

环境科学

(HUANJING KEXUE)

ENVIRONMENTAL SCIENCE

第37卷 第8期

Vol.37 No.8

2016

中国科学院生态环境研究中心 主办
科学出版社 出版



目次

中国地区二次有机气溶胶的时空分布特征和来源分析	陈卓,刘峻峰,陶玮,陶澍 (2815)
中国民用煤燃烧排放细颗粒物中重金属的清单	刘海彪,孔少飞,王伟,严沁 (2823)
基于长时间序列的北京 PM _{2.5} 浓度日变化及气象条件影响分析	苗蕾,廖晓农,王迎春 (2836)
2004~2015年北京市清洁点臭氧浓度变化特征	
程念亮,李云婷,张大伟,陈添,魏强,孙彤卉,王步英,富佳明,何乐为,程兵芬,皮帅,马立光,崔继宪,孟凡 (2847)	
抗战胜利70周年大阅兵期间石家庄大气细颗粒物在线来源解析	
周静博,李治国,路娜,徐曼,杨鹏,高康宁,王建国,靳伟 (2855)	
成都平原大气颗粒物中无机水溶性离子污染特征	蒋燕,贺光艳,罗彬,陈建文,王斌,杜云松,杜明 (2863)
嘉兴市春季一次持续雾霾过程中气象条件与污染物变化特征分析	
沈利娟,王红磊,李莉,吕升,袁婧,张孝寒,章国骏,王翥 (2871)	
泉州市大气降尘中金属元素污染特征及来源解析	张棕巍,胡恭任,于瑞莲,刘贤荣,胡起超,王晓明 (2881)
城市室内灰尘重金属水平、影响因素及健康风险:以贵阳市为例	李晓燕,汪浪,张舒婷 (2889)
桂林市酸雨变化特征及来源分析	郭雅思,于爽,黎泳珊,孙平安,何若雪 (2897)
农田土壤施用系列新型氮肥后气态氮(NH ₃ 和N ₂ O)减排效果比较:以夏玉米季为例	范会,姜姗姗,魏茨,蒋静艳 (2906)
青海南部高原积雪期与生长季高寒草甸土壤CO ₂ 、CH ₄ 和N ₂ O通量的观测	吴建国,周巧富 (2914)
三峡库区香溪河秋末至中冬CO ₂ 和CH ₄ 分压特征分析	张军伟,雷丹,肖尚斌,张成,穆晓辉,刘佳,李迎晨 (2924)
气候变化对于桥水库总磷与溶解氧的潜在影响分析	张晨,刘汉安,高学平,张文娜 (2932)
三峡库区小流域土地利用结构变化及其氮素输出控制效应:以兰陵溪小流域为例	
吴东,黄志霖,肖文发,曾立雄,韩黎阳 (2940)	
入湖河流水质对土地利用时空格局的响应研究:以洱海北部流域为例	项颂,庞燕,储昭升,胡小贞,孙莉,薛力强 (2947)
库湾营养盐循环对三峡库区营养盐运输的影响:以草堂河为例	王晓彤,罗光富,操满,王雨春,汪福顺,邓兵 (2957)
农田溪流人工深潭地貌格局暂态存储特征分析	李如忠,黄青飞,钱靖,殷晓曦,韦林 (2964)
农田排水沟渠水体-底泥中溶质氮分布特征试验研究	李强坤,胡亚伟,宋常吉,彭聪 (2973)
三峡库区典型消落带土壤微生物生物量碳、氮的变化特征及其影响因素探讨	
柴雪思,雷利国,江长胜,黄哲,范志伟,郝庆菊 (2979)	
重金属在河口区潮汐界面与盐度界面响应规律研究	刘静,郑丙辉,刘录三,马迎群,林岗璇,汪星,夏阳 (2989)
深圳地区全氟辛烷磺酸的环境多介质迁移和归趋行为研究	崔晓宇,张鸿,罗骥,张若冰 (3001)
柘林湾表层沉积物中有机氯农药的分布特征及生态风险评价	卫亚宁,潘佳钊,宋玉梅,郭鹏然,王毅 (3007)
北运河水体中荧光溶解性有机物空间分布特征及来源分析	陈永娟,胡玮璇,庞树江,王晓燕 (3017)
昌邑滨海湿地沉积物的放射性核素水平与环境指示意义	王启栋,宋金明,李学刚,袁华茂,李宁,曹磊 (3026)
甯醇对南山老龙洞地下水粪便污染的指示	廖昱,孙玉川,王尊波,梁作兵,张远瞩 (3034)
漳沱河冲洪积扇地下水中酚类化合物的污染现状与分布特征	昌盛,赵兴茹,刘琰,耿梦娇,肖晋翠 (3041)
雨季不同土地利用下表层岩溶泉中脂肪酸来源分析	张媚,孙玉川,谢正兰,余琴,赵瑞一,梁作兵 (3049)
Zn系LDHs覆膜改性人工湿地沸石基质除磷机制	张翔凌,黄华玲,郭露,陈巧珍,阮聪颖,冷玉洁 (3058)
Ce ³⁺ 与Cu ²⁺ 协同强化芬顿体系氧化苯酚的效能与机制研究	张剑桥,迟惠中,宋阳,罗从伟,江进,马军 (3067)
Pt/生物炭电极反应器处理水中腐殖酸的研究	丁文川,向星光,曾晓岚,厉晓宇,梁国强, M. M. Mian (3073)
石墨烯-TiO ₂ 光催化剂复合板制备及其对五氯酚的催化降解	徐琪,周泽宇,王洪涛 (3079)
单偶氮染料AY17的光催化降解动力学及机制	阳海,魏宏庆,胡乐天,胡倩,阳立平,刘华杰,易翔,易兵 (3086)
硫自养反硝化处理高含氟光伏废水可行性	马航,朱强,朱亮,李祥,黄勇,魏凡凯,杨朋兵 (3094)
膜曝气-生物膜反应器生物强化处理阿特拉津废水运行性能	刘春,于长富,张静,陈晓轩,张磊,杨景亮 (3101)
ABR工艺ANAMMOX耦合短程硝化协同脱氮处理城市污水	吴鹏,张诗颖,宋吟玲,徐乐中,沈耀良,张婷 (3108)
活性污泥厌氧Fe(III)还原氨氧化现象初探	李祥,林兴,杨朋兵,黄勇,刘恒蔚 (3114)
低浓度氨氮废水单级自养脱氮EGSB反应器的快速启动	顾书军,方芳,李凯,刘勇,郭劲松,陈猷鹏,蒋甫阳 (3120)
超低溶解氧条件下的EBPR系统除磷性能	马娟,宋璐,俞小军,李璐,孙雷军,孙洪伟,李光银 (3128)
活性污泥表面性质对絮凝沉降性能与出水悬浮物的影响	何志江,赵媛,张源凯,王洪臣,齐鲁,尹训飞,张晓军 (3135)
山东省典型金矿区土壤重金属空间特征分析与环境风险评估	
王菲,吴泉源,吕建树,董玉龙,曹文涛,康日斐,曹见飞 (3144)	
电子垃圾拆解区土壤重金属空间异质性及分布特征	赵科理,傅伟军,叶正钱,戴巍 (3151)
我国18种不同理化性质的土壤对硒酸盐的吸附解吸作用研究	冯璞阳,李哲,者渝芸,黄杰,梁东丽 (3160)
流动搅动法研究针铁矿对亚砷酸盐的吸附特征	李鑫,杨军,饶伟,王代长,杜光辉,化党领,刘世亮,刘红恩 (3169)
聚羟基铝柱撑硅藻土的制备及其对水溶液中Cu ²⁺ 、Zn ²⁺ 的吸附特性	朱健,雷明婧,王平,张伟丽,陈仰 (3177)
新型污泥基吸附材料制备及其氨氮去除性能评价	王文东,刘荟,张银婷,杨生炯 (3186)
纳米复合水凝胶的制备及其对重金属离子的吸附	朱倩,李正魁,张一品,韩华杨,王浩 (3192)
鼠李糖脂与β-环糊精复合提取预测污染土壤中PAHs的生物有效性	
张亚楠,杨兴伦,卞永荣,谷成刚,王芳,王代长,蒋新 (3201)	
不同磷水平下丛枝菌根真菌对纳米氧化锌生物效应的影响	景新新,苏志忠,邢红恩,王发园,石兆勇,刘雪琴 (3208)
中美水生生物基准受试物种敏感性差异研究	王晓南,闫振广,余若祯,王婉华,陈丽红,刘征涛 (3216)
贫营养和痕量抗生素对质粒抗生素抗性适应度代价的影响	林文芳,陈胜,万堃,王春明,林惠荣,于鑫 (3224)
不同氨水平下间作对玉米土壤硝化势和氨氧化微生物数量的影响	吕玉,周龙,龙光强,汤利 (3229)
《环境科学》征订启事(3025) 《环境科学》征稿简则(3057) 信息(3072, 3085, 3143)	

