

聚苯乙烯微(纳)塑料对抗生素抗性基因转移的影响及其机制

唐振平^{1,2}, 龚子璇¹, 刘博阳³, 宋建¹, 周帅^{1,2,3,*}

(1. 南华大学 稀有金属矿产开发与废物地质处置技术湖南省重点实验室, 湖南 衡阳 421001;

2. 南华大学 污染控制与资源化技术湖南省高校重点实验室, 湖南 衡阳 421001;

3. 南华大学 土木工程学院, 湖南 衡阳 421001)

摘要: 细菌抗生素抗性基因(ARGs)与微/纳米塑料(MPs/NPs)作为新兴污染物,其复合污染逐渐成为环境领域研究的前沿热点。MPs/NPs被认为是ARGs在环境介质中增殖与传播的关键影响因素之一,但其对ARGs水平转移(尤其是转化)的影响机制研究仍较为有限。本研究通过构建耐药质粒pUC19转化体系,揭示不同浓度和尺寸聚苯乙烯(PS)MPs/NPs胁迫下大肠杆菌中ARGs的水平转移规律。结果表明,5 mg/L 100 μm、50 mg/L 100 μm、5 mg/L 100 nm和50 mg/L 100 nm PS暴露后,大肠杆菌的生长抑制率分别达到15.13%、18.59%、26.97%和35.84%($p < 0.01$),说明PS对大肠杆菌生长抑制作用与浓度成正比,与尺寸成反比。此外,PS MPs(浓度 ≤ 5 mg/L)和PS NPs(浓度 ≤ 50 mg/L)冲击会显著促进ARGs的转化过程,且具有浓度依赖性。在同种浓度下,ARGs转化频率随着PS冲击尺寸的增大而减小。其中,100 nm PS(50 mg/L)对ARGs转化频率的影响最大(增加79.34%)。然而,经过1 mm PS(50 mg/L)冲击后,ARGs转化频率降低了21.80%,说明高浓度1 mm PS冲击抑制了ARGs的转化过程。此外,通过活/死细胞检测分析发现,大肠杆菌细胞膜通透性随着PS浓度的增加持续显著增加(较对照组增加了56.66%~69.47%)。在同浓度条件下,PS尺寸越小细胞膜通透性越高。与PS MPs相似,PS NPs使细胞膜通透性增加了41.99%~46.62%。这说明高浓度PS NPs冲击会通过增强*E. coli*细胞膜通透性促进ARGs的转化。研究结果阐明了MPs/NPs对ARGs转化的影响机制,为处理ARGs和MPs/NPs复合污染高效控制策略提供了理论依据和技术指导。

关键词: 抗生素抗性基因; 微塑料; 纳米塑料; 水平基因转移; 细胞膜通透性; 大肠杆菌

中图分类号: X703

文献标识码: A

Influence and Mechanisms of Polystyrene Micro/Nanoplastics on the Transfer of Antibiotic Resistance Genes

TANG Zhenping^{1,2}, GONG Zixuan¹, LIU Boyang³, SONG Jian¹, ZHOU Shuai^{1,2,3,*}

(1. Hunan Province Key Laboratory of Rare Metal Mineral Exploitation and Geological Disposal of Wastes, University of South China, Hengyang 421001, China; 2. Hunan Province Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse Technology, University of South China, Hengyang 421001, China; 3. School of Civil Engineering, University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract: As emerging environmental pollutants, antibiotic resistance genes (ARGs) and micro/nanoplastics (MPs/NPs) have been detected in various environmental media worldwide. Due to their small size and large surface area, MPs/NPs possess significant potential to act as carriers of ARGs.

收稿日期: 2024-12-09

修回日期: 2024-12-27

接受日期: 2024-12-31

DOI: 10.20078/j.ep.20250107

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目(2024JJ5329); 南华大学研究生科研创新资助项目(233YXC004)

