沈洪艳,尹康年,王浩林,等.环境污染水平的抗生素对大肠杆菌的毒性与耐药性风险 [J]. 中国环境科学, 2025,45(7):4003-4011.
Shen H Y, Yin K N, Wang H L, et al. Toxicity and resistance risk of antibiotics to *Escherichia coli* based on the level of environmental pollution [J]. China Environmental Science, 2025,45(7):4003-4011.

环境污染水平的抗生素对大肠杆菌的毒性与耐药性风险

沈洪艳[1,2],尹康年[1],王浩林[1],孙昊宇[3],杨 雷[4],边永欢[1,2*] (1.河北科技大学环境科学与工程学院,河北 石家庄 050018；2.河北省污染防治生物技术重点实验室,河北 石家庄 050018；3.上海大学环境与化学工程学院,有机复合污染控制工程教育部重点实验室,上海 200444；4.河北化工医药职业技术学院质量检测与管理系,河北 石家庄 050026)

摘要：为明确水环境中抗生素对细菌的毒性与耐药性风险,以诺氟沙星(NOR)与头孢噻肟钠(CTX)为受试化合物,选择半数效应浓度(EC_{50})、突变和接合转移促进率为10%的较低浓度作特征参数,采用直接均分射线法设计混合抗生素,探究抗生素对大肠杆菌(*E.coli*)的毒性及耐药性效应.结果表明,NOR与CTX在单一及二元混合条件下对*E.coli*的毒性、突变与接合转移效应均产生了“Hormesis”现象,生长促进率、突变促进率与接合促进率峰值分别达38.40%、101.26%、28.73%.相比于抗生素单独暴露,混合抗生素对*E.coli*生长与突变的最大促进率均减小,*E.coli*产生突变与接合转移的相对安全浓度降低.混合体系中NOR浓度配比越大,EC_{50}越小,最大突变促进率、最大接合促进率越高,且相对安全浓度越低.随着混合体系浓度的增加,对*E.coli*毒性、突变与接合转移的联合作用模式分别由相加、协同、协同转变为协同、拮抗、拮抗,且NOR浓度配比越高,促进*E.coli*生长、突变、接合转移的协同、协同、拮抗强度最大值越小.水环境中抗生素的混合浓度配比是评估其细菌毒性与耐药性等生态风险的重要因素.

关键词：环境浓度；抗生素；细菌毒性；突变；接合转移；Hormesis 效应
中图分类号：X503 **文献标识码**：A **文章编号**：1000-6923(2025)07-4003-09

Toxicity and resistance risk of antibiotics to *Escherichia coli* based on the level of environmental pollution.

SHEN Hong-yan[1,2], YIN Kang-nian[1], WANG Hao-lin[1], SUN Hao-yu[3], YANG Lei[4], BIAN Yong-huan[1,2*] (1.College of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China；2.Hebei Key Laboratory of Pollution Prevention Biotechnology, Shijiazhuang 050018, China；3.Key Laboratory of Organic Composite Pollution Control Engineering, Ministry of Education, School of Environmental and Chemical Engineering, Shanghai University, Shanghai 200444, China；4.Department of Quality Monitoring and Management, Hebei Chemical & Pharmaceutical College, Shijiazhuang 050026, China).
China Environmental Science, 2025,45(7)：4003~4011

Abstract：To clarify the ecological risks of antibiotics in aquatic environments regarding bacterial toxicity and resistance, norfloxacin (NOR) and ceftazidime sodium (CTX) were selected as test compounds. Characteristic parameters including EC50and lower concentrations inducing 10% mutation/conjugation transfer promotion rates were employed. Binary antibiotic mixtures were designed using the direct equipartition ray method to investigate their toxicity and resistance-inducing effects on *Escherichia coli* (*E. coli*). Results demonstrated hormetic effects in both individual and combined exposures, with maximum growth promotion, mutation promotion, and conjugation transfer promotion rates reaching 38.40%, 101.26%, and 28.73%, respectively. Compared with individual exposure, the maximum promotion rate of mixed antibiotics on *E.coli* growth and mutation was reduced, along with decreased relative safety concentrations for mutation and conjugation transfer. Higher NOR proportion in mixtures resulted in lower EC_{50} values, elevated maximum mutation/conjugation promotion rates, and reduced safety concentrations. The combined action patterns transitioned from additive/synergistic/synergistic to synergistic/antagonistic/antagonistic for toxicity/mutation/conjugation transfer effects respectively as concentrations increased. Higher NOR proportions diminished the maximum synergistic intensities for growth/mutation promotion and antagonistic intensity for conjugation transfer. The concentration ratio in antibiotic mixtures was identified as a critical factor for assessing bacterial toxicity and resistance risks in aquatic environments.
Key words：environmental concentration；antibiotics；bacterial toxicity；mutation；conjugation transfer；Hormesis

据统计,70%~90%的抗生素以原型或活性代谢物的形式被生物体排出体外[1],最终汇入污水处理厂.目前污水处理工艺对抗生素的去除效率为65%~93%[2].资料显示,喹诺酮类抗生素与β-内酰胺

收稿日期：2024-12-15
基金项目：国家自然科学基金资助项目(42277270);河北省化工行业挥发性有机物检测与治理技术创新中心基金资助项目(ZXJJ20240102);石家庄高新区给水管网水力计算模型研究项目(XQ2024-01)
* 责任作者，讲师, bianyonghuan@163.com

类抗生素在临床治疗中常联合使用[3].我国地表水中共检出 16 种β-内酰胺类抗生素、33 种喹诺酮类抗生素,其浓度达到ng/L~μg/L 级别[4].雄安新区地表水中检出的抗生素主要是β-内酰胺类和喹诺酮类抗生素,分别占地表水中抗生素总浓度的 45%和16%[5].由此可见,上述两类抗生素多在水环境中共存,以 ng/L~μg/L 浓度级别共存.

研究发现,在低剂量污染物作用下,生物体会出现刺激反应,而在高剂量作用下污染物对生物体产生抑制作用,即“低浓度促进、高浓度抑制”的 Hormesis 效应[6],例如低剂量抗生素共存会对大肠杆菌(*E.coli*)生长与接合转移产生 Hormesis 现象[7].以质粒为载体的接合转移被认为是一种自然界中发生频率最高、最普遍的耐药基因(ARGs)水平转移方式[8],细菌通过接合转移获得 ARGs,并以此传播耐药性.研究表明采用等最小抑菌浓度法得到的四环素类与磺胺类抗生素混合物能够促进 *E.coli* 突变,使 *E.coli* 产生耐药性[9].由此可见,抗生素共存能够对 *E.coli* 诱导出 Hormesis 效应,进而促进耐药性的产生与传播.但以往研究中常以等浓度比方法设计抗生素混合物,该方法确定的抗生素浓度配比与实际水环境中抗生素的共存特点差异较大,研究结果难以全面反映实际水环境中抗生素对细菌耐药性的影响.

