

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20160412003

宋春磊, 方淑霞, 周虹, 等. 抗生素单一及联合暴露对 RP4 质粒介导的抗性基因水平转移的 hormesis 效应研究[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(1): 148-154

Song C L, Fang S X, Zhou H, et al. Hormesis effect of single and combined exposure of antibiotics on antibiotic resistance gene transfer mediated by RP4 plasmid [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(1): 148-154 (in Chinese)

抗生素单一及联合暴露对 RP4 质粒介导的抗性基因水平转移的 hormesis 效应研究

宋春磊¹, 方淑霞¹, 周虹², 林志芬^{1,3,*}, 刘颖³

1. 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

2. 南京师范大学地理科学学院, 南京 210023

3. 同济大学 上海市化学品分析、风险评估与控制重点实验室, 上海 200092

收稿日期: 2016-04-12 录用日期: 2016-06-05

摘要: 抗生素滥用导致的抗性基因(ARGs)泛滥问题引起人们的日益关注。目前关于抗性基因的研究主要集中在环境监测方面,但是关于抗生素对 ARGs 传播的影响研究还相对缺乏。质粒是 ARGs 传播的重要载体,因此以基于 RP4 质粒的大肠杆菌(*E. coli*)接合转移体系为研究对象,探讨了盐酸四环素、甲氧苄啶、磺胺氯哒嗪、磺胺异唑在单一暴露条件下对 RP4 质粒接合转移的影响。根据单一暴露的结果设计混合抗生素的浓度比,探究抗生素联合暴露实验对质粒接合转移的影响。结果表明:在单一暴露条件下,只有盐酸四环素对含有四环素抗性的 RP4 质粒的接合转移频率有低促高抑的 hormesis 效应;在联合暴露条件下,对 RP4 质粒接合转移无促进作用的抗生素会抑制四环素的 hormesis 效应,这一定程度上降低了抗生素的环境风险。并且用受体理论解释了抗生素对质粒接合转移的 hormesis 效应产生机制,为目前尚无定论的 hormesis 受体理论机制提供了证据支持。

关键词: 四环素;磺胺;磺胺增效剂;抗性基因;大肠杆菌;基因水平转移;接合转移;RP4 质粒

文章编号: 1673-5897(2017)1-148-07 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Hormesis Effect of Single and Combined Exposure of Antibiotics on Antibiotic Resistance Gene Transfer Mediated by RP4 Plasmid

Song Chunlei¹, Fang Shuxia¹, Zhou Hong², Lin Zhifen^{1,3,*}, Liu Ying³

1. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, College of Environmental Sciences and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China

2. College of Geographical Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China

3. Shanghai Key Laboratory of Chemical Assessment and Sustainability, Shanghai 200092, China

Received 12 April 2016 accepted 5 June 2016

Abstract: The abuse of antibiotics has caused a series of environmental problems, among which the antibiotic re-

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项目(PCRRK16007);国家自然科学基金面上基金(21377096,21577105);同济大学英才(攀登)计划(0400219287);上海市科学技术委员会(14DZ2261100)资助

作者简介: 宋春磊(1992-),男,硕士研究生,研究方向为生态毒性学, E-mail: 1song@tongji.edu.cn

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: lzhifen@tongji.edu.cn

sistance genes (ARGs) problem is the most concerned. However, the majority of the current researches mainly focused on the environmental monitoring of the antibiotics and ARGs, while researches about the influence of antibiotics on the transfer of ARGs is still lacking. In this study, the frequency of RP4 plasmid transfer was measured in co-cultures of a donor and an acceptor strain upon exposure to tetracycline, trimethoprim, sulfachloropyridazine and sulfamethoxazole, both individually and in combination. The results revealed that the transfer frequency of RP4 plasmid that contained the tetracycline ARGs showed hormetic responses to the exposure of single tetracycline, which were inhibited when combined with other antibiotics. It is the first time that the receptor theory is used to explain the hormetic mechanism of the antibiotics on the plasmid conjugation transfer, and evidence is provided for the hormesis receptor theory that is not yet conclusive.

