

对氯间二甲苯酚对抗生素抗性基因接合转移的影响机制研究

康婉莹¹, 方桂妹¹, 田里¹, 林韵琪¹, 林紫琪¹, 毛艳萍^{1,2,*}

(1. 深圳大学化学与环境工程学院, 广东深圳 518071; 2. 深圳大学生态环境部滨海城市水土环境演化重点实验室(筹), 广东深圳 518060)

摘要: 水环境中残留的消毒剂可能通过影响微生物水平基因转移, 促进抗生素抗性基因(Antibiotic Resistance Genes, ARGs)的传播。对氯间二甲苯酚(*p*-Chloro-*m*-xylenol, PCMX)是一种广泛应用的酚类消毒剂, 在城市污水和地表水中常以 ng/L~μg/L 水平检出, 其对 ARGs 传播的影响机制仍不明确。本文以携带 RP4-8 质粒的大肠杆菌 CHS56 为供体菌、恶臭假单胞菌 TS44 为受体菌, 构建了属间接合转移模型。在 0.1~10 000.0 μg/L 浓度范围内评估 PCMX 对 ARGs 接合转移的影响, 并结合活性氧(ROS)、细胞膜通透性和转录组分析探讨其机制。研究结果表明, 在环境相关浓度(0.1~100.0 μg/L)范围内, PCMX 可促进质粒接合转移, 且在 10 μg/L 时促进作用最为显著; 当浓度升高至 1 000~10 000 μg/L 时, 转移频率下降, 这可能与高浓度 PCMX 抑制细胞生长有关。此外, PCMX 可以显著提高供体菌 ROS 水平, 并增强受体菌膜通透性。转录组分析表明, PCMX 处理显著上调甘油转运蛋白基因等多种跨膜物质转运相关基因的表达, 提示 PCMX 通过改变细胞膜通透性和干扰跨膜运输过程, 进而促进 ARGs 的接合转移。因此, 需加强 PCMX 的环境排放管控, 以降低其介导的 ARGs 环境传播风险。

关键词: 抗生素抗性基因; 可移动遗传元件; 水平基因转移; 酚类化合物

中图分类号: X703

文献标识码: A

Influence Mechanism of Parachlorometaxylenol on the Conjugative Transfer of Antibiotic Resistance Genes

KANG Wanying¹, FANG Guimei¹, TIAN Li¹, LIN Yunqi¹,
LIN Ziqi¹, MAO Yanping^{1,2,*}

(1. College of Chemistry and Environmental Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518071, China;
2. Key Laboratory of Coastal Urban Soil-Water Environmental Evolution, Ministry of Ecology and Environment (under construction), Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract: Residual disinfectants in aquatic environments may influence the dissemination of antibiotic resistance genes (ARGs) by affecting horizontal gene transfer among microorganisms. The phenolic disinfectant *p*-chloro-*m*-xylenol (PCMX) has been widely used and is frequently detected in municipal wastewater and surface waters at concentrations ranging from ng/L to μg/L. However, its potential effects on plasmid-mediated ARG dissemination remain insufficiently understood. This study investigated the influence of PCMX on the conjugative transfer of ARGs and explored the potential mechanisms involved. An intergeneric conjugation model was established using *Escherichia coli*

收稿日期: 2026-01-12

修回日期: 2026-03-27

接受日期: 2026-03-31

DOI: 10.20078/j.eep.20260403

基金项目: 深圳市科技计划项目-可持续发展专项(KCXFZ20230731093959008; KCXFZ20240903094205008)

第一作者: 康婉莹(2002—), 女, 黑龙江漠河人, 硕士研究生, 主要研究方向为抗生素耐药性的传播机制。E-mail: kkk9933@163.com

方桂妹(1997—), 女, 广东珠海人, 硕士研究生, 主要研究方向为抗生素抗性基因在水产养殖系统中的传播机制。

E-mail: 511521292@qq.com

*通讯作者: 毛艳萍(1985—), 女, 广西富川县人, 副教授, 主要研究方向为水污染控制工程及环境微生物学研究。E-mail: maoy@szu.edu.cn

CHS56 carrying plasmid RP4-8 as the donor strain and *Pseudomonas* sp. TS44 as the recipient strain. The effects of PCMX on conjugative transfer were evaluated over a concentration range of 0.1–10 000 µg/L. Conjugation experiments were combined with reactive oxygen species (ROS) detection, cell membrane permeability measurements, and transcriptomic analysis to investigate the physiological responses and molecular mechanisms associated with PCMX exposure. The results demonstrated that PCMX promoted plasmid-mediated conjugative transfer within environmentally relevant concentration ranges. Specifically, at concentrations between 0.1 and 100 µg/L, PCMX enhanced the transfer frequency of plasmid RP4-8 between the donor and recipient strains. The highest conjugation frequency (7.22×10^{-6}) was observed at 10 µg/L PCMX. When the concentration increased to 1 000–10 000 µg/L, the conjugation frequency declined, which may be associated with the inhibitory effects of high PCMX concentrations on bacterial growth and cellular activity. Flow cytometry analysis using DCF-DA staining indicated that PCMX exposure increased intracellular ROS levels in the donor strain *E. coli* CHS56 at concentrations of 100 and 10 000 µg/L. In contrast, no significant ROS variation was detected in the recipient strain *Pseudomonas* sp. TS44. The addition of the ROS scavenger N-acetylcysteine (NAC) significantly reduced intracellular ROS levels in the donor strain but did not markedly decrease the conjugation frequency, suggesting that oxidative stress was not the dominant factor responsible for the enhancement of plasmid transfer under PCMX exposure. Membrane permeability analysis revealed that PCMX exposure altered the integrity and permeability of bacterial cell membranes, particularly in the recipient strain. Increased membrane permeability may facilitate physical contact between donor and recipient cells and promote plasmid transfer. Transcriptomic analysis further showed that PCMX exposure significantly affected the global gene expression profiles of both donor and recipient strains. Multiple genes associated with membrane transport and transmembrane processes were differentially expressed. Among them, the glycerol uptake facilitator gene involved in membrane transport was significantly upregulated, indicating enhanced transmembrane transport activity under PCMX stress. These results suggest that PCMX can enhance plasmid-mediated ARG conjugative transfer primarily by altering cell membrane permeability and transmembrane transport processes rather than by ROS-mediated oxidative stress. Considering that PCMX cannot be completely removed during conventional wastewater treatment, residual PCMX may persist in biological treatment units containing dense microbial communities, thereby increasing the potential risk of ARG dissemination. The findings provide experimental evidence for evaluating the ecological risks of disinfectant residues in wastewater treatment systems and aquatic environments.