本文选择典型模式生物 *E.coli* 为受试生物,以喹诺酮类抗生素诺氟沙星(NOR)与β-内酰胺类抗生素头孢噻肟钠(CTX)两种水环境中常检出的抗生素为受试化合物,运用最大限度模拟实际水环境中抗生素共存特点的直接均分射线法(EquRay),设置 2 种抗生素的浓度配比,探究一元与二元混合抗生素暴露对 *E.coli* 毒性与耐药性的影响;判别混合抗生素对 *E.coli* 毒性与耐药性的联合作用模式,并分析联合作用强度变化规律;分析不同浓度配比的 NOR+CTX 混合抗生素对 *E.coli* 毒性与耐药性的诱导效应,以期为实际水环境中 NOR 与 CTX 共存时对水生生物的毒性与耐药性风险评估提供数据参考.

1 材料与方法

1.1 试剂与生物

NOR 与 CTX 均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司(上海,中国),试剂均为分析纯. NOR 的 CAS 号为 70458-96-7,相对分子质量为 319.33g/mol; CTX 的 CAS 号为 64485-93-4,相对分子质量为 477.45g/mol.毒性与突变实验所用菌株为 *E.coli* MG1655,购自 Biovector 生物科技有限公司(北京,中国).接合转移实验所用菌株是由 *E.coli* MG1655 构建的工程菌.供体菌为 *E.coli* MG1655(RP4),受体菌为 *E.coli* MG1655(Nal).

1.2 毒性实验

使用 1%(质量分数)NaCl 溶液将 NOR 与 CTX 稀释成等对数梯度的系列溶液.向 96 孔板中加入 80μL 不同浓度的抗生素溶液(实验组)或 1%(质量分数)NaCl 溶液(对照组)、80μL MH 培养基和 40μL 工作菌液(约为 5×10^4cells/mL),每个抗生素浓度梯度均设置 3 个平行样.在 37℃、180r/min 条件下培养 24h 后,测定实验组和对照组在 600nm 处的光密度值(OD_{600}).

根据(1)式计算抗生素对 *E.coli* 的生长抑制率.

$$\text{Inhibition}(\%)=\frac{OD_{600,0}-OD_{600,i}}{OD_{600,0}}\times100\% \quad (1)$$

式中:$OD_{600,i}$ 表示各实验组的 OD_{600} 值;$OD_{600,i}$ 表示对照组的 OD_{600} 值.

1.3 突变试验

完成毒性试验后,将 96 孔板中各个浓度的平行组菌液吸取到 1.5mL 离心管中,对菌液进行 4 次洗涤.一部分菌液稀释 10^6 倍后滴加至无利福平的固体 LB 培养基,37℃倒置培养 12h 后记录菌落数量得到总菌数(CFU/mL).剩余菌液稀释 10 倍后滴加至含利福平的固体 LB 培养基,37℃倒置培养 16h 后记录菌落数量得到突变菌数(CFU/mL).每个对照组与实验组均设置 3 个平行样.

根据(3)式计算抗生素对 *E.coli* 的突变促进率.

$$F_M=\frac{Num_{mE}}{Num_{tE}} \quad (2)$$

式中:F_M 为突变频率;Num_{mE} 为突变菌数,CFU/mL;Num_{tE} 为总菌数,CFU/mL.

$$PF_M(\%)=\frac{F_{M,t}-F_{M,c}}{F_{M,c}} \quad (3)$$

式中:PF_M 为突变促进率;$F_{M,c}$ 与 $F_{M,t}$ 分别为对照组与实验组的突变频率.

1.4 接合转移实验

将供体菌 *E.*coli(RP4)与受体菌 *E.coli*(Nal)培养

10h 后,进行 4 次洗菌后将菌液的 OD_{600} 调至 0.5.以供体菌:受体菌=1:2 的体积比混合得到工作菌液.每个实验体系总体积为 200μL,其中包括 40μL 抗生素溶液(实验组)或 1%(质量分数)NaCl 溶液(对照组),100μL2 倍 LB 培养基和 60μL 工作菌液,振荡混匀后静置培养 10h.随后进行梯度稀释,取 25μL 稀释后菌液分别滴加至接合子筛选平板(含萘啶酮酸和卡那霉素)与受体菌筛选平板(仅含萘啶酮酸),37℃倒置培养 12h 后分别记录接合子数量与受体菌数量(CFU/mL).每个对照组与实验组均设置 3 个平行样.

根据(5)式计算抗生素对 *E.coli* 的接合促进率.

$$F_{\mathrm{C}}=\frac{\mathrm{Num}_{\mathrm{zE}}}{\mathrm{Num}_{\mathrm{rE}}} \tag{4}$$

式中:F_c 为接合频率;Num_{zE} 为接合子数,CFU/mL;Num_{tE} 为受体菌数,CFU/mL.

$$\mathrm{PF}_{\mathrm{C}}(\%)=\frac{F_{\mathrm{C,t}}-F_{\mathrm{C,c}}}{F_{\mathrm{C,c}}}\times 100\% \tag{5}$$

式中:PF_c 为接合促进率;$F_{C,c}$ 与 $F_{C,t}$ 分别为对照组与实验组的接合频率.

1.5　混合抗生素设计

表 1　混合抗生素射线中组分浓度配比(P_i)

Table 1　Component concentration ratio(P_i) in the mixed antibiotic ray

项目	射线	P_{NOR}(mol/L)	P_{CTX}(mol/L)
毒性试验	T-R1	2.47×10^{-6}	2.92×10^{-5}
	T-R2	5.52×10^{-6}	2.61×10^{-5}
	T-R3	9.41×10^{-6}	2.22×10^{-5}
	T-R4	1.45×10^{-5}	1.71×10^{-5}
	T-R5	2.15×10^{-5}	1.01×10^{-5}
突变试验	M-R1	8.32×10^{-9}	4.17×10^{-8}
	M-R2	1.66×10^{-8}	3.34×10^{-8}
	M-R3	2.50×10^{-8}	2.50×10^{-8}
	M-R4	3.33×10^{-8}	1.67×10^{-8}
	M-R5	4.17×10^{-8}	8.35×10^{-9}
接合转移实验	C-R1	4.82×10^{-6}	1.77×10^{-7}
	C-R2	4.93×10^{-6}	7.25×10^{-8}
	C-R3	4.96×10^{-6}	3.65×10^{-8}
	C-R4	4.98×10^{-6}	1.83×10^{-8}
	C-R5	4.99×10^{-6}	7.35×10^{-9}