第一作者: 唐振平(1962—), 男, 湖南资兴人, 研究员, 主要研究方向为矿山环境监测、评价及治理, 新污染物处理理论与技术。

E-mail: zptang01@126.com

通讯作者: 周帅(1987—), 男, 湖南衡阳人, 副教授, 主要研究方向为新污染物处理理论与技术。E-mail: zs402606665@126.com

As such, the combined pollution of ARGs and MPs/NPs has attracted widespread attention due to their potential synergistic effects. Although MPs/NPs are considered key factors in the spread of ARGs in environmental media, knowledge of the effects and mechanisms of MPs/NPs on the horizontal transfer (particularly the transformation process) of ARGs in *Escherichia coli* (*E. coli*) is still largely limited. To bridge this knowledge gap, this study investigated the effects of different concentrations and sizes of polystyrene (PS) on the horizontal transfer of ARGs. We constructed a plasmid-mediated transformation system using the antibiotic-resistant plasmid pUC19 as donor and *E. coli* as recipient bacteria. Our results showed that after exposure to 5 mg/L 100 μm , 50 mg/L 100 μm , 5 mg/L 100 nm, and 50 mg/L 100 nm PS, the growth inhibition rates of *E. coli* reached 15.13%, 18.59%, 26.97%, and 35.84%, respectively ($p < 0.01$). In addition, the impact of PS MPs (≤ 5 mg/L) and PS NPs (≤ 50 mg/L) could significantly promote the transformation process of ARGs in a concentration-dependent manner. Under the same PS concentration, the ARGs transformation frequency decreased with increasing PS particle size. Specifically, 100 nm PS at 50 mg/L increased the transfer frequency by 79.34%. However, 1 mm PS particles at 50 mg/L resulted in a 21.80% decrease in the ARGs transformation frequency, suggesting that 1 mm PS particles at this concentration inhibit ARGs transfer. Based on the live/dead cell detection, we revealed that, with increasing PS concentration, cell membrane permeability in *E. coli* significantly increased by 56.66% to 69.47% compared to the control group. Under the condition of the same PS concentration, the cell membrane permeability rises as the PS size diminishes, implying a negative correlation between them. Similarly, the cell membrane permeability in NPs exposure was increased by 41.99% to 46.62%. These results demonstrated that high concentrations of NPs might enhance the cell membrane permeability in *E. coli*, thus facilitating the horizontal transfer of ARGs. Our findings elucidated the influence mechanism of MPs/NPs on the transformation of ARGs, providing a theoretical basis and technical guidance for the efficient assessments and control of combined ARGs and MPs/NPs pollution.

Keywords: Antibiotic resistance genes; Microplastics; Nanoplastics; Horizontal gene transfer; Cell membrane permeability; *Escherichia coli*

0 引 言

抗生素耐药性(AMR)已被确定为现今人类发展面临的重大威胁之一^[1]。根据世界卫生组织(WHO)报道,目前全球每年因抗生素耐药性感染而导致死亡的人数达 70 万人。如果当下无法减缓耐药性感染,预计到 2050 年,每年死亡人数将增至 1 000 万人^[2]。作为抗生素耐药性的载体,抗生素抗性基因(ARGs)被公认为一种新兴环境污染物的^[3],受到全世界公众、研究人员和政府的关注。

已有研究相继报道,在海洋、土壤和污水处理厂等环境中均检测出了多样的 ARGs^[4-6]。微塑料(MPs)是直径小于 5 mm 的塑料碎片或颗粒,而纳米塑料(NPs)则为直径小于 1 μm 的塑料碎片或颗粒,二者广泛分布于环境中^[7-8],并且其分布区域与 ARGs 的分布区域重叠程度较高^[9]。MPs 由于

体积小、表面粗糙和疏水等特性,很容易成为微生物定殖的合适基质,形成生物膜^[10]。MPs 生物膜使细菌避免受到恶劣环境条件(如高温、干旱和杀菌剂刺激等)的影响^[11],从而导致大量致病菌在 MPs 中定殖。已有研究表明,MPs 生物膜的存在有利于细菌之间的接触和通过群体感应的信息交换^[12],这可能会加速 ARGs 在细菌间的水平传播^[13]。此外,NPs 和 MPs 具有相似的组成和来源,但 NPs 特有性质(如传输特性、生物利用度和潜在毒性等)对 ARGs 传播的影响也值得关注。研究发现,聚乙烯和聚氯乙烯 MPs 暴露 125 d 导致污泥中 ARGs 丰度增加 5.7%~123.4%^[14]。此外,聚苯乙烯(PS)NPs 暴露 60 d 促使 β -内酰胺抗性基因 *bla_{oxA}* 的丰度增加了 4 倍^[15]。然而,不同浓度和尺寸塑料冲击下 ARGs 水平转移机制(尤其是转化摄取细胞外 ARGs)仍不明晰。

本研究选取大肠杆菌(*Escherichia coli*,

E. coli)感受态细胞 DH5 α 和质粒 pUC19 进行转化实验,探究了不同尺寸和浓度 PS 暴露对 ARGs 转化的影响及其机制,为评估和控制其环境风险奠定基础。本研究的目的如下。

(1)通过测定 *E. coli* 生长曲线,探究不同浓度和尺寸 PS 冲击对 *E. coli* 不同生长期的影响;

(2)基于药敏实验研究不同浓度和尺寸 PS 冲击对 *E. coli* 转移转化的影响;

(3)通过测定细胞膜通透性探究不同浓度和尺寸 PS 对 ARGs 转化机制的影响。

1 实验材料与方法

1.1 试验材料

PS 被广泛用于制造食品包装、塑料瓶和塑料餐具,是自然环境中最常见的 MPs/NPs 种类之一^[16]。因此,本文选择 PS 作为代表性 MPs/NPs。*E. coli* 作为一种常见细菌,广泛存在于医药、养殖业废水与废弃物等环境介质中^[17-18]。同时,*E. coli* 细胞是环境中 ARGs 的重要载体且具有转化 ARGs 的能力^[19-20],故本研究选择 *E. coli* 作为模式细菌。*E. coli* DH5 α 感受态细胞、pUC19 质粒、氨苄青霉素(AMP)和所有 MPs/NPs 分别购自中国碧云天、中国 Takara、中国安谱与中国格瑞。本实验中其他常用化学试剂主要购自麦克林试剂有限公司(中国)(均为优级纯或质谱纯)。

