

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20230106002

沈洪艳, 韩冬旭, 杨雷, 等. 外加碳源对抗生素诱导大肠杆菌 Hormesis 效应的调控作用[J]. 生态毒理学报, 2023, 18(5): 156-164

Shen H Y, Han D X, Yang L, et al. Regulation of external carbon source on antibiotic-induced hormetic effect in *Escherichia coli* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2023, 18(5): 156-164 (in Chinese)

外加碳源对抗生素诱导大肠杆菌 Hormesis 效应的调控作用

沈洪艳^{1,2}, 韩冬旭^{1,2}, 杨雷³, 李双江¹, 孙昊宇^{4,*}, 唐量⁴

1. 河北科技大学环境科学与工程学院, 石家庄 050018

2. 河北省药物分子化学重点实验室, 石家庄 050018

3. 河北化工医药职业技术学院质量检测与管理系, 石家庄 050026

4. 上海大学有机复合污染控制工程教育部重点实验室, 上海 200444

收稿日期: 2023-01-06

录用日期: 2023-04-10

摘要: 抗生素对细菌通常表现出“低促高抑”的 Hormesis 效应, 这显著影响了抗生素的生态风险评估。目前关于抗生素诱导细菌 Hormesis 效应的研究多集中于单一碳源条件, 针对多种碳源共存条件的相关研究还十分有限。因此, 为进一步探究外加碳源对抗生素诱导细菌 Hormesis 效应的影响, 本文以大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)为受试生物, 在外加不同浓度葡萄糖的 Mueller-Hinton 培养基中测定了盐酸四环素(tetracycline hydrochloride, TCH)和 2(5H)-呋喃酮(2(5H)-furanone, 2F)2 种抗生素单一及联合暴露对 *E. coli* 生长的毒性效应, 并分析了外加葡萄糖与抗生素对 *E. coli* 生长的交互效应。结果表明, TCH 和 2F 单一及联合暴露均能诱导 *E. coli* 产生 Hormesis 效应, 随着外加葡萄糖浓度的升高, TCH、2F 和 TCH+2F 在低浓度下对 *E. coli* 生长的促进作用逐渐增强, 最大促进率分别由 47.66%、9.08%、5.63% 增加到 158.65%、40.20%、21.30%; 在高浓度下对 *E. coli* 生长的抑制作用逐渐减弱, EC_{50} 值分别从 $3.17E-05$ 、 $1.62E-02$ 、 $3.71E-03$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加到 $9.24E-05$ 、 $4.10E-02$ 、 $1.01E-02$ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 外加葡萄糖与抗生素对抑制 *E. coli* 生长的交互效应总体上呈拮抗作用, 且随着外加葡萄糖浓度升高拮抗作用也随之增强, 可以看出外加碳源能够降低抗生素的细菌毒性。本研究可为从外界营养条件角度更加全面评估抗生素的 Hormesis 效应及生态风险提供参考和数据支持。

关键词: 抗生素; 大肠杆菌; Hormesis 效应; 碳源; 葡萄糖

文章编号: 1673-5897(2023)5-156-09

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

Regulation of External Carbon Source on Antibiotic-induced Hormetic Effect in *Escherichia coli*

Shen Hongyan^{1,2}, Han Dongxu^{1,2}, Yang Lei³, Li Shuangjiang¹, Sun Haoyu^{4,*}, Tang Liang⁴

1. School of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China

2. Hebei Provincial Key Laboratory of Medicinal Molecular Chemistry, Shijiazhuang 050018, China

3. Department of Quality Inspection and Management, Hebei Chemical & Pharmaceutical College, Shijiazhuang 050026, China

4. Ministry of Education Key Laboratory of Organic Compound Pollution Control Engineering, Shanghai University, Shanghai 200444, China

Received 6 January 2023

accepted 10 April 2023

基金项目: 国家自然科学基金(42277270, 22006116); 河北省化工行业挥发性有机物检测与治理技术创新中心开放课题基金(ZXJJ20210404)

第一作者: 沈洪艳(1971—), 女, 博士, 教授, 研究方向为污染物环境行为及效应、环境影响评价及规划研究, E-mail: 1178611805@qq.com

* 通信作者 (Corresponding author), E-mail: sunhaoyu2021@shu.edu.cn

Abstract: Antibiotics usually trigger hormetic effects on bacteria that exhibit low-dose stimulation and high-dose inhibition, which significantly influence the ecological risk assessment of antibiotics. Currently, the studies regarding the hormesis effects of antibiotics on bacteria have been always conducted under the condition of single carbon source, while the related researches rarely consider the condition of multiple carbon sources. In this study, *Escherichia coli* (*E. coli*) was used as the test organism to further explore the influence of the added carbon source on the hormetic phenomena in bacteria induced by antibiotics. Under the culture conditions of Mueller-Hinton medium with added different concentrations of glucose, the single and combined toxicity of tetracycline hydrochloride (TCH) and 2(5H)-furanone (2F) was determined using the growth of *E. coli* as the endpoint, where the interaction effects between added glucose and antibiotics on *E. coli* growth were also analyzed. The results showed that TCH, 2F and their mixture could all induced the hormetic effects on *E. coli*. With the increase of the added glucose, the low-dose stimulatory effects of TCH, 2F and TCH+2F on *E. coli* growth gradually increased, while the high-dose inhibitory effects gradually weakened. The maximum stimulatory rates of TCH, 2F and TCH+2F increased from 47.66% to 158.65%, from 9.08% to 40.20%, and from 5.63% to 21.30%, respectively. The EC_{50} values of TCH, 2F and TCH+2F increased from $3.17E-05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ to $9.24E-05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, from $1.62E-02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ to $4.10E-02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, and from $3.71E-03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ to $1.01E-02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. The interaction effects between added glucose and antibiotics on *E. coli* growth were generally antagonism, which enhanced with the increase of added glucose. These results indicated that added carbon source could reduce the bacterial toxicity of antibiotics. This study can provide reference and data support for a more comprehensive assessment of antibiotics' hormesis and their ecological risk from the perspective of external nutritional condition.

