Eco-Environmental Knowledge Web

环境科学

ENVIRONMENTAL SCIENCE

ISSN 0250-3301 CODEN HCKHDV
HUANJING KEXUE

■ 主办 中国科学院生态环境研究中心
■ 出版 科学出版社

2020
Vol.41 No.8
第41卷 第8期

环境科学
(HUANJING KEXUE)
ENVIRONMENTAL SCIENCE
第41卷 第8期
2020年8月15日

目 次

首都重大活动与空气重污染应急减排措施效果对比分析 …… 钟凝盛, 周颖, 程水源, 王晓琦, 邵玄逸(3449)
基于天津市在线数据评估ISORROPIA-Ⅱ模式结果及气溶胶pH的影响因素 …… 高洁, 史旭荣, 卫昱婷, 宋少洁, 史国良, 冯银厂(3458)
餐饮源有机颗粒物排放特征 …… 李源滤, 吴爱华, 童梦雪, 栾胜基, 李鹜, 胡敏(3467)
华中地区黄冈市一次重度污染期间$PM_{2.5}$中12种微量元素特征及来源解析 …… 陈展乐, 田倩, 毛瑶, 刘威杰, 石明明, 程铖, 胡天鹏, 邢新丽, 祁士华, 胡金旭(3475)
艾比湖地区气溶胶光学特性分析 …… 张喆, 丁建丽, 王瑾杰(3484)
天津市冬季重污染二次有机化学污染特征及VOCs对SOA生成潜势 …… 徐虹, 唐邈, 肖致美, 高璟赟, 杨宁, 李立伟, 郑乃源, 陈魁, 邓小文(3492)
郑州市某城区冬季不同污染水平大气VOCs特征及源解析 …… 李一丹, 尹沙沙, 张瑞芹, 于世杰, 杨健, 张栋(3500)
长江三角洲2010~2018年生物质燃烧中等挥发性有机物(IVOCs)排放清单 …… 朱永慧, 王倩, 黄凌, 殷司佳, 李莉, 王杨君(3511)
北方常见绿化树种BVOCs排放特征及其与光合作用参数的相关性 …… 许燕, 李双江, 袁相洋, 冯兆忠(3518)
广州地区秋季不同站点类型地面臭氧变化特征与影响因子 …… 高平, 庄立跃, 王龙, 陈瑜萍, 闫慧, 沈劲, 范丽雅, 叶代启(3527)
泰安市大气臭氧污染特征及敏感性分析 …… 李凯, 刘敏, 梅如波(3539)
有色冶炼园区道路扬尘中重金属污染特征及健康风险评价 …… 冯于耀, 史建武, 钟曜谦, 韩新宇, 封银川, 任亮(3547)
西安市高校校园地表灰尘重金属污染来源解析 …… 樊馨瑶, 卢新卫, 刘慧敏, 秦青(3556)
超低排放高湿废气总颗粒物监测方法及燃气电厂实际测试 …… 胡月琪, 颜旭, 孔川, 张虎, 邬晓东(3563)
厦门市船舶控制区大气污染物排放清单与污染特征 …… 王坚, 黄屋, 刘艳英, 陈森阳, 吴艳聪, 何月云, 杨心怡(3572)
基于交通流的成都市高分辨率机动车排放清单建立 …… 潘玉瑾, 李媛, 陈军辉, 石嘉诚, 田红, 张季, 周敬, 陈霞, 刘政, 钱骏(3581)
基于无人机多光谱影像和OPT-MPP算法的水质参数反演 …… 黄昕晰, 应晗婷, 夏凯, 冯海林, 杨琅晖, 杜晓晨(3591)
不同水体分层对沉积物间隙水氮素垂向分布影响:以三峡水库和小湾水库为例 …… 刘静思, 朱晓声, 胡子龙, 张思思, 杨正健, 纪道斌, 刘德富(3601)
城市河道表层水及沉积物中微塑料的污染现状与污染行为 …… 赵昕, 陈浩, 贾其隆, 沈忱思, 朱弈, 李磊, 聂云汉, 叶建锋(3612)
上海河道浮游植物群落结构时空变化特征及影响因素分析 …… 许志, 陈小华, 沈根祥, 朱英, 钱晓雍, 张心良, 张卫, 胡双庆, 白玉杰(3621)
过氧化钙(CaO_2)联合生物炭对河道底泥的修复 …… 李雨平, 姜莹莹, 刘宝明, 阮文权, 缪恒锋(3629)
基于双同位素($\delta^{15}N\text{-}NO_3^-$-$\delta^{18}O\text{-}NO_3^-$)和IsoSource模型的岩溶槽谷区地下水硝酸盐来源的定量示踪 …… 徐璐, 蒋勇军, 段世辉, 何瑞亮(3637)
三峡库区规模化顺坡沟垄果园氮、磷输出过程及流失负荷 …… 严坤, 王玉宽, 刘勤, 徐佩, 闫洋洋(3646)
高度城镇化地区城市小区降雨径流污染特征及负荷估算 …… 高斌, 许有鹏, 陆苗, 林芷欣, 徐兴(3657)
Fe@GOCS的制备及其对水中As(Ⅲ)的吸附 …… 赵超然, 单慧媚, 曾春芽, 张进贤, 彭三曦(3665)
微塑料对水中铜离子和四环素的吸附行为 …… 薛向东, 王星源, 梅雨晨, 庄海峰, 宋亚丽, 方程冉(3675)
多孔填料特性对生物膜形成影响 …… 江宇勤, 厉炯慧, 方治国(3684)
硝化生物膜系统对低温的适应特性:MBBR和IFAS …… 李韧, 于莉芳, 张兴秀, 戴子承, 滑思思, 彭党聪(3691)
单质硫自养短程反硝化耦合厌氧氨氧化强化脱氮 …… 方文烨, 李祥, 黄勇, 郭超然, 胡羽婷, 陶仁杰(3699)
间歇梯度曝气的生活污水好氧颗粒污泥脱氮除磷 …… 张玉君, 李冬, 李帅, 张杰(3707)
基于不同废污泥源的短程反硝化快速启动及稳定性 …… 张星星, 王超超, 王垚, 徐乐中, 吴鹏(3715)
基于AHP-PROMETHEE Ⅱ法的鸟粪石磷回收污泥预处理方案决策 …… 刘晓蕾, 李安婕(3725)
零价铁对厌氧消化过程中氨氮抑制解除的影响 …… 刘吉宝, 牛雨彤, 郁达伟, 谭颖锋, 左壮, 魏源送(3731)
基于厌氧膜生物反应器的剩余污泥-餐厨垃圾厌氧共消化性能 … 戴金金, 牛承鑫, 潘阳, 陆雪琴, 甄广印, 郑朝婷, 张瑞良, 何欣昱(3740)
亚剂量抗生素诱导抗性基因水平迁移 …… 袁其懿, CHEN Hong-jie, Laurence Haller, 何义亮(3748)
四环素胁迫对*Shigella flexneri*细菌四环素抗性基因抗性表达的影响过程 …… 高品, 阮晓慧, 邱文婕, 薛罡, 钱雅洁(3758)
羟胺对氨氧化菌和亚硝酸盐氧化菌的竞争性选择 …… 乔昕, 王博, 郭媛媛, 彭永臻(3765)
高温冲击对亚硝酸盐氧化过程中微生物菌群结构影响 …… 侯晓薇, 牛永健, 李维维, 王光杰, 孙洪伟(3773)
微生物种间相互作用产生锰氧化的普适性及其潜在应用 …… 宁雪, 梁金松, 柏耀辉, 廖恺玲俐, 刘会娟, 曲久辉(3781)
三亚河红树林表层沉积物中好氧氨氧化微生物的分布特征及潜在硝化速率 …… 罗晴, 甄毓, 彭宗波, 贺惠(3787)
臭氧污染对水稻生长、产量及矿质金属元素含量的影响 …… 方笑莹, 罗小三, 张丹, 吴礼春, 邱丹, 陈志炜, 赵朕(3797)
改变碳输入对新疆天山雪岭云杉林土壤呼吸的短期影响 …… 邵康, 贡璐, 何学敏, 陈文静, 张雪妮, 朱海强(3804)
有机无机肥配施对不同程度盐渍土N_2O排放的影响 …… 周慧, 史海滨, 郭珈玮, 张文聪, 王维刚(3811)
原位电阻热脱附土壤升温机制及影响因素 …… 葛松, 孟宪荣, 许伟, 施维林(3822)
羽序灯心草作为酸性矿山废弃地先锋植物潜力 …… 黄建洪, 伏江丽, 严鑫睿, 尹凤, 田森林, 宁平, 李英杰(3829)
滴灌方式和生物质炭对温室土壤矿质态氮及其微生物调控的影响 …… 蔡九茂, 刘杰云, 邱虎森, 吕谋超, 周新国(3836)
棉秆炭调控对碱性镉污染水稻根际土壤真菌群落结构和功能的影响 …… 刘师豆, 韩耀光, 朱新萍, 吴相南(3846)
不同水分管理模式联合叶面喷施硅肥对水稻Cd累积的影响 …… 魏宾纭, 周航, 刘佳炜, 张竞颐, 黄芳, 霍洋, 胡雨丹, 辜娇峰, 刘俊, 廖柏寒(3855)
螯合剂GLDA对象草修复镉污染农田的影响 …… 覃建军, 唐盛爽, 蒋凯, 黄敬, 侯红波, 龙坚, 彭佩钦(3862)
种植业面源污染防控技术发展历程分析及趋势预测 …… 俞映倞, 杨林章, 李红娜, 朱昌雄, 杨桢, 薛利红(3870)
《环境科学》征订启事(3636) 《环境科学》征稿简则(3764) 信息(3538, 3628, 3724)

Eco-Environmental Knowledge Web
环 境 科 学
Environmental Science
第41卷第8期 2020年8月
Vol.41, No.8 Aug., 2020