1.2 实验方法

1.2.1 PS 冲击下 *E. coli* 生长曲线测定

为了判断 *E. coli* DH5 α 的生长状况,参照吕佩帅等^[21]方法进行 *E. coli* DH5 α 生长曲线测定,具体步骤如下。

取 30 μ L *E. coli* DH5 α 加入 2 mL 离心管中,添加 LB 液体培养基至 300 μ L,设置 3 组平行实验。对照组仅加入 LB 培养基,不添加 PS。将上述样品放入塑封袋,并以相同步骤同时制备 48 份,按照不同 PS 条件(5 mg/L 100 μ m、50 mg/L 100 μ m、5 mg/L 100 nm 和 50 mg/L 100 nm)和检测时刻(0、1.5、3.0、5.0、6.0、8.0、10.0、12.0、13.5、15.0、16.0、17.0 h)进行编号,以上样品置于 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 的恒温振荡培养箱中进行培养。在 0、1.5、3.0、5.0、6.0、8.0、10.0、12.0、13.5、15.0、16.0、17.0 h 取出样品,用酶标仪(BioTek Synergy TM 4)测定 OD₆₀₀ 值,以 3 组 OD₆₀₀ 值均值为纵坐标,培养时间为横坐标,绘制 *E. coli* DH5 α 的标准生长曲线。

1.2.2 *E. coli* 转化实验

在 2 mL 圆底离心管中依次加入 50 μ L *E. coli* DH5 α 感受态细菌、1 μ L 25 ng/ μ L pUC19 质粒和 PS,随后依次于冰中放置 30 min、42 $^{\circ}$ C 下放置 45 s 再于冰中放置 1~2 min。添加 37 $^{\circ}$ C LB 液体培养基至 1 mL,于 37 $^{\circ}$ C、160~225 r/min 条件下水浴振荡 1 h。取 100 μ L 菌液涂布于 MH 选择培养基(含有 100 mg/L AMP),37 $^{\circ}$ C 过夜培养 14~16 h,以确定转化子数量。在不含抗生素的 MH 培养基平板上涂布稀释混合物以检测总受体数(仅当来自阴性对照的菌落没有在 AMP 选择性平板上生长时,计算转化子的数量);通过将转化子数量除以总受体数量计算转化频率。每组设置 3 组平行实验。

1.2.3 细菌抗生素敏感性测定

挑取转化平板中的菌落接种于 LB 液体培养基中,置于摇床中培养至对数生长期;培养后用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,再用 PBS 稀释至 OD₆₀₀ 约 0.6,制得细菌悬液。分别在灭菌的 96 孔板中加入稀释菌液和含抗生素的 LB 培养基,每孔含有 75 μ L 转化后的细胞悬液和 75 μ L 含抗生素的 LB 培养基,其中第 1 孔到第 11 孔 AMP 浓度分别达到 1 024、512、256、128、64、32、16、8、4、2、1 μ g/L,第 12 孔通过添加等量无菌无酶水设置为空白对照。在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 16 h 后,通过酶标仪测定 OD₆₀₀。每组设置 3 组平行实验。

1.2.4 细胞膜通透性测定

采用试剂盒 LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits(Invitrogen)开展活/死细胞染色实验。使用多功能酶标仪,在激发波长约 485 nm 条件下,分别测定发射波长约 530 nm(绿光特征发射波长)和约 630 nm(红光特征发射波长)的荧光值,分别记为 F_g 和 F_r 。以“活细菌”比例为横坐标,以其对应的荧光比值 F_g/F_r 为纵坐标,绘制标准曲线。

样品中“活细菌”比例按式(1)计算:

$$R_g = \frac{F_g/F_r - a}{b} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

R_g ——“活细菌”比例, %;

F_g ——530 nm 波长处绿色荧光强度值;

F_r ——630 nm 波长处红色荧光强度值;

a ——标准曲线的斜率;

b ——标准曲线的截距。

2 结果与讨论

2.1 细菌最小抑制浓度

由表 1 可以看出,感受态 *E. coli* DH5 α 菌株(不携带 pUC19 质粒)对 AMP 的最低抑制浓度

(MIC)为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$,而转化后的 *E. coli* DH5 α 菌株对 AMP 的 MIC 均超过 1 024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。根据上述 MIC 范围(4~1 024 $\mu\text{g}/\text{mL}$),本研究将转化体系中筛选转化子的 AMP 浓度设置为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1 AMP 对受体菌生长的最低抑制浓度

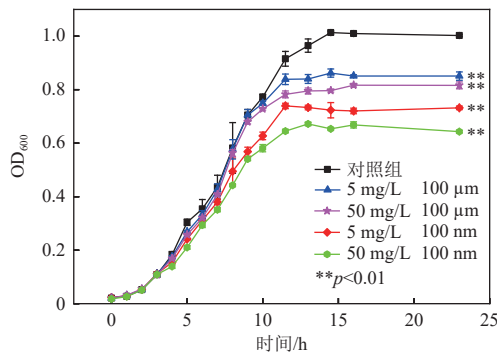
Table 1 Minimum inhibitory concentrations of AMP on the growth of receptor bacteria