Keywords: Antibiotic resistance genes; Mobile genetic elements; Horizontal gene transfer; Phenolic compounds

0 引 言

抗生素的广泛使用导致其在环境中持续残留,进而驱动抗生素抗性基因(Antibiotic Resistance Genes, ARGs)在各类生态系统中富集与扩散。ARGs可通过垂直及水平基因转移(Horizontal Gene Transfer, HGT)传播,其中质粒介导的接合转移是ARGs实现跨菌种传播的关键途径之一^[1]。污水处理系统具有微生物密度高、营养条件充足且长期受多种污染物共同选择压力等特点,被视作

ARGs环境传播的典型热点区域^[2]。宏基因组学研究表明,城市污水中富集的ARGs往往与可移动遗传元件(Mobile Genetic Elements, MGEs)共存,其遗传背景与临床多重耐药菌株高度相关,揭示污水处理系统既是重要的ARGs环境储存库,也是耐药性进化与跨介质传播的关键节点^[3]。

传统研究普遍将抗生素残留视为驱动ARGs扩散的核心因素,而近年来越来越多研究表明,多种非抗生素类化学污染物也可显著促进ARGs传播,其中包括消毒剂、个人护理品组分及其他抗菌

类化合物^[4-5]。这类污染物通常以亚致死浓度长期赋存于环境中,可通过诱导活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)产生、改变细胞膜通透性或调控相关基因表达等方式加速 ARGs 的水平转移过程^[6]。同时,微生物在环境中的生存竞争策略也会影响耐药基因传播,当资源竞争加剧或环境胁迫增强时,ARGs 丰度会显著上升,这一过程与生物应激响应及代谢调控通路密切相关^[7]。此外,ARGs 与 MGEs 在水体、沉积物、土壤等不同环境介质中的分布存在明显差异,其迁移与归驱还受到环境条件及生态过程的共同调控。

酚类化合物是一类应用广泛的抗菌物质,普遍存在于消毒剂、清洁用品及个人护理产品中,且在常规污水处理工艺中难以被完全去除^[8]。已有研究证实,部分酚类物质可显著促进 ARGs 水平转移。例如在活性污泥体系中,苯酚及其衍生物可通过诱导 ROS 累积、提高细胞膜通透性,进而强化质粒介导的 ARGs 接合转移^[9]。药物残留、表面活性剂等其他外源污染物,也可通过改变细菌生理状态、调控微生物种间互作等方式加剧 ARGs 传播^[10-11],上述结果均表明,非抗生素类污染物可通过多种机制参与环境 ARGs 的扩散过程。

在常用酚类抗菌剂中,对氯间二甲苯酚(*p*-Chloro-*m*-xylenol, PCMX)因其广谱抗菌特性,被大量应用于香皂、洗手液、织物整理及医疗卫生消毒等领域^[12]。环境监测数据显示,PCMX 在污水、地表水及近岸海域中均有检出,浓度多处于 ng/L~ μ g/L 水平,部分污水处理厂进水中浓度更高^[13]。PCMX 分子结构中的氯取代基与酚羟基使其具有较高化学稳定性,常规污水处理工艺难以将其彻底矿化^[14]。尽管高级氧化工艺可借助活性氧实现 PCMX 降解,但在自然水体及传统处理单元中,PCMX 降解速率缓慢,表现出明显的环境持久性^[15]。与其他酚类物质相比,PCMX 不仅环境残留风险更高,还具有显著的生态毒性,可显著干扰微生物群落结构与功能^[16]。研究发现,高浓度 PCMX 会降低沉积物微生物多样性,并富集多药外排泵相关耐药基因^[17]。

PCMX 在污水管网等缺氧环境中性质稳定,其环境行为主要受生物膜吸附与微生物互作调控^[18],这意味着 PCMX 在进入污水处理系统前即可与微生物群落长期接触,为其影响 ARGs 传播提供了潜在环境条件。已有研究表明,多种消毒剂可通过交叉耐受、共选择等机制改变细菌耐药

性表型^[19-21],并可改变细菌对外源质粒的接收能力,进而影响 ARGs 在群落中的传播潜力^[22-23]。此外,细菌胞外聚合物(Extracellular Polymeric Substances, EPS)可通过强化菌株间接触与黏附,促进 ARGs 接合转移^[24]。然而,相较于其他消毒剂,目前关于 PCMX 对 ARGs 水平转移过程的影响及其分子机制,仍缺乏系统性研究。

值得关注的是,ARGs 在环境中不仅可在同种细菌内部传播,还能在不同属甚至不同科的菌株间发生水平转移。属间接合转移是耐药质粒跨生态位传播的重要方式,可显著拓宽 ARGs 宿主范围,加速耐药基因在环境微生物群落中的扩散。因此,在评价环境污染物对 ARGs 传播风险的影响时,系统探究其对属间接合转移的调控效应具有重要意义。基于此,本文以携带 RP4-8 质粒的大肠杆菌 CHS56 为供体菌、恶臭假单胞菌 TS44 为受体菌,构建属间接合转移模型,系统探究环境相关浓度 PCMX 对 ARGs 接合转移频率的影响,并结合 ROS 水平、细胞膜通透性及转录组响应变化,解析其潜在分子机制。研究结果旨在深化酚类抗菌剂对环境 ARGs 传播驱动机制的科学认识,为评估 PCMX 的生态风险与公共安全提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细菌菌株与培养条件

本文采用大肠杆菌 CHS56(携带 RP4-8 质粒,具有庆大霉素和氨苄青霉素抗性)作为供体菌株,恶臭假单胞菌 TS44(具有利福平和氨苄青霉素抗性)作为受体菌株。CHS56 购自武汉森灵生物科技有限公司,TS44 由本实验室长期保存。2 种菌株均保存于-80 °C 甘油管中,实验前在 LB 琼脂培养基上 30 °C 活化 24 h 后,挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中 30 °C 振荡培养过夜,用于后续实验。

LB 液体培养基由胰蛋白胨、酵母粉和氯化钠溶于超纯水中配制,经 121 °C 灭菌 20 min 后备用。LB 琼脂培养基在上述配方中加入琼脂粉灭菌后,冷却至约 50 °C 时加入含相应抗生素的磷酸盐缓冲溶液(PBS),PBS 由 KCl、NaCl、KH₂PO₄ 和 Na₂HPO₄ 配制后灭菌备用。实验中使用的 PCMX 溶液由无菌水配制成不同浓度,并通过 0.22 μ m 滤膜过滤除菌。

1.2 水平基因转移实验

为研究酚类抗菌物质 PCMX 对质粒介导的

ARGs 水平转移的影响,将活化后的供体 CHS56 与受体 TS44 分别离心、PBS 清洗,并调节至 1×10^8 CFU/mL。将浓度均为 1×10^8 CFU/mL 的供体菌液与受体菌液等体积混合,分别暴露于不同浓度的 PCMX 溶液(0.1、1、10、100、1 000 和 10 000 $\mu\text{g/L}$)中,于 30 $^\circ\text{C}$ 反应 7 h。以未添加 PCMX、仅加入等体积 PBS 的体系作为空白对照组。