贫营养和痕量抗生素对质粒抗生素抗性适应度代价的影响

林文芳, 陈胜, 万堃, 王春明, 林惠荣, 于鑫*

(中国科学院城市环境研究所, 城市环境与健康重点实验室, 厦门 361021)

摘要: 本文针对饮用水系统中营养和抗生素水平对质粒抗生素抗性的适应度代价进行了研究. 选取了 pACYC184、RP4 和 PBR322 这 3 种不同的抗性质粒, 发现在不同的营养水平下, 抗性质粒的适应度代价具有普遍性. 而且, 营养水平越低, 其适应度代价表现得越明显. 另外, 痕量浓度的抗生素也会影响抗性质粒的适应度代价. 本研究中, 小于 50% MIC 的抗生素浓度对野生菌的损伤或抑制作用不足以抗衡抗性质粒的适应度代价, 质粒难以维持. 因而, 推断在饮用水系统(贫营养和 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 水平的抗生素)中, 质粒抗生素抗性的适应度代价较大, 质粒不易维持, 在饮用水系统中传播和扩散的风险较小.

关键词: 质粒; 抗生素抗性; 营养条件; 痕量抗生素; 适应度代价; 抗性稳定

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2016)08-3224-05 DOI: 10.13227/j.hjxx.2016.08.051

Effects of Low-level Nutrition and Trace Antibiotics on the Fitness Cost of Plasmids Bearing Antibiotic Resistance

LIN Wen-fang, CHEN Sheng, WAN Kun, WANG Chun-ming, LIN Hui-rong, YU Xin*

(Key Laboratory of Urban Environment and Health, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China)

Abstract: The effects of nutrition and antibiotic level on fitness costs of plasmid containing antibiotic resistance in drinking water system were investigated in this study. Three plasmids harboring different antibiotic resistances, i. e. pACYC184, RP4, and PBR322, were selected. It was found that the antibiotic resistance imposed cost on the fitness of all plasmids at different nutrition levels, which was universal. Moreover, the fitness costs were larger at lower nutrition levels. Besides, the fitness costs of plasmid bearing antibiotic resistance were also affected by trace antibiotics. In this study, when exposed to antibiotics (lower than 50% MIC), the fitness costs of plasmid imposed to the bacteria were more apparent than the injury or inhibition effect by antibiotics. The plasmids were unstable. Therefore, it was inferred that the plasmid containing antibiotic resistance imposed large fitness costs on bacteria in drinking water system (with low-level nutrition and $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ level antibiotic), and it was not stable. Thus, the risk of plasmid bearing antibiotic resistance transmission and spread in drinking water system was low.

Key words: plasmids; antibiotic resistance; nutrition level; trace antibiotic; fitness cost; resistance stability

自 1940 年青霉素被发现以来, 抗生素极大地促进了人类和动物疾病的预防和治疗, 但是随着抗生素的大量生产和使用造成了环境中抗性细菌和抗性基因的严重污染^[1~4]. 抗性基因作为一种新型的环境污染物, 在饮用水系统中被广泛检出和发现, 对人类公共健康构成潜在的威胁^[5~8]. 微生物质粒是独立于染色体外能够自主复制的遗传因子, 可赋予细菌一些特殊的表型和性状, 如抗生素抗性^[9,10]. 因此, 质粒是微生物抗生素抗性基因重要的携带者之一. 有研究表明, 抗性质粒会使细菌产生一定的适应度代价^[11,12]. 质粒介导的适应度代价是指携带抗生素抗性质粒的细菌在面对有抗生素选择压力时, 细菌因有抗性质粒, 较野生型菌株生长更具优势; 而当抗生素选择压力解除时, 抗性菌株中的某些耐药机制(如酶的产生、外排泵系统的高表达等)会成

为菌株生长的额外负担, 使其适应能力小于野生菌株, 这一现象称为适应度代价(fitness cost)^[13].