组别	PS类型					
	无	100 nm 5×10^{-2} mg/L	100 nm 5×10^{-1} mg/L	100 nm 5 mg/L	100 nm 50 mg/L	100 nm 500 mg/L
AMP MIC/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$						
<i>E. coli</i> DH5 α	4	4	4	4	4	4
<i>E. coli</i> DH5 α (pUC19)	>1 024	>1 024	>1 024	>1 024	>1 024	>1 024
组别	100 μm 5×10^{-2} mg/L	100 μm 5×10^{-1} mg/L	100 μm 5 mg/L	100 μm 50 mg/L	100 μm 500 mg/L	1 μm 5 mg/L
AMP MIC/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$						
<i>E. coli</i> DH5 α	4	4	4	4	4	4
<i>E. coli</i> DH5 α (pUC19)	>1 024	>1 024	>1 024	>1 024	>1 024	>1 024
组别	10 μm 5 mg/L	1 mm 5 mg/L	1 μm 50 mg/L	10 μm 50 mg/L	1 mm 5 mg/L	—
AMP MIC/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$						
<i>E. coli</i> DH5 α	4	4	4	4	4	—
<i>E. coli</i> DH5 α (pUC19)	>1 024	>1 024	>1 024	>1 024	>1 024	—

2.2 不同 PS 条件下 *E. coli* 生长状态测定

不同浓度和尺寸 PS 冲击下 *E. coli* DH5 α 菌株生长曲线如图 1 所示,在 *E. coli* 适应期(0~3.0 h),不同浓度和尺寸 PS 并未对 *E. coli* DH5 α 生长产生明显抑制作用。然而随着 *E. coli* 进入对数期(3.0~11.5 h),PS 冲击对 *E. coli* 生长起到一定的抑制效果。相较于对照组,PS MPs 冲击后 OD₆₀₀ 值下降了 0~15.35%,而 PS NPs 冲击后 OD₆₀₀ 值降幅达到了 12.14%~30.81%。这表明 PS NPs 较 PS MPs

暴露更不利于 *E. coli* 在对数期存活。当 *E. coli* 进入稳定期和衰亡期(11.5~23.0 h)时,不同浓度和尺寸 PS 冲击对 *E. coli* 生长起到明显的抑制作用($p < 0.01$),这可能是由于 PS 塑料本身具有一定的毒性^[22]。具体而言,5 mg/L 100 μm 、50 mg/L 100 μm 、5 mg/L 100 nm 和 50 mg/L 100 nm PS 暴露 23 h 后,*E. coli* 抑制率分别达到 15.13%、18.59%、26.97% 和 35.84%($p < 0.01$)。其中,在同种尺寸下,相较于 5 mg/L、50 mg/L PS 对 *E. coli* 的抑制作用更强;在同种浓度下,100 nm PS 的毒性强于 100 μm PS,对 *E. coli* 的抑制效果更加明显。



注:误差棒表示 3 个平行样的标准差;* $p < 0.05$ 表示对照组和冲击组之间的显著差异,** $p < 0.01$ 表示极显著差异。

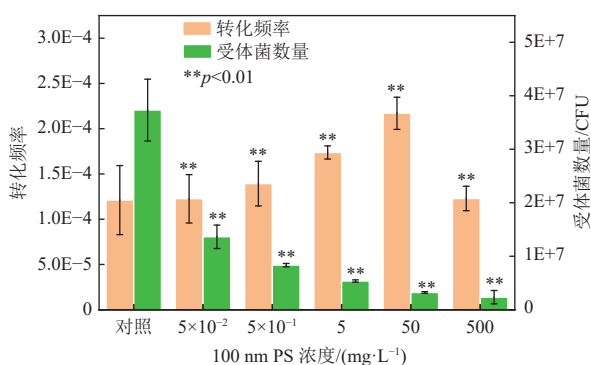
图 1 不同浓度和尺寸 PS 暴露下 *E. coli* 的生长曲线
Fig. 1 Growth curves of *E. coli* under exposure to different concentrations and sizes of PS

2.3 PS MPs/NPs 对 ARGs 转化频率的影响

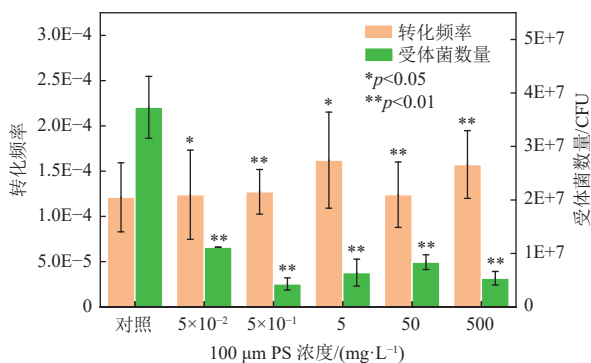
将编码 AMP 抗性的游离质粒 pUC19 接种于感受态细菌 *E. coli* DH5 α 以建立转化系统。转化成功后的转化子(含 pUC19 质粒)通过转化子选择性平板法进行定量测定。转化频率为转化子数量和受体细菌数量比值。转化频率越高,ARGs 越容易发生水平转移,从而加速其在环境中的传播。
2.3.1 不同浓度 PS MPs/NPs 对 ARGs 转化频率的影响