Keywords: tetracycline; sulfanilamide; trimethoprim; antibiotic resistance gene; *Escherichia coli*; horizontal gene transfer; conjugation transfer; RP4 plasmid

抗生素大量滥用诱发的抗生素抗性基因 (ARGs) 和抗性细菌的二次污染问题已经引起人们的广泛关注^[1-5]。ARGs 能够在菌群间的迁移、转化和传播^[6],并在环境中持久性存在,其对人类的危害可能比抗生素残留本身更严重^[7]。目前,细菌获得 ARGs 的途径有 2 种,一种是正常基因突变产生抗性基因,另一种是抗性基因在不同细菌个体间的水平转移,其中以质粒为载体的接合转移是细菌获得 ARGs 的重要途径^[8-11]。同时质粒的接合转移会诱发受体菌的基因调控进而将质粒上的整合子和抗性基因整合到染色体基因组上^[12],从而有效避免质粒的不相容性对 ARGs 水平转移的抑制作用,加速了多重耐药菌的出现。

环境中的各种胁迫总能直接或间接地影响细菌质粒接合转移的行为^[13-14],比如纳米材料和离子液体胁迫对质粒的接合转移具有低促高抑的毒物兴奋效应(hormesis)^[15-17],同时对质粒有正向选择压力的抗生素(即质粒上含有该抗生素的 ARG,简称有选择压力抗生素)对质粒的接合转移也具有 hormesis 效应^[11],那么对质粒无正向选择压力的抗生素(即质粒上不含该抗生素的 ARG,简称无选择压力抗生素)对质粒的接合转移是否具有相似的 hormesis 效应?有文献表明,抗生素联合暴露会加速多重耐药菌的进化^[18],那么抗生素联合暴露对质粒介导的 ARG 水平转移的影响又是如何,是否会产生更大的环境风险?

因此,本文采用具有萘啶酮酸耐药标记的 *E. coli* MG1655 和具有四环素抗性标记的 RP4 质粒的 *E. coli* MG1655 菌株作为质粒接合转移模型的受体菌和供体菌,以有正向选择压力的盐酸四环素(TH)和无正向选择压力的甲氧苄啉(TMP)、磺胺氯哒嗪

(SCP)、磺胺异唑(SIX)为研究对象,研究比较了这 2 种抗生素在单一及联合暴露条件下对质粒接合频率的剂量效应关系,从而揭示了抗生素在单一及联合暴露条件下对抗生素二次污染物 ARGs 水平转移过程的影响,为抗生素污染的环境风险评价及医学中抗生素联合用药的合理性等问题提供了理论依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 仪器与试剂

实验试剂包括:盐酸四环素(TH)、甲氧苄啉(TMP)、磺胺氯哒嗪(SCP)、磺胺二甲异噁唑(SIX)、萘啶酮酸、硫酸卡那霉素、二甲基亚砷等,均为化学纯,均购自 sigma-aldrich 化学制品有限公司(st. Louis, MO, USA)。

实验仪器:精密电子天平(BT25S,德国 sartorius 公司)、电子 pH 计(pH510,美国 QAKTON 公司)、生化培养箱(ZHP-Y2102F,上海德洋意邦仪器有限公司)等。

1.2 实验菌株

实验中的 *E. coli* MG1655 菌株购买于北京谱如汀生物技术有限公司,RP4 质粒由中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所的李君文教授惠赠。RP4 质粒携带四环素、卡那霉素以及氨苄青霉素 3 种抗生素的 ARGs,可在多个菌属中进行接合转移,在接合转移研究方面被广泛应用^[12,15-16]。为了构建抗性质粒接合转移模型,本实验将 RP4 质粒转化入 *E. coli* MG1655 中构建成可在 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸卡那霉素的筛选板上正常生长的供体菌,同时使用抗生素将 *E. coli* MG1655 诱导为耐 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的萘啶酮酸且抗性稳定的受体菌。本实验所使用的细菌质粒接合转移模型稳定可靠,重现性好,为后续实验提供了良好基础。