反应结束后将混合菌悬液适当稀释,涂布于含有庆大霉素、氨苄青霉素和利福平的 LB 琼脂平板以计数转导结合体;同时涂布于仅含利福平的平板以计数受体菌落。转移频率计算方式为转导结合体数量除以受体菌落数量。为排除突变导致的假阳性,分别设置供体单独处理组和受体单独处理组,并在相同 PCMX 浓度下进行处理,以确保选择性平板上的菌落均为真正的转导结合体。

1.3 最低抑制浓度的测定

为验证转导结合体是否获得供体质粒上的抗性基因,本文分别测定供体菌、受体菌及接合后转导结合体对庆大霉素、氨苄青霉素和利福平的最低抑制浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)。将活化后的各菌株接种于 LB 液体培养基中,振荡培养 12 h,随后根据菌液的光密度(Optical Density, OD)值,将其调节至约 1×10^6 CFU/mL,将调节好浓度的菌液接种至预先配制好、含不同浓度梯度抗生素的 96 孔板中,置于 30 $^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中培养 16 h,期间于 600 nm 波长处每小时测定一次菌液的 OD₆₀₀ 值,以监测菌株生长情况。

由于利福平本身呈红色,会影响 OD 测量,因此其 MIC 采用肉眼观察浑浊度的方式确定。所有实验均设置 3 次平行,以 LB 液体培养基作为阴性对照。

1.4 质粒 DNA 的提取与鉴定

为确认转导结合体是否携带供体的 RP4-8 质粒,分别从供体、受体及不同处理条件下的转导结合体中提取质粒 DNA。采用 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒(生工生物工程上海有限公司)获取质粒 DNA,并使用酶标仪测定其浓度,随后使用琼脂糖凝胶电泳分析质粒条带情况。同时选取 RP4-8 质粒上的两段特征序列进行 PCR 扩增,并对扩增产物进行 Sanger 测序,以判断转导结合体携带的质粒是否来源于供体质粒。

1.5 ROS 水平的检测

为探究 PCMX 对细菌氧化应激的影响,将供体 CHS56 和受体 TS44 重悬于 PBS 中至 1×10^6

CFU/mL,加入 ROS 荧光探针 DCF-DA,在 37 $^\circ\text{C}$ 、100 r/min、避光条件下孵育 30 min。随后加入不同浓度的 PCMX,继续孵育 2 h。

为评估 ROS 在促进质粒转移中的作用,在加入 PCMX 之前,在部分体系中加入 ROS 清除剂 N-乙酰基-L-半胱氨酸。孵育结束后使用流式细胞仪(美国 Beckman Coulter, CytoFLEX)检测荧光强度变化,以反映 ROS 水平的变化。

1.6 细胞膜通透性测定

通过碘化丙啶(PI)染色后使用流式细胞仪测定 PCMX 对细菌细胞膜通透性的影响。将供体和受体菌株分别暴露于不同浓度的 PCMX,与 PI 溶液混合,在避光条件下孵育 30 min。随即使用流式细胞仪检测荧光信号强度,以评估细胞膜的受损程度。未经处理的菌体作为完整细胞对照,而经 80 $^\circ\text{C}$ 加热 2 h 的菌体作为受损细胞对照。

1.7 转录组测序与分析

为分析 PCMX 对细菌基因表达的影响,将供体和受体菌株分别在 0、100 和 10 000 $\mu\text{g/L}$ PCMX 作用 2 h 后收集菌体,采用 RNA prep Pure Cell/Bacteria 试剂盒(天根,中国)提取样品的总 RNA 用于转录组测序。通过 NanoDrop 2000(ThermoFisher, 美国)和琼脂糖凝胶检测其纯度和完整性,并使用 Agilent 2100 生物分析仪(Agilent Technologies, 美国)测定 RNA 完整性指数,该指数大于 8.0 的样品用于建库。构建链特异性文库后,通过 Illumina NovaSeq 6000 平台进行 PE150 测序。

采用 Bowtie2 软件(v2.2.6)^[25]将测序获得的 clean reads 与供体和受体的参考基因组进行比对,利用 Samtools 软件(v1.10)^[26]将 Bowtie2 比对产生的 Sam 格式文件转换为 bam 格式并排序,然后根据 bam 文件,利用 HTSeq 软件(v0.11.3)^[27]计算基因表达量。使用 R 软件包 DESeq2 鉴定处理组和对照组的差异表达基因(Differentially Expression Gene, DEG),输入文件为 HTSeq 产生的基因表达量矩阵。差异表达基因的筛选使用 DESeq2 软件进行,筛选标准为 $|\log_2\text{FoldChange}| \geq 1$ 且 $p.\text{adj} < 0.05$ 。进一步对 HTSeq 进行差异表达分析,采用 DESeq2 完成归一化与差异检验,并对计数矩阵进行 VST 转换用于样本层面汇总。根据 KO 注释结果,重点关注与膜通透性、细胞包膜及跨膜运输相关的功能类别。

1.8 数据统计分析

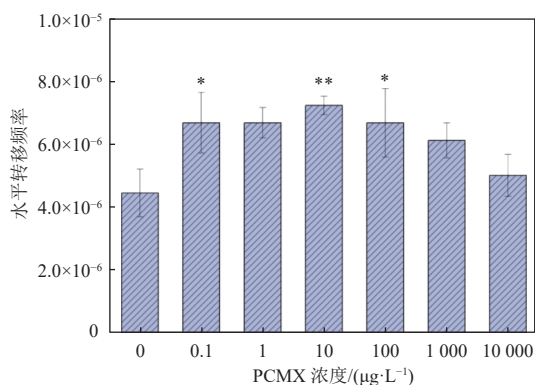
本研究设置 3 个平行实验,数据以平均值 \pm 标

准差表示。采用 Origin 2019 进行绘图, SPSS 2.0 进行差异显著性分析。相关性分析使用 Spearman 相关系数, 差异显著性判断采用 t 检验, 其中 $p < 0.05$ 表示差异显著, $p < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果和讨论

2.1 PCMX 影响细菌质粒介导的 ARGs 水平转移

为探究 PCMX 对细菌质粒介导的接合转移的影响, 本文选择了供体大肠杆菌 CHS56 及受体恶臭假单胞菌 TS44 暴露在不同浓度(0、0.1、1、10、100、1 000 和 10 000 $\mu\text{g/L}$)的 PCMX 溶液下进行属间转移, 以模拟环境中 PCMX 对细菌 ARGs 水平转移的影响。基于水平转移频率, 即转导结合体选择平板的菌落数量除以受体选择平板上的菌落数量的数值来代表转导结合率。如图 1 所示, 所有浓度下的 PCMX 均会增加细菌属间转移的水平基因转移频率, 整体呈现先上升后下降趋势, 其中在 10 $\mu\text{g/L}$ 的 PCMX 下, 水平转移频率最高达到 7.22×10^{-6} 。当 PCMX 浓度不断增大, 可能由于它对细菌生长造成了毒害作用, 水平转移频率降低。PCMX 在环境中残留的浓度范围(0.1~100.0 $\mu\text{g/L}$)较可能影响细菌 ARGs 水平基因转移, 因此需关注环境中 PCMX 对 ARGs 传播造成的影响。



