ ,试剂信息如表1所示。用二甲基亚砜(DMSO)改善SAs在样品中的溶解度,并且DMSO在样品中的浓度 $< 0.1\%$ 。

表1 实验用化合物性质

Table 1 Characteristics of the test chemicals

序号 No.	名称 Chemical name	简称 Abbreviation	CAS	结构 Structure	$\log(\text{EC}_{50})(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$
1	磺胺嘧啶 Sulfadiazine	SD	68-35-9		-6.35
2	磺胺甲基嘧啶 Sulfamerazin	SMR	127-79-7		-6.16
3	磺胺甲恶唑 Sulfamethoxazole	SMX	723-46-6		-6.67
4	磺胺二甲嘧啶 Sulfamethazine	SMZ	57-68-1		-5.75
5	磺胺吡啶 Sulfapyridine	SPY	144-83-2		-5.64

## 1.2 培养基

LB培养基:取10 g胰蛋白胨、5 g酵母提取物和10 g NaCl于烧杯中,加入一定量的蒸馏水进行水浴加热,至成分完全溶解后冷却,用蒸馏水定容至1 L,最后将培养基的pH调整至 $7.1 \pm 0.1$ 。之后将培养基分装、灭菌,于4 °C下保存备用。

MH培养基:取2 g牛肉浸粉、17.5 g酸水解酪蛋白和1.5 g水溶性淀粉于烧杯中,加入一定量的蒸馏水进行水浴加热,至成分完全溶解后冷却,用蒸馏水定容至1 L,最后将培养基的pH调整至7.2~7.4。之后将培养基分装、灭菌,于4 °C下保存备用。

## 1.3 毒性实验

首先,在透明96孔板中加入80  $\mu\text{L}$ 的SAs(作为实验组)或质量分数为1%的NaCl溶液(作为对照组),80  $\mu\text{L}$ 的0.4倍MH培养基(0.4倍为总体积的最终倍数)和40  $\mu\text{L}$ 准备好的细菌(约为 $1 \times 10^4$  cells·mL<sup>-1</sup>),在37 °C、180 r·min<sup>-1</sup>培养22 h,所有毒性试验均为一式3份。在酶标仪(Multiskan GO,美国赛默飞世尔科技公司)上测定实验组和对照组的OD<sub>600</sub>值,毒性结果计算如式(1)所示:

$$\text{Inhibition} = (1 - \frac{\text{OD}_t}{\text{OD}_c}) \times 100\% \quad (1)$$

式中:Inhibition表示SAs对细菌生长的抑制率(%);OD<sub>t</sub>和OD<sub>c</sub>分别表示实验组和对照组的OD<sub>600</sub>值。使用Weibull函数(Origin8.6)拟合数据。

## 1.4 突变实验

突变实验的培养条件与毒性试验相同。在37 °C培养22 h后,收集平行孔中的菌液,将收集的菌液一部分稀释10<sup>6</sup>倍,剩余的部分浓缩3倍。稀释后的菌液在不含有任何抗生素的LB培养基平板上进行培养,对照组和实验组皆为5组平行。计算总菌数(CFU·mL<sup>-1</sup>),浓缩的菌液充分混匀后在含有25 mg·L<sup>-1</sup>利福平的LB培养基平板上进行利福平抗性突变体的筛选,计算突变体个数(CFU·mL<sup>-1</sup>)。

突变次数使用MM法(MSS maximum likelihood)计算<sup>[23]</sup>。根据式(2)和(3)计算突变频率和突变率促进率:

$$M = \frac{m}{N_t} \quad (2)$$

$$\text{Promotion1} = (\frac{M_t}{M_c} - 1) \times 100\% \quad (3)$$

式中:M为暴露于SAs的细菌突变频率;m为突变体个数(CFU·mL<sup>-1</sup>);N<sub>t</sub>表示培养物中活细胞的总数

(CFU·mL<sup>-1</sup>);Promotion1表示突变频率促进率(%);M<sub>t</sub>和M<sub>c</sub>分别代表实验组和对照组的突变频率。最后,利用Hormesis模型(Origin8.6)对突变数据进行拟合。

## 1.5 接合转移实验

将*E. coli*(RP4)菌液和*E. coli*(Nal)菌液按1:2的比例混合20 min。接合转移体系的总体积是200  $\mu\text{L}$ ,包括40  $\mu\text{L}$  SAs溶液(实验组)或质量分数为1%的NaCl溶液(对照组),60  $\mu\text{L}$ 混合菌液和100  $\mu\text{L}$  2倍LB培养基,充分摇匀在37 °C下培养8 h,对照组和实验组皆有3组平行。然后用质量分数为1%的NaCl溶液适当稀释混合菌液并摇匀,分别在受体菌筛选平板(含有40 mg·L<sup>-1</sup>萘啶酮酸)和接合子筛选平板(含有40 mg·L<sup>-1</sup>萘啶酮酸和40 mg·L<sup>-1</sup>卡那霉素)倾注,于37 °C下倒置培养12 h后计算受体菌数(CFU·mL<sup>-1</sup>)和接合子数(CFU·mL<sup>-1</sup>)。根据式(4)和式(5)计算接合转移频率和接合转移频率促进率:

$$T = \frac{N_c}{N_r} \quad (4)$$

$$\text{Promition2} = (\frac{T_t}{T_c} - 1) \times 100\% \quad (5)$$

式中:T为接合转移频率;N<sub>c</sub>是接合子数(CFU·mL<sup>-1</sup>);N<sub>r</sub>为受体菌数(CFU·mL<sup>-1</sup>);Promition2为接合转移频率促进率(%);T<sub>t</sub>和T<sub>c</sub>分别为实验组和对照组的接合转移频率。最后,利用Hormesis模型(Origin8.6)拟合接合转移数据。