亚剂量抗生素诱导抗性基因水平迁移

袁其懿[1], CHEN Hong-jie[2], Laurence Haller[2], 何义亮[1*]
(1. 上海交通大学环境科学与工程学院, 上海 200240; 2. Department of Civil and Environmental Engineering, National University of Singapore, Singapore 117576, Singapore)

摘要: 为探究亚剂量抗生素诱导下编码广谱β-内酰胺酶(extended-spectrum β-lactamase, ESBL)基因的接合转移(conjugation),使用从新加坡主要医院的废水中直接分离的可合成 ESBL 的铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)和大肠杆菌(*E. coli*)菌株作为 ESBL 编码质粒的供体,以携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因的耐氯霉素(chloramphenicol, CHL)大肠杆菌 SCC1(*E. coli* SCC1)作为受体,借助响应面分析,检测并分析了携带有 ESBL 编码基因的质粒在亚剂量水平的四环素(tetracycline, TC),磺胺甲噁唑(sulfamethoxazole, SMZ)和头孢他啶(ceftazidime, CAZ)单一暴露和共同暴露时,从供体菌株接合传递至受体菌株的特征. 结果发现,ESBL 编码质粒可在无诱导抗生素胁迫下,以平均0.001 5和0.004 2的频率分别由铜绿假单胞菌和大肠杆菌供体接合转移至受体大肠杆菌 SCC1 菌株,具有较低的"适应性代价",并在质量浓度低于最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)的抗生素暴露下更易在大肠杆菌菌株之间传递. 大肠杆菌菌株之间的接合转移显著发生在质量浓度低于 0.03 mg·L^{-1}的 TC 与质量浓度低于 0.002 mg·L^{-1}的 CAZ 单一暴露或共同暴露时,并可被亚 MIC 的 TC 显著抑制. 铜绿假单胞菌与大肠杆菌间的接合转移可在 5 倍 MIC 的 TC、CAZ 共同暴露时被显著诱导,未检测到亚 MIC 水平抗生素对其的促进作用.

关键词: 广谱β-内酰胺酶(ESBL); 质粒; 接合体; 抗生素; 亚剂量; 响应面分析
中图分类号: X171.5 **文献标识码**: A **文章编号**: 0250-3301(2020)08-3748-10 **DOI**: 10.13227/j.hjkx.201912015

Antibiotics Induce Horizontal Gene Transfer of Resistance at Sublethal Concentrations

YUAN Qi-yi[1], CHEN Hong-jie[2], Laurence Haller[2], HE Yi-liang[1*]
(1. School of Environmental Science and Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 2. Department of Civil and Environmental Engineering, National University of Singapore, Singapore 117576, Singapore)

Abstract: In order to explore the conjugation of genes encoding extended-spectrum β-lactamase (ESBL), ESBL-expressing *P. aeruginosa* and *E. coli* strains isolated from the wastewater of major hospitals in Singapore were used as donors. gfp-tagged *E. coli* SCC1 strains resistant to chloramphenicol (CHL) were chosen as recipients. Using response surface analysis, we detected and analyzed the induction of conjugal transfer under single-exposure and co-exposure of tetracycline (TC), sulfamethoxazole (SMZ), and ceftazidime (CAZ) at sublethal concentrations. It was found that the ESBL plasmid could be conjugal transferred from *P. aeruginosa* and *E. coli* strains to the recipient *E. coli* SCC1 strains at an average frequency of 0.001 5 and 0.004 2, respectively, without stress from inducing antibiotics, thus showing a low fitness cost and higher conjugal frequency between *E. coli* strains under the exposure of sub-MIC antibiotics. A significant conjugation between *E. coli* strains occurred under the single-exposure or co-exposure of a TC concentration of <0.03 mg·L^{-1} and a CAZ concentration of <0.002 mg·L^{-1}, as inhibited by a sub-MIC level of TC. The conjugation between *P. aeruginosa* and *E. coli* strains was stimulated under the exposure of TC and CAZ with concentrations 5-times larger than the MIC, while no significant induction was detected from the sub-MIC antibiotics.

Key words: extended-spectrum β-lactamase (ESBL); plasmids; transconjugants; antibiotics; sublethal; response surface analysis

近年来,环境细菌对β-内酰胺类抗生素持续增加的耐药性日益得到了人们的关注[1,2],其机制主要是通过合成多种β-内酰胺酶(β-lactamase)使进入细菌细胞的β-内酰胺类抗生素失活. 以中国为例,编码β-内酰胺酶的抗生素抗性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)已在包括河流、水库在内的城市水体[3~6]、污水处理系统[7~9]、河口沉积物[10]、土壤[11,12]和牲畜排泄物[13]等被检出,具有种类多、丰度大的特点. 其中 *blaCTX*、*blaOXA*、*blaTEM* 和 *blaSHV* 等 ARGs 编码广谱β-内酰胺酶(extended-spectrum β-lactamase, ESBL),可使细菌获得对大多数青霉素类和头孢菌素类抗生素的耐药性,对人类健康危害极大[1].

编码 ESBL 的基因通常位于包括质粒在内的可动遗传元件(mobile genetic elements, MGEs)上[14],易于通过基因水平迁移(horizontal gene transfer,

收稿日期: 2019-12-03; **修订日期**: 2020-02-20
基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2017ZX07207002-05); 上海交通大学-新加坡国立大学重大国际合作项目(CREATE)
作者简介: 袁其懿(1994~),男,硕士研究生,主要研究方向为环境细菌耐药性和耐药基因传递, E-mail: yqy6611@sjtu.edu.cn
* 通信作者, E-mail: ylhe@sjtu.edu.cn

HGT)造成传播扩散[15]. 对于编码在质粒上的 ESBL 基因,接合转移(conjugation)是最主要的 HGT 途径[16,17]. 有研究发现,当细菌暴露于低于其最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration,MIC)的抗生素下,HGT 将是细菌修补 DNA 损伤和获得耐药性的重要途径[18]. 国内外已有研究证明了亚 MIC 水平的四环素类[19~21]、磺胺类[22]和喹诺酮类[23]等抗生素具有富集抗性菌株、影响 ARGs 赋存特性和调节 ARGs 接合转移的功效,但是这些研究普遍存在很少涉及 ESBL 编码基因、局限于单一抗生素暴露、对质粒做了过多人为改造等局限性. 对于多种亚剂量抗生素共同暴露下 ESBL 编码质粒的接合传递,国内外仍鲜见报道.

头孢他啶(ceftazidime,CAZ)是典型的第三代头孢菌素,可作为判断菌株是否具备合成 ESBL 能力的指示剂. 研究分别使用从新加坡主要医院的废水中直接分离的可合成 ESBL 的铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)和大肠杆菌(*E. coli*)作为 ESBL 编码质粒的供体细菌,以携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因的耐氯霉素(chloramphenicol,CHL)大肠杆菌 SCC1(*E. coli* SCC1)作为受体细菌,以抗 CAZ 基因作筛选基因,定量研究携带有 ESBL 编码基因的质粒在亚 MIC 水平的四环素(tetracycline,TC),磺胺甲噁唑(sulfamethoxazole,SMZ)和 CAZ 单一暴露和共同暴露时,从供体细胞水平迁移至受体细菌细胞的特征及其影响因素,以期为了解和抑制 ESBL 编码基因在亚剂量抗生素胁迫下的迁移扩散提供科学依据.

1　材料与方法

1.1　所用的化学药剂

使用的抗生素如下:TC: Tetracycline hydrochloride (Sigma-Aldrich, T3383), SMZ: Sulfamethoxazole (Fluka, S7507), CAZ: Ceftazidime hydrate (Sigma-Aldrich, A6987), CHL: Chloramphenicol (Sigma-Aldrich, C0378).

所用的 LB 培养液使用 LB Broth Base (Invitrogen, 12780-052) 配置而成. 配置操作严格遵守产品指示.

1.2　供体细菌和受体细菌的准备

作为供体的大肠杆菌菌株由 Laurence Haller 提供,铜绿假单胞菌菌株由 Goh Shin Giek 提供. 菌株分离、纯化、种属鉴定和耐药性检验方法可详见文献[1]. 作为受体的携带 gfp 基因的耐 CHL 大肠杆菌 SCC1 菌株由 CHEN Hong-jie 提供. 供体和受体分别预生长于含有 15 $mg\cdot L^{-1}$ CHL 的 LB 培养液中,在温度 37℃,摇速 150 $r\cdot min^{-1}$ 条件下过夜培养.

受体对诱导抗生素的 MIC 使用基于 LB 培养液培养的连续双倍稀释法检测. MIC 数值如表 1 所示.

表 1　受体 MIC 值

Table 1　MIC values for the recipient

诱导抗生素	MIC/$mg\cdot L^{-1}$
TC	4.0
SMZ	32
CAZ	0.25

1.3　接合转移实验与转移频率计算

各取 5 μL 供体细菌和受体细菌悬浮液混合入含有 5 mL LB 培养液的 15 mL 离心管中,在温度 37℃,摇速 150 $r\cdot min^{-1}$ 条件下过夜培养. 测试的抗生素质量浓度如下:TC 为 0、0.000 03、0.000 3、0.003、0.03、0.3 和 3 $mg\cdot L^{-1}$;SMZ 为 0、0.000 3、0.003、0.03、0.3、3 和 30 $mg\cdot L^{-1}$;CAZ 为 0、0.000 02、0.000 2、0.002、0.02 和 0.2 $mg\cdot L^{-1}$. 同时分别在 3 支仅含有 5 mL LB 培养液的 15 mL 离心管中混合入 5 μL 受体细菌悬浮液,在温度 37℃,摇速 150 $r\cdot min^{-1}$ 条件下过夜培养,作为对照. 含 CAZ (50 $mg\cdot L^{-1}$) 的 LB 培养液用于选择接合体(transconjugants)细胞(即成功获得 ESBL 编码质粒的受体细菌细胞)和排除受体细胞发生耐药性突变的可能性. 使用流式细胞仪(CytoFLEX S,美国贝克曼库尔特有限公司)检测接合体细胞的数量. 通过将接合体细胞数除以从对照中推导出的平均受体细胞总数来计算转移频率. 各组接合转移实验均做 3 组独立重复实验.

