

DOI: 10.5846/stxb201306241772

温丽华, 许燕滨, 周艳, 阮晶晶, 侯毛宇, 孙浩, 屈毛毛, 袁保红, 郑莉. 重金属胁迫对 *Pseudomonas alcaligenes* LH7 抗生素抗性的影响. 生态学报, 2015, 35(10): 3411-3418.

Wen L H, Xu Y B, Zhou Y, Ruan J J, Hou M Y, Sun H, Qu M M, Yuan B H, Zheng L. Effects of heavy metal stress on antibiotics resistance of *Pseudomonas alcaligenes* LH7. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(10): 3411-3418.

重金属胁迫对 *Pseudomonas alcaligenes* LH7 抗生素抗性的影响

温丽华¹, 许燕滨^{1,*}, 周艳¹, 阮晶晶¹, 侯毛宇¹, 孙浩¹, 屈毛毛¹, 袁保红², 郑莉¹

1 广东工业大学环境科学与工程学院, 广州 510006

2 广东药学院基础部, 广州 510006

摘要:从广州某养猪场废水处理系统中筛选出 1 株优势菌 *Pseudomonas alcaligenes* LH7。为了研究重金属胁迫对细菌抗生素抗性响应的影响, 采用琼脂稀释法和 K-B 纸片扩散法, 测定了重金属 (Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+}) 的最小抑制浓度 (MIC), 及不同重金属种类和浓度胁迫下, 四种抗生素 (红霉素、阿莫西林、头孢拉定、四环素) 的抑菌圈直径。结果表明: 菌体对 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 的 MIC 分别为 125、125、100 mg/L, 并且具有四环素、阿莫西林、红霉素和头孢拉定多重抗性。重金属与抗生素之间的交互作用对细菌的抗性有显著影响 ($P < 0.05$)。重金属和抗生素间的交互作用随重金属种类和浓度的不同而改变, 可分为三类: 低浓度重金属与抗生素共存时表现为协同抗性, 高浓度时则表现为协同杀菌, 如 Cr^{6+} 或 Zn^{2+} 与红霉素, Cu^{2+} 与头孢拉定; 低浓度重金属与抗生素共存时表现为协同杀菌, 高浓度时则表现为协同抗性, 如 Cr^{6+} 或 Zn^{2+} 与阿莫西林; 只与共存重金属种类相关的抗性组合有 Cu^{2+} 与四环素或阿莫西林或红霉素, Cr^{6+} 与头孢拉定。环境中重金属离子的共存将改变抗生素污染物的生态危害和环境行为, 并最终影响对应的污染防治技术的开发和应用。

关键词:养猪场废水; *Pseudomonas alcaligenes* LH7; 重金属胁迫; 抗生素; 协同抗性; 协同杀菌

Effects of heavy metal stress on antibiotics resistance of *Pseudomonas alcaligenes* LH7

WEN Lihua¹, XU Yanbin^{1,*}, ZHOU Yan¹, RUAN Jingjing¹, HOU Maoyu¹, SUN Hao¹, QU Maomao¹, YUAN Baohong², ZHENG Li¹

1 School of Environmental Science and Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China

2 School of Basic Courses, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: To study the effect of heavy metal stress on bacterial antibiotic resistance, a Gram-negative bacteria isolated from swine wastewater in Guangzhou was characterized and identified as *Pseudomonas alcaligenes* LH7. The minimal inhibition concentration (MIC) of heavy metals (Cu^{2+} , Zn^{2+} and Cr^{6+}) and antibiotic susceptibility test were determined by the methods of Kirby-Bauer disk diffusion and agar dilution. Furthermore, with the joint effect of type and concentration of heavy metals, the inhibition zone diameter of the tested antibiotics (erythromycin, amoxicillin, cephadrine and tetracycline) was measured by vernier caliper. The results showed that the MICs of Cu^{2+} , Zn^{2+} and Cr^{6+} were 125 mg/L, 125 mg/L and 100 mg/L, respectively. Multiple antibiotic resistance was also observed. The *Pseudomonas alcaligenes* LH7

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (40801194); 中山市科技计划项目 (2013A3FC0243)

收稿日期:2013-06-24; **网络出版日期:**2014-05-30

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: hopeybxu@163.com

showed resistance to erythromycin, amoxicillin, cephradine and tetracycline. The interaction of antibiotics and heavy metals significantly affected bacterial resistance ($P < 0.05$). There were three kinds of cross-effects between antibiotics and heavy metals according to the types and concentrations of heavy metals. Firstly, the effect of heavy metals on antibiotic resistance could be co-resistance at low concentrations but synergic germicidal at high concentrations, such as Cr^{6+} and erythromycin, Zn^{2+} and erythromycin, Cu^{2+} and cephradine. Secondly, the effect of heavy metals on antibiotic resistance could be synergic germicidal at low concentrations but co-resistance at high concentrations, such as Cr^{6+} and amoxicillin, Zn^{2+} and amoxicillin. Finally, the antibiotic resistance was only associated with the types of heavy metal, such as Cu^{2+} and tetracycline or amoxicillin or erythromycin, Cr^{6+} and cephradine. Co-existence of heavy metals in environment will change the ecological harm and environmental behavior of antibiotics, and affect the development and application of relative pollution prevention techniques, so this is a field worthy of attention.