为最大限度模拟水环境中抗生素的共存特征,参考水环境中 NOR 与 CTX 的检出浓度范围设置实验浓度区间[10].半数效应浓度(EC_{50})、突变促进率为 10%时的较低浓度($CPF_{(M,10^{-1})}$)、接合促进率为 10%时的较低浓度($CPF_{(C,10^{-1})}$)分别体现了抗生素对细菌的毒性大小以及抗生素诱导 ARGs 产生与传播的相对安全浓度.选择上述 3 个特征参数采用直接均分射线法分别设置毒性、突变与接合转移实验中 NOR+CTX 混合抗生素的浓度配比[11].该方法可从大量混合物中挑选 5 条具有不同浓度配比(P_i)的代表性混合抗生素射线(混合抗生素具体浓度配比见表 1),全面地覆盖各种可能的浓度配比组合.由于毒性实验、突变试验与接合转移实验中每条混合抗生素射线具有不同浓度配比,因此每种实验中的 5 条混合抗生素射线分别表示为“T−”、“M−”与“C−”.毒性实验中混合抗生素体系设置 16 个浓度梯度,突变与接合转移实验中混合抗生素体系设置 12 个浓度梯度.

1.6　联合作用模式判别与强度分析

由于 NOR 与 CTX 对生物体的毒性作用机制不同[12],因此采用独立作用(IA)模型对 NOR+CTX 混合物的毒性、突变与接合转移效应的联合作用模式进行判别[13].基于式(6)IA 模型的计算公式计算理论毒性效应.

$$\mathrm{ET}\left(c_{\mathrm{mix}}\right)=1-\prod_{i=1}^{n}\left(1-\mathrm{ET}\left(c_i\right)\right) \tag{6}$$

式中:c_{mix} 为混合抗生素总浓度;$ET(c_{mix})$为混合抗生素的理论毒性效应;$ET(c_i)$为第 i 种抗生素在混合抗生素中对应浓度 c 时产生的单一毒性抑制率.

类似地,借助(6)式分别计算突变试验与接合转移实验中 NOR+CTX 混合物的理论突变效应 $EM(c_{mix})$与理论接合转移效应 $EC(c_{mix})$.计算时需注意将 $ET(c_i)$分别替换为第 i 种抗生素在混合抗生素中对应浓度 c 时产生的单一突变促进率 $EM(c_i)$与单一接合促进率 $EC(c_i)$.

将理论效应值进行非线性曲线拟合,得到 IA 曲线.通过比较 IA 曲线与实验得到的混合抗生素剂量-效应曲线(CRCs)的位置关系,判别混合抗生素的联合作用模式:IA 曲线位于 CRCs(包含 95%置信区间)的上方、中间与下方时,联合作用模式分别为表示拮抗作用、相加作用和协同作用.为了更清晰、直观地表达混合抗生素的相互作用随浓度变化与混合浓度配比的规律,基于 IA 模型进一步分析联合毒性作用强度(JTAI)[14].JTAI 代表 IA 模型预测结果与毒性实验观测结果的偏差值,JTAI 绝对值越大,作用强度越强.

$$JTAI=\begin{cases}E_{IA}-E_{UCL}, & \text{if } E_{IA}>E_{UCl}\\ 0, & \text{if } E_{LCL}<E_{IA}<E_{UCL}\\ E_{IA}-E_{LCL}, & \text{if } E_{IA}<E_{UCL}\end{cases} \quad (7)$$

式中:E_{IA}为IA模型预测的ET(c_{mix});E_{UCl}与E_{LCL}分别为毒性实验中CRCs的95%置信区间的置信上限与置信下限.

类似地,借助式(7)分别计算联合突变作用强度(JMAI)与联合接合作用强度(JCAI).计算时需注意将 E_{IA} 分别替换为 EM(c_{mix})、EC(c_{mix}),E_{UCl} 与 E_{LCl} 分别替换为突变实验和接合转移实验中 CRCs 的95%置信区间的置信上限与置信下限.当 JTAI、JMAI 与 JCAI>、=和<0 时,联合作用模式分别为协同作用、相加作用和拮抗作用,JTAI、JMAI 与 JCAI 的绝对值越大,表明联合作用强度越大.

2 结果与讨论

2.1 NOR 和 CTX 对 *E.coli* 的毒性与耐药性的单一效应

表 2 单一及二元抗生素对 *E.coli* 的毒性、突变、接合转移效应的 CRCs 特征参数

Table 2 Characteristic parameters of CRCs for toxicity, mutation and conjugation transfer effects of single and binary antibiotics on *E.coli.*

抗生素	毒性(T−)				突变(M−)				接合(C−)			
	EC_{50} (mol/L)	PG_{max} (%)	CPG_{max} (mol/L)	$CPF_{(0-2)}$ (mol/L)	$CPF_{(M,\ 10-1)}$ (mol/L)	$PF_{(M,max)}$ (%)	$CPF_{(M,\ max)}$ (mol/L)	$CPF_{(0-2)}$ (mol/L)	$CPF_{(C,\ 10-1)}$ (mol/L)	$PF_{(C,\ max)}$ (%)	$CPF_{(C,\ max)}$ (mol/L)	$CPF_{(0-2)}$ (mol/L)
NOR	3.15×10^{-6}	31.20	2.73×10^{-7}	1.34×10^{-6}	1.04×10^{-8}	101.26	1.03×10^{-7}	3.21×10^{-7}	4.09×10^{-9}	24.15	9.08×10^{-8}	1.24×10^{-6}
CTX	7.44×10^{-6}	38.40	2.43×10^{-6}	4.59×10^{-6}	5.64×10^{-8}	90.87	6.37×10^{-7}	1.87×10^{-6}	3.01×10^{-11}	28.73	3.38×10^{-10}	5.51×10^{-8}
NOR+CTX −R1	8.56×10^{-6}	8.48	1.09×10^{-6}	3.63×10^{-6}	3.40×10^{-10}	39.57	1.15×10^{-9}	6.00×10^{-9}	5.65×10^{-11}	21.69	1.42×10^{-9}	8.71×10^{-8}
NOR+CTX −R2	5.54×10^{-6}	15.94	1.09×10^{-6}	2.62×10^{-6}	2.49×10^{-10}	48.25	1.27×10^{-9}	8.83×10^{-9}	3.54×10^{-11}	22.36	8.50×10^{-10}	6.41×10^{-8}
NOR+CTX −R3	3.63×10^{-6}	21.20	1.77×10^{-6}	2.77×10^{-6}	1.88×10^{-10}	54.06	1.25×10^{-9}	1.15×10^{-8}	2.04×10^{-11}	24.17	5.24×10^{-10}	5.03×10^{-8}
NOR+CTX −R4	3.01×10^{-6}	11.99	1.13×10^{-6}	3.84×10^{-6}	1.74×10^{-10}	59.23	1.13×10^{-9}	1.73×10^{-8}	6.20×10^{-12}	28.01	5.68×10^{-10}	1.17×10^{-7}
NOR+CTX −R5	2.61×10^{-6}	8.66	5.97×10^{-7}	1.87×10^{-6}	1.58×10^{-10}	75.33	1.29×10^{-9}	1.92×10^{-8}	2.17×10^{-12}	32.90	4.46×10^{-10}	1.66×10^{-7}

注:PG_{max}与CPG_{max}分别代表最大生长促进率、最大生长促进率对应浓度;$PF_{(M,max)}$与$CPF_{(M,max)}$分别代表最大突变促进率、最大突变促进率对应浓度;$PF_{(C,max)}$与$CPF_{(C,max)}$分别代表最大接合转移促进率、最大接合转移促进率对应浓度;$CPF_{(0-2)}$代表促进效应与抑制效应的浓度临界值.