Keywords: antibiotic; *Escherichia coli*; Hormesis; carbon sources; glucose

由于良好的抗病原体性能,抗生素在临床医疗、畜牧业和水产养殖等领域被广泛应用^[1]。然而,抗生素的过度或不当使用使其环境浓度不断升高,因此抗生素对生物体,特别是其靶标生物细菌的胁迫效应引发了广泛关注。细菌在面对抗生素的胁迫时往往表现出“低浓度促进,高浓度抑制”的 Hormesis 效应^[2]。例如,低剂量的氯霉素能够诱导费氏弧菌(*Vibrio fischeri*, *V. fischeri*)产生 Hormesis 效应^[3];大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)能够对低于毒理学阈值剂量的磺胺类和四环素类抗生素表现出 Hormesis 效应^[4-5]。目前,抗生素诱导的细菌 Hormesis 效应显著影响着其生态风险评价的关键环节。

已有研究表明,抗生素诱导的细菌 Hormesis 效应受到多种因素的调控。其中,环境温度、盐度、细菌的群体感应以及暴露时间被认为是影响抗生素诱导细菌 Hormesis 效应的关键因素^[6]。然而,作为细菌代谢主要能量来源的碳源物质在抗生素诱导细菌 Hormesis 效应中的作用尚未引起足够重视。碳源物质可以通过调控代谢活动、种群密度、碳分解代谢物抑制(carbon catabolite repression, CCR)途径或群体感应系统决定细菌在外界胁迫下的生存策略,最终影响细菌的剂量效应特征甚至 Hormesis 现象的发

生^[7-9]。其中,CCR 是细菌在混合碳源中生长时实现优先利用首选碳源(如葡萄糖, glucose, Glc)的一种全局代谢调控机制,这导致了细菌的二次生长,即只有首选碳源耗尽后,其他碳源才会被细菌消耗^[10](图 1(a))。而细菌在实际环境中往往会遇到多种碳源物质共存的情况^[11]。因此,在包含多种碳源的培养体系中研究抗生素诱导的细菌 Hormesis 现象具有重要的现实意义。

在混合碳源培养条件下测试抗生素对细菌的毒性效应,细菌受到了营养物质改变和抗生素胁迫 2 种因素的共同影响。如何有效评估外加碳源和抗生素对细菌的联合效应是值得关注的科学问题。Gurevitch 等^[12]构建了一种以 Hegde's d 计算为基础的多种压力源交互效应的分析方法,该方法通过比较各压力源个体效应的加和与多重压力源总体效应的大小关系判别多种压力源对受体的交互效应类型,目前已被应用于生态环境等多领域内多重压力源交互效应的评价^[13-14]。因此,本研究希望通过计算混合碳源培养体系中外加碳源和抗生素对细菌的交互效应来有效表征外界碳源改变和抗生素胁迫的联合作用。

本研究以经典模式生物 *E. coli* 为受试生物,选

取盐酸四环素(tetracycline hydrochloride, TCH)和 2(5H)-呋喃酮(2(5H)-furanone, 2F)2 种典型抗生素作为受试化合物,测定了在外加不同浓度 Glc(0.00、0.25、0.50、1.00、1.50、2.00 g·L⁻¹)的 Mueller-Hinton (MH)培养基中 TCH 和 2F 单一及联合暴露对 *E. coli* 的 Hormesis 效应,进而分析培养体系中外加碳源对抗生素诱导 Hormesis 效应的调控作用;然后,采用影响因素 Hegde's *d* 计算方法,判别外加碳源和抗生素胁迫对 *E. coli* 生长的交互效应,从而为从外界碳源角度更加全面地评估抗生素的生态风险提供数据支持。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料

本研究所用受试生物为 *E. coli* K-12 MG1655 菌株,购自 Biovector 生物科技有限公司(北京,中国)。D-(+)-葡萄糖、盐酸四环素和 2(5H)-呋喃酮等试剂均购自上海阿拉丁生物科技股份有限公司(上海,中国),试剂纯度均为分析纯。化合物的基本信息见表 1。

1.2 受试生物的培养及工作菌液的制备

将斜面培养基中培养至第三代的 *E. coli* 接种至 5 mL Luria-Bertani(LB)液体培养基(胰蛋白胨 10 g·L⁻¹,酵母浸粉 5 g·L⁻¹,氯化钠 10 g·L⁻¹,pH=7.3 ± 0.1)中,在 37 °C、160 r·min⁻¹条件下培养 6 h 至对数生长期。随后将菌液稀释 10⁵ 倍,使菌密度维持在 10⁴ cell·mL⁻¹左右,磁力搅拌 40 min 后得到工作

菌液用于后续实验。

1.3 *E. coli* 二次生长的测定

在 0~2 g·L⁻¹之间选择 6 个浓度的 Glc(分别为 0.00、0.25、0.50、1.00、1.50、2.00 g·L⁻¹)加入到培养体系中,测定 *E. coli* 在添加 Glc 的 MH 培养基中的二次生长现象。在 96 孔板中依次加入 1% NaCl 溶液、含有不同浓度 Glc 的 MH 培养基(牛肉浸粉 2 g·L⁻¹,酸水解酪蛋白 17.5 g·L⁻¹,可溶性淀粉 1.5 g·L⁻¹,pH=7.3 ± 0.1)和工作菌液,每孔总体积为 200 μL,每个浓度包含 5 个平行。在 37 °C、160 r·min⁻¹条件下振荡培养 24 h,使用全波长酶标仪(Spectra-max190, Molecular Devices, 美国)每小时测定一次 600 nm 处的光密度(OD₆₀₀),观察各培养条件下 *E. coli* 的二次生长。

