

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20190710004

陈帅, 邹海燕, 高方舟, 等. 抗生素、重金属和杀生剂抗性共选择机制[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(2): 1-10

Chen S, Zou H Y, Gao F Z, et al. Co-selection mechanism of antibiotic, metal and biocide resistance [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(2): 1-10 (in Chinese)

抗生素、重金属和杀生剂抗性共选择机制

陈帅^{1,2}, 邹海燕^{1,2}, 高方舟^{1,2}, 吴黛灵^{1,2}, 张敏^{1,2}, 何良英^{1,2,*}, 应光国^{1,2}

1. 华南师范大学环境研究院, 广东省化学品污染与环境安全重点实验室 & 环境理论化学教育部重点实验室, 广州 510006

2. 华南师范大学环境学院, 广州 510006

收稿日期: 2019-07-10 录用日期: 2019-09-09

摘要: 细菌抗生素抗性已被世界卫生组织认定为对公众健康的重要威胁。细菌抗性除了受到抗生素的直接选择压力, 也受到其他物质如重金属和杀生剂的共同影响。研究发现, 细菌可以通过外排泵系统、细胞膜通透性改变、作用靶标点的改变、酶修饰或降解作用、应激反应改变生理特性、金属螯合和生物转化等抗性机制对这些选择压力产生抗性, 或者通过协同抗性、交叉抗性和共调控抗性的机制产生多重抗性。本文综述了细菌对抗生素、重金属和杀生剂的单一抗性机制、多重抗性机制, 以及重金属和杀生剂对细菌抗生素抗性的影响机制, 并分析了目前研究的不足之处。

关键词: 重金属; 杀生剂; 协同抗性; 交叉抗性; 共调控抗性; 抗生素抗性机制

文章编号: 1673-5897(2020)2-001-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Co-selection Mechanism of Antibiotic, Metal and Biocide Resistance

Chen Shuai^{1,2}, Zou Haiyan^{1,2}, Gao Fangzhou^{1,2}, Wu Dailing^{1,2}, Zhang Min^{1,2}, He Liangying^{1,2,*}, Ying Guangguo^{1,2}

1. Environmental Research Institute, Guangdong Provincial Key Laboratory of Chemical Pollution and Environmental Safety & MOE Key Laboratory of Environmental Theoretical Chemistry, South China Normal University, Guangzhou 510006, China

2. School of Environment, South China Normal University, Guangzhou 510006, China

Received 10 July 2019 accepted 9 September 2019

Abstract: Bacterial antibiotic resistance has been recognized as an important threat to public health by the World Health Organization. Besides the direct selection pressure of antibiotics, bacterial antibiotic resistance is also affected by some other substances such as heavy metals and biocides. It has been found that the mechanisms of bacterial resistance include efflux pump system, change of cell membrane permeability, change of target sites, modification or degradation of enzymes, change of physiological characteristics by stress response, metal chelation and biotransformation. And multiple resistance could be produced by synergistic, cross-resistance and co-regulation of resistance. In this paper, we summarized the single and multiple resistance mechanisms of bacteria to antibiotics, heavy metals and biocides, and the influence mechanism of heavy metals and biocides on bacterial antibiotic resistance. The short of current researches were also addressed.

基金项目: 国家自然科学基金联合基金 NSFC-广东联合基金资助项目(U1701242); 国家自然科学基金-青年科学基金资助项目(41703117)

作者简介: 陈帅(1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向为抗生素抗性基因, E-mail: shuai.chen@m.scnu.edu.cn

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: liangying.he@m.scnu.edu.cn

Keywords: heavy metal; biocide; co-resistance; cross-resistance; co-regulation resistance; antibiotic resistance mechanism

抗生素是由真菌、细菌或其他生物在繁殖过程中所产生的一类具有杀灭或抑制微生物生长作用的物质^[1]。抗生素因其可以有效预防和治疗由细菌导致的疾病问题而得到大量的使用,近年来临床与农业生产中抗生素滥用与随之产生的抗性问题的广泛关注^[2-5]。据调查,我国2013年抗生素总产量估计为24.8万吨,总使用量约为16.2万吨,兽用抗生素的消费量占比从2007年的46%增加到2013年的52%^[6]。当前抗生素抗性已成为全球公共健康领域的重大挑战,也是世界各国政府和社会广泛关注的问题^[7-8]。为了应对抗生素抗性带来的挑战,我国发布了《遏制细菌耐药国家行动计划(2016~2020年)》。

细菌抗性的形成机制及其选择压力是遏制细菌耐药的关键之一,也是近年来的研究热点。对环境中抗生素残留和细菌抗生素抗性的研究发现,二者之间存在着较强的相关性,从各种途径排入到水环境中的抗生素改变了细菌群落结构,提高了总体的抗性水平,抗生素成为导致细菌产生抗药性的重要选择压力^[9]。研究发现,细菌产生抗生素抗性主要机制有外排泵系统、膜通透性改变、改变靶标点、酶修饰及降解作用以及产生应激反应改变生理特性作用,其中关于外排泵系统的研究较为丰富,并且值得注意的是,抗生素抗性的选择压力不止来源于抗生素本身,其他化学物质如金属和杀生剂也参与了抗生素抗性的共同选择^[10-12]。杀生剂是一类无机或合成有机分子,用于对物体和表面进行消毒或灭菌,并保护材料或工艺不受微生物降解,如抗真菌剂、驱虫剂、尼泊金酯类防腐剂和消毒剂等。一般认为,杀生剂的作用机制主要为氧化作用、亲电体作用和溶解细胞膜^[13]。研究发现,细菌对抗生素和杀生剂具有相似的抗性机制,其中外排泵机制最为重要^[14-22]。此外,重金属在环境中难以降解且容易发生富集而长期稳定存在,可对细菌群落对药物的抗性产生持续选择压力^[12]。细菌对重金属抗性机制主要包括外排泵系统、金属螯合与生物转化作用^[23-25]。越来越多的研究证明,细菌不但可以单独对某一种药物产生抗性,也可以通过协同抗性、交叉抗性和共调控抗性等多种机制产生多重抗性^[26-28]。由此可见,细菌抗性的研究不仅要关注抗生素的使用和抗生素的直接选择压力,也要考虑多种物质共同作用机制。