1.3 质粒接合转移实验

将受体菌与供体菌分别接种于加有对应抗生素的LB液体培养基中,在37℃摇床中以 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 的转速震荡培养至对数生长期(6 h),将培养的菌液离心去上清液后,加入5 mL的质量分数为1%的NaCl,震荡重新悬浮,这样重复4次,洗去残余的抗生素。用质量分数为1%的NaCl溶液调节菌液浓度使 OD_{600} 为0.5,再将受体菌、供体菌以2:1的比例混匀即为工作菌液。

精确称量供试抗生素,加入适量二甲基亚砜(二甲基亚砜在体系中的最终体积分数不高于0.1%),用质量分数为1%的NaCl溶液配制成浓度较高的抗生素溶液,随后稀释成一系列等对数浓度的抗生素溶液待用。在抗生素混合暴露实验中,抗生素混合物的浓度比有2种,第一种是等毒性比,即 $\text{EC}_{50\text{A}}:\text{EC}_{50\text{B}}$ 。第二种是根据单一抗生素对抗性质粒结合转移实验,获得接合转移抑制率为0%时对应的化合物浓度(RC_0),以 $\text{RC}_{0\text{A}}:\text{RC}_{0\text{B}}$ 的

浓度比配制混合溶液。随后,用质量分数为1%的NaCl溶液稀释成等对数浓度梯度的化合物溶液。这2种混合浓度比具有一定的意义:以 $\text{EC}_{50\text{A}}:\text{EC}_{50\text{B}}$ 等毒性比进行混合能够更好地模拟医学中的联合用药过程^[19];以 $\text{RC}_{0\text{A}}:\text{RC}_{0\text{B}}$ 比例进行混合可以使混合暴露体系中的2种药物的亚抑制浓度区间重合,便于更好地分析亚抑制浓度的抗生素的联合作用。

取上述工作菌液60 μL 、抗生素溶液40 μL 、2倍LB培养基100 μL 于96孔板中,混匀后在37℃培养箱中静置反应8 h,随后将反应体系进行适当稀释,取适量受体菌及接合子至对应的固体LB培养基筛选平板。其中,受体菌的筛选平板上含 $40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的萘啶酮酸,接合子的筛选平板上含 $40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的萘啶酮酸和 $40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硫酸卡那霉素。将筛选平板于37℃培养箱中静置培养12 h后计数。