Key Words: swine wastewater; *Pseudomonas alcaligenes* LH7; heavy metal stress; antibiotics; co-resistance; synergic germicidal

在我国每年用作饲料添加剂的抗生素已超过 8000t^[1],养殖业通常利用抗生素提高饲料利用率、牲畜的增重率以及预防和治疗牲畜疾病^[2],因为过量添加,大部分抗生素不能被动物吸收,最终以母药的形式随粪便和尿液排出^[3]。抗生素的滥用、过量使用,甚至人药兽用,使得抗生素的环境危害和生态风险越来越大。研究者已从浙江、广西、杭州、北京、济南等多个省市的养殖场畜禽粪便中检测出抗生素^[4-7]。此外,市政污水、河流水、湖泊水、沉积物和土壤,甚至地下水中均检测出抗生素残留^[8-9]。抗生素抗性基因作为抗生素污染的次生污染物,已在包括河流、污水厂排水等多个水体中检测出来^[10-11],由于其可能通过水平迁移等途径实现生物间传递,而人们对其具体的环境行为仍有非常多未知的领域,也吸引了越来越多学者的关注。目前主要的研究集中在抗生素对环境受体的影响^[12]及抗生素在水环境、土壤环境以及污染治理设施中的降解情况研究等^[13-16]。

重金属污染由于来源广泛,且具有生物累积性、长期性和不可逆性,一直以来备受关注。作为两种备受关注的污染物,重金属和抗生素复合污染的现象也越来越普遍,如畜禽养殖的固废和废水、施用粪肥的土壤环境等^[4,17]。目前,有关重金属和抗生素复合污染的研究主要集中在重金属和抗生素在环境中的分布、含量上的分析及对污水处理的影响^[17-18],而重金属对抗生素抗性的影响未做系统性研究,随着人们从环境中筛选出越来越多同时具有重金属抗性和抗生素抗性的菌种,如从鱼、虾体内及沉积物中分离的气单胞菌属(*Aeromonas* spp.)等^[19-20],及从南极海水中分离的莫拉氏菌属(*Moraxella*)、产碱杆菌(*Alcaligenes*)和假单胞菌(*Pseudomonas*)等嗜冷菌^[21],重金属和抗生素抗性间的相关性也引起了学者的关注,研究发现重金属和抗生素的联合毒性表现为拮抗作用和相加作用^[18]。

养殖废水作为一种典型的重金属和抗生素复合污染环境,其抗生素浓度范围多为 $\mu\text{g/L}$ 级,有些可达到 1—6mg/L,而重金属以 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 最高,在猪粪中可达几百 mg/kg ^[4,22-23],为了准确了解重金属胁迫对菌体抗生素抗性的响应特点,本试验从中筛选获得 1 株优势菌 *Pseudomonas alcaligenes* LH7,研究 3 种典型重金属(Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+})在不同浓度下对菌株抗生素(红霉素、阿莫西林、头孢拉定、四环素)抗性的影响,从而为微生物法治理重金属和抗生素复合污染提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌株

本实验菌株从广州某养猪场废水处理系统中分离获得,为 1 株革兰氏阴性杆菌,细杆状,无芽孢,能运动,菌落呈圆形,无色,光滑不透明,色氨酸脱氢酶、V-P 测定、硝酸盐还原、接触酶、氧化酶反应呈阳性,不能利用

葡萄糖、蔗糖、果糖,经鉴定为产碱假单胞菌(*Pseudomonas alcaligenes* LH7)。对照菌株为大肠杆菌 K-12,质控菌株为大肠杆菌 ATCC 25922、铜绿假单胞菌 ATCC 27853 和大肠杆菌 ATCC 35218。

1.1.2 培养基

(1)菌种的活化和培养、菌悬液的制备、抗生素敏感实验分别采用牛肉膏蛋白胨固体培养基、牛肉膏蛋白胨液体培养基、MH 琼脂培养基。

(2)试验培养基:分别称取定量的分析纯 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 ZnSO_4 和 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$,以无菌去离子水定容,再用 $0.22 \mu\text{m}$ 膜过滤,配制成浓度为 $1 \times 10^4 \text{ mg/L}$ 的重金属标准溶液,作为储备液,用于调节培养基中重金属浓度。将灭菌(121°C , 1.0 MPa)后的 MH 琼脂培养基冷却至 50°C 左右,加入不同量的重金属储备液,调节重金属浓度。摇匀后,倒入培养皿待凝固,用于菌体的重金属 MIC 测定及重金属对菌株抗生素抗性影响研究。

1.2 实验方法

1.2.1 菌悬液制备

挑取冰箱中甘油保存的菌种,接种于牛肉膏蛋白胨固体培养基上,在生化培养箱中 37°C 培养 24 h 活化,从平板上挑取单菌落接种于牛肉膏蛋白胨培养液中,于 37°C 恒温振荡器培养 16—18 h 获得种子培养液;按照 5% 的接种量,接种到新鲜培养液中,继续 37°C 恒温振荡器培养 16—18 h,获得浓度为 10^8 CFU/mL 的菌悬液,用于重金属最小抑制浓度 MIC 测定及抗生素抗性研究。