抗生素的大量使用促进了细菌抗性的产生,然而环境中不止残留着大量抗生素,也存在着大量重金属和杀生剂等可进一步影响细菌抗性的物质。因此,研究细菌产生抗生素抗性的机制以及各种化学物质对细菌抗生素抗性的作用显得尤为重要。本文阐述了细菌对抗生素、重金属和杀生剂的抗性机制,以及多种选择压力的共同抗性研究进展,旨在综述多重抗性共选择的研究现状,剖析细菌产生抗性的机制,为抗生素抗性研究探讨新思路和新方法。

1 环境中的选择压力及其抗性机制 (Chemical selection pressure in the environment and resistance mechanism)

我国是抗生素生产和使用大国,环境中抗生素含量较高,2013年我国抗生素总使用量约为16.2万吨,其中人用抗生素占到总量的48%,其余为兽用抗生素。其中36种常见抗生素总使用量达到9.27万吨,其84.3%为兽用抗生素用量,经过人和动物体内代谢作用后,由粪便和尿液排泄的抗生素总量为5.4万吨,进一步通过各种污水处理后,共有5.38万吨进入受纳环境中^[6]。不止抗生素,环境中同样存在着大量重金属和杀生剂残留。对珠江三角洲地区沉积物和河水中重金属的检测表明,大部分沉积物均受到严重的镉、铅和锌污染;珠江水体的重金属含量普遍在高于Ⅰ类水标准的 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 级^[29-31]。三氯生和三氯卡班是常见的杀生剂,用于牙膏和洗手液等多种产品中,在水环境中广泛检出,对我国辽河、海河、黄河、珠江和东江五大河流的监测发现,在五大河流中均检测到三氯生和三氯卡班,几乎每条河流的地表水和沉积物中三氯生和三氯卡班的检出率均为100%或接近100%,三氯生和三氯卡班在地表水中的浓度分别为478和338 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$,在沉积物中的浓度分别为1329和2723 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ^[32]。环境中普遍存在的这些抗生素、杀生剂和重金属成为诱导环境中细菌抗性的重要因素,导致细菌通过各种不同的机制对这些选择压力产生抗性。

1.1 外排泵功能

细菌抗性机制中研究较为丰富的是外排泵功能,细菌通过在细胞膜上产生特定的转运蛋白,使药物等进入细菌内部后还未发挥作用就被排放到细菌体外,从而产生抗性(图1)。通过核苷酸序列分析,

预测 *qacA* 基因编码一个包含 514 个氨基酸的 M_r55017 蛋白,该蛋白具有典型的细胞膜蛋白的性质,分析表明,这些蛋白质的 N-和 C-端区分别参与能量耦合(质子转移)和底物运输,并且被证明属于运输蛋白家族,通过转运蛋白对四环素和亚甲基霉素产生抗性^[33]。与抗生素外排相似,金属外排泵也使细菌拥有了金属抗性,利用单分子超分辨成像和基因工程技术研究大肠杆菌发现,细胞中的三联复合外排泵 CusCBA 配合物是一种动态结构,周质衔接蛋白 CusB 是一种金属传感元件,它在 *cus* 操纵子的转录激活之前驱动外排复合物的形成,以产生金属抗性^[25]。

同样,在杀生剂抗性中外排泵机制也被证明具有重要作用,有研究发现,根据 RNA 测序数据分析,戊二醛暴露诱导外排泵产生和磷酸盐降解,同时影响脂质和多胺的生物合成代谢,此外,对外排泵进行化学抑制发现戊二醛活性增强,表明外排泵有助于戊二醛抗性^[20]。这些研究说明,外排泵功能是细菌产生抗性的重要机制。

1.2 细胞膜通透性改变

另一种重要的抗性机制是改变细胞膜通透性,细菌通过调节控制细胞膜的结构,选择性地减少或禁止某些化学物质进入细菌细胞内,从而产生对该化学物质的抗性(图 1)。细菌可以通过突变而改变外膜中外膜孔蛋白和脂多糖的渗透性,从而产生四环素抗性^[34]。对于杀生剂抗性的研究也表明,膜通透性改变可以提高细菌的杀生剂抗性,Bisbiroulas 等^[4]将单核细胞增生李斯特氏菌在苯扎氯铵作用下生长的极性和中性脂类成分进行分析,并将其与最佳生长细胞进行比较发现,细菌通过调整脂质变化导致膜流动性降低,并且还导致细胞表面的物理化学性质的改变,从而改变细菌对非生物物质表面的粘附,产生了对杀生剂的抗性。而另一种通过蛋白质组学方法分析杀生剂抗性的实验也发现,受苯酚压力选择的大肠杆菌的外膜蛋白 OmpA、FadL、LamB 和 OmpT,细胞质相关蛋白 AceA 和 EF-Tu,内膜蛋白 AtpB,推断的衣壳蛋白 Q8FewO 和未知位置蛋白 Dps 蛋白质也发生改变,从而使细菌产生了对苯酚的抗性^[19]。

1.3 改变作用靶标点

细菌还可以通过干扰或限制抗生素等化学物质的靶标位点,使其杀菌作用降低或受到抑制,从而产生抗性(图 1)。例如大环内酯类、林可酰胺和链霉素

抗生素在化学结构上是不同的,但有相似的作用模式,细菌通过修饰它们在核糖体上的靶标点,特别是 23S rRNA 的结构域中腺嘌呤残基的甲基化,使抗生素药物无法作用到正确靶标点,从而产生抗性^[35-37]。改变靶标点同样是杀生剂抗性的一种重要机制。在大肠杆菌中,FabI 突变转化为 FabI[G93V],而 FabI 可以与蛋白质和三氯生形成稳定的三元结构,突变后的 FabI[G93V]则影响了三氯生在细胞中的稳定结构,使三氯生更容易被去除,从而产生对三氯生的抗性^[16]。

