

DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2022041301

韩晓丰, 王亮, 宁清, 等. 抗生素和纳米银对大肠杆菌的联合毒性和抗性突变诱导效应[J]. 环境化学, 2023, 42(1): 1-10.

HAN Xiaofeng, WANG Liang, NING Qing, et al. Joint toxicity and resistance mutation-inducing effect of antibiotics and AgNPs on *Escherichia coli*[J]. Environmental Chemistry, 2023, 42 (1): 1-10.

## 抗生素和纳米银对大肠杆菌的联合毒性和抗性突变诱导效应\*

韩晓丰<sup>1,2</sup> 王亮<sup>3</sup> 宁清<sup>1</sup> 田大勇<sup>2</sup> 王大力<sup>1\*\*</sup> 游静<sup>1</sup>

(1. 暨南大学环境学院, 广州, 511486; 2. 安阳工学院化学与环境工程学院, 安阳, 455099; 3. 湖北省生态环境厅武汉生态环境监测中心, 武汉, 430022)

**摘要** 抗生素和纳米银因在各自领域的大量应用而不可避免地进入环境中, 对生态环境尤其是微生物群体构成联合暴露的风险, 但是二者对细菌生长和耐药性的联合作用, 目前受到的关注较少. 本研究测定了两种抗生素(四环素和氯霉素)以及纳米银(10—15 nm)对大肠杆菌的联合毒性及对细菌抗性突变的诱导作用, 并对相关机制进行了初步探讨. 结果表明, 抗生素和纳米银对细菌的联合毒性呈现协同效应, 但是二者联合作用下细菌对利福平的抗性突变频率显著降低. DNA测序和分子对接结果表明, 编码利福平靶标蛋白的 *rpoB* 基因发生点突变, 导致突变后的靶蛋白与利福平的结合能降低. 同时, qPCR结果表明抗生素和纳米银联合作用时, 细菌胞内 *rpoS*、*dinB* 和 *mutS* 等基因表达显著上调, 可能是抗性突变频率在联合作用下降低的主要原因. 本研究揭示了抗生素和纳米银联合作用对细菌抗性突变的影响, 有利于全面认识二者联合暴露的环境和健康风险.

**关键词** 纳米银, 抗生素, 大肠杆菌, 联合毒性, 抗性突变.

## Joint toxicity and resistance mutation-inducing effect of antibiotics and AgNPs on *Escherichia coli*

HAN Xiaofeng<sup>1,2</sup> WANG Liang<sup>3</sup> NING Qing<sup>1</sup> TIAN Dayong<sup>2</sup>  
WANG Dali<sup>1\*\*</sup> YOU Jing<sup>1</sup>

(1. School of Environment, Jinan University, Guangzhou, 511486, China; 2. College of Chemistry and Environmental Engineering, Anyang Institute of Technology, Anyang, 455099, China; 3. Wuhan Ecological Environment Monitoring Center, Department of Ecology and Environment of Hubei Province, Wuhan, 430022, China)

**Abstract** Antibiotics and nanosilver (AgNPs) are extensively applied in their respective fields and have high probability to co-exist in the environment, posing joint exposure risks on environmental organisms, especially on bacterial communities. However, the combined effects of antibiotics and AgNPs on bacterial growth and bacterial resistance mutations remain largely underexplored. In this study, the single and joint effects of two antibiotics (tetracycline and chloramphenicol) and AgNPs (10–15 nm) on bacterial growth and resistance mutations were investigated using *Escherichia coli* as a model bacterium, and the underlying mechanisms for the joint effects were explored. The results suggested that the antibiotics and AgNPs had synergistic effects on bacterial growth whilst

2022年4月13日收稿(Received: April 13, 2022).

\* 国家自然科学基金(21806055), 广东省基础与应用基础研究基金(2019A1515011583)和广州市基础与应用基础研究基金(202102020779)资助.

**Supported by** the National Natural Science Foundation of China (21806055), Guangdong Provincial Basic and Applied Basic Research Foundation (2019A1515011583) and Guangzhou Municipal Basic and Applied Basic Research Foundation (202102020779).

\*\* 通信联系人 **Corresponding author**, E-mail: wdali2018@jnu.edu.cn

antagonistic effects on the mutation frequency of *E. coli* against rifampicin, in comparison with their single actions. Furthermore, DNA sequencing and molecular docking results showed that point mutations occurred on *rpoB* gene that encodes the rifampicin target protein, leading to a decrease in the binding energy of the mutated protein with rifampicin. In addition, qPCR results showed that the gene expressions of *rpoS*, *dinB* and *mutS* in *E. coli* were significantly promoted upon exposure to antibiotics and AgNPs mixtures, which was likely a major cause for the significant decrease of the resistance mutations. This study is conducive to a comprehensive understanding of the environmental and health risks of combined exposure to antibiotics and AgNPs and provides a reference for assessment of their joint exposure risks.

**Keywords** nanosilver, antibiotics, *Escherichia coli*, combined toxicity, resistance mutation.

抗生素被大量应用于医疗和养殖等领域,导致环境中抗生素残留无处不在,甚至在饮用水和牛奶中,都普遍检测出抗生素残留<sup>[1-3]</sup>. 纳米银是一种良好的抗菌剂,同样被广泛用于灭菌和消毒等过程,并在食品、医疗、纺织和建材等行业被大量使用<sup>[4-5]</sup>,因此环境中不可避免地存在纳米银残留<sup>[6]</sup>. 同时,由于抗生素和纳米银在医疗领域均被大量应用,导致二者在医疗环境中广泛共存<sup>[4]</sup>. 并且,来自于医疗废水、生活污水和工业废水中的抗生素以及纳米银会汇集于污水处理厂,并经由污水处理厂的出水和污泥处置等方式进入环境水体或土壤中,造成二者在自然环境中的普遍共存<sup>[7]</sup>. 鉴于此,抗生素和纳米银联合暴露对生态环境尤其是微生物群体的影响需要引起格外重视. 以往的研究表明,抗生素和纳米银联合作用时会产生比各自单独作用时更强的抑菌活性. 例如, Huang 等<sup>[8]</sup>发现,纳米银和链霉素对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均表现出显著的协同抑制作用;王孟珍等<sup>[9]</sup>发现,纳米银复合材料和卡那霉素对大肠杆菌能够产生协同抑制作用. 除直接的抑菌效应外,抗生素和纳米银还能够促进细菌耐药性的产生和传播<sup>[10-12]</sup>,加剧环境中耐药细菌和耐药基因的污染问题,直接危害环境和人体健康. 然而,纳米银和抗生素的联合暴露对细菌耐药性的影响尚未引起足够的重视.