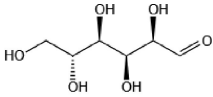
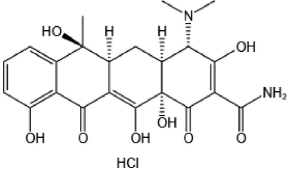
1.4 毒性试验

1.4.1 抗生素单一毒性的测定

分别在单一碳源培养体系(分别为 0.00、0.25、0.50、1.00、1.50、2.00 g·L⁻¹的单一 Glc 和 1.5 g·L⁻¹的单一可溶性淀粉)和混合碳源培养体系(包含 0.00、0.25、0.50、1.00、1.50、2.00 g·L⁻¹ Glc 的 MH 培养基)中测定抗生素对 *E. coli* 的毒性效应。实验时,将受试抗生素溶解于适量 1% NaCl 溶液配制成抗生素标准溶液。实验时将抗生素标准溶液用 1% NaCl 溶液稀释成 16 个等对数梯度系列,将抗生素溶液加入 96 孔板中,每孔包含 80 μL 不同浓度的受试抗生素(实验组)或 1% NaCl 溶液(对照组)、80 μL 单一/混合培养基以及 40 μL 工作菌液,每个浓度梯度点

表 1 化合物的理化参数

Table 1 Physicochemical parameters of the compound

序号 Ordinal	名称 Name	CAS 号 CAS number	缩写 Abbreviation	相对分子质量 Relative molecular mass	结构式 Structural formula
1	D-(+)-葡萄糖 D-(+)-glucose	50-99-7	Glc	180.160	
2	盐酸四环素 Tetracycline hydrochloride	64-75-5	TCH	480.900	
3	2(5H)-呋喃酮 2(5H)-furanone	497-23-4	2F	84.073	

设置3个平行。随后将96孔板在37℃、160 r·min⁻¹条件下振荡培养24 h,结束培养后用全波长酶标仪测定其OD₆₀₀值。抗生素对*E. coli*的毒性效应采用生长抑制率(Inhibition)进行表征,其计算公式见式(1):

$$\text{Inhibition} = \frac{\text{OD}_{600,0} - \text{OD}_{600,i}}{\text{OD}_{600,0}} \times 100\% \quad (1)$$

式中:OD_{600,0}为*E. coli*在无抗生素作用的OD₆₀₀平均值;OD_{600,i}为*E. coli*在不同浓度抗生素作用下的OD₆₀₀平均值。当Inhibition>0时,表示抗生素对*E. coli*生长产生抑制作用,当Inhibition<0时,表示抗生素对*E. coli*生长产生促进作用。

采用Hormesis方程对单一毒性实验的剂量-效应关系进行拟合,其表达式^[15]见式(2):

$$f(x) = C - \frac{D+m}{1+(\frac{x}{a})^b} + \frac{D-C+m}{1+(\frac{x}{p})^q} \quad (2)$$

式中:C代表最大抑制率的趋近值;D代表低浓度处的趋近值;m代表最大刺激率的趋近值;a代表m/2处的浓度;b代表a处的斜率;p代表C/2处的浓度;q代表p处的斜率。

1.4.2 抗生素联合毒性的测定

根据单一抗生素的剂量-效应曲线(concentration-response curve, CRC)计算其半数效应浓度(EC₅₀, mol·L⁻¹),按照EC_{50A}:EC_{50B}=1:1的毒性比配制抗生素A与抗生素B的混合溶液。按照单一毒性的测定方法测定混合抗生素的联合毒性。采用独立作用模型(independent action model, IA)对2种抗生素的联合作用进行评价,IA模型计算公式^[16-17]见式(3):

$$E(c_{\text{mix}}) = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - E(c_i)) \quad (3)$$

式中:c_{mix}表示混合物的总浓度;E(c_i)表示第i个组分独立存在且其浓度为c_i时产生的效应;E(c_{mix})表示混合物的效应。基于单一毒性数据,IA曲线采用与实际CRC相同的拟合模型进行拟合,其统计学不确定性以95%置信区间表示,通过比较两者的位置关系判别2种抗生素的联合作用模式——实际CRC位于IA曲线及其95%置信区间的下方、中间和上方分别代表联合作用为拮抗、加和和协同。

1.5 外加碳源与抗生素对*E. coli*的交互效应

使用Hedge's *d*^[12]分别计算外加碳源和抗生素对*E. coli*生长的个体效应,个体效应表示*E. coli*对于单个应激源(外加碳源或抗生素)的反应,通过式

(4)计算个体效应的Hedge's *d*值:

$$d = \frac{\bar{x}_t - \bar{x}_c}{s} J(m) \quad (4)$$

式中: $\bar{x}_t$ 和 $\bar{x}_c$ 分别是实验组和对照组中变量的平均值,s和J(m)分别是样本的标准偏差和校正项,通过式(5)和式(6)进行计算:

$$s = \sqrt{\frac{(n_t-1)(s_t)^2 + (n_c-1)(s_c)^2}{n_t + n_c - 2}} \quad (5)$$

$$J(m) = 1 - \frac{3}{4m-1} \quad (6)$$

式中:n_t和s_t是实验组的样本量和标准偏差;n_c和s_c是对照组的样本量和标准偏差;m是自由度(m=n_t+n_c-2)。

随后,通过式(7)计算外加碳源和抗生素2个应激源对*E. coli*生长交互效应的Hedge's *d*值:

$$d_1 = \frac{(\bar{X}_{AB} - \bar{X}_A) - (\bar{X}_B - \bar{X}_C)}{2s} J(m) \quad (7)$$