1.2.2 重金属最小抑制浓度(MIC)确定

采用琼脂稀释法,用涂布棒将 $100 \mu\text{L}$ 菌悬液涂布到含重金属溶液的试验培养基上, Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 的浓度变化范围为 $0\text{—}200 \text{ mg/L}$,置于生化培养箱恒温 37°C 培养 24 h,观察菌的生长情况。以大肠杆菌 K-12 为对照菌株,MIC 的终点判断标准为抑制细菌生长的最低浓度。

1.2.3 抗生素抗性实验

采用 K-B 纸片扩散法做抗生素耐药试验,实验规程按美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)标准进行操作。由于该菌株为革兰氏阴性菌,本实验选用四种常见并针对革兰氏阴性菌的抗生素,分别为红霉素($15 \mu\text{g}/\text{片}$)、阿莫西林($20 \mu\text{g}/\text{片}$)、头孢拉定($30 \mu\text{g}/\text{片}$)、四环素($30 \mu\text{g}/\text{片}$),药敏纸片购于杭州天和微生物试剂有限公司,直径为 6 mm ,于 -20°C 保存。以大肠杆菌 ATCC 25922,铜绿假单胞菌 ATCC 27853,大肠杆菌 ATCC 35218 为质控菌株。

1.2.4 重金属对抗生素抗性影响实验

本试验设计抗生素浓度一定时,即红霉素($15 \mu\text{g}/\text{片}$)、阿莫西林($20 \mu\text{g}/\text{片}$)、头孢拉定($30 \mu\text{g}/\text{片}$)、四环素($30 \mu\text{g}/\text{片}$),不同浓度的重金属对菌株的抗生素抗性的影响。移取 $100 \mu\text{L}$ 菌悬液滴加至含重金属的试验培养基上,涂布均匀。15 min 后,用小镊子夹取药敏纸片贴在涂好菌液的培养基上,每个平板上贴 3 片,每个实验设置 3 个平行样,于 37°C 培养箱中培养 16—18 h,测量抑菌圈直径。

1.3 统计分析

采用 SPSS 17.0 软件,以抗生素种类、重金属种类和重金属浓度为固定因子,抑菌圈直径为因变量,对数据进行单变量多因素方差分析,显著性水平为 0.05。抑菌圈直径变化率 $k = (b - a) / a$ (a 为未添加重金属时抑菌圈直径, b 为添加重金属后抑菌圈直径)。采用 Origin 8.1 软件绘制不同浓度 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 对四种抗生素抗性影响的柱形图。

2 结果与分析

2.1 重金属最小抑制浓度确定

本研究采用最小二乘法确定 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+} 的最小抑制浓度分别为 125、125、100 mg/L。根据重金属的 MIC 值,重金属和抗生素交叉抗性试验中选取重金属 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 的浓度梯度为 0、0.1、2、10、50、100 mg/L, Cr^{6+} 的浓度梯度为 0、0.1、2、20、50、80 mg/L。

2.2 药敏结果

根据美国临床和实验室标准协会中药敏试验纸片法的抑菌范围解释标准,以 R(耐药)、I(中介)、S(敏感)表示,该菌株对红霉素、阿莫西林、头孢拉定和四环素 4 种抗生素的敏感程度见表 1,发现该菌株对阿莫西林和四环素有抗性,而对头孢拉定敏感。

表 1 *Pseudomonas alcaligenes* LH7 的抗生素敏感性
Table 1 Susceptibility of *Pseudomonas alcaligenes* LH7 to antibiotics

抗生素 Antibiotic	纸片含药量 Disk Content/ (μg/片)	CLSI 推荐抑菌圈直径折点/mm Zone Diameter Breakpoints, nearest whole			抑菌圈直径/mm Zone Diameter	敏感性判定 Sensitivity determination
		耐药 R	中介 I	敏感 S		
		Resistant (R)	Intermediate (I)	Susceptible (S)		
红霉素 Erythromycin	15	≤13	14—22	≥23	15.41	I
阿莫西林 Amoxicillin	20	≤13	14—17	≥18	7.95	R
头孢拉定 Cephadrine	30	≤14	15—17	≥18	18.21	S
四环素 Tetracycline	30	≤11	12—14	≥15	6.92	R

2.3 重金属对菌体抗生素抗性的影响

2.3.1 重金属种类和浓度与抗生素抗性的相关性分析

方差分析发现重金属种类和浓度对抑菌圈直径影响显著 ($F_{\text{种类}} = 18.370, P_{\text{种类}} < 0.05; F_{\text{浓度}} = 47.335, P_{\text{浓度}} < 0.05$)。另外,抗生素种类×重金属种类、抗生素种类×重金属浓度、重金属种类×重金属浓度之间的二维交互效应对抑菌圈直径也有极为显著的影响 ($P < 0.05$),甚至抗生素种类×重金属种类×重金属浓度之间的三维交互效应对抑菌圈直径也有极为显著的影响 ($F = 32.605, P < 0.05$) (表 2)。这表明对于菌株的抗性影响因素,除抗生素种类、重金属种类和重金属浓度主因子外,抗生素种类×重金属种类、抗生素种类×重金属浓度、重金属种类×重金属浓度之间的二维交互效应以及抗生素种类×重金属种类×重金属浓度之间的三维交互效应也不可忽略,重金属和抗生素存在交互作用,即重金属胁迫对细菌抗生素抗性响应有影响。