突变是细菌产生抗生素耐药性的主要原因之一<sup>[13]</sup>. 突变是指基因在复制或修复过程中发生碱基组成或排列的变化,包括碱基的替换、缺失、重复或插入等,其中导致细菌产生抗生素耐药型的突变即为抗性突变. 大量研究表明,细菌在抗生素以及各种非抗生素药物的作用下,抗性突变会被显著促进. 例如, Manna 等<sup>[14]</sup>发现,甲氧苄氨嘧啶能够通过诱导大肠杆菌 *folA* 基因的突变,促进其对抗生素的耐药性; Lu 等<sup>[15]</sup>发现,三氯生通过促进 *fabI*、*frdD*、*marR*、*acrR* 和 *soxR* 等基因的突变而显著提高大肠杆菌对多种抗生素的耐药性. 此外,最近的研究表明,纳米材料如纳米  $\text{Al}_2\text{O}_3$  和  $\text{ZnO}$  等能够通过诱导细菌胞内活性氧物种(ROS)的产生,促进细菌对抗生素的抗性突变<sup>[16]</sup>. 然而,纳米银作为一种常用的纳米抗菌剂,其对细菌抗性突变的影响尚未见相关的报道. 更重要的是,目前研究大都关注的是单一污染物对细菌抗性突变的影响,抗生素和纳米材料联合暴露对细菌抗性突变的影响仍有待进一步研究.

本文选取四环素(Tetracycline, TET)、氯霉素(Chloramphenicol, CHL)和纳米银(AgNPs)作为研究对象,以大肠杆菌(*E. coli*)作为模式细菌,测定了抗生素和纳米银分别单一和联合作用时对细菌的生长抑制效应以及抗性突变诱导效应,借助 DNA 测序和分子对接结合的方式验证了细菌的抗性突变位点和抗性机制,同时采用 qPCR 技术测定了细菌胞内与突变相关的基因表达(*rpoS*、*recA*、*lexA*、*dinB*、*mutS* 和 *uvrD*),对抗生素和纳米银的联合抗性突变诱导效应进行了初步的机制阐释.

## 1 材料与方法(Materials and methods)

### 1.1 实验材料

实验所用的模式细菌为大肠杆菌 MG1655, 购买自 Biovector 公司. 氯霉素( $\geq 98\%$ )、四环素( $\geq 98\%$ )、利福平( $\geq 98\%$ )和纳米银(10—15 nm)等化学试剂均购自阿拉丁试剂有限公司.

### 1.2 毒性测试

将大肠杆菌接种到 5 mL 的 MH 培养基(酸水解酪蛋白  $17.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、牛肉浸膏粉  $3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、淀粉  $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、

琼脂  $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{pH}=7.0\text{—}7.2$ )中,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下培养至  $\text{OD}_{590}$  ( $590 \text{ nm}$  处的光密度)达到 0.5. 随后, 将菌液稀释  $10^5$  倍后加入含有不同浓度待测物质的 96 孔板中. 每个浓度设置 3 个平行, 同时设置空白对照组. 将孔板置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  培养 24 h, 使用酶标仪测定每孔 OD 值. 之后, 计算不同浓度化合物对细菌的生长抑制率(式 1), 绘制浓度-效应曲线 (concentration-response curves, CRCs) 并获得半抑制浓度 (50% inhibiting concentration,  $\text{IC}_{50}$ ).

$$\text{Inh}(\%) = \frac{\text{OD}_{590,0} - \text{OD}_{590,i}}{\text{OD}_{590,0}} \times 100\% \quad (1)$$

根据单一毒性测试得出的  $\text{IC}_{50}$  值, 将抗生素和纳米银按照等毒性比设计混合浓度, 测定二元混合暴露体系对细菌的生长抑制作用, 获得混合物的  $\text{IC}_{50}$  值. 此外, 采用浓度加和 (concentration addition, CA) 模型, 根据抗生素和纳米银单一毒性结果, 预测联合作用的 CRCs. CA 模型适用于具有相似作用机制的化合物联合毒性的预测, 并且被广泛应用于判别混合物的相互作用类型, 具体的判别依据为: 实验组曲线及其 95% 置信区间与 CA 模型曲线重叠时, 二元混合毒性视为加和效应, 位于 CA 模型曲线的左侧和右侧时, 则分别视为协同和拮抗效应<sup>[17]</sup>. CA 模型的计算如公式(2)所示<sup>[18]</sup>.

$$\text{EC}_{y,m} = 1 / \left( \frac{\text{P1}}{\text{EC}_{y,1}} + \frac{\text{P2}}{\text{EC}_{y,2}} \right) \quad (2)$$

式中:  $\text{EC}_{y,m}$  为达到  $y(\%)$  抑制率时混合体系下的总浓度,  $\text{EC}_{y,1}$  和  $\text{EC}_{y,2}$  为达到  $y(\%)$  抑制率时组分 1 和 2 的浓度, P1 和 P2 表示混合物中组分 1 和 2 所占的浓度比例.

### 1.3 抗性突变频率测试

大肠杆菌在 96 孔板中暴露于待测物质 24 h 后, 将每孔的菌悬液 ( $200 \mu\text{L}$ ) 收集到  $1.5 \text{ mL}$  离心管中, 离心并洗涤 3 次后重新悬浮菌液 ( $20 \mu\text{L}$ ). 将重悬后的菌液用移液枪转移至含有  $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  利福平的 MH 固体培养基上, 在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下培养 48 h 后统计菌落数  $N_m$ ,  $N_m$  即为每孔菌液中发生突变的细菌个数. 同时通过梯度稀释法, 利用不含利福平的 MH 固体培养基, 测定菌悬液中的细菌总数  $N_t$ . 通过公式(3)计算突变频率  $\eta$ .

$$\eta = \frac{N_m}{N_t} \quad (3)$$

### 1.4 突变位点测定

随机挑选抗性板上筛选出的耐药菌落, 接种至含有利福平的 MH 液体培养基中, 并于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  恒温过夜培养后保存于离心管中. 使用 DNA 提取试剂盒 (生工生物, 上海) 提取细菌总 DNA, 利用引物 5'-AAGCTCATCGATATCCGTAACG-3' 和 5'-GCACGTCGCCACGTTCAACC-3' 对 *rpoB* 基因片段进行 PCR 扩增<sup>[19]</sup>. PCR 扩增过程的升温程序为: 在  $96 \text{ }^\circ\text{C}$  下进行 1 个循环, 保持时间为 1 min; 在  $96 \text{ }^\circ\text{C}$  下进行 26 个循环, 保持时间为 10 s; 在  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  保持 5 s, 最后在  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸 4 min. 扩增后的产物使用琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并将产物纯化后进行基因测序 (ABI 3730). 测序结果通过 DNASTAR 软件中 MegAlign 模块的多序列比对程序, 将样本序列与标准 *rpoB* 序列 (NCBI 编号为 NC\_000913.3) 进行比对, 样本序列与标准序列中的碱基差异即为突变发生的位点.