1.4 酶修饰和降解作用

细菌可以产生针对某些种类抗生素或杀生剂的修饰酶或降解酶,当这些化学物质进入细菌细胞后,首先被相应的酶作用水解或者修饰,或者被一些生化作用降解,从而无法起到杀菌作用,导致细菌产生抗性(图 1)。Cagliero 等^[38]使用红霉素和泰乐菌素在体外选择空肠弯曲杆菌和弯曲杆菌的大环内酯抗性突变体,发现这些突变体通过在核糖体蛋白 L4 (G74D)和 L22(插入位置 86 或 98)中表现出修饰作用而产生抗生素抗性。细菌对杀生剂的这一抗性机制主要是通过生化降解作用。Meade 等^[17]从堆肥、水和土壤样品中分离到对三氯生具有高度抗性的恶臭假单胞菌和木糖氧化无色杆菌反硝化亚种,利用含有三氯生的培养基进行细菌培养实验,通过高效液相色谱法结合生物测定证明,三氯生在液体培养物中被灭活或失去效用。Nishihara^[18]也发现从城市污水处理厂的活性污泥中分离到的一种假单胞菌可以通过 N-脱烷基化降解作用对季铵类化合物产生高度抗性。

1.5 应激反应及改变生理特性

与 4 种常见抗性机制不同的是,最近的一些研究发现,细菌还可以通过生理代谢变化降低细胞对杀生剂的敏感性,比较常见的现象为营养限制、降低生长速率和防止杀生剂进入下层细胞^[22,27]。Muñoz 等^[39]对比了益生菌戊糖乳杆菌 MP-10 暴露于亚致死浓度的抗生素(阿莫西林、氯霉素和四环素)和杀生剂(苯扎氯铵和三氯生)2 种环境的抗性表现,并利用蛋白质组学分析发现,戊糖乳杆菌 MP-10 对抗生素产生的适应性表现为蛋白质合成相关基因的表达增加、碳水化合物代谢及能量生产的相关基因的表达下降,对杀生剂的适应性表现为磷酸化载体蛋白 HPr 和氧化还原酶相关编码基因表达的下调,但它们的共同点在于蛋白质合成基因的过量表达,这些

生理代谢共同的适应性使细菌对抗生素和杀生剂产生了抗性(图1)。

1.6 金属螯合与生物转化

金属螯合与生物转化作用是细菌针对重金属产生的抗性机制,而近些年的研究发现,重金属抗性与抗生素抗性密切相关^[26]。关于细菌对重金属的抗性,研究发现,由 *mer* 操纵子编码的细菌抗汞机制中,进入细胞膜的 Hg^{2+} 先与 Hg^{2+} 结合蛋白结合,将结合的汞传递给位于细胞质膜中的汞运输系统,该系统允许汞向细胞内的易化扩散,随后非细胞汞(Hg^{2+})被细胞质汞还原酶还原为无毒的0价汞从细胞中挥发,防止了 Hg^{2+} 对细胞的损伤(图1)^[23]。在另一项研究中,由于细胞壁上存在磷酸二酯基、羧基、糖羟基和酰胺基等许多阴离子位点,使枯草芽孢杆菌细胞壁与多种金属(Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Na^+ 和 K^+)结合,结合后的金属失去了生物毒性^[24],所以使细菌产生重金属抗性(图1)。

2 细菌对多种选择压力的共选择机制 (Resistance mechanism of bacteria to multiple selection pressures)

重金属、杀生剂和抗生素都是具有抗菌作用的物质,具有相似的抑菌/杀菌手段,所以,细菌可以同时它们产生抗性,且可能具有相似的选择和共存

机制,与单一化学物质抗性相比,细菌的多重抗性机制更为复杂,研究较多的则是协同抗性(共抗性)、交叉抗性和共调控抗性。

2.1 协同抗性(共抗性)

当不同抗性表型的基因位于同一遗传元件(如质粒,转座子或整合子)上时,就会发生共同抗性^[40]。Buffet-Bataillon 等^[41]通过调查发现, *dfiA*、*sulI* 和 *qacEΔ1* 基因盒的存在与对复方新诺明的抗性和季铵类杀生剂的最小抑菌浓度(MIC)值相关。Zhang 等^[42]对金黄色葡萄球菌 LZ-01 的研究发现,经铬酸盐或氨苄青霉素处理后的细菌,基因组和转录组 *EmrA* 和 *EmrB* 基因水平都会相应上调,使细菌对铬和氨苄青霉素的抗性增加,在将 *EmrA* 和 *EmrB* 基因扣除后,这种诱导现象消失,表明 *EmrAB* 操纵子赋予了细菌在生存环境中对铬酸盐或氨苄青霉素的共抗性。另外,对于携带多种抗性基因质粒的研究已有许多报道,Fang 等^[43]研究发现, *pco* 和 *sil* 操纵子、*oqxAB/bla_{CTX-M}* 共存于 IncHI2 质粒上,含有这一质粒的细菌表现出对重金属和抗生素的共抗性(图2)。另一项研究表明,质粒 pUUH239.2 编码对 β -内酰胺类抗性(*bla_{CTX-M-15}*、*bla_{TEM-1}* 和 *bla_{OXA-1}*)、氨基糖苷类抗性(*aac*-(6')-*1b-cr* 和 *aadA2*)、四环素类抗性(*tet* (A)和 *tetR*)、甲氧苄氨嘧啶类抗性(*dhfrXII*)、磺胺类抗性(*sulI*)、季铵化合物类抗性(*qacEΔ1*)、大环内酯类