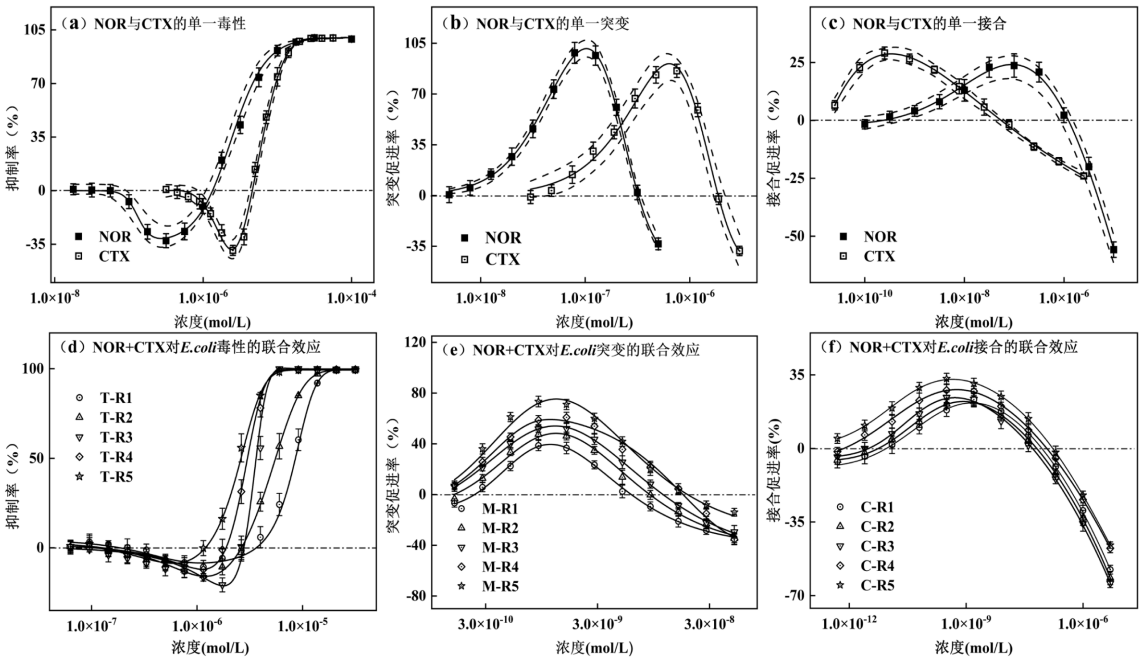


图 1 单一及二元抗生素对 *E.coli* 的毒性、突变、接合转移效应

Fig.1 The toxicity, mutation and conjugation transfer effects of single and binary antibiotics on *E.coli*

——— 为实际剂量−效应曲线的 95%置信区间

抗生素对 *E.coli* 的毒性以抑制率表示,当抑制率小于 0 时,代表抗生素促进了 *E.coli* 的生长.由图 1(a)可知,NOR 对 *E.coli* 的 EC_{50} 与最大生长促进率 PG_{max} 都小于 CTX,说明 NOR 的毒性更强、对细菌生长的促进作用更小.NOR 对 *E.coli* 突变的 $CPF_{(M,\ 10^{-1})}$ 小于 CTX,但对 *E.coli* 的最大突变促进率高于 CTX(图 1(b)),说明 NOR 比 CTX 更容易在较低浓度诱导 *E.coli* 发生突变.NOR 对 *E.coli* 接合转移的 $CPF_{(C,10^{-1})}$ 大于 CTX,而对 *E.coli* 的最大接合促进率低于 CTX(图 1(c)),说明 CTX 比 NOR 更容易在较低浓度诱导 *E.coli* 发生接合转移.因此,NOR 与 CTX 单独存在时,NOR 诱导 *E.coli* 突变导致 ARGs 产生的风险更高,CTX 诱导 *E.coli* 接合转移导致 ARGs 传播的风险更高.NOR 与 CTX 对 *E.coli* 的毒性、突变、接合转移效应均产生低浓度促进,高浓度抑制的 Hormesis 现象.

2.2　NOR 与 CTX 对 *E.coli* 毒性与耐药性的联合效应

由图 1 可见,与抗生素单一实验结果类似,NOR+CTX 混合抗生素对 *E.coli* 毒性的 CRCs 呈现“J”型,对 *E.coli* 的突变与接合转移的 CRCs 呈现为倒“U”型,均表现出 Hormesis 效应特征[15].不同浓度配比的混合抗生素对 *E.coli* 的毒性、突变、接合转移产生不同的效应.在毒性实验中(图 1(d)),5 种不同浓度配比的 NOR+CTX 混合物对 *E.coli* 的 EC_{50} 随着体系中 NOR 浓度配比的增加而逐渐减小,即 5 种混合抗生素的毒性由小到大依次为:T−R1<T−R2<T−R3<T−R4<T−R5,说明单一毒性更强的抗生素占比越多,混合抗生素的毒性越强.5 种混合抗生素对 *E.coli* 生长的最大促进率峰值仅有 21.23%,均低于两者单一作用时的最大促进率,表明 NOR 与 CTX 共存时对 *E.coli* 生长的促进作用弱于两者单独存在时对 *E.coli* 生长的促进作用.混合抗生素从 T−R1 到 T−R5,CPG_{max} 整体上不断减小,促进 *E.coli* 生长的浓度范围逐渐缩小,且整体上呈向更低浓度移动趋势,意味着混合抗生素 T−R1 到 T−R5 中 NOR 浓度配比越大,混合抗生素促进 *E.coli* 生长的程度越弱.