## 1.6 数据分析

采用SPSS18.0软件进行线性回归分析,通过相关系数(r<sup>2</sup>)、标准误差(SE)、Fisher统计(F)和显著性水平(P)来评价。

## 2 结果与讨论 (Results and discussion)

### 2.1 SAs对*E. coli*生长的毒性作用

如图1(a)所示,SAs对*E. coli*生长毒性剂量-效应曲线呈现典型的S型,说明SAs对*E. coli*生长的抑制率随着SAs浓度的增加而逐渐增大。根据毒性剂量-效应曲线,计算了SAs对*E. coli*生长的半数抑制浓度(EC<sub>50</sub>)(表1)。SAs的EC<sub>50</sub>顺序为:SPY < SMZ < SMR < SD < SMX。基于课题组之前的研究及文献报道,SAs抑制*E. coli*生长的机制如图2(a)所示,SAs与对氨基苯甲酸(PABA)竞争结合二氢蝶酸合成酶(DHPS),这阻碍了二氢叶酸(DHFA)的合成,进而抑制了二氢叶酸还原酶(DHFR)与DHFA的结合<sup>[24-25]</sup>,从而阻碍四氢叶酸(THFA)的合成,最终抑

制 *E. coli* 的生长<sup>[26]</sup>。

为了探究 SAs 胁迫与 ARGs 在 *E. coli* 中产生和传播的关系, 根据毒性剂量-效应曲线选择了典型

的毒性参数, 包括无观察效应浓度(NOEC), EC<sub>50</sub> 和抑制率 80% 的化合物浓度(EC<sub>80</sub>)。NOEC、EC<sub>50</sub> 和 EC<sub>80</sub> 的对数值如表 2 所示。