### 1.5 分子对接

从蛋白质结构数据库 (<https://www.rcsb.org>) 中获取大肠杆菌中利福平的靶标蛋白, 即 RNA 聚合酶的三级结构 (编号为 5UAC). 根据细菌突变位点及编码氨基酸变化, 使用 PremPS (<https://lilab.jysw.suda.edu.cn/research/PremPS/>) 在线服务构建以 5UAC 为模板的突变蛋白的三级结构. 然后使用 Discovery Studio 软件中的 CDOCKER 模块, 将野生型与突变后蛋白分别与利福平分子进行对接, 获得野生型和突变后蛋白与利福平分子对接的相互作用能大小.

### 1.6 基因表达测定

本研究选择了 6 个与突变相关的基因: *rpoS*、*lexA*、*recA*、*dinB*、*mutS* 和 *uvrD*, 测定了抗生素和纳米银分别单独和联合作用时对这些基因表达的影响, 所用的引物序列参考之前的文献<sup>[20]</sup>. 具体实验步骤如下: 离心收集不同处理组的细菌, 使用 trizol 试剂盒提取总 RNA, 去除基因组中 DNA 杂质后逆转录,

再通过 PCR 扩增获得每个样品循环数值 ( $C_t$ ), 并用相对定量 (relative quantitative, RQ) 法对数据进行归一化. 将对照组的 RQ 值设为 1, 计算基因表达差异, 详细方程计算如式(4—6):

$$\Delta C_t = C_{t, \text{目标基因}} - C_{t, \text{对照基因}} \quad (4)$$

$$\Delta \Delta C_t = \Delta C_{t, \text{暴露组}} - \Delta C_{t, \text{对照组}} \quad (5)$$

$$RQ = 2^{-\Delta \Delta C_t} \quad (6)$$

式中,  $\Delta C_{t, \text{暴露组}}$  和  $\Delta C_{t, \text{对照组}}$  分别表示目标基因与对照基因的循环阈值差值,  $\Delta \Delta C_t$  表示暴露组和对照组中每个样品循环阈值的差值, RQ 是基因表达的倍数变化与对照相比.

## 2 结果与讨论 (Results and discussion)

### 2.1 抗生素和纳米银对大肠杆菌的单一和联合毒性

首先测定了抗生素和纳米银分别单独作用时对细菌生长的抑制作用. 结果如图 1(a) 所示, 抗生素和纳米银对细菌的生长抑制作用均呈现典型的 S 型浓度效应关系. 纳米银对大肠杆菌的毒性显著大于四环素和氯霉素, 其中纳米银的  $IC_{50}$  值为  $0.61\text{—}1.18 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 而四环素和氯霉素的  $IC_{50}$  值分别为  $1.29\text{—}1.52 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $1.92\text{—}2.64 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (表 1). 此外, 本研究还测定了银离子 ( $\text{AgNO}_3$  形式) 对大肠杆菌的毒性, 其  $IC_{50}$  值为  $0.32\text{—}0.43 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 显著大于纳米银和抗生素的抑菌效应. 随后, 测定了纳米银、银离子分别与氯霉素、四环素的联合抑菌效应. 联合作用的浓度效应关系与单一化合物相似, 均表现为典型的 S 型浓度效应曲线. 二元混合物的  $IC_{50}$  值在  $0.6\text{—}1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  之间 (表 1), 其中四环素和纳米银以及氯霉素和纳米银的二元联合对大肠杆菌的毒性效应相对较大,  $IC_{50}$  值分别为  $0.41\text{—}0.74 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $0.72\text{—}1.02 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 而四环素和银离子及氯霉素和银离子的二元联合对大肠杆菌的毒性效应相对较弱, 其  $IC_{50}$  值分别为  $0.65\text{—}1.27 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $0.77\text{—}1.18 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

随后比较了 CA 模型与实验获得的混合物剂量效应曲线的关系. 如图 1b 和 c 所示, 抗生素和纳米银联合作用的浓度效应曲线均在 CA 模型的左侧, 二者的联合毒性呈现协同效应; 与之不同的是, 抗生素和银离子的 CA 模型曲线均在暴露组的 95% 置信区间内, 表明二者联合毒性的相互作用类型为相加效应 (图 1d 和 e).