式中: $\bar{X}_C$ 、 $\bar{X}_A$ 、 $\bar{X}_B$ 、 $\bar{X}_{AB}$ 分别为对照组和实验组A、B及其组合(A+B)中变量的平均值,标准偏差(s)和自由度(m)分别通过式(8)和式(9)进行计算:

$$s = \sqrt{\frac{(n_c-1)(s_c)^2 + (n_A-1)(s_A)^2 + (n_B-1)(s_B)^2 + (n_{AB}-1)(s_{AB})^2}{n_c + n_A + n_B + n_{AB} - 4}} \quad (8)$$

$$m = n_c + n_A + n_B + n_{AB} - 4 \quad (9)$$

根据式(7)计算的Hedge's *d*值判别外加碳源和抗生素2个应激源对*E. coli*生长的交互效应类型:当Hedge's *d*>0时,为拮抗作用,当Hedge's *d*=0时,为相加作用;当Hedge's *d*<0时,为协同作用。

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 *E. coli*在混合碳源条件下的二次生长

*E. coli*在含有0.00(不添加Glc的对照组)、0.25、0.50、1.00、1.50、2.00 g·L⁻¹ Glc的MH培养基中0~24 h的生长情况如图1(b)所示。如图1(a)所示,*E. coli*在添加Glc的MH培养基上生长期间呈现明显的二次生长模式,且*E. coli*2次对数生长期之间的延滞期随培养体系中Glc浓度的升高而延长,这是*E. coli*的CCR机制调控的结果。

CCR为细菌在首选碳源存在的情况下,利用次级碳源的功能表达和相应酶的活性降低,进而阻碍细菌代谢次级碳源的一种调控现象。研究表明,由于Glc会诱导*E. coli*的CCR调控机制,*E. coli*在Glc和其他碳源(如乳糖、丙酮酸、富马酸等)的混合物中表现出二次生长的模式^[18]。如图2所示,在

E. coli 中, $EIIA^{Glc}$ 是 CCR 的中心处理单元, 磷酸化的 $EIIA^{Glc}$ 可以结合并激活腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC), 从而导致环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)的合成, 一定浓度的 cAMP 会触发 cAMP-CRP 复合物的形成, 从而结合并激活分解代谢基因的启动子; 而去磷酸化的 $EIIA^{Glc}$ 不能激活 AC, 这种情况下, $EIIA^{Glc}$ 与次级碳源的代谢酶

和转运蛋白结合, 表现出对次级碳源代谢的抑制^[19]。在本研究中, 培养体系中加入 Glc 后, Glc 的存在使 $EIIA^{Glc}$ 呈现去磷酸化的状态, 此时 *E. coli* 优先代谢 Glc(6 ~ 12 h), 抑制其他碳源的代谢; Glc 耗尽后, *E. coli* 发生代谢适应性转变, 进入延滞期; 延滞期结束后, *E. coli* 利用次级碳源进行生长, 迎来一个新的对数生长期, *E. coli* 呈现二次生长的模式。

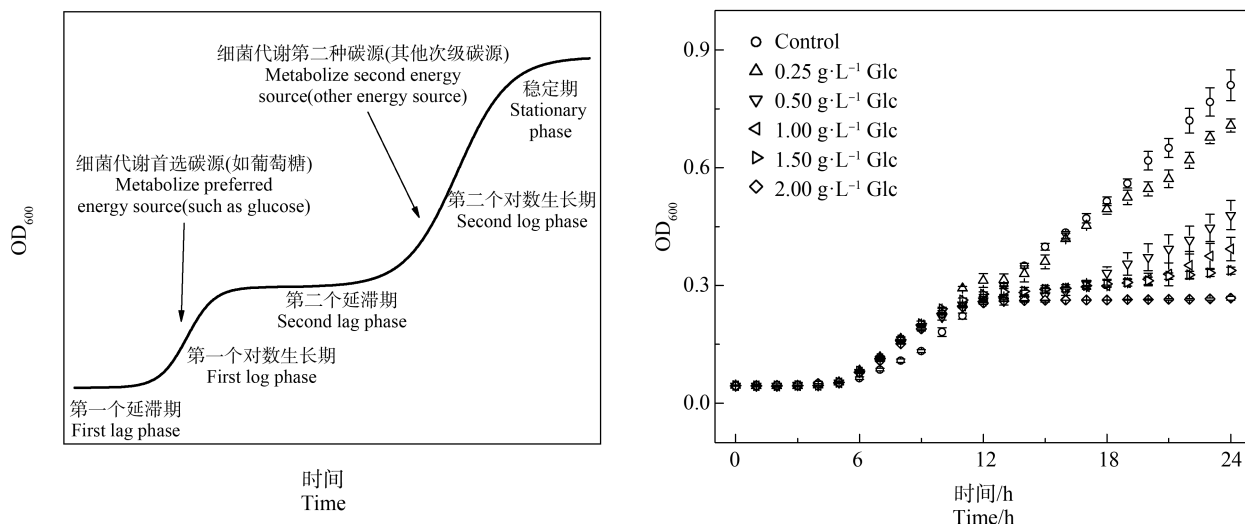


图1 (a) 细菌的二次生长示意图和 (b) 添加不同浓度 Glc 的 MH 培养基中 *E. coli* 0 ~ 24 h 的 OD_{600} 的变化

注: Glc 表示葡萄糖。

Fig. 1 (a) Schematic diagram of the diauxic growth of bacteria, and (b) Trends in OD_{600} of *E. coli* during 0 ~ 24 h in MH medium with different concentrations Glc

Note: Glc stands for glucose.