1.4　统计分析

本研究所涉及的响应面分析使用 Design Expert 11 完成,选用 Box-Behnken Design,中心点设置为 3 个. 其余的统计分析和绘图在 R 3.6.2 环境下实现.

2　结果与分析

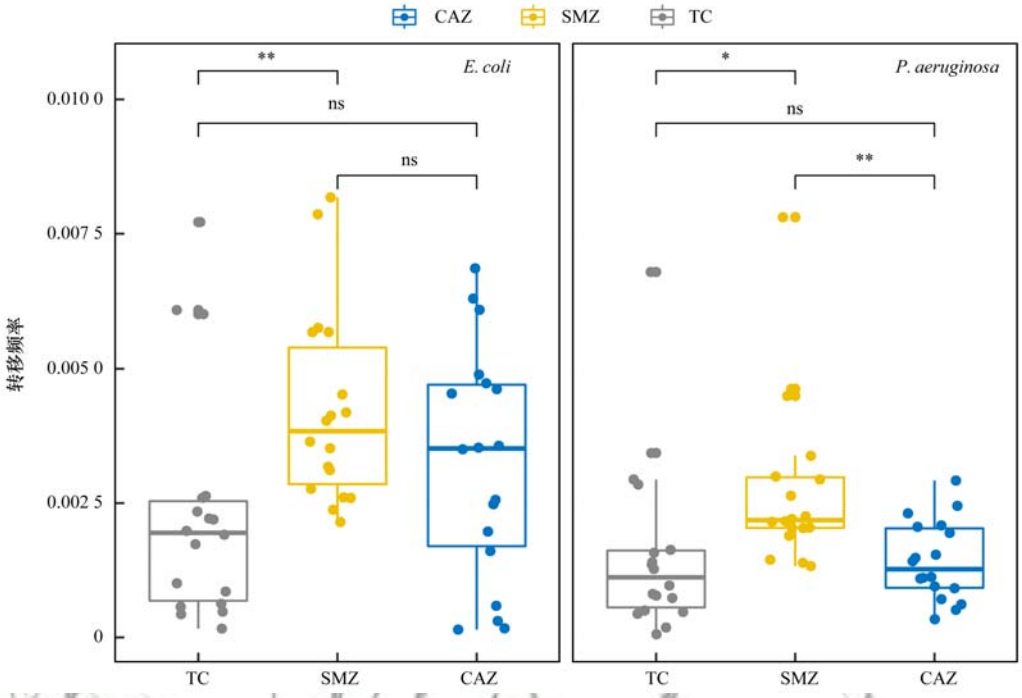
2.1　无四环素、磺胺甲噁唑和头孢他啶胁迫时的接合转移频率

当供体菌株和受体菌株仅暴露于 15 $mg\cdot L^{-1}$ 氯霉素下,发生的接合转移频率视为本研究的接合转移频率背景值.

当供体菌株为铜绿假单胞菌时,该背景值变化范围为 0.000 5 ~ 0.002 6,均值 0.001 5. 当供体菌株为大肠杆菌时,该背景值变化范围为 0.003 0 ~ 0.005 4,均值 0.004 2. 比较发现,无 TC、SMZ 和 CAZ 胁迫时,大肠杆菌供体更易将抗性质粒接合转移至大肠杆菌受体(t 检验,$P<0.01$).

2.2 单一亚剂量抗生素胁迫对接合转移影响

无论供体菌株是铜绿假单胞菌还是大肠杆菌,在亚剂量 SMZ 胁迫下,供受体菌株之间接合传递 ESBL 编码质粒的频率最高(t 检验,$P < 0.01$,图 1). 在此胁迫条件下,铜绿假单胞菌和受体菌株之间的抗性传递频率介于0.002 2 ~ 0.004 6之间(图 2);大肠杆菌与受体菌株之间的抗性传递频率介于0.002 7 ~ 0.005 2之间(图 2). 随着 SMZ 的胁迫质量浓度接近受体菌株的 MIC,受体菌株吸收不同供体菌株 ESBL 编码质粒的频率随着胁迫质量浓度增大而产生波动,但与背景值无显著差异(t 检验,$P > 0.05$)[图 2(b)]. 各胁迫质量浓度下,检测误差多超过 0.95 置信区间范围 [图 2(a)].



ns 为 $P > 0.05$, * 为 $P < 0.05$, ** 为 $P < 0.01$

图 1 亚 MIC 抗生素对接合转移的诱导能力比较

Fig. 1 Comparison of the ability of induction by sub-MIC antibiotics on conjugation

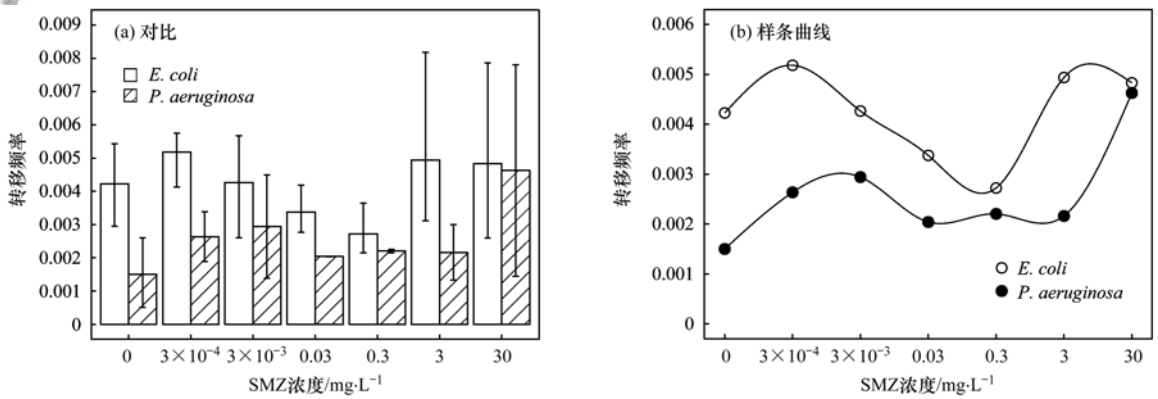


图 2 SMZ 对接合转移诱导作用对比和样条曲线

Fig. 2 Bar chart and splines to compare of the induction of SMZ on conjugation

供受体菌株暴露于亚剂量 CAZ 下时,同样可发生较高频率的质粒接合传递. 当供体菌株为铜绿假单胞菌时,供受体菌株在亚剂量 CAZ 胁迫下的质粒迁移频率显著低于在亚剂量 SMZ 胁迫下的质粒迁移频率(t 检验,$P < 0.01$);当供体菌株为大肠杆菌时,供受体菌株在亚剂量 CAZ 胁迫下的质粒迁移频率在亚剂量 SMZ 胁迫下的质粒迁移频率无显著差异(t 检验,$P > 0.05$,图 1). 在此胁迫条件下,铜绿假单胞菌和受体菌株之间的抗性传递频率介于0.001 0 ~ 0.001 8之间(图 3);大肠杆菌与受体菌株之间的抗性传递频率介于0.000 3 ~ 0.005 3之间(图 3). 铜绿假单胞菌和受体菌株之间的抗性质粒传递频率在亚剂量 CAZ 胁迫下与背景值无显著差异(t 检验,$P > 0.05$). 当 CAZ 质量浓度不高于

0.002 mg·L^{-1}时，大肠杆菌供体与大肠杆菌受体菌株之间接合转移频率与背景值无显著差异（t 检验，$P>0.05$）；当 CAZ 质量浓度高于 0.002 mg·L^{-1}时，接合转移频率存在显著的降低（t 检验，$P<0.01$）[图 3(b)]. 在各胁迫质量浓度下，检测误差多超过 0.95 置信区间范围 [图 3(a)].

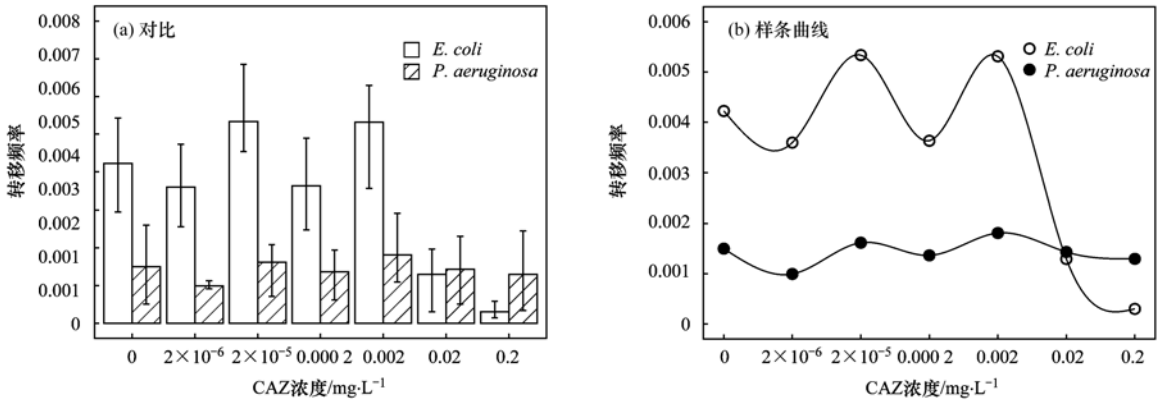


图 3　CAZ 对接合转移诱导作用对比和样条曲线

Fig. 3　Bar chart and splines to compare of the induction of CAZ on conjugation

比较发现，在亚剂量 TC 胁迫下，受体菌株吸收源于不同供体的抗性质粒的频率最低（t 检验，$P<0.01$，图 1）. 在此胁迫条件下，铜绿假单胞菌和受体菌株之间的抗性传递频率介于 0.000 3 ~ 0.003 3 之间（图 4）；大肠杆菌与受体菌株之间的抗性传递频率介于 0.000 5 ~ 0.004 2 之间（图 4）. 铜绿假单胞菌和受体菌株之间的抗性质粒传递频率在亚剂量 TC 胁迫下与背景值无显著差异（t 检验，$P>0.05$）. 当 TC 质量浓度低于 0.003 mg·L^{-1}时，大肠杆菌供体与大肠杆菌受体菌株之间接合转移频率与背景值无显著差异（t 检验，$P>0.05$）；当 TC 质量浓度高于 0.003 mg·L^{-1}时，接合转移频率存在显著的降低[t 检验，$P<0.01$，图 4(b)]. 在各胁迫质量浓度下，检测误差多超过 0.95 置信区间范围 [图 4(a)].