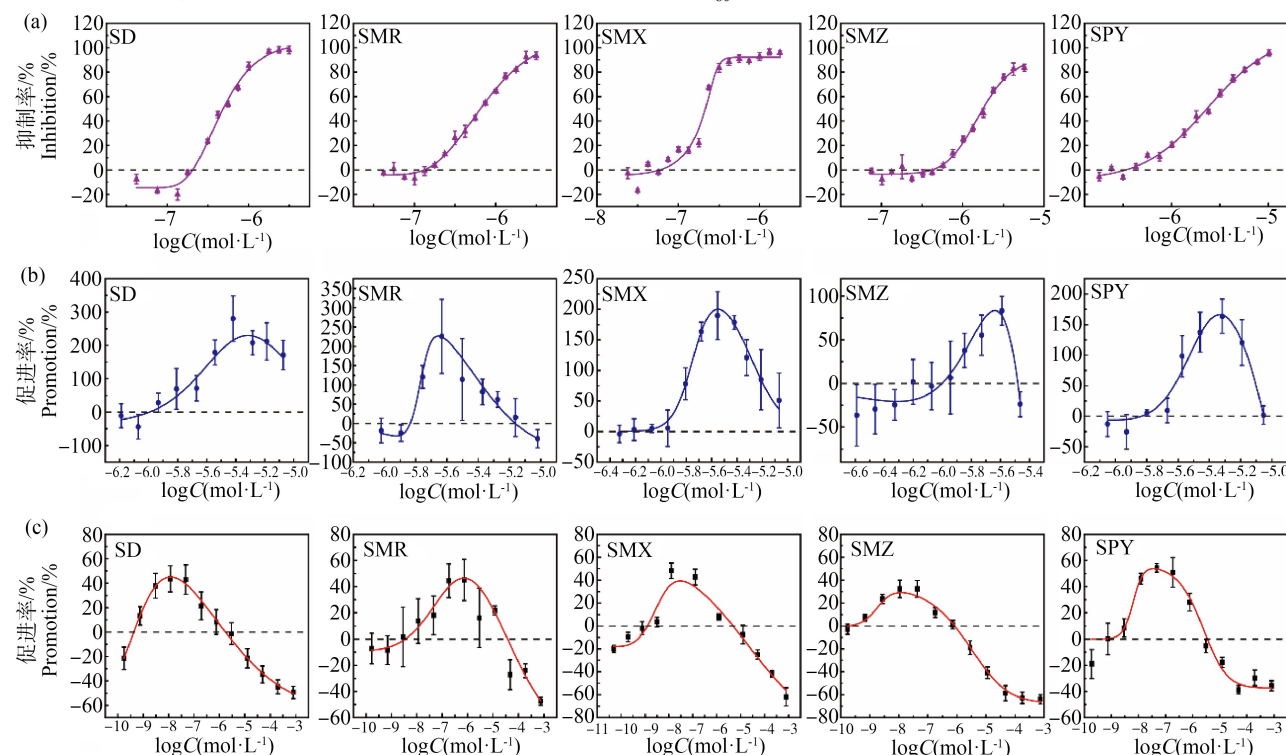


图 1 磺胺类药物 (SAs) 对 *E. coli* 的生长毒性剂量-效应曲线

注: (a) 毒性; (b) 突变频率; (c) 接合转移频率。

Fig. 1 The concentration-response curves for sulfonamides (SAs) effect on *E. coli* growth

Note: (a) the growth; (b) the mutation frequency; (c) the conjugative transfer frequency.

表 2 SAs 对 *E. coli* 生长、突变和接合转移作用的典型参数值

Table 2 The typical concentration values of SAs to the growth, mutation, and the conjugative transfer of *E. coli*

化合物 Compound	毒性参数 Toxic parameters			突变参数 Mutation parameters			接合转移参数 Conjugative transfer parameters		
	log(NOEC)	log(EC <sub>50</sub> )	log(EC <sub>80</sub> )	log(MC <sub>0.1</sub> )	log(MC <sub>50</sub> )	log(MC <sub>max</sub> )	log(RC <sub>0.1</sub> )	log(RC <sub>max</sub> )	log(RC <sub>0.2</sub> )
SMX	-7.23	-6.67	-6.54	-6.32	-5.85	-5.55	-8.91	-7.53	-5.36
SD	-6.69	-6.35	-6.03	-5.99	-5.80	-5.32	-9.37	-7.92	-5.80
SMR	-6.88	-6.16	-5.80	-5.83	-5.80	-5.65	-8.46	-6.15	-4.46
SMZ	-6.38	-5.75	-5.39	-6.00	-5.80	-5.64	-9.72	-7.92	-6.11
SPY	-6.47	-5.64	-5.27	-5.83	-5.63	-5.33	-9.34	-7.45	-5.48

注: NOEC 表示无观察效应浓度; EC<sub>50</sub> 表示抑制率为 50% 的化合物浓度; EC<sub>80</sub> 表示抑制率为 80% 的化合物浓度; 典型突变参数包括 MC<sub>0.1</sub>、MC<sub>50</sub> 和 MC<sub>max</sub>, 其中, MC<sub>0.1</sub> 表示促进率为 1% 时最低可观测突变促进效应浓度, MC<sub>50</sub> 表示促进率为 50% 时突变促进效应浓度, MC<sub>max</sub> 表示促进率最大时突变促进效应浓度; 典型结合转移参数包括 RC<sub>0.1</sub>、RC<sub>max</sub> 和 RC<sub>0.2</sub>, 其中, RC<sub>0.1</sub> 表示促进率为 1% 时最低可观测接合转移促进效应浓度, RC<sub>max</sub> 表示促进率最大时接合转移促进效应浓度, RC<sub>0.2</sub> 表示促进率为 1% 时最高可观测接合转移促进效应浓度。

Note: NOEC stands for the no-observed-effect concentration of SAs that inhibits the growth of *E. coli*; EC<sub>50</sub> stands for the concentration of SAs that induces the 50% inhibition on the growth of *E. coli*; EC<sub>80</sub> stands for the concentration of SAs that induces the 80% inhibition on the growth of *E. coli*; the typical mutation parameters include MC<sub>0.1</sub>, MC<sub>50</sub> and MC<sub>max</sub>, in which MC<sub>0.1</sub> stands for minimum observable concentration of SAs that induces the 1% promotion on the mutation, MC<sub>50</sub> stands for the concentration of SAs that induces the 50% promotion, and MC<sub>max</sub> stands for the concentration of SAs that induces maximum promotion; the typical conjugative transfer parameters include RC<sub>0.1</sub>, RC<sub>max</sub> and RC<sub>0.2</sub>, in which RC<sub>0.1</sub> stands for the minimum observable concentration of SAs that induces the 1% promotion on the conjugative transfer, RC<sub>max</sub> stands for the concentration of SAs that induces the maximum promotion, and RC<sub>0.2</sub> stands for the maximum observable concentration of SAs that induces the 1% promotion on the conjugative transfer.