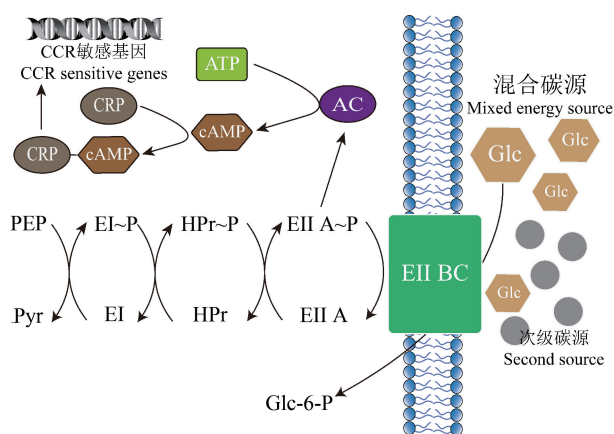


图2 *E. coli* 的碳分解代谢物抑制

Fig. 2 Carbon catabolite repression in *E. coli*

然而, *E. coli* 利用 Glc 快速生长期间会发生乙酸盐的“代谢溢出”。研究表明, Glc 耗竭后 *E. coli* 发生适应性代谢调整, 关键分解代谢过程的诱导被

延迟^[20], 诱导前的延滞时间取决于乙酸盐的浓度——乙酸盐的浓度越高, 延滞时间越长。当培养体系中 Glc 的浓度为 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 乙酸盐的“代谢溢出”严重, *E. coli* 2 次对数生长之间的延滞期随之延长, 导致该 Glc 浓度下生长的 *E. coli* 在培养第 24 小时仍处于延滞期。

2.2 外加碳源调控单一抗生素诱导的细菌 Hormesis 效应

结合 2.1 的实验结果, 分别在含有相应浓度 Glc、可溶性淀粉的单一碳源培养体系以及添加相应浓度 Glc 的 MH 培养基构成的混合培养体系中, 测定 24 h 时 TCH 和 2F 单独作用对 *E. coli* 的毒性效应。由于单一 Glc、可溶性淀粉培养条件中缺乏氮源, 对照组(不添加抗生素)和各实验组(添加抗生素)中的 *E. coli* 均无法生长^[21-22], 故无法在这些培养条件下评估 TCH 和 2F 对 *E. coli* 的毒性效应。添加不同浓度 Glc(0.00、0.25、0.50、1.00、1.50、2.00 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的

MH 培养基中 24 h 时 TCH 和 2F 对 *E. coli* 的单一毒性剂量-效应曲线如图 3 所示,在 MH 培养基中生长的 *E. coli* 对 2 种抗生素的胁迫均表现出 Hormesis 效应。随着添加 Glc 浓度的增加,抗生素在低浓度下对 *E. coli* 的促进作用逐渐增强、促进区间逐步扩大,TCH 和 2F 在第 24 小时对 *E. coli* 的最大促进率分别从 44.58% 和 9.08% 逐渐增加到 158.65% 和 40.20%,促进区间右端点分别从 $1.96\text{E}-05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $3.56\text{E}-03 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 逐步增加到 $4.29\text{E}-05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1.71\text{E}-02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$;在高浓度下对 *E. coli* 的抑制作用逐渐减弱,TCH 和 2F 在第 24 小时的 EC_{50} 值分别由 $3.17\text{E}-05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1.62\text{E}-02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 逐渐增大到 $9.24\text{E}-05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $4.10\text{E}-02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

可见,添加 Glc 能够增强低浓度抗生素对 *E. coli* 生长的促进作用、减弱高浓度抗生素对 *E. coli* 的抑制作用。这可能与 *E. coli* 中 CCR 的调控有关。培养体系中 Glc 的存在使 *E. coli* 中的 EIIA^{Glc} 呈现去磷酸化状态,去磷酸化的 EIIA^{Glc} 不能激活 AC,抑制了 *E. coli* 次级碳源分解代谢基因的表达;以往的研究表明抗生素进入细菌后可能与 AC 结合,从而暴露其活性位点,导致 AC 活性的增强,这将增加 *E. coli* 胞内 cAMP 的量以及 cAMP-CRP 复合物的积累^[23],进而激活 CCR 敏感基因的转录,使得 Glc 耗尽后 *E. coli* 迅速转向对 MH 培养基中酸水解酪蛋白、牛肉浸粉等次级碳源的利用进行生长,导致抗生素在低浓度下对 *E. coli* 的促进作用的增强;另一方面,*E. coli* 代谢 Glc 产生的代谢副产物乙酸盐可能会增强细菌外排泵的功能,减少抗生素的胞内积

累^[24],进而减少抗生素对 *E. coli* 的损伤,造成抗生素在高浓度下对 *E. coli* 抑制作用的减弱。

2.3 外加碳源调控混合抗生素诱导的细菌 Hormesis 效应

抗生素往往被混合使用以增加药效,因此 TCH 和 2F 在环境中存在共存可能。本文测定了添加不同浓度 Glc(0.00、0.25、0.50、1.00、1.50、2.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的 MH 培养基中 24 h 时 TCH 与 2F 对 *E. coli* 的联合毒性,并采用 IA 模型评价了 2 种抗生素在相应培养体系中的联合作用模式,结果如图 4 所示。