表 2 主效应方差分析
Table 2 Tests of Between-Subjects effects

方差来源 Source	Ⅲ型平方和 Type Ⅲ Sum of Squares	df	均方 Mean Square	F	P
修正模型 Corrected Model	9785.531	70	139.793	70.460	0.000
截距平方和 Intercept	35001.775	1	35001.775	17641.861	0.000
抗生素种类 Antibiotic	3898.066	3	1299.355	654.911	0.000
重金属种类 Heavy Metals	72.892	2	36.446	18.370	0.000
重金属浓度 Concentration of Heavy Metals	657.394	7	93.913	47.335	0.000
抗生素种类×重金属种类 Antibiotic×Heavy Metals	1311.310	6	218.552	110.156	0.000
抗生素种类×重金属浓度 Antibiotic×Concentration of Heavy Metals	1541.242	20	77.062	38.841	0.000
重金属种类×重金属浓度 Heavy Metals×Concentration of Heavy Metals	309.866	8	38.733	19.523	0.000
抗生素种类×重金属种类×重金属浓度 Antibiotic × Heavy Metals × Concentration of Heavy Metals	1552.510	24	64.688	32.605	0.000
误差 Error	281.731	142	1.984		
总偏差平方和 Total	49899.870	213			
修正总平方和 Corrected Total	10067.261	212			

df 自由度; F 是 F 统计量的值,用来检验模型的显著性; P 为差异性显著的检验值, P < 0.05 表示差异显著

2.3.2 重金属浓度对抗生素抗性的影响

由图1—图3可知,重金属的加入对细菌的抗生素抗性有不同程度的影响。从抑菌圈直径相对变化率来看,重金属的加入对菌体四环素抗性的影响最为明显,而对头孢拉定的影响最不明显。随着共存 Cu^{2+} 浓度升高,四环素抑菌圈直径与空白相比,变化率也不断增大,分别为 115.32% (0.1 mg/L Cu^{2+}), 161.56% (2 mg/L Cu^{2+}), 162.14% (10 mg/L Cu^{2+}), 171.97% (50 mg/L Cu^{2+}), 174.28% (100 mg/L Cu^{2+}), 而头孢拉定抑菌圈直径变化率范围在 -16.80% — +11.26%; Zn^{2+} 共存时,菌体四环素抑菌圈直径变化率分别为 170.81% (0.1 mg/L Zn^{2+}), -100.00% (2 mg/L Zn^{2+}), -100.00% (10 mg/L Zn^{2+}), 134.54% (50 mg/L Zn^{2+}), 140.03% (100 mg/L Zn^{2+}), 而头孢拉定抑菌圈直径变化率范围很小,在 -9.12% — 34.65% 之间; Cr^{6+} 共存使得菌体四环素抑菌圈直径的变化率分别为 -100.00% (0.1 mg/L Cr^{6+}), 7.80% (2 mg/L Cr^{6+}), -100.00% (20 mg/L Cr^{6+}), -100.00% (50 mg/L Cr^{6+}), -100.00% (80 mg/L Cr^{6+}), 而头孢拉定抑菌圈直径的变化率明显随着 Cr^{6+} 浓度的升高而逐渐增大,分别为 1.26% (0.1 mg/L Cr^{6+}), 15.65% (2 mg/L Cr^{6+}), 22.30% (20 mg/L Cr^{6+}), 40.91% (50 mg/L Cr^{6+}), 53.32% (80 mg/L Cr^{6+})。