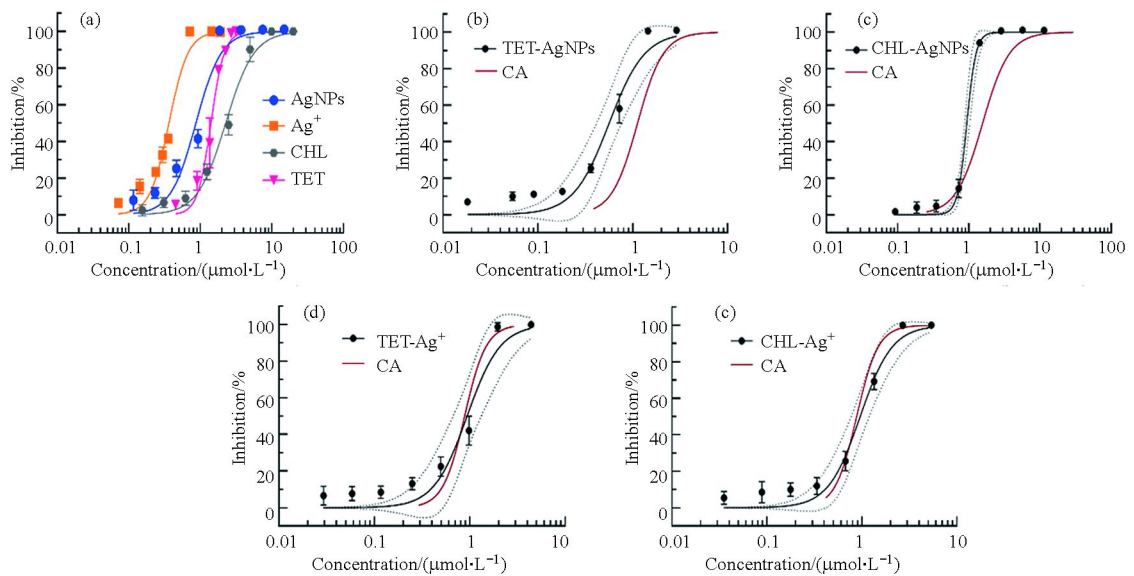


图 1 纳米银 ( $\text{AgNPs}$ )、银离子 ( $\text{Ag}^+$ ) 和抗生素分别单独和联合作用时的抑菌效应

注: CHL 表示氯霉素, TET 表示四环素, CA 表示浓度相加模型

Fig. 1 Antibacterial effect of nanosilver ( $\text{AgNPs}$ ), silver ions ( $\text{Ag}^+$ ) and antibiotics when acting alone or in combination

Note: CHL stands for chloramphenicol; TET stands for tetracycline; CA stands for concentration addition model



表 1 化合物单独和联合作用对大肠杆菌的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)Table 1 The IC<sub>50</sub> value of target substances against *E. coli* when acting alone or in combination

暴露组 Exposure group	组分 Components	IC <sub>50</sub> (95% CI)/(μmol·L <sup>-1</sup> )
单一暴露 Individual exposure	四环素(TET)	1.41(1.29—1.52)
	氯霉素(CHL)	2.26(1.92—2.64)
	纳米银(AgNPs)	0.87(0.61—1.18)
	银离子(Ag <sup>+</sup> )	0.36(0.32—0.43)
联合暴露 Combined exposure	TET-AgNPs	0.56(0.41—0.74)
	TET-Ag <sup>+</sup>	0.94(0.65—1.27)
	CHL-AgNPs	0.94(0.72—1.02)
	CHL-Ag <sup>+</sup>	0.96(0.77—1.18)

注: IC<sub>50</sub>表示半抑制浓度, CI表示置信区间。

Note: IC<sub>50</sub> is concentration for 50% of maximal inhibition, CI stands for confidence interval.

## 2.2 抗生素和纳米银对大肠杆菌的抗性突变诱导效应

根据细菌毒性测试结果, 选择亚抑制浓度的抗生素和纳米银, 首先测定了抗生素和纳米银单独作用时, 大肠杆菌对利福平的抗性突变频率。由图 2(a—c)可知, 抗生素和纳米银单独作用时对细菌的抗性突变频率随浓度的升高而增加。其中, 四环素和氯霉素的浓度分别达到 0.9 μmol·L<sup>-1</sup> 和 0.6 μmol·L<sup>-1</sup> 时, 细菌的抗性突变频率约是空白的 20 倍和 27 倍。纳米银对细菌的抗性突变诱导效应与抗生素相比较弱, 其浓度达到 0.2 μmol·L<sup>-1</sup> 时, 细菌的抗性突变诱导频率约是空白组的 6 倍。

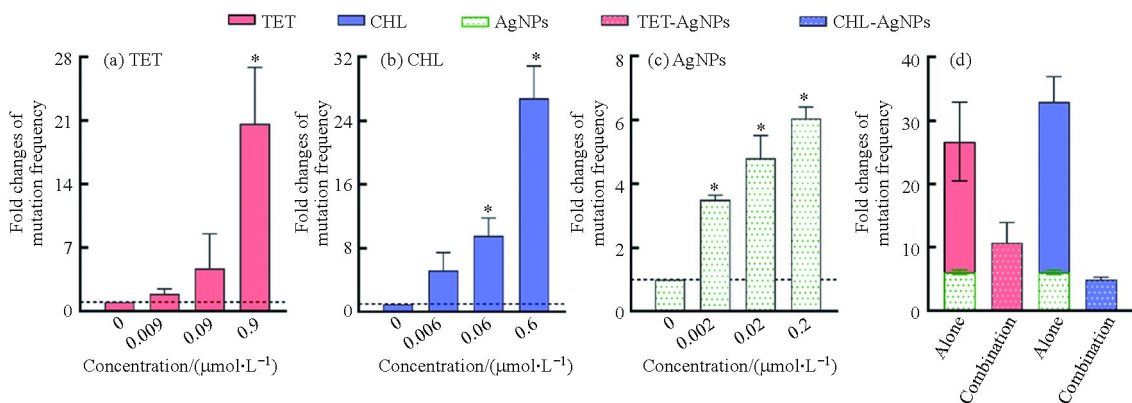


图 2 四环素(TET)、氯霉素(CHL)和纳米银(AgNPs)单独(a—c)或联合作用时(d)对大肠杆菌抗性突变频率的影响  
注: \*表示  $P < 0.05$ ; 图中虚线表示  $Y=1$ 。

Fig.2 Effects of tetracycline(TET), chloramphenicol(CHL) and nanosilver(AgNPs) on resistance mutation frequency in *E. coli* when acting alone or in combination

Note: \* represents  $P < 0.05$ ; The dotted line in the figure represents  $Y=1$ .

测定了四环素(0.9 μmol·L<sup>-1</sup>)和氯霉素(0.6 μmol·L<sup>-1</sup>)分别与纳米银(0.2 μmol·L<sup>-1</sup>)联合作用时对细菌抗性突变频率的影响。结果如图 2(d)所示, 四环素和纳米银联合作用的抗性突变频率约是空白组自发突变频率的 10 倍; 而氯霉素和纳米银联合作用下的突变频率约是空白组自发突变频率的 5 倍。与单独作用时相比, 抗生素和纳米银的联合作用显著降低了细菌的抗性突变频率。

## 2.3 抗性突变位点的和抗性机制的验证

利福平是细菌抗性突变研究中最常用的抗性筛选药物之一, 细菌对利福平的抗性大都由利福平靶蛋白 RpoB(即 RNA 聚合酶 β 亚基)的突变所致<sup>[21]</sup>。本研究通过对抗性菌 *rpoB* 基因的测序, 确定了 *rpoB* 基因上的突变位点。如图 3(a)所示, 在不同的暴露组中, 细菌均发生了 *rpoB* 基因上的点突变, 且突变位点均位于 1535—1592 区间内, 其中 1585 和 1538 是突变发生的热点区域。这两个位点的突变分别导致 RpoB 蛋白上第 529 位的精氨酸突变为半胱氨酸以及 513 位的谷氨酰胺突变为脯氨酸。由图 3(b)

可知, 本研究中检测到的突变氨基酸均位于 RpoB 蛋白的“利福平抗性决定区域”(Rifampicin resistance determining regions, RRDRs), 即在空间上靠近利福平药物的结合位点. 这表明这些氨基酸的变化很可能会影响 RpoB 蛋白的三级结构, 改变利福平结合位点的构象, 从而影响利福平与靶标蛋白结合, 并最终导致细菌对利福平的耐药性.