添加不同浓度 Glc(0.00、0.25、0.50、1.00、1.50、2.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的 MH 培养基中 24 h 时 TCH 与 2F 对 *E. coli* 的联合毒性剂量-效应曲线如图 4(a)所示。TCH 与 2F 混合也可以诱导 *E. coli* 的 Hormesis 效应,与 2.2 的结果类似,添加 Glc 浓度的增加导致混合抗生素在低浓度下对 *E. coli* 的促进作用逐渐增强,在高浓度下对 *E. coli* 的抑制作用逐渐减弱,具体表现为最大促进率由 5.63% 逐渐增加到 21.30%,促进区间右端点从 $1.22\text{E}-03 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 逐渐扩大到 $3.68\text{E}-03 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, EC_{50} 由 $3.71\text{E}-03 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 逐渐增加到 $1.01\text{E}-02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$;这说明 2 种抗生素混合暴露时仍然能够影响 *E. coli* 的 CCR 机制。在各 Glc 浓度下 TCH 与 2F 联合作用的 IA 曲线如图 4(b)所示,实际 CRCs 均位于 IA 曲线的上方,TCH 与 2F 的联合作用呈现明显的协同效果;随着 Glc 浓度的增加,实际 CRCs 与 IA 曲线的距离逐渐增大,表明这 2 种抗生素的协同作用效果逐渐增强。

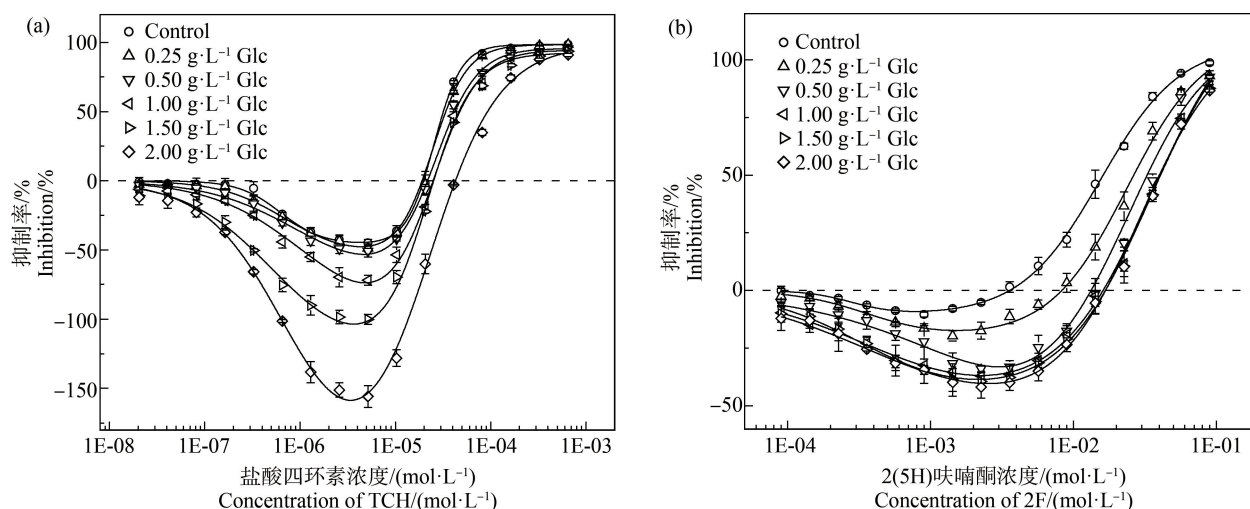


图3 添加不同浓度 Glc 的 MH 培养基中 24 h 时 TCH(a) 和 2F(b) 对 *E. coli* 的单一毒性剂量-效应曲线

Fig. 3 Single toxic CRCs of TCH (a) and 2F (b) to *E. coli* in MH medium with different concentrations of Glc at 24 h