1.4 数据处理

接合转移频率用于表征共培养体系中单个受体

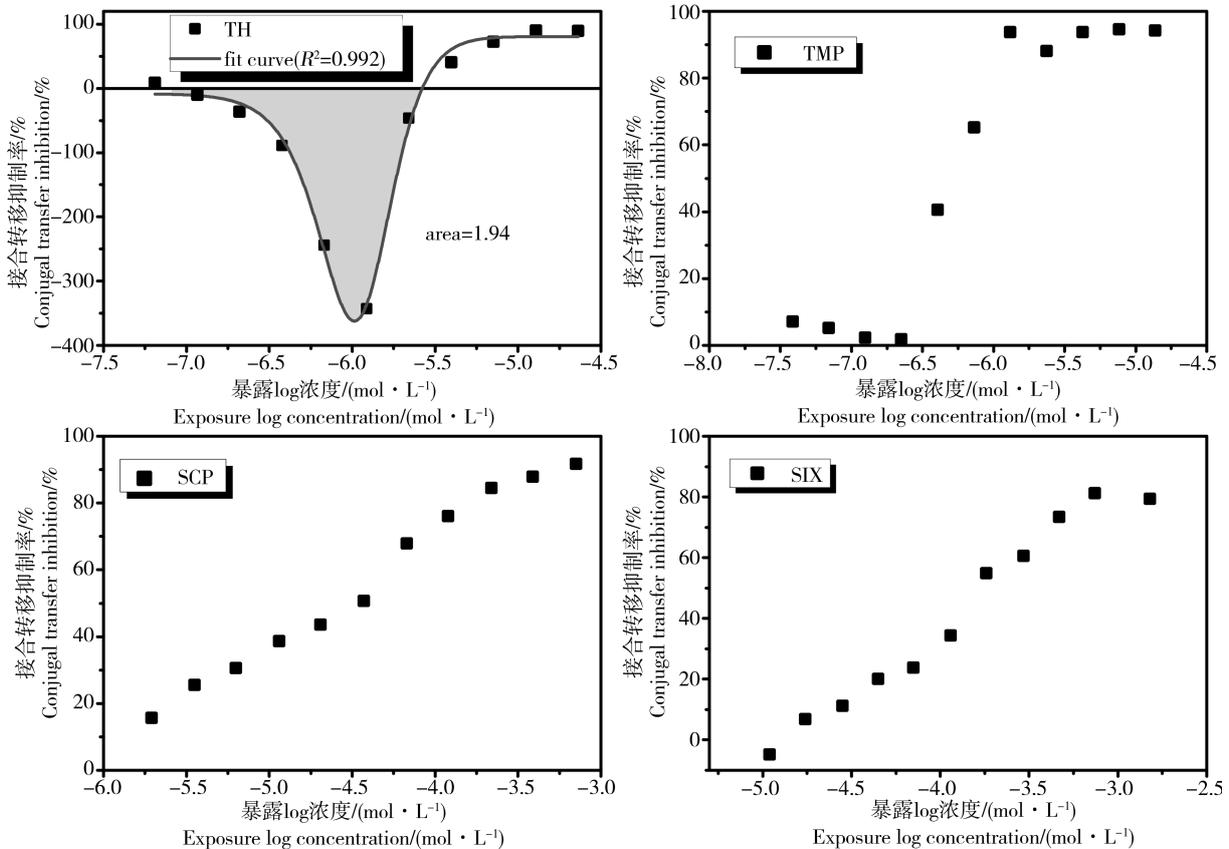


图1 抗生素的单一暴露对RP4质粒接合转移抑制率的剂量效应关系

注:TH、TMP、SCP、SIX分别表示盐酸四环素、甲氧苄啶、磺胺氯吡嗪、磺胺二甲异噁唑。

Fig. 1 The dose-effect relationship between the single antibiotics exposure and the inhibition of RP4 transfer

Note: TH, TMP, SCP, SIX stand for tetracycline hydrochloride, trimethoprim, sulfachloropyridazine, sulfisoxazole.

菌能发生接合转移的概率, 计算如公式 1 所示:

$$f = \frac{No.t}{No.r} \quad (1)$$

其中, f 表示接合转移频率, $No.t$ 表示接合子数量 (CFU · mL⁻¹), $No.r$ 表示受体菌数量 (CFU · mL⁻¹)。

抑制率用于表征化合物对抗性质粒接合转移的影响程度, 计算如公式 2 所示:

$$P = \frac{f_0 - f_i}{f_0} \times 100\% \quad (2)$$

其中, P 表示抑制率, f_i 表示第 i 个测试样的接合频率, f_0 表示对照组平均接合频率。抑制率为 0%

对应的化合物浓度即为 RC₀。

Hormesis 积分面积, 即拟合曲线与横坐标围成的面积, 用于表征 hormesis 效应的促进程度, 由 OriginPro 9.1 软件计算获得。

2 结果 (Results)