不同浓度 100 nm PS 胁迫 1.5 h 后 *E. coli* DH5 α 的转化频率如图 2(a)所示。结果显示,PS NPs 冲击后可培养的 *E. coli* 数量随着冲击浓度的

增加而降低,相较于对照组(3.73×10^7 CFU)降低了6.48%~9.75%(图2(a))。这可能由于NPs直接损害了细菌细胞或抑制关键酶和功能基因^[23],进一步导致PS NPs冲击浓度越高,对*E. coli*的存活抑制性越强。经过 5×10^{-2} 、 5×10^{-1} 、5、50和500 mg/L 100 nm PS冲击后,*E. coli* DH5 α 的转化频率相较于对照组(1.2×10^{-4})分别增加了1.2%、15.0%、43.4%、79.2%和1.4%(图2(a))。这说明PS冲击导致ARGs转化频率一定程度地增加,从而加速了ARGs在环境的传播,这与YUAN等研究结果一致^[24]。具体而言,当PS NPs冲击浓度 ≤ 50 mg/L时,*E. coli*中ARGs的转化频率随PS浓度升高逐渐增加。然而,当PS NPs浓度达到500 mg/L时,*E. coli*的转化明显受到抑制($p < 0.01$)。这可能是由于高浓度PS导致质粒复制能力下降继而产生一定抑制作用^[25]。



(a) 不同浓度 100 nm PS 冲击下 ARGs 转化频率和受体菌数量



(b) 不同浓度 100 μm PS 冲击下 ARGs 转化频率和受体菌数量

注: 误差棒表示 3 个平行样的标准差; * $p < 0.05$ 表示对照组和暴露组之间的一般显著差异; ** $p < 0.01$ 表示高度显著差异。

图 2 不同浓度 PS 冲击下 ARGs 转化频率和受体菌数量

Fig. 2 ARGs transformation frequency and number of receptor bacteria under different concentrations of PS exposure

不同浓度 100 μm PS 冲击对*E. coli*转化的影响如图2(b)所示。相较于对照组,受体菌数量随PS MPs冲击浓度的增加而大幅度下降,降幅达

70.09%~88.48% ($p < 0.01$)。这说明PS MPs对*E. coli*有一定致死效应,该结论与MRAKOVIC等研究相一致^[26]。在不同浓度PS MPs胁迫下,ARGs转化频率均呈现增长趋势(增幅为2.35%~33.85%)(图2(b))。具体而言,当PS MPs冲击浓度为 5×10^{-2} 、 5×10^{-1} 和50 mg/L时,其对*E. coli*转化的影响较小,转化频率相较于对照组仅上升了2.35%~5.01%。然而当PS冲击浓度为5 mg/L和500 mg/L时,其转化频率分别为 1.62×10^{-4} 和 1.57×10^{-4} ,相较于对照组分别增加了1.34倍和1.30倍,这说明PS MPs一定程度上促进了ARGs转化,但转化频率变化对浓度依赖性不显著。

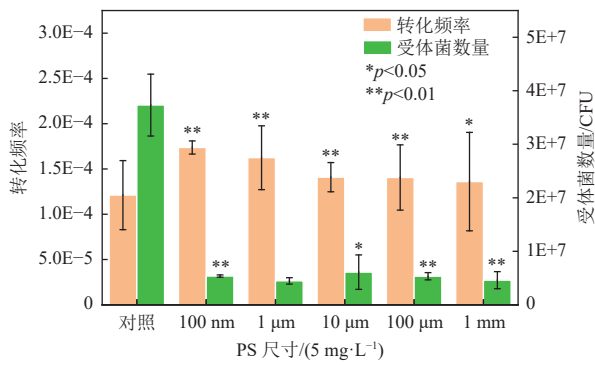
2.3.2 不同尺寸 PS 对 ARGs 转化频率的影响

如图3(a)所示,相较于对照组受体菌数量(3.73×10^7 CFU),不同尺寸PS冲击后受体菌数量下降了83.66%~88.04%。该现象说明低浓度(5 mg/L)不同尺寸PS暴露对可培养*E. coli*的存活起强抑制作用,且可培养*E. coli*致死效应对尺寸依赖性不高。值得注意的是,受体菌数量的降低一定程度上导致了转化频率的升高。具体而言,在浓度为5 mg/L时,5种尺寸(100 nm、1 μm、10 μm、100 μm和1 mm)PS暴露后转化频率分别为 1.74×10^{-4} 、 1.62×10^{-4} 、 1.41×10^{-4} 、 1.41×10^{-4} 和 1.36×10^{-4} ,分别相较于对照组(1.21×10^{-4})增加了1.43倍、1.34倍、1.16倍、1.16倍和1.12倍($p < 0.01$)(图3(a))。这些结果说明,ARGs转化频率随PS冲击尺寸增大而降低,当PS尺寸达到10 μm时,ARGs转化频率逐渐趋于稳定。