饮用水系统的典型特征是贫营养条件($\text{TOC} < 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)和痕量抗生素水平($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)^[14,15]. 该条件对细菌的生长和各种生理生化特征具有很大影响. 但迄今, 对于饮用水系统中质粒介导的抗生素抗性的适应度代价仍无人研究. 本研究将选取 pACYC184 质粒, 分析不同营养水平和痕量抗生素水平(Tet 和 Chl)对其适应度代价的影响. 并且, 用同样方法验证另外 2 种不同的抗性质粒(RP4 和 PBR322)是否具有同样的现象, 以探讨饮用水系统

收稿日期: 2016-02-23; 修订日期: 2016-03-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(51278482, 51478450)

作者简介: 林文芳(1987~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为饮用水水质安全及其微生物学, E-mail: wflin@iue.ac.cn

* 通讯联系人, E-mail: xyu@iue.ac.cn

中抗生素抗性维持可能性这一科学问题.

1 材料与方法

1.1 试剂和培养基

所试抗生素,包括四环素(tetracycline, Tet)、氯霉素(chloramphenicol, Chl)、氨苄青霉素(ampicillin, Amp)和卡那霉素(kanamycin, Kan)均购自北京索莱宝科技有限公司. pACYC184 质粒购于杭州宝赛生物科技有限公司, PBR322 质粒购于宝生物工程(大连)有限公司. RP4 质粒获赠于军事医学科学院李君文教授和邱志刚博士. CaCl₂、LB 肉汤和琼脂培养基购自青岛海博生物技术有限公司. 质粒小提试剂盒购于天根生化科技有限公司. 首先分别配制 1 mol·L⁻¹ 的 MgSO₄ 母液、1 mol·L⁻¹ 的 CaCl₂ 母液和 5 × M9 母液(每 200 mL 添加

Na₂HPO₄ 12.8 g、KH₂PO₄ 3 g、NaCl 0.5 g、NH₄Cl 1.0 g),单独装瓶,121℃ 灭菌 15 min. 然后配制 20% 的葡萄糖溶液,0.22 μm 滤膜过滤除菌. 含葡萄糖的 M9 基础培养基(即 M9 + Glc)的配方如下:5 × M9 母液 200 mL, 20% 的葡萄糖溶液 20 mL, 1 mol·L⁻¹ 的 MgSO₄ 2 mL, 0.1 mol·L⁻¹ 的 CaCl₂ 0.1 mL,最后加无菌双蒸馏水至 1 000 mL. 不含碳源的 M9 培养基(即 M9-Glc)除了不添加葡萄糖外,其它配方同上. 实验用的所有玻璃器材及枪头均需高压灭菌.

1.2 质粒和抗性菌株的构建

实验菌株为大肠杆菌 *Escherichia coli* K12; 3 种实验质粒为 pACYC184 质粒(携带 Tet 和 Chl 抗性)、RP4 质粒(携带 Tet、Amp、和 Kan 抗性)、PBR322 质粒(携带 Tet 和 Amp 抗性). 各个质粒具体的特征见表 1.

表 1 质粒的特征

Table 1 Characteristics of Plasmids

质粒	拷贝数(细胞)	质量/kb	抗生素抗性	类型 ¹⁾
pACYC184	10 ~ 212	4	Tet、Chl	非接合型
RP4	4 ~ 7	60	Amp、Tet、Kan	接合型
PBR322	15 ~ 20	4	Tet、Amp	非接合型

1) 接合型质粒指能够发生接合水平基因转移的质粒,接合水平基因转移是指 DNA 通过细菌间直接的物理连接(如菌毛)从供体菌转移到受体菌的水平转移的方式,非接合型质粒指不能发生接合水平基因转移的质粒

携带质粒的抗性菌株的构建:采用氯化钙转化的方法分别将 pACYC184、RP4、PBR322 质粒转化导入到野生型大肠杆菌 *E. coli* K12,获得具有抗生素抗性的菌株. 具体的方法如下.

首先从 -80℃ 冰箱取出保存的野生型甘油菌 *E. coli* K12,接种至 LB 肉汤培养基,置于 37℃ 摇床 180 r·min⁻¹ 振荡培养 12 ~ 16 h 进行活化,此时细菌达到对数期的末期. 重复活化 2 次,使细菌生长活跃. 取上述的菌液,按 1:100 ~ 1:500 比例接种于 100 mL 的 LB 肉汤培养基 37℃ 振荡扩大培养约 2 ~ 3 h,使细菌浓度约为 10⁸ CFU·mL⁻¹. 接着,取 50 mL 离心管,加入 20 mL 菌悬液,在冰上冷却 20 ~ 30 min. 4℃,4 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,尽量倒掉培养基(之后所有操作均在冰上进行). 加入 20 mL 提前预冷的 0.1 mol·L⁻¹ 的 CaCl₂ 溶液,轻轻悬浮细菌,冰浴片刻,感受态细胞制备完成.

取 10 μL 质粒加入新鲜制备的感受态 *E. coli* K12 中,冰上放置 30 min. 将样品在 42℃ 水浴加热 2 min 后,迅速放入冰中 1 min. 加入 1 mL 不加抗生素的 LB 肉汤培养基,37℃ 振荡培养约 2 h,使细菌复苏生长. 将上述菌液上下颠倒轻轻混匀,取 100 μL

菌液涂布于含抗生素的 LB 琼脂平板,37℃ 培养 16 ~ 24 h. 挑取单个菌落,划线于新的含抗生素的平板上培养,4℃ 保存. 最后,将菌落扩大培养,用天根的质粒小提试剂盒抽提质粒进一步验证质粒是否导入成功.

1.3 竞争实验

分别将野生型和携带质粒的抗性菌 *E. coli* K12 接种于 LB 肉汤过夜活化. 取 1 mL 菌液用无菌生理盐水漂洗 2 次,调节细菌的浓度约为 10⁸ CFU·mL⁻¹. 按体积比 1:1 的比例混合野生菌和抗性菌,获得混合的菌液. 配制不同营养梯度的培养液: M9、M9/10、M9/100、M9/1 000、M9/10 000; 对应配方分别为:20 mL(M9 + Glc)、2 mL(M9 + Glc) + 18 mL(M9-Glc)、2 mL(M9/10) + 18 mL(M9-Glc)、2 mL(M9/100) + 18 mL(M9-Glc) 和 2 mL(M9/1 000) + 18 mL(M9-Glc); 对应的 TOC 分别约为:2 000、200、20、2 和 0.2 mg·L⁻¹.