注: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$, 余同

图 1 PCMX 对质粒 RP4-8 从大肠杆菌 CHS56 到恶臭假单胞菌 TS44 的接合转移频率的影响

Fig. 1 Effect of PCMX on the the conjugative transfer frequency of plasmid RP4-8 from *Escherichia coli* CHS56 to *Pseudomonas sp.* TS44

在实际污水处理系统中, PCMX 并不能被完全去除, 其在生物处理单元中的长期存在可能对抗性基因传播产生潜在风险。尤其在以化学强化初沉为主的处理工艺中^[28], PCMX 几乎无法被有效去除, 其出水是水环境中 PCMX 的重要持续污

染源。

本文结果表明, 在环境相关浓度范围内的 PCMX 可显著促进供受体菌之间的接合转移频率, 说明在实际污水生物处理单元(如曝气池和生物膜反应器)中, 残留 PCMX 可能通过影响细胞膜通透性和氧化应激水平, 进一步增强抗性基因在微生物群落中的扩散风险。该发现为评估消毒剂类污染物在污水处理系统中的潜在生态风险提供了新的证据, 也提示了未来有必要在工程运行层面加强对 PCMX 等消毒剂残留的监测与控制。

2.2 最低抑制浓度分析

通过比较庆大霉素、氨苄西林和利福平对供体 CHS56、受体 TS44 和转导结合体菌株的 MIC, 能够为转导结合体通过水平转移获得质粒提供证据。结果见表 1, 供体 CHS56 对庆大霉素和氨苄西林抗生素具有抗性, MIC 分别达到 1 000 mg/L 和 $>2 000 \text{mg/L}$, 而利福平的 MIC 为 0。具有利福平和氨苄西林抗性的受体 TS44 对庆大霉素、氨苄西林和利福平的 MIC 分别为 0、 $>2 000$ 和 1 000 mg/L 。经过水平基因转移之后的转导结合体既具备供体对抗生素产生的抗性, 也具备受体对抗生素产生的抗性, 与预期设想的结果一致。转导结合体对庆大霉素、氨苄西林和利福平的 MIC 分别为 1 000、 $>2 000$ 和 1 000 mg/L 。此外, 所有转导结合体均在假单胞菌选择性平板上生长, 由于供体大肠杆菌 CHS56 在假单胞菌选择性培养基上不具备生长能力, 因此能够在该平板上形成菌落的菌株为获得质粒的受体假单胞菌, 从而排除了供体菌突变耐药的可能性, 这证实它们是转导结合体的假单胞菌属物种, 而不是具有高利福平抗性的供体大肠杆菌。

表 1 抗生素对菌株的最低抑制浓度测定结果

Table 1 Minimum inhibitory concentrations of antibiotics against the tested strains

类别	庆大霉素 MIC/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	氨苄西林 MIC/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	利福平 MIC/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
供体 CHS56	1 000	$>2 000$	0
受体 TS44	0	$>2 000$	1 000
转导结合体	1 000	$>2 000$	1 000

2.3 质粒鉴定分析

本文提取了供体 CHS56、受体 TS44 以及不同 PCMX 浓度下属间转移后转导结合体菌株的质粒, 并进行了琼脂糖凝胶电泳。从供体和所有转

导结合体的质粒中可以观察到一条明显的质粒 DNA 条带, 在受体中没有检测到可观察的质粒 DNA 条带。琼脂糖凝胶电泳图中所有来自转导结合体质粒与供体质粒的 DNA 迁移距离相似, 表明供体和转导结合体之间质粒大小相似。

为了进一步确认提取的质粒的遗传同一性, 采用 Sanger 测序方法对供体及转导结合体质粒

DNA 的 PCR 扩增产物进行了测序。对于每个样品, 选择质粒上两段序列, 引物信息见表 2, 具体位置如图 2 所示。对质粒 DNA 进行 PCR 扩增, 随后对产物进行 Sanger 测序, 测序得到序列与 RP4-8 质粒相应序列完全匹配, 证明转导结合体的质粒来源于供体质粒。

表 2 质粒 RP4-8 序列的引物信息

Table 2 Primer information for the plasmid RP4-8 sequence

类别	正向引物	反向引物	扩增产物/bp
序列1	catagttctcgcgtgtcgtgatggt	acgtcatggcaattctaacaagccg	640
序列2	acgggtggccgtctggatcagctt	tgcttctcggcgtcatcctcgcac	1 027