2.1 抗生素单一暴露对质粒接合转移频率的影响

TH、TMP、SCP、SIX 在不同暴露浓度下对 RP4 质粒的接合转移频率作用如图 1 所示。

由图 1 可知, 随着浓度范围的变化, TH 对 RP4 质粒的接合转移表现出低促高抑的 hormesis 效应,

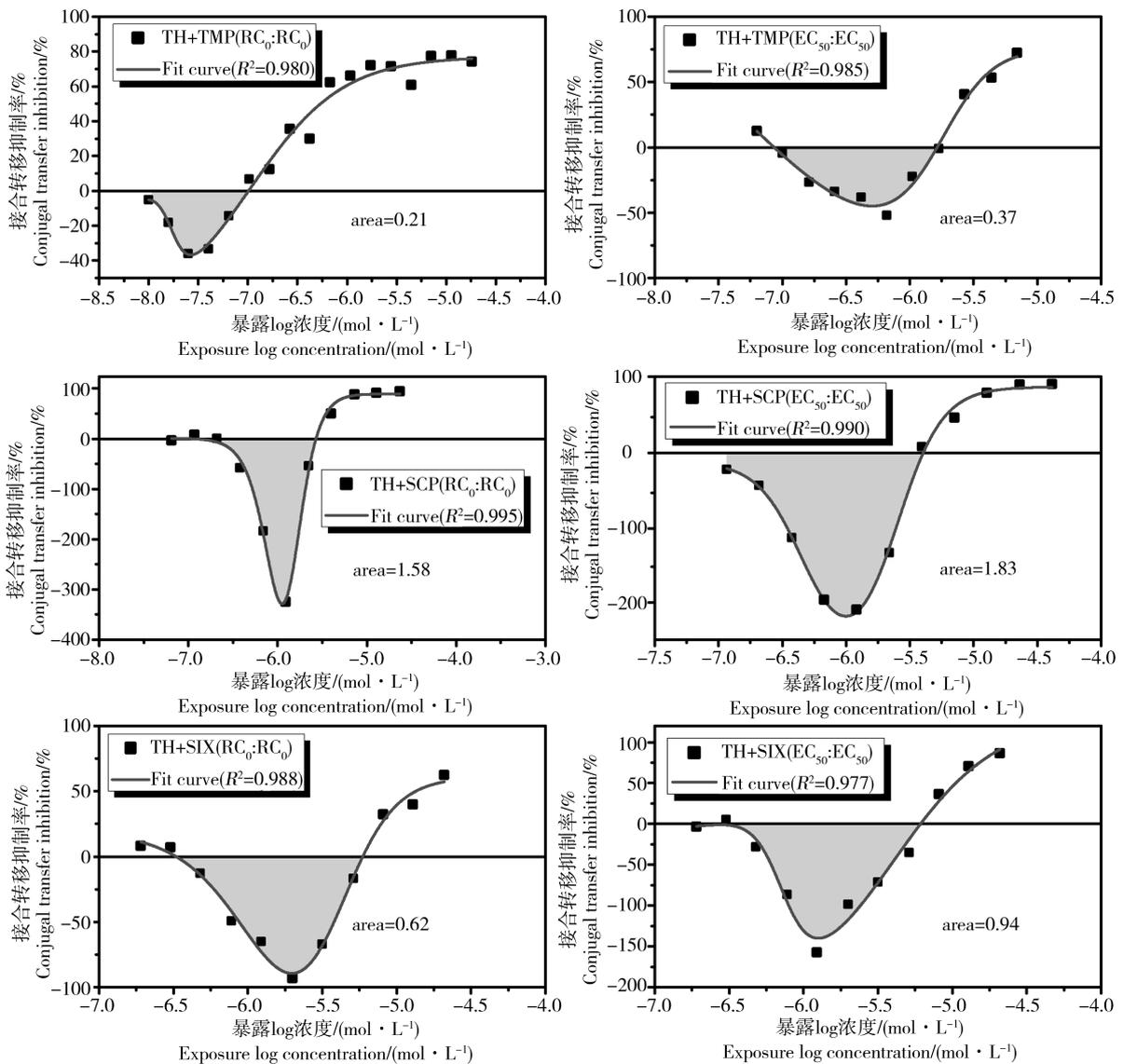


图 2 抗生素联合暴露对 RP4 质粒接合转移抑制率的剂量效应关系

注: RC₀、EC₅₀ 表示质粒接合转移抑制率、生长抑制率分别为 0%、50% 时的化合物浓度。

Fig. 2 The dose-effect relationship between the combined antibiotics exposure and the inhibition of RP4 transfer

Note: RC₀, EC₅₀ stand for the concentration when the inhibition rate of plasmid transfer frequency was 0%

and the inhibition rate of cell growth was about 50% .