按 1:10 000 的比例(2 μL:20 mL)将混合菌液接种于上述培养液中,37℃ 振荡培养. 通过预实验测定细菌的生长曲线,得出 *E. coli* K12 在 M9 培养液生长达到稳定期的时间为 24 h. 因此,每隔 24 h 将细菌按

1:10 的体积比转接至新鲜的培养液进行培养,连续转接 6~7 次.同时,每次转接前将混合菌液稀释至合适浓度,分别涂布于普通的 LB 平板和加入相应抗生素的 LB 平板,37℃ 培养 16~24 h 后计数,获得总菌和抗性菌的数量.研究 pACYC184 质粒时,LB 平板加入 Tet 10 mg·L⁻¹ 和 Chl 35 mg·L⁻¹;研究 RP4 质粒时,LB 平板加入 Amp 60 mg·L⁻¹、Tet 40 mg·L⁻¹ 和 Kan 50 mg·L⁻¹;研究 PBR322 质粒时,LB 平板加入 Tet 25 mg·L⁻¹ 和 Amp 10 mg·L⁻¹.

预先测定野生型 *E. coli* K12 对 Tet 和 Chl 的最小抑制浓度(MIC).为了考察抗生素 Tet 和 Chl 对 pACYC184 质粒适应度代价的影响,将营养梯度设为 M9/500, Tet 抗生素浓度梯度设为 0%、1%、10%、50% 和 90% MIC(野生型 *E. coli* K12),对应的 Tet 的浓度分别为 0、0.008、0.08、0.4 和 0.72 mg·L⁻¹. Chl 抗生素浓度设为 0%、1%、10%、20%、50% 和 90% MIC(野生型 *E. coli* K12),对应的 Chl 的浓度分别为 0、0.054、0.54、1.08、2.7 和 4.86 mg·L⁻¹. 具体的竞争实验操作同营养梯度实验.

为了进一步研究营养梯度对质粒适应度代价影响的广谱性,选取另外两种抗性质粒 PBR322 和 RP4. 具体的操作同质粒 pACYC184.

1.4 数据分析

将抗性菌的数量记为 N_r ,野生菌的数量记为 N_s ,那么 $\lg(N_r/N_s)$ 的比值即抗性菌和野生菌数量的比值,可以用来评价两菌的竞争关系即抗性质粒的相对适应度.本研究中用酶标仪测量初步确定初始细菌的浓度,平板培养需经过 16~24 h 才能获得准确的细菌数,所以初始抗性菌和野生菌数量的比值存在一定的偏差,计算 $\lg(N_r/N_s)$ 时,先将 i h 时的细菌数除以 0 h 时的细菌数进行标准化处理.具体计算公式如下:

$$\lg(N_r/N_s) = \lg[(N_{ri}/N_{r0})/(N_{si}/N_{s0})]$$

式中, N_{s0} 和 N_{r0} 分别为 0 h 时野生型和抗性菌的细菌浓度, N_{si} 和 N_{ri} 分别为 i h 时野生型和抗性菌的细菌浓度.另外,当 $\lg(N_r/N_s) = 0$ 时,表示抗性菌与野生菌生长的适应度相同,适应度代价一致; $\lg(N_r/N_s) < 0$ 时,表示抗性菌适应度小于野生菌,适应度代价大; $\lg(N_r/N_s) > 0$ 时,表示抗性菌适应度大于野生菌,适应度代价小.

2 结果与讨论

2.1 营养水平对 pACYC184 质粒适应度代价的影响

从图 1 看出,携带 pACYC184 质粒的抗性菌株

在与野生型菌株竞争培养过程中,随着转接次数的增加,抗性菌与野生型菌株的比值逐渐变小.到第 6 次转接时(培养 144 h),两菌的比值下降了 2.15~6.0 个数量级.而且,营养水平越低,抗性菌与野生型菌株的比例减小得越快,即质粒丢失的速度越快.在 M9/10 000 的营养水平下,第 3 次转接时(培养 72 h),抗性菌已不能生长.该结果表明,pACYC184 质粒在不同的营养水平下,都存在适应度代价.质粒往往通过表达修饰酶或外排泵等抗性机制产生抗生素抗性,这些机制的表达及质粒的复制都会使细菌消耗能量,影响细菌的正常生长,从而表现出适应度代价^[11,16].质粒发生丢失,不稳定遗传的原因主要有两个:一是细胞分裂时不均匀分配,二是质粒存在适应度代价,细菌为了自身的生存往往将质粒丢失,产生新的不携带质粒的菌株^[17,18].而且,营养水平越低,适应度代价表现得越明显.因为抗性菌株在低营养水平时,必须先满足细菌最基本的能量和生理需求,尽量降低其生存成本.所以,低营养水平时,质粒丢失的速度也最快. Lenski 等^[19]用数学模拟研究也发现 *E. coli* 菌群的 pACYC184 质粒在葡萄糖有限的基础培养基中培养时快速丢失,不能稳定遗传,与本研究的结果相互印证.

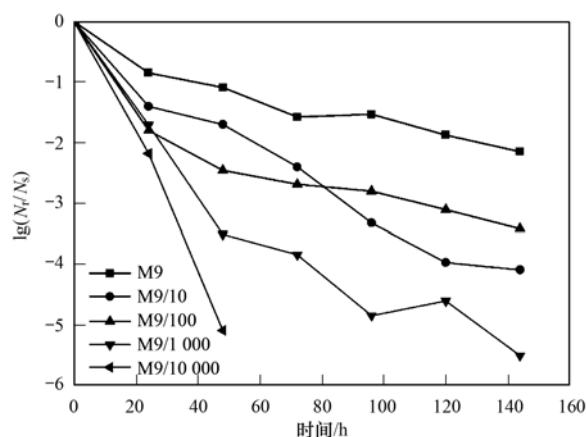


图 1 营养水平对 pACYC184 质粒适应度代价的影响

Fig. 1 Effect of nutrition level on the fitness cost of pACYC184 plasmid

2.2 痕量抗生素对 pACYC184 质粒适应度代价的影响

已有报道发现在饮用水系统检测出痕量的抗生素^[20,21].通常情况下,短期饮用含痕量抗生素的水体不足以直接危害人类的身体健康^[15].但是,痕量的抗生素仍可能通过间接影响细菌的抗性给人类带来潜在的健康风险.从图 2 看出,当四环素和氯霉