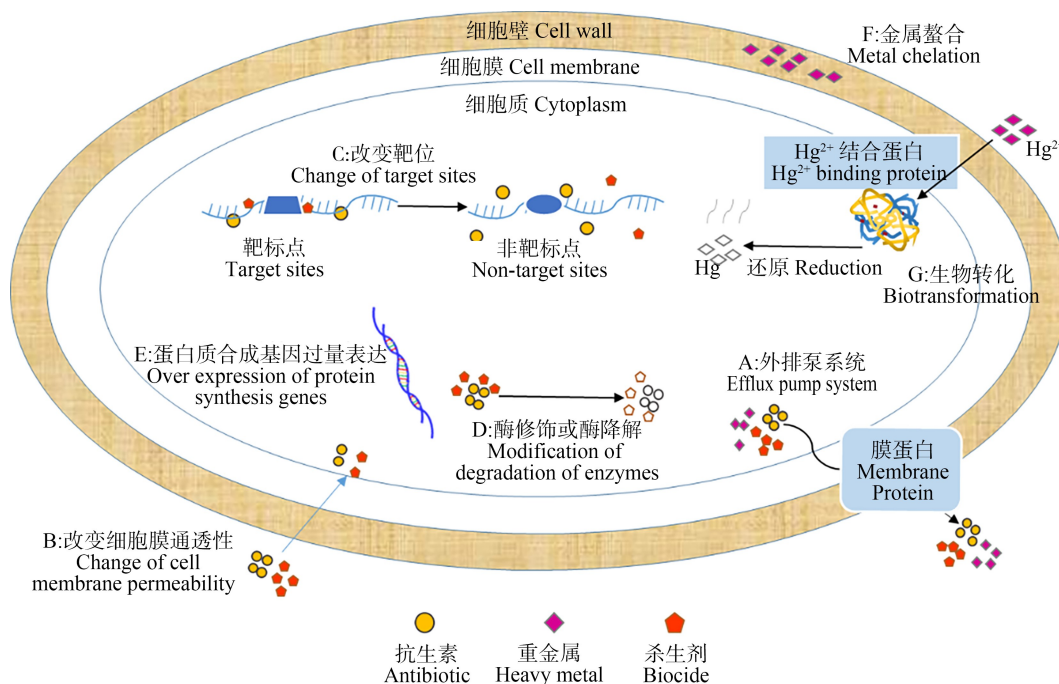


图1 细菌对抗生素、重金属和杀生剂的抗性机制

Fig. 1 Resistance mechanism of antibiotic, heavy metal and biocide

抗性(*mph(A)-mxr-mphR(A)*)和重金属离子(银、铜和砷)抗性,这种同时编码对抗生素、杀生剂和重金属抗性的质粒的存在对细菌多重抗性有重要作用^[44]。

2.2 交叉抗性

交叉抗性是指细菌通过同一种抗性机制可以同时对抗生素、杀生剂和重金属等产生抗性^[45]。已有研究证明,由于应激反应增强导致喹诺酮类药物与其他抗菌药物(包括三氯生)之间的交叉抗性^[46-47]。外排泵功能作为一个重要的抗性机制,在交叉抗性机制中也占据主导地位。由3个基因操纵子(*cme-ABC*)编码的外排泵与已知的三重多药外排泵具有显著结构同源性,它由周质融合蛋白(CmeA)、内膜外排转运蛋白(CmeB)和外膜蛋白(CmeC)组成,有助于空肠弯曲杆菌野生型 81-176 菌株中的多重抗性^[48]。且后续实验发现,*cmeDEF* 编码的外排系统对包括氨基青霉素、溴化乙锭、吡啶、十二烷基硫酸钠(SDS)、脱氧胆酸盐、三氯生和西曲酰亚胺等具有多重抗性^[49]。关于在外排泵功能中常见的 RND 型多蛋白外排机制,Conroy 等^[50]研究发现,*ges* 编码系统与 RND 型蛋白外排系统密切相关,且 *ges* 系统具有较为广泛的底物特性,可以同时将重金属和抗生素类药物排出细胞外。而对于另一具有外排功能的 MexAB-OprM 系统,Schweizer^[51]采用一种基于酵母 FLP 重组酶的新技术,验证了 MexAB-OprM 系统是

铜绿假单胞菌对蓝藻素和硫代乳霉素的内源性耐药系统,且该系统同时可以排出具有广谱杀菌作用的三氯生。另有研究证明,在鼠伤寒沙门氏菌中 BaeSR 系统通过诱导 AcrD 和 MdtABC 药物外排系统增加沙门氏菌的多重抗性和金属抗性(图 2)^[52]。Shahcheraghi 等^[53]通过基因克隆,将含有编码多药外排功能 *smfY* 基因的质粒转移到宿主细菌,观察细菌抗性发现,宿主菌对诺氟沙星、苯扎氯铵、吡啶黄和溴化乙锭的 MIC 显著增加。另一诱导实验发现,大肠杆菌产生应激反应或对苯扎氯铵和抗生素适应性增强,导致大肠杆菌表征出对苯扎氯铵和抗生素的获得性交叉抗性,其中外排功能的增强在具有抗性的细胞中明显增加^[54]。

2.3 共调控抗性

细菌的生命活动依靠各种胞内组织的共同调节,当细菌暴露于选择压力之下时,会将转录翻译过程联系起来,通过应激协调反应产生抗性^[26]。Navarre 等^[55]发现调节基因 *slyA* 和 *phoP/phoQ* 在沙门氏菌对药物产生的抗性中起关键作用,*slyA* 的主要作用是改变细胞表面以保护细胞免受宿主产生的有毒化合物的影响(图 2)。Perron 等^[56]通过亚抑制浓度或亚致死浓度诱导实验,证明了双组分调节基因 *czcR-czcS* 与铜绿假单胞菌的重金属抗性和碳青霉烯抗生素抗性有关。Balasubramanian 等^[57]的研究证