在突变试验中(图 1(e)),5 种不同浓度配比的 NOR+CTX 混合物对 *E.coli* 的 $CPF_{(M,\ 10^{-1})}$ 与 $PF_{(M,\ max)}$ 远低于两者单一作用时对 *E.coli* 的 $CPF_{(M,\ 10^{-1})}$ 与 $PF_{(M,\ max)}$,说明 NOR 与 CTX 混合后会降低 *E.coli* 突变的相对安全浓度,减弱对 *E.coli* 突变的促进作用.混合抗生素 M−R1 到 M−R5 对 *E.coli* 的 $PF_{(M,\ max)}$ 随着 NOR 浓度配比的增加而增加,对 *E.coli* 的 $CPF_{(M,10^{-1})}$ 随着 NOR 浓度配比的增加而减小,即混合体系中 NOR 浓度配比越大,*E.coli* 的最大突变促进率越高,*E.coli* 产生突变的相对安全浓度越来越低,说明 NOR 在混合体系中对 *E.coli* 的突变效应起决定性作用.因此,NOR 对 *E.coli* 突变比 CTX 具有更高的环境风险.

在接合转移实验中(图 1(f)),5 种 NOR+CTX 混合物对 *E.coli* 的 $CPF_{(C,\ 10^{-1})}$ 均低于 NOR 与 CTX 单一作用时对 *E.coli* 的 $CPF_{(C,\ 10^{-1})}$,说明 NOR 与 CTX 混合后会降低 *E.coli* 接合转移的相对安全浓度.混合抗生素 C−R1 到 C−R5 对 *E.coli* 的 $PF_{(C,max)}$ 随着 NOR 浓度配比的增加而增大,对 *E.coli* 的 $CPF_{(C,\ 10^{-1})}$ 随着 NOR 浓度配比的增加而减小,即混合体系中 NOR 浓度配比越大,*E.coli* 的最大接合促进率越高,*E.coli* 发生接合转移的相对安全浓度越来越低,意味着 NOR 在混合体系中对 *E.coli* 的接合转移效应起决定性作用,促进 *E.coli* 传播 ARGs 的风险更大.

2.3　联合作用模式判别及强度分析

由图 2(a)~图 2(e)可知,混合抗生素 T−R1 到 T−R5 对 *E.coli* 毒性的联合作用模式随 NOR+CTX 混合物浓度的升高由相加作用转变为协同作用.随着体系中 NOR 浓度配比的增加,相加作用的浓度范围不断减小,协同作用范围逐渐增大,可能是混合抗生素 T−R1 到 T−R5 的毒性逐渐增大的原因.随着 NOR+CTX 混合物浓度的升高,混合抗生素 M−R1 到 M−R5 促进 *E.coli* 突变的联合作用模式与 C−R1 到 C−R5 促进 *E.coli* 接合转移的联合作用模式整体上由协同作用转变为拮抗作用(图 2(f)~图 2(o)).NOR+CTX 促进 *E.coli* 突变与接合转移的相加作用随着体系中 NOR 浓度配比的增加而逐渐消失.由此可见,NOR+CTX 对 *E.coli* 的毒性、突变与接合转移效应的联合作用模式不仅具有浓度依赖性,还具有浓度配比依赖性,这可能与抗生素的作用机制有关[16].

由图 3(a)~图 3(e)可知,在毒性实验中,混合抗生素 T−R1 与 T−R2 的最强协同作用出现在促进 *E.coli* 生长的浓度范围内(1.18×10^{-7}~2.42×10^{-6}mol/L),T−R3、T−R4、T−R5 的最强协同作用产生在抑制 *E.coli* 生长的浓度范围内(2.42×10^{-6}~3.16×10^{-5}mol/L),且每种混合抗生素的最大 JTAI 值各不相同,这表明

不同的组分浓度配比不仅会影响产生最大协同作用的浓度,更会直接改变最大协同作用的强弱.在突变与接合转移实验中(图 2(f)~图 2(O)),混合抗生素 M−R1 到 M−R5、C−R1 到 C−R5 在较低浓度下(1.58×10^{-10}~2.81×10^{-9}mol/L 、 5.00×10^{-13}~7.92×10^{-9}mol/L)的协同促进强度峰值随着 NOR 配比的增加而逐渐增强,在较高浓度下(2.81×10^{-9}~5.00×10^{-8}mol/L 、7.92×10^{-9}~5.00×10^{-6}mol/L)的拮抗促进强度峰值随着 NOR 占比的增加而逐渐减弱,表明联合作用强度同样具有浓度配比依赖性.需要说明的是,协同促进与拮抗促进仅意味着促进作用的强度有所改变,两者均体现为促进效果.