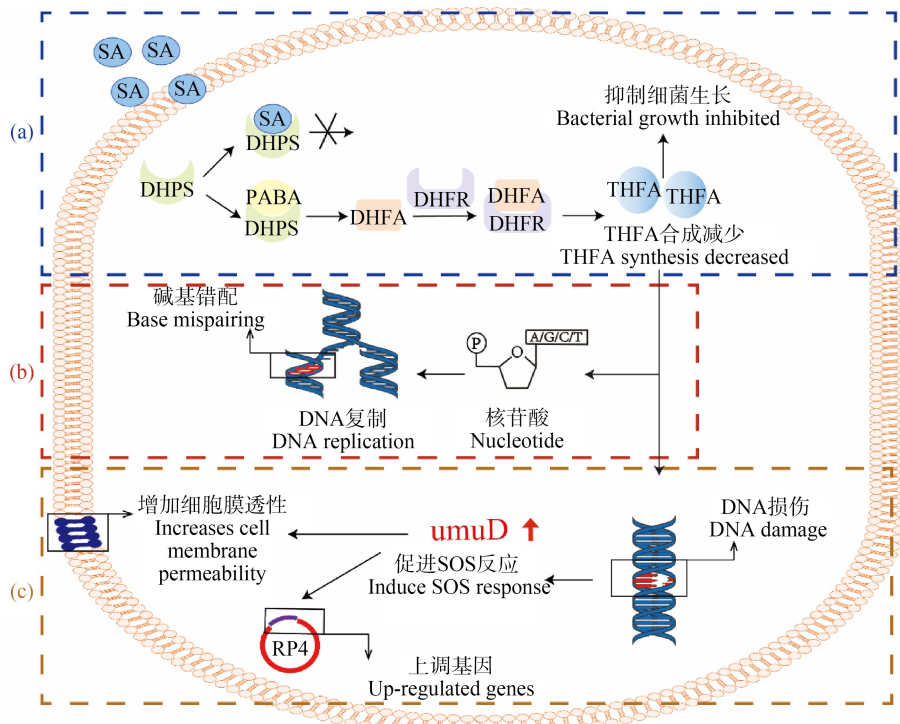


图2 SAs对 *E. coli* 的作用机理

注:(a)抑制生长;(b)促进突变频率;(c)促进接合转移频率;PABA表示对氨基苯甲酸,DHPS表示二氢蝶呤合成酶,DHFR表示二氢叶酸还原酶,DHFA表示二氢叶酸,THFA表示四氢叶酸。

Fig. 2 The mechanistic hypothesis for SAs effect on *E. coli*

Note: (a) the growth inhibition; (b) the promotion of the mutation frequency; (c) the promotion of the conjugative transfer frequency;

PABA stands for para-aminobenzoic acid; DHPS stands for dihydropteroate synthase;

DHFR stands for dihydrofolate reductase; DHFA stands for dihydrofolic acid; THFA stands for tetrahydrofolic acid.

## 2.2 SAs对 *E. coli* 突变频率的影响

如图1(b)所示,SAs促进 *E. coli* 突变频率的剂量-效应曲线呈倒U型,表明SAs对 *E. coli* 突变频率的促进率随SAs浓度的增加先升高后降低。最大促进率的顺序为SMZ(83.58%)<SPY(166.16%)<SMX(199.94%)<SMR(227.04%)<SD(230.36%)。SAs促进 *E. coli* 的突变频率可能的机制如下(图2(b)):SAs阻碍THFA的生物合成,从而减少嘌呤和嘧啶的合成,在DNA复制和转录时,这可能会导致碱基的错配,最终促进 *E. coli* 的突变频率<sup>[27]</sup>。此外,当SAs浓度超过阈值时,SAs会导致细菌总数和突变体数量大幅下降,从而导致SAs对 *E. coli* 突变频率的促进作用下降<sup>[28]</sup>。

根据SAs促进 *E. coli* 突变频率的剂量-效应曲线,本研究选取了典型的突变参数,包括促进率为1%时最低可观测突变促进效应浓度( $MC_{0.1}$ )、促进率为50%时突变促进效应浓度( $MC_{50}$ )和促进率最大时突变促进效应浓度( $MC_{max}$ ),并且  $MC_{0.1}$ 、 $MC_{50}$  和

$MC_{max}$  的对数值如表2所示。

## 2.3 SAs对 *E. coli* 接合转移频率的影响

由图1(c)可知,SAs促进 *E. coli* 接合转移频率的剂量-效应曲线呈现典型的倒J型。随着SAs浓度的增加,接合转移促进率的提升先增大后减小。最大促进率的顺序为SMZ(29.18%)<SMX(39.34%)<SD(45.07%)<SMR(46.50%)<SPY(53.73%)。SAs促进 *E. coli* 接合转移频率的可能机制如下(图2(c)):SAs的作用可引起DNA和蛋白质损伤,从而触发 *E. coli* 的SOS反应<sup>[29-30]</sup>。SOS反应可能上调胞内基因,这包括RP4质粒编码基因,以及控制供体和受体细菌细胞膜通透性的基因,从而促进RP4质粒的结合转移<sup>[31-34]</sup>。当SAs的胁迫逐渐增大时,SOS反应不能完全修复DNA和蛋白质损伤,这可能影响供体和受体细菌的活性,甚至是接合子的活性,导致SAs对接合转移频率的促进作用逐渐降低<sup>[35-36]</sup>。

典型的接合转移参数包括促进率为1%时最低可观测接合转移促进效应浓度( $RC_{0.1}$ )、促进率最大

时接合转移促进效应浓度( $RC_{max}$ )和促进率为1%时最高可观测接合转移促进效应浓度( $RC_{0.2}$ ),  $RC_{0.1}$ 、 $RC_{max}$  和  $RC_{0.2}$  的对数值如表2所示。