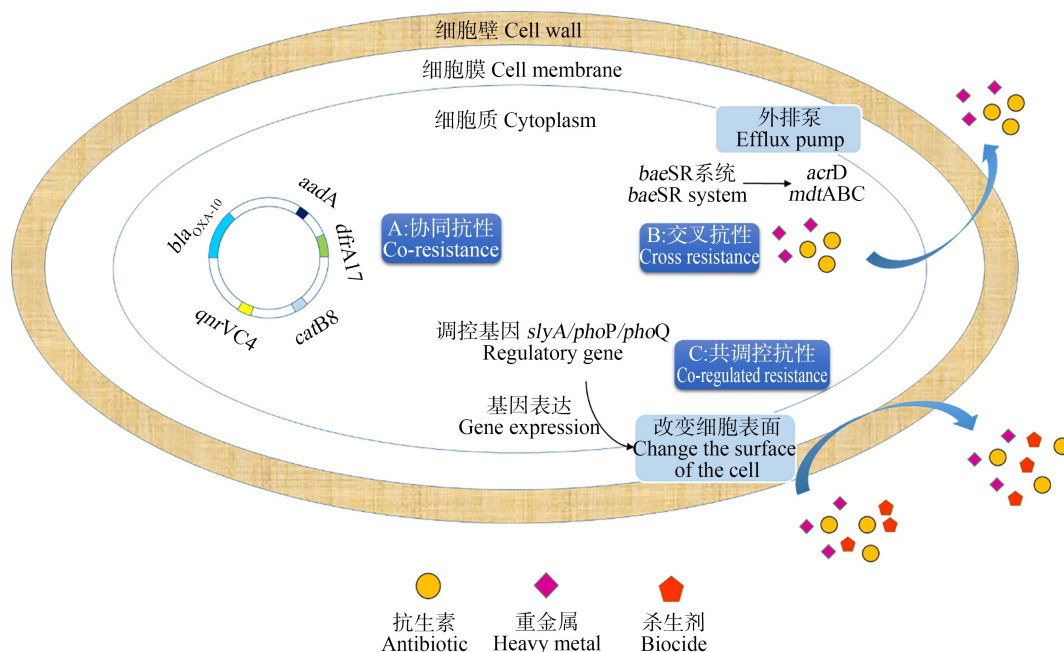


图2 抗生素、重金属和杀生剂的共选择机制

Fig. 2 Co-selection mechanisms of antibiotic, heavy metal and biocide

明,*ampR*的丢失导致了药物对细菌作用的增强,这表明在 β -内酰胺抗性、藻酸盐生产、群体感应基因和毒性因子产生之间存在着一个共同调节网络,其中*ampR*起着核心作用。与此相似,*acrD*和*mdtABC*基因的共同缺失抑制了*bacR*介导的多重抗性,而单个基因的缺失并不能抑制*bacR*介导的多重抗性,证明BacR调节系统通过诱导AcrD和MdtABC外排系统增加了沙门氏菌的多重抗性^[52]。最近的一项实验发现,三氯生可诱导野生型大肠埃希菌通过共调控作用产生多重抗性,三氯生诱导的氧化应激导致*fabI*、*frdD*、*marR*、*acrR*和*soxR*等基因的突变,引起编码 β -内酰胺酶和多药外排泵基因转录的上调,以及膜通透性相关基因的下调^[58]。

3 重金属和杀生剂对细菌抗生素抗性影响的研究现状 (Research status of the effects of heavy metals and biocides on bacterial antibiotic resistance)

重金属对细菌抗生素抗性影响的研究,过去主要采用诱导实验的方法观察细菌抗生素抗性的变化,并且发现受重金属刺激的细菌更容易在抗生素环境中存活;后期的研究专注于与表型相关的基因及其表达的情况,证明了环境污染浓度的重金属暴露可以提高细菌的抗生素抗性^[59-61]。与重金属的环境污染浓度下细菌抗生素抗性的变化相比,现在的研究更关注于环境浓度及亚抑制浓度下细菌抗生素抗性的变化,并且抗性的持续性问题成为研究热点。一些实验证明,低浓度的重金属共选择作用提高了环境中抗生素抗性基因(ARGs)的丰度,改变了细菌群落结构,使细菌整体抗性水平增强,且在去除重金属后,这种抗性水平会维持较长时间,在土壤环境中这种抗性甚至会持续几十天^[61-63]。最近研究发现,在亚抑制浓度 Cu^{2+} 暴露下,细菌细胞内产生过量的活性氧(ROS),提高了细菌的接合频率,从而增强了抗生素抗性基因的水平转移^[64]。此外,环境浓度Cu、Ag、Cr和Zn的暴露,不仅促进了细菌内ROS的形成,使得细胞产生应激反应,也对膜完整性造成损害,从而增加了脂质相关*rfaZ*、*rfaQ*、*pmrD*、*htrL*和*pIsX*等的表达,从而促进抗生素抗性基因的水平转移^[65]。由此可见,亚抑制浓度重金属对细菌的抗生素抗性具有促进作用,其中ROS的产生被认为是重金属促进抗性基因水平转移的原因之一^[64-65]。