素的浓度 <50% MIC 时,其对野生菌的损伤或抑制作用不足以抗衡抗性质粒对细菌生长带来的负担即适应度代价。从而,在竞争实验过程中抗性菌与野生型的比例逐渐减少。当四环素浓度 <50% MIC 时,转接 7 次后(培养 168 h)抗性菌比野生菌下降了 2.25 ~ 3.13 个数量级。另外,当氯霉素浓度 <50% MIC 时,抗性菌的数量在转接 7 次后(培养 168 h),迅速下降,比野生菌约下降了 5.03 ~ 6.53 个数量级。而当抗生素包括四环素和氯霉素的浓度继续提高(即大于或等于 50% MIC 时),抗性菌在竞争过程中,逐渐表现出优势。这是因为该浓度的

痕量抗生素会杀死或抑制部分野生菌的生长。相反地,携带质粒的细菌通过表达抗性机制产生抗生素抗性,在含有抗生素的条件下更具生长优势^[22]。进一步观察抗性菌的生长曲线(未显示)也可以看出,当抗生素浓度为 50% 和 90% MIC 时,抗性菌的生长较其它浓度下生长得更稳定。如前所述,在实际饮用水系统中,抗生素的浓度通常在 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 的水平,即在本研究的 <50% MIC 的抗生素浓度范围。也就是说,抗性质粒在实际饮用水的痕量抗生素浓度条件下不容易维持,适应度代价较大,从而对人类健康的影响也较小。

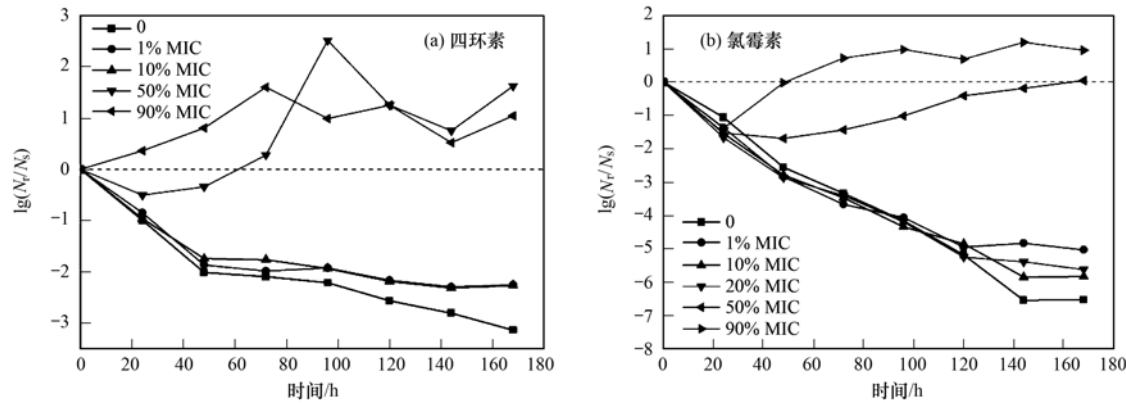


图 2 抗生素水平对 pACYC184 质粒适应度代价的影响
Fig. 2 Effect of antibiotic level on the fitness cost of pACYC184 plasmid

2.3 质粒适应度代价的广谱性分析

从上面的研究得出 pACYC184 质粒对 *E. coli* K12 菌株是有适应度代价的,而且营养水平越低,适应度代价表现得越明显。为了验证这一现象的普遍性,再选择两种质粒 RP4 和 PBR322 作进一步的研究。由表 1 介绍,RP4 质粒长度为 60 kb,每个细胞含 4 ~ 7 个拷贝数的质粒。而且,RP4 质粒是接合型质粒,可能通过接合方式发生水平基因转移。PBR322 质粒长度为 4 kb,每个细胞含 15 ~ 20 个拷

贝数的质粒。从图 3(a)表明,RP4 质粒在所有的营养水平条件,都很容易丢失。在第 2 次转接(培养 48 h)时,抗性细菌就比野生菌下降约 3.0 ~ 4.44 个数量级。而且,在 M9/10 000 的营养水平下,抗性质粒丢失的速度最快。在第 5 次转接(培养 120 h)时,抗性菌就已经全部消失了。另外,图 3(b)显示 PBR322 质粒在不同营养水平条件下,均会发生丢失的现象即都具有适应度代价。但是,除了 M9/10 000 的营养水平外,其它的营养水平下的适应度

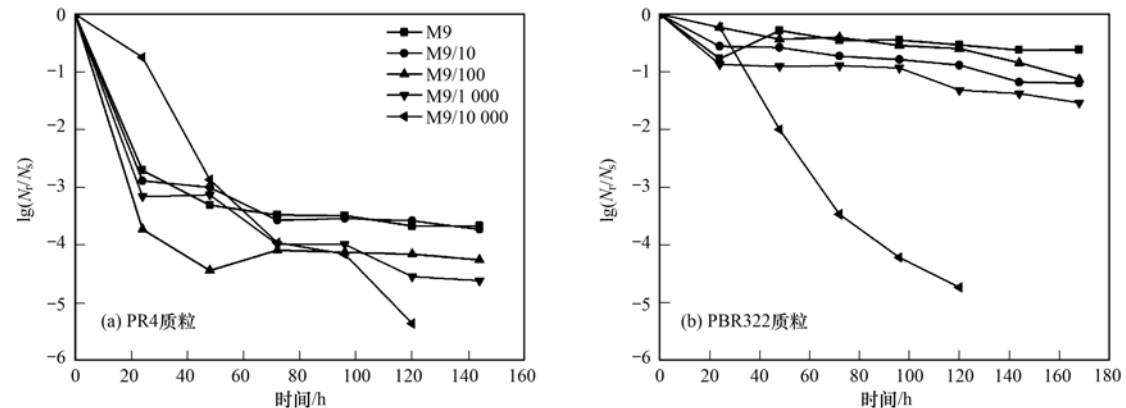


图 3 营养水平对质粒适应度代价的影响
Fig. 3 Effect of nutrition level on the fitness cost of plasmids

代价区分不明显. 因此,认为质粒的适应度代价具有普遍性,但是具体到某个质粒的适应度代价更为复杂,可能与质粒大小、拷贝数及其类型等因素有关^[23]. 比如,Dahlberg 等^[16]研究两个接合型质粒 R1 和 RP4 对 *E. coli* J53-1 的适应度代价,发现这两种质粒都有适应度代价. 虽然接合型质粒会通过水平基因发生转移,但是水平转移率很低,不足以补偿质粒的适应度代价,因而质粒仍会发生丢失.