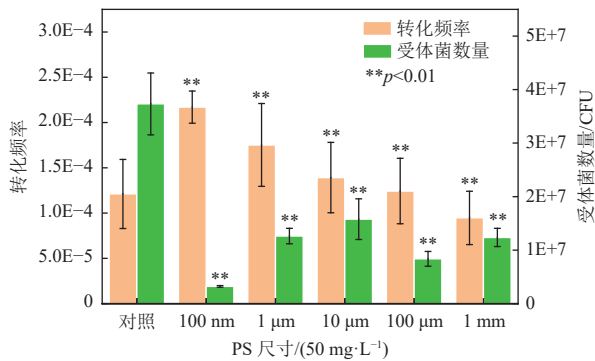
不同尺寸的高浓度(50 mg/L)PS冲击对ARGs转化转移的影响如图3(b)所示。在5种尺寸PS冲击后,转化频率随着尺寸增加而逐渐降低。具体来说,100 nm、1 μm和10 μm PS冲击促进了*E. coli*转化,其转化频率分别为 2.17×10^{-4} 、 1.75×10^{-4} 和 1.39×10^{-4} ,相较于对照组(转化频率为 1.21×10^{-4})增加了1.15~1.79倍($p < 0.01$)(图3(b))。值得注意的是,经过1 mm PS冲击后,其转化频率相较于对照组降低了21.80% ($p < 0.01$)。这说明高浓度1 mm PS冲击一定程度上抑制了ARGs转化转移。

2.4 PS MPs/NPs 对细胞膜通透性的影响

作为革兰氏阴性菌的重要细胞器,细胞膜可以作为阻止胞外DNA转运至体内细胞的屏障^[27]。已有研究证实,增加细胞膜通透性会促进ARGs的传播^[28]。为验证PS胁迫对转化转移体系中细



(a) 不同尺寸 5 mg/L PS 冲击下 ARGs 转化频率和受体菌数量



(b) 不同尺寸 50 mg/L PS 冲击下 ARGs 转化频率和受体菌数量

注: 误差棒表示 3 个平行样的标准差; * $p < 0.05$ 表示对照组和暴露组之间的一般显著差异; ** $p < 0.01$ 表示高度显著差异。

图 3 不同尺寸 PS 冲击下 ARGs 转化频率和受体菌数量
Fig. 3 ARGs transformation frequency and number of receptor bacteria under different sizes of PS exposure

胞膜通透性的影响, 采用荧光酶标仪分别测定了不同尺寸和浓度 PS 冲击下受体菌细胞膜通透性变化。

2.4.1 不同浓度 PS MPs/NPs 对细胞膜通透性的影响

不同浓度 100 nm PS 冲击后 *E. coli* 的活细胞比例变化如图 4 所示。当 PS 冲击浓度 ≤ 5 mg/L 时, 活细胞比例相较于对照组 (活细胞比例为 100%) 仅下降了 7.25%~30.26%, 证明低浓度 NPs 不会对细胞膜产生严重破坏。这说明低浓度 PS 冲击后细胞膜通透性增加不是转化频率升高的主要因素。然而, 当 PS 冲击浓度 > 5 mg/L 时, 活细胞比例随着 PS 浓度的增加而持续显著下降, 较对照组比例下降了 56.66%~69.47%。这进一步说明 PS NPs 冲击浓度大于 5 mg/L 时会显著增强细菌的细胞膜通透性。

对于不同浓度 100 μ m PS 冲击后, 细菌的活细胞比例相较于对照组仅下降了 8.59%~42.81%, 均保持在原水平的 50% 以上, 这说明 PS MPs 对 *E. coli* 毒性较低, 对细胞膜通透性影响不大。

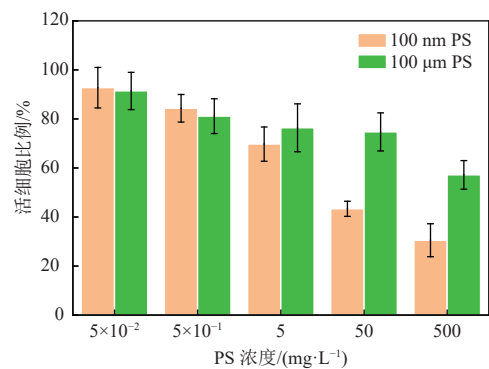


图 4 不同浓度 MPs/NPs 冲击后活细胞比例变化

Fig. 4 Changes in live cell ratio after MPs/NPs impact of different concentrations