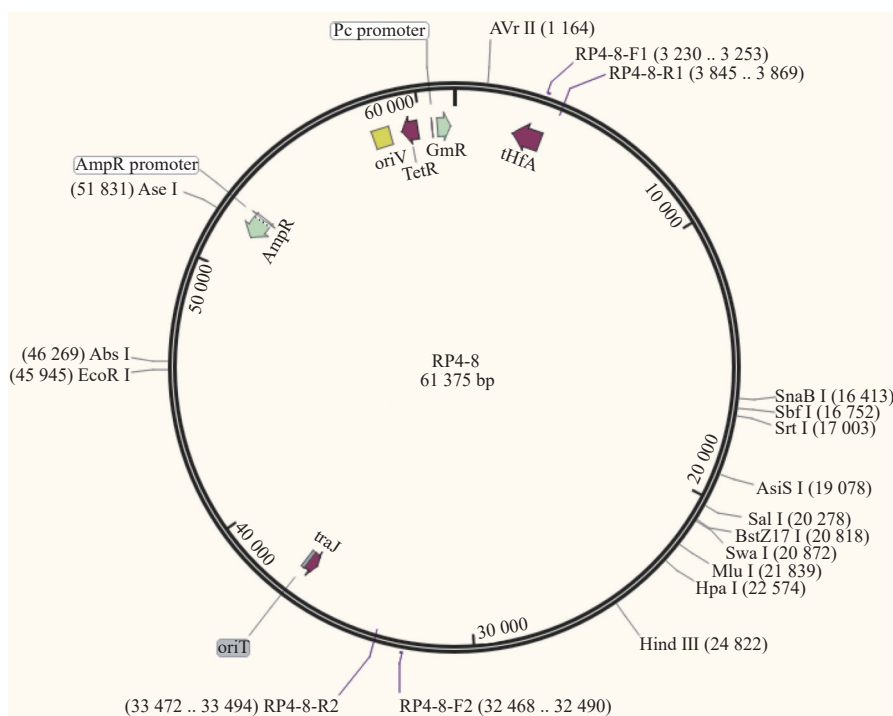


图 2 质粒 RP4-8 的序列信息

Fig. 2 Sequence information of plasmid RP4-8

2.4 细胞内活性氧分析

为了测试增加的共轭转移频率是否与 ROS 的过量产生有关, 本文使用流式细胞仪测量 PCMX 对细菌 ROS 产生的影响。使用特定染色剂 2', 7'-二氯荧光素二乙酸盐 (DCF-DA) 对细菌染色, 然后用流式细胞仪检测荧光强度的变化来判断细菌在 PCMX 刺激前后 ROS 的变化。结果如图 3 所示, ROS 的变化由对照的百分比表示。对于供体大肠杆菌 CHS56 来说, 当 PCMX 的浓度在 100 $\mu\text{g/L}$ 和 10 000 $\mu\text{g/L}$ 时, ROS 水平显著增加, 而受体恶臭假单胞菌 TS44 菌株在不同浓度的 PCMX 刺激

下 ROS 水平没有明显变化。

为进一步探讨 ROS 在 PCMX 介导的接合转移过程中的潜在作用, 本文引入 ROS 清除剂 N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 进行辅助实验。结果表明, 在加入 NAC 后, 供体菌 CHS56 的 ROS 水平呈下降趋势, 表明 ROS 参与了 PCMX 诱导的细胞应激响应过程。然而, 与前人关于 ARGs 接合转移的研究相比^[29-30], 本研究 ROS 清除剂未显著降低接合转移频率, 说明 PCMX 可能并非主要通过 ROS 途径发挥作用, 更可能是通过影响细胞膜结构和转录调控实现其促进效应。

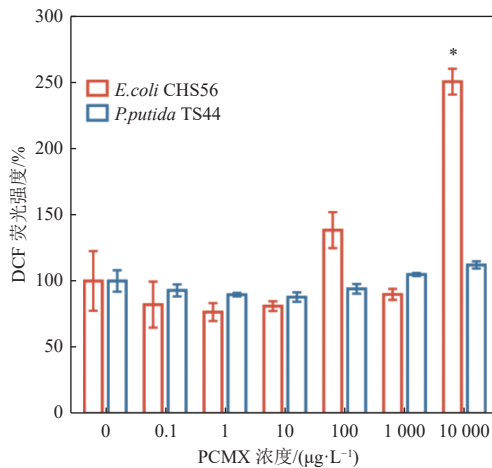


图3 不同浓度 PCMX 处理下 CHS56 和 TS44 的活性氧产生情况

Fig. 3 Reactive oxidative species (ROS) generation of CHS56 and TS44 under different PCMX concentrations

2.5 细胞膜通透性分析

为了测试增加的接合转移频率是否与细胞膜通透性变化有关,本文采用流式细胞仪测量 PCMX 对细菌细胞膜通透性产生的影响。使用染色剂碘化丙啶对细菌染色,然后用流式细胞仪检测荧光强度来判断细菌在 PCMX 刺激前后细胞膜通透性的变化,因此 PI 阳性细胞(即被 PI 染色的细胞)的比例可反映细胞膜通透性的变化。结果如图 4 所示,用 PCMX 处理的受体 TS44 细胞的 PI 阳性百分比在不同 PCMX 浓度下均呈现增加的趋势,在 10 000 µg/L 时明显增加。说明一定浓度 PCMX 刺激下会引起受体细胞膜的通透性增加。然而对于供体 CHS56,其 PI 阳性细胞在 PCMX 的刺激下与空白对照相比没有较显著变化,仅在 10 000 µg/L 时呈现较明显的增加趋势。

2.6 转录组分析

为了研究 PCMX 在分子水平上对细菌水平转移的影响,本文通过提取不同浓度酚作用下水平转移 2 h 后菌体的 RNA 进行转录组测序。首先通过聚类分析剔除误差较大的样品,PCA 分析和 Spearman 分析供体与受体样品基因差异表达的相关性。为便于结果展示与区分不同处理条件,本研究对转录组样本进行统一编号。X0 表示未添加 PCMX 的空白对照组;P1 和 P3 分别表示不同浓度 PCMX 处理组,其中 P1 为 10 000 µg/L, P3 为 100 µg/L; D4 和 D6 分别表示不同浓度的 2,4-DCP 处理组, D4 为 1 mg/L, D6 为 0.01 mg/L。其中 2,4-DCP 处理组作为典型酚类污染物对照,用于比较不同酚类化合物对细菌转录响应的影响。结果如

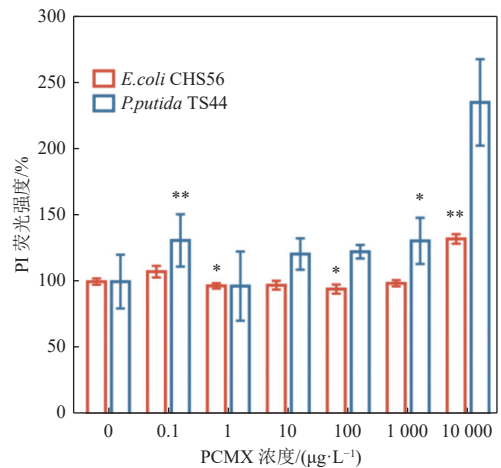


图4 不同浓度 PCMX 处理下 CHS56 和 TS44 的细胞膜通透性

Fig. 4 Cell membrane permeability of CHS56 and TS44 under different PCMX concentrations

图 5 和图 6 所示。PCA 分析显示,10 000 µg/L PCMX 处理组与对照组明显分离,表明 PCMX 可

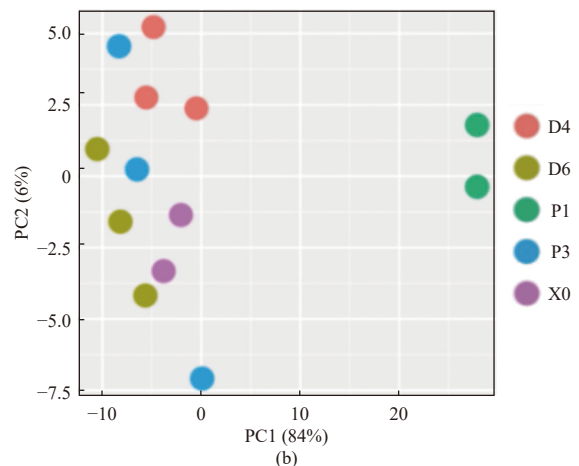
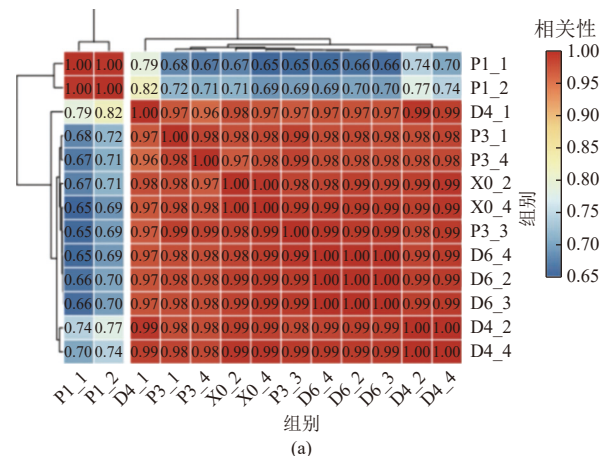