重金属对细菌抗生素抗性的促进作用已被广泛认可,但目前对于杀生剂与抗生素抗性的相关性存在一些争议。已经有多项研究表明,杀生剂抗性与

抗生素抗性之间并无直接关联性,对从环境样品中分离的抗性细菌的调查分析显示,来自动物粪便、含氯自来水和临床菌株等多种途径的细菌可以同时对抗多种抗生素和杀生剂产生抗性,但2种抗性之间仅存在弱相关性^[66-68]。这种2种抗性之间相关性分析很明显,不能成为杀生剂与抗生素抗性间作用的有效证据,更多的诱导实验及基因层面的机理研究准确地说明了杀生剂对抗生素抗性的促进作用。一些调查分析表明,杀生剂与细菌抗生素抗性密切相关。在空气和水体环境中的调查发现,杀生剂的存在往往提高了环境中ARGs的丰度,且抗生素抗性呈现随杀生剂浓度升高而增强的现象^[69-70]。Liu等^[70]对暴露于消毒副产物中的铜绿假单胞菌的抗生素抗性研究表明,杀生剂暴露使细菌对10种单独抗生素和多种抗生素的抗性均有不同程度的提高,与对照相比,对诺氟沙星和多霉素B抗性增强甚至超过10倍。对这些抗性表型的作用机制研究发现,SmeT是多药外排系统SmeDEF的一种阻遏物,三氯生与SmeT结合,降低了SmeT对SmeDEF的抑制作用,提高了SmeDEF在细胞内的表达,从而提高抗性^[71]。不止这种化学结合作用,杀生剂还可以通过诱导而导致多药外排泵AcrAB-TolC突变,该突变与多重抗性表型有关,使细菌对喹诺酮类抗生素和杀生剂三氯生均产生高度抗性^[72]。最近的一项实验发现,2种常见的水消毒副产物(亚氯酸盐和碘乙酸)具有选择抗生素抗性的作用,导致在高(接近MIC)和低(亚MIC)暴露浓度下抗性大肠杆菌菌株的突变,且亚抑制浓度的消毒副产物暴露产生的抗性高于MIC暴露浓度下产生的抗性^[73]。综上,可以看出杀生剂可以诱导抗生素抗性增强,但对于这种抗性在环境中的持续性问题研究较少,Li等^[74]将革兰氏阴性菌大肠杆菌长期暴露于环境浓度的三氯生中,检测分析细菌基因组和转录组信息发现,由于靶基因的过度表达和突变导致细菌对三氯生的抗性明显增强,且在停止暴露后细菌由于可遗传的基因突变,适应细胞对三氯生表现出持续的抗性;而在暴露过程中细菌的抗生素抗性变化不大,暴露停止后会随着时间的推移而下降。而关于杀生剂促进抗生素抗性传播的研究,目前仅有一篇文献介绍了在对供体菌和受体菌共同培养的条件下,三氯生和洗必泰显著增加了抗生素抗性的转移频率,促进了抗生素抗性的水平传播^[75]。

从目前研究来看,对于环境中的重金属和杀生

剂对细菌抗生素抗性的研究,首先通过细菌诱导实验观察其抗性表型,其次结合分子生物学和测序技术,分析细菌基因组、转录组和蛋白组信息,深入研究细菌产生抗生素抗性的基因型和抗性表型^[59-61,66-71]。一般认为高浓度暴露更容易产生细菌抗生素抗性^[59-61],但近些年来发现,亚抑制浓度暴露也是促进细菌抗生素抗性^[59-61]及多重抗性的关键因素^[73-74],并在此基础上进一步分析了细菌抗生素抗性的持久性^[61-63],以更好评估重金属和杀生剂带来的抗生素抗性的环境影响。其中,抗性基因的水平转移是目前重金属和杀生剂对细菌抗生素抗性影响研究的重点^[64-65,75]。

4 研究展望 (Research prospect)

重金属和杀生剂已成为推动细菌抗性增长的重要因素,但目前的研究仍存在一些不足,主要表现在:(1)缺乏多种选择压力共选择实验研究。目前有关选择压力胁迫产生抗生素抗性的研究多是采用单一化学物质暴露的实验,而环境中更多的情况是多种选择压力并存,进一步研究多种选择压力对细菌抗生素抗性的共选作用及机制有利于应对细菌抗性^[73-74]问题。(2)驱动机制研究不足。虽然已有足够证据表明细菌可以通过多种作用机制产生多重抗性,但驱使这种多重抗性产生的机制仍不清楚;另外,虽然已有部分研究证明重金属和杀生剂可以驱动抗生素抗性水平传播,但其传播机制和诱导传播的机制尚不明确。抗生素抗性研究已涉及微生物学、分子生物学和生物信息学等多个学科领域,因此,有必要利用多学科研究手段对细菌抗性的形成机制、选择压力和驱动机制开展深入研究。

通讯作者简介:何良英(1986—),女,博士,助理研究员,主要研究方向为环境中抗生素和耐药基因的污染特征和传播扩散。

参考文献 (References):

- [1] Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance [J]. *Microbiologia* (Madrid, Spain), 1996, 12(1): 9-16
- [2] Wright G D. Antibiotic resistance in the environment: A link to the clinic? [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2010, 13(5): 589-594
- [3] Ying G G, He L Y, Ying A J, et al. China must reduce its antibiotic use [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(3): 1072-1073
- [4] Van Boeckel T P, Brower C, Gilbert M, et al. Global trends in antimicrobial use in food animals [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112(18): 5649-5654
- [5] Port J A, Cullen A C, Wallace J C, et al. Metagenomic frameworks for monitoring antibiotic resistance in aquatic environments [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2014, 122(3): 222-228
- [6] Zhang Q Q, Ying G G, Pan C G, 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] World Health Organization. Antimicrobial resistance: Global report on surveillance [J]. *Australasian Medical Journal*, 2014, 7(4): 237
- [8] World Health Organization. Global action plan on antimicrobial resistance 2015 [R]. Geneva: World Health Organization, 2015
- [9] Baquero F, José-Luis M, Rafael C. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, 19(3): 260-265
- [10] Chapman J S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance [J]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2003, 51(4): 271-276
- [11] Sidhu M S, Heir E, Sørnum H, et al. Genetic linkage between resistance to quaternary ammonium compounds and beta-lactam antibiotics in food-related *Staphylococcus* spp.[J]. *Microbial Drug Resistance*, 2001, 7(4): 363-371
- [12] Stepanauskas R, Glenn T C, Jagoe C H, et al. Elevated microbial tolerance to metals and antibiotics in metal-contaminated industrial environments [J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39(10): 3671-3678
- [13] Chapman J S. Biocide resistance mechanisms [J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2003, 51 (2): 133-138
- [14] Bisbiroulas P, Psylou M, Iliopoulou I, et al. Adaptational changes in cellular phospholipids and fatty acid composition of the food pathogen *Listeria monocytogenes* as a stress response to disinfectant sanitizer benzalkonium chloride [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2011, 52(3): 275-280
- [15] Escalada M G. Triclosan inhibition of fatty acid synthesis and its effect on growth of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005, 55(6): 879-882
- [16] Heath R J, Rubin J R, Holland D R, et al. Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274 (16): 11110-