## 2.4 SAs 的胁迫与 ARGs 在 *E. coli* 中产生和传播的关系

### 2.4.1 SAs 的胁迫与 *E. coli* 中 ARGs 突变频率的关系

通过毒性参数(NOEC、 $EC_{50}$  和  $EC_{80}$ )与突变参数( $MC_{0.1}$ 、 $MC_{50}$  和  $MC_{max}$ )的线性回归,探讨 SAs 胁迫与 *E. coli* 突变频率之间的关系,回归方程如式(6)~(14)。

$$\log MC_{0.1} = 0.391 \log NOEC - 3.369$$

$$n=5, r^2 = 0.437, SE=0.174, F=2.327, P=0.225 \quad (6)$$

$$\log MC_{50} = 0.152 \log NOEC - 4.755$$

$$n=5, r^2 = 0.351, SE=0.081, F=1.624, P=0.292 \quad (7)$$

$$\log MC_{max} = 0.109 \log NOEC - 4.767$$

$$n=5, r^2 = 0.050, SE=0.185, F=0.159, P=0.717 \quad (8)$$

$$\log M_{0.1} = 0.346 \log EC_{50} - 3.886$$

$$n=5, r^2 = 0.529, SE=0.158, F=3.367, P=0.164 \quad (9)$$

$$\log MC_{50} = 0.156 \log EC_{50} - 4.820$$

$$n=5, r^2 = 0.577, SE=0.065, F=4.094, P=0.136 \quad (10)$$

$$\log MC_{max} = 0.045 \log EC_{50} - 5.221$$

$$n=5, r^2 = 0.014, SE=0.188, F=0.041, P=0.852 \quad (11)$$

$$\log M_{0.1} = 0.313 \log EC_{80} - 4.180$$

$$n=5, r^2 = 0.635, SE=0.139, F=5.214, P=0.107 \quad (12)$$

$$\log MC_{50} = 0.125 \log EC_{80} - 5.047$$

$$n=5, r^2 = 0.544, SE=0.068, F=3.578, P=0.115 \quad (13)$$

$$\log MC_{max} = 0.027 \log EC_{80} - 5.344$$

$$n=5, r^2 = 0.027, SE=0.189, F=0.021, P=0.895 \quad (14)$$

根据以上的回归结果可知, $EC_{80}$  与  $MC_{0.1}$  回归的  $r^2$  为 0.64, 是这些方程中最高的, 说明  $EC_{80}$  与  $MC_{0.1}$  的相关性更好。结合图 2(a)和图 2(b), 分析  $EC_{80}$  与  $MC_{0.1}$  之间相关的可能机理如下(图 3): 较高的 SAs 胁迫作用可能会导致 THFA 的合成大大减少, 从而限制了核苷酸碱基的产生; 同时, 碱基对错配的概率可能由于核苷酸碱基的减少而大大增加, 最终导致 *E. coli* 突变频率的提高<sup>[29]</sup>。此外, 任何细菌在接近抗生素最低抑菌浓度(MIC)时, 可以获得突变的最大选择压力, 这说明突变在高压下发生得更多<sup>[6]</sup>。此外, 大多数细菌的染色体中都含有丰富的毒素-抗毒素(TA)系统<sup>[37]</sup>。在低 SAs 胁迫下, TA 系统可能为细菌种群提供耐受性, 并保护细菌免受基因突变的影响<sup>[38]</sup>。因此, 只有当 SAs 对 *E. coli* 施

加更大的压力时, SAs 才可能导致 *E. coli* 突变频率促进率增加。

### 2.4.2 SAs 的胁迫与 *E. coli* 中 ARGs 接合转移频率的关系

通过毒性参数(NOEC、 $EC_{50}$  和  $EC_{80}$ )与接合转移参数( $RC_{0.1}$ 、 $RC_{max}$  和  $RC_{0.2}$ )的线性回归, 探讨 SAs 胁迫与 *E. coli* 接合转移频率之间的关系, 回归方程如式(15)~(23)。