3 结论

本研究选取了 3 种不同的抗性质粒 pACYC184、RP4 和 PBR322,分析营养水平和痕量抗生素对其适应度代价的影响. 结果得出营养水平影响抗性质粒的适应度代价. 而且,在较低浓度的营养条件下(M9/1 000 和 M9/10 000,即 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TOC),质粒介导的抗生素抗性的适应度代价表现得越明显,抗性质粒很快丢失. 另外,在小于 50% MIC 的抗生素浓度下(即 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 甚至 $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 水平),抗性质粒的适应度代价效应大于该浓度的抗生素本身对细菌生长的抑制作用,质粒难以维持. 进一步将该研究结果拓展到实际饮用水系统中,即贫营养条件($\text{TOC} < 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)和痕量的抗生素浓度($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$),这两种条件同时存在的情况下,质粒介导的抗生素抗性的适应度代价将表现得更为明显. 因而,质粒介导的抗生素抗性在实际饮用水系统中不易维持. 从这个角度来讲,质粒介导的抗生素抗性对人类健康的潜在风险也将大大减小.

参考文献:

- [1] 刘苗苗,杨敏,张昱,等. 环境中抗药基因水平转移研究进展[J]. 生态毒理学报, 2015, **10**(5): 11-19.
- [2] Jia S Y, Shi P, Hu Q, *et al.* Bacterial community shift drives antibiotic resistance promotion during drinking water chlorination [J]. Environmental Science & Technology, 2015, **49**(20): 12271-12279.
- [3] 梁惜梅,聂湘平,施震. 珠江口典型水产养殖区抗生素抗性基因污染的初步研究[J]. 环境科学, 2013, **34**(10): 4073-4080.
- [4] 张俊,杨晓洪,葛峰,等. 长期施用四环素残留猪粪对土壤中耐药菌及抗性基因形成的影响[J]. 环境科学, 2014, **35**(6): 2374-2380.
- [5] 罗义,周启星. 抗生素抗性基因(ARGs)——一种新型环境污染因子[J]. 环境科学学报, 2008, **28**(8): 1499-1505.
- [6] 苏建强,黄福义,朱永官. 环境抗生素抗性基因研究进展[J]. 生物多样性, 2013, **21**(4): 481-487.
- [7] 徐莉柯. 城市自来水处理系统中抗生素抗性基因的行为特征[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [8] Pruden A, Pei R T, Storteboom H, *et al.* Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado [J]. Environmental Science & Technology, 2006, **40**(23): 7445-7450.
- [9] 郭丽芳,王明义. 微生物质粒研究进展[J]. 医学检验与临床, 2007, **18**(1): 54-55.
- [10] 宋春敬,宋春娟,段昌群. 抗生素抗性质粒研究进展[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2003, **25**(S): 194-198.
- [11] Andersson D I, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? [J]. Nature Reviews Microbiology, 2010, **8**(4): 260-271.
- [12] Schrag S J, Perrot V, Levin B R. Adaptation to the fitness costs of antibiotic resistance in *Escherichia coli* [J]. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 1997, **264**(1386): 1287-1291.
- [13] 徐丽,吕瑞辰,王海燕,等. 携带 *bla*_{NDM-1} 的质粒 pNDM-BJ01 在鲁氏不动杆菌中的适应度代价[J]. 微生物学报, 2013, **53**(1): 99-104.
- [14] 齐枝花,赵阳,陈海棠,等. 管网水限制性营养元素对微生物再生长的影响[J]. 环境科学与管理, 2012, **37**(10): 109-112.
- [15] 叶必雄,张岚. 环境水体及饮用水中抗生素污染现状及健康影响分析[J]. 环境与健康杂志, 2015, **32**(2): 173-178.
- [16] Dahlberg C, Chao L. Amelioration of the cost of conjugative plasmid carriage in *Escherichia coli* K12 [J]. Genetics, 2003, **165**(4): 1641-1649.
- [17] Heuer H, Fox R E, Top E M. Frequent conjugative transfer accelerates adaptation of a broad-host-range plasmid to an unfavorable *Pseudomonas putida* host [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, **59**(3): 738-748.
- [18] Adler M, Anjum M, Berg O G, *et al.* High fitness costs and instability of gene duplications reduce rates of evolution of new genes by duplication-divergence mechanisms [J]. Molecular Biology and Evolution, 2014, **31**(6): 1526-1535.
- [19] Lenski R E, Bouma J E. Effects of segregation and selection on instability of plasmid pACYC184 in *Escherichia coli* B [J]. Journal of Bacteriology, 1987, **169**(11): 5314-5316.
- [20] 姚宏,王辉,苏佳亮,等. 某饮用水处理厂中 5 种抗生素的去除[J]. 环境工程学报, 2013, **7**(3): 801-809.
- [21] 尹俊发,汪海林. 分子印迹固相萃取法用于环境水和饮用水中痕量抗生素的检测[A]. 见: 中国化学会第 26 届学术年会环境化学分会会场论文集. 天津: 中国化学会, 2008. 106.
- [22] Sandegren L. Selection of antibiotic resistance at very low antibiotic concentrations [J]. Upsala Journal of Medical Sciences, 2014, **119**(2): 103-107.
- [23] San Millan A, Santos-Lopez A, Ortega-Huedo R, *et al.* Small-plasmid-mediated antibiotic resistance is enhanced by increases in plasmid copy number and bacterial fitness [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2015, **59**(6): 3335-3341.