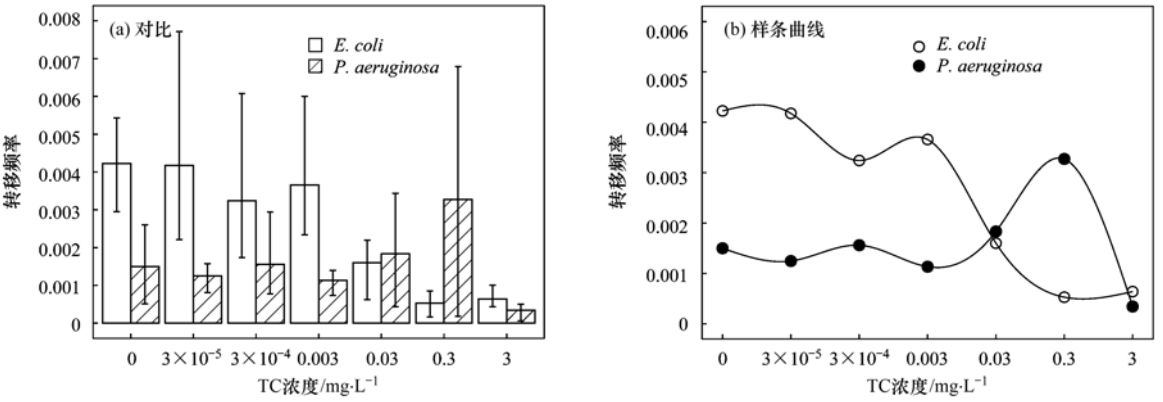


图 4　TC 对接合转移诱导作用对比和样条曲线

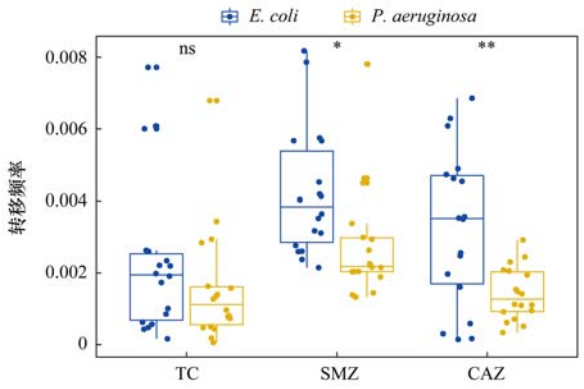
Fig. 4　Bar chart and splines to compare of the induction of TC on conjugation

综上，在亚剂量 SMZ、CAZ 或 TC 胁迫下，受体和不同供体发生 ESBL 编码质粒接合传递的频率符合相同的分布（Wilcoxon，$P>0.05$），证明大肠杆菌受体使用相似的机制接受不同供体的 ESBL 编码质粒. 在亚剂量 SMZ 或 CAZ 胁迫下，相较于铜绿假单胞菌和大肠杆菌受体之间的抗性质粒转移，供受体均为大肠杆菌时两者之前更易发生抗性质粒的接合转移（t 检验，$P<0.01$，图 5）. 当 TC 质量浓度范围在 0 ~ 3 mg·L^{-1}之间变化，铜绿假单胞菌和大肠杆菌受体之间的抗性质粒转移频率与供受体均为大肠杆菌时的质粒转移频率无显著差异（t 检验，$P>0.05$，图 5）；当 TC 质量浓度不高于 0.003 mg·L^{-1}，供受体均为大肠杆菌时两者之前更易发生抗性质粒的接合转移（t 检验，$P<0.01$）.

2.3　多种亚剂量抗生素对铜绿假单胞菌与受体菌株间接合转移的协同影响

根据 2.2 节的结果，本节设计了两组 Box-Behnken 响应面分析实验. 实验方案和检测结果如表 2 和表 3 所示.

响应面分析结果表明，当 TC 质量浓度低于 0.03 mg·L^{-1}，CAZ 质量浓度低于 0.002 mg·L^{-1}时，均值模型具有最佳的拟合效果（ANOVA，$P<$



ns 为 $P>0.05$, * 为 $P<0.05$, ** 为 $P<0.01$

图 5 受体接受来自不同供体的质粒的能力比较

Fig. 5 Comparison of the ability of recipients to accept plasmids from different donors

0.01),此时亚剂量 TC、SMZ 和 CAZ 对铜绿假单胞菌与受体菌株间抗性质粒接合转移频率没有显著的影响;接合转移频率与背景值接近.

当 TC 质量浓度高于 0.03 mg·L^{-1},CAZ 质量浓度高于 0.002 mg·L^{-1}时,二次型具有最佳的拟合效果($P<0.01$). ANOVA 结果认为,此时 TC 对接合传递频率影响最为显著(ANOVA,$P<0.01$),剂量-效应呈现符合二次多项式的"抛物线型"促进-抑制特点(ANOVA,$P<0.01$). TC 与 SMZ、CAZ 的交互作用均不显著(ANOVA,$P>0.05$),可认为 TC 对接合转移频率的影响具有相对独立性. CAZ 对接合传递同样具有显著影响(ANOVA,$P<0.01$),剂量-效应同样呈现"抛物线型"促进-抑制特点(ANOVA,$P<$

表 2 TC 质量浓度低于 0.03 mg·L^{-1},CAZ 质量浓度低于 0.002 mg·L^{-1}时 Box-Behnken 响应面分析实验设计表及结果

Table 2 Design table and results of Box-Behnken response surface analysis with concentrations of TC lower than 0.03 mg·L^{-1} and CAZ lower than 0.002 mg·L^{-1}

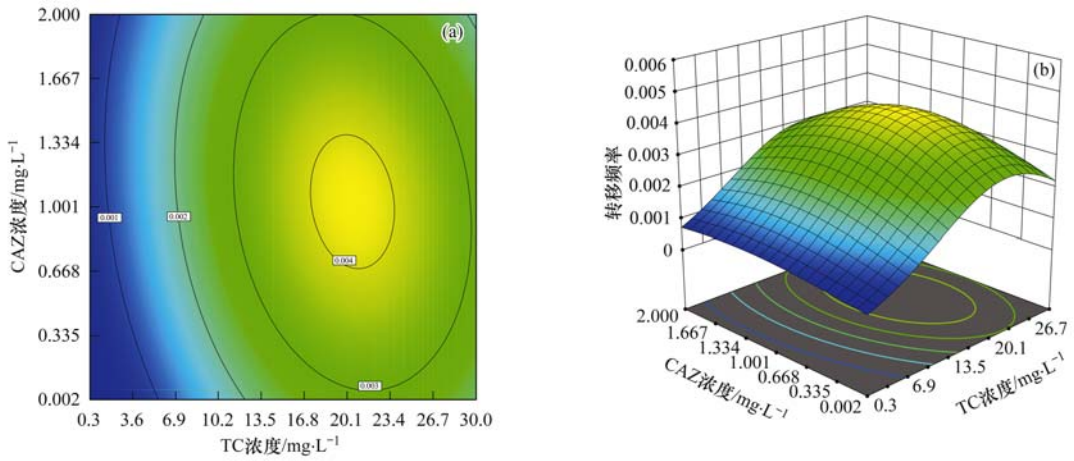
标准序次	实验序次	TC/mg·L^{-1}	SMZ/mg·L^{-1}	CAZ/mg·L^{-1}	转移频率
15	1	0.015 015	0.001 65	0.001 001	0.013 8
13	2	0.015 015	0.001 65	0.001 001	0.009 1
1	3	3E−05	0.000 3	0.001 001	0.010 2
3	4	3E−05	0.003	0.001 001	0.019 5
10	5	0.015 015	0.003	2E−06	0.017 4
5	6	3E−05	0.001 65	2E−06	0.016 4
8	7	0.03	0.001 65	0.002	0.020 4
4	8	0.03	0.003	0.001 001	0.014 5
11	9	0.015 015	0.0003	0.002	0.012 5
12	10	0.015 015	0.003	0.002	0.013 9
7	11	3E−05	0.001 65	0.002	0.038 9
6	12	0.03	0.001 65	2E−06	0.012 4
14	13	0.015 015	0.001 65	0.001 001	0.018 7
9	14	0.015 015	0.000 3	2E−06	0.018 3
2	15	0.03	0.000 3	0.001 001	0.016 5

表 3 TC 质量浓度高于 0.03 mg·L^{-1},CAZ 质量浓度高于 0.002 mg·L^{-1}时 Box-Behnken 响应面分析实验设计表及结果

Table 3 Design table and results of Box-Behnken response surface analysis with concentrations of TC higher than 0.03 mg·L^{-1} and CAZ higher than 0.002 mg·L^{-1}