图5 CHS56 的 Spearman 分析热图(a)和 PCA 分析图(b) of CHS56

显著改变菌株的整体转录响应模式,其偏离程度显著大于典型酚类 D4 组,表明高浓度 PCMX 对细菌整体转录模式的影响比传统酚类污染物更为剧烈。然后对样品进行基因表达分析,得到供体和受体在空白对照及加入酚之后基因表达量的变化,图 7 和图 8 中,Up-regulated、Down-regulated 和 Not-significant 分别表示显著上调基因、显著下调基因及差异不显著基因。结果如图 7 和图 8 所示,10 000 $\mu\text{g/L}$ PCMX 处理后,供体大肠杆菌和受体恶臭假单胞菌的基因上下调结果较明显,供体 CHS56 有 208 个 DEGs 显著上调,497 个 DEGs 显著下调,而受体 TS44 有 28 个 DEGs 显著上调,60 个 DEGs 显著下调。100 $\mu\text{g/L}$ PCMX 处理的样品基因差异表达情况不显著。

进一步的 KEGG 代谢通路富集分析结果显示,供体菌株 CHS56 的转录组数据中,相较于空

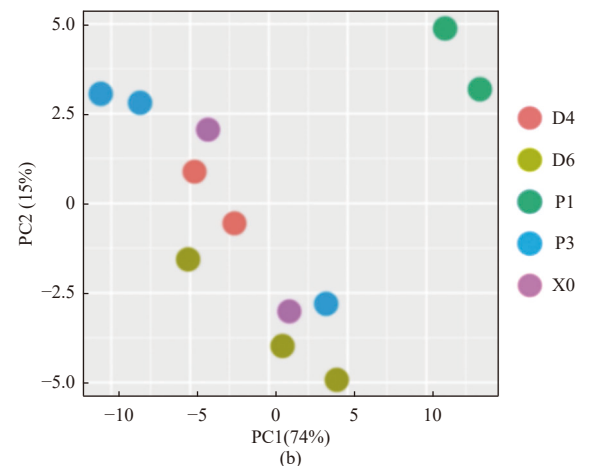
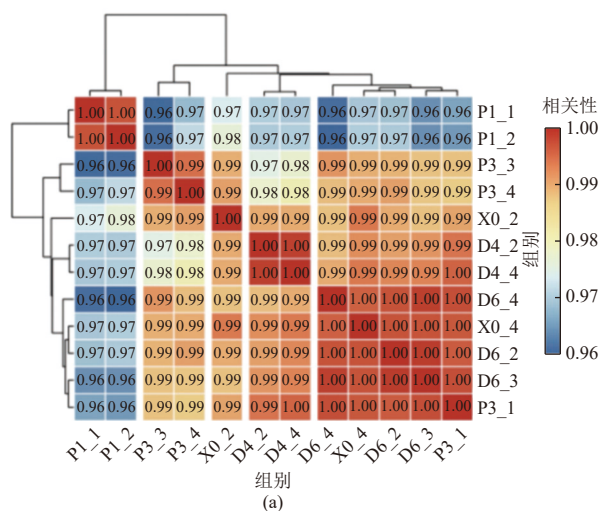


图 6 TS44 的 Spearman 分析热图(a)和 PCA 分析图(b)
Fig. 6 Spearman correlation heatmap (a) and PCA plot (b) of TS44

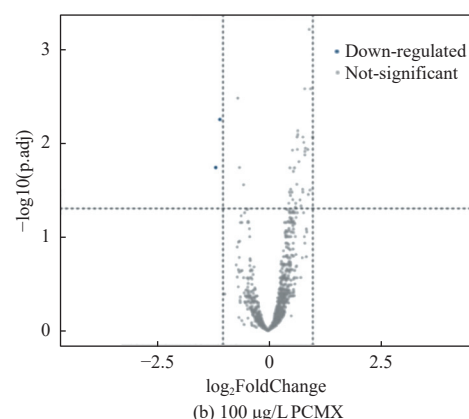
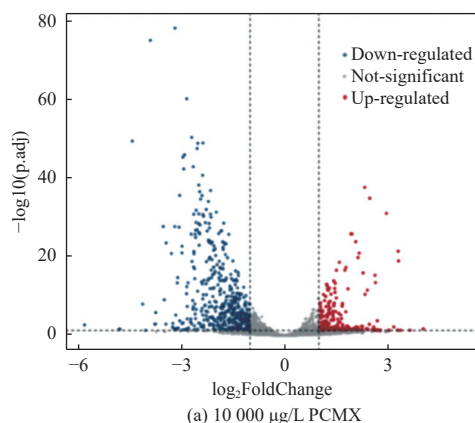


图 7 CHS56 在 10 000 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$ PCMX 处理下的基因上下调情况

Fig. 7 Up- and down-regulated genes in CHS56 under PCMX treatment at 10 000 $\mu\text{g/L}$ and 100 $\mu\text{g/L}$

白对照组(X0), P1 处理组膜相关功能基因集的整体表达水平存在明显差异(图 9(a))。在关键基因层面,典型跨膜通道与跨膜转运相关基因呈现显著响应特征:基于 KofamScan 的 KO 功能注释,筛选出膜通透性相关关键基因后发现,甘油转运蛋白基因(glycerol uptake facilitator, K02440)在 P1 处理条件下显著上调($\log_2\text{FoldChange}=2.67$, $p.\text{adj}=0.051$, 满足 $p.\text{adj}<0.1$ 的统计标准),同时多类转运系统相关基因也均呈现上调趋势(图 9(b))。上述结果从转录组水平直接佐证了 P1 处理可引发菌株跨膜物质交换能力及膜通透性相关过程的变化,为该调控机制的论证提供了关键数据支撑。

3 结 论

本文构建了以大肠杆菌 CHS56 为供体、恶臭假单胞菌 TS44 为受体的属间接合转移体系,系统评估了酚类消毒剂对氯间二甲苯酚(PCMX)在 0.1~10 000.0 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内对质粒 RP4-8 介导