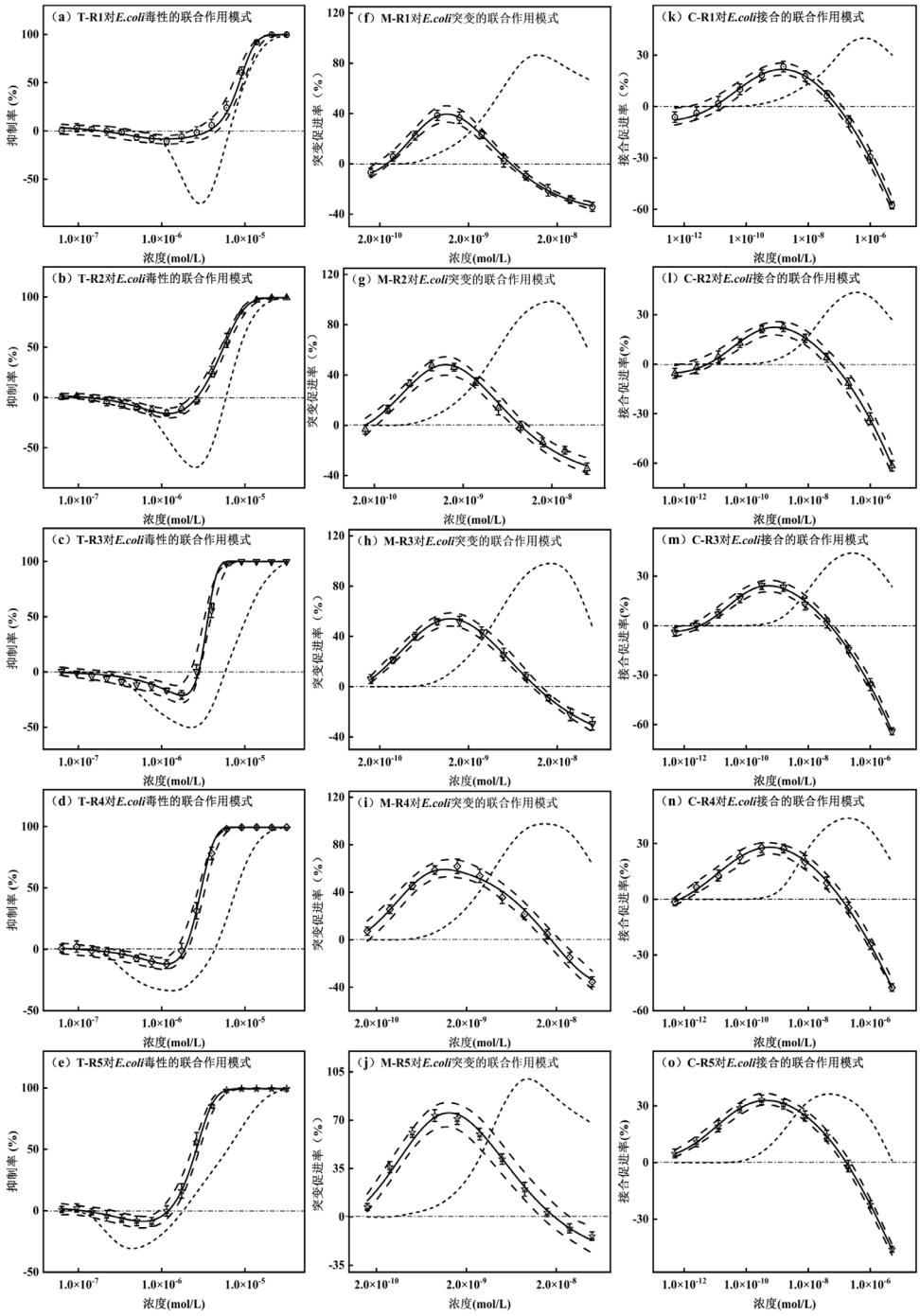


图 2 NOR+CTX 混合抗生素对 *E.coli* 的毒性、突变、接合转移效应的联合作用判别

Fig.2 Discrimination of the combined effect on the toxicity, mutation, conjugation transfer effect of NOR + CTX mixed antibiotics on *E.coli*

——为混合物实际剂量−效应曲线; ——— 为实际剂量−效应曲线的 95%置信区间; - - - - -为 IA 模型预测曲线

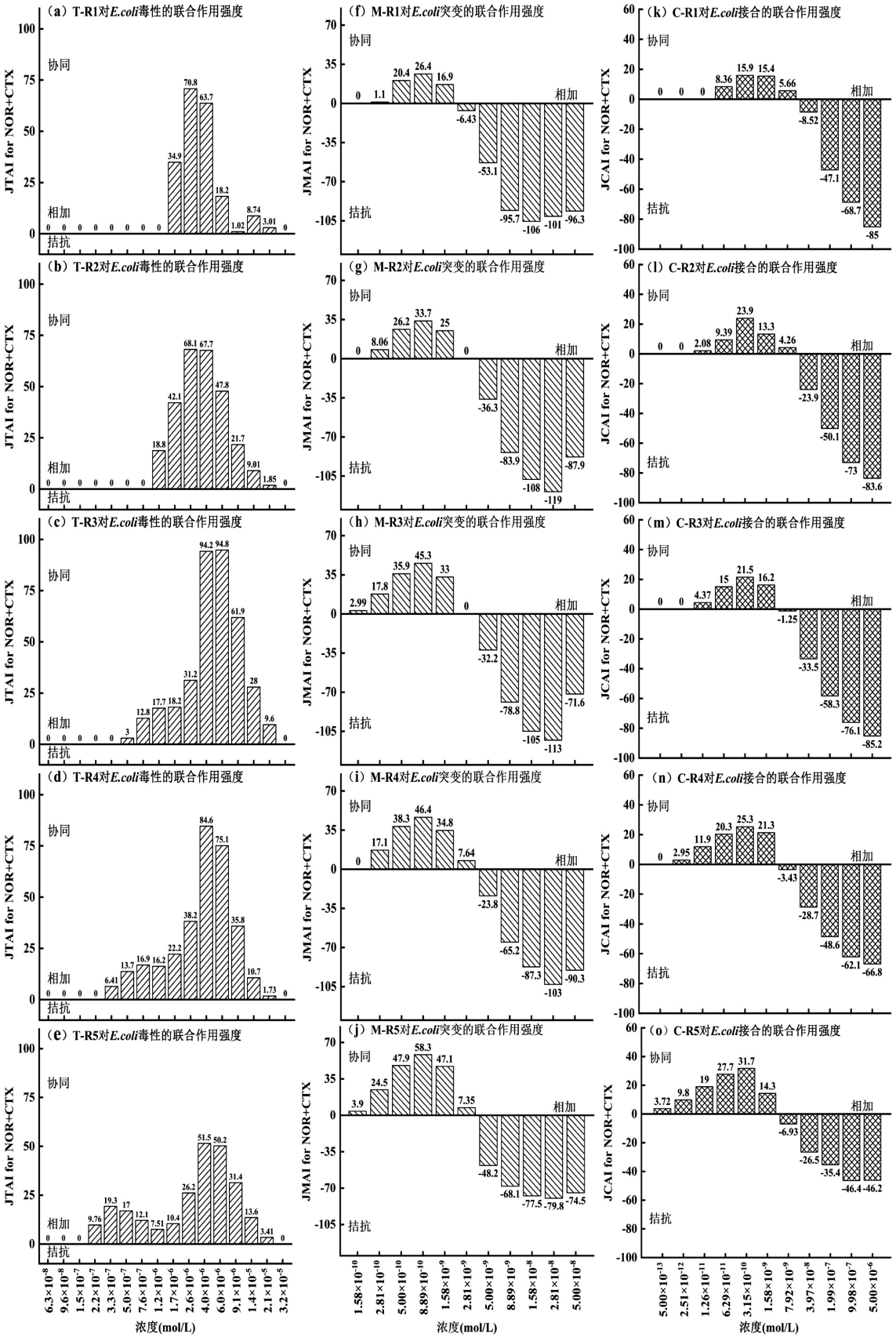


图 3　NOR+CTX 混合抗生素对 *E.coli* 的毒性、突变、接合转移效应的联合强度分析

Fig.3　Analysis of the combined intensity on the toxicity, mutation, conjugation transfer effect of NOR + CTX mixed antibiotics on *E.coli*

2.4 讨论

我国东、中部地区地表水中 NOR 的平均浓度分别为 1.68×10^{-9},1.24×10^{-10}mol/L[17]; 富春江水体中 CTX 的最大浓度为 9.21×10^{-12}mol/L[18];钱塘江流域杭州段地表水中 NOR 与 CTX 也同时被检出[19].我国地表水环境中 NOR 与 CTX 的污染浓度处于 0~1.40×10^{-8}mol/L 的范围内,与本研究中突变实验、接合转移实验中 Hormesis 效应的促进浓度区间(9.64×10^{-11}~5.00×10^{-8}mol/L)有重叠部分.*E.coli* 作为广泛使用的模式生物,与众多环境细菌在细胞基本结构与功能上有诸多共性,其 DNA 复制、转录、翻译等过程遵循原核生物的基本规律[20].因此,本研究推测实际水环境中的抗生素有可能促进环境细菌产生突变与接合转移,从而增加耐药性产生与传播的风险.此外,抗生素共存对 *E.coli* 的联合作用模式与作用强度受混合物浓度以及混合物中组分浓度配比影响,其联合作用模式与作用强度变化影响抗生素对细菌的毒性与耐药性,例如当混合物组分浓度配比增加时,混合物的 Hormesis 强度随之增加[14],因此衡量实际水环境中抗生素对细菌的毒性与耐药性风险时需要考虑 Hormesis 效应.本研究表明 Hormesis 效应的强弱与 NOR 的浓度配比呈正相关,即 NOR 浓度配比越高,Hormesis 效应越明显,因此相比 β-内酰胺类抗生素,更需要关注喹诺酮类抗生素的环境风险.