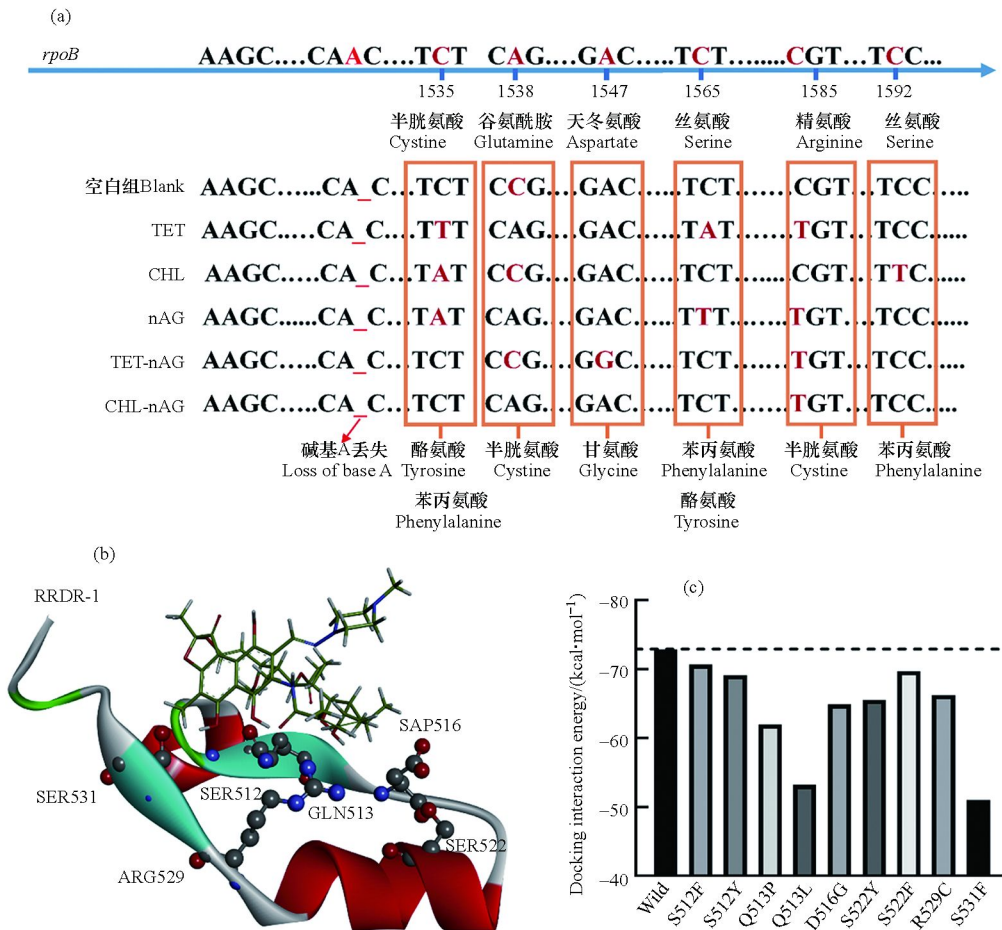


图 3 (a)空白组和暴露组下大肠杆菌突变位点碱基变化及氨基酸变化;(b)大肠杆菌 RpoB 利福平抗性决定区域 (RRDR—1) 突变氨基酸位置与利福平结构图;(c)RpoB 蛋白与利福平对接相互作用能

注: (a)*rpoB* 表示耐利福平决定区域基因片段, 数字表示突变核苷酸位置, 字母表示对应碱基;(b)字母表示氨基酸缩写, “SER、GLN、ASP、ARG”分别代表“丝氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、精氨酸”, 数字表示氨基酸位置

Fig.3 (a) Mutation sites and base changes of *E. coli* in the blank and exposed groups; (b) Amino acid location and rifampicin structure diagram of RpoB rifampicin resistance determination region (RRDR—1) mutant in *E. coli*; (c) Docking interaction energy between RpoB protein and rifampicin molecule.

Note: (a) *rpoB* represents the gene fragment of the rifampicin-resistant region, the mutation number represents the nucleotide position of the mutation, and the letter represents the corresponding base change; (b) Letters represent amino acid abbreviations, “SER, GLN, ASP, ARG” represent “serine, glutamine, aspartic acid, arginine” respectively, numbers indicate amino acid positions

根据大肠杆菌野生型 RpoB 蛋白构象 (PDB ID: 5UAC), 结合实验确定的 RpoB 蛋白中突变的氨基酸位置, 构建了突变型 RpoB 蛋白, 并与利福平进行分子对接获得分子对接相互作用能, 结果如图 3(c) 所示. 未突变的 RpoB 蛋白 (即 5UAC) 与利福平的相互作用能约为  $-73 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ , 而突变后的 RpoB 蛋白与利福平结合的相互作用能在数值上均低于未突变的 RpoB 蛋白. 这证实了 RpoB 蛋白突变后与利福平的亲和力降低, 导致利福平的抑菌活性降低, 即细菌对利福平的耐药性增加.

#### 2.4 抗生素和纳米银对突变相关基因表达的影响

本研究测定了四环素和纳米银分别单独和联合作用下, 细菌胞内与抗性突变相关的 6 种基因的表达, 即 *dinB*、*lexA*、*mutS*、*recA*、*rpoS* 和 *uvrD*. 其中, *rpoS* 是一种应激响应基因, 同时调控细菌胞内多种

基因的表达; *lexA* 和 *recA* 是 DNA 损伤应激体系 SOS 中的主要调控基因; *dinB* 调控参与 DNA 复制过程的 DNA 聚合酶 IV; *mutS* 和 *uvrD* 是细菌 DNA 错配修复基因<sup>[22]</sup>. 测试结果如图 4 所示, 在四环素和纳米银的单独暴露组中, *recA* 的基因表达显著增强, 但是 *rpoS*、*dinB*、*mutS*、*lexA* 和 *uvrD* 的表达与空白组相比没有显著变化; 而在四环素和纳米银的联合暴露组中, *rpoS*、*recA*、*dinB*、*mutS* 的基因表达均显著增强, 但是 *lexA* 和 *uvrD* 的表达相比较空白组没有显著变化.