CONTENTS

Spatiotemporal Distribution and Source Attribution of SOA in China	CHEN Zhuo, LIU Jun-feng, TAO Wei, <i>et al.</i> (2815)
Emission Inventory of Heavy Metals in Fine Particles Emitted from Residential Coal Burning in China	LIU Hai-biao, KONG Shao-fei, WANG Wei, <i>et al.</i> (2823)
Diurnal Variation of PM _{2.5} Mass Concentration in Beijing and Influence of Meteorological Factors Based on Long Term Date	MIAO Lei, LIAO Xiao-nong, WANG Ying-chun (2836)
Characteristics of Ozone Background Concentration in Beijing from 2004 to 2015	CHENG Nian-liang, LI Yun-ting, ZHANG Da-wei, <i>et al.</i> (2847)
Online Sources about Atmospheric Fine Particles During the 70th Anniversary of Victory Parade in Shijiazhuang	ZHOU Jing-bo, LI Zhi-guo, LU Na, <i>et al.</i> (2855)
Pollution Characteristics of Inorganic Water-soluble Ions in Atmospheric Particulate Matter in Chengdu Plain	JIANG Yan, HE Guang-yan, LUO Bin, <i>et al.</i> (2863)
Observation Analysis on the Characteristics of Meteorological Elements and Pollutants During a Continuous Fog and Haze Episode in Spring in Jiaying City	SHEN Li-juan, WANG Hong-lei, LI Li, <i>et al.</i> (2871)
Characteristics and Source Apportionment of Metals in the Dustfall of Quanzhou City	ZHANG Zong-wei, HU Gong-ren, YU Rui-lian, <i>et al.</i> (2881)
Level and the Courses of Heavy Metals and Its Risk Assessment in Indoor Dust of City: Take Guiyang as a Case	LI Xiao-yan, WANG Lang, ZHANG Shu-ting (2889)
Chemical Characteristics and Source of Acid Precipitation in Guilin	GUO Ya-si, YU Shi, LI Yong-shan, <i>et al.</i> (2897)
Assessment of Gaseous Nitrogen (NH ₃ and N ₂ O) Mitigation After the Application of a Range of New Nitrogen Fertilizers in Summer Maize Cultivation	FAN Hui, JIANG Shan-shan, WEI Ying, <i>et al.</i> (2906)
Soil CO ₂ , CH ₄ and N ₂ O Fluxes from Alpine Meadows on the Plateau of Southern Qinghai Province During Snow Cover Period and Growing Seasons	WU Jian-guo, ZHOU Qiao-fu (2914)
Partial Pressure of Carbon Dioxide and Methane from Autumn to Winter in Xiangxi Bay of the Three Gorges Reservoir	ZHANG Jun-wei, LEI Dan, XIAO Shang-bin, <i>et al.</i> (2924)
Potential Impacts of Climate Change on Phosphorus and DO in Yuqiao Reservoir	ZHANG Chen, LIU Han-an, GAO Xue-ping, <i>et al.</i> (2932)
Land Use Structure Change and Its Control Effect of Nitrogen Output in a Small Watershed of Three Gorges Reservoir Area: A Case Study of Lanlingxi Watershed	WU Dong, HUANG Zhi-lin, XIAO Wen-fa, <i>et al.</i> (2940)
Response of Inflow Water Quality to Land Use Pattern in Northern Watershed of Lake Erhai	XIANG Song, PANG Yan, CHU Zhao-sheng, <i>et al.</i> (2947)
Effect of Nutrient Cycles in Tributaries on the Transport of Nutrient in the Three Gorge Reservoirs: A Case Study of Caotang River	WANG Xiao-tong, LUO Guang-fu, CAO Man, <i>et al.</i> (2957)
Transient Storage Characteristics of Artificial Pool Geomorphic Structure in an Agricultural Headwater Stream	LI Ru-zhong, HUANG Qing-fei, QIAN Jing, <i>et al.</i> (2964)
Distribution Characteristics of Solute Nitrogen in the Water-Sediment of Farmland Drainage Ditch	LI Qiang-kun, HU Ya-wei, SONG Chang-ji, <i>et al.</i> (2973)
Characteristics and Influencing Factors of Soil Microbial Biomass Carbon and Nitrogen in Drawdown Area in the Three Gorges Reservoir	CHAI Xue-si, LEI Li-guo, JIANG Chang-sheng, <i>et al.</i> (2979)
Response Behaviors of Heavy Metals at Tidal Currents Interface and Salinity Interface in the Estuary Area	LIU Jing, ZHENG Bing-hui, LIU Lu-san, <i>et al.</i> (2989)
Simulation of Multimedia Transfer and Fate of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) in Shenzhen Region	CUI Xiao-yu, ZHANG Hong, LUO Ji, <i>et al.</i> (3001)
Distribution Characteristics and Ecological Risk Assessment of Organochlorine Pesticides in Surface Sediments of Zhelin Bay in Guangdong Province, China	WEI Ya-ning, PAN Jia-chuan, SONG Yu-mei, <i>et al.</i> (3007)
Spatial Distribution Characteristics and Source Analysis of Dissolved Organic Matter in Beiyun River	CHEN Yong-juan, HU Wei-xuan, PANG Shu-jiang, <i>et al.</i> (3017)
Distribution and Environmental Significances of Radionuclides in the Sediment of the Changyi Coastal Wetland	WANG Qi-dong, SONG Jin-ning, LI Xue-gang, <i>et al.</i> (3026)
Fecal Contamination in Laolongdong Underground River as Measured by the Sterol Biomarkers	LIAO Yu, SUN Yu-chuan, WANG Zun-bo, <i>et al.</i> (3034)
Distribution Characteristics and Pollution Status of Phthalate Esters in the Groundwater of Hutuo River Pluvial Fan	CHANG Sheng, ZHAO Xing-ru, LIU Yan, <i>et al.</i> (3041)
Impacts of Land Use on the Source of Dissolved Fatty Acids in Epikarst Spring During Rainy Season	ZHANG Mei, SUN Yu-chuan, XIE Zheng-lan, <i>et al.</i> (3049)
Mechanisms of Phosphorus Removal by Modified Zeolites Substrates Coated with Zn-LDHs in Laboratory-scale Vertical-flow Constructed Wetlands	ZHANG Xiang-ling, HUANG Hua-ling, GUO Lu, <i>et al.</i> (3058)
Synergistic Enhancement on Oxidation of Phenol by Fenton Processes by Adding Ce ³⁺ and Cu ²⁺ Ions	ZHANG Jian-qiao, CHI Hui-zhong, SONG Yang, <i>et al.</i> (3067)
Removal of Humic Acid from Water Using Pt/biochar Electrode Reactor	DING Wen-chuan, XIANG Xing-guang, ZENG Xiao-lan, <i>et al.</i> (3073)
Generation of Graphene-titanium Dioxide Nanotubes Catalytic Board and Its Photocatalysis Capability to Degrade Pentachlorophenol	XU Qi, ZHOU Ze-yu, WANG Hong-tao (3079)
Photocatalytic Degradation Kinetics and Mechanism of Monoazo Dye Acid Yellow 17 by UV/TiO ₂ in Aqueous Solution	YANG Hai, WEI Hong-qin, HU Le-tian, <i>et al.</i> (3086)
Feasibility of Sulfur-based Autotrophic Denitrification of Photovoltaic Wastewater Containing High Fluorine	MA Hang, ZHU Qiang, ZHU Liang, <i>et al.</i> (3094)
Operation Performance of a Bioaugmented Membrane-aerated Biofilm Reactor Treating Atrazine Wastewater	LIU Chun, YU Chang-fu, ZHANG Jing, <i>et al.</i> (3101)
Nitrogen Removal of Municipal Wastewater by ANAMMOX Coupled Shortcut Nitrification in Anaerobic Baffled Reactor	WU Peng, ZHANG Shi-ying, SONG Yin-ling, <i>et al.</i> (3108)
Simultaneous Ferric Reduction with Ammonia Oxidation Phenomena in Activated Sludge in Anaerobic Environment	LI Xiang, LIN Xing, YANG Peng-bing, <i>et al.</i> (3114)
Rapid Start-up of One-stage Autotrophic Nitrogen Removal Process in EGSB Reactor for Wastewater with Low Concentration of Ammonia	GU Shu-jun, FANG Fang, LI Kai, <i>et al.</i> (3120)
Phosphorus Removal Performance in EBPR System under Extra-low Dissolved Oxygen Condition	MA Juan, SONG Lu, YU Xiao-jun, <i>et al.</i> (3128)
Influence of Activated Sludge Surface Properties on Flocculating Settling and Effluent Suspend Solid	HE Zhi-jiang, ZHAO Yuan, ZHANG Yuan-kai, <i>et al.</i> (3135)
Spatial Characteristics and Environmental Risk of Heavy Metals in Typical Gold Mining Area of Shandong Province	WANG Fei, WU Quan-yuan, LÜ Jian-shu, <i>et al.</i> (3144)
Spatial Variation of Soil Heavy Metals in an E-waste Dismantling Area and Their Distribution Characteristics	ZHAO Ke-li, FU Wei-jun, YE Zheng-qian, <i>et al.</i> (3151)
Selenate Adsorption and Desorption in 18 Kinds of Chinese Soil with Their Physicochemical Properties	FENG Pu-yang, LI Zhe, ZHE Yu-yun, <i>et al.</i> (3160)
Adsorption Characteristics of Arsenite on Goethite by Flow Stirring Method	LI Xin, YANG Jun, RAO Wei, <i>et al.</i> (3169)
Preparation of Poly-hydroxy-aluminum Pillared Diatomite and Characteristics of Cu ²⁺ , Zn ²⁺ Adsorption on the Pillar in Aqueous Solutions	ZHU Jian, LEI Ming-jing, WANG Ping, <i>et al.</i> (3177)
Preparation and NH ₄ ⁺ -N Removal Performance of a Novel Filter Substrate Made from Sludges	WANG Wen-dong, LIU Hui, ZHANG Yin-ting, <i>et al.</i> (3186)
Preparation of Nanocomposite Hydrogel and Its Adsorption of Heavy Metal Ions	ZHU Qian, LI Zheng-kui, ZHANG Yi-pin, <i>et al.</i> (3192)
Prediction of PAHs Bioavailability in Spiked Soil by Composite Extraction with Hydroxypropyl-β-cyclodextrin and Rhamnolipid	ZHANG Ya-nan, YANG Xing-lun, BIAN Yong-rong, <i>et al.</i> (3201)
Biological Effects of ZnO Nanoparticles as Influenced by Arbuscular Mycorrhizal Inoculation and Phosphorus Fertilization	JING Xin-xin, SU Zhi-zhong, XING Hong-en, <i>et al.</i> (3208)
Difference of Species Sensitivities for Aquatic Life Criteria in China and the USA	WANG Xiao-nan, YAN Zhen-guang, YU Ruo-zhen, <i>et al.</i> (3216)
Effects of Low-level Nutrition and Trace Antibiotics on the Fitness Cost of Plasmids Bearing Antibiotic Resistance	LIN Wen-fang, CHEN Sheng, WAN Kun, <i>et al.</i> (3224)
Effect of Different Nitrogen Rates on the Nitrification Potential and Abundance of Ammonia-oxidizer in Intercropping Maize Soils	LÜ Yu, ZHOU Long, LONG Guang-qiang, <i>et al.</i> (3229)