$$\log RC_{0.1} = -1.052 \log NOEC - 16.240$$

$$n=5, r^2 = 0.532, SE=0.386, F=3.410, P=0.162 \quad (15)$$

$$\log RC_{max} = -0.732 \log NOEC - 12.319$$

$$n=5, r^2 = 0.115, SE=0.793, F=0.391, P=0.576 \quad (16)$$

$$\log RC_{0.2} = -0.967 \log NOEC - 11.949$$

$$n=5, r^2 = 0.276, SE=0.612, F=1.146, P=0.363 \quad (17)$$

$$\log RC_{0.1} = -0.621 \log EC_{50} - 12.953$$

$$n=5, r^2 = 0.286, SE=0.476, F=1.204, P=0.353 \quad (18)$$

$$\log RC_{max} = -0.179 \log EC_{50} - 8.486$$

$$n=5, r^2 = 0.011, SE=0.839, F=0.032, P=0.869 \quad (19)$$

$$\log RC_{0.2} = -0.428 \log EC_{50} - 8.058$$

$$n=5, r^2 = 0.084, SE=0.689, F=0.275, P=0.636 \quad (20)$$

$$\log RC_{0.1} = -0.448 \log EC_{80} - 11.761$$

$$n=5, r^2 = 0.218, SE=0.499, F=0.837, P=0.428 \quad (21)$$

$$\log RC_{max} = -0.023 \log EC_{80} - 7.525$$

$$n=5, r^2 = 0.000, SE=0.843, F=0.001, P=0.980 \quad (22)$$

$$\log RC_{0.2} = -0.260 \log EC_{80} - 6.949$$

$$n=5, r^2 = 0.045, SE=0.703, F=0.142, P=0.731 \quad (23)$$

由以上回归方程可知, NOEC 与  $RC_{0.1}$  回归的  $r^2$  值最高, 为 0.53, 说明 NOEC 与  $RC_{0.1}$  的相关性较好。根据图 2(a)和图 2(c), 分析了 NOEC 与  $RC_{0.1}$  之间的密切关系如下(图 3): 在低 SAs 胁迫下, THFA 合成受阻可能导致 DNA 损伤, 从而触发细胞 SOS 反应, 最终促进 RP4 质粒的接合转移<sup>[39]</sup>。此外, *umuDC* 操纵子被认为是维持 SOS 应答的关键因素, 高 SAs 胁迫可能导致 *umuD* 蛋白和 *umuC* 的损伤, 从而抑制 SOS 反应<sup>[39]</sup>。因此, 只有当 SAs 对 *E. coli* 施加较低的压力时, 才会导致其对接合转移频率的提升率增加。

## 2.5 影响抗生素胁迫与 ARGs 产生和传播关系的因素

综上所述, 本研究认为 ARGs 的产生和传播可能受到不同水平的抗生素胁迫的调控(图 3): 当高浓度抗生素胁迫引起突变频率的初始提升时, 低浓度抗生素胁迫引起接合转移频率的初始提升。然而,