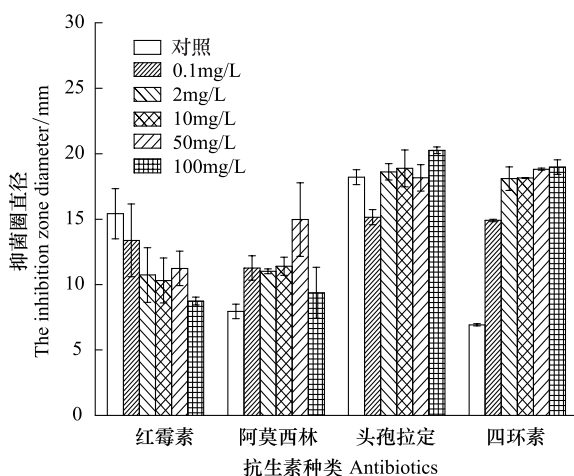


图1 Cu^{2+} 对抗生素抗性的影响

Fig.1 Effect of copper on antibiotic resistance

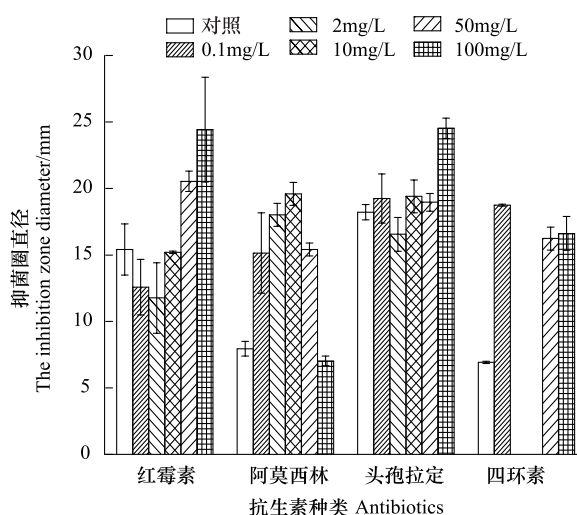


图2 Zn^{2+} 对抗生素抗性的影响

Fig.2 Effect of zinc on antibiotic resistance

重金属对细菌抗生素抗性的影响主要表现为促进作用和抑制作用,即重金属和抗生素间的交互作用表现为协同抗性和协同杀菌,且随重金属种类和浓度的不同而改变,可将交叉抗性组合分为3种类型。第1种,低浓度的重金属离子与抗生素共存表现为协同抗性,而高浓度重金属离子与抗生素共存表现为协同杀菌,如 Cr^{6+} 或 Zn^{2+} 与红霉素, Cu^{2+} 与头孢拉定。低浓度的 Cr^{6+} 或 Zn^{2+} 与红霉素共存时,测得的抑菌圈直径均小于空白组的抑菌圈直径 15.41mm,即低浓度的 Cr^{6+} 和 Zn^{2+} 使得菌株红霉素抗性增强, Cr^{6+} 或 Zn^{2+} 与红霉素之间表现为协同抗性;而高浓度的 Cr^{6+} 或 Zn^{2+} 与红霉素共存时,菌株红霉素抗性减弱,此时 Cr^{6+} 或 Zn^{2+} 与红霉素之间表现为协同杀菌。第2种,与第1种类型相反,即高浓度的重金属离子与抗生素共存表现为协同抗性,而低浓度重金属离子与抗生素共存表现为协同杀菌,如 Cr^{6+} 或 Zn^{2+} 与阿莫西林。低浓度的 Cr^{6+} 或 Zn^{2+} 与阿莫西林共存时,测得抑菌圈直径均大于空白组的抑菌圈直径 7.95 mm,

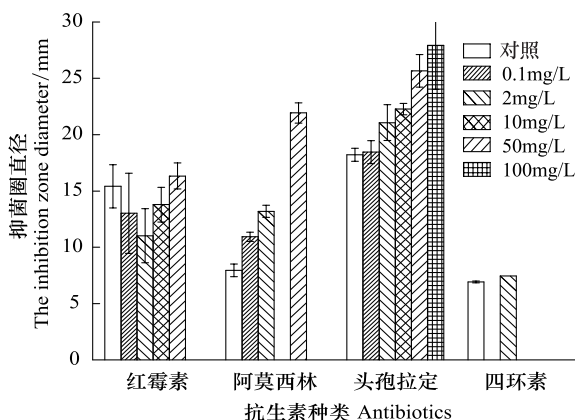


图3 Cr^{6+} 对抗生素抗性的影响

Fig.3 Effect of chrome on antibiotic resistance

即低浓度 Cr^{6+} 或 Zn^{2+} 使得 *Pseudomonas alcaligenes* LH7 对阿莫西林的抗性减弱, Cr^{6+} 或 Zn^{2+} 与阿莫西林之间表现为协同杀菌; 而高浓度的 Cr^{6+} 或 Zn^{2+} 与阿莫西林共存时, 菌株对阿莫西林的抗性增强, 此时 Cr^{6+} 或 Zn^{2+} 与阿莫西林之间表现为协同抗性。这两类抗性组合都存在重金属折点浓度, 且因抗性组合而异。如与阿莫西林共存时, Cu^{2+} 、 Cr^{6+} 的折点浓度 50 mg/L, 而 Zn^{2+} 的折点浓度为 10mg/L。第 3 种, 菌体的抗生素抗性变化只与重金属种类相关, 如 Cu^{2+} 的共存导致菌体的四环素抗性减弱, 敏感性从 R 变成 S, 类似的还有 Cu^{2+} 与阿莫西林及 Cr^{6+} 与头孢拉定, 而 Cu^{2+} 的共存导致菌体的红霉素抗性明显增强, 敏感性从 I 变成 R(表 3)。

表 3 重金属共存对抗生素敏感性的影响
Table 3 Effect of heavy metals on susceptibility of *Pseudomonas alcaligenes* LH7