- 11114
- [17] Meade M J, Waddell R L, Callahan T M. Soil bacteria *Pseudomonas putida* and *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. denitrificans inactivate triclosan in liquid and solid substrates [J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 204(1): 45-48
- [18] Nishihara T. Biodegradation of didecyldimethylammonium chloride by *Pseudomonas fluorescens* TN4 isolated from activated sludge [J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 88(4): 641-647
- [19] Zhang D F, Li H, Lin X M, et al. Characterization of outer membrane proteins of *Escherichia coli* in response to phenol stress [J]. Current Microbiology, 2011, 62(3): 777-783
- [20] Vikram A, Bomberger J M, Bibby K J. Efflux as a glutaraldehyde resistance mechanism in *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2015, 59(6): 3433-3440
- [21] Webber M A, Randall L P, Cooles S, et al. Triclosan resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2008, 62(1): 92-97
- [22] Ortega Morente E, Fernández-Fuentes M A, Grande Burgos M J, et al. Biocide tolerance in bacteria [J]. International Journal of Food Microbiology, 2013, 162(1): 13-25
- [23] Brown N L, Camakaris J, Lee B T O, et al. Bacterial resistance to mercury and copper [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 1991, 46(2): 106-114
- [24] Han X, Gu J. Sorption and transformation of toxic metals by microorganisms [M]// Mitchell R, Gu J. Environmental Microbiology. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc., 2010: 153-176
- [25] Santiago A G, Chen T Y, Genova L A, et al. Adaptor protein mediates dynamic pump assembly for bacterial metal efflux [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017, 114(26): 6694-6699
- [26] Baker-Austin C, Wright M S, Stepanauskas R, et al. Co-selection of antibiotic and metal resistance [J]. Trends in Microbiology, 2006, 14(4): 176-182
- [27] Gnanadhas D P, Marathe S A, Chakravorty D. Biocides-resistance, cross-resistance mechanisms and assessment [J]. Expert Opinion on Investigational Drugs, 2013, 22(2): 191-206
- [28] Pal C, Asiani K, Arya S, et al. Metal resistance and its association with antibiotic resistance [J]. Advances in Microbial Physiology, 2017, 70: 261-313
- [29] Cheung K C, Poon B H T, Lan C Y, et al. Assessment of metal and nutrient concentrations in river water and sediment collected from the cities in the Pearl River Delta, South China [J]. Chemosphere, 2003, 52(9): 1431-1440
- [30] Liu W X, Li X D, Shen Z G, et al. Multivariate statistical study of heavy metal enrichment in sediments of the Pearl River Estuary [J]. Environmental Pollution, 2003, 121(3): 377-388
- [31] 吴兴让, 尹平河, 赵玲, 等. 珠江广州段微表层和次表层水中重金属分布与风险的初步评价[J]. 暨南大学学报: 自然科学版, 2010, 31(1): 84-88
- Wu X R, Yin P H, Zhao L, et al. Health risk assessment of heavy metals in the water of surface and subsurface microlayers from Guangzhou section of Pearl River [J]. Journal of Jinan University: Natural Science, 2010, 31(1): 84-88 (in Chinese)
- [32] Zhao J L, Zhang Q Q, Chen F, et al. Evaluation of triclosan and triclocarban at river basin scale using monitoring and modeling tools: Implications for controlling of urban domestic sewage discharge [J]. Water Research, 2013, 47(1): 395-405
- [33] Rouch D A, Cram D S, Diberardino D, et al. Efflux-mediated antiseptic resistance gene *qacA* from *Staphylococcus aureus*: Common ancestry with tetracycline- and sugar-transport proteins [J]. Molecular Microbiology, 2010, 4(12): 2051-2062
- [34] Chopra I. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2001, 65(2): 232-260
- [35] Schmitz F J, Sadurski R, Kray A, et al. Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European university hospitals [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2000, 45(6): 891-894
- [36] Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification [J]. Antimicrob Agents and Chemother, 1995, 39(3): 577-585
- [37] Leclercq R, Courvalin P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1991, 35(7): 1267-1272
- [38] Cagliero C, Mouline C, Cloeckaert A, et al. Synergy between efflux pump CmeABC and modifications in ribosomal proteins L4 and L22 in conferring macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, 50(11): 3893-3896
- [39] Muñoz M C C, Benomar N, Ennahar S, et al. Compar-