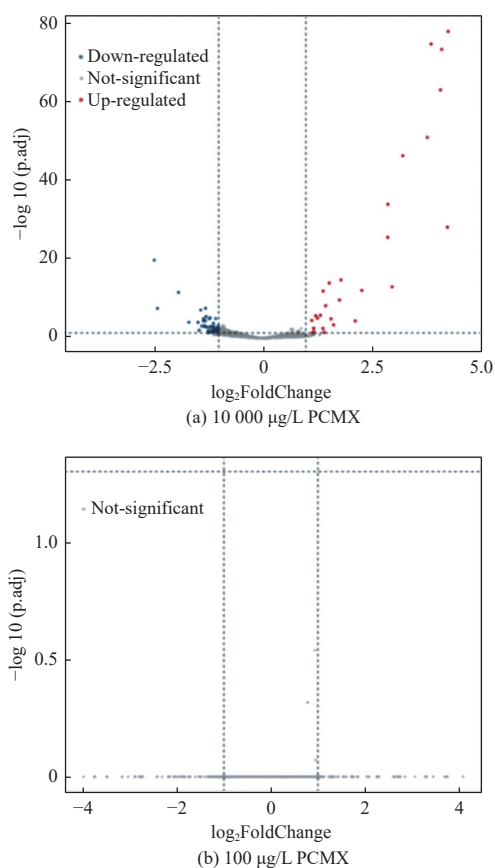


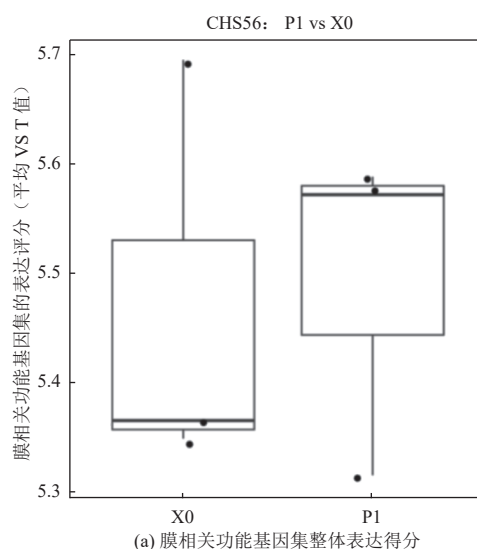
图 8 TS44 在 10 000 µg/L 和 100 µg/L PCMX 处理下的基因上下调情况

Fig. 8 Up- and down-regulated genes in TS44 under PCMX treatment at 10 000 µg/L and 100 µg/L

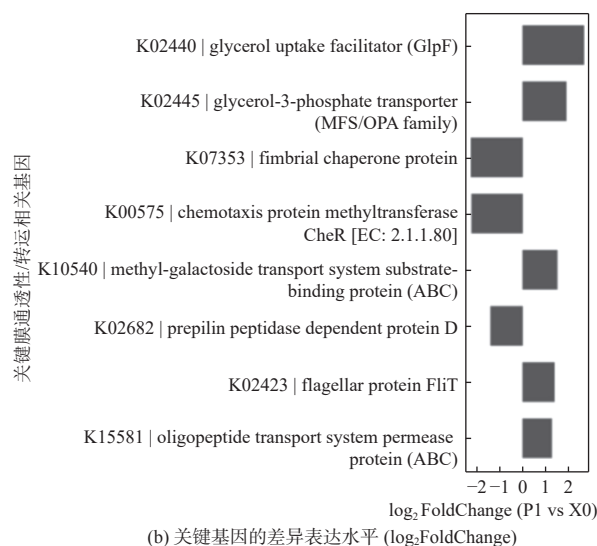
的抗生素抗性基因(ARGs)接合转移的影响,并结合 ROS 测定、细胞膜通透性分析和转录组测序解析其作用机制。

综上,在环境相关浓度(0.1~100.0 µg/L)范围内,PCMX 可显著促进 ARGs 的属间接转移,最大转移频率(10 µg/L 时)达 7.22×10^{-6} ,表明环境残留的 PCMX 可能加剧抗生素抗性基因的传播风险。当 PCMX 浓度进一步升高至 1 000~10 000 µg/L 时,接合转移频率出现下降趋势,这可能与高浓度 PCMX 对细胞生长和代谢产生毒性抑制作用有关,从而降低细胞活性及供受体细胞间有效接触概率。该结果表明,PCMX 在亚抑制浓度条件下,能够作为一种非抗生素选择压力促进耐药质粒传播,而在高浓度条件下,则表现出抑制微生物活性的毒性效应。

ROS 检测结果显示,可在 100 µg/L 和 10 000 µg/L PCMX 条件下诱导供体菌 CHS56 的 ROS 水平升高,但受体菌 TS44 的 ROS 水平变化不明



(a) 膜相关功能基因集整体表达得分



(b) 关键基因的差异表达水平 (log₂FoldChange)

图 9 CHS56 菌株在 PCMX 处理下(P1)相对于空白对照(X0)的膜通透性及跨膜转运相关转录响应

Fig. 9 Transcriptional responses related to membrane permeability and transmembrane transport in strain CHS56 under PCMX treatment (P1) relative to the control (X0)

显。进一步通过添加 ROS 清除剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)验证后发现,尽管 ROS 水平下降,但接合转移频率并未明显降低,说明 ROS 并非 PCMX 促进 ARGs 接合转移的主要驱动因素。

细胞膜通透性分析表明,PCMX 处理后受体菌 TS44 的 PI 阳性细胞比例随浓度升高而增加,在 10 000 µg/L 时显著上升($p < 0.01$),表明 PCMX 可改变细胞膜完整性并提高膜通透性,从而有利于供受体细胞之间的物理接触及质粒传递过程。转录组结果进一步证实了该调控机制:在 10 000 µg/L

的 PCMX 处理条件下,供体菌 CHS56 出现 208 个显著上调基因和 497 个显著下调基因,并且多类跨膜运输相关基因表达显著增强。其中甘油转运蛋白基因显著上调($\log_2\text{FoldChange}=2.67$),表明 PCMX 暴露能够调控膜运输及跨膜物质交换过程,从分子水平解释了 PCMX 对细胞膜通透性及接合转移能力的影响。

综上所述,研究结果表明 PCMX 在环境相关浓度(0.1~100.0 $\mu\text{g/L}$)下能够促进质粒 RP4-8 介导的 ARGs 属间接合转移,其主要机制与细胞膜通透性增强及跨膜运输相关基因表达变化有关,而 ROS 并非主要的驱动因素。由于 PCMX 在常规污水处理过程中难以完全去除,其在生物处理单元中的长期残留可能增加耐药基因在微生物群落中的传播风险。因此,应加强对 PCMX 等消毒剂残留的环境监测与管理,以降低其对水环境抗生素耐药性传播的潜在生态风险。

参考文献 (References) :