《环境科学》第6届编辑委员会

主 编: 赵进才

副主编: 赵景柱 郝吉明 田 刚

编 委: (按姓氏笔画排序)

万国江 王华聪 王凯军 王绪绪 田 刚 田 静 史培军
朱永官 刘志培 刘 毅 汤鸿霄 孟 伟 周宗灿 林金明
赵进才 赵景柱 姜 林 郝郑平 郝吉明 聂永丰 黄 霞
黄 耀 鲍 强 潘 纲 潘 涛 魏复盛

环 境 科 学

(HUANJING KEXUE)

(月刊 1976年8月创刊)

2016年8月15日 第37卷 第8期

ENVIRONMENTAL SCIENCE

(Monthly Started in 1976)

Vol. 37 No. 8 Aug. 15, 2016

主 管	中国科学院	Superintended	by	Chinese Academy of Sciences
主 办	中国科学院生态环境研究中心	Sponsored	by	Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences
协 办	(以参加先后为序) 北京市环境保护科学研究院 清华大学环境学院	Co-Sponsored	by	Beijing Municipal Research Institute of Environmental Protection School of Environment, Tsinghua University
主 编	赵进才	Editor-in -Chief		ZHAO Jin-cai
编 辑	《环境科学》编辑委员会 北京市2871信箱(海淀区双清路 18号, 邮政编码:100085) 电话:010-62941102, 010-62849343 传真:010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn	Edited	by	The Editorial Board of Environmental Science (HUANJING KEXUE) P. O. Box 2871, Beijing 100085, China Tel:010-62941102, 010-62849343; Fax:010-62849343 E-mail: hjkx@ rcees. ac. cn http://www. hjkx. ac. cn
出 版	科 学 出 版 社 北京东黄城根北街16号 邮政编码:100717	Published	by	Science Press 16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷 装 订	北京北林印刷厂	Printed	by	Beijing Bei Lin Printing House
发 行	科 学 出 版 社 电话:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com	Distributed	by	Science Press Tel:010-64017032 E-mail: journal@ mail. sciencep. com
订 购 处	全国各地邮电局	Domestic		All Local Post Offices in China
国外总发行	中国国际图书贸易集团有限公司 (北京399信箱)	Foreign		China International Book Trading Corporation (Guoji Shudian), P. O. Box 399, Beijing 100044, China

中国标准刊号: ISSN 0250-3301
CN 11-1895/X

国内邮发代号: 2-821

国内定价: 120.00元

国外发行代号: M 205

国内外公开发行