重金属 Heavy Metals	浓度/(mg/L) Concentration	敏感性判定 Sensitivity Determination			
		红霉素 Erythromycin	阿莫西林 Amoxicillin	头孢拉定 Cephadrine	四环素 Tetracycline
Cr^{6+}	0 ^c	I	R	S	R
	0.1	R	R	S	R
	2	R	R	S	R
	20	R	R	S	R
	50	I	S	S	R
	80	S	R	S	R
Cu^{2+}	0 ^c	I	R	S	R
	0.1	R	R	I	I
	2	R	R	S	S
	10	R	R	S	S
	50	R	I	S	S
	100	R	R	S	S
Zn^{2+}	0 ^c	I	R	S	R
	0.1	R	I	S	S
	2	R	S	I	R
	10	I	S	S	R
	50	S	I	S	I
	100	S	R	S	I

c 空白

3 讨论

从养殖废水中筛选出的菌株 *Pseudomonas alcaligenes* LH7 具有重金属 (Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cr^{6+}) 抗性和抗生素 (红霉素、阿莫西林、头孢拉定、四环素) 抗性, 菌体的重金属抗性强弱顺序为 $\text{Cu}^{2+} = \text{Zn}^{2+} > \text{Cr}^{6+}$ 。Matyar 等^[23]也从海水及沉积物中分离得到具有重金属和抗生素抗性的假单胞菌, 发现菌体的重金属抗性强弱顺序为 $\text{Cu} > \text{Cd} > \text{Mn} > \text{Zn} > \text{Cr} > \text{Pb}$, 且同时对多种抗生素表现出抗性^[24]。对于菌体同时具有重金属和抗生素抗性的原因, 可能是与许多抗生素和重金属抗性基因位于相同的移动遗传元件 (MGEs), 如质粒、转座子和整合子有关^[2]。

重金属种类和浓度对菌株的抗生素抗性有很大影响 ($P < 0.05$)。重金属和抗生素的交互作用主要表现在协同抗性和协同杀菌。具有协同抗性的抗性组合有 Cu^{2+} 与红霉素, 低浓度的 Cr^{6+} 、 Zn^{2+} 与红霉素及高浓度的 Cr^{6+} 、 Zn^{2+} 与阿莫西林。孙建平^等^[18]研究了抗生素和重金属联合毒性作用下对发光细菌的影响, 发现金霉素与 $\text{Cu}(\text{II})$ 存在拮抗作用, 金霉素的抑制作用随 $\text{Cu}(\text{II})$ 浓度的增加而减小。协同抗性是指重金属抗性基因和抗生素抗性基因定位于同一个遗传元件上, 如质粒、转座子或整合子, 通过转化、质粒消除和质粒测序方法已经证明重金属和抗生素抗性基因常常定位于质粒上^[25-26]。除了基因上的联系, 重金属与抗生素之间的吸附作用、络合作用也可能是其协同抗性的原因。Jia 等^[27]研究发现重金属铜和四环素共存时, 会影响它们在土

壤上的吸附行为,四环素增加了 Cu 在两种土壤上的吸附量。Hölzel 等^[28]研究发现锌离子与四环素会形成稳定的络合物,锌离子会抑制肠道对四环素的吸收,使得瞬时肠道(及排泄的)中的四环素浓度瞬时增大。而这种螯合作用对母药的抑菌效力的影响还有待进一步研究。

而具有协同杀菌作用的抗性组合有 Cu^{2+} 与四环素或阿莫西林, Cr^{6+} 与头孢拉定,低浓度的 Zn^{2+} 与阿莫西林以及高浓度的 Cu^{2+} 与头孢拉定, Zn^{2+} 与四环素。相类似地,孙建平等研究发现金霉素与 $\text{Zn}(\text{II})$ 之间为相加作用^[18]。在重金属、外源性化合物、有机溶剂的选择压力下,细菌的抗生素抗性基因会受到影响^[29]。某些金属(例如 Ca、Co、Cr、Cu、Fe、K、Mg、Mn、Na、Ni 和 Zn)是必要的,作为微量营养素,用于氧化还原过程,以通过静电作用稳定分子,作为多种酶的组成部分和调节渗透压^[30]。有研究表明重金属会引起亚致死损伤,这可能会增加细菌对抗生素的敏感性^[28]。另外,同一交叉抗性组合在低浓度和高浓度的表现出的作用类型有所不同,可能有 3 种原因,第一,不同浓度重金属的毒性不同,低浓度的重金属可作为微量营养素刺激微生物生长,高浓度的重金属与酶或 DNA 结合,或产生氧自由基发生 Fenton 反应,表现为毒性增强,抑制微生物的生长繁殖,延长微生物的增代时间,如 0.5 mM 的 Zn^{2+} 可以抑制大肠杆菌的生长,10 mM 浓度的 Zn^{2+} 可以减少大肠杆菌的存活^[31-32]。所以,在低浓度表现为协同抗性,高浓度表现为协同杀菌。然而,某些重金属既有毒性,又有致突变性,如 Cr^{6+} 会引起细菌 DNA 码组错位突变和碱基对替换^[33],这就使得高浓度的 Cr^{6+} 与阿莫西林表现为协同抗性。第二,重金属与抗生素间的络合作用,如重金属阳离子与四环素类抗生素间的配合作用^[34],铜(II),镍(II),钴(II)与头孢拉定的氨基和羰基形成络合物^[35]。由于形成的络合物对细菌的影响还不明确,有以下 3 种可能:(1)络合物无毒性;(2)络合物低毒性;(3)络合物高毒性。四环素与 Zn^{2+} 共存时,四环素抗性随 Zn^{2+} 浓度的增大表现为先减弱后增强再减弱,可能是由于 Zn^{2+} 与四环素形成的络合物无毒或低毒,在低浓度时,以抗生素和重金属的毒性为主,在一定范围的高浓度,以络合作用后四环素或重金属的毒性为主,超过临界浓度时,则以重金属的毒性为主。第三,与抗生素的种类有关,种类不同,抗菌作用机制也不同。红霉素和四环素主要抑制蛋白质的形成,阿莫西林和头孢拉定则抑制细胞壁的合成。细菌的耐药作用可能需要某些重金属的参与,如 Zn^{2+} 与阿莫西林共存时,阿莫西林属 β -内酰胺青霉素类抗生素,产生 β -内酰胺酶是细菌耐药的重要机制之一,其中金属 β -内酰胺酶为 β -内酰胺酶中的一类,需要金属离子 Zn^{2+} 作辅因子^[36]。此外,微生物的不同发育阶段对重金属敏感性不同^[32],失活的菌体对某些重金属还具有一定的吸附作用或还原作用,如 Cr^{6+} ,有研究发现用失活的黑曲霉吸附水体中的 Cr^{6+} 时,发现吸附在菌体上的铬大部分以 Cr^{3+} 存在,说明失活菌体对在吸附 Cr^{6+} 的过程中还有较好的还原作用^[37]。因此,重金属的浓度与抗生素抗性之间有着很复杂的关系。