标准序次	实验序次	TC/mg·L^{-1}	SMZ/mg·L^{-1}	CAZ/mg·L^{-1}	转移频率
12	1	15.15	300	2	0.001 7
4	2	30	300	1.001	0.002 7
9	3	15.15	0.03	0.002	0.001 7
5	4	0.3	150.015	0.002	0.000 5
13	5	15.15	150.015	1.001	0.003 7
10	6	15.15	300	0.002	0.003 1
6	7	30	150.015	0.002	0.002 2
14	8	15.15	150.015	1.001	0.004 6
2	9	30	0.03	1.001	0.003 3
3	10	0.3	300	1.001	0.000 5
7	11	0.3	150.015	2	0.000 7
11	12	15.15	0.03	2	0.005 4
8	13	30	150.015	2	0.001 6
15	14	15.15	150.015	1.001	0.002 6
1	15	0.3	0.03	1.001	0.001 1

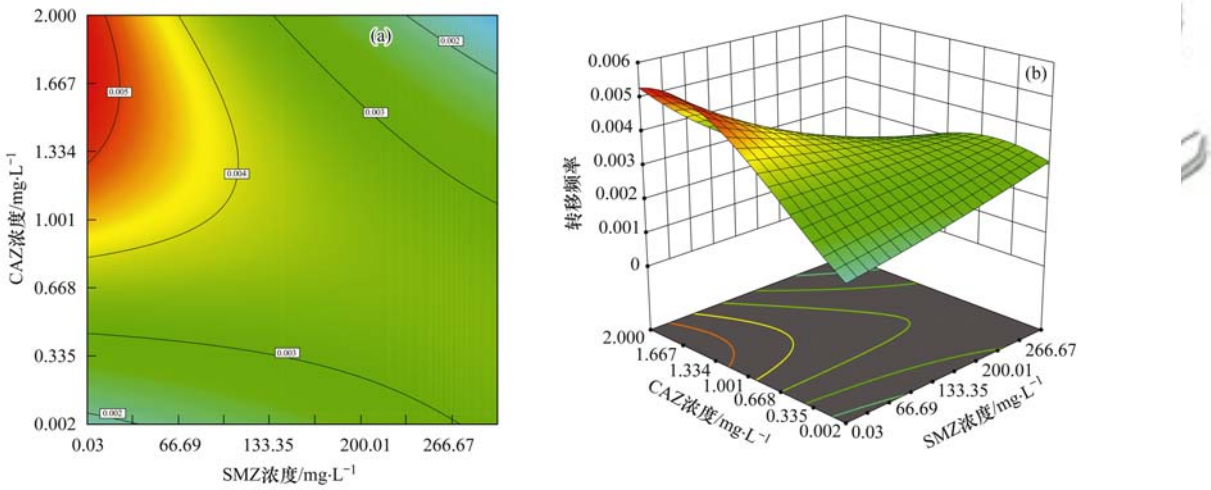
0.01). SMZ 对接合传递频率呈现微弱的“线性抑制”(ANOVA, $P = 0.04$), 同时 SMZ 与 CAZ 存在极显著的交互作用(ANOVA, $P < 0.01$), 剂量-效应呈现“抑制”. 响应面分析结果如图 6 和图 7 所示.



(a)等高线图; (b)三维图

图 6　暴露于 TC 和 CAZ 下, 铜绿假单胞菌和受体之间接合转移的剂量-效应曲面

Fig. 6　Dose-response surface of conjugation between *P. aeruginosa* and recipients under exposure of TC and CAZ



(a)等高线图; (b)三维图

图 7　暴露于 SMZ 和 CAZ 下, 铜绿假单胞菌和受体之间接合转移的剂量-效应曲面

Fig. 7　Dose-response surface of conjugation between *P. aeruginosa* and recipients under exposure of SMZ and CAZ

TC、SMZ 和 CAZ 之间的协同作用, 可以显著提升受体菌株的抗性, 使其可暴露于超过 MIC 水平的抗生素下依旧存活. 当 TC 和 CAZ 剂量达到 5 倍 MIC 的水平时, 仍可检测到显著的抗性质粒传递. 上述结果表明无 ESBL 合成能力的大肠杆菌菌株具备在高质量浓度抗生素胁迫下接收铜绿假单胞菌输出的 ESBL 编码质粒从而增强抗药性的能力, 揭示了铜绿假单胞菌在环境细菌抗药性增强过程中起到的关键作用.

2.4　多种亚剂量抗生素对大肠杆菌与受体菌株间接合转移的协同影响

与 2.3 节类似, 本节设计了两组 Box-Behnken 响应面分析实验. 实验方案和检测结果如表 4 和表 5 所示.

当 TC 质量浓度低于 0.03 mg·L^{-1}, CAZ 质量浓度低于 0.002 mg·L^{-1}时, 二次型具有最佳的拟合效果($P < 0.01$). ANOVA 结果认为, 此时 TC 对接合传递频率影响最为显著(ANOVA, $P < 0.01$), 剂量-效应总体呈现线性抑制(ANOVA, $P < 0.01$), 同时伴随着较微弱的抛物线型“抑制-促进”效应(ANOVA, $P = 0.04$). TC 与 SMZ、CAZ 的交互作用均不显著(ANOVA, $P > 0.05$), 一样可认为 TC 对接合转移频率的影响具有相对独立性. SMZ、CAZ 均对接合传递频率无显著影响(ANOVA, $P > 0.05$), 与 2.2 节类似. 响应面由图 8 所示.

综上, 当 TC 质量浓度低于 0.03 mg·L^{-1}, CAZ 质量浓度低于 0.002 mg·L^{-1}时, TC 对大肠杆菌供受体之间 ESBL 编码质粒传递频率具有最显著的

表 4 TC 质量浓度低于 0.03 mg·L^{-1},CAZ 质量浓度低于 0.002 mg·L^{-1}时 Box-Behnken 响应面分析实验设计表及结果

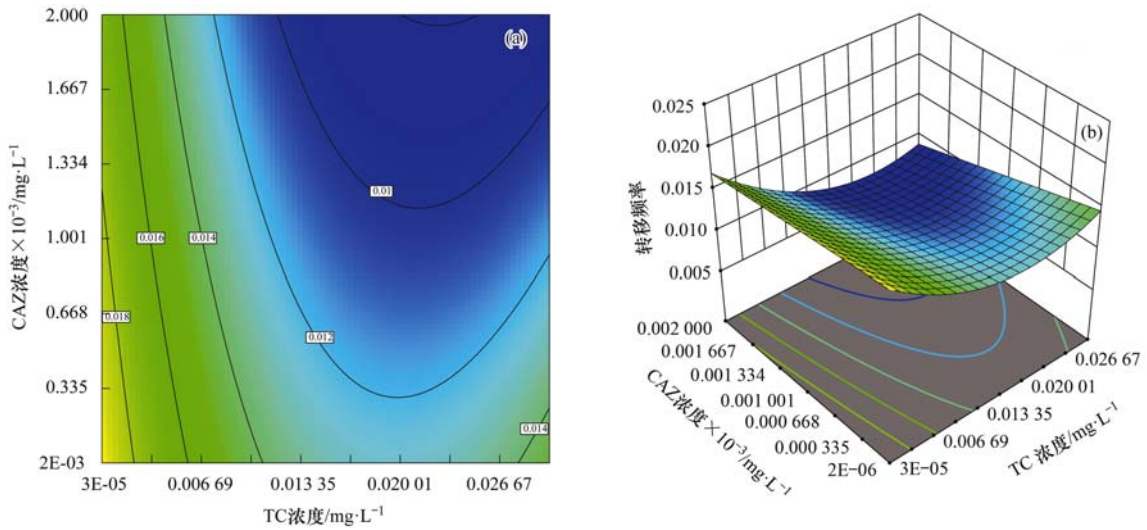
Table 4 Design table and results of Box-Behnken response surface analysis with concentrations of TC lower than 0.03 mg·L^{-1} and CAZ lower than 0.002 mg·L^{-1}

标准序次	实验序次	TC/mg·L^{-1}	SMZ/mg·L^{-1}	CAZ/mg·L^{-1}	转移频率
3	1	3E－05	0.3	0.001 001	0.012 6
8	2	0.03	0.150 15	0.002	0.009 8
9	3	0.015 015	0.000 3	2E－06	0.009 1
5	4	3E－05	0.150 15	2E－06	0.021 2
15	5	0.015 015	0.150 15	0.001 001	0.009 3
14	6	0.015 015	0.150 15	0.001 001	0.010 5
1	7	3E－05	0.000 3	0.001 001	0.023 0
10	8	0.015 015	0.3	2E－06	0.014 3
12	9	0.015 015	0.3	0.002	0.010 3
2	10	0.03	0.000 3	0.001 001	0.009 5
11	11	0.015 015	0.000 3	0.002	0.010 1
13	12	0.015 015	0.150 15	0.001 001	0.013 3
6	13	0.03	0.150 15	2E－06	0.018 2
7	14	3E－05	0.150 15	0.002	0.016 3
4	15	0.03	0.3	0.001 001	0.009 6

表 5 TC 质量浓度高于 0.03 mg·L^{-1},CAZ 质量浓度高于 0.002 mg·L^{-1}时 Box-Behnken 响应面分析实验设计表及结果

Table 5 Design table and results of Box-Behnken response surface analysis with concentrations of TC higher than 0.03 mg·L^{-1} and CAZ higher than 0.002 mg·L^{-1}

标准序次	实验序次	TC/mg·L^{-1}	SMZ/mg·L^{-1}	CAZ/mg·L^{-1}	转移频率
3	1	0.03	300	1.001	0.001 6
9	2	15.001 5	3	0.002	0.031 7
15	3	15.001 5	151.5	1.001	0.002 0
13	4	15.001 5	151.5	1.001	0.004 1
10	5	15.001 5	300	0.002	0.001 2
8	6	30	151.5	2	0.002 9
7	7	0.03	151.5	2	0.002 6
11	8	15.001 5	3	2	0.002 6
5	9	0.03	151.5	0.002	0.001 8
4	10	30	300	1.001	0.002 8
6	11	30	151.5	0.002	0.001 9
1	12	0.03	3	1.001	0.000 9
12	13	15.001 5	300	2	0.000 2
14	14	15.001 5	151.5	1.001	0.000 7
2	15	30	3	1.001	0.033 2



(a)等高线图;(b)三维图

图 8 在暴露于 TC 和 CAZ 的情况下,大肠杆菌和受体之间接合转移的剂量-效应曲面

Fig. 8 Dose-response surface of conjugation between *E. coli* and recipients under exposure of TC and CAZ

调节作用,剂量-效应主要呈现为“抑制”,与图 4(b)趋势一致. CAZ 对于调节大肠杆菌供受体之间 ESBL 编码质粒传递频率无显著作用,说明 β-内酰胺类抗生素胁迫不必然影响 ESBL 编码质粒的传递扩散,揭示了抗生素与抗性基因之间复杂的关系.