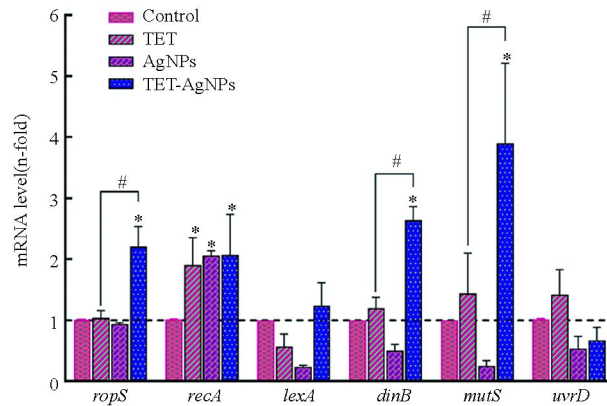


图 4 四环素(TET)和纳米银(AgNPs)单独和联合作用时(TET-AgNPs)对突变相关基因表达的影响

注: *rpoS*、*recA*、*lexA*、*dinB*、*mutS* 和 *uvrD* 表示与突变相关基因, \*  $P < 0.05$

Fig.4 Expressions of mutation-related genes in *E. coli* exposed to tetracycline(TET) and nanosilver(AgNPs) and their mixture(TET-AgNPs)

Note: *rpoS*、*recA*、*lexA*、*dinB*、*mutS* and *uvrD* represent the genes associated with the mutations, \* represents  $P < 0.05$

## 2.5 抗生素和纳米银协同抑菌效应机制

纳米银对细菌的毒性效应主要缘于其对细胞膜的物理损伤和在水介质中释放的银离子<sup>[4]</sup>. 一方面, 纳米银因其小尺寸效应而极易附着于细菌表面, 引起细胞膜凹陷或形成穿孔, 随后进入胞内对蛋白质和 DNA 等生物大分子造成损伤; 另一方面, 纳米银在水介质中能够释放出银离子, 诱导产生活性氧物种(ROS), 并与胞内含磷(P)、硫(S)和巯基(SH)的生物大分子结合, 干扰细胞功能. 本研究中, 银离子的  $IC_{50}$  值略低于纳米银, 表现出更高的细菌毒性. 这与之前的研究结果类似, 例如 Choi 等<sup>[23]</sup> 发现银离子对大肠杆菌的生长抑制作用显著大于纳米银. 与纳米银和银离子不同, 四环素和氯霉素能够特异性地作用于细菌的核糖体, 分别与核糖体的 30S 和 50S 亚基结合, 通过抑制蛋白质合成达到抑菌效果. 本研究中, 四环素和氯霉素的  $IC_{50}$  值均大于纳米银和银离子, 其细菌毒性相对较弱. 在联合毒性测试中, 纳米银与抗生素的联合作用类型表现出明显的协同效应, 这可能源自于纳米银对抗生素分子的载体效应. 如图 5 所示, 在纳米银和抗生素的混合体系中, 纳米银因具有较大的比表面积而容易吸附抗生素分子, 随后携带抗生素分子附着于细菌表面, 增加细菌与抗生素分子相互作用的机率; 同时, 纳米银对细胞膜的损伤增加了细胞膜的通透性, 使抗生素分子更容易进入胞内, 与靶蛋白结合, 因此二者具有协同的抑菌效应.

## 2.6 抗生素和纳米银联合抗性突变诱导效应机制

本研究选用利福平用于测定抗生素和纳米银暴露对细菌抗性突变的影响, 这是因为细菌对利福平的耐药性多由发生在 *rpoB* 基因上的点突变所致<sup>[21]</sup>. 研究表明, 在亚抑制浓度的抗生素和纳米银作用下, 大肠杆菌对利福平的抗性突变频率显著增加. 基因测序和分子对接结果证实了大肠杆菌对利福平的耐药性是由 *rpoB* 基因上的点突变引起的. 抗生素和纳米银对细菌抗性突变诱导效应的机制如图 5 所示, 首先, 抗生素和纳米银进入细菌胞内后, 通过诱导 ROS 或直接作用于 DNA 造成后者的损伤, 导致细菌 SOS 系统中的 *recA* 基因表达显著上调. RecA 蛋白是细菌 DNA 损伤的感应器, DNA 损伤发生后, 它能够与单链 DNA(ssDNA) 结合, 促进 LexA 二聚体的裂解, 从而解除 LexA 二聚体对 DNA 损伤修复系统的遏制作用, 促进下游 *dinB*、*mutS* 和 *uvrD* 等基因的表达<sup>[24-25]</sup>. 抗生素和纳米银造成的 DNA 损伤导致其在复制和修复过程中突变率增加, 引起利福平靶蛋白 RpoB 结合位点的构象改变, 最终导致细菌对利福平的耐药性增加. 需要注意的是, 在抗生素和纳米银联合作用于大肠杆菌时,



其抗性突变频率相比于抗生素单独作用时有明显的下降趋势. 结合基因表达的测试结果可以发现, 在抗生素单独作用时, SOS 系统的主要调控基因 *recA* 表达增强, 而其他基因无明显变化; 纳米银加入后, 除 *recA* 基因依然呈现高表达外, *rpoS*、*dinB* 和 *mutS* 的表达与抗生素单独作用时相比也显著增强. 由此可以推断, 在抗生素和纳米银的联合作用下, 细菌胞内 *rpoS*、*dinB* 和 *mutS* 的表达增加, 促进了细菌 DNA 损伤的修复进程, 最终使细菌抗性突变维持在相对较低的水平.