与 NOR、CTX 单独暴露相比,两者共存时增强了对 *E.coli* 的毒性,降低了对 *E.coli* 生长与突变的促进作用强度,这与韩宝苍等[21]的二元混合抗生素研究结果相似.NOR 与 CTX 对 *E.coli* 生长的抑制作用可能与 *E.coli* 通过突变获得耐药性的过程相互影响[22].NOR 可阻碍 *E.coli* 内 DNA 复制[23],CTX 能抑制蛋白质合成[24],两者共存时两条通路共同抑制 *E.coli* 生长,增强毒性作用.由于毒性增强,抑制了 *E.coli* 核酸与氨基酸生成,使得易错的 DNA 聚合酶表达减弱[25],进而降低 *E.coli* 突变的促进作用.此外,NOR 与 CTX 共存时降低了 *E.coli* 产生耐药突变与接合转移的相对安全浓度,使促进浓度区间向更低浓度移动,这与宋雪薇等的研究结果相同[9].NOR 与 CTX 都属于杀菌抗生素,能够诱导活性氧(ROS)产生[26].而 ROS 在低水平下对 *E.coli* 起保护作用[27],故推测低浓度的 NOR 与 CTX 引起 ROS 水平的轻微升高,使 ROS 作信号分子起保护作用的同时触发 SOS 反应,SOS 反应促进 *E.coli* 产生适应性变化[28],最终表现出突变与接合转移的促进浓度区间向更低浓度移动的现象.

本研究中 NOR 的最小抑菌浓度(MIC)为 3.17×10^{-5}mol/L,CTX 的 MIC 为 2.46×10^{-5}mol/L,抗生素促进大肠杆菌突变与接合转移的浓度范围分别为 1.92×10^{-8}~1.58×10^{-10},1.66×10^{-7}~7.25×10^{-13}mol/L,意味着抗生素浓度在低于 MIC 时即可促进细菌耐药性的产生与传播.同时,细菌发生接合转移的浓度范围(3.80×10^{-12}~9.69×10^{-8}mol/L)涵盖细菌出现突变的浓度范围(1.74×10^{-10}~1.26×10^{-8}mol/L),说明 NOR+CTX 抗生素浓度为 1.74×10^{-10}~1.26×10^{-8}mol/L 时,存在其对 *E.coli* 突变与接合转移的耦合促进作用.无论 NOR 与 CTX 单独还是共同存在,其对 *E.coli* 生长、耐药突变与 RP4 质粒接合转移在特定浓度下均具有促进作用,这将造成耐药细菌在环境中的大范围传播[29],影响生态系统的稳定性,增加人类感染耐药菌的风险.因此,环境中多种抗生素残留所带来的毒性与耐药性生态风险不容忽视.

3 结论

3.1 NOR 与 CTX 单独暴露于 *E.coli* 时,NOR 与 CTX 的 EC_{50} 分别为 3.15×10^{-6}mol/L、7.44×10^{-6}mol/L,说明 NOR 毒性更强、促进生长的作用更小;NOR 与 CTX 的 $PF_{(M,max)}$分别为 101.26%、90.87%,说明 NOR 诱导 *E.coli* 突变使 ARGs 产生的风险更高; NOR 与 CTX 的 $PF_{(C,max)}$分别为 24.15%、28.73%,说明 CTX 诱导 *E.coli* 接合转移使 ARGs 传播的风险更高.

3.2 相对于 NOR 与 CTX 单独暴露,共同暴露时 $CPF_{(M,10-1)}$与 $CPF_{(C,10-1)}$更小,降低了 *E.coli* 产生突变与接合转移的相对安全浓度,减弱了对 *E.coli* 突变的促进作用.而且,混合体系中 NOR 浓度配比越大,对 *E.coli* 的最大突变促进率、最大接合促进率越高,*E.coli* 发生突变与接合转移的相对安全浓度越低.

3.3 混合抗生素对 *E.coli* 的联合作用模式与作用强度变化呈浓度及其配比依赖性,即随着混合体系的浓度逐渐增加,混合体系对 *E.coli* 毒性的联合作用模式由相加作用转变为协同作用,对 *E.coli* 突变与接合转移的联合作用模式由协同作用转变为拮抗作用.随着混合体系中 NOR 浓度配比的增加,对 *E.coli* 生长的协同作用强度峰值逐渐减小,促进突变与接

合转移的协同作用强度峰值逐渐增大,拮抗作用强度峰值逐渐减小.

3.4　NOR 与 CTX 单一及二元联合暴露时对 *E.coli* 的毒性、突变与接合转移均产生了 Hormesis 现象.

水环境中单一或混合抗生素具有促进细菌耐药性的产生与传播的可能性,相比β-内酰胺类抗生素,更需要关注喹诺酮类抗生素的环境风险.

参考文献：

[1] Massé D I, Cata Saady N M, Gilbert Y. Potential of biological processes to eliminate antibiotics in livestock manure: an overview [J]. *Animals*, 2014,4(2):146−163.

[2] Fan J J, Wang S, Tang J P, et al. Bioaccumulation of endocrine disrupting compounds in fish with different feeding habits along the largest subtropical river, China [J]. Environmental Pollution, 2019, 247:999−1008.

[3] 徐　辉,何晓静,李晓冰,等. β-内酰胺类联合氟喹诺酮类抗菌药物治疗铜绿假单胞菌感染机制研究进展 [J]. 实用药物与临床, 2017, 20(6):712−715.
Xu H, He X J, Li X B, et al. Research progress on the mechanism of beta lactam combined with fluoroquinolones in the treatment of infection of Pseudomonas aeruginosa [J]. Practical Pharmacy And Clinical Remedies, 2017,20(6):712−715.

[4] 屈森虎,汪　斌,何玉洁,等.中国地表水中抗生素的分布特征与生态风险 [J]. 生物工程学报, 2024,40(7):2120−2135.
Qu S H, Wang B, He Y J, et al. Occurrence and environmental risks of antibiotics in surface water of China [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024,40(7):2120−2135.