当 TC 质量浓度高于 0.03 mg·L^{-1},CAZ 质量浓度高于 0.002 mg·L^{-1}时,均值模型具有最佳的拟合效果(ANOVA,$P < 0.01$),转移频率显著低于背景值. 这说明高质量浓度(接近和超过 MIC)的 TC、SMZ、CAZ 对大肠杆菌供受体菌株间抗性质粒接合转移频率具有强烈的抑制作用,作用原理为强烈抑制大肠杆菌受体的生长繁殖. ESBL 编码质粒在大肠杆菌菌株之间的扩散只可在亚剂量抗生素胁迫下显著发生.

3　讨论

3.1　ESBL 编码质粒在亚剂量抗生素胁迫下的接合传递特点

携带高丰度耐药性基因的质粒通常具有较高的“适应性代价”[24],具体表现为在低胁迫条件下,耐药性细菌的生长速率显著低于野生型细菌. 然而本研究发现,从医院废水中分离获得的可合成 ESBL 的铜绿假单胞菌和大肠杆菌供体,其 ESBL 编码质粒可在极低质量浓度抗生素胁迫甚至无抗生素胁迫下发生水平迁移和垂直迁移,说明 ESBL 编码质粒的“适应性代价”较低. 低“适应度代价”的抗性基因能更稳定地存在于细菌基因组中,对于耐药性扩散具有更大的风险.

抗生素对接合转移的作用效果受到包括供受体菌株、抗性质粒结构、培养环境和计数方法等因素的复杂影响,因此不同研究报道的亚 MIC 水平抗生素对接合转移的影响特性,具有很大差异. 例如,已有研究证实了亚 MIC 水平的环丙沙星可显著促进接合转移[23],但是 Jutkina 等[18]的研究显示亚 MIC 水平的环丙沙星对接合转移并无显著的诱导促进作用. 本研究未发现亚 MIC 水平的四环素对 ESBL 编码质粒的接合转移有显著的诱导促进作用,这与文献[20]存在矛盾. 当 ESBL 编码质粒的供体为铜绿假单胞菌时, 5 倍 MIC 水平的 TC 和 CAZ 共同暴露可显著提升接合转移的频率,剂量-效应关系与文献[20]接近. 因此,亚 MIC 水平可能并不是抗生素显著诱导促进接合转移的充分必要条件. 诱导抗生素与接合转移频率之间的剂量-效应关系具有一定的不一致性.

由于接合转移是耐药性扩散的重要途径,抑制该过程被视为是控制耐药基因在环境微生物间扩散的有效途径[25]. 抑制原理可分为特异性和非特异性:非特异性抑制作用抑制了细菌的生长繁殖,使得可接受抗性质粒的野生型细菌数量显著减少. 当 TC 和 CAZ 质量浓度接近大肠杆菌受体 MIC 时所造成的抗性质粒接合转移频率相较于背景值的显著下降,就属于非特异性抑制,因为在该质量浓度的胁迫下,大肠杆菌受体的生长繁殖受到了显著抑制. 除典型抗生素和杀菌剂外,Kwapong 等[26]的研究发现亚剂量异硫氰酸酯在质量浓度接近 MIC 时可对接合转移过程产生非特异性的抑制作用. 特异性抑制指在不抑制受体细菌生长繁殖的前提下,对质粒 DNA 的复制和转录,或者对质粒接合转移系统的抑制作用. 已有研究发现 2-十六烷酸可以与第四分泌系统(T4SS)的 ATP 酶 TrwD 共价结合,特异性抑制质粒的接合转移过程[27]. 当 ESBL 编码质粒的供体为大肠杆菌时,本研究发现了 TC 在低于 MIC 两个数量级的亚剂量胁迫下,ESBL 编码质粒的接合转移受到了显著抑制(图 8). TC 对接合转移的抑制机制未见文献详述,可能与抑制 T4SS 结构蛋白或与之密切联系的 ATP 酶的合成有关. 因此,本研究发现了 TC 对于 ESBL 编码质粒的接合转移同时存在促进和抑制的机制:低于 MIC 时相对背景值呈现抑制作用(图 8),高于 MIC 一定范围时相较于 MIC 呈现相对的促进-抑制作用(图 6 和图 7).

3.2　临床废水对环境微生物抗药性扩散的危害

临床废水对于环境细菌耐药性增强与扩散具有重要的影响作用. 临床废水中携带的耐药性菌株随着地表和地下径流进入河流、水库等自然水体中,其耐药性基因丰度可能会产生两种变化方向:一是由于自然水体中抗生素质量浓度低于临床废水,耐药性基因在“适度性代价”的影响下丰度降低; 二是在自然水体中稳定存在并发生水平和垂直转移,后者将导致耐药基因在自然水体宏基因组中的比重不断增加.

中国是抗生素使用大国,亚 MIC 水平的抗生素残留陆续在各重要河流和水库中被检出. 近年来,杨俊[28]的研究发现,苏州市不同功能区的河湖水环境最主要的抗生素污染为四环素类(13.41 ~ 1 322.0 ng·L^{-1})和喹诺酮类(8.07 ~ 805.11 ng·L^{-1}),Jiang 等[29]发现喹诺酮类(n.d ~ 362.69 ng·L^{-1}, n.d 指未检出)和 β-内酰胺类(n.d ~ 404.81 ng·L^{-1})为青草沙水库中主要残留抗生素. 此外,亚 MIC 水平的喹诺酮类、磺胺类和四环素类抗生素在东江流域也被检出[30]. 除中国外,Tran 等[31]通过对河内的主要湖泊检测,同样发现了较低质量浓度的喹诺酮类抗生素残留(<100 ng·L^{-1}), 而四环素类和 β-内酰胺

类抗生素残留则极少被检测到. 亚 MIC 水平的抗生素对耐药性基因扩散具有重要作用:一是亚 MIC 水平的抗生素具有筛选富集耐药性突变细菌的作用;二是亚 MIC 水平的抗生素作为一种诱导物质,可诱导包括接合转移在内的各类基因水平迁移、耐药性突变以及同源重组过程.

作为 ESBL 编码质粒供体的铜绿假单胞菌和大肠杆菌,均具备在上述河湖水环境中稳定存活并保持 ESBL 的表达能力. 以磺胺类和四环素类为例,在苏州河库、长江口和东江等中国重要水体中残留的磺胺类和四环素类含量,大多低于受体大肠杆菌细胞对应 MIC 值的千分之一[32]. 在该质量浓度的胁迫下,ESBL 编码质粒将以较高的频率在大肠杆菌细胞之间,或铜绿假单胞菌与大肠杆菌之间,发生接合传递,使受体菌株增强对 β-内酰胺类抗生素的抗药性. 本研究未使用喹诺酮类抗生素诱导接合转移,但是已有研究发现,低于 1/8 MIC 水平的环丙沙星可显著提高大肠杆菌细胞通过接合转移接受外源质粒的频率[23]. 包括环丙沙星在内的喹诺酮类抗生素在自然水体中被广泛检出,这为水体细菌获得 ESBL 编码质粒提供了良好的条件. 铜绿假单胞菌是自然水体中耐药性基因的主要携带者之一,并且由于适应能力极强,在自然水体中广泛分布. 本研究发现,在接近 MIC 甚至超过 MIC 的抗生素质量浓度胁迫下,受体大肠杆菌仍可以从铜绿假单胞菌获得 ESBL 编码质粒. 上述结果发现了铜绿假单胞菌在提高环境细菌耐受高质量浓度的抗生素冲击负荷的作用. 此外,接合转移并不是 ESBL 基因水平传递的唯一途径,因接合转移常常与整合子迁移紧密联系在一起[33]. 两者的接合会导致 ESBL 基因水平迁移的频率上升,加速 β-内酰胺类抗生素抗药性的扩散.

4 结论

(1)ESBL 编码质粒具有较低的“适应性代价”,可在极低抗生素胁迫下稳定存在和发生菌株间接合传递,传递过程不受亚剂量 SMZ 胁迫的显著影响.

(2)亚剂量抗生素胁迫下,相较于铜绿假单胞菌供体,大肠杆菌供体更易将 ESBL 编码质粒接合传递至大肠杆菌受体.

(3)亚 MIC 的 TC、SMZ、CAZ 单一暴露和共同暴露均未对铜绿假单胞菌与大肠杆菌间 ESBL 编码质粒的接合传递起到显著的调节作用; 5 倍 MIC 水平的 TC、CAZ 共同暴露对铜绿假单胞菌与大肠杆菌间接合转移有显著的诱导作用.

(4)大肠杆菌供受体之间发生的 ESBL 编码质粒接合传递受到 TC 和 CAZ 的调节; 显著的接合转移过程仅发生在 TC 质量浓度低于 0.03 mg·L^{-1}, CAZ 质量浓度低于 0.002 mg·L^{-1}时,并可被 TC 显著抑制.