综上所述, PS MPs/NPs 冲击可以通过改变细胞膜通透性而促进细菌转化。具体来说, 在 PS 冲击浓度 ≤ 5 mg/L 条件下, PS MPs 和 PS NPs 对细胞膜损伤较小, 对细胞膜通透性影响有限。在 PS 冲击浓度 > 5 mg/L 条件下, 相较于 PS MPs, PS NPs 活细胞比例下降程度更显著 (41.99%~46.62%), 导致细胞膜通透性增强。该结论与细菌转化频率结果一致, 表明 PS NPs 相较于 PS MPs 更有利于细胞膜通透性增强, 从而促进细菌中 ARGs 的转化。

2.4.2 不同尺寸 PS 对细菌的细胞膜通透性影响

在 5 mg/L 和 50 mg/L 不同尺寸 PS 冲击下, 细菌的活细胞比例的变化。如图 5 所示, 在 5 mg/L 和 50 mg/L PS 冲击下, 活细胞比例均随着 PS 尺寸增加而上升。其中, 在 5 mg/L PS 冲击下, 活细胞比例仅下降了 4.30%~39.95%, 这说明在低浓度 PS 冲击下, 细胞膜通透性受 PS 冲击尺寸影响较小。在高浓度 100 nm PS 冲击下, 其活细胞比例下降了 57.00%, 说明高浓度 PS NPs 冲击会通过增

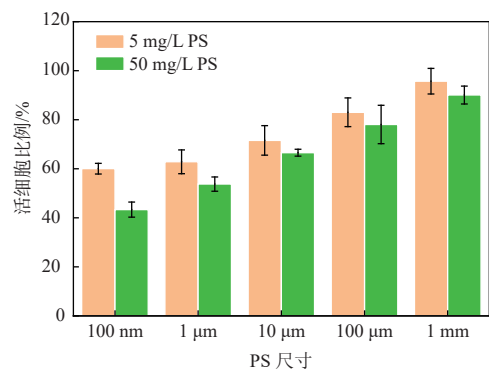


图 5 不同尺寸 PS 冲击后活细胞比例变化

Fig. 5 Changes in live cell ratio after PS impact of different sizes

强细胞膜通透性促进 ARGs 的水平转化。

3 结 论

本文通过不同浓度、不同尺寸 PS 胁迫下 pUC19 质粒介导的 ARGs 转化实验,揭示了不同浓度、不同尺寸 PS 对 ARGs 水平转移的影响及其机制。主要研究结论如下。

(1)不同浓度和尺寸 PS 对 *E. coli* 生长情况有明显影响。其中,5 mg/L 100 μm 、50 mg/L 100 μm 、5 mg/L 100 nm 和 50 mg/L 100 nm PS 暴露后,*E. coli* 抑制率分别达到 15.13%、18.59%、26.97% 和 35.84% ($p < 0.01$),这说明 PS 的抑制作用与浓度成正比,与尺寸成反比。

(2)ARGs 转化频率在 PS NPs 冲击浓度 ≤ 5 mg/L 范围内显著上升。PS MPs 冲击浓度 ≤ 5 mg/L 时,ARGs 转化频率随浓度增加而上升。同时,在同浓度条件下,受体菌在不同尺寸 PS 冲击下均受到显著抑制;ARGs 转化频率随 PS 尺寸增加而下降。

(3)当 PS 冲击浓度 > 5 mg/L 时,PS NPs 活细胞比例相较于 PS MPs 下降了 41.99%~46.62%,表明 PS NPs 更有利于增强细胞膜通透性而促进细菌转化。在同浓度条件下,PS 尺寸越小细胞膜通透性越高。

参考文献 (References):