该结果与 Schuurmans 等^[11]的结果一致。经过 Origin Lab 软件内置的 Biphasic 方程拟合,得到图中的拟合曲线且具有良好的拟合度(R^2 为 0.992)。TH 的浓度在 $3.82 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 到 $4.01 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 区间能显著地促进 RP4 质粒接合转移,在浓度为 $1.24 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对接合频率的促进作用最大,比空白对照的接合转移频率(0.049)高 4 倍多,当浓度增加到 2.86×10^{-6} 时,对质粒接合转移的效应由促进变为抑制。

TMP、SCP、SIX 对 RP4 质粒的接合转移抑制率都是随着浓度的升高而增加,没有出现与 TH 相似的 hormesis 现象,说明抗生素不会促进不含自身 ARGs 的质粒的水平转移。TMP、SCP、SIX 的 RC_0 分别是 2.36×10^{-7} 、 4.25×10^{-6} 、 $1.58 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,说明它们对 RP4 接合转移的抑制毒性依次减弱。当抑制率从 0% 增加到 90% 时,TMP、SIX、SCP 的浓度分别增加了 10 倍、100 倍、1 000 倍左右,这也表明实验选用的药物之间存在明显的差异,具有较好的代表性。

2.2 抗生素联合暴露对质粒接合转移频率的影响

2.1 的结果表示有选择压力的 TH 对 RP4 质粒的接合转移具有低促高抑的 hormesis 效应,而无选择压力抗生素只有抑制效应。为了进一步评估无选择压力抗生素的环境风险,将 TMP、SCP、SIX 这 3 种无选择压力抗生素分别与有选择压力的 TH 进行联合暴露实验,分析无选择压力抗生素对 TH 的 hormesis 效应的影响。实验结果如图 2 所示,其中横坐标表示 TH 的 log 浓度。

由图 2 可知,含 TH 的抗生素混合物对 RP4 接

合转移都有低促高抑的 hormesis 现象。为了便于分析比较不同的暴露体系的 hormesis 效应,我们对其相关参数进行了统计,结果如表 1 所示。

从表 1 中的相对浓度一栏可知, $RC_0 : RC_0$ 、 $EC_{50} : EC_{50}$ 这 2 种联合暴露浓度比之间有明显的差异,TMP-TH、SCP-TH、SIX-TH 的 2 种相对浓度之比($RC_0 : RC_0$) : ($EC_{50} : EC_{50}$) 约为 56、14、7,说明计算获得的不同药物的 RC_0 与 EC_{50} 的相关性不明显,具有独立的生物学意义。

从表 1 中的 hormesis 区间一栏可知,磺胺类药物(SCP 或 SIX)与 TH 的联合暴露对 TH 的 hormesis 区间影响不明显。而当混合体系中 TMP 的相对浓度为 0.04、2.4 时,TH 的 hormesis 区间分别向前移动了 1.3、0.36 个数量级。也就是说,特定浓度 TH、TMP 的联合暴露会表现出单一暴露所没有的对质粒接合转移的促进作用,可能存在一定的环境风险。

从表 1 中的最大促进浓度及促进率一栏可知,无选择压力的抗生素都能降低 TH 的 hormesis 最大促进率,其中 TMP 对 TH 的 hormesis 最大促进率的影响最大,从 360% 降到了 40% 左右。这说明无选择压力的抗生素能够降低有选择压力抗生素的环境风险。

由于 hormesis 促进面积由 hormesis 促进区域和 hormesis 促进率共同决定,它能够更全面地表征 hormesis 效应,因此将该参数作为表征 hormesis 效应大小的主要指标。从表 1 中的促进面积一栏可知,无选择压力的抗生素 TMP、SCP、SIX 都能减小 TH 的 hormesis 促进面积,抑制 TH 的 hormesis 效应,其中 TMP、SIX 的抑制作用更加明显,在 50% 以上。

表 1 不同暴露条件下 hormesis 相关参数的统计

Table 1 Statistics of hormesis related parameters under different exposure conditions