致谢:本研究在新加坡国立大学(National University of Singapore, NUS)完成. 作者感谢 Department of Civil and Environmental Engineering 的李文譞博士和毛飞剑博士在实验编排上提供的帮助,Lim Jit Xin 在实验仪器准备方面提供的大量帮助. 感谢上海交通大学的张小凡、张波和李彭老师提供的指导与帮助.

参考文献:

[1] Haller L, Chen H J, Ng C, *et al*. Occurrence and characteristics of extended-spectrum β-lactamase- and carbapenemase- producing bacteria from hospital effluents in Singapore[J]. Science of the Total Environment, 2018, **615**: 1119-1125.

[2] Lerminiaux N A, Cameron A D S. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2019, **65**(1): 34-44.

[3] 吴韵斐, 何义亮, 袁其懿, 等. 水源型水库抗生素抗性基因赋存特征研究[J]. 环境科学学报, 2019, **39**(6): 1834-1841.
Wu Y F, He Y L, Yuan Q Y, *et al*. Study on antibiotic resistance genes characteristics in a drinking water reservoir[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2019, **39**(6): 1834-1841.

[4] 江月, 陈奕涵, 何义亮. 长江下游某水源型水库抗生素抗性基因污染研究[J]. 环境科学学报, 2018, **38**(3): 884-891.
Jiang Y, Chen Y H, He Y L. Study on antibiotic resistance genes contamination in a reservoir located at Yangtze River downstream[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2018, **38**(3): 884-891.

[5] Chen Y H, Su J Q, Zhang J Y, *et al*. High-throughput profiling of antibiotic resistance gene dynamic in a drinking water river-reservoir system[J]. Water Research, 2019, **149**: 179-189.

[6] Li P, Wu Y F, He Y L, *et al*. Occurrence and fate of antibiotic residues and antibiotic resistance genes in a reservoir with ecological purification facilities for drinking water sources[J]. Science of the Total Environment, 2020, **707**: 135276.

[7] Le T H, Ng C, Tran N H, *et al*. Removal of antibiotic residues, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in municipal wastewater by membrane bioreactor systems[J]. Water Research, 2018, **145**: 498-508.

[8] 姚鹏城, 陈嘉瑜, 张永明, 等. 废水处理系统中抗生素抗性基因分布特征[J]. 环境科学, 2019, **40**(11): 5024-5031.
Yao P C, Chen J Y, Zhang Y M, *et al*. Distribution characteristics of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plants[J]. Environmental Science, 2019, **40**(11): 5024-5031.

[9] Yu K F, Li P, Chen Y H, *et al*. Antibiotic resistome associated with microbial communities in an integrated wastewater reclamation system[J]. Water Research, 2020, **173**: 115541.

[10] Zhu Y G, Zhao Y, Li B, *et al*. Continental-scale pollution of estuaries with antibiotic resistance genes[J]. Nature Microbiology, 2017, **2**(4): 16270.

[11] Zhao Y, Cocerva T, Cox S, *et al*. Evidence for co-selection of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in metal polluted urban soils[J]. Science of the Total Environment, 2019, **656**: 512-520.

[12] Zhou X, Qiao M, Su J Q, *et al*. High-throughput characterization of antibiotic resistome in soil amended with commercial organic fertilizers [J]. Journal of Soils and Sediments, 2019, **19**(2): 641-651.

[13] Qian X, Gu J, Sun W, *et al*. Diversity, abundance, and persistence of antibiotic resistance genes in various types of animal manure following industrial composting [J]. Journal of Hazardous Materials, 2018, **344**: 716-722.

[14] Hashemizadeh Z, Kalantar-Neyestanaki D, Mansouri S. Clonal relationships, antimicrobial susceptibilities, and molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections and fecal samples in Southeast Iran[J]. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2018, **51**(1): 44-51.

[15] 黄福义, 杨凯, 张子兴, 等. 微塑料对河口沉积物抗生素抗性基因的影响[J]. 环境科学, 2019, **40**(5): 2234-2239.
Huang F Y, Yang K, Zhang Z X, *et al*. Effects of microplastics on antibiotic resistance genes in estuarine sediments [J]. Environmental Science, 2019, **40**(5): 2234-2239.

[16] Lopatkin A J, Huang S Q, Smith R P, *et al*. Antibiotics as a selective driver for conjugation dynamics [J]. Nature Microbiology, 2016, **1**(6): 16044.

[17] Blázquez J, Rodríguez-Beltrán J, Matic I. Antibiotic-induced genetic variation: how it arises and how it can be prevented[J]. Annual Review of Microbiology, 2018, **72**: 209-230.

[18] 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, **616-617**: 172-178.

[19] 赖晓琳, 吴平霄, 阮博. 四环素对大肠杆菌抗生素抗性基因进化的影响[J]. 环境科学学报, 2019, **39**(8): 2475-2482.
Lai X L, Wu P X, Ruan B. Evolution of antibiotic resistance genes in *E. coli* by tetracycline [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2019, **39**(8): 2475-2482.

[20] Jutkina J, Rutgersson C, Flach C F, *et al*. An assay for determining minimal concentrations of antibiotics that drive horizontal transfer of resistance [J]. Science of the Total Environment, 2016, **548-549**: 131-138.

[21] 陈景阳, 夏慧, 黄魁, 等. 四环素对污泥蚯蚓粪中微生物种群和抗性基因的影响[J]. 环境科学, 2019, **40**(7): 3263-3269.
Chen J Y, Xia H, Huang K, *et al*. Effects of tetracycline on microbial communities and antibiotic resistance genes of vermicompost from dewatered sludge [J]. Environmental Science, 2019, **40**(7): 3263-3269.

[22] 张海丰, 史明明, 孙艳梅, 等. 磺胺甲噁唑污染土壤中微生物群落结构与抗生素抗性基因的分布特征[J]. 环境科学, 2019, **40**(10): 4678-4684.
Zhang H F, Shi M M, Sun Y M, *et al*. Microbial community structure and the distribution of antibiotic resistance genes in soil contaminated by sulfamethoxazole[J]. Environmental Science, 2019, **40**(10): 4678-4684.

[23] E S M, Zeng J M, Yuan H, *et al*. Sub-inhibitory concentrations of fluoroquinolones increase conjugation frequency[J]. Microbial Pathogenesis, 2018, **114**: 57-62.

[24] San M A. Evolution of plasmid-mediated antibiotic resistance in the clinical context[J]. Trends in Microbiology, 2018, **26**(12): 978-985.

[25] Cabezón E, De La Cruz F, Arechaga I. Conjugation inhibitors and their potential use to prevent dissemination of antibiotic resistance genes in bacteria [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, **8**: 2329.

[26] Kwapong A A, Stapleton P, Gibbons S. Inhibiting plasmid mobility: the effect of isothiocyanates on bacterial conjugation [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2019, **53**(5): 629-636.

[27] García-Cazorla Y, Getino M, Sanabria-Ríos D J, *et al*. Conjugation inhibitors compete with palmitic acid for binding to the conjugative traffic ATPase TrwD, providing a mechanism to inhibit bacterial conjugation[J]. Journal of Biological Chemistry, 2018, **293**(43): 16923-16930.

[28] 杨俊. "城-郊"梯度水环境中典型污染物赋存特征研究——以苏州市为例[D]. 上海: 上海交通大学, 2019. 56-82.
Yang J. Occurrence characteristics of typical contaminants in the aquatic environment under "urban-rural" gradient—a case study of Suzhou city[D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2019. 56-82.

[29] Jiang Y, Xu C, Wu X Y, *et al*. Occurrence, seasonal variation and risk assessment of antibiotics in qingcaosha reservoir[J]. Water, 2018, **10**(2): 115.

[30] Chen Y H, Chen H J, Zhang L, *et al*. Occurrence, distribution, and risk assessment of antibiotics in a subtropical river-reservoir system[J]. Water, 2018, **10**(2): 104.

[31] Tran N H, Hoang L, Nghiem L D, *et al*. Occurrence and risk assessment of multiple classes of antibiotics in urban canals and lakes in Hanoi, Vietnam[J]. Science of the Total Environment, 2019, **692**: 157-174.

[32] 江月. 长江下游某水源型水库抗生素与抗性基因赋存特征与风险评价[D]. 上海: 上海交通大学, 2018. 24-37.
Jiang Y. The occurrence and risk assessment of antibiotic and antibiotic resistant genes in a reservoir located at Yangtze river [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2018. 24-37.

[33] Dionisio F, Zilhão R, Gama J A. Interactions between plasmids and other mobile genetic elements affect their transmission and persistence[J]. Plasmid, 2019, **102**: 29-36.