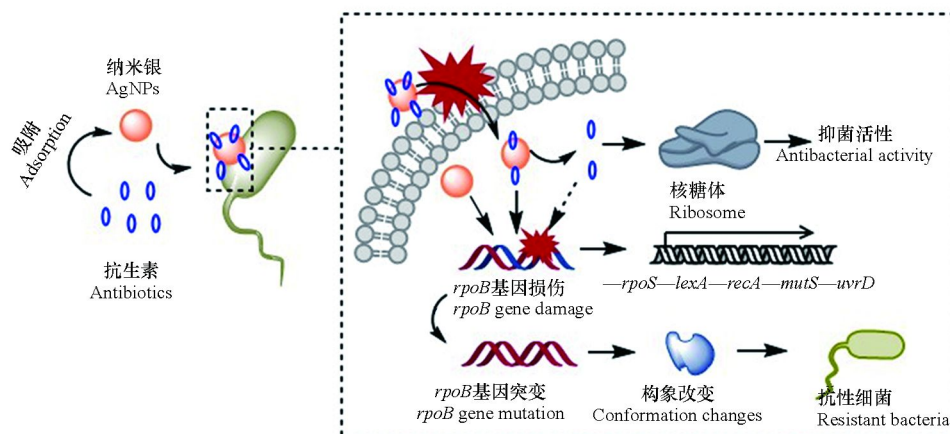


图 5 抗生素和纳米银(AgNPs)对大肠杆菌的联合作用机制和抗性突变诱导效应机制

Fig.5 Mechanism for joint effects of antibiotics and nanosilver(AgNPs) on *E. coli* and its resistance mutations

## 2.7 抗生素和纳米银抗性突变诱导效应的环境意义

细菌的抗生素耐药性已成为威胁人类健康的重大环境问题之一. 细菌主要通过基因突变或从外源获取抗性基因(如质粒接合转移等)而产生抗生素耐药性. 环境污染物能够通过促进细菌的抗性突变和抗性基因的水平传播而加剧环境中的耐药细菌和耐药基因污染. 其中, 抗生素作为特异性作用于细菌的一类污染物, 已被大量研究证明在环境相关浓度下能够促进细菌的抗性突变. 例如, 环丙沙星、丝裂霉素、呋喃唑啉、氨苄西林、链霉素、甲氧苄氨嘧啶和新生霉素等抗生素能够显著增加大肠杆菌对利福平的抗性突变, 其中环丙沙星和呋喃唑啉分别使抗性突变率增加了 7 倍和 10 倍<sup>[26]</sup>. 本研究所关注的四环素和氯霉素是两种广谱性抗生素, 常用于临床医药等领域, 在环境介质中被频繁检出. 根据实验结果, 四环素和氯霉素均表现出显著的抗性突变诱导效应, 在亚抑制浓度下对大肠杆菌耐利福平突变的促进率分别高达 20 倍和 27 倍. 尤其值得关注的是, 本实验中采用的抗生素浓度接近其环境检出浓度, 表明环境中的抗生素残留具有促进细菌抗性突变的风险. 纳米银作为一种高效的纳米抗菌剂, 其抑菌活性显著高于四环素和抗生素, 并且在亚抑制浓度下同样表现出显著的抗性突变诱导效应, 对大肠杆菌的抗性突变产生高达 5 倍左右的促进率. 这些研究结果表明, 环境中广泛存在的抗生素和纳米银残留虽然多以亚抑制浓度形式存在, 不足以直接对细菌造成毒性作用, 但是能够通过促进细菌的抗性突变而增加细菌对抗生素的耐药性, 最终对生态环境和人体健康构成更大的威胁. 更重要的是, 除抗生素和纳米银外, 其他环境污染物, 如杀生剂<sup>[27]</sup>、重金属<sup>[28]</sup>、纳米  $\text{Al}_2\text{O}_3$  和  $\text{ZnO}$ <sup>[16]</sup>、消毒副产物<sup>[29]</sup> 以及纳米塑料<sup>[22]</sup> 等均表现出对细菌抗性突变的促进作用. 环境污染物对细菌的抗性突变诱导效应是否与日趋严峻的耐药细菌和耐药基因污染问题相关, 是关乎人类健康的重大问题, 需要引起足够的重视. 此外, 本研究还揭示了抗生素和纳米银的协同抑菌效应以及纳米银对抗生素诱导细菌抗性突变的遏制作用, 研究结果能够为全面认识二者联合暴露的生态和健康风险提供参考.

## 3 结论(Conclusion)

本研究测定了两种抗生素(四环素和氯霉素)与纳米银对大肠杆菌的联合抑菌效应和抗性突变诱导效应, 验证了抗生素和纳米银胁迫下大肠杆菌的抗性突变位点和抗性机制, 得到以下主要结论: 抗生素和纳米银的联合抑菌效应呈现协同作用, 可能源自于纳米银对抗生素的载体效应; 抗生素和纳米银



在亚抑制浓度下能够引起大肠杆菌 *rpoB* 基因的利福平抗性决定区域(RRDR)发生点突变, 导致利福平与靶标蛋白 RpoB 的结合能降低, 从而促进大肠杆菌对利福平的耐药性; 抗生素和纳米银联合作用对细菌的抗性突变诱导效应显著低于抗生素的单独作用, 可能是由于联合作用下细菌胞内 *rpoS*、*dinB* 和 *mutS* 基因表达显著上调所致. 需要注意的是, 尽管本研究结合突变频率和基因表达的测试结果, 对抗生素和纳米银联合抗性突变诱导效应的机制进行了初步地探讨, 但是相关的分子调控机制仍需进一步研究.