抗生素类型 Antibiotics	相对浓度 ^a Relative concentration ^a	Hormesis 区间/($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) Hormesis zone/($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	最大促进浓度/($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)及促进率/% LogC ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and value (%) of maximum hormesis/($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, %)	促进面积 Hormesis area
TH ^b	0.00	[-6.70,-5.58]	(-5.97,360)	1.94
TMP-TH($RC_0 : RC_0$)	0.04	[-8.00,-6.99]	(-7.56,37)	0.21
TMP-TH($EC_{50} : EC_{50}$)	2.40	[-7.06,-5.78]	(-6.27,45)	0.37
SCP-TH($RC_0 : RC_0$)	1.48	[-6.56,-5.57]	(-5.92,325)	1.58
SCP-TH($EC_{50} : EC_{50}$)	20.69	[-6.93,-5.38]	(-5.98,218)	1.83
SIX-TH($RC_0 : RC_0$)	4.96	[-6.51,-5.22]	(-5.71,89)	0.62
SIX-TH($EC_{50} : EC_{50}$)	35.60	[-6.42,-5.21]	(-5.89,140)	0.94

注:a,相对浓度指混合暴露体系中无选择压力的抗生素与 TH 的摩尔浓度的比值;b,为空白,即暴露体系中只有 TH 一种药物。

Note: a, relative concentration refers to the ratio of the concentration of antibiotic without selective pressure to the concentration of TH in the mixed exposure system; b, blank control, only TH in the exposure system.

3 讨论 (Discussion)

4种抗生素的单一暴露的实验结果中,只有有选择压力的抗生素 TH 能够产生对质粒接合转移的 hormesis 效应,这说明抗生素只能促进含有其自身 ARGs 的质粒的传播,而对其他质粒的传播没有促进作用。该结果与不具有正向选择压力的纳米材料和离子液体的结果形成对比^[15-16],同时也说明人兽用药分离可以在一定程度上保证人的用药安全。由抗生素的联合暴露实验可知,无选择压力的抗生素能够降低有选择压力抗生素对质粒接合转移的 hormesis 效应。因此,这2种类型的抗生素联合暴露不会增加它们的环境风险。同时医学中的抗生素联合用药也应该被推广。本文为环境中单一及混合抗生素的生态风险评价和抗生素联合用药提供了重要的理论依据。

目前 hormesis 效应的产生机制尚无定论,一个比较公认解释是受体理论^[20]:低浓度时具有高亲和力的受体亚型起主导作用,高浓度时具有低亲和力的受体亚型起主导作用,2种受体亚型联合作用就可能出现 hormesis 效应。因为接合子的 RP4 质粒上含有 TH 的 ARGs,所以低浓度的 TH 对接合子的相关受体的亲和力低于对受体菌的相关受体的亲和力,此时抗生素只作用于受体菌的相关受体,从而对接合子和 RP4 质粒产生正向选择压力,促进质粒接合转移;随着 TH 浓度的不断增加,其对接合子的相关受体的亲和力不断增加,此时抗生素同时作用于受体菌和接合子的相关受体,从而对接合子和 RP4 质粒产生负向选择压力,抑制质粒接合转移。

在课题组的前期研究中,曾提出了基于受体理论 hormesis 叠加理论^[21],即 hormesis 剂量效应曲线是由一个促进曲线和一个抑制曲线叠加而成。根据该理论,TH 单一暴露对接合转移的剂量效应曲线可以理解为由 TH 与受体菌的相关受体结合产生的促进曲线(正向选择压力)、由 TH 与接合子的相关受体结合产生的抑制曲线(负向选择压力)组成;而 TMP、SCP、SIX 在低浓度和高浓度时对接合子和受体菌的相关受体亲和力相同,因此其剂量效应曲线只能由抑制曲线组成,无促进曲线;TH 与 TMP(或 SCP、或 SIX)联合暴露对接合转移的剂量效应曲线可以分解为由 TH 的促进曲线、TH 的抑制曲线、TMP(或 SCP、或 SIX)的抑制曲线3条曲线组成。因此,当这2类抗生素联合暴露时,TMP、SCP、SIX 和 TH 的抑制曲线(负向选择压力)加和在一起,抵消了

部分促进曲线(正向选择压力)的促进作用,进而减小了 TH 的 hormesis 效应。本文首次使用受体理论和基于受体理论的叠加理论解释了抗生素单一及联合暴露对质粒接合转移的 hormesis 效应产生机制,为目前尚无定论的 hormesis 受体模型提供了证据支持。