4 结论

(1)从养殖废水分离出的革兰氏阴性杆菌 *Pseudomonas alcaligenes* LH7 具有 3 种重金属抗性和 4 种抗生素抗性,对重金属抗性强弱顺序为 $\text{Cu}^{2+} = \text{Zn}^{2+} > \text{Cr}^{6+}$ 。

(2)重金属作用下,对菌株的抗生素抗性有显著影响。抗生素种类、重金属种类和重金属浓度、抗生素种类 $\times$ 重金属种类、抗生素种类 $\times$ 重金属浓度、重金属种类 $\times$ 重金属浓度之间的二维交互效应以及抗生素种类 $\times$ 重金属种类 $\times$ 重金属浓度之间的三维交互效应对抑菌圈直径有极为显著的影响($P < 0.05$)。重金属的加入对四环素抗性的影响最为明显,而对头孢拉定的影响最不明显。

(3)重金属和抗生素的交互作用主要表现为协同抗性和协同杀菌,浓度对交叉抗性组合的影响主要分为 3 种类型。在低浓度表现为协同抗性,高浓度表现为协同杀菌的抗性组合有 Cr^{6+} 或 Zn^{2+} 与红霉素, Cu^{2+} 与头孢拉定;在低浓度表现协同杀菌,高浓度表现为协同抗性的抗性组合有 Cr^{6+} 或 Zn^{2+} 与阿莫西林;菌体的抗生素抗性变化只与重金属种类相关的抗性组合有 Cu^{2+} 与四环素或阿莫西林或红霉素, Cr^{6+} 与头孢拉定。

参考文献 (References):

- [1] Ben W W, Qiang Z M, Pan X, Chen M X. Removal of veterinary antibiotics from sequencing batch reactor (SBR) pretreated swine wastewater by