- [1] ZHENG Dongsheng, YIN Guoyu, LIU Min, et al. Global biogeography and projection of soil antibiotic resistance genes[J]. *Science Advances*, 2022, 8(46): eabq8015.
- [2] ROOPE L S J, SMITH R D, POWWELS K B, et al. The challenge of antimicrobial resistance: What economics can contribute[J]. *Science*, 2019, 364(6435): eaau4679.
- [3] PRUDEN A, PEI Ruoting, STORTEBOOM H, et al. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in northern Colorado[J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(23): 7445-7450.
- [4] 张晓娜, 许慧芹, 汝少国, 等. 海洋环境中抗生素抗性基因的分布、来源、传播和风险研究 [J]. *生态毒理学报*, 2023, 18(1): 174-190.
ZHANG Xiaona, XU Huiqin, RU Shaoguo, et al. Study on distribution, source, propagation and risk of antibiotic resistance genes in marine environment[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2023, 18(1): 174-190.
- [5] WU Jie, WANG Jinyang, LI Zhutao, et al. Antibiotics and antibiotic resistance genes in agricultural soils: A systematic analysis[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2023, 53(7): 847-864.
- [6] RAZA S, SHIN H, HUR H G, et al. Higher abundance of core antimicrobial resistant genes in effluent from wastewater treatment plants[J]. *Water Research*, 2022, 208: 11788.
- [7] DE BOEVER S, DEVISSCHER L, VINKEN M. Unraveling the micro- and nanoplastic predicament: A human-centric insight[J]. *Science of the Total Environment*, 2024, 916: 17026.
- [8] WAYMAN C, NIEMANN H. The fate of plastic in the ocean environment —A minireview[J]. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 2021, 23(2): 198-212.
- [9] LI Bing, YANG Ying, MA Liping, et al. Metagenomic and network analysis reveal wide distribution and co-occurrence of environmental antibiotic resistance genes[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(11): 2490-2502.
- [10] HE Siying, JIA Meiyang, XIANG Yiping, et al. Biofilm on microplastics in aqueous environment: Physicochemical properties and environmental implications[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 424: 127286.
- [11] FLEMMING H C, NEU T R, WOZNAK D J. The EPS matrix: The "house of biofilm cells"[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(22): 7945-7947.
- [12] GILLINGS M R, HOLLEY M P, STOKES H W. Evidence for dynamic exchange of qac gene cassettes between class 1 integrons and other integrons in freshwater biofilms[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2009, 296(2): 282-288.
- [13] ZENG Zhenshun, GUO Xingpan, LI Baiyuan, et al. Characterization of self-generated variants in *Pseudoalteromonas lipolytica* biofilm with increased antifouling activities[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(23): 10127-10139.
- [14] LUO Tianyi, DAI Xiaohu, CHEN Zhijie, et al. Different microplastics distinctively enriched the antibiotic resistance genes in anaerobic sludge digestion through shifting specific hosts and promoting horizontal gene flow[J]. *Water Research*, 2023, 228: 119356.
- [15] SHI Jianhong, WU Dong, SU Yinglong, et al. (Nano) microplastics promote the propagation of antibiotic resistance genes in landfill leachate[J]. *Environmental Science: Nano*, 2020, 7(11): 3536-3546.
- [16] ALI I, DING Tengda, PENG Changsheng, et al. Micro- and nanoplastics in wastewater treatment plants: Occurrence, removal, fate, impacts and remediation technologies —A critical review[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2021, 423: 130205.
- [17] VAN ELSAS J D, SEMENOV A V, COSTA R, et al. Survival of *Escherichia coli* in the environment: Fundamental and public health aspects[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(2): 173-183.
- [18] ERCUMEN A, PICKERING A J, KWONG L H, et al. Animal feces contribute to domestic fecal contamination: Evidence from *E. coli* measured in water, hands, food, flies, and soil in Bangladesh[J]. *Environmental Science &*

- Technology, 2017, 51(15): 8725-8734.
- [19] GUO Mengyue, WANG Huanyu, XIE Nengbin, et al. Positive effect of carbon sources on natural transformation in *Escherichia coli*: Role of low-level cyclic AMP (cAMP)-cAMP receptor protein in the derepression of *rpoS*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(20): 3317-3328.
- [20] TSEN S D, FANG S S, CHEN M J, et al. Natural plasmid transformation in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2002, 9(3): 246-252.
- [21] 吕佩帅, 张丽红, 丁小松, 等. 胸膜肺炎放线杆菌在不同培养基中生长、生物膜形成及 Apx 毒素分泌能力的差异研究 [J]. *动物医学进展*, 2022, 43(1): 6-11.
LYU Peishuai, ZHANG Lihong, DING Xiaosong, et al. Diversity on growth, biofilm formation and Apx toxin secretion of *actinobacillus pleuropneumoniae* in different culture media[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2022, 43(1): 6-11.
- [22] LIU Shuqin, FANG Shuting, XIANG Zhangmin, et al. Combined effect of microplastics and DDT on microbial growth: A bacteriological and metabolomics investigation in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 407: 124849.
- [23] MOHAMMAD MIRSOLEIMANI AZIZI S, HAI F I, LU Wenjing, et al. A review of mechanisms underlying the impacts of (nano) microplastics on anaerobic digestion[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 329: 124894.
- [24] YUAN Qingbin, SUN Ruonan, YU Pingfeng, et al. UV-aging of microplastics increases proximal ARG donor-recipient adsorption and leaching of chemicals that synergistically enhance antibiotic resistance propagation[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 427: 127895.
- [25] HU Xiaojie, WAIGI M G, YANG Bing, et al. Impact of plastic particles on the horizontal transfer of antibiotic resistance genes to bacterium: Dependent on particle sizes and antibiotic resistance gene vector replication capacities[J]. *Environmental Science & Technology*, 2022, 56(21): 14948-14959.
- [26] MRAKOVČIČ M, MEINDL C, ROBLEGG E, et al. Reaction of monocytes to polystyrene and silica nanoparticles in short-term and long-term exposures[J]. *Toxicology Research*, 2014, 3(2): 86-97.
- [27] YU Zhigang, WANG Yue, HENDERSON I R, et al. Artificial sweeteners stimulate horizontal transfer of extracellular antibiotic resistance genes through natural transformation[J]. *The ISME Journal*, 2022, 16(2): 543-554.
- [28] JIN Min, LIU Lu, WANG Daning, et al. Chlorine disinfection promotes the exchange of antibiotic resistance genes across bacterial Genera by natural transformation[J]. *The ISME Journal*, 2020, 14(7): 1847-1856.