2.4 外加碳源与抗生素对 *E. coli* 生长的交互效应

本文使用影响因素 Hedge's *d* 计算方法计算了

混合培养体系中外加 Glc 和抗生素胁迫对 *E. coli* 的交互效应,结果如图5所示。

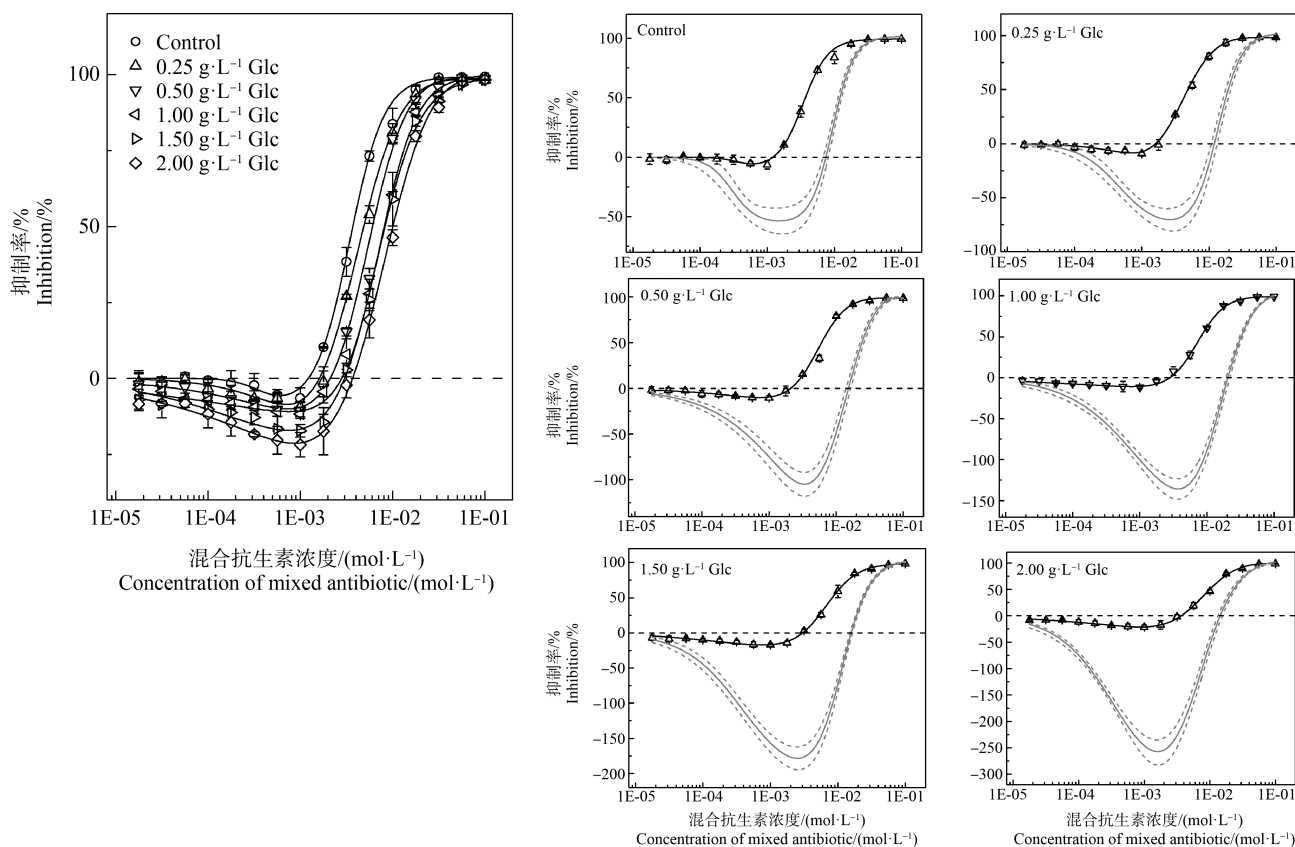


图4 添加不同浓度 Glc 的 MH 培养基中 24 h 时 TCH 与 2F 对 *E. coli* 的联合毒性剂量-效应曲线 (a) 及 IA 曲线 (b)

注:图(b)中,黑色实线代表实际的 CRCs;灰色实线代表根据单一毒性数据计算拟合出的 IA 预测线;灰色虚线代表 IA 预测线的 95% 置信区间。

Fig. 4 Combined toxic CRCs (a) and IA curves (b) of TCH and 2F to *E. coli* in MH medium with different concentrations of Glc at 24 h

Note: In Fig.4(b), the solid black lines represent the actual CRCs; the solid gray line represents the calculated fitted IA prediction line based on a single toxicity data; the gray dashed line represents the 95% confidence interval of the IA prediction line.

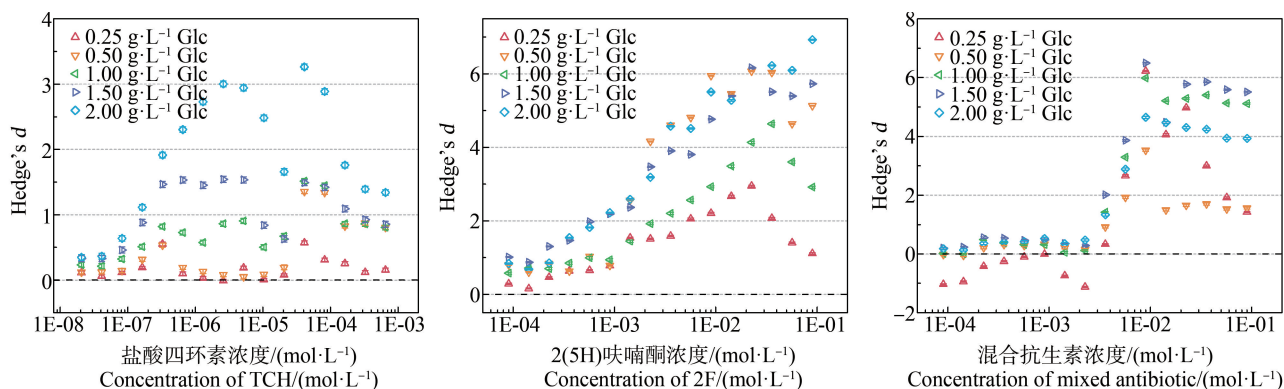


图5 培养体系中的 Glc 与抗生素对 *E. coli* 的交互效应

注:(a) TCH;(b) 2F;(c) TCH+2F。

Fig. 5 Interaction of Glc in culture systems and antibiotics on *E. coli*

Note: (a) TCH; (b) 2F; (c) TCH+2F.

Glc 与 TCH、2F、TCH+2F 对 *E. coli* 的交互效应 Hedge's d 值如图 5(a)~5(c)所示。当 TCH 和 2F 单一暴露时,Glc 与 2 种抗生素的交互效应 Hedge's d 值均 ≥ 0 ,说明大部分情况下外加 Glc 和抗生素胁迫对 *E. coli* 的生长产生明显的拮抗作用。当 TCH 与 2F 联合暴露时, $1.78\text{E}-05 \sim 1.00\text{E}-03 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内的混合抗生素与 $0.25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glc 的 Hedge's d 值 <0 ,其交互效应为协同作用;其余条件下混合抗生素与 Glc 的交互效应均表现为明显的拮抗作用(Hedge's $d>0$)。随着培养体系中 Glc 浓度的增加,Hedge's d 值逐渐增大,拮抗作用也越来越明显。以上结果表明,无论抗生素单一作用还是混合作用,外加 Glc 与抗生素对 *E. coli* 的交互效应总体上为拮抗作用,且外加 Glc 浓度升高拮抗作用也随之增强,这说明外加 Glc 不利于抗生素细菌毒性的表达,但是有利于增强低浓度抗生素的 Hormesis 效应。

本文研究了添加 0.00、0.25、0.50、1.00、1.50、2.00 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Glc 的 MH 培养基中 2 种抗生素(TCH 和 2F)单一及联合暴露对 *E. coli* 的 Hormesis 效应的调控作用,结果表明:

(1)无论是 TCH 或 2F 单一暴露还是 TCH 与 2F 联合暴露均能够诱导 *E. coli* 产生 Hormesis 效应,外加 Glc 能够对抗生素诱导 *E. coli* 产生的 Hormesis 效应具有调控作用——随着外加 Glc 浓度的升高,抗生素在低浓度下对 *E. coli* 的促进作用逐渐增强、促进区间逐步扩大,在高浓度下对 *E. coli* 的抑制作用逐渐减弱。外加 Glc 对抗生素诱导 *E. coli* 的 Hormesis 效应的调控作用可能与 *E. coli* 的 CCR 途径有关。

(2)IA 模型计算的结果表明,TCH 与 2F 的联合作用模式为协同,随着外加 Glc 浓度的升高,2 种抗生素之间的协同作用逐渐增强。交互效应的计算结果表明,外加 Glc 与抗生素对 *E. coli* 的交互效应总体上呈拮抗作用,且外加 Glc 浓度的升高,拮抗作用也随之增强,表明外加 Glc 不利于抗生素细菌毒性的表达。

(3)本研究表明外加碳源能够调控抗生素诱导 *E. coli* 产生的 Hormesis 效应,进而抑制抗生素细菌毒性的表达。本研究可为 Hormesis 效应在抗生素的生态影响评估中的应用提供数据基础。

通信作者简介:孙昊宇(1991—),男,博士,副研究员,主要研究方向为 Hormesis(毒物兴奋)效应与机制及其应用。

参考文献(References):

- [1] Grenni P, Ancona V, Barra Caracciolo A. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review [J]. Microchemical Journal, 2018, 136: 25-39
- [2] Calabrese E J, Baldwin L A. Toxicology rethinks its central belief [J]. Nature, 2003, 421(6924): 691-692
- [3] 于岩,游瑞容,姚志峰,等.氯霉素对费氏弧菌 0~24h 的 Hormesis 效应及其机制初探[J]. 同济大学学报(自然科学版), 2016, 44(5): 767-772
Yu Y, You RR, Yao Z F, et al. Chloramphenicol hormesis effects about time-dependent and mechanism on *Vibrio fischeri* [J]. Journal of Tongji University (Natural Science), 2016, 44(5): 767-772 (in Chinese)
- [4] Shen H Y, Liu Y Y, Liu Y N, et al. Hormetic dose-responses for silver antibacterial compounds, quorum sensing inhibitors, and their binary mixtures on bacterial resistance of *Escherichia coli* [J]. Science of the Total Environment, 2021, 786: 147464
- [5] 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)
- [6] Tang L A, Zhou Y, Zhang Y L, et al. The role of energy source or substrate in microbial hormesis [J]. Current Opinion in Toxicology, 2022, 29: 10-18
- [7] Towbin B D, Korem Y, Bren A, et al. Optimality and sub-optimality in a bacterial growth law [J]. Nature Communications, 2017, 8: 14123
- [8] Pacciani-Mori L, Giometto A, Suweis S, et al. Dynamic metabolic adaptation can promote species coexistence in competitive microbial communities [J]. PLoS Computational Biology, 2020, 16(5): e1007896
- [9] Saitanis C J, Agathokleous E. Stress response and population dynamics: Is Allee effect hormesis? [J]. The Science of the Total Environment, 2019, 682: 623-628
- [10] Heo J M, Kim H J, Lee S J. Efficient anaerobic consumption of D-xylose by *E. coli* BL21(DE3) via xylR adaptive mutation [J]. BMC Microbiology, 2021, 21(1): 332
- [11] Sauvage S, Gaviard C, Tahrioui A, et al. Impact of carbon source supplementations on *Pseudomonas aeruginosa* physiology [J]. Journal of Proteome Research, 2022, 21(6): 1392-1407
- [12] Gurevitch J, Morrow LL, Wallace A, et al. A meta-analysis of competition in field experiments [J]. The American

- Naturalist, 1992, 140(4): 539-572
- [13] Crain C M, Kroeker K, Halpern B S. Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems [J]. Ecology Letters, 2008, 11(12): 1304-1315
- [14] Zhou L Y, Zhou X H, Shao J J, et al. Interactive effects of global change factors on soil respiration and its components: A meta-analysis [J]. Global Change Biology, 2016, 22(9): 3157-3169
- [15] Deng Z Q, Lin Z F, Zou X M, 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
- [16] Bureš M S, Cvetnić M, Miloloža M, et al. Modeling the toxicity of pollutants mixtures for risk assessment: A review [J]. Environmental Chemistry Letters, 2021, 19(2): 1629-1655
- [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 SS, 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] Mahadevan R, Edwards J S, Doyle F J. Dynamic flux balance analysis of diauxic growth in *Escherichia coli* [J]. Biophysical Journal, 2002, 83(3): 1331-1340
- [19] Görke B, Stülke J. Carbon catabolite repression in bacteria: Many ways to make the most out of nutrients [J]. Nature Reviews Microbiology, 2008, 6(8): 613-624
- [20] Enjalbert B, Coccagn-Bousquet M, Portais J C, et al. Acetate exposure determines the diauxic behavior of *Escherichia coli* during the glucose-acetate transition [J]. Journal of Bacteriology, 2015, 197(19): 3173-3181
- [21] Bren A, Park J O, Towbin B D, et al. Glucose becomes one of the worst carbon sources for *E. coli* on poor nitrogen sources due to suboptimal levels of cAMP [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 24834
- [22] Chubukov V, Sauer U. Environmental dependence of stationary-phase metabolism in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(9): 2901-2909
- [23] Sun H Y, Zhang X Y, Wang D L, et al. Insights into the role of energy source in hormesis through diauxic growth of bacteria in mixed cultivation systems [J]. Chemosphere, 2020, 261: 127669
- [24] Liu Y, Fang D, Yang K N, et al. Sodiumdehydroacetate confers broad antibiotic tolerance by remodeling bacterial metabolism [J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 432: 128645 ◆