[5] Fu C, Xu B, Chen H, et al. Occurrence and distribution of antibiotics in groundwater, surface water, and sediment in in Xiong'an New Area, China, and their relationship with antibiotic resistance genes [J]. Science of The Total Environment, 2022,807:151011.

[6] Zhang Y, Gao Q, Liu S, et al. Hormetic dose−response of halogenated organic pollutants on Microcystis aeruginosa: Joint toxic action and mechanism [J]. Science of The Total Environment, 2022,829:154581.

[7] Li X, Shi J, Sun H, et al. Hormetic dose−dependent response about typical antibiotics and their mixtures on plasmid conjugative transfer of Escherichia coli and its relationship with toxic effects on growth [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2020,205:111300.

[8] Zhang H, Chen S, Zhang Q, et al. Fungicides enhanced the abundance of antibiotic resistance genes in greenhouse soil [J]. Environmental Pollution, 2020,259:113877.

[9] 宋雪薇,马清萍,于　洋,等.磺胺和四环素类抗生素对大肠杆菌联合突变效应的研究 [J]. 生态毒理学报, 2018,13(5):110−117.
Song X W, Ma Q P, Yu Y, et al. Combined mutation effect of sulfonamide and tetracycline antibiotics against Escherichia coli [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018,13(5):110−117.

[10] Jiang L, Zhai W, Wang J, et al. Antibiotics and antibiotic resistance genes in the water sources of the Wuhan stretch of the Yangtze River: Occurrence, distribution, and ecological risks [J]. Environmental Research, 2023,239:117295.

[11] Dou R N, Liu S S, Mo L Y, et al. A novel direct equipartition ray design (EquRay) procedure for toxicity interaction between ionic liquid and dichlorvos [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2011,18:734−742.

[12] Uddin T M, Chakraborty A J, Khusro A, et al. Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects [J]. Journal of infection and public health, 2021,14(12): 1750−1766.

[13] Faust M, Altenburger R, Backhaus T, et al. Joint algal toxicity of 16dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action [J]. Aquat Toxicol, 2003,63:43–63.

[14] Tao M T, Liu S S, Gu Z W, et al. Beneficial or harmful: Time−dependent hormesis induced by typical disinfectants and their mixtures with toxicological interaction [J]. Science of The Total Environment, 2023,904:167204.

[15] Sun H, Calabrese E J, Lin Z, et al. Similarities between the yin/yang doctrine and hormesis in toxicology and Pharmacology [J]. Trends in pharmacological sciences, 2020,41(8):544−556.

[16] 童丹青,孙昊宇,张玉莲,等.抗菌剂对大肠杆菌浓度依赖的联合耐药效应 [J]. 中国环境科学, 2023,43(6):3194−3202.
Tong D Q, Sun H Y, Zhang Y L, et al. Dose−dependent joint resistance effects of antibacterial agents on Escherichia coli [J]. China Environmental Science, 2023,43(6):3194−3202.

[17] 杨大杰,欧阳友,李炳华,等.我国水环境中喹诺酮类抗生素赋存特征及生态风险评估 [J]. 人民黄河, 2022,44(8):97−102,108.
Yang D J, Ou Y Y, Li B H, et al. Occurrence Characteristics and Ecological Risk Assessment of Quinolone Antibiotics in Chinese Aquatic Environment [J]. Yellow River, 2022,44(8):97−102,108.

[18] 洪宇伟,李江波,姜丽丹,等.2023 年杭州市某区地表水和城市管网水中抗生素分布特征及风险评估 [J]. 中国公共卫生, 2024,40(1):75−81.
Hong Y W, Li J B, Jiang L D, et al. Antibiotic residues in surface water and urban water supply and their health risk in a suburban district of Hangzhou municipality, 2023 [J]. China Public Health, 2024,40(1):75−81.

[19] 叶旭红,张宝锋,周　猛,等.钱塘江流域杭州段地表水中典型抗生素的分布特征及生态风险评价 [J]. 中国环境科学, 2024,44(6):3247−3258.
Ye X B, Zhang B F, Zhou M, et al. Distribution characteristics and ecological risk evaluation of typical antibiotics in surface water of Hangzhou section of the Qiantang River basin [J]. China Environmental Science, 2024,44(6):3247−3258.

[20] Chetri S. Escherichia coli: An arduous voyage from commensal to Antibiotic−resistance [J]. Microbial Pathogenesis, 2024:107173.

[21] 韩宝苍,陈志彬,张跃恒,等.“鸡尾酒”式混合抗生素对细菌耐药性的影响 [J]. 中国环境科学, 2022,42(1):434−443.
Han B C, Chen Z B, Zhang Y H, et al. The effects of antibiotic mixtures on bacterial resistance based on “cocktail” exposure [J]. China Environmental Science, 2022,42(1):434−443.

[22] 李旭飞,巫晓丹,孙昊宇,等.抗生素和纳米银对大肠杆菌耐药性的联合效应 [J]. 中国环境科学, 2020,40(11):5045−5054.
Li X F, Wu X D, Sun H Y, et al. Joint effects of antibiotics and silver nanoparticles on resistance of Escherichia coli [J]. China Environmental Science, 2020,40(11):5045−5054.

[23] Shen H, Yang M, Yin K, et al. Size−and surface charge−dependent hormetic effects of microplastics on bacterial resistance and their interactive effects with quinolone antibiotic [J]. Science of The Total Environment, 2023,903:166580.

[24] Wale Y M, Roberts J A, Wolie Z T, et al. Is there evidence on the optimal duration of aminoglycoside therapy in beta−lactam/ aminoglycoside combination regimens used for the treatment of Gram−negative bacterial infections?−A Systematic Review [J]. International Journal of Antimicrobial Agents, 2024:107297.

[25] Long H, Miller S F, Strauss C, et al. Antibiotic treatment enhances the genome−wide mutation rate of target cells [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016,113(18):E2498−E2505.

[26] Qi W, Jonker M J, de Leeuw W, et al. Reactive oxygen species accelerate de novo acquisition of antibiotic resistance in E. coli [J]. Iscience, 2023,26(12):108373.

[27] Zhao X, Drlica K. Reactive oxygen species and the bacterial response to lethal stress [J]. Current opinion in microbiology, 2014,21:1−6.

[28] Wang D, Ning Q, Deng Z, et al. Role of environmental stresses in elevating resistance mutations in bacteria: Phenomena and mechanisms [J]. Environmental Pollution, 2022,307:119603.

[29] Cedeño−Muñoz J S, Aransiola S A, Reddy K V, et al. Antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes as contaminants of emerging concern: occurrences, impacts, mitigations and future guidelines [J]. Science of The Total Environment, 2024,952:175906.

作者简介：沈洪艳(1971−),女,天津人,教授,博士,主要从事污染物生态效应和风险评价、环境影响评价及规划研究.发表论文 100 余篇. 1178611805@qq.com.