- [1] YI Jiaming, LI Zhengtao, HAN Xuezhu, et al. Metformin drives the antibiotic resistome in activated sludge by reshaping microbial communities and promoting horizontal gene transfer[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2026, 501: 140887.
- [2] PAUL D, TALUKDAR D, KAPUGANTI R S, et al. Antibiotic contamination and antimicrobial resistance dynamics in the urban sewage microbiome in India[J]. *Nature Communications*, 2026, 17: 1274.
- [3] LI Bingcong, CHANG Chao, SUN Changshun, et al. Multi-habitat distribution and coalescence of resistomes at the watershed scale based on metagenomics[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2024, 477: 135349.
- [4] LI Mingzhu, HE Yuning, SUN Jing, et al. Chronic exposure to an environmentally relevant triclosan concentration induces persistent triclosan resistance but reversible antibiotic tolerance in escherichia coli[J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(6): 3277–3286.
- [5] NOWAK LANGE M, NIEDZIAŁKOWSKA K, LISOWSKA K. Cosmetic preservatives: Hazardous micropollutants in need of greater attention?[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(22): 14495.
- [6] ZENG Jieyi, LI Yaying, JIN Guoping, et al. Short-term benzalkonium chloride (C_{12}) exposure induced the occurrence of wide-spectrum antibiotic resistance in agricultural soils[J]. *Environmental Science & Technology*, 2022, 56(21): 15054–15063.
- [7] LIU Zishu, YAO Xiangwu, CHEN Chengyi, et al. Growth of microbes in competitive lifestyles promotes increased ARGs in soil microbiota: Insights based on genetic traits[J]. *Microbiome*, 2025, 13(1): 8.
- [8] LUO Pengcheng, ZHANG Han, DUAN Jinping, et al. Mechanistic insights into the effectiveness of double dielectric barrier discharge plasma for PCMX removal from water[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2025, 13(5): 118755.
- [9] MA Xueyan, ZHANG Xiuwen, XIA Juntao, et al. Phenolic compounds promote the horizontal transfer of antibiotic resistance genes in activated sludge[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 800: 149549.
- [10] YIN Hongliang, CHEN Xiaofang, LI Guiying, et al. Can photocatalytic technology facilitate conjugative transfer of ARGs in bacteria at the interface of natural sphalerite under different light irradiation?[J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2021, 287: 119977.
- [11] ZHANG Huanjun, XU Linyun, HOU Xing, et al. Keto-pyren promotes the conjugative transfer of antibiotic resistance among antibiotic resistant bacteria in natural aqueous environments[J]. *Environmental Pollution*, 2024, 360: 124676.
- [12] MAILLARD J Y. Impact of benzalkonium chloride, benzethonium chloride and chloroxylenol on bacterial antimicrobial resistance[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2022, 133(6): 3322–3346.
- [13] AU C K, JASON CHAN K K, CHAN Wan, et al. Occurrence and stability of PCMX in water environments and its removal by municipal wastewater treatment processes[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 445: 130550.
- [14] CHOI D, OH S. Removal of chloroxylenol disinfectant by an activated sludge microbial community[J]. *Microbes and Environments*, 2019, 34(2): 129–135.
- [15] LI Wei, GUO Hongguang, WANG Chengjin, et al. ROS reevaluation for degradation of 4-chloro-3, 5-dimethylphenol (PCMX) by UV and UV/persulfate processes in the water: Kinetics, mechanism, DFT studies and toxicity evolution[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2020, 390: 124610.
- [16] PAN Hanqing, SHI Jia, XU Dan, et al. Environmental occurrence, ecological risks, and microbial interactions of *p*-chloro-*m*-xylenol: An emerging ubiquitous antimicrobial agent[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2026, 207: 106229.
- [17] SHI Jia, ZHAO Liang, FAN Minghao, et al. Deciphering the intricate microbial responses and potential degraders of *p*-chloro-*m*-xylenol in marine sediments[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2025, 495: 138785.
- [18] XIA Xinhui, MU Huizhi, DU Yujia, et al. Could chloroxylenol be used as WBE biomarker in gravity sewers? Fates, behaviors and feasible conditions[J]. *Water Research*, 2025, 278: 123376.
- [19] WEATHERLY L M, GOSSE J A. Triclosan exposure, transformation, and human health effects[J]. *Journal of Toxi-*

- cology and Environmental Health Part B, *Critical Reviews*, 2017, 20(8): 447–469.
- [20] ROZMAN U, PUŠNIK M, KMETEC S, et al. Reduced susceptibility and increased resistance of bacteria against disinfectants: A systematic review[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(12): 2550.
- [21] YANG QIU e, MA Xiaodan, LI Minchun, et al. Evolution of triclosan resistance modulates bacterial permissiveness to multidrug resistance plasmids and phages[J]. *Nature Communications*, 2024, 15: 3654.
- [22] LU Ji, WANG Yue, LI Jie, et al. Triclosan at environmentally relevant concentrations promotes horizontal transfer of multidrug resistance genes within and across bacterial Genera[J]. *Environment International*, 2018, 121: 1217–1226.
- [23] HU Qin, ZHANG Lilan, YANG Rui, et al. Quaternary ammonium biocides promote conjugative transfer of antibiotic resistance gene in structure- and species-dependent manner[J]. *Environment International*, 2024, 189: 108812.
- [24] SUN Hong, CHANG Wenjiao, XIONG Pengcheng, et al. Unveiling the impact of extracellular polymeric substances (EPS) on the conjugative transfer of antibiotic resistance genes (ARGs) [J]. *Environmental Science & Technology*, 2026, 60(1): 788–799.
- [25] LANGMEAD B, SALZBERG S L. Fast gapped-read alignment with bowtie 2[J]. *Nature Methods*, 2012, 9(4) : 357–359.
- [26] DANECEK P, BONFIELD J K, LIDDLE J, et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools[J]. *GigaScience*, 2021, 10(2): giab008.
- [27] PUTRI G H, ANDERS S, PYL P T, et al. Analysing high-throughput sequencing data in Python with HTSeq 2.0[J]. *Bioinformatics*, 2022, 38(10): 2943–2945.
- [28] GUO Yi, GAO Jingfeng, CUI Yingchao, et al. Chloroxylenol at environmental concentrations can promote conjugative transfer of antibiotic resistance genes by multiple mechanisms[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 816: 151599.
- [29] XUE Bin, GUO Xuan, CAO Jinrui, et al. The occurrence, ecological risk, and control of disinfection by-products from intensified wastewater disinfection during the COVID-19 pandemic[J]. *Science of the Total Environment*, 2023, 900: 165602.
- [30] YU Zhigang, WANG Yue, LU Ji, et al. Nonnutritive sweeteners can promote the dissemination of antibiotic resistance through conjugative gene transfer[J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(7): 2117–2130.