- tive proteomic analysis of a potentially probiotic *Lactobacillus pentosus* MP-10 for the identification of key proteins involved in antibiotic resistance and biocide tolerance [J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 222: 8-15
- [40] Chapman J S. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance [J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2003, 51(4): 271-276
- [41] Buffet-Bataillon S, Le Jeune A, Le Gall-David S, et al. Molecular mechanisms of higher MICs of antibiotics and quaternary ammonium compounds for *Escherichia coli* isolated from bacteraemia [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2012, 67(12): 2837-2842
- [42] Zhang H, Ma Y, Liu P, et al. Multidrug resistance operon *emrAB* contributes for chromate and ampicillin co-resistance in a *Staphylococcus* strain isolated from refinery polluted river bank [J]. SpringerPlus, 2016, 5(1): 1648
- [43] Fang L, Li X, Li L, et al. Co-spread of metal and antibiotic resistance within ST3-IncHI2 plasmids from *E. coli* isolates of food-producing animals [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 25312
- [44] Sandegren L, Linkevicius M, Lytsy B, et al. Transfer of an *Escherichia coli* ST131 multiresistance cassette has created a *Klebsiella pneumoniae*-specific plasmid associated with a major nosocomial outbreak [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2011, 67(1): 74-83
- [45] Schwaiger K, Harms K S, Bischoff M, et al. Insusceptibility to disinfectants in bacteria from animals, food and humans—Is there a link to antimicrobial resistance? [J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 88
- [46] Chuanchuen R, Beinlich K, Hoang T T, et al. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: Exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects *nfxB* mutants overexpressing MexCD-OprJ [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001, 45(2): 428-432
- [47] Webber M A, Buckner M M C, Redgrave L S, et al. Quinolone-resistant gyrase mutants demonstrate decreased susceptibility to triclosan [J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2017, 72(10): 2755-2763
- [48] Lin J, Michel L O, Zhang Q. CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002, 46(7): 2124-2131
- [49] Pumbwe L, Randall L P, Woodward M J, et al. Evidence for multiple-antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* not mediated by CmeB or CmeF [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2005, 49(4): 1289-1293
- [50] Conroy O, Kim E H, Meevov M M, et al. Differing ability to transport nonmetal substrates by two RND-type metal exporters [J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 308(2): 115-122
- [51] Schweizer H P. Intrinsic resistance to inhibitors of fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is due to efflux: Application of a novel technique for generation of unmarked chromosomal mutations for the study of efflux systems [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998, 42(2): 394-398
- [52] Nishino K, Nikaido E, Yamaguchi A. Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [J]. Journal of Bacteriology, 2007, 189(24): 9066-9075
- [53] Shahcheraghi F, Minato Y, Chen J, et al. Molecular cloning and characterization of a multidrug efflux pump, SmfY, from *Serratia marcescens* [J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2007, 30(4): 798-800
- [54] Langsrud S, Sundheim G, Holck A L. Cross-resistance to antibiotics of *Escherichia coli* adapted to benzalkonium chloride or exposed to stress-inducers [J]. Journal of Applied Microbiology, 2004, 96(1): 201-208
- [55] Navarre W W, Halsey T A, Walthers D, et al. Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ [J]. Molecular Microbiology, 2005, 56(2): 492-508
- [56] Perron K, Caille O, Rossier C, et al. CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(10): 8761-8768
- [57] Balasubramanian D, Kong K F, Jayawardena S R, et al. Co-regulation of β -lactam resistance, alginate production and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Journal of Medical Microbiology, 2011, 60(2): 147-156
- [58] 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
- [59] Chen S, Li X, Sun G, et al. Heavy metal induced antibiotic resistance in bacterium LSJC7 [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(10): 23390-23404
- [60] Flach C F, Pal C, Svensson C J, et al. Does antifouling paint select for antibiotic resistance? [J]. Science of the Total Environment, 2017, 590: 461-468
- [61] Zhang M, Chen L, Ye C, et al. Co-selection of antibiotic resistance via copper shock loading on bacteria from a drinking water bio-filter [J]. Environmental Pollution,

- 2018, 233: 132-141
- [62] Xu Y, Xu J, Mao D, et al. Effect of the selective pressure of sub-lethal level of heavy metals on the fate and distribution of ARGs in the catchment scale [J]. *Environmental Pollution*, 2017, 220: 900-908
- [63] Kang W, Zhang Y J, Shi X, et al. Short-term copper exposure as a selection pressure for antibiotic resistance and metal resistance in an agricultural soil [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25 (29): 29314-29324
- [64] Zhang S, Wang Y, Song H, et al. Copper nanoparticles and copper ions promote horizontal transfer of plasmid-mediated multi-antibiotic resistance genes across bacterial genera [J]. *Environment International*, 2019, 129: 478-487
- [65] 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
- [66] Rizzotti L, Rossi F, Torriani S. Biocide and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from the swine meat chain [J]. *Food Microbiology*, 2016, 60: 160-164
- [67] Khan S, Beattie T K, Knapp C W. Relationship between antibiotic-and disinfectant-resistance profiles in bacteria harvested from tap water [J]. *Chemosphere*, 2016, 152: 132-141
- [68] Oggioni M R, Coelho J R, Furi L, et al. Significant differences characterise the correlation coefficients between biocide and antibiotic susceptibility profiles in *Staphylococcus aureus* [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2015, 21 (16): 2054
- [69] Fahimipour A K, Ben Mamar S, Mcfarland A G, et al. Antimicrobial chemicals associate with microbial function and antibiotic resistance indoors [J]. *mSystems*, 2018, 3 (6): e00200-18
- [70] Liu S S, Qu H M, Yang D, et al. Chlorine disinfection increases both intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in a full-scale wastewater treatment plant [J]. *Water Research*, 2018, 136: 131-136
- [71] Hernández A, Ruiz F M, Romero A, et al. The binding of triclosan to SmeT, the repressor of the multidrug efflux pump SmeDEF, induces antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* [J]. *PLoS Pathogens* (Online), 2011, 7(6): e1002103
- [72] Webber M A, Whitehead R N, Mount M, et al. Parallel evolutionary pathways to antibiotic resistance selected by biocide exposure [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2015, 70(8): 2241-2248
- [73] Li D, Zeng S, He M, et al. Water disinfection byproducts induce antibiotic resistance-role of environmental pollutants in resistance phenomena [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(6): 3193-3201
- [74] Li M, He Y, Sun J, et al. Chronic exposure to an environmentally relevant triclosan concentration induces persistent triclosan resistance but reversible antibiotic tolerance in *Escherichia coli* [J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(6): 3277-3286
- [75] Jutkina J, Marathe N P, Flach C F, et al. Antibiotics and common antibacterial biocides stimulate horizontal transfer of resistance at low concentrations [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 616: 172-178
- ◆