- Fenton's reagent. *Water Research*, 2009, 43(17): 4392-4402.
- [2] Fard R M N, Heuzenroeder M W, Barton M D. Antimicrobial and heavy metal resistance in commensal enterococci isolated from pigs. *Veterinary Microbiology*, 2011, 148(2/4): 276-282.
- [3] Ji X L, Shen Q H, Liu F, Ma J, Xu G, Wang Y L, Wu M H. Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai, China. *Journal of Hazardous Materials*, 2012, 235-236: 178-185.
- [4] 单英杰, 章明奎. 不同来源畜禽粪的养分和污染物组成. *中国生态农业学报*, 2012, 20(1): 80-86.
- [5] 董占荣, 陈一定, 林咸永, 章永松, 倪丹华. 杭州市郊规模化养殖场猪粪的重金属含量及其形态. *浙江农业学报*, 2008, 20(1): 35-39.
- [6] 张树清, 张夫道, 刘秀梅, 王玉军, 邹绍文, 何绪生. 规模化养殖畜禽粪主要有毒成分测定分析研究. *植物营养与肥料学报*, 2005, 11(6): 822-829.
- [7] 黄玉溢, 刘斌, 陈桂芬, 王影. 规模化养殖场猪配合饲料和粪便中重金属含量研究. *广西农业科学*, 2007, 38(5): 544-546.
- [8] Lei T, Li P, Wang Y X, Zhu K Z. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. *Chemosphere*, 2008, 74(8): 1090-1097.
- [9] Hamscher G, Sczesny S, Höper H, Nau H. Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2002, 74(7): 1509-1518.
- [10] 何基兵, 胡安谊, 陈猛, 胡友彪, 于昌平. 九龙江河口及厦门污水处理设施抗生素抗性基因污染分析. *微生物学通报*, 2012, 39(5): 683-695.
- [11] Luo Y, Mao D Q, Rysz M, Zhou Q X, Zhang H J, Xu L, Alvarez P J J. Trends in antibiotic resistance genes occurrence in the Haihe River, China. *Environmental Science and Technology*, 2010, 44(19): 7220-7225.
- [12] 刘锋, 陶然, 应光国, 杨基峰, 张丽娟. 抗生素的环境归宿与生态效应研究进展. *生态学报*, 2010, 30(16): 4503-4511.
- [13] 张健, 关连珠, 颜丽. 鸡粪中3种四环素类抗生素在棕壤中的动态变化及原因分析. *环境科学学报*, 2011, 31(5): 1039-1044.
- [14] 陈永山, 章海波, 骆永明, 胡冠九, 赵永刚, 宋静. 典型规模化养猪场废水中兽用抗生素污染特征与去除效率研究. *环境科学学报*, 2010, 30(11): 2205-2212.
- [15] 鲍艳宇, 周启星, 万莹, 余强, 谢秀杰. 3种四环素类抗生素在褐土上的吸附和解吸. *中国环境科学*, 2010, 30(10): 1383-1388.
- [16] 鲍艳宇, 周启星, 张浩. 阳离子类型对土霉素在2种土壤中吸附-解吸影响. *环境科学*, 2009, 30(2): 551-556.
- [17] 王瑾, 韩剑众. 饲料中重金属和抗生素对土壤和蔬菜的影响. *生态与农村环境学报*, 2008, 24(4): 90-93.
- [18] 孙建平. 抗生素与重金属对猪场废水厌氧消化的抑制效应及其调控对策[D]. 杭州: 浙江大学, 2009.
- [19] Akinbowale O L, Peng H H, Grant P, Barton M D. Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2007, 30(2): 177-182.
- [20] Najiah M, Lee S W, Wendy W, Tee L W, Nadirah M, Faizah S H. Antibiotic resistance and heavy metals tolerance in Gram-Negative bacteria from diseased American bullfrog (*Rana catesbeiana*) cultured in Malaysia. *Agricultural Sciences in China*, 2009, 8(10): 1270-1275.
- [21] De Souza M J, Nair S, Bharathi P A L, Chandramohan D. Metal and antibiotic-resistance in psychrotrophic bacteria from Antarctic Marine waters. *Ecotoxicology*, 2006, 15(4): 379-384.
- [22] 杨煜东, 陈东辉, 黄满红. 环境中抗生素的来源及其生态影响研究进展. *环境科学与管理*, 2010, 35(1): 140-143.
- [23] 冀秀玲, 刘芳, 沈群辉, 刘扬. 养殖场废水中磺胺类和四环素抗生素及其抗性基因的定量检测. *生态环境学报*, 2011, 20(5): 927-933.
- [24] Matyar F, Akkan T, Uçak Y, Eraslan B. *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). *Environmental Monitoring and Assessment*, 2010, 167(1/4): 309-320.
- [25] Baker-Austin C, Wright M S, Stepanauskas R, McArthur J V. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(4): 176-182.
- [26] 季秀玲, 魏云林, 林连兵. 细菌抗生素和重金属协同选择抗性机制研究进展. *生物技术通报*, 2010, (5): 65-69.
- [27] Jia D A, Zhou D M, Wang Y J, Zhu H W, Chen J L. Adsorption and cosorption of Cu(II) and tetracycline on two soils with different characteristics. *Geoderma*, 2008, 146(1/2): 224-230.
- [28] Hölzel C S, Müller C, Harms K S, Mikolajewski S, Schäfer S, Schwaiger K, Bauer J. Heavy metals in liquid pig manure in light of bacterial antimicrobial resistance. *Environmental Research*, 2012, 113: 21-27.
- [29] Alonso A, Sánchez P, Martínez J L. Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology*, 2001, 3(1): 1-9.
- [30] Hussein H, Farag S, Kandil K, Moawad H. Tolerance and uptake of heavy metals by *Pseudomonads*. *Process Biochemistry*, 2005, 40(2): 955-961.
- [31] Matyar F, Kaya A, Dinçer S. Antibacterial agents and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey. *Science of the Total Environment*, 2008, 407(1): 279-285.
- [32] 张甲耀. 重金属对微生物的毒性效应. *环境科学*, 1983, 4(3): 71-74, 64-64.
- [33] 龚平, 孙铁珩, 李培军. 重金属对土壤微生物的生态效应. *应用生态学报*, 1997, 8(2): 218-224.
- [34] Bednorz C, Oelgeschläger K, Kinnemann B, Hartmann S, Neumann K, Pieper R, Bethe A, Semmler T, Tedin K, Schierack P, Wieler L H, Guenther S. The broader context of antibiotic resistance: Zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant *Escherichia coli* in vivo. *International Journal of Medical Microbiology*, 2013, 303(6/7): 396-403.
- [35] Shoukry M M, Shoukry E M, El-Medani S M. Metal complexes of cephradine: Synthesis and equilibrium studies. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, 1995, 126(8/9): 909-918.
- [36] 陈照强, 刘一方, 朱宁, 陈姣, 郑珩. 金属 β -内酰胺酶的研究进展. *国外医药(抗生素分册)*, 2011, 32(3): 111-115.
- [37] Park D, Yun Y S, Jo J H, Park J M. Mechanism of hexavalent chromium removal by dead fungal biomass of *Aspergillus niger*. *Water Research*, 2005, 39(4): 533-540.