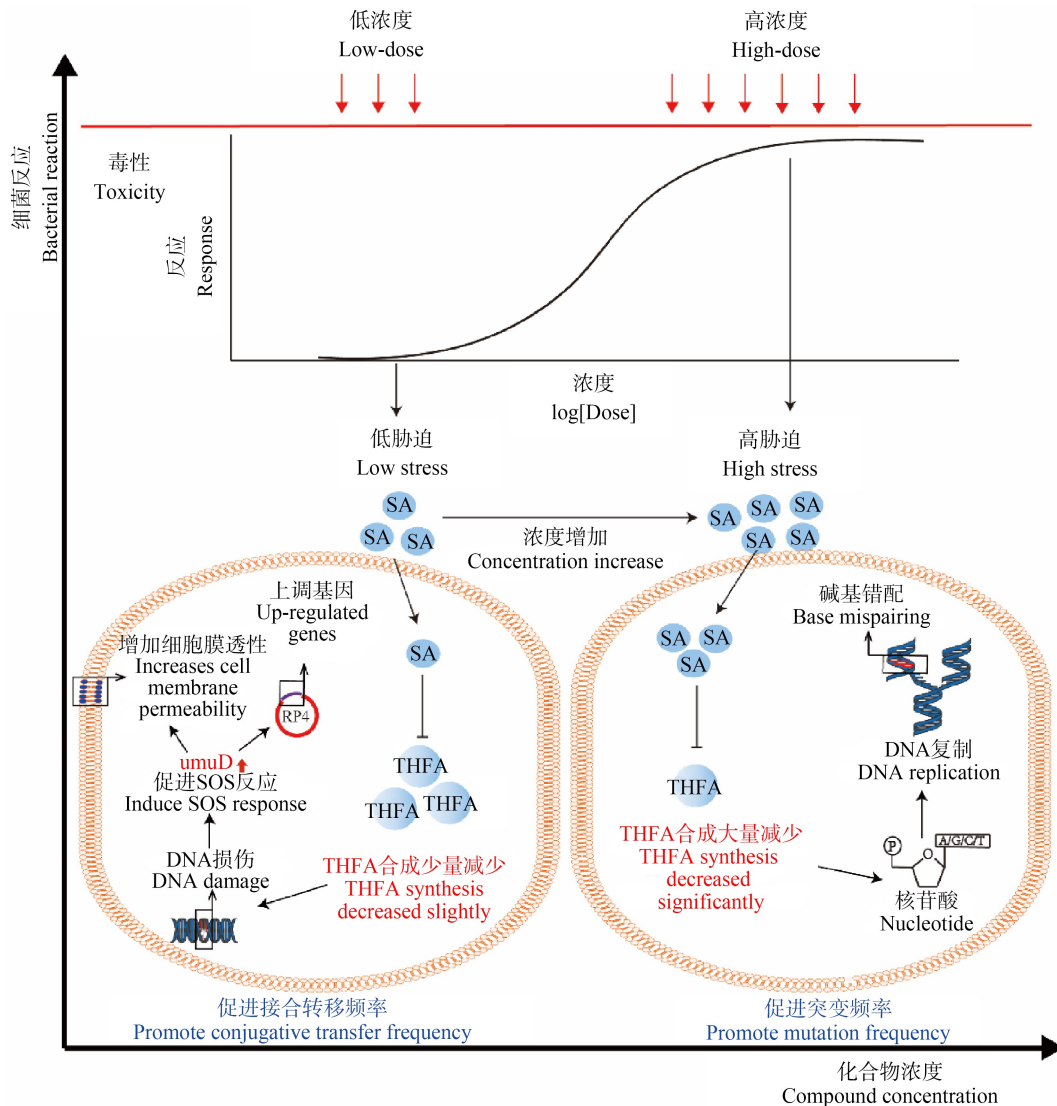


图3 SAs胁迫与突变和接合转移的关系

Fig. 3 The relationship of mutation and conjugative transfer with the SAs stress

正如引言中提到的,一些研究人员对 ARGs 和抗生素之间的关系得出了不同的结论。环境中 ARGs 与抗生素浓度之间关系的不一致性可能是由 2 个因素造成的:

(1)不同的抗生素浓度。不同的环境条件下,抗生素浓度可能有很大的差异,这导致抗生素对细菌的胁迫大小不同,从而导致环境中 ARGs 的产生和传播存在差异。

(2)在环境中可能的影响因素。在实际环境中,有许多因素影响抗生素胁迫与 ARGs 的产生和传播的关系:①真实环境中存在许多抗生素外的其他种类的化合物可以影响 ARGs 的产生和传播。例如,重金属的亚抑制浓度,包括 Cu(II)、Ag(I)、Cr(VI)

和 Zn(II)都可以促进 ARGs 的产生和传播<sup>[34]</sup>。②传播介质的不同可能导致 ARGs 的传播发生变化。例如,SMX 促进的 pB10 质粒在活性污泥中的传播速率远远高于其促进 pB10 质粒在细菌之间的传播速率<sup>[40]</sup>。此外,还有研究表明,低温和高盐度会阻碍 ARGs 的产生和传播<sup>[15]</sup>。③不同菌种 ARGs 的产生和传播可能相互干扰。例如,有研究发现,来自其他细菌物种的水平基因转移也会增加 *E. coli* 对抗生素的耐药性<sup>[41]</sup>。

本研究发现,ARGs 产生与传播和抗生素胁迫之间是密切相关的。然而,在真实环境中也存在许多其他因素影响 ARGs 产生与传播,例如,其他种类化合物、环境介质以及细菌种类等。因此,建议在探



究 ARGs 产生与传播时,应考虑这些影响因素和抗生素胁迫的综合作用。本研究为研究抗生素胁迫下 ARGs 的产生和传播提供了新的思路,为寻找 ARGs 污染的防治方法提供了一定的指导。

通讯作者简介:张饮江(1961—),男,硕士,教授,主要研究方向为水域生态修复。

#### 参考文献 (References):

- [1] Managaki S, Murata A, Takada H, et al. Distribution of macrolides, sulfonamides, and trimethoprim in tropical waters: Ubiquitous occurrence of veterinary antibiotics in the Mekong Delta [J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(23): 8004-8010
- [2] Jiang L, Hu X, Yin D, et al. Occurrence, distribution and seasonal variation of antibiotics in the Huangpu River, Shanghai, China [J]. *Chemosphere*, 2011, 82(6): 822-828
- [3] Qin Y, Wen Q, Ma Y, et al. Antibiotics pollution in Gonghu Bay in the period of water diversion from Yangtze River to Taihu Lake [J]. *Environmental Earth Sciences*, 2018, 77(11): 419
- [4] Li Y, Wu X, Mo C, et al. Investigation of sulfonamide, tetracycline, and quinolone antibiotics in vegetable farmland soil in the Pearl River Delta Area, Southern China [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(13): 7268-7276
- [5] Hartmann E M, Hickey R, Hsu T, et al. Antimicrobial chemicals are associated with elevated antibiotic resistance genes in the indoor dust microbiome [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(18): 9807-9815
- [6] Zhang Q, Ying G, Pan C, et al. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: Source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(11): 6772-6782
- [7] Wright G D. Antibiotic resistance in the environment: A link to the clinic? [J]. *Current Opinion In Microbiology*, 2010, 13(5): 589-594
- [8] Tripathi V, Tripathi P. Antibiotic Resistance Genes: An Emerging Environmental Pollutant [M]. Kesari K K. *Environmental Science and Engineering*. Springer, 2017: 183-201
- [9] Li S, Shi W, Liu W, et al. A duodecennial national synthesis of antibiotics in China's major rivers and seas (2005-2016) [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 615: 906-917
- [10] 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
- [11] Zhao R, Feng J, Liu J, et al. Deciphering of microbial community and antibiotic resistance genes in activated sludge reactors under high selective pressure of different antibiotics [J]. *Water Research*, 2019, 151: 388-402
- [12] Zhang Q, Jia A, Wan Y, et al. Occurrences of three classes of antibiotics in a natural river basin: Association with antibiotic-resistant *Escherichia coli* [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(24): 14317-14325
- [13] Rodriguez-Mozaz S, Chamorro S, Marti E, et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river [J]. *Water Research*, 2015, 69: 234-242
- [14] Hurst J J, Oliver J P, Schueler J, et al. Trends in antimicrobial resistance genes in manure blend pits and long-term storage across dairy farms with comparisons to antimicrobial usage and residual concentrations [J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(5): 2405-2415
- [15] Jia J, Guan Y, Cheng M, et al. Occurrence and distribution of antibiotics and antibiotic resistance genes in Ba River, China [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 642: 1136-1144
- [16] Martinez J L, Baquero F. Mutation frequencies and antibiotic resistance [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2000, 44(7): 1771-1777
- [17] Davison J. Genetic exchange between bacteria in the environment [J]. *Plasmid*, 1999, 42(2): 73-91
- [18] 谢志雄, 沈萍. 细菌遗传转化与水平基因转移[J]. *中南民族大学学报: 自然科学版*, 2003(4): 1-5
- [18] Xie Z X, Shen P. Bacterial genetic transformation and horizontal gene transfer [J]. *Journal of Central South University for Nationalities: Natural Science*, 2003(4): 1-5 (in Chinese)
- [19] Solomon J M, Grossman A D. Who's competent and when: Regulation of natural genetic competence in bacteria [J]. *Trends in Genetics*, 1996, 12(4): 150-155
- [20] 黄锦岭. 水平基因转移及其发生机制[J]. *科学通报*, 2017, 62(12): 1221-1225
- [20] Huang J L. Horizontal gene transfer and its mechanism [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2017, 62(12): 1221-1225 (in Chinese)
- [21] Lermiaux N A, Cameron A D S. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2019, 65(1): 34-44
- [22] Zhou L, Ying G, Liu S, et al. Excretion masses and environmental occurrence of antibiotics in typical swine and