### 参考文献 (References)

- [ 1 ] WANG H X, WANG N, WANG B, et al. Antibiotics in drinking water in Shanghai and their contribution to antibiotic exposure of school children [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(5): 2692-2699.
- [ 2 ] DU B Y, WEN F, GUO X D, et al. Evaluation of an ELISA-based visualization microarray chip technique for the detection of veterinary antibiotics in milk [J]. *Food Control*, 2019, 106: 106713.
- [ 3 ] LYU J, YANG L S, ZHANG L, et al. Antibiotics in soil and water in China—a systematic review and source analysis [J]. *Environmental Pollution*, 2020, 266: 115147.
- [ 4 ] RIZZELLO L, POMPA P P. Nanosilver-based antibacterial drugs and devices: Mechanisms, methodological drawbacks, and guidelines [J]. *Chemical Society Reviews*, 2014, 43(5): 1501-1518.
- [ 5 ] 吴宗山, 胡海洋, 任艺, 等. 纳米银的抗菌机理研究进展 [J]. *化工进展*, 2015, 34(5): 1349-1356,1370.
- WU Z S, HU H Y, REN Y, et al. Progress of antibacterial mechanisms of silver nanoparticles [J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2015, 34(5): 1349-1356,1370(in Chinese).
- [ 6 ] 唐诗璟, 郑雄, 陈银广. 水体环境中纳米银的来源、迁移转化及毒性效应的研究进展 [J]. *化工进展*, 2013, 32(11): 2727-2733.
- TANG S J, ZHENG X, CHEN Y G. Research progresses in aquatic environmental silver nanoparticles: Sources, transformation and toxicity [J]. *Chemical Industry and Engineering Progress*, 2013, 32(11): 2727-2733(in Chinese).
- [ 7 ] MCGILICUDDY E, MURRAY I, KAVANAGH S, et al. Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology [J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 575: 231-246.
- [ 8 ] HUANG W D, WANG J, WANG Z X, et al. Synergistic antimicrobial activity of silver nanoparticles combined with streptomycin sulfate against gram-negative and gram-positive bacteria [J]. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 2021, 714(1): 80-88.
- [ 9 ] 王孟珍, 孙昊宇, 龙茜, 等. 纳米银复合材料与抗生素的联合抗菌性能及相关机制研究 [J]. *生态毒理学报*, 2020, 15(2): 39-49.
- WANG M Z, SUN H Y, LONG X, et al. Combined antibacterial property and mechanism of nanosilver composites and antibiotics against bacteria [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2020, 15(2): 39-49(in Chinese).
- [ 10 ] 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).
- [ 11 ] 赖晓琳, 吴平霄, 阮博. 四环素对大肠杆菌抗生素抗性基因进化的影响 [J]. *环境科学学报*, 2019, 39(8): 2475-2482.
- LAI X L, WU P X, RUAN B. Evolution of antibiotic resistance genes in *E. coli* by tetracycline [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2019, 39(8): 2475-2482(in Chinese).
- [ 12 ] 李旭飞, 巫晓丹, 孙昊宇, 等. 抗生素和纳米银对大肠杆菌耐药性的联合效应 [J]. *中国环境科学*, 2020, 40(11): 5045-5054.
- LI X F, WU X D, SUN H Y, et al. Joint effects of antibiotics and silver nanoparticles on resistance of *Escherichia coli* [J]. *China Environmental Science*, 2020, 40(11): 5045-5054(in Chinese).
- [ 13 ] MCGRATH M, van PITTIUS N C G, van HELDEN P D, et al. Mutation rate and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2013, 69(2): 292-302.
- [ 14 ] MANNA M S, TAMER Y T, GASZEK I, et al. A trimethoprim derivative impedes antibiotic resistance evolution [J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 2949.
- [ 15 ] LU J, WANG Y, LI J, et al. Triclosan at environmentally relevant concentrations promotes horizontal transfer of multidrug resistance genes within and across bacterial genera [J]. *Environment International*, 2018, 121: 1217-1226.
- [ 16 ] ZHANG Y, GU A Z, XIE S S, et al. Nano-metal oxides induce antimicrobial resistance via radical-mediated mutagenesis [J]. *Environment International*, 2018, 121: 1162-1171.
- [ 17 ] 刘树深, 刘玲, 陈浮. 浓度加和模型在化学混合物毒性评估中的应用 [J]. *化学学报*, 2013, 71(10): 1335-1340.
- LIU S S, LIU L, CHEN F. Application of the concentration addition model in the assessment of chemical mixture toxicity [J]. *Acta*

- [Chimica Sinica](#), 2013, 71(10): 1335-1340 (in Chinese).
- [18] ESCHER B, BRAUN G, ZARFL C. Exploring the concepts of concentration addition and independent action using a linear low-effect mixture model [J]. [Environmental Toxicology and Chemistry](#), 2020, 39(12): 2552-2559.
- [19] KOTHARY V, SCHERL E J, BOSWORTH B, et al. Rifaximin resistance in *Escherichia coli* associated with inflammatory bowel disease correlates with prior rifaximin use, mutations in rpoB, and activity of Phe-Arg- $\beta$ -naphthylamide-inhibitable efflux pumps [J]. [Antimicrobial Agents and Chemotherapy](#), 2013, 57(2): 811-817.
- [20] NING Q, WANG D L, YOU J. Joint effects of antibiotics and quorum sensing inhibitors on resistance development in bacteria [J]. [Environmental Science. Processes & Impacts](#), 2021, 23(7): 995-1005.
- [21] NING Q, WANG D L, CHENG F, et al. Predicting rifampicin resistance mutations in bacterial RNA polymerase subunit beta based on majority consensus [J]. [BMC Bioinformatics](#), 2021, 22(1): 210.
- [22] NING Q, WANG D L, AN J H, et al. Combined effects of nanosized polystyrene and erythromycin on bacterial growth and resistance mutations in *Escherichia coli* [J]. [Journal of Hazardous Materials](#), 2022, 422: 126858.
- [23] CHOI O, DENG K K, KIM N J, et al. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth [J]. [Water Research](#), 2008, 42(12): 3066-3074.
- [24] 张岩, 盛多红. 细菌DNA损伤诱导反应(SOS反应)在控制细菌耐药性中的作用 [J]. [微生物前沿](#), 2013(2): 83-89.  
ZHANG Y, SHENG D H. Role of DNA damage response (SOS response) on the control of bacterial resistance [J]. [Advance in Microbiol](#), 2013(2): 83-89 (in Chinese).
- [25] GALHARDO R S, HASTINGS P J, ROSENBERG S M. Mutation as a stress response and the regulation of evolvability [J]. [Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology](#), 2007, 42(5): 399-435.
- [26] MO C Y, MANNING S A, ROGGIANI M, et al. Systematically altering bacterial SOS activity under stress reveals therapeutic strategies for potentiating antibiotics [J]. [mSphere](#), 2016, 1(4): e00163-e00116.
- [27] LU J, JIN M, NGUYEN S H, et al. Non-antibiotic antimicrobial triclosan induces multiple antibiotic resistance through genetic mutation [J]. [Environment International](#), 2018, 118: 257-265.
- [28] LI X Y, GU A Z, ZHANG Y, et al. Sub-lethal concentrations of heavy metals induce antibiotic resistance via mutagenesis [J]. [Journal of Hazardous Materials](#), 2019, 369: 9-16.
- [29] LI D, GU A Z. Antimicrobial resistance: A new threat from disinfection byproducts and disinfection of drinking water? [J]. [Current Opinion in Environmental Science & Health](#), 2019, 7: 83-91.