通讯作者简介:林志芬(1972-),女,教授,博士生导师,主要研究方向为混合污染物生物效应及人体健康评价。

参考文献 (References):

- [1] Pei R, Kim S C, Carlson K H, et al. Effect of river landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG) [J]. *Water Research*, 2006, 40(12): 2427-2435
- [2] Martinez J L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants [J]. *Environmental Pollution*, 2009, 157(11): 2893-2902
- [3] Jiang L, Hu X, Xu T, et al. Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China [J]. *Science of the Total Environment*, 2013, 458: 267-272
- [4] Karkman A, Johnson T A, Lyra C, et al. High-throughput quantification of antibiotic resistance genes from an urban wastewater treatment plant [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, 92(3): fiw014
- [5] 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
- [6] Sharma V K, Johnson N, Cizmas L, et al. A review of the influence of treatment strategies on antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes [J]. *Chemosphere*, 2016, 150: 702-714
- [7] Hoa P T P, Managaki S, Nakada N, et al. Antibiotic contamination and occurrence of antibiotic-resistant bacteria in aquatic environments of northern Vietnam [J]. *The Science of the Total Environment*, 2011, 409(15): 2894-2901
- [8] 罗义,周启星. 抗生素抗性基因 (ARGs)——一种新型环境污染物[J]. *环境科学学报*, 2008, 28(8): 1499-1505
Luo Y, Zhou Q. Antibiotic resistance genes (ARGs) as emerging pollutants [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(8): 1499-1505 (in Chinese)
- [9] Kohanski M A, DePristo M A, Collins J J. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis [J]. *Molecular Cell*, 2010, 37(3): 311-320

- [10] Panoff J-M, Chuiton C. Horizontal gene transfer: A universal phenomenon [J]. *Human and Ecological Risk Assessment*, 2004, 10(5): 939-943
- [11] Schuurmans J M, Hijum S A F T V, Piet J R, et al. Effect of growth rate and selection pressure on rates of transfer of an antibiotic resistance plasmid between *E. coli* strains [J]. *Plasmid*, 2014, 72: 1-8
- [12] Baharoglu Z, Bikard D, Mazel D. Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through integron activation [J]. *PLoS Genet*, 2010, 6(10): e1001165
- [13] Thammavongs B, Denou E, Missous G, et al. Response to environmental stress as a global phenomenon in biology: The example of microorganisms [J]. *Microbes and Environments*, 2008, 23(1): 20-23
- [14] Smit E, Van Elsas J. Determination of plasmid transfer frequency in soil: Consequences of bacterial mating on selective agar media [J]. *Current Microbiology*, 1990, 21(2): 151-157
- [15] Wang Q, Mao D, Luo Y. Ionic liquid facilitates the conjugative transfer of antibiotic resistance genes mediated by plasmid RP4 [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(14): 8731-8740
- [16] Qiu Z, Shen Z, Qian D, et al. Effects of nano-TiO₂ on antibiotic resistance transfer mediated by RP4 plasmid [J]. *Nanotoxicology*, 2015, 9(7): 895-904
- [17] van der Woude H, Alink G M, Rietjens I. The definition of hormesis and its implications for *in vitro* to *in vivo* extrapolation and risk assessment [J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 2005, 35(6): 603-607
- [18] Hegreness M, Shores N, Damian D, et al. Accelerated evolution of resistance in multidrug environments [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(37): 13977-13981
- [19] Lin Z, Ping Z, Kong D, et al. The ratios of individual chemicals in a mixture determine the degree of joint effect: The climax hypothesis [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2005, 49(1): 1-8
- [20] Calabrese E J, Baldwin L A. Hormesis: A generalizable and unifying hypothesis [J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 2001, 31(4-5): 353-424
- [21] Deng Z, Lin Z, Zou X, et al. Model of hormesis and its toxicity mechanism based on quorum sensing: A case study on the toxicity of sulfonamides to *Photobacterium phosphoreum* [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(14): 7746-7754 ◆