- dairy cattle farms in China [J]. *Science of the Total Environment*, 2013, 444: 183-195
- [23] Hall B M, Ma C, Liang P, et al. Fluctuation analysis calculator: A web tool for the determination of mutation rate using Luria-Delbruck fluctuation analysis [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(12): 1564-1565
- [24] Seydel J K. Sulfonamides, structure-activity relationship, and mode of action. Structural problems of the antibacterial action of 4-aminobenzoic acid (PABA) antagonists [J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1968, 57 (9): 1455-1478
- [25] Brown G M. The biosynthesis of folic acid. II. Inhibition by sulfonamides [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1962, 237(6): 536-540
- [26] Skold O. Sulfonamide resistance: Mechanisms and trends [J]. *Drug Resistance Updates*, 2000, 3(3): 155-160
- [27] Wang T, Liu Y, Wang D, et al. The joint effects of sulfonamides and quorum sensing inhibitors on *Vibrio fischeri*: Differences between the acute and chronic mixed toxicity mechanisms [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2016, 310: 56-67
- [28] Vedantam G, Guay G G, Austria N E, et al. Characterization of mutations contributing to sulfathiazole resistance in *Escherichia coli* [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1998, 42(1): 88-93
- [29] Sultan I, Rahman S, Jan A T, et al. Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: A bacterial perspective [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2066
- [30] Andersson D I, Hughes D. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2014, 12(7): 465-478
- [31] Thomas C M, Nielsen K M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(9): 711-721
- [32] Sorensen S J, Bailey M, Hansen L H, et al. Studying plasmid horizontal transfer *in situ*: A critical review [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, 3(9): 700-710
- [33] Wang Y, Lu J, Mao L, et al. Antiepileptic drug carbamazepine promotes horizontal transfer of plasmid-borne multi-antibiotic resistance genes within and across bacterial genera [J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(2): 509-522
- [34] Zhang Y, Gu A Z, Cen T, et al. 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
- [35] Bae Y S, Oh H, Rhee S G, et al. Regulation of reactive oxygen species generation in cell signaling [J]. *Molecules and Cells*, 2011, 32(6): 491-509
- [36] Schieber M, Chandel N S. ROS function in redox signaling and oxidative stress [J]. *Current Biology*, 2014, 24 (10): R453-R462
- [37] Xie Y, Wei Y, Shen Y, et al. TADB 2.0: An updated database of bacterial type II toxin - antitoxin loci [J]. *Nucleic Acids Research*, 2018, 46(D1): D749-D753
- [38] Harms A, Maisonneuve E, Gerdes K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure [J]. *Science*, 2016, 354(6318): 4268
- [39] Maslowska K H, Makiela Dzbenka K, Fijalkowska I J. The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage [J]. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2019, 60(4): 368-384
- [40] Kim S, Yun Z, Ha U, et al. Transfer of antibiotic resistance plasmids in pure and activated sludge cultures in the presence of environmentally representative micro-contaminant concentrations [J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 468-469: 813-820
- [41] Hu J, Shi J, Chang H, et al. Phenotyping and genotyping of antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from a natural river basin [J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(9): 3415-3420