HUANJING KEXUE

Environmental Science (monthly)

Vol. 41 No. 8

Aug. 15, 2020

CONTENTS

Comparison Analysis of the Effect of Emission Reduction Measures for Major Events and Heavy Air Pollution in the Capital …… ZHONG Yi-sheng, ZHOU Ying, CHENG Shui-yuan, *et al.* (3449)

Evaluation of Different ISORROPIA-Ⅱ Modes and the Influencing Factors of Aerosol pH Based on Tianjin Online Data …… GAO Jie, SHI Xu-rong, WEI Yu-ting, *et al.* (3458)

Emission Characteristics of Particulate Organic Matter from Cooking …… LI Yuan-ju, WU Ai-hua, TONG Meng-xue, *et al.* (3467)

Characteristics and Sources of 12 Trace Amount Elements in $PM_{2.5}$ During a Period of Heavy Pollution in Huanggang, Central China …… CHEN Zhan-le, TIAN Qian, MAO Yao, *et al.* (3475)

Aerosol Optical Properties over the Ebinur Region …… ZHANG Zhe, DING Jian-li, WANG Jin-jie (3484)

Characteristics of Secondary Organic Particles and the Potential Formation of SOA from VOCs During Wintertime Heavy Pollution Episodes in Tianjin …… XU Hong, TANG Miao, XIAO Zhi-mei, *et al.* (3492)

Characteristics and Source Apportionment of VOCs at Different Pollution Levels During the Winter in an Urban Area in Zhengzhou …… LI Yi-dan, YIN Sha-sha, ZHANG Rui-qin, *et al.* (3500)

Emission Inventory of Intermediate Volatility Organic Compounds(IVOCs) from Biomass Burning in the Yangtze River Delta During 2010-2018 …… ZHU Yong-hui, WANG Qian, HUANG Ling, *et al.* (3511)

Emission Characteristics of Biogenic Volatile Compounds (BVOCs) from Common Greening Tree Species in Northern China and Their Correlations with Photosynthetic Parameters …… XU Yan, LI Shuang-jiang, YUAN Xiang-yang, *et al.* (3518)

Characteristics of Surface Ozone and Impact Factors at Different Station Types During the Autumn in Guangzhou …… GAO Ping, ZHUANG Li-yue, WANG Long, *et al.* (3527)

Pollution Characteristics and Sensitivity Analysis of Atmospheric Ozone in Taian City …… LI Kai, LIU Min, MEI Ru-bo (3539)

Pollution Characteristics and Health Risk Assessment of Heavy Metals in Road Dust from Non-ferrous Smelting Parks …… FENG Yu-yao, SHI Jian-wu, ZHONG Yao-qian, *et al.* (3547)

Pollution and Source Analysis of Heavy Metal in Surface Dust from Xi'an University Campuses …… FAN Xin-yao, LU Xin-wei, LIU Hui-min, *et al.* (3556)

Monitoring Method of Total Particulate Matter in Ultra-low-emission and High-humidity Exhaust Gas from Stationary Sources and an Actual Test in a Gas Power Plant …… HU Yue-qi, YAN Xu, KONG Chuan, *et al.* (3563)

Vessels' Air Pollutant Emissions Inventory and Emission Characteristics in the Xiamen Emission Control Area …… WANG Jian, HUANG Zhi, LIU Yan-ying, *et al.* (3572)

Method for High-resolution Emission Inventory for Road Vehicles in Chengdu Based on Traffic Flow Monitoring Data …… PAN Yu-jin, LI Yuan, CHEN Jun-hui, *et al.* (3581)

Inversion of Water Quality Parameters Based on UAV Multispectral Images and the OPT-MPP Algorithm …… HUANG Xin-xi, YING Han-ting, XIA Kai, *et al.* (3591)

Effects of Different Water Stratification on the Vertical Distribution of Nitrogen in Sediment Interstitial Waters: A Case Study of the Three Gorges Reservoir and Xiaowan Reservoir …… LIU Jing-si, ZHU Xiao-sheng, HU Zi-long, *et al.* (3601)

Pollution Status and Pollution Behavior of Microplastic in Surface Water and Sediment of Urban Rivers …… ZHAO Xin, CHEN Hao, JIA Qi-long, *et al.* (3612)

Spatial and Temporal Variation of Phytoplankton Community Structure and Its Influencing Factors in Shanghai River Channels …… XU Zhi, CHEN Xiao-hua, SHEN Gen-xiang, *et al.* (3621)

Restoration of River Sediment by Calcium Peroxide(CaO_2) Combined with Biochar …… LI Yu-ping, JIANG Ying-ying, LIU Bao-ming, *et al.* (3629)

Quantification of Nitrate Sources to Groundwater in Karst Trough-valley Areas Based on Dual Stable Isotopes of $\delta^{15}N\text{-}NO_3^-$ and $\delta^{18}O\text{-}NO_3^-$ and the IsoSource Model …… XU Lu, JIANG Yong-jun, DUAN Shi-hui, *et al.* (3637)

Dynamic Process of Nitrogen and Phosphorus Export and Loss Load in an Intensive Orchard with Ridge and Furrow Plantation in the Three Gorges Reservoir Area …… YAN Kun, WANG Yu-kuan, LIU Qin, *et al.* (3646)

Analysis of Rainfall Runoff Pollution and Pollution Load Estimation for Urban Communities in a Highly Urbanized Region …… GAO Bin, XU You-peng, LU Miao, *et al.* (3657)

Adsorption of As(Ⅲ) in Water by Iron-loaded Graphene Oxide-Chitosan …… ZHAO Chao-ran, SHAN Hui-mei, ZENG Chun-ya, *et al.* (3665)

Sorption Behaviors of Copper Ions and Tetracycline on Microplastics in Aqueous Solution …… XUE Xiang-dong, WANG Xing-yuan, MEI Yu-chen, *et al.* (3675)

Effect of Porous Fillers Properties on Biofilm Growth …… JIANG Yu-qin, LI Jiong-hui, FANG Zhi-guo (3684)

Adaptability of Nitrifying Biofilm Systems to Low Temperature: MBBR and IFAS …… LI Ren, YU Li-fang, ZHANG Xing-xiu, *et al.* (3691)

Improved on Nitrogen Removal of Anaerobic Ammonia Oxidation by Coupling Element Sulfur-based Autotrophic Short-cut Denitrification … FANG Wen-ye, LI Xiang, HUANG Yong, *et al.* (3699)

Nitrogen and Phosphorus Removal from Domestic Sewage Aerobic Granular Sludge Under Intermittent Gradient Aeration …… ZHANG Yu-jun, LI Dong, LI Shuai, *et al.* (3707)

Rapid Start-up and Stability of Partial Denitrification Based on Different Waste Sludge Sources …… ZHANG Xing-xing, WANG Chao-chao, WANG Yao, *et al.* (3715)

Decision-making Analysis of Excess Sludge Pretreatment for Struvite Recovery Based on AHP-PROMETHEE Ⅱ Method …… LIU Xiao-lei, LI An-jie (3725)

Effect on Ammonia Inhibition Mitigation in the Anaerobic Digestion Process with Zero-Valent Iron …… LIU Ji-bao, NIU Yu-tong, YU Da-wei, *et al.* (3731)

Performance of Anaerobic Membrane Bioreactors for the Co-digestion of Sewage Sludge and Food Waste …… DAI Jin-jin, NIU Cheng-xin, PAN Yang, *et al.* (3740)

Antibiotics Induce Horizontal Gene Transfer of Resistance at Sublethal Concentrations …… YUAN Qi-yi, CHEN Hong-jie, Laurence Haller, *et al.* (3748)

Impact of Tetracycline Antibiotic on the Transcriptional Expression of Tetracycline Resistance Genes in *Shigella flexneri* …… GAO Pin, RUAN Xiao-hui, QIU Wen-jie, *et al.* (3758)

Competitive Selection of Hydroxylamine on Ammonia Oxidizing Bacteria and Nitrite Oxidizing Bacteria …… QIAO Xin, WANG Bo, GUO Yuan-yuan, *et al.* (3765)

Analysis of the Effect of Temperature on the Microbial Flora Structure During the Nitrite Oxidation Process Using 16S rRNA High-throughput Sequencing …… HOU Xiao-wei, NIU Yong-jian, LI Wei-wei, *et al.* (3773)

Universality and Potential Application of Mn(Ⅱ) Oxidation Triggered by Microbial Interspecies Interactions …… NING Xue, LIANG Jin-song, BAI Yao-hui, *et al.* (3781)

Distribution and Potential Nitrification Rates of Aerobic Ammonia-Oxidizing Microorganisms in Surface Sediments of Mangrove in Sanya River …… LUO Qing, ZHEN Yu, PENG Zong-bo, *et al.* (3787)

Effects of Ozone Pollution on Growth, Yields, and Mineral Metallic Element Contents of Paddy Rice …… FANG Xiao-kun, LUO Xiao-san, ZHANG Dan, *et al.* (3797)

Short Term Effects of a Changing Carbon Input on the Soil Respiration of *Picea schrenkiana* Forests in the Tianshan Mountains, Xinjiang …… SHAO Kang, GONG Lu, HE Xue-min, *et al.* (3804)

Effects of the Combined Application of Organic and Inorganic fertilizers on N_2O Emissions from Saline Soil …… ZHOU Hui, SHI Hai-bin, GUO Jia-wei, *et al.* (3811)

Mechanism and Influencing Factors of Increasing Soil Temperature by *in-situ* Electrical Resistance Heating …… GE Song, MENG Xian-rong, XU Wei, *et al.* (3822)

Acid Mine Wasteland Reclamation by *Juncus ochraceus* Buchen as a Potential Pioneer Plant …… HUANG Jian-hong, FU Jiang-li, YAN Xin-rui, *et al.* (3829)

Effects of Drip Irrigation Patterns and Biochar Addition on Soil Mineral Nitrogen and Microbial Regulation of Greenhouse …… CAI Jiu-mao, LIU Jie-yun, QIU Hu-sen, *et al.* (3836)

Effects of Cotton Stalk Biochar on the Structure and Function of Fungi Community in Alkaline Rhizosphere Soil of Rice Under Cadmium Pollution …… LIU Shi-dou, HAN Yao-guang, ZHU Xin-ping, *et al.* (3846)

Effects of Different Treatments with Water Management Combined with Leaf Spraying Silicon Fertilizer on Cd Accumulation in Rice …… WEI Bin-yun, ZHOU Hang, LIU Jia-wei, *et al.* (3855)

Effects of Chelate GLDA on the Remediation of Cadmium Contaminated Farmland by *Pennisetum purpureum* Schum …… QIN Jian-jun, TANG Sheng-shuang, JIANG Kai, *et al.* (3862)

Situation Analysis and Trend Prediction of the Prevention and Control Technologies for Planting Non-Point Source Pollution …… YU Ying-liang, YANG Lin-zhang, LI Hong-na